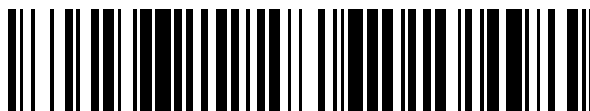


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 749**

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)
C12N 15/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011** E 16154526 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019** EP 3034608

54 Título: **Ratones que expresan una cadena ligera híbrida de inmunoglobulina con una región variable humana**

30 Prioridad:

22.06.2010 US 357317 P
22.06.2010 US 357314 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 721 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones que expresan una cadena ligera híbrida de inmunoglobulina con una región variable humana

5 **Campo**

Ratones modificados genéticamente que comprenden un segmento genético variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana ($hV\lambda$) sin reordenar y un segmento genético que se une a λ humana ($hJ\lambda$) unidos de forma operativa con una región constante de cadena ligera kappa (κ) de ratón ($C\kappa$). Ratones modificados genéticamente que expresan anticuerpos que comprenden una cadena ligera que procede de un segmento genético de $V\lambda$ humano, un segmento genético de $J\lambda$ humano y un gen de $C\kappa$ de ratón.

Antecedentes

15 En la técnica se conocen ratones que expresan anticuerpos que son totalmente humanos, o parcialmente humanos y parcialmente de ratón. Por ejemplo, se ha informado sobre ratones transgénicos que expresan anticuerpos totalmente humanos a partir de transgenes que contienen genes de región variable de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada humanas. También se conocen ratones modificados genéticamente que comprenden una sustitución de los segmentos genéticos de región variable de cadena pesada (HCVR) de ratón endógenos y segmentos genéticos de región variable de cadena ligera (LCVR) kappa (κ) con segmentos genéticos de HCVR y LCVR humanas y la preparación de anticuerpos quiméricos con una cadena kappa quimérica de ser humano/ratón.

25 Las cadenas ligeras de anticuerpo se codifican con uno de dos loci separados: kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas ligeras de anticuerpos de ratón son principalmente de tipo κ . La proporción de uso de cadena ligera de κ a λ en seres humanos es aproximadamente de 60:40, mientras que en ratones es de aproximadamente 95:5. El uso sesgado de cadenas ligeras κ en ratones se sustenta de acuerdo con informes en ratones modificados genéticamente capaces de expresar anticuerpos total o parcialmente humanos. Por lo tanto, parece que los ratones que expresan anticuerpos total o parcialmente humanos están limitados en el uso de la variable lambda.

30 En la técnica existe una necesidad de generar regiones variables lambda, ya sean de ratón o de ser humano, para uso en la preparación de proteínas de unión a epítipo. En la técnica existe una necesidad de ratones que expresen anticuerpos total o parcialmente humanos, los que los ratones presenten un aumento del uso de la variable lambda ($V\lambda$).

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

Sumario

40 La invención, en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes. Se desvelan ratones modificados genéticamente, embriones, células, tejidos, así como construcciones de ácido nucleico para modificación de ratones, y métodos y composiciones para su preparación y uso. Se proporcionan ratones y las células que generan regiones variables lambda (λ) humanas en el contexto de una cadena ligera kappa (κ) de ratón como se menciona en las reivindicaciones. También se desvelan ratones y células que generan regiones variables λ humanas en el contexto de una cadena ligera κ o una cadena ligera λ , por ejemplo, a partir de un locus endógeno de cadena ligera de ratón. También se desvelan métodos para preparar anticuerpos que comprenden regiones variables lambda. También se desvelan métodos para seleccionar cadenas pesadas que se expresan con regiones variables lambda afines.

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

55 La presente invención proporciona un ratón que comprende:

un segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H) sin reordenar, un segmento genético de diversidad de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hD_H) sin reordenar y un segmento genético que se une a cadena pesada de inmunoglobulina humana (hJ_H) sin reordenar que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena pesada (C_H) de inmunoglobulina de ratón, y
 60 un segmento genético variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana ($hV\lambda$) sin reordenar y un segmento genético que se une a λ humana ($hJ\lambda$) que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena ligera κ ($C\kappa$) de inmunoglobulina de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del segmento genético $C\kappa$ (denominado $E\kappa i$)
 65 y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del segmento genético $C\kappa$ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen,

en donde el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia $V_H-D_H-J_H$ humana reordenada y una secuencia C_H de ratón, y una cadena ligera que comprende una secuencia V_L-J_L humana reordenada y una secuencia C_k de ratón.

5 La invención también proporciona:

10 una célula aislada que expresa un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia $V_H-D_H-J_H$ humana reordenada y una secuencia C_H de ratón, y una cadena ligera que comprende una secuencia V_L-J_L humana reordenada y una secuencia C_k de ratón, en la que la célula proviene, o se puede obtener de, el ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y en el que la célula comprende un hV_H , un hD_H y un hJ_H que están unidos de forma operativa a un gen C_H , y

15 un hV_L y un hJ_L que están unidos de forma operativa a un gen C_k de ratón en un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón endógeno, en el que en dicho locus el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen C_k (denominado $E_{\kappa I}$) y el amplificador 3' de κ aguas abajo del gen C_k (denominado $E_{\kappa 3'}$) se mantienen; una célula madre embrionaria (ES) de ratón aislada que comprende:

20 un segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H) sin reordenar, un segmento genético de diversidad de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hD_H) sin reordenar y un segmento genético que se une a cadena pesada de inmunoglobulina humana sin reordenar (hJ_H) que están unidos de forma operativa a un gen de cadena pesada (C_H) de inmunoglobulina de ratón, y

25 un segmento genético variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana (hV_L) sin reordenar y un segmento genético que se une a λ humana (hJ_L) que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena ligera κ (C_k) de inmunoglobulina de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen C_k (denominado $E_{\kappa I}$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen C_k (denominado $E_{\kappa 3'}$) se mantienen;

un embrión de ratón que comprende, se puede preparar, o se puede obtener a partir de dicha célula ES,

30 en el que el embrión de ratón comprende:

35 un segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H) sin reordenar, un segmento genético de diversidad de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hD_H) sin reordenar y un segmento genético que se une a cadena pesada de inmunoglobulina humana (hJ_H) sin reordenar que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena pesada (C_H) de inmunoglobulina de ratón, y

40 un segmento genético variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana (hV_L) sin reordenar y un segmento genético que se une a λ humana (hJ_L) que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena ligera κ (C_k) de inmunoglobulina de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen C_k (denominado $E_{\kappa I}$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen C_k (denominado $E_{\kappa 3'}$) se mantienen;

45 un hibridoma que comprende una secuencia genética de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada del ratón de la reivindicación 1, la secuencia reordenada que comprende un segmento genético hV_L , un segmento genético de hJ_V y un gen C_k de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen C_k (denominado $E_{\kappa I}$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen C_k (denominado $E_{\kappa 3'}$) se mantienen, donde el hibridoma expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia V_L-J_L humana reordenada y una secuencia C_k de ratón; y

50 uso de un linfocito B de la invención para preparar un hibridoma que comprende una secuencia genética de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada del ratón de la reivindicación 1, la secuencia reordenada que comprende un segmento genético hV_L , un segmento genético de hJ_V y un gen C_k de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen C_k (denominado $E_{\kappa I}$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen C_k (denominado $E_{\kappa 3'}$) se mantienen, donde el hibridoma expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia V_L-J_L humana reordenada y una secuencia C_k de ratón.

60 La presente invención también proporciona un ratón que comprende:

65 (a) un segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H) sin reordenar, un segmento genético de diversidad de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hD_H) sin reordenar y un segmento genético que se une a cadena pesada humana de inmunoglobulina humana (hJ_H) sin reordenar que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena pesada (C_H) de inmunoglobulina de ratón;

- (b) de 12 a 40 segmentos genéticos de región variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana ($hV\lambda$) no reordenados y al menos un segmento genético $J\lambda$ humano ($hJ\lambda$) que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena ligera κ ($C\kappa$) de inmunoglobulina de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón; en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa i$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen;
- y
- (c) una secuencia de ácidos nucleicos intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana localizada entre los 12 a 40 segmentos genéticos de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y la al menos una secuencia de ácidos nucleicos $J\lambda$ humana;
- en la que el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia V_H - D_H - J_H humana reordenada y una secuencia C_H de ratón, y una cadena ligera que comprende una secuencia $V\lambda$ - $J\lambda$ humana reordenada y una secuencia $C\kappa$ de ratón.
- La presente invención también proporciona un método para preparar un anticuerpo en un ratón, método que comprende: (a) exponer un ratón de la invención a un antígeno; (b) permitir que el ratón desarrolle una respuesta inmune al antígeno; y (c) aislar a partir del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce de forma específica el antígeno, o aislar a partir del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce de forma específica el antígeno, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada derivada de un segmento genético V_H humano, un segmento genético D_H humano, un segmento genético J_H humano y un gen C_H de ratón, y una cadena ligera derivada de un segmento genético $V\lambda$ humano, un segmento genético $J\lambda$ humano y un gen $C\kappa$ de ratón
- Se desvelan anticuerpos que comprenden (a) un dominio variable de cadena pesada humana (hV_H) fusionado con una región constante de cadena pesada de ratón, y (b) una $V\lambda$ humana fusionada con un dominio C_L ; incluyendo en los que uno o más de los dominios variables se mutan de forma somática, por ejemplo, durante la selección de anticuerpo o célula inmune en un ratón de la invención. El $hV\lambda$ sin reordenar y el $hJ\lambda$ sin reordenar están unidos de forma operativa con una región constante κ ($C\kappa$) humana o de ratón.
- También se desvela un ratón que comprende, en su línea germinal, en un locus endógeno de cadena ligera de ratón, una secuencia de región variable de cadena ligera λ humana, en el que la secuencia de la región variable λ humana se expresa en una cadena ligera que comprende una secuencia genética de región constante de inmunoglobulina de ratón.
- El locus endógeno de cadena ligera de ratón es un locus κ .
- En un aspecto, el ratón carece de una secuencia variable de cadena ligera endógena en el locus endógeno de cadena ligera de ratón.
- En un aspecto, todos o substancialmente todos los segmentos genéticos endógenos de región variable de cadena ligera de ratón se reemplazan con uno o más segmentos genéticos de región variable λ humana.
- En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende una secuencia $J\lambda$ humana. En un aspecto, la secuencia $J\lambda$ humana se selecciona entre el grupo que consiste en $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$, y una combinación de los mismos.
- En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento del grupo A del locus de cadena ligera humana. En un aspecto específico, el fragmento del grupo A del locus de cadena ligera λ humana se extiende de $hV\lambda 3$ -27 a $hV\lambda 3$ -1.
- En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento del grupo B del locus de cadena ligera humana. En un aspecto específico, el fragmento del grupo B del locus de cadena ligera λ humana se extiende de $hV\lambda 5$ -52 a $hV\lambda 1$ -40.
- En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende un fragmento del genoma del grupo A y un fragmento del genoma del grupo B. En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera λ humana comprende al menos un segmento genético del grupo A y al menos un segmento genético del grupo B.
- En un aspecto, más de un 10 % del repertorio no tratado previamente de la cadena ligera del ratón se deriva de al menos dos segmentos genéticos $hV\lambda$ seleccionados entre 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, y 9-49. En un aspecto, más de un 20 % del repertorio no tratado previamente de la cadena ligera del ratón se deriva de al menos tres segmentos genéticos $hV\lambda$ seleccionados entre 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, y 9-49. En un aspecto, más de un 30 % del repertorio no tratado previamente de la cadena ligera del ratón se deriva de al menos cuatro segmentos genéticos $hV\lambda$ seleccionados entre 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, y 9-49.
- También se desvela un ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia $V\lambda$ -

ES 2 721 749 T3

- J λ humana reordenada y una secuencia C κ de ratón, en las que el ratón presenta una proporción de uso de κ con respecto a uso de λ de aproximadamente 1:1.
- 5 En un aspecto, la cadena ligera de inmunoglobulina se expresa a partir de un locus endógeno de cadena ligera de ratón.
- También se desvela un ratón que comprende una secuencia de región variable (V λ) de cadena ligera λ y al menos una secuencia J (J), contigua con una secuencia de región constante de cadena ligera κ de ratón.
- 10 En un aspecto, el ratón carece de un segmento genético funcional V κ de ratón y/o J κ de ratón.
- En un aspecto, el de V λ es una V λ humana (hV λ), y la J es una J λ humana (hJ λ). En un aspecto, la hV λ y la hJ λ son segmentos genéticos sin reordenar.
- 15 En un aspecto, el ratón comprende una pluralidad de segmentos genéticos hV λ sin reordenar y al menos un hJ λ segmento genético. En un aspecto específico, la pluralidad de segmentos genéticos hV λ sin reordenar son al menos 12 segmentos genéticos, al menos 28 segmentos genéticos, o al menos 40 segmentos genéticos.
- 20 En un aspecto, el al menos un segmento genético de hJ λ se selecciona entre el grupo que consiste en J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7, y una combinación de los mismos.
- En un aspecto, un locus endógeno de cadena ligera A de ratón se elimina total o parcialmente.
- 25 En un aspecto, la secuencia de región constante de cadena ligera κ de ratón está en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón.
- En un aspecto, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 45 % de los linfocitos B del ratón expresan un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable (V λ) de cadena ligera λ y un dominio constante (C κ) de cadena ligera κ .
- 30
- En un aspecto, el dominio variable λ humano se deriva de una secuencia hV λ /hJ λ reordenada seleccionarán entre el grupo que consiste en 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.
- 35
- En un aspecto, el ratón comprende adicionalmente una región intergénica V κ -J κ humana de un locus de cadena ligera κ humana, en el que la región intergénica V κ -J κ humana es contigua con la secuencia V λ y con la secuencia J. En un aspecto específico, la región intergénica V κ -J κ humana se coloca entre la secuencia V λ y la secuencia J.
- 40 [Eliminado]
- También se desvela un ratón que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia variable λ y una secuencia constante κ .
- 45 En un aspecto, el ratón presenta una proporción de uso de κ con respecto a uso de λ de aproximadamente 1:1.
- En un aspecto, una población de linfocitos B inmaduros obtenidos de la médula ósea del ratón presenta una proporción de uso de κ con respecto a uso de λ de aproximadamente 1:1.
- 50 También se desvela un ratón modificado genéticamente, en el que el ratón comprende un segmento genético V λ y uno J λ de inmunoglobulina sin reordenar unidos de forma operativa a un locus de cadena ligera de ratón que comprende un gen C λ de ratón.
- Los segmentos genéticos V λ y J λ son segmentos genéticos humanos.
- 55 En un aspecto, el locus endógeno de cadena ligera de ratón es un locus de cadena ligera κ .
- Los segmentos genéticos V λ y J λ sin reordenar están en un locus endógeno de cadena ligera kappa de ratón.
- 60 [Eliminado]
- El ratón comprende adicionalmente una sustitución de uno o más segmentos genéticos V, D, y/o J de cadena pesada con uno o más segmentos genéticos V, D, y/o J humanos en un locus endógeno de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón.
- 65 El ratón comprende un segmento genético V λ y uno J λ de inmunoglobulina humana sin reordenar en un locus

endógeno de cadena ligera κ de ratón que comprende un gen C κ de ratón.

[Eliminado]

5 El locus genético variable de cadena ligera (el "locus V κ ") comprende al menos un segmento genético V λ humano (hV λ) y al menos un segmento genético J λ humano (hJ λ). En otro aspecto, el locus V κ comprende hasta cuatro segmentos genéticos hJ λ . En un aspecto, el locus V λ comprende una secuencia contigua que comprende una secuencia genómica λ humana, como se menciona en las reivindicaciones.

10 En un aspecto, el locus κ comprende hasta cuatro segmentos genéticos hJ λ . En un aspecto, el locus κ comprende al menos un hV λ y al menos un hJ λ , y carece o substancialmente carece de un segmento genético de región V κ funcional y carece o substancialmente carece de un segmento genético de región J κ funcional. En un aspecto, el ratón no comprende segmento genético de región V κ funcional. En un aspecto, el ratón no comprende segmento genético de región J κ funcional.

15 [Eliminado]

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

25 En un aspecto, los hV λ incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, y 3-12. En un aspecto específico, el locus V κ comprende una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humana que se extiende de V λ 3-12 a V λ 3-1. En un aspecto, el locus V λ comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 hV λ . En un aspecto específico, los hV λ incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, y 3-12. En un aspecto específico, el locus V κ comprende una secuencia contigua del locus λ humano que se extiende de V λ 3-12 a V λ 3-1. En un aspecto específico, el locus endógeno de la cadena ligera λ se elimina parcial o completamente.

30 En un aspecto, el locus V κ comprende de 13 a 28 o más hV λ . En un aspecto específico, los hV λ incluyen 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, y 3-27. En un aspecto específico, el locus κ comprende una secuencia contigua del locus λ humano que se extiende de V λ 3-27 a V λ 3-1. El locus V κ está en el locus κ endógeno. En un aspecto específico, el locus endógeno de la cadena ligera λ se elimina parcial o completamente.

40 En un aspecto, el locus V κ comprende de 29 a 40 hV λ . En un aspecto específico, el locus κ comprende una secuencia contigua del locus λ humano que se extiende de V λ 3-29 a V λ 3-1, y una secuencia contigua del locus λ humano que se extiende de V λ 5-52 a V λ 1-40. En un aspecto específico, todas o substancialmente todas las secuencias entre hV λ 1-40 y hV λ 3-29 en el ratón modificado genéticamente consisten substancialmente en una secuencia λ humana de aproximadamente 959 pb encontrada en la naturaleza (por ejemplo, en la población humana) aguas abajo del segmento genético hV λ 1-40 (corriente debajo de la parte sin traducir en la posición 3'), un sitio enzimático de restricción (por ejemplo PI-SceI), seguido por una secuencia λ humana de aproximadamente 3.431 pb aguas arriba del segmento genético hV λ 3-29 encontrado en la naturaleza. En un aspecto específico, el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón se elimina parcial o completamente.

50 El locus V κ comprende al menos un hJ λ . En un aspecto, el locus V κ comprende una pluralidad de hJ λ . En un aspecto, el locus V κ comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, o 7 hJ λ . En un aspecto específico, el locus V κ comprende cuatro hJ λ . En un aspecto específico, los cuatro hJ λ son hJ λ 1, hJ λ 2, hJ λ 3, y hJ λ 7. En un aspecto específico, el locus endógeno de la cadena ligera λ se elimina parcial o completamente. En un aspecto, el locus V κ comprende un hJ λ . En un aspecto específico, un hJ λ es hJ λ 1. En un aspecto específico, el locus endógeno de la cadena ligera λ se elimina parcial o completamente.

55 El locus V κ comprende al menos un hV λ , al menos un hJ λ , y un gen C κ de ratón.

60 En un aspecto, el ratón comprende una sustitución en el locus endógeno κ de ratón de segmentos genéticos endógenos V κ de ratón con uno o más segmentos genéticos hV λ , en el que los segmentos genéticos hV λ están unidos de forma operativa a un gen endógeno de la región C κ de ratón, de modo que el ratón reordenar los segmentos genéticos V λ humanos y expresa una cadena ligera de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio V λ humano y un C κ de ratón. En un aspecto, un 90-100 % de los segmentos genéticos V κ de ratón sin reordenar fluyen con al menos un segmento genético hV λ reordenado. En un aspecto específico, todos o substancialmente todos los segmentos genéticos endógenos V κ de ratón se sustituyen con al menos un segmento genético hV λ reordenado. En un aspecto, la sustitución se realiza con al menos 12, al menos 28, o al menos 40 segmentos genéticos hV λ sin reordenar. En un aspecto, la sustitución se realiza con al menos 7 segmentos genéticos hV λ sin reordenar funcionales, al menos 16 segmentos genéticos hV λ sin reordenar funcionales, o al menos 27 segmentos genéticos hV λ sin reordenar funcionales. En un aspecto, el ratón comprende una sustitución de todos los segmentos genéticos J κ de

- 5 ratón con al menos un segmento genético de hJλ sin reordenar. En un aspecto, el al menos un segmento genético de hJλ sin reordenar se selecciona entre Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ4, Jλ5, Jλ6, Jλ7, y una combinación de los mismos. En un aspecto específico, el uno o más segmentos genéticos hVλ se selecciona entre un segmento genético hVλ 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, un segmento genético hVλ 5-52, y una combinación de los mismos. En un aspecto específico, el al menos un segmento genético de hJλ sin reordenar se selecciona entre Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, y una combinación de los mismos.
- 10 [Eliminado]
- 15 También se desvela un ratón modificado genéticamente que comprende una secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana situada en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón.
- 20 En un aspecto, la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana está en un locus endógeno de cadena ligera κ de un ratón que comprende un segmento genético hVλ y hJλ, y la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana se coloca entre los segmentos genéticos hVλ y hJλ. En un aspecto específico, los segmentos genéticos hVλ y hJλ son capaces de combinarse para formar un dominio variable de cadena ligera λ humana funcional en el ratón.
- 25 También se desvela un ratón que comprende una pluralidad de hVλ uno o más hJλ, y la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana se coloca, con respecto a la transcripción, aguas abajo de la secuencia hVλ proximal o en la posición 3' y cadena bajo o en la posición 5' de la primera secuencia hJλ.
- 30 En un aspecto, la región intergénica Vκ-Jκ humana es una región situada a aproximadamente 130 pb aguas abajo o en la posición 3' de un segmento genético Vκ4-1 humano, aproximadamente 130 pb aguas abajo de la región sin traducir en la posición 3' del segmento genético Vκ4-1 humano, y se extiende aproximadamente 600 pb aguas arriba o en la posición 5' de un segmento genético Jκ1 humano. En un aspecto específico, la región intergénica Vκ-Jκ humana tiene un tamaño de aproximadamente 22,8 kb. En un aspecto, la región intergénica Vκ-Jκ es idéntica en aproximadamente un 90 % o más, un 91 % o más, un 92 % o más, un 93 % o más, un 94 % o más, o aproximadamente un 95 % o más a una región intergénica Vκ-Jκ humana que se extiende desde el extremo de la región sin traducir en la posición 3' de un segmento genético Vκ4-1 humano a aproximadamente 600 pb aguas arriba de un segmento genético Jκ1 humano. En un aspecto, la región intergénica Vκ-Jκ comprende la SEQ ID NO: 100. En un aspecto específico, la región intergénica Vκ-Jκ comprende un fragmento funcional de la SEQ ID NO: 100. En un aspecto específico, la región intergénica Vκ-Jκ es la SEQ ID NO: 100.
- 35 También se desvela una célula de ratón (por ejemplo, una célula madre embrionaria de ratón), un embrión de ratón, y un tejido de ratón que comprenden la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana mencionada, en la que la secuencia de la región intergénica es ectópica. En un aspecto específico, la secuencia ectópica se coloca en un locus endógeno de inmunoglobulina de ratón inmunizado.
- 40 También se desvela una construcción de ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana mencionada. En un aspecto, la construcción de ácido nucleico comprende ramas de dirección para dirigir la secuencia de región intergénica Vκ-Jκ humana a un locus de cadena ligera de ratón. En un aspecto específico, el locus de cadena ligera de ratón es un locus κ. En un aspecto específico, las ramas de dirección dirigen la región intergénica Vκ-Jκ humana a un locus endógeno κ de ratón modificado, en el que la dirección se produce en una posición entre una secuencia hVλ y una secuencia hJλ.
- 45 También se desvela un ratón modificado genéticamente, en el que el ratón comprende no más de dos alelos de cadena ligera, en el que los alelos de cadena ligera comprenden (a) un segmento genético Vλ y un segmento genético Jλ humanos de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera de ratón que comprende un gen C_L de ratón; y, (b) un segmento genético V_L y un segmento genético J_L de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera de ratón que comprende un gen C_L de ratón.
- 50 En un aspecto, el locus endógeno de cadena ligera de ratón es un locus κ. En otro aspecto, el locus endógeno de cadena ligera de ratón es un locus λ.
- 55 En un aspecto, los no más de dos alelos de cadena ligera se seleccionan entre un alelo κ y un alelo λ, dos alelos κ, y dos alelos λ. En un aspecto específico, uno de los dos alelos de cadena ligera es un alelo λ que comprende un gen Cλ2.
- 60 En un aspecto, el ratón comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina funcional y un locus de cadena ligera no funcional, en el que el locus de cadena ligera funcional comprende un segmento genético Vλ y un segmento genético Jλ humanos de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón que comprende un gen Cκ de ratón.
- 65 En un aspecto, el ratón comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina funcional y de un locus de cadena ligera no funcional, en el que el locus de cadena ligera funcional comprende un segmento genético Vλ y un segmento

genético J λ humanos de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón que comprende un gen C λ de ratón. En un aspecto, el gen C λ es C λ 2. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón es idéntico en al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % al C λ 2 de ratón.

5 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 genético V_H humano, un segmento genético D_H humano, un segmento genético J_H humano en un locus endógeno de cadena pesada de ratón que comprende un gen humano de cadena pesada que expresa una cadena pesada de ser humano/ratón. En un aspecto específico, el ratón comprende dos alelos de cadena pesada de inmunoglobulina, y el ratón expresa una cadena pesada de ser humano/ratón.

15 En un aspecto, el ratón comprende un primer alelo de cadena ligera que comprende un hV κ sin reordenar y un hJ κ sin reordenar, en un locus endógeno κ de ratón que comprende un gen C κ endógeno; y un segundo alelo de cadena ligera que comprende un hV λ sin reordenar y un hJ λ sin reordenar, en un locus endógeno κ de ratón que comprende un gen C κ endógeno. En un aspecto específico, el primer y el segundo alelos de cadena ligera son los únicos alelos de cadena ligera funcionales del ratón modificado genéticamente. En un aspecto específico, el ratón comprende un locus λ no funcional. En un aspecto, el ratón modificado genéticamente no expresa una cadena ligera que comprende a una región constante λ .

20 En un aspecto, el ratón comprende un primer alelo de cadena ligera que comprende un hV κ sin reordenar y un hJ κ sin reordenar, en un locus endógeno κ de ratón que comprende un gen C κ endógeno; y un segundo alelo de cadena ligera que comprende un hV λ sin reordenar y un hJ λ sin reordenar, en un locus endógeno λ de ratón que comprende un gen C λ endógeno. En un aspecto específico, el primer y el segundo alelos de cadena ligera son los únicos alelos de cadena ligera funcionales del ratón modificado genéticamente. En un aspecto, el gen C λ endógeno es C λ 2. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón es idéntico en al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % al C λ 2 de ratón.

30 En un aspecto, el ratón comprende seis alelos de inmunoglobulina, en el que el primer alelo comprende un segmento genético V λ y un segmento genético J λ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón que comprende un gen C κ de ratón, el segundo comprende un segmento genético V κ y un segmento genético J κ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón que comprende un gen C κ de ratón, el tercero comprende un segmento genético V λ y un segmento genético J λ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón que comprende un gen C λ de ratón, el cuarto y el quinto, cada uno independientemente, comprenden un segmento genético V_H y D_H y J_H sin reordenar en un locus endógeno de cadena pesada de ratón que comprende un gen de cadena pesada de ratón, y el sexto comprende cualquiera de (a) un segmento genético V λ y un segmento genético J λ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón que comprende un gen C λ de ratón, (b) un λ que no es funcional, o (c) una supresión en todo o parte del locus λ .

40 En un aspecto, el primer alelo comprende un hV λ y un hJ λ sin reordenar. En un aspecto, el segundo alelo comprende un hV κ y hJ κ sin reordenar. En un aspecto, el tercer alelo comprende un hV λ y un hJ λ sin reordenar. En un aspecto, el cuarto y el quinto, cada uno independientemente, comprende un hV_H y hD_H y hJ_H sin reordenar. En un aspecto, el sexto alelo comprende un locus endógeno λ de ratón que se elimina total o parcialmente.

45 En un aspecto, el ratón comprende seis alelos de inmunoglobulina, en el que el primer alelo comprende un segmento genético V λ y J λ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón que comprende un gen C λ de ratón, el segundo comprende un segmento genético V λ y un segmento genético J λ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón que comprende un gen C λ de ratón, el tercero comprende un segmento genético V κ y J κ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón que comprende un gen C κ de ratón, el cuarto y el quinto, cada uno independientemente, comprenden un segmento genético V_H y D_H y J_H sin reordenar en un locus endógeno de cadena pesada de ratón que comprende un gen de cadena pesada de ratón, y el sexto comprende cualquiera de (a) un segmento genético V κ y un segmento genético J κ de inmunoglobulina sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón que comprende un gen C κ de ratón, (b) locus κ que no es funcional, o (c) una supresión de uno o más de los elementos del locus κ .

50 En un aspecto, el primer alelo comprende un segmento genético hV λ y hJ λ sin reordenar. En un aspecto, el segundo alelo comprende un segmento genético hV λ y hJ λ sin reordenar. En un aspecto, el tercer alelo comprende un segmento genético hV κ y hJ κ sin reordenar. En un aspecto, el cuarto y el quinto, cada uno independientemente, comprenden un segmento genético hV_H y hD_H y hJ_H sin reordenar. En un aspecto, el sexto alelo comprende un locus endógeno κ de ratón que se silencia de forma funcional.

60 En un aspecto, el ratón modificado genéticamente comprende un linfocito B que comprende un gen de anticuerpo reordenado que comprende un dominio hV λ reordenado unido de forma operativa a un dominio C κ de ratón.

65 También se desvela un ratón modificado genéticamente que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera

que comprende una secuencia Vλ-Jλ humana reordenada y una secuencia Cκ de ratón.

5 En un aspecto, aproximadamente un 10-50 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), de los que aproximadamente un 9-28 % expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

10 En un aspecto específico, aproximadamente un 23-34 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), o de los que aproximadamente un 9-11 % expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

15 En un aspecto específico, aproximadamente un 19-31 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), o de los que aproximadamente un 9-17 % expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

20 En un aspecto específico, aproximadamente un 21-38 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), o de los que aproximadamente un 24-27 % expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

25 En un aspecto específico, aproximadamente un 10-14 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), o de los que aproximadamente un 9-13 % expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

30 En un aspecto específico, aproximadamente un 31-48 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), o de los que aproximadamente un 15-21 % expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón. En un aspecto específico, aproximadamente un 30-38 % de los esplenocitos del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), de los que aproximadamente un 33-48 % expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

35 En un aspecto, aproximadamente un 52-70 % de la médula ósea del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), o de los que aproximadamente un 31-47 % de los linfocitos B inmaduros (es decir, positivos para CD19/positivos intermedios para B220/positivos para IgM) expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

40 En un aspecto, aproximadamente un 60 % de la médula ósea del ratón son linfocitos B (es decir, positivos para CD19), o de los que aproximadamente un 38,3 % de los linfocitos B inmaduros (es decir, positivos para CD19/positivos intermedios para B220/positivos para IgM) expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio hVλ fusionado a un dominio Cκ de ratón.

45 También se desvela un ratón que expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia Vλ-Jλ humana reordenada y una secuencia Cκ de ratón. El gen de la región constante de ratón es un gen Cκ. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende adicionalmente una cadena pesada que comprende un dominio variable derivado de un segmento genético V humano, uno D humano y uno J humano, y un dominio constante de cadena pesada derivado de un gen de región constante de cadena pesada de ratón. En un aspecto, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia bisagra-CH₂-CH₃ de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH₁-bisagra-CH₂-CH₃ de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH₁-CH₂-CH₃-CH₄ de un dominio constante de cadena pesada. En otro aspecto, el gen de región constante de cadena pesada de ratón comprende una secuencia CH₂-CH₃-CH₄ de un dominio constante de cadena pesada.

50 El ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia Vλ-Jλ humana reordenada y una secuencia Cκ de ratón. En un aspecto, la secuencia Vλ-Jλ humana reorganizada se deriva de una reordenación de segmentos genéticos hVλ seleccionados entre un segmento genético 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-14, 3-19, 2-23, 3-25, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 9-49, segmento genético 1-51. En un aspecto, la secuencia Vλ-Jλ humana reorganizada se deriva de una reordenación de segmentos genéticos hJλ seleccionados entre un segmento genético Jλ1, Jλ2, Jλ3, y Jλ7.

55 En un aspecto, el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera λ de inmunoglobulinas reordenada que comprende una secuencia Vλ/Jλ humana seleccionada entre 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. En un aspecto específico, el linfocito B expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana fusionado con un dominio constante de cadena pesada de ratón, y un dominio variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana fusionado con un dominio constante de cadena ligera κ de ratón.

También se desvela un ratón que expresa un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada derivado de un segmento genético de región variable de cadena pesada humana sin reordenar, en el que el dominio variable de cadena pesada fusiona con una región constante de cadena pesada (C_H) de ratón; y, (b) una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera derivado de un $hV\lambda$ y un $hJ\lambda$ sin reordenar, en el que el dominio variable de cadena ligera se fusiona con una región C_k de ratón.

En un aspecto, el ratón comprende (i) un locus de cadena pesada que comprende una sustitución de todos o substancialmente todos los segmentos genéticos endógenos V, D y J de ratón funcionales con todos o substancialmente todos los V, D, y J humanos funcionales, un gen C_H de ratón, (ii) un primer locus de cadena ligera κ que comprende la sustitución de todos o substancialmente todos los segmentos genéticos V_k y J_k de ratón endógenos funcionales con todos, substancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos genéticos $hV\lambda$ y $hJ\lambda$ funcionales, y un gen C_k de ratón, (iii) un segundo locus de cadena ligera λ que comprende la sustitución de todos o substancialmente todos los segmentos genéticos V_k y J_k de ratón endógenos funcionales con todos, substancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos genéticos $hV\lambda$ y $hJ\lambda$ funcionales, y un gen C_k de ratón. En un aspecto, el ratón no expresa un anticuerpo que comprende una región $C\lambda$. En un aspecto, el ratón comprende una supresión de un gen $C\lambda$ y/o un segmento genético $V\lambda$ y/o un segmento genético $J\lambda$. En un aspecto, el ratón comprende un locus de la cadena ligera λ no funcional. En un aspecto específico, el locus de cadena ligera λ se elimina total o parcialmente.

