

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 832**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012** E 12192727 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019** EP 2578688

54 Título: **Ratones ADAM6**

30 Prioridad:

**25.02.2011 US 201161446895 P**

**16.06.2011 US 201161497650 P**

**06.02.2012 US 201261595200 P**

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

**18.03.2020**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**

**(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road**

**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, LYNN;**

**STEVENS, SEAN y**

**MURPHY, ANDREW J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 748 832 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 ADAM6

5 **Campo de la invención**

Se describen ratones, células, embriones y tejidos genéticamente modificados que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un locus de ADAM6 funcional. Las modificaciones incluyen loci de inmunoglobulina humanos y/o humanizados. Se describen ratones que carecen de un gen ADAM6 endógeno funcional pero que comprenden una función de ADAM6, incluyendo ratones que comprenden una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica una proteína ADAM6. Se describen ratones macho genéticamente modificados que comprenden una modificación de un locus VH de inmunoglobulina endógeno que vuelve a los ratones incapaces de fabricar una proteína ADAM6 funcional y da como resultado una pérdida de fertilidad, y que comprende además la función de ADAM6 en los ratones macho, incluyendo ratones que comprenden una secuencia de ácido nucleico ectópica que restaura la fertilidad en los ratones macho.

**Antecedente de la invención**

Se conocen en la técnica ratones que contienen genes de anticuerpos humanos. Las aplicaciones farmacéuticas para anticuerpos en las dos últimas décadas han impulsado fuertemente la investigación acerca de la preparación de anticuerpos que sean adecuados para su uso como agentes terapéuticos humanos. Los primeros agentes terapéuticos basados en anticuerpos, que se basaban en anticuerpos de ratón, no eran ideales como agentes terapéuticos humanos debido a que la administración repetida de anticuerpos de ratón a seres humanos da como resultado una inmunogenicidad que puede confundir los regímenes de tratamiento a largo plazo. Se han desarrollado soluciones basadas en anticuerpos de ratón humanizantes que los hacen parecer más humanos y menos similares a los de ratón. Siguió métodos para expresar secuencias de inmunoglobulina humana para uso en anticuerpos, la mayoría basados en la expresión *in vitro* de bibliotecas de inmunoglobulina humana en fagos, bacterias, o levaduras. Finalmente, se han hecho intentos de preparar anticuerpos humanos útiles a partir de linfocitos humanos *in vitro*, en ratones a los que se habían injertado células hematopoyéticas humanas, y en ratones transgénicos o transgénicos con loci de inmunoglobulina endógena desactivados. En los ratones transgénicos ha sido necesario desactivar los genes de inmunoglobulina de ratón endógenos para que los transgenes completamente humanos integrados aleatoriamente funcionen como el origen de las secuencias de inmunoglobulina expresadas en el ratón. Dichos ratones pueden fabricar anticuerpos humanos adecuados para el uso como agentes terapéuticos humanos, pero estos ratones presentan problemas sustanciales en sus sistemas inmunes. Estos problemas (1) hacen que los ratones sean poco prácticos para generar un repertorio de anticuerpos suficientemente diverso, (2) requieren el uso de extensas fijaciones de rediseño genético, (3) proporcionan un proceso de selección clonal subóptimo debido probablemente a la incompatibilidad entre elementos humanos y de ratón, y (4) convierten a estos ratones en una fuente no fiable de poblaciones grandes y diversas de secuencias variables humanas necesarias para ser verdaderamente útiles para preparar agentes terapéuticos humanos.

Sigue existiendo la necesidad en la técnica para crear ratones genéticamente modificados que sean útiles en la generación de secuencias de inmunoglobulina, incluyendo secuencias de anticuerpos humanos. Sigue existiendo también una necesidad de ratones que puedan reordenar segmentos génicos de la inmunoglobulina para formar genes de la inmunoglobulina reordenados útiles, o que puedan fabricar proteínas a partir de loci de inmunoglobulina alterados, reduciendo o eliminando al mismo tiempo cambios perjudiciales que puedan ser el resultado de las modificaciones genéticas.

**Sumario de la invención**

50 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, se proporcionan métodos para crear ratones que comprenden una modificación que da como resultado una proteína ADAM 6 o un gen ADAM 6 de ratón endógeno no funcional (por ejemplo, una inactivación génica o una delección en un gen ADAM6 endógeno), en el que los ratones comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que sea funcional en un ratón macho.

Se describen construcciones de ácidos nucleicos, células, embriones, ratones, y métodos para crear ratones que comprenden una modificación de un locus endógeno de inmunoglobulina de ratón, en el que los ratones comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que sea funcional en un ratón macho. El locus endógeno de la inmunoglobulina de ratón puede ser un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina, y la modificación puede reducir o eliminar la actividad de ADAM6 de una célula o tejido de un ratón macho.

65 Se describen ratones que comprenden una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma; se proporcionan ratones que comprenden una secuencia

de nucleótidos endógena que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma, y al menos una modificación genética de un locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

- 5 En un aspecto, se proporcionan métodos para crear ratones que comprenden una modificación de un locus endógeno de inmunoglobulina de ratón, en el que los ratones comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que sea funcional en un ratón macho. Se pueden obtener ratones de acuerdo con la invención, por ejemplo, mediante los métodos descritos en el presente documento.
- 10 Se describen métodos para crear ratones que comprenden una modificación genética de un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, en el que la aplicación de los métodos da como resultado ratones macho que comprenden un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (o una de sus delecciones), y los ratones macho pueden generar progenie mediante apareamiento. Los ratones macho pueden ser capaces de producir esperma que puede atravesar un útero de ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón.
- 15 En un aspecto, se proporcionan métodos para crear ratones que comprenden una modificación genética de un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, en el que la aplicación de los métodos da como resultado ratones macho que comprenden un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (o una de sus delecciones), y los ratones macho presentan una reducción de la fertilidad, y los ratones comprenden una modificación genética que restaura en todo o en parte la reducción de la fertilidad. En varias realizaciones, la reducción de la fertilidad se caracteriza por una incapacidad del esperma de los ratones macho para migrar desde un útero de ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón. En varias realizaciones, la reducción de la fertilidad se caracteriza por un esperma que presenta un defecto de migración *in vivo*. En varias realizaciones, la modificación genética que restaura en todo o en parte la reducción de la fertilidad es una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen
- 20 ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho.
- 25 En una realización, la modificación genética comprende sustituir los loci variables de la cadena pesada de inmunoglobulina endógena por los loci variables de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. En una realización, la modificación genética comprende la inserción de los loci de la cadena pesada de inmunoglobulina ortóloga en los loci variables de la cadena pesada de inmunoglobulina endógena. En una realización, la modificación genética comprende la delección de un locus variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina endógena en todo o en parte, en el que la delección da como resultado una pérdida de la función endógena de ADAM6. En una realización específica, la pérdida de la función de ADAM6 endógena se asocia con una reducción de la fertilidad en ratones macho.
- 30 Se describen ratones que comprenden una modificación que reduce o elimina la expresión de ADAM6 de ratón de un alelo endógeno de ADAM6 de tal manera que un ratón macho que tiene la modificación presenta una fertilidad reducida (por ejemplo, una capacidad muy reducida para generar progenie mediante apareamiento), o no es esencialmente fértil, debido a la reducción o eliminación de la función de ADAM6 endógena, en el que los ratones comprenden además una secuencia ectópica de ADAM6 o un homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma. La modificación que reduce o elimina la expresión de ADAM6 de ratón puede ser una modificación (por ejemplo, una inserción, una delección, una sustitución, etc.) en un locus de inmunoglobulina de ratón.
- 35 La reducción o pérdida de la función de ADAM6 puede comprender una incapacidad o incapacidad sustancial del ratón para producir esperma que pueda viajar desde un útero de ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un ovario de ratón. Al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de los espermatozoides producidos en un volumen eyaculado del ratón puede ser incapaz de viajar a través de un oviducto *in vivo* tras la cópula y fertilizar un óvulo de ratón.
- 40 La reducción o pérdida de la función de ADAM6 puede comprender una incapacidad para formar o una incapacidad sustancial para formar un complejo de ADAM2 y/o ADAM3 y/o ADAM6 sobre la superficie de un espermatozoide del ratón. La pérdida de la función de ADAM6 puede comprender una incapacidad sustancial para fertilizar un ovario de ratón mediante cópula con un ratón hembra.
- 45 Se describe un ratón que carece de un gen ADAM6 endógeno funcional, y comprende una proteína (o una secuencia ectópica de nucleótidos que codifica una proteína) que confiere funcionalidad ADAM6 en el ratón. El ratón puede ser un ratón macho y la funcionalidad comprende una fertilidad aumentada en comparación con un ratón que carece de un gen ADAM 6 endógeno funcional.
- 50 La proteína puede estar codificada por una secuencia genómica localizada en un locus de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de inmunoglobulina puede ser un locus de la cadena pesada. La cadena pesada puede comprender al menos una V<sub>H</sub> humana, al menos una D<sub>H</sub> humana y al menos un segmento del gen J<sub>H</sub>. La proteína ectópica puede estar codificada por una secuencia genómica localizada en un locus no de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus no de inmunoglobulina puede ser un locus transcripcionalmente activo. El
- 55 locus transcripcionalmente activo puede ser el locus ROSA26. El locus transcripcionalmente activo puede estar asociado con una expresión específica de tejido. La expresión específica de tejido puede estar presente en tejidos
- 60
- 65

reproductores. La proteína puede estar codificada por una secuencia genómica insertada aleatoriamente en la línea germinal del ratón.

5 El ratón puede comprender una cadena ligera humana o una quimera de ser humano/ratón o una quimera de ser humano/rata (por ejemplo, variable humana, constante de ratón o rata) y una quimera variable humana/de ratón o una cadena pesada constante de rata. El ratón puede comprender un transgén que comprende una quimera variable humana/de rata o un gen de la cadena ligera constante de ratón unido de manera operativa a un promotor transcripcionalmente activo, por ejemplo, un promotor ROSA26. La quimera humana/de ratón o el transgén de la cadena ligera de rata puede comprender una secuencia de la región variable de la cadena humana reordenada en la línea germinal del ratón.

15 La secuencia ectópica de nucleótidos puede estar localizada en un locus de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de inmunoglobulina puede ser un locus de la cadena pesada. El locus de la cadena pesada puede comprender al menos una V<sub>H</sub> humana, al menos una D<sub>H</sub> humana y al menos un segmento del gen J<sub>H</sub> humano. La secuencia ectópica de nucleótidos puede estar localizada en un locus no de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus no de inmunoglobulina puede ser un locus transcripcionalmente activo. El locus transcripcionalmente activo puede ser el locus ROSA26. La secuencia ectópica de nucleótidos se puede situarse insertada aleatoriamente en la línea germinal del ratón.

20 Se describe un ratón que carece de un gen ADAM6 endógeno funcional, en el que el ratón comprende una secuencia ectópica de nucleótidos que complementa la pérdida de la función de ADAM6 de ratón. La secuencia ectópica de nucleótidos puede conferir al ratón la capacidad de producir progenie que es comparable con la correspondiente a un ratón silvestre que incluye un gen ADAM6 endógeno funcional. La secuencia puede conferir al ratón capacidad para formar un complejo de ADAM2 y/o ADAM3 y/o ADAM6 sobre la superficie de un espermatozoide del ratón. La secuencia puede conferir al ratón capacidad de viajar desde un útero de ratón a través del oviducto de ratón a un óvulo de ratón para fertilizar el óvulo.

30 El ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos puede producir al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % del número de crías que un ratón de tipo silvestre de la misma edad y cepa produce en un periodo de tiempo de seis meses.

35 El ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos puede producir al menos aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, o aproximadamente 10 veces o más progenie cuando se reproduce durante un periodo de tiempo de seis meses que un ratón de la misma edad y misma cepa o similar que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia ectópica de nucleótidos, que se reproduce durante sustancialmente el mismo periodo de tiempo y esencialmente en las mismas condiciones.

40 El ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos puede producir un promedio de al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, o un número mayor de 4 veces de crías por camada en un periodo de cría de 4 o 6 meses que un ratón que carece de un gen ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia ectópica de nucleótidos, y que se reproduce durante el mismo periodo de tiempo.

45 El ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos puede ser un ratón macho, y el ratón macho puede producir espermatozoides que, cuando se recupera de los oviductos aproximadamente 5-6 horas después de la cópula, refleja una migración desde el oviducto que es al menos de 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, 100 veces, 110 veces, o 120 veces o más que un ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia ectópica de nucleótidos.

50 El ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos, cuando copula con un ratón hembra, puede generar un espermatozoides que puede atravesar el útero y penetrar y atravesar el oviducto en aproximadamente 6 horas con una eficacia que es aproximadamente igual a la del espermatozoides de un ratón de tipo silvestre.

60 El ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos puede producir al menos aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, o aproximadamente 4 veces o más crías en un periodo comparable de tiempo que un ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia ectópica de nucleótidos.

65 Se describe un ratón que comprende en su línea germinal una secuencia de ácido nucleico no de ratón que codifica una proteína inmunoglobulina, en el que la secuencia de inmunoglobulina no de ratón comprende una inserción de un gen ADAM6 de ratón o un homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma. La secuencia de inmunoglobulina no de ratón puede comprender una secuencia de inmunoglobulina humana. La secuencia puede

comprender una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. La secuencia puede comprender una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana. La secuencia puede comprender uno o más segmentos génicos V, uno o más segmentos génicos D, y uno o más segmentos génicos J; en una realización, la secuencia comprende uno o más segmentos génicos V y uno o más segmentos génicos J. Los uno o más segmentos génicos V, D, y J, o uno o más segmentos génicos V y J, pueden no estar reordenados. Los uno o más segmentos génicos V, D, y J, o uno o más segmentos génicos V y J, pueden estar reordenados. Tras la reordenación de los uno o más segmentos génicos V, D, y J, o uno o más segmentos génicos V y J, el ratón puede comprender en su genoma al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen ADAM6 de ratón o el homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo. Tras la reordenación, el ratón puede comprender en su genoma al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican un gen ADAM6 de ratón o el homólogo u ortólogo o fragmento funcional del mismo. El ratón puede comprender el gen ADAM6 o el homólogo u ortólogo o el fragmento funcional del mismo en un linfocito B. El ratón puede comprender el gen ADAM6 o el homólogo u ortólogo o el fragmento funcional del mismo en un linfocito que no sea un linfocito B.

Se describen ratones que expresan una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana o fragmento funcional de la misma procedente de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, en el que los ratones comprenden una actividad de ADAM6 que es funcional en un ratón macho.

Los ratones macho pueden comprender un alelo ADAM6 endógeno no modificado individualmente u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo en un locus de ADAM6 endógeno.

Los ratones macho pueden comprender una secuencia ectópica de ADAM6 de ratón o el homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma que codifica una proteína que confiere la función de ADAM6.

Los ratones macho pueden comprender una secuencia de ADAM6 o el homólogo u ortólogo o el fragmento funcional de la misma en una localización del genoma de ratón que se parece a la localización del alelo endógeno de ADAM6, por ejemplo, en 3' de la secuencia final del segmento del gen V y en 5' del segmento inicial del gen D.

Los ratones macho pueden comprender una secuencia ectópica de ADAM6 o un homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma flanqueado en la dirección 5', la dirección 3', o la dirección 5' y la dirección 3' (con respecto a la dirección de transcripción de la secuencia de ADAM6) de una secuencia de ácido nucleico que codifica un segmento génico variable de la inmunoglobulina. El segmento génico variable de inmunoglobulina puede ser un segmento de gen humano. El segmento génico variable de inmunoglobulina puede ser un segmento de gen humano, y la secuencia que codifica la ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma puede estar entre los segmentos génicos V humanos; el ratón puede comprender dos o más segmentos génicos V humanos, y la secuencia puede estar entre el segmento final del gen V y el penúltimo segmento del gen V; la secuencia puede estar tras el segmento final del gen V y el primer segmento del gen D.

Se describe un ratón macho que comprende un gen ADAM6 endógeno no funcional, o una deleción en un gen ADAM6 endógeno, en su línea germinal; en el que los espermatozoides del ratón pueden transitar a través del oviducto de un ratón hembra y fertilizar un óvulo. Los ratones pueden comprender una copia extracromosómica de un gen ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo que es funcional en un ratón macho. Los ratones pueden comprender un gen ectópico de ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo que es funcional en un ratón macho.

Se describen ratones que comprenden una modificación genética que reduce la función endógena de ADAM6 de ratón, en el que el ratón comprende al menos alguna funcionalidad de ADAM6 proporcionada tanto mediante un alelo endógeno no modificado que es funcional en todo o en parte (por ejemplo, un heterocigoto), o mediante la expresión de una secuencia ectópica que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma que es funcional en un ratón macho.

Los ratones pueden comprender una función de ADAM6 suficiente para conferir a los ratones macho la capacidad de generar progenie mediante apareamiento, en comparación con ratones macho que carecen de ADAM6 funcional. La función de ADAM6 puede transmitirse mediante la presencia de una secuencia ectópica de nucleótidos que codifica una ADAM6 de ratón o un homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma. Los homólogos u ortólogos de ADAM6 o sus fragmentos que son funcionales en un macho de ratón incluyen aquellos que restauran, en todo o en parte, la pérdida de capacidad para generar progenie observada en un ratón macho que carece de actividad endógena de ADAM6 de ratón suficiente, por ejemplo, la pérdida de capacidad observada en un ratón ADAM6 inactivado genéticamente. En este sentido, los ratones ADAM6 inactivados genéticamente incluyen ratones que comprenden un locus endógeno o un fragmento del mismo, pero que no es funcional, es decir, que no expresa ADAM6 (ADAM6a y/o ADAM6b) en ningún caso, o que expresa ADAM6 (ADAM6a y/o ADAM6b) a un nivel que es insuficiente para soportar una capacidad esencialmente normal para generar la progenie de un ratón macho de tipo silvestre. La pérdida de la función puede deberse, por ejemplo, a una modificación en un gen estructural del locus (es decir, en una región de codificación de ADAM6a o ADAM6b) o en una región reguladora del locus (por ejemplo,

- 5 en una secuencia en 5' del gen ADAM6a, o en 3' de la región de codificación de ADAM6a o ADAM6b, en el que la secuencia controla, en todo o en parte, la transcripción de un gen ADAM6, la expresión de un ARN de ADAM6, o la expresión de una proteína ADAM6). En varias realizaciones, los ortólogos u homólogos o sus fragmentos que son funcionales en un macho de ratón son aquellos que permiten que el esperma de un macho de ratón (o una mayoría de espermatozoides en el eyaculado de un ratón macho) transite por el oviducto de un ratón y fertilice un óvulo de ratón.
- 10 Los ratones macho que expresan la región variable de la inmunoglobulina humana o sus fragmentos funcionales pueden comprender una actividad de ADAM6 suficiente para conferir a los ratones macho la capacidad de generar progenie mediante apareamiento con un ratón hembra y los ratones macho pueden presentar una capacidad de generar progenie mediante apareamiento que puede ser al menos del 25 %, al menos del 30 %, al menos del 40 %, al menos del 50 %, al menos del 60 %, al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 %, o aproximadamente la misma que la de los ratones con uno o dos alelos endógenos de ADAM6 no modificados.
- 15 Los ratones macho pueden expresar suficiente ADAM6 (o un ortólogo u homólogo o sus fragmentos funcionales) para permitir que un espermatozoide de ratón macho atraviese el oviducto de un ratón hembra.
- 20 La funcionalidad de ADAM6 puede conferirse por una secuencia de ácido nucleico que es contigua a una secuencia cromosómica de ratón (por ejemplo, el ácido nucleico se integra aleatoriamente en un cromosoma de ratón; o se coloca en una localización específica, por ejemplo, dirigiendo el ácido nucleico a una localización específica, por ejemplo, mediante inserción o recombinación homóloga mediada por recombinasa específica del sitio (por ejemplo, mediada por Cre)). La secuencia de ADAM6 puede estar presente en un ácido nucleico que es distinto del de un cromosoma del ratón (por ejemplo, la secuencia de ADAM6 está presente en un episoma, es decir, extracromosómicamente, por ejemplo, en una construcción de expresión, un vector, un YAE, un transcromosoma, etc.).
- 25 Se describen ratones genéticamente modificados y células que comprenden una modificación de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina, en el que los ratones expresan al menos una parte de una secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, al menos una parte de una secuencia humana, en el que los ratones comprenden una actividad de ADAM6 que es funcional en un ratón macho. La modificación puede reducir o erradicar la actividad de ADAM6 del ratón. El ratón puede estar modificado de tal manera que ambos alelos que codifican la actividad de ADAM6 bien están ausentes o bien expresan una ADAM6 que no funciona sustancialmente para soportar el apareamiento normal en un macho de ratón. El ratón puede comprender además una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma.
- 30 Se describen ratones genéticamente modificados y células que comprenden una modificación de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina, en el que la modificación reduce o elimina la actividad de ADAM6 expresada a partir de una secuencia de ADAM6 del locus, y en el que los ratones comprenden una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma. La proteína ADAM6 o el fragmento funcional de la misma pueden estar codificados por una secuencia ectópica de ADAM6. La proteína ADAM6 o el fragmento de la misma pueden expresarse a partir de un alelo endógeno de ADAM6. El ratón puede comprender un primer alelo de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende una primera modificación que reduce o elimina la expresión de una ADAM6 funcional procedente del primer alelo de la cadena pesada de inmunoglobulina, y el ratón comprende un segundo alelo de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende una primera modificación que no reduce o elimina sustancialmente la expresión de una ADAM6 funcional procedente del segundo alelo de la cadena pesada de inmunoglobulina.
- 40 La segunda modificación puede localizarse en 3' (con respecto a la dirección de la transcripción del segmento del gen V) de un segmento final del gen V de ratón y localizarse en 5' (con respecto a la dirección de la transcripción de la secuencia constante) del gen de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de un ratón (o quimera de ser humano/ratón) o de su fragmento (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica: C<sub>H</sub>1 y/o la región bisagra y/o C<sub>H</sub>2 y/o C<sub>H</sub>3 de un ser humano y/o ratón).
- 45 La modificación puede ser en un primer alelo de la cadena pesada de inmunoglobulina en un primer locus que codifica un primer alelo de ADAM6, y la función de ADAM6 es resultado de la expresión de una ADAM6 endógena en un segundo alelo de la cadena pesada de inmunoglobulina en un segundo locus funcional que codifica una ADAM6 funcional, en el que el segundo alelo de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende al menos una modificación de un segmento del gen V, D, y/o J, La al menos una modificación del segmento del gen V, D, y/o J puede ser una delección, una sustitución con un segmento del gen V, D, y/o J humano, una sustitución con un segmento del gen V, D, y/o J de camélido, una sustitución con un segmento del gen V, D, y/o J de camélido, una sustitución de una secuencia de la cadena pesada por una secuencia de la cadena ligera, y una de sus combinaciones. La al menos una modificación puede ser la delección de uno o más segmentos génicos V, D, y/o J de la cadena pesada y la sustitución con uno o más segmentos génicos V y/o J de la cadena ligera (por ejemplo, un segmento del gen V y/o J de la cadena ligera humana) en los locus de la cadena pesada.
- 50
- 55
- 60
- 65

La modificación puede ser en un primer alelo de la cadena pesada de la inmunoglobulina en un primer locus y en un segundo alelo de la cadena pesada de la inmunoglobulina en un segundo locus, y la función de ADAM6 puede ser el resultado de la expresión de una ADAM6 ectópica en un locus no de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus no de inmunoglobulina puede ser el locus ROSA26. El locus no de inmunoglobulina puede ser transcripcionalmente activo en un tejido reproductor.

Se describe un ratón que comprende un ADAM6 heterocigótico u homocigótico inactivado genéticamente. El ratón puede comprender además una secuencia de inmunoglobulina modificada que es una secuencia de inmunoglobulina humana o humanizada, o una secuencia de inmunoglobulina de camélido o camelizada, de ser humano o de ratón. La secuencia de inmunoglobulina modificada puede estar presente en el locus endógeno de la inmunoglobulina de la cadena pesada de ratón. La secuencia de inmunoglobulina modificada puede comprender una secuencia génica de la región variable de la cadena pesada humana en un locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. La secuencia génica de la región variable de la cadena pesada humana puede sustituir una secuencia endógena de la región variable de la cadena pesada de ratón en el locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón.

Se describe un ratón incapaz de expresar una ADAM6 endógena funcional de ratón procedente de un locus de ADAM6 endógeno de ratón. El ratón puede comprender una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica una ADAM6, o un fragmento funcional de la misma, que es funcional en el ratón. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede codificar una proteína que rescata una pérdida en la capacidad de generar la progenie que tiene un macho de ratón que homocigótico con respecto a un ratón ADAM6 inactivado genéticamente. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede codificar una proteína ADAM6 de ratón.

Se describe un ratón que carece de un locus de ADAM6 endógeno funcional, y que comprende una secuencia de ácido nucleico ectópica que confiere la función ADAM6 al ratón. La secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia endógena de ADAM6 de ratón o un fragmento funcional de la misma. La secuencia endógena de ADAM6 de ratón puede comprender una secuencia que codifica ADAM6a y ADAM6b localizada en un ratón de tipo silvestre entre el segmento 3' del gen V de la cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) de la mayoría de ratones y el segmento 5' del gen D de la cadena pesada de la inmunoglobulina de la mayoría de ratones (DH).

En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia que codifica ADAM6a o uno de sus fragmentos funcionales y/o una secuencia que codifica ADAM6b o uno de sus fragmentos funcionales, en la que ADAM6a y/o ADAM6b o uno de sus fragmento(s) funcionales está unido de manera operativa a un promotor. En una realización, el promotor es un promotor humano. En una realización, el promotor es el promotor de ADAM6 de ratón. En una realización específica, el promotor de ADAM6 comprende una secuencia localizada entre el primer codón del primer gen ADAM6 más cercano al segmento 5' de los D<sub>H</sub> de la mayoría de los ratones y la secuencia de señalización de la recombinación del segmento 5' de los genes D<sub>H</sub> de la mayoría de los ratones, en el que 5' está indicado con respecto a la dirección de la transcripción de los genes de la inmunoglobulina de ratón. En una realización, el promotor es un promotor vírico. En una realización específica, el promotor vírico es un promotor de citomegalovirus (CMV). En una realización, el promotor es un promotor de la ubiquitina.

En una realización, el promotor es un promotor inducible. En una realización, el promotor inducible regula la expresión en tejidos no reproductivos. En una realización, el promotor inducible regula la expresión en tejidos reproductivos. En una realización específica, la expresión de las secuencias de ADAM6a y/o ADAM6b o sus fragmento(s) funcionales se regula desde el punto de vista del desarrollo por el promotor inducible en tejidos reproductivos.

En una realización, los ratones ADAM6a y/o ADAM6b se seleccionan entre ADAM6a de SEQ ID NO: 1 y/o ADAM6b de la secuencia SEQ ID NO: 2. En una realización, el promotor ADAM6 de ratón es un promotor de la SEQ ID NO: 3. En una realización específica, el promotor de ADAM6 de ratón comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 directamente en la dirección 5' (con respecto a la dirección de la transcripción de ADAM6a) del primer codón de ADAM6a y se extiende hasta el extremo de la SEQ ID NO: 3 en la dirección 5' de la región de codificación de ADAM6. En otra realización específica, el promotor ADAM6 es un fragmento que se extiende a partir de entre aproximadamente 5 a aproximadamente 20 nucleótidos en la dirección 5' del codón de inicio de ADAM6a hasta aproximadamente 0,5 kb, 1 kb, 2 kb, o 3 kb o más en la dirección 5' del codón de inicio de ADAM6a.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 3 o uno de sus fragmentos, que cuando se coloca en un ratón que no es fértil o que tiene una fertilidad baja debido a la carencia de ADAM6, aumenta la fertilidad o restaura la fertilidad hasta aproximadamente la fertilidad de un ratón silvestre. En una realización, la SEQ ID NO: 3 o uno de sus fragmentos confiere a un ratón macho la capacidad de producir un espermatozoide que puede atravesar el oviducto de un ratón hembra a fin de fertilizar un óvulo de ratón.

Se describe un ratón que comprende una delección de una secuencia endógena de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6, una sustitución de un segmento endógeno del gen V<sub>H</sub> de ratón con un segmento del gen V<sub>H</sub> humano, y una secuencia ectópica de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

5 El ratón puede comprender un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una delección de una secuencia endógena de nucleótidos del locus de la inmunoglobulina que comprende un gen de ADAM6 endógeno, puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más segmentos génicos de la inmunoglobulina humana, y donde la secuencia ectópica de nucleótidos que codifica la proteína ADAM6 humana está comprendida o es directamente adyacente a la secuencia de nucleótidos que codifica el uno o más segmentos génicos de la inmunoglobulina humana.

10 El ratón puede comprender una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$ , y la secuencia ectópica de nucleótidos que codifica la proteína ADAM6 de ratón puede estar comprendida, o es directamente adyacente a, la secuencia de nucleótidos que codifica el uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos. El ratón puede comprender además una sustitución de uno o más segmentos endógenos del gen  $D_H$  con uno o más segmentos de los genes  $D_H$  en el locus endógeno del gen  $D_H$ . El ratón puede comprender además una sustitución de uno o más segmentos endógenos del gen  $J_H$  con uno o más segmentos del gen  $J_H$  en el locus endógeno del gen  $J_H$ .  
 15 El ratón puede comprender una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$  y una sustitución en los loci endógenos del gen  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$  con segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$ , en el que el ratón comprende una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón. La secuencia ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón puede colocarse entre el penúltimo segmento 3' de la mayoría de genes  $V_H$  presentes en los segmentos génicos  $V_H$  humanos, y el último segmento 3' del gen  $V_H$  presente en los segmentos génicos  $V_H$  humanos. El ratón puede comprender una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$ , y una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$ , y la secuencia ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón puede colocarse en la dirección 3' del segmento 1-2 del gen  $V_H$  humano y en la dirección 5' del segmento 6-1 del gen  $V_H$  humano.

25 El ratón puede comprender una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$ , y la secuencia ectópica de nucleótidos que codifica la proteína ADAM6 de ratón puede estar comprendida, o es directamente adyacente a, la secuencia de nucleótidos que codifica el uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos.

30 La secuencia ectópica de nucleótidos que codifica la proteína ADAM6 de ratón puede estar presente en un transgén en el genoma del ratón. La secuencia ectópica de nucleótidos que codifica la proteína ADAM6 de ratón puede estar presente extracromosómicamente en el ratón.

35 Se describe un ratón que comprende una modificación de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina, en el que el ratón expresa un linfocito B que comprende una secuencia reordenada de inmunoglobulina unida de manera operativa a una secuencia génica de la región constante de la cadena pesada, y el linfocito B comprende en su genoma (por ejemplo, en un cromosoma del linfocito B) un gen que codifica una ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho. La secuencia de inmunoglobulina reordenada unida de manera operativa a la secuencia génica de la región constante de la cadena pesada puede comprender una secuencia V, D, y/o J de la cadena pesada humana; una secuencia V, D, y/o J de la cadena pesada de ratón; una secuencia V y/o J de la cadena ligera humana o de ratón. La región constante de la  
 40 cadena pesada puede comprender una secuencia de la cadena pesada humana o de ratón seleccionada entre el grupo que consiste en  $C_H1$ , una bisagra,  $C_H2$ ,  $C_H3$ , y una de sus combinaciones.

45 Se describe un ratón genéticamente modificado, en el que el ratón comprende un gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina silenciado funcionalmente, y comprende además una sustitución de uno o más segmentos génicos endógenos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina, en el que el ratón carece de un locus de ADAM6 endógeno funcional, y en el que el ratón comprende una secuencia ectópica de nucleótidos que expresa una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

50 Se describe un ratón que carece de un locus o secuencia de ADAM6 de ratón endógeno funcional y que comprende una secuencia ectópica de nucleótidos que codifica un locus de ADAM6 de ratón o un fragmento funcional de un locus o secuencia de ADAM6 de ratón, en el que el ratón puede aparearse con un ratón del sexo opuesto para producir una progenie que comprende el locus o secuencia ectópica de ADAM6. El ratón puede ser macho. El ratón puede ser hembra.

55 Se describe un ratón genéticamente modificado, en el que el ratón comprende un segmento génico de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana en un locus génico endógeno de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, careciendo el ratón de una secuencia endógena de ADAM6 funcional en el locus génico endógeno de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, y en el que el ratón comprende una secuencia ectópica de nucleótidos que expresa una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.  
 60

65 La secuencia ectópica de nucleótidos que expresa la proteína ADAM6 de ratón puede ser extracromosómica. La secuencia ectópica de nucleótidos que expresa la proteína ADAM6 de ratón puede estar integrada en uno o más loci en el genoma del ratón. El uno o más loci puede incluir un locus de inmunoglobulina.

Se describe un ratón que expresa una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina procedente de un locus endógeno modificado de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, en el que la cadena pesada se deriva de un fragmento del gen V humano, un segmento del gen D, y un segmento del gen J, en el que el ratón comprende una actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón.

5 El ratón puede comprender una pluralidad de segmentos génicos V humanos, una pluralidad de segmentos génicos D, y una pluralidad de segmentos J. Los segmentos génicos D pueden ser segmentos de los genes D humanos. Los segmentos de los genes J pueden ser segmentos de los genes J humanos. El ratón puede comprender además una secuencia humanizada de la región constante de la cadena pesada, donde la inmunización comprende la sustitución de una secuencia seleccionada entre C<sub>H</sub>1, bisagra, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3, y una de sus combinaciones. La cadena pesada se puede obtener de un fragmento del gen V humano, un segmento del gen D humano, un segmento del gen J humano, una secuencia CH1 humana, una secuencia bisagra humana o de ratón, una secuencia C<sub>H</sub>2 de ratón, y una secuencia C<sub>H</sub>3 de ratón. El ratón puede comprender además una secuencia de la región constante de la cadena ligera humana.

15 El segmento del gen D puede estar flanqueado en 5' (con respecto a la dirección de la transcripción del segmento del gen D) por una secuencia que codifica una actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón.

20 En una realización, la actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón es el resultado de la expresión de una secuencia de nucleótidos localizada en 5' de los segmentos de los genes D situados más en dirección 5' y en 3' de los segmentos génicos V situados más en la dirección 3' (con respecto a la dirección de la transcripción del segmento del gen V) del locus endógeno modificado de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón.

25 En una realización, la actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón es el resultado de la expresión de una secuencia de nucleótidos localizada entre los segmentos génicos V humanos en el locus endógeno modificado de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. En una realización, los dos segmentos génicos V humanos son el segmento 1-2 del gen V<sub>H</sub> y el segmento 6-1 del gen V<sub>H</sub> humano.

30 En una realización, la secuencia de nucleótidos entre los dos segmentos génicos V humanos se coloca en una orientación opuesta a la transcripción con respecto a los segmentos génicos V humanos. En una realización específica, la secuencia de nucleótidos codifica, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción de los genes ADAM6, y una secuencia de ADAM6a seguida por una secuencia de ADAM6b.

35 El ratón puede comprender una sustitución de una secuencia del pseudogén ADAM6 humano entre los segmentos 1-2 de V<sub>H</sub> y 6-1 de V<sub>H</sub> del gen V humano con una secuencia de ADAM6 de ratón o uno de sus fragmentos funcionales.

40 En una realización, la secuencia que codifica la actividad de ADAM6 que es funcional en el ratón es una secuencia de ADAM6 de ratón o uno de sus fragmentos funcionales.

45 Se describe un ratón que comprende un segmento endógeno del gen DFL16.1 de ratón (por ejemplo, en un ratón heterocigótico para el locus endógeno modificado de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón), o un segmento 1-1 del gen D<sub>H</sub> humano. El segmento del gen D de la cadena pesada de la inmunoglobulina expresada por el ratón puede derivarse de un segmento endógeno del gen DFL16.1 de ratón o un segmento 1-1 del gen D<sub>H</sub> humano.

50 Se describe un ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ADAM6 de ratón (o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) en una célula que contiene ADN de un linaje no reordenado de linfocitos B, pero no comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica ADAM6 de ratón (o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) en un linfocito B que comprende los loci reordenados de la inmunoglobulina, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la ADAM6 de ratón (o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) se produce en el genoma en una posición que es diferente de una posición en la que la ADAM6 de ratón aparece en un ratón silvestre. La secuencia de ácido nucleico que codifica la ADAM6 de ratón (o el homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) puede estar presente en todas o sustancialmente todas las células que contienen el ADN que no son del linaje reordenado de linfocitos B; la secuencia del ácido nucleico puede estar presente en las células de la línea germinal del ratón, pero no en un cromosoma de un linfocito B reordenado.

60 Se describe un ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una ADAM6 de ratón (o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) en todas o sustancialmente todas las células que contienen el ADN, incluyendo los linfocitos B que comprenden los loci reordenados de la inmunoglobulina, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la ADAM6 de ratón (o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) se produce en el genoma en una posición que es diferente de una posición en la que la ADAM6 de ratón aparece en un ratón silvestre. La secuencia del ácido nucleico que codifica la ADAM6 de ratón (o el homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) puede estar en un ácido nucleico que es contiguo al locus reordenado de la inmunoglobulina. El ácido nucleico que es contiguo al locus reordenado de la inmunoglobulina puede ser un cromosoma. El cromosoma puede ser un cromosoma que se encuentra en un ratón silvestre y el cromosoma comprende una modificación de un locus

de la inmunoglobulina de ratón.

Se describe un ratón genéticamente modificado, en el que el ratón comprende un linfocito B que comprende en su genoma una secuencia de ADAM6 o un ortólogo o un homólogo de la misma.

5 La secuencia de ADAM6 o un ortólogo u homólogo de la misma puede estar en un locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina. La secuencia de ADAM6 o un ortólogo u homólogo de la misma puede estar en un locus que no es un locus de la inmunoglobulina. La secuencia de ADAM6 puede estar en un transgén impulsado por un promotor heterólogo. El promotor heterólogo puede ser un promotor no de inmunoglobulina. Los linfocitos B pueden expresar una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo de la misma.

El 90 % o más de los linfocitos B del ratón pueden comprender un gen que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo de la misma o un homólogo de la misma o un fragmento de la misma que es funcional en el ratón. El ratón puede ser un ratón macho.

15 El genoma del linfocito B puede comprender un primer alelo y un segundo alelo que comprende la secuencia de ADAM6 o un ortólogo u homólogo de la misma. El genoma del linfocito B puede comprender un primer alelo pero no un segundo alelo que comprende la secuencia de ADAM6 o un ortólogo u homólogo de la misma.

20 Se describe un ratón que comprende una modificación en uno o más alelos endógenos de ADAM6.

La modificación puede volver al ratón incapaz de expresar una proteína ADAM6 funcional procedente de al menos uno del uno o más alelos endógenos de ADAM6. El ratón puede ser incapaz de expresar una proteína ADAM6 funcional procedente de cada uno de los alelos endógenos de ADAM6.

25 Los ratones pueden ser incapaces de expresar una proteína ADAM6 funcional procedente de cada alelo endógeno de ADAM6, y los ratones comprenden una secuencia ectópica de ADAM6.

30 Los ratones pueden ser incapaces de expresar una proteína ADAM6 funcional procedente de cada alelo endógeno de ADAM6, y los ratones pueden comprender una secuencia ectópica de ADAM6 localizada en 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, o 120 o más kb en la dirección 5' (con respecto a la dirección de la transcripción del locus de la cadena pesada de ratón) de una secuencia de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. La secuencia ectópica de ADAM6 puede estar en el locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina (por ejemplo, en una región V-D intergénica, entre dos segmentos génicos V, entre un segmento del gen V y el gen D, entre un segmento del gen D y el gen J, etc.). La secuencia ectópica de ADAM6 puede estar localizada en una secuencia intergénica de 90 a 100 kb entre el segmento final del gen V de ratón y el primer segmento del gen D de ratón. La secuencia endógena V-D intergénica de 90 a 100 kb puede eliminarse y la secuencia ectópica de ADAM6 puede colocarse entre el segmento final del gen V y el primer gen D.

40 Se describe un ratón macho estéril, en el que el ratón comprende una delección de dos o más alelos endógenos de ADAM6. Se describe un ratón hembra que es portador de un rasgo de esterilidad del macho, en el que el ratón hembra comprende en su línea germinal un alelo no funcional de ADAM6 o un alelo endógeno de ADAM6 inactivado genéticamente.

45 Se describe un ratón que carece de un segmento endógeno del gen V, D, y J de la cadena pesada de la inmunoglobulina, donde una mayoría de los linfocitos B del ratón comprenden una secuencia de ADAM6 o un ortólogo u homólogo de la misma.

50 El ratón puede carecer de los segmentos génicos endógenos de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionados entre dos o más segmentos génicos V, dos o más segmentos de los genes D, dos o más segmentos de los genes J, y una de sus combinaciones. El ratón puede carecer de los segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionados entre al menos uno y hasta al menos 89 segmentos génicos de V, al menos uno y hasta 13 segmentos génicos de D, al menos uno y hasta cuatro segmentos génicos de J, y una de sus combinaciones. El ratón puede carecer de un fragmento de ADN genómico del cromosoma 12 que comprende aproximadamente tres megabases del locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina. El ratón puede carecer de todos los segmentos endógenos del gen V, D, y J de la cadena pesada. El ratón puede carecer de 89 segmentos del gen V<sub>H</sub>, 13 segmentos de los genes D<sub>H</sub> y cuatro segmentos de los genes J<sub>H</sub>.

