

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 052**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011 E 14198318 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2905338**

54 Título: **Ratones transgénicos con un locus endógeno de inmunoglobulina lambda modificado**

30 Prioridad:

**22.06.2010 US 357314 P**  
**22.06.2010 US 357317 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.12.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 646 052 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Ratones transgénicos con un locus endógeno de inmunoglobulina lambda modificado

5 **Campo**

La invención se refiere a ratones genéticamente modificados, así como a células aisladas de, o que se pueden obtener de, los ratones y a embriones de ratón.

10 **Antecedentes**

Los ratones que expresan anticuerpos que son completamente humanos, o parcialmente humanos y parcialmente de ratón, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se ha informado de ratones transgénicos que expresan anticuerpos completamente humanos a partir de transgenes que contienen genes de la región variable de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada humana. Los ratones modificados genéticamente que comprenden un

15 remplazo de los segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de ratón endógenos (HCVR) y segmentos génicos de la región variable de cadena ligera kappa ( $\kappa$ ) (LCVR) con segmentos génicos HCVR y LCVR humanos y que componen anticuerpos quiméricos con una cadena kappa quimérica humana/de ratón también son conocidos.

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

25 anticuerpos completa o parcialmente humanos parecen estar restringidos en el uso de regiones variables lambda.

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

30 ( $V\lambda$ ).

Existe una necesidad de la técnica de ratones que expresen anticuerpos completa o parcialmente humanos, donde los ratones presenten un uso aumentado de región variable lambda ( $V\lambda$ ). El documento WO 2010/039900 se refiere a células no humanas y mamíferos genosustituídos que tienen un genoma que codifica cadenas de IgG y anticuerpos quiméricos, y a métodos para producir tales células y mamíferos genosustituídos. Se describen ratones transgénicos genosustituídos que portan ya sea el reemplazo del grupo proximal completo de ratón que comprende los segmentos génicos  $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$  con un primer BAC (sigla del inglés *bacterial artificial chromosome*, cromosoma artificial bacteriano) que comprende los segmentos génicos  $V\lambda$  y  $J\lambda$  humanos, mientras que el grupo  $\lambda$  de ratón endógeno distal que comprende  $V\lambda 2$ -  $V\lambda$ - $J\lambda 2$ -  $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ -3'LCR permanece intacto, o el reemplazo del grupo proximal completo de ratón que comprende los segmentos génicos  $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 3$  con un primer BAC que comprende los segmentos génicos  $V\lambda$ - $J\lambda$  humanos y el reemplazo del grupo distal de ratón entero que comprende los segmentos génicos  $V\lambda 2$ - $V\lambda$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ -3'LCR con un segundo BAC solapante que comprende

40 adicionalmente una Ig  $\lambda$  humana, un segmento génico constante.

45 **Sumario**

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

50

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

55

La presente invención proporciona un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico  $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$  de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de  $V\lambda 2$  a  $J\lambda 2$  del grupo génico  $V\lambda 2$ - $V\lambda 3$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$  de ratón endógeno, donde el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno comprende los segmentos

60

65 génicos  $C\lambda 2$ ,  $J\lambda 4$  y  $C\lambda 4$  endógenos.

La invención proporciona adicionalmente:

5 una célula de ratón que comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1 de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de V $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 2 del grupo génico V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón endógeno, donde el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno conserva los segmentos génicos C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4 y C $\lambda$ 4 endógenos;

10 una célula aislada de, o que se puede obtener de, el ratón de la invención, donde la célula de ratón comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1 de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de V $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 2 del grupo génico V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón endógeno, donde el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno conserva los segmentos génicos C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4 y C $\lambda$ 4 endógenos; y

15 un embrión de ratón que comprende, está creado a partir de, o se puede obtener de, una célula ES (sigla del inglés *embryonic stem*, madre embrionaria) de ratón de la invención, donde el embrión de ratón comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1 de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de V $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 2 del grupo génico V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón endógeno, donde el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno conserva los genes C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4 y C $\lambda$ 4 endógenos.

20 Se describen anticuerpos que comprenden (a) un dominio variable de cadena pesada humana (hV $\mu$ ) fusionado a una región constante de cadena pesada de ratón, y (b) un V $\lambda$  humano fusionado a un dominio C $\lambda$  de ratón; donde uno o más de los dominios variables se mutan somáticamente, por ejemplo, durante selección de anticuerpos o células inmunitarias en un ratón de la invención. El hV $\lambda$  no reordenado y hJ $\lambda$  no reordenado están unidos de forma funcional a una región constante  $\lambda$  (C $\lambda$ ) de ratón intacta.

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

El locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus  $\lambda$ .

35 El ratón carece de una secuencia variable de cadena ligera endógena en el locus de cadena ligera de ratón endógeno.

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

40 La secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  humana comprende una secuencia J $\lambda$  humana. En un aspecto, la secuencia J $\lambda$  humana se selecciona del grupo que consiste en J $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3, J $\lambda$ 7, y una combinación de los mismos.

45 En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  humana comprende un fragmento del grupo A del locus de cadena ligera humana. En un aspecto específico, el fragmento del grupo A del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana se extiende desde hV $\lambda$ 3-27 hasta hV $\lambda$ 3-1.

50 En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera  $\lambda$  humana comprende un fragmento del grupo B del locus de cadena ligera humana. En un aspecto específico, el fragmento del grupo B del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana se extiende desde hV $\lambda$ 5-52 hasta hV $\lambda$ 1-40.

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

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

60 También se describe un ratón modificado genéticamente, donde el ratón comprende un segmento génico V $\lambda$  y uno J $\lambda$  de inmunoglobulina no reordenado unido de forma funcional a un locus de cadena ligera de ratón que comprende un gen C $\lambda$  de ratón intacto.

65 Los segmentos génicos V $\lambda$  y J $\lambda$  son segmentos génicos humanos.

El locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus de cadena ligera  $\lambda$ .

- 5 En un aspecto, el ratón comprende adicionalmente un remplazo de uno o más segmentos génicos V, D y/o J de cadena pesada con uno o más segmentos génicos V, D y/o J humanos en un locus de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón endógeno.
- 10 En un aspecto, el ratón comprende un segmento génico variable de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina humana no reordenado ( $V\lambda$ ) y un segmento génico de unión  $\lambda$  ( $J\lambda$ ) en un locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón endógeno que comprende un gen  $C\lambda$  de ratón intacto.
- 15 En un aspecto, el locus génico variable de cadena ligera  $\lambda$  (el "locus  $\lambda$ ") comprende al menos un segmento génico  $hV\lambda$  y al menos un segmento génico  $J\lambda$  humano ( $hJ\lambda$ ). En otro aspecto, el locus  $\lambda$  comprende hasta cuatro segmentos génicos  $hJ\lambda$ .
- 20 En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende una pluralidad de  $hV\lambda$ . En un aspecto, la pluralidad de  $hV\lambda$  se selecciona de modo que provoque la expresión de un repertorio de región variable de cadena ligera  $\lambda$  que refleje aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, o aproximadamente el 90 %, o más del uso de  $V\lambda$  observado en un ser humano. En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende segmentos génicos  $hV\lambda$  1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21, y una combinación de los mismos.
- 25 En un aspecto, los  $hV\lambda$  incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, y 3-12. En un aspecto específico, el locus  $V\lambda$  comprende una secuencia contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana que abarca desde  $V\lambda 3-12$  a  $V\lambda 3-1$ . En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12  $hV\lambda$ . En un aspecto específico, las  $hV\lambda$  incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, y 3-12. En un aspecto específico el locus  $V\lambda$  comprende una secuencia contigua del locus  $\lambda$  humano que abarca desde  $V\lambda 3-12$  a  $V\lambda 3-1$ . En un aspecto específico, el locus  $\kappa$  endógeno está deletado en parte o completamente.
- 30 En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende de 13 a 28 o más  $hV\lambda$ . En un aspecto específico, los  $hV\lambda$  incluyen 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, y 3-27. En un aspecto específico el locus  $\kappa$  endógenos está deletado en parte o completamente.
- 35 En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende de 29 a 40  $hV\lambda$ . En un aspecto específico, toda o sustancialmente toda la secuencia entre  $hV\lambda 1-40$  y  $hV\lambda 3-29$  en el ratón modificado genéticamente consiste esencialmente en una secuencia  $\lambda$  humana de aproximadamente 959 pb encontrada en la naturaleza (por ejemplo, en la población humana) cadena abajo del segmento génico  $hV\lambda 1-40$  (cadena abajo de la parte no traducida 3'), a un sitio de enzima de restricción (por ejemplo,  $PI-SceI$ ), seguido por una secuencia  $\lambda$  humana de aproximadamente 3.431 pb cadena arriba del segmento génico  $hV\lambda 3-29$  encontrado en la naturaleza. En un aspecto específico, el locus  $\kappa$  de ratón endógeno está deletado en parte o completamente.
- 40 En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende al menos un  $hJ\lambda$ . En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende una pluralidad de  $hJ\lambda$ . En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, o 7  $hJ\lambda$ . En un aspecto específico, el locus  $V\lambda$  comprende cuatro  $hJ\lambda$ . En un aspecto específico, los cuatro  $hJ\lambda$  son  $hJ\lambda 1$ ,  $hJ\lambda 2$ ,  $hJ\lambda 3$ , y  $hJ\lambda 7$ . En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende un  $hJ\lambda$ . En un aspecto específico, el un  $hJ\lambda$  es  $hJ\lambda 1$ . En un aspecto específico, el locus  $\kappa$  endógeno está deletado en parte o completamente.
- 45 En un aspecto, el locus  $V\lambda$  comprende al menos un,  $hV\lambda$ , al menos un  $hJ\lambda$ , y un gen  $C\lambda$  de ratón intacto. En un aspecto específico, el gen  $C\lambda$  de ratón intacto es  $C\lambda 2$ .
- 50 En un aspecto, el ratón comprende un remplazo de los segmentos génicos  $V\lambda$  de ratón endógenos en el locus  $\lambda$  de ratón endógeno con uno o más segmentos génicos  $V\lambda$  humanos en el locus  $\lambda$  de ratón endógeno, donde los segmentos génicos  $hV\lambda$  están unidos de forma funcional a un gen de la región  $C\lambda$  de ratón intacto, de modo que el ratón reordene los segmentos génicos  $hV\lambda$  y exprese una cadena ligera de inmunoglobulina quimérica inversa que comprenda un dominio  $hV\lambda$  y un  $C\lambda$  de ratón. El gen  $C\lambda$  de ratón intacto es  $C\lambda 2$ . En un aspecto específico todos los segmentos génicos  $V\lambda$  de ratón endógenos se reemplazan con al menos un segmento génico  $hV\lambda$  no reordenado. En un aspecto, el remplazo es con al menos 12, al menos 28, o al menos 40 segmentos génicos  $hV\lambda$  no reordenados. En una realización, el remplazo es con al menos 7 segmentos génicos  $hV\lambda$  no reordenados funcionales, al menos 16 segmentos génicos  $hV\lambda$  no reordenados funcionales, o al menos 27 segmentos génicos  $hV\lambda$  no reordenados funcionales. En un aspecto, el ratón comprende un remplazo de todos los segmentos génicos  $J\lambda$  de ratón con al menos un segmento génico  $hJ\lambda$  no reordenado. En un aspecto, el al menos un segmento génico  $hJ\lambda$  no reordenado
- 55
- 60
- 65

5 se selecciona de J $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3, J $\lambda$ 4, J $\lambda$ 5, J $\lambda$ 6, J $\lambda$ 7, y una combinación de los mismos. En una realización específica el uno o más segmentos génicos hV $\lambda$  se seleccionan de un segmento génico hV $\lambda$  3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52, y una combinación de los mismos. En un aspecto específico, el al menos un segmento génico hJ $\lambda$  no reordenado se

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

15 En un aspecto, el locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus  $\kappa$ . En otro aspecto, el locus de cadena ligera de ratón endógeno es un locus  $\lambda$ .

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

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

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

[Eliminado]

35 En un aspecto, el ratón comprende un primer alelo de cadena ligera, que comprende un hV $\kappa$  no reordenado y un hJ $\kappa$  no reordenado, en un locus  $\kappa$  de ratón endógeno que comprende un gen C $\kappa$  endógeno intacto; y un segundo alelo de cadena ligera que comprende un hV $\lambda$  no reordenado y un hJ $\lambda$  no reordenado, en un locus  $\lambda$  de ratón endógeno que comprende un gen C $\lambda$ 2 endógeno intacto. En un aspecto específico, el primer y el segundo alelo de cadena ligera son los únicos alelos de cadena ligera funcionales del ratón modificado genéticamente.

40 En un aspecto, el ratón comprende seis alelos de inmunoglobulina, donde el primer alelo comprende un segmento génico V $\lambda$  y J $\lambda$  de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera  $\kappa$  de ratón endógeno que comprende un gen C $\kappa$  de ratón, el segundo comprende un segmento génico V $\kappa$  y J $\kappa$  de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera  $\kappa$  de ratón endógeno que comprende un gen C $\kappa$  de ratón, el tercero comprende un segmento  
45 génico V $\lambda$  y J $\lambda$  de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón endógeno que comprende un gen C $\lambda$ 2 de ratón intacto, el cuarto y quinto comprenden cada uno independientemente un segmento génico V $H$  y D $H$  y J $H$  no reordenados en un locus de cadena pesada de ratón endógeno que comprende un gen de cadena pesada de ratón, y el sexto comprende (a) un segmento génico V $\lambda$  y J $\lambda$  de inmunoglobulina no reordenado en un locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón endógeno que comprende un gen C $\lambda$  de ratón, (b) un locus  $\lambda$  que es no funcional,  
50 o (c) una deleción en la totalidad o en parte del locus  $\lambda$ .

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

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

En un aspecto, el primer alelo comprende un segmento génico hV $\lambda$  y hJ $\lambda$  no reordenado. En un aspecto, el segundo alelo comprende un segmento génico hV $\lambda$  y hJ $\lambda$  no reordenado. En un aspecto, el tercer alelo comprende un segmento génico hV $\kappa$  y hJ $\kappa$  no reordenado. En un aspecto, el cuarto y quinto comprenden cada uno independientemente un segmento génico hV<sub>H</sub> y hD<sub>H</sub> y hJ<sub>H</sub> no reordenado. En un aspecto, el sexto alelo comprende un locus  $\kappa$  de ratón endógeno que está funcionalmente silenciado.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente comprende una célula B que comprende un gen de anticuerpo reordenado que comprende un dominio hV $\lambda$  reordenado unido de forma funcional a un dominio C $\lambda$  de ratón intacto. El dominio C $\lambda$  de ratón se obtiene de un gen C $\lambda$ 2.

También se describe un ratón modificado genéticamente que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia V $\lambda$ -J $\lambda$  humana reordenada y una secuencia C $\lambda$  de ratón.

También se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera derivada de un gen hV $\lambda$ , uno hJ $\lambda$  y uno C $\lambda$  de ratón. La región C $\lambda$  es C $\lambda$ 2. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende adicionalmente una cadena pesada que comprende un dominio variable derivado de un segmento génico V humano, uno D humano y uno J humano, y un dominio constante de cadena pesada derivado de un gen de la región constante de cadena pesada de ratón. En un aspecto, el gen de la región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia bisagra CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de la región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH<sub>1</sub> bisagra-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-CH<sub>4</sub> de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de la región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-CH<sub>4</sub> de un dominio constante de cadena pesada.

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

También se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada derivado de un segmento génico de la región variable de cadena pesada humana no reordenado, donde el dominio variable de cadena pesada está fusionado a una región constante de cadena pesada (C<sub>H</sub>) de ratón; y, (b) una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera derivado de un hV $\lambda$  y un hJ $\lambda$  no reordenado, donde el dominio variable de cadena ligera está fusionado a una región C $\lambda$  de ratón intacta.

En un aspecto, el ratón comprende (i) un locus de cadena pesada que comprende un remplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J de ratón endógenos funcionales con todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J humanos funcionales, un gen C<sub>H</sub> de ratón, (ii) un primer locus de cadena ligera  $\lambda$  que comprende un remplazo de todos los segmentos génicos V $\lambda$  y J $\lambda$  de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos génicos hV $\lambda$  y hJ $\lambda$  funcionales, y un gen C $\lambda$  de ratón intacto, (iii) un segundo locus de cadena ligera  $\lambda$  que comprende un remplazo de todos los segmentos génicos V $\lambda$  y J $\lambda$  de ratón endógenos funcionales con todos, sustancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos génicos hV $\lambda$  y hJ $\lambda$  funcionales, y un gen C $\lambda$  de ratón intacto. El gen C $\lambda$  de ratón intacto es C $\lambda$ 2.

En un aspecto, el ratón comprende una delección de un gen C $\kappa$  y/o un segmento génico V $\kappa$  y/o uno J $\kappa$ . En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera  $\kappa$  no funcional.

También se describe un ratón modificado genéticamente que expresa un anticuerpo, donde más del 10 %, más del 15 %, más del 20 %, más del 25 %, más del 30 %, más del 35 %, más del 40 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, o más del 90 % del anticuerpo IgG total producido por el ratón comprende un dominio variable derivado de  $\lambda$ , y donde el ratón expresa anticuerpos que comprenden un dominio variable derivado de  $\kappa$  fusionado con una región C $\kappa$  de ratón. En aspectos específicos, aproximadamente el 15-40 %, 20-40 %, 25-40 %, 30-40 %, o 35-40 % de anticuerpo total producido por el ratón comprende un dominio variable derivado de  $\lambda$ . En un aspecto, el dominio variable derivado de  $\lambda$  se obtiene de un hV $\lambda$  y un hJ $\lambda$ . En un aspecto específico, la región variable derivada de  $\lambda$  está en una cadena ligera que comprende una región C $\lambda$  de ratón. La región C $\lambda$  es una región C $\lambda$ 2.

También se describe una construcción de ADN aislado que comprende un brazo de homología cadena arriba y un brazo de homología cadena abajo, donde los brazos de homología cadena arriba y cadena abajo dirigen la construcción a un locus  $\kappa$  de ratón, y la construcción comprende un segmento hV $\lambda$  no reordenado funcional y un segmento hJ $\lambda$  no reordenado funcional, y una secuencia de selección o marcadora.

También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir una secuencia  $\lambda$  de ratón cadena arriba de V $\lambda$ 2 de ratón, un

casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, y un brazo de direccionamiento para dirigir una secuencia  $\lambda$  de ratón 3' de J $\lambda$ 2 de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete Hyg-TK flanqueado por Frt. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4, C $\lambda$ 4 de ratón y el potenciador de ratón 2.4.

5 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus  $\lambda$  de ratón 5' con respecto a V $\lambda$ 1, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia  $\lambda$  de ratón 3' con respecto a C $\lambda$ 1 de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina flanqueado por lox. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende el potenciador 3'  $\lambda$  de ratón y el potenciador 3'  $\lambda$  de ratón 3.1.

15 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus  $\lambda$  de ratón 5' con respecto a V $\lambda$ 2, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia  $\lambda$  de ratón 3' con respecto a J $\lambda$ 2 de ratón y 5' con respecto a C $\lambda$ 2 de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de higromicina-TK flanqueado por Frt. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende los segmentos génicos C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón y el potenciador  $\lambda$  de ratón 2.4.

20 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus  $\lambda$  de ratón 5' con respecto a V $\lambda$ 2, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, un fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 3-12 cadena abajo hasta el final de hJ $\lambda$ 1, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia  $\lambda$  de ratón 3' con respecto a J $\lambda$ 2 de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina flanqueado por Frt. En un aspecto, el brazo de direccionamiento 3' comprende los segmentos génicos C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón y el potenciador  $\lambda$  de ratón 2.4.

25 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 3-12 cadena abajo hasta el final de hJ $\lambda$ 1.

30 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus  $\lambda$  de ratón 5' con respecto a V $\lambda$ 2, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa y un fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 3-27 cadena abajo hasta el final de hV $\lambda$ 2-8. En un aspecto, el casete de selección es un casete de higromicina flanqueado por Frt. En un aspecto, el fragmento genómico humano comprende un brazo de direccionamiento 3'. En un aspecto específico, el brazo de direccionamiento 3' comprende aproximadamente 53 kb del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 3-12 cadena abajo hasta el final de hV $\lambda$ 2-8.

35 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 3-27 cadena abajo hasta el final de hV $\lambda$ 3-12.

40 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus  $\lambda$  de ratón 5' con respecto a V $\lambda$ 2, un casete de selección flanqueado 5' y 3' con sitios de reconocimiento por recombinasa, un primer fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 5-52 cadena abajo hasta el final de hV $\lambda$ 1-40, un sitio para enzimas de restricción, y un segundo fragmento genómico humano que comprende una región contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 3-29 cadena abajo hasta el final de hV $\lambda$ 82K. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina flanqueado por Frt. En un aspecto, el sitio para enzimas de restricción es un sitio para una endonucleasa constitutiva. En un aspecto específico, la endonucleasa constitutiva es PI-SceI. En un aspecto, el segundo fragmento genómico humano es un brazo de direccionamiento 3'. En un aspecto específico, el brazo de direccionamiento 3' comprende aproximadamente 27 kb del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 3-29 cadena abajo hasta el final de hV $\lambda$ 82K.

45 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de cadena ligera  $\lambda$  humana desde hV $\lambda$ 5-52 cadena abajo hasta el final de hV $\lambda$ 1-40.

50 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus  $\kappa$  de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos V $\kappa$  endógenos, dos sitios de reconocimiento por recombinasa yuxtapuestos, un casete de selección 3' a los sitios de reconocimientos por recombinasa yuxtapuestos, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia  $\kappa$  de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos variables de cadena ligera  $\kappa$ . En un aspecto, los sitios de reconocimiento por recombinasa yuxtapuestos están en orientación opuesta con respecto uno del otro. En un aspecto específico, los sitios de reconocimiento por recombinasa son diferentes. En otro aspecto específico, los sitios de reconocimiento por recombinasa son un sitio loxP y un sitio lox511. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina.

- 5 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' 3' con respecto a la dirección de transcripción, un brazo de direccionamiento para dirigir el locus  $\kappa$  de ratón 5' con respecto a los segmentos génicos J $\kappa$  de ratón, un casete de selección, un sitio de reconocimiento por recombinasa 3' al casete de selección, y un brazo de direccionamiento 3' para dirigir una secuencia  $\kappa$  de ratón 3' con respecto a los segmentos génicos J $\kappa$  de ratón y 5' al potenciador intrónico  $\kappa$  de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de higromicina-TK. En un aspecto, el sitio de reconocimiento por recombinasa está en la misma dirección con respecto a la transcripción que el casete de selección. En un aspecto específico, el sitio de reconocimiento por recombinasa es un sitio *loxP*.
- 10 También se describe una construcción de ADN aislado, que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción, un primer fragmento genómico de ratón que comprende la secuencia 5' de los segmentos génicos V $\kappa$  de ratón endógenos, un primer sitio de reconocimiento por recombinasa, un segundo sitio de reconocimiento por recombinasa, y un segundo fragmento genómico de ratón que comprende la secuencia 3' de los segmentos génicos J $\kappa$  de ratón endógenos y 5' del potenciador intrónico  $\kappa$  de ratón.
- 15 También se describe un ratón modificado genéticamente, donde la modificación genética comprende una modificación con una o más de las construcciones de ADN descritas anteriormente o en este documento.
- 20 También se describe el uso de una construcción de ADN aislado para crear un ratón como se describe en este documento. También se describe el uso de una construcción de ADN aislado como se describe en este documento en un método para preparar una proteína de unión a antígeno.
- 25 También se describe una célula madre no humana que comprende un vector de direccionamiento que comprende una construcción de ADN como se ha descrito anteriormente y en este documento. También se describe una célula madre no humana, donde la célula madre no humana se obtiene de un ratón descrito en este documento.
- 30 En un aspecto, la célula madre no humana es una célula madre embrionaria (ES). En un aspecto específico, la célula ES es una célula ES de ratón.
- 35 También se describe el uso de una célula madre no humana como se describe en este documento para crear un ratón como se describe en este documento. También se describe el uso de una célula madre no humana como se describe en este documento para preparar una proteína de unión a antígeno.
- 40 También se describe un embrión de ratón, donde el embrión de ratón comprende una modificación genética como se describe en este documento. En un aspecto, se describe un embrión de ratón hospedador que comprende una célula ES donante, donde la célula ES donante comprende una modificación genética como se describe en este documento. En un aspecto, el embrión de ratón es un embrión en fase premórula. En un aspecto específico, el embrión en fase premórula es un embrión en fase de 4 células o un embrión en fase de 8 células. En otro aspecto específico, el embrión de ratón es un blastocisto.
- 45 También se describe el uso de un embrión de ratón como se describe en este documento para crear un ratón como se describe en ese documento. En un aspecto, se describe el uso de un embrión de ratón como se describe en este documento para preparar una proteína de unión a antígeno.
- 50 También se describe una célula no humana, donde la célula no humana comprende una secuencia génica de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada de un ratón modificado genéticamente como se describe en este documento. En un aspecto, la célula es una célula B. En un aspecto, la célula es un hibridoma. En un aspecto, la célula codifica un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina y/o un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que está mutado somáticamente.
- 55 También se describe una célula no humana, donde la célula no humana comprende una secuencia génica de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada de un ratón modificado genéticamente como se describe en este documento. En un aspecto, la célula es una célula B. En un aspecto, la célula es un hibridoma. En un aspecto, la célula codifica un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina y/o un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que está mutado somáticamente.
- 60 También se describe el uso de una célula no humana como se describe en este documento para crear un ratón como se describe en este documento. En un aspecto, se describe el uso de una célula no humana como se describe en este documento para preparar una proteína de unión a antígeno.