En un aspecto, el ratón comprende (i) un locus de cadena pesada que comprende una sustitución de todos o substancialmente todos los segmentos genéticos V, D y J de ratón endógenos funcionales con todos o substancialmente todos los segmentos genéticos V, D, y J humanos funcionales, un gen C_H de ratón, (ii) un primer locus de cadena ligera λ que comprende una sustitución de todos o substancialmente todos los segmentos genéticos $V\lambda$ y $J\lambda$ de ratón endógenos funcionales con todos, substancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos genéticos $hV\lambda$ y $hJ\lambda$ funcionales, y un gen $C\lambda$ de ratón, (iii) un segundo locus λ de cadena ligera que comprende una sustitución de todos o substancialmente todos los segmentos genéticos $V\lambda$ y $J\lambda$ de ratón endógenos funcionales con todos, substancialmente todos, o una pluralidad de, segmentos genéticos $hV\lambda$ y $hJ\lambda$ funcionales, y un gen $C\lambda$ de ratón. En un aspecto específico, el gen $C\lambda$ de ratón es $C\lambda 2$. En un aspecto específico, el gen $C\lambda$ de ratón se deriva de un gen $C\lambda$ que es idéntico en al menos 60 %, al menos un 70 %, al menos 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % al $C\lambda 2$ de ratón.

[Eliminado]

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

En un aspecto, el dominio variable derivado de λ se deriva de un $hV\lambda$ y un $hJ\lambda$. En un aspecto, el dominio variable derivado de λ se encuentra en una cadena ligera que comprende una región C_k de ratón. En un aspecto específico, la región variable derivada de λ se encuentra en una cadena ligera que comprende una región $C\lambda$ de ratón. En otro aspecto específico, la región $C\lambda$ es una región $C\lambda 2$. En un aspecto, el dominio había derivado de κ se deriva de un hV_k y un hJ_k , y en un aspecto específico se encuentra en una cadena ligera que comprende una región C_k de ratón.

También se desvela una construcción de ADN aislado que comprende una rama de homología aguas arriba y una rama de homología aguas abajo, en la que las ramas de homología aguas arriba y aguas abajo dirigen la construcción a un locus κ de ratón, y la construcción comprende un segmento $hV\lambda$ sin reordenar funcional y un segmento $hJ\lambda$ sin reordenar funcional, y una secuencia de selección o de marcador.

También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir una secuencia λ de ratón aguas arriba del $V\lambda 2$ de ratón, un casete de selección flanqueado en las posiciones 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa, y una rama de dirección para dirigirse a la secuencia 3' de λ de $J\lambda 2$ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de Hyg-TK de Frt. En un aspecto, la rama de dirección en la posición 3' comprende $C\lambda 2$, $J\lambda 4$, $C\lambda 4$ de ratón, y el amplificador 2.4 de ratón.

También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir el locus λ de ratón en la posición 5' con respecto a $V\lambda 1$, un casete de selección flanqueado en las posiciones 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa, y una rama de dirección en la posición 3' para dirigir una secuencia λ de ratón en la posición 3' con respecto a $C\lambda 1$ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina flanqueado con lox. En un aspecto, la rama de dirección en la posición 3' comprende el amplificador en la posición 3' de λ de ratón y el amplificador 3.1 en la posición 3' de λ de ratón.

5 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir el locus λ de ratón en la posición 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado en las posiciones 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa, y una rama de dirección en la posición 3' para dirigir una secuencia λ de ratón en la posición 3' con respecto a $J\lambda 2$ de ratón y en la posición 5' con respecto a $C\lambda 2$ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de selección de higromicina-TK de Frt. En un aspecto, la rama de dirección en la posición 3' comprende los segmentos genéticos $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ de ratón y el amplificador 2.4 de λ de ratón.

10 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir el locus λ de ratón en la posición 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado en las posiciones 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa, un fragmento del genoma humano que comprende una región contigua del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 3$ -12 aguas abajo con respecto al extremo de $hJ\lambda 1$, y una rama de dirección en la posición 3' para dirigir una secuencia λ de ratón en la posición 3' con respecto a $J\lambda 2$ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de selección de neomicina de Frt. En un aspecto, la rama de dirección en la posición 3' comprende los segmentos genéticos $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ de ratón y el amplificador 2.4 de λ de ratón.

20 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 3$ -12 aguas abajo con respecto al extremo de $hJ\lambda 1$.

25 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir el locus λ de ratón en la posición 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado en las posiciones 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa y un fragmento del genoma humano que comprende una región contigua del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 3$ -27 aguas abajo con respecto al extremo de $hV\lambda 2$ -8. En un aspecto, el casete de selección es un casete de selección de higromicina de Frt. En un aspecto, el fragmento del genoma humano comprende una rama de dirección en la posición 3'. En un aspecto específico, la rama de dirección en la posición 3' comprende aproximadamente 53 kb del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 3$ -12 aguas abajo con respecto al extremo de $hV\lambda 2$ -8.

30 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 3$ -27 aguas abajo con respecto al extremo de $hV\lambda 3$ -12.

35 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir el locus λ de ratón en la posición 5' con respecto a $V\lambda 2$, un casete de selección flanqueado en las posiciones 5' y 3' con sitios de reconocimiento de recombinasa, un primer fragmento del genoma humano que comprende una región contigua del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 5$ -52 aguas abajo con respecto al extremo de $hV\lambda 1$ -40, un sitio enzimático de restricción, y un segundo fragmento del genoma humano que comprende una región contigua del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 3$ -29 aguas abajo con respecto al extremo de $hV\lambda 82K$. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina de Frt. En un aspecto, el sitio enzimático de restricción es un sitio para una endonucleasa buscadora. En un aspecto específico, la endonucleasa buscadora es PI-SceI. En un aspecto, el segundo fragmento del genoma humano es una rama de dirección en la posición 3'. En un aspecto específico, la rama de dirección en la posición 3' comprende aproximadamente 27 kb del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 3$ -29 aguas abajo con respecto al extremo de $hV\lambda 82K$.

45 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende una región contigua del locus de la cadena ligera λ humana de $hV\lambda 5$ -52 aguas abajo con respecto al extremo de $hV\lambda 1$ -40.

50 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir el locus κ de ratón en la posición 5' con respecto a los segmentos genéticos endógenos de $V\kappa$, dos sitios de reconocimiento de recombinasa yuxtapuestos, un casete de selección en la posición 3' con respecto a los sitios de reconocimiento de recombinasa yuxtapuestos, y una rama de dirección en la posición 3' para dirigir una secuencia κ de ratón en la posición 5' con respecto a los segmentos genéticos variables de la cadena ligera κ . En un aspecto, los sitios de reconocimiento de recombinasa yuxtapuestos están en una orientación opuesta entre sí. En un aspecto específico, los sitios de reconocimiento de recombinasa son diferentes. En otro aspecto específico, los sitios de reconocimiento de recombinasa son un sitio *loxP* y un sitio *lox511*. En un aspecto, el casete de selección es un casete de neomicina.

60 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una rama de dirección para dirigir el locus κ de ratón en la posición 5' con respecto a los segmentos genéticos $J\kappa$ de ratón, un casete de selección, un sitio de reconocimiento de recombinasa en la posición 3' con respecto al casete de selección, y una rama de dirección en la posición 3' para dirigir una secuencia κ de ratón en la posición 3' con respecto a los segmentos genéticos $J\kappa$ de ratón y en la posición 5' con respecto al amplificador intrónico κ de ratón. En un aspecto, el casete de selección es un casete de higromicina-TK. En un aspecto, el sitio de reconocimiento de recombinasa está en la misma dirección con respecto a la transcripción, el casete de selección. En un aspecto específico, el sitio de reconocimiento de recombinasa es un sitio *loxP*.

5 También se desvela una construcción de ADN aislado, que comprende, de la posición 5' a la posición 3' con respecto a la dirección de la transcripción, un primer fragmento de genoma de ratón que comprende la secuencia en la posición 5' de los segmentos genéticos endógenos V κ de ratón, un primer sitio de reconocimiento de recombinasa, un segundo sitio de reconocimiento de recombinasa, y un segundo fragmento de genoma de ratón que comprende la secuencia en la posición 3' de los segmentos genéticos endógenos J κ de ratón y en la posición 5' del amplificador intrínico κ de ratón.

10 También se desvela un ratón modificado genéticamente, en el que la modificación genética comprende una modificación con una o más de las construcciones de ADN que se han descrito anteriormente o en el presente documento.

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

20 También se desvela una célula madre no humana que comprende un vector de dirección que comprende una construcción de ADN como se ha descrito anteriormente en el presente documento. También se desvela una célula madre no humana, en la que la célula madre en humana se deriva de un ratón descrito en el presente documento.

25 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.

30 También se desvela el uso de una célula madre no humana como se describe en el presente documento para preparar un ratón como se describe en el presente documento. También se desvela el uso de una célula madre no humana como se describe en el presente documento para preparar una proteína de unión a antígeno.

35 También se desvela un embrión de ratón, en el que el embrión de ratón comprende una modificación genética como se desvela en el presente documento. En un aspecto, se desvela un embrión de ratón hospedador que comprende una célula ES dadora, en el que la célula ES dadora comprende una modificación genética como se describe en el presente documento. En un aspecto, el embrión de ratón es un embrión en la etapa pre-mórula. En un aspecto específico, el embrión en la etapa pre-mórula es un embrión en una etapa de 4 células o un embrión en una etapa de 8 células. En otro aspecto específico, el embrión de ratón es un blastocito.

40 También se desvela el uso de un embrión de ratón como se describe en el presente documento para preparar un ratón como se describe en el presente documento. En un aspecto, se desvela el uso de un embrión de ratón como se describe en el presente documento para preparar una proteína de unión a antígeno.

45 También se desvela una célula no humana, en el que la célula no humana comprende una secuencia genética de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento. En un aspecto, las celulares un linfocito 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 de forma somática.

50 También se desvela una célula no humana, en el que la célula no humana comprende una secuencia genética de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento. En un aspecto, la célula es un linfocito 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 de forma somática.

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

60 También se desvela un linfocito B de ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende (a) una región variable derivada de un segmento genético hV λ y un segmento genético de hJ λ ; y, (b) un gen C λ de ratón. En un aspecto, el gen C λ de ratón se selecciona entre un gen C κ y un gen C λ . En un aspecto específico, el gen C λ es C λ 2. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón se deriva de un gen C λ que es idéntico en al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % al C λ 2 de ratón. En un aspecto, el linfocito B de ratón expresa adicionalmente una cadena pesada afín que comprende (c) una región variable derivada de un segmento hV μ , un segmento hD μ , y (d) un segmento hJ μ . En un aspecto, el linfocito B no comprende un gen λ reordenado. En otro aspecto, el linfocito B no comprende un gen κ reordenado.

65 También se desvela un método para preparar un anticuerpo en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, en el que el ratón tiene un genoma que comprende al menos un hV λ y al menos un hJ λ en un locus endógeno de cadena ligera, en el que el locus endógeno de cadena ligera comprende un gen C λ de ratón; (b) permitir que el ratón modificado genéticamente desarrolle una respuesta

inmune al antígeno; y, (c) aislar a partir del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce de forma específica el antígeno, o aislar a partir del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce de forma específica el antígeno, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un hV λ , un hJ λ y un gen C λ de ratón. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón es un gen C κ de ratón.

5 En un aspecto, un método para preparar un anticuerpo en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, en el que el ratón tiene un genoma que comprende al menos un hV λ en un sitio endógeno κ y al menos un hJ λ en el locus κ , en el que el locus κ comprende un gen C κ de ratón; (b) permitir que el ratón modificado genéticamente desarrolle una respuesta inmune al antígeno; y, (c) aislar a partir del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce de forma específica el antígeno, o aislar a partir del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce de forma específica el antígeno, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un hV λ , un hJ λ y un gen C κ de ratón.

[Eliminado]

15 En un aspecto, se desvela un método para preparar un anticuerpo en un ratón modificado genéticamente, que comprende: (a) exponer un ratón modificado genéticamente a un antígeno, en el que el ratón tiene un genoma que comprende al menos un hV λ en un locus de la cadena ligera λ y al menos un J λ en el locus de la cadena ligera λ , en el que el locus de la cadena ligera λ comprende un gen C λ de ratón; (b) permitir que el ratón modificado genéticamente desarrolle una respuesta inmune al antígeno; y, (c) aislar a partir del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce de forma específica el antígeno, o aislar a partir del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce de forma específica el antígeno, o identificar en el ratón de B una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o ligera que se une al antígeno, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un hV λ , un hJ λ y un gen C λ de ratón.

20 En un aspecto, el gen constante de cadena ligera λ se selecciona entre un gen C λ humano y un gen C λ de ratón. En un aspecto, el gen constante de cadena ligera λ es un gen C λ humano. En un aspecto específico, el gen C λ humano se selecciona entre C λ 1, C λ 2, C λ 3 y C λ 7. En un aspecto, el gen constante de cadena ligera λ es un gen C λ de ratón. En un aspecto específico, el gen C λ de ratón se selecciona entre C λ 1, C λ 2 y C λ 3. En un aspecto más específico, el gen C λ de ratón es C λ 2. En otro aspecto específico, el gen C λ de ratón se deriva de un gen C λ que es idéntico en al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % al C λ 2 de ratón.

30 También se desvela 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, en el que la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ en un locus endógeno de cadena ligera, en el que el locus endógeno de cadena ligera comprende un gen C λ de ratón o fragmento funcional del mismo; y, (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, en el que el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento genético de región variable de la cadena ligera λ y un gen C λ o fragmento funcional del mismo.

35 En un aspecto, el método comprende adicionalmente la clonación de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, en el que la región variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C λ de ratón.

40 En un aspecto, el gen C λ de ratón o fragmento funcional del mismo se selecciona entre un gen C λ humano y un gen C λ de ratón, o fragmento funcional del mismo.

45 En un aspecto, se desvela 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, en el que la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ en un locus de cadena ligera κ , en el que el locus de cadena ligera κ comprende un gen C κ de ratón o fragmento funcional del mismo; y, (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, en el que el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento genético de región variable de la cadena ligera λ y un gen C κ o fragmento funcional del mismo.

50 En un aspecto, el gen constante de la cadena ligera κ o fragmento funcional del mismo se selecciona entre un gen C κ humano y un gen C κ de ratón, o un fragmento funcional del mismo.

55 En un aspecto, el método comprende adicionalmente la clonación de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, en el que la región variable de cadena pesada y/o ligera es de un anticuerpo que comprende un V λ humano y un C κ de ratón.

60 En un aspecto, se desvela 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, en el que la modificación genética comprende un hV λ y un hJ λ en un locus de la cadena ligera λ de ratón, en el que el locus de la cadena ligera λ comprende un gen C λ de ratón o fragmento funcional del mismo; y, (b) identificar un gen de inmunoglobulina reordenado en dicho ratón, en el que el gen de inmunoglobulina reordenado comprende un segmento

genético de región variable de la cadena ligera λ y un gen $C\lambda$ o fragmento funcional del mismo.

En un aspecto, el gen constante de cadena ligera λ o fragmento funcional del mismo se selecciona entre un gen $C\lambda$ humano y un gen $C\lambda$ de ratón, o un fragmento funcional del mismo. En un aspecto específico, el gen constante de cadena ligera λ es un gen $C\lambda$ de ratón, o un fragmento funcional del mismo.

En un aspecto, el método comprende adicionalmente la clonación de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena pesada y/o ligera del ratón, en el que 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 desvela un método para preparar un anticuerpo, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno, permitir que el ratón supere una respuesta inmune que comprende preparar un anticuerpo que se une en forma específica al antígeno, identificar una secuencia de ácidos nucleicos reordenada en el ratón que codifica cadena pesada y una secuencia de ácidos nucleicos reordenada en el ratón que codifica una secuencia de dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, en el que el anticuerpo se une de forma específica al antígeno, y usar las secuencias de ácidos nucleicos de los dominios variables de cadena pesada y ligera fusionadas con dominios constantes humanos para preparar un anticuerpo deseado, en el que el anticuerpo deseado comprende una cadena ligera que comprende un dominio $V\lambda$ fusionado con un dominio C_L . En un aspecto, el dominio $V\lambda$ es humano y el dominio C_L es un dominio $C\lambda$ humano o de ratón. En un aspecto, el dominio $V\lambda$ es de ratón y el dominio C_L es un dominio C_K humano o de ratón.

En un aspecto, se desvela un método para preparar un anticuerpo, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno, permitir que el ratón supere una respuesta inmune que comprende preparar un anticuerpo que se une en forma específica al antígeno, identificar una secuencia de ácidos nucleicos reordenada en el ratón que codifica una cadena pesada y una secuencia de ácidos nucleicos reordenados en el ratón que codifica una secuencia de dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, en el que el anticuerpo se une de forma específica al antígeno, y usar las secuencias de ácidos nucleicos de los dominios variables de cadena pesada y ligera fusionadas con secuencias de ácidos nucleicos de dominios constantes humanos para preparar un anticuerpo deseado, en el que el anticuerpo deseado comprende una cadena ligera que comprende un dominio $V\lambda$ fusionado con un dominio C_K .

En un aspecto, se desvela un método para preparar un anticuerpo, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno, permitir que el ratón supere una respuesta inmune que comprende preparar un anticuerpo que se une en forma específica al antígeno, identificar una secuencia de ácidos nucleicos reordenada en el ratón que codifica un dominio variable de cadena pesada y una secuencia de ácidos nucleicos reordenada que codifica una secuencia de dominio variable de cadena ligera afín de un anticuerpo, en el que el anticuerpo se une de forma específica al antígeno, y usar las secuencias de ácidos nucleicos fusionadas con secuencias de ácidos nucleicos que codifican un dominio constante de cadena pesada humana y un dominio constante de cadena ligera humana para preparar un anticuerpo derivados de secuencias humanas, en el que el anticuerpo que se une en forma específica al antígeno comprende una cadena ligera que comprende un dominio $V\lambda$ humano fusionado con una región $C\lambda$ de ratón.

En un aspecto, la región $C\lambda$ de ratón se selecciona entre $C\lambda_1$, $C\lambda_2$ y $C\lambda_3$. En un aspecto específico, la región $C\lambda$ de ratón es $C\lambda_2$.

En un aspecto, se desvela un método para preparar una secuencia genética de región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno; (b) permitir que el ratón supere una respuesta inmune; (c) identificar una célula en el ratón que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de dominio $V\lambda$ humana fusionada con un dominio C_L de ratón, en el que la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V_H humano y un dominio C_H de ratón, y en el que la célula expresa un anticuerpo que se une al antígeno; (d) clonar, a partir de la célula, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio $V\lambda$ humano y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio V_H humano afín; y, (e) usar la secuencia de ácidos nucleicos clonada que codifica el dominio $V\lambda$ humano y la secuencia de ácidos nucleicos clonada que codifica el dominio V_H humano afín para preparar un anticuerpo totalmente humano.

En un aspecto, se desvela un método para preparar una secuencia genética de región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en la presente divulgación a un antígeno; (b) permitir que el ratón supere una respuesta inmune; (c) identificar una célula en el ratón que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de dominio $V\lambda$ humano reordenada contigua en la misma molécula de ácido nucleico con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio C_K de ratón, en el que la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V_H humano y un dominio C_H de ratón, y en el que la célula expresa un anticuerpo que se une al antígeno; (d) clonar, a partir de la célula, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio $V\lambda$ humano y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio V_H humano afín; y, (e) usar la secuencia de ácidos nucleicos clonada que codifica el dominio $V\lambda$ humano y la secuencia de ácidos nucleicos clonada que codifica el dominio V_H humano afín para preparar un anticuerpo totalmente humano.

En un aspecto, se desvela un método para preparar una secuencia genética de región variable de cadena ligera de anticuerpo reordenada, que comprende (a) exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno; (b) permitir que el ratón supere una respuesta inmune al antígeno; (c) identificar una célula en el ratón que comprende ADN que codifica una secuencia de dominio V λ humana fusionada con un dominio C λ de ratón, en el que la célula también codifica una cadena pesada afín que comprende un dominio V H humano y un dominio C H de ratón, y en el que la célula expresa un anticuerpo que se une al antígeno; (d) clonar, a partir de la célula, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio V λ humano reordenado y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio V H humano afín; y, (e) usar la secuencia de ácidos nucleicos clonada que codifica el dominio V λ humano y la secuencia de ácidos nucleicos clonada que codifica el dominio V H humano afín para preparar un anticuerpo totalmente humano. En un aspecto, el dominio C λ de ratón es C λ 2 de ratón. En un aspecto específico, el dominio C λ de ratón se deriva de un gen C λ que es idéntico en al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % al C λ 2 de ratón.

También se desvela un ratón modificado genéticamente que expresa una cadena ligera derivada de λ humano fusionada con una región constante de cadena ligera endógena (C L), en el que el ratón, después de inmunización con antígeno, prepara un anticuerpo que comprende un dominio V λ humano fusionado con un dominio C L de ratón. En un aspecto, el dominio C L de ratón se selecciona entre un dominio C K y un dominio C λ . En un aspecto, el dominio C L de ratón es un dominio C K . En un aspecto, el dominio C L de ratón es un dominio C λ . En un aspecto específico, dominio C λ es C λ 2. En un aspecto específico, el dominio C λ de ratón se deriva de un gen C λ que es idéntico en al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 98 % al C λ 2 de ratón.

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

También se desvela un ratón adecuado para preparar anticuerpos que tienen una cadena ligera derivada de λ humano en la que todos substancialmente todos los anticuerpos preparados en el ratón se expresan con una cadena ligera derivada de λ humano. En un aspecto, la cadena ligera derivada de λ humano se expresa a partir de un locus endógeno de cadena ligera. En un aspecto, el locus endógeno de cadena ligera es un locus de cadena ligera κ . En un aspecto específico, el locus de cadena ligera κ es un locus de cadena ligera κ de ratón.

También se desvela un método para preparar una cadena ligera derivada de λ para un anticuerpo humano, que comprende obtener a partir de un ratón como se describe en el presente documento una secuencia de cadena ligera y una secuencia de cadena pesada, y usar la secuencia de cadena ligera y la secuencia de cadena pesada en la preparación de un anticuerpo humano.

También se desvela un método para preparar una proteína de unión a antígeno, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento a un antígeno; permitir que el ratón supere una respuesta inmune; y obtener a partir del ratón una proteína de unión a antígeno que se une al antígeno, u obtener a partir del ratón una secuencia a usar en la preparación de una proteína de unión a antígeno que se une al antígeno.

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

También se desvela una célula que comprende una modificación genética como se describe en el presente 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 λ humana fusionada con una secuencia constante de ratón. En un aspecto específico, la secuencia constante de ratón es una secuencia constante κ de ratón.

También se desvela un tejido derivado de un ratón como se describe en el presente documento.

También se desvela el uso de un ratón o una célula como se describe en el presente 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.

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

[Eliminado]

10 **Breve descripción de las figuras**

La **FIG. 1** muestra una ilustración detallada, no a escala, del locus de cadena ligera λ humana incluyendo los grupos de segmentos genéticos V λ (A, B y C) y los pares de la región J λ y C λ (pares J-C)

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

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

20 La **FIG. 4A** muestra una ilustración general, no a escala de un vector de dirección inicial para dirigir el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón con secuencias de cadena ligera λ humana que incluyen 12 segmentos genéticos hV λ y el segmento genético hJ λ 1 (12/1- λ , Vector de Dirección).

25 La **FIG. 4B** muestra una ilustración general, no a escala, de cuatro vectores de dirección iniciales para dirigir el locus endógeno de cadena ligera κ de ratón con secuencias de cadena ligera λ humana que incluyen 12 segmentos genéticos hV λ y el segmento genético hJ λ 1 (12/1- κ Vector de Dirección), 12 segmentos genéticos hV λ y hJ λ 1, 2, 3 y 7 segmentos genéticos (Vector de Dirección 12/4- κ), 12 segmentos genéticos hV λ , una secuencia genómica V κ -J κ humana y el segmento genético hJ λ 1 (Vector de Dirección 12(κ)1- κ) y 12 segmentos genéticos hV λ , una secuencia genómica V κ -J κ humana y hJ λ 1, 2, 3 y 7 segmentos genéticos (Vector de Dirección 12(κ)4- κ).

La **FIG. 5A** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de dirección para inserción progresiva de 40 segmentos genéticos hV λ y un solo segmento genético hJ λ en el locus de cadena ligera λ de ratón.

30 La **FIG. 5B** muestra una ilustración general, no a escala, de una estrategia de dirección para inserción progresiva de 40 segmentos genéticos hV λ y un solo segmento genético hJ λ en el locus κ de ratón.

La **FIG. 6** muestra una ilustración general, no a escala, de las etapas de dirección e ingeniería molecular usadas para preparar vectores de dirección híbridos λ - κ humanos para construcción de un locus híbrido de cadena ligera que contenga una secuencia intergénica κ humana, múltiples segmentos genéticos hJ λ o ambos.

35 La **FIG. 7A** muestra una ilustración general, no a escala, de la estructura del locus para un locus modificado de cadena ligera λ de ratón que contiene 40 segmentos genéticos hV λ y un solo hJ λ segmento genético unidos de forma operativa al gen endógeno C λ 2.

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

40 La **FIG. 8A** muestra representaciones de contorno de esplenocitos de Ig λ ⁺ e Ig κ ⁺ seleccionados en CD19⁺ a partir de un ratón de tipo silvestre (WT), un ratón homocigoto para 12 hV λ y cuatro segmentos genéticos hJ λ que incluyen una secuencia genómica V κ -J κ humana (12hV λ -V κ J κ -4hJ λ) y un ratón homocigoto para 40 hV λ y un segmento genético hJ λ (40hV λ -1hJ λ).

45 La **FIG. 8B** muestra número total de linfocitos B CD19⁺ en bazo extraídos de ratones de tipo silvestre (WT), homocigotos para 12 hV λ y cuatro segmentos genéticos hJ λ que incluyen una secuencia genómica V κ -J κ humana (12hV λ -V κ J κ -4hJ λ) y ratones homocigotos para 40 hV λ y un segmento genético hJ λ (40hV λ -1hJ λ).

50 La **FIG. 9A**, en el panel superior, muestra representaciones de contorno de esplenocitos seleccionados en singletes y teñidos para linfocitos B y T (CD19⁺ y CD3⁺, respectivamente) a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para 40 hV λ y cuatro J λ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ). El panel inferior muestra representaciones de contorno de esplenocitos seleccionados en CD19⁺ y teñidos para expresión de Ig λ ⁺ e Ig κ ⁺ a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para 40 hV λ y cuatro J λ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

55 La **FIG. 9B** muestra el número total de linfocitos B CD19⁺, CD19⁺Ig κ ⁺ y CD19⁺Ig λ ⁺ en bazo extraídos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para 40 hV λ y cuatro J λ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

60 La **FIG. 9C** muestra representaciones de contorno de esplenocitos seleccionados en CD19⁺ y teñidos para inmunoglobulina D (IgD) e inmunoglobulina M (IgM) a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para 40 hV λ y cuatro J λ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ). Los linfocitos B maduros (72 para WT, 51 para 40hV λ -V κ J κ -4hJ λ) y transicionales (13 para WT, 22 para 40hV λ -V κ J κ -4hJ λ) se indican en cada una de las representaciones de contorno.

65 La **FIG. 9D** muestra el número total de linfocitos B CD19⁺, linfocitos B transicionales (CD19⁺IgM^{hi}IgD^{lo}) y linfocitos B maduros (CD19⁺IgM^{lo}IgD^{hi}) en bazo extraídos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para 40 hV λ y cuatro J λ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica V κ -J κ humana (40hV λ -V κ J κ -4hJ λ).

La **FIG. 10A**, en el panel superior, muestra representaciones de contorno de médula ósea obtenida para linfocitos

B y T (CD19⁺ y CD3⁺, respectivamente) a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para 40 hVλ y cuatro Jλ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jk humana (40hVλ-VκJk-4hJλ). El panel inferior muestra representaciones de contorno de médula ósea seleccionada en CD19⁺ y teñida para ckit⁺ y CD43⁺ a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para 40 hVλ y cuatro Jλ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jk humana (40hVλ-VκJk-4hJλ). Los linfocitos Pro y Pre B se indican en las representaciones de contorno en el panel inferior.

La **FIG. 10B** muestra el número de linfocitos Pro (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) y Pre (CD19⁺CD43⁻ckit⁺) B en médula ósea recogida de los fémures de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para 40 hVλ y cuatro segmentos genéticos Jλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jk humana (40hVλ-VκJk-4hJλ).

La **FIG. 10C** muestra representaciones de contorno de médula ósea seleccionada en singletes teñidos para inmunoglobulina M (IgM) y B220 a partir de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para 40 hVλ y cuatro Jλ segmentos genéticos que incluye una secuencia genómica Vκ-Jk humana (40hVλ-VκJk-4hJλ). Los linfocitos B inmaduros, maduros y pro/pre B se indican en cada una de las representaciones de contorno.

La **FIG. 10D** muestra el número total de linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{hi}IgM⁺) en médula ósea aislada de los fémures de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para 40 hVλ y cuatro Jλ segmentos genéticos que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jk humana (40hVλ-VκJk-4hJλ).

La **FIG. 10E** muestra representaciones de contorno de médula ósea seleccionada en linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{hi}IgM⁺) teñidos para expresión de Igλ e Igκ aislados de los fémures de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para 40 hVλ y cuatro Jλ segmentos genéticos que incluye una secuencia genómica Vκ-Jk humana (40hVλ-VκJk-4hJλ).

La **FIG. 11** muestra un alineamiento 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 portan secuencias genéticas de cadena ligera λ humana en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón. 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 de las cajas inferiores indican bases no germinales que resultan de cualquier mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los aminoácidos consenso dentro de la región Marco 4 (FWR4) codificados por la secuencia de nucleótidos de hJλ1 y Cκ de ratón se indican en la parte inferior del alineamiento de la secuencia.

La **FIG. 12** muestra un alineamiento 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 portan secuencias genéticas de cadena ligera λ humana que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana contigua en un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón. 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 de las cajas inferiores indican bases no germinales que resultan de cualquier mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los aminoácidos consenso dentro de la región Marco 4 (FWR4) codificados por la secuencia de nucleótidos de cada Jλ humano y Cκ de ratón se indican en la parte inferior del alineamiento de la secuencia.

La **FIG. 13** muestra un alineamiento 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 portan secuencias genéticas de cadena ligera λ humana en un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón. 2D1 = SEQ ID NO: 101; 2D9 = SEQ ID NO: 102; 3E15 = SEQ ID NO: 103. Las bases de las cajas inferiores indican bases no germinales que resultan de cualquier mutación y/o adición de N durante la recombinación. Los aminoácidos consenso dentro de la región Marco 4 (FWR4) codificados por la secuencia de nucleótidos de hJλ1 y Cλ2 de ratón se indican en la parte inferior del alineamiento de la secuencia.

Descripción detallada

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

El término "contiguo" incluye referencia a aparición en la misma molécula de ácido nucleico, por ejemplo, dos secuencias de ácidos nucleicos son "contiguas" si aparecen en la misma molécula de ácido nucleico pero están interrumpidas por otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una secuencia V(D)J reordenada es "contigua" con una secuencia genética de región constante aunque el codón final de la secuencia V(D)J no vaya a seguir inmediatamente por el primer codón de la secuencia de región constante. En otro ejemplo, dos secuencias de segmento genético V son "contiguas" si aparecen en el mismo fragmento genómico, aunque pueden estar separadas por secuencia que no codifica un codón de la región V, por ejemplo, pueden estar separadas por una secuencia reguladora, por ejemplo, una secuencia promotora u otra secuencia de no codificación. Una secuencia contigua, incluye un fragmento genómico que contiene secuencias canónicas colocadas tal como se encuentran en un genoma de tipo silvestre.

La expresión "derivado de" cuando se usa con respecto a una región variable "derivada de" un gen o segmento genético mencionados incluye la capacidad para trazar la secuencia de nuevo hacia un segmento genético o segmentos genéticos sin reordenar en particular que se reordenaron para formar un gen que expresa el dominio variable (que representa, cuando sea aplicable, diferencias de corte y empalme y mutaciones somáticas).

La expresión "funcional" cuando se usa con respecto a un segmento genético o unión de segmento genético de región variable se refiere al uso en un repertorio de anticuerpos expresado; por ejemplo, en los segmentos genéticos 3-1, 4-3, 2-8 de V λ humano, *etc.* son funcionales, mientras que los segmentos genéticos 3-2, 3-4, 2-5 de V λ , *etc.* no son funcionales.

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

10 Un "locus κ " incluye una posición en un cromosoma, por ejemplo un cromosoma de ratón, en el que, en una región variable κ de ratón de tipo silvestre (V κ), unión de κ (J κ), y constante de κ (C κ), se encuentran secuencias de ADN.

Un "locus λ " incluye una posición en un cromosoma, por ejemplo un cromosoma de ratón, en el que, en una región variable λ de ratón de tipo silvestre (V λ), unión de λ (J λ), y constante de λ (C λ), se encuentran secuencias de ADN.

15 El término "reordenado" incluye el estado de un locus de inmunoglobulina en el que algunos segmentos genéticos V y algunos segmentos genéticos J (para cadenas pesadas, también segmentos genéticos D) se mantienen por separado pero son capaces de unirse para formar un gen V(D)J reordenado que comprende un solo V_(D)J del repertorio de V(D)J.

20 **Ratones que Expresan Dominios Variables λ Humano**

Anteriormente se ha informado de ratones que expresan anticuerpos que son totalmente humanos, o parcialmente humanos o parcialmente de ratón. Los ratones modificados por ingeniería genética VELOCIMMUNE® comprenden una sustitución de segmentos genéticos V(D)J sin reordenar en loci endógenos de ratón con segmentos genéticos 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 mayor parte de otros informes se refieren a ratones que expresan anticuerpos totalmente humanos a partir de transgenes totalmente humanos en ratones que tienen loci endógenos de inmunoglobulina deshabitados.

30 Las cadenas ligeras de anticuerpo están codificadas por uno de dos loci separados: kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas ligeras de anticuerpos de ratón son principalmente de tipo κ . Los ratones que preparan anticuerpos de ratón, y ratones modificados que prepararon anticuerpos totalmente humanos o quiméricos de ser humano-ratón, presentan un sesgo en el uso de la cadena ligera. Los seres humanos también presentan sesgos de cadena ligera, pero no tan pronunciado como en los ratones; la proporción de cadenas ligeras κ con respecto a cadenas ligeras λ en ratones es de aproximadamente 95:5, mientras que en seres humanos la proporción es de aproximadamente 60:40. No se cree que el sesgo más pronunciado en ratones influya de forma rigurosa en la diversidad del anticuerpo, porque, en ratones, el locus variable de λ no es tan diverso en el primer caso. Esto no es de este modo en seres humanos. El locus de la cadena ligera λ humana es muy diverso.

40 El locus de la cadena ligera λ humana se extiende desde aproximadamente 1.000 kb y contiene aproximadamente 80 genes que codifican segmentos variables (V) o de unión (J) (FIG. 1). Dentro del locus de la cadena ligera λ humana, aproximadamente la mitad de todos los dominios V λ observados están codificados con los segmentos genéticos 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, y 3-21. En general, se cree que aproximadamente 30 o menos de los segmentos genéticos V λ humanos son funcionales. Existen siete segmentos genéticos J λ , de los que solamente cuatro se contemplan generalmente como segmentos genéticos J λ 1, J λ 2, J λ 3, y J λ 7 funcionales de J λ .