60 Se describe un ratón, en el que el ratón tiene un genoma en la línea germinal que comprende una modificación de un locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina, donde la modificación en el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina comprende la sustitución de una o más secuencias de la región variable de la inmunoglobulina de ratón con una o más secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón, y en el que el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 de ratón. Las secuencias D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> y al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60, o al menos 80 secuencias de V<sub>H</sub> del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina están sustituidas preferentemente por secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón. Las secuencias D<sub>H</sub>, J<sub>H</sub>, y todas las V<sub>H</sub> del locus de la cadena pesada de la

- 5 inmunoglobulina están sustituidas por secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón. Las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón pueden no estar reordenadas. Las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón comprenden preferentemente las regiones  $D_H$  y  $J_H$  no reordenadas y al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60, o al menos 80 secuencias de  $V_H$  no reordenadas de especies no de ratón. Las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón comprenden preferentemente la región variable completa, incluyendo todas las regiones  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$ , de las especies no de ratón. Las especies no de ratón pueden ser *Homo sapiens* y las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón pueden ser secuencias humanas.
- 10 Se describe un ratón que expresa un anticuerpo que comprende al menos un dominio variable humano/dominio constante no humano del polipéptido de la inmunoglobulina, en el que el ratón expresa una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo de la misma procedente de un locus diferente que el de un locus de la inmunoglobulina.
- 15 La proteína ADAM6 o el ortólogo u el homólogo de la misma se expresa en un linfocito B del ratón, en el que el linfocito B comprende una secuencia reordenada de inmunoglobulina que comprende una secuencia de la región variable humana y una secuencia de la región constante no humana.
- 20 La secuencia de la región constante no humana puede ser una secuencia de roedor. El roedor puede seleccionarse entre un ratón, una rata, y un hámster.
- 25 Se describe un método para crear un ratón macho estéril, que comprende convertir en no funcional un alelo ADAM6 endógeno de una célula ES donante (o inactivar genéticamente dicho alelo), introducir la célula ES donante en un embrión hospedador, introducir el embrión hospedador en una madre sustituta, y dejar que la madre sustituta críe a la progenie derivada en todo o en parte de la célula ES donante. El método puede comprender además criar la progenie para obtener un ratón macho estéril.
- 30 Se describe un método para crear un ratón con una modificación genética de interés, en el que el ratón es estéril, comprendiendo el método las etapas de (a) crear una modificación genética de interés en un genoma; (b) modificar el genoma para inactivar genéticamente un alelo endógeno de ADAM6, o convertir en no funcional un alelo endógeno de ADAM6; y, (c) emplear el genoma en la creación de un ratón. El genoma puede proceder de una célula ES o se usa en un experimento de transferencia nuclear.
- 35 Se describe un ratón creado utilizando un vector director, una construcción de nucleótidos, o una célula tal como se describe en el presente documento.
- Se describe una progenie procedente del apareamiento de un ratón tal como se describe en el presente documento con un segundo ratón que es un ratón silvestre o genéticamente modificado.
- 40 Se describe un método para mantener una cepa de ratones, donde la cepa de ratón comprende una sustitución de una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón con una o más secuencias heterólogas de la cadena pesada de la inmunoglobulina. La una o más secuencias heterólogas de la cadena pesada de la inmunoglobulina pueden ser secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana.
- 45 La cepa de ratón puede comprender una delección de uno o más segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ , y/o  $J_H$ . El ratón puede comprender además uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de los genes  $D_H$  humanos, y/o uno o más segmentos de los genes  $J_H$  humanos. El ratón puede comprender al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60, o al menos 80 segmentos  $V_H$  humanos, al menos 27 segmentos de los genes  $D_H$  humanos, y al menos seis segmentos de los genes  $J_H$ . El ratón puede comprender al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60, o al menos 80 segmentos  $V_H$  humanos, los al menos 27 segmentos de los genes  $D_H$  humanos, y los al menos seis segmentos de los genes  $J_H$  se unen de manera operativa a un gen de la región constante. El gen de la región constante puede ser un gen de la región constante de ratón. El gen de la región constante puede comprender una secuencia génica de la región constante de ratón seleccionado entre  $C_H1$ , una bisagra,  $C_H2$ ,  $C_H3$ , y/o  $C_H4$  o una de sus combinaciones.
- 50 55
- 60 Se describe un método que comprende generar un ratón macho heterocigótico para la sustitución de la secuencia pesada de la inmunoglobulina de ratón, y la reproducción del ratón macho heterocigótico con un ratón hembra silvestre o un ratón hembra que es homocigótico o heterocigótico para la secuencia de la cadena pesada humana. El método puede comprender mantener la cepa criando repetidamente machos heterocigóticos con hembras que son silvestres u homocigóticas o heterocigóticas para la secuencia de la cadena pesada humana.
- 65 El método puede comprender obtener células de los ratones machos o hembras homocigóticos o heterocigóticos para la secuencia de la cadena pesada humana, y emplear dichas células como células donantes o los núcleos de las anteriores como núcleos donantes, y utilizar las células o los núcleos para criar animales genéticamente modificados utilizando células hospedadoras y/o gestando las células y/o los núcleos en madres sustitutas.

Solo los ratones macho que son heterocigóticos para la sustitución en el locus de la cadena pesada pueden reproducirse con ratones hembra. Los ratones hembra pueden ser homocigóticos, heterocigóticos, o silvestres con respecto al locus sustituido de la cadena pesada.

- 5 El ratón puede comprender además una sustitución de las secuencias de la región variable de la cadena ligera  $\lambda$  y/o  $\kappa$  en un locus endógeno de la cadena ligera de la inmunoglobulina con secuencias heterólogas de la cadena ligera de la inmunoglobulina. Las secuencias heterólogas de la cadena ligera de la inmunoglobulina pueden ser secuencias de la región variable de la cadena ligera  $\lambda$  y/o  $\kappa$ .
- 10 El ratón puede comprender además un transgén en un locus diferente al locus endógeno de la inmunoglobulina, en la que el transgén comprende una secuencia que codifica una secuencia heteróloga reordenada o no reordenada de la cadena ligera de  $\lambda$  o  $\kappa$  (por ejemplo,  $V_L$  no reordenada y  $J_L$  no reordenada, o  $VJ$ ) reordenada unida de manera operativa (para la no reordenada) o fusionada (para la reordenada) a una secuencia de la región constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina. La secuencia heteróloga de la cadena ligera  $\lambda$  o  $\kappa$  puede ser humana. La secuencia de la región constante se puede seleccionar entre roedor, ser humano, y primate no humano. La secuencia de la región constante se puede seleccionar entre ratón, rata, y hámster. El transgén puede comprender un promotor no de inmunoglobulina que impulsa la expresión de las secuencias de la cadena ligera. El promotor puede ser un promotor transcripcionalmente activo. El promotor puede ser un promotor ROSA26.
- 15
- 20 Se describe una construcción de ácido nucleico, que comprende un brazo de homología en la dirección 5' y un brazo de homología en la dirección 3', en el que el brazo de homología en la dirección 5' comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina, el brazo de homología en la dirección 5' comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de la región variable de la inmunoglobulina humana o de ratón, y dispuesta entre los brazos de homología
- 25 en la dirección 5' y en la dirección 3' hay una secuencia que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 de ratón. La secuencia que codifica el gen ADAM6 de ratón puede estar unida operativamente a un promotor de ratón con el que se une la ADAM 6 de ratón en un ratón silvestre.
- 30 Se describe un vector director, que comprende (a) una secuencia de nucleótidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos del segmento génico de la región variable humana; y, (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón.
- 35 El vector director puede comprender además un promotor unido operativamente a la secuencia que codifica ADAM6 de ratón. El promotor puede ser un promotor ADAM6 de ratón.
- 40 Se describe una construcción de nucleótidos para modificar un locus de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, en el que la construcción comprende al menos un sitio de reconocimiento de la recombinasa específico del emplazamiento y una secuencia que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón.
- 45 Se describen células de ratón y embriones de ratón, incluyendo pero sin limitarse a células ES, células pluripotentes, y células pluripotentes inducidas, que comprenden modificaciones genéticas tal como se describe en el presente documento. Se proporcionan células que son XX y células que son XY. Se proporcionan también células que comprenden un núcleo que contiene una modificación tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, una modificación introducida en una célula mediante una inyección pronuclear. También se proporcionan células, embriones, y ratones que comprenden un gen ADAM6 introducido víricamente, por ejemplo, células, embriones, y ratones que comprenden una construcción de transducción que comprende un gen ADAM6 que es funcional en el
- 50
- 55 Se describe una célula de un ratón genéticamente modificado, en el que la célula carece de un locus de ADAM6 de ratón endógeno funcional, y la célula comprende una secuencia ectópica de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 de ratón o uno de sus fragmentos funcionales. La célula puede comprender además una modificación de una secuencia génica endógena de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina. La modificación de la secuencia génica endógena de la región variable de la cadena pesada puede comprender una delección seleccionada entre una delección de un segmento del gen  $V_H$ , una delección de un segmento del gen  $D_H$  de ratón, una delección de un segmento del gen  $J_H$  de ratón, y una de sus combinaciones. El ratón puede comprender una sustitución de una o más secuencias de  $V_H$ ,  $D_H$ , y/o  $J_H$  con una secuencia de la inmunoglobulina humana. La secuencia de inmunoglobulina humana se puede seleccionar entre una  $V_H$  humana, una  $V_L$  humana, una  $D_H$  humana, una  $J_H$  humana, una  $J_L$  humana, y una de sus combinaciones.
- 60
- La célula puede ser una célula totipotente, una célula pluripotente, o célula pluripotente inducida. La célula puede ser una célula ES de ratón.
- 65 Se describe un linfocito B de ratón, en el que el linfocito B comprende un gen reordenado de la cadena pesada de la inmunoglobulina, en el que el linfocito B comprende, en un cromosoma del linfocito B, una secuencia de ácido

nucleico que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho. El linfocito B de ratón puede comprender dos alelos de la secuencia de ácido nucleico.

5 La secuencia de ácido nucleico puede estar en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un cromosoma del linfocito B) que es contiguo al locus reordenado de la cadena pesada de inmunoglobulina.

La secuencia de ácido nucleico puede estar en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un cromosoma de linfocito B) que es distinto de la molécula de ácido nucleico que comprende el locus reordenado de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón.

10 El linfocito B de ratón puede comprender una secuencia génica reordenada de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón unida de manera operativa a un gen de la región constante de la inmunoglobulina de ratón o humana, en la que el linfocito B comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho.

15 Se describe una célula somática de ratón que comprende un cromosoma que comprende un locus modificado de la cadena pesada de inmunoglobulina, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho. La secuencia de ácido nucleico puede estar en el mismo cromosoma que el locus modificado de la cadena pesada. El ácido nucleico puede estar en un cromosoma diferente que el del locus modificado de la cadena pesada. La célula somática puede comprender una única copia de la secuencia del ácido nucleico. La célula somática puede comprender al menos dos copias de la secuencia del ácido nucleico. La célula somática puede ser un linfocito B. La célula puede ser una célula germinal. La célula puede ser un citoblasto.

25 Se describe una célula germinal de ratón, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una ADAM6 de ratón (o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) en un cromosoma de la célula germinal, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la ADAM6 de ratón (o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional) está en una posición que es diferente de la posición en un cromosoma de una célula germinal de ratón silvestre. La secuencia de ácido nucleico puede estar en un locus de la inmunoglobulina de ratón. La secuencia de ácido nucleico puede estar en el mismo cromosoma de la célula germinal que el del locus de la inmunoglobulina de ratón. La secuencia de ácido nucleico puede estar en un cromosoma diferente que el del locus de la inmunoglobulina de ratón. El locus de la inmunoglobulina de ratón puede comprender una sustitución de al menos una secuencia de la inmunoglobulina de ratón con al menos una secuencia de la inmunoglobulina no de ratón. La al menos una secuencia de inmunoglobulina no de ratón puede ser una secuencia de inmunoglobulina humana.

30 Se describe una célula pluripotente, pluripotente inducida, o totipotente derivada de un ratón que se describe en el presente documento. La célula puede ser un embriocitoblasto (ES) de ratón.

40 Se describe un tejido derivado de un ratón que se describe en el presente documento. El tejido se puede obtener del bazo, los ganglios linfáticos o la médula ósea de un ratón tal como se describe en el presente documento.

Se describe un núcleo derivado de un ratón tal como se describe en el presente documento. El núcleo puede proceder de una célula diploide que no es un linfocito B.

45 Se describe una secuencia de nucleótido que codifica una región variable de inmunoglobulina procedente de un ratón tal como se describe en el presente documento.

50 Se describe una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina o la cadena ligera de inmunoglobulina de un anticuerpo procedente de un ratón tal como se describe en el presente documento.

55 Se describe una secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina o la cadena ligera de inmunoglobulina que codifican una región variable de un anticuerpo procedente de un ratón tal como se describe en el presente documento.

60 Se describe un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv) procedente de un ratón que se describe en el presente documento. Se describe un método para crear un ratón modificado genéticamente, que comprende sustituir uno o más segmentos génicos de la cadena pesada de inmunoglobulina en la dirección 5' (con respecto a la transcripción de los segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina) de un locus endógeno de ADAM6 con uno o más segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, y sustituir uno o más segmentos génicos de la inmunoglobulina en la dirección 3' (con respecto a la transcripción de los segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina) del locus de ADAM6 con uno o más segmentos génicos de la cadena pesada o de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana. Los uno o más segmentos génicos de la inmunoglobulina humana sustituyen uno o más segmentos génicos endógenos de la inmunoglobulina en la dirección 5' de un locus endógeno de ADAM6 del ratón pueden incluir segmentos génicos V. Los segmentos génicos de la inmunoglobulina humana que sustituyen uno o más

- segmentos génicos endógenos de la inmunoglobulina en la dirección 5' de un locus endógeno de ADAM6 del ratón pueden incluir segmentos génicos V y del gen D. Los uno o más segmentos génicos de la inmunoglobulina humana sustituyen uno o más segmentos génicos endógenos de la inmunoglobulina en la dirección 3' de un locus endógeno de ADAM6 del ratón pueden incluir segmentos de los genes J. Los uno o más segmentos génicos de la
- 5 inmunoglobulina humana sustituyen uno o más segmentos génicos endógenos de la inmunoglobulina en la dirección 3' de un locus endógeno de ADAM6 del ratón pueden incluir segmentos de los genes D y del gen J. Los uno o más segmentos génicos de la inmunoglobulina humana sustituyen uno o más segmentos génicos endógenos de la inmunoglobulina en la dirección 3' de un locus endógeno de ADAM6 del ratón pueden incluir segmentos génicos V, D y J.
- 10 Los uno o más segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina en la dirección 5' y/o 3' del gen ADAM6 pueden sustituirse en una célula pluripotente, pluripotente inducida, o totipotente para formar una célula progenitora modificada genéticamente; la célula progenitora modificada genéticamente se introduce en un hospedador; y, el hospedador que comprende la célula progenitora modificada genéticamente se puede gestar para
- 15 formar un ratón que comprende un genoma derivado de la célula progenitora modificada genéticamente. En una realización, el hospedador es un embrión. El hospedador se puede seleccionar entre un ratón premórula (por ejemplo, en un estadio de 8 o 4 células), un embrión tetraploide, un agregado de células embrionarias, o un blastocito.
- 20 En un aspecto, se proporciona un método para crear un ratón modificado genéticamente, que comprende sustituir una secuencia de nucleótidos que comprende un segmento génico de la inmunoglobulina de ratón y una secuencia de nucleótidos ADAM6 de ratón (o un ortólogo u homólogo o su fragmento funcional en un ratón macho) con una secuencia que comprende un segmento génico de la inmunoglobulina humana para formar un primer locus quimérico, insertando a continuación una secuencia que comprende una secuencia que codifica ADAM6 de ratón (o
- 25 una secuencia que codifica un ortólogo u homólogo o su fragmento funcional) en la secuencia que comprende el segmento génico de la inmunoglobulina humana para formar un segundo locus quimérico.
- El segundo locus quimérico comprende un segmento del gen  $V_L$  humano unido operativamente a un segmento del gen  $D_H$  humano y un segmento del gen  $J_H$  humano. En una realización específica adicional, el segundo locus quimérico se une operativamente a un tercer locus quimérico que comprende una secuencia  $C_{H1}$  humana, o una  $C_{H1}$  humana y una secuencia bisagra, fusionada con una secuencia  $C_{H2} + C_{H3}$  de ratón.
- 30 Se describe el uso de un ratón que comprende una secuencia ectópica de nucleótidos que comprende un locus o secuencia ADAM6 de ratón para crear un ratón macho fértil, donde el uso comprende aparear el ratón que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos que comprende el locus o la secuencia ADAM6 de ratón a un ratón que carece de un locus o secuencia endógena funcional de ADAM6 de ratón, y obtener una progenie, esto es, una hembra capaz de producir progenie que tenga el locus o la secuencia ectópica de ADAM6 o que es un macho que comprende el locus o la secuencia ectópica de ADAM6, y el macho presenta una fertilidad que es aproximadamente la misma que la fertilidad presentada por un ratón macho silvestre.
- 40 Se describe el uso de un ratón tal como se describe en el presente documento para preparar una secuencia de nucleótidos de la región variable de la inmunoglobulina.
- Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para preparar un Fab completamente humano o un  $F(ab)_2$  completamente humano.
- 45 Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para preparar una línea celular inmortalizada.
- 50 Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para preparar un hibridoma o cuadroma.
- Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para preparar una biblioteca de fagos que contenga regiones variables de la cadena pesada humana y regiones variables de la cadena ligera humana.
- 55 Se describe el uso de un ratón tal como se describe en el presente documento para generar una secuencia de la región variable para preparar un anticuerpo humano, que comprende (a) inmunizar un ratón que se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar un linfocito del ratón inmunizado de (a), (c) exponer el linfocito a uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar un linfocito que sea capaz de unirse al antígeno de interés, y (e) amplificar una o más secuencias de ácido nucleico de la región variable procedentes del linfocito generando por tanto una secuencia de la región variable.
- 60 El linfocito se puede obtener del bazo del ratón. El linfocito se puede obtener de un ganglio linfático del ratón. El linfocito se puede obtener de la médula ósea del ratón.
- 65 El anticuerpo marcado puede ser un anticuerpo conjugado con fluoróforo. El uno o más anticuerpos conjugados con fluoróforos se pueden seleccionar a partir de una IgM, una IgG, y/o una de sus combinaciones.

El linfocito puede ser un linfocito B.

5 La una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable pueden comprender una secuencia de la región variable de la cadena pesada. La una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable pueden comprender una secuencia de la región variable de la cadena ligera. La secuencia de la región variable de la cadena ligera puede ser una secuencia de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina. La una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable pueden comprender una secuencia de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$ .

10 Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para generar una secuencia de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$ , que comprende (a) inmunizar un ratón que se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar el bazo del ratón inmunizado de (a), (c) exponer los linfocitos B del bazo a uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar un linfocito B de (c) que sea capaz de unirse al antígeno de interés, y (e) amplificar una secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  procedentes del linfocito B generando por tanto las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera  $\kappa$ .

15 Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para generar una secuencia de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$ , que comprende (a) inmunizar un ratón que se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar uno o más ganglios linfáticos del ratón inmunizado de (a), (c) exponer los linfocitos B procedentes del uno o más ganglios linfáticos al uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar un linfocito B de (c) que sea capaz de unirse al antígeno de interés, y (e) amplificar una secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  procedentes del linfocito B generando por tanto las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera  $\kappa$ .

20 Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para generar una secuencia de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$ , que comprende (a) inmunizar un ratón que se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) aislar la médula ósea del ratón inmunizado de (a), (c) exponer los linfocitos B de la médula ósea a uno o más anticuerpos marcados, (d) identificar un linfocito B de (c) que sea capaz de unirse al antígeno de interés, y (e) amplificar una secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  procedentes del linfocito B generando por tanto las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera  $\kappa$ . El uno o más anticuerpos marcados se pueden seleccionar a partir de una IgM, una IgG, y/o una de sus combinaciones.

25 Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para generar una secuencia de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$ . para preparar un anticuerpo humano, que comprende además fusionar las secuencias amplificadas de la región variable de la cadena pesada y ligera, expresar las secuencias fusionadas de la cadena pesada y ligera en una célula, y recuperar las secuencias expresadas de la cadena pesada y ligera generando por tanto un anticuerpo humano.

30 Las regiones constantes de la cadena pesada humana se pueden seleccionar entre IgM, IgD, IgA, IgE e IgG. La IgG se puede seleccionar entre una IgG1, una IgG2, una IgG3 y una IgG4. La región constante de la cadena pesada humana puede comprender una  $C_{H1}$ , una bisagra, una  $C_{H2}$ , una  $C_{H3}$ , una  $C_{H4}$ , o una combinación de las mismas. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante de la inmunoglobulina  $\kappa$ . La célula se puede seleccionar entre una célula HeLa, una célula DU145, una célula Lncap, una célula MCF-7, una célula MDA-MB-438, una célula PC3, una célula T47D, una célula THP-1, una célula U87, una célula SHSY5Y (neuroblastoma humano), una célula Saos-2, una célula Vero, una célula CHO, una célula GH3, una célula PC12, una célula retinal humana (por ejemplo, una célula PER.C6™), y una célula MC3T3. La célula puede ser una célula CHO.

35 Se describe un método para generar un anticuerpo quimérico inverso de roedor-ser humano específico frente a un antígeno de interés, que comprende las etapas de inmunizar un ratón que se describe en el presente documento con el antígeno, aislar al menos una célula del ratón produciendo un anticuerpo quimérico inverso de ratón-ser humano específico contra el antígeno, cultivar al menos una célula produciendo el anticuerpo quimérico inverso de ratón-ser humano específico contra el antígeno, y obtener dicho anticuerpo.

40 El anticuerpo quimérico inverso de ratón-ser humano puede comprender un dominio variable de la cadena pesada humana fusionado con un gen de la región constante de la cadena pesada de ratón o rata, y un dominio de la región variable de la cadena ligera humana fusionado con un gen de la región constante de la cadena ligera de rata o ser humano.

45 El cultivo de al menos una célula produciendo el anticuerpo quimérico inverso de roedor-ser humano específico contra el antígeno se puede realizar en al menos una célula de hibridoma generada a partir de al menos una célula aislada procedente de ratón.

Se describe un método para generar un anticuerpo completamente humano frente a un antígeno de interés, que comprende las etapas de inmunizar un ratón que se describe en el presente documento con el antígeno, aislar al menos una célula del ratón produciendo un anticuerpo quimérico inverso de roedor-ser humano específico contra el antígeno, generar al menos una célula productora de un anticuerpo completamente humano derivada de un anticuerpo quimérico inverso de roedor-ser humano específico contra el antígeno, y cultivar al menos una célula productora del anticuerpo completamente, y obtener el mencionado anticuerpo completamente humano.

La al menos una célula aislada procedente del ratón que produce un anticuerpo quimérico inverso de roedor-ser humano específico contra el antígeno puede ser un esplenocito o un linfocito B.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal.

La inmunización con un antígeno de interés se puede realizar con una proteína, ADN, una combinación de ADN y proteína, o células que expresan el antígeno.

Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para preparar una secuencia de ácido nucleico de la región variable de la inmunoglobulina o uno de sus fragmentos. La secuencia de ácido nucleico se puede usar para preparar un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El ratón se puede usar para preparar una proteína de unión a antígeno seleccionada entre un anticuerpo, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), un scFv, un scFv biespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, una V-NAR, una  $V_{HH}$ , una  $V_L$ , un F(ab), un F(ab)<sub>2</sub>, un DVD (es decir, un dominio variable doble de antígeno-proteína de unión), un SVD (es decir, un dominio variable simple de antígeno-proteína de unión), o emplear un linfocito T biespecífico (BiTE).

Se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para introducir una secuencia ectópica de ADAM6 en un ratón que carece de una secuencia endógena funcional de ADAM6 de ratón, donde el uso comprende aparear un ratón como se describe en el presente documento con el ratón que carece de la secuencia endógena funcional de ADAM6 de ratón.

Se describe el uso de material genético procedente de un ratón como se describe en el presente documento para crear un ratón que tiene una secuencia ectópica de ADAM6. El uso puede comprender la transferencia nuclear utilizando un núcleo de una célula de un ratón como se describe en el presente documento. El uso puede comprender clonar una célula de un ratón como se describe en el presente documento para producir un animal derivado de la célula. El uso puede comprender emplear un esperma o un óvulo de un ratón tal como se describe en el presente documento en un proceso para crear un ratón que comprende la secuencia ectópica de ADAM6.

Se describe un método para crear un ratón macho estéril que comprende un locus modificado de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende fertilizar una primera célula germinal de ratón que comprende una modificación de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina con una segunda célula germinal de ratón que comprende un gen ADAM6 o un ortólogo u homólogo o su fragmento que es funcional en un ratón macho; formar una célula fertilizada; dejar que la célula fertilizada se desarrolle en un embrión; y, gestar el embrión en una madre sustituta para obtener un ratón.

La fertilización se puede conseguir apareando un ratón macho y un ratón hembra. El ratón hembra puede comprender el gen ADAM6 o el homólogo u ortólogo o el fragmento funcional del mismo. El ratón macho puede comprender el gen ADAM6 o el ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo.

Se describe el uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo de la misma o un fragmento funcional de la proteína ADAM6 correspondiente para restaurar o aumentar la fertilidad de un ratón que tiene un genoma que comprende una modificación de un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina, donde la modificación reduce o elimina la función endógena de ADAM6.

La secuencia de ácido nucleico puede estar integrada en el genoma del ratón en una posición ectópica. La secuencia de ácido nucleico puede estar integrada en el genoma del ratón en un locus endógeno de la inmunoglobulina. El locus endógeno de la inmunoglobulina puede ser un locus de la cadena pesada. La secuencia de ácido nucleico puede estar integrada en el genoma del ratón en una posición diferente de la del locus endógeno de la inmunoglobulina.

Se describe el uso del ratón que se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno), o para la fabricación de una secuencia que codifica una secuencia de la región variable de un medicamento (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno), para el tratamiento de una enfermedad o trastorno humano.

**Breve descripción de las figuras**

**La FIG. 1A** muestra una ilustración general, no hecha a escala, de la sustitución genómica directa de aproximadamente tres megabases (Mb) de un locus génico de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón (símbolos cerrados) con aproximadamente una megabase (Mb) del locus génico de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (símbolos abiertos).

**La FIG. 1B** muestra una ilustración general, no hecha a escala, de la sustitución genómica directa de aproximadamente tres megabases (Mb) de un locus génico de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón (símbolos cerrados) con aproximadamente 0,5 megabases (Mb) de la primera, o proximal, de dos repeticiones prácticamente idénticas de un locus génico de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina (símbolos abiertos).

**La FIG. 2A** muestra una ilustración detallada, no hecha a escala, de tres etapas iniciales (A-C) para la sustitución genómica directa de un locus génico de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón que da como resultado la delección de todos los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  y la sustitución con tres segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$ . Se muestra un vector director (3hVH BACvec) para una primera inserción de segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana con un brazo 5' de 67 kb de homología de ratón, un casete de selección (rectángulo abierto), un sitio de recombinación específico de emplazamiento (triángulo abierto), un fragmento genómico humano de 145 kb y un brazo 3' de 8 kb de homología de ratón. Se muestran segmentos génicos de la inmunoglobulina humana (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados), casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específicos de emplazamiento (triángulos abiertos) insertados en los vectores de dirección posteriores.

**La FIG. 2B** muestra una ilustración detallada, no hecha a escala, de seis etapas adicionales (D-I) para la sustitución genómica directa de un locus génico de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón que da como resultado la inserción de 77 segmentos adicionales del gen  $V_H$  humano y la eliminación de un casete final de selección. Se muestra un vector director para la inserción de segmentos adicionales del gen  $V_H$  humano (18hVH BACvec) para la inserción inicial de segmentos génicos de la cadena pesada humana (Alelo híbrido 3hVH-CRE) con un brazo 5' de 20 kb de homología de ratón, un casete de selección (rectángulo abierto), un fragmento genómico humano de 196 kb y un brazo de 62 kb de homología humana que se solapa con el extremo 5' de la inserción inicial de segmentos génicos de la cadena pesada humana que se muestra con un sitio de recombinación específico de emplazamiento (triángulo abierto) localizado 5' en los segmentos génicos humanos. Se muestran segmentos génicos de la inmunoglobulina humana (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados) y casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) insertados en vectores directores posteriores.

**La FIG. 2C** muestra una ilustración detallada, no hecha a escala, de tres etapas iniciales (A-C) para la sustitución genómica directa de un locus génico de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón que da como resultado la delección de todos los segmentos génicos  $V_H$ , y de los segmentos de los genes  $J_k$  (Alelo híbrido  $Ig_k$ -CRE). Se muestran casetes de selección (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específicos de emplazamiento (triángulos abiertos) insertados en los vectores directores.

**La FIG. 2D** muestra una ilustración detallada, no hecha a escala, de cinco etapas adicionales (D-H) para la sustitución genómica directa de un locus génico variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón que da como resultado la inserción de todos los segmentos génicos  $V_k$  y  $J_k$  humanos de la repetición y delección proximales de un casete de selección final (Alelo híbrido 40hVkdHyg). Se muestran segmentos génicos de la inmunoglobulina humana (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados) y casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) insertados en vectores directores posteriores.

**La FIG. 3A** muestra una ilustración general, no hecha a escala, de una estrategia de cribado que incluye las localizaciones de los conjuntos de cebadores/sondas de la PCR cuantitativa (qPCR) para detectar la inserción de las secuencias génicas de la cadena pesada humana y la pérdida de secuencias génicas de la cadena pesada de ratón en embriocitoblastos dirigidos (ES). Se muestra la estrategia de cribado en células y ratones ES para una primera inserción génica de la cadena pesada con conjuntos de cebadores/sondas de la qPCR de la región borrada ("pérdida" de las sondas C y D), la región insertada (sondas G y H "alto") y regiones flanqueantes (sondas de "retención" A, B, E y F) en un cromosoma de ratón no modificado (parte superior) y un cromosoma correctamente dirigido (parte inferior).

**La FIG. 3B** muestra un cálculo representativo del número de copias de sondas observado en células ES progenitoras y modificada durante una primera inserción de segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Se ha calculado el número de copias de sondas observado para las sondas A B como  $2/2\Delta\Delta Ct$ .  $\Delta\Delta Ct$  se ha calculado como  $\text{pro}[\Delta Ct(\text{muestra}) - \text{med}\Delta Ct(\text{control})]$  en el que  $\Delta Ct$  es la diferencia en Ct entre las sondas de ensayo y de referencia (entre las sondas de referencia 4 y 6 dependiendo del ensayo). El término  $\text{med}\Delta Ct(\text{control})$  es el promedio  $\Delta Ct$  de múltiples muestras de ADN (>60) no dirigido procedente de células ES progenitoras. Se evaluó cada clon de células ES por sextuplicado. Para calcular el número de copias de las sondas G y H de  $IgH$  en células ES progenitoras, se supuso que estas sondas tenían un número de copias de 1 en células ES modificadas y una Ct máxima de 35 y se usaron incluso sin que se observara amplificación.

**La FIG. 3C** muestra un cálculo representativo del número de copias para cuatro ratones de cada genotipo calculado utilizando solo las sondas D y H. Ratones silvestres: Ratones WT; ratones heterocigóticos para una primera inserción de segmentos génicos de la inmunoglobulina humana: Ratones HET; Ratones

heterocigóticos para una primera inserción de segmentos génicos de la inmunoglobulina humana: Ratones Homo.

**La FIG. 4A** muestra una ilustración detallada, no hecha a escala, de las tres etapas empleadas para la construcción de 3hV<sub>H</sub>BACvec mediante recombinación bacteriana homóloga (BHR). Se muestran segmentos génicos de la inmunoglobulina humana (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados), casetes de selección (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específicos de emplazamiento (triángulos abiertos) insertados en los vectores directores.

**La FIG. 4B** muestra la electroforesis en gel en un campo de pulsos (PFGE) de tres BAC los clones (B1, B2 y B3) tras la digestión de NotI. Los marcadores M1, M2 y M3 son de gama baja, marcadores lambda y PFG en escalera de gama media, respectivamente (New England BioLabs, Ipswich, MA).

**La FIG. 5A** muestra una ilustración esquemática, no hecha a escala, de las modificaciones secuenciales de un locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón con cantidades crecientes de segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. Se crearon ratones homocigóticos de cada una de las tres etapas diferentes de humanización de la cadena pesada. Los símbolos abiertos indican una secuencia humana; los símbolos cerrados indican una secuencia de ratón.

**La FIG. 5B** muestra una ilustración esquemática, no hecha a escala, de las modificaciones secuenciales de un locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina  $\kappa$  de ratón con cantidades crecientes de segmentos génicos de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana. Se crearon ratones homocigóticos de cada una de las tres etapas diferentes de humanización de la cadena ligera  $\kappa$ . Los símbolos abiertos indican una secuencia humana; los símbolos cerrados indican una secuencia de ratón.

**La FIG. 6** muestra las gráficas de puntos FACS de poblaciones de linfocitos B en ratones silvestres y VELOCIMMUNE® humanizados. Células de bazo (hilera superior, tercera hilera de la parte superior e hilera de la parte inferior) o ganglio linfático inguinal (segunda hilera de la parte superior) de ratones silvestres (wt), VELOCIMMUNE® 1 (V1), VELOCIMMUNE® 2 (V2) o VELOCIMMUNE® 3 (V3) se tiñeron para la IgM superficial que expresaba linfocitos B (hilera superior, y una segunda hilera en la parte superior), inmunoglobulina superficial que contiene tanto cadenas ligeras  $\kappa$  como cadenas ligeras A (tercera hilera de la parte superior) o IgM superficial de haplotipos específicos (hilera inferior), y poblaciones separadas mediante FACS.

**La FIG. 7A** muestra las secuencias CDR3 representativas de la cadena pesada de anticuerpos VELOCIMMUNE® seleccionados aleatoriamente alrededor de la unión V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> (CDR3), demostrando la diversidad de la unión y las adiciones de nucleótidos. Las secuencias CDR3 de la cadena pesada se agrupan de acuerdo con la utilización del segmento de gen O<sub>H</sub>, la línea germinal del cual se proporciona encima de cada grupo en negrita. Se señalan segmentos génicos V<sub>H</sub> de cada secuencia CDR3 de la cadena pesada en paréntesis en el extremo 5' de cada secuencia (por ejemplo, 3-72 es 3-72 de V<sub>H</sub> humana). Se señalan segmentos de gen J<sub>H</sub> de cada CDR3 de la cadena pesada en paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (por ejemplo, 3 es 3 de J<sub>H</sub> humana). Se muestran las SEC ID N<sup>os</sup> de cada secuencia como sigue procediendo desde la parte superior a la parte inferior: SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39.

**La FIG. 7B** muestra las secuencias CDR3 representativas de la cadena ligera de anticuerpos VELOCIMMUNE® seleccionados aleatoriamente alrededor de la unión V<sub>k</sub>-J<sub>k</sub> (CDR3), demostrando la diversidad de la unión y las adiciones de nucleótidos. Se señalan segmentos génicos V<sub>k</sub> de cada secuencia CDR3 de la cadena ligera en paréntesis en el extremo 5' de cada secuencia (por ejemplo, 1-6 es 1-6 de V<sub>k</sub> humana). Se señalan segmentos de gen J<sub>k</sub> de cada CDR3 de la cadena ligera en paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (por ejemplo, 1 es 1 de J<sub>k</sub> humana). Se muestran las SEC ID N<sup>os</sup> de cada secuencia como sigue procediendo desde la parte superior a la parte inferior: SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 53; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58.

**La FIG. 8** muestra frecuencias somáticas de hipermutación de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos VELOCIMMUNE® puntuadas (tras alineación para emparejar secuencias de líneas germinales) como porcentaje de secuencias cambiadas en cada nucleótido (NT; columna izquierda) o posición de aminoácido (AA; columna derecha) entre conjuntos de 38 (IgM no inmunizada), 28 (IgG inmunizada), 32 (Igk no inmunizada procedente de IgG), 36 (IgG inmunizada) o 36 secuencias (Igk inmunizada procedente de IgG). Las barras sombreadas indican las localizaciones de CDRs.

**La FIG. 9A** muestra los niveles de inmunoglobulina sérica de los isotipos en ratones silvestres (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

**La FIG. 9B** muestra los niveles de inmunoglobulina sérica del isotipo IgA en ratones silvestres (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

**La FIG. 9C** muestra los niveles de inmunoglobulina sérica del isotipo IgE en ratones silvestres (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

**La FIG. 10A** muestra los títulos de IgG específicos de antígeno frente al receptor de la interleuquina 6 (IL-6R) del suero de siete ratones VELOCIMMUNE® (VI) y cinco ratones silvestres (WT) tras dos (exudado 1) o tres (exudado 2) ciclos de inmunización con el ectodominio de IL-6R.

**La FIG. 10B** muestra los títulos de IgG específica de isotipo dirigida contra IL-6R-específica de siete ratones

VELOCIMMUNE® (VI) y cinco ratones silvestres (WT).

La **FIG. 11A** muestra la distribución de afinidad de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de la interleuquina 6 generados en ratones VELOCIMMUNE®.

La **FIG. 11B** muestra el bloqueo específico de antígeno de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de la interleuquina 6 generados en ratones VELOCIMMUNE® (VI) y silvestres (WT).

La **FIG. 12** muestra una ilustración esquemática, no hecha a escala, de los genes ADAM6a y ADAM6b en un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. Se muestra un vector directo (mADAM6) utilizado para la inserción de ADAM6a y ADAM6b de ratón en un locus endógeno de la cadena pesada humanizada con un casete de selección (HYG: higromicina) flanqueado por sitios de recombinación específicos de emplazamiento (Frt) que incluyen sitios de restricción diseñados mediante ingeniería genética en los extremos 5' y 3'.

La **FIG. 13** muestra una ilustración esquemática, no hecha a escala, de un pseudogén A0AM6 humano (hADAM6 $\Psi$ ) localizado entre los segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada humana 1-2 (V<sub>H</sub>1-2) y 6-1 (V<sub>H</sub>6-1). Se muestra un vector director para la recombinación homóloga bacteriana (Vector director hADAM6 $\Psi$ ) para borrar un pseudogén ADAM6 humano e insertar sitios de restricción únicos en un locus de la cadena pesada humana con un casete de selección (NEO: neomicina) flanqueado por sitios de recombinación específicos de emplazamiento (loxP) que incluyen sitios de restricción generados en los extremos 5' y 3'. Se muestra una ilustración, no hecha a escala, del locus dirigido de la cadena pesada humanizada resultante que contiene un fragmento genómico que codifica los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón que incluyen un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación específicos del emplazamiento.

La **FIG. 14A** muestra las gráficas de contorno de FACS de los linfocitos clasificados en singletes para establecer la expresión superficial de IgM y B220 en la médula ósea de ratones homocigóticos para investigar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) y ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento ectópico genómico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>). Se señala el porcentaje de linfocitos B inmaduros (B220<sup>int</sup>IgM<sup>+</sup>) y maduros (B220<sup>high</sup>IgM<sup>+</sup>) en cada gráfica de contorno.

La **FIG. 14B** muestra el número total de linfocitos B inmaduros (B220<sup>int</sup>IgM<sup>+</sup>) y maduros (B220<sup>alt</sup>IgM<sup>+</sup>) en la médula ósea aislada de fémures de ratones homocigóticos para investigar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>).

La **FIG. 15A** muestra las gráficas de contorno de FACS de los linfocitos B clasificados CD19<sup>+</sup> para establecer la expresión superficial del kit c y de CD43 en la médula ósea de ratones homocigóticos para investigar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>). Se señala el porcentaje de células pro-B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup>) y pre-B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>ckit<sup>-</sup>) en los cuadrantes de la parte superior derecha y de la parte inferior izquierda, respectivamente, de cada gráfica de contorno.

La **FIG. 15B** muestra el número total de prolinfocitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup>) y prelinfocitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>ckit<sup>-</sup>) en la médula ósea aislada de fémures de ratones homocigóticos para investigar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) y de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>).

La **FIG. 16A** muestra las gráficas de contorno de FACS de los linfocitos clasificados en singletes para establecer la expresión superficial de CD19 y CD43 en la médula ósea de ratones homocigóticos para investigar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) y ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento ectópico genómico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>). Se señala el porcentaje de linfocitos B inmaduros (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>), prelinfocitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>int</sup>) y prolinfocitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) en cada gráfica de contorno.

La **FIG. 16B** muestra histogramas de linfocitos B inmaduros (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>) y de prelinfocitos B (CD19<sup>+</sup>CD43<sup>int</sup>) en la médula ósea de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) y de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>).

La **FIG. 17A** muestra las gráficas de contorno de FACS de los linfocitos clasificados en singletes para la expresión superficial de CD19 y CD3 para investigar ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) y ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6

de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ). Se señala el porcentaje de linfocitos B ( $CD19^+CD3^-$ ) y linfocitos T ( $CD19^+CD3^+$ ) en cada gráfica de contorno.

**La FIG. 17B** muestra las gráficas de contorno de FACS de los linfocitos B clasificados  $CD19^+$  para investigar la expresión superficial de la cadena ligera de  $Ig\lambda$  e  $Ig\kappa$  en el bazo de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ). Se señala el porcentaje de linfocitos B en  $Ig\lambda^+$  (cuadrante superior izquierdo) e  $Ig\kappa^+$  (cuadrante inferior derecho) en cada gráfica de contorno.

**La FIG. 17C** muestra el número total de linfocitos B  $CD19^+$  en el bazo de ratones homocigóticos para investigar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ).

**La FIG. 18A** muestra las gráficas de contorno de FACS de los linfocitos B clasificados  $CD19^+$  para establecer la expresión superficial de  $IgD$  y de  $IgM$  en el bazo de ratones homocigóticos para investigar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ). Se señala el porcentaje de linfocitos B maduros ( $CD19^+IgD^{high}IgM^{int}$ ) para cada gráfica de contorno. La flecha de la gráfica de contorno de la derecha ilustra el proceso de maduración de los linfocitos B con relación a la expresión superficial de  $IgM$  e  $IgD$ .

**La FIG. 18B** muestra el número total de linfocitos B en el bazo de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ) durante la maduración de  $CD19^+IgM^{alto}IgD^{int}$  a  $CD19^+IgM^{int}IgD^{alto}$ .

**La FIG. 19** muestra el título del anticuerpo para la primera y segunda exudaciones procedentes de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ;  $n=5$ ) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica genes ADAM6 de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ;  $n=5$ ) que se han inmunizado con un receptor superficial celular humano (Antígeno A).

**La FIG. 20** muestra el título del anticuerpo para la primera y segunda exudaciones procedentes de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ;  $n=5$ ) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica genes ADAM6 de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ;  $n=10$ ) que se han inmunizado con un anticuerpo humano específico del receptor de la proteína tirosina quinasa humano (Antígeno B).

**La FIG. 21** muestra el título del anticuerpo para la primera y segunda exudaciones procedentes de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ;  $n=12$ ) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica genes ADAM6 de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ;  $n=12$ ) que se han inmunizado con una proteína humana secretada que funciona en la regulación de la ruta de señalización de TGF- $\beta$  (Antígeno C).

**La FIG. 22** muestra el título del anticuerpo para la primera y segunda exudaciones procedentes de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la cadena pesada humana y de la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica genes ADAM6 de ratón ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ;  $n=12$ ) que se han inmunizado con un receptor de la tirosina quinasa humano (Antígeno D).

### Descripción detallada de la invención

Esta invención no está limitada a los métodos concretos, y a las condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. Debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene solamente el fin de describir solamente realizaciones concretas, y no se pretende que sea limitante, debido a que el alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Salvo que se indique de otra manera, todos los términos y frases utilizados en el presente documento incluyen los significados que los términos y frases han alcanzado en la técnica, a no ser que se indique claramente lo contrario o que se evidencie claramente a partir del contexto en el que se usa el término o frase. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales concretos.

La frase "sustancial" o "sustancialmente", cuando se usa para referirse a una cantidad de segmentos génicos (por ejemplo, "sustancialmente todos" los segmentos génicos V) incluye segmentos génicos funcionales y no funcionales e incluye, en algunas realizaciones, por ejemplo, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de todos los segmentos génicos; en algunas realizaciones, "sustancialmente todos" los segmentos génicos incluye, por ejemplo, al menos del 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de los segmentos génicos funcionales (es decir, sin pseudogenes).

El término "sustitución" incluye dónde se coloca una secuencia de ADN en un genoma de una célula de tal manera que sustituye una secuencia en el genoma con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia humana en un ratón), en el locus de la secuencia genómica. La secuencia de ADN colocada de esta manera puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de la fuente de ADN utilizada para obtener la secuencia colocada de esta manera (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, secuencias de señalización de la recombinación adecuadas, etc.). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución de una secuencia endógena por una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico procedente de la secuencia de ADN colocada de esta manera (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; la sustitución es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de ADN que codifica una proteína que tiene una función similar que una proteína codificada por la secuencia genómica endógena (por ejemplo, la secuencia genómica endógena codifica un gen o dominio de la inmunoglobulina, y el fragmento de ADN codifica uno o más genes o dominios de la inmunoglobulina humana). En varias realizaciones, un gen endógeno o un fragmento del mismo se sustituyen con un gen humano o un fragmento del mismo correspondiente. Un gen humano o fragmento del mismo correspondiente es un gen o fragmento humano que es un ortólogo de, un homólogo de, o es sustancialmente idéntico o igual en estructura y/o función, que el gen endógeno o fragmento del mismo que se sustituye.