También se describe una célula B de ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende (a) una región variable derivada de un segmento génico hV $\lambda$  y un segmento génico hJ $\lambda$ ; y, (b) un gen C $\lambda$  de ratón. El gen C $\lambda$  es C $\lambda$ 2. En un aspecto, la célula B de ratón expresa adicionalmente una cadena pesada afín que comprende (c) una región variable derivada de un segmento hV $H$ , uno hD $H$ , y (d) uno hJ $H$ . En un aspecto, la célula B no comprende un gen  $\lambda$  reordenado. En otro aspecto, la célula B no comprende un gen  $\kappa$  reordenado.

También se describe un método para preparar un anticuerpo en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, donde el ratón tiene un genoma que comprende al menos un hV $\lambda$  y al menos un hJ $\lambda$  en un locus de cadena ligera endógeno, donde el locus de cadena ligera endógeno comprende un gen C $\lambda$  de ratón; (b) permitir que el ratón modificado genéticamente desarrolle una respuesta inmunitaria contra el antígeno; y, (c) aislar del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno, o aislar del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce específicamente el antígeno, donde el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un gen hV $\lambda$ , uno hJ $\lambda$  y uno C $\lambda$  de ratón.

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

El gen constante de cadena ligera  $\lambda$  es un gen C $\lambda$  de ratón intacto. El gen C $\lambda$  de ratón intacto es C $\lambda$ 2.

También se describe un método para preparar un gen de anticuerpo reordenado en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, donde la modificación genética comprende un hV $\lambda$  y un hJ $\lambda$  en un locus de cadena ligera endógeno, donde el locus de cadena ligera endógeno comprende un gen C $\lambda$  de ratón intacto; y, (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, donde el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento génico de región variable de cadena ligera  $\lambda$  y un gen C $\lambda$ 2 o fragmento funcional del mismo.

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

En un aspecto, se describe un método para preparar un gen de anticuerpo reordenado en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, donde la modificación genética comprende un hV $\lambda$  y un hJ $\lambda$  en un locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón, donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  comprende un gen C $\lambda$ 2 de ratón intacto; y, (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, donde el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento génico de región variable de cadena ligera  $\lambda$  y un gen C $\lambda$ 2.

El gen constante de cadena ligera  $\lambda$  es un gen C $\lambda$ 2 de ratón intacto.

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

También se describe un método para preparar un anticuerpo, que comprende exponer un ratón como se describe en este documento a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende crear un anticuerpo que se una específicamente al antígeno, identificar una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifique la cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico en el ratón que codifique una secuencia del dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, donde el anticuerpo se une específicamente al antígeno, y emplear las secuencias de ácido nucleico de los dominios variables de cadena pesada y ligera fusionados a dominios constantes humanos para crear un anticuerpo deseado, donde el anticuerpo deseado comprende una cadena ligera que comprende un dominio V $\lambda$  fusionado a un dominio C $L$ . El dominio V $\lambda$  es humano y el dominio C $L$  es un dominio C $\lambda$ 2 de ratón.

En un aspecto, se describe un método para preparar un anticuerpo que comprende exponer un ratón como se describe en ese documento a un antígeno, permitir que el ratón monte una respuesta inmunitaria que comprende

crear un anticuerpo que se une específicamente al antígeno, identificar una secuencia de ácido nucleico reordenada en el ratón que codifique un dominio variable de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico reordenada que codifique una secuencia de dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, donde el anticuerpo se une específicamente al antígeno, y emplear las secuencias de ácido nucleico fusionadas a secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio constante de cadena pesada humana y un dominio constante de cadena ligera humana para crear un anticuerpo derivado de secuencias humanas, donde el anticuerpo que se une específicamente al antígeno comprende una cadena ligera que comprende un dominio V $\lambda$  humano fusionado a una región C $\lambda$  de ratón.

La región C $\lambda$  de ratón es C $\lambda$ 2.

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

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

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

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

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

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

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

emplear en la preparación de una proteína de unión a antígeno que se une al antígeno.

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

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

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

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

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

### Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). El panel inferior muestra diagramas de contorno de esplenocitos sincronizados con CD19<sup>+</sup> y teñidos para la expresión de Igλ<sup>+</sup> e Igκ<sup>+</sup> a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

La **Fig. 9B** muestra la cantidad total de células B CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>Igκ<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>Igλ<sup>+</sup> en bazos recogidos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

La **Fig. 9C** muestra diagramas de contorno de esplenocitos sincronizados con CD19<sup>+</sup> y teñidos para inmunoglobulina D (IgD) e inmunoglobulina M (IgM) de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigótico para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). Se aprecian células B maduras (72 para WT, 51 para 40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ) y transicionales (13 para WT, 22 para 40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ) en cada uno de los diagramas de contorno.

La **Fig. 9D** muestra la cantidad total de células B CD19<sup>+</sup>, células B transicionales (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>lo</sup>) y células B maduras (CD19<sup>+</sup>IgM<sup>lo</sup>IgD<sup>hi</sup>) en bazos recogidos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y cuatro Jλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

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

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

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

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

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

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

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

La **Fig. 13** muestra una alineación de secuencia de nucleótidos de la unión Vλ-Jλ-Cλ de tres clones de RT-PCR independientes amplificados a partir de ARN de esplenocitos de ratones que albergan secuencias génicas de cadena ligera λ humana en un locus de cadena ligera λ de ratón endógeno. 2D1 = SEQ ID NO: 101; 2D9 = SEQ ID NO: 102; 3E15 = SEQ ID NO: 103. Las bases en letra minúscula indican bases no de la línea germinal resultantes de mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los aminoácidos consenso dentro de la región flanqueante 4 (FWR4) codificada por la secuencia de nucleótidos de hJλ1 y Cλ2 de ratón se indican en la parte inferior de la alineación de secuencia.

#### Descripción detallada

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Ratones que expresan dominios variables $\lambda$ humanos**

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

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

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

El locus de cadena ligera  $\lambda$  en seres humanos es similar en estructura al locus  $\kappa$  tanto de ratones como de seres humanos porque el locus de cadena ligera  $\lambda$  humano tiene varios segmentos génicos de región variable que son capaces de recombinarse para formar una proteína de cadena ligera funcional. El locus de cadena ligera  $\lambda$  humano

contiene aproximadamente 70 segmentos génicos V y 7 pares de segmentos génicos J $\lambda$ -C $\lambda$ . Solamente cuatro de estos pares de segmentos génicos J $\lambda$ -C $\lambda$  parecen ser funcionales. En algunos alelos, un quinto par de segmentos génicos J $\lambda$ -C $\lambda$  es supuestamente un pseudogén (C $\lambda$ 6). Los 70 segmentos génicos V $\lambda$  parecen contener 38 segmentos génicos funcionales. Las 70 secuencias V $\lambda$  están ordenadas en tres grupos, todos los cuales contienen

5 diferentes miembros de distintos grupos de la familia génica V (grupos A, B y C; FIG. 1). Esta es una fuente potencialmente rica de diversidad relativamente inexplorada para generar anticuerpos con regiones V humanas en animales no humanos.

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

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

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

25 Explotar la rica diversidad del locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón en ratones probablemente produciría, entre otras cosas, una fuente para un repertorio humano más completo de dominios V de cadena ligera. Intentos previos por aprovechar esta diversidad usaron transgenes humanos que contenían porciones del locus de cadena ligera  $\lambda$  humano incorporados aleatoriamente en el genoma de ratón (véase, por ejemplo, el documento US 6.998.514 y el documento US 7.435.871). Ratones que contienen estos transgenes integrados aleatoriamente expresan

30 supuestamente cadenas ligeras  $\lambda$  completamente humanas, sin embargo, en algunos casos, uno o ambos loci de cadena ligera endógenos permanecen intactos. Esta situación no es deseable ya que las secuencias de cadena ligera  $\lambda$  humanas compiten con la cadena ligera de ratón ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) en el repertorio expresado de anticuerpos del ratón.

35 En contraste, los inventores describen ratones modificados genéticamente que son capaces de expresar una o más secuencias de ácido nucleico de cadena ligera  $\lambda$  directamente a partir de un locus de cadena ligera de ratón  $\lambda$  endógeno. Los ratones modificados genéticamente capaces de expresar secuencias de cadena ligera  $\lambda$  humana a partir de un locus  $\lambda$  endógeno pueden cruzarse adicionalmente con ratones que comprenden un locus de cadena pesada humana y por tanto usarse para expresar anticuerpos que comprenden regiones V (pesada y ligera  $\lambda$ ) que son completamente humanas. Las regiones V se expresan con regiones constantes de ratón. En diversos aspectos,

40 no hay segmentos génicos de inmunoglobulina de ratón endógenos presentes y las regiones V se expresan con las regiones constantes humanas. Estos anticuerpos demostrarían ser útiles en numerosas aplicaciones, tanto de diagnóstico así como terapéuticas.

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

50 contexto de regiones C $\lambda$  o C $\kappa$ .

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

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

60 Se describen diversos enfoques para generar ratones modificados genéticamente que creen anticuerpos que contengan una cadena ligera que tenga un dominio V $\lambda$  humano fusionado a una región C $\lambda$  endógena. Se describen modificaciones genéticas que, en diversos aspectos, comprenden una delección de uno o ambos loci de cadena ligera endógenos. Por ejemplo, para eliminar cadenas ligeras  $\lambda$  de ratón del repertorio endógeno de anticuerpos

65 puede hacerse una delección de un primer grupo génico V $\lambda$ -J $\lambda$ -C $\lambda$  y remplazo, en su totalidad o en parte, de los segmentos génicos V $\lambda$ -J $\lambda$  de un segundo grupo génico con segmentos génicos V $\lambda$ -J $\lambda$  humanos. También se

describen embriones de ratón modificados genéticamente, células, y construcciones de direccionamiento para generar los ratones, embriones de ratón, y células.

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

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

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

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

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

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

65 Los enfoques anteriores para insertar segmentos génicos de cadena ligera  $\lambda$  humana en el locus  $\lambda$  de ratón,  
 mantienen los potenciadores posicionados cadena abajo de los segmentos génicos C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 (denominados Enh

2.4, Enh y Enh 3.1, FIG. 4A y FIG. 5A). Este enfoque produce un único alelo modificado en el locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón endógeno (FIG. 7A).

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

También se describe un segundo enfoque donde pueden posicionarse segmentos génicos de cadena ligera  $\lambda$  humana en el locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno. La modificación genética, en diversos aspectos, comprende una delección del locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno. Por ejemplo, para eliminar cadenas ligeras  $\kappa$  de ratón del repertorio endógeno de anticuerpos, puede hacerse una delección de los segmentos génicos  $V\kappa$  y  $J\kappa$  de ratón. También se describen embriones de ratón modificados genéticamente, células, y construcciones de direccionamiento para generar los ratones, embriones de ratón, y células.

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

Por tanto, un segundo enfoque posiciona uno o más segmentos génicos  $V\lambda$  humanos en el locus de cadena ligera  $\kappa$  de ratón contiguo con un segmento génico  $J\lambda$  humano único (vector de direccionamiento 12/1- $\kappa$ , FIG. 4B). Pueden hacerse modificaciones a este enfoque y añadir segmentos génicos y/o secuencias reguladoras para optimizar el uso de las secuencias de cadena ligera  $\lambda$  humanas desde el locus  $\kappa$  de ratón dentro del repertorio de anticuerpos de ratón.

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

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

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

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

#### **Anticuerpos de dominio lambda a partir de ratones modificados genéticamente**

Ratones que comprenden secuencias  $\lambda$  humanas en el locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón expresada en una cadena ligera que comprende una región  $hV\lambda$  fusionada a una región  $C\lambda$  de ratón. Estos se cruzan ventajosamente con ratones que (a) comprenden un locus de cadena ligera funcionalmente silenciado (por ejemplo, una eliminación del locus de cadena ligera  $\kappa$  o  $\lambda$  de ratón endógeno); (b) comprenden un locus de cadena ligera  $\lambda$  de ratón endógeno

que comprende segmentos génicos hV y hJ unidos de forma funcional a un gen Cλ de ratón endógeno; (c) comprenden un locus de cadena ligera κ de ratón endógeno que comprende segmentos génicos hVκ y hJκ unidos de forma funcional a un gen Cκ de ratón endógeno; y, (d) un ratón en que un alelo κ comprende hVκ y hJκ; comprendiendo el otro alelo κ hVλ y hJλ; comprendiendo un alelo λ hVλ y hJλ y un alelo λ silenciado o eliminado, o comprendiendo ambos alelos λ hVλ y hJλ; y, dos alelos de cadena pesada que comprenden cada uno hV<sub>H</sub>, hD<sub>H</sub>, y hJ<sub>H</sub>.

Los anticuerpos que comprenden los dominios hVλ expresados en el contexto de Cλ se usan para generar anticuerpos completamente humanos por clonación de los ácidos nucleicos que codifican los dominios hVλ en construcciones de expresión que albergan genes que codifican Cλ humano. Las construcciones de expresión resultantes se transfectan en células hospedadoras adecuadas para expresar anticuerpo que presenta un dominio hVλ completo fusionado a hCλ.

### Ejemplos

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

#### Ejemplo I

##### Delección de los loci de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón

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

**Delección del locus de cadena ligera λ de ratón.** Se modificó ADN del clon BAC de ratón RP23-135k15 (Invitrogen) por recombinación homóloga para inactivar el locus de cadena ligera λ de ratón endógeno a través de delección dirigida de los grupos génicos Vλ-Jλ-Cλ (Fig. 2)

En resumen, se delecionó el grupo proximal completo que comprende los segmentos génicos Vλ1-Jλ3-Cλ3-Jλ1-Cλ1 en un único evento de direccionamiento usando un vector de direccionamiento que comprende un casete de neomicina flanqueado por sitios *loxP* con un brazo de homología de ratón 5' que contenía la secuencia 5' del segmento génico Vλ1 y un brazo de homología de ratón 3' que contenía la secuencia 3' del segmento génico Cλ1 (Fig. 2, vector de direccionamiento 1).

Se preparó una segunda construcción de direccionamiento para delecionar de forma precisa el grupo génico λ de ratón endógeno distal que contenía Vλ2-Jλ2-Cλ2-Jλ4-Cλ4 excepto que la construcción de direccionamiento contenía un brazo de homología de ratón 5' que contenía la secuencia 5' del segmento génico Vλ2 y un brazo de homología de ratón 3' que contenía la secuencia 5' al segmento génico Cλ2 endógeno (Fig. 2, vector de direccionamiento 2). Por tanto, la segunda construcción de direccionamiento delecionaba de forma precisa Vλ2-Jλ2, dejando al mismo tiempo Cλ2-Jλ4-Cλ4 intacto en el locus λ de ratón endógeno. Se confirmaron células ES que contenían un locus λ endógeno inactivado (como se ha descrito anteriormente) por métodos de cariotipado y exploración (por ejemplo, TAQMAN®) conocidos en la técnica. Después se aisló el ADN de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con recombinasa CRE mediando de ese modo la delección del casete de direccionamiento proximal que contenía el gen marcador de neomicina, dejando solamente un único sitio *loxP* en el punto de delección (Fig. 2, parte inferior).

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

En resumen, se delecionaron los segmentos génicos Jκ (1-5) del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno en un único evento de direccionamiento usando un vector de direccionamiento que comprendía un casete de higromicina-timidina quinasa (*hyg*-TK) que contenía un único sitio *loxP* 3' al casete *hyg*-TK (Fig. 3, vector de direccionamiento de Jκ). Los brazos de homología usados para preparar este vector de direccionamiento contenían la secuencia genómica de ratón 5' y 3' de los segmentos génicos Jκ de ratón endógenos. En un segundo evento de direccionamiento, se preparó un segundo vector de direccionamiento para delecionar una parte de la secuencia genómica de ratón cadena arriba (5') al segmento génico Vκ de ratón endógeno más distal (Fig. 3, vector de direccionamiento de Vκ). Este vector de direccionamiento contenía un sitio *lox511* invertido, un sitio *loxP* y un casete de neomicina. Los brazos de homología usados para preparar este vector de direccionamiento, contenían la secuencia genómica de ratón cadena arriba del segmento génico Vκ de ratón más distal. Los vectores de direccionamiento se usaron de un modo secuencial (es decir, Jκ después Vκ) para direccionar el ADN en células ES.

Se confirmaron ES que albergaban un cromosoma doblemente abordado (es decir, un único locus  $\kappa$  de ratón endógeno abordado con ambos vectores de direccionamiento) por métodos de cariotipado y exploración (por ejemplo, Taqman™) conocidos en la técnica. Después se aisló el ADN de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con recombinasa Cre mediando de ese modo la delección de los segmentos génicos  $V\kappa$  de ratón endógenos y ambos casetes de selección, dejando al mismo tiempo dos sitios *lox* yuxtapuestos en orientación opuesta uno con relación al otro (Fig. 3, parte inferior; SEQ ID NO: 1).

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

## Ejemplo II

### Remplazo de loci de cadena ligera de ratón con un minilocus de cadena ligera $\lambda$ humana

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

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

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

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

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

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

La recombinación homóloga con cualquiera de estos dos vectores de direccionamiento iniciales creó un locus de cadena ligera de ratón modificado ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) que contenía 12 segmentos génicos  $hV\lambda$  y un segmento génico  $hJ\lambda 1$  unido

de forma funcional al gen constante de cadena ligera de ratón endógeno y los potenciadores (Ck o C $\lambda$ 2 y Eki/Ek3' o Enh 2.4/Enh 3.1) que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera  $\lambda$  quimérica.

**Un minilocus  $\lambda$  humano con 12 segmentos génicos V $\lambda$  humanos y cuatro J $\lambda$  humanos.** En otro enfoque para añadir diversidad a un locus de cadena ligera  $\lambda$  quimérico, se diseñó un tercer vector de direccionamiento inicial para insertar los doce primeros segmentos génicos V $\lambda$  humanos consecutivos del grupo A y los segmentos génicos hJ $\lambda$ 1, 2, 3 y 7 en el locus de cadena ligera  $\kappa$  de ratón (Fig. 4B, vector de direccionamiento 12/4- $\kappa$ ). Se preparó un segmento de ADN que contenía los segmentos génicos hJ $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3 y J $\lambda$ 7 por síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies) incluyendo cada segmento génico J $\lambda$  y la secuencia genómica humana de ~100 pb de las regiones 5' y 3' inmediatas de cada segmento génico J $\lambda$ . Se diseñó un sitio PI-SceI en el extremo 3' de este fragmento de ADN de ~1 kb y se ligó a un casete de cloranfenicol. Los brazos de homología se amplificaron por PCR a partir de la secuencia  $\lambda$  humana en las posiciones 5' y 3' respecto al segmento génico hJ $\lambda$ 1 del clon BAC humano 729g4. Se realizó recombinación homóloga con este vector de direccionamiento intermedio sobre un clon BAC 729g4 modificado que se había abordado previamente cadena arriba (5') del segmento génico V $\lambda$ 3-12 humano con un casete de neomicina flanqueado por sitios Frt, que también contenía un sitio I-Ceul 5' al sitio Frt 5'. El clon BAC 729g4 doblemente abordado incluía de 5' a 3' un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', un fragmento de ~123 kb que contenía los 12 primeros segmentos génicos hV $\lambda$ , un fragmento de ~1 kb que contenía los segmentos génicos J $\lambda$ 1, 2, 3 y 7 humanos, un sitio PI-SceI, y un casete de cloranfenicol. Este vector de direccionamiento intermedio se digirió junto con I-Ceul y PI-SceI y posteriormente se ligó en el clon BAC de ratón modificado (descrito anteriormente) para crear el tercer vector de direccionamiento.

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

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

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

En resumen, el clon BAC 2366j12 es de aproximadamente 132 kb de tamaño y contiene los segmentos génicos hV $\kappa$  1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, la secuencia genómica  $\kappa$  humana cadena abajo de los segmentos génicos V $\kappa$ , los segmentos génicos hJ $\kappa$ 1-5, el hCk y aproximadamente 20 kb de secuencia genómica adicional del locus  $\kappa$  humano. Este clon primero se abordó con un vector de direccionamiento que contenía un casete de higromicina flanqueado por sitios Frt y un sitio NotI cadena abajo (3') del sitio Frt 3'. Los brazos de homología para este vector de direccionamiento contenían la secuencia genómica humana 5' y 3' de los segmentos génicos V $\kappa$  dentro del clon BAC de modo que, tras recombinación homóloga con este vector de direccionamiento, se delecionaran los segmentos génicos V $\kappa$  y se diseñó un sitio NotI ~133 pb cadena abajo del segmento génico hV $\kappa$ 4-1 (Fig. 6, superior derecha). Este clon BAC 2366j12 modificado se abordó independientemente con dos vectores de direccionamiento en el extremo 3' para delecionar los segmentos génicos hJ $\kappa$  con un casete de cloranfenicol que también contenía un segmento génico hJ $\lambda$ 1, un sitio PI-SceI y un sitio AsiSI o un fragmento genómico  $\lambda$  humano que contenía cuatro segmentos génicos hJ $\lambda$  (*supra*), un sitio PI-SceI y un sitio AsiSI (Fig. 6, superior derecha). Los brazos de homología

para estos dos vectores de direccionamiento similares contenían la secuencia 5' y 3' de los segmentos génicos hJk. La recombinación homóloga con estos segundos vectores de direccionamiento y el clon BAC 2366j12 modificado produjo un clon 2366j12 doblemente abordado que incluía, de 5' a 3', un sitio Frt 5', un casete de higromicina, un sitio Frt 3', un sitio NotI, un fragmento genómico de 22.800 pb del locus  $\kappa$  humano que contenía la región intergénica entre los segmentos génicos V $\kappa$ 4-1 y J $\kappa$ 1, un segmento génico hJ $\lambda$ 1 o un fragmento genómico  $\lambda$  humano que contenía hJ $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3 y J $\lambda$ 7, un sitio PI-Scel y un casete de cloranfenicol (Fig. 6, superior derecha). Se consiguieron dos vectores de direccionamiento finales para hacer las dos modificaciones adicionales mediante dos etapas de ligamiento usando los clones doblemente abordados 729g4 y 2366j12.

Se digirieron los clones 729g4 y 2366j12 doblemente abordados con NotI y AsiSI produciendo un fragmento que contenía el casete de neomicina y los segmentos génicos hV $\lambda$  y otro fragmento que contenía el fragmento genómico de ~23 kb del locus  $\kappa$  humano que contenía la región intergénica entre los segmentos génicos V $\kappa$ 4-1 y J $\kappa$ 1, un segmento génico hJ $\lambda$ 1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos hJ $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3 y J $\lambda$ 7, el sitio PI-Scel y el casete de cloranfenicol respectivamente. El ligamiento de estos fragmentos generó dos clones BAC únicos que contenían de 5' a 3' los segmentos génicos hV $\lambda$ , la secuencia genómica  $\kappa$  humana entre los segmentos génicos V $\kappa$ 4-1 y J $\kappa$ 1, un segmento génico hJ $\lambda$ 1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos hJ $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3 y J $\lambda$ 7, un sitio PI-Scel y un casete de cloranfenicol (Fig. 6, parte inferior). Estos nuevos clones BAC después se digirieron con I-Ceul y PI-Scel para liberar los fragmentos únicos que contenían el casete de neomicina cadena arriba y las secuencias  $\lambda$  y  $\kappa$  humanas contiguas y se ligaron en un clon BAC de ratón modificado 302g12 que contenía de 5' a 3' la secuencia genómica de ratón 5' del locus  $\kappa$  endógeno, un sitio I-Ceul, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3', los segmentos génicos hV $\lambda$  (3-12 a 3-1), un sitio NotI ~200 pb cadena abajo de V $\lambda$ 3-1, -23 kb de la secuencia  $\kappa$  humana encontrada de forma natural entre los segmentos génicos V $\kappa$ 4-1 y J $\kappa$ 1 humanos, un segmento génico hJ $\lambda$ 1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos génicos hJ $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3 y J $\lambda$ 7, el E $\kappa$ i de ratón, el gen C $\kappa$  de ratón y E $\kappa$ 3' (Fig. 4, vectores de direccionamiento 12hV $\lambda$ -V $\kappa$ J $\kappa$ -hJ $\lambda$ 1 y 12hV $\lambda$ -V $\kappa$ J $\kappa$ -4hJ $\lambda$ ). La recombinación homóloga con estos dos vectores de direccionamiento creó dos loci de cadena ligera  $\kappa$  de ratón modificados diferentes que contenían 12 segmentos génicos hV $\lambda$ , la secuencia genómica  $\kappa$  humana, y uno o cuatro segmentos génicos hJ $\lambda$  unidos de forma funcional al gen C $\kappa$  de ratón endógeno que, tras recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica  $\lambda$  humana/ $\kappa$  de ratón.