50 El locus de la cadena ligera λ en seres humanos es similar en estructura al locus κ tanto de ratones como de seres humanos en que el locus de la cadena ligera λ humana tiene varios segmentos genéticos de región variable que son capaces de combinarse para formar una proteína de cadena ligera funcional. El locus de la cadena ligera λ humana contiene aproximadamente 70 V segmentos genéticos y 7 pares de segmentos genéticos J λ -C λ . Parece que solamente cuatro de estos pares de segmentos genéticos J λ -C λ son funcionales. En algunos alelos, un quinto par de segmento genético J λ -C λ es un pseudo gen (C λ 6) según se informa. Parece que los 70 segmentos genéticos V λ contienen 38 segmentos genéticos funcionales. Las 70 secuencias V λ se colocan en tres grupos, todos los cuales contienen diferentes miembros de distintos grupos de la familia genética V (grupos A, B y C; FIG. 1). Esto es una fuente potencialmente rica de diversidad relativamente sin explorar para la generación de anticuerpos con regiones V humanas en animales no humanos.

60 En contraste notable, el locus de cadena ligera λ de ratón contiene solamente dos o tres (dependiendo de la cepa) segmentos genéticos de la región V λ de ratón (FIG. 2). Al menos por esta razón, no se cree que el sesgo de κ riguroso en ratones sea particularmente perjudicial para la diversidad total del anticuerpo.

De acuerdo con mapas publicados del locus de cadena ligera λ de ratón, el locus consiste substancialmente en dos grupos de segmentos genéticos en un espacio de aproximadamente 200 kb (FIG.2). Los dos grupos contienen dos conjuntos de genes V, J, y C que son capaces de reordenación independiente: V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4 y V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1. Aunque se ha encontrado que V λ 2 se le combina con todos los segmentos genéticos J λ , parece que V λ 1 se

recombina de forma exclusiva con C λ 1. Se cree que C λ 4 es un pseudo gen con sitios de corte y empalme defectuosos.

El locus de cadena ligera κ de ratón es notablemente diferente. La estructura y el número de segmentos genéticos que participan en los sucesos de recombinación que conducen a una proteína de cadena ligera funcional a partir del locus κ de ratón son mucho más complejos (FIG. 3). Por lo tanto, las cadenas ligeras λ de ratón no contribuyen en gran medida a la diversidad de una población de anticuerpos en un ratón habitual.

La explotación de la rica diversidad del locus de cadena ligera λ humana en ratones probablemente daría como resultado, entre otras cosas, una fuente para un repertorio humano más completo de dominios V de cadena ligera. Algunos intentos anteriores para aprovechar esta diversidad usaban trans en los humanos que contenían trozos del locus de cadena ligera λ humana incorporados de forma aleatoria en el genoma del ratón (véanse, por ejemplo, los documentos de patente US 6.998.514 y US 7.435.871). Los ratones que contienen estos transgenes integrados de forma aleatoria expresan según se informa cadenas ligeras λ totalmente humanas, sin embargo, en algunos casos, uno o ambos loci endógenos de cadena ligera permanecen intactos. Esta situación no es deseable ya que las secuencias de cadena ligera λ humana se sostienen con la cadena ligera de ratón (κ o λ) en el repertorio de anticuerpos expresado del ratón.

Por el contrario, los inventores describen ratones modificados genéticamente que son capaces de expresar una o más secuencias de los nucleicos de cadena ligera λ directamente a partir de un locus endógeno de cadena ligera kappa de ratón. Los ratones modificados genéticamente capaces de expresar secuencias de cadena ligera λ humana a partir de un locus endógeno κ se pueden proporcionar adicionalmente a ratones que comprenden un locus de cadena pesada humana y de este modo se pueden usar para expresar anticuerpos que comprenden regiones V (pesada y ligera κ) que son totalmente humanos. Las regiones V se expresan con regiones constantes de ratón. En diversos aspectos, están presentes algunos segmentos genéticos no endógenos de inmunoglobulinas de ratón y las regiones V se expresan con regiones constantes humanas. Se demostraría que estos anticuerpos son útiles en numerosas aplicaciones, tanto de diagnóstico como terapéuticas.

Se pueden conseguir muchas ventajas para diversos aspectos de expresión de proteínas de unión derivadas de los segmentos genéticos V λ y J λ humanos en ratones. Algunas ventajas se pueden conseguir colocando secuencias λ humanas en un locus endógeno de cadena ligera, por ejemplo, el locus κ o λ de ratón. Algunos anticuerpos preparados a partir de tales ratones pueden tener cadenas ligeras que comprenden dominios V λ humanos fusionados con una región C κ de ratón. Los ratones también expresaron dominios V λ humanos que son adecuados para identificación y clonación para uso con regiones C λ humanas, de forma específica regiones C κ y/o C λ . Dado que el desarrollo de linfocitos B en tales ratones es de otro modo normal, es posible generar dominios V λ compatibles (incluyendo dominios de V λ mutados de forma somática) en el contexto de cualquiera de las regiones C λ o C κ .

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden un segmento genético humano V λ sin reordenar y un J λ humano sin reordenar en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina. Se describen ratones que expresan anticuerpos que comprenden una cadena ligera que tiene un dominio V λ humano fusionado con una región C κ .

Transcripciones Estériles del Locus de Cadena Ligera κ de Inmunoglobulina

Algunas variaciones sobre el tema de la expresión de secuencias λ de inmunoglobulina humana en ratones se reflejan en diversos aspectos de ratones modificados genéticamente capaces de una expresión de este tipo. Por lo tanto, en algunos aspectos, los ratones modificados genéticamente comprenden cierta secuencia(s) de no codificación de un locus humano. En un aspecto, el ratón modificado genéticamente comprende segmentos genéticos V λ y J λ humanos en un locus endógeno de cadena ligera κ , y comprende adicionalmente un fragmento genómico de la cadena ligera κ humana. En un aspecto específico, el fragmento genómico de la cadena ligera κ humana es una secuencia de no codificación encontrada en la naturaleza entre un segmento genético V κ humano y un segmento genético J κ humano.

Los loci de cadena ligera κ humano y de ratón contienen secuencias que codifican transcripciones estériles que carecen ya sea de un codón de inicio o de un marco de lectura abierto, y que se contemplan como elementos que regulan la transcripción de los loci de la cadena ligera κ . Estas transcripciones estériles provienen de una secuencia intergénica situada aguas abajo o en la posición 3' del segmento genético V κ más proximal y aguas arriba o en la posición 5' del amplificador intrónico de la cadena ligera κ (E κ i) que se encuentra aguas arriba del gen de la región constante de la cadena ligera κ (C κ). Las transcripciones estériles provienen de la reordenación de la secuencia intergénica para formar un segmento de V κ J κ 1 fusionado con un C κ .

Una sustitución del locus de cadena ligera κ aguas arriba del gen C κ eliminaría la región intergénica que codifica las transcripciones estériles. Por lo tanto, en diversos aspectos, una sustitución de la secuencia de la cadena ligera κ de ratón aguas arriba del gen C κ de ratón con segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana daría como resultado un locus de cadena ligera κ de ratón humanizado que contiene segmentos genéticos V λ y J λ humanos pero no la región intergénica de la cadena ligera κ que codifica las transcripciones estériles.

Como se describe en el presente documento, la humanización del locus endógeno de cadena ligera κ de ratón con

segmentos genéticos de cadena ligera λ humana, en el que la humanización elimina la región intergénica, da como resultado una disminución sorprendente del uso del locus de cadena ligera κ , junto con un aumento notable uso de la cadena ligera λ . Por lo tanto, aunque un ratón humanizado que carece de la región intergénica es útil porque puede preparar anticuerpos con dominios variables de cadena ligera humana (por ejemplo, dominios λ o κ humanos), el uso desde el locus disminuye.

También se describe la humanización del locus endógeno de cadena ligera κ de ratón con segmentos genéticos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos acoplados con una inserción de una región intergénica κ humana para crear un locus $V\lambda$ que contiene, con respecto a la transcripción, entre el segmento genético $V\lambda$ humano final y el primer segmento genético $J\lambda$ humano, una región intergénica κ ; que presenta una población de linfocitos B con una expresión más elevada que un locus que carezca de la región intergénica κ . Esta observación es coherente con la hipótesis de que la región intergénica directamente a través de la transcripción estéril, o indirectamente suprime el uso del locus endógeno de la cadena ligera λ . Bajo una hipótesis de este tipo, la inclusión de la región intergénica daría como resultado una disminución del uso del locus endógeno de la cadena ligera λ , dejando al ratón una elección limitada pero para poder usar el locus modificado (λ en κ) para generar anticuerpos como se mencionan las reivindicaciones.

En diversos aspectos, una sustitución de la secuencia de la cadena ligera κ de ratón aguas arriba del gen $C\kappa$ de ratón con una secuencia de la cadena ligera λ humana comprende adicionalmente una región intergénica de cadena ligera κ humana colocada, con respecto a la transcripción, entre la región sin traducir en la posición 3' del segmento genético $V\lambda$ que se encuentra más cerca de la posición 3' y en la posición 5' con respecto al primer segmento genético $J\lambda$ humano. Como alternativa, 1 región intergénica de este tipo se puede omitir de un locus endógeno de cadena ligera κ sustituido (aguas arriba del gen $C\kappa$ de ratón) haciendo una sustitución en el locus endógeno de la cadena ligera λ . Del mismo modo, bajo este aspecto, el ratón genera anticuerpos de un locus endógeno de cadena ligera κ que contienen secuencias de la cadena ligera λ humana como se describen las reivindicaciones.

Enfoques para Modificar por Ingeniería Ratones para Expresar Dominios $V\lambda$ Humanos

Se describen diversos enfoques para preparar ratones modificados genéticamente que tengan anticuerpos que contengan una cadena ligera que tenga un dominio $V\lambda$ humano fusionado con una región endógena $C\kappa$. Se describen modificaciones genéticas que, en diversos aspectos, comprenden una supresión de uno o ambos loci endógenos de cadena ligera. Por ejemplo, para eliminar las cadenas ligeras λ de ratón del repertorio de anticuerpos endógeno, se puede realizar una supresión de un primer grupo genético $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ y la sustitución, total o parcialmente, de los segmentos genéticos $V\lambda$ - $J\lambda$ de un segundo grupo genético con segmentos genéticos $V\lambda$ - $J\lambda$ humanos. También se desvelan embriones de ratón modificados genéticamente, células, y construcciones de dirección para preparar los ratones, embriones de ratón, y células.

La supresión de un grupo genético $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ endógeno y la sustitución de los segmentos genéticos $V\lambda$ - $J\lambda$ de otro grupo genético $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ endógeno usa una alteración relativamente mínima en la asociación de la región constante del anticuerpo natural y función en el animal, en diversos aspectos, porque los genes $C\lambda$ endógenos se dejan intactos y por lo tanto retienen su funcionalidad y capacidad normal para asociarse con la región constante de una cadena pesada endógena. Por lo tanto, en tales aspectos, la modificación no afecta a otras regiones constantes de cadena pesada endógenas que dependen de las regiones constantes de cadena ligera funcional para el ensamblaje de una molécula de anticuerpo funcional que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Además como en diversos aspectos, la modificación no influye en el ensamblaje de una molécula funcional de anticuerpo unido a membrana que involucra a una cadena pesada endógena y una cadena ligera, por ejemplo, un dominio $hV\lambda$ unido a una región $C\lambda$ de ratón. Dado que al menos un gen $C\lambda$ funcional se detiene en el locus endógeno, los animales que contienen una sustitución de los segmentos genéticos $V\lambda$ - $J\lambda$ de un grupo genético $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ endógeno con segmentos genéticos $V\lambda$ - $J\lambda$ humanos debería ser capaces de preparar cadenas ligeras λ normales que fueran capaces de unión al antígeno durante una respuesta inmune a través de los segmentos genéticos $V\lambda$ - $J\lambda$ humanos presentes en el repertorio de anticuerpos expresado del animal.

En la FIG. 2 se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de un grupo genético endógeno $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ de ratón suprimido. Como se ilustra, el locus de cadena ligera λ de ratón se organiza en dos grupos genéticos, ambos de los cuales contienen segmentos genéticos funcionales capaces de combinarse para formar una cadena ligera λ de ratón funcional. El grupo genético endógeno $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$ de ratón se elimina mediante una construcción de dirección (Vector de Dirección 1) con un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación. El otro grupo genético endógeno ($V\lambda 2$ - $V\lambda 3$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$) se elimina en parte con una construcción de dirección (Vector de Dirección 2) con un casete de higromicina-timidina quinasa flanqueado por sitios de recombinación. En este segundo suceso de dirección, los segmentos genéticos endógenos $C\lambda 2$ - $J\lambda 4$ - $C\lambda 4$ se retienen. La segunda construcción de dirección (Vector de Dirección 2) se construye usando sitios recombinantes que son diferentes de los de la primera construcción de dirección (Vector de Dirección 1) permitiendo de este modo la supresión selectiva del casete de selección después de conseguir una dirección satisfactoria. El locus de dirección doble está silenciado funcionalmente por que no se puede producir ninguna cadena ligera λ endógena. Este locus modificado se puede usar para la inserción de segmentos genéticos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos para crear un locus endógeno λ de ratón que comprende segmentos genéticos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos, mediante lo cual, después de recombinación en el locus modificado, el animal produce cadenas ligeras λ que comprenden segmentos genéticos $V\lambda$ y $J\lambda$ humanos reordenados unidos a un segmento

genético endógeno C λ de ratón.

La modificación genética de un ratón para conseguir segmentos genéticos λ endógenos no funcionales, en diversos aspectos, da como resultado un ratón que presentan exclusivamente cadenas ligeras κ en su repertorio de anticuerpos, haciendo que el ratón sea útil para la evaluación de la función de las cadenas ligeras λ en la respuesta inmune, inútil para preparar un repertorio de anticuerpos que comprende dominios V κ pero no dominios V λ .

Con cualquier método conocido en la técnica se puede preparar un ratón modificado genéticamente que expresa un hV λ unido a un gen C λ de ratón se ha de combinado en el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón. Una ilustración esquemática (no a escala) de la sustitución de los segmentos genéticos endógenos V λ 2-V λ 3-J λ 2 de ratón con segmentos genéticos V λ y J λ humanos se proporcionan en la FIG. 4A. Como se ilustra, un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón que se ha convertido en no funcionar se sustituye con una construcción de dirección (Vector de Dirección 12/1- λ) que incluye un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación. Los segmentos genéticos V λ 2-V λ 3-J λ 2 se sustituyen con un fragmento genómico que contiene secuencia λ humana que incluye 12 segmentos genéticos hV λ y un solo segmento genético hJ λ .

Por lo tanto, este primer enfoque coloca uno o más segmentos genéticos hV λ en el locus endógeno de la cadena ligera λ contiguo con un solo segmento genético hJ λ (FIG. 4A).

Se pueden conseguir modificaciones adicionales para el locus endógeno de la cadena ligera λ usando técnicas similares para insertar más segmentos genéticos hV λ . Por ejemplo, en la FIG. 5A se proporcionan ilustraciones esquemáticas de dos construcciones de dirección adicionales (Vectores de Dirección +16- λ y +12- λ) usadas para inserción progresiva de segmentos genéticos hV λ humanos. Como se ilustra, los fragmentos germánicos adicionales que contienen segmentos genéticos hV λ humanos específicos se insertan en el locus endógeno modificado de la cadena ligera λ en etapas sucesivas usando homología proporcionada por la inserción anterior de secuencias de cadena ligera λ humana. Después de la recombinación con cada construcción de dirección ilustrada, de una forma secuencial, se insertan 28 segmentos genéticos hV λ adicionales en el locus endógeno modificado de la cadena ligera λ . Esto crea un locus quimérico que produce una proteína de cadena ligera λ que comprende segmentos genéticos V λ -J λ humanos unidos a un gen C λ de ratón.

Los enfoques mencionados anteriormente para insertar segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana en el locus λ de ratón, mantiene a los amplificadores colocados aguas abajo de los segmentos genéticos C λ 2-J λ 4-C λ 4 (denominados Enh 2.4, Enh y Enh 3.1 en la FIG. 4A y la FIG. 5A). Este enfoque da como resultado un solo alelo modificado en el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón (FIG. 7A).

También se desvelan composiciones y métodos para preparar un ratón que expresa una cadena ligera que comprende segmentos genéticos V λ y J λ unidos de forma operativa a un segmento genético C λ de ratón, incluyendo composiciones y métodos para preparar un ratón que expresa tales genes de un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón. Los métodos incluyen la conversión de forma selectiva de un grupo genético endógeno V λ -J λ -C λ de ratón no funcional (por ejemplo, mediante una supresión dirigida), y el uso de segmentos genéticos V λ y J λ en el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón para expresar un dominio hV λ en un ratón.

De forma alternativa, en un segundo enfoque, algunos segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana se colocará en el locus endógeno de la cadena ligera κ . La modificación genética, en diversos aspectos, comprende una supresión del locus endógeno de cadena ligera κ . Por ejemplo, para eliminar cadenas ligeras κ de ratón del repertorio de anticuerpos endógenos, se puede realizar una supresión de los segmentos genéticos V κ y J κ de ratón. También se desvelan embriones de ratón modificados genéticamente, células, y construcciones de dirección para preparar los ratones, embriones de ratón, y células.

Por razones indicadas anteriormente, la supresión de los segmentos genéticos V κ y J κ de ratón usa una interrupción relativamente mínima. Una ilustración esquemática (no a escala) de los segmentos genéticos V κ y J κ de ratón suprimidos se proporciona en la FIG. 3. Los segmentos genéticos endógenos V κ y J κ de ratón se eliminan a través supresión mediada por recombinasa de posición de secuencias de ratón entre dos vectores de dirección colocados de forma precisa cada uno usando sitios de recombinación específica del sitio. Un primer vector de dirección (Vector de Dirección J κ) se usa en un primer suceso de dirección para suprimir los segmentos genéticos J κ de ratón. Un segundo vector de dirección (Vector de Dirección V κ) se usa en un segundo suceso de dirección, secuencial para suprimir una secuencia situada en la posición 5' del segmento genético V κ de ratón más distal. Ambos vectores de dirección contienen sitios de recombinación específicos del sitio que permiten de este modo la supresión selectiva tanto de los casetes de selección como de todas las secuencias de cadena ligera κ de ratón que intervienen después de que se haya conseguido una dirección satisfactoria. El locus suprimido resultante se silencia de forma funcional porque no se puede producir ninguna cadena ligera κ endógena. Este locus modificado se puede usar para la inserción de segmentos genéticos V λ y J λ para crear un locus endógeno κ de ratón que comprende segmentos genéticos V λ y J λ , mediante lo cual, después de la recombinación en el locus modificado, el animal produce cadenas ligeras λ que comprenden segmentos genéticos V λ y J λ reordenados unidos de forma operativa a un segmento genético endógeno C κ de ratón. Se pueden usar diversos vectores de dirección que comprenden secuencias de cadena ligera λ humana en conjunto con este locus κ de ratón suprimido para crear un locus híbrido de cadena ligera que contiene segmentos

genéticos λ humanos unidos de forma operativa con una región C κ de ratón.

Por lo tanto, un segundo enfoque posiciona uno o más segmentos genéticos V λ humanos en el locus de la cadena ligera de ratón κ , contiguo a un solo segmento genético J λ humano (Vector de Dirección 12/1- κ , FIG. 4B).

5 Se pueden realizar modificaciones en este enfoque para añadir segmentos genéticos y/o secuencias reguladoras para optimizar el uso de las secuencias de cadena ligera λ humana del locus κ de ratón dentro del repertorio de anticuerpos del ratón.

10 En un tercer enfoque, uno o más segmentos genéticos hV λ se colocan en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con cuatro secuencias genéticas hJ λ (Vector de Dirección 12/4- κ en la FIG. 4B).

En un tercer enfoque, uno o más segmentos genéticos hV λ se colocan en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con una secuencia intergénica κ humana y una sola secuencia genética hJ λ (Vector de Dirección 12(κ)1- κ , FIG. 4B).

15 En un cuarto enfoque, uno o más segmentos genéticos hV λ se colocan en el locus de cadena ligera κ de ratón contiguo con una secuencia intergénica κ humana y cuatro secuencias genéticas hJ λ (Vector de Dirección 12(κ)4- κ en la FIG. 4B).

20 Todos los enfoques mencionados anteriormente para insertar segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana en el locus κ de ratón, mantienen el elemento amplificador intrónico de κ aguas arriba del gen C κ (denominado E κ i, FIG. 4B y FIG. 5B) y el elemento amplificador de κ en la posición 3' aguas abajo del gen C κ (denominado E κ 3', FIG. 4B y FIG. 5B). Estos enfoques dan como resultado cuatro alelos modificados separados en el locus endógeno de cadena ligera κ de ratón (FIG. 7B).

25 En diversos aspectos, los ratones modificados genéticamente comprenden una supresión genética en el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón. En un aspecto, el locus de la cadena ligera λ presenta supresión genética mediante una estrategia que suprime la región que se extiende de V λ 2 a J λ 2, y la región que se extiende de Y λ 1 a C λ 1 (FIG. 2). Cualquier estrategia que reduzca o elimine la capacidad del locus endógeno de la cadena ligera λ para expresar dominios endógenos de λ es adecuada para uso en esta divulgación.

Anticuerpos de Dominio Lambda de Ratones Modificados Genéticamente

35 Los ratones que comprenden secuencias λ humanas ya sea en el locus de la cadena ligera κ o λ de ratón expresarán una cadena ligera que comprende una región hV λ fusionada con una región C λ de ratón (C κ o C λ). Estas se reproducen de forma ventajosa para ratones que (a) comprenden un locus de cadena ligera silenciado de forma funcional (por ejemplo, una supresión genética del locus endógeno de la cadena ligera κ o λ de ratón); (b) comprenden un locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón que comprende segmentos genéticos hV y hJ unidos de forma operativa a un gen endógeno C λ de ratón; (c) comprenden un locus endógeno de cadena ligera κ de ratón que comprende segmentos genéticos hV κ y hJ κ unidos de forma operativa a un gen endógeno C κ de ratón; y, (d) un ratón en el que un alelo de κ comprende los hV κ y los hJ κ ; el otro alelo de κ que comprende los hV λ y los hJ λ ; un alelo de λ que comprende los hV λ y los hJ λ y un alelo de λ silenciado o con supresión genética, o ambos alelos de λ que comprenden los hV λ y los hJ λ ; y, dos alelos de cadena pesada cada uno de los cuales que comprende los hV H , los hD H , y los hJ H .

45 Los anticuerpos que comprenden los dominios hV λ expresados en el contexto de cualquier C κ se usan para preparar anticuerpos totalmente humanos mediante clonación de los ácidos nucleicos que codifican los dominios de hV λ en construcciones de expresión que portan genes que codifican el C λ humano. Las construcciones de expresión resultantes se transfectan en células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos que presentan un dominio de hV λ completo fusionado con hC λ .

Ejemplos

50 Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de describir cómo preparar y usar métodos de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores contemplan como su invención. A menos que se indique de otro modo, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es la atmosférica o casi la atmosférica.

Ejemplo I

Supresión de los Loci de Cadena Ligera de Inmunoglobulina de Ratón

60 Se realizaron diversas construcciones de dirección usando tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, los documentos de 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) genómicas de ratón a la inactivar los loci de la cadena ligera κ y λ de ratón.

Supresión del locus de la cadena ligera λ de ratón. El ADN del clon RP23-135k15 de BAC de ratón (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga para inactivar el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón a través de la supresión dirigida de los grupos de genes V λ -J λ -C λ (FIG. 2).

5 En resumen, todo el grupo proximal que comprende los segmentos genéticos V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1 se suprimió en un solo suceso de dirección usando un vector de dirección que comprende un casete de neomicina flanqueado por sitios loxP con una rama de homología de ratón en la posición 5' que contenía la secuencia en la posición 5' del segmento genético V λ 1 y una rama de homología de ratón en la posición 3' que contenía la secuencia en la posición 3' del segmento genético C λ 1 (FIG. 2, Vector de Dirección 1).

10 Una segunda construcción de dirección se preparó para suprimir de forma precisa el grupo genético endógeno λ de ratón distal que contenía V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4 excepto porque la construcción de dirección contenía una rama de homología de ratón en la posición 5' que contenía la secuencia en la posición 5' del segmento genético V λ 2 y una rama de homología de ratón en la posición 3' que contenía la secuencia en la posición 5' para el segmento genético endógeno C λ 2 (FIG. 2, Vector de Dirección 2). Por lo tanto, la segunda construcción de dirección V λ 2-J λ 2 se elimina de forma precisa, a la vez que se deja a C λ 2-J λ 4-C λ 4 intacto en el locus endógeno λ de ratón. Las células ES que contienen un locus endógeno λ inactivado (como se ha descrito anteriormente) se confirmaron con métodos de formación de cariotipos y de identificación sistemática (por ejemplo, TAQMAN®) conocidos en la técnica. A continuación, el ADN se aisló de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con CRE recombinasa mediando de este modo la supresión del casete de dirección proximal que contenía al gen marcador de neomicina, dejando solamente un solo sitio de loxP en el punto de supresión (FIG. 2, parte inferior).

15 **Supresión del locus de la cadena ligera κ de ratón.** Se prepararon varias construcciones de dirección usando métodos similares a los descritos anteriormente para modificar el ADN de los clones RP23-302g12 y RP23-254m04 de BAC de ratón (Invitrogen) mediante recombinación homóloga para inactivar el locus de cadena ligera κ de ratón en un proceso de dos etapas (FIG. 3).

20 En resumen, los segmentos genéticos J κ (1-5) del locus endógeno de cadena ligera κ de ratón se suprimieron en un solo suceso de dirección usando un vector de dirección que comprendía un casete de higromicina-timidina quinasa (hyg-TK) que contenía un solo sitio loxP en la posición 3' con respecto al casete de hyg-TK (FIG. 3, Vector de Dirección J κ). Las ramas de homología usadas para preparar este vector de dirección contenían secuencia genómica de ratón en las posiciones 5' y 3' de los segmentos genéticos endógenos J κ de ratón. En un segundo suceso de dirección, se preparó un segundo vector de dirección para suprimir una porción de la secuencia genómica de ratón aguas arriba (5') con respecto al segmento genético endógeno V κ de ratón más distal (FIG. 3, Vector de Dirección V κ). Este vector de dirección contenía un sitio lox511 invertido, un sitio loxP y un casete de neomicina. Las ramas de homología usadas para preparar este vector de dirección contenían secuencia genómica de ratón aguas arriba del segmento genético V κ de ratón más distal. Los vectores de dirección se usaron de una manera secuencial (es decir, J κ la continuación V κ) para dirigir el ADN en las células ES. Las células ES que portan un cromosoma de doble dirección (es decir, un solo locus endógeno κ de ratón dirigido con ambos vectores de dirección) se confirmaron mediante métodos de formación de cariotipos e identificación sistemática (por ejemplo, Taq-man™) conocidos en la técnica. A continuación, el ADN se aisló de las células ES modificadas y se sometió a tratamiento con Cre recombinasa mediando de este modo la supresión de los segmentos genéticos endógenos V κ de ratón y ambos casetes de selección, a la vez que se dejan dos sitios lox yuxtapuestos en orientación opuesta entre sí (FIG. 3, parte inferior; SEQ ID NO: 1).

45 Por lo tanto, se crearon dos loci endógenos modificados de cadena ligera (κ y λ) que contenían regiones amplificadoras y regiones constantes intactas para la inserción de forma progresiva de segmentos genéticos de línea germinal λ humana sin reordenar de una manera precisa usando vectores de dirección que se describen a continuación.

50 Ejemplo II

Sustitución de Loci de Cadena Ligera de Ratón

con un Mini-Locus de Cadena Ligera λ Humana

55 Se modificaron por ingeniería múltiples vectores de dirección para inserción progresiva de segmentos genéticos λ humanos en los loci endógenos de la cadena ligera κ y λ de ratón usando métodos similares a los que se han descrito anteriormente. Se realizaron múltiples modificaciones iniciales independientes a los loci endógenos de cadena ligera produciendo cada 11 locus de cadena ligera quimérica que contenía los segmentos genéticos V λ y J λ unidos de forma operativa a genes y elementos amplificadores constantes de cadena ligera de ratón.

60 **Un mini-locus λ humano que contiene 12 V λ humanos y un segmento genético J λ humano.** Una serie de vectores de dirección iniciales se modificaron por ingeniería para que contuvieran los primeros 12 segmentos genéticos V λ humanos consecutivos del grupo A y un segmento genético hJ λ 1 o cuatro segmentos genéticos hJ λ usando un clon de BAC humano denominado RP11-729g4 (Invitrogen). Las FIG. 4A y 4B muestran los vectores de dirección que se construyeron para preparar una inserción inicial de los segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana en los loci de la cadena ligera λ y κ de ratón, respectivamente.

Para un primer conjunto de vectores de dirección iniciales, un fragmento de ADN de 124.125 pb del clon de BAC 729g4 que contenía 12 segmentos genéticos hVλ y un segmento genético hJλ1 se modificó por ingeniería para que contuviera un sitio PI-SceI de 996 pb aguas abajo (3') del segmento genético hJλ1 para ligación de la rama de homología de ratón en la posición 3'. Se usaron dos conjuntos diferentes de ramas de homología para ligación a este fragmento humano;

5 un conjunto de ramas de homología contenían secuencias endógenas λ de ratón del clon de BAC 135k15 (FIG.4A) y otro conjunto contenían la secuencia endógena κ en las posiciones 5' y 3' de los segmentos genéticos Vκ y Jκ de ratón de los clones RP23-302g12 y RP23-254m04, respectivamente de BAC (FIG. 4B).

Para el Vector de Dirección 12/1-λ (FIG. 4A), un sitio PI-SceI se modificó por ingeniería en el extremo en la posición 5' de un fragmento de ADN de 27.847 pb que contenía el Cλ2-Jλ4-Cλ4 de ratón y el elemento amplificador 2.4 del locus λ de ratón modificado descrito en el Ejemplo 1. El fragmento de ratón de -28 kb se usó como una rama de homología en la posición 3' mediante ligación con el fragmento λ humano de -124 kb, que creó una unión en la posición 3' que contenía, de la posición 5' a la posición 3', un segmento genético hJλ1, de 996 pb de la secuencia λ humana en la posición 3' del segmento genético hJλ1, 1229 pb de la secuencia λ de ratón en la posición 5' con respecto al gen Cλ2 de ratón, el gen Cλ2 de ratón y la porción restante del fragmento de ratón de ~28 kb. Aguas arriba (5') del segmento genético Vλ3-12 se encontraban 1456 pb de la secuencia λ humana antes del inicio de la rama de homología de ratón en la posición 5', que contenía 23.792 pb del ADN genómico de ratón que correspondían a la secuencia en la posición 5' del locus endógeno λ de ratón. Entre la rama de homología en la posición 5' y el comienzo de la secuencia λ humana había un casete de neomicina flanqueado por sitios de Frt.

10
15
20

Por lo tanto, el Vector de Dirección 12/1-λ incluía, de la posición 5' a la posición 3', una rama de homología en la posición 5' que contenía ~24 kb secuencia genómica λ de ratón en la posición 5' del locus endógeno λ, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de neomicina, un sitio de Frt en la posición 3', ~123 kb de la secuencia genómica λ humana que contenían los primeros 12 segmentos genéticos hVλ consecutivos y un segmento genético hJλ1, un sitio PI-SceI, y una rama de homología en la posición 3' que contenía ~28 kb de la secuencia genómica de ratón que incluía los segmentos genéticos endógenos Cλ2-Jλ4-Cλ4, la secuencia 2.4 amplificadora de ratón y la secuencia genómica de ratón adicional aguas abajo (3') del elemento amplificador 2.4 (FIG. 4A).

25

De una manera similar, el Vector de Dirección 12/1-κ (FIG. 4B) usaba el mismo fragmento λ humano de ~124 kb con la excepción de que se usaron las ramas de homología de ratón que contenían la secuencia κ de ratón de modo que la dirección al locus endógeno κ se pudo conseguir mediante recombinación homóloga. Por lo tanto, el Vector de Dirección 12/1-κ incluía, de la posición 5' a la posición 3', una rama de homología en la posición 5' que contenía ~23 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus endógeno κ, un sitio I-CeuI, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de neomicina, un sitio de Frt en la posición 3', ~124 kb de la secuencia genómica λ humana que contenía los primeros 12 segmentos genéticos hVλ consecutivos y un segmento genético hJλ1, un sitio PI-SceI, y una rama de homología en la posición 3' que contenía ~28 kb de la secuencia genómica de ratón incluyendo el gen endógeno Cκ de ratón, Eκi y Eκ3' y la secuencia genómica de ratón adicional aguas abajo (3') de Eκ3' (FIG. 4B, Vector de Dirección 12/1-κ).

30
35

La recombinación homóloga con cualquiera de estos dos vectores de dirección inicial creó un locus de cadena ligera de ratón (κ o λ) modificado que contenía 12 segmentos genéticos hVλ y un segmento genético hJλ1 unidos de forma operativa al gen constante endógeno de la cadena ligera de ratón y genes amplificadores (Cκ o Cλ2 y Eκi/Eκ3' o Enh 2.4/Enh 3.1) que, después de recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera λ quimérica.

40

Un mini-locus λ humano con 12 Vλ humanos y cuatro segmentos genéticos Jλ humanos. En otro enfoque para añadir diversidad a un locus de cadena ligera λ quimérica, un tercer vector de dirección inicial se modificó por ingeniería para insertar los primeros 12 segmentos genéticos Vλ humanos consecutivos del grupo A y los segmentos genéticos hJλ1, 2, 3 y 7 en el locus de la cadena ligera κ de ratón (FIG. 4B, Vector de Dirección 12/4-κ). Un segmento de ADN que contenía los segmentos genéticos hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7 se preparó mediante síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies) incluyendo cada segmento genético Jλ y la secuencia genómica de ~100 pb de ambas regiones inmediatas en las posiciones 5' y 3' de cada segmento genético Jλ. Un sitio PI-SceI se modificó por ingeniería en el extremo en la posición 3' de este fragmento de ADN de ~1 kb y se ligó con un casete de cloroamfenicol. Las ramas de homología se amplificaron con PCR a partir de la secuencia λ humana en las posiciones 5' y 3' con respecto al segmento genético hJλ1 del clon 729g4 de BAC humano. La recombinación homóloga con este vector de dirección intermedio se realizó en un clon de 729g4 modificado que se había dirigido anteriormente aguas arriba (5') del segmento genético Vλ3-12 humano con un casete de neomicina flanqueado por sitios de Frt, que también contenían un sitio I-CeuI en la posición 5' con respecto a la posición 5' del sitio de Frt. El clon de BAC 729g4 de doble dirección incluía de la posición 5' a la posición 3' un sitio I-CeuI, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de neomicina, un sitio de Frt en la posición 3', un fragmento de -123 kb que contenía los primeros 12 segmentos genéticos hVλ, un fragmento de ~1 kb que contenían los segmentos genéticos Jλ1, 2, 3 y 7 humanos, un sitio PI-SceI, y un casete de cloroamfenicol. Este vector de dirección intermedio se digirió con I-CeuI y PI-SceI y posteriormente se ligó en el clon de BAC de ratón modificado (descrito anteriormente) para crear el tercer vector de dirección.