El ratón como modelo genético se ha potenciado mucho mediante tecnologías transgénicas y de inactivación genética, que han permitido el estudio de los efectos de la expresión en exceso o delección dirigidas de los genes específicos. A pesar de todas sus desventajas, el ratón presenta todavía obstáculos genéticos que los vuelven un modelo imperfecto para las enfermedades humanas y una plataforma imperfecta para ensayar agentes de tratamiento para seres humanos o fabricarlos. En primer lugar, aunque aproximadamente el 99 % de los genes humanos tienen un homólogo en ratón (*Waterston et al.* 2002, Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature* 420:520-562), los agentes de tratamiento fracasan a menudo porque reaccionan en cruzado, o reaccionan en cruzado de forma inadecuada, con ortólogos de ratón de las dianas humanas previstas. Para obviar este problema, los genes diana usados puede ser "humanizados", esto es, el gen de ratón se puede eliminar y sustituir por la correspondiente secuencia génica ortóloga humana (por ejemplo, documentos US 6.586.251, US 6.596.541 y US 7.105.348). Inicialmente, se han llevado a cabo esfuerzos para humanizar genes mediante una estrategia de "desactivación génica más humanización transgénica" que conlleva cruzar un ratón que transporta una delección (es decir, una inactivación genética) del gen endógeno con un ratón que transporta un transgén humano integrado aleatoriamente (véase, por ejemplo, *Bril et al.*, 2006, Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution, *Thromb Haemost* 95:341-347; *Homanics et al.*, 2006, Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease, *BMC Med Genet* 7:33; *Jamsai et al.*, 2006, A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/beta-thalassemia, *Genomics* 88(3):309-15; *Pan et al.*, 2006, Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gammadelta-deficient mice, *Mol Immunol* 43:1741-1750). Pero aquellos esfuerzos estuvieron obstaculizados debido a limitaciones de tamaño; las tecnologías de inactivación genética convencionales no han sido suficientes para sustituir directamente genes de ratón grandes con sus homólogos genómicos humanos grandes. Se ha intentado raramente una solución sencilla de sustitución homóloga directa en la que el gen endógeno de ratón se sustituye directamente por el gen homólogo humano en la misma localización precisa del gen de ratón (es decir, en el locus endógeno de ratón) debido a las dificultades técnicas. Hasta ahora, los esfuerzos en la sustitución directa han implicado procesos elaborados y laboriosos, limitando de esta manera la longitud del material genético que podría manipularse y la precisión con la cual se podría manipular.

Los transgenes de la inmunoglobulina humana introducidos exógenamente se reordenan en linfocitos B precursores en ratones (*Alt et al.*, 1985, Immunoglobulin genes in transgenic mice, *Trends Genet* 1:231-236). Este hallazgo se ha explicado mediante ratones diseñados con ingeniería genética usando la solución transgénica más la inactivación genética para expresar anticuerpos humanos (*Green et al.*, 1994, Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs, *Nat Genet* 7:13-21; *Lonberg y col.*, 1994, Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications, *Nature* 368:856-859; *Jakovovits et al.*, 2007, From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice, *Nat Biotechnol* 25:1134-1143). Se han inactivado en estos ratones los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera  $\kappa$  mediante delección dirigida de porciones críticas pero pequeñas de cada locus endógeno, seguido por la introducción de loci de genes de la inmunoglobulina humana que integran aleatoriamente transgenes grandes, como se ha descrito anteriormente, o minicromosomas (*Tomizuka et al.*, 2000, Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies, *PNAS USA* 97:722-727). Dichos ratones han representado un importante avance en la ingeniería genética; se han aislado anticuerpos monoclonales completamente humanos a partir de ellos dando como

resultado potenciales y prometedores agentes de tratamiento para tratar varias enfermedades humanas (Gibson *et al.*, 2006, Resultados del ensayo en fase III aleatorizado de panitumumab, un anticuerpo monoclonal completamente humano dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico, cáncer colorrectal metastásico, Clin Colorectal Cancer 6:29-31; Jakobovits *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007, Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two Phase II studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma, Blood 109(11):4655-62; Lonberg, 2005, Human antibodies from transgenic animals, Nat Biotechnol 23:1117-1125; Maker *et al.*, 2005, Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study, Ann Surg Oncol 12:1005-1016; McClung *et al.*, 2006, Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density, New Engl J Med 354:821-831). Pero, tal como se ha descrito anteriormente, estos ratones presentan desarrollo de linfocitos B comprometidos y deficiencias inmunes cuando se comparan con ratones silvestres. Dichos problemas limitan potencialmente la capacidad de los ratones de soportar una intensa respuesta humoral y, en consecuencia, generar anticuerpos completamente humanos contra algunos antígenos. Las deficiencias pueden ser debidas a: (1) una funcionalidad ineficaz debida a la introducción aleatoria de los transgenes de la inmunoglobulina humana y la expresión incorrecta resultante debido a la carencia de elementos de control anteriores y posteriores (Garrett *et al.*, 2005, Chromatin architecture near a potential 3' end of the IgH locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites, Mol Cell Biol 25:1511-1525; Manis *et al.*, 2003, Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region, Mol Immunol 39:753-760; Pawlitzky *et al.*, 2006, Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse IgH locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, y E2A, J Immunol 176:6839-6851); (2) ineficientes interspecies interacciones entre dominios constantes humanos y componentes de la B-cel receptor signaling complex on the cell surface, which may impair signaling processes required for normal maturation, proliferation, and survival of B cells (Hombach *et al.*, 1990, Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class, Nature 343:760-762); y (3) ineficientes interspecies interacciones entre dominios solubles humanos y receptores Fc que podrían reducir la selección (Rao *et al.*, 2002, Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB on germinal center cells: implications for selection of high affinity B cells, J Immunol 169:1859-1868) and inmunoglobulin serum concentrations (Brambell *et al.*, 1964, A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism, Nature 203:1352-1354; Junghans y Anderson, 1996, The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor, PNAS USA 93:5512-5516; Rao *et al.*, 2002; Hjelm *et al.*, 2006, Antibody-mediated regulation of the immune response, Scand J Immunol 64:177-184; Nimmerjahn y Ravetch, 2007, Fc-receptors as regulators of immunity, Adv Immunol 96:179-204). Estas deficiencias se pueden corregir mediante humanización *in situ* solo de las regiones variables de los loci de la inmunoglobulina de ratón en sus localizaciones naturales en los loci endógenos de la cadena pesada y la cadena ligera. Esto daría un resultado eficaz en ratones que producen "quimeras inversas (es decir, V humano:C ratón) que serían capaces de interacciones y selección normales con el entorno del ratón basadas en la retención de las regiones constantes de ratón. Además, dichos anticuerpos quiméricos inversos pueden reformarse fácilmente en anticuerpos completamente humanos a fines terapéuticos.

Pueden crearse animales genéticamente modificados que comprenden una sustitución en el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina con secuencias heterólogas de inmunoglobulina (por ejemplo, de otras especies) junto con sustituciones en los loci endógenos de la cadena ligera de inmunoglobulina o junto con transgenes de la cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, transgenes quiméricos de la cadena ligera de inmunoglobulina o completamente humanos o completamente de ratón, etc.). Las especies a partir de las cuales se derivan secuencias heterólogas de la cadena pesada de la inmunoglobulina pueden variar ampliamente; como con las secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina empleadas en las sustituciones de secuencias de la cadena ligera de la inmunoglobulina o los transgenes de la cadena ligera de la inmunoglobulina.

Las secuencias de ácido nucleico de la región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, los segmentos V, D y/o J, se obtienen de un ser humano.

Se describe un ratón que comprende una sustitución de segmentos de V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, y J<sub>H</sub> en un locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina con uno o más segmentos de V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, y J<sub>H</sub>, donde el uno o más segmentos de V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub>, y J<sub>H</sub> se unen operativamente a un gen endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina; en el que el ratón comprende un transgén en un locus diferente que un locus endógeno de la inmunoglobulina, donde el transgén comprende un segmento de V<sub>L</sub> humano y de J<sub>L</sub> humano no reordenado o reordenado unido operativamente a una región constante de ratón o rata o ser humano.

Se describe un método para una sustitución genética grande *in situ* de los loci génicos de la región variable de la inmunoglobulina de la línea germinal de ratón manteniendo a la vez la capacidad de los ratones de generar progenie. Específicamente, se describe la sustitución exacta de seis megabases de los loci génicos de la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera k de inmunoglobulina con sus homólogos humanos dejando intactas las regiones constantes de ratón. Como resultado, se han creado ratones que tienen una sustitución precisa del repertorio de la región variable de la inmunoglobulina de su línea germinal con secuencias equivalentes de la región variable de la inmunoglobulina de la línea germinal humana, manteniendo a la vez las regiones constantes de ratón. Las regiones variables humanas se unen a regiones constantes de ratón para formar loci quiméricos de inmunoglobulina humana-de ratón que se reordenan y expresan a niveles fisiológicamente adecuados. Los

anticuerpos expresados son "quimeras inversas", es decir, comprenden secuencias de la región variable humana y secuencias de la región constante de ratón. Estos ratones que tienen regiones variables de la inmunoglobulina inmunizada que expresan anticuerpos que tienen regiones variables humanas y regiones constantes de ratón se denominan ratones VELOCIMMUNE®.

5 Los ratones VELOCIMMUNE® humanizados presentan un sistema inmune humoral completamente funcional que es esencialmente indistinguible del de los ratones silvestres. Presentan poblaciones de células normales en todas las etapas de desarrollo de los linfocitos B. Presentan una morfología normal de los órganos linfáticos. Las secuencias de anticuerpos de los ratones VELOCIMMUNE® presentan una reordenación V(D)J normal y frecuencias somáticas de hipermutación normales. Las poblaciones de anticuerpos en estos ratones reflejan distribuciones isotópicas que son el resultado de cambios de clase normales (por ejemplo, cambios *cis* isotópicos normales). Los ratones VELOCIMMUNE® inmunizantes dan como resultados sólidas inmunorrespuestas humorales que generan grandes repertorios de anticuerpos diversos que tienen dominios variables de la inmunoglobulina humana adecuados para el uso como candidatos terapéuticos. Esta plataforma proporciona una abundante fuente de secuencias de la región variable de la inmunoglobulina humana maduradas por afinidad naturalmente para preparar anticuerpos farmacéuticamente aceptables y otras proteínas de unión a antígeno.

Es la sustitución precisa de secuencias de la región variable de la inmunoglobulina de ratón con secuencias de la región variable de la inmunoglobulina humana lo que permite crear ratones VELOCIMMUNE®. Además, incluso una sustitución precisa de secuencias endógenas de la inmunoglobulina humana en los loci de la cadena pesada y la cadena ligera con las secuencias equivalentes de la inmunoglobulina humana mediante ingeniería recombinógena secuencial de tramos muy grandes de secuencias de la inmunoglobulina humana, puede presentar determinados estímulos debido a la evolución divergente de los loci de la inmunoglobulina entre el ratón y el hombre. Por ejemplo, las secuencias intergénicas intercaladas en los loci de la inmunoglobulina no son idénticas entre ratones y seres humanos y, en algunas circunstancias, pueden no ser funcionalmente equivalentes. Las diferencias entre ratones y seres humanos en sus loci de inmunoglobulina pueden dar como resultado además anomalía en ratones humanizados, particularmente cuando se humanizan o manipulan determinadas porciones de loci endógenos de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. Algunas modificaciones en los loci de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón son perjudiciales. Las modificaciones perjudiciales pueden incluir, por ejemplo, la pérdida de la capacidad de los ratones modificados de aparearse y dar lugar a progenie.

Se ha llevado a cabo una sustitución precisa, a gran escala, *in situ* de seis megabases de las regiones variables de los loci de inmunoglobulina de la cadena pesada y la cadena ligera del ratón ( $V_H$ - $D_H$ - $J_H$  and  $V_K$ - $J_K$ ) con las megabases 1,4 correspondientes de las secuencias genómicas humanas, manteniendo a la vez las secuencias flanqueantes de ratón intactas y funcionales en los loci híbridos, incluyendo todos los genes de la cadena constante de ratón y las regiones locus de control de la transcripción (FIG. 1A y FIG. 1B). Específicamente, se han introducido las secuencias de genes  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$ ,  $V_K$  y  $J_K$  mediante una inserción por etapas de 13 vectores directores BAC quiméricos que contienen fragmentos solapantes de los loci de la región variable de la línea germinal humana en las células ES de ratón utilizando la tecnología de genomaniplación VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, Patente de los 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, *Nat Biotechnol* 21:652-659).

La humanización de los genes de la inmunoglobulina de ratón representa la mayor modificación genética hasta la fecha en el genoma de ratón. Aunque los esfuerzos anteriores con transgenes de la inmunoglobulina humana integrados aleatoriamente han tenido cierto éxito (se ha discutido anteriormente), la sustitución directa de los genes de la inmunoglobulina de ratón con sus homólogos humanos aumenta drásticamente la eficacia con la cual se pueden generar eficazmente anticuerpos completamente humanos generados en ratones por otra parte normales. Además, dichos ratones presentan una diversidad drásticamente aumentada de anticuerpos completamente humanos que se pueden obtener tras inmunización con virtualmente cualquier antígeno, en comparación con ratones que contienen loci endógenos deshabilitados y transgenes de anticuerpos completamente humanos. Múltiples versiones de loci humanizados sustituidos presentan niveles completamente normales de linfocitos B maduros e inmaduros, en contraste con ratones que tienen transgenes humanos integrados aleatoriamente, que presentan poblaciones de linfocitos B significativamente reducidas es diversas etapas de la diferenciación. Aunque los esfuerzos para aumentar el número de segmentos génicos humanos en ratones transgénicos humanos han reducido dichos defectos, los repertorios ampliados de la inmunoglobulina no han corregido en conjunto las reducciones en las poblaciones de linfocitos B en comparación con ratones silvestres.

A pesar de la proximidad de la función inmune humoral silvestre observada en ratones con loci de inmunoglobulina sustituidos (es decir, ratones VELOCIMMUNE®), se han encontrado otros estímulos cuando se emplea una sustitución directa de la inmunoglobulina que no se han encontrado en algunas soluciones que emplean transgenes aleatoriamente integrados. Las diferencias en la composición genética de los loci de inmunoglobulina entre ratones y seres humanos han conducido al descubrimiento de secuencias beneficiosas para la propagación de ratones con segmentos génicos de inmunoglobulina sustituidos. Específicamente, los genes ADAM de ratón localizados en los locus endógenos de la inmunoglobulina están óptimamente presentes en ratones con los loci de inmunoglobulina sustituidos, debido a su papel en la fertilidad.

### Localización y función genómica de ADAM6 de ratón

- Ratones macho que carecen de la capacidad de expresar cualquier proteína ADAM6 funcional presentan sorprendentemente un defecto en la capacidad de los ratones de aparearse y generar progenie. Los ratones carecen de la capacidad de expresar una proteína ADAM6 funcional en virtud de una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos de la región variable de la inmunoglobulina de ratón con los segmentos génicos de la región variable humana. La pérdida de la función de ADAM6 tiene lugar debido a que el locus de ADAM6 está localizado en una región del locus endógeno génico de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, próximo al extremo 3' del locus del segmento del gen V<sub>H</sub> que se encuentra en la dirección 5' de los segmentos del gen DH. Para criar ratones que sean homocigóticos para una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de ratón con segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada humana, es generalmente una solución laboriosa desarrollar machos y hembras que sean cada uno homocigóticos para la sustitución y esperar un apareamiento productivo. Las camadas satisfactorias tienen una frecuencia y tamaño bajos. En su lugar, se han empleado machos heterocigóticos para aparearse con hembras homocigóticas para la sustitución para generar progenie que sea heterocigótica para la sustitución, criando a un ratón homocigótico a partir de la anterior. Los inventores han determinado que la causa probable de la pérdida de fertilidad en los ratones macho es la ausencia en ratones macho homocigóticos de una proteína ADAM6 funcional.
- En diversos aspectos, los ratones macho que comprenden un gen ADAM6 dañado (es decir, no funcional o marginalmente funcional) presentan una reducción o eliminación de la fertilidad. Debido a que en ratones (y en otros roedores) el gen ADAM6 está localizado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina, los inventores han determinado que a fin de propagar ratones, o crear y mantener una cepa de ratones que comprenda un locus sustituido de la cadena de la inmunoglobulina, se empleen algunos esquemas de reproducción o propagación modificados. La fertilidad baja, o infertilidad, de ratones macho homocigóticos para una sustitución del locus génico endógeno de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina convierte el mantenimiento de dicha modificación en un ratón en algo difícil. El mantenimiento de la cepa puede comprender evitar los problemas de infertilidad presentados por ratones macho homocigóticos para la sustitución.
- Se describe un método para mantener una cepa de ratón que se describe en el presente documento. La cepa de ratón no necesita comprender una secuencia de ADAM6 ectópica, y en algunas realizaciones, la cepa de ratón es homocigótica o heterocigótica para una inactivación genética (por ejemplo, una inactivación genética funcional) de ADAM6.
- La cepa de ratón puede comprender una modificación de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina que da como resultado una reducción o pérdida de fertilidad en un macho de ratón. La modificación puede comprender una delección de una región reguladora y/o una región de codificación de un gen ADAM6. La modificación puede comprender una modificación de un gen ADAM6 endógeno (región reguladora y/o de codificación) que reduce o elimina la fertilidad de un macho de ratón que comprende la modificación; la modificación puede reducir o eliminar la fertilidad de un macho de ratón que es homocigótico para la modificación.
- La cepa de ratón puede ser homocigótica o heterocigótica para una inactivación genética (por ejemplo, una inactivación genética funcional) o una delección de un gen ADAM6.
- La cepa de ratón puede mantenerse aislándola de un ratón que es homocigótico o heterocigótico para la modificación de una célula, y empleando la célula donante en el embrión hospedador, y gestando el embrión hospedador y la célula donante en una madre sustituta, y obtener a partir de la madre sustituta una progenie que comprenda la modificación genética. En una realización, la célula es una célula ES. La célula donante puede ser una célula pluripotente, por ejemplo, una célula pluripotente inducida.
- La cepa de ratón puede mantenerse aislándola de un ratón que es homocigótico o heterocigótico para la modificación de una secuencia de ácido nucleico que comprende la modificación, e introduciendo la secuencia de ácido nucleico en un núcleo hospedador, y gestando una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico y el núcleo hospedador en un animal adecuado. La secuencia de ácido nucleico puede introducirse en un embrión de oocito hospedador.
- La cepa de ratón puede mantenerse aislándola de un ratón que es homocigótico o heterocigótico para la modificación de un núcleo, e introduciendo el núcleo en una célula hospedadora, y gestando el núcleo y la célula hospedadora en un animal adecuado para obtener una progenie que es homocigótica o heterocigótica para la modificación.
- La cepa de ratón puede mantenerse empleando la fertilización *in vitro* (IVF) de un ratón hembra (silvestre, homocigótico para la modificación, o heterocigótico para la modificación) empleando el esperma de un macho de ratón que comprende la modificación genética. El macho de ratón puede ser heterocigótico para la modificación genética. El macho de ratón puede ser homocigótico para la modificación genética.

La cepa de ratón puede mantenerse criando un macho de ratón que es heterocigótico para la modificación genética con un ratón hembra para obtener una progenie que comprende la modificación genética, identificar una progenie de machos y hembras que comprenda la modificación genética, y emplear un macho que es heterocigótico para la modificación genética en la reproducción con una hembra silvestre, homocigótica, o heterocigótica para la modificación genética para obtener una progenie que comprenda la modificación genética. Se puede repetir la etapa de cría de un macho heterocigótico para la modificación genética con una hembra silvestre, una hembra heterocigótica para la modificación genética, o una hembra homocigótica para la modificación genética a fin de mantener la modificación genética en la cepa de ratón.

Se describe un método que se proporciona para mantener una cepa de ratón que comprende una sustitución de un locus génico endógeno de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina con una o más secuencias de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, que comprende criar la cepa de ratones a fin de generar ratones macho heterocigóticos, donde los ratones macho heterocigóticos se crían para mantener la modificación genética en la cepa. La cepa no necesita mantenerse mediante cualquier cría de un macho homocigótico con una hembra silvestre, o una hembra homocigótica o heterocigótica para la modificación genética.

La proteína ADAM6 es un miembro de la familia ADAM de proteínas, en el que ADAM es un acrónimo de una de una desintegrina A y metaloproteasa. La familia ADAM de proteínas es grande y diversa, con funciones diversas que incluyen la adhesión celular. Algunos miembros de la familia ADAM están implicados en la espermatogénesis y la fertilización. Por ejemplo, ADAM2 codifica una subunidad de la proteína fertilina, que está implicada en las interacciones esperma-huevo. ADAM3, o ciristetina, parece ser necesaria para la unión del esperma a la zona pelúcida. La ausencia tanto de ADAM2 como de ADAM3 da como resultado infertilidad. Se ha postulado que ADAM2, ADAM3, y ADAM6 forman un complejo sobre la superficie de los espermatozoides de ratón. El gen ADAM6 humano, que se encuentra normalmente entre los segmentos génicos V<sub>H</sub> humano V<sub>H</sub>1-2 y V<sub>H</sub>6-1, parece ser un pseudogén (Figura 12). En ratones, existen dos genes ADAM6, ADAM6a y ADAM6b que se encuentran en una región intergénica entre los segmentos génicos V<sub>H</sub> y D<sub>H</sub>, y en el ratón, los genes ADAM6a y ADAM6b se orientan en una orientación transcripcional opuesta a la de los segmentos génicos de la inmunoglobulina que los rodean (FIG. 12). En ratones, se requiere aparentemente un locus de ADAM6 funcional para una fertilización normal. Un locus o secuencia de ADAM6 funcional, entonces, se refiere a un locus o secuencia de ADAM6 que puede complementar, o rescatar, la fertilización drásticamente reducida presentada en ratones macho con loci endógenos de ADAM6 desaparecidos o no funcionales.

La posición de la secuencia intergénica en ratones que codifica ADAM6a y ADAM6b vuelve la secuencia intergénica susceptible a modificación cuando se modifica una cadena pesada endógena de ratón. Cuando los segmentos génicos V<sub>H</sub> se eliminan o sustituyen, o cuando los segmentos de los genes D<sub>H</sub> se eliminan o sustituyen, existe una elevada probabilidad de que un ratón resultante presente un grave déficit de fertilidad. A fin de compensar el déficit, el ratón está modificado para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que complementará la pérdida de la actividad de ADAM6 debida a la modificación del locus endógeno de ADAM6 de ratón. En varias realizaciones, la secuencia de nucleótidos complementaria es una que codifica ADAM6a de ratón, ADAM6b de ratón, o un homólogo u ortólogo o su fragmento funcional que rescata el déficit de fertilidad.

La secuencia de nucleótidos que rescata la fertilidad se puede colocar en cualquier posición adecuada. Se puede colocar en la región intergénica, o en cualquier posición adecuada en el genoma (es decir, ectópicamente). En una realización, la secuencia de nucleótidos se puede introducir en un transgén que se integra aleatoriamente en el genoma de ratón. En una realización, la secuencia puede mantenerse episómicamente, es decir, en un ácido nucleico separado más bien que en un cromosoma de ratón. Las posiciones adecuadas incluyen posiciones que son transcripcionalmente permisivas o activas, por ejemplo, un locus ROSA26 (Zambrowicz *et al.*, 1997, PNAS USA 94:3789-3794), un locus BT-5 (Michael *et al.*, 1999, Mech. Dev. 85:35-47), o un locus Oct4 (Wallace *et al.*, 2000, Nucleic Acids Res. 28:1455-1464). Se describen secuencias de nucleótidos dirigidas a loci transcripcionalmente activos, por ejemplo, en el documento US 7.473.557.

Como alternativa, la secuencia de nucleótidos que rescata la fertilidad puede acoplarse con un promotor inducible con el fin de facilitar la expresión en las células y/o tejidos adecuados, por ejemplo, tejidos reproductores. Los promotores inducibles ilustrativos incluyen promotores activados mediante medios físicos (por ejemplo, promotor del choque térmico) y/o químicos (por ejemplo, IPTG o Tetraciclina).

Además, la expresión de la secuencia de nucleótidos puede unirse a otros genes a fin de conseguir la expresión en los estadios específicos de desarrollo o en tejidos específicos. Se puede conseguir dicha expresión colocando la secuencia de nucleótidos en unión operativa con el promotor de un gen expresado en un estadio específico de desarrollo. Por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina de una especie genomanipulada en el genoma de una especie hospedadora se colocan unidas operativamente a una secuencia promotora de un gen CD19 (un gen específico de linfocitos B) de la especie hospedadora. Se consigue la expresión específica de los linfocitos B en los estadios precisos del desarrollo cuando se expresan las inmunoglobulinas.

Otro método adicional para conseguir una sólida expresión de una secuencia de nucleótidos insertada es emplear un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos ilustrativos incluyen SV40, CMV, UBC, EF1A, PGK y CAGG.

De una manera similar, la secuencia de nucleótidos deseada se coloca en unión operativa con un promotor constitutivo seleccionado, que proporciona un elevado nivel de expresión de la(s) proteína(s) codificada(s) por la secuencia de nucleótidos.

5 Se pretende que el término "ectópico" incluya un desplazamiento, o una colocación en una posición que no se encuentra normalmente en la naturaleza (por ejemplo, la colocación de una secuencia de ácido nucleico en una posición que no es la misma posición que la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en un ratón silvestre). El término, en algunas realizaciones, se usa en el sentido de un objeto que se encuentra fuera de su posición normal o correcta. Por ejemplo, la frase "una secuencia ectópica de nucleótidos que codifica..." se refiere a una secuencia de  
 10 nucleótidos que aparece en una posición en la cual no se encuentra normalmente en el ratón. Por ejemplo, en el caso de una secuencia ectópica de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6 de ratón (o un ortólogo u homólogo o uno de sus fragmentos que proporciona el mismo o similar beneficio de fertilidad en ratones macho), la secuencia se puede colocar en una posición diferente en el genoma del ratón que la que se encuentra en un ratón silvestre. En esos casos, se crearán secuencias novedosas de la secuencia de ratón colocando la secuencia en una  
 15 posición diferente en el genoma del ratón que en un ratón silvestre. Un homólogo u ortólogo funcional de ADAM6 de ratón es una secuencia que confiere un rescate de pérdida de fertilidad (por ejemplo, la pérdida de la capacidad de un ratón macho para generar progenie mediante apareamiento) que se observa en un ratón ADAM6<sup>-/-</sup>. Los homólogos u ortólogos funcionales incluyen proteínas que tienen al menos aproximadamente un 89 % de identidad o más, por ejemplo, hasta un 99 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de ADAM6a y/o con la secuencia de aminoácidos de ADAM6b, y que pueden complementar, o rescatar la capacidad de aparearse satisfactoriamente, de un ratón que tiene un genotipo que incluye una delección o inactivación genética de ADAM6a y/o ADAM6b.

La posición ectópica puede ser en cualquier parte (por ejemplo, como con la inserción aleatoria de un transgén que contiene una secuencia de ADAM6 de ratón), o puede ser, por ejemplo, en una posición que se aproxima (pero no es precisamente la misma que) su localización en un ratón silvestre (por ejemplo, en un locus endógeno modificado de inmunoglobulina de ratón, pero tanto anterior o posterior a su posición natural, por ejemplo, en un locus modificado de inmunoglobulina pero entre diferentes segmentos génicos, o en una posición diferente en una secuencia V-D intergénica de ratón). Un ejemplo de una colocación ectópica es una colocación es locus humanizado de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, un ratón que comprende una sustitución de uno o más  
 25 segmentos endógenos del gen V<sub>H</sub> con segmentos humanos del gen V<sub>H</sub>, donde la sustitución elimina una secuencia endógena de ADAM6, se puede genomanipular para tener una secuencia de ADAM6 de ratón localizada en una secuencia que contienen segmentos génicos V<sub>H</sub> humano. La modificación resultante generaría una secuencia (ectópica) de ADAM6 de ratón en una secuencia génica humana, y la colocación (ectópica) de la secuencia de ADAM6 de ratón en la secuencia génica humana puede aproximarse a la posición del pseudogén ADAM6 humano (es decir, entre dos segmentos V) o puede aproximarse a la posición de la secuencia de ADAM6 de ratón (es decir, en la región intergénica de V-D). Las uniones resultantes de la secuencia creadas mediante la unión de una secuencia (ectópica) de ADAM6 de ratón en o adyacente a una secuencia génica humana (por ejemplo, una secuencia génica de inmunoglobulina) en la línea germinal del ratón sería novedosa en comparación con la misma o similar posición en el genoma de un ratón silvestre.

40 Se describen animales no humanos que carecen de ADAM6 o un homólogo o su ortólogo, donde la carencia vuelve infértil al animal no humano, o reduce sustancialmente la fertilidad del animal no humano. La carencia de ADAM6 o del ortólogo o su homólogo puede deberse a una modificación de un locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Una reducción sustancial de la fertilidad es, por ejemplo, una reducción en la fertilidad (por ejemplo, en la frecuencia reproductiva, en las crías por camada, en las crías por año, etc.) de aproximadamente un  
 45 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % o más. En varias realizaciones, los animales no humanos se suplementan con un gen ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo que es funcional en un macho del animal no humano, en las que el gen ADAM6 suplementado o el ortólogo o el homólogo o su fragmento funcional rescata la reducción de la fertilidad completamente o en una parte sustancial. Un rescate de fertilidad en una parte sustancial es, por ejemplo, una restauración de la fertilidad de tal manera que el animal no humano presenta una fertilidad que es al menos del 70 %, 80 %, o 90 % o más en comparación con un locus no modificado (es decir, un animal sin una modificación en el gen ADAM6 o en el ortólogo o su homólogo) de la cadena pesada.

La secuencia que se confiere en el animal genéticamente modificado (es decir, el animal que carece de ADAM6  
 55 funcional o el ortólogo o su homólogo, debido a, por ejemplo, una modificación de un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina) es, en algunas realizaciones, seleccionada a partir de un gen ADAM6 o un ortólogo u homólogo del mismo. Por ejemplo, en un ratón, la pérdida de la función de ADAM6 se rescata añadiendo, en una realización, un gen ADAM6 de ratón. En una realización, la pérdida de la función de ADAM6 en el ratón se rescata añadiendo un ortólogo u homólogo de una especie estrechamente relacionada con respecto al ratón, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una cepa o especie diferente, una rata de cualquier especie, un roedor; donde la adición del ortólogo u homólogo al ratón rescata la pérdida de fertilidad debida a la pérdida de la función de ADAM6 o la pérdida de un gen ADAM6. Los ortólogos y homólogos de otras especies, en algunas realizaciones, se seleccionan de especies filogenéticamente relacionadas y, en algunas realizaciones, presentan un porcentaje de identidad con el ADAM6 endógeno (u ortólogo) que es aproximadamente el 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más,  
 60 96 % o más, o 97 % o más; y esta pérdida de fertilidad relacionada con el rescate de ADAM6 o (en un animal no ratón) o relacionada con el ortólogo de ADAM6. Por ejemplo, en una rata macho genéticamente modificada que

carece de la función de ADAM6 (por ejemplo, una rata con una región variable endógena de la cadena pesada de la inmunoglobulina sustituida con una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, o una inactivación genética en la región de la cadena pesada de la inmunoglobulina), la pérdida de fertilidad en la rata es rescatada mediante la adición de una rata ADAM6 o, en algunas realizaciones, un ortólogo de una rata ADAM6 (por ejemplo, un ortólogo de ADAM6 de otra cepa o especie de rata, o, en una realización, de un ratón).

De esta manera, los animales genéticamente modificados que no presentan fertilidad o que presentan una reducción de la fertilidad debida a la modificación de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 (o un ortólogo o su homólogo) o una región reguladora unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico, pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que complementa, o restaura, la pérdida de fertilidad en el que la secuencia de ácido nucleico que complementa o restaura la pérdida de fertilidad es de una cepa diferente de la misma especie o de especies filogenéticamente relacionadas. La secuencia de ácido nucleico complementario es un ortólogo u homólogo de ADAM6 o su fragmento funcional. El ortólogo u homólogo de ADAM6 complementario o su fragmento funcional puede ser de un animal no humano que está estrechamente relacionado con el animal genéticamente modificado que tiene el defecto de fertilidad. Por ejemplo, en el que el animal genéticamente modificado es un ratón de una cepa concreta, se puede obtener un ortólogo u homólogo de ADAM6 o su fragmento funcional de un ratón de otra cepa, o de un ratón de una especie relacionada. El ortólogo o el homólogo de ADAM6 o su fragmento funcional se puede seleccionar de un animal del orden *Rodentia*, o del suborden *Myomorpha*.

En varias realizaciones, uno o más ortólogos u homólogos de ADAM6 de roedor o sus fragmentos funcionales de un roedor en una familia restauran la fertilidad en un roedor genéticamente modificado de la misma familia que carece de un ortólogo u homólogo de ADAM6 (por ejemplo, *Cricetidae* (por ejemplo, hámsteres, ratas y ratones del nuevo mundo, topillos); *Muridae* (por ejemplo, ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas de crin)).

En varias realizaciones, los ortólogos, homólogos, y sus fragmentos se evalúan para la funcionalidad discerniendo si el ortólogo, homólogo, o fragmento restaura la fertilidad en un animal no humano macho genéticamente modificado que carece de la actividad de ADAM6 (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o rata, que comprende una inactivación genética de ADAM6 o su ortólogo). En varias realizaciones, la funcionalidad se define como la capacidad de un espermatozoide de un animal genéticamente modificado que carece de ADAM6 endógeno o del ortólogo o su fragmento de migrar por un oviducto y fertilizar un óvulo de la misma especie de un animal genéticamente modificado.

Se pueden crear ratones que comprendan delecciones o sustituciones del locus endógeno de la región variable de la cadena pesada o de sus porciones que contengan una secuencia ectópica de nucleótidos que codifique una proteína que confiera similares beneficios de fertilidad a un ratón ADAM6 (por ejemplo, un ortólogo o un homólogo o su fragmento que es funcional en un ratón macho). La secuencia ectópica de nucleótidos puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifique una proteína que sea un homólogo u ortólogo de ADAM6 (o su fragmento) de una cepa de ratones diferentes o de una especie diferente, por ejemplo, una especie diferente de roedor, y que confiere un beneficio en la fertilidad, por ejemplo, un número aumentado de camadas en un periodo de tiempo especificado, y/o un número aumentado de crías por camada, y/o la capacidad de un espermatozoide de un ratón macho de atravesar un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón.

En una realización, ADAM6 es un homólogo u ortólogo que es al menos un 89 % a 99 % idéntica a una proteína ADAM6 de ratón (por ejemplo, al menos un 89 % a 99 % idéntica a ADAM6a de ratón o ADAM6b de ratón). En una realización, la secuencia ectópica de nucleótidos codifica una o más proteínas seleccionadas independientemente de una proteína al menos un 89 % idéntica a ADAM6a de ratón, una proteína al menos 89 % idéntica a ADAM6b de ratón, y una de sus combinaciones. En una realización, el homólogo u ortólogo es una proteína de rata, hámster, ratón, que se modifica de esta manera para ser aproximadamente un 89 % o más idéntica a ADAM6a y/o ADAM6b de ratón. En una realización, el homólogo u ortólogo es o es al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a ADAM6a y/o ADAM6b de ratón.

#### **ADAM6 ectópico en ratones de cadena pesada humanizada**

Desarrollos en el direccionamiento génico, por ejemplo, el desarrollo de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) permite ahora la recombinación de fragmentos genómicos relativamente grandes. La genomaniplulación de BAC ha permitido la capacidad de realizar delecciones grandes, e inserciones grandes, en las células ES de ratón.

Los ratones que fabrican anticuerpos humanos han estado disponibles desde algún tiempo. Aunque representan un importante avance en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos humanos, estos ratones presentan numerosas anomalías significativas que limitan su utilidad. Por ejemplo, presentan un desarrollo de linfocitos B comprometido. El desarrollo comprometido puede ser debido a varias diferencias entre ratones transgénicos y ratones silvestres.

Los anticuerpos humanos pueden no interactuar óptimamente con prelinfocitos B o receptores de los linfocitos B en la superficie de las células de ratón que señalizan la maduración, proliferación, o supervivencia durante la selección clonal. Los anticuerpos completamente humanos pueden no interactuar óptimamente con un sistema del receptor de Fc de ratón; los ratones expresan los receptores de Fc que no presentan una correspondencia uno a uno con los

receptores de Fc humano. Finalmente, algunos ratones que fabrican anticuerpos completamente humanos no incluyen todas las secuencias genuinas de ratón, por ejemplo, elementos potenciadores en la dirección 3' y otros elementos de control del locus, que pueden requerirse para el desarrollo de linfocitos B silvestres.

5 Los ratones que fabrican anticuerpos completamente humanos comprenden loci endógenos de inmunoglobulina que están de alguna manera inhabilitados, y se introducen transgenes humanos que comprenden segmentos génicos variables y constantes de la inmunoglobulina en una localización aleatoria en el genoma de ratón. Siempre que el locus endógeno esté suficientemente inhabilitado a fin de no reordenar segmentos génicos para formar un gen de inmunoglobulina funcional, la meta de fabricar anticuerpos completamente humanos puede casi conseguirse en el  
10 mencionado ratón con el desarrollo de linfocitos B comprometidos.

Aunque obligados a fabricar anticuerpos completamente humanos a partir de un locus de transgenes humanos, generar anticuerpos humanos en un ratón es aparentemente un proceso desfavorecido. En algunos ratones, el proceso está desfavorecido de esta manera para dar como resultado la formación de cadenas pesadas de la región variable humana/constante de ratón (pero no cadenas ligeras) a través del mecanismo de cambio en *trans*. Mediante este mecanismo, los transcritos que codifican anticuerpos completamente humanos que experimentan el cambio de isotipo en *trans* desde el isotipo humano a un isotipo de ratón. El proceso es en *trans*, debido a que el transgén completamente humano se localiza lejos del locus endógeno que retiene una copia no dañada de un gen de la región constante de la cadena pesada de ratón. Aunque en dichos ratones, el cambio en *trans* es muy evidente, el  
15 fenómeno sigue siendo insuficiente para rescatar el desarrollo de linfocitos B, que sigue estando francamente deteriorado. En cualquier caso, los anticuerpos con cambios en *trans* fabricados en dichos ratones retienen cadenas ligeras completamente humanas, debido a que el fenómeno de cambio en *trans* no se produce aparentemente con respecto a las cadenas ligeras; el cambio en *trans* se basa presumiblemente en secuencias de cambio en los loci endógenos utilizados (casi diferentes) en cambios de isotipo normales en *cis*. De esta manera, incluso cuando los  
20 ratones genomanipulados fabrican anticuerpos completamente humanos seleccionan un mecanismo de cambio en *trans* para fabricar anticuerpos con regiones constantes de ratón, la estrategia es todavía insuficiente para rescatar un desarrollo normal de linfocitos B.

Un riesgo principal en la fabricación de agentes de tratamiento humano basados en anticuerpos es preparar una diversidad suficientemente grande de secuencias de la región variable de la inmunoglobulina humana para identificar dominios variables útiles que reconocen específicamente epítopos concretos y se unen a ellos con una afinidad deseable, usualmente, pero no siempre con una elevada afinidad. Antes del desarrollo de ratones VELOCIMMUNE® (descrito en el presente documento), no había indicaciones de que los ratones que expresaban regiones variables humanas con regiones constantes de ratón exhibirían diferencias significativas procedentes de ratones que fabrican anticuerpos humanos a partir de un transgén. Esta suposición, sin embargo, era incorrecta.  
30

ratones VELOCIMMUNE®, que contienen una sustitución precisa de regiones variables de la inmunoglobulina de ratón con regiones variables de la inmunoglobulina humana en loci endógenos de ratón, presentan una sorprendente y remarcable similitud con ratones silvestres con respecto al desarrollo de linfocitos B. En un desarrollo sorprendente y llamativo, los ratones VELOCIMMUNE® presentaron una respuesta a la inmunización normal esencialmente natural que difirió solo en un aspecto significativo de las regiones variables de los ratones silvestres - las regiones variables generadas en respuesta a la inmunización son completamente humanas.  
40

Los ratones VELOCIMMUNE® contienen una sustitución a gran escala precisa de regiones variables de la línea germinal de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana de ratón (IgH) y de la cadena ligera de la inmunoglobulina (por ejemplo, una cadena ligera  $\kappa$ , Igk) con las regiones variables correspondientes de la inmunoglobulina humana, en los loci endógenos. En total, aproximadamente seis megabases de los loci de ratón se sustituyen con aproximadamente 1,5 megabases de la secuencia genómica humana. Esta sustitución precisa da como resultado un ratón con loci híbridos de inmunoglobulina que fabrican las cadenas pesada y ligera que tienen regiones variables humanas y una región constante de ratón. La sustitución precisa de los segmentos  $V_H$ - $D_H$ - $J_H$  and  $V_k$ - $J_k$  deja intactas y funcionales las secuencias flanqueantes de ratón en los loci híbridos de la inmunoglobulina. El sistema inmune humoral de las funciones del ratón es similar al de un ratón silvestre. El desarrollo de linfocitos B no está impedido en ningún aspecto significativo y se genera una rica diversidad de regiones variables humanas en el ratón tras el estímulo del antígeno.  
50

Los ratones VELOCIMMUNE® son posibles debido a que los segmentos génicos de la inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera  $\kappa$  se reordenan de forma similar en seres humanos y ratones, lo que no significa que sus loci sean iguales o incluso casi tan claramente que no lo son. Sin embargo, los loci son lo suficientemente similares para poder realizar la inmunización del locus génico de la región variable de la cadena pesada sustituyendo aproximadamente tres millones de pares de bases de la secuencia contigua de ratón que contienen todos los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$  con aproximadamente un millón de bases de la secuencia genómica contigua humana que cubren básicamente la secuencia equivalente de un locus de la inmunoglobulina humana.  
60

La sustitución adicional de determinadas secuencias génicas de la región constante de ratón con secuencias génicas humanas (por ejemplo, la sustitución de la secuencia  $C_H1$  de ratón con la secuencia  $C_H1$  humana, y la sustitución de la secuencia  $C_L$  de ratón con la secuencia  $C_L$  humana) da como resultado ratones con loci híbridos de  
65

inmunoglobulina que fabrican anticuerpos que tienen regiones variables humanas y regiones constantes parcialmente humanas, adecuadas para, por ejemplo, preparar fragmentos de anticuerpos completamente humanos, por ejemplo, Fab completamente humanos. Ratones con loci híbridos de inmunoglobulina presentan una reordenación normal del segmento génico de la región variable, frecuencias normales de hipermutación somática, y cambios de clase normales. Estos ratones presentan un sistema inmune humoral que es indistinguible del que tiene el ratón silvestre, y presentan poblaciones normales de células en todas las etapas de desarrollo de los linfocitos B y estructuras normales de órganos linfáticos - incluso cuando el ratón carece de un repertorio completo de segmentos génicos de la región variable humana. Inmunizar estos ratones da como resultado respuestas humorales sólidas que presentan una amplia diversidad de utilización de segmentos génicos variables.