### 30 Ejemplo III

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

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

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

En resumen, se diseñaron dos vectores de direccionamiento para la introducción de 16 segmentos génicos hV $\lambda$  adicionales en los loci de cadena ligera de ratón modificados descritos en el Ejemplo 2 (FIG. 5A y 5B, vector de direccionamiento +16- $\lambda$  o +16- $\kappa$ ). Se diseñó un fragmento de ADN de ~172 kb del clon BAC humano RP11-76113 (Invitrogen) que contenía 21 segmentos génicos hV $\lambda$  consecutivos del grupo A con un brazo de homología 5' que contenía la secuencia genómica de ratón 5' a cualquiera de los loci de cadena ligera  $\kappa$  o  $\lambda$  endógenos y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia  $\lambda$  genómica humana. Los brazos de homología  $\kappa$  o  $\lambda$  de ratón 5' usados en estas construcciones de direccionamiento eran los mismos brazos de homología 5' descritos en el Ejemplo 2 (FIG. 5A y 5B). El brazo de homología 3' incluía un solapamiento de 53.057 pb de la secuencia  $\lambda$  genómica humana correspondiente al extremo 5' equivalente del fragmento de aproximadamente ~123 kb de la secuencia  $\lambda$  genómica humana descrita en el Ejemplo 2. Estos dos vectores de direccionamiento incluían, de 5' a 3', un brazo de homología de ratón 5' que contenía ~23 kb de la secuencia genómica 5' del locus de cadena ligera  $\kappa$  de ratón endógeno o ~24 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera  $\lambda$  endógeno, un sitio Frt 5', un casete de higromicina, un sitio Frt 3' y 171.457 pb de la secuencia  $\lambda$  genómica humana que contenía 21 segmentos génicos hV $\lambda$  consecutivos, ~53 kb de los cuales solapan con el extremo 5' de la secuencia  $\lambda$  humana descrita en el Ejemplo 3 y sirve como brazo de homología 3' para esta construcción de direccionamiento (FIG. 5A y 5B, vectores de direccionamiento +16- $\lambda$  o +16- $\kappa$ ). La recombinación homóloga con estos vectores de direccionamiento creó loci de cadena ligera  $\kappa$  y  $\lambda$  de ratón modificados independientemente que contenían cada uno 28 segmentos génicos hV $\lambda$  y un segmento génico hJ $\lambda$ 1 unidos de forma funcional a genes constantes de ratón endógenos (C $\kappa$  o C $\lambda$ 2) que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica.

De un modo similar, también se usó el vector de direccionamiento +16- $\kappa$  para introducir los 16 segmentos génicos

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

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

En resumen, se diseñó un vector de direccionamiento para la introducción de 12 segmentos génicos hV $\lambda$  adicionales a los loci de cadena ligera  $\kappa$  y  $\lambda$  de ratón modificados descritos anteriormente (FIG. 5A y 5B, vectores de direccionamiento +12- $\lambda$  o +12- $\kappa$ ). Se diseñó un fragmento de ADN de 93.674 pb del clon BAC humano RP11-22118 (Invitrogen) que contenía 12 segmentos génicos hV $\lambda$  consecutivos del grupo B con un brazo de homología 5' que contenía la secuencia genómica de ratón 5' a cualquiera de los loci de cadena ligera  $\kappa$  o  $\lambda$  de ratón endógenos y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia  $\lambda$  genómica humana. Los brazos de homología 5' usados en esta construcción de direccionamiento eran los mismos brazos de homología 5' usados para la adición de 16 segmentos génicos hV $\lambda$  descritos anteriormente (FIG. 5A y 5B). El brazo de homología 3' se preparó diseñando un sitio PI-SceI ~3431 pb 5' al segmento génico V $\lambda$ 3-29P humano contenido en un fragmento genómico de 27.468 pb de la secuencia  $\lambda$  humana del clon BAC RP11-761113. Este sitio PI-SceI sirvió como punto de ligamiento para unir el fragmento de ~94 kb de la secuencia  $\lambda$  humana adicional al fragmento de ~27 kb de la secuencia  $\lambda$  humana que solapa con el extremo 5' de la secuencia  $\lambda$  humana en la modificación previa usando los vectores de direccionamiento +16- $\lambda$  o +16- $\kappa$  (FIG. 5A y 5B). Estos dos vectores de direccionamiento incluían, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contenía ~23 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno o ~24 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus de cadena ligera  $\lambda$  endógeno, un sitio Frt 5', un casete de neomicina, un sitio Frt 3' y 121.188 pb de la secuencia  $\lambda$  genómica humana que contenía 16 segmentos génicos hV $\lambda$  y un sitio PI-SceI, ~27 kb de los cuales solapan con el extremo 5' de la secuencia  $\lambda$  humana desde la inserción de 16 segmentos génicos hV $\lambda$  adicionales y sirve como brazo de homología 3' para esta construcción de direccionamiento (FIG. 5A y 5B, vectores de direccionamiento +12- $\lambda$  o +12- $\kappa$ ). La recombinación homóloga con estos vectores de direccionamiento creó independientemente loci de cadena ligera  $\kappa$  y  $\lambda$  de ratón modificados que contenían 40 segmentos génicos hV $\lambda$  y J $\lambda$ 1 humano unido de forma funcional a los genes constantes de ratón endógenos (C $\kappa$  o C $\lambda$ 2) que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica (parte inferior de la FIG. 5A y 5B).

De un modo similar, también se usó el vector de direccionamiento +12 $\kappa$  para introducir los 12 segmentos génicos hV $\lambda$  adicionales a las otras modificaciones iniciales que incorporaban múltiples segmentos génicos hJ $\lambda$  con y sin una secuencia  $\kappa$  humana integrada (FIG. 4B). La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento en el locus  $\kappa$  de ratón endógeno que contenía las otras modificaciones creó un locus de cadena ligera  $\kappa$  de ratón que contenía 40 segmentos génicos hV $\lambda$  y los segmentos génicos hJ $\lambda$ 1, 2, 3 y 7 con y sin una secuencia genómica V $\kappa$ -J $\kappa$  humana unida de forma funcional al gen C $\kappa$  de ratón endógeno que, tras la recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera  $\lambda$ - $\kappa$  quimérica.

#### **Ejemplo IV**

##### **Identificación de células ES abordadas que albergan segmentos génicos de cadena ligera $\lambda$ humana**

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

Las células ES que albergan los segmentos génicos de cadena ligera  $\lambda$  humana se transfectan opcionalmente con una construcción que expresa FLP para retirar el casete de neomicina flanqueado por Frt introducido mediante la inserción de la construcción de direccionamiento que contiene los segmentos génicos V $\lambda$ 5-52 - V $\lambda$ 1-40 humanos (FIG. 5A y 5B). El casete de neomicina puede retirarse opcionalmente cruzándolos con ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se retiene en los

ratones.

Tabla 1

Cebador	SEQ ID NO:	Sonda	SEQ ID NO:
hL2F	2	hL2P	24
hL2R	3		
hL3F	4	hL3P	25
hL3R	5		
NeoF	6	NeoP	26
NeoR	7		
61hJ1F	8	61hJ1P	27
61hJ1R	9		
67hT1F	10	67hT1P	28
67hT1R	11		
67hT3F	12	67hT3P	29
67hT3R	13		
HygF	14	HygP	30
HygR	15		
MKD2F	16	MKD2P	31
MKD2R	17		
MKP8F	18	MKP8P	32
MKP8R	19		
MKP15F	20	MKP15P	33
MKP15R	21		
MK20F	22	-	-
MKP4R	23		
68h2F	34	68h2P	38
68h2R	35		
68h5F	36	68h5P	39
68h5R	37		
mL1F	75	mL1P	83
mL1R	76		
mL2F	77	mL2P	84
mL2R	78		
mL11F	79	mL11P	85
mL11R	80		
mL12F	81	mL12P	86
mL12R	82		

5

Tabla 2

Modificación	Ensayo	Conjunto de cebadores directo/inverso	Sonda	Localización de secuencia	
Inserción de 12 hVλ y hJλ 1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12-hVλ3-1	
		hL3F/hL3R	hL3P		
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	secuencia hJλ	
		NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina	
	LOA	MK20F/MKP4R		-	Secuencia <i>lox511/loxP</i> de locus κ inactivado
			HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina de locus λ inactivado
		mL1F/mL1R	mL1P	Grupo Vλ1-Cλ1 de ratón	
		mL2F/mL2R	mL2P		
		mL11F/mL11R	mL11P	Grupo Vλ2-Cλ2 de ratón	
		mL12F/mL12R	mL12P		
AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 5'		
	MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en el locus Vκ 3'		
Inserción de 16 hVλ	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 - hVλ3-12	
		67hT3F/67hT3R	67hT3P		
		HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina	
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina	
		mL1F/mL1R	mL1P	Grupo Vλ1-Cλ1 de ratón	
		mL2F/mL2R	mL2P		
		mL11F/mL11R	mL11P	Grupo Vλ2-Cλ2 de ratón	

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

### Ejemplo V

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

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

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

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

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

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

45 En resumen, se sacrificaron dos grupos (N=3 cada uno, 9-12 semanas de edad, machos y hembras) de ratones de tipo silvestre y homocigóticos para 40 segmentos génicos hVλ y 4 hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma funcional al gen Cκ de ratón y se recogieron los bazos y la médula ósea. La médula ósea se

recogió de los fémures por lavado abundante con medio RPMI completo (medio RPMI suplementado con suero de ternera fetal, piruvato sódico, Hepes, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales, y gentamicina). Se lisaron las RBC de preparaciones de bazo y médula ósea con tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville), seguido por lavado con medio RPMI completo. Se incubaron  $1 \times 10^6$  células con anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón (2.4G2, BD Biosciences) en hielo durante 10 minutos, seguido por marcaje con un panel de anticuerpos seleccionados durante 30 minutos en hielo.

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

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

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

**Tabla 3**

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

**Tabla 4**

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

**Tabla 5**

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

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

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

Se realizó RT-PCR sobre el ARN de esplenocitos usando cebadores específicos para los segmentos génicos hVλ

humanos y el gen Ck de ratón (Tabla 6). Los productos de PCR se purificaron del gel y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) y se secuenciaron con los cebadores M13 directo (GTAAAACGACGGCCAG; SEQ ID NO: 55) y M13 inverso (CAGGAAACAGCTATGAC; SEQ ID NO: 56) localizados dentro del vector en localizaciones que flanquean el sitio de clonación. Se secuenciaron ochenta y cuatro clones totales derivados de la primera y tercera inserción de secuencias  $\lambda$  humanas para determinar el uso del gen hV $\lambda$  (Tabla 7). La secuencia de nucleótidos de la unión hV $\lambda$ -hJ $\lambda$ 1-mCk para clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIG. 11.

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

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

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

Tabla 6

Cebador de hV $\lambda$ 5'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	40
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	41
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSCTCTCC	44
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	45
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL-6	TCACCATGGC CTGGCTCCA CTACTT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL-11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53
Cebador de Ck de ratón 3'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
mIgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

Tabla 7

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

Tabla 8

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

5 La FIG. 11 muestra la secuencia de la unión hVλ-hJλ1-mCκ para clones de RT-PCR de ratones que albergan una primera y tercera inserción de segmentos génicos hVλ con un único segmento génico hJλ. Las secuencias mostradas en la FIG. 11 ilustran reordenamientos únicos que implican diferentes segmentos génicos hVλ con hJλ1 recombinado con el gen Cκ de ratón. Ratones heterocigóticos que albergaban un único locus κ endógeno modificado que contenía 12 segmentos génicos hVλ y hJλ1 y ratones homocigóticos que albergaban 2 loci κ endógenos modificados que contenían 40 segmentos génicos hVλ y hJλ1 eran ambos capaces de producir segmentos génicos λ humanos unidos de forma funcional al gen Cκ de ratón y producir células B que expresaban cadenas ligeras λ humanas. Estos reordenamientos demuestran que los loci quiméricos eran capaces de reordenar independientemente segmentos génicos λ humanos en múltiples células B independientes en estos ratones. Además, estas modificaciones en el locus de cadena ligera κ endógeno no volvían a ningún segmento génico hVλ no funcional o evitaban que el locus quimérico recombinara con múltiples hVλ y un segmento génico hJλ (Jλ1) durante el desarrollo de células B como se evidencia por los 16 segmentos génicos hVλ diferentes que se observó que se reordenaban con hJλ1 (Tabla 7). Además, estos ratones generaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos Vλ-Jλ humanos reordenados unidos de forma funcional a genes Cκ de ratón como parte del repertorio de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno.

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

La FIG. 13 muestra la secuencia de la unión hVλ-hJλ-mCλ2 para tres clones de RT-PCR individuales de ratones

homocigóticos para 12 segmentos génicos hV $\lambda$  y hJ $\lambda$ 1. Las secuencias mostradas en la FIG. 13 ilustran reordenamientos únicos adicionales que implican diferentes segmentos génicos hV $\lambda$ , que abarcan la longitud de la primera inserción, con hJ $\lambda$ 1 reordenado y unido de forma funcional al gen C $\lambda$ 2 de ratón (2D1 = V $\lambda$ 2-8J $\lambda$ 1; 2D9 = V $\lambda$ 3-10J $\lambda$ 1; 3E15 = V $\lambda$ 3-1J $\lambda$ 1). Un clon demostró un reordenamiento no productivo debido a adiciones N en la unión hV $\lambda$ -hJ $\lambda$  (2D1, FIG. 13). Esto no es infrecuente en la recombinación V(D)J, ya que la unión de segmentos génicos durante la recombinación ha demostrado ser imprecisa. Aunque este clon representa un recombinante no productivo presente en el repertorio de cadena ligera de estos ratones, demuestra que el mecanismo genético que contribuye a la diversidad de unión entre genes de anticuerpo está funcionando de forma normal en estos ratones y conduciendo a un repertorio de anticuerpos que contiene cadenas ligeras con mayor diversidad.

Ratones homocigóticos que albergan loci  $\lambda$  endógenos modificados que contienen 12 segmentos génicos hV $\lambda$  y hJ $\lambda$ 1 también eran capaces de producir segmentos génicos  $\lambda$  humanos unidos de forma funcional a un gen C $\lambda$  de ratón endógeno y producir células B que expresaban cadenas ligeras  $\lambda$  quiméricas inversas que contenían regiones hV $\lambda$  unidas a regiones C $\lambda$  de ratón. Estos reordenamientos demuestran adicionalmente que segmentos génicos de cadena ligera  $\lambda$  humana colocados en el otro locus de cadena ligera (es decir, el locus  $\lambda$ ) eran capaces de reordenar independientemente segmentos génicos  $\lambda$  humanos en múltiples células B independientes en estos ratones. Además, las modificaciones al locus de cadena ligera  $\lambda$  endógeno demuestran que la inserción de segmentos génicos  $\lambda$  humanos no volvían a ninguno de los segmentos génicos hV $\lambda$  y/o hJ $\lambda$ 1 no funcionales o evitaban que el locus quimérico recombinara los segmentos génicos hV $\lambda$  y hJ $\lambda$ 1 durante el desarrollo de células B. Además, estos ratones también generaron anticuerpos funcionales que contenían segmentos génicos V $\lambda$ -J $\lambda$  humanos unidos de forma funcional a una región C $\lambda$  de ratón como parte del repertorio de cadena ligera de inmunoglobulina endógena.

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

**Ejemplo VI****Cruce de ratones que expresan cadenas ligeras  $\lambda$  humanas a partir de un locus de cadena ligera endógeno**

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

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

**Ejemplo VII****Generación de anticuerpos a partir de ratones que expresan cadenas pesadas humanas y cadenas ligeras  $\lambda$  humanas**

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.	
5	<120> RATONES CON LAMBDA MODIFICADA	
	<130> N115474D-EP	
	<140> 14198318.9	
10	<141> 22-06-2011	
	<150> 61/357.314	
	<151> 22-06-2010	
15	<150> 61/357.317	
	<151> 22-06-2010	
	<160> 141	
20	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 219	
	<212> ADN	
25	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
30	<400> 1	
	<b>actttcagaa tgttcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt</b>	<b>60</b>
	<b>atagtataca ttatacgaag ttattctaga cccccgggct cgataactat aacggtccta</b>	<b>120</b>
	<b>aggtagcgac tcgagataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttatc catggtaagc</b>	<b>180</b>
	<b>ttacgtggca tacagtgtca gattttctgt ttatcaagc</b>	<b>219</b>
	<210> 2	
35	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> sintética	
	<400> 2	
	agctgaatgg aaacaaggca a	21
45	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 3	
55	ggagacaatg ccccagtga	19
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	

<220>  
 <223> sintética

5 <400> 4  
 tcccataggg ctaggattc c 21

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

10

<220>  
 <223> sintética

15 <400> 5  
 tcccctcaca ctgttccc 19

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

20

<220>  
 <223> sintética

25 <400> 6  
 ggtggagagg ctattcggc 19

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

30

<220>  
 <223> sintética

35 <400> 7  
 gaacacggcg gcatcag 17

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

40

<220>  
 <223> sintética

45 <400> 8  
 tcaaccttc ccagcctgc t 21

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

50

<220>  
 <223> sintética

55 <400> 9  
 ccccagagag agaaaacaga tttt 24

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

60

65

<220>  
 <223> sintética

5 <400> 10  
 ccctggtgaa gcatgtttgc 20

10 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintética

15 <400> 11  
 tgtggcctgt ctgccttacg 20

20 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintética

25 <400> 12  
 cacacctaga ccccggaagt c 21

30 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

35 <220>  
 <223> sintética

35 <400> 13  
 tcgctttgcc agttgattct c 21

40 <210> 14  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> sintética

50 <400> 14 17  
 tgcggccgat cttagcc 17

55 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintética

60 <400> 15 18  
 ttgaccgatt ccttgccg 18

65 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

5 <400> 16 20  
 gcaaacaaaa accactggcc 20

<210> 17  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 10 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

15 <400> 17 19  
 ggccacattc catgggttc 19

<210> 18  
 <211> 22  
 20 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

25 <400> 18 22  
 ccatgactgg gcctctgtag ac 22

<210> 19  
 <211> 25  
 30 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

35 <400> 19  
 caagtcaggg tgctaagtct gtatc 25

40 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> sintética

<400> 20  
 50 cacagcttgt gcagcctcc 19

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

55 <220>  
 <223> sintética

<400> 21  
 60 gggcactgga tacgatgtat gg 22

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

<400> 22  
 5 tcataggtag gtctcagttt g 21

<210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

<400> 23  
 15 tgatctgctc tgtttcatcc t 21

<210> 24  
 <211> 31  
 20 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

<400> 24  
 25 tgacatgaac catctgttct tctctcgaca a 31

<210> 25  
 <211> 29  
 30 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

<400> 25  
 agagacgctc cgaggtaag gtgctctag 29

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

<220>  
 <223> sintética

<400> 26  
 50 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

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

<220>  
 <223> sintética

<400> 27  
 60 accctctgct gtcct 16

<210> 28  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 65 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

5 <400> 28  
 ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa 26

<210> 29  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

15 <400> 29  
 tccacactgt cggctgggag ctca 24

<210> 30  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

25 <400> 30  
 acgagcgggt tcggcccatt c 21

<210> 31  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 30 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

35 <400> 31  
 ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa 37

<210> 32  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 40 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

<400> 32  
 50 tgccgcttat acaacactgc catctgc 27

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

55 <220>  
 <223> sintética

<400> 33  
 60 agaagaagcc tgtactacag catccgtttt acagtca 37

<210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

5 <400> 34  
 gggctactg aggacctgc t 21

<210> 35  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 10 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

15 <400> 35 23  
 gacagccctt acagagtttg gaa 23

<210> 36  
 <211> 23  
 20 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

25 <400> 36 23  
 aagaccagga gctctgccta agt 23

<210> 37  
 <211> 22  
 30 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

35 <400> 37 22  
 cccatcacga actgaagtg ag 22

<210> 38  
 <211> 20  
 40 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

45 <400> 38 20  
 cagggcctcc atcccaggca 20

<210> 39  
 <211> 28  
 50 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

55 <400> 39 28  
 ccccagtgtg tgaatcactc taccctcc 28

<210> 40  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

65

<220>  
 <223> sintética

5 <400> 40  
 cctctctcc tcaccctct 20

10 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintética

20 <220>  
 <221> variación  
 <222> (4)..(4)  
 <223> r = a o g

25 <220>  
 <221> variación  
 <222> (9)..(9)  
 <223> s = c o g

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

35 <220>  
 <221> variación  
 <222> (12)..(12)  
 <223> y = c o t

40 <220>  
 <221> variación  
 <222> (13)..(13)  
 <223> y = c o t

45 <400> 41  
 atgrccdgst yyctctct 20

50 <210> 42  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

55 <220>  
 <223> sintética

60 <400> 42  
 ctctcactc agggcaca 18

65 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

60 <220>  
 <223> sintética

65 <220>  
 <221> variación  
 <222> (18)..(18)  
 <223> s = c o g

<400> 43  
 atggcctggg ctctgctct 20

5 <210> 44  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética

15 <220>  
 <221> variación  
 <222> (11)..(11)  
 <223> y = c o t

20 <220>  
 <221> variación  
 <222> (13)..(13)  
 <223> s = c o g

25 <400> 44  
 atggcctgga ycsctctcc 19

30 <210> 45  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

35 <220>  
 <223> sintética

40 <220>  
 <221> variación  
 <222> (11)..(11)  
 <223> y = c o t

45 <220>  
 <221> variación  
 <222> (15)..(15)  
 <223> r = a o g

50 <220>  
 <221> variación  
 <222> (16)..(16)  
 <223> y = c o t

55 <220>  
 <221> variación  
 <222> (18)..(18)  
 <223> y = c o t

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

65 <220>  
 <221> variación  
 <222> (21)..(21)  
 <223> y = c o t

<400> 45  
 tcaccatggc ytggrycycm ytc 23

<210> 46

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

5

<220>  
 <223> sintética

<400> 46  
 tcaccatggc ctgggtctcc tt    22

10

<210> 47  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

15

<220>  
 <223> sintética

20

<220>  
 <221> variación  
 <222> (16)..(16)  
 <223> m = a o c

25

<220>  
 <221> variación  
 <222> (19)..(19)  
 <223> y = c o t

30

<400> 47  
 tcaccatggc ctggamtcyt ct    22

35

<210> 48  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

40

<400> 48  
 tcaccatggc ctgggctcca ctactt    26

45

<210> 49  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

50

<220>  
 <223> sintética

<400> 49  
 tcaccatggc ctggactcct    20

55

<210> 50  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

60

<220>  
 <223> sintética

<400> 50  
 tcaccatggc ctggatgatg ctt    23

65

<210> 51  
 <211> 22

<212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintética  
  
 <400> 51  
 taaatatggc ctgggctcct ct 22  
  
 10 <210> 52  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> sintética  
  
 <400> 52  
 20 tcaccatgcc ctgggctctg ct 22  
  
 <210> 53  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 <400> 53  
 30 tcaccatggc cctgactcct ct 22  
  
 <210> 54  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 <400> 54  
 40 cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30  
  
 <210> 55  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 <400> 55  
 50 gtaaaacgac ggccag 16  
  
 <210> 56  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 <400> 56  
 60 caggaaacag ctatgac 17  
  
 <210> 57  
 <211> 440  
 65

ES 2 646 052 T3

<212> ADN  
<213> secuencia artificial

5 <220>  
<223> sintética

<400> 57

```

gggcctgggc tctgctgctc ctcaccctcc tcaactcaggg cacagggtcc tgggccccagt    60
ctgccctgac tcagcctccc tccgcgctcc ggtctcctgg acagtcagtc accatctcct    120
gcactggaac cagcagtgac gttggtggtt ataactatgt ctcttggtac caacagcacc    180
caggcaaagc ccccaaactc atgatttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtccctg    240
atcgcttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg    300
ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtcttcg    360
gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc    420
caccatccag taagcttggg                                         440
    
```