45
50
55
60

Esta ligación dio como resultado un tercer vector de dirección para inserción de secuencias λ humanas en el locus endógeno de la cadena ligera κ, que incluía, de la posición 5' a la posición 3', una rama de homología de ratón en la posición 5' que contenía ~23 kb de la secuencia genómica en la posición 5' del locus endógeno κ de ratón, un sitio I-CeuI, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de neomicina, un sitio de Frt en la posición 3', un fragmento de -123 kb

65

que contenía los primeros 12 segmentos genéticos hVλ, un fragmento de ~1 kb que contenían los segmentos genéticos hJλ1, 2, 3 y 7, un sitio PI-SceI y una rama de homología en la posición 3' que contenía ~28 kb de la secuencia genómica de ratón incluyendo el gen endógeno Ck de ratón, Eki y Ek3' y la secuencia genómica de ratón adicional aguas abajo (3') de Ek3' (FIG. 4B, Vector de Dirección 12/4-κ). La recombinación homóloga con este tercer vector de dirección creó un locus modificado de la cadena ligera κ de ratón que contenía 12 segmentos genéticos hVλ y cuatro hJλ segmentos genéticos unidos de forma operativa al gen endógeno Ck de ratón, que después de recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica λ humana/κ de ratón.

Un mini-locus λ humano con una secuencia de la cadena ligera κ humana integrada. De una manera similar, dos vectores de dirección adicionales similares a los modificados por ingeniería para preparar una inserción inicial de los segmentos genéticos λ humanos en el locus endógeno de la cadena ligera κ (FIG. 4B, Vectores de Dirección 12/1-κ y 12/4-κ) se modificaron por ingeniería para insertar de forma progresiva segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana usando vectores de dirección construidos de forma única que contenían secuencias genómicas λ y κ humanas contiguas. Estos vectores de dirección se construyeron para incluir una secuencia genómica κ humana de ~ 23 kb situada de forma natural entre los segmentos genéticos human Vκ 4-1 y Jκ1 humanos. Esta secuencia genómica κ humana se colocó de forma específica en estos vectores de dirección adicionales entre Vλ humano y los segmentos genéticos Jλ humanos (FIG. 4B, Vectores de Dirección 12(κ)1-κ y 12(κ)4-κ).

Ambos vectores de dirección que contienen la secuencia genómica κ humana se prepararon usando el clon de BAC RP11-729g4 modificado descrito anteriormente (FIG. 6). Este clon de BAC estaba dirigido con un casete de selección de espectinomicina flanqueado con sitios de restricción NotI y AsiSI (FIG.6, parte superior a la izquierda). La recombinación homóloga con el casete de espectinomicina dio como resultado un clon de BAC 729g4 de doble dirección que incluía, de la posición 5' a la posición 3', un sitio de I-CeuI, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de neomicina, un sitio de Frt en la posición 3', un fragmento de -123 kb que contenía los primeros 12 segmentos genéticos hVλ, un sitio de NotI aproximadamente 200 pb aguas abajo (3') con respecto a la secuencia de nonúmero del segmento genético hVλ3-1, un casete de espectinomicina y un sitio de AsiSI. Un clon de BAC humano separado que contenía la secuencia κ humana (CTD-2366j12) se dirigió dos veces independientemente para modificar por ingeniería los sitios de restricción en las posiciones entre los segmentos genéticos hVκ4-1 y hJκ1 para permitir la clonación posterior de un fragmento de -23 kb para ligación con los segmentos genéticos hVλ contenidos en el clon de BAC 729g4 modificado de doble dirección (FIG. 6, parte superior izquierda a la derecha).

En resumen, el clon 2366j12 de BAC tiene un tamaño de aproximadamente 132 kb y contiene segmentos genéticos hVκ 1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, secuencia genómica κ humana aguas abajo de los segmentos genéticos Vκ, segmentos genéticos hJκ 1-5, el hCκ y aproximadamente 20 kb de secuencia genómica adicional del locus κ humano. Este clon se dirigió primero con un vector de dirección que contenía un casete de higromicina flanqueado por sitios de Frt y un sitio de NotI aguas abajo (3') del sitio de Frt en la posición 3'. Las ramas de homología para este vector de dirección contenían secuencia genómica humana en las posiciones 5' y 3' de los segmentos genéticos Vκ dentro del clon de BAC de modo que después de la recombinación homóloga con este vector de dirección, los segmentos genéticos Vκ se suprimían y un sitio de NotI se modificó por ingeniería -133 pb aguas abajo del segmento genético hVκ4-1 (FIG. 6, parte superior a la derecha). Este clon 2366j12 de BAC modificado se dirigía en forma independiente con dos vectores de dirección en el extremo en la posición 3' para suprimir los segmentos genéticos hJκ con un casete de cloroamfenicol que también contenía cualquiera de un segmento genético hJλ1, un sitio de PI-SceI y un sitio de AsiSI o un fragmento genómico λ humano que contenía cuatro segmentos genéticos hJλ (mencionado anteriormente), un sitio de PI-SceI y un sitio de AsiSI (FIG. 6, parte superior a la derecha). Las ramas de homología para estos dos vectores de dirección similares contenían secuencia en las posiciones 5' y 3' de los segmentos genéticos hJκ. La recombinación homóloga con estos segundos vectores de dirección y el clon 2366j12 de BAC modificado proporcionó un clon 2366j12 de doble dirección que incluía, de la posición 5' a la posición 3', un sitio de Frt en la posición 5', un casete de higromicina, un sitio de Frt en la posición 3', un sitio de NotI, un fragmento o genómico de 22.800 pb del locus κ humano que contenía la región intergénica entre los segmentos genéticos Vκ4-1 y Jκ1, cualquiera de un segmento genético hJλ1 o un fragmento genómico λ humano que contenía hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, un sitio de PI-SceI y un casete de cloroamfenicol (FIG. 6, parte superior a la derecha). Se consiguieron dos vectores de dirección finales para preparar las dos modificaciones adicionales mediante dos etapas de ligación usando los clones 729g4 y 2366j12 de doble dirección.

Los clones 729g4 y 2366j12 de doble dirección se digirieron con NotI y AsiSI proporcionan un fragmento que contenía el casete de neomicina y segmentos genéticos hVλ y otro fragmento que contenía el fragmento genómico de -23 kb del locus κ humano que contenía la región en intergénica entre los segmentos genéticos Vκ4-1 y Jκ1, cualquiera de un segmento genético hJλ1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos genéticos hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, el sitio PI-SceI y el casete de cloroamfenicol, respectivamente. La ligación de estos fragmentos generó dos clones de BAC únicos que contenían, de la posición 5' a la posición 3', los segmentos genéticos hVλ, la secuencia genómica κ humana entre los segmentos genéticos Vκ4-1 y Jκ1, cualquiera de un segmento genético hJλ1 o un fragmento genómico que contenía los segmentos genéticos hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, un sitio de PI-SceI y un casete de cloroamfenicol (FIG. 6, parte inferior). Estos nuevos clones de BAC se digirieron a continuación con I-CeuI y PI-SceI para liberar los fragmentos únicos que contenían el casete de neomicina aguas arriba y las secuencias contiguas λ y κ humanas y se ligaron en un clon 302g12 de BAC de ratón modificado que contenía, de la posición 5' a la posición 3', secuencia genómica de ratón en la posición 5' del locus endógeno κ, un sitio de I-CeuI, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de neomicina, un sitio de Frt en la posición 3', segmentos genéticos hVλ (3-12 a 3-1), un sitio de NotI ~200 pb aguas

abajo de Vλ3-1, -23 kb de la secuencia κ humana encontrada en la naturaleza entre los segmentos genéticos Vκ4-1 y Jκ1 humanos, cualquiera de un segmento genético hJλ1 o un fragmento genómico que contenían los segmentos genéticos hJλ1, Jλ2, Jλ3 y Jλ7, el Eκ1 de ratón, el gen Cκ de ratón y Eκ3' (FIG. 4, 12hVλ-VκJκ-hJλ1 y 12hVλ-VκJκ-4hJλ. Vectores de Dirección). La recombinación homóloga con ambos de estos vectores de dirección creó dos loci de

5 cadena ligera κ de ratón modificados separados que contenían 12 segmentos genéticos hVλ, secuencia genómica κ humana, y cualquiera de uno o cuatro segmentos genéticos hJλ unidos de forma operativa al gen endógeno Cκ de ratón que, después de recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera de λ humano/κ de ratón quimérica.

Ejemplo III

Modificación por Ingeniería de Segmentos Genéticos Vλ Humanos Adicionales

En un Mini-Locus de Cadena Ligera λ Humana

15 Se añadieron segmentos genéticos hVλ adicionales independientemente a cada una de las modificaciones iniciales descritas en el Ejemplo 2 usando vectores de dirección y métodos similares (FIG. 5A, Vector de Dirección +16-λ y FIG. 5B, Vector de Dirección +16-κ).

20 **Introducción de 16 segmentos genéticos Vλ humanos adicionales.** Las ramas de homología aguas arriba (5') usadas en la construcción de vectores de dirección para añadir 16 segmentos genéticos hVλ adicionales a los loci de cadena ligera modificada descritas en el Ejemplo 2 contenían secuencia genómica de ratón en la posición 5' de cualquiera de los loci endógenos de cadena ligera κ o λ. Las ramas de homología en la posición 3' eran las mismas para todos los vectores de dirección y contenían secuencia genómica humana que se superponían con el extremo en la posición 5' de la secuencia λ humana de las modificaciones como se describe en el Ejemplo 2.

25 En resumen, dos vectores de dirección se modificaron por ingeniería para introducción de 16 segmentos genéticos hVλ adicionales a los loci de cadena ligera de ratón modificados descritos en el Ejemplo 2 (FIG. 5A y 5B, Vector de Dirección +16-λ o +16-κ). Un fragmento de ADN de ~172 kb del clon RP11- 76113 de BAC (Invitrogen) que contenía 21 segmentos genéticos hVλ consecutivos del grupo A se modificó por ingeniería con una rama de homología en la posición 5' que contenía la secuencia genómica de ratón en la posición 5' con respecto a cualquiera de los loci endógenos de la cadena ligera κ o λ y una rama de homología en la posición 3' que contenía la secuencia genómica λ humana. Las ramas de homología κ o λ de ratón en la posición 5' usadas en estas construcciones de dirección eran las mismas ramas de homología en la posición 5' descritas en el Ejemplo 2 (FIG. 5A y 5B). La rama de homología en la posición 3' incluía un solapamiento de 53.057 pb de la secuencia genómica λ humana que correspondía al extremo en la posición 5' equivalente del fragmento de -123 kb de la secuencia genómica λ humana descrita en el Ejemplo 2.

30 Estos dos vectores de dirección incluían, de la posición 5' a la posición 3', una rama de homología de ratón en la posición 5' que contenía cualquiera de -23 kb de la secuencia genómica en la posición 5' del locus endógeno de cadena ligera κ de ratón o -24 kb de la secuencia genómica de ratón 5' del locus endógeno de la cadena ligera λ, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de higromicina, un sitio de Frt en la posición 3' y 171.457 pb de la secuencia genómica λ humana que contenía 21 segmentos genéticos hVλ consecutivos, -53 kb que se superponen con el extremo en la posición 5' de la secuencia λ humana descrita en el Ejemplo 3 y sirve como la rama de homología en la posición 3' para esta construcción de dirección (FIG. 5A y 5B, Vectores de Dirección +16-λ o +16-κ). La recombinación homóloga con estos vectores de dirección creó loci de la cadena ligera κ y λ de ratón modificados de forma independiente conteniendo cada uno 28 segmentos genéticos hVλ un segmento genético hJλ1 unidos de forma

35 operativa a los genes endógenos constantes de ratón (Cκ o Cλ2) que, después de recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica.

De una manera similar, el Vector de Dirección +16-κ también se usó para introducir los 16 segmentos genéticos hVλ adicionales a las otras modificaciones iniciales descritas en el Ejemplo 2 que incorporaban múltiples segmentos genéticos hJλ con y sin una secuencia κ humana integrada (FIG. 4B). La recombinación homóloga con este vector de dirección en el locus endógeno κ de ratón que contenía las otras modificaciones iniciales creó loci de cadena ligera κ de ratón que contenían 28 segmentos genéticos hVλ y hJλ1, 2, 3 y 7 segmentos genéticos con y sin una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unidos de forma operativa al gen endógeno Cκ de ratón que, después de recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera λ-κ quimérica.

55 **Introducción de 12 segmentos genéticos Vλ humanos adicionales.** Se añadieron segmentos genéticos hVλ adicionales de forma independiente a cada una de las modificaciones descritas anteriormente usando vectores de dirección y métodos similares. La estructura del locus final que resulta de la recombinación homóloga con vectores de dirección que contienen segmentos genéticos hVλ adicionales se muestra en la FIG. 7A y 7B.

60 En resumen, un vector de dirección se modificó por ingeniería para introducción de 12 segmentos genéticos hVλ adicionales a los loci de cadena ligera κ y λ de ratón modificados descritos anteriormente (FIG. 5A y 5B, Vectores de Dirección +12-λ o 12-κ). Un fragmento de ADN de 93.674 pb del clon RP11-22118 de BAC humano (Invitrogen) que contenía 12 segmentos genéticos hVλ consecutivos del grupo B se modificó por ingeniería con una rama de homología en la posición 5' que contenía la secuencia genómica de ratón en la posición 5' para cualquiera de los loci endógenos de cadena ligera κ o λ de ratón y una rama de homología en la posición 3' que contenía la secuencia λ genómica

65

humana. Las ramas de homología en la posición 5' usadas en esta construcción de dirección fueron las mismas ramas de homología en la posición 5' usadas para la adición de 16 segmentos genéticos hVλ descrita anteriormente (FIG. 5A y 5B). La rama de homología en la posición 3' se preparó mediante modificación por ingeniería de un sitio de PI-SceI de -3431 pb en la posición 5' con respecto al segmento genético Vλ3-29P humano contenido en un fragmento genómico de 27.468 pb de la secuencia λ humana del clon RP11-76113 de BAC. Este sitio de PI-SceI sirvió como un punto de ligación para unir el fragmento de -94 kb de la secuencia λ humana adicional para la modificación usando el fragmento de -27 kb de la secuencia λ humana que se superpone con el extremo en la posición 5' de la secuencia λ humana en la modificación anterior usando los Vectores de Dirección +16-λ o +16-κ (FIG. 5A y 5B). Estos dos vectores de dirección incluían, de la posición 5' a la posición 3', una rama de homología en la posición 5' que contenía cualquiera de -23 kb de la secuencia genómica de ratón en la posición 5' del locus endógeno de cadena ligera κ o -24 kb de la secuencia genómica de ratón en la posición 5' del locus endógeno de la cadena ligera λ, un sitio de Frt en la posición 5', un casete de neomicina, un sitio de Frt en la posición 3' y 121.188 pb de la secuencia genómica λ humana que contenía 16 segmentos genéticos hVλ y un sitio de PI-SceI, -27 kb que se superponen con el extremo en la posición 5' de la secuencia λ humana de la inserción de 16 segmentos genéticos hVλ adicionales y sirve como la rama de homología en la posición 3' para esta construcción de dirección (FIG. 5A y 5B, Vectores de Dirección +12-λ o 12-κ). La recombinación homóloga con estos vectores de dirección creó de forma independiente loci modificados de cadena ligera κ y λ de ratón que contenían 40 segmentos genéticos hVλ y Jλ1 humano unidos de forma operativa a los genes endógenos constantes de ratón (Cκ o Cλ2 que, después de recombinación, conduce a la formación de una cadena ligera quimérica (parte inferior de la FIG.5A y 5B).

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

Ejemplo IV

Identificación de células ES dirigidas que Portan

Segmentos Genéticos de Cadena Ligera λ Humana

El ADN de BAC dirigido preparado de acuerdo con los varios permiten ejemplos mencionados anteriormente se usó para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresan segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana. Las células ES que contienen una inserción de segmentos genéticos sin reordenar de la cadena ligera λ humana se identificaron con un ensayo TAQMAN® cuantitativo. Se diseñaron conjuntos de cebadores y sondas para inserción de secuencias λ humanas y casetes de selección asociados (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 de franqueo (retención de alelo, AR). Para cada inserción adicional de secuencias λ humanas, se usaron conjuntos de cebador y sondas adicionales para confirmar la presencia de las secuencias λ humanas adicionales así como los conjuntos de cebador y sondas anteriores para confirmar la retención de las secuencias humanas dirigidas anteriormente. La Tabla 1 establecen los cebadores y sondas asociadas usados en los ensayos de PCR cuantitativa. La Tabla 2 establece las combinaciones usadas para confirmar la inserción de cada sección de segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana en clones de linfocitos ES.

Las células ES que portan los segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana se transfectaron de forma opcional con una construcción que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina de Frt introducido por la inserción de la construcción de dirección que contiene segmentos genéticos Vλ5-52 - Vλ1-40 humanos (FIG. 5A y 5B). El casete de neomicina se puede eliminar opcionalmente cruzando ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, documento de patente US 6.774.279). De forma opcional, el casete de neomicina se retiene en el ratón.

Tabla 1

Sonda	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		

ES 2 721 749 T3

(continuación)

Sonda	SEQ ID NO:	Sonda	SEQ ID NO:
61hJ1F	8	61hJ1P	27
61hJ1R	9		
67hT1F	10	67hT1 P	28
67hT1R	11		
67hT3F	12	67hT3P	29
67hT3R	13		
HyqF	14	HygP	30
HyqR	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		
mL1 F	75	mL1 P	83
mL1R	76		
mL2F	77	mL2P	84
mL2R	78		
mL11F	79	mL11P	85
mL11R	80		
mL12F	81	mL12P	86
mL12R	82		

Tabla 2

Modificación	Ensayo	Conjunto de	Sonda	Posición de la Secuencia
Inserción de 12 hVλ y hJλ1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 - hVλ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	Secuencia hJλ
		NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
	LOA	MK20F/MKP4R	-	Secuencia <i>lox511/loxP</i> del locus <i>k</i> inactivado
		HygF/HygR	HygP	Casete de higromicina del locus <i>λ</i> inactivado
		mL1 F/mL1R	mL1 P	Grupo Yλ1-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 <i>Vk</i> en la posición 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en el locus <i>Vk</i> en la posición 3'
Inserción de 16 hVλ	GOA	67hT1 F/67hT1R	67hT1 P	hVλ3-27 - hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HyqF/HyqR	HyqP	Casete de higromicina
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina

(continuación)

Modificación	Ensayo	Conjunto de	Sonda	Posición de la Secuencia
		mL1 F/mL11R	mL1 P	Grupo Yλ1-Cλ1 de Ratón
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Grupo Yλ2-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 en la posición 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en el locus Vκ en la posición 3'
Inserción de 12 hVλ	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hVλ5-52 - hVλ1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	Casete de neomicina
	LOA	HyaF/HyaR	HyaP	Casete de higromicina
		mL1 F/mL11R	mL1P	Grupo Yλ1-Cλ1 de Ratón
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Grupo Yλ2-Cλ2 de Ratón
	mL12F/mL12R	mL12P		
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 - hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1 F/67hT1R	67hT1 P	hVλ3-27 - hVλ3-12
	67hT3F/67hT3R	67hT3P		
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Secuencia de ratón en el locus Vκ en la posición 5'
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Secuencia de ratón en el locus Vκ en la posición 3'

Ejemplo V**Generación de Ratones que Expresan Cadenas Ligeras λ Humanas**

5

De un Locus Endógeno de Cadena Ligera

Las células ES dirigidas descritos anteriormente se usaron como células ES dadoras y se introdujeron en un embrión de ratón en una etapa de 8 células con 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. Se identificaron segmentos genéticos de λ humano que portaban independientemente VELOCIMICE® (ratones F0 derivados totalmente de la célula ES dadora) mediante formación de fenotípicos usando una modificación del ensayo de alelo (Valenzuela *et al.*, mencionado anteriormente) que detectaba la presencia de los segmentos genéticos λ humanos únicos (mencionado anteriormente).

15

Uso de la cadena ligera κ:λ de ratones que portan segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana.

Se analizaron ratones homocigotos para cada una de las tres inserciones sucesivas de segmentos genéticos hVλ con un solo segmento genético hJλ (FIG. 5B) y ratones homocigotos para una primera inserción de segmentos genéticos hVλ con cualquiera de un solo segmento genético hJλ o cuatro segmentos genéticos Jλ humanos incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana (FIG. 4B) para expresión de la cadena ligera κ y λ en esplenocitos usando citometría de flujo.

En resumen, se extirparon bazo de grupos de ratones (que variaban de tres a siete 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), los esplenocitos se tiñeron con anticuerpos conjugados con colorante fluorescente específicos para CD19 de ratón (Clone 1D3; 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 usando 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 del porcentaje medio para expresión de linfocitos B (CD19⁺), cadena ligera κ (CD19⁺Igκ⁺Igλ⁻) y cadena ligera λ (CD19⁺Igκ⁻Igλ⁺) observada

30

en esplenocitos de grupos de animales cada uno de los cuales portando modificación genética.

En un experimento similar, los contenidos de linfocitos B del compartimento esplénico de ratones homocigotos para una primera inserción de 12 hVλ y cuatro segmentos genéticos hJλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma operativa al gen Cκ de ratón (parte inferior de la FIG. 4B) y ratones homocigotos para 40 hVλ y un segmento genético hJλ (parte inferior de la FIG. 5B o parte superior de la FIG. 7B) se analizaron 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 linfocitos B CD19⁺ para un ratón representativo de cada grupo. El número de linfocitos B CD19⁺ por bazo también se registró para cada ratón (FIG. 8B).

En otro experimento, los contenidos de linfocitos B de los compartimentos del bazo y la médula ósea de ratones homocigotos para 40 hVλ y cuatro segmentos genéticos hJλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma operativa al gen Cκ de ratón (parte inferior de la FIG. 7B) se analizaron para la evolución a través del desarrollo de linfocitos B usando citometría de flujo de diversos marcadores de superficie celular.

En resumen, se sacrificaron dos grupos (N = 3 cada uno, 9-12 semanas de edad, macho y hembra) de tipo silvestre y ratones homocigotos para 40 hVλ y cuatro segmentos genéticos hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma operativa al gen Cκ de ratón y se extrajeron bazos y médula ósea. La médula ósea se extrajo de los fémures con un lavado rápido con medio RPMI completo (medio RPMI complementado con un suero bovino fetal, piruvato sódico, Hepes, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales y gentamicina). Los RBC de preparaciones de bazo y médula ósea se lisaron con tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville), seguido de lavado con medio RPMI completo. Se incubaron 1 x 10⁶ células con CD16/CD32 anti-ratón (2.4G2, BD Biosciences) en hielo durante 10 minutos, seguido de etiquetado con panel de anticuerpos seleccionados durante 30 min en hielo.

Panel de médula ósea: FITC-CD43 anti-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: FITC-Igκ anti-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 se fijaron en formaldehído al 2 %. La adquisición de los datos se realizó en un citómetro de flujo FACSCANTOII™ (BD Biosciences) y se analizó 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 FIGs. 10A - 10E muestran los resultados para el compartimento de la médula ósea de un ratón representativo de cada grupo. La Tabla 4 expone los valores de porcentaje medio para expresión de linfocitos B (CD19⁺), cadena ligera κ (CD19⁺Igκ⁺Igλ⁻) y cadena ligera λ (CD19⁺Igκ-Igλ⁺) observaran esplenocitos de grupos de animales que portan diversas modificaciones genéticas. La Tabla 5 expone los valores del porcentaje medio para linfocitos B (CD19⁺), linfocitos B maduros (B220^{hi}IgM⁺), linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺), linfocitos B inmaduros que expresan la ligera κ (B220^{int}IgM⁺Igκ⁺) y linfocitos B inmaduros que expresan la cadena ligera λ (B220^{int}IgM⁺Igλ⁺) observada en médula ósea de ratones de tipo silvestre y ratones homocigotos para 40 hVλ y cuatro segmentos genéticos hJλ que incluyen una secuencia genómica Vκ-Jκ humana unida de forma operativa al gen Cκ de ratón. Este experimento se repitió con grupos adicionales de los ratones descritos anteriormente y demostró resultados similares (los datos no se muestran).

Tabla 3

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

Tabla 4

Genotipo	% de linfocitos B	% de Igκ ⁺	% de Igλ ⁺
Tipo Silvestre	49,8	91,2	3,5
40 hVλ-VκJκ-4hJλ	33,3	41,6	43,1

Tabla 5

Genotipo	% de linfocitos B	% de linfocitos B maduros	% de linfocitos B inmaduros	% de linfocitos Igk ⁺ B inmaduros	% de linfocitos Igλ ⁺ B inmaduros
Tipo Silvestre	62,2	9,2	12,0	79,0	8,84
40 hVλ-VκJk-4hJλ	60,43	2,59	7,69	38,29	43,29

5 **Uso del gen Vλ humanos en ratones que portan segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana.** Se analizaron ratones heterocigotos para una primera inserción de secuencias λ humanas (hVλ3-12-hVλ3-1 y hJλ1, FIG. 5B) y homocigotos para una tercera inserción de secuencias λ humanas (hVλ5-52 - hVλ3-1 y hJλ1, FIG. 5B) para uso de genes de cadena ligera λ humana mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) usando a ARN aislado de esplenocitos.

10 En resumen, se extrajeron 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 solo bazo se colocó a continuación en un STOMACHER™ (Seward) y se homogeneizó con un ajuste del medio durante 30 segundos. Los bazos homogeneizados se filtraron usando un tamiz celular de 0,7 μm y a continuación se sedimentaron con una centrifugadora (1000 rpm durante 10 minutos) y los RBC se lisaron en BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences) durante tres minutos. Los esplenocitos se diluyeron con RPMI-1640 y se centrifugaron de nuevo, seguido de resuspensión en 1 ml de PBS (Irvine Scientific). El ARN se aisló de los esplenocitos sedimentados usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

15 La RT-PCR se realizó en ARN esplenocitos usando cebadores específicos para segmentos genéticos hVλ humanos y el gen Cκ de ratón (Tabla 6). Los productos de PCR se purificaron con gel y se clonaron en vector pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) y se secuencian con cebadores M13 Directo (GTAAAACGAC GGCCAG; SEQ ID NO: 55) y M13 Inverso (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO: 56) situados dentro del vector en posiciones de flanqueo del sitio de clonación. Se secuencian ochenta y cuatro clones totales derivados de la primera y tercera inserciones de secuencias λ humanas para determinar el uso del gen hVλ (Tabla 7). La secuencia de nucleótidos de la unión de hVλ-hJλ1-mCκ para clones de RT-PCR seleccionado se muestra en la FIG. 11.

20 De una manera similar, los ratones homocigotos para una tercera inserción de secuencias genéticas de cadena ligera λ humana (es decir, 40 segmentos genéticos hVλ y cuatro segmentos genéticos hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana, parte inferior de la FIG. 7B) unidos de forma cooperativa al gen endógeno Cκ de ratón se analizaron para uso de gen de la cadena ligera λ humana con RT-PCR usando ARN aislado de esplenocitos (como se ha descrito anteriormente). El uso del segmento genético de la cadena ligera λ humana para 26 clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la Tabla 8. La secuencia de nucleótidos de la unión de hVλ-hJλ-mCκ para clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIG. 12.

25 De una manera similar, los ratones homocigotos para una primera inserción de segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana (12 segmentos genéticos hVλ y hJλ1, FIG. 4A y FIG. 5A) unidos de forma operativa al gen endógeno Cλ2 de ratón se analizaron para el uso de genes de la cadena ligera λ humana mediante RT-PCR usando ARN aislado de esplenocitos (como se ha descrito anteriormente). Los cebadores específicos para segmentos genéticos hVλ (Tabla 6) se emparejaron con uno de dos cebadores específicos para el gen Cλ2 de ratón; Cλ2-1 (SEQ ID NO: 104) o Cλ2-2 (SEQ ID NO: 105).

30 Se observaron múltiples segmentos genéticos hVλ reordenados con respecto a hλ1 a partir de los clones de RT-PCR de ratones que portaban segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana en el locus endógeno de la cadena ligera λ de ratón. La secuencia de nucleótidos de la unión de hVλ-hJλ-mCλ2 para clones de RT-PCR seleccionados se muestra en la FIG. 13.

Tabla 6

Cebador de hVλ en la posición 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 CTGGGCTCCA CTA CT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49

ES 2 721 749 T3

(continuación)

Cebador de hVA en la posición 5'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
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 en la posición 3'	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
mlgkC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

Tabla 7

hVA	N.º de Clones Observados
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	hVA	hJA
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

(continuación)

Clon	hVλ	hJλ
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

La FIG. 11 muestra la secuencia de la unión de hVλ-hJλ1-mCκ para clones de RT-PCR de ratones portadores de una primera y tercera instalaciones de los segmentos genéticos hVλ con un solo segmento genético hJλ. Las secuencias mostradas en la FIG. 11 ilustran reordenamientos únicos que implican diferentes segmentos genéticos hVλ con hJλ1 del combinado con el gen Cκ de ratón. Tanto los ratones heterocigotos que portan un solo locus endógeno κ modificado que contiene 12 segmentos genéticos hVλ y hJλ1 como los ratones homocigotos que portan dos κ endógenos modificados que contienen 40 segmentos genéticos hVλ y hJλ1 eran capaces de producir segmentos genéticos λ humanos unidos de forma operativa al gen Cκ de ratón y producir linfocitos B que expresaban cadenas ligeras λ humanas. Estos reordenamientos demuestran que los loci quiméricos eran capaces de reordenar de forma independiente los segmentos genéticos λ en linfocitos B múltiples, independientes en estos ratones. Además, estas modificaciones en el locus endógeno de cadena ligera κ no hicieron que ninguno de los segmentos genéticos hVλ no fuera operativo ni evitaron que la recombinación del locus quimérico con múltiples segmentos genéticos hVλ y un segmento genético hJλ (Jλ1) durante el desarrollo de los linfocitos B tal como se pone en evidencia con 16 segmentos genéticos hVλ diferentes que se observó que se reordenaban con hJλ1 (Tabla 7). Además, estos ratones hicieron funcionales a los anticuerpos que contenían segmentos genéticos Vλ-Jλ humanos reordenados unidos de forma operativa a genes Cκ de ratón como parte del repertorio de la cadena ligera de inmunoglobulina.

La FIG. 12 muestra la secuencia de la unión de hVλ-hJλ-mCκ para clones de RT-PCR seleccionados de ratones homocigotos para 40 hVλ y cuatro segmentos genéticos hJλ incluyendo una secuencia genómica Vκ-Jκ humana. Las secuencias mostradas en la FIG. 12 ilustran reordenamientos únicos adicionales que implican múltiples segmentos genéticos hVλ diferentes, que se extienden por todo el locus quimérico, con múltiples segmentos genéticos hJλ diferentes reordenados y unidos de forma operativa al gen Cκ de ratón. Los ratones homocigotos portadores de loci endógenos κ modificados que contienen 40 hVλ y cuatro segmentos genéticos hJλ también eran capaces de producir λ segmentos genéticos humanos unidos de forma operativa al gen Cκ de ratón y producir linfocitos B que expresaban cadenas ligeras λ humanas. Estos reordenamientos demuestran adicionalmente que todas las etapas de los loci quiméricos eran capaces de reordenar de forma independiente los segmentos genéticos λ humanos en linfocitos B independientes múltiples en estos ratones. Además, estas modificaciones adicionales en el locus endógeno de la cadena ligera κ demuestran que cada inserción de segmentos genéticos λ humanos no hacía que ninguno de los segmentos genéticos hVλ y/o Jλ no fueran operativos ni evitaban recombinación del locus quimérico de los segmentos genéticos Vλ y Jλ durante el desarrollo de los linfocitos B tal como se pone en evidencia con 12 segmentos genéticos hVλ diferentes que se observó que se reordenaban con los cuatro segmentos genéticos hJλ (Tabla 8) de los 26 clones de RT-PCR seleccionados. Además, estos ratones también hicieron funcionales a los anticuerpos que contenían segmentos genéticos Vλ-Jλ humanos unidos de forma operativa a regiones Cκ de ratón como parte del repertorio de la cadena ligera de inmunoglobulina.

La FIG. 13 muestra la secuencia de la unión de hVλ-hJλ-mCλ2 para tres planes de RT-PCR individuales de ratones homocigotos para 12 segmentos genéticos hVλ y hJλ1. Las secuencias mostradas en la FIG. 13 ilustran reordenamientos únicos adicionales que involucran a diferentes segmentos genéticos hVλ, que abarcan la longitud de la primera inserción, con hJλ1 reordenado y unido de forma operativa al gen Cλ2 de ratón (2D1 = Vλ2-8Jλ1; 2D9 = Vλ3-10Jλ1; 3E15 = Vλ3-1Jλ1). Un clon demostró un reordenamiento no productivo debido a adiciones de N en la unión de hVλ-hJλ (2D1, FIG.13). Esto no es común en la recombinación de V(D)J, ya que se ha mostrado que la unión de los segmentos genéticos durante la recombinación es imprecisa. Aunque este clon representa un elemento recombinante no productivo presente en el repertorio de la cadena ligera de estos ratones, esto demuestra que el mecanismo genético que contribuye a la diversidad de unión entre genes de anticuerpo funciona normalmente en estos ratones y conduce a un repertorio de anticuerpos que contiene cadenas ligeras con una diversidad mayor.