La sustitución precisa de segmentos génicos de la región variable de la línea germinal de ratón permite crear ratones que tienen loci de inmunoglobulina parcialmente humanos. Debido a que los loci de inmunoglobulina parcialmente humanos se reordenan, se hipermutan, y cambian de clase normalmente, los loci de inmunoglobulina parcialmente humanos generan anticuerpo en un ratón que comprenden regiones variables humanas. Se pueden identificar y clonar secuencias de nucleótidos que codifican regiones variables, a continuación fusionarse (por ejemplo, en un sistema *in vitro*) con cualquier secuencia de elección, por ejemplo, cualquier isotipo de inmunoglobulina adecuado para un uso concreto, dando como resultado un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno derivada completamente de secuencias humanas.

La humanización a gran escala mediante métodos de ingeniería recombinógena se utilizaron para modificar embriocitoblastos (ES) de ratón para sustituir con precisión hasta tres megabases del locus de inmunoglobulina de la cadena pesada de ratón que incluían esencialmente todos los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$  con segmentos génicos humanos equivalentes con hasta una secuencia genómica humana de una megabase que contiene algunos o esencialmente todos los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$  humanos. Se ha usado hasta la mitad del segmento de megabase del genoma humano que comprende una de dos repeticiones que codifican esencialmente todos los segmentos génicos  $V_k$  y  $J_k$  para sustituir un segmento de tres megabases del locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina  $k$  que contiene esencialmente todos los segmentos génicos  $V_k$  y  $J_k$ .

Los ratones con dichos loci de inmunoglobulina sustituidos pueden comprender una perturbación o delección del locus endógeno de ADAM6 de ratón, que se encuentra normalmente entre los segmentos 3' de la mayoría de genes  $V_H$  y los segmentos 5' de la mayoría de genes  $D_H$  en el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. La perturbación en esta región puede conducir a la reducción o eliminación de la funcionalidad del locus endógeno de ADAM6 de ratón. Si los segmentos 3' de la mayoría de genes  $V_H$  del repertorio de la cadena pesada humana se convierten en una sustitución, una región intergénica que contiene un pseudogén que parece ser un pseudogén ADAM6 humano está presente entre estos segmentos génicos  $V_H$ , es decir, entre  $V_{H1-2}$  y  $V_{H1-6}$  humanos. Sin embargo, los ratones macho que comprenden esta secuencia intergénica humana presentan una reducción en la fertilidad.

Se describe que los ratones comprenden los loci sustituidos como se ha descrito anteriormente, y comprenden también una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica ADAM6 de ratón, en el que el ratón presenta esencialmente fertilidad normal. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede comprender una secuencia ADAM6a de ratón y/o una secuencia ADAM6b de ratón o sus fragmentos funcionales colocados entre  $V_{H1-2}$  humano y  $V_{H6-1}$  humano en un locus endógeno modificado de la cadena pesada. La secuencia de ácido nucleico ectópica puede ser la SEQ ID NO: 3, colocada entre  $V_{H1-2}$  humano y  $V_{H6-1}$  humano en un locus endógeno modificado de la cadena pesada. La dirección de la transcripción de los genes ADAM6 de la SEQ ID NO: 3 son opuestos con respecto a la dirección de la transcripción de los segmentos génicos  $V_H$  humanos que lo rodean. Aunque los ejemplos en el presente documento muestran el rescate de la fertilidad colocando la secuencia ectópica entre los segmentos indicados del gen  $V_H$  humano, las personas expertas reconocerán que se esperará que la colocación de la secuencia ectópica en cualquier locus permisible transcripcionalmente adecuado en el genoma de ratón (o incluso extracromosómicamente) sea similar al rescate de la fertilidad en un macho de ratón.

El fenómeno de complementar un ratón que carece de un locus de ADAM6 funcional con una secuencia ectópica que comprende un gen ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o su fragmento funcional es un método que es aplicable para rescatar cualesquiera ratones con loci de ADAM6 endógenos no funcionales o mínimamente funcionales. De esta manera, muchísimos ratones que comprenden una modificación perturbadora de ADAM6 del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina pueden ser rescatados con las composiciones y métodos de la invención. Por consiguiente, la invención comprende ratones con una amplia variedad de modificaciones en los loci de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprenden la función endógena de ADAM6. Se proporcionan en esta descripción algunos ejemplos (no limitantes). Además de los ratones VELOCIMMUNE® descritos, las composiciones y métodos relacionados con ADAM6 se pueden usar en muchísimas aplicaciones, por ejemplo, cuando se modifica un locus de la cadena pesada en una amplia variedad de maneras.

Se describen ratones que comprendían una secuencia ectópica de nucleótidos que codificaba una proteína ADAM6 funcional (o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma), una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$  de ratón con uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos, una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de los genes  $D_H$  y los segmentos de los genes  $J_H$  de ratón con los segmentos

de los genes  $D_H$  y los segmentos de los genes  $J_H$  humanos; en el que el ratón carece de  $C_H1$  y/o la región bisagra. En una realización, el ratón fabrica una única proteína de unión al dominio variable que es un dímero de las cadenas de inmunoglobulina seleccionadas entre: (a)  $V_H$  humano -  $C_H1$  ratón -  $C_H2$  ratón -  $C_H3$  ratón; (b)  $V_H$  humano - bisagra de ratón -  $C_H2$  de ratón -  $C_H3$  ratón; y, (c)  $V_H$  humano -  $C_H2$  ratón -  $C_H3$  ratón.

5 En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que rescata la fertilidad se coloca en una secuencia de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (por ejemplo, entre los segmentos 1-2 del gen  $V_H$  y 1-6 del gen  $V_H$ ) en un ratón que tiene una sustitución de uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón (de  $mV_H$ ,  $mD_H$ , y/o  $mJ_H$ ) con uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón (de  $hV_H$ ,  $hD_H$ , y/o  $hJ_H$ ), y el ratón comprende además una sustitución de uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina (de  $mV_\kappa$  y/o  $mJ_\kappa$ ) con uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina (de  $hV_\kappa$  y/o  $hJ_\kappa$ ).

15 En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón comprenden aproximadamente tres megabases del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón comprende al menos 89 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 13 segmentos de los genes  $D_H$ , al menos cuatro segmentos de los genes  $J_H$  o una de sus combinaciones del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana comprenden aproximadamente una megabase del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana comprende al menos 80 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 27 segmentos de los genes  $D_H$ , al menos seis segmentos de los genes  $J_H$  o una de sus combinaciones de un locus variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana.

30 En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón comprende aproximadamente tres megabases del locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón. En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón comprende al menos 137 segmentos génicos  $V_\kappa$ , al menos cinco segmentos de los genes  $J_\kappa$  o una de sus combinaciones del locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón. En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina comprende aproximadamente la mitad de la megabase de un locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina. En una realización específica, el uno o más de uno segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina comprende la repetición proximal con respecto a la región constante  $\kappa$  de la inmunoglobulina) de un locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina humana. En una realización, el uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina humana comprende al menos 40 segmentos génicos  $V_\kappa$ , al menos cinco segmentos de los genes  $J_\kappa$  o una de sus combinaciones del locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina humana.

40 En una realización, la secuencia de nucleótidos se coloca entre dos segmentos génicos de la inmunoglobulina humana. En una realización específica, los dos segmentos génicos de la inmunoglobulina humana son segmentos génicos de la cadena pesada. En una realización, la secuencia de nucleótidos se coloca entre un segmento 1-2 del gen  $V_H$  y un segmento 1-6 del gen  $V_H$  en un ratón VELOCIMMUNE® (documento US 6.596.541 y US 7.105.348). En una realización, el ratón VELOCIMMUNE® modificado de esta manera comprende una sustitución de segmentos génicos de la región variable de la inmunoglobulina de ratón con al menos 80 segmentos génicos  $V_H$  humanos, 27 segmentos de los genes  $D_H$  humanos y seis segmentos de los genes  $J_H$  humanos, y una sustitución de segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina con al menos 40 segmentos génicos  $V_\kappa$  y cinco segmentos de los genes  $J_\kappa$ .

50 En un aspecto, un locus funcional de ADAM6 de ratón (o un ortólogo u homólogo o sus fragmentos funcionales) está presente en los segmentos medios del gen  $V_H$  humano que sustituye el gen  $V_H$  humano. En una realización, al menos 89 segmentos génicos  $V_H$  de ratón se eliminan y sustituyen con uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos, y el locus de ADAM6 de ratón está presente inmediatamente adyacente al extremo 3' de los segmentos génicos  $V_H$  humanos, o entre dos segmentos génicos  $V_H$  humanos. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente entre dos segmentos génicos  $V_H$  en aproximadamente 20 kilo bases (kb) a aproximadamente 40 kilo bases (kb) del extremo 3' de los segmentos insertados en los genes  $V_H$  humanos. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente entre dos segmentos génicos  $V_H$  en aproximadamente 29 kb a aproximadamente 31 kb del extremo 3' de los segmentos insertados en los genes  $V_H$  humanos. En una realización específica, y el locus de ADAM6 de ratón está presente inmediatamente adyacente al extremo 3' de los segmentos génicos  $V_H$  humanos. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente en aproximadamente 30.184 pb del extremo 3' de los segmentos insertados del gen  $V_H$  humano. En una realización específica, la sustitución incluye los segmentos  $V_H1-2$  y  $V_H6-1$  humanos, y el locus de ADAM6 de ratón está presente en la dirección 3' del segmento génico  $V_H1-2$  y en la dirección 5' del segmento génico  $V_H6-1$ . En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón está presente entre un segmento génico  $V_H1-2$  humano y un segmento génico  $V_H6-1$  humano, donde el extremo 5' del locus de ADAM6 de ratón tiene aproximadamente 13.848 pb desde el

extremo 3' del segmento génico V<sub>H</sub>1-2 humano y el extremo 3' del locus de ADAM6 tiene aproximadamente 29.737 pb desde el extremo 5' del segmento génico V<sub>H</sub>6-1 humano. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón comprende la SEQ ID NO: 3 o uno de sus fragmentos que confieren la función de ADAM6 en las células de ratón. En una realización específica, la disposición de los segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos es entonces la siguiente  
 5 (de la dirección 5' a la dirección 3' con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos): V<sub>H</sub>1-2 humano - locus de ADAM6 de ratón - V<sub>H</sub>6-1 humano. En una realización específica, El pseudogén ADAM6 entre V<sub>H</sub>1-2 humano y V<sub>H</sub>6-1 humano está sustituido con el locus de ADAM6 de ratón. En una realización, la orientación de uno o más de uno ADAM6a de ratón y ADAM6b de ratón del locus de ADAM6 locus es opuesta con respecto a la dirección de la transcripción comparada con la orientación de los segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos.  
 10 Como alternativa, el locus de ADAM6 de ratón está presente en la región intergénica entre el segmento 3' de la mayoría de genes V<sub>H</sub> humanos y el segmento 5' de la mayoría de genes D<sub>H</sub>. Este puede ser el caso cuando el segmento 5' de la mayoría de genes D<sub>H</sub> es de ratón o ser humano.

De manera similar, un ratón modificado con uno o más segmentos génicos V<sub>L</sub> (por ejemplo, los segmentos V<sub>k</sub> o V<sub>λ</sub>)  
 15 que sustituyen todos o sustancialmente todos los segmentos endógenos del gen V<sub>H</sub> de ratón pueden modificarse con el fin de mantener cualquier locus endógeno de ADAM6 de ratón, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, empleando un vector director que tenga un brazo de homología en la dirección 3' que incluya un locus ADAM6 de ratón o uno de sus fragmentos funcionales, o sustituir un locus dañado de ADAM6 de ratón con una secuencia ectópica situada entre dos segmentos génicos V<sub>L</sub> humanos o entre los segmentos génicos V<sub>L</sub> humanos y un  
 20 segmento del gen D<sub>H</sub> (tanto humano como de ratón, por ejemplo, V<sub>A</sub> + m/hDH), o un segmento J (tanto humano como de ratón, por ejemplo, V<sub>k</sub> + J<sub>H</sub>). En una realización, la sustitución incluye dos o más segmentos génicos V<sub>L</sub> humanos, y el locus ADAM6 de ratón o su fragmento funcional está presente entre los dos segmentos 3' de la mayoría de genes V<sub>L</sub>. En una realización específica, la disposición de los segmentos génicos V<sub>L</sub> humano es entonces la siguiente (desde la dirección 5' a la dirección 3' con respecto a la dirección de la transcripción de los  
 25 segmentos génicos humanos): V<sub>L</sub>3'-1 humano - locus de ADAM6 - V<sub>L</sub>3' humano. En una realización, la orientación de uno o más ADAM6a de ratón y ADAM6b de ratón y del locus de ADAM6 es opuesta con respecto a la dirección de la transcripción en comparación con la orientación de los segmentos génicos V<sub>L</sub> humanos. Como alternativa, el locus de ADAM6 de ratón está presente en la región intergénica entre el segmento 3' de la mayoría de genes V<sub>L</sub> humanos y el segmento 5' de la mayoría de genes D<sub>H</sub>. Este puede ser el caso cuando el segmento 5' de la mayoría  
 30 de genes D<sub>H</sub> es de ratón o ser humano.

Se describe un ratón con una sustitución de uno o más segmentos endógenos del gen V<sub>H</sub> de ratón, y que comprenden al menos un segmento endógeno del gen D<sub>H</sub> de ratón. En dicho ratón, la modificación de los segmentos endógenos del gen V<sub>H</sub> de ratón comprende una modificación de uno o más segmentos 3' de la mayoría de genes V<sub>H</sub>,  
 35 pero no de los segmentos 5' de la mayoría de genes D<sub>H</sub>, cuando se tiene cuidado con el fin de que la modificación de los uno o más segmentos 3' de la mayoría de genes V<sub>H</sub> no perturbe o vuelva el locus endógeno de ADAM6 funcional. Por ejemplo, en una realización, el ratón comprende una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos endógenos del gen V<sub>H</sub> de ratón con uno o más segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos, y el ratón comprende uno o más segmentos endógenos del gen D<sub>H</sub> y un locus endógeno funcional de ADAM6 de ratón.

El ratón puede comprender la modificación de los segmentos 3' endógenos de la mayoría de genes V<sub>H</sub>, y una modificación de uno o más segmentos endógenos del gen D<sub>H</sub> de ratón, y la modificación se lleva a cabo de tal manera que mantiene la integridad del locus endógeno de ADAM6 de ratón en la extensión en la que el locus endógeno de ADAM6 sigue siendo funcional. En un ejemplo, Dicha modificación se realiza en dos etapas: (1)  
 45 sustituir los segmentos 3' de la mayoría de genes V<sub>H</sub> endógenos de ratón con uno o más segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos que emplean un vector director con un brazo de homología en la dirección 5' y un brazo de homología en la dirección 3' donde el brazo de homología en la dirección 3' incluye todo o una porción de un locus funcional de ADAM6 de ratón; (2) sustituyendo a continuación un segmento endógeno del gen D<sub>H</sub> de ratón con un vector director que tiene un brazo de homología en la dirección 5' que incluye todo o una porción funcional de un locus de ADAM6  
 50 de ratón.

El empleo de ratones que contienen una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o su homólogo funcional puede ser útil cuando las modificaciones perturban la función de ADAM6 endógeno de ratón. La probabilidad de perturbar la función endógena de ADAM6 de ratón es alta cuando se preparan modificaciones de los loci de inmunoglobulina de ratón, en particular cuando se modifican regiones variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón y las secuencias de la rodean. Por tanto, dichos ratones proporcionan un beneficio concreto cuando se crean ratones con loci de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se eliminan en todo o en parte, se humanizan en todo o en parte, o se sustituyen (por ejemplo,  
 55 con secuencias V<sub>k</sub> o V<sub>λ</sub>) en todo o en parte. Los expertos en la materia conocen los métodos para crear las modificaciones genéticas descritas para los ratones descritos a continuación.  
 60

Los ratones que contienen una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón o una proteína sustancialmente idéntica o similar que confiere los beneficios de fertilidad de una proteína ADAM6 de ratón, son particularmente útiles junto con las modificaciones en un locus génico de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón que perturba o elimina la secuencia endógena de ADAM6 de ratón. Aunque se describe principalmente vinculada a ratones que expresan anticuerpos con regiones variables humanas y regiones constantes  
 65

- de ratón, dichos ratones son útiles vinculadas a cualquier modificación genética que perturbe los genes endógenos de ADAM6 de ratón. Las personas expertas reconocerán que esto abarca una amplia variedad de ratones genéticamente modificado que contienen modificaciones de los loci génicos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón. Estos incluyen, por ejemplo, ratones con una delección o una sustitución de todos o una porción de los segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, con respecto a otras modificaciones. Se describen a continuación ejemplos no limitantes.
- Se describen ratones genéticamente modificados que comprenden un ratón, roedor ectópico, u otro gen ADAM6 (o el ortólogo o el homólogo o un fragmento) funcional en un ratón, y uno o más segmentos génicos de la región variable y/o la región constante de la inmunoglobulina humana. Otros ortólogos de ADAM6 o los homólogos o fragmentos funcionales en un ratón pueden incluir secuencias de bóvido, cánido, primate, conejo u otras secuencias no humanas.
- Se describe un ratón que comprende una secuencia ectópica de ADAM6 que codifica una proteína ADAM6 funcional, una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$  con uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos; una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de los genes  $D_H$  humano con uno o más segmentos de los genes  $D_H$  humanos; y una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de los genes  $J_H$  de ratón con uno o más segmentos de los genes  $J_H$  humanos.
- El ratón puede comprender además una sustitución de una secuencia de nucleótidos  $C_H1$  de ratón con una secuencia de nucleótidos  $C_H1$  humana. El ratón puede comprender además una sustitución de una secuencia de nucleótidos bisagra de ratón con una secuencia de nucleótidos bisagra humana. El ratón puede comprender además una sustitución de un locus de la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$  y  $J_L$ ) con un locus de la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina. El ratón puede comprender además una sustitución de una secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón con una región constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana. La  $V_L$ ,  $J_L$ , y  $C_L$  pueden ser secuencias de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina. El ratón puede comprender una secuencia de la región constante  $C_H2$  and  $C_H3$  de la inmunoglobulina de ratón fusionada con una bisagra humana y una secuencia  $C_H1$  humana, de tal manera que los loci de la inmunoglobulina de ratón se reordenan para formar un gen que codifica una proteína de unión que comprende (a) una cadena pesada que tiene una región variable humana, una región  $C_H1$  humana, una región bisagra humana, y una región  $C_H2$  de ratón y una región  $C_H3$  de ratón; y (b) un gen que codifica una cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende un dominio de la región variable humana y una región constante humana.
- Se describe un ratón que comprende una secuencia ectópica de ADAM6 que codifica una proteína ADAM6 funcional, una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$  de ratón con uno o más segmentos génicos  $V_L$  humanos, y opcionalmente una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de los genes  $D_H$  y/o los segmentos de los genes  $J_H$  con uno o más segmentos de los genes  $D_H$  humanos y/o los segmentos de los genes  $J_H$  humanos, u opcionalmente una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de los genes  $D_H$  y los segmentos de los genes  $J_H$  con uno o más segmentos de los genes  $J_L$  humanos.
- El ratón puede comprender una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$  de ratón,  $D_H$ , y  $J_H$  con uno o más segmentos génicos  $V_L$ , uno o más segmentos de los genes  $D_H$ , y uno o más segmentos de los genes  $J$ , (por ejemplo,  $J\kappa$  o  $J\lambda$ ), en el que los segmentos génicos se unen operativamente a una región bisagra endógena de ratón, en el que el ratón forma un gen reordenado de la cadena de inmunoglobulina que contiene, desde 5' a 3' en la dirección de la transcripción,  $V_L$  humano -  $D_H$  humano o de ratón -  $J$  humano o de ratón - bisagra de ratón -  $C_H2$  de ratón -  $C_H3$  de ratón. La región  $J$  puede ser una región  $J\kappa$  humana. La región  $J$  puede ser una región  $J_H$  humana. La región  $J$  puede ser una región  $J\lambda$  humana. La región  $V_L$  humana puede seleccionarse entre una región  $V\lambda$  humana y una región  $V\kappa$  humana.
- El ratón puede expresar un único anticuerpo de dominio variable que tiene una región constata de ratón o humana y una región variable de  $V\kappa$  humana,  $D_H$  humana y  $J\kappa$  humana;  $V\lambda$  humana, una  $D_H$  humana, y una  $J_H$  humana;  $V\lambda$  humana,  $D_H$  humana, y  $J\lambda$  humana;  $V\lambda$  humana,  $D_H$  humana, y una  $J_H$  humana;  $V\kappa$  humana,  $D_H$  humana, y  $J\lambda$  humana;  $V\lambda$  humana,  $D_H$  humana, y  $J\kappa$  humana. Las secuencias de reconocimiento de la recombinación pueden modificarse de tal manera que permiten que se produzcan redistribuciones productivas entre los segmentos génicos  $V$ ,  $D$ , y  $J$  o entre los segmentos génicos  $V$  y  $J$  enumerados.
- Se describen ratones que comprendían una secuencia ectópica de nucleótidos que codificaba una proteína ADAM6 funcional (o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma), una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_H$  de ratón con uno o más segmentos génicos  $V_L$  humanos, una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de los genes  $D_H$  y los segmentos de los genes  $J_H$  con los segmentos de los genes  $J_L$  humanos; en el que el ratón carece de  $C_H1$  y/o la región bisagra.
- El ratón puede carecer de una secuencia que codifica un dominio  $C_H1$ . En una realización, el ratón puede carecer de una secuencia que codifica una región bisagra. El ratón puede carecer de una secuencia que codifica un dominio  $C_H1$  y una región bisagra.

El ratón puede expresar una proteína de unión que comprende un dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana ( $\lambda$  o  $\kappa$ ) fusionado a un dominio C<sub>H</sub>2 de ratón que se une a un dominio C<sub>H</sub>3 de ratón.

5 Se describe un ratón que comprende una secuencia ectópica de nucleótidos que codificaba una proteína ADAM6 funcional (o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma), una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V<sub>H</sub> de ratón con uno o más segmentos génicos V<sub>L</sub> humanos, una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos de los genes D<sub>H</sub> y los segmentos de los genes J<sub>H</sub> con los segmentos de los genes J<sub>L</sub> humanos.

10 El ratón puede comprender una delección de una secuencia génica de la región constante de la cadena pesada que codifica una región C<sub>H</sub>1, una región bisagra, una región C<sub>H</sub>1 y una región bisagra, o una región C<sub>H</sub>1 y una región bisagra y una región C<sub>H</sub>2.

15 El ratón puede fabricar una única proteína de unión a un dominio variable que comprende un homodímero seleccionado a partir de los siguientes: (a) V<sub>H</sub> humano - C<sub>H</sub>1 ratón - C<sub>H</sub>2 ratón - C<sub>H</sub>3 ratón; (b) V<sub>H</sub> humano - bisagra de ratón - C<sub>H</sub>2 de ratón - C<sub>H</sub>3 de ratón; (c) V<sub>H</sub> humano - C<sub>H</sub>2 de ratón - C<sub>H</sub>3 de ratón.

20 Se describe un ratón con un locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina inactivado, que comprende un locus endógeno de ADAM6 de ratón inhabilitado o eliminado, en el que el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que expresa un anticuerpo humano o de ratón o humano/de ratón u otro anticuerpo quimérico. En una realización, la secuencia de ácido nucleico está presente en un transgén integrado que se integra aleatoriamente en el genoma de ratón. La secuencia de ácido nucleico puede estar en un episoma (por ejemplo, un cromosoma) que no se encuentra en un ratón silvestre.

25 El ratón puede comprender además un locus endógeno inactivado de la cadena ligera de la inmunoglobulina. El locus endógeno de la cadena ligera de la inmunoglobulina se puede seleccionar entre un locus de la cadena ligera kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). El ratón puede comprender un locus endógeno de la cadena ligera  $\kappa$  y un locus inactivado de la cadena ligera  $\lambda$ , en el que el ratón expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana y un dominio de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana. El dominio de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana se puede seleccionar entre un dominio de la cadena ligera  $\kappa$  y un dominio de la cadena ligera A humana.

35 Se describe un ratón genéticamente modificado que expresa un anticuerpo quimérico y expresa una proteína ADAN6 o un ortólogo o su homólogo que es funcional en el ratón genéticamente modificado.

El anticuerpo quimérico comprende un dominio variable humano y una secuencia de región constante de un ratón.

40 El anticuerpo quimérico se puede expresar a partir de un locus de inmunoglobulina. El dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo quimérico se puede expresar a partir de un locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina. En una realización, el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo quimérico se expresa a partir de un locus endógeno reordenado de la cadena pesada de la inmunoglobulina. El dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo quimérico y/o el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo quimérico se pueden expresar a través de un transgén reordenado (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico reordenada derivada de una secuencia de ácido nucleico no reordenada integrada en el genoma del animal en un locus diferente que un locus endógeno de inmunoglobulina). El dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo quimérico se puede expresar a partir de un transgén (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico reordenada derivada de una secuencia de ácido nucleico no reordenada integrada en el genoma del animal en un locus diferente que un locus endógeno de inmunoglobulina).

El transgén se puede expresar a través de un locus transcripcionalmente activo, por ejemplo, un locus ROSA26, por ejemplo, un murino (por ejemplo, ratón) un locus ROSA26.

55 Se describe un ratón que comprende un locus humanizado de la cadena pesada de inmunoglobulina, donde el locus humanizado de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de ADAM6 no humana o un ortólogo o su homólogo.

60 El ortólogo de ADAM6 u homólogo no humano puede ser una secuencia que es ortóloga y/u homóloga a una secuencia de ADAM6 de ratón, donde el ortólogo u homólogo es funcional en el ratón.

En una realización específica, el animal no humano es un ratón y el ortólogo u homólogo de ADAM6 procede de un animal que se selecciona de especies de ratón diferentes, una rata, y un hámster.

65 En una realización específica, la secuencia de ADAM6 procede de un animal seleccionado entre un roedor de la

superfamilia *Dipodoidea* y un roedor de la superfamilia *Muroidea*. En una realización específica, el roedor es un ratón de la superfamilia *Muroidea*, y el ortólogo o el homólogo de ADAM6 procede de un ratón o una rata o un hámster de la superfamilia *Muroidea*.

- 5 En una realización, la secuencia de ADAM6 no humana se sitúa entre dos segmentos génicos V. En una realización, la secuencia de ADAM6 no humana se yuxtapone entre un segmento del gen V y D. En una realización, la secuencia de ADAM6 de ratón se sitúa entre un segmento del gen V y del gen J. En una realización, la secuencia de ADAM6 de ratón se yuxtapone entre un segmento del gen D y un segmento del gen J.
- 10 Se describe ratón genéticamente modificado, que comprende un linfocito B que expresa un dominio  $V_H$  análogo humano con un dominio  $V_L$  humano procedente de un locus de inmunoglobulina, donde el ratón expresa una proteína no humana no de inmunoglobulina procedente del locus de inmunoglobulina. La proteína no humana no de inmunoglobulina es una proteína ADAM o un homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma.
- 15 La proteína no humana no de inmunoglobulina puede ser una proteína de roedor. El roedor puede ser de la familia *Muridae*. El roedor puede ser de la subfamilia *Murinae*. El roedor puede seleccionarse de un ratón, una rata y un hámster.  
Los dominios  $V_H$  y  $V_L$  pueden estar unidos directamente o a través de un enlazador a una secuencia de un dominio constante de la inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante puede comprender una secuencia seleccionada entre una bisagra, una  $C_H2$  una  $C_H3$ , y una de sus combinaciones. El dominio  $V_L$  humano se puede seleccionar entre un dominio  $V_k$  o un dominio VA.
- 20 Se describe un ratón, que comprende una secuencia de inmunoglobulina humana contigua a una secuencia no humana que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo u homólogo o su fragmento funcional.
- 25 La secuencia de inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos del gen  $V_H$ , uno o más segmentos del gen  $D_H$  y uno o más segmentos del gen  $J_H$ .
- 30 En una realización, la secuencia de la inmunoglobulina comprende uno o más segmentos génicos  $V_H$  que tienen una elevada frecuencia en los repertorios humanos naturales. En una realización específica, el uno o más segmentos génicos  $V_H$  comprende no más de dos segmentos génicos  $V_H$ , no más de tres segmentos génicos  $V_H$ , no más de cuatro segmentos génicos  $V_H$ , no más de cinco segmentos génicos  $V_H$ , no más de seis segmentos génicos  $V_H$ , no más de siete segmentos génicos  $V_H$ , no más de ocho segmentos génicos  $V_H$ , no más de nueve segmentos génicos  $V_H$ , no más de 10 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 11 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 12 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 13 segmentos del gen  $V_H$ , no más de 14 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 15 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 16 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 17 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 18 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 19 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 20 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 21 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 22 segmentos génicos  $V_H$  o no más de 23 segmentos génicos  $V_H$ .
- 35  $V_H$ , no más de 13 segmentos del gen  $V_H$ , no más de 14 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 15 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 16 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 17 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 18 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 19 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 20 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 21 segmentos génicos  $V_H$ , no más de 22 segmentos génicos  $V_H$  o no más de 23 segmentos génicos  $V_H$ .
- 40 En una realización específica, el uno o más segmentos génicos  $V_H$  comprende cinco segmentos génicos  $V_H$ . En una realización específica, el uno o más segmentos génicos  $V_H$  comprende 10 segmentos génicos  $V_H$ . En una realización específica, el uno o más segmentos génicos  $V_H$  comprende 15 segmentos génicos  $V_H$ . En una realización específica, el uno o más segmentos génicos  $V_H$  comprende 20 segmentos génicos  $V_H$ .
- 45 En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H6-1}$ ,  $V_{H1-2}$ ,  $V_{H1-3}$ ,  $V_{H2-5}$ ,  $V_{H3-7}$ ,  $V_{H1-8}$ ,  $V_{H3-9}$ ,  $V_{H3-11}$ ,  $V_{H3-13}$ ,  $V_{H3-15}$ ,  $V_{H3-16}$ ,  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H3-20}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H1-24}$ ,  $V_{H2-26}$ ,  $V_{H4-28}$ ,  $V_{H3-30}$ ,  $V_{H4-31}$ ,  $V_{H3-33}$ ,  $V_{H4-34}$ ,  $V_{H3-35}$ ,  $V_{H3-38}$ ,  $V_{H4-39}$ ,  $V_{H3-43}$ ,  $V_{H1-45}$ ,  $V_{H1-46}$ ,  $V_{H3-48}$ ,  $V_{H3-49}$ ,  $V_{H5-51}$ ,  $V_{H3-53}$ ,  $V_{H1-58}$ ,  $V_{H4-59}$ ,  $V_{H4-61}$ ,  $V_{H3-64}$ ,  $V_{H3-66}$ ,  $V_{H1-69}$ ,  $V_{H2-70}$ ,  $V_{H3-72}$ ,  $V_{H3-73}$  y  $V_{H3-74}$ .
- 50 En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H1-2}$ ,  $V_{H1-8}$ ,  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H1-46}$ ,  $V_{H1-69}$ ,  $V_{H3-7}$ ,  $V_{H3-9}$ ,  $V_{H3-11}$ ,  $V_{H3-13}$ ,  $V_{H3-15}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-30}$ ,  $V_{H3-33}$ ,  $V_{H3-43}$ ,  $V_{H3-48}$ ,  $V_{H4-31}$ ,  $V_{H4-34}$ ,  $V_{H4-39}$ ,  $V_{H4-59}$ ,  $V_{H5-51}$  y  $V_{H6-1}$ .
- 55 En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H1-46}$ ,  $V_{H1-69}$ ,  $V_{H3-7}$ ,  $V_{H3-11}$ ,  $V_{H3-15}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-30}$ ,  $V_{H3-33}$ ,  $V_{H3-48}$ ,  $V_{H4-34}$ ,  $V_{H4-39}$ ,  $V_{H4-59}$  y  $V_{H5-51}$ .
- En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H1-46}$ ,  $V_{H1-69}$ ,  $V_{H3-7}$ ,  $V_{H3-11}$ ,  $V_{H3-15}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-30}$ ,  $V_{H3-33}$ ,  $V_{H3-48}$ ,  $V_{H4-34}$ ,  $V_{H4-39}$ ,  $V_{H4-59}$  y  $V_{H5-51}$ .
- 60 En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H3-11}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-30}$ ,  $V_{H4-39}$  y  $V_{H4-59}$ .
- En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-30}$  y  $V_{H4-39}$ .
- 65 En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H3-23}$  y  $V_{H4-39}$ .

En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-23}$  y  $V_{H3-30}$ .

En varias realizaciones, los segmentos génicos  $V_H$  se seleccionan entre  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-30}$  y  $V_{H4-39}$ .

5 En una realización específica, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende segmentos de los genes 18  $V_H$ , segmentos de los genes 27  $D_H$  y seis segmentos de los genes  $J_H$ . En una realización específica, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende segmentos de los genes 39  $V_H$ , segmentos de los genes 27  $D_H$  y seis segmentos de los genes  $J_H$ . En una realización específica, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende segmentos de los genes 80  $V_H$ , segmentos de los genes 27  $D_H$  y seis segmentos de los genes  $J_H$ .

10 El animal no humano es un ratón, y el ratón comprende una sustitución de segmentos endógenos de genes  $V_H$  de ratón con uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos, en el que los segmentos génicos  $V_H$  humanos se unen operativamente a un gen de la región  $C_H$  de ratón, de tal manera que el ratón reordena los segmentos génicos  $V_H$  humanos y expresa una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio de  $V_H$  humano y un dominio de  $C_H$  de ratón. En una realización, un 90-100 % de segmentos no reordenados del gen  $V_H$  de ratón se sustituyen con al menos un segmento no reordenado de un segmento del gen  $V_H$  humano. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos endógenos del gen  $V_H$  de ratón están sustituidos con al menos un segmento no reordenado del gen  $V_H$  humano. En una realización, la sustitución es con al menos 19, al menos 39, o al menos 80 u 81 segmentos no reordenados del gen  $V_H$  humano. En una realización, la sustitución es con al menos 12 segmentos funcionales no reordenados de segmentos génicos  $V_H$  humanos, al menos 25 segmentos funcionales no reordenados de segmentos génicos  $V_H$  humanos, o al menos 43 segmentos funcionales no reordenados de segmentos génicos  $V_H$  humanos. En una realización, el ratón comprende una sustitución de todos los segmentos  $D_H$  y  $J_H$  de ratón con al menos un segmento no reordenado de  $D_H$  humano y al menos un segmento no reordenado de  $J_H$  humano. En una realización, el al menos un segmento no reordenado de un segmento  $D_H$  humano se selecciona de 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, 7-27, y una de sus combinaciones. En una realización, el al menos un segmento no reordenado de un segmento  $J_H$  humano se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, y una de sus combinaciones. En una realización específica, el uno o más segmentos génicos  $V_H$  humanos se selecciona de un segmento 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5,3-7; 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 del gen  $V_H$  humano, y una de sus combinaciones.

30 En varias realizaciones, la secuencia de la inmunoglobulina humana está unida operativamente con una región constante en la línea germinal del ratón (por ejemplo, el roedor, por ejemplo, el ratón, rata, o hámster). En una realización, la región constante es una región constante humana, quimérica humana/de ratón o quimérica humana/de rata o quimérica humana/de hámster, de ratón, de rata, o de hámster. En una realización, la región constante es una región constante de roedor (por ejemplo, de ratón o rata o hámster). En una realización específica, el roedor es un ratón o una rata. En varias realizaciones, la región constante comprende al menos un dominio  $C_{H2}$  y un dominio  $C_{H3}$ .

40 El ratón puede comprender además una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana (por ejemplo, una o más secuencias no reordenadas de V y J de la cadena ligera, o una o más secuencias reordenadas de VJ) en la línea germinal del animal no humano. La secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina puede ser una secuencia de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina. La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede comprender uno o más segmentos génicos  $V_L$ . La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede comprender uno o más segmentos de los genes  $J_L$ . La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede comprender uno o más segmentos génicos  $V_L$  y uno más segmentos de los genes  $J_L$ . La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede comprender al menos segmentos de los genes 16  $V_k$  y cinco segmentos de los genes  $J_k$ . La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede comprender al menos segmentos de los genes 30  $V_k$  y cinco segmentos de los genes  $J_k$ . La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede comprender al menos segmentos de los genes 40  $V_k$  y cinco segmentos de los genes  $J_k$ . La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede estar unida operativamente con una región constante en la línea germinal del ratón. La región constante puede ser una región constante humana, quimérica humana/de roedor ratón, rata, o de hámster. La región constante puede ser una región constante de ratón o de rata. La región constante puede ser una región constante  $\kappa$  de ratón ( $mC_k$ ) o una región constante  $\kappa$  de rata ( $rC_k$ ).

55 El ratón puede comprender una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_k$  y del gen  $J_k$  con al menos seis segmentos génicos  $V_k$  y al menos un segmento del gen  $J_k$ . Todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_k$  y  $J_k$  se pueden sustituir por al menos 16 segmentos génicos  $V_k$  humanos ( $V_k$  humano) y al menos un segmento del gen  $J_k$ . Todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_k$  y  $J_k$  se pueden sustituir por al menos 30 segmentos génicos  $V_k$  humanos, y al menos un segmento del gen  $J_k$ . Todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_k$  y  $J_k$  se pueden sustituir por al menos 40 segmentos génicos  $V_k$  y al menos un segmento del gen  $J_k$ . El al menos un segmento del gen  $J_k$  puede comprender dos, tres, cuatro, o cinco segmentos de los genes  $J_k$ .

65 Los segmentos génicos  $V_k$  pueden comprender  $V_k$  4-1,  $V_k$ 5-2,  $V_k$ 7-3,  $V_k$ 2-4,  $V_k$ 1-5, y  $V_k$ 1-6. En una realización, los

segmentos génicos  $V_k$  comprenden  $V_k$  3-7,  $V_{k1}$ -8,  $V_{k1}$ -9,  $V_{k2}$ -10,  $V_{k3}$ -11,  $V_{k1}$ -12,  $V_{k1}$ -13,  $V_{k2}$ -14,  $V_{k3}$ -15 y  $V_{k1}$ -16. Los segmentos génicos  $V_k$  pueden comprender  $V_k$  1-17,  $V_{k2}$ -18,  $V_{k2}$ -19,  $V_{k3}$ -20,  $V_{k6}$ -21,  $V_{k1}$ -22,  $V_{k1}$ -23,  $V_{k2}$ -24,  $V_{k3}$ -25,  $V_{k2}$ -26,  $V_{k1}$ -27,  $V_{k2}$ -28,  $V_{k2}$ -29, y  $V_{k2}$ -30. Los segmentos génicos  $V_k$  pueden comprender  $V_k$  3-31,  $V_{k1}$ -32,  $V_{k1}$ -33,  $V_{k3}$ -34,  $V_{k1}$ -35,  $V_{k2}$ -36,  $V_{k1}$ -37,  $V_{k2}$ -38,  $V_{k1}$ -39, y  $V_{k2}$ -40.

5 Los segmentos génicos  $V_k$  pueden comprender segmentos contiguos del gen  $\kappa$  de la inmunoglobulina que abarcan el locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina desde  $V_{k4}$ -1 a  $V_{k2}$ -40, y los segmentos de los genes  $J_k$  comprenden segmentos contiguos del gen que abarcan el locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina desde  $J_{k1}$  a  $J_{k5}$ .

10 La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede localizarse en un locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina en la línea germinal del ratón puede ser un locus de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina. La secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana puede localizarse en un locus de la cadena ligera no de inmunoglobulina en la línea  
15 germinal del ratón que es transcripcionalmente activo. El locus no de inmunoglobulina puede ser un locus ROSA26.

Se describe un método para crear un anticuerpo humano, donde el anticuerpo humano comprende dominios variables derivados de una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable codificadas en una célula de ratón que se describe en el presente documento.

20 Se describe una composición farmacéutica, que comprende un polipéptido que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se deriva de una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable aisladas de ratón que se describe en el presente documento. El polipéptido puede ser un anticuerpo. El polipéptido puede ser un anticuerpo con una única cadena pesada. El polipéptido puede ser un fragmento de la región variable monocatenario (por ejemplo, un scFv).  
25

Se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para preparar un anticuerpo. El anticuerpo puede comprender uno o más dominios variables que se derivan de secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables aisladas de ratón. Las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable pueden comprender segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable pueden comprender segmentos génicos de la cadena ligera de la inmunoglobulina.  
30

### Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas. Salvo que se indique otra cosa, se indica la temperatura en grados Celsius, y la presión es o está próxima a la atmosférica.

#### 40 Ejemplo 1

##### Humanización de genes de la inmunoglobulina de ratón

45 Se han usado cromosomas artificiales bacterianos humanos y de ratón (BAC) para diseñar mediante ingeniería genética 13 vectores directores BAC (BACvec) diferentes para la humanización de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina de ratón. Las tablas 1 y 2 definen las descripciones de las etapas realizadas para la construcción de todos los BACvec empleados para la humanización de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina, respectivamente.

50 **Identificación de BAC humanos y de ratón.** BAC de ratones que abarcan los extremos 5' y 3' de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina se identificaron mediante la hibridación de los filtros manchados con una biblioteca de BAC o mediante combinados de ADN de una biblioteca de BAC de ratones seleccionados mediante PCR. Se hibridaron los filtros en condiciones normalizadas utilizando sondas que se correspondían con las regiones de interés. Se cribaron las bibliotecas mediante la PCR utilizando parejas de cebadores únicos que flanquean la región diana de interés. Se realizó una PCR adicional utilizando los mismos cebadores para deconvolucionar un pocillo dado y aislar los BAC de interés correspondientes. Se generaron filtros y bibliotecas combinadas de BAC a partir de células de ratones 129 Svj (Incyte Genomics/Invitrogen). Los BAC humanos que cubren la totalidad de los loci de la cadena pesada y de la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina se identificaron tanto mediante hibridación de los filtros manchados con la biblioteca de BAC (Caltech B, C, como las bibliotecas D y la biblioteca RPCI-11, Research Genetics/Invitrogen) mediante el cribado de combinados de bibliotecas de BAC humanos (biblioteca Caltech, Invitrogen) mediante un método basado en la PCR o utilizando una base de datos de secuencias terminales de BAC (biblioteca Caltech D, TIGR).  
60

65 **Construcción de BACvec mediante recombinación homóloga bacteriana y ligadura.** Se realizó la recombinación homóloga bacteriana (BHR) como se ha descrito (Valenzuela *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1998, A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*, Nat Genet 20:123-128). En la mayor parte de

casos, se generaron fragmentos lineales mediante secuencias de homología generadas mediante PCR de ligadura para casetes clonados mediante aislamiento en gel de productos de ligadura y electroporación en bacterias competentes para BHR que hospedaban los BAC diana. Tras la selección en placas petri con antibióticos adecuados, se identificaron los BAC recombinados correctamente mediante PCR a través de ambas uniones novedosas seguido por un análisis de restricción en geles de campo pulsado (Schwartz y Cantor, 1984, Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, Cell 37:67-75) y se comprobaron las manchas mediante la PCR usando cebadores distribuidos a través de las secuencias humanas.