10 <210> 58  
<211> 441  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

15 <220>  
<223> sintética

<400> 58

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc tcaactcagg gcacagggtc ctgggccccag    60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgctc ggtctcctg gacagtcagt caccatctcc    120
tgactgggaa ccagcagtgga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac    180
ccaggcaaag ccccaaactc catgatttat gaggtcacta agcggccctc aggggtccct    240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag    300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc    360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc    420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                         441
    
```

25 <210> 59  
<211> 441  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

30 <220>  
<223> sintética

<400> 59

ES 2 646 052 T3

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctgggccag 60  
 tctgccctga ctacagctcc ctccgcgtcc gggctctctg gacagtcagt caccatctcc 120  
 tgcaactgaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180  
 ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtcctt 240  
 gatcgcttct ctggctcaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300  
 gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaaaa ttatgtcttc 360  
 ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420  
 ccaccatcca gtaagcttgg g 441

5 <210> 60  
 <211> 438  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética

<400> 60

atggcctggg ctctgctcct caccctcctc actcagggca cagggctctg ggcccagtct 60  
 gccctgactc agcctccctc cgcgtccggg tctctcggac agtcagtcac catctcctgc 120  
 actggaacca gcagtgacgt tgggtggtat aactatgtct cctggtacca acagcaccca 180  
 ggcaaagccc ccaaactcat gatttatgag gtcagtaagc ggccctcagg ggtccctgat 240  
 cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gcctccctga ccgtctctgg gctccaggct 300  
 gaggatgagg ctgattatta ctgcagctca tatgcaggca gcaacaatta tgtcttcgga 360  
 actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420  
 ccatccagta agcttggg 438

15 <210> 61  
 <211> 438  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintética

<400> 61

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctgggccag 60  
 tctgccctga ctacagctcc ctccgcgtcc gggctctctg gacagtcagt caccatctcc 120  
 tgcaactgaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180  
 ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtcctt 240  
 gatcgcttct ctggctcaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300  
 gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaaaa tgtcttcgga 360  
 actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420  
 ccatccagta agcttggg 438

25

ES 2 646 052 T3

<210> 62  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 62  
 10

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

<210> 63  
 <211> 442  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> sintética  
 20  
 <400> 63

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggccag	60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctcctg gacagtcagt caccatctcc	120
tgcaactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac	180
ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct	240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag	300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaaca tttatgtctt	360
cggactggg accaaggtca ccgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt	420
cccaccatcc agtaagcttg gg	442

25 <210> 64  
 <211> 428  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 64

ES 2 646 052 T3

**ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgctc tgctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60**  
**ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagtgag cacagcacct 120**  
**acaccatcga atggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggtta 180**  
**agagtgatgg cagccacagc aagggggacg ggatccccga tcgcttcatg ggctccagtt 240**  
**ctggggctga ccgctacctc accttctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300**  
**actgtggaga gagccacacg attgatggcc aagtcggttg tgtcttcgga actgggacca 360**  
**aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca ccatccagta 420**  
**agcttggg 428**

5 <210> 65  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética

<400> 65

**atgacctgct cccctctctc cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60**  
**tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct ggggccccag gacagaaggt caccatctcc 120**  
**tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180**  
**ggaacagecc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240**  
**cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcateaccgg actccagact 300**  
**ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ttatgtcttc 360**  
**ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420**  
**ccaccatcca gtgagcagtt a 441**

15 <210> 66  
 <211> 441  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintética

<400> 66

ES 2 646 052 T3

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

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

10 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 67

cccgggcaga gggtcaccat ctcttgttct ggaagcagct ccaacatcgg aagtaatact 60  
 gtaaactggt accagcagct cccaggaacg gccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120  
 cagcggccct caggggtccc tgaccgatc tctggtcca agtctggcac ctccagctcc 180  
 ctggccatca gtgggctcca gtctgaggat gaggtgatt attactgtgc agcatgggat 240  
 gacagcctga atggttatgt cttcggaaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300  
 gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca tccagtgagc agtta 345

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

20 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 68

atggcctgga cccctctcct gctccccctc ctcactttct gcacagtctc tgaggcctcc 60  
 tatgagctga cacagccacc ctcggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120  
 tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttattggt accagcagaa gtcaggccag 180  
 gccccctgtc tggatcctta tgaggacagc aaacgaccct ccgggatccc tgagagattc 240  
 tctggctcca gctcagggac aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300  
 gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggta atcatgtctt cggaactggg 360  
 accaaggtea ccgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420  
 agtgagcagt ta 432

25 <210> 69

ES 2 646 052 T3

<211> 426  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sintética

<400> 69

atggcctgga ctctctctt tctgttctc ctcacttgc gccagggtc caattcccag 60  
 gctgtggtga ctcaggagcc ctcactgact gtgtccccag gaggacagt cactctcacc 120  
 tgtggctcca gcactggagc tgtcaccagt ggtcattat cctactggtt ccagcagaag 180  
 cctggccaag cccccaggac actgatttat gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240  
 gcccggttct caggctccct ccttgggggc aaagctgcc tgacccttc gggcgcgag 300  
 cctgaggatg aggctgagta ttactgctg ctctctata gtggtgctta tgccttcgga 360  
 actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catctccca 420  
 ccatcc 426

10

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

15

<220>  
 <223> sintética

20 <400> 70

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

25 <210> 71  
 <211> 417  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintética

<400> 71

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

5 <210> 72  
 <211> 393  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 72

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

15 <210> 73  
 <211> 417  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 73

atggcctggg ctctgctgct cctcactctc ctactcagg acacagggtc ctgggcccag 60  
 tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctcctg gacagtcgat caccatctcc 120  
 tgcactggaa ccagcagtga tgttgggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180  
 ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240  
 aatcgttct ctggctcaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300  
 gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360  
 ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

25

ES 2 646 052 T3

<210> 74  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 5 <213> secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 10 <400> 74  
  
**cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60**  
**tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctctg gtaccaacag 120**  
**cacccaggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggcca gtaatcggcc ctcagggggt 180**  
**tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct cctgaccat ctctgggctc 240**  
**caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300**  
**ttcggaaactg ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348**

<210> 75  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 20 <400> 75  
 aacaaccgag ctccaggtg 20

<210> 76  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 30 <400> 76  
 agggcagcct tgtctcaa 19

<210> 77  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 40 <400> 77  
 cctgccagat tctcaggctc 20

<210> 78  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 50 <400> 78

<210> 79  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 60 <400> 79

ES 2 646 052 T3

catcacaggg gcacagactg 20  
 <210> 79  
 <211> 19  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintética  
 10 <400> 79  
 gatttgctga gggcagggt 19  
 <210> 80  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintética  
 20 <400> 80  
 cccaagtct gatccttct t 21  
 25 <210> 81  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 81  
 35 gctgaccaac gatgcctaa 20  
 <210> 82  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 82  
 45 taagcgccac actgcacct 19  
 <210> 83  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintética  
 55 <400> 83  
 cctgccagat tctcaggctc cctg 24  
 <210> 84  
 <211> 23  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sintética  
 65 <400> 84

ES 2 646 052 T3

ctgattggag acaaggctgc cct 23

5 <210> 85  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> sintética

<400> 85  
ccttcatact cttgcatcct cccttctcca 30

15 <210> 86  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> sintética

<400> 86  
ttccttctct tctgtgactc aattatttgt ggaca 35

25 <210> 87  
<211> 159  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> sintética

<400> 87

**tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60**

**tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg caccggctg 120**

35 **accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159**

40 <210> 88  
<211> 159  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sintética

45 <400> 88

**tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60**

**tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120**

**accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159**

50 <210> 89  
<211> 159  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> sintética

<400> 89

ES 2 646 052 T3

	<b>tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat</b>	<b>60</b>
	<b>tactgtgcag catgggatga cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg</b>	<b>120</b>
	<b>accgcctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc</b>	<b>159</b>
5	<210> 90 <211> 159 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
	<400> 90	
	<b>tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat</b>	<b>60</b>
	<b>tactgtgcag catgggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg</b>	<b>120</b>
	<b>accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc</b>	<b>159</b>