Los ratones homocigotos portadores de loci endógenos λ modificados que contienen 12 segmentos genéticos hVλ y hJλ1 también eran capaces de producir segmentos genéticos λ humanos unidos de forma operativa a un gen endógeno Cλ de ratón y producir linfocitos B que expresaban cadenas ligeras λ quiméricas inversas que contenían regiones hVλ unidas a regiones Cλ de ratón. Estos reordenamientos demuestran adicionalmente que los segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana colocados en el otro locus de cadena ligera (es decir, el locus λ) eran capaces de reordenar de forma independiente los segmentos genéticos λ humanos en linfocitos B independientes, múltiples en estos ratones. Además, las modificaciones en el locus endógeno de la cadena ligera λ demuestran que la inserción de los segmentos genéticos λ humanos no hacían que ninguno de los segmentos genéticos hVλ y/o hJλ1 no fueran funcionales ni evitaban la recombinación del locus quimérico de los segmentos genéticos hVλ y hJλ1 durante el desarrollo de los linfocitos B. Además como estos ratones también hicieron funcionales a los anticuerpos que contenían segmentos genéticos Vλ-Jλ humanos unidos de forma operativa a una región Cλ de ratón como parte del repertorio de la cadena

ligera de inmunoglobulina.

Como se muestra en este Ejemplo, los ratones portadores de segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana en los loci endógenos de cadena ligera κ y λ son capaces de reordenar los segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana expresarlos en el contexto de una región C κ y/o C λ de ratón como parte del repertorio de anticuerpos normal del ratón por qué una cadena ligera funcional se necesita en diversos puntos de control en el desarrollo de los linfocitos B tanto en el bazo como en la médula ósea. Además, algunos subconjuntos iniciales de linfocitos B (por ejemplo, linfocitos pre-, pro- y B transicionales) demuestran un fenotipo normal en estos ratones en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre (FIG. 9D, 10A y 10B). Se observó un pequeño déficit en las poblaciones de médula ósea y de linfocitos B periféricos, lo que se puede atribuir a una supresión de un subconjunto de linfocitos B inmaduros autorreactivos y/o una asociación subóptima de la cadena ligera λ humana con la cadena pesada de ratón. Sin embargo, el uso de Ig κ /Ig λ observado en estos ratones demuestra una situación que es más similar a la expresión de la cadena ligera humana que la observada en ratones.

Ejemplo VI

Reproducción de Ratones que Expresan Cadenas Ligeras λ Humanas

De un Locus Endógeno de Cadena Ligera

Para optimizar el uso de los segmentos genéticos λ humanos en un locus endógeno de cadena ligera de ratón, los ratones que portan los segmentos genéticos λ humanos sin reordenar se reproducen en otro ratón que contiene una supresión en el locus endógeno de la cadena ligera opuesta (ya sea κ o λ). Por ejemplo, los segmentos genéticos λ humanos colocados en el locus endógeno κ serían los únicos segmentos genéticos funcionales de cadena ligera presentes en un ratón que también portara una supresión en el locus endógeno de la cadena ligera λ . De esta manera, la progenie obtenida expresaría solamente las cadenas ligeras λ humanas como se ha descrito en los ejemplos mencionados anteriormente. La reproducción se realiza con técnicas convencionales reconocidas en la técnica y, como alternativa, en compañías comerciales, por ejemplo, The Jackson Laboratory. Las cepas de ratones que portan segmentos genéticos de la cadena ligera λ humana en el locus endógeno κ y una supresión del locus endógeno de la cadena ligera λ se identifica sistemáticamente para la presencia de las cadenas ligeras λ quiméricas inversas (ser humano-ratón) únicas y la ausencia de las cadenas ligeras λ endógenas de ratón.

Los ratones que portan un locus reordenado de la cadena ligera λ humana también se reproducen con ratones que contienen una sustitución del locus endógeno genético variable de cadena pesada de ratón con el locus de gen variable de cadena pesada humana (véase el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, el ratón VELOCIMMUNE® modificado por ingeniería genética). El ratón VELOCIMMUNE® incluye, en parte, el que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada humana unidas de forma operativa a loci endógenos de región constante de ratón 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 como respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos se puede aislar y unir de forma operativa al ADN que codifican las regiones constantes de cadena pesada humana. A continuación, el ADN se puede expresar en una célula capaz de expresar toda la cadena pesada humana del anticuerpo. Después de un programa de reproducción adecuado, los ratones que portan una sustitución del locus endógeno de cadena pesada de ratón con el locus de cadena pesada humana y se obtiene un locus de la cadena ligera λ humana no reordenado en el locus endógeno de la cadena ligera κ . Los anticuerpos que contienen regiones variables de cadena pesada humana mutadas de forma somática y regiones variables de la cadena ligera λ humana se pueden aislar después de inmunización con un antígeno de interés.

Ejemplo VII

Generación de Anticuerpos De Ratones que Expresan

Cadenas Pesadas Humanas y Cadenas Ligeras λ Humanas

Después de reproducir ratones que contienen el locus de la cadena ligera λ humana sin reordenar a varias cepas deseadas que contienen modificaciones y supresiones de otros loci endógenos de Ig (como se ha descrito anteriormente), los ratones seleccionados se inmunizan con un antígeno de interés.

Por lo general, un ratón VELOCIMMUNE® que contiene una de las regiones de cadena ligera de línea germinal humana reordenada individual se estimula con un antígeno, y las células linfáticas (tales como los linfocitos B) se recuperan del suero de los animales. Las células linfáticas se pueden fusionar con una línea de células de mieloma para preparar líneas de células de hibridoma inmortal, y tales líneas de células de hibridoma se identifican sistemáticamente y se seleccionan para identificar líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos que contienen cadena pesada humana y cadena ligera λ humana que son específicas para el antígeno usado para inmunización. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras λ se puede aislar y unir a regiones constantes isotópicas deseadas de la cadena pesada y la cadena ligera. Debido a la presencia

de los segmentos genéticos hVλ adicionales en comparación con el locus endógeno λ de ratón, la diversidad del repertorio de cadena ligera aumenta de forma espectacular y confiere una diversidad más elevada en el repertorio específico del antígeno después de inmunización. Las secuencias de anticuerpos clonados resultantes se pueden producir posteriormente en una célula, tal como una célula de CHO. Como alternativa, el ADN que codifican los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se pueden aislar directamente de linfocitos específicos de antígeno (por ejemplo, linfocitos B).

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 se seleccionan para características deseadas, que incluyen afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se sustituyen con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo totalmente humano que contiene una cadena pesada humana mutada de forma somática y una cadena ligera λ humana derivada de un locus de la cadena ligera λ humana sin reordenar de la divulgación. Algunas regiones constantes humanas adecuadas incluyen, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 de tipo silvestre o modificadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> RATONES QUE EXPRESAN UNA CADENA LIGERA HÍBRIDA DE INMUNOGLOBULINA
<130> N115473-EP

<140> 11728509.8
<141> 22-06-2011

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

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

<160> 141

<170> PatentIn versión 4.0

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

<220>
<223> sintética

<400> 1

```

actttcagaa tgttcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt 60
atagtataca ttatacgaag ttattctaga cccccgggct cgataactat aacggtccta 120
aggtagcgcac tccagataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttatc catggttaagc 180
ttacgtggca tacagtgtca gattttctgt ttatcaagc 219
    
```

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

<220>
<223> sintética

<400> 2
agctgaatgg aaacaaggca a 21

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

<220>
 <223> sintética

5 <400> 3
 ggagacaatg ccccagtga 19

10 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

<400> 4
 tcccataggg ctaggatttc c 21

20 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

<400> 5
 tcccctcaca ctgtcccc 19

30 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

<400> 6
 ggtggagagg ctattcggc 19

40 <210> 7
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 7
 gaacacggcg gcatcag 17

55 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

60 <400> 8
 tcaacctttc ccagcctgtc t 21

65 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 9
 ccccagagag agaaaacaga tttt 24

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

15 <220>
 <223> sintética

15 <400> 10
 ccctggtgaa gcatgtttgc 20

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

25 <220>
 <223> sintética

25 <400> 11
 tgtggcctgt ctgccttacg 20

30 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

40 <400> 12
 cacacctaga ccccggaagt c 21

40 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 13
 tcgcttgcc agttgattct c 21

55 <210> 14
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> sintética

60 <400> 14
 tgcggccgat ctagcc 17

65 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

	<220> <223> sintética	
5	<400> 15 ttgaccgatt ccttgagg	18
10	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
15	<220> <223> sintética	
15	<400> 16 gcaaacaata accactggcc	20
20	<210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> sintética	
25	<400> 17 ggccacattc catgggtc	19
30	<210> 18 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética	
35	<400> 18 ccatgactgg gcctctgtag ac	22
40	<210> 19 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética	
50	<400> 19 caagtcaggg tgctaagtgt gtatc	25
55	<210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> sintética	
60	<400> 20 cacagctgt gcagcctcc	19
65	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	

<220>
 <223> sintética

5 <400> 21
 gggcactgga tacgatgat gg 22

10 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

<400> 22
 tcataggtag gtctcagttt g 21

20 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

<400> 23
 tgatctgcg tgtttcatcc t 21

30 <210> 24
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

<400> 24
 tgacatgaac catctgtttc tctctcgaca a 31

40 <210> 25
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

50 <400> 25
 agagacgctc cgaggccaag gtgctctag 29

55 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> sintética

<400> 26
 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

65 <210> 27
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

5 <400> 27
 accctctgct gtcct 16

<210> 28
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

15 <400> 28
 ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa 26

<210> 29
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética

25 <400> 29
 tccacactgt cggtgggag ctca 24

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

<220>
 <223> sintética

35 <400> 30
 acgagcgggt tcggccatt c 21

40 <210> 31
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

<400> 31
 50 ctgttctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa 37

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

55 <220>
 <223> sintética

<400> 32
 60 tgccgcttat acaacactgc catctgc 27

<210> 33
 <211> 37
 <212> ADN
 65 <213> secuencia artificial

ES 2 721 749 T3

	<220>		
	<223> sintética		
5	<400> 33		
	agaagaagcc tgactacag catccgtttt acagtca		37
	<210> 34		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
15	<400> 34		
	gggctacttg aggacctgc t	21	
	<210> 35		
	<211> 23		
20	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
25	<400> 35		
	gacagccctt acagagtttg gaa	23	
	<210> 36		
30	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
35	<400> 36		
	aagaccagga gctctgccta agt	23	
40	<210> 37		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 37		
50	cccatcacga actgaagttg ag	22	
	<210> 38		
	<211> 20		
	<212> ADN		
55	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
60	<400> 38		
	cagggcctcc atcccaggca	20	
	<210> 39		
	<211> 28		
65	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		

<220>
 <223> sintética

5 <400> 39
 cccagtggtg tgaatcactc tacctcc 28

10 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> sintética

<400> 40
 cctctctcc tcacctct 20

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

25 <220>
 <223> sintética

30 <220>
 <221> variación
 <222> (4)...(4)
 <223> r = a o g

35 <220>
 <221> variación.
 <222> (9)...(9)
 <223> s = c o g

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

45 <220>
 <221> variación.
 <222> (12)...(12)
 <223> y = c o t

<400> 41
 atgrccdgst yyctctct 20

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

55 <220>
 <223> sintética

<400> 42
 ctctcactc agggcaca 18

60 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

65 <220>
 <223> sintética

<220>
 <221> variación
 <222> (18)...(18)
 <223> s = c o g
 5
 <400> 43
 atggcctggg ctctgtsct 20
 <210> 44
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> sintética
 <220>
 <221> variación
 20 <222> (11)...(11)
 <223> y = c o t
 <220>
 <221> variación
 25 <222> (13)...(13)
 <223> s = c o g
 <400> 44
 atggcctgga ycsctctcc 19
 30 <210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> sintética
 <220>
 <221> variación
 40 <222> (11)...(11)
 <223> y = c o t
 <220>
 <221> variación
 45 <222> (15)...(15)
 <223> r = a o g
 <220>
 <221> variación
 50 <222> (16)...(16)
 <223> y = c o t
 <220>
 <221> variación
 55 <222> (18)...(18)
 <223> y = c o t
 <220>
 <221> variación
 60 <222> (20)...(20)
 <223> m = a o c
 <220>
 <221> variación
 65 <222> (21)...(21)
 <223> y = c o t

	<400> 45 tcacatggc ytggrycym ytc	23
5	<210> 46 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
	<400> 46 tcacatggc ctgggtctcc tt	22
15	<210> 47 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
25	<220> <221> variación <222> (16)...(16) <223> m = a o c	
30	<220> <221> variación <222> (19)...(19) <223> y = c o t	
35	<400> 47 tcacatggc ctggamtctt ct	22
40	<210> 48 <211> 26 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
45	<400> 48 tcacatggc ctgggtctca ctact	26
50	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
55	<400> 49 tcacatggc ctggactct	20
60	<210> 50 <211> 23 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
65	<400> 50	

ES 2 721 749 T3

	tcaccatggc ctggatgatg ctt	23
5	<210> 51 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
	<400> 51 taaatatggc ctgggctcct ct	22
15	<210> 52 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
	<400> 52 tcaccatggc ctgggctctg ct	22
25	<210> 53 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> sintética	
	<400> 53 tcaccatggc cctgactcct ct	22
35	<210> 54 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> sintética	
45	<400> 54 cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga	30
50	<210> 55 <211> 16 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
55	<400> 55 gtaaacgac ggccag	16
60	<210> 56 <211> 17 <212> ADN <213> secuencia artificial	
65	<220> <223> sintética	
	<400> 56	

ES 2 721 749 T3

caggaaacag ctatgac 17

5 <210> 57
 <211> 440
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 57

```

gggcctgggc tctgctgct ctcaccctcc tcaactcagg cacagggtcc tgggcccagt 60
ctgccctgac teagcctccc tccgcgctcc ggtctcctgg acagtcagtc accatctcct 120
gcactggaac cagcagtgac gttggtgggt ataactatgt ctccctggta caacagcacc 180
caggcaaagc ccccaaactc atgatttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtccctg 240
atcgcttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg 300
ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtcttcg 360
gaactgggac caaggctcac gtccctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420
caccatccag taagcttggg                                     440
  
```

15 <210> 58
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética
 <400> 58

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc tcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgctcc gggctccttg gacagtcagt caccatctcc 120
tgactggaa ccagcagtgga cgttgggtgg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag ccccaaactc catgatttat gaggtcacta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggctcac cgtccctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441
  
```

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

30 <220>
 <223> sintética
 <400> 59

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc tcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60

tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgctcc gggctccttg gacagtcagt caccatctcc 120
tgactggaa ccagcagtgga cgttgggtgg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag ccccaaactc catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggctcac cgtccctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g                                     441
  
```

ES 2 721 749 T3

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

<220>
 <223> sintética

10
 <400> 60

```

atggcctggg ctctgctcct caccctcctc actcagggca cagggtcctg ggcccagtct 60
gccctgactc agcctccctc cgcgtccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 120
actggaacca gcagtgcagt 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 aggtcacctg cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggg                                     438
    
```

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

<220>
 <223> sintética

20
 <400> 61

```

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

25
 <210> 62
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30
 <220>
 <223> sintética

<400> 62

```

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

35
 <210> 63
 <211> 442
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40

ES 2 721 749 T3

<220>
<223> sintética

<400> 63

5

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcccgctcc gggctctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtga cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaact catgatttat gaggtcagta agcggcctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tttatgtctt 360
cggaaactggg accaaggcca cgcctcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt 420
cccaccatcc agtaagcttg gg                                     442
    
```

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

10

<220>
<223> sintética

15

<400> 64

```

ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgctc tgccctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60
ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagtgag cacagcacct 120
acaccatcga atggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggtta 180
agagtgatgg cagccacagc aagggggacg ggatccccga tcgcttcgat 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
    
```

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

20

<220>
<223> sintética

<400> 65

```

atgacctget cccctctcct cctcaccctt ctcaattcaact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct ggggccccag gcagaaggc caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctcca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatagca gcctgagtgc ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a                                     441
    
```

30

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

35

<220>
<223> sintética

<400> 66

40

ES 2 721 749 T3

```

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

```

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

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 67

```

cccgggcaga gggtcacccat ctcttgttct ggaagcagct ccaacatcgg aagtaatact 60
gtaaactggc accagcagct cccaggaacg gcccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120
cagcggccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc 180
ctggccatca gtgggctcca gtctgaggat gaggctgatt attactgtgc agcatgggat 240
gacagcctga atggttatgt cttcggaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300
gctgcaccaa ctgtatccat ctteccacca tccagtgaqc agtta 345

```

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

20 <220>
 <223> sintética
 <400> 68

```

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

```

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

30 <220>
 <223> sintética
 <400> 69

ES 2 721 749 T3

atggcctgga ctctctcttt tctgttctc ctcacttgct gccaggggc caattcccag 60
 gctgtgggga ctcaggagcc ctcaactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120
 tgtggctcca gcaactggagc tgtcaccagt ggtcattatc cctactgggt ccagcagaag 180
 cctggccaag cccccaggac actgatttat gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240
 gcccggttct caggctccct ccttgggggc aaagctgccc tgacccttc gggtgcgag 300
 cctgaggatg aggctgagta ttactgcttg ctctcctata gtggtgctta tgtcttcgga 360

actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
 ccatcc 426

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

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 70

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

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

20 <220>
 <223> sintética
 <400> 71

actcctctcc tctcctctgtt cctctctcac tgcacaggtt cctctctgca ggctgtgctg 60
 actcagccgt ctteccctctc tgcactctct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 120
 cgcagtggca tcaatggttg tacctacagg atatactggt accagcagaa gccagggagt 180
 cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcagg ctctggagtc 240
 cccagccgct tctctggatc caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 300
 gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga ttgggcacag cagcgcttat 360
 gtcttcggaa ctgggaccaaa ggtcaccgtc ctaggggctg atgctgcacc aactgta 417

30 <210> 72
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> sintética
 <400> 72

ES 2 721 749 T3

```

tttctgttcc tctcacttg ctgccaggg tccaattctc agactgtggt gactcaggag 60
ccctcaactga ctgtgtcccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcactgga 120
gcagtcacca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcaccagg 180
gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tctggacc ccgcccgggt ctcaggctcc 240
ctccttgggg gcaaagctgc cctgacactg tcagggtgtc agcctgagga cgaggctgag 300
tattactgcc tgcttacta tgggtggtgct tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc 360
gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tcc 393

```

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

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 73

```

atggcctggg ctctgctgct cctcaactct ctaactcagg acacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctctctg gacagtcgat caccatctcc 120
tgcaactgaa ccagcagtgga tgttgggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaag cccccaaact catgatttat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240
aatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300
gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

```

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

20 <220>
 <223> sintética
 <400> 74