Se construyó BACvec 3hV<sub>H</sub> utilizando tres etapas secuenciales de BHR para la etapa inicial de humanización del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (FIG. 4A y Tabla 1). En la primera etapa (Etapa 1) se introdujo un casete en un BAC humano progenitor en la dirección 5' a partir del segmento del gen V<sub>H</sub>1-3 humano que contiene una región de homología con el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón (HB1), un gen que confiere resistencia a la kanamicina en bacterias y resistencia a G418 en células animales (kanR) y un sitio de recombinación específico de emplazamiento (por ejemplo, IOxP). En la segunda etapa (Etapa 2) se introdujo un segundo casete exactamente en la dirección 3' desde el último segmento de J<sub>H</sub> que contiene una segunda región de homología con el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (HB2) y un gen que confiere resistencia en bacterias a la espectinomicina (specR). Esta segunda etapa incluyó eliminar las secuencias del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina en la dirección 3' entre J<sub>H</sub>6 y el gen de resistencia al cloranfenicol del vector BAC (cmR). En la tercera etapa (Etapa 3) el BAC humano modificado por duplicado (B1) se linealizó a continuación utilizando los sitios I-Ceul que se habían añadido en las primeras dos etapas y se integró en un BAC de ratón (B2) mediante BHR a través de las dos regiones de homología (HB1 y HB2). Se diseñaron las selecciones de fármacos para que la primera (cm/kan), segunda (spec/kan) y tercera (cm/kan) etapas fueran específicas de los productos deseados. Los clones de BAC modificados se analizaron mediante electroforesis en gel en campo pulsado (PGFE) tras digestión con enzimas de restricción para determinar la construcción adecuada (FIG. 4B).

De una manera similar, se diseñaron mediante ingeniería genética 12 BACvec adicionales para la humanización de los loci de la cadena pesada y los loci de la cadena ligera κ. En algunos casos, se realizó la ligadura de BAC en lugar de BHR para unir dos BAC grandes mediante la introducción de sitios de restricción raros en ambos BACvec progenitores mediante BHR junto con una cuidadosa colocación de los marcadores seleccionables. Esto permitió la supervivencia del producto de ligadura deseado tras la selección con combinaciones específicas de fármacos marcadores. Se identificaron los BAC recombinantes mediante ligadura tras la digestión con enzimas de digestión raros y se cribaron de una manera similar a los obtenidos mediante BHR (como se ha descrito anteriormente).

Tabla 1

BACvec	Etapas	Descripción	Proceso
3hV <sub>H</sub>	1	Inserción de la secuencia de homología de ratón en la dirección 5' del BAC proximal humano CTD-2572o2	BHR
	2	Inserción de la secuencia de homología de ratón en la dirección 3' del BAC proximal humano CTD-2572o2	BHR
	3	Inserción de 3hV <sub>H</sub> /27hD <sub>H</sub> /9hJ <sub>H</sub> en el BAC proximal de ratón CT7-302a07 para crear 3hV <sub>H</sub> BACvec	BHR
DC	1	Insertar el casete en el extremo distal del locus de IgH de ratón utilizando el BAC CT7/253i20	BHR
18hV <sub>H</sub>	1	Insertar el marcador specR en la dirección 3' terminal de la inserción de 3hV <sub>H</sub> utilizando el BAC humano CTD-2572o2	BHR
	2	Insertar los sitios I-Ceul y Not que flanquean puroR en la dirección 5' terminal de la inserción de 3hV <sub>H</sub>	BHR
	3	Insertar el sitio Not en la dirección 3' del BAC Rel2-408p02 (≈10 kb en la dirección 3' de V <sub>H</sub> 2-5)	BHR
	4	Insertar el sitio I-Ceul en la dirección 5' del BAC Rel2-408p02 (≈23 kb en la dirección 5' de V <sub>H</sub> 1-18)	BHR
	5	Ligar el fragmento de 184kb procedente de la etapa 4 en el vector de 153kb procedente de la etapa 2	Ligadura
	6	Disminuir la homología humana del BAC CTD-2572o2 eliminar ≈85kb y dejar una homología de 65kb a 3hV <sub>H</sub>	BHR
	7	Insertar el casete y el sitio Not en el extremo distal del locus de IgH de ratón en el BAC CT7-253i20	BHR
	8	Subclonar el brazo de homología distal del ratón para la inserción en la dirección 5' de los BAC humanos	Ligadura
	9	Insertar 20 kb del brazo de ratón en la dirección 5' de Rel2-408p02	BHR
	10	Intercambiar el casete de selección de hygR a neoR para crear el BACvec 18hV <sub>H</sub>	BHR

(continuación)

BACvec	Etapas	Descripción	Proceso
39hV <sub>H</sub>	1	Insertar los sitios I-CeuI y PI-SceI que flanquean hygR en el extremo distal del BAC humano CTD 2534n10	BHR
	2	Insertar CmR en el extremo proximal del BAC CTD-2534n10 para permitir la selección para la ligadura del BAC RP11-72n10	BHR
	3	Insertar el sitio PI-SceI en el BAC RP11-72n10 para la ligadura del BAC CTD-2534n10	BHR
	4	Insertar los sitios I-CeuI y Ascl que flanquean puroR en el extremo distal del BAC RP11-72n10	BHR
	5	Ligar un fragmento de 161 kb procedente de la construcción de la etapa 4 en la construcción de la etapa 2 sustituyendo hygR	Ligadura
	6	Insertar los sitios neoR y Ascl en el extremo proximal del brazo de homología distal del ratón utilizando el BAC CT7-253i20	BHR
	7	Insertar los sitios specR e I-CeuI en el extremo distal del brazo de homología distal de ratón	BHR
	8	Ligar el brazo de homología distal de ratón en la inserción humana de la etapa 5	Ligadura
	9	Intercambiar el casete de selección de neo a hyg utilizando UbCp y pA como secuencias de homología para crear el BACvec 39hV <sub>H</sub>	BHR
53hV <sub>H</sub>	1	Insertar specR en el extremo proximal del BAC CTD-3074b5 humano	BHR
	2	Insertar el sitio Ascl en el extremo distal del BAC CTD-3074b5 humano	BHR
	3	Insertar los sitios hygR y Ascl en el extremo proximal del brazo de homología distal del ratón utilizando el BAC CT7-253i20	BHR
	4	Ligar el brazo de homología distal del ratón en la construcción de la etapa 2	Ligadura
	5	Intercambiar el casete de selección de hyg a neo utilizando UbCp y pA como secuencias de homología para crear el BACvec 53hV <sub>H</sub>	BHR
70hV <sub>H</sub>	1	Insertar los sitios PI-SceI y I-CeuI que flanquean spec en el extremo distal del BAC CTD-2195p5 humano	BHR
	2	Insertar el sitio I-CeuI en el extremo proximal del BAC RP11-926p12 para la ligadura al BAC CTD-2195p5	BHR
	3	Insertar los sitios PI-SceI y Ascl en el extremo distal del BAC RP11-926p12 para la ligadura del brazo de ratón	BHR
	4	Ligar el brazo de homología distal del ratón en la construcción de la etapa 3	Ligadura
	5	Ligar el brazo de homología distal del ratón y el fragmento higH del BAC RP11-926p12 en el BAC CTD-2195p5 para crear el BACvec 70 hV <sub>H</sub>	Ligadura
80hV <sub>H</sub>	1	Insertar los sitios I-CeuI y Ascl que flanquean hygR en el extremo distal del BAC CTD-2313e3	BHR
	2	Ligar el brazo de homología distal del ratón en el BAC CTD-2313e3 humano de la etapa 1 para crear el BACvec 80hV <sub>H</sub>	Ligadura

Tabla 2

BACvec	Etapas	Descripción	Proceso
Igk-PC	1	Insertar el sitio loxP en el intrón J-C de ratón utilizando el BAC CT7-254m04	BHR
Igk-DC	1	Insertar el sitio loxP en el extremo distal del locus Igk de ratón utilizando el BAC CT7-302g12	BHR
6hVk	1	Insertar el sitio PI-SceI = 400 pb en la dirección de hJk5 en el BAC CTD-2366j12	BHR
	2	Insertar los sitios I-CeuI y Ascl que flanquean hygR en el extremo distal del BAC CTD-2366j12	BHR
	3	Insertar sitios I-CeuI y PI-SceI flanqueando puroR en la dirección 3' de mJk utilizando el BAC CT7-254m04	BHR
	4	Insertar hIgVk/Jk en la dirección 5' de Enhk/Ck de ratón utilizando la construcción de la etapa 3	Ligadura
	5	Sustituir cmR en la construcción de la etapa 4 con specR	BHR
	6	Insertar el casete de selección Neo en el extremo distal del locus Igk de ratón utilizando el locus Igk del BAC CT7-302g12	BHR
	7	Ligar el brazo de homología distal de ratón en la dirección 5' de la inserción humana en la construcción de la etapa 6 para crear el BACvec 6hVk	Ligadura

(continuación)

BACvec	Etapa	Descripción	Proceso
16hVk	1	Insertar NeoR en el extremo distal del BAC RP11-1061b13	BHR
	2	Sustituir cmR en la construcción de la etapa 1 con specR	BHR
	3	Insertar el casete de selección Hyg en el extremo distal del locus de Igk de ratón utilizando el BAC CT7-302g12	BHR
	4	Ligar el brazo de homología distal en la dirección 5' de la inserción humana de la construcción de la etapa 2 para crear el BACvec 16hVk	Ligadura
30hVk	1	Insertar HygR en el extremo distal del BAC RP11-99g6 BAC	BHR
	2	Sustituir cmR en la construcción de la etapa 1 con specR	BHR
	3	Insertar el casete de selección Neo en el extremo distal del locus Igk de ratón utilizando el locus Igk del BAC CT7-302g12	BHR
	4	Ligar el brazo de homología distal del ratón de la inserción humana de la construcción de la etapa 2 para crear el BACvec 30hVk	Ligadura
40hVk	1	Insertar NeoR en el extremo distal del locus en el BAC CTD-2559d6	BHR
	2	Sustituir cmR en la construcción de la etapa 1 con specR	BHR
	3	Ligar el brazo de homología distal de ratón en la dirección 5' de la inserción humana en la construcción de la etapa 2 para crear el BACvec 40hVk	Ligadura

**Modificación de embriocitoblastos (ES) y generación de ratones.** Se realizó el direccionamiento de células ES (F1H4) utilizando el método de ingeniería genética VELOCIGENE® como se describe (Valenzuela *et al.*, 2003).

5 Derivation of mice from modified ES cells by either blastocyst (Valenzuela *et al.*, 2003) o mediante inyección de células 8 (Poueymirou *et al.*, 2007, F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses, Nat Biotechnol 25:91-99) como se ha descrito. Se confirmaron las células y los ratones ES dirigidos cribando el ADN de células o ratones ES con conjuntos únicos de sondas y cebadores en un ensayo basado en la PCR (por ejemplo, FIG. 3A, 3B y 3C). Todos los estudios en ratones fueron supervisados y homologados por el Regeneron's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

**Análisis del cariotipo e hibridación fluorescente *in situ* (FISH).** El análisis del cariotipo fue realizado por el Coriell Cell Repositories (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ). Se realizó FISH en células ES dirigidas tal como se ha descrito (Valenzuela *et al.*, 2003). Las sondas que correspondían tanto a ADN de BAC de ratón o ADN de BAC humano se marcaron mediante traducción de mellas (Invitrogen) con los nucleótidos dUTP marcados fluorescentemente en el espectro del naranja o en el espectro del verde (Vysis).

**Locus génico de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.** Se consiguió la humanización de la región variable del locus de la cadena pesada en nueve etapas secuenciales mediante la sustitución directa de aproximadamente tres millones de pares de bases (Mb) de una secuencia genómica contigua de ratón que contenía todos los segmentos génicos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> con aproximadamente un Mb de secuencia genómica contigua humana que contenía los segmentos génicos equivalentes humanos (FIG. 1A y Tabla 1) utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos. N.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.*, 2003).

25 El intrón entre los segmentos génicos J<sub>H</sub> y los genes de la región constante (el intrón J-C) Contiene un potenciador de la transcripción (Neuberger, 1983, Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells, EMBO J 2:1373-1378) seguido de repeticiones simples requeridas para la recombinación durante el cambio de isotipo (Kataoka *et al.*, 1980, Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch, PNAS USA 77:919-923). Se seleccionó la unión entre la región V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> humana y la región C<sub>H</sub> de ratón (la unión proximal) para mantener el potenciador intrónico de la cadena pesada de ratón y el dominio de cambio a fin de preservar la expresión eficaz y el cambio de clase del locus humanizado de la cadena pesada en el ratón. La posición exacta de los nucleótidos de estas y posteriores uniones en todas las sustituciones fue posible mediante el uso del método de ingeniería genética VELOCIGENE® (*más arriba*), que empleó la recombinación homóloga bacteriana impulsada por los oligonucleótidos sintetizados. De esta manera, la unión proximal se colocó aproximadamente 200 pb en la dirección 3' del último segmento del gen J<sub>H</sub> y la unión distal se colocó algunos cientos en la dirección 5' del segmento 5' de la mayoría de genes V<sub>H</sub> del locus humano y aproximadamente 9 kb en la dirección 3' del segmento génico V<sub>H</sub>1-86 de ratón, conocido también como J558.55. El segmento génico V<sub>H</sub>1-86 (J558.55) es el segmento génico de la región variable más distal, notificado por ser un pseudogén en ratones C57BL/6, pero potencialmente activo, pero con una secuencia RSS mal caracterizada, en el alelo 129 diana. El extremo distal del locus de la cadena pesada de ratón puede contener tal como se informa

elementos de control que regulan la expresión y/o la reordenación del locus (Pawlizky *et al.*, 2006).

Se consiguió una primera inserción de la secuencia de ADN de la inmunoglobulina humana en el ratón utilizando 144 kb del extremo proximal del locus de la cadena pesada humana que contenía los segmentos de los genes 3 V<sub>H</sub>, 27 D<sub>H</sub> y 9 J<sub>H</sub> humano insertados en el extremo proximal del locus IgH de ratón, con una delección de 16,6 kb simultánea de la secuencia genómica de ratón, utilizando 75 kb de los brazos de homología del ratón (Etapa A, FIG. 2A; Tablas 1 y 3, 3hV<sub>H</sub>). Esta inserción grande de 144 kb y la delección de 16,6 kb acompañante se realizó en una única etapa (Etapa A) que se produjo con una frecuencia de 0,2 % (Tabla 3). Las células ES correctamente dirigidas se puntuaron mediante un ensayo de pérdida de alelos no naturales (LONA) (Valenzuela *et al.*, 2003) utilizando sondas en y que flanqueaban la secuencia eliminada de ratón y en la secuencia humana insertada, y se verificó la integridad de la inserción grande en ser humano utilizando sondas múltiples que abarcaban la inserción completa (FIG. 3A, 3B y 3C). Debido a que se anticiparon muchos ciclos de direccionamiento secuencial de células ES, los clones de células ES diana en esta, y todas las etapas posteriores, se sometieron a análisis cariotípico (más arriba) y solo aquellos clones que mostraban cariotipos normales en al menos 17 de 20 propagaciones para las etapas posteriores.

Las células ES dirigidas de la Etapa A se redirigieron con el BACvec que produjeron una delección de 19 kb en el extremo distal del locus de la cadena pesada (Etapa B, La FIG. 2A). El BACvec de la Etapa B contenía un gen de resistencia a la higromicina (hyg) en contraste con el gen de resistencia a la neomicina (neo) contenido en el BACvec de la Etapa A. Los genes de resistencia procedentes de los dos BACvec se diseñaron de tal manera que, tras el direccionamiento satisfactorio en el mismo cromosoma, aproximadamente tres Mb del locus génico de la región variable de la cadena pesada de ratón que contenía todos los segmentos génicos V<sub>H</sub> de ratón diferentes de V<sub>H</sub>1-86 y todos los segmentos de los genes D<sub>H</sub> diferentes de DQ52, así como los dos genes de resistencia, estaban flanqueados por sitios loxP; DQ52 y todos los segmentos génicos de la cadena J<sub>H</sub> de ratón se eliminaron en la Etapa A. se identificaron clones de células ES doblemente dirigidos en el mismo cromosoma impulsando el casete proximal 3hV<sub>H</sub> para la homocigosidad en G418 de expresión elevada (Mortensen *et al.*, 1992, Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct, Mol Cell Biol 12:2391-2395) y siguiendo el comportamiento del casete hyg distal. Los segmentos de ratón de hasta cuatro Mb de tamaño, que se han modificado de forma que estén flanqueados por sitios loxP, se han eliminado satisfactoriamente en células ES mediante la expresión transitoria de la recombinasa CRE con eficacias elevadas (hasta ≈11 %) incluso en ausencia de selección de fármacos (Zheng *et al.*, 2000, Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications, Mol Cell Biol 20:648-655). De una manera similar, los inventores consiguieron una delección de tres Mb en un 8 % de los clones de células ES tras la expresión transitoria de CRE (Etapa C, La FIG. 2A; Tabla 3). La delección se puntuó mediante el ensayo LONA utilizando sondas en cualquier extremo de la secuencia de ratón eliminada, así como la pérdida de neo y hyg y la aparición de un producto de la PCR a lo largo del punto de delección que contenía el único sitio loxP restante. Además, Se confirmó la delección mediante hibridación *in situ* (no se muestran los datos).

Se añadió el resto de la región variable de la cadena pesada humana al alelo 3hV<sub>H</sub> en una serie de 5 etapas utilizando el método de ingeniería genética VELOCIGENE® (Etapas E-H, La FIG. 2B), implicando cada etapa la inserción precisa de hasta 210 kb de secuencias génicas humanas. Para cada etapa, se diseñó el extremo proximal de cada nuevo BACvec para solapar las secuencias humanas más distales de la etapa previa y el extremo distal de cada nuevo BACvec contenía la misma región distal de homología del ratón que se usó en la Etapa A. Los BACvec de las etapas D, F y H contenían los casetes de selección neo, mientras que aquellos de las etapas E y G contenían los casetes de selección hyg, de esta manera, las selecciones se alternaron entre G418 e higromicina. Se evaluó el direccionamiento en la Etapa D mediante la pérdida del único producto de la PCR a lo largo del sitio loxP del alelo híbrido 3hV<sub>H</sub>. Se evaluó el direccionamiento de las Etapas E a I mediante la pérdida del casete de selección previo. En la etapa final (Etapa I, La FIG. 2B), el casete de selección neo, flanqueado por sitios Frt (McLeod *et al.*, 1986, Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the Saccharomyces cerevisiae plasmid 2 microns circle, Mol Cell Biol 6:3357-3367), se eliminó mediante la expresión transitoria de FLPe (Buchholz *et al.*, 1998, Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis, Nat Biotechnol 16:657-662). Se derivaron las secuencias humanas de los BACvec para las Etapas D, E y G de cada uno de los dos BAC progenitores humanos, mientras que los de las Etapas F y H fueron de BAC individuales. Se confirmó la retención de las secuencias humanas en cada etapa utilizando sondas múltiples que abarcaban las secuencias humanas insertadas (como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, FIG. 3A, 3B y 3C). Solo se hicieron avanzar a la siguiente etapa los clones con cariotipo normal y una línea germinal potencial. Las células ES de la etapa final fueron aún capaces de contribuir a la línea germinal después de nueve manipulaciones secuenciales (Tabla 3). Fueron viables los ratones homocigóticos para cada uno de los alelos de la cadena pesada, aparecieron sanos y demostraron un sistema inmune humoral esencialmente natural (véase el Ejemplo 3).

60

**Tabla 3**

Alelo híbrido	Secuencia humana	Construcción directora	Eficacia directora	% de utilización	V <sub>H</sub> total	V <sub>H</sub> funcional
3hV <sub>H</sub>	144 kb	240 kb	0,2 %	5	3	3
3hV <sub>H</sub> /DC	144 kb	110 kb	0,1 %	5	3	3
3hV <sub>H</sub> -CRE	144 kb	-	8 %	5	3	3
18hV <sub>H</sub>	340 kb	272 kb	0,1 %	25	18	12
39hV <sub>H</sub>	550 kb	282 kb	0,2 %	60	39	25
53hV <sub>H</sub>	655 kb	186 kb	0,4 %	65	53	29
70hV <sub>H</sub>	850 kb	238 kb	0,5 %	90	70	39
80hV <sub>H</sub>	940 kb	124 kb	0,2 %	100	80	43
80hV <sub>H</sub> dNeo	940 kb	-	2,6 %	100	80	43

**Locus génico variable de la cadena ligera κ.** La región variable de la cadena ligera κ se humanizó en ocho etapas secuenciales mediante la sustitución directa de aproximadamente tres Mb de la secuencia de ratones que contenía todos los segmentos génicos V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> con aproximadamente 0,5 Mb de la secuencia humana que contenía los segmentos proximales humanos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> de una manera similar a la de la cadena pesada (FIG. 1B; Tablas 2 y 4).

La región variable del locus de la cadena ligera κ humana contiene dos repeticiones de 400 kb casi idénticas separadas por un separador de 800 kb (Weichhold *et al.*, 1993, The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity, Genomics 16:503-511). Como las repeticiones son tan similares, se puede reproducir casi toda la diversidad de locus en ratones utilizando la repetición proximal. Además, se ha notificado la desaparición de la repetición distal del locus de la cadena ligera κ de un alelo humano natural (Schaible *et al.*, 1993, The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals, Hum Genet 91:261-267). Los inventores sustituyeron aproximadamente tres Mb de la secuencia génica de la región variable de la cadena ligera κ de ratón para sustituir eficazmente todos los segmentos génicos V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> de ratón con los V<sub>k</sub> proximales humanos y los segmentos de los genes J<sub>k</sub> humanos (FIG. 2C y 2D; Tablas 2 y 4). En contraste con el método descrito en el Ejemplo 1 para el locus de la cadena pesada, la región completa de genes V<sub>k</sub> de ratón, que contiene todos los segmentos génicos V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub>, se eliminó en un proceso en tres etapas antes de que se añadiera cualquier secuencia humana. En primer lugar, se introdujo un casete neo en el extremo proximal de la región variable (Etapa A, FIG. 2C). A continuación, se insertó un casete hyg en el extremo distal del locus κ (Etapa B, FIG. 2C). Sitios de reconocimiento de la recombinasa (por ejemplo, loxP) se situaron de nuevo en cada casete de selección de tal manera que el tratamiento de CRE indujo la delección de los 3 Mb restantes de la región V<sub>k</sub> de ratón junto con ambos genes de resistencia (Etapa C, La FIG. 2C).

Se insertó un fragmento genómico humano de aproximadamente 480 kb de tamaño que contenía la región variable completa de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina en cuatro etapas secuenciales (FIG. 2D; Tablas 2 y 4), con hasta 150 kb de la secuencia de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina humana insertada en una única etapa, usando métodos similares a los empleados para la cadena pesada (véase el Ejemplo 1). Se eliminó el gen final de resistencia a la higromicina mediante la expresión transitoria de FLPe. Como con la cadena pesada, se evaluaron los clones de células dirigidas para la integridad de la inserción humana completa, el cariotipo normal y la línea germinal potencial tras cada etapa. Se generaron ratones homocigóticos para cada uno de los alelos de la cadena ligera κ y se encontró que tenían una apariencia sana y normal.

**Tabla 4**

Alelo híbrido	Secuencia humana	Construcción directora	Eficacia directora	% de utilización	V <sub>k</sub> total	V <sub>k</sub> funcional
Igκ-PC	0	132 kb	1,1 %	-	-	-
Igκ-PC/DC	0	90 kb	0,4 %	-	-	-
Igκ-CRE	0	-	1 %	-	-	-
6hV <sub>k</sub>	110 kb	122 kb	0,3 %	14	6	4
16hV <sub>k</sub>	240 kb	203 kb	0,4 %	47	16	11
30hV <sub>k</sub>	390 kb	193 kb	0,1 %	70	30	18
40hV <sub>k</sub>	480 kb	185 kb	0,2 %	100	40	25
40hV <sub>k</sub> dHyg	480 kb	-	0,7 %	100	40	25

**Ejemplo 2****Generación de ratones completamente inmunizados mediante combinación de múltiples alelos de inmunoglobulina humanizada**

5 En varios momentos, se microinyectaron las células ES que contienen una porción de repertorios de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana o de repertorios de la región variable de la cadena ligera  $\kappa$  tal como se describen en el Ejemplo 1, y se criaron los ratones resultantes para crear múltiples versiones de ratones VELOCIMMUNE® con fracciones progresivamente más grandes de repertorios de inmunoglobulina de la línea germinal humana (Tabla 5; La FIG. 5A y 5B). Los ratones VELOCIMMUNE® 1 (V1) poseen dieciocho segmentos génicos  $V_H$  humanos y todos los segmentos de los genes  $D_H$  y  $J_H$  humanos combinados con dieciséis segmentos génicos  $V_k$  humanos y todos los segmentos de los genes  $J_k$  humanos. Los ratones VELOCIMMUNE® 2 (V2) y VELOCIMMUNE® (V3) han aumentado los repertorios de la región variable que contienen un total de treinta y nueve  $V_H$  y treinta  $V_k$ , y ochenta  $V_H$  y cuarenta  $V_k$ , respectivamente. Debido a que se han sustituido completamente las regiones genómicas que codifican los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  de ratón y los segmentos génicos  $V_k$  y  $J_k$ , los anticuerpos producidos por todas las versiones de ratones VELOCIMMUNE® contienen regiones variables humanas unidas a regiones constantes de ratón.

20 Los loci de la cadena ligera  $\lambda$  de ratón permanecen intactos en varias realizaciones de ratones VELOCIMMUNE® y sirven como un comparador de la eficacia y la expresión de los diversos loci de la cadena ligera  $\kappa$  de VELOCIMMUNE®.

25 Se generaron ratones doblemente homocigóticos para las humanizaciones de la cadena pesada de inmunoglobulina y las humanizaciones de la cadena ligera  $\kappa$  a partir de un subconjunto de los alelos descritos en el Ejemplo 1. Todos los genotipos observados durante el curso de la reproducción generan ratones doblemente homocigóticos que se producen en proporciones groseramente Mendelianas. La progenie homocigótica de machos para cada uno de los alelos de la cadena pesada humana demostró una fertilidad reducida, que dio como resultado la pérdida de la actividad de ADAM6 de ratón. El locus génico de la región variable de la cadena pesada de ratón contiene dos genes ADAM6 funcionales incluidos (ADAM6a y ADAM6b). Durante la inmunización del locus génico de la región variable de la cadena pesada de ratón, la secuencia genómica humana insertada contenía un pseudogén ADAM6. Puede requerirse ADAM6 de ratón para la fertilidad, y de esta manera, la carencia de genes ADAM6 de ratón en loci génicos variables de la cadena pesada humanizada pueden conducir a una reducción de la fertilidad a pesar de la presencia del pseudogén humano. Los Ejemplos 7-11 describen la genomanipulación de los genes ADAM6 de ratón en un locus génico de la región variable de la cadena pesada humanizada, y la restauración de la fertilidad a nivel natural en ratones con un locus de inmunoglobulina de la cadena pesada humanizada.

**Tabla 5**

Versión de ratón VELOCIMMUNE®	Cadena pesada			Cadena ligera $\kappa$		
	$V_H$ humano	Alelo	Gen $V_H$ 5'	$V_k$	Alelo	Gen $V_k$ 5'
V1	18	18h $V_H$	$V_H$ 1-18	16	16h $V_k$	$V_k$ 1-16,
V2	39	39h $V_H$	$V_H$ 4-39	30	30h $V_k$	$V_k$ 2-29
V3	80	80h $V_H$	$V_H$ 3-74	40	40h $V_k$	$V_k$ 2-40

**Ejemplo 3****40 Poblaciones de linfocitos en ratones con genes de inmunoglobulina humanizados**

Las poblaciones de linfocitos B maduros en las tres versiones diferentes de ratones VELOCIMMUNE® se evaluaron mediante citometría de flujo.

45 En resumen, suspensiones celulares procedentes de la médula ósea, bazo y timo se prepararon con métodos convencionales. Las células se resuspendieron a  $5 \times 10^5$  células/ml en tampón de tinción BD Pharmingen FACS, bloqueado con anticuerpo dirigido contra IgG de ratón CD16/32 (BD Pharmingen), teñido con el cóctel de anticuerpos adecuado y fijado con BD CYTOFIX™, todo ello de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los aglomerados celulares finales se suspendieron en 0,5 ml de tampón de tinción y se analizaron con un BD FACSCALIBUR™ y un programa informático BD CELLQUEST PRO™. Todos los anticuerpos (BD Pharmingen) se prepararon en una masa de dilución/cóctel y se añadieron a una concentración final de 0,5 mg/ $10^5$  células.

55 Los cócteles de anticuerpos para tinción de la médula ósea (A-D) fueron los siguientes: A: IgM<sup>b</sup>-FITC dirigido contra IgG de ratón, IgM<sup>a</sup>-PE dirigido contra IgG de ratón, CD45R(B220)-APC dirigido contra IgG de ratón; B: CD43(S7)-PE dirigido contra IgG de ratón, CD45R(B220)-APC dirigido contra IgG de ratón; C: CD24(HSA)-PE dirigido contra IgG de ratón; CD45R(B220)-APC dirigido contra IgG de ratón; D: BP-1-PE dirigido contra IgG de ratón, CD45R(B220)-APC dirigido contra IgG de ratón.

Los cócteles de anticuerpo para tinción del bazo y el ganglio linfático inguinal (E-H) fueron los siguientes: E: IgM<sup>b</sup>-

5 FITC dirigido contra IgG de ratón, IgM<sup>a</sup>-PE dirigido contra IgG de ratón, CD45R(B220)-APC dirigido contra IgG de ratón; F: Ig, A1, A2, A3 Cadena ligera-FITC dirigido contra IgG de ratón, Ig cadena ligera κ-PE dirigido contra IgG de ratón, CD45R(B220)-APC dirigido contra IgG de ratón; G: Ly6G/C-FITC dirigido contra IgG de ratón, CD49b(DX5)-PE dirigido contra IgG de ratón, CD11b-APC dirigido contra IgG de ratón; H: CD4(L3T4)-FITC dirigido contra IgG de ratón, CD45R(B220)-PE dirigido contra IgG de ratón, CD8a-APC dirigido contra IgG de ratón. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

10 Los linfocitos aislados del bazo o los ganglios linfáticos de ratones VELOCIMMUNE® teñidos para establecer la expresión en la superficie de los marcadores B220 e IgM y se analizaron usando citometría de flujo (FIG. 6). Los tamaños de las poblaciones de linfocitos B B220<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> maduros en todas las versiones de los ratones VELOCIMMUNE® ensayados fueron virtualmente idénticos a los de los ratones silvestres, independientemente del número de segmentos génicos V<sub>H</sub> que contengan. Además, los ratones que contienen loci de la cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada híbrida homocigóticos, incluso los que solamente contienen 3 segmentos génicos V<sub>H</sub> pero loci de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina de ratón normal con loci de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón normal, tuvieron también cifras normales de linfocitos B220<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> en sus compartimentos periféricos (no se muestra). Estos resultados indican que los loci quiméricos con segmentos génicos variables humanos y regiones constantes de ratón pueden poblar completamente el compartimento de linfocitos B maduros. Además, el número de segmentos génicos variables en los loci tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera κ, y por tanto la diversidad teórica del repertorio de anticuerpos, no se correlaciona con la capacidad de generar poblaciones silvestres de linfocitos B maduros. Por el contrario, los ratones con transgenes de inmunoglobulina completamente humana integrados aleatoriamente y loci de inmunoglobulina de ratón inactivados han reducido las cifras de linfocitos B en estos compartimentos, donde la gravedad del déficit depende del número de segmentos génicos variables incluidos en el transgén (Green y Jakobovits, 1998, Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes, J Exp Med 188:483-495). Esto demuestra que la "estrategia de humanización genética *in situ*" da como resultado un resultado funcional fundamentalmente diferente que los transgenes integrados aleatoriamente conseguidos en el enfoque "desactivación genética más transgénica".

30 **Exclusión alélica y selección de locus.** La capacidad de mantener la exclusión alélica se examinó en ratones heterocigóticos para diferentes versiones del locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizado.

35 La humanización de los loci de la inmunoglobulina se llevó a cabo en una línea F1 ES (F1H4, Valenzuela *et al.*, 2003), derivada de los embriones heterocigóticos 129S6ISvEvTac y C57BLI6NTac. Las secuencias génicas variables de la línea germinal de la cadena pesada humana se dirigieron hacia el alelo 129S6, que transporta el haplotipo IgM<sup>a</sup> mientras que el alelo C576BLI6N no modificado de ratón tiene el haplotipo IgM<sup>b</sup>. Estas formas alélicas de IgM se pueden distinguir mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos de los polimorfismos encontrados en los alelos IgM<sup>a</sup> o IgM<sup>b</sup>. Tal como se muestra en la Fig. 6 (fila inferior), los linfocitos B identificados en ratones heterocigóticos para cada versión del locus de la cadena pesada humanizado solamente expresa un único alelo, ya sea IgM<sup>a</sup> (el alelo humanizado) o IgM<sup>b</sup> (el alelo de tipo silvestre). Esto demuestra que los mecanismos implicados en la exclusión alélica están intactos en los ratones VELOCIMMUNE®. Además, el número relativo de linfocitos B positivos para el alelo humanizado (IgM<sup>a</sup>) es aproximadamente proporcional al número de segmentos génicos de V<sub>H</sub> presentes. El locus de inmunoglobulina humanizado se expresa en aproximadamente el 30 % de los linfocitos B en ratones heterocigóticos VELOCIMMUNE® 1, que tienen 18 segmentos génicos V<sub>H</sub>, y un 50 % de los linfocitos B en ratones heterocigóticos VELOCIMMUNE® 2 y 3 (no se muestra), con 39 y 80 segmentos génicos V<sub>H</sub>, respectivamente. De forma notable, la relación de células que expresan el alelo humanizado comparado con el alelo de ratón silvestre (0,5 para ratones VELOCIMMUNE® 1 y 0,9 para ratones VELOCIMMUNE® 2) es mayor que la relación del número de segmentos génicos variables incluidos en los loci humanizados comparados con los loci silvestres (0,2 para ratones VELOCIMMUNE® 1 y 0,4 para ratones VELOCIMMUNE® 2). Esto puede indicar que la probabilidad de selección de alelo es algo intermedio entre una selección aleatoria de uno u otro cromosoma y una selección aleatoria de cualquier RSS de un segmento V particular. Además, puede ser que una fracción de los linfocitos B, pero no todos, en los que un alelo queda accesible para la recombinación, complete el proceso y deshabilite la recombinación antes de que el otro alelo quede accesible. Además, la distribución equitativa de células que tienen IgM superficial (sIgM) derivada bien del locus de la cadena pesada híbrido humanizado o bien el locus de la cadena pesada de ratón silvestre es evidencia de que el locus híbrido está funcionando a su nivel normal. Por el contrario, los transgenes de inmunoglobulina humana integrados aleatoriamente compiten mal con los loci de la inmunoglobulina de ratón silvestre (Bruggemann *et al.*, 1989, A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice, PNAS 86:6709-6713; Green *et al.*, 1994; Tuailon *et al.*, 1993, Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in mu and gamma transcripts, PNAS USA 90:3720-3724). Esto demuestra adicionalmente que las inmunoglobulinas producidas por ratones VELOCIMMUNE® son funcionalmente distintas que las producidas mediante los transgenes integrados aleatoriamente en ratones conseguidos con el enfoque "desactivación genética más transgénica".

65 Los polimorfismos de las regiones C<sub>κ</sub> no están disponibles en 129S6 o C57BLI6N para examinar la exclusión alélica de los loci de cadena ligera κ humanizados en comparación con los no humanizados. Sin embargo, Todos los ratones VELOCIMMUNE® tienen los loci de cadena ligera κ de ratón silvestre, por lo tanto, es posible observar si la

reordenación y la expresión de los loci de cadena ligera  $\kappa$  humanizados pueden evitar la expresión de los loci de cadena ligera  $\kappa$  de ratón. La relación entre el número de células que expresan la cadena ligera  $\kappa$  humanizada con respecto al número de células que expresan la cadena ligera  $\lambda$  de ratón resultó relativamente inalterada en los ratones VELOCIMMUNE® comparados con los ratones silvestres, independientemente del número de segmentos génicos de  $V\kappa$  humana insertados en el locus de cadena ligera  $\kappa$  (FIG. 6, tercera fila desde la parte superior). Además, no se produjo incremento en el número de células doble positivas ( $\kappa$  y  $\lambda$ ), lo que indica que la recombinación productiva en el loci de cadena ligera  $\kappa$  híbrido da como resultado una supresión correcta de la recombinación del loci de cadena ligera  $\lambda$  de ratón. Por el contrario, los ratones que contenían transgenes de cadena ligera  $\kappa$  integrados aleatoriamente junto con loci de cadena ligera  $\kappa$  de ratón inactivados pero con loci de cadena ligera  $\lambda$  de ratón mostraron valores fuertemente aumentados de la relación  $\lambda/\kappa$  (Jakobovits, 1998), lo que implica que los transgenes de la cadena ligera  $\kappa$  introducidos no funcionan bien en este tipo de ratones. Esto demuestra adicionalmente el resultado funcional diferente observado en las inmunoglobulinas preparadas por los ratones VELOCIMMUNE® comparado con los preparados con ratones de tipo "desactivación genética más transgénica".

**Desarrollo de linfocitos B.** Puesto que las poblaciones de linfocitos B maduros en ratones VELOCIMMUNE® se parecen a los de los ratones silvestres (descritos anteriormente), es posible que los defectos en una diferenciación temprana de linfocitos B se compensen con la expansión de las poblaciones de linfocitos B maduros. Las diferentes fases de la diferenciación de los linfocitos B se examinaron mediante el análisis de poblaciones de linfocitos B usando citometría de flujo. La Tabla 6 define la relación de la fracción de células en cada linaje de linfocitos B definida por FACs, usando marcadores específicos de la superficie celular, en ratones VELOCIMMUNE® comparados con las crías homólogas silvestres.

El desarrollo inicial de los linfocitos B se produce en la médula ósea, y las diferentes fases de la diferenciación de linfocitos B se caracterizan por cambios en los tipos y cantidades de expresión de los marcadores de la superficie celular. Estas diferencias en la expresión superficial se correlacionan con los cambios moleculares que se producen en los loci de inmunoglobulina en el interior de la célula. La transición de pro-B a pre-B requiere una reordenación con éxito y la expresión de la proteína de cadena pesada funciona, mientras que la transición de pre-B a la fase B madura está controlada por la reordenación correcta y la expresión de una cadena ligera  $\kappa$  o  $\lambda$ . De esta manera, la transición ineficaz entre las fases de diferenciación de los linfocitos B se puede detectar mediante los cambios en las poblaciones relativas de linfocitos B en una fase dada.

**Tabla 6**

Versión de ratones VELOCIMMUNE®	Médula ósea				Bazo	
	pro-B CD43 <sup>hi</sup> B220 <sup>lo</sup>	pre-B CD24 <sup>hi</sup> B220 <sup>lo</sup>	B220 <sup>lo</sup> inmaduro IgM <sup>+</sup>	Maduro B220 <sup>hi</sup> IgM <sup>+</sup>	B220 <sup>hi</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> emergente	B220 <sup>hi</sup> IgM <sup>+</sup> Maduro
V1	1,1	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0
V2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
V3	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1

No se observaron defectos importantes en la diferenciación de linfocitos B en cualquiera de los ratones VELOCIMMUNE®. La introducción de segmentos génicos de la cadena pesada humana no parece afectar la transición de pro-B a pre-B, y la introducción de segmentos génicos de la cadena ligera  $\kappa$  no afecta la transición de pre-B a B en ratones VELOCIMMUNE®. Esto demuestra que las moléculas "quiméricas inversas" de inmunoglobulina que tienen regiones variables humanas y regiones constantes de ratón funcionan normalmente en el contexto de señalización de linfocitos B y moléculas correceptoras que conducen a una diferenciación adecuada de linfocitos B en un entorno de ratón. Por el contrario, el equilibrio entre las diferentes poblaciones durante la diferenciación de linfocitos B está perturbado en cantidades variables en ratones que contienen transgenes de inmunoglobulina integrados aleatoriamente y loci de cadena pesada o de cadena ligera  $\kappa$  inactivados endógenamente (Green and Jakobovits, 1998).

**Ejemplo 4**

**Repertorio de genes variables en ratones con inmunoglobulina humanizada**

El uso de segmentos génicos variables humanos en el repertorio de anticuerpos humanizados de los ratones VELOCIMMUNE® se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de las regiones variables humanas procedentes de fuentes múltiples incluyendo esplenocitos y células de hibridoma. Se determinaron la secuencia de la región variable, el uso del segmento génico, la hipermutación somática, y la diversidad de unión de los segmentos génicos reordenados de la región variable.

En resumen, el ARN total se extrajo de  $1 \times 10^7$  -  $2 \times 10^7$  esplenocitos o aproximadamente  $10^4$  -  $10^5$  células de hibridoma usando TRIZOL™ (Invitrogen) o Qiagen RNEASY™ Mini Kit (Qiagen) y se cebaron con cebadores específicos de la región constante de ratón usando el sistema de RT-PCR SUPERSRIPT™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen). Las reacciones se realizaron con 2-5  $\mu$ l de ARN de cada muestra usando los cebadores específicos 3' constantes

anteriormente mencionados emparejados con cebadores líderes combinados para cada familia de regiones constantes humanas tanto de la cadena pesada como la cadena ligera  $\kappa$ , independientemente. Los volúmenes de reactivos y cebadores, y las condiciones de RT-PCR/PCR se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de cebadores se basaron en fuentes múltiples (Wang y Stollar, 2000, Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR, *J Immunol Methods* 244:217-225; Ig-primer sets, Novagen). Según necesidad, se realizaron reacciones PCR anidadas secundarias con los cebadores marco combinados específicos de la familia y el mismo cebador específico constante de la inmunoglobulina 3' de ratón utilizado en la reacción principal. Se analizaron alícuotas (5 ml) de cada región mediante electroforesis en agarosa y los productos de reacción se purificaron de la agarosa usando un kit de extracción en gel MONTAGE™ (Millipore). Los productos purificados se clonaron mediante el sistema de clonación TOPO™ TA (Invitrogen) y se transformaron en células DH10p *E. coli* mediante electroporación. Se seleccionaron clones individuales de cada reacción de transformación y se hicieron crecer en cultivos con 2 ml de caldo LB con selección mediante antibióticos durante la noche a 37 °C. El ADN plásmido se purificó a partir de los cultivos bacterianos mediante un abordaje de tipo kit (Qiagen).

**Uso de los genes variables de inmunoglobulina.** Se secuenció el ADN plásmido de clones tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera  $\kappa$  con los cebadores inversos T7 o M13 en el equipo ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los datos de secuencia brutos se importaron al equipo SEQUENCHER™ (v4.5, Gene Codes). Cada secuencia se ensambla en cóntigos y se alinea con las secuencias de inmunoglobulina humana usando IMGT V-Quest (Brochet *et al.*, 2008, IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis, *Nucleic Acids Res* 36:W503-508) como función de búsqueda para identificar el uso de los segmentos humanos  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$  y  $V_k$ ,  $J_k$ . Las secuencias se compararon con las secuencias de la línea germinal para hipermutaciones somáticas y análisis de unión con recombinación.