15	<210> 91 <211> 153 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
	<400> 91	
25	<b>tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccggggatga ggctgactat</b>	<b>60</b>
	<b>tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcaccca gctgaccgcc</b>	<b>120</b>
	<b>ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc</b>	<b>153</b>
30	<210> 92 <211> 156 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética	
	<400> 92	
	<b>tcagggaaa tggccacctt gactatcagt ggggccagg tggaggatga agctgactac</b>	<b>60</b>
	<b>tactgttact caacagacag cagtggtaat gctgtgttcg gaggaggcac ccagctgacc</b>	<b>120</b>
	<b>gccctcgggg ctgatgctgc accaactgta tccatc</b>	<b>156</b>
40	<210> 93 <211> 159 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética	

ES 2 646 052 T3

<400> 93

tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60  
 tactgttact caacagacag cagtggtaat cataggggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120  
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

5 <210> 94  
 <211> 159  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética

<400> 94

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

15  
 <210> 95  
 <211> 159  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética

25 <400> 95

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

30 <210> 96  
 <211> 153  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> sintética

<400> 96

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

40  
 <210> 97  
 <211> 153  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> sintética

ES 2 646 052 T3

<400> 97

**cttgggggca aagctgccct gaccctttcg ggtgcgcagc ctgaggatga ggctgagtat 60**  
**tactgcttgc tctcctatag tgggtctcga gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120**  
**ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153**

5

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

10

<220>  
 <223> sintética

15

<400> 98

**tcaggcctga atcggtaacct gaccatcaag aacatccagg aagaggatga gagtgactac 60**  
**cactgtgggg cagaccatgg cagtgggagc aacttcgtgt ctgtgttcgg aggaggcacc 120**  
**cagctgaccg ccctcggggc tgatgctgca ccaactgtat ccatc 165**

20

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

25

<220>  
 <223> sintética

<400> 99

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

30

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

35

<220>  
 <223> sintética

<400> 100

ES 2 646 052 T3

aagctctaaa actacaaact gctgaaagat ctaatgacta ggacagccta gtaattttca	60
taggggcata aatgtgaaac gccttgtgca tcgtagaaga aagcagaaga gaaagcattc	120
ccaattttctt aactgccttt tacctatatt aatcagtaat atactggcctt ttacctctgt	180
taatcataat aaacaaattc tcaataaatt ttatcgatac tcttcaatgc ctgctcagca	240
acattttccg aaggcagctc aagatattaa ataactcata agggccaacc tcctattgca	300
gcattctttg ggatttaacc agtttcccaa gactcttttc acaatgtaa gatgttagaa	360
atagatccaa aactaggtga tatatcccct agtaaaactg tgaggtcaaa cttgtctggc	420
taatgcttcc atttaaaaat ttctctttct tgatccttca ttgtatgtac acaataaatc	480
aggggaaaac ttaactgag tgaatcaaag tattctcatt attataatag gagcttcaca	540
cacacacaaa aaaaatcaatt ctattactct cagcctcagt tcctaaagcc aagttaaagt	600
cctgttctaa gatcattggt gcatgaccat atgtattcca ggtctaactc aaactgtgga	660
taaatcccag caggacatta gagatttttg tgagagtaag catataggat tcagggttta	720
tgagctttag atttttcttg tcaaaatgaa tgagagttgc catatctaaa aattattccc	780
agataaataa aattcactac ctagaattaa tttatgcata taagtagaaa tgctatctcc	840
ctttttacca tccaaagtgg aaagcctcat ggaactagaa attaataata gaaaaatcag	900
ttaataaaaag tatgtcattt catcaattca ataagttata atagcaaaaa accataataa	960
attatcactt aatgtcaat acattataa actatggtac ataaatagga tattgaatag	1020
ccattgatgc tcctgatgaa aattagcagg cagtgataaa tgataaatat gaagcacatg	1080
tcaataaata aaataagttt tatgtaattt aggagaaaat ggtgataatg acacaaaatg	1140
tgaattatgg atgcatctat aaaattcttt gtacatttgt gaattgtaa tatttatctt	1200
agagacatta ttactttgta tatgttccat ttgctcacct atatgtccca gtctccttac	1260

aaatgctatg gccaaagaaa taggcataca tacatccttt gcaggctgag gcaggaaaa 1320  
 gatcttacgg aattttccag tctatccttt atctgtataa gcaacttaag aggccatgtg 1380  
 ctccaaatgg tgcaaataca agatggtaga gcctctgtct gcctggatcc ttgagtggct 1440  
 gcatggagca gagcaccttt ctggccctgg tgaagattgt agcatgagca agatataagc 1500  
 atttgttggg gctaggccat gagatttggg gcagtggat aacctaccct attatgaaa 1560  
 atataaatac acaaaacaga aaagagagag agaagtgaga gaagactgtg agagaagtgc 1620  
 atgagagaag actgtgtttt gttcatttcc tataatccta tatcaccatg ggatcctgtg 1680  
 ccttctggtg atcaaaactaa tgttctacag ctccaaagaa gaatgctcgc ctaacgtctc 1740  
 cattccaatg acctagagac taaaagccaa aaagaacctt agaaattatc tattgcattc 1800  
 tttgatgtaa ggaaatatct tagaggcac agatagaaat atcttaacct aggtcactta 1860  
 gttcgtggca gagctgaggc taaaaccagg cttttgact cctaattttg tgctctttac 1920  
 accttctcac atcacttctc caaccxaaag tctagcagaa aaggctaaaa taagatatat 1980  
 gcatagattt gctattataa gtccatgtac ttctcagac gctttaagat ggggcttctc 2040  
 atggttcaca ataagcagca gaggaagtg aataactatc ttcgtctccc ctactgctat 2100  
 ttgtgcagtt tgaagcttat ctcttaaatc atgttttctt ctctgtagta atactacaac 2160  
 ttgtgccttt tatgtgtgta taaattttaa tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220  
 aatggacac tccaaaaaga tttcaataa gttacatgg cttcacattg cccctctac 2280  
 acctcttgt ggagctacac atcacctca cccaaattg agaaaaataa tcaagaaaat 2340  
 gactctcact agcagtgaga ccaagtccat aagcactaat gtcacagtg cacactgcag 2400  
 cctcatgctg ccaagcatgt tttggcgta tccctggact ggtttgggta catgatcaaa 2460  
 ggtacatttt ccacctgcat agcccatcc tggatctata gccttccttg tgtctttgtg 2520  
 aacaacctag tgtgaactca aagtatgaga cagatctcaa ttaatttaga aagttattt 2580  
 tccaagatt aaggacaagc ccatgataaa gcctccagag gtctgatat atgtgccaa 2640  
 gggggtcggg gcacagcttg gtgtataca ttttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700  
 tgtagaagat gtgcatcgtt ttggtctgga aagggtgac aactcaaggc aggaagggg 2760  
 gcttctgct ggggttgcag tgttttgagt ctctgatcag ctttcacat gtgaaaggca 2820  
 ggtagagaaa tagtcattta tgccttagtc tggcttattg aaacagtagg gcagaagaag 2880  
 cattgcatat gcatttgtct gaagtgaaca gagggatgac tttgagctct gtctttctt 2940  
 tgtccacaag gaattacctt gtgggcaaat tgtgaggag gtatgtagct ttttttctt 3000  
 tgtagctatc ttatttagga ataaaatggg aggcagggtt gcctgatgca attcccagct 3060  
 tgactttccc ttttgctta gtgattttt gggtcctgag gttattttt tcttcacat 3120  
 tagtataact acttttctt ttctaattcc ttttctact gtatgtgta cagctgact 3180

ES 2 646 052 T3

atgttacttg caaaaagaat tctgactaat gcaccatctg actagaaggc agggttcttc 3240  
 gatgataacg aatcctccag aatctagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgic 3300  
 ttcttgggga atttctcatg gcaatgaatg gcaactggcc aaaggattta tgaccagact 3360  
 gagctctctt ttatctattc tgttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacagg 3420  
 gacactggtt tctaagttct agggttaaac agtccactcc caggcccacc acaccatacc 3480  
 ctctgacat ctggtgaaca gcaataaaat tgtttcttat tctgaaaatc ctccaatact 3540  
 tccaccatcc ccaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaac 3600  
 acaatatcca ttatattatt cttggccttt gagatacctt acaaaacaaa tacaaaaaaa 3660  
 gtcccaattt aacatctttt aataatcttt acaaaacaga acacatctcc tttcttgata 3720  
 atagtcaaga ggctcagtgg caactgtggt gaaaagtgtc agattctggt catgtttcaa 3780  
 aggtagaaaa aatagaattt gttaacatat tggatgtgag gcgtgggaga aacgtgaaat 3840  
 caaggtggtt gcaagtgtt aacctgagca actagagaat ttggaaggac attttctgag 3900  
 atggggaagg caggcgggaa tcagggatta gagtgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960  
 tgctagacct ctaattggca atatcccttg gacaggtgga tgaatatgcg tgattctgga 4020  
 gttcgggaaa tagtccgggt ggagatgcaa atttgggaaa cagggcgagg ttactagcaa 4080  
 tgagttaaat caatgaaggc aggctgggac ctggcaggta acccaacaag tagaggtcga 4140  
 agagatgaga agaaaacagc acaggagact tagaagcagt ggtcaggagg aaggagtga 4200  
 accaagaaag tgatgtcca gagccaacaa aataaggatt tcttttctgt ttacaaatgt 4260  
 aaaattaataa ggtttaataa aaagaaaatt tacttttatg gttggttgtt attaagtgt 4320  
 ccaaacactg tctcctattt gtagaatcag aactctctca tggcagtaga aaatttgga 4380  
 agttactttt taaaagggtg gtgactgct gccctttgct ggtcaagttt atgactgca 4440  
 aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctctttaa atagctcagg ctgtacaagc 4500  
 tagaaagaac ctgcaagat attccttcca acatttgc attgacttatg ggaagtgcag 4560  
 gttcagccag aaaagttgtg tgcaaggccg ttatgtgaag tttatcagac ctgattctta 4620  
 cggctcttcc cattgtttcg agcctccctt ccattcactt cccgctcata cgcgaccaag 4680  
 tataggacag gagtagttat tctgacttt atagcagctc cactgtctgg cactctgatg 4740  
 ttctttaatt acaagcttta tgacagtgat tetcaacctg ctccactgcc tccacctagt 4800  
 ggcagaaaga agaaaatgtg tgtaactcgg gagtctctgg tctgaaagct cgggggtatc 4860  
 atttcttcaa agtcttgagc ttgttttgt ttgtatttat ttatttattt gttttagaga 4920  
 caaggtctcg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980  
 gtgaataaag agatatcagt aatgactggt ttatattgtg gctgtagcgc attcgagggga 5040

taattcgatt ctgttctgct ttcgaatgca tggctcactg taacctccaa ctcccgggct 5100  
 caagcgatcc tctacctca gcttctccag tagttgagct tgatttattt taaagtttca 5160  
 taaaattttg gcatttcttt ccacaatatg gccatgtgtg ctttactata aaatattttc 5220  
 atcacaaaat ttacatcgct ggaaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caaccaaga 5280  
 aagcagaaca gactcaaatt atcccttaa tcccccttaa ccacaaatat aaaacagtcc 5340  
 gtgactgggc gtgttggcct acacctgtaa tcccagcact ttgggaggcc aaggcgggtg 5400  
 gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaaac cccgtcccta 5460  
 ttaaaaatac aaaattattc aggagtgtg gcaggcagtt gtaatcccag ctacttggga 5520  
 ggctgaggca ggagaatcac ttgaacctcag gagggtggagg ttgtagtgag ccaagattgt 5580  
 gccagtgcac tccagcctgg gcaacagagc gagacttcca tcttaaaaa aaaaaattaa 5640  
 gtaaataaaa tataaaaaaa taaagcagtc cctattgata tctctttatt cactaaatca 5700  
 acctggaatt gacctgaatt ctgattttt tttcatcatg gattttttgc attaattttg 5760  
 attgtttaaa tattgcatta aaatattatt tatcttgact actgagtttg cgggacctcc 5820  
 ttaaaattta tgaccaaggc aatgcctcac tactcgcct taccataatc tgggccacat 5880  
 atcaggggct ccaatagcaa gcaacatgac tttgaaacag ctaagacttc tctcttact 5940  
 gtgaagacca gatgggccct gcaaacagtg taacctctac atgaaaatgc acgagattcc 6000  
 aactacaacc aggcacaaaa gactctgatg gtgaagtccc agccctccaa gtcccaactt 6060  
 cctgaagggg aagagcacc ccaagttctga ccagaggcca gagtcataac gaagatggaa 6120  
 tgtgagcttg acatagaagg ggtggtagca cctggctcag taatgaagag gctttcggtc 6180  
 ctgaaggaag agctcagcac attcaaagat tagaaggag gtcccagtca taggagcagg 6240  
 gaaggagaga aggcccata agaaacacag acaggaggga ggggtcaggg caagatcata 6300  
 ctggaacaa ctagagagct aataaaagtc acagtgccca gtccccacat ggaccagact 6360  
 cttcggaatc tctaggcatc aatttgggca ccagtagttt tcaaagttct ccagaagatt 6420  
 ctatgcacac cagccaaggg tgggaaccac aggtgttggc ctagggatca tgacaatgag 6480  
 tttctaagtg caataagaaa cctccagaga gtttaagcag ggaataatt tgatttgtt 6540  
 cttgtttgtg atttttaaag atcagtctgg ttactgtgtg taagacaata atccagaaaa 6600  
 tctgttgctc atgaaccaca tatctgtaa tttgcttccc ctgtaactgg atctaacc 6660  
 caaaaattag tacttactaa gaaattacat gcccaggac tatgctaagt aattcataaa 6720  
 cactatttta tttactctc acagcaagtt tataagagaa acgttattat ttccacattt 6780  
 cggatgagaa atttgaggct tgggaaagt taagtaattt acctaattgtc acaccagtt 6840  
 cataagatgc agagttaaga ttctaattct gtgtctaagt tgatgtcca tcaaacacac 6900  
 cagcctcca actaggaagc aacatgctgg ccagaggatg ctgtcatcaa gtttacagaa 6960

tggttagatt tctaggcaca gatgaataaa tcaacatggt ggtttgcaat agaatgaatc 7020  
 tatccagctc tgaatttgca tccaagggtt tgtgagcaca caagtctaaa agtgtggcct 7080  
 cagctctgct aacttcatca aggtgaatac ctaggaggcc accctctgag accaccagat 7140  
 ggacagtcca ccatctgttt acagatggta aagccacata ccagctttgc catctgatgt 7200  
 tctctattca cattcaacat ttatacaaga aatagtcata tggatccttt tcaatagaca 7260  