```

cagctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccaggca aagccccaa actcatgatt tatgaggta gtaatcggcc ctcaggggtt 180
tctaactgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300
ttcggaaactg ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348

```

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

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

40 <210> 76
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

	<400> 76 agggcagcct tgtctcaa	19
5	<210> 77 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
	<400> 77 cctgccagat tctcaggctc	20
15	<210> 78 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
	<400> 78 catcacaggg gcacagactg	20
25	<210> 79 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> sintética	
	<400> 79 gatttgctga gggcagggt	19
35	<210> 80 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> sintética	
	<400> 80 ccccaagtct gatccttct t	21
45	<210> 81 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> sintética	
	<400> 81 gctgaccaac gatcgctaa	20
55	<210> 82 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> sintética	
65	<220> <223> sintética	

ES 2 721 749 T3

<400> 82
 taagcgccac actgcacct 19

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

10 <220>
 <223> sintética

<400> 83
 cctgccagat tctcaggctc cctg 24

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

20 <220>
 <223> sintética

<400> 84
 ctgattggag acaaggctgc cct 23

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

30 <220>
 <223> sintética

<400> 85
 ccttcatact ctgcatcct ccctctcca 30

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

40 <220>
 <223> sintética

45 <400> 86
 ttccctctct tctgtgactc aattattgt ggaca 35

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

55 <220>
 <223> sintética

<400> 87

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

60 <210> 88
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 721 749 T3

<220>
 <223> sintética

 <400> 88
 5
 tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggctc 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

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

 <220>
 <223> sintética
 15
 <400> 89

 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catgggatga cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg 120
 accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

 <210> 90
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 25
 <400> 90

 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catgggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 30

 <210> 91
 <211> 153
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> sintética

 <400> 91

 tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccggggatga ggctgactat 60
 tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcacca gctgaccgcc 120
 ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

 <210> 92
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 50
 <400> 92

ES 2 721 749 T3

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

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

10 <220>
 <223> sintética

<400> 93

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

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

20 <220>
 <223> sintética

<400> 94

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

25 <210> 95
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética

35 <400> 95

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

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

45 <220>
 <223> sintética

<400> 96

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

50

ES 2 721 749 T3

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

<220>
<223> sintética

10 <400> 97

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

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

<220>
<223> sintética

20 <400> 98

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

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

<220>
<223> sintética

30 <400> 99

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

35 <210> 100
<211> 22800
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

40 <400> 100

ES 2 721 749 T3

aagctctaaa	actacaaaact	gctgaaagat	ctaatagacta	ggacagccta	gtaattttca	60
taggggcata	aatgtgaaac	gccttgtgca	tcgtagaaga	aagcagaaga	gaaagcattc	120
ccaatttctt	aactgccttt	tacctatatt	aatcagtaat	atactggctt	ttacctctgt	180
taatcataat	aaacaaatc	tcaataaatt	ttatcgatac	tcttcaatgc	ctgctcagca	240
acattttccg	aaggcagctc	aagatattaa	ataactcata	agggccaacc	tcctattgca	300
gcattctttg	ggatttaacc	agtttcccaa	gactcttttc	acaatgttaa	gatgttagaa	360
atagatccaa	aactaggtga	tatatccctt	agtaaaactg	tgaggtcaaa	cttgtctggc	420
taatgcttcc	atttaaaaat	ttctctttct	tgatccttca	ttgtatgtac	acaataaatc	480
aggggaaaac	tttaactgag	tgaatcaaag	tattctcatt	attataatag	gagcttcaca	540
cacacaceaa	aaaatcaatt	ctattactct	cagcctcagt	tcctaaagcc	aagttaaagt	600
cctgttctaa	gatcattggt	gcatgaccat	atgtattcca	ggtctaattc	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	attaatatta	gaaaaatcag	900
ttaataaaaag	tatgtcattt	catcaattca	ataagttata	atagcaaaaa	accataataa	960
attatcactt	aaatgtcaat	acatttataa	actatggtac	ataaatagga	tattgaatag	1020
ccattgatgc	tcctgatgaa	aattagcagg	cagtgataaa	tgataaatat	gaagcacatg	1080
tcaataaata	aaataagttt	tatgtaattt	aggagaaaat	ggtgataatg	acacaaaatg	1140
tgaattatgg	atgcatctat	aaaattcttt	gtacattttg	gaattgtaaa	tatttatctt	1200
agagacatta	ttactttgta	tatgttccat	ttgctcacct	atatgtccca	gtctccttac	1260
aaatgctatg	gccaaagaaa	taggcataca	tacatccttt	gcaggctgag	gcaggaaaaa	1320
gatcttacgg	aattttccag	tctatccttt	atctgtataa	gcaacttaag	aggccatgtg	1380
ctccaaatgg	tgcaaataca	agatggtaga	gcctctgtct	gcctggatcc	ttgagtggct	1440
gcatggagca	gagcaccttt	ctggccctgg	tgaagattgt	agcatgagca	agatataagc	1500
attgtttgga	gctaggccat	gagatttggg	gcagtgggat	aacctacctt	attatggaaa	1560
atataaatac	acaaaacaga	aaagagagag	agaagtgaga	gaagactgtg	agagaagtgc	1620
atgagagaag	actgtgtttt	gttcatttcc	tataatccta	tatcaccatg	ggatcctgtg	1680
ccttctggtg	atcaaactaa	tgttctacag	ctccaaagaa	gaatgctcgc	ctaacgtctc	1740
cattccaatg	acctagagac	taaaagccaa	aaagaacctt	agaaattatc	tattgcattc	1800
tttgatgtaa	ggaaatatct	tagagggcac	agatagaaat	atcttaacc	aggctactta	1860

gttcgtggca gagctgaggc taaaaccagg ccttttgact cctaattttg tgctctttac 1920
 accttctcac atcacttctc caacccaaag tctagcagaa aaggctaaaa taagatatat 1980
 gcatagattt gctattataa gtccatgtac ttccctcagac gctttaagat ggggcttctc 2040
 atggttcaca ataagcagca gagggaagtg aataactatc ttcgtctccc ctactgtctat 2100
 ttgtgcagtt tgaagcttat ctcttaaatc atgttttctt ctcgtagtaa atactacaac 2160
 ttgtgccttt tatgtgtgta taaattttaa tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220
 aaatggacac tccaaaaaga tgttcaataa ggttacatgg cttcacattg cccctctac 2280
 accatcttgt ggagctacac attcacctca cccaaatttg agaaaaataa tcaagaaaat 2340
 gactctcact agcagtgaga ccaagtccat aagcactaat gtcactcagt cacactgcag 2400
 cctcatgctg ccaagcatgt tttgggctga tccctggact gggttggtga catgatcaaa 2460
 ggtacatttt ccacctgcat agcccatoc tggatctata gccttccttg tgtctttgtg 2520
 aacaacctag tgtgaactca aagtatgaga cagatctcaa ttaattttaga aagtttattt 2580
 toccaagatt aaggacaagc ccatgataaa gcctccagag gtccctgatat atgtgcccaa 2640
 gggggtcggg gcacagcttg gtgttataca ttttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700
 tgtagaagat gtgcatgct ttggtctgga aaggtgtgac aactcaaggc agggaagggt 2760
 gcttctgctt ggggttgcac tgttttgagt ctctgatcag cctttcacat gtgaaaggca 2820
 ggtagagaaa tagtcattta tgccttagtc tggcttattg aaacagttag gcagaagaag 2880
 cattgcataat gcatttgtct gaagtgaaca gagggatgac tttgagctct gtctttctt 2940
 tgtccacaag gaattacctt gtgggcaaat tgtgagggag gtatgtagct ttttttctt 3000
 tgtagctatc ttatttagga ataaaatggg aggcaggttt gcctgatgca attcccagct 3060
 tgactttccc ttttggttta gtgatttttg gggctctgag gtttattttt tctttcacat 3120
 tagtataact acttttcttt ttctaattcc ttttctactt gtatgtgta cagctgactt 3180
 atgttacttg caaaaagaat tctgactaat gcaacctctg actagaagge aggttcttc 3240
 gatgataacg aatctctcag aatctagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgtc 3300
 ttcttgggga atttctcatg gcaatgaatg gcaactggcc aaaggattta tgaccagact 3360
 gagctctctt ttatctattc tgttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacag 3420
 gacactgggt tctaagttct agggttaaac agtccactcc caggcccacc acaccatacc 3480
 ctctgacat ctggggaaca gcaataaaat tgtttcttat tctgaaaatc ctccaatact 3540
 tccaccatcc ccaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaac 3600
 acaatatoca ttatattatt ctggcctttt gagatacctt acaaaaacaa tacaaaaaaa 3660
 gtcccaattt aacatctttt aataatcttt acaaaaacaga acacatctcc tttcttgata 3720
 atagtcaaga ggctcagtg caactgtggt gaaaagtgtc agattctggt catgtttcaa 3780
 aggtagaaaa aatagaattt gtaacatat tggatgtgag gcgtgggaga aactgaaat 3840
 caagtggtt gcaagtgtt acctgagca actagagaat ttggaaggac atttctgag 3900
 atggggaagg caggcgggaa tcagggatta gagttgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960
 tgctagacct ctaattggca atatcccttg gacaggtgga tgaatatgctg tgattctgga 4020
 gttcgggaaa tagtccgggt ggagatgcaa atttgggaaa cagggcgagg ttactagcaa 4080
 tgagttaaat caatgaaggc aggtcgggac ctggcaggta acccaacaag tagaggtcga 4140
 agagatgaga agaaaacagc acaggagact tagaagcagt ggtcaggagg aaggagttga 4200
 accaagaaag tgatgtccca gagccaacaa aataaggatt tcttttctgt ttacaaatgt 4260
 aaaattaaaa ggtttaataa aaagaaaatt tacttttatg gttggttgtt attaagtgtt 4320
 ccaaacactg tctctattt gtagaatcag aactctctca tggcagtaga aaatttgaa 4380
 agttactttt taaaagggtt gtgcaactgct gccccttgot ggtcaagttt atttctgca 4440
 aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctcccttaaa atagctcagg ctgtacaagc 4500
 tagaaagaac ctgcaagat attccttcca acatttgcac ttgacttatg ggaagtgcag 4560
 gttcagccag aaaagttgtg tgcaaggccg tttatgtaag tttatcagac ctgattctta 4620
 cggctcttcc cattgttctg agctccctt ccattcactt cccgctcata cgcgaccaag 4680
 tataggacag gagtagtatt tctgcacttt atagcagctc cactgtctgg cactctgatg 4740
 ttctttaatt acaagcttta tgacagtgat tctcaacctg ctccactgcc tccacctagt 4800
 ggcagaaaga agaaaatgtg tgtaactcgg gactctctgg tctgaaaget ccgggtatc 4860
 atttcttcaa agtcttgagc ttgttttgt ttgtatttat ttatttattt gtttagaga 4920
 caaggtctcg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980
 gtgaataaag agatctcagt aatgactgtt ttatattgtg gctgtagcgc attcgaggga 5040
 taattcgatt ctgttctgct ttcgaatgca tggctcactg taacctcaa ctcccgggt 5100
 caagcgatcc tctacctca gcttctccag tagttgagct tgatttattt taaagtcca 5160
 taaaattttg gcatttcttt ccacaatatg gccatgtgtg ctttactata aaatattttc 5220
 atcacaaaat ttacatcgct ggaaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caaccaga 5280
 aagcagaaca gactcaatt atcccttaa tcccocttaa ccacaaatat aaaacagtc 5340
 gtgactgggc gtgttggtt acacctgtaa tcccagcact ttgggaggcc aaggcgggtg 5400
 gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaaac cccgtcccta 5460
 taaaaatac aaaattattc aggagttgtg gcaggcagtt gtaatccag ctacttggga 5520

ggctgaggca	ggagaatcac	ttgaaccag	gagggtggagg	ttgtagttag	ccaagattgt	5580
gccagtgac	tccagcctgg	gcaacagagc	gagacttcca	tcttaaaaaa	aaaaaattaa	5640
gtaaatata	tataaaaaaa	taaagcagtc	cctattgata	tctctttatt	caetaaatca	5700
acctggaatt	gacctgaatt	ctgatttttt	tttcatcatg	gattttttgc	attaattttg	5760
attgtttaaa	tattgcatta	aaatattatt	tatcttgact	actgagtttg	cgggacctcc	5820
ttaaaattta	tgaccaaggc	aatgcctcac	toactcgcct	taccataatc	tgggccaacat	5880
atcaggggct	ccaatagcaa	gcaacatgac	ttttgaacag	ctaagacttc	tctcttcact	5940
gtgaagacca	gatgggcoct	gcaaacagtg	taacctctac	atgaaaatgc	acgagattcc	6000
aactacaacc	aggcacaata	gactctgatg	gtgaagtccc	agccctccaa	gtcccaactt	6060
cctgaagggg	aagagcacc	caagttctga	ccagaggcca	gagtcataac	gaagatggaa	6120
tgtgagcttg	acatagaagg	ggtggtagca	cctggctcag	taatgaagag	gctttcggtc	6180
ctgaaggaag	agctcagcac	attcaaagat	tagaagggag	gtcccagtca	taggagcagg	6240
gaaggagaya	aggccaata	agaaacacag	acaggaggga	ggggtcaggg	caagatcata	6300
ctggaaacaa	ctagagagct	aataaaaagtc	acagtgccca	gtcccacat	ggaccagact	6360
cttcggaatc	tctaggcatc	aatttgggca	ccagtagttt	tcaaagttct	ccagaagatt	6420
ctatgcacac	cagccaagg	tgggaaccac	aggtgttggc	ctagggatca	tgacaatgag	6480
tttctaagtg	caataagaaa	cctccagaga	gtttaagcag	gggaataatt	tgatttgttt	6540
cttgtttgtg	atttttaaag	atcagctctg	ttactgtgtg	taagacaata	atccagaaaa	6600
tctgttgctc	atgaaccaca	tatctgtaaa	tttgcttccc	ctgtaactgg	atctaaccac	6660
caaaaattag	tacttactaa	gaaattacat	gcccagggac	tatgctaagt	aattcataaa	6720
cactatttta	tttactcctc	acagcaagtt	tataagagaa	acgttattat	ttccacattt	6780
cggatgagaa	atgtgaggct	tggggaaagt	taagtaattt	acctaagtgc	acaccagctt	6840
cataagatgc	agagtttaaga	ttctaattct	gtgtctaagt	tgatgctcca	tcaaaccac	6900
cacgcctcca	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	ccatctgcag	aagaatggaa	ctagacctct	atctctcacc	7320
aaatacaaaa	gttaactcaa	gacagattaa	agacttacat	ataagacctg	taactacaaa	7380
aacactagaa	gaaaacctag	ggaaaatgct	tctggaaatg	atctagggtg	agaactcagg	7440
actaagatat	caaaaagcaca	agcaccacaaa	caaaaataga	caaacaggac	ttaattaaac	7500
tagaacgctt	ctgaacagca	agagaaaata	tcaatagagt	gaacagataa	tctgcagaat	7560
gggtgaaaat	atttgcaaac	tatgcatcct	acagggaaat	aatgtccaga	atthagaaag	7620
aactcaaaac	attcaacaac	aacagcaaaa	taaccccacc	aaaaaagtgg	gcaaaggaca	7680
tgaatagaca	tttttcaaaa	gaaggtatat	gatatggttt	ggctctgtgt	ctccaccag	7740
atctcacctt	aaattgtaat	aatccccaca	tatcatggga	gagacccggt	gggaggtaat	7800
tgaatcatgg	gggcagggtt	gtcccatgct	gttctcatga	tactgaataa	gtcctatgag	7860
atctgatgat	tttataaagg	ggagttcccc	tgcacacact	ctcttgccctg	cctccatgta	7920
atatgtgect	ttgcttctcc	tttgccctct	gccatgattg	tgaggccctc	ccagccatat	7980
ggaactgagt	caattaaacc	actttttctt	tgtaaattac	ccaatcttgg	gtagctcttt	8040
attagcagca	taagaacaga	ctaatacagt	gtacaaatgg	ccaagaagcg	tacaaaaaac	8100
aaaatgctca	aactactaat	cactagagaa	tcgcaagtta	aaaccacaat	gagatattat	8160
cttacagcag	tcagaatgcc	tattattaaa	acaccaaaaa	ataacatggt	ggcaaggatg	8220
cagagaaaag	ggaataactta	cacattatta	gtgggaatgt	aaactagtac	agcttctgtg	8280
gaaaacacta	tggagatttc	tcaaagaact	agaaatagaa	ctaccatgtg	gttcagcaat	8340
accacaactg	ggtatctacc	caaagggaaa	taaattatta	tataaaaaag	atatctgcac	8400
tcaettgttt	attgcagcac	tattcacaat	agcaaagata	tggaatcaac	ccaagtgtcc	8460
atcaacagat	gattggataa	agaaaacgtg	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtat	8520
acacatacca	caatgaaata	ctattcagct	ataaagaaaa	gaatgaaatc	atgtcttttg	8580
cagaatgtg	gttggaaactg	gaggccatta	tcttaagtgg	ataattcaaa	aacagaaggt	8640
caaatgtcac	atgttctcac	ttataagtg	gagctaaatg	atgtgtacac	atggacatag	8700
agtgtggtat	gataaacact	ggagattgag	atgggtggaa	gggtggaagg	aggttgagtg	8760
atgagaaaat	actaaatgga	tacaatatac	atgattcagg	cgatagatac	actaaaagcc	8820
cagacttcac	cactacacag	tatagctatg	tagcaaaatt	gcacctgtat	tgcttaaatt	8880
tatacaagta	aaaaaagat	cgtacgaatt	ctgtttttta	ttctctatga	aattactact	8940
gagagtatta	tccaatgccg	tttctatgca	gtgcccccaa	tattatecat	ttagcagctc	9000
ctatgcaatg	ccccaaagata	gaaattgtct	tcaactttta	tcccaggaaa	accttcagtc	9060
acacgtagaa	actagaaatt	tttcccttag	atgaaagtta	tgtaacataa	caattatctt	9120
tcatttagtc	ggtttccaag	aagctcagaa	ccagatttta	tgttcaatca	aaaactgctt	9180

ES 2 721 749 T3

attttaagtg aggtttactg aggtataaat tacaataaaa gccacctttt cgtgtatatt 9240
 tctataagtt ttggcaaatg catagctgtg taaccacaac cacattcaag atataggaca 9300
 agtccctcat cctttaaagt tcctttatgc cccttccttc accccagccc ttggcaacca 9360
 ctggtttttg tctgatccaa tcgtttgect cttcctgaat gtcatgtaaa tagagccatg 9420
 caatgtgaag ccttttgagt ctggccttgt tcacttgctc acttaggaga atgcatttga 9480
 gattcatctt tgctgittcg tgtagcacta gttcactgtc tattgttgag tagtattcca 9540
 ttgtgtggat atgccacaga ttgtttatct agttaacaat ttaaagccat ttggtcattt 9600
 ctaattttta gctgctaaga ataaagtgtc tgtaagcttt ccaatgcagg tttttgtgtg 9660
 aactcaggat ttcatttcgc ttgggtaaat tcctagcttt gggactgctg agtcatctgg 9720
 taggtgtatg ttgaacttta taagaaactg ccaaactggt ttccaaagt gctgtgctct 9780
 tttgcactcc catcagcagt gaatgagggt tccacttgct cgagcctagt attttaactt 9840
 cactatatac cttctttgat gacatatcct ttcaaatttt tggccaagtt tttattgggg 9900
 tgttggtact atggactgtg agagttcctt gtatattctg catatgattt tttctcaca 9960
 tttgtgtttt atgaatatgt tcctccaatg tgtggcgcct tttattttct ttaactgcca 10020
 tgtgaagagc agaagtttaá ttttatgatg tccaaattat cttttttct tttctttttt 10080
 agatcaaaat aggggtctat tttgattacc actgttattt tatctccatt tgattttcga 10140
 tttttatttt tatttttcta atttcattgt aaattttta ttaaacccaa atattctagg 10200
 ggaaagaggc aagataaaaa tagtctaact tgggcataaa ttttagagtc atattctctt 10260
 gccgagaaa gaaactagct ctcttacatt gattgtttta tttcagact cactacttta 10320
 tgaggatgcc caaattatgg gctttaaaaa atatataatc aaacaggggt tcagaaagaa 10380
 taactaattt gtccacaaca acacaaaaaa tgaattccacc ataagtttgcc ccagtgacag 10440
 ggtctatatt attttctata tatcaaatc tacaactggt tcttaaagct actgtacata 10500
 acctaaagta aaatattagg tattagttga taagacattt tatcatctat gaaatgttgc 10560
 ctggtgtcat agttagagaa tcttttaaaa tatggagcta ttttcataga ttaaactatg 10620
 ccagttaaaa gttgggtaaa aagaactaca gaataatatt tatgtttatc gtgtaagggt 10680
 ttaaagcaaa ctccaagtca ttttcatcaa tgaatcaat aaggttttgc aaatatatat 10740
 gtatgaaaat actgatttaa aatgcaata aggggagagt ttgagagaga gagagagacc 10800
 aaatgatttt ataattctag taagtttata ggtttatggg gtttttacgt acttttctac 10860
 ccaacttgtc tataagactt taatgaatca cttagaattt ttaaaataat ttattattac 10920
 tctgtacctg ttctttactc tgcaaatctt accttgccct tttgtctaaa agcaataaaa 10980
 tctgacctgg tttatatcgt atcattgatt ttgttactta gcaagcacag tgatccatta 11040
 ggcctatgta ggctcatggt ttatacaaca tgcctactg ctgacagagt gtgacagtca 11100
 cagtcagcaa cccgagacca ctttattttc atttttagtg tttatagaaa tatgaaatata 11160
 cacaaatagt ataatgaacc ctaagcttca caaattaaca ttttgctaat cttgtttcaa 11220
 ctaccgcctc cccctcctc caattactct gttctctcac ctctccacac acagacactg 11280
 gcagtatttt tcagccaatc attaatagct tgccaactga taaggacttt taaaaaacaa 11340
 ccaccattcc attatgatcc ccagcataat tgagagtaat tccctaatat ccaataccca 11400
 ttttctatcc caatttcctt gattgtcctt aaactgtttt taccctaagt ttgcttaaat 11460
 caaagtcocag gtctgtttaa acatatggtt aagttttacc caaacccaaa taaataaata 11520
 aataaataaa taaataacct atttttcca atccagga atagtgaag agggtaaatg 11580
 ccattattta gaaacataaa tcacatcata ggactagaat tatcttgaag tcaaaattga 11640
 agactgaaaa tggaaaagaa aggtatagac taaacttatt taaaaactc aatgcagaac 11700
 tctaagagaa gatattagaa agttgtacca gcattcatta ttcagtattc atcagtattc 11760
 actcagctat atgtagtga aatctaacta gaggagcttg atcagataaa gagatacatt 11820
 tttctacca aggccgactc tggaggcagg tggttcagag ctgacagct gctgcaggac 11880
 ccaggctcct tcctgctctg ctctccact ctgactgtg actttcatcc tgcaagatgg 11940
 gtgtttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtggt 12000
 gcctctgcc atcaagcaaa atttttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060
 aacagtocta actgcaaaga agctgaggaa ttagattttt ggctgggaca ctggtgocct 12120
 gtaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaaga ttgaaactc 12180
 ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tgggcatacc ttaaaaacag 12240
 gcaattcaca acagatgaga cccaatagc caataaacat ttttaaatgg tcaacctcat 12300
 gagtgatcag aaaacacaaa tatgtatttt aaacccaaaa taaaatacaa tgtattgacc 12360
 atttgagtgg aaaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag gatgtagagt 12420
 gaggaaactc catggaggac ctatcattgc aaatgtggga atgaaactta atacacgaat 12480
 ttgaggcaa tttgtaaat gaaaaatgcg cacacctgc aaccaagtac cccttgcaat 12540
 atttttgaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaatcatg caatatgtga cctttatact 12600
 cagcataatg cccctcagat ccattgaagt catgtgtatc aacagctcac tatttttttt 12660
 ttaatttttt tttagagacag agtctcactc tctcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720
 tcataactct ctctagcagc ctcgaaactc tgggctcaag catcctcctg cctcagcctc 12780
 ccaagtagct aggactacag gcatgggaca caacacacag ctaatttttt taaatttttt 12840

ES 2 721 749 T3

ttgagacat ggtctcacta tgttgectac gctggctca aactcctagg tcaagcgatt 12900
 ctcccacctc tacttcacaa agtgctgtag gtatgtaggt atggattgta ggtatgaacc 12960
 accgtgcccc 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 aatatgttac 13200
 atcttcagtt ttattctatt caatatataa tcttttattt tccttgaaat ctcccatgga 13260
 ttgttttagaa gtgtgttgtt ttgtttccaa gggtttgga tttttcccat ttttttcta 13320
 ttatcgattt ccagtttgat tccaggtggt cagagaacac acttcatgtg atttcagttc 13380
 tattaatatt gttgaggttt gttacatggc ccagtatatg gcaattttgg tatatgttcc 13440
 atgagcactt gaaaagaatg cgaattctgc tgggtctggt tggagttttc cagcaatgtt 13500
 gatttatgat ctactcatt gatgggtggt ttgagtttga tgtgttctta cgatggcagc 13560
 ttaaacattc ttgtcaggta attctaactg ctctgtcatg tcagtattag cgcctcttaa 13620
 ctgtctcctc aaagctgaga ttttctggtt tcccctggtt cctgttggga attgtggttt 13680
 tcatttgaaa tctggacttt ggagtattgt gttatgaggc tttggatctc ttttaaacctc 13740
 atctcagcga atttcctctc ttgccactca ggaaggagaa gttgggtgtt tgaatggagc 13800
 agagccgtta ctgcctaaga attgttttac tgggcttccc ctttctttct cctttgacta 13860
 gagagagcca gctttttatt agggctttat gttttctgg gcctgttggg gtttctgggt 13920
 tgacaaactt ctccagaacc aagtctggaa tggatgaggc aaaaagaaac cccgtggaat 13980
 gcaactgctg gtgcctcctt gggctccaat gttcctaact ggtctgcctt cttctctcca 14040
 gcttccagag tcttcataag tttgctttac gtacaatgtc cgggggtttt actttacttg 14100
 agagaaatag gtaaaagtaa ttctactcca tctttcagga agcaaaagcc cccttgtgta 14160
 tttttttaa ctttcaaaaa caaaacaaaa ggcagctgca acagtaaaga agctagtaac 14220
 accottggtg ggaattcaa gtccaaatc acattttaag tttggctagc cagtgagaac 14280
 atcagaatag ttcaggtttt aaacaaattt atatttatga ttatgcatat actaaaagct 14340
 gaaggcatct tatatttact aagcacctat tttgttcttg ttaaaaagac agaattccat 14400
 tccctaggaa atttgacctg gcagctggag ctgatccacc tggccactag agcacagagc 14460
 agggagagta gtagccctgc cccagccacc cctcaagaca ggattctttc tctgggaact 14520
 gtaggtaaca ctaaactcgtt ctggaacaca acaacgaaag aagaaaggaa agagaaagaa 14580
 agaaaggaaag aaagagagag agaaggaaag aagggaggga gggaaaggaa gaaggggaaag 14640
 ggaagggaat ggaagggaag gaaggaaagga aaaggaaagga agggaggggag agaggggagga 14700
 aggaaggaaa ggaagggaag gaaggaaagaa ggaaggaaa aaagaaagaa agaagaaaga 14760
 aagaaagaca agaaagaaag aagaaagaaa gaaagggga aagaaagaaa agagaaagaa 14820
 aagaaagaaa gacaagaaag aaaaaggaaa gaaaagaaa agaaagaaa gaaagaaag 14880
 aaagaaagag aaagaaagaa aaagaaagaa agaaaagaag aaagagaaag aaagaaagaa 15000
 aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaaaag aaaaagaaag gagaaaatga cagcaattac 15060
 ttttgcaaca acctaatata agttttttaa aagttaaata ttctgttcca tgcattgctg 15120
 gatacctat aaataacagg gcatcctatg acctgaattt cccaaattat gagttgaggg 15180
 tttgaactag ttttaaaaaa caaggaggcc agggcactg gctcatgcct gtaatcccag 15240
 cactttggga ggctgaggca ggtggatcac gaggtcagga gctcgagacc agccttacca 15300
 acatagtga acacccctc tactaaaaat acaaaaatta gccggcgtg atggtgcgca 15360
 cctgtaactc cagctactca gcaggctgag gcagagaat cgctgaacc cagaaggcgg 15420
 aggttgcagt gagccaagat cacagcattg cactccagcc tgggcgacag agggagactc 15480
 cgtcttcaaa aaaaaaaaaa aagacaagg aatctgtaaaa caggcactgg aagtatatgc 15540
 acttttattt tcattctatg ctatccgatg cctactgcta tttcccttca ttttaacct 15600
 ccaacagctg cattttgctc cctccagacc acctgattgg agctcacgtg ctcccacaca 15660
 gtacctcaa ccagagagag tcgagtcca cagaaaggcg taacaatcac cagtaatttt 15720
 gcactatatt tacattgtgc cttgatacag agtactcaat gaatgctctt tgaatcatat 15780
 ttaataaata tgtgtatttg ggattgtagc atattgcagc tacctggata tataatttaa 15840
 ttagaaaaaa aattttgtgt ggctcaatca acaaacgact tttctctctc tctctttctc 15900
 tttctccctc tctctctctt tcttctcagt tgatgttgcg ggagttcagt gttgtgcaga 15960
 tggcagtgac aaatgccatg ggcacatgag atatgataaa aggtccctga agaaggtgga 16020
 gaaccagtta tcttatgaaa ttttccagag tgggtactgg atctctcctg tctggacca 16080
 tgctggcctc agcccaaggg gaatttctct ccagagacag agggcagtgat ttgaggtggg 16140
 gagacagatc gtaaacactga gacttacatg aggacaccaa acagaaaaaa ggtggcaagt 16200
 atagaaaatt ctttcttctg gacagctctc tctgttctaa cttcagcaaa atttctcccc 16260
 cagtggatgc tattgcacaa cctacatata gctatgtttt ttctataca cacttaccta 16320
 tgataaaatg cattaattag tcacagtaag aggttaacaa caataactag taataaata 16380
 gaacaattca gtaaaataag agttacttga gcacaaacac taggatataca tgacagtcaa 16440
 tctgatgacc aagagggcta ctaagcatct aaacaggagg gtaagtgtag acagcatgga 16500

gacgctggac aaagggatga ttcagtccca ggctgggatg gagcgggaagg gcatgatatg 16560
tcatcacgct actaaggcac acaatttaaa atgagtaaat tcttatttct agaaatttct 16620
ttttaatatt ttcagactac agttgcctac aggtaactga aaccccagaa agcaaaattg 16680
ttgataagga ggtactactg tacatcgtcc tttgaaccaa ctttatcatt tgctagtata 16740
tacatatata cctacataca tacatatata catacctgca cacacctata tgtatacgta 16800
cacacacaca cacgcacaca cacacactca catctactaa tgttagaata agtttgctaa 16860
ataagatgca caacttgta atgtcctaca gagcaataaa accataagca ttgggggttat 16920
cttttctact agataaaaat ccattatcat tttcataaag ttttctttac attaacatct 16980
aacttttgca atctagtttt taatcatcat aaataggaag caaatgaact gtttctctag 17040
tgaatcaaat atccttgaaa acatacatag tcatcttttt ggtttatttt tttttttaga 17100
taaattattt aaagttttaa ataatttaac attcacaata gtttgtagct gtatattttg 17160
acttggctct caaaacttaa tttgtacttt tatgtatcgt gottacctca attttttatt 17220
cacttttctt aaactttgct ggattggttt attatttttg tctatttctt tcttctctag 17280
tggtttggga gggtttttta aateccatta ctattgaatg cctattaact tgcccccttt 17340
ttctttcaat ctctattccc acggcctgaa gcatgagggc caagetgtct gtaaccagca 17400
gagagatgac ccagggtgta ttcactctc cactgtccac ctatcaccat tcccagcccg 17460
atagctctga agtacggctt ttctggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgcttca 17520
aggacacctc ctgtttttgc aatggaaaaa atgttcttaa attccagttt ctctatgaat 17580
tcaatgacat ggtttaaatc tctgtgggtg tcttcaaaqt tttttcttct aataggacct 17640
ctcatgattc tccaaccacg aaataaattc attatcattt ttatatttct tctgtcattg 17700
caaaggaggt ttgaaagag tggaggacgc gctaatgaac tcaaaaatcc acactatccc 17760
ttgtttccat ctgttttca ttcattgttt catgtggcct gtccgcctcc tctctctctt 17820
cttagacttg gagctctagc ctccagccagg ataggaaaaa gagagatcag actgttactt 17880
tgtctatgta gaaaaggaag acataagaaa ctccattttg atctgtatcc tgaacaattg 17940
ttttgctctg agatgctggt aatctgtaac tttagcccca acctgtgct cacagaaaca 18000
tgtgtgtgat ggaatcaaga ttaagggat ctagggctgt gcagaatgtg ccttgttaac 18060
aacatgttta caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgcc attctccatt ctcgattaac 18120
taggggcaca gtgcaactgc gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattg 18180
tccaaggttt ctccccactg agacagcctg agatatggcc ttgcgggatg ggaaagatct 18240
gaccgtcccc cagcctgaca cccgtgaagg gtctgcgctg aggaggatta gtaaaagagg 18300
aaggcctctt gcggttgaga taagaggaag cctctgtct cctgcatgcc cctgggaacg 18360
gcatgtctca gctgaaaacc tgattgtaca ttcgttctat tctgagatag gagaaaaccg 18420
ctctgtggct ggaggcgaga tatgctggcg gcaatgctgc tctgttgttc tttactacac 18480
tgagatgttt gggtgagaga agcataaatc tggcctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540
ttcccttgaa tttacttgtg acacagattc ctttgtctac atgttttctt gctgaccttc 18600
tcccactat cacctgttc tctgcccga ttcctctgc tgaggtagtg aaaatagtaa 18660
tcaataaata ctgagggaac tcagagaccg gtgccagcgc gggctcctccg tatgctgagt 18720
gacggtccct tgggcccact gttccttctc tatactttgt ctctgtgtct ttttctttt 18780
ctcagctctc cgtcccact gacgagaaat acccaaggt gtggaggggc tggacacctc 18840
ttcgagccag gattatcagg gcatttgggg gtctgcaaaa ctaagcccca atcctcatag 18900
ttcacaactt catccagagc cagcctgaac agtagttgcc catgatttct atgccttaat 18960
acgagaagag aacatagggg ctgggtgcca agtaggtaga cagggagggc agggaactct 19020
aagacagagc ttgaggggct cattctctct gcaaaatgaa acaaaaacca cagcactgaa 19080
tatgtaaatc tgggtggctg aaccctctct aggatagtaa gccctgacac aattgctgct 19140
atcttctctt tctctcaagg aagtcaaaaa acacctgag ccttactgtc cccttgaaa 19200
caagatgaac atctacatt tctaaagtgg gacaagaatc tctgttcata tttatgtccc 19260
atgcatttgc acgtggccgg acaaaggact ttgcttctgc cagcacatct gtcttcagat 19320
atgagaggaa acagacacaa cctggaggcg gcaagaagc agctctttct caagtgacct 19380
cctctactct cctacttctt ggctaattgg gcagccttga tccctgggaa tccaggacag 19440
atatccactc gtgacaaaact agctggaaga atgacaacca atcaggttcc 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 caggtagggg aatggccatc 19740
cctcaaacct tgcaaaaagg aaacttatgc cattgtgtcc tctgacatac tgggtgatgt 19800
actgtatgtt actgatgtga ggggaacttc ctaaattggc tagtaaatta tgccaataa 19860
aaagcaaaaa tgatatttct tgaaatgta catctgagga acattgctaa aataatttat 19920
cagtatttt caggatgatt tatagatgt cactgaagtg tgtacttgtt cctctctct 19980
cctctctctc tctcttctc tctctctct cgcttttct cctcttgecc ctctccctcc 20040
ctgactttcc ttctgtccc ctccacagca gtttatattt ttttctgat aatctaactt 20100
tgctgagggt tcaatgtaaa gcaccttcag tgatgagtta gttggaatgt tccccagaa 20160

```

attctatttc cagcactctt ttacatgaaa tccaagaagc tctcagacta tcttactgac 20220
accttgccct tcctcaacag atcaatctta tcaatgtcca tcacagatat tttgtagaac 20280
ggtaggatcct ggcagagtct cacagatgct tctgagacaa catttgcttt caaaaaatga 20340
accacacaca tcctaaagat ctcagccact tcccattggtt ctttttggtt tacagcaaac 20400
atcacaacaa tcattcctac agatcaccac tgcattgtgat caataaaata gtttttgcaa 20460
caatggctact tatgataatc atcttttatt gtttacaaat actgctttac aatagttatt 20520
cggttgcact gttcatatta gatttccaat tagctcactt aggaacataa gtcctcga 20580
cagctcagtc atctttttca ttccctgtttc tatcccctac atctctttcc tttgcagacg 20640
actatctcct acactgaaac aggaaagctt ttaccttttt ggcatgcttg atttaaagat 20700
tatagaaaag tatttgacaa agaaaactca cacatgtgtg tacatatctt ttaaaaagtt 20760
atgtttatgc attgcacagg aatatcgaga atgctaatag gcaatgtcag agtttactgt 20820
ttttcaaaat tagtacagtt ttattatttc taaaaactat aaaatgaata tattcacatc 20880
accatacaga agagtaggag gagatggcat aaagtgtcat tgttccctcct ctgcaatccc 20940
aggagataac taccaagcac aatttatgtc ttttaaaatt cagcccgtat ttataacat 21000
atatattcaa tgtagatggg atcatgatat ctcaccacac atactcttca gtgacctgca 21060
ttttcacaaa caccttccac gtaactatat agaagtctac gtcttcccct taatgtctgc 21120
tttggtctac attgtaaagc tctagcacag ttaacccaaa ctctatata tgaggatttt 21180
agttattttt cactctttaa acaatatttc catgtgtagt cttatacata cgtctgtaca 21240
cacttatccc agtctaagga gttcctttta ccttccccca tcccagcatt cctgtcacg 21300
cttgttgctt ccggtgagtg actttactcc tggagtataa tctgcgtata gttcagttaa 21360
aaacatggga tctgagttta ggtcacagct ctgccactta ctgccataag ccagttcctt 21420
gacctctctg cctcaagtt ttgacaccta caaagtaggg gataatatta gttcctagtt 21480
catagagtct tgggaataat taaatgtgat gatccatgta caatgtctgg cacttagtaa 21540
gtgctcaata aatgtcacc tttatgattg gtattgctgt tatgtctgca gagaaaatca 21600
ctttgtgtcc ctttaaaaaa aggactatgc cttggtcag ctattttgca cattaaattt 21660
cacttgccaa tattaactct ccacctctaa ctgatccct ctcttctctc atcttctggt 21720
gagaccaaat gctaattctg ctattcaagg caactagcaa agctgccagt gacagaatca 21780
aataaaccta ccctaactct ttagaattgt agttatgatt tctgttgtaa aagttactgt 21840
tgtggcagtc agtattagtc tttggtctat gatagctct ctgatctatt attgayttc 21900
aattakgtat tttttttat ttattctgaa aatgtttgtt aagcatttgc taagtaaaga 21960
tactggackg agcctcccaa atacagggca aataaaacat caaacagctt ataatttaga 22020
agggtagaag agaatctgaa agcaggtaaa aataaacagg cactcggctg ggcgcggtgg 22080
ctcagcctg taatcccagc actttgggag gccgaggtgg gcggatcacg aggtcaggag 22140
atcgagacca tcctggctaa cacggtgaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaatta 22200
gcgaggcgtg gtggcgggag cctttagctc cagctagctg ggaggctgag gcaggagaat 22260
ggtgtgaacc cgggaggcgg agcttgcaat gagccaagat cgcaccactg cactccagcc 22320
tgggygacag agcgagactc cgtctcaaaa aaataaata aataaaataa aaaataatta 22380
ggtactctag gccagtgac ctgtctctgt actctgtaaa ttcaggtcac ctgctcaggg 22440
ctaacttgag agaaggtctc tottcagttg aatttgaaa gacaattagc agttcacaag 22500
ctaaccagc tctaaggagt gtaggaggt gggagtaatg tatggaagg gctggaggcc 22560
atagaaaaac tctaaggagt gtaggaggt gggagtaatg tatggaagg gctggaggcc 22620
aaggttaaag gagatacaag gctgcaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aatactgaaa 22680
aggtcttcag tgttgttgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740
ggcagctcca aagatggcat gcgcctggtc cagctcagta agagctgagc tcttctgtg 22800

```

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

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 101