Los ratones se generaron a partir de células ES que contenían la modificación inicial de la cadena pesada (alelo híbrido 3hV<sub>H</sub>-CRE, parte inferior de la FIG. 2A) mediante complementación RAG (Chen *et al.*, 1993, RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development, *PNAS USA* 90:4528-4532), y se preparó ADNc a partir de ARN de esplenocitos. El ADNc se amplificó usando conjuntos de cebadores (descritos anteriormente) específicos del ARNm de la cadena pesada quimérica que surgiría de la recombinación V(D)J dentro de los segmentos génicos humanos insertados y el posterior corte y empalme con cualquiera de los dominios constantes IgM o IgG. Las secuencias derivadas de estos clones de ADNc (no mostradas) demuestran que se ha producido la recombinación correcta V(D)J dentro de las secuencias génicas variables humanas, que los segmentos génicos V(D)J humanos reordenados han experimentado correctamente el corte y empalme en marco hacia las regiones constantes de ratón, y que se ha producido la recombinación con cambio de clase. Se realizó un análisis de secuencia adicional de los productos de ARNm de los loci híbridos de inmunoglobulina posteriores.

En un experimento similar, linfocitos B procedentes de ratones silvestres y ratones VELOCIMMUNE® no inmunizados se separaron mediante citometría de flujo en función de la expresión superficial de B220 y IgM o IgG. Los linfocitos B220<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> o las IgG<sup>+</sup> de la superficie (sIgG<sup>+</sup>) se combinaron y se obtuvieron las secuencias de  $V_H$  y  $V_k$  después de la amplificación y clonación mediante RT-PCR (descrita anteriormente). Se registró el uso de genes representativos usando un conjunto de varios ADNc amplificados mediante RT-PCR procedentes de ratones VELOCIMMUNE® 1 no inmunizados (Tabla 7) y ratones VELOCIMMUNE® 3 (Tabla 8) (\*RSS defectivo; † faltante o pseudogén). Asterisco: segmentos génicos con RSS defectivo. †: el segmento génico falta o pseudogén.





Como se muestra en las Tablas 7 y 8, se utilizaron casi todos los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$ ,  $V_k$  y  $J_k$  humanos funcionalizados. De los segmentos génicos variables funcionales descritos pero no detectados en el ratón VELOCIMMUNE® de este experimento, se ha notificado que algunos tienen secuencias señal de recombinación (RSS) defectivas y, por tanto, no se esperaba que se expresaran (Feeney, 2000, Factors that influence formation of B cell repertoire, Immunol Res 21:195-202). El análisis de otros conjuntos de secuencias de inmunoglobulina diferentes procedentes de varios ratones VELOCIMMUNE®, aislados de repertorios tanto silvestres como inmunizados, han demostrado el uso de estos segmentos génicos, aunque con menores frecuencias (no se muestran los datos). Los datos agregados del uso génico han demostrado que todos los segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$ ,  $V_k$ , y  $J_k$  funcionales humanos incluidos en los ratones VELOCIMMUNE® se habían observado en diferentes repertorios silvestres e inmunizados (no se muestran los datos). Aunque el segmento génico  $V_{H7-81}$  humano se había identificado en el análisis de las secuencias del locus de la cadena pesada humana (Matsuda *et al.*, 1998, The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, J Exp Med 188:2151-2162), no está presente en el ratón VELOCIMMUNE® tal como se confirma mediante la resecuenciación completa del genoma del ratón VELOCIMMUNE® 3.

Se sabe que las secuencias de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos muestran una variabilidad excepcional, especialmente en segmentos polipeptídicos cortos con reordenación del dominio variable. Estas regiones, conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), crean el sitio de unión para el antígeno en la estructura de la molécula de anticuerpo. Las secuencias de polipéptido intervinientes se denominan regiones marco (FR). Existen tres CDR (CDR1, CDR2, CDR3) y 4 FR (FR1, FR2, FR3, FR4) tanto en las cadenas ligeras como en las pesadas. Una CDR, CDR3, es único en que estas CDR se crean mediante la recombinación de ambos segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  y  $V_k$  y  $J_k$  y genera una cantidad significativa de diversidad de repertorio antes de encontrar al antígeno. La unión es imprecisa debido a ambas delecciones de nucleótido realizadas mediante actividad exonucleasa y las adiciones no codificadas en el molde mediante la desoxinucleotidil transferasa (TdT) del extremo y, por tanto, permite que aparezcan secuencias novedosas a partir del proceso de recombinación. Aunque las FR pueden mostrar una mutación somática sustancial debido a la elevada capacidad de mutación de la región variable en su conjunto, la variabilidad, sin embargo, no se distribuye de manera uniforme a lo largo de la región variable. Las CDR son regiones de elevada variabilidad concentradas y localizadas en la superficie de la molécula de anticuerpo que permiten la unión al antígeno. Las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpos seleccionados procedentes de ratones VELOCIMMUNE® alrededor de la unión CDR3 que demuestran diversidad en la unión se muestra en la FIG. 7A y 7B, respectivamente.

Tal como se muestra en la Fig. 7A, las adicionales de nucleótidos no codificadas en el molde (N-adiciones) se observan en ambas uniones  $V_H-D_H$  y  $D_H-J_H$  en los anticuerpos procedentes de los ratones VELOCIMMUNE®, indicando la función correcta de TdT con los segmentos humanos. Los puntos finales de los segmentos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  con respecto a sus homólogos en la línea germinal indican que también se ha producido actividad exonucleasa. A diferencia del locus de la cadena pesada, las reordenaciones de la cadena ligera  $\kappa$  humana muestran poca o ninguna adición de sat CDR3, que se forma mediante la recombinación de los segmentos  $V_k$  y  $J_k$  (FIG. 7B). Esto se esperaba debido a la falta de expresión de TdT en los ratones durante las reordenaciones de la cadena ligera en la transición de prelinfocito B a linfocito B. La diversidad observada en la CDR3 de reordenación de las regiones  $V_k$  humanas se introduce predominantemente mediante actividad exonucleasa durante el acontecimiento de recombinación.

**Hipermutación somática.** Se añadió diversidad adicional a las regiones variables de los genes de inmunoglobulina reordenados durante la reacción del centro germinal mediante un proceso denominado hipermutación somática. Los linfocitos B que expresan regiones variables mutadas compiten somáticamente con otros linfocitos B para acceder al antígeno presentado por las células dendríticas foliculares. Estos linfocitos B, con mayor afinidad por el antígeno, se expandirán adicionalmente y experimentarán cambio de clase antes de salir en dirección a la periferia. De esta manera, los linfocitos B que expresan isotipos cambiados habitualmente se han encontrado con el antígeno y experimentado reacciones en el centro germinal y tendrán un número de mutaciones aumentado con respecto a los linfocitos B no expuestos. Además, se esperaba que las secuencias de regiones variables procedentes de linfocitos B  $slgM^+$  predominantemente no expuestos tuvieran relativamente menos mutaciones que las secuencias variables procedentes de linfocitos B  $slgG^+$  B que han experimentado selección mediante antígeno.

Las secuencias de clones aleatorios  $V_H$  o  $V_k$  procedentes de linfocitos B  $slgM^+$  o  $slgG^+$  B procedentes de ratones VELOCIMMUNE® no inmunizados o linfocitos B  $slgG^+$  B procedentes de ratones inmunizados se compararon con los segmentos génicos variables de su línea germinal y se anotaron los cambios con respecto a la secuencia de la línea germinal. Las secuencias de nucleótidos resultantes se tradujeron *in silico* y también se anotaron las mutaciones que conducían a cambios de aminoácidos. Los datos se recogieron de todas las regiones variables y se calculó el cambio porcentual en una posición dada (FIG. 8).

Tal como se muestra en la Fig. 8, las regiones variables de la cadena pesada humana derivadas de linfocitos B  $slgG^+$  procedentes de ratones VELOCIMMUNE® no inmunizados muestran más nucleótidos comparado con los linfocitos B  $slgM^+$  B procedentes de los mismos esplenocitos combinados, y las regiones variables de la cadena pesada derivados de ratones inmunizados muestran incluso más cambios. El número de cambios aumenta en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con respecto a las regiones marco, indicando selección

mediante antígeno. Las correspondientes secuencias de aminoácidos procedentes de las regiones variables de cadena pesada también muestran cifras significativamente más elevadas de mutaciones en IgG comparado con IgM e incluso más en IgG inmunizada. Estas mutaciones parecen ser de nuevo más frecuentes en las CDR comparadas con las regiones marco, lo que sugiere que los anticuerpos fueron seleccionados *in vivo* mediante antígenos. Un aumento similar en el número de mutaciones de nucleótidos y aminoácidos se observa en las secuencias V $\kappa$  derivadas de linfocitos B IgG<sup>+</sup> B procedentes de ratones inmunizados.

El uso génico y la frecuencia de hipermutaciones somáticas observados en ratones VELOCIMMUNE® demuestran que esencialmente todos los segmentos génicos presentes pueden reordenarse para formar anticuerpos quiméricos inversos completamente funcionales en estos ratones. Además, los anticuerpos de VELOCIMMUNE® participan completamente en el sistema inmunitario del ratón para experimentar selección por afinidad y maduración para crear anticuerpos humanos completamente maduros que pueden neutralizar eficazmente su antígeno diana. Los ratones VELOCIMMUNE® pueden desencadenar respuestas inmunes sólidas frente a numerosas clases de antígeno como resultado del uso de una amplia gama de anticuerpos humanos que al mismo tiempo tienen una elevada afinidad y son adecuados para su uso terapéutico (no se muestran los datos).

### Ejemplo 5

#### Análisis de la estructura linfoide y los isotipos séricos

Las estructuras fundamentales del bazo, ganglios linfáticos inguinales, placas de Peyer y timo de las muestras de tejido procedentes de ratones silvestres o VELOCIMMUNE® teñidas con H&E se examinaron al microscopio óptico. Los niveles de isotipos de inmunoglobulina en el suero procedentes de ratones silvestres o VELOCIMMUNE® se analizaron con la tecnología LUMINEX™.

**Estructura del órgano linfoide.** La estructura y función de los tejidos linfoides dependen, en parte, del desarrollo correcto de las células hematopoyéticas. Un defecto en el desarrollo o la función de los linfocitos B se puede mostrar como una alteración en la estructura de los tejidos linfoides. Tras el análisis de las secciones tisulares teñidas, no se identificó una diferencia significativa en el aspecto de los órganos linfoides secundarios entre los ratones silvestres o VELOCIMMUNE® (no se muestran los datos).

**Niveles de inmunoglobulina sérica.** El nivel de expresión de cada isotipo es similar entre los ratones silvestres o VELOCIMMUNE® (FIG. 9A, 9B y 9C). Esto demuestra que la humanización de los segmentos génicos variables no tiene aparentemente ningún efecto adverso sobre el cambio de clase o la expresión y secreción de inmunoglobulina y por tanto mantiene aparentemente todas las secuencias endógenas de ratón necesarias para estas funciones.

### Ejemplo 6

#### Inmunización y producción de anticuerpos en ratones con inmunoglobulina humanizada

Diferentes versiones de ratones VELOCIMMUNE® se inmunizaron con antígeno para examinar la respuesta humoral contra el desafío de un antígeno extraño.

**Inmunización y desarrollo de hibridoma.** Ratones VELOCIMMUNE® y silvestres se pueden inmunizar con un antígeno en forma de proteína, ADN, una combinación de ADN y proteína, o células que expresan el antígeno. Los animales se sometieron a refuerzo cada tres semanas para un total de dos a tres veces. Después de cada refuerzo con antígeno, se recogieron y analizaron muestras de suero de cada animal para determinar respuestas de anticuerpo específicas de antígeno mediante la determinación de los títulos en suero. Antes de la fusión, los ratones recibieron un refuerzo pre-fusión final de 5  $\mu$ g de proteína o ADN, según se desee, mediante inyecciones intraperitoneales o intravenosas. Se recogieron los esplenocitos que se fusionaron con células Ag8.653 de mieloma en una cámara de electrofusión de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante (Cyto Pulse Sciences Inc., Glen Burnie, MD, Diez días después del cultivo, se seleccionaron los hibridomas para determinar la especificidad de antígeno usando un ensayo ELISA (Harlow y Lane, 1988, Anticuerpos: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Nueva York). Como alternativa, se aislaron linfocitos B específicos de antígeno directamente a partir de ratones VELOCIMMUNE® inmunizados que se seleccionaron con técnicas convencionales, que incluyen las descritas en el presente documento, para obtener anticuerpos humanos específicos del antígeno de interés (por ejemplo, véase el documento US 2007/0280945A1).

**Determinación del título sérico.** Para controlar la respuesta sérica dirigida contra el antígeno del animal, se recogieron muestras de suero durante aproximadamente 10 días después de cada refuerzo y se determinaron los títulos utilizando ELISA específico de antígeno. En resumen, placas de 96 pocillos Nunc MAXISORP™ 96 se revistieron con 2  $\mu$ g/m de antígeno durante la noche a 40 °C y se bloquearon con albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, MO). Muestras de suero diluidas en serie 3 veces se dejaron unir a las placas durante una hora a temperatura ambiente. A continuación las placas se lavaron con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % y la IgG se detectó con FC de cabra dirigido contra Ig de ratón conjugado con HRP (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) para determinar el título de IgG total, o anticuerpos específicos del isotipo marcados con

biotina o anticuerpos policlonales específicos de la cadena ligera (Southern Biotech Inc.) para determinar los títulos específicos del isotipo, respectivamente. Para los anticuerpos marcados con biotina, tras el lavado de la placa, se añadió estreptavidina conjugada con HRP (Pierce, Rockford, IL). Todas las placas se revelaron con sustratos colorimétricos tales como BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Tras determinar la

5 reacción con ácido fosfórico 1 M, se registraron las absorbancias ópticas a 450 nM y los datos se analizaron con el programa informático PRISM™ de Graph Pad. Las diluciones necesarias para obtener dos veces la señal del fondo se definieron como el título.

10 En un experimento, los ratones VELOCIMMUNE® se inmunizaron con el receptor de la interleuquina-6 humano (hIL-6R). Un conjunto representativo de títulos séricos para ratones VELOCIMMUNE® y silvestres inmunizados con hIL-6R se muestra en la FIG. 10A y 10B.

15 Los ratones VELOCIMMUNE® y silvestres desencadenaron respuestas intensas contra IL-6R con intervalos de títulos similares (FIG. 10A). Algunos ratones de las cohortes VELOCIMMUNE® y silvestre alcanzaron una respuesta máxima después de un solo refuerzo con antígeno. Estos resultados indican que la intensidad de la respuesta inmune y la cinética de este antígeno fueron similares en los ratones VELOCIMMUNE® y silvestres. Estas respuestas de anticuerpo específicas de antígeno se analizaron adicionalmente para examinar los isotipos concretos de los anticuerpos específicos de antígeno descubiertos en el suero. Ambos grupos VELOCIMMUNE® y silvestre desencadenaron predominantemente una respuesta IgG1 (FIG. 10B), lo que sugiere que el cambio de clase durante

20 la respuesta humoral es similar en los ratones de cada tipo.

**Determinación de la afinidad de la unión entre antígeno y anticuerpo en solución.** Un ensayo de competición en solución basado en ELISA se diseñó de forma típica para determinar la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno.

25

En resumen, los anticuerpos en medio condicionado se premezclaron con diluciones en serie de proteína de antígeno comprendidas entre 0 y 10 mg/ml. Las soluciones del anticuerpo y la mezcla de antígeno se incubaron a continuación de dos a cuatro horas a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio de unión. A continuación se determinó la cantidad de anticuerpo libre en las mezclas usando un ELISA en sándwich cuantitativo. Placas MAXISORB™ de 96 pocillos (VWR, West Chester, PA) se revistieron con 1 µg/ml de proteína de antígeno en solución de PBS durante la noche a 4 °C seguido por bloqueo con BSA no específico. Las soluciones de mezcla anticuerpo-antígeno se transfirieron a continuación a dichas placas seguidas por incubación durante una hora. A continuación, las placas se lavaron con tampón de lavado y los anticuerpos unidos a las placas se detectaron con un reactivo de anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson Immuno Research Lab) y se desarrollaron usando sustratos colorimétricos como BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Tras determinar la reacción con ácido fosfórico 1 M, se registraron las absorbancias ópticas a 450 nM y los datos se analizaron con el programa informático PRISM™ de Graph Pad. La dependencia de las señales de las concentraciones de antígeno en solución se analizó mediante un análisis de ajuste de 4 parámetros y se notificaron como  $CI_{50}$ , la concentración de antígeno necesaria para conseguir una reducción del

30 50 % de la señal comparada con las muestras de anticuerpo sin presencia de antígeno en solución.

En un experimento, ratones VELOCIMMUNE® se inmunizaron con hIL-6R (como se ha descrito anteriormente.). La FIG. 11A y 11 B muestran un conjunto representativo de medidas de afinidad de anticuerpos dirigidos contra hIL6R procedentes de ratones VELOCIMMUNE® y silvestres.

45

Tras la inmunización los ratones recibieron un tercer refuerzo de antígeno, se determinaron los títulos séricos con un ensayo ELISA. Se aislaron esplenocitos de cohortes de ratones silvestres y VELOCIMMUNE® seleccionadas y se fusionaron con células AgB.653 de mieloma para formar hibridomas que se hicieron crecer con selección (como se ha descrito anteriormente). De un total de 671 hibridomas contra IL-6R producidos, se encontró que 236 expresaban anticuerpos específicos de antígeno. El medio recogido de los pocillos positivos para antígeno se utilizó para determinar la afinidad de unión del anticuerpo con el antígeno usando un ELISA de competición en solución. Los anticuerpos derivados de ratones VELOCIMMUNE® mostraron una amplia gama de afinidad en su unión con el antígeno en solución (FIG. 11A). Además, se encontró que 49 de 236 hibridomas contra IL-6R bloqueaban la unión entre IL-6 y el receptor en un bioensayo in vitro (no se muestran los datos). Además, estos 49 anticuerpos bloqueantes dirigidos contra IL-6 mostraron una gama de afinidades elevadas en solución similar a la de los anticuerpos bloqueantes derivados de la inmunización paralela de los ratones silvestres (FIG. 11B).

50 55

## Ejemplo 7

### 60 Construcción de un vector director de ratón ADAM6

Debido a la sustitución de los loci génicos variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón por los loci génicos variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, las versiones iniciales de los ratones VELOCIMMUNE® carecen de la expresión de los genes de los ratones ADAM6. En particular, los ratones VELOCIMMUNE® macho demuestran una reducción en la fertilidad. De esta manera, la capacidad de expresar ADAM6 se volvió a genomanipular en los ratones VELOCIMMUNE® para recuperar el defecto de fertilidad.

65

Se construyó un vector director para insertar los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón en un locus de la cadena pesada humanizado usando tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (*más arriba*) para modificar un cromosoma bacteriano artificial (BAC) 929d24, que se obtuvo del Dr. Frederick Alt (Universidad de Harvard). El ADN de 929d24 BAC se genomanipuló para incluir fragmentos genómicos que incluyeran los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón y un casete de higromicina para la delección dirigida de un pseudogén ADAM6 humano (hADAM6 $\Psi$ ) situado entre los segmentos génicos V<sub>H</sub>1-2 and V<sub>H</sub>6-1 humanos de un locus de la cadena pesada humanizado (FIG. 12).

En primer lugar, un fragmento genómico que contenía el gen ADAM6b de ratón, de ~800 pb en de la secuencia en dirección ascendente (5') y ~4800 pb de la secuencia en dirección descendente (3') se subclonó en el clon 929d24 BAC. Un segundo fragmento genómico que contenía el gen ADAM6a de ratón, de ~300 pb en de la secuencia en dirección ascendente (5') y ~3400 pb de la secuencia en dirección descendente (3'), se subclonó independientemente del clon 929d24 BAC. Los dos fragmentos genómicos que contenían los genes ADAM6b y ADAM6a de ratón se unieron a un casete de higromicina flanqueado por sitios de recombinación Frt para crear el vector director (vector director ADAM6 de ratón, Figura 12; SEQ ID NO: 3). Se manipularon genéticamente varios sitios de enzimas de restricción en el extremo 5' del vector director después del gen ADAM6b de ratón y en el extremo 3' después del gen ADAM6a de ratón (parte inferior de la FIG. 12) para su unión en el locus de la cadena pesada humanizado.

Se realizó una modificación independiente en un clon BAC que contenía una sustitución de los loci génicos variables de la cadena pesada de ratón por loci génicos variables de la cadena pesada humana incluyendo el pseudogén ADAM6 humano (hADAM6 $\Psi$ ) situado entre los segmentos génicos V<sub>H</sub>1-2 y V<sub>H</sub>6-1 humanos del locus humanizado para la posterior unión del vector director ADAM6 de ratón (FIG. 13).

En resumen, se genomanipuló un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación loxP para incluir brazos de homología conteniendo la secuencia genómica humana en las posiciones 3' del segmento génico V<sub>H</sub>1-2 humano (en 5' con respecto a hADAM6 $\Psi$ ) y a 5' del segmento génico V<sub>H</sub>6-1 humano (en 3' con respecto a hADAM6 $\Psi$ ; véase la parte central de la FIG. 13). La situación del sitio de inserción de esta construcción directora era 1,3 kb en 5' y ~350 pb en 3' del pseudogén ADAM6 humano. La construcción directora también incluía los mismos sitios de restricción que el vector director ADAM6 de ratón para permitir la posterior unión a BAC entre el clon BAC modificado que contenía la delección del pseudogén ADAM6 humano y el vector director ADAM6 de ratón.

Tras la digestión de BAC el ADN derivado de ambas construcciones, los fragmentos genómicos se unieron entre sí para construir un clon BAC genomanipulado que contenía un locus de cadena pesada humanizado que contenía una secuencia genómica situada ectópicamente que comprendía las secuencias de nucleótidos ADAM6a y ADAM6b de ratón. La construcción directora final para la delección de un gen ADAM6 humano dentro de un locus de cadena pesada humanizado y la inserción de las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón en células ES contenía, de 5' a 3', un fragmento genómico 5' que contenía ~13 kb de la secuencia genómica humana en 3' del segmento génico V<sub>H</sub>1-2 humano, ~800 pb de la secuencia genómica de ratón en dirección 3' del gen ADAM6b de ratón, un sitio Frt en 5', un casete de higromicina, un sitio Frt en 3', ~300 pb de la secuencia genómica de ratón en dirección 3' del gen ADAM6a de ratón, el gen ADAM6a de ratón, ~3400 pb de la secuencia genómica de ratón en dirección 5' del gen ADAM6a de ratón, y un fragmento genómico 3' que contenía ~30 kb de la secuencia genómica humana en 5' del segmento génico V<sub>H</sub>6-1 humano (parte inferior de la FIG. 13).

El clon BAC genomanipulado (descrito anteriormente) se utilizó para electroporar células ES de ratón que contenían un locus de cadena pesada humanizado para crear células ES modificadas que comprenden una secuencia genómica de ratón situada ectópicamente que comprende las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón dentro de un locus de cadena pesada humanizado. Las células ES positivas que contenían el fragmento genómico de ratón situado ectópicamente dentro del locus de cadena pesada humanizado se identificaron mediante un ensayo con PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie and Petropoulos, 1998, Advances in quantitative PCR technology: 5'nuclease assays, Curr Opin Biotechnol 9(1):43-48). Las regiones 3' y 5' situadas fuera de la parte modificada del locus de cadena pesada humanizado se confirmaron mediante PCR usando cebadores y sondas situados dentro de la región modificada para confirmar la presencia de la secuencia genómica ectópica de ratón dentro del locus de cadena pesada humanizado, así como la presencia del casete de higromicina. La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción en 5' incluyó lo siguiente, que indica la secuencia genómica de la cadena pesada humana en dirección 5' del punto de inserción, así como un sitio de restricción (I-CeuI (incluido entre paréntesis a continuación) unido de forma contigua a la secuencia genómica de ratón presente en el punto de inserción. (CCAGCTTCAT TAGTAATCGT TCATCTGTGG TAAAAGGCA GGATTTGAAG CGATGGAAGA TGGGAGTACG GGGCGTTGGA AGACAAAGTG CCACACAGCG CAGCCTTCGT CTAGACCCC GGGCTAACTA TAACGGTCCT AAGGTAGCGA G)GGGATGACAG ATTCTGTGGT CAGTCACTC AGGGTCTGCC TCCACGAGAA TCACCATGCC CTTTCTCAAG ACTGTGTTCT GTGCAGTGCC CTGTCACTGG (SEQ ID NO: 4). La secuencia de nucleótidos a través de la inserción en dirección 5' en el extremo 3' de la región diana incluyó lo siguiente, que indica una secuencia genómica de ratón y un sitio de restricción PI-SceI (incluido entre paréntesis a continuación) unido de forma contigua a la secuencia genómica de la cadena pesada humana en dirección 3' del punto de inserción:

(AGGGGTCGAG GGGGAATTTT ACAAAGAACA AAGAAGCGGG CATCTGCTGA  
 CATGAGGGCC GAAGTCAGGC TCCAGGCAGC GGGAGCTCCA CCGCGGTGGC  
 GCCATTTTACAT TACCTCTTTC TCCGCACCCG ACATAGATAAAGCTT) ATCCCCCACC  
 AAGCAAATCC CCCTACCTGG GGCCGAGCTT CCCGTATGTG GGAAAATGAA  
 TCCCTGAGGT CGATTGCTGC ATGCAATGAA ATTCAACTAG (SEQ ID NO:5).

5 Las células ES diana anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes en un embrión de ratón en la fase de 8 células según el método de genomanipulación del ratón VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos. N.º 7,6598, 442, 7.576.259, 7.294.754). Los ratones que contenían un locus de cadena pesada humanizado que incluía una secuencia genómica ectópica de ratón que comprendía las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón se identificaron mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, 2003) que detectó la presencia de los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón dentro del locus de cadena pesada humanizado.

10 Los ratones que contenían un locus de cadena pesada humanizado que incluía los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón se reprodujeron para conseguir una cepa de ratón que incluía el eliminador FLPe (véase, por ejemplo, Rodríguez *et al.*, 2000, High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-*loxP*. Nature Genetics 25:139-140) para eliminar los casetes de higromicina en Frt introducidos mediante el vector director que no se hubieran eliminado, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. De manera opcional, el casete de higromicina queda retenido en los ratones.

15 Las crías se genotiparon y las crías heterocigóticas para el locus de cadena pesada humanizado que contiene un fragmento genómico ectópico de ratón que comprende las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón se seleccionaron para caracterizar la expresión génica y la fertilidad del ratón ADAM6.

## Ejemplo 8

### 25 Caracterización de los ratones de rescate ADAM6

**Citometría de flujo.** Tres ratones de 25 semanas de edad homocigóticos para los loci génicos variables de cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ) y tres ratones de 18-20 semanas de edad homocigóticos para la cadena pesada humana y la cadena ligera  $\kappa$  humana que tienen el fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón dentro de ambos alelos del locus de cadena pesada humano ( $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$ ) se sacrificaron para identificación y análisis de las poblaciones de linfocitos mediante FACS en el sistema BD LSR II (BD Bioscience). Los linfocitos se clasificaron en linajes celulares específicos y se analizaron para establecer su progreso por las diferentes fases del desarrollo de los linfocitos B. Los tejidos recogidos de los animales incluyeron sangre, bazo y médula ósea. La sangre se recogió en tubos BD microtainer con EDTA (BD Biosciences). La médula ósea se recogió de los fémures lavando con medio RPMI completo suplementado con suero de feto de ternera, piruvato de sodio, HEPES, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales, y gentamicina. Los glóbulos rojos procedente de las preparaciones de sangre, bazo y médula ósea se lisaron con un tampón de lisis basado en cloruro de amonio (por ejemplo, el tampón de lisis ACK), seguido por lavado con medio RPMI completo.

40 Para teñir las poblaciones celulares,  $1 \times 10^6$  células de diferentes fuentes de tejido se incubaron con anticuerpo CD16/CD32 dirigido contra IgG de ratón (2.4G2, BD Biosciences) en hielo durante 10 minutos, seguido por marcado con uno o una combinación de los siguientes cócteles de anticuerpo durante 30 minutos sobre hielo.

45 Médula ósea: anticuerpos contra IgG de ratón FITC-CD43 (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience), A700-CD19 (1D3, BD Biosciences).

50 Sangre periférica y bazo: anticuerpos contra IgG de ratón FITC- $\kappa$  (187.1, BD Biosciences), PE-A (RML-42, BioLegend), PeCy7- IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-CD3 (14S-2C11, BD), A700-CD19 (1D3, BD), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience). Tras la incubación con los anticuerpos marcados, las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 2%. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo LSR II y se analizaron con FlowJo (Treestar, Inc.). Los resultados de un ratón  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$  y  $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$  representativo se muestran en las FIGS. 14 - 18,

55 Los resultados demuestran que los linfocitos B de los ratones  $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$  progresan por las fases de desarrollo de los linfocitos B de una forma similar a la de los ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$  en la médula ósea y los compartimentos de la sangre periférica, y muestran modelos de maduración normales cuando han alcanzado la periferia. Los ratones  $H^{+/+}A6^{res\kappa^{+/+}}$

demonstraron una población de células CD43<sup>int</sup>CD19<sup>+</sup> mayor en comparación con los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> (FIG. 16B). Esto puede indicar una expresión IgM acelerada procedente del locus de cadena pesada humanizado que incluye un fragmento genómico ectópico de ratón que comprende las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón en los ratones H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup>. En la periferia, las poblaciones de linfocitos B y T de los ratones H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup> parece normal y similar a la de los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>.

**Morfología del testículo y caracterización del espermatozoide.** Para determinar si la infertilidad en ratones que tienen loci variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana se debe a defectos en los testículos o en la producción de espermatozoides, se examinó la morfología y el contenido de espermatozoides del epidídimo.

En resumen, testículos procedentes de dos grupos (n=5 por grupo; grupo 1: ratones homocigóticos para los loci génicos variables de cadena pesada y cadena ligera κ humanos, H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>; grupo 2: ratones heterocigóticos para los loci génicos variables de cadena pesada y cadena ligera κ humanos, H<sup>+/-</sup>κ<sup>+/+</sup>) se diseccionaron con el epidídimo intacto y se pesaron. A continuación los especímenes se fijaron, se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con colorante de hematoxilina y eosina (HE). Secciones testiculares (2 testículos por ratón, para un total de 20) se examinaron para examinar defectos en la morfología y evidencia en la producción de espermatozoides, mientras que las secciones del epidídimo se examinaron para determinar la presencia de espermatozoides.

En este experimento, no se observaron diferencias en el peso o morfología de los testículos entre los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> y los ratones H<sup>+/-</sup>κ<sup>+/+</sup>. Se observó el espermatozoide tanto de los testículos como del epidídimo de todos los genotipos. Estos resultados establecieron que la ausencia de genes ADAM6a y ADAM6b de ratón no conduce a cambios detectables en la morfología testicular, y que el espermatozoide se produce en los ratones en presencia y ausencia de ambos genes. Por tanto, no son probables defectos en la fertilidad de los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> machos debidos a la baja producción de espermatozoides.

**Motilidad y migración del espermatozoide.** Los ratones que carecen de otros miembros de la familia de genes ADAM son infértiles debido a defectos en la motilidad del espermatozoide o migración. La migración del espermatozoide se define como la capacidad del espermatozoide para pasar del útero al oviducto, y normalmente es necesaria para la fertilización en ratones. Para determinar si la delección de los ADAM6a y ADAM6b en ratones afecta este proceso, la migración y la motilidad del espermatozoide se evaluaron en ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>.

En resumen, se obtuvo espermatozoides de los testículos de (1) ratones heterocigóticos para los loci génicos variables de la cadena pesada humana y homocigóticos para los loci génicos variables de la cadena ligera κ humana (H<sup>+/-</sup>κ<sup>+/+</sup>); (2) ratones homocigóticos para los loci génicos variables de la cadena pesada humana y homocigóticos para los loci génicos variables de la cadena ligera κ humana (H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>); (3) ratones homocigóticos para los loci génicos variables de la cadena pesada humana y homocigóticos para para la cadena ligera κ silvestre (H<sup>+/+</sup>mκ); y, (4) ratones C57 BL/6 silvestres (WT). No se observaron anomalías significativas en el recuento espermático o en la movilidad global del espermatozoide tras la inspección. En todos los ratones se observó dispersión del cúmulo, indicando que cada muestra de espermatozoides pudo penetrar las células del cúmulo y unirse *in vitro* a la zona pelúcida. Estos resultados establecen que los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> tienen espermatozoides que pueden penetrar en el cúmulo y unirse a la zona pelúcida.

La fertilización de los ovarios de ratón *in vitro* (IVF) se realizó usando espermatozoides de ratones como se ha descrito anteriormente. Se observaron un número ligeramente inferior de embriones escindidos para los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> el día posterior a IVF, así como un número reducido en el espermatozoide unido a los óvulos. Estos resultados establecen que el espermatozoide de ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>, una vez expuesto a un óvulo, puede penetrar en el cúmulo y unirse a la zona pelúcida.

En otro experimento, la capacidad del espermatozoide de los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> para migrar desde el útero y a través del oviducto se determinó en un ensayo de migración de espermatozoides.

En resumen, un primer grupo de ratones hembra superovuladas (n=5) se emparejaron con machos H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> (n=5) y un segundo grupo de ratones hembra superovuladas (n=5) se emparejaron con machos H<sup>+/-</sup>κ<sup>+/+</sup> (n=5). Se observó la copulación de las parejas, y de cinco a seis horas después de la copulación, se extrajo el útero y el oviducto unido de todas las hembras, y se lavaron para su análisis. Las soluciones de lavado se investigaron para encontrar óvulos para verificar la ovulación y obtener un recuento de espermatozoides. La migración del espermatozoide se evaluó de dos maneras diferentes. En primer lugar, ambos oviductos se extrajeron del útero, se lavaron con suero salino, y se contaron todos los espermatozoides identificados. También se anotó la presencia de óvulos como evidencia de la ovulación. En segundo lugar, los oviductos se unieron al útero por su izquierda y se fijaron ambos tejidos, se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron (como se ha descrito anteriormente). Las secciones se examinaron para determinar la presencia de espermatozoides, tanto en el útero como en ambos oviductos.

De las hembras emparejadas con los cinco machos H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>, se encontró poco espermatozoides en la solución del lavado del oviducto. Las soluciones de lavado procedentes de los oviductos de las hembras emparejadas con los machos H<sup>+/-</sup>

$\kappa^{+/+}$  mostraron un nivel de esperma aproximadamente 25 a 30 veces mayor (prom.  $n = 10$  oviductos) que el presente en las soluciones de lavado procedentes de los oviductos de las hembras emparejadas con los machos  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ . En la Tabla 9 se muestra una comparación representativa de la reproducción de los ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$  y  $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$ .

- 5 Se prepararon secciones histológicas del útero y del oviducto. Las secciones se examinaron para determinar la presencia de esperma en el útero y en el oviducto (el conducto colicular). La inspección de las secciones histológicas del oviducto y del útero reveló que, para las hembras emparejadas con los ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ , se encontró esperma en el útero pero no en el oviducto. Además, las secciones procedentes de hembras emparejadas con los ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$  reveló que no aparecía esperma en la unión útero-tubal (UTJ). En secciones procedentes de hembras emparejadas con los ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ , se identificó esperma en la UTJ y en el oviducto.

15 Estos resultados establecen que los ratones que carecen de los genes ADAM6a y ADAM6b fabrican esperma que muestra un defecto de migración *in vivo*. En todos los casos, se observó esperma en el interior del útero, lo que indica que la copulación y la liberación de esperma se producen aparentemente de forma normal, pero no se observó poco o ningún esperma dentro de los oviductos después de la copulación, tal como se mide tanto mediante el recuento de esperma como mediante observación histológica. Estos resultados establecen que los ratones que carecen de los genes ADAM6a y ADAM6b producen un esperma que muestra una incapacidad para migrar desde el útero hasta el oviducto. Este defecto conduce aparentemente a la infertilidad porque el esperma no puede atravesar la unión útero-tubal en el oviducto, donde los óvulos se fertilizan. En su conjunto, todos estos resultados convergen en respaldar la hipótesis de que los genes ADAM6 de ratón ayudan a dirigir el esperma con motilidad normal para migrar fuera del útero, a través de la unión útero-tubal y hacia el oviducto, y acercarse de esta forma a un óvulo para conseguir el acontecimiento de fertilización. El mecanismo mediante el cual ADAM6 alcanza esto puede estar dirigido mediante una o ambas proteínas ADAM6, o a través de una expresión coordinada con otras proteínas, por ejemplo, otras proteínas ADAM, en la célula espermática, como se describe más adelante.

25

Tabla 9

Genotipo del macho	Animales reproductores (Macho/hembra)	Duración de la cría	Camada	Progenie
$H^{+/+}\kappa^{+/+}$	6/6	6 meses	2	25
$H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$	4/8	4 meses	4	198

30 **Expresión de la familia de genes ADAM.** Se sabe que un complejo de proteínas ADAM está presente como complejo en la superficie del esperma en maduración. Los ratones que carecen de otros miembros de la familia de los genes pierden este complejo a medida que el esperma madura, y muestran una reducción en múltiples proteínas ADAM en el esperma maduro. Para determinar si una falta de los genes ADAM6a y ADAM6b afecta otras proteínas ADAM de una forma similar, se realizaron transferencias Western de extractos de proteínas del testículo (esperma inmaduro) y los epidídimos (esperma maduro) para determinar los niveles de expresión de otros miembros de la familia de los genes ADAM.

35

En este experimento, se analizaron extractos de proteínas procedentes de grupos ( $n=4$  por grupo) de ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$  y  $H^{+/-}\kappa^{+/+}$ . Los resultados mostraron que la expresión de ADAM2 y ADAM3 no se vieron afectados en los extractos de testículo. Sin embargo, ambas ADAM2 y ADAM3 se redujeron drásticamente en los extractos de epidídimo. Esto demuestra que la ausencia de ADAM6a y ADAM6b en el esperma de ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$  puede tener un efecto directo sobre la expresión y quizás la función de otras proteínas ADAM a medida que el esperma madura (por ejemplo, ADAM2 y ADAM3). Esto sugiere que ADAM6a y ADAM6b forman parte de un complejo de proteína ADAM situado en la superficie del esperma, que puede ser fundamental para una correcta migración del esperma.

#### 45 Ejemplo 9

##### Utilización de los genes variables de la cadena pesada humana en ratones ADAM6

El uso de genes variables de la cadena pesada humana seleccionados se determinó en ratones homocigóticos para los loci de la cadena pesada y la cadena ligera  $\kappa$  humanas que bien carecían de los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón ( $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ ) o contenían un fragmento genómico ectópico que codificaba los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón ( $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$ ) mediante un ensayo de PCR cuantitativo usando sondas TAQMAN™ (como se ha descrito anteriormente).

55 En resumen, Se purificaron linfocitos B CD19<sup>+</sup> B a partir de bazo de ratones  $H^{+/+}\kappa^{+/+}$  y  $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$  usando CD19Microbeads (Miltenyi Biotec) de ratón y el ARN total se purificó con el Mini kit RNEASY™ (Qiagen). Se retiró el ARN genómico usando DNasa exenta de RNasa mediante tratamiento en una columna (Qiagen). Aproximadamente 200 ng de ARNm se transcribió inversamente a ADNc usando el kit de síntesis First Stand cDNA (Invitrogen) y a continuación se amplificó con la TAQMAN™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) usando el sistema de

detección de secuencia ABI 7900 (Applied Biosystems). La expresión relativa de cada gen se normalizó a la expresión de la región constante de la cadena ligera  $\kappa$  de ratón (mC $\kappa$ ). La Tabla 10 define las combinaciones de sonda de sentido directo/sentido contrario/TAQMAN™ MGB utilizadas en este experimento.

5

Tabla 10

V <sub>H</sub> humana Secuencia (5'-3') SEQ ID NO:		
V <sub>H</sub> 6-1	Sentido directo: CAGGT ACAGCTGCAGCAGTCA	6
	Sentido contrario: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA	7
	Sonda: TCCAGGACTGGTGAAGC	8
V <sub>H</sub> 1-2	Sentido directo: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT	9
	Sentido contrario: GAGAACACAGAAGTGGATGAGATC	10
	Sonda: TGAGTCCAGTCCAGGGA	11
V <sub>H</sub> 3-23	Sentido directo: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG	12
	Sentido contrario: AACCTGGTCAGAACTGCCA	13
	Sonda: AGAGAAACAGTGGATACGT	14
V <sub>H</sub> 1-69	Sentido directo: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG	15
	Sentido contrario: GTCGTGGATTTGTCCGC	16
	Sonda: CAGAGTCACGATTACC	17
mC $\kappa$	Sentido directo: TGAGCAGCACCTCACGTT	18
	Sentido contrario: GTGCCTCACAGGTATAGCTGTT	19
	Sonda: ACCAAGGACGAGTATGAA	20

En este experimento, se observó en las muestras analizadas la expresión de los cuatro genes V<sub>H</sub> humanos. Además, los niveles de expresión fueron comparables entre los ratones H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup> y H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>. Estos resultados demuestran que los genes V<sub>H</sub> humanos que eran a la vez distales al sitio de la modificación (V<sub>H</sub>3-23 y V<sub>H</sub>1-69) y proximales al sitio de modificación (V<sub>H</sub>1-2 y V<sub>H</sub>6-1) pudieron recombinarse para constituir una cadena pesada humana funcionalmente expresada. Estos resultados demuestran que el fragmento genómico ectópico que comprendía las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón insertadas en una secuencia genómica de cadena pesada humana no afectó la recombinación V(D)J de los segmentos de la cadena pesada humana dentro del locus, y estos ratones pudieron recombinar segmentos génicos de la cadena pesada humana de forma normal para producir proteínas de la cadena pesada de la inmunoglobulina funcionales.

### Ejemplo 10

#### 20 Respuesta inmune humoral en ratones ADAM6 de rescate

La respuesta inmune humoral se determinó en ratones homocigóticos para los loci de la cadena pesada y la cadena ligera  $\kappa$  humanas que bien carecían de los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón (H<sup>+/+</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) o contenían un fragmento genómico ectópico que codificaba los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup> $\kappa$ <sup>+/+</sup>) mediante un esquema de inmunización multiantígeno seguido por aislamiento y caracterización de anticuerpos. Se compararon los resultados para determinar cualquier efecto sobre la recombinación de V(D)J que implique los segmentos génicos de la inmunoglobulina humana, valoración de la evolución de los títulos séricos, producción de anticuerpos mediante hibridomas y afinidad por el antígeno.

30 **Protocolo de inmunización:** un receptor de la superficie celular humano (Antígeno A), un anticuerpo humano específico de un receptor de la proteína tirosina quinasa humano (Antígeno B), una proteína humana secretada que funciona en la regulación de la ruta de señalización TGF- $\beta$  (Antígeno C), y un receptor de la tirosina quinasa humano (Antígeno D) se utilizaron para realizar inmunizaciones comparativas en grupos de ratones. Se recogió suero de grupos de ratones antes de la inmunización con los antígenos anteriores. Cada antígeno (2,3  $\mu$ g cada uno) se administró en una inmunización inicial mezclado con 10  $\mu$ g de oligonucleótido CpG como adyuvante (Invivogen). El inmunógeno se administró en la almohadilla plantar (a.p.) en un volumen de 25  $\mu$ l por ratón. Posteriormente, los ratones recibieron un refuerzo en la a.p. con 2,3  $\mu$ g de antígeno junto con 10  $\mu$ g de CpG y 25  $\mu$ g de Adju-Phos (Brenntag) como adyuvantes en los días 3, 6, 11, 13, 17, y 20 para un total de seis refuerzos. Se extrajo sangre de los ratones en los días 15 y 22 después de los refuerzos cuarto y sexto, respectivamente, y se ensayaron los antisueros para determinar el título de anticuerpo para cada antígeno específico.