 gtactgggga aattgaattg ccatatgcag aagaatggaa ctagacctct atctctcacc 7320  
 aaatacaaaa gttaactcaa gacagattaa agacttacat ataagacctg taactacaaa 7380  
 aacactagaa gaaaacctag ggaaaatgct tctggaatta atctagggtga agaactcagg 7440  
 actaagatat caaaagcaca agcaccacaaa caaaaataga caaacaggac ttaattaaac 7500  
 tagaacgctt ctgaacagca agagaaataa tcaatagagt gaacagataa tctgcagaat 7560  
 gggtgaaaat atttgcaaac tatgcatcct acagggaaat aatgtccaga atttagaagg 7620  
 aactcaaaaca attcaacaac aacagcaaaa taaccccacc aaaaaagtgg gcaaaggaca 7680  
 tgaatagaca tttttcaaaa gaaggtatat gatatggttt ggctctgtgt ctccaccag 7740  
 atctcacctt aaattgtaat aatccccaca tatcatggga gagaccgggt gggaggtaat 7800  
 tgaatcatgg gggcaggttt gtcccatgct gttctcatga tactgaataa gtccatgag 7860  
 atctgatgat ttataaagg ggagttcccc tgcacacact ctcttgcttg cctccatgta 7920  
 atatgtgcct ttgcttctcc tttgcttct gccatgattg tgaggcctct ccagccatat 7980  
 ggaactgagt caattaaacc acttttctt tgtaaattac ccaatcttg gtatgtcttt 8040  
 attagcagca taagaacaga ctaatacagt gtacaaatgg ccaagaagcg taaaaaaaaac 8100  
 aaaatgctca aatcactaat cactagagaa tcgcaagtta aaaccacaat gagatattat 8160  
 cttacagcag tcagaatgcc tattattaaa acaccaaaaa ataacatggt ggcaaggatg 8220  
 cagagaaaag ggaatactta cacattatta gtgggaatgt aaactagtac agcttctgtg 8280  
 gaaaacacta tggagatttc tcaagaact agaaatagaa ctaccatgtg gttcagcaat 8340  
 accacaactg ggtatctacc caaagggaaa taaattatta tataaaaaag atatctgcac 8400  
 tcacttgitt attgcagcac tattcacaat agcaaagata tggaatcaac ccaagtgtcc 8460  
 atcaacagat gattggataa agaaaacgtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat 8520  
 acacatacca caatgaata ctattcagct ataaagaaaa gaatgaaatc atgtcttttg 8580  
 cagcaatgtg gttggaactg gaggccatta tcttaagtgg ataattcaaa aacagaagg 8640  
 caaatgtcac atgttctcac ttataagtgg gagctaaatg atgtgtacac atggacatag 8700  
 agtgtggtat gataaacact ggagattgag atgggtggaa ggggtggaagg aggttgagt 8760  
 atgagaaaat actaaatgga tacaatatac atgattcagg cgatagatac actaaaagcc 8820

cagacttcac cactacacag tatagctatg tagcaaaaatt gcacctgtat tgcttaaatt 8880  
 tatacaagta aaaaaaagat cgtacgaatt ctgtttttta ttctctatga aattactact 8940  
 gagagtatta tccaatgccg tttctatgca gtgcccccaa tattatccat ttagcagctc 9000  
 ctatgcaatg ccccaagata gaaattgtct tcaactttta tcccaggaaa accttcagtc 9060  
 acacgtagaa actagaaatt tttcccctag atgaaagtta tgtaacataa cacattatct 9120  
 tcatttagtc ggtttccaag aagctcagaa ccagatttta tgttcaatca aaaactgctt 9180  
 attttaagtg aggtttactg aggtataaat tacaataaaa gccacctttt cgtgtatatt 9240  
 tctataagtt ttggcaaatg catagctgtg taaccacaac cacattcaag atataggaca 9300  
 agtccctcat cctttaaagt tcctttatgc cccttcctc accccagccc ttggcaacca 9360  
 ctggtttttg tctgatccaa tcgtttgctt ctctctgaat gtcatgtaaa tagagccatg 9420  
 caatgtgaag ccttttgagt ctggctttgt tcaactgttc acttaggaga atgcatttga 9480  
 gattcatctt tgctgtttcg tgtagcacta gttcactgtc tattgttgag tagtattcca 9540  
 ttgtgtggat atgccacaga ttgtttatct agttaacaat ttaaagccat ttggtcattt 9600  
 ctaattttta gctgctaaga ataaagttgc tgtaagcttt ccaatgcagg tttttgtgtg 9660  
 aactcaggat ttcatttcgc ttgggtaaatt tcctagcttt gggactgctg agtcatctgg 9720  
 taggtgatg ttgaacttta taagaaactg ccaaactggt ttccaaagtt gctgtgctct 9780  
 tttgactcc catcagcagt gaatgagggt tccacttgct cgagcctagt attttaactt 9840  
 cactatatac cttctttgat gacatatcct ttcaaatttt tggcaagtt tttattgggg 9900  
 tgttgttact atggactgtg agagttcttt gtatattctg catatgattt tttctcaca 9960  
 tttgtgtttt atgaatatgt tctcccaatg tgtggcgctt tttattttct taacgtgcca 10020  
 tgtgaagagc agaagtttaa ttttatgatg tccaaattat cttttttct tttcttttt 10080  
 agatcaaat aggggtctat tttgattacc actgttattt tatctccatt tgattttcga 10140  
 tttttatttt ttttttcta atttcattgt aaatttttaa ttaaacccea atattctagg 10200  
 ggaaagaggc aagataaaaa tagtctaact tgggcataaa ttttagagtc atattctctt 10260  
 gccgagaaag gaaactagct ctcttacatt gattgtttaa tttcagacgt cactacttta 10320  
 tgaggatgcc caaattatgg gctttaaaaa atatatatcc aaacaggggt tcagaaagaa 10380  
 taactaattt gtccacaaca acacaaaaaa tgattccacc ataagtttgc ccagtgacag 10440  
 ggtctatatt attttctata tatcaaattc tacaactggt tcttaaagct actgtacata 10500  
 acctaagtta aatattagg tattagttga taagacattt tatcatctat gaaatgttgc 10560  
 ctgtttgcat agttagagaa tcttttaaaa tatggagcta tttcataga ttaaactatg 10620  
 ccagttaaaa gttgggtaaa aagaactaca gaataatatt tatgtttatc gtgtaagggt 10680  
 ttaaagcaaa ctccaagtca ttttcatcaa tgaaatcaat aaggttttgc aaatatatat 10740

ES 2 646 052 T3

gtatgaaaat actgatttaa aatgcaaata aggggagagt ttgagagaga gagagagacc 10800  
 aatgattttt ataattctag taagtttata ggtttatggg gtttttacgt acttttctac 10860  
 ccaacttgtc tataagactt taatgaatca cttagaatth ttaaaataat ttattattac 10920  
 tctgtacctg ttctttactc tgcaaatctt accttgccct tttgtctaaa agcaataaaa 10980  
 tctgacctgg tttatattcg atcattgatt ttgttactta gcaagcacag tgatccatta 11040  
 ggcttatgta ggctcatggt ttatacaaca ctgccatctg ctgacagagt gtgacagtca 11100  
 cagtcagcaa cacgagacca ctttattttc attttttagtg tttatagaaa tatgaatata 11160  
 cacaaatagt ataatgaacc ctaagcttca caaattaaca ttttgctaatt cttgtttcaa 11220  
 ctaccgctc cccctcctc caattactct gttctctcac ctctcacac acagacactg 11280  
 gcagtatttt tcagccaatc attaatagct tgccaactga taaggacttt taaaaaacia 11340  
 ccaccattcc attatgattc ccagcataat tgagagtaat tccctaatat ccaataccca 11400  
 ttttctattc caatttcctt gattgtcttt aaactgtttt taccttaagt ttgcttaaat 11460  
 caaagtccag gtctgttaa acatattggt aagttttacc caaacccaaa taaataaata 11520  
 aataaataaa taaataacct atttttcca attccaggga atagtgaag agggtaaatg 11580  
 ccattattta gaaacataaa tcacatcata ggactagaat tatcttgaag tcaaaatga 11640  
 agactgaaaa tggaaaagaa aggtatagac taaacttatt taaaacttc aatgcagaac 11700  
 tctaagagaa gatattagaa agttgtacca gcattcatta ttcagtattc atcagtattc 11760  
 actcagctat atgtagttga aatctaacta gaggagcttg atcagataaa gagatacatt 11820  
 tttctacca aggcggactc tggaggcagg tggttcagag ctgacagct gctgcaggac 11880  
 ccaggtcctt tccctgcctg ctctccact ctgcttctg actttcatcc tgcaagatgg 11940  
 gtgtttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtgg 12000  
 gcctctgtcc atcaagcaaa atttttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060  
 aacagtccta actgcaaaga agctgaggaa ttagattttt ggctgggaca ctgttgccct 12120  
 gtaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaga ttgaaaactc 12180  
 ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tgggcatacc ttaaaaacag 12240  
 gcaattcaca acagatgaga cccaatagc caataaacat ttttaaatgg tcaacctcat 12300  
 gagtgatcag aaaacacaaa tatgtatttt aaaccaaaaa taaaatacaa tgtattgacc 12360  
 atttgagtgg aaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag gatgtagagt 12420  
 gaggaaactc catggaggac ctatcattgc aatgtggga atgaaactta atacacgaat 12480  
 ttgaggccaa ttgttaaatt gaaaaatgcg cacaccctgc aaccaagtac cccttgaat 12540  
 atttttgaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaaatcatg caatatgtga cctttatact 12600

cagcataatg cccctcagat ccattgaagt catgtgtatc aacagctcac tatttttttt 12660  
 ttaatttttt ttagagacag agtctcactc tgtcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720  
 tcataactct ctctagcagc ctcgaactcc tgggctcaag catcctcctg cctcagcctc 12780  
 ccaagtagct aggactacag gcatgggaca caacacacag ctaatttttt taaatttttt 12840  
 ttagagacat ggtctcacta tgttgcttac gctggtctca aactcctagg tcaagcgatt 12900  
 ctcccacctc tacttcacaa agtgctgtag gtatgtaggt atggattgta ggtatgaacc 12960  
 accgtgccca actcactact ttttattact aattattcca tgggatggat gtaccgcagt 13020  
 ttgttttacc attaacttat tgtaggacat tttgactgat tccagttttt ttttaataca 13080  
 aataaaacca ctatgaatag ttgtgtattg tatacgtttt tgtgctaagt tttcattttt 13140  
 ctgggataag ttttcatttc tttgggcttt tactgtatcc ttgatattat aatagtgtac 13200  
 atcttcagtt ttattctatt caatatataa tcttttattt tccttgaaat ctcccatgga 13260  
 ttgttttagaa gtgtgttgtt ttgtttccaa gggtttgga tttttcccat tatttttcta 13320  
 ttatcgattt ccagtttgat tccaggtggt cagagaacac acttcatgtg atttcagttc 13380  
 tattaaattt gttgaggtt gttacatggc ccagtatatg gcaattttgg tatatgttcc 13440  
 atgagcactt gaaaagaatg cgaattctgc tgggtctggt tggagtttc cagcaatggt 13500  
 gatttatgat cttactcatt gatggtggtg ttgagtttga tgtgttctta cgatggcagc 13560  
 tttaacattc ttgtcaggta attctaactc ctctgtcatg tcagtattag cgcctcttaa 13620  
 ctgtctcatc aaagctgaga ttttctggt tcccctggtt cctgttggga tgtgtggttt 13680  
 tcatttgaaa tctggacttt ggagtattgt gttatgaggc tttggatctc atttaaactc 13740  
 atctcagcga atttctctc ttgccactca ggaaggagaa gttgggtggt tgaatggagc 13800  
 agagccgta ctgcctaaga attgttttac tgggcttccc ctttcttct cctttgacta 13860  
 gagagagcca gctttttatt agggctttat gtttttctgg gcctgttgggt gtttctgggt 13920  
 tgacaaactt ctccagaacc aagtctggaa tggatgaggc aaaaagaaac cccgtggaat 13980  
 gcaactgctg gtcgctcctt gggcccatt gttcctaact ggtctgcctt cttctctcca 14040  
 gcttccagag tcttcataag tttgctttac gtacaatgtc cggggttttt actttacttg 14100  
 agagaaatag gtaaaagtaa ttctactcca tctttcagga agcaaaagcc cccttggtga 14160  
 tttttttaa ctttcaaaaa caaaacaaaa ggcagctgca acagtaaaga agctagtaac 14220  
 acccttggtg ggaaattcaa gtccaaatac acattttaag tttggctagc cagtgagaac 14280  
 atcagaatag ttcaggtttt aaacaaattt atatttatga ttatgcatat actaaaagct 14340  
 gaaggcatct tatatttact aagcacctat tttgttcttg ttaaaaagac agaattccat 14400  
 tccttaggaa atttgacctg gcagctggag ctgatccacc tggccactag agcacagagc 14460  
 agggagagta gtagccctgc cccagccacc cctcaagaca ggattctttc tctggaact 14520

ES 2 646 052 T3

gtaggtaaca ctaaatcggt ctggaacaca acaacgaaag aagaaaggaa agagaaagaa 14580  
 agaaaggaag aaagagagag agaaggaagg aaggaggga ggaaggaag gaaggggaag 14640  
 ggaagggaaat ggaagggaaag gaaggaagga aaaggaagga agggaggag agaggagga 14700  
 aggaaggaag ggaaggaag gaaggaagaa ggaaggaagaa aaagaaagaa agaagaaaga 14760  
 aagaaagaca agaaagaaag aaagaaagaa agaaagggga aagaaagaa agaggaaaga 14820  
 aagagaaaga aagaaagaa agaaaggaag gaaagagaaa gaaagaaaa gaaagagaaa 14880  
 gaaagagaaa gacaagaaag aaaaaggaag gaaagaaag aagaaagaaa gaaagaaag 14940  
 aaagaaagag aaagaaagaa aaagaaagaa agaaagaaag aaagagaaag aaagaaagaa 15000  
 aaagaaagaa aagaaagaaag aaagaaagaa aaaaagaaag gagaaatga cagcaattac 15060  
 ttttgaaca acctaataata agtttttaa aagttaaata ttctgtcca tgcattgctg 15120  
 gataccttat aaataacagg gcatcctatg acctgaattt cccaaattat gagttgagg 15180  
 tttgaactag ttttaaaaa caaggaggcc aggcgactg gctcatgctt gtaatccag 15240  
 cactttgga ggctgaggca ggtggatcac gaggtcagga gctcgagacc agccttacca 15300  
 acatagtga acaccgctc tactaaaaat aaaaaatta gccggcgctg atgggtgcga 15360  
 cctgtaatct cagctactca gcaggctgag gcaggagaat cgcttgaacc cagaaggcgg 15420  
 aggttgcagt gagccaagat cacagcattg cactccagcc tggcgacag agggagactc 15480  
 cgtcttcaa aaaaaaaaa aagacaagga atctgtaaaa caggcactgg aagtatatgc 15540  
 acttttattt tcattctatg ctatccgatg cctactgcta tttccctca tatttaacct 15600  
 ccaacagctg cttttgctc cctccagacc acctgattgg agctcacgtg ctcccacaca 15660  
 gtacctcaa ccagagagag tcgagtcca cagaagggc taacaatcac cagtaatttt 15720  
 gcacttattt tacattgtgc cttgatacag agtactcaat gaatgctctt tgaatcatat 15780  
 ttaataaata tgtgtatttg ggattgtagc atattgcagc tacctggata tataatttaa 15840  
 ttagaaaaa aattttgtgt ggctcaatca aaaaacgact tttctctctc tctcttctc 15900  
 tttctcctc tctctctctt tctctcagt tgatgttctt ggagttcagt gttgtgcaga 15960  
 tggcagtgc aaatgccatg ggcacatgag atatgataaa aggtccctga agaaggtgga 16020  
 gaaccagtta tcttatgaaa tttccagag tgggtactgg atctctctg tctggacca 16080  
 tgctggctc agccaaggg gaatttcctt ccagagacag agggcagtga ttgaggtgg 16140  
 gagacagatc gtaacactga gacttacatg aggacaccaa acagaaaaa ggtggcaagt 16200  
 atagaaaatt ctttctctg gacagtctc tctgttctaa cttcagcaa attctcccc 16260  
 cagtggatgc tattgcacaa ccctacatat gctatgtttt ttctataca cacttaccta 16320  
 tgataaatg cattaattag tcacagtaag aggttaacaa caataactag taataaata 16380

ES 2 646 052 T3