```

tctggcaaca eggcctccct gaccgtctct gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaaggctcac 120
cgctcctaggt cagcccaagt ccaactcccac tctc 154

```

15 <210> 102

ES 2 721 749 T3

<211> 156
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> sintética

<400> 102

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

10

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

15

<220>
 <223> sintética

20

<400> 103

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

25

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

30

<220>
 <223> sintética

<400> 104
 aggtgaaac acggtgagag t 21

35

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

40

<220>
 <223> sintética

45

<400> 105
 ccactcgggg aaaagttgga a 21

50

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

55

<220>
 <223> sintética

<400> 106

gcaacaattt cgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac 60
 caactgtatc catcttc 77

ES 2 721 749 T3

<210> 107
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> sintética
 <400> 107
 10
gcaacaatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac 60
caactgtatc catcttc 77
 <210> 108
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> sintética
 20
 <400> 108
gcaacaatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac 60
caactgtatc catcttc 77
 25
 <210> 109
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> sintética
 <400> 109
gcaacaatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac 60
caactgtatc catcttc 77
 35
 <210> 110
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> sintética
 45
 <400> 110
gcaacaatgt cttcgggaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat gctgcaccaa 60
ctgtatccat cttc 74
 50
 <210> 111
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>

ES 2 721 749 T3

	<223> sintética		
	<400> 111		
	gcaacaatta tgtcttcgga actgggacca aggtcacccg cctaggggct gatgctgcac		60
5	caactgtatc catcttc		77
	<210> 112		
	<211> 78		
10	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
15	<400> 112		
	gcaacaattt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcacccg tcctaggggc tgatgctgca		60
	ccaactgtat ccatcttc		78
	<210> 113		
20	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> sintética		
	<400> 113		
	caagtcgggt gtgtcttcgg aactgggacc aaggtcacccg tcctaggggc tgatgctgca		60
	ccaactgtat ccatcttc		78
30			
	<210> 114		
	<211> 77		
	<212> ADN		
35	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 114		
40			
	tgagtgetta tgtcttcgga actgggacca aggtcacccg cctaggggct gatgctgcac		60
	caactgtatc catcttc		77
	<210> 115		
45	<211> 77		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sintética		
50			
	<400> 115		

ES 2 721 749 T3

	tgagtgcggc ttttttggga actgggacca aggtcacogt cctaggggct gatgctgca	60
	caactgtatc ccatcttc	77
5	<210> 116 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética <400> 116	
	ctgaatgggtt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcacogt tcctaggggc tgatgctgca	60
	ccaactgtat ccatcttc	78
15	<210> 117 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética <400> 117	
	agtggtaatc atgtcttcgg aactgggacc aaggtcacogt tcctaggggc tgatgctgca	60
25	ccaactgtat ccatcttc	78
30	<210> 118 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética <400> 118	
	agtgggtgctt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcacogt tcctaggggc tgatgctgca	60
	ccaactgtat ccatcttc	78
40	<210> 119 <211> 78 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética <400> 119	
	agcagcactt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcacogt tcctaggggc tgatgctgca	60
50	ccaactgtat ccatcttc	78
	<210> 120	

ES 2 721 749 T3

	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 120	
	agcagcgctt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca	60
	ccaactgta	69
10		
	<210> 121	
	<211> 72	
	<212> ADN	
15	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
20	<400> 121	
	ggtggtgctt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca	60
	ccaactgtat cc	72
	<210> 122	
25	<211> 75	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> sintética	
	<400> 122	
	agtagcactt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg tcctaggggc tgatgctgca	60
	ccaactgtat ccac	75
35		
	<210> 123	
	<211> 63	
	<212> ADN	
40	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 123	
45	agcagcactt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg gcctgggggc tgatgctgca	60
	cca	63
	<210> 124	
50	<211> 21	
	<212> PRT	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> sintética	

ES 2 721 749 T3

<400> 124

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

Thr Val Ser Ile Phe
 20

5 <210> 125
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 125

cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg caccgggctg accgcctcg gggctgatgc 60

15 **tgcaccaact gtatccatc** 79

<210> 126
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

25 <400> 126

cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc accgtcctag gggctgatgc 60

tgcaccaact gtatccatc 79

30 <210> 127
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

<400> 127

cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg accgcctcg gggctgatgc 60

tgcaccaact gtatccatc 79

40 <210> 128
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

<400> 128

50

ES 2 721 749 T3

	cagcctgagt ggtcgggtgt tggcgggagg gaccaagctg accgtcctag gggctgatgc	60
	tgcaccaact gtatccatc	79
5	<210> 129 <211> 76 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
	<400> 129	
	cagcagcact gctgtgttcg gaggaggcac ccagctgacc gccctcgggg ctgatgctgc	60
	accaactgta tccatc	76
15	<210> 130 <211> 79 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
	<400> 130	
	cagcagtggc aatgctgtgt tgggaggagg caccagctg accgccctcg gggctgatgc	60
25	tgcaccaact gtatccatc	79
30	<210> 131 <211> 82 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
35	<400> 131	
	cagcagtggc aatcataggg tgttcggcgg agggaccaag ctgaccgtcc taggggctga	60
	tgctgcacca actgtatcca tc	82
40	<210> 132 <211> 79 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética	
	<400> 132	
	cagcctgagt gggtatgtct tcggaactgg gaccaaggtc accgtcctag gggctgatgc	60
50	tgcaccaact gtatccatc	79
	<210> 133 <211> 76 <212> ADN	

ES 2 721 749 T3

	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
5	<400> 133	
	cagcagcgct gtggtattcg gcgaggac caagctgacc gtcctagggg ctgatgctgc	60
	accaactgta tccatc	76
10	<210> 134	
	<211> 82	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> sintética	
	<400> 134	
	ctactatggt ggtgctcggg tgttcggcgg agggaccaag ctgaccgtcc taggggctga	60
20	tgctgcacca actgtatcca tc	82
	<210> 135	
	<211> 82	
	<212> ADN	
25	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintética	
30	<400> 135	
	ctcctatagt ggtgctcgag tattcggcgg agggaccaag ctgaccgtcc taggggctga	60
	tgctgcacca actgtatcca tc	82
	<210> 136	
35	<211> 79	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> sintética	
	<400> 136	
	gagcaacttc gtgtctgtgt tcggaggagg caccagctg accgccctcg gggetgatgc	60
	tgaccaact gtatccatc	79
45	<210> 137	
	<211> 20	
	<212> PRT	
	<213> secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> sintética	

ES 2 721 749 T3

<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

5 <210> 138
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética

<400> 138

gcaggcagca acaatttaag tcttcggaac tgggaccaag gtcaccgtcc taggtcagcc 60

15 **caagtccact cccactctc 79**

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

<220>
 <223> sintética

25 <400> 139

gacagcagtg gtaatcatta tgtcttcgga actgggacca aggtcaccgt cctaggtcag 60

cccaagtcca ctcccactct c 81

30 <210> 140
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

<400> 140

gacagcagca ctgcccgtctt cggaactggg accaaggtca ccgtcctagg tcagcccaag 60

tccactccca ctctc 75

40 <210> 141
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> sintética

<400> 141

50

ES 2 721 749 T3

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

Pro Thr Leu

REIVINDICACIONES

1. Un ratón, que comprende:

- 5 un segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H) sin reordenar, un segmento genético de diversidad de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hD_H) sin reordenar y un segmento genético que se une a cadena pesada de inmunoglobulina humana (hJ_H) sin reordenar que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena pesada (C_H) de inmunoglobulina de ratón, y
- 10 un segmento genético variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana (hV_λ) sin reordenar y un segmento genético que se une a λ humana (hJ_λ) que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena ligera κ (C_κ) de inmunoglobulina de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del segmento genético C_κ (denominado $E\kappa i$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del segmento genético C_κ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen,
- 15 en donde el ratón expresa un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia $V_H-D_H-J_H$ humana reordenada y una secuencia C_H de ratón, y una cadena ligera que comprende una secuencia $V_\lambda-J_\lambda$ humana reordenada y una secuencia C_κ de ratón.
2. El ratón de la reivindicación 1, en la que el ratón carece o substancialmente carece de un segmento genético V_κ de ratón funcional y carece o substancialmente carece de un segmento genético J_κ de ratón funcional.
3. El ratón de la reivindicación 1, que comprende una pluralidad de segmentos genéticos hV_λ sin reordenar.
4. El ratón de la reivindicación 3, en el que la pluralidad de segmentos genéticos hV_λ sin reordenar comprende:
- 25 (a) al menos 12 segmentos genéticos hV_λ ; o
(b) de 13 a 28 o más segmentos genéticos hV_λ .
5. El ratón de la reivindicación 4, en el que los segmentos genéticos hV_λ incluyen 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 y 3-12.
- 30 6. El ratón de la reivindicación 4, en el que los segmentos genéticos hV_λ incluyen 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25 y 3-27.
7. El ratón de la reivindicación 1, en el que el segmento genético J_λ humano es $J\lambda 1$ humano.
- 35 8. El ratón de la reivindicación 1, en el que el ratón comprende cuatro segmentos genéticos J_λ humanos, en el que preferentemente los cuatro segmentos genéticos J_λ humanos son $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$ y $J\lambda 7$.