- Se determinaron los títulos de anticuerpo en los sueros de los ratones inmunizados mediante un ensayo ELISA. Placas de microtitulación de noventa y seis pocillos (Thermo Scientific) se revistieron con el correspondiente antígeno (2 µg/ml) en suero salino tamponado con fosfato (PBS, Irvine Scientific) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con suero salino tamponado con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBS-T, Sigma-Aldrich) cuatro veces usando un lavador de placas (Molecular Devices). Las placas se bloquearon a continuación con 250 µl de albúmina de suero bovino al 0,5 % (BSA, Sigma-Aldrich) en PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas cuatro veces con PBS-T. El suero de los ratones inmunizados y preinmunizados se diluyó en serie tres veces en BSA-PBS al 0,5 % comenzando a partir de 1:300 o 1:1000 y se añadieron a las placas bloqueadas por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Los últimos dos pocillos se dejaron en blanco para usarse como control de anticuerpo secundario. Las placas se volvieron a lavar cuatro veces con PBS-T en un lavador de placas. Una dilución 1:5000/1:10000 de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón- Fc-peroxidasa de rábano picante (HRP, Jackson Immunoresearch) o anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón-kappa-conjugado con HRP (Southern Biotech) se añadió a las placas y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se volvieron a lavar ocho veces con PBS-T y se revelaron usando TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato. El sustrato se incubó durante veinte minutos y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N (VWR) o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 N (JT Baker). Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Victor, Perkin Elmer) a 450 nM. Los títulos de anticuerpos se calcularon usando el programa informático Graphpad PRISM.
- El título del suero se calculó como dilución del suero dentro del intervalo de titulación experimental en la señal de unión a antígeno equivalente a dos veces el valor del fondo. Los resultados de la respuesta humoral inmune se muestran en la FIG. 19 (Antígeno A), La FIG. 20 (Antígeno B), La FIG. 21 (Antígeno C), y la Fig. 22 (Antígeno D). La puntuación positiva para los antígenos de hibridomas fabricados a partir de dos bazos aislados de ratones de cada grupo de inmunizaciones seleccionadas se muestra en la Tabla 11 (la puntuación del antígeno es igual a 2X/fondo).
- Tal como se muestra en este Ejemplo, los títulos de anticuerpo generados por los ratones de rescate Adam6 (H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup>) fueron comparables a los generados por ratones que carecían de ADMA6a y ADAM6b y que tenían una cadena pesada humanizada (H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>). Además, Los bazos de ratones H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup> proporcionaron hibridomas positivos para el antígeno para todos los antígenos ensayados, incluyendo los anticuerpos de alta afinidad, a niveles comparables con los ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup>. De esta manera, no se cree que exista un desequilibrio en la recombinación V(D)J de los segmentos génicos de la inmunoglobulina humana en los ratones Adam6 de rescate dada la producción de anticuerpos con afinidad elevada que contienen genes de inmunoglobulina humana.

Tabla 11

Antígeno	Cepa de ratón	Puntuación del antígeno
A	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	76
A	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	32
B	H <sup>+/+</sup> κ <sup>+/+</sup>	4
B	H <sup>+/+</sup> κ <sup>+/+</sup>	12
B	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	41
B	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	95

### 35 Ejemplo 11

#### Determinación de la afinidad de unión al antígeno

- Se seleccionaron las afinidades de unión de los anticuerpos que mostraban una unión específica al Antígeno B usando un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real (BIAcore 2000). Durante la selección realizada con el equipo BIAcore se utilizaron medios condicionados procedentes de hibridomas aislados de dos cepas de ratones inmunizados con el Antígeno B (H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> y H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup>). La superficie del sensor BIAcore se derivatizó en primer lugar con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IgG de ratón (GE) para capturar los anticuerpos dirigidos contra el Antígeno B procedentes de los medios condicionados. Durante la totalidad del proceso de selección se utilizó HBST (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005 %) como tampón de análisis. El fragmento Fab del Antígeno B se inyectó sobre la superficie que había capturado el anticuerpo dirigido contra el Antígeno B a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto a una concentración de 100 nM. La asociación anticuerpo-antígeno se vigiló durante tres minutos mientras que la disociación del antígeno procedente del anticuerpo capturado se vigiló durante cinco minutos en tampón de análisis HBST. El experimento se realizó a 25 °C. Las constantes cinéticas de velocidad de asociación (k<sub>a</sub>) y disociación (k<sub>d</sub>) se determinaron procesando y ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 usando el programa informático de ajuste de curvas Scrubber 2.0. Las constantes del equilibrio de disociación de la unión (K<sub>D</sub>) y semividas de disociación (T<sub>1/2</sub>) se calcularon a partir de las constantes cinéticas de la siguiente forma: K<sub>D</sub> (M) = k<sub>d</sub> / k<sub>a</sub>; y T<sub>1/2</sub> (min) = (ln2)/(60\*k<sub>d</sub>). Los

resultados de los anticuerpos dirigidos contra el Antígeno B seleccionados se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12**

Anticuerpo	Cepa de ratón	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub> (min)
5D6	H <sup>+/+</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,62E-08	3
8G10	H <sup>+/+</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,20E-08	5
10F10	H <sup>+/+</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,09E-08	3
1F5	H <sup>+/+</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,00E-07	0,3
10G8	H <sup>+/+</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,47E-07	0,3
1B11	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,98E-08	6
2D9	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	9,40E-10	51
4D11	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	5,60E-08	0,8
6C5	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,10E-09	188
6F4	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,35E-08	3
7C4	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	2,00E-06	0,05
8G12	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	2,31 E-09	19
9B12	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	3,47E-09	13
10B4	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	3,60E-09	23
11E7	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	3,06E-08	2
11E12	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	2,70E-07	0,1
1E4	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	7,00E-10	58
4D2	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	5,80E-10	150
5H6	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	2,60E-09	3
5H10	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	6,00E-09	70
9A9	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	3,80E-09	12
11C11	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	1,55E-09	38
12C10	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	5,90E-09	16
12G7	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	9,00E-08	7
12G9	H <sup>+/+</sup> A6 <sup>res</sup> κ <sup>+/+</sup>	3,32E-09	12

- 5 En un experimento similar, se determinó la cinética de diferentes anticuerpos monoclonales presentes en medio condicionado con hibridomas para su unión con el Antígeno A usando un ensayo con un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real (BIAcore 4000). Todos los clones de hibridoma producidos en este ensayo se produjeron en ratones H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup>.
- 10 En resumen, para capturar los anticuerpos específicos del Antígeno A, anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IgG de ratón (N.º de catálogo GE BR1008-38) se inmovilizó en primer lugar en el chip sensor. La selección mediante BIAcore se realizó en dos tampones diferentes - PBSP, pH 7,2 y PBSP, pH 6,0. Ambos tampones estuvieron suplementados con 0,1 mg/ml de BSA. Después de la captura de los anticuerpos dirigidos contra el Antígeno A de los medios condicionados, se inyectó 1 µM de monómero del Antígeno A (preparado en el correspondiente tampón de análisis) sobre la superficie con el anticuerpo capturado durante 1,5 minutos a 30 µl/minuto y la disociación del monómero de Antígeno A unido se vigiló durante 1,5 minutos en el correspondiente tampón de análisis a 25 °C. Se determinaron las constantes de velocidad de asociación (ka) y disociación (kd) procesando y ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 utilizando el software de ajuste de curvas Scrubber 2.0. Se calcularon las constantes de equilibrio de disociación de la unión (K<sub>D</sub>) y las semividas disociativas (T<sub>1/2</sub>) a partir de las constantes cinéticas de la siguiente forma: K<sub>D</sub> (M) = kd / ka; y T<sub>1/2</sub> (min) = (ln2)/(60\*kd). La Tabla 13 define los parámetros de la cinética de unión para anticuerpos dirigidos contra el Antígeno A seleccionados que se unen al monómero de Antígeno A pH 7,2 y pH 6.0. ND: no se detectó unión en las condiciones experimentales actuales.

Tabla 13

Anticuerpo	pH 7,2		pH 6,0	
	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub> (min)	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub> (min)
1D7	3,89E-10	25	9,45E-10	17
2B4	Nota	Nota	Nota	Nota
2B7	3,90E-09	1,2	2,98E-09	2
2F7	2,36E-10	144	2,06E-11	1882
3A7	Nota	Nota	6,42E-10	17
3F6	Nota	Nota	Nota	Nota
4A6	1,91E-09	2	2,12E-09	2
4C4	Nota	Nota	Nota	Nota
4E12	2,69E-10	16	2,03E-10	18
5C11	1,68E-09	3	2,31 E-09	3
5D10	Nota	Nota	4,56E-09	2
5E7	Nota	Nota	Nota	Nota
5F10	Nota	Nota	Nota	Nota
5F11	8,18E-10	8	6,79E-10	7
5G4	3,55E-10	15	7,42E-11	53
5G9	6,39E-10	15	4,31E-10	21
5H8	4,73E-10	15	Nota	Nota
6D2	Nota	Nota	Nota	Nota
6D3	2,88E-10	14	8,82E-11	39
6E4	Nota	Nota	2,67E-09	4
6E6	1,37E-09	10	1,30E-09	14
6H6	Nota	Nota	Nota	Nota
7A12	Nota	Nota	Nota	Nota
7C3	Nota	Nota	Nota	Nota
7E8	4,38E-10	22	2,63E-10	34
7F10	Nota	Nota	Nota	Nota
7G9	Nota	Nota	Nota	Nota
8B8	Nota	Nota	Nota	Nota
8B11	Nota	Nota	Nota	Nota
8C3	Nota	Nota	Nota	Nota
8E9	Nota	Nota	Nota	Nota
8G3	Nota	Nota	Nota	Nota
8H3	Nota	Nota	Nota	Nota
8H4	3,70E-07	0,1	Nota	Nota
8H8	Nota	Nota	Nota	Nota

(continuación)

Anticuerpo	pH 7,2		pH 6,0	
	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub> (min)	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub> (min)
1A8	2,30E-09	4	7,40E-10	6
1B6	Nota	Nota	Nota	Nota
1C6	Nota	Nota	Nota	Nota
1C12	Nota	Nota	Nota	Nota
1D2	Nota	Nota	Nota	Nota
1E2	1,17E-09	42	3,08E-09	29
1E3	5,05E-10	89	8,10E-10	57
1E6	1,97E-08	3	1,84E-08	3
1E9	1,14E-09	30	1,14E-09	25
1H6	2,93E-09	14	9,87E-10	25
2H9	2,30E-08	2	1,91E-08	2
3A2	1,15E-10	44	1,25E-10	33
3A4	1,70E-10	31	1,44E-10	30
3D11	Nota	Nota	1,58E-08	1
3H10	2,82E-09	20	2,59E-09	15
4B6	7,79E-10	6	6,36E-10	7
4H6	9,18E-11	62	1,20E-10	43
5A2	Nota	Nota	7,04E-10	12
5C5	8,71E-11	49	7,02E-11	48
5F6	6,16E-11	114	5,46E-11	121

5 Como se muestra anteriormente, se obtuvieron anticuerpos de afinidad elevada de ambos ratones H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup> y H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> de una forma comparable. Entre los veinticinco anticuerpos representados en la Tabla 12, veinte producidos en ratones H<sup>+/+</sup>A6<sup>res</sup>κ<sup>+/+</sup> demostraron un intervalo de afinidad de 0,5 nM a 1 μM, mientras que los cinco generados en ratones H<sup>+/+</sup>κ<sup>+/+</sup> demostraron un intervalo de afinidad de 10 nM a 150 nM. Además, los cincuenta y cinco anticuerpos representados en la Tabla 13 demostraron un intervalo de afinidad de 20 pM a 350 nM para unión al monómero A.

10 Tal como se demuestra en este Ejemplo, la reinserción de los genes Adam6 de ratón en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina no altera la capacidad del ratón para desencadenar una respuesta inmune intensa para múltiples antígenos caracterizados por repertorios de anticuerpos humanos que tienen diversas afinidades en el intervalo subnanomolar, que se han derivado de segmentos génicos humanos reordenados procedentes de una línea germinal genomanipulada.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- 20 <120> Ratones ADAM6
- <130> 210-001T1
- <150> EP 12716101.6
- 25 <151> 24-02-2012
- <150> PCT/US2012/026416
- <151> 24-02-2012

ES 2 748 832 T3

<150> 61/595.200  
<151> 06-02-2012

5 <150> 61/497.650  
<151> 16-06-2011

10 <150> 61/446.895  
<151> 25-02-2011

<160> 58

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15 <210> 1  
<211> 754  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

20 <400> 1

```

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

```

ES 2 748 832 T3

Asn Tyr Ala Thr His Pro Ala Ala Ile Lys Gly His Phe Gln Ala Thr  
 210 215 220  
 His Ser Val Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Asp Lys Leu Ser Ser Thr Val  
 225 230 235 240  
 Glu Tyr Leu Phe Lys Val Ile Ser Leu Met Asp Thr Tyr Leu Thr Asn  
 245 250 255  
 Leu His Met Arg Tyr Tyr Val Phe Leu Met Thr Val Tyr Thr Glu Ala  
 260 265 270  
 Asp Pro Phe Ser Gln Asp Phe Arg Val Pro Gly Gly Gln Ala His Thr  
 275 280 285  
 Phe Tyr Glu Arg Val Phe Tyr Ala His Phe Arg Pro Asp Ala Gly Ala  
 290 295 300  
 Ile Ile Asn Lys Asn Ser Pro Gly Asp Asp Ala Val Asn Pro Ala Glu  
 305 310 315 320  
 Arg Ser Ile Cys Ser Pro Ser Ala Leu Ile Cys Leu Gly Gln His Gly  
 325 330 335  
 Arg Asn Pro Leu Phe Leu Ser Ile Ile Ile Thr Asn Arg Val Gly Arg  
 340 345 350  
 Ser Leu Gly Leu Lys His Asp Glu Gly Tyr Cys Ile Cys Gln Arg Arg  
 355 360 365  
 Asn Thr Cys Ile Met Phe Lys Asn Pro Gln Leu Thr Asp Ala Phe Ser  
 370 375 380  
 Asn Cys Ser Leu Ala Glu Ile Ser Asn Ile Leu Asn Thr Pro Asp Leu  
 385 390 395 400  
 Met Pro Cys Leu Phe Tyr Asp Arg His Val Tyr Tyr Asn Thr Ser Leu  
 405 410 415  
 Thr Tyr Lys Phe Cys Gly Asn Phe Lys Val Asp Asn Asn Glu Gln Cys  
 420 425 430  
 Asp Cys Gly Ser Gln Lys Ala Cys Tyr Ser Asp Pro Cys Cys Gly Asn  
 435 440 445  
 Asp Cys Arg Leu Thr Pro Gly Ser Ile Cys Asp Lys Glu Leu Cys Cys  
 450 455 460  
 Ala Asn Cys Thr Tyr Ser Pro Ser Gly Thr Leu Cys Arg Pro Ile Gln  
 465 470 475 480  
 Asn Ile Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Ser Gly Ser Lys Phe Ile Cys  
 485 490 495  
 Pro Asp Asp Thr Tyr Leu Gln Asp Gly Thr Pro Cys Ser Glu Gly  
 500 505 510  
 Tyr Cys Tyr Lys Gly Asn Cys Thr Asp Arg Asn Ile Gln Cys Met Glu  
 515 520 525  
 Ile Phe Gly Val Ser Ala Lys Asn Ala Asn Ile Lys Cys Tyr Asp Ile  
 530 535 540  
 Asn Lys Gln Arg Phe Arg Phe Gly His Cys Thr Arg Ala Glu Glu Ser  
 545 550 555 560  
 Leu Thr Phe Asn Ala Cys Ala Asp Gln Asp Lys Leu Cys Gly Arg Leu  
 565 570 575  
 Gln Cys Thr Asn Val Thr Asn Leu Pro Phe Leu Gln Glu His Val Ser  
 580 585 590  
 Phe His Gln Ser Val Ile Ser Gly Val Thr Cys Phe Gly Leu Asp Glu  
 595 600 605  
 His Arg Gly Thr Glu Thr Ala Asp Ala Gly Leu Val Arg His Gly Thr  
 610 615 620  
 Pro Cys Ser Arg Gly Lys Phe Cys Asp Arg Gly Ala Cys Asn Gly Ser  
 625 630 635 640  
 Leu Ser Arg Leu Gly Tyr Asp Cys Thr Pro Glu Lys Cys Asn Phe Arg  
 645 650 655  
 Gly Val Cys Asn Asn Arg Arg Asn Cys His Cys His Phe Gly Trp Ser  
 660 665 670  
 Pro Pro Lys Cys Lys Glu Glu Gly His Ser Gly Ser Ile Asp Ser Gly  
 675 680 685

ES 2 748 832 T3

Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Arg	Arg	Ile	Ile	Lys	Gln	Asn	Leu	Glu	Pro	Val
	690					695					700				
Val	Tyr	Leu	Arg	Ile	Leu	Phe	Gly	Arg	Ile	Tyr	Phe	Leu	Phe	Val	Ala
705					710					715					720
Leu	Leu	Phe	Gly	Ile	Ala	Thr	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Lys	Ile	Phe	Arg
				725					730					735	
Phe	Glu	Asp	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Arg	Ser	Trp	Gln	Glu	Gln	Ala	Lys
			740					745					750		
Asp	Lys														

<210> 2

<211> 756

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

ES 2 748 832 T3

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

ES 2 748 832 T3

Arg Asn Pro Leu Phe Leu Ser Pro Ile Ile Thr Asn Arg Val Gly Arg  
 340 345 350  
 Ser Leu Gly Leu Lys Tyr Asp Glu Gly Tyr Cys Val Cys Gln Arg Arg  
 355 360 365  
 Asn Thr Cys Ile Met Phe Arg His Pro Gln Leu Thr Asp Ala Phe Ser  
 370 375 380  
 Asn Cys Ser Leu Ala Glu Ile Ser Asn Ile Leu Asn Thr Pro Gly Leu  
 385 390 395 400  
 Met Pro Cys Leu Phe Tyr Asp Arg His Val Tyr Tyr Asn Thr Ser Leu  
 405 410 415  
 Thr Tyr Lys Phe Cys Gly Asn Phe Lys Val Asp Asn Asp Glu Gln Cys  
 420 425 430  
 Asp Cys Gly Ser Gln Lys Ala Cys Tyr Ser Asp Pro Cys Cys Gly Asn  
 435 440 445  
 Asp Cys Arg Leu Thr Pro Gly Ser Ile Cys Asp Lys Glu Leu Cys Cys  
 450 455 460  
 Ala Asn Cys Thr Tyr Ser Pro Ser Gly Thr Leu Cys Arg Pro Ile Gln  
 465 470 475 480  
 Asn Ile Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Thr Lys Tyr Ile Cys  
 485 490 495  
 Pro Asp Asp Thr Tyr Leu Gln Asp Gly Thr Pro Cys Ser Glu Asp Gly  
 500 505 510  
 Tyr Cys Tyr Lys Gly Asn Cys Thr Asp Arg Asn Ile Gln Cys Met Glu  
 515 520 525  
 Ile Phe Gly Val Ser Ala Lys Asn Ala Asn Ile Lys Cys Tyr Asp Ile  
 530 535 540  
 Asn Lys Gln Arg Phe Arg Phe Gly His Cys Thr Arg Ala Glu Glu Ser  
 545 550 555 560  
 Leu Thr Phe Asn Ala Cys Ala Asp Gln Asp Lys Leu Cys Gly Arg Leu  
 565 570 575  
 Gln Cys Thr Asn Val Thr Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Glu His Val Ser  
 580 585 590  
 Phe His Gln Ser Ile Ile Ser Gly Phe Thr Cys Phe Gly Leu Asp Glu  
 595 600 605  
 His Arg Gly Thr Glu Thr Thr Asp Ala Gly Met Val Arg His Gly Thr  
 610 615 620  
 Pro Cys Ser Lys Ser Lys Phe Cys Asp Gln Gly Ala Cys Ser Gly Ser  
 625 630 635 640  
 Leu Ser His Leu Gly Tyr Asp Cys Thr Pro Glu Lys Cys Ser Phe Arg  
 645 650 655  
 Gly Val Cys Asn Asn His Arg Asn Cys His Cys His Phe Gly Trp Lys  
 660 665 670  
 Pro Pro Glu Cys Lys Glu Glu Gly Leu Ser Gly Ser Ile Asp Ser Gly  
 675 680 685  
 Ser Pro Pro Val Gln Arg His Thr Ile Lys Gln Lys Gln Glu Pro Val  
 690 695 700  
 Val Tyr Leu Arg Ile Leu Phe Gly Arg Ile Tyr Phe Leu Phe Val Ala  
 705 710 715 720  
 Leu Leu Phe Gly Ile Ala Thr Arg Val Gly Val Thr Lys Ile Phe Arg  
 725 730 735  
 Phe Glu Asp Leu Gln Ala Thr Leu Arg Ser Gly Gln Gly Pro Ala Arg  
 740 745 750  
 Asp Lys Pro Lys  
 755

<210> 3  
 <211> 13894  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> sintética

<400> 3

gtcctaaggat agcgagggat gacagattct ctgttcagtg cactcagggg ctgcctccac 60  
gagaatcacc atgccctttc tcaagactgt gttctgtgca gtgccctgtc agtggaaatc 120  
tggagagcat gcttccatga gcttgtgagt agtataatcta gtaagccatg gctttgtggt 180  
aatggtgatg ttctacatac cagttctctg gcttaataat gaggatga ttctatgttc 240  
ctgtaacgct tctcaactg ggtcctaagt ctttcttccac tccatctatt cctctaagga 300  
atgatcctga aaatcccatc acaaaactata ggagatggga accatcaaaa aacacagtga 360  
caaagagggtg ggaacgcatac aggggttcagg aaccatattt taaaaagata tegttaaataa 420  
cttcttaaaa gagatataga caaatctcca ttaatacggga gaccagaggc ctaaggctaa 480  
gaaccaatgg tggctcaagg tctcctgcta cccgaggagc aaacgtagag cagtttctaa 540  
tgatttattt aaaatataga atcaaaagta ccagtttgca attttgaaag atttatttca 600  
gcaatgcaac aacatcaggt ggtgccaggt ccaacacgtc ttatgtccca tgatataaac 660  
aaaggccatc cagaactgtg gactggagtt ctacottgtc cctaatgac attcagattt 720  
ttttccatt ctctttatct tagaggagac agggggctaa ctcattttac ttgtcctttg 780  
cttgttcttg ccaagaacgt aaagcagctt gcaagtcttc aaacctaaat atcttagtaa 840  
ctcctacacg agtggcaatg ccaaagagca gtgcaacaaa gaggaagtaa atacgacca 900  
agagtattct taaatacact actggctcta ggttctggtt tattatgcgc ctttgaacog 960  
gaggggaccc actgtctatg ctcccactgt gtccctcttc ttgcacttt ggagggctcc 1020  
aaccaaaatg gcaatggcaa ttccgacgat tgttacacac tctctgaaa ttgcattttt 1080  
ctgggggtgca gtcataaccc aaacgagata aacttccatt gcaagctcct cgtacacaga 1140  
acttaccct tgaacacggg gtaccatgtc tccacaatcc agcatctgct gttctgtctc 1200  
cactgatttc atcaagccca aagcaggtaa cccagagat aaccgattga ttggaatgaaa 1260  
catgttcttg caaaaatgga agattggtga cattggtaca ctgcaacott ccacacagct 1320  
tgtcctgate agcacaagca ttgaatgtga ggtttcttc tgctctagta caatgcccaa 1380  
atcgaacccg ttgttgttg atgtcatagc acttaataat agcattotta gcacttacac 1440  
caaagatttc catgcattgt atgttgcat cagtgcagtt acctttatag cagtaacct 1500  
cttctgagca tgggtgctcca tcttgcatg aagtgtcctc tgggcaaatg aacttagagc 1560  
cactacagta ctctggaaga tcacatatgt tctggatagg tctgcagagt gtcccagaag 1620  
gactgtaagt gcaatttgca cagcataatt ctttatcaca aatgctacca ggtgttaacc 1680  
tgcaatcatt tccacagcag ggatctgaat aacatgcctt ttgggagcca cagtcacact 1740  
gctcattggt atctactttg aagtttccac aaaacttata agtcaatgat gtattataat 1800  
aaacatgacg gtcatagaaa agacatggca tcagatcagg agtattaagt atgttgctta 1860  
tctctgcaag ggaacaattg ctgaaagcat ctgtaattg aggatttttg aacatgatgc 1920  
agggtttcct tctctggcag atacagtacc cctcatcatg ttttaggctt aaactccttc 1980  
caacacgatt ggttattata atagataaaa ataaaggatt tgcaccatgt tgaccaagac 2040  
aaattagggc tgagggagaa catatactcc tctcagctgg attaacagca tcatctctct 2100  
cgcaattcct gtttaattata gctcctgcat caggcctaaa atgagcataa taactctctc 2160  
catagaaagt atgagcctgc cctcctggaa ctcgaaaate ttgtgaaaat ggatcagcct 2220  
cggatatacac agtcatgaga aagacatagt accgcatatg aagattgggtc agatagggtg 2280  
ccattaaact aatgacttta acaaaatact caacagtaga tgaaagtttg tcacctccag 2340  
aagcactata tacagaatgg gttgcttgaa agtggccttt tatagcagct ggatgtgtag 2400  
cgtaattcct actagatagt ctgggagctc catctgcata ttccaactcg gaggagggag 2460  
aacctgtatt atggctccag tgcttccatg cattcatagg cctgtgtca tcagactcag 2520  
atactatctg agaaacaagg tgttcaaagc tctgtgaate attgaggggt ttgatttcat 2580  
aggtaagggt atccaacttt atgacccctg acaggecccc ataacaagta tccacagtga 2640  
ccatggattg caggatcccc tccaggtagc caatatagta acaatctaca ggaaaaaagg 2700  
ggtactccat ctgtaaggct ccttggctat cttgagttgt cagcaacaag tgtctgggct 2760  
aaatgagtgct ctttctccgc aggtggatga tatgtctctg gccccgaaaa cgaagctat 2820  
acgagagcag tctttgtgct tgaagtcctt tggatggta gatctccttc cgaagataa 2880  
ccacctccga tgagatgtaa cgccaagtgg gatggccttg agaacaccag actggaacca 2940  
ggaggagcag ccagagtgca aatagcaaga ggaggacct ggggaccaca ggtctttcca 3000  
ctagcctcat gccccaggtc agagataaca tctgggtgg agctaactcc ctctctgtg 3060  
gccactgect ggtctagaaa atactgacag aggaactaaa acctcctcag tctcccaacc 3120  
taagtgggta ccagacaac tggagttagg taacagtcac tgggtgtggc aggaattgag 3180  
tctgaatgtg ttagctgagg ttgaggttaa atattgtcaa aagggatgtc tataaatgtg 3240  
cctggacaag aaaagtcaga agcagcaagg agtgtctctg acaggctcaa tcttttcttt 3300

ES 2 748 832 T3

tctttttttg aagttcaaaa tatcatttcc acgtgaatgt atttggttcc cagtgtgact 3360  
ctgggtctct ttctaggagt caatatttct ttatatcttg gctcatgttt ttcacagttg 3420  
ttctaacttc ttgttttggt ttgtttggtt gtttggttga aagttagaag taaatactgt 3480  
ctatatttagc ctttttagcta taaatgattg tttttatttc ttctaatacat gttttgtttg 3540  
agttttggtt aaactattta caaatgagtt ttttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag 3600  
tttggagctt tctgttaata ttgtgttggt gtttctccaa tattattaga cctgagaatt 3660  
ctacctgggt acctgtgaac tccagaattt ttaaaaattc catctcttgga gaacattatc 3720  
tctgaccccg tctgaggccg aagtggctgt cccctccaa cctttagat ctttctttcc 3780  
tgactattgg gatttcttca agcaatcagg ctgatgggtt ctcagcagt agaccagtag 3840  
actgtcggta tgaacgtcga agagtctgcc acacactccg ggttcataca cagtgccttc 3900  
gcgctctcta cttttgtaga aggaaatgca gcctctgagt tttctccaag aaatcattga 3960  
tgaaaggtg aaaagatggg tatcaccggg agttcatgac aagcctggc tcagacacgt 4020  
gagcaaggtc tacagcccca aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagataggag 4080  
aaaaaatgg gtagttggag ggttgatcaa cttacttct ctcaaacata tatactcat 4140  
ctaagtgtgc aggggaaaac tctgtagaac tactgggata cctgctcacc ccaggagcc 4200  
tcatgaataa gtctctgctt ctgccttgta gccatgagca ttaactgacc tgataccct 4260  
gcagcttctt agggaagagg gaggaagtga cttggcccct gtctggttaa ggtaagagga 4320  
gataaatccc ttctcattga ttagggtgag aggggtcatg tgctctatca ttggtgacct 4380  
agttgggaca tgggtttata ccaaagtcac cactctgagg ttctgtgtac caccaggctg 4440  
aactcccata tctacatgg acataggaca acaccaagca gaaggaggt ttaggactaa 4500  
actgaaggac agagatgagg tttctaaca actagggagt gccaggcca gccctctaa 4560  
ccactatagg acaactgtga gtctggttac aaagagagat tactcaaggt ccttagcact 4620  
gattacagag catatctcag atgcctctg ctgaccagat gtatcttgc ataactctgc 4680  
tatccagatt cagaaaattg atgccacata gccaaagtga ctttcaggaa cagaogattt 4740  
aaaaacaggc agagagatgt gagagaaagg agaaggagag agagaaggga gagggagaga 4800  
agagagaggg agacggagaa ggaaagaggg agaaggagaa ggagagaagg ggcattggaca 4860  
gagggagggg cagaaggaga gaggagatag agagggggat aaggaagaag ggagggaggg 4920  
agagagagag aaggctaagt ctttccatac ctgggtccca atacctcta taaccaagc 4980  
acatggtttc acatatcaca atgcggttg gatatagata actgtaata cttgtgaaaa 5040  
taatggggct gagatctggg gtttcatga tagtttcaa gtcaccgtac tgactaaaac 5100  
cttccactgg cccatctcca gcttctaata ctgaggggat caaatttccc actaagtgtg 5160  
tttagaaaga tctccacctt ttgcccctg tcttccagt cccacactac gttctggctc 5220  
cccacatctg atgtcttctc agtgattctg gccctgcctg ctccacagct acaaacctc 5280  
tctataatg agctctgtgc tgagccatca tctgaaatca atccacctta agcagatgtt 5340  
ttgcttattt ttctgtgtc catactacag aggaaaggta ggcattgtag agctgaagca 5400  
tctcacctca ttccaagcac cctcagctc taaatgtgcc ccctgtttc cagaagtgca 5460  
acctcaagca ttttttatc attcatctta gagggccaca tgtgctgtag tgttataaga 5520  
tgaaatttaa agcattaatt attctaaca agccaattaa acaagccaaa aacattcatc 5580  
agtcattccc atggaacctc tgaagcatct tctgctcta acctgggtt tccagggtc 5640  
gctctgggat cacaggagct gtctgtcta ccagccatat aaaggcagac ctatcagaat 5700  
tacaccagac ttctcaccat agactataaa agccagaata tcttgacag atgttataca 5760  
gaaactaaga gaacacaaat gccagccag gctactata ccagcaaac tctcaattac 5820  
catcgatgaa gaaaccaaga tattcatta caagtccaaa ttacacaa atctttccat 5880  
aaatccagcc ctacaaagga tagcagatgg aaaactccaa cacagtagg aaaactacac 5940  
cctagaaaga gcaactaaagt aatcatcttt caacacactc aaaagaagat aaccacacaa 6000  
acataattec acctctaaca acaaaaataa agtaggcaac aatcactatt ccttaatac 6060  
tcttttaaca tcaatggact caattctcca ataaaaagac atagactaac agactgaata 6120  
cataaacagg acacagcatt ttgtgcata aagcaaacac agegttactt tttttttct 6180  
aaatgacatt ttttattaga tattgtcttt attgacattt caaatgttat cccctttct 6240  
ggtttaccct ctgaaatccc ctatctctc cccctcccc tgctacccaa tccaccact 6300  
cccacttcca ggccctggca atcccctata tttgggcata gaccctcac aggaccaagg 6360  
tactctctt gcatlgatga ccaactagtc cattctctgc taaaaatgca gctagatcta 6420  
tgagtcccac catgttttct tttgttggtg gtttcatgcc agggagctct tggagtactg 6480  
attggttcat attgttgttc tcctatggg gttacaaaac ccttcaact ctgggtctc 6540  
ttctctgget gcctcattgg ggacctgtg ggaagtccaa tggatgactg ttgactcca 6600  
cttctgtatt tgccaggcac tggcagagcc tctcagaaga cagctatata aagatcctgg 6660  
cagcaagctc ttgttggtat ccacaaaagt gtctggtggt tgtctatggg atggatcccc 6720  
aaaggggcag tctctggatg gtcattctt cagtctctgt tccacacttt gtctctttaa 6780  
ctccttccat gactatttta ttctccctc taagaaggac cgaagtatc atactttgg 6840  
cttccctctt gaaattcatg tgttttgta attgtatctt tgatattccg aacttctggg 6900

ES 2 748 832 T3

ctaatatcca cttatcagtg agtgaatate atgtgtgttc ttatgtgatt gagttacctc 6960  
 actcaggatg atatacctcca gaaccatcca tttgtctaag aatttaataga attcattggt 7020  
 tttaatagct gaggagtact ccattgtgta aatgtaccac attttctgta cccattgttc 7080  
 tcttgaggga catctgggtt ctttaagct tctggacatt aaatataaagg ctgctatgga 7140  
 aatagtgagg aatgtgtcct tattacatgt tggagcatct tctgggtata tgcccaggag 7200  
 tgctattgct ggatcctctg atagtactat gtccaatfff ctgaggaaact gccaaactga 7260  
 tttacagagt ggttgtaacca gcttgcaatt ccaccagcaa tggagaaaatg tttccccttc 7320  
 tccacatcct caccaacatc tgctgtcacc tcaatfffgt cttagtattg cagacagggtg 7380  
 tgagggtgaa tctcagccat tctcagccat tccctgatga ctagtatgat tgaaaaaaat 7440  
 tttaaagtgtt tctcagccat tctcagccat tccctgatga attcactggt tagctctgta 7500  
 ctcagggtttt tttaataggg ttatfffgtt ttctggagtc taacgtcttg aattctttct 7560  
 atataattgga tattagcct ctgtcatatt taggattggt aaagatcttt cccaatatgt 7620  
 tggctgcctt tttgtgtcct ttgcttaca gaacctfff aatfffatga ggtcccattt 7680  
 gctaattctt catfffacag cacaagccat tgggtttctg ttcaaaaatc tttcccctg 7740  
 aaccctatct tccagagatct tcccacttt ctcctctata agtttcagtg tctctattat 7800  
 tgtgctgagg ggtaccgaag ttctatttc gaagttccta ttctctagaa agtataggaa 7860  
 ctcccctagg gtttaaaacc gcggtggagc tctgatgtgg gaacgettca gtgttcagga 7920  
 accatattgat ttatfftaaa tatagaatca aaagtaccaa tttgcagttt tgaaagattt 7980  
 attccagtgat aagcattagc aatgcaccaa catcagggtg tttctgaatc caacagctct 8040  
 tatgtcctca tgatattaaa aaaaaaaaaa gggcatccag aactgtgaac ttgagttcta 8100  
 cctgtttccc tactgacatt cagatfffct tttttgcatt ctctttatct tacaggagac 8160  
 aggagggggag ggctaactca ttttactttg gcttgcctct tgctggctct tgcccagaac 8220  
 gtaaagtagc ttgcaagtct tcaaatctaa aaatcttagt aactcctaca cgagtggcaa 8280  
 tgccaaagag cagtgaaca aagaggaagt aaatcagacc aaagagtatt cttaaataca 8340  
 ccactggctc ttgtttttgt tttattgtgt gcctttgaac tggaggggac cactgtctca 8400  
 tgctcccact tagtcccctc tctttgcact ctggaggctt ccaaccaaaa tgacaatggc 8460  
 aattccgatg attgttacac actcctotaa aactgcattt ttctggggtg cagtcataac 8520  
 ccaaatgaga taaacttcca ctgcaagctc cttgatcaca gaacttactt ttggagcagg 8580  
 gggtaaccat tctcaccatt ccagcatctg ttgtttctgt cccaagatgt tcatcaagcc 8640  
 caaagcagtg aaaccagag ataatogatt gatggaatga aacatgttct tgcaaatatg 8700  
 gaagattggt gaacattggtg cactgcaacc tccacacag cttgtcctga tcageacaag 8760  
 cattgaatgt gaggtttct tctgtctag tacaatgcc aaatcgaac cgttgtttgt 8820  
 tgatgtcata gcacttaata ttagcattct tagcacttac accaaagatt tccatgcatt 8880  
 gtatgttgag atcagtgcag ttacctttat agcagtaacc atcttctgag catgggtgctc 8940  
 catcttgagc ataagtgtea tctgggcaaa tgtatffagt cccattacag tactctggaa 9000  
 gatcacatat gttctggata ggtctgcaga gtgtcccaga aggactgtaa gtgcaatffg 9060  
 cacagcataa ttctttatca caaatgctac cagggtgtaa cctgcaatca tttccacagc 9120  
 aggatctga ataacatgcc ttttgggagc cacagtcaca ctgctcatcg ttatctactt 9180  
 tgaagttcc acaaaactta taagtcaatg atgtattata ataaacatga cggtcataga 9240  
 aaagacatgg catcagacca ggagtattaa catgtttgct tatctctgca agggcaacaat 9300  
 tgctgaaagc atctgttaat tgaggatgct tgaacataat gcagggtgtc cttctctggtc 9360  
 agacacagta cccctcatca ttttttaagc ctaaactcct tccaacacga ttggttatta 9420  
 taggagataa aaataaagga tttcgatcat atttaccaat acaaattagg gctaaggaag 9480  
 aacatatact cctctcagct ggattaacct ggttatcttg tggcccatac ttattaagta 9540  
 aaactcctgc atcaggctta aatffattat aaaagactga cacatagtaa ttataagccg 9600  
 accctcctgg aactgcaaac tcaagtgcga atggatcaga attggtgtac acagtcatga 9660  
 gaaagacata gtaccgcata tgaagattgg tcagatagggt gtccattaaa ctaatgactt 9720  
 gaaacaaata cccaacagta gatgaaagtt tgtcacctgc agcagaatta tatacagaat 9780  
 tggttgcttg aaagtggcct tttatagcag ctggatgtgt agcgtagttc ttactagata 9840  
 tctgggagc tccatctgca tttccaate tggaggagg agaacctgta ttatggctcc 9900  
 agtgcctcca tgcattcata ggccctgtgt catcagactc agatactatc tgagaaacaa 9960  
 ggtgttcaaa gctctgtgaa tcattgaggg gtttgatffc ataggtaagg tcatctaaact 10020  
 tcatgacccc tgacaggccc ccataacaag tatccacagt gaccatggat tgtgggatec 10080  
 cctccaggta gccaatatag taacaatcta caggaaaaaa ggggtaatcc atctgtaagg 10140  
 ctccctggct atcttgagtt gtcagcaaca agtgtctggg ccaaatgagt gtctttctcc 10200  
 gcagggtgat gatatgtctc tggccccgaa aatgcaagct atatgagagc agtctttgtg 10260  
 cttgaagtec tttggtatgg tagatctcct tccgaggaat aaccacctcc gatgagatgt 10320  
 aacgccaagt aggatggcct tgagaacacc agactggaac caggaggagc agccagagtg 10380  
 caaatagcaa gaggaggacc ctggggacca caggctcttc cactagcctc atgcccaggt 10440  
 tcagagataa catcctgggt ggagetaaat ccctctgctg tggccactgc ctggctetaga 10500

ES 2 748 832 T3

aaatactgac agaggactaa aaacctcctc aggctcccaa cctaagtggc taccagaca 10560  
 actggagtta ggtaacagtc actgggtgtg gcaggaattg agtctgaatg tgttagctga 10620  
 gggtgaggtt aatatattgtc aaaagggatg tctataaatg tgccctggaca agaaaagtca 10680  
 gaagcagcaa ggagtgtctc tgacaggctc aatcctttct tttctttttt tgaagttcaa 10740  
 aatatcattt ccacgtgaat gtatttgggtt cccagtggtga ctctgggtct ctttctagga 10800  
 gtcaatattt ctttataatct tggctcatgt ttctcacagt tgttctaatt tcttgttttg 10860  
 ttttgtttgt ttgtttgaac gttagtagta aatactgtct atattagcct ttttagctata 10920  
 aatgattggt tttatttctt ctaatcatat tttgtttgag ttttgggttaa actatattaca 10980  
 aatgagtttt ttttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag tttggagcct tctgttaata 11040  
 ttgtgtggtt atttttccaa tattattaga cctgagaatt ctatctgggt acctgtgaac 11100  
 tctagaattt ttaaaaattc catctcttgg gaacattacc tctgaccccg tctgaggccg 11160  
 aagtggctgt cccctcccaa ccttttagtat ctttctttcc tgactattgg gattttottca 11220  
 agcaatcagg ctgatgggtt ctcagcagtg agaccagtag actgcoggta tgaacgtcga 11280  
 agagactgcc acacactcca ggttcatcaa cagtgtcttc gcgtctctta cttttgtaga 11340  
 aggaaaagca gcctctgagt tatctccaag aaatcattaa tgaagagttt aaaagatggg 11400  
 tatcaccogg agttcatgac aagccctggc tcagacagtg gagcaaggtc tacagcccca 11460  
 aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagatagaag aaaaaaatgg gtgggtggag 11520  
 ggttgatcaa cttacttctc ctcaaacata tatatctcat ctaagtgtgc aggggaaaac 11580  
 tctgtaggac tactgggatt gttattatca ttattattat tattattatt attattatta 11640  
 ttattattat tattaactta aggcatttta ttagatattt tcttcattta gttttcaaat 11700  
 gttatccccc gaacctecta tactctctcc ctgcctgtct ccccaacca cccaotccta 11760  
 catcctggcc ctggcattcc cctatactgt ggcagatgat cttcgtgaaga ccaagagcct 11820  
 ttctcccat tgatggccta ctaggetatc ctcttttaca tatgcaacta gagtoacagc 11880  
 tctggggagg tattgcttag ttcatattgt ttttctctct ataggggtgc agatcccttt 11940  
 agctccttgg gtactttctc tagctcctcc attggggggc ctgtgttcca tccaatagat 12000  
 gactgtgagc atccacttct gtatttgcca ggtattggca tggatcttac tgcacottct 12060  
 gaactcteta agcagcttcc ctggtcacct ccaggagcct catgaataag tctctgcttc 12120  
 ccccttgtgg ctatgagcat tactgcacct gatacacctt gcagcttctt aggggaagagg 12180  
 gaggaagtgg cttggccctt gtctgggttaa ggaagagga gataaatccc ttctcatgaa 12240  
 ttagggtagg aagggtcatg tgctctatca ttggtgacca acttggggac atgggcttat 12300  
 acagtcatca ctctgaggct ctgtgtacca ccagactgaa ctcccatac ctacatgca 12360  
 ataggacaac accaagtaga aggaggtttt aggactaaac tgaaggacag agatgggggt 12420  
 tctaaacaac tagggagtgc cagggccagc ctctctaacc actataggac actatggagt 12480  
 ctggttacaa agagagatta ctcaaggtcc tttagcactga ttacagagca ttactcagat 12540  
 gccctctgct gaccagatgt atctttgcat aatctgccta tccagattca gaaaattgat 12600  
 gccacatagc caagtggact ttcaggaaca gacgatttaa aaacaggcag agagatgtga 12660  
 gagaaaggag aaggagagag agaagggaga gggagagaag agagagggag acggagaagg 12720  
 aaagagggag aaggagaagg agagaagggg catggacaga gggagggaca gaaggagaga 12780  
 ggagatagag agggggataa ggaagaaagg agggagggag agagagagaa ggctaagtct 12840  
 ttccatacct gggteccaat acctcttata acccaagcac atgggtttcag atatacaat 12900  
 gcggttggga tatagataac tgtaaatact tgtgaaaata atggggctga gatctgggg 12960  
 tttcatgata gtttcaaagt cactgtactg actaaaacct tccactggcc catctccagc 13020  
 ttgttaatct gagggtatca aatttcccac taagtgtgtt tagaaagatc tccacctttt 13080  
 tgccctagtc ttccagtgcc ccacctacgt tctgggtctcc cacatctgat gtcttctcag 13140  
 tgattctggc cctgctgtct ccacagctac aaacccttcc ctataatgag ctctgtgtctg 13200  
 agccatcatc ctgaatcaat ccaccttaag cagatgtttt gcttattttt cctgtgtcca 13260  
 tactacagag gaagggtagg catgtagaag ctgaggcctc tcatctcact ctaagcacc 13320  
 tcagtctcta aatgtgcccc ttgttttcca gcagttcagc ctcaagcate ttttattcac 13380  
 tcgtcttaga gggacacatg tgctgtagtg ttataagatg aaatltaaag cattagttat 13440  
 tcccaacaag ccaattaaac aagccaaaaa cattcatcag tcatlcccat ggaacctctg 13500  
 aagcatcttc ctgctctaac cttgagtttc ctagggctgc tgtgggatca caggagctgt 13560  
 cctgtttacc agcctatcct gtcccacggg attcagttat tagtgggtgc gagggggacc 13620  
 gcaaacctgg aagaaaaagg gattggaaga gaaaagagaa acgaagacca agtagactct 13680  
 ttctatcaa ggtcttctgt tattaggctg aggtgcctgg tgtaaagcat gctctcggg 13740  
 gaataggaag gggctgaggg ggaattttac aaagaacaaa gaagcgggca tctgctgaca 13800  
 tgagggccga agtcaggctc caggcagcgg gagctccacc gcggtggegc catttcaata 13860  
 cctctttctc cgcacccgac atagataaag cttta 13894