gaacaattca gtaaaataag agttacttga gcacaaacac taggatatca tgacagtcaa 16440  
 tctgatgacc aagagggcta ctaagcatct aaacaggagg gtaagtgtag acagcatgga 16500  
 gacgctggac aaagggatga ttcagtccca ggctggatg gagcggaaag gcatgatatg 16560  
 tcatcacgct actaaggcac acaatttaaa atgagtaa atcttatttct agaaatttct 16620  
 ttttaatat ttcagactac agttgcctac aggtaactga aaccccagaa agcaaaattg 16680  
 ttgataagga ggtactactg tacatcgtcc tttgaaccaa ctttatcatt tgctagtata 16740  
 tacatatata cctacataca tacatataca catacctgca cacacctata tgtatacgta 16800  
 cacacacaca cacgcacaca cacacactca catctactaa tgttagaata agtttgctaa 16860  
 ataagatgca caacttgta atgtcctaca gagcaataaa accataagca ttggggttat 16920  
 cttttctact agataaaaat ccattatcat tttcataaag ttttctttac attaacatct 16980  
 aacttttgca atctagtttt taatcatcat aaataggaag caaatgaact gtttctctag 17040  
 tgaatcaaat atccttgaaa acatacatag tcatcttttt ggtttatttt tatttttaga 17100  
 taaattattt aaagttttaa ataatttaac attcacaata gtttgtgact gtatattttg 17160  
 acttggctcct tcaaacttaa tttgtacttt tatgtatcgt gcttacctca attttttatt 17220  
 cacttttcct aaactttgct ggattggttt attatttttg tctatttctt ttccttctag 17280  
 tggtttggga gggtttttta aatcccatta ctattgaatg cctattaact tgccccctt 17340  
 ttctttcaat ctctattccc acggcctgaa gcatgagggc caagctgtct gtaaccagca 17400  
 gagagatgac ccagggtgta ttccactctc cactgtccac ctatcaccat tcccagcccg 17460  
 atagctctga agtacggctt ttctggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgctca 17520  
 aggacacctc ctgtttttgc aatggaaaa atgtttctaa attccagttt ctctatgaat 17580  
 tcaatgacat ggtttaaatc tctgtggtgt tcttcaaagt ttttcttct aataggacct 17640  
 ctcatgattc tccaaccacg aaataaattc attatcattt ttatatttct tctgtcattg 17700  
 caaaggaggt tttgaaagag tggaggacgc gctaatgaac tcaaaaatcc aactattcc 17760  
 ttgtttccat ctgttgttca ttcattgttt ccattggcct gtccgcctcc tatcctcctt 17820  
 cttagacttg gagctctagc ctccagccagg atagggaaaa gagagatcag actgttactt 17880  
 tgtctatgta gaaaaggaag acataagaaa ctccattttg atctgtatcc tgaacaattg 17940  
 ttttgccttg agatgctggt aatctgtaac tttagccca accttgctgct cacagaaaca 18000  
 tgtgttgat ggaatcaaga ttaagggat ctagggctgt gcagaatgtg ccttgtaac 18060  
 aacatgttta caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgcc attctccatt ctgattaac 18120  
 taggggcaca gtgactgcg gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattg 18180  
 tccaaggttt ctccccactg agacagcctg agatatggcc ttgcgggatg ggaaagatct 18240  
 gaccgtcccc cagcctgaca cccgtgaagg gtctgcgctg aggaggatta gtaaaagagg 18300

aaggcctctt gcggttgaga taagaggaag ccctctgtct cctgcatgcc cctgggaacg 18360  
gcatgtctca gtgtaaaacc tgattgtaca ttcgttctat tctgagatag gagaaaaccg 18420  
ctctgtggct ggaggcgaga tatgtctggcg gcaatgctgc tctgttgttc tttactacac 18480  
tgagatgttt ggggtgagaga agcataaatc tggcctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540  
ttcccttgaa tttacttgty acacagattc ctttgctcac atgttttctt gctgaccttc 18600  
tccccactat caccctgttc tcctgcccga tccccctgic tgaggtagtg aaaatagtaa 18660  
tcaataaata ctgagggaac tcagagaccg gtgccagcgc gggtcctccg tatgtctgagt 18720  
gacggtccct tgggccact gttccttctc tatactttgt ctctgtgtct tatttctttt 18780  
ctcagtctct cgtcccacct gacgagaaat acccacaggt gtggaggggc tggacacccc 18840  
ttcgagccag gattatcagg gcatttgggg gtctgcaaaa ctaagcccca actcatcgat 18900  
ttcacaactt catccagagc cagcctgaac agtagttgcc catgatttct atgccttaat 18960  
acgagaagag aacatagggg ctgggtgcca agtaggtaga cagggagggc agggaaactct 19020  
aagacagagc ttgaggggct cattcctctt gcaaaatgaa acaaaaacca cagcactgaa 19080  
tatgtaaate tcggtggctg aaccctctct aggatagtaa gccctgacac aattgctgct 19140  
atcttctctt tctctcaagg aagtcaaaaa acacctgag ccttactgtc cccttggaaa 19200  
caagatgaac atctacattt tctaaagtgg gacaagaate tctgttcata tttatgtccc 19260  
atgcatttgc acgtggccgg acaaaggact ttgcttctgc cagcacatct gtcttcagat 19320  
atgagaggaa acagacacaa cctggaggcg gcaaagaagc agctctttct caagtgaact 19380  
cctctatctc cctacttctt ggctaattgg gcagccttga tccttgggaa tccaggacag 19440  
atatccactc gtgacaaact agctggaaga atgacaacca atcaggttec aagcaccact 19500  
ggatgtgaac cacagaattt cctcctctcc ttgtggaatg tcagcttacg tctgacaaaa 19560  
aatgtaaaac tgagagagtt acaatcttaa ggaggagtca agctaaagca gaaagaatca 19620  
cctactctgg actccagcat gactgctgag ctcaaatata tatagagaga gaaagaacca 19680  
caaaactgaa gatggatate agctacagac tttcctgagt caggtagggc aatggccatc 19740  
cctcaaacct tgcaaaaggc aaacttatgc cattgtgtcc tctgacatac tgggtgatgt 19800  
actgtatggt actgatgtga ggggaacttc ctaaattggc tagtaaatta tgccaaataa 19860  
aaagcaaaaa tgatatttct tgaaatgtta catctgagga acattgctaa aataatttat 19920  
cagtagtttt caggatgatt tatagatgtg cattgaagtg tgtacttgtg ctctctctct 19980  
cctctctctc tctctttctc tcctctctct cgtctttctt ctcttggccc cctccctcc 20040  
ctgactttcc ttcctgtccc ctccacagca gtttatattt tttttctgat aatctaactt 20100  
tgctgagggg tcaatgtaaa gcacctcag tgatgagtta gttggaatgt tccccaagaa 20160

ES 2 646 052 T3

attctatttc cagcactctt ttacatgaaa tccaagaagc tctcagacta tcttactgac 20220  
 accttgccct tcctcaacag atcaatctta tcaatgtcca tcacagatat tttgtagaac 20280  
 ggtggatcct ggcagagtct cacagatgct tctgagacaa catttgcttt caaaaaatga 20340  
 accacacaca tcctaaagat ctcagccact tcccatgttt cattttgtgt tacagcaaac 20400  
 atcacaacaa tcattcctac agatcaccac tgcattgtgat caataaaata gtttttgcaa 20460  
 caatggtact tatgataatc atcttttatt gtttacaat actgctttac aatagttatt 20520  
 cggttgcact gttcatatta gatttccaat tagctcactt aggaacataa gtccctcgaa 20580  
 cagctcagtc atctttttca ttctgtttc tatcccctac atctctttcc tttgcagacg 20640  
 actatctcct aactgaaac aggaaagctt ttaccttttt ggcattgcttg atttaaagat 20700  
 tatagaaaag ttttgacaa agaaaactca cacatgtgtg tacatatctt ttaaaaagtt 20760  
 atgtttatgc attgcacagg aatatcgaga atgctaatag gcaatgtcag agtttactgt 20820  
 ttttcaaat tagtacagtt ttattatttc taaaaactat aaaatgaata tattcacatc 20880  
 accatacaga agagtaggag gagatggcat aaagtgtcat tgttcctcct ctgcaatccc 20940  
 aggagataac taccaagcac aatttatgtc ttttaaaatt cagcccgtat ttatatacat 21000  
 atatatcaa tgtagatggg atcatgatat ctcaccacac atactcttca gtgacctgca 21060  
 ttttcacaaa caccttcac gtaactatat agaagtctac gtcttcccct taatgtctgc 21120  
 tttgtgctac attgtaaagc tctagcacag tttaaccaaa ctctattaa tgaggatttt 21180  
 agttattttt cactctttaa acaatatttc catgtgtagt cttatacata cgtctgtaca 21240  
 cacttatccc agtctaagga gttcctttta ccttccccca tcccagcatt ccctgtcacg 21300  
 cttgttgctt ccgttgagtg actttactcc tggagtataa tctgctgata gttcagttaa 21360  
 aaacatggga tctgagtta ggtcacagct ctgccactta ctgccataag ccagttcctt 21420  
 gacctctctg ccctcaagt tttgcaccta caaagtaggg gataatatta gttcctagtt 21480  
 catagagtct tgggaataat taaatgtgat gatccatgta caatgtctgg cacttagtaa 21540  
 gtgctcaata aatgtcacc tttatgattg gtattgctg tatgtctgca gagaaaatca 21600  
 ctttgtgtcc ctttataaaa aggactatgc ctttggctcag ctattttgca cattaatatt 21660  
 cacttgccaa tattaactct ccaccttaa cttgatccct ctcttctc atcttctggt 21720  
 gagacaaat gctaattctg ctattcaagg caactagcaa agctgccagt gacagaatca 21780  
 aataaaccta cccctaatct ttagaattgt agttatgatt tctgttgtaa aagttactgt 21840  
 tgtggcagtc agtattagtc tttggtctat gatagcatct ctgatctatt attgaytttc 21900  
 aattakgtat tttttttat ttattctgaa aatgtttgtt aagcatttgc taagtaaaga 21960  
 tactggackg agcctcccaa atacagggca aataaacat caaacagctt ataatttaga 22020  
 agggtagaag agaatctgaa agcaggtaaa aataaacagg cactcggctg ggcgcggtgg 22080

ES 2 646 052 T3

ctcacgcctg taatcccagc actttgggag gccgaggtgg gcggatcacg aggtcaggag 22140  
 atcgagacca tcctggctaa cacgggtgaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaatta 22200  
 gcgagggcgtg gtggcgggcg cctttagtcc cagctagtcg ggaggctgag gcaggagaat 22260  
 ggtgtgaacc cgggagggcg agcttgcaat gagccaagat cgcaccactg cactccagcc 22320  
 tgggygacag agcgagactc cgtctcaaaa aaaataaata aataaaataa aaaataatta 22380  
 ggtactctag gccccagtac ctgtctctgt actctgtaaa ttcagggtcac ctgctcaggg 22440  
 ctaatctgag agaaggcttc tcttcagttg aattttgaaa gacaattagc agttcacaag 22500  
 ctaaccagg tggacaaaga tgttcccaag cagagggagt gcttgtgaaa gctggaggcc 22560  
 atagaaaaac tctaaggagt gtaggagggt gggagtaatg tatggaaggg gtggagatgg 22620  
 aagggttaaga gagatacaag gctgcaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aatactgaaa 22680  
 aggtcttcag tgttgtgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740  
 ggcagctcca aagatggcat gcgcctggtc cagctcagta agagctgagc tcttcctgtg 22800

5 <210> 101  
 <211> 154  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 101

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

15 <210> 102  
 <211> 156  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 102

tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggccagg tggaggatga agctgactac 60  
 tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120  
 accgtcctag gtcagcccaa gtccactccc actctc 156

30 <210> 103  
 <211> 150  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 103

ES 2 646 052 T3

**tctgggaaca cagccactct gaccatcagc gggaccagc ctatggatga ggctgactat 60**  
**tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcc gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 120**  
**ctaggtcagc ccaagtccac tcccactctc 150**

5 <210> 104  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética

<400> 104  
 aggtggaac acggtgagag t 21

15 <210> 105  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintética

<400> 105  
 ccactcgggg aaaagtgga a 21

25 <210> 106  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

30 <220>  
 <223> sintética

<400> 106

35 **gcaacaattt cgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac 60**  
**caactgtatc catcttc 77**

40 <210> 107  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> sintética

<400> 107

**gcaacaatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac 60**  
**caactgtatc catcttc 77**

50 <210> 108  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

55 <220>  
 <223> sintética

	<400> 108		
		<b>gcaacaattā tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac</b>	<b>60</b>
		<b>caactgtatc catcttc</b>	<b>77</b>
5	<210> 109 <211> 77 <212> ADN <213> secuencia artificial		
10	<220> <223> sintética		
15	<400> 109		
		<b>gcaacaatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac</b>	<b>60</b>
		<b>caactgtatc catcttc</b>	<b>77</b>
20	<210> 110 <211> 74 <212> ADN <213> secuencia artificial		
25	<220> <223> sintética		
	<400> 110		
		<b>gcaacaatgt ctctcgaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat gctgcaccaa</b>	<b>60</b>
		<b>ctgtatccat cttc</b>	<b>74</b>
30	<210> 111 <211> 77 <212> ADN <213> secuencia artificial		
35	<220> <223> sintética		
	<400> 111		
		<b>gcaacaatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac</b>	<b>60</b>
40		<b>caactgtatc catcttc</b>	<b>77</b>
45	<210> 112 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial		
50	<220> <223> sintética		
	<400> 112		

	<b>gcaacaattt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca</b>	<b>60</b>
	<b>ccaactgtat ccatcttc</b>	<b>78</b>
5	<210> 113 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética  <400> 113	
	<b>caagtcggtt gtgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca</b>	<b>60</b>
	<b>ccaactgtat ccatcttc</b>	<b>78</b>
15	<210> 114 <211> 77 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética  <400> 114	
	<b>tgatgcttta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac</b>	<b>60</b>
25	<b>caactgtatc catcttc</b>	<b>77</b>
30	<210> 115 <211> 77 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética  <400> 115	
	<b>tgatgctggc ttttttggga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac</b>	<b>60</b>
	<b>caactgtatc catcttc</b>	<b>77</b>
40	<210> 116 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética  <400> 116	