9. El ratón de la reivindicación 1, en el que el locus endógeno de cadena ligera λ de ratón se elimina total o parcialmente.
- 40 10. El ratón de la reivindicación 1, en el que el locus endógeno de cadena ligera κ de ratón comprende
- (a) una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humana que se extiende de $hV\lambda 3-12$ a $hV\lambda 3-1$;
- 45 (b) una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humana que se extiende de $hV\lambda 3-27$ a $hV\lambda 3-1$; o
(c) una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humana que se extiende de $hV\lambda 5-52$ a $hV\lambda 1-40$ y una secuencia contigua del locus de cadena ligera λ humana que se extiende de $hV\lambda 3-29$ a $hV\lambda 3-1$.
11. Una célula aislada que expresa un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una secuencia $V_H-D_H-J_H$ humana reordenada y una secuencia C_H de ratón, y una cadena ligera que comprende una secuencia $V_\lambda-J_\lambda$ humana reordenada y una secuencia C_κ de ratón, en la que la célula proviene, o se puede obtener de, el ratón de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y en la que la célula comprende:
- 50 un hV_H , un hD_H y un hJ_H que están unidos de forma operativa a un gen C_H de ratón, y
55 un hV_λ y un hJ_λ , que están unidos de forma operativa a un gen C_κ de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que en dicho locus el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen C_κ (denominado $E\kappa i$) y el amplificador intrónico en la posición 3' de κ aguas abajo del gen C_κ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen.
- 60 12. La célula aislada de la reivindicación 11, en la que la célula es un linfocito B.
13. Una célula madre embrionaria (ES) de ratón aislada que comprende:
- 65 un segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H) sin reordenar, un segmento genético de diversidad de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hD_H) sin reordenar y un segmento genético

- que se une a cadena pesada de inmunoglobulina humana (hJ_H) sin reordenar que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena pesada (C_H) de inmunoglobulina de ratón, y un segmento genético variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana ($hV\lambda$) sin reordenar y un segmento genético que se une a λ humana ($hJ\lambda$) que está unido de forma operativa a un gen constante de cadena ligera κ ($C\kappa$) de inmunoglobulina de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que en dicho locus el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa i$) y el amplificador en la posición 3' de κ corriente abajo del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen.
14. Un embrión de ratón que comprende, se puede preparar o se puede obtener a partir de, la célula ES de ratón de la reivindicación 13, en la que el embrión de ratón comprende:
- un segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hV_H) sin reordenar, un segmento genético de diversidad de cadena pesada de inmunoglobulina humana (hD_H) sin reordenar y un segmento genético que se une a cadena pesada de inmunoglobulina humana (hJ_H) sin reordenar que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena pesada (C_H) de inmunoglobulina de ratón, y un segmento genético variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana ($hV\lambda$) sin reordenar y un segmento genético que se une a λ humana ($hJ\lambda$) que están unidos de forma operativa a un gen constante de cadena ligera κ ($C\kappa$) de inmunoglobulina de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa i$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen.
15. Un hibridoma que comprende una secuencia genética de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada del ratón de la reivindicación 1, la secuencia reordenada que comprende un segmento genético $hV\lambda$, un segmento genético $hJ\lambda$ y en un gen $C\kappa$ de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa i$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen, en donde el hibridoma expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia $V\lambda$ - $J\lambda$ humana reordenada y una secuencia $C\kappa$ de ratón.
16. Uso del linfocito B de la reivindicación 12 para preparar un hibridoma que comprende una secuencia genética de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada derivada del ratón de la reivindicación 1, la secuencia reordenada que comprende un segmento genético $hV\lambda$, un segmento genético $hJ\lambda$ y un gen $C\kappa$ de ratón en un locus endógeno de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, en el que, en dicho locus, el elemento amplificador intrónico κ aguas arriba del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa i$) y el amplificador en la posición 3' de κ aguas abajo del gen $C\kappa$ (denominado $E\kappa 3'$) se mantienen, en donde el hibridoma expresa un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia $V\lambda$ - $J\lambda$ humana reordenada y una secuencia $C\kappa$ de ratón.
17. El ratón de la reivindicación 1, en el que el ratón comprende: de 12 a 40 segmentos genéticos de región variable de cadena ligera λ de inmunoglobulina humana ($hV\lambda$) no reordenados y al menos un segmento genético $J\lambda$ humano ($hJ\lambda$); y una secuencia de ácidos nucleicos intergénica $V\kappa$ - $J\kappa$ humana localizada entre los 12 a 40 segmentos genéticos de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y la al menos una secuencia de ácidos nucleicos $J\lambda$ humana.
18. El ratón de la reivindicación 1, en la que el ratón comprende
- (a) 12 segmentos genéticos $V\lambda$ humanos; o
- (b) 28 o más segmentos genéticos $V\lambda$ humanos.
19. Un método para preparar un anticuerpo en un ratón, comprendiendo el método
- (a) exponer un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 17 a un antígeno;
- (b) permitir que el ratón desarrolle una respuesta inmune al antígeno; y
- (c) aislar a partir del ratón de (b) un anticuerpo que reconoce de forma específica el antígeno, o aislar a partir del ratón de (b) una célula que comprende un dominio de inmunoglobulina que reconoce de forma específica el antígeno, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada derivada de un segmento genético V_H humano, un segmento genético D_H humano, un segmento genético J_H humano y un gen C_H de ratón, y una cadena ligera derivada de un segmento genético $V\lambda$ humano, un segmento genético $J\lambda$ humano y un gen $C\kappa$ de ratón.

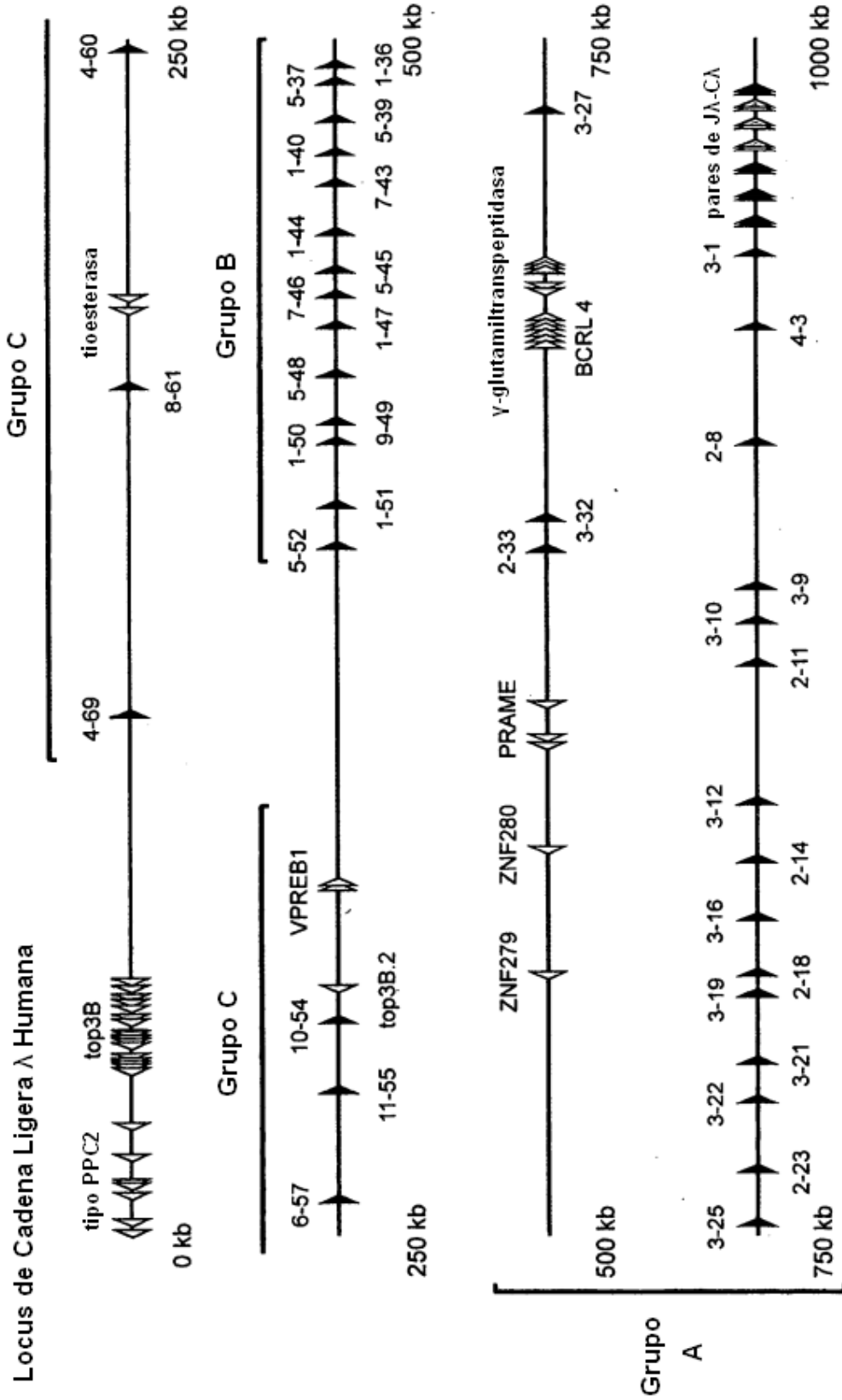


FIG. 1

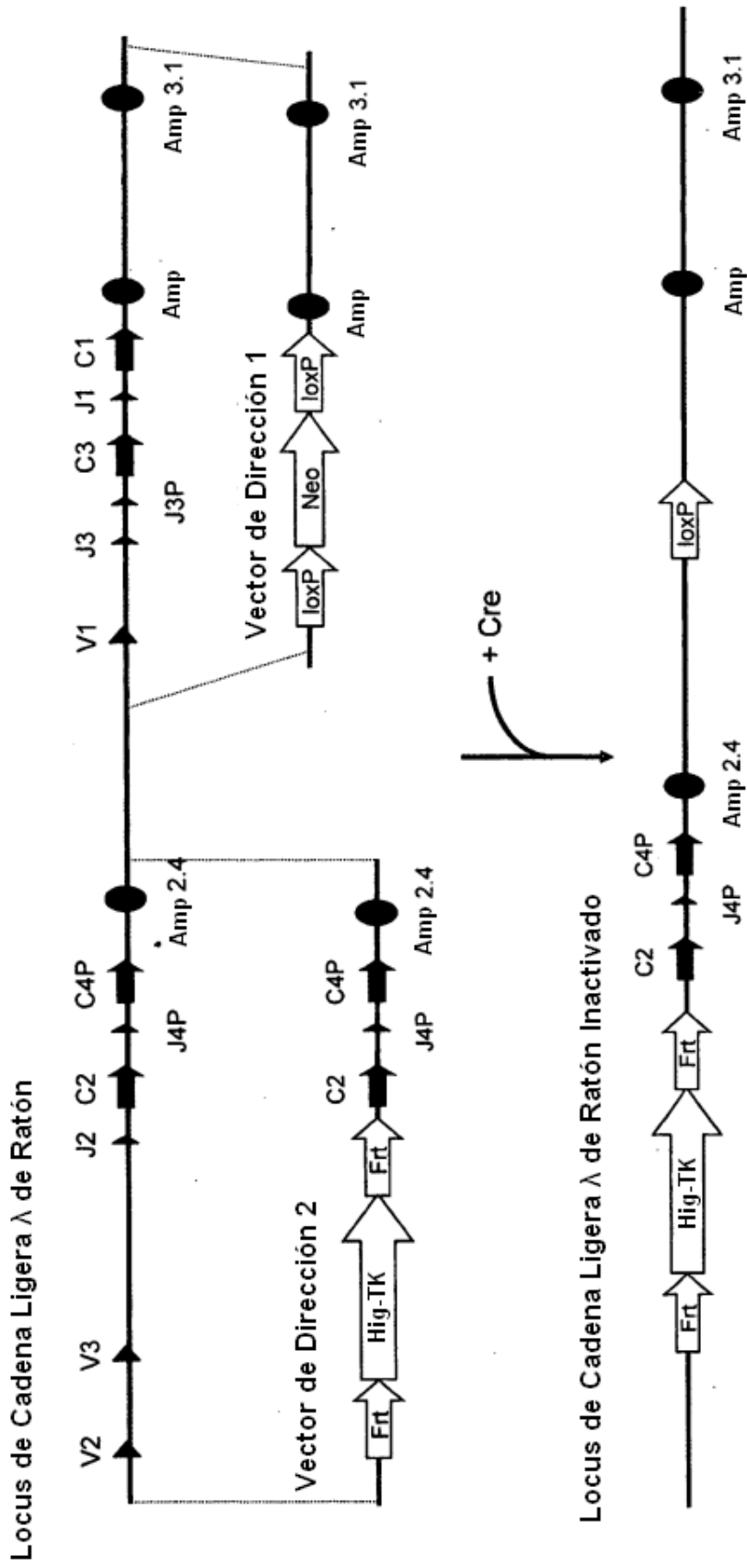


FIG. 2

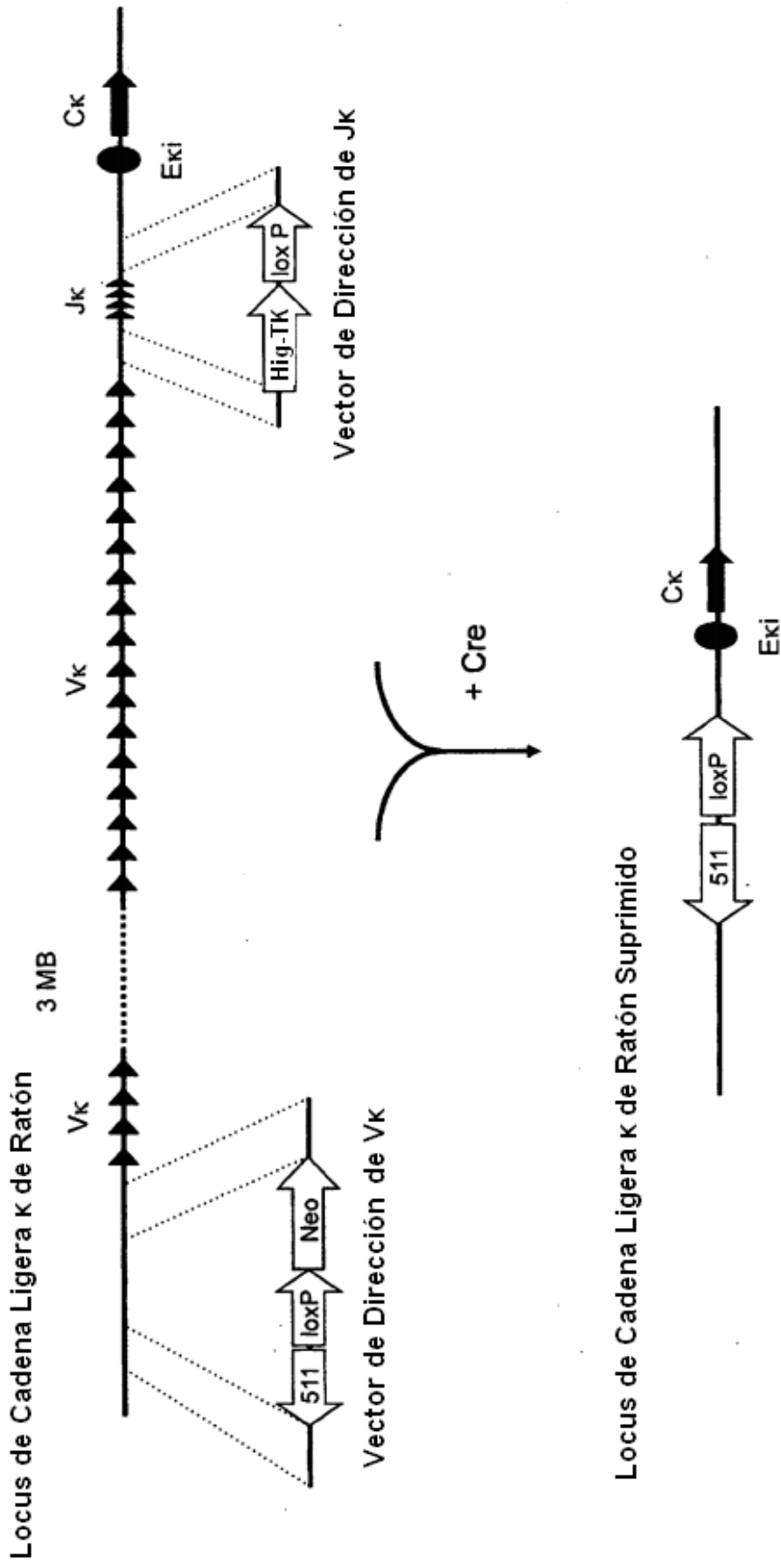


FIG. 3

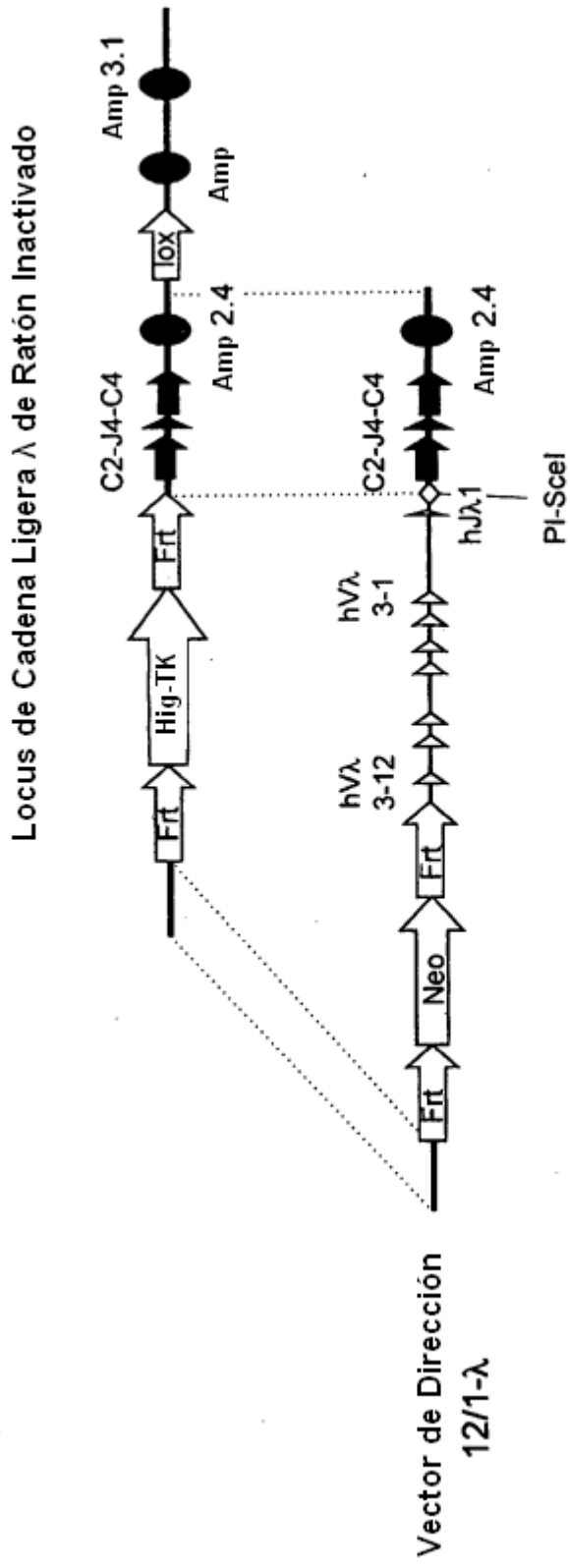


FIG. 4A

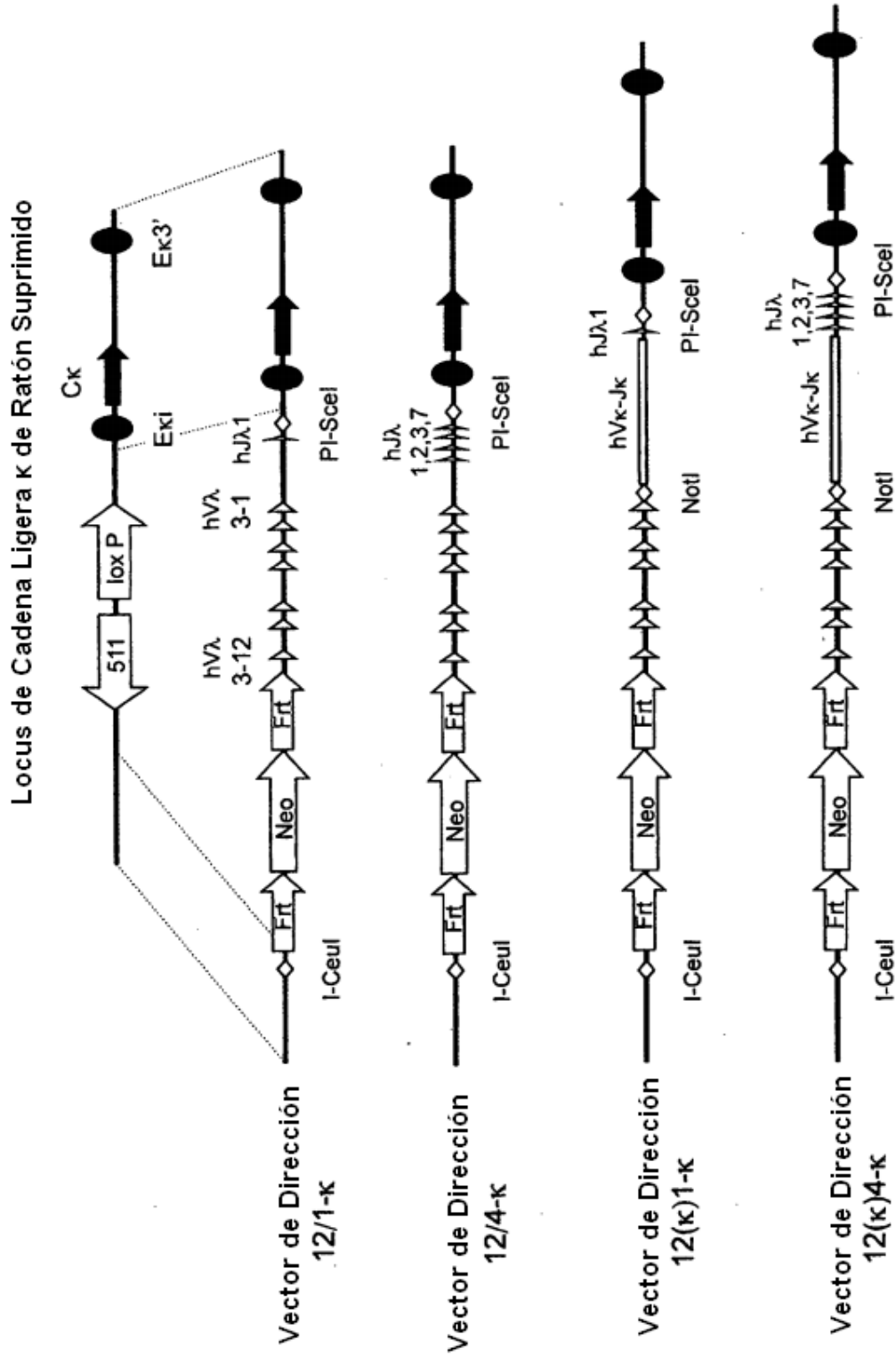


FIG. 4B

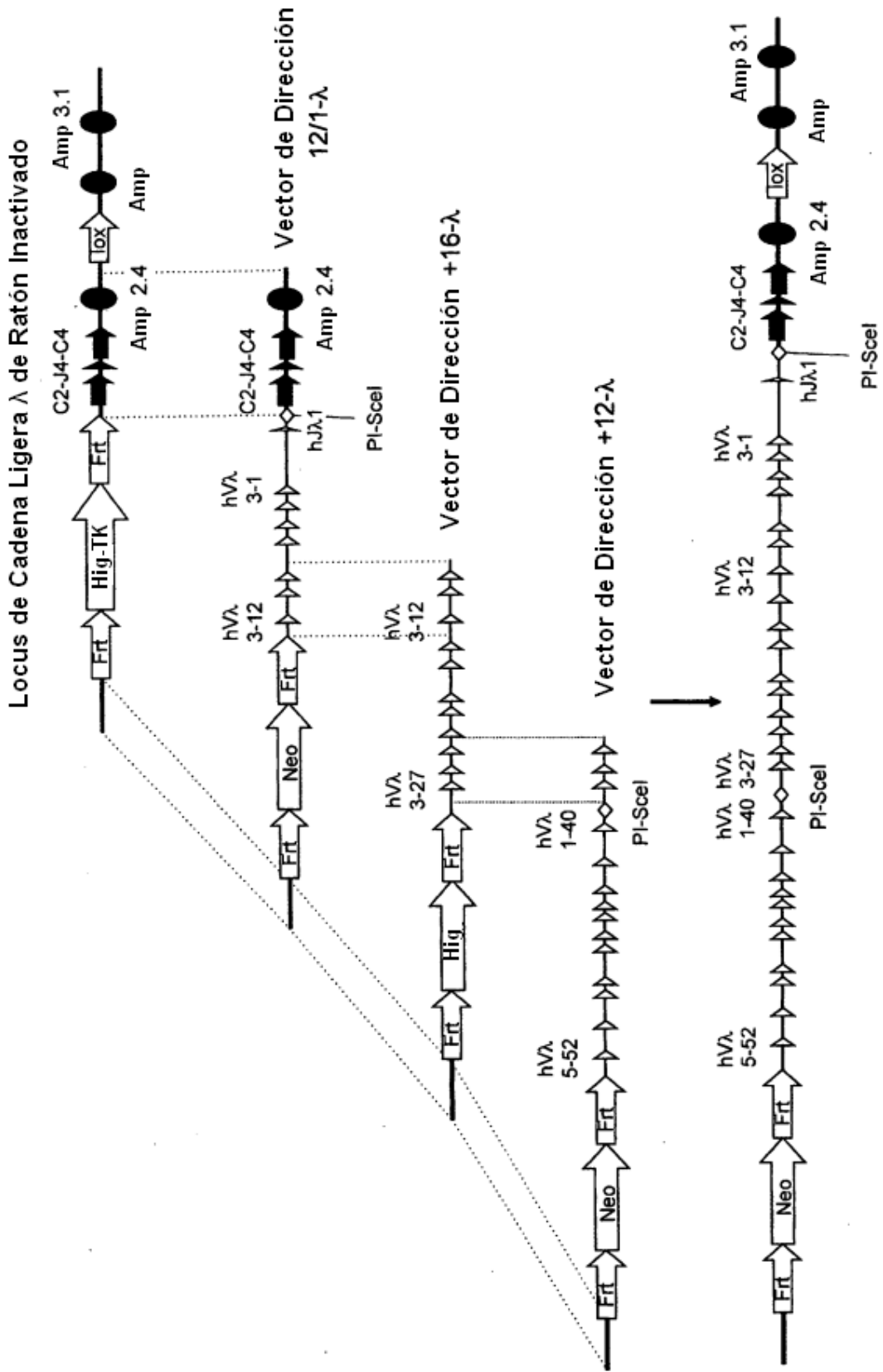


FIG. 5A

Locus de Cadena Ligera κ de Ratón Suprimido

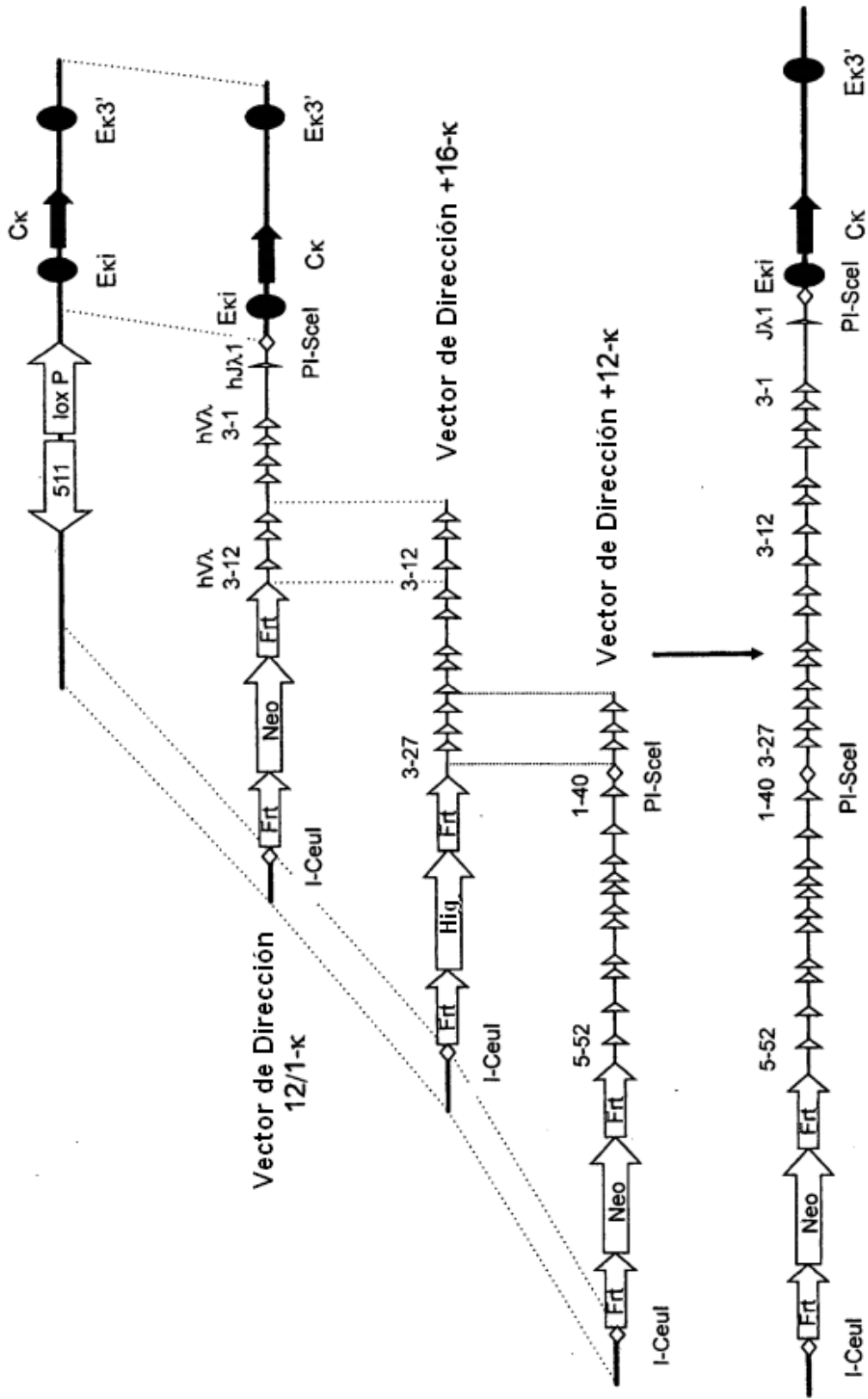


FIG. 5B

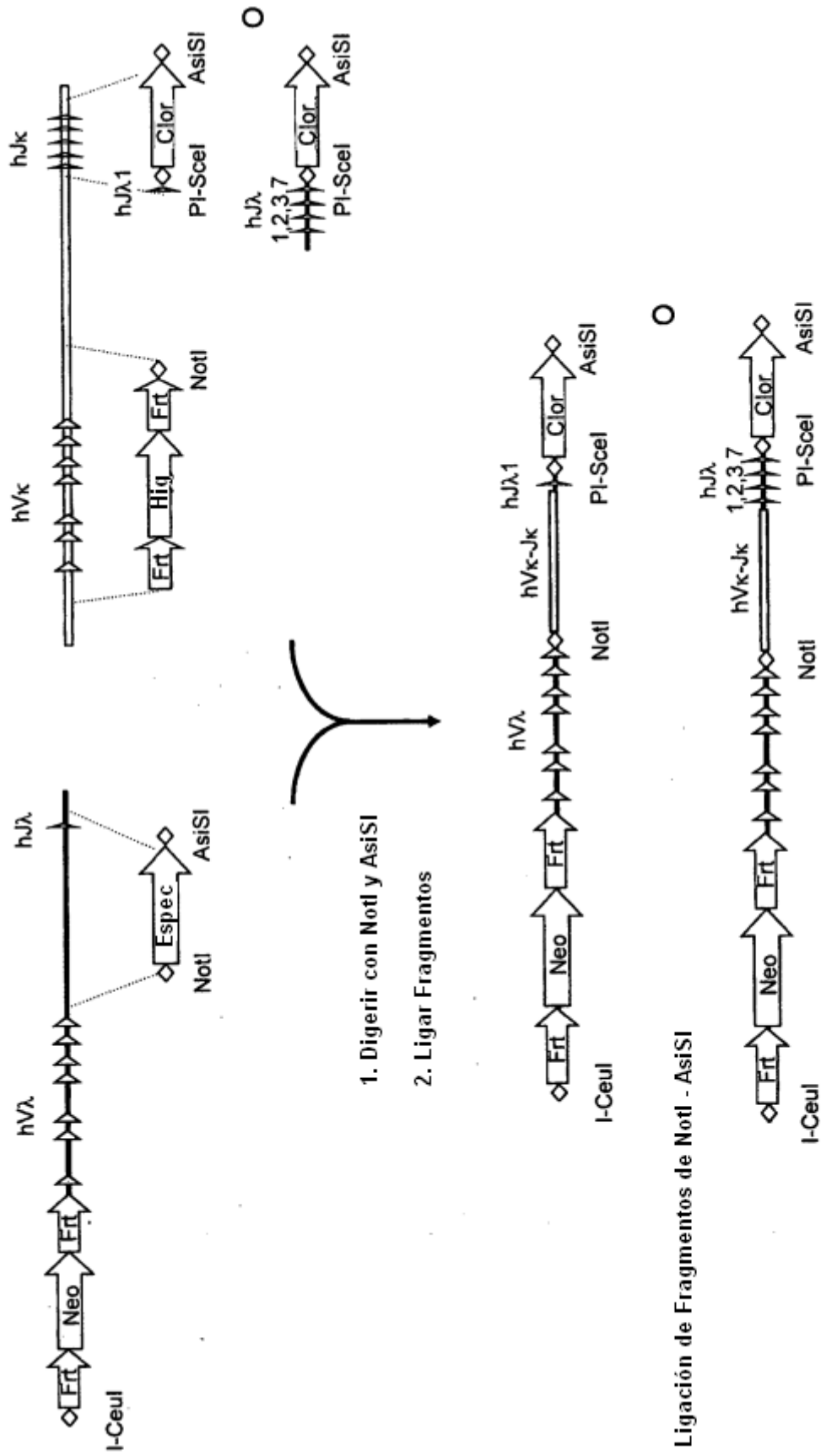


FIG. 6

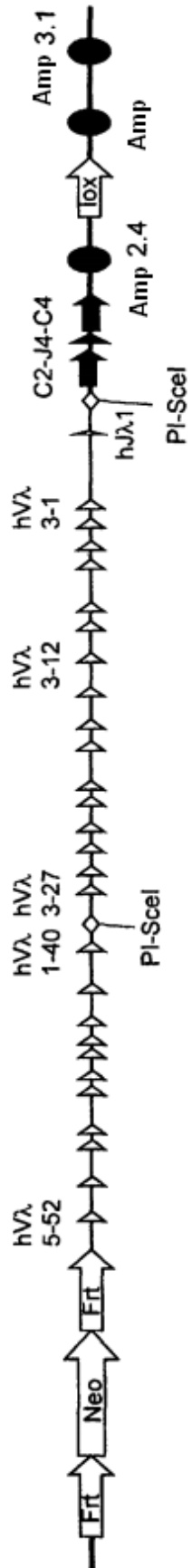


FIG. 7A

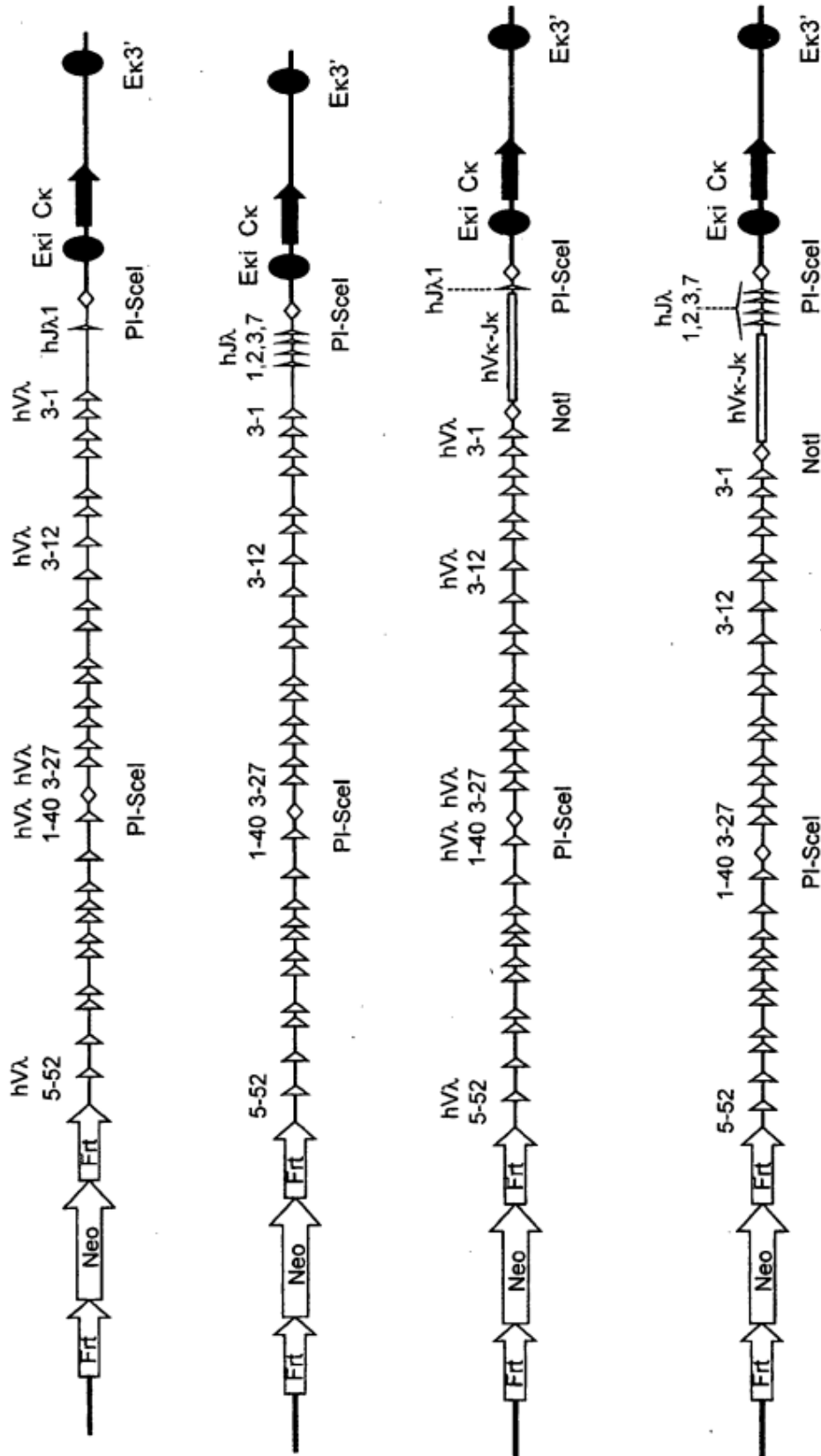


FIG. 7B

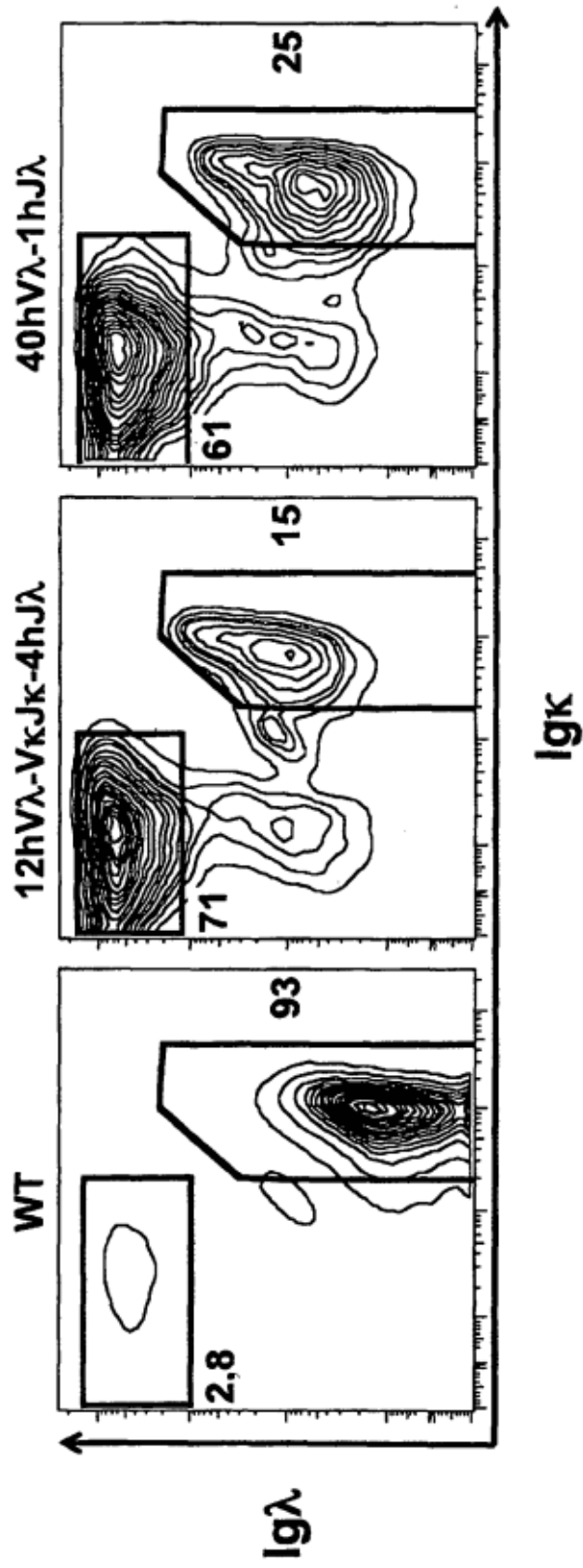


FIG. 8A

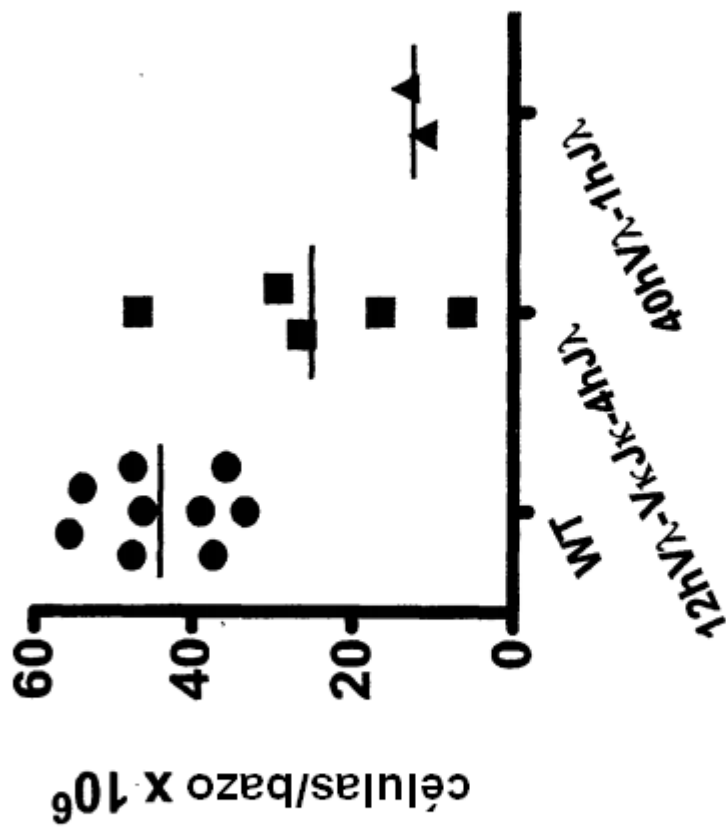


FIG. 8B

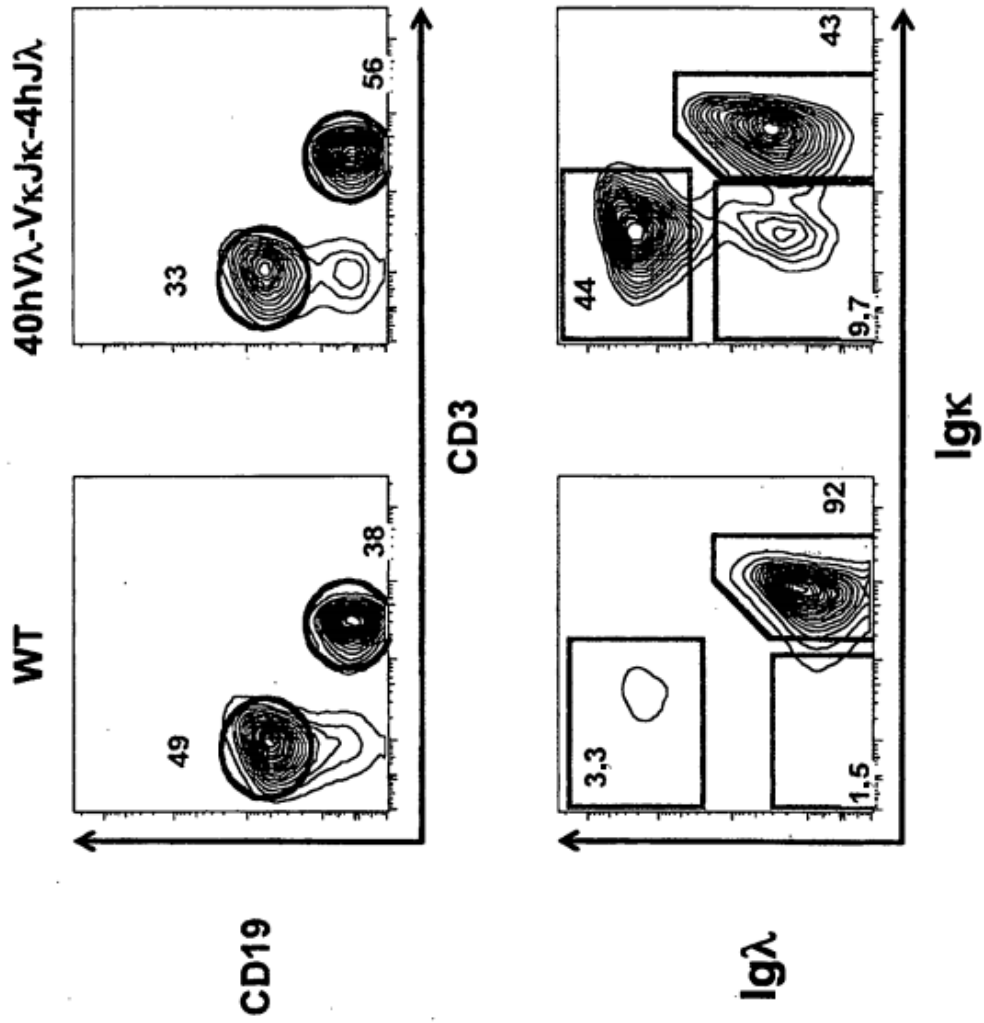


FIG. 9A

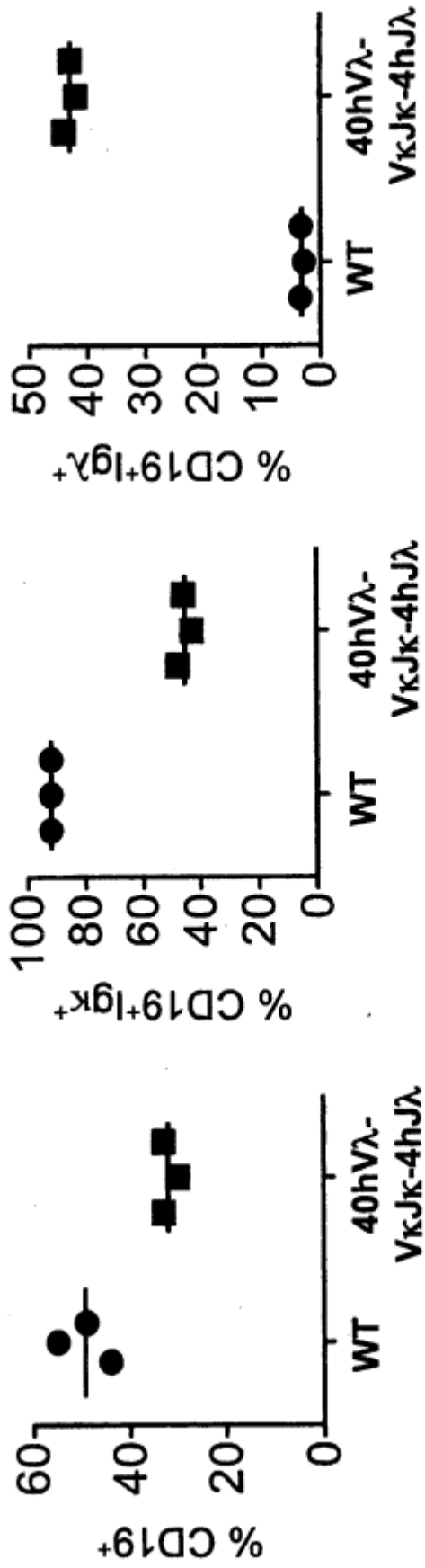


FIG. 9B

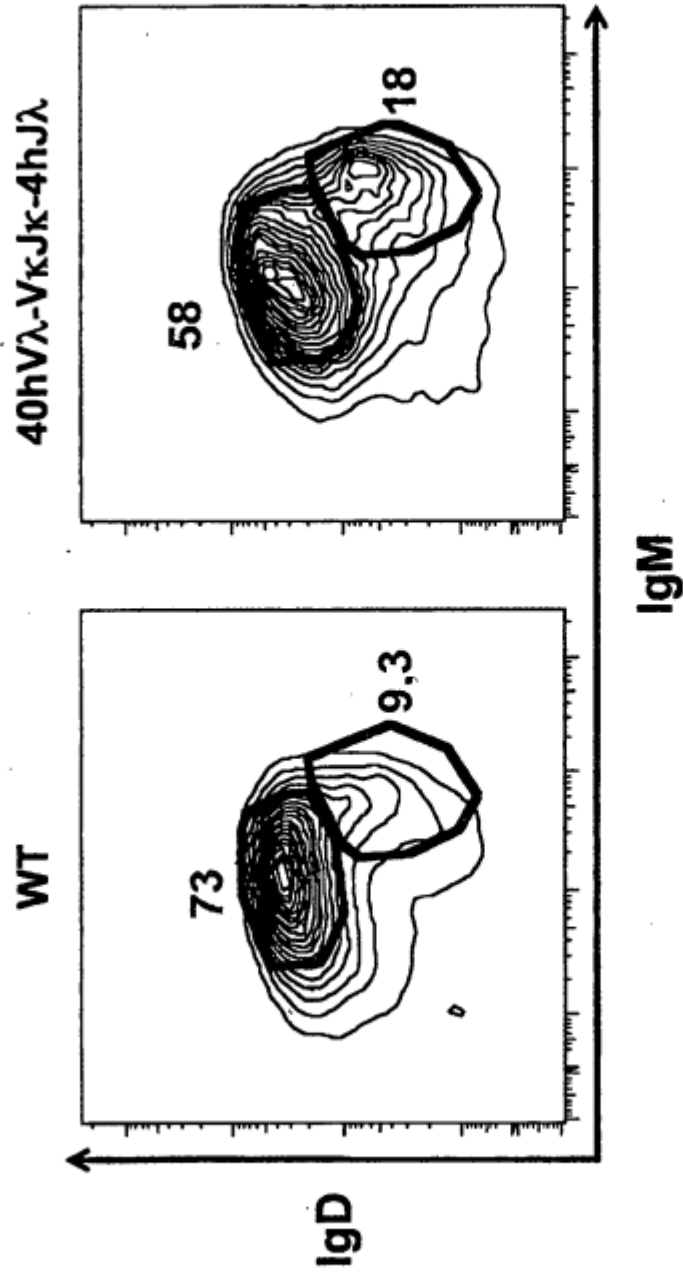


FIG. 9C

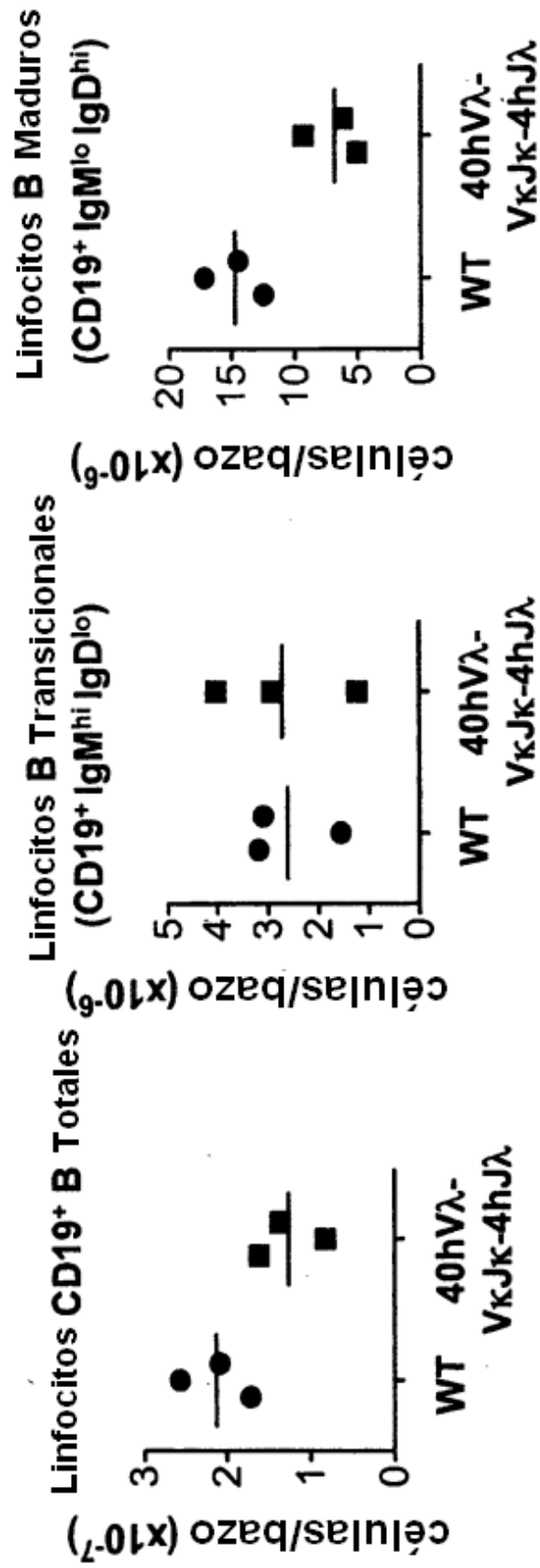


FIG. 9D

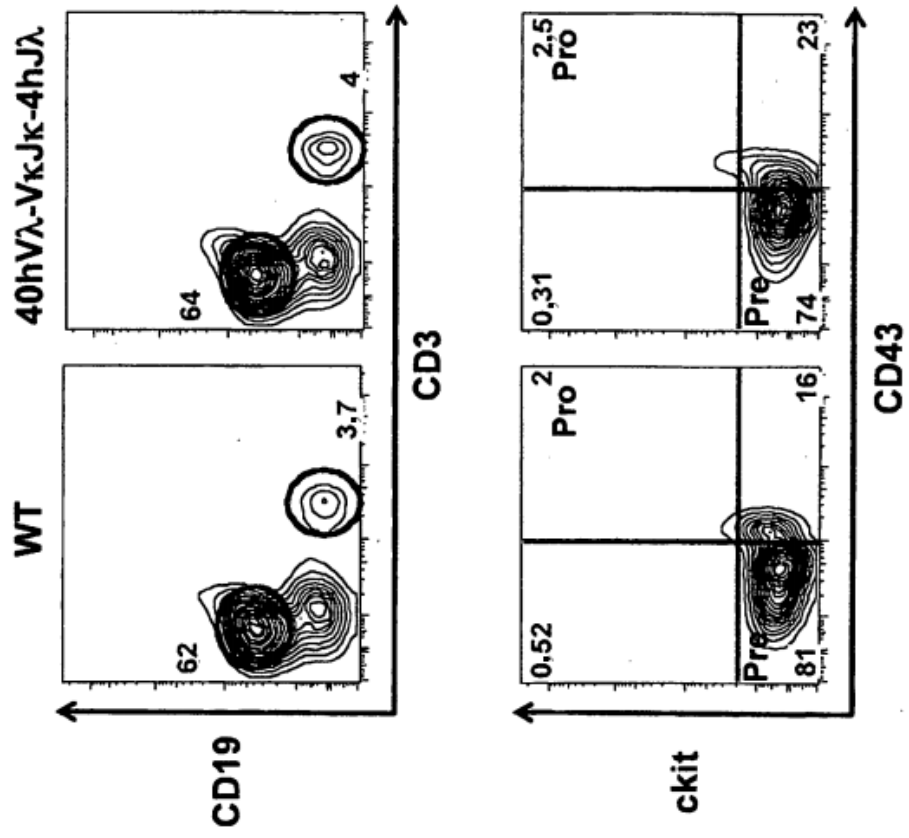


FIG. 10A

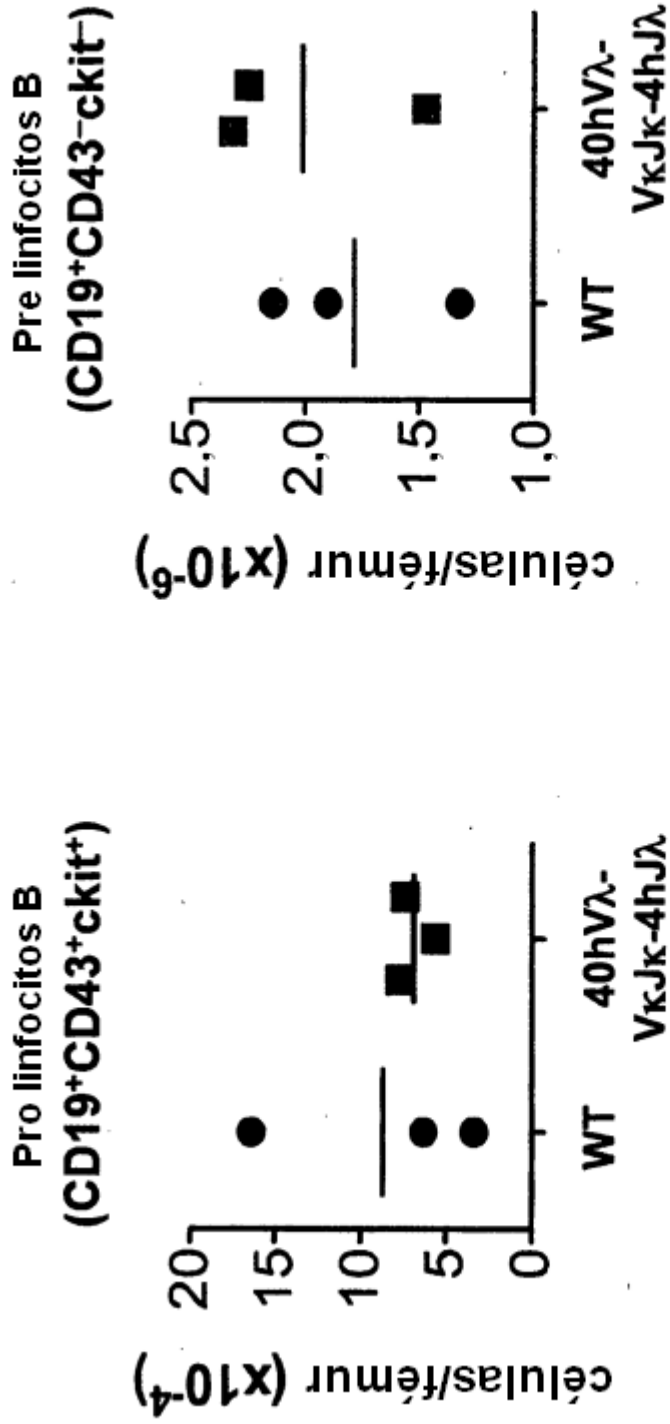


FIG. 10B

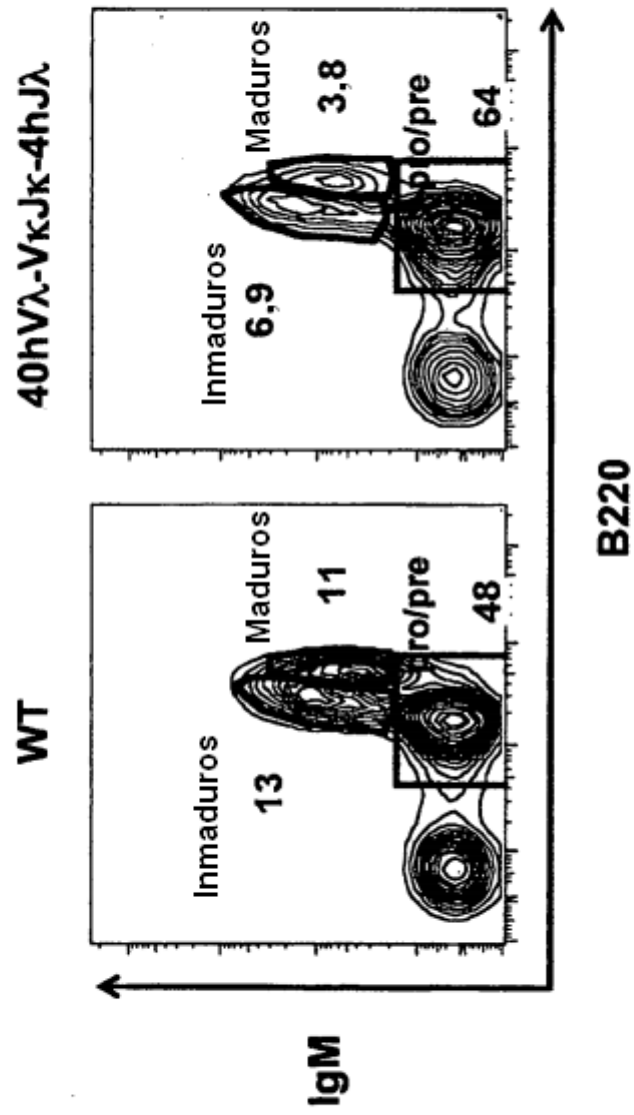


FIG. 10C

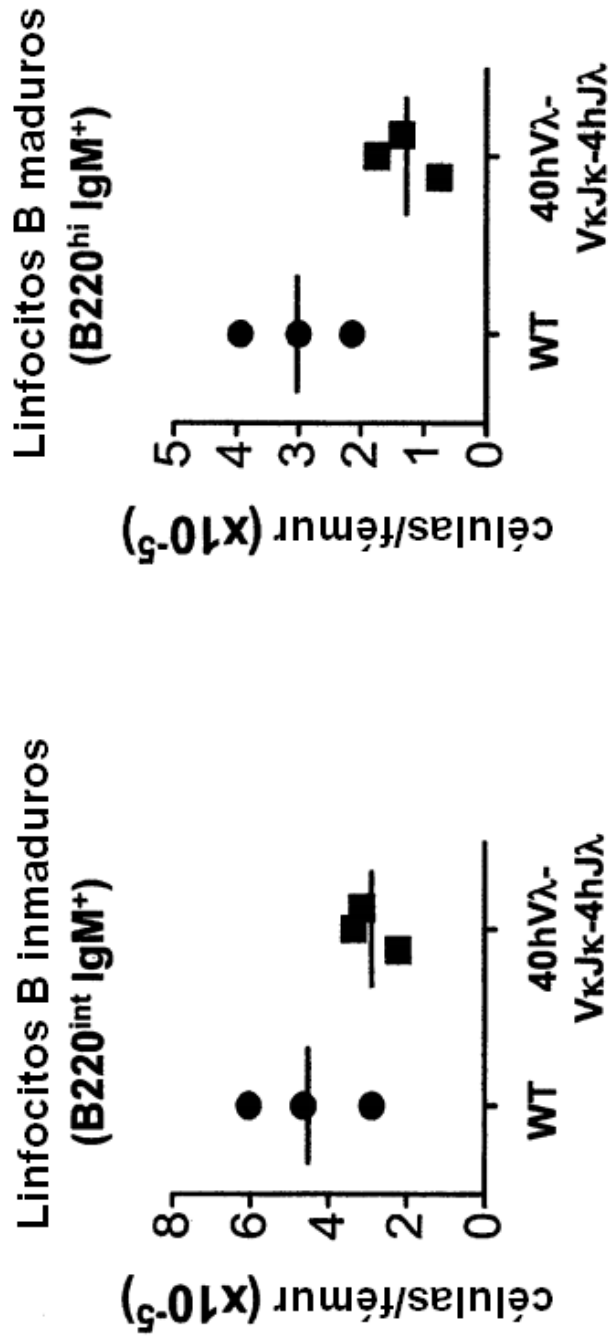


FIG. 10D

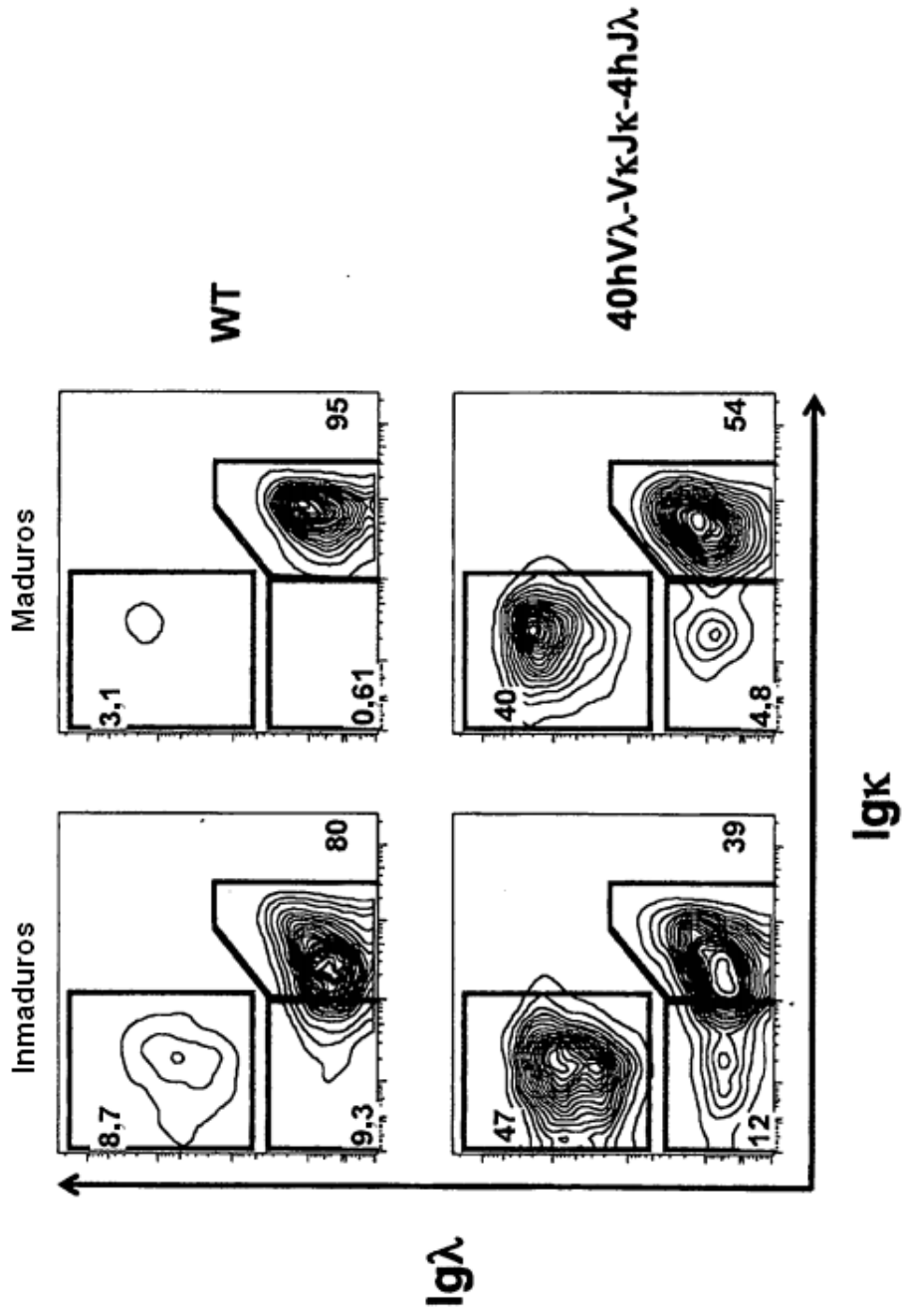


FIG. 10E

	JA1 Humano	Ck de Ratón 5'
A6	GCAACAATT	<u>tCGTCTTCGGAAC</u> TGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
B6	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
F6	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
B7	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
E7	GCAACAAT	GTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
F7	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
C8	GCAACAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
E12	CAAGTCGGTT	gTGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
1-4	TGAGTGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
1-20	TGAGTGCG	gcttcttTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
3B43	CTGAATGGT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
5-8	AGTGGTAAT	CAATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
5-19	AGTGGTGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
1010	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
11A1	AGCAGCGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
7A8	GGTGGTGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
3A3	AGTAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
2-7	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCTAG
FWR4		F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F

FIG. 11

	V\ Humano 3'	J\1 Humano	Ck de Ratón 5'
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTCCGGAGGACCCCGGCTGACCCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTC TTCGGAAC TGGGACCAAGGTCA CCGTCCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTC TTCGGAAC TGGGACCAAGGTCA CCGTCCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTGCTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGC TC Ga	GTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

FIG. 12

	V\ Humano 3'	J\1 Humano	C\2 de Ratón 5'
2D1	<u>GCAGGCAGCAACAATTTa</u>	<u>aGTC TTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCCTAG</u>	<u>GTCAGCCCCAAGTCCCACTCCCACACTCTC</u>
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTC TTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCCACTCCCACACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTC TTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCCGTCCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCCACTCCCACACTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

FIG. 13