	<b>ctgaatggtt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca</b>	<b>60</b>
50	<b>ccaactgtat ccatcttc</b>	<b>78</b>
	<210> 117	

ES 2 646 052 T3

	<211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial		
5	<220> <223> sintética		
	<400> 117		
	<b>agtggtaatc atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca</b>	<b>60</b>	
10	<b>ccaactgtat ccatcttc</b>	<b>78</b>	
	<210> 118 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial		
15	<220> <223> sintética		
	<400> 118		
	<b>agtggtgctt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca</b>	<b>60</b>	
	<b>ccaactgtat ccatcttc</b>	<b>78</b>	
	<210> 119 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial		
25	<220> <223> sintética		
	<400> 119		
	<b>agcagcactt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca</b>	<b>60</b>	
	<b>ccaactgtat ccatcttc</b>	<b>78</b>	
35	<210> 120 <211> 69 <212> ADN <213> secuencia artificial		
40	<220> <223> sintética		
	<400> 120		
45	<b>agcagcgctt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca</b>	<b>60</b>	
	<b>ccaactgta</b>	<b>69</b>	
	<210> 121 <211> 72 <212> ADN <213> secuencia artificial		
50	<220> <223> sintética		
55			



	<b>cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg caccggctg accgccctcg gggctgatgc</b>	<b>60</b>
	<b>tgcaccaact gtatccatc</b>	<b>79</b>
5	<210> 126 <211> 79 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética  <400> 126	
	<b>cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggctc accgtcctag gggctgatgc</b>	<b>60</b>
	<b>tgcaccaact gtatccatc</b>	<b>79</b>
15	<210> 127 <211> 79 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética  <400> 127	
	<b>cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg accgccctcg gggctgatgc</b>	<b>60</b>
25	<b>tgcaccaact gtatccatc</b>	<b>79</b>
30	<210> 128 <211> 79 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética  <400> 128	
	<b>cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg accgtcctag gggctgatgc</b>	<b>60</b>
	<b>tgcaccaact gtatccatc</b>	<b>79</b>
40	<210> 129 <211> 76 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética  <400> 129	
	<b>cagcagcact gctgtgttcg gaggaggcac ccagctgacc gccctcgggg ctgatgctgc</b>	<b>60</b>
50	<b>accaactgta tccatc</b>	<b>76</b>



<400> 134

ctactatggt ggtgctcggg tgttcggcgg agggaccaag ctgaccgtcc taggggctga 60

tgctgcacca actgtatcca tc 82

5 <210> 135  
<211> 82  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> sintética

<400> 135

ctcctatagt ggtgctcgag tattcggcgg agggaccaag ctgaccgtcc taggggctga 60

15 tgctgcacca actgtatcca tc 82

20 <210> 136  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> sintética

25 <400> 136

gagcaacttc gtgtctgtgt tcggaggagg caccagctg accgccctcg gggctgatgc 60

tgaccaact gtatccatc 79

30 <210> 137  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

35 <220>  
<223> sintética

<400> 137

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Asp Ala Ala Pro  
1 5 10 15

Thr Val Ser Ile  
20

40 <210> 138  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

45 <220>  
<223> sintética

<400> 138

50

gcaggcagca acaatttaag tcttcggaac tgggaccaag gtcaccgtcc taggtcagcc 60  
 caagtccact cccactctc 79

5 <210> 139  
 <211> 81  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 139

gacagcagtg gtaatcatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggtcag 60  
 cccaagtcca ctcccactct c 81

15 <210> 140  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> sintética  
 <400> 140

gacagcagca ctgccgtctt cggaaactggg accaagggtca ccgtcctagg tcagcccaag 60  
 tccactccca ctctc 75

30 <210> 141  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> sintética  
 <400> 141

**Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser Thr**  
**1 5 10 15**

**Pro Thr Leu**

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1 de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de V $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 2 del grupo génico V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón endógeno, en el que el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno comprende los segmentos génicos C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4 y C $\lambda$ 4 endógenos.
- 10 2. El ratón genéticamente modificado de la reivindicación 1, en el que el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno comprende el potenciador 2.4 de ratón endógeno o el potenciador 3' de ratón endógeno.
- 15 3. El ratón genéticamente modificado de la reivindicación 1, en el que el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno comprende adicionalmente segmentos génicos V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos no reordenados unidos operativamente al segmento génico C $\lambda$ 2 endógeno.
- 20 4. El ratón genéticamente modificado de la reivindicación 1, en el que el ratón comprende adicionalmente en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\kappa$  endógeno que comprende un reemplazo de los segmentos génicos V $\kappa$  y J $\kappa$  endógenos con segmentos génicos V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos no reordenados, y en el que los segmentos génicos V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos están unidos operativamente a un gen C $\kappa$  de ratón endógeno, de forma que el ratón expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una región variable  $\lambda$  humana fusionada con una región constante  $\kappa$  de ratón.
- 25 5. El ratón genéticamente modificado de la reivindicación 4, en el que el ratón comprende adicionalmente una secuencia de región intergénica V $\kappa$ -J $\kappa$  humana emplazada entre los segmentos génicos V $\lambda$  humanos y los segmentos génicos J $\lambda$  humanos.
- 30 6. Una célula de ratón que comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1 de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de V $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 2 del grupo génico V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón endógeno, en el que el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno conserva los segmentos génicos C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4 y C $\lambda$ 4 endógenos.
- 35 7. La célula de ratón de la reivindicación 6, en la que el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno comprende el potenciador 2.4 de ratón endógeno o el potenciador 3' de ratón endógeno.
- 40 8. La célula de ratón de la reivindicación 6, en la que la célula es una célula B, un hibridoma o una célula ES.
- 45 9. Una célula aislada de, o que se puede obtener de, el ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la célula comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1 de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de V $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 2 del grupo génico V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón endógeno, en el que el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno conserva los segmentos génicos C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4 y C $\lambda$ 4 endógenos.
- 50 10. La célula aislada de la reivindicación 9, en la que la célula es una célula B o un hibridoma.
- 55 11. Un embrión de ratón que comprende, está creado a partir de o se puede obtener de, la célula ES de ratón de la reivindicación 8, en el que el embrión de ratón comprende en su genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno que comprende una delección del grupo génico V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1 de ratón endógeno y una delección de una región que abarca de V $\lambda$ 2 a J $\lambda$ 2 del grupo génico V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4 de ratón endógeno, en el que el locus de inmunoglobulina de cadena ligera  $\lambda$  endógeno conserva los segmentos génicos C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 4 y C $\lambda$ 4 endógenos.

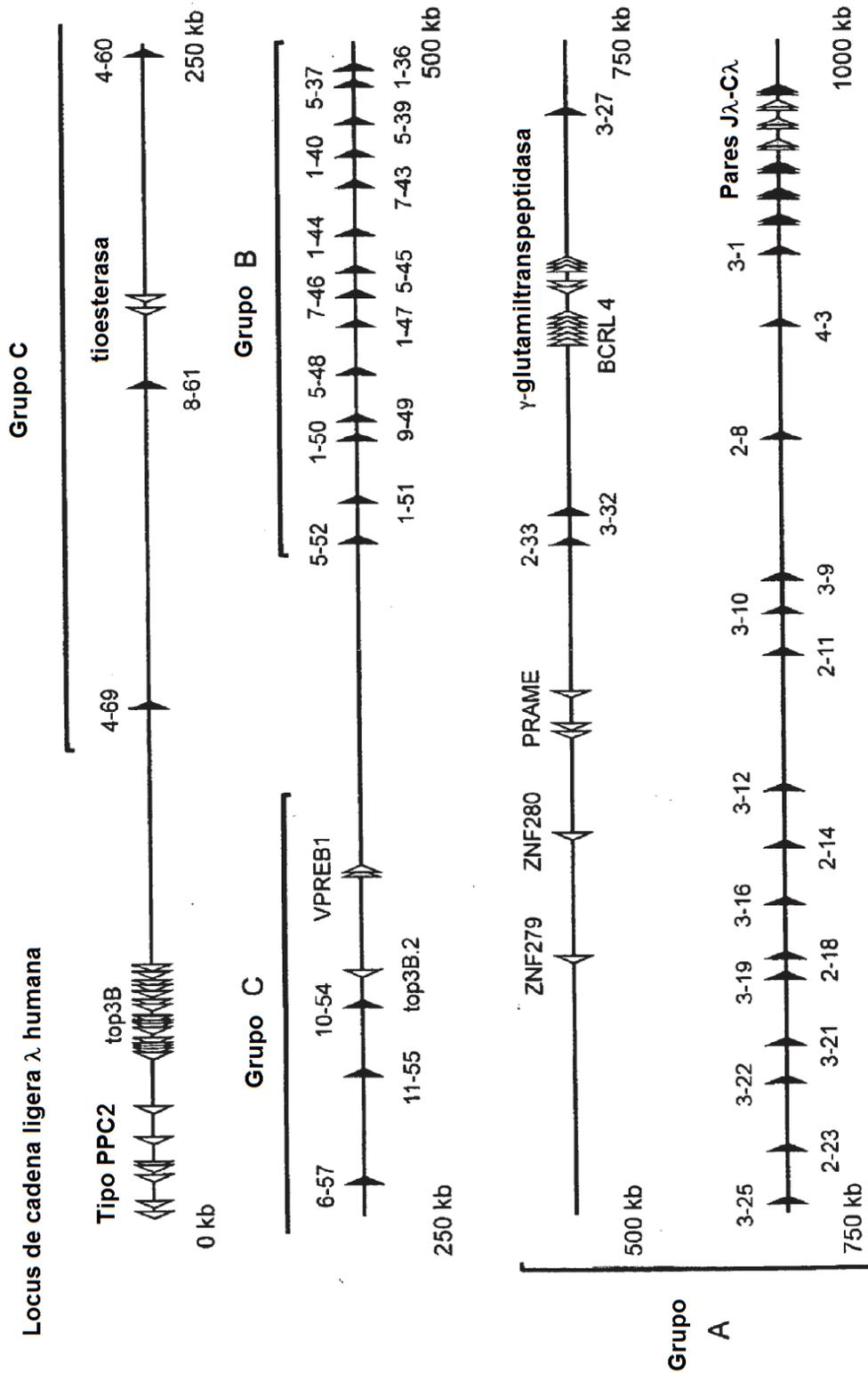


FIG. 1

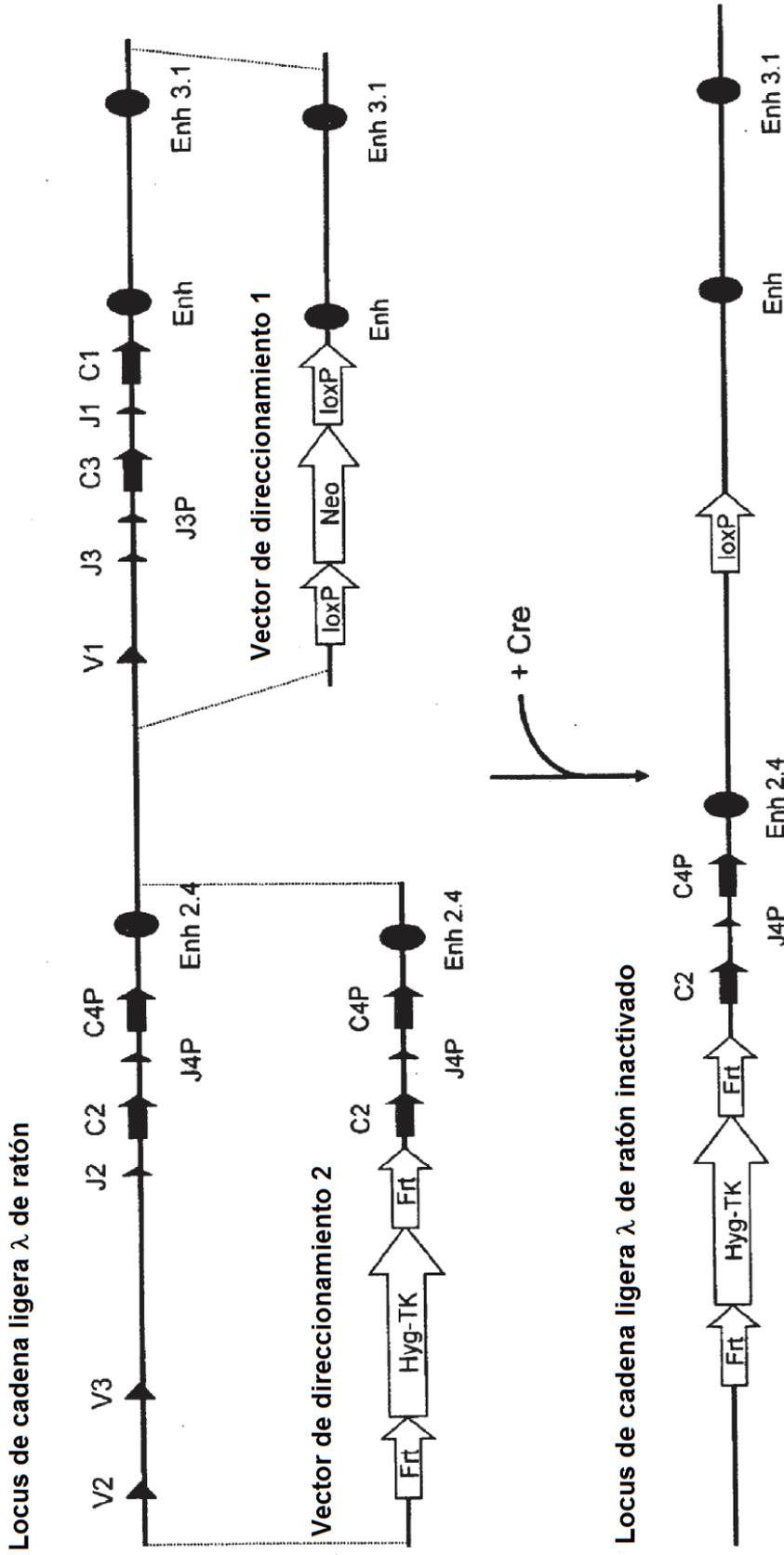


FIG. 2

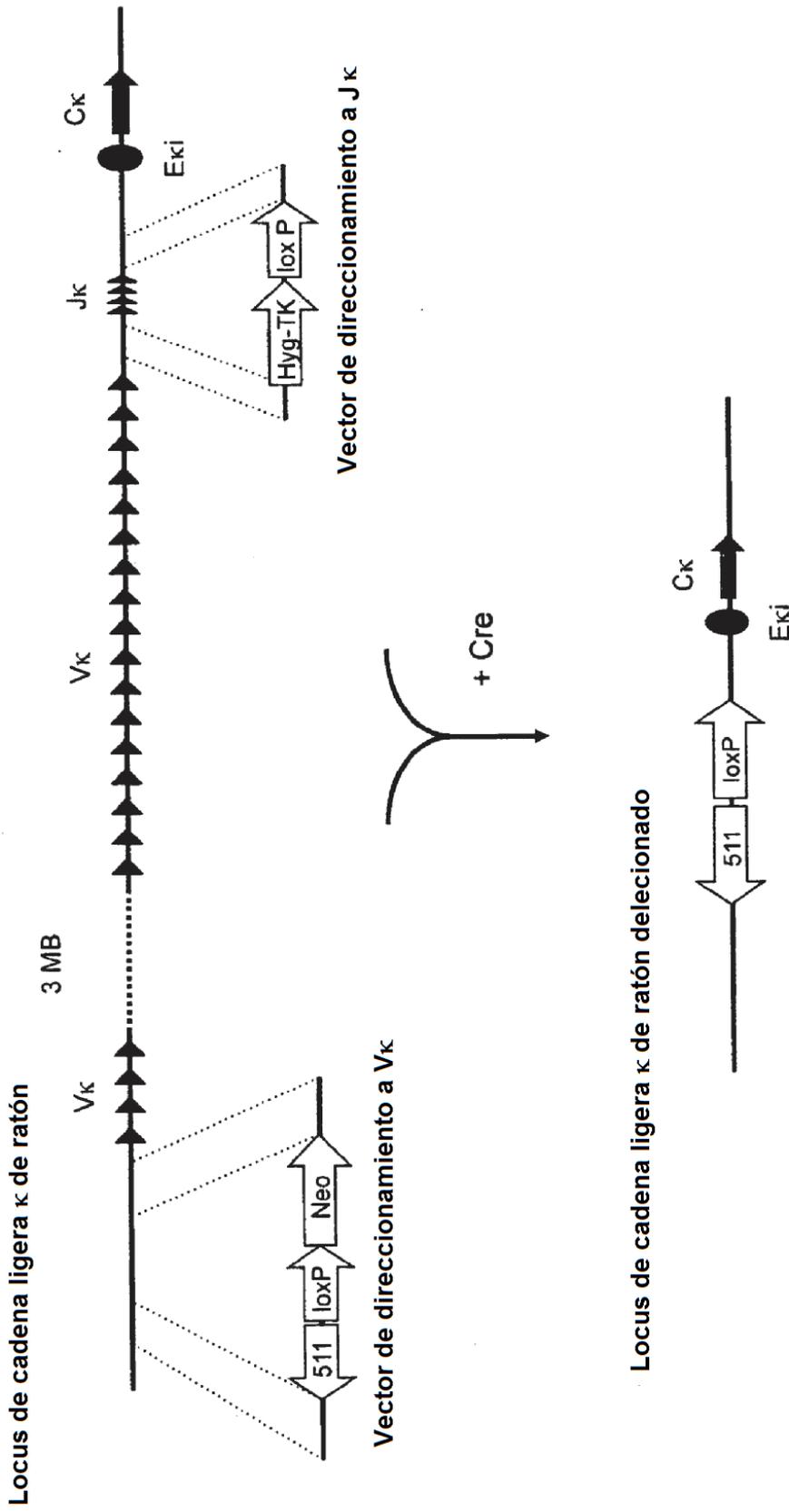


FIG. 3

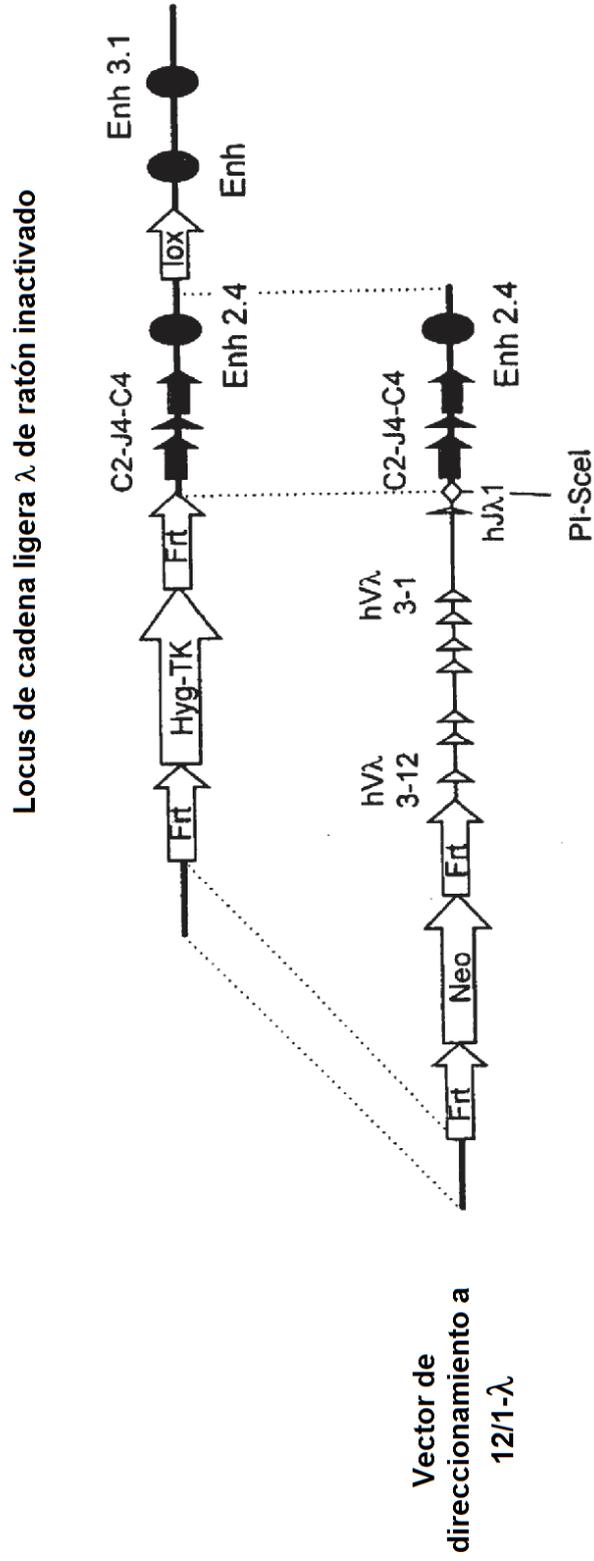
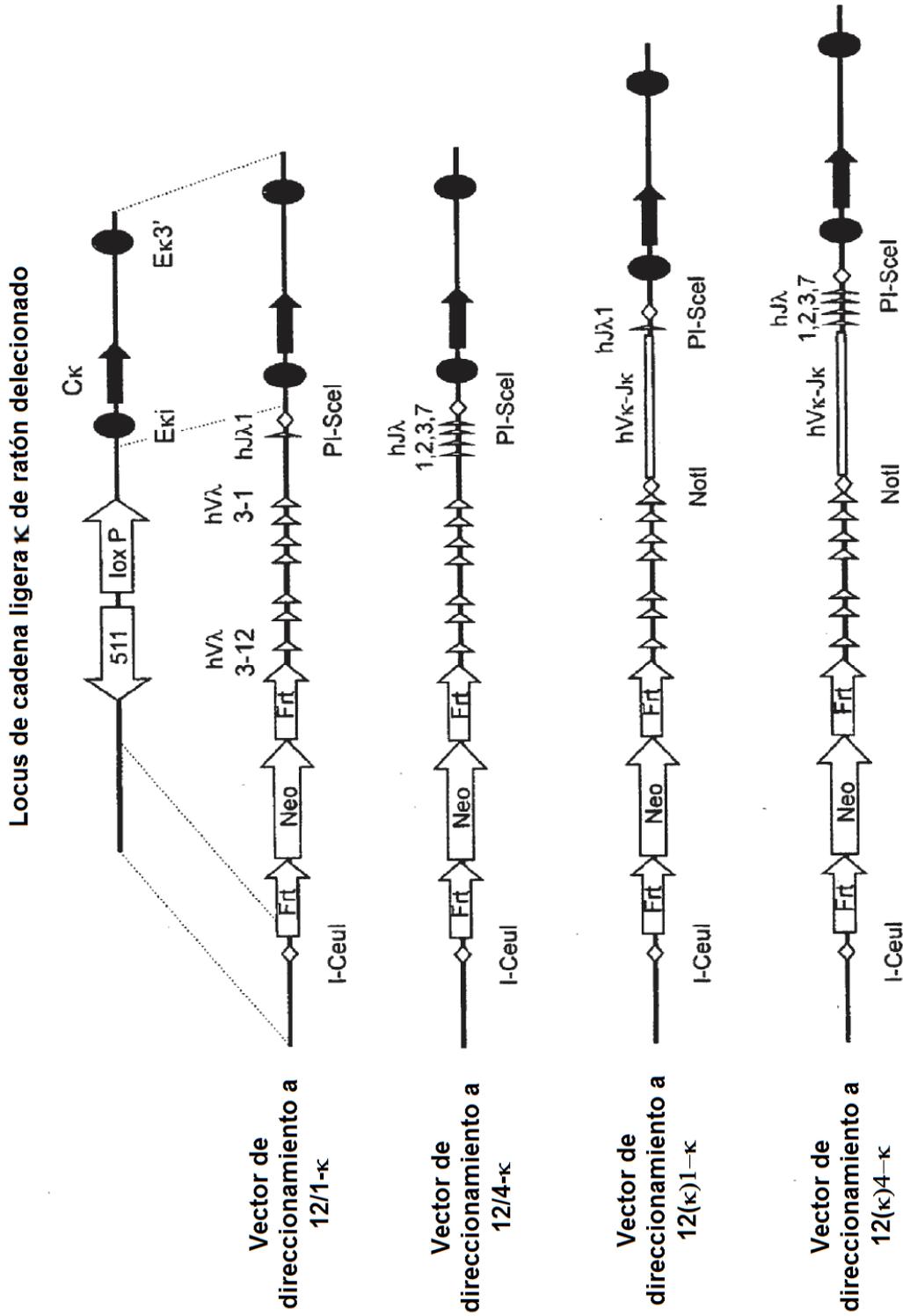


FIG. 4A



**FIG. 4B**

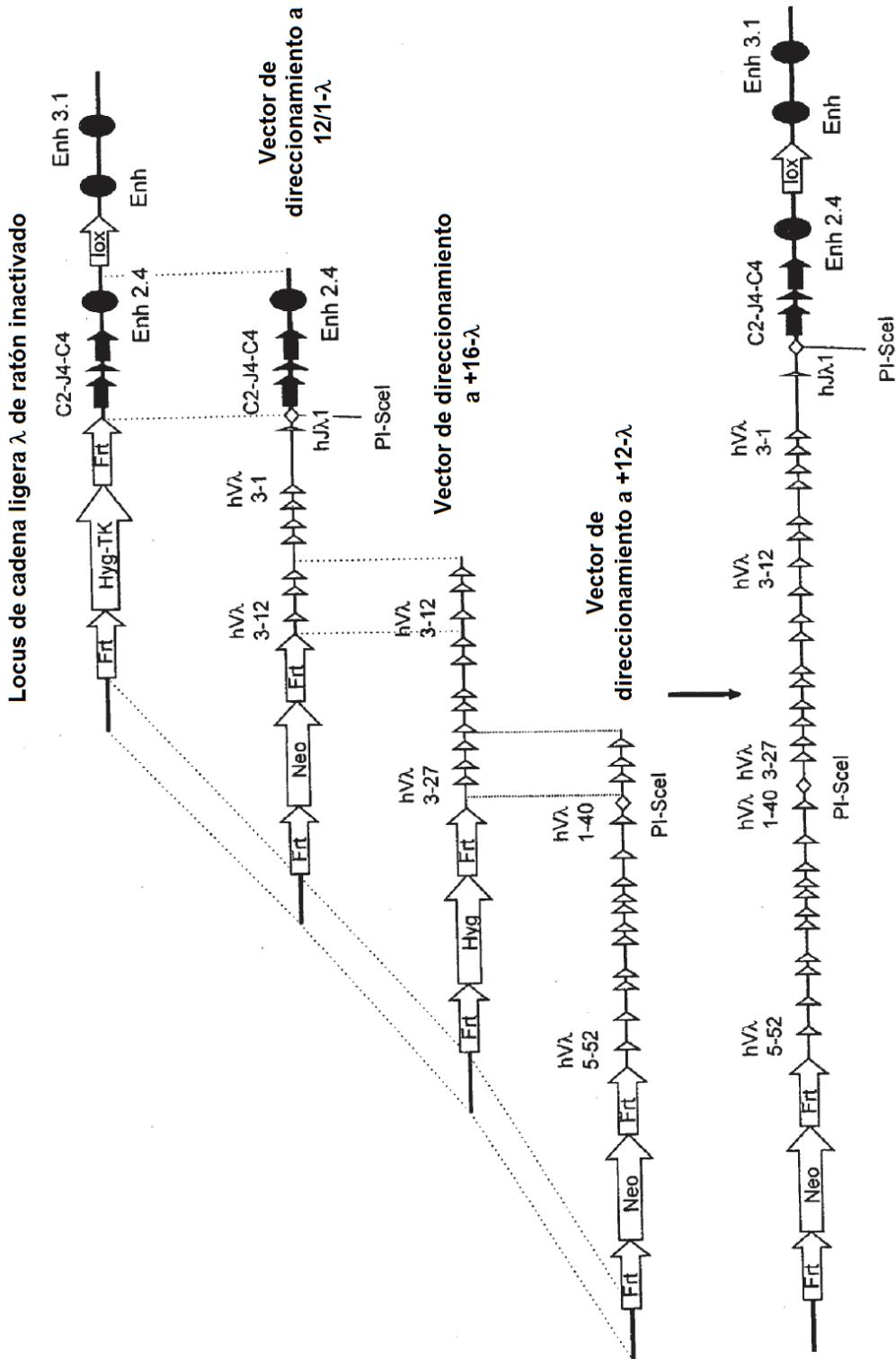


FIG. 5A

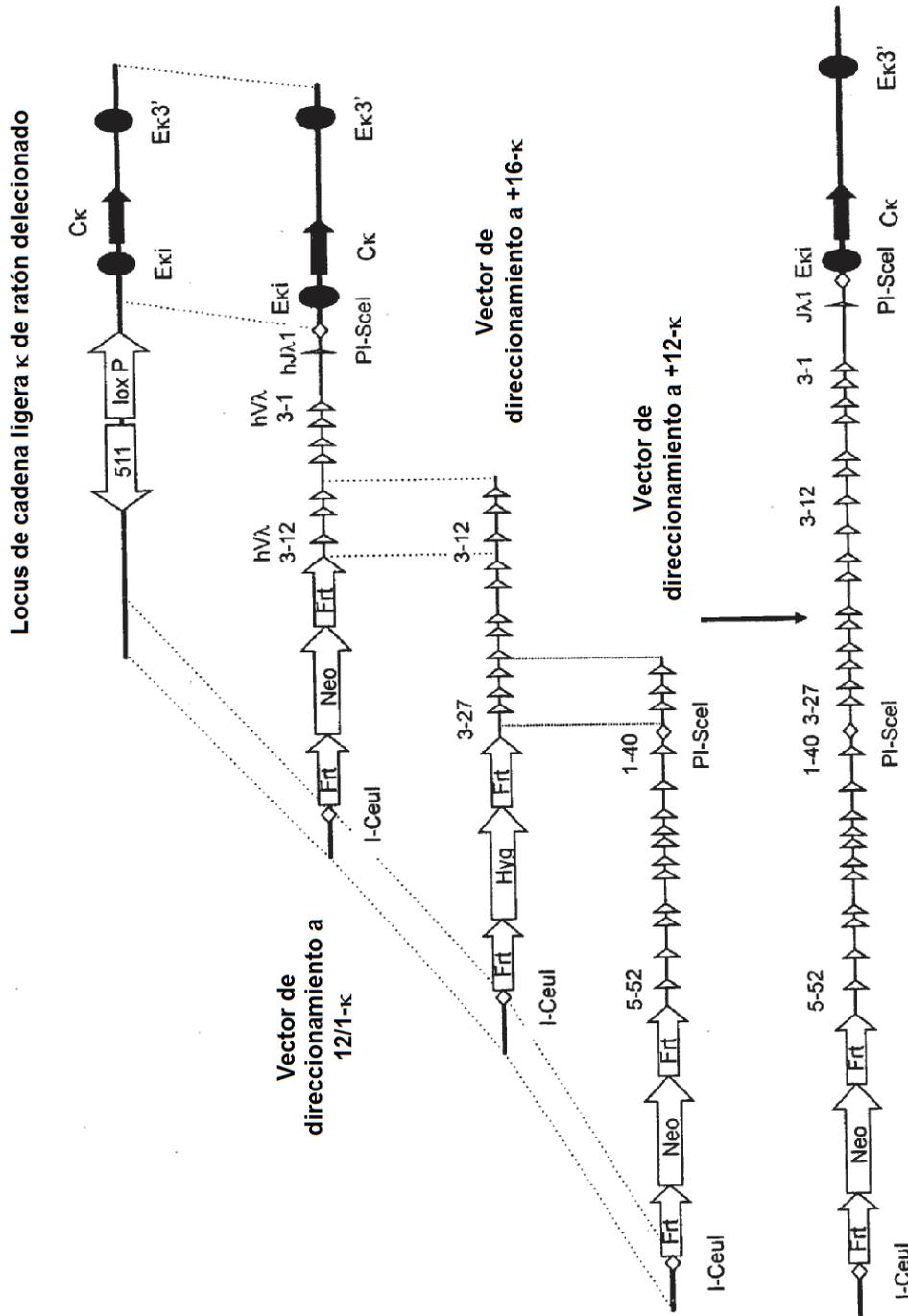


FIG. 5B

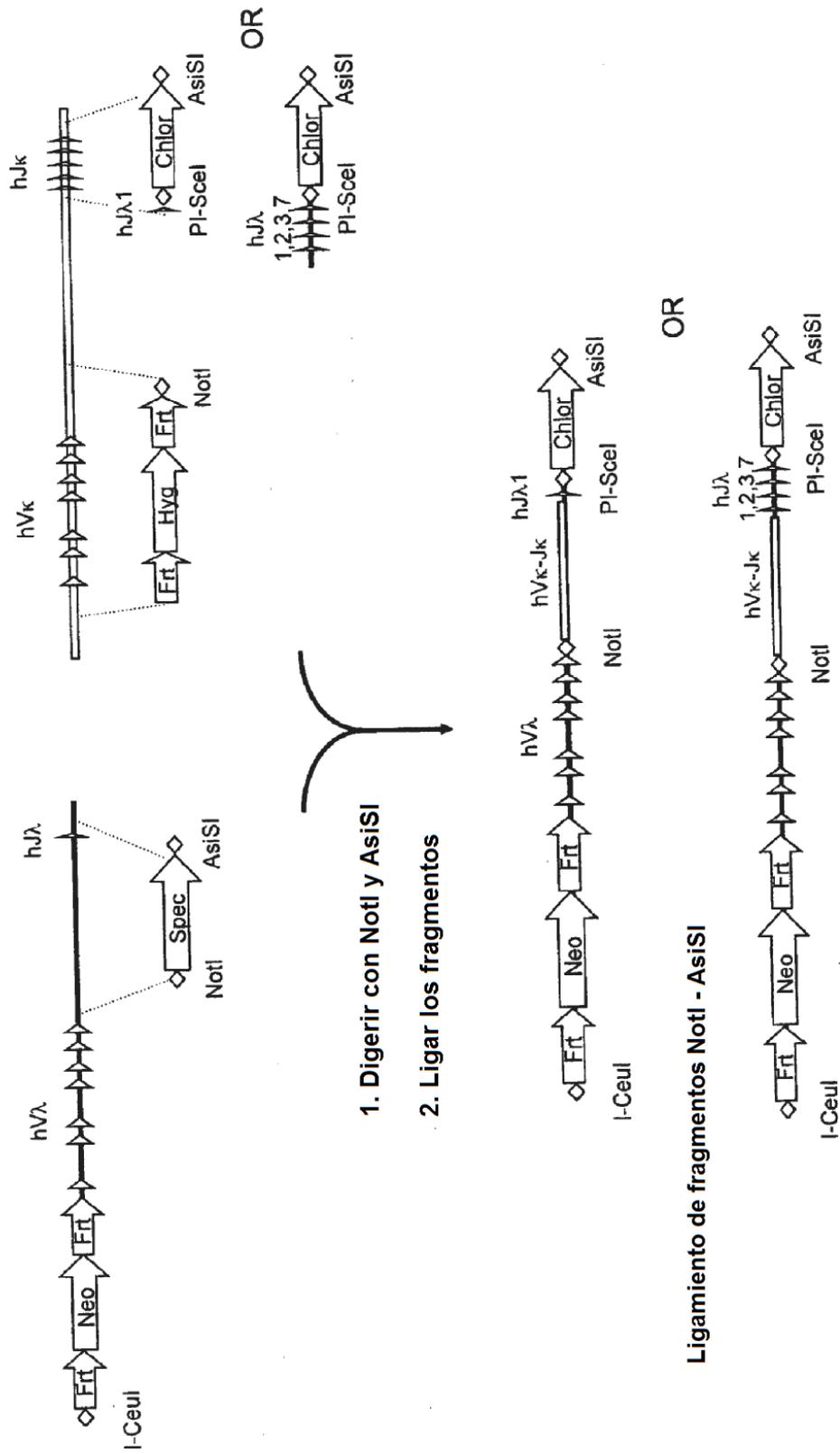


FIG. 6

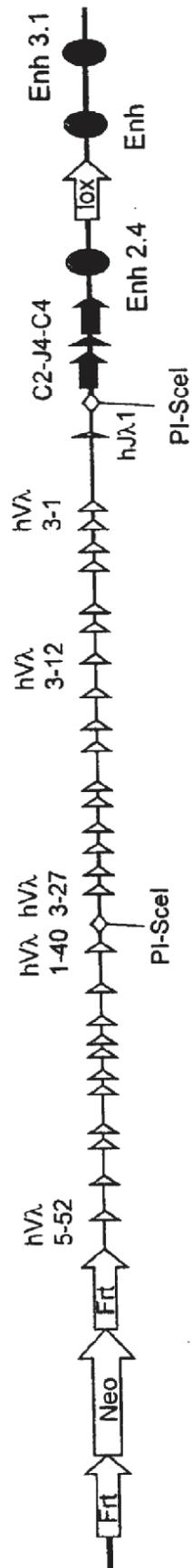


FIG. 7A

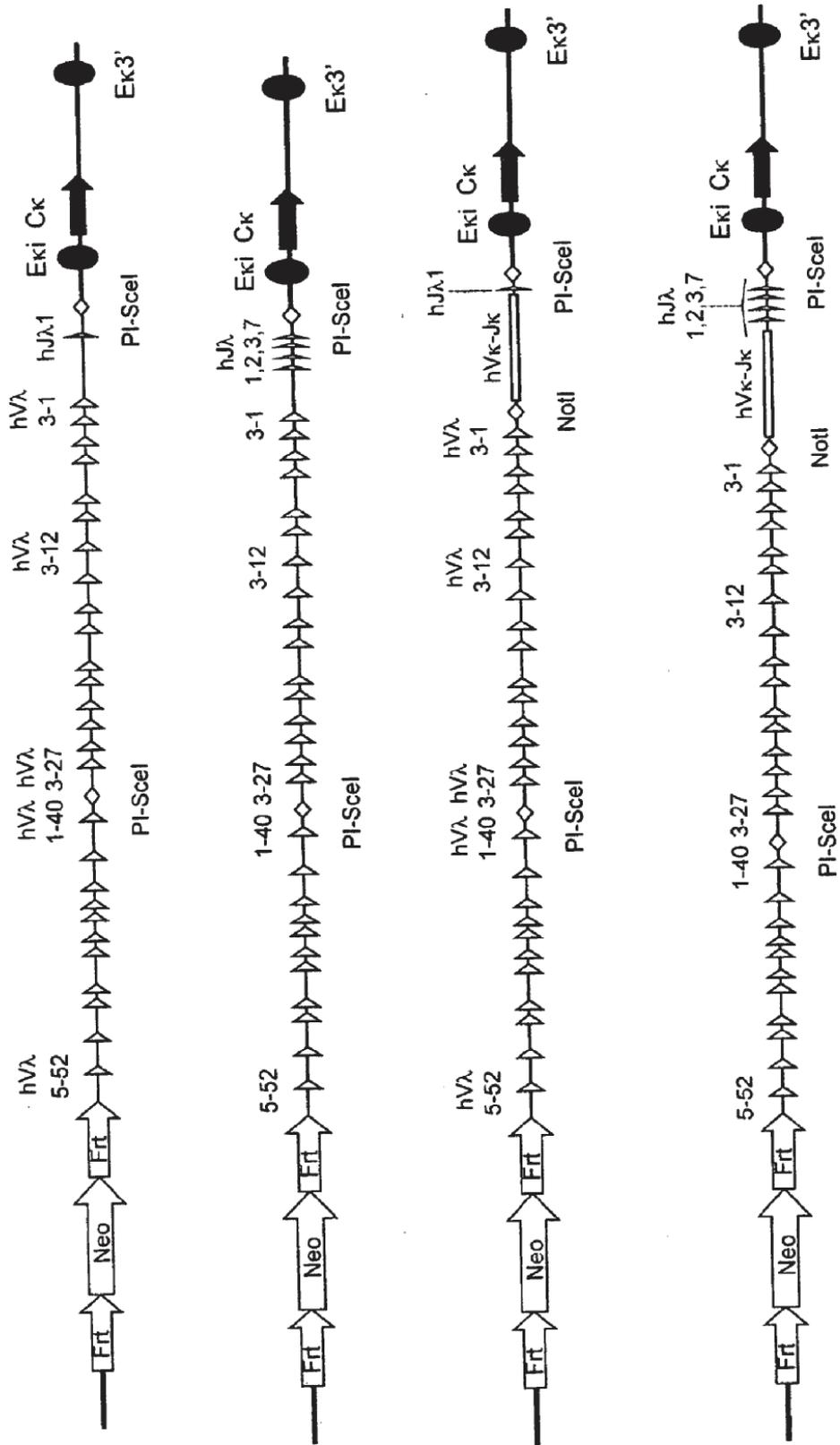


FIG. 7B

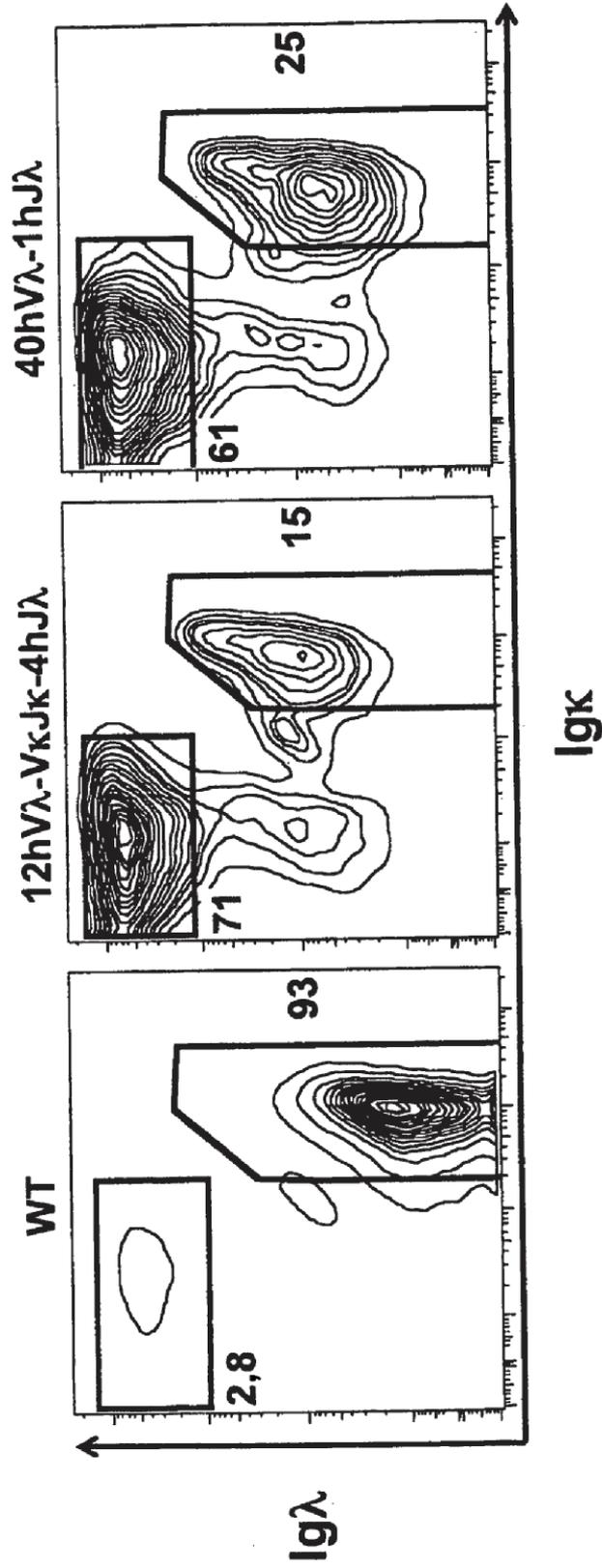


FIG. 8A

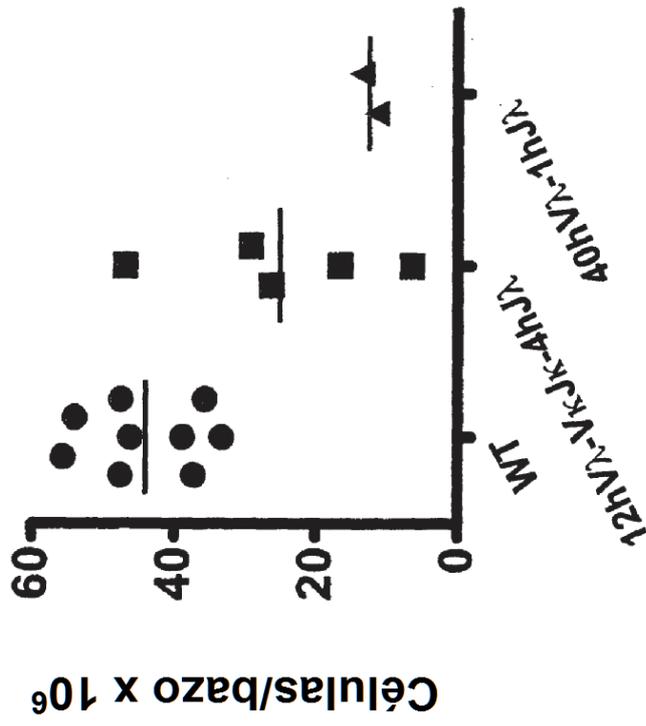


FIG. 8B

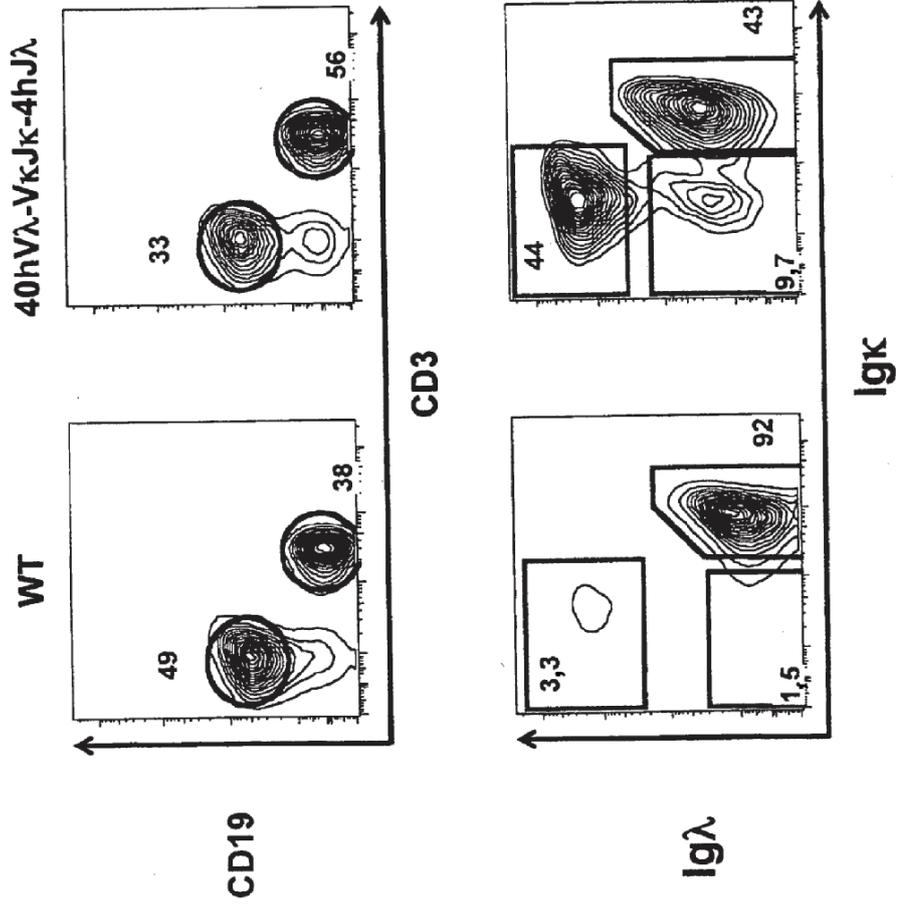


FIG. 9A

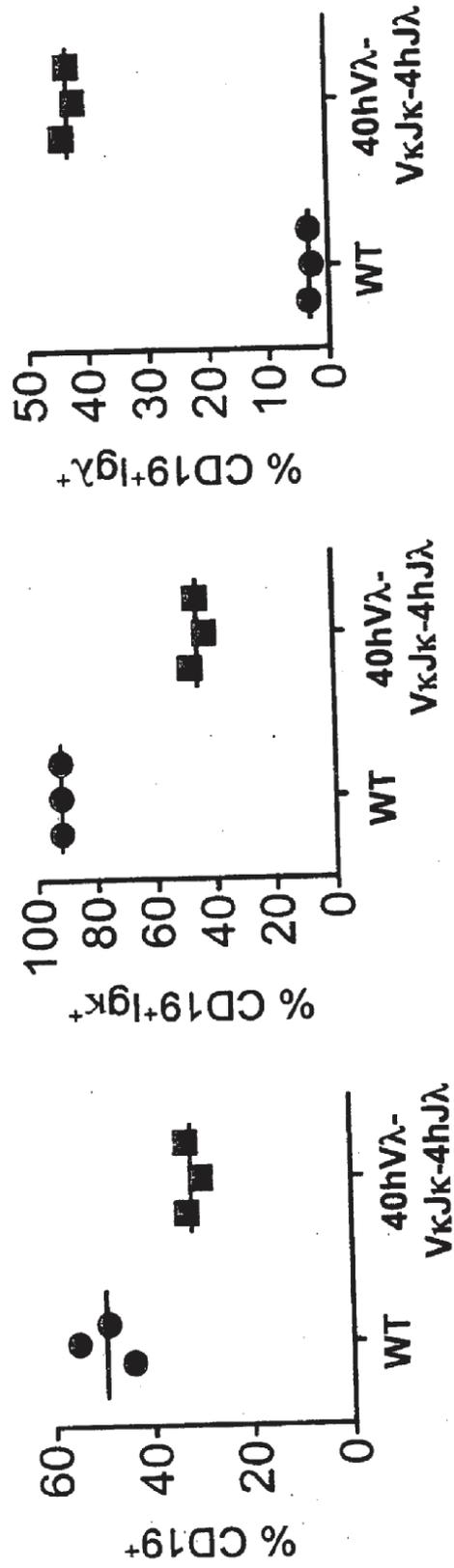


FIG. 9B

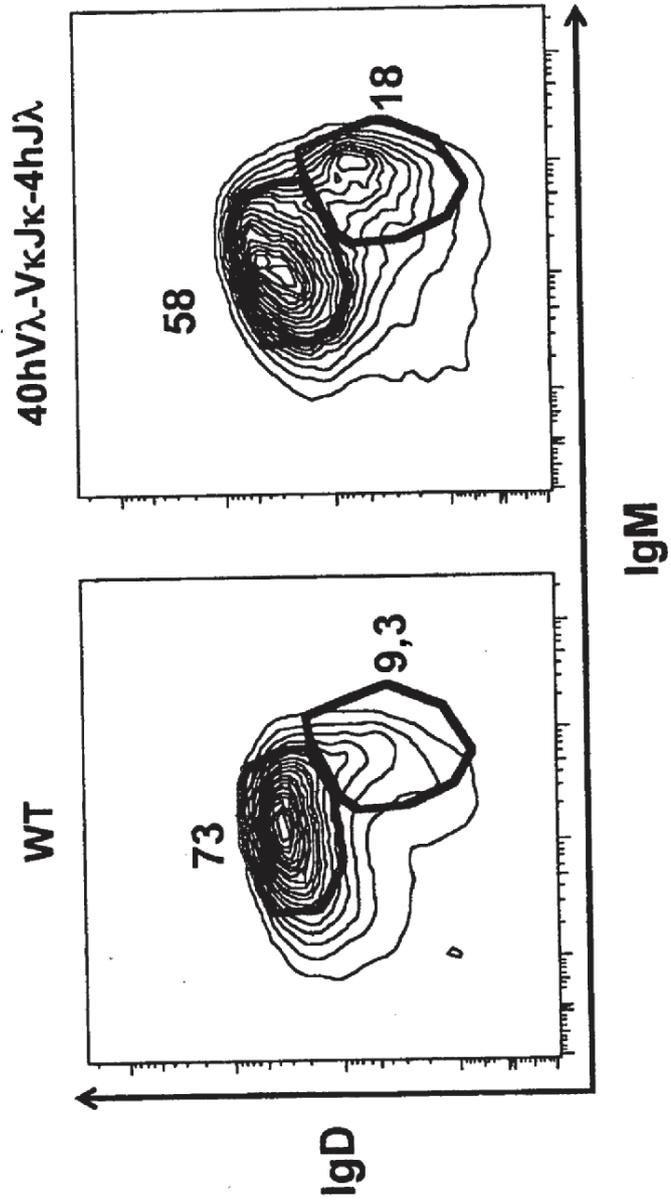


FIG. 9C

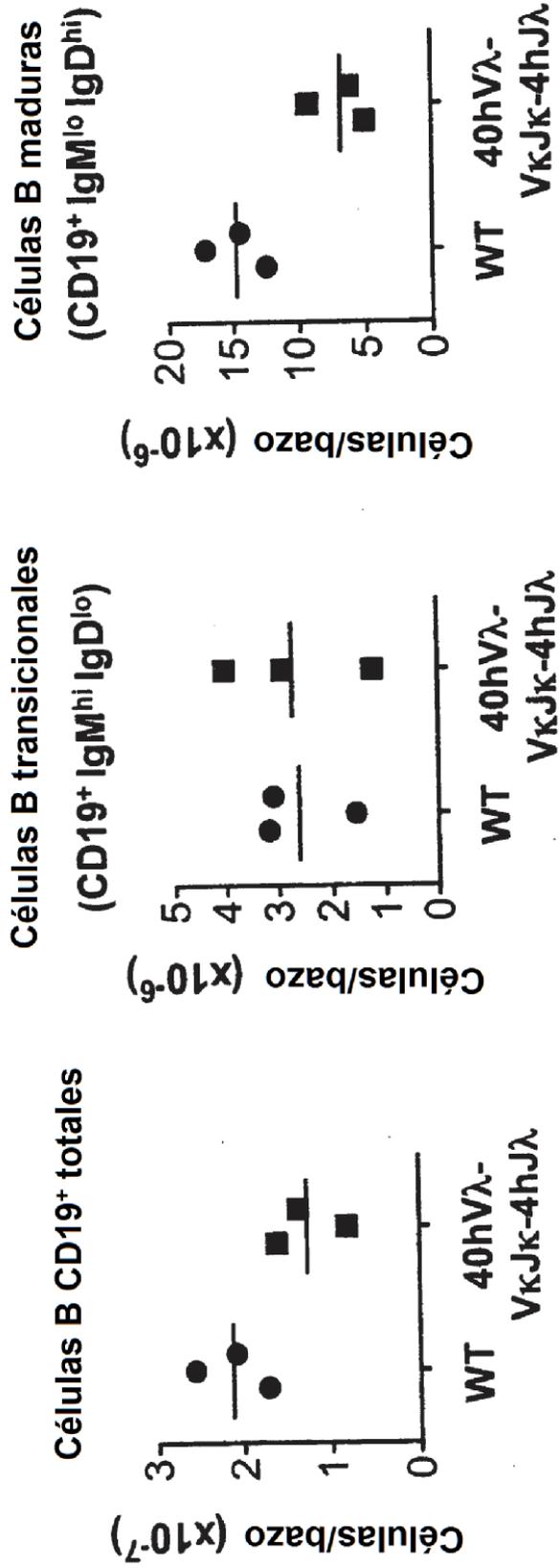


FIG. 9D

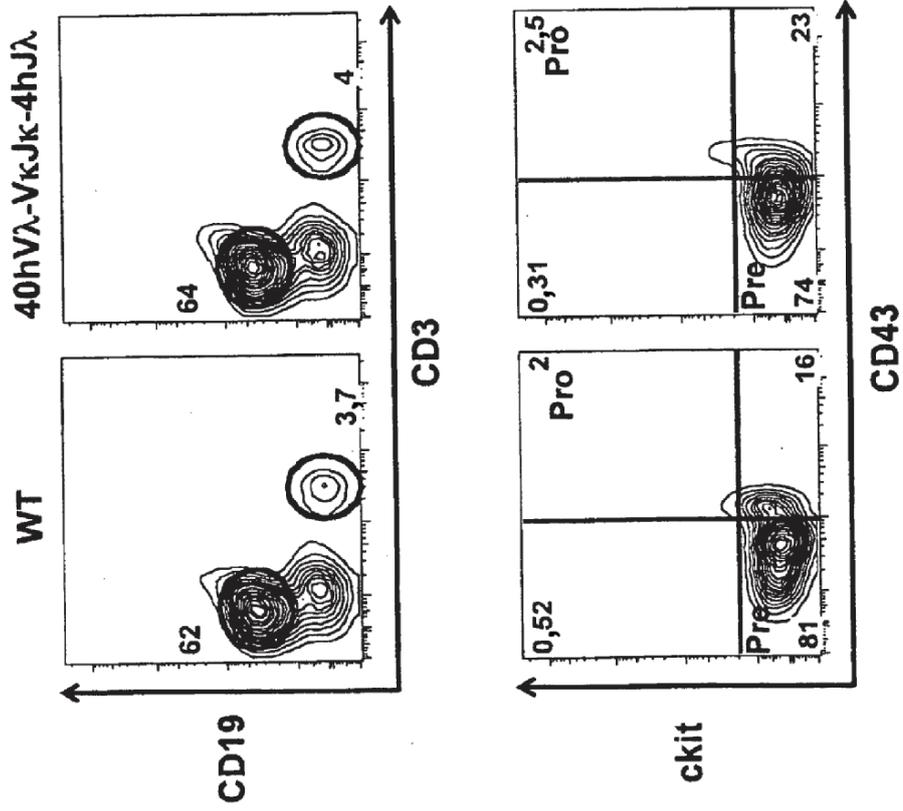


FIG. 10A

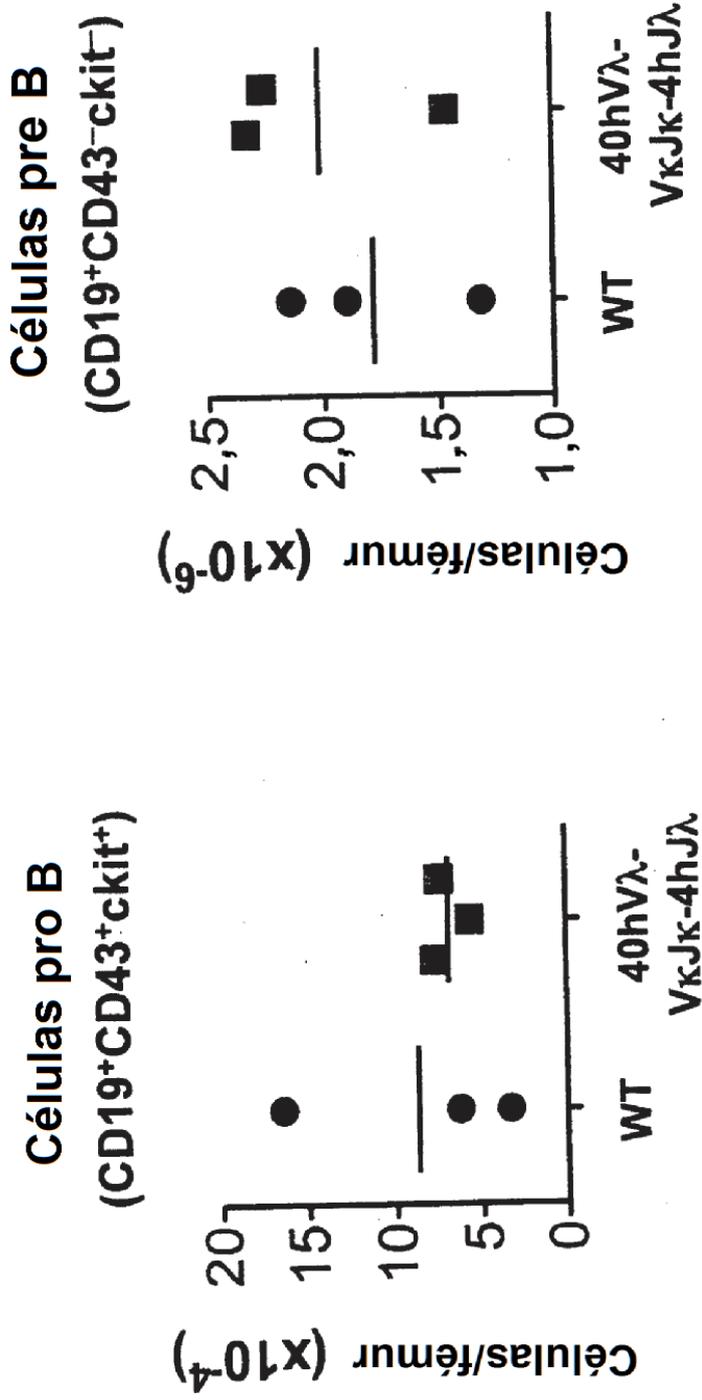


FIG. 10B

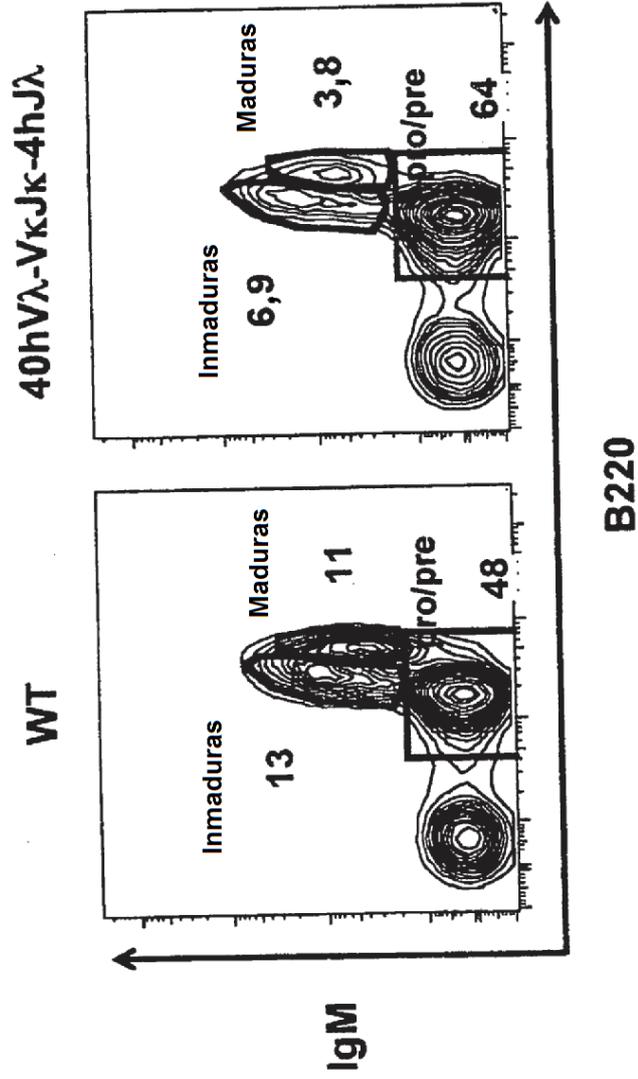


FIG. 10C

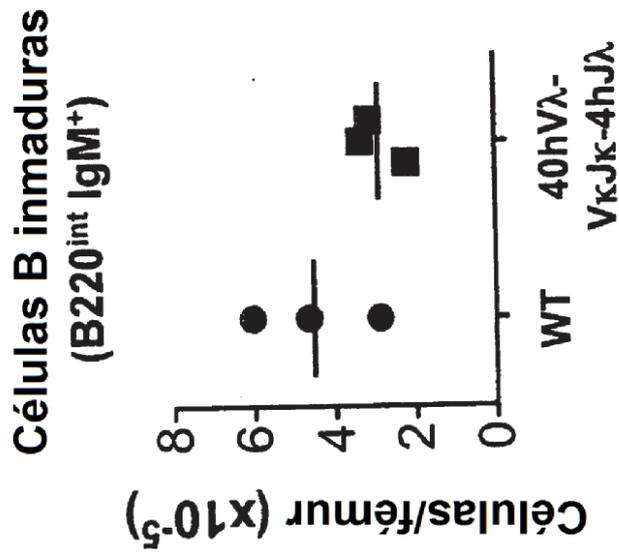
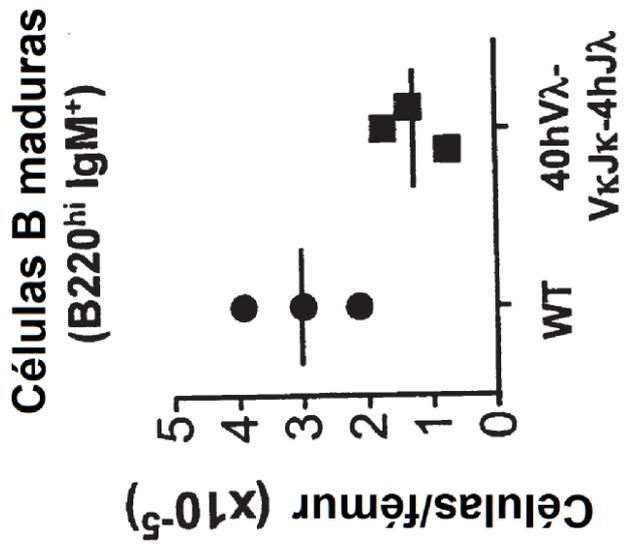


FIG. 10D

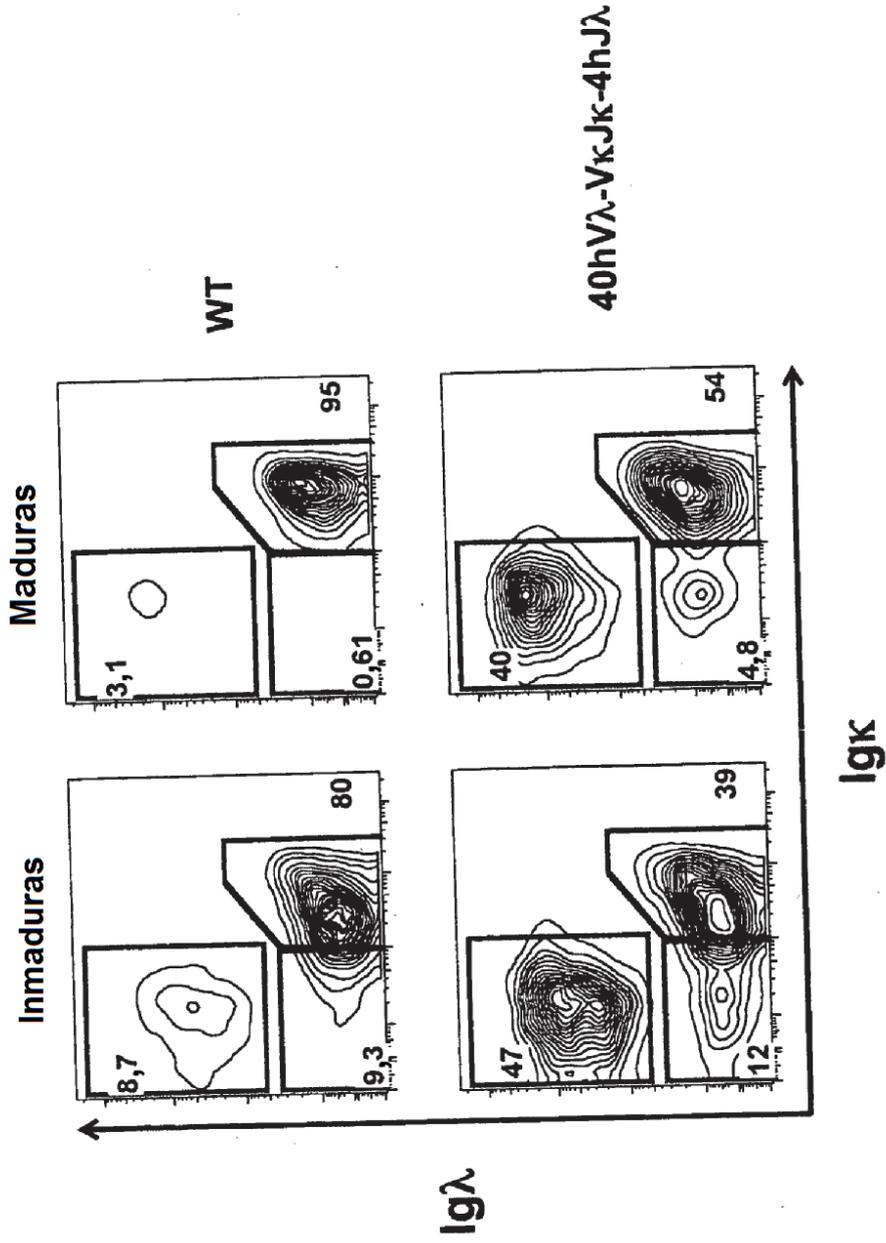


FIG. 10E

	λ1 humano	Cκ de ratón 5'
A6	<u>GCAACAATT</u>	<u>GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC</u>
B6	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F6	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
B7	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E7	GCAACAAT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F7	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
C8	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E12	CAAGTCGGTT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-4	TGAGTGCT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-20	TGAGTGCg	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
3B43	CTGAATGGT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-8	AGTGGTAAT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-19	AGTGGTGCT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1010	AGCAGCACT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
11A1	AGCAGCGCT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
7A8	GGTGGTGCT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
3A3	AGTAGCACT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
2-7	AGCAGCACT	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
FWR4		F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F

FIG. 11

	Vλ humano 3'	Jλ humano	Cκ de ratón 5'
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTCCGGAGGAGGCACCCGGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACCTGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCCGGAGGAGGCACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCAGGAGGCACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACCTGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
5-7	CTACTAIGGTGGTGCTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGCTCGa	GTAATTCGGCAGGAGGCACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCACCAACTGTATCCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

FIG. 12

	Vλ humano 3'	Jλ1 humano	Cλ2 de ratón 5'
2D1	<u>GCAGGCAGCAACAATTa</u>	<u>aGTC TTCGGAAC TGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG</u>	<u>GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCACTCTC</u>
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTCTTCGGAAC TGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTCTTCGGAAC TGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCACTCTC
<b>FWR4</b>		<b>F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L</b>	

FIG. 13