<210> 4  
 <211> 251

ES 2 748 832 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> sintética  
  
 <400> 4  
 ccagcttcat tagtaatcgt tcactctgtgg taaaaaggca ggatttgaag cgatggaaga 60  
 tgggagtaacg gggcggttggg agacaaagtg ccacacagcg cagccttcgt ctagaccccc 120  
 gggctaacta taacggtcct aaggtagcga ggggatgaca gattctctgt tcagtgcact 180  
 cagggctctgc ctccacgaga atcaccatgc cttttctcaa gactgtgttc tgtgcagtgc 240  
 cctgtcagtg g 251  
  
 10  
 <210> 5  
 <211> 245  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 <400> 5  
 20  
 aggggtcgag ggggaatddd acaaagaaca aagaagcggg catctgctga catgagggcc 60  
 gaagtcaggc tccaggcagc gggagctcca ccggcgggtggc gccatttcat tacctctttc 120  
 tccgcacccg acatagataa agcttatccc ccaccaagca aatcccccta cctggggcgcg 180  
 agcttcccgt atgtgggaaa atgaatccct gaggtcgatt gctgcatgca atgaaattca 240  
 actag 245  
  
 <210> 6  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 30  
 <400> 6  
 caggtagcgc tgcagcagtc a 21  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 40  
 <400> 7  
 ggagatggca caggtgagtg a 21  
  
 45  
 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50  
 <220>  
 <223> sintética  
  
 <400> 8  
 55 tccaggactg gtgaagc 17  
  
 <210> 9

	<211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> sintética	
	<400> 9 tagtcccagt gatgagaaag agat	24
10	<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> sintética	
20	<400> 10 gagaacacag aagtggatga gatc	24
	<210> 11 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> sintética	
30	<400> 11 tgagtccagt ccaggga	17
	<210> 12 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética	
40	<400> 12 aaaaattgag tgtgaatgga taagagtg	28
45	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> sintética	
55	<400> 13 aacctggtc agaaactgcc a	21
	<210> 14 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> sintética	
65	<400> 14 agagaaacag tggatacgt	19

5	<210> 15 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> sintética	
10	<400> 15 aactacgcac agaagtcca gg	22
15	<210> 16 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> sintética	
20	<400> 16 gctcgtgat ttgtccgc	18
25	<210> 17 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> sintética	
30	<400> 17 cagagtcacg attacc	16
35	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> sintética	
40	<400> 18 tgagcagcac cctcacgtt	19
45	<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> sintética	
50	<400> 19 gtggcctcac aggtatagct gtt	23
55	<210> 20 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> sintética	
60	<400> 20 accaaggacg agtatgaa	

		18
5	<210> 21 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
	<400> 21 gctagtagtg gggcctacag gcctttgat atc	33
15	<210> 22 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
	<400> 22 gcaaaagccc aggggagtg gagctactac acctatgctt ttgatatc	48
25	<210> 23 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> sintética	
	<400> 23 gegagagagg gtatagtgga aactactgag gactttgatt ac	42
35		
40	<210> 24 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
45	<400> 24 gegagagga cagtgggagc cctcttgac tac	33
50	<210> 25 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
	<400> 25 gcgaaaccta gtgggagcta ctctgggtc gacccc	36
60	<210> 26 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> sintética	

	<400> 26 gcgagaggag gagggtataa ctggaactcg aatgctttg atac	45
5	<210> 27 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
15	<400> 27 gcgagaggat ataactggaa ctacttgac tac	33
20	<210> 28 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> sintética	
30	<400> 28 gcgaaagagt ataactggaa ccaactgtac ttgactac	39
35	<210> 29 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> sintética	
45	<400> 29 gcgagagaga taactggaac ccccttgac tac	33
50	<210> 30 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> sintética	
60	<400> 30 gcgaggggat ataactggaa cttttctttt ttgactac	39
65	<210> 31 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
	<400> 31 gcgagaggta actggaactc tctgggcttt gactac	36
	<210> 32 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

# ES 2 748 832 T3

	<220> <223> sintética	
5	<400> 32 gcgaaaaggg ctactatggt tcggggagct cttgactac	39
10	<210> 33 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> sintética	
	<400> 33 gcgagagata ttactatggt tcggggaggt attataacga aggtctacgg tatggacgctc	60
20	<210> 34 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> sintética	
30	<400> 34 gcgagagagt atagcagctt tgactac	27
35	<210> 35 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> sintética	
	<400> 35 gcgagagaga gtatagcagc tcggttgac tac	33
45	<210> 36 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> sintética	
	<400> 36 gcaagagagg ataggagctc gccctcggg tactttgact ac	42
55	<210> 37 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> sintética	
65	<400> 37 gcgagagatc ttgggaagg ctac	24

5	<210> 38 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
10	<400> 38 accaccata actggggagg gttgactac	30
15	<210> 39 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
20	<400> 39 gcgagagata ggggaccg	18
25	<210> 40 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> sintética	
35	<400> 40 caacagagtt atagtacccc tccggagacg	30
40	<210> 41 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
45	<400> 41 caacagctta atagttaccc tcggacg	27
50	<210> 42 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
55	<400> 42 caacagctta atagttacca ttcact	26
60	<210> 43 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> sintética	

	<400> 43 caacatttta atagttaccc gctcact	27
5	<210> 44 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
15	<400> 44 cagcagtata ataactggcc tctcact	27
20	<210> 45 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> sintética	
30	<400> 45 ctacagcata atagttaccc gtggacg	27
35	<210> 46 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> sintética	
45	<400> 46 ctacagcata atagttaccc tcggacg	27
50	<210> 47 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> sintética	
60	<400> 47 cagcagtatg gtagctcacc tcggacg	27
65	<210> 48 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> sintética	
	<400> 48 atgcaaggta cacactggcc gtggacg	27
	<210> 49	

	<211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> sintética	
10	<400> 49 atgcaagggt cacactggcc gtacact	27
15	<210> 50 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
25	<400> 50 atgcaaggta cacactggcc gtcact	27
30	<210> 51 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética	
40	<400> 51 caacagtatg ataactccc tcccact	27
45	<210> 52 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> sintética	
55	<400> 52 caacagtatg ataactccc attcact	27
60	<210> 53 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> sintética	
70	<400> 53 caacagtatg ataactccc cgtcact	27
75	<210> 54 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
80	<220> <223> sintética	

	<400> 54 caacagtatg ataatctccc gatcacc	27
5	<210> 55 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> sintética	
15	<400> 55 caacggatt acaatgccga cacc	24
20	<210> 56 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> sintética	
	<400> 56 caacagagtt acagtacccc catgtacact	30
30	<210> 57 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> sintética	
	<400> 57 caacagagtt acagtacccc tctcact	27
40	<210> 58 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> sintética	
50	<400> 58 caacagagtt acagtactcc tcccact	27

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para modificar un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de un ratón, que comprende:

- 5 (a) realizar una primera modificación del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, comprendiendo la primera modificación la colocación de uno o más segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  de inmunoglobulina humana o la sustitución de una o más secuencias en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón por uno o más segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  de inmunoglobulina humana, donde dicha primera modificación elimina la expresión de ADAM6 de ratón a partir de un alelo Adam6 endógeno, de modo que un ratón macho que tiene la  
10 primera modificación presenta una fertilidad reducida; y  
(b) realizar una segunda modificación del ratón para añadir una secuencia de ácido nucleico que confiera al ratón actividad de ADAM6 que es funcional en un ratón macho, secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6a de ratón o un ortólogo, un homólogo o un fragmento funcional de la misma, y una proteína ADAM6b de ratón o un ortólogo, un homólogo o un fragmento funcional de la misma, donde dicha segunda modificación se  
15 realiza de modo que dicha secuencia de ácido nucleico esté flanqueada en dirección 5', en dirección 3' o en dirección 5' y en dirección 3' por una secuencia de ácido nucleico que codifica un segmento de gen variable de inmunoglobulina humana de dicho locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno modificado,

preferentemente, donde las primera y segunda modificaciones se realizar simultáneamente.

- 20 2. El método de la reivindicación 1, donde el ratón es macho o donde el ratón es hembra.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, donde dichos segmentos génicos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  de inmunoglobulina humana comprenden  
25 al menos 18 segmentos génicos  $V_H$  de ser humano, 27 segmentos génicos  $D_H$  de ser humano y seis segmentos génicos  $J_H$  de ser humano, que están unidos operativamente a un gen de región constante de ratón después de dicha primera modificación, o  
al menos 39 segmentos génicos  $V_H$  de ser humano, 27 segmentos génicos  $D_H$  de ser humano y seis segmentos génicos  $J_H$  de ser humano que están unidos operativamente a un gen de región constante de ratón después de  
30 dicha primera modificación, o  
al menos 80 segmentos génicos  $V_H$  de ser humano, 27 segmentos génicos  $D_H$  de ser humano y seis segmentos génicos  $J_H$  de ser humano que están unidos operativamente a un gen de región constante de ratón después de dicha primera modificación.
- 35 4. El método de la reivindicación 3, donde el gen de región constante de ratón comprende una secuencia seleccionada de una  $C_H1$ , una bisagra, una  $C_H2$ , una  $C_H3$ , una  $C_H4$  y una combinación de las mismas.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la primera modificación comprende la delección de uno o más segmentos de gen  $V_H$  endógeno.  
40
6. El método de la reivindicación 5, donde la primera modificación comprende la delección de segmentos génicos  $D_H$  y  $J_H$  de ratón.
7. Una célula aislada o un tejido aislado de un ratón obtenible mediante el método de una cualquiera de las  
45 reivindicaciones 1-6.

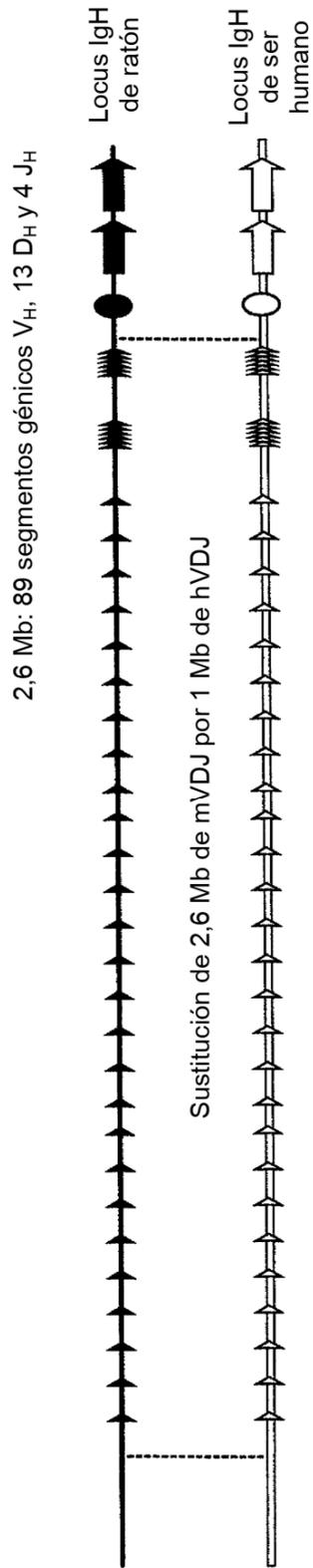


FIG. 1A

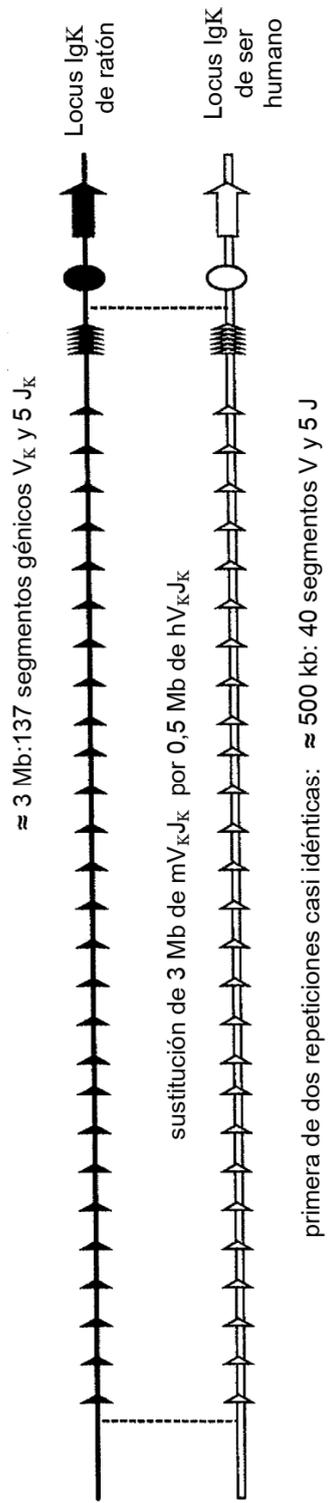


FIG. 1B

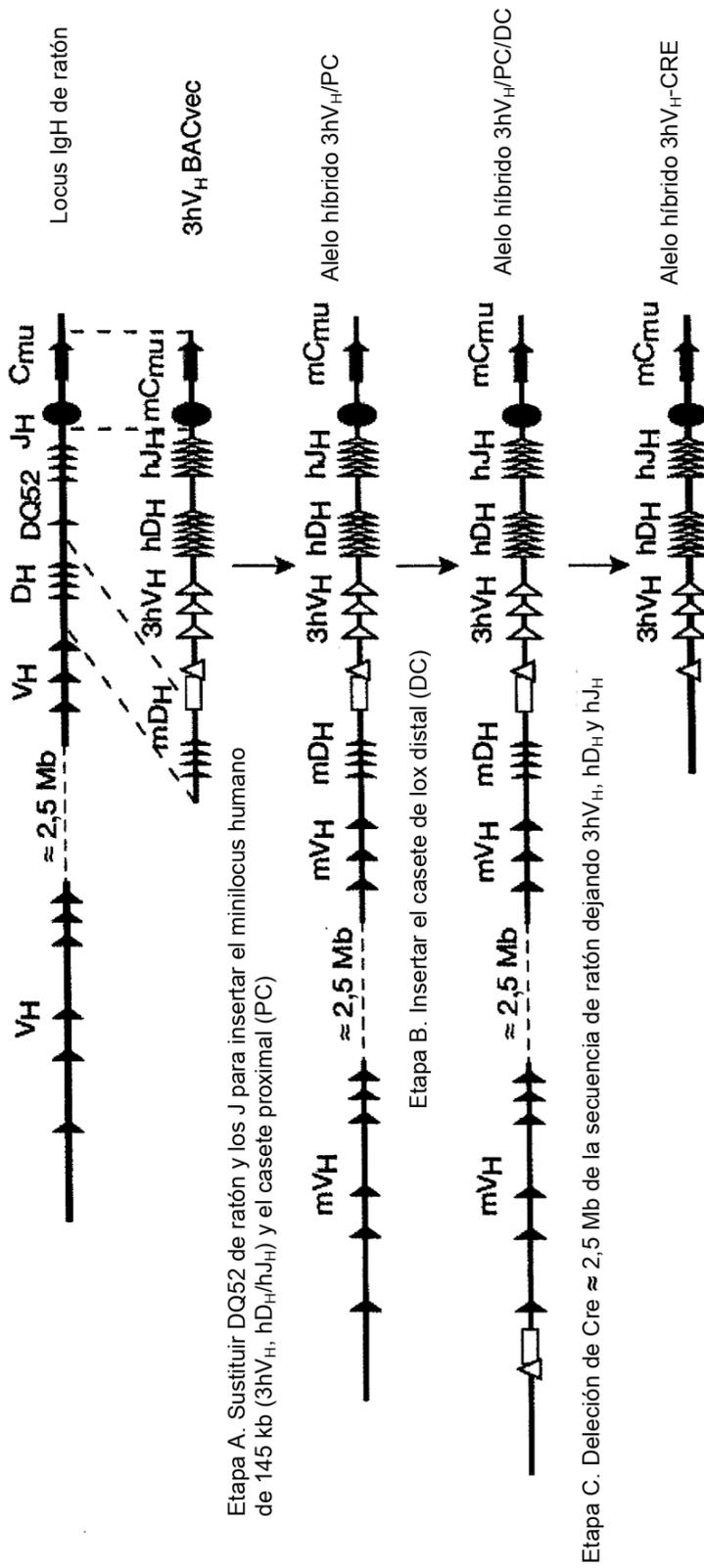


FIG. 2A

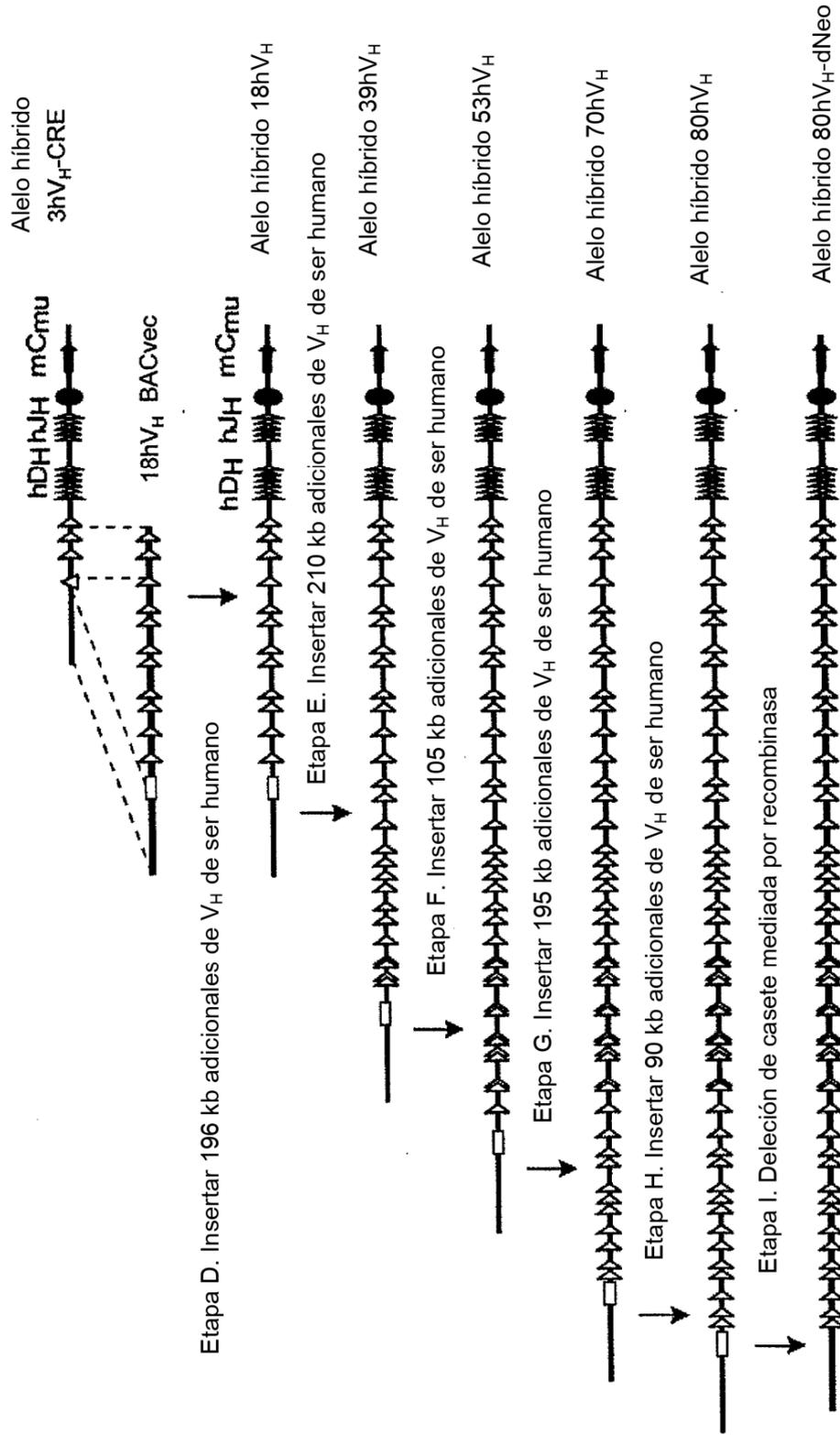


FIG. 2B

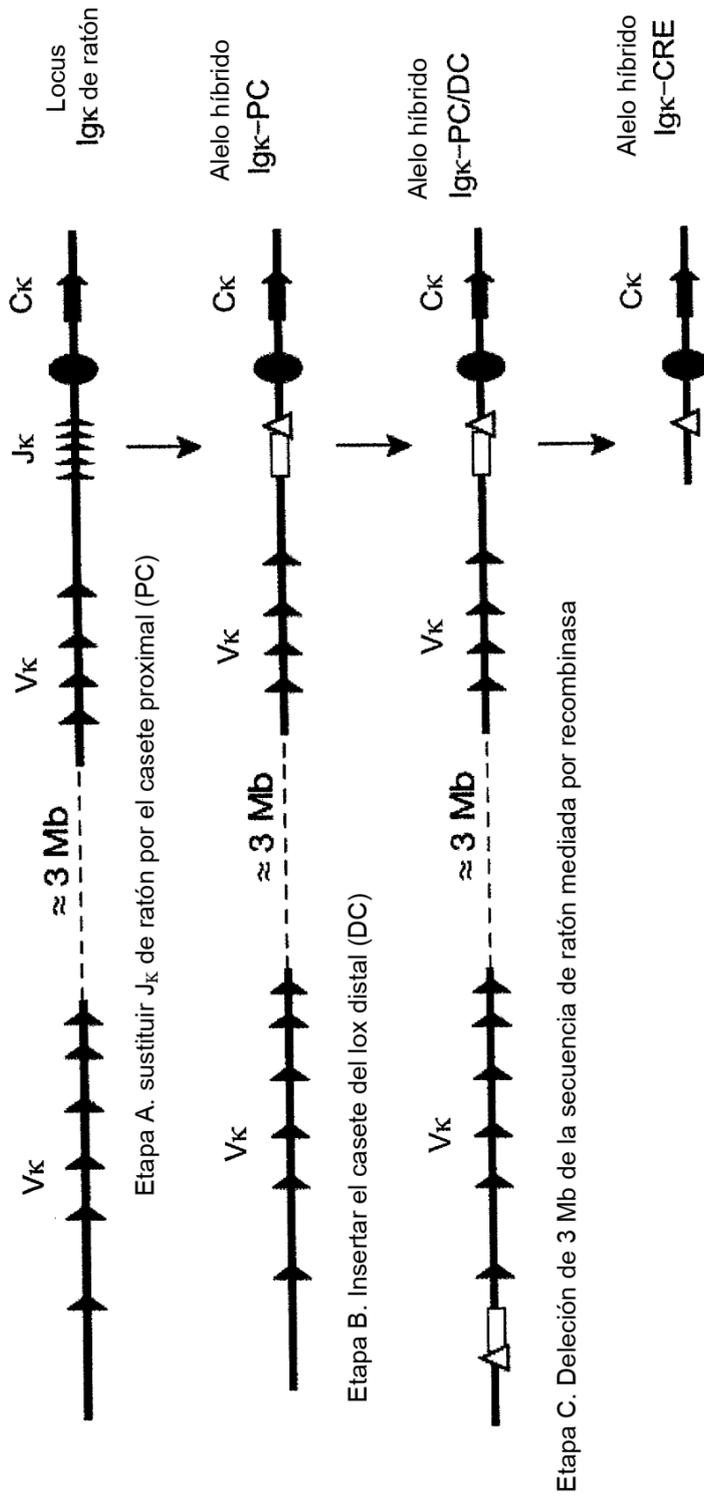


FIG. 2C

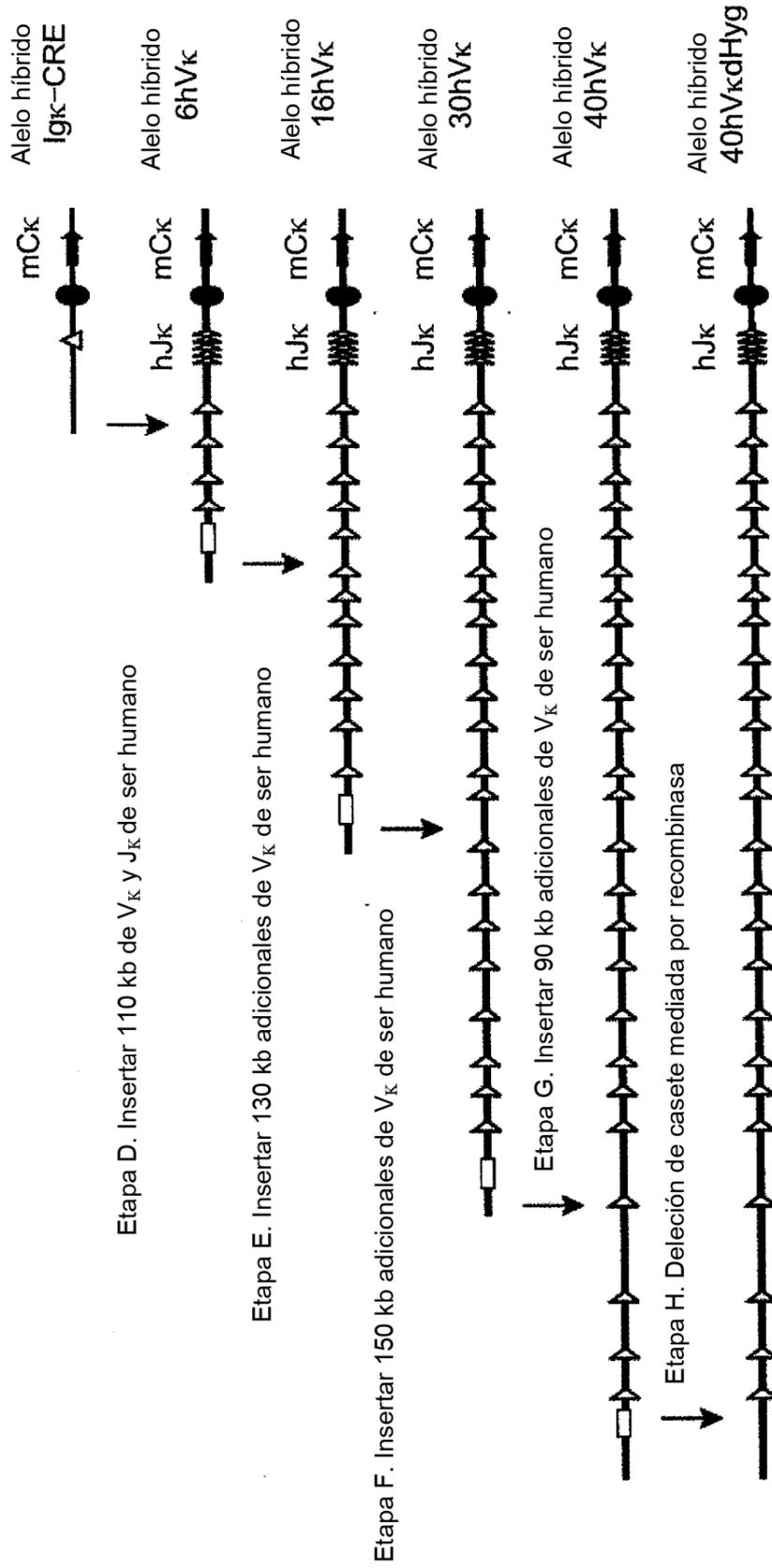


FIG. 2D

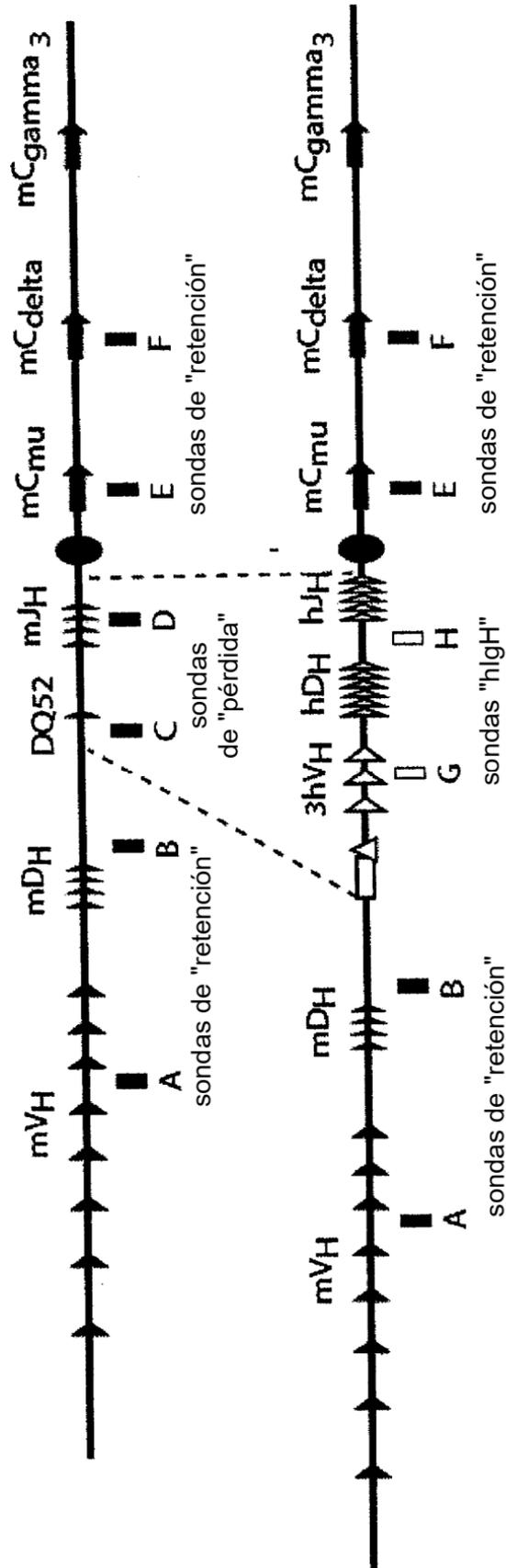


FIG. 3A

	A	B	C	D	E	F	G	H
ES parenteral	Número de copias teórico	2	2	2	2	2	0	0
	Número de copias observado	1,9	1,8	2,1	1,8	1,9	1,8	<0,01
ES modificado	Número de copias teórico	2	2	1	1	2	2	1
	Número de copias observado	1,9	2,4	1,0	1,0	2,0	1,9	+

FIG. 3B

	Número de copias	D	H
Ratones WT	Teórico	2	0
	Observado 1	1,71	< 0,01
	Observado 2	2,07	< 0,01
	Observado 3	2,16	< 0,01
	Observado 4	1,88	< 0,01
Ratones Het	Teórico	1	1
	Observado 1	1,22	1,04
	Observado 2	0,94	1,02
	Observado 3	0,85	0,95
	Observado 4	1,02	1,00
Ratones Homo	Teórico	0	2
	Observado 1	< 0,01	2,37
	Observado 2	< 0,01	2,22
	Observado 3	< 0,01	2,43
	Observado 4	< 0,01	1,93

FIG. 3C

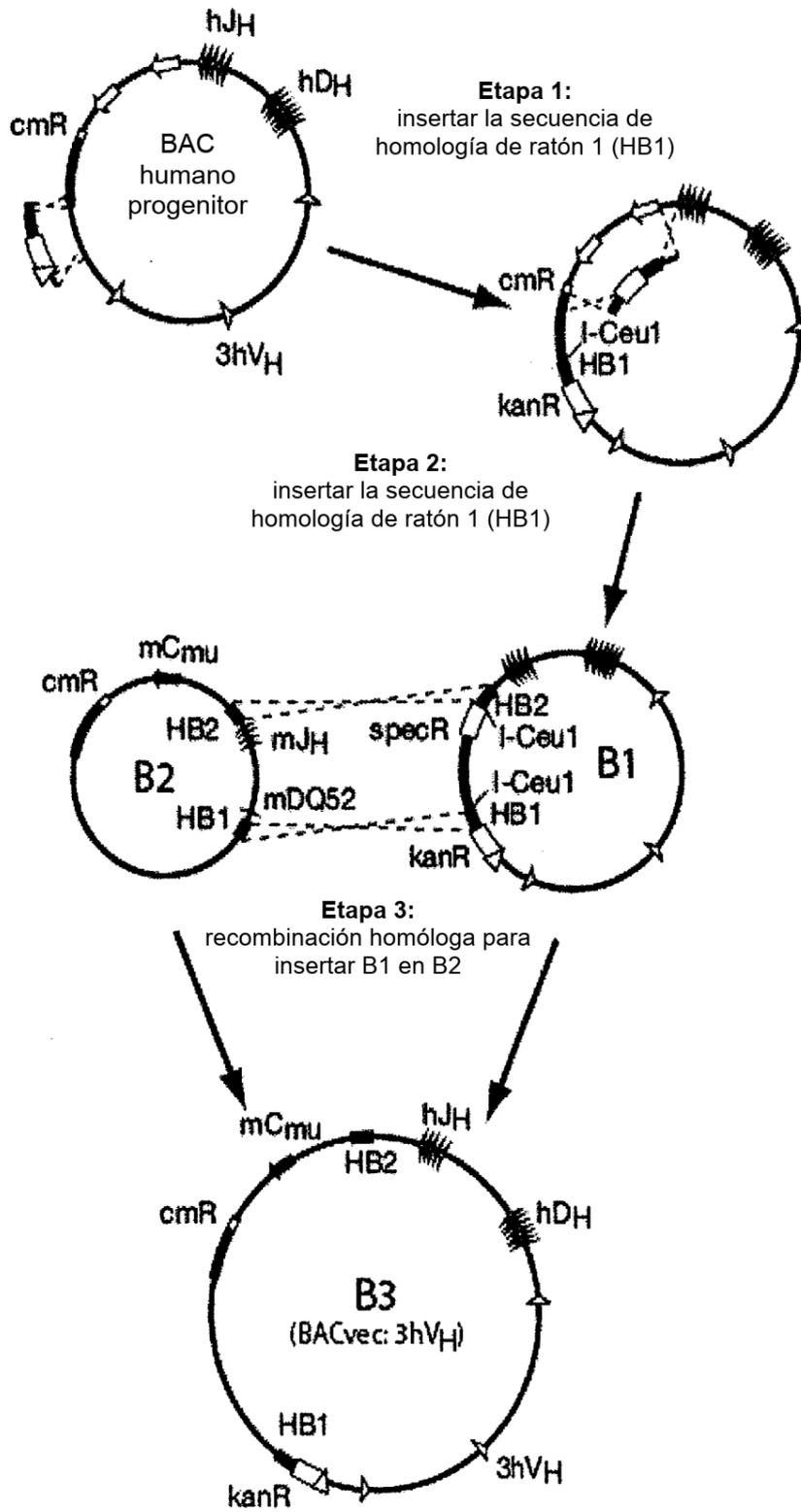


FIG. 4A

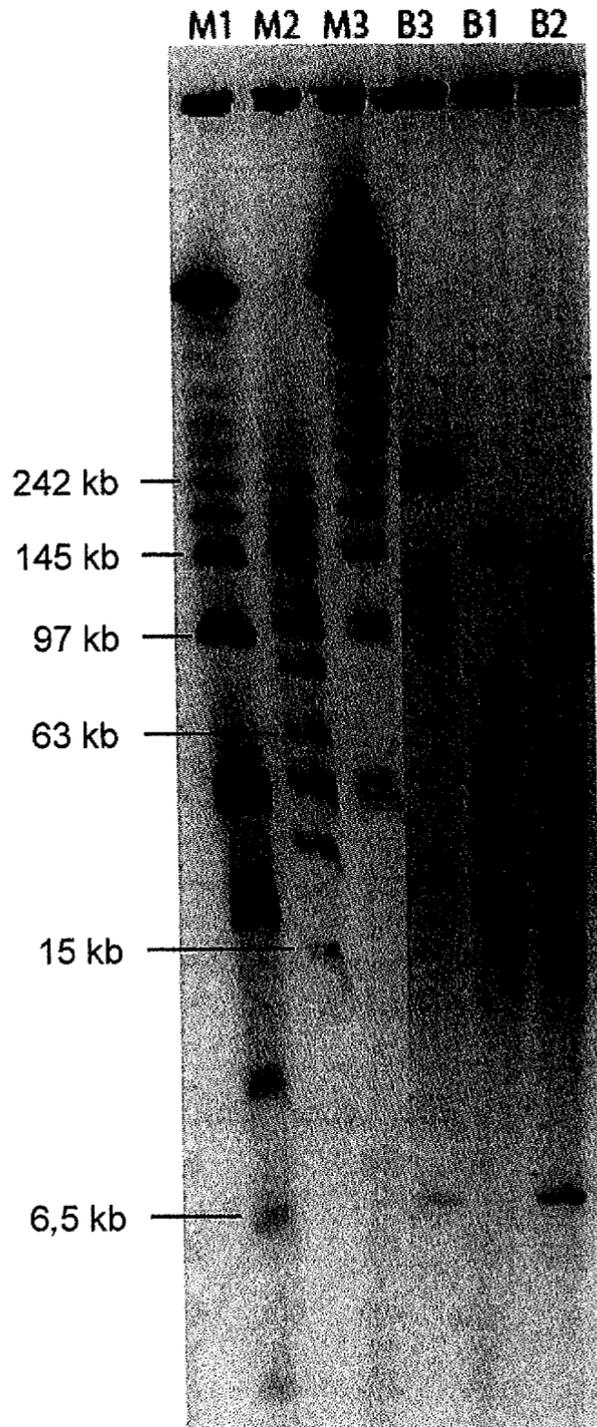


FIG. 4B

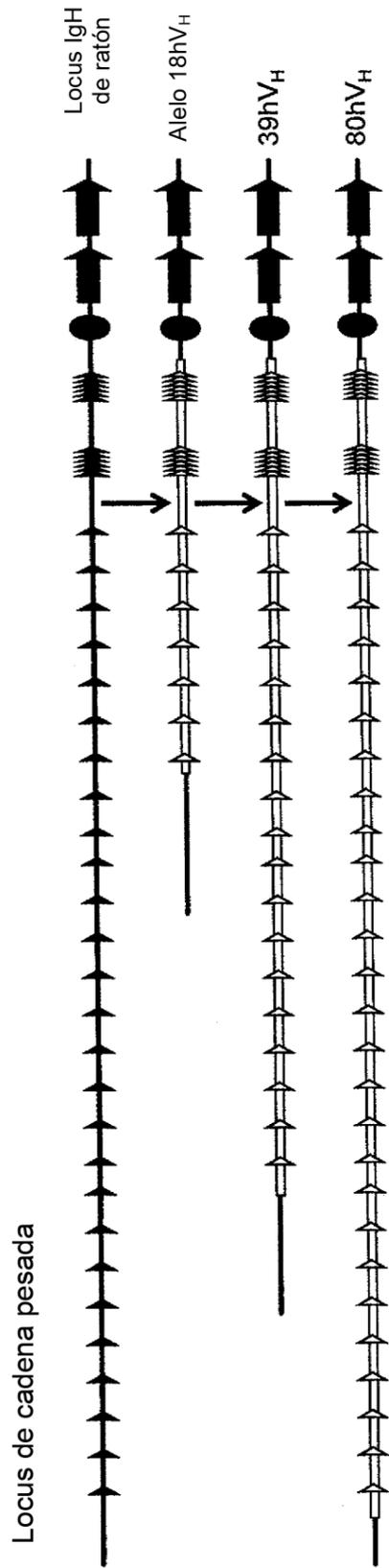


FIG. 5A

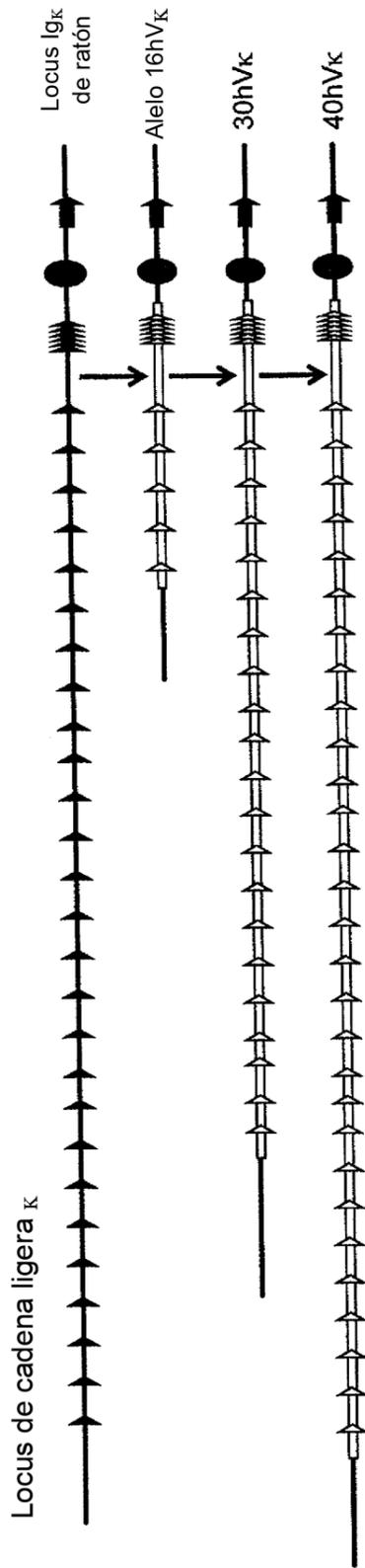


FIG. 5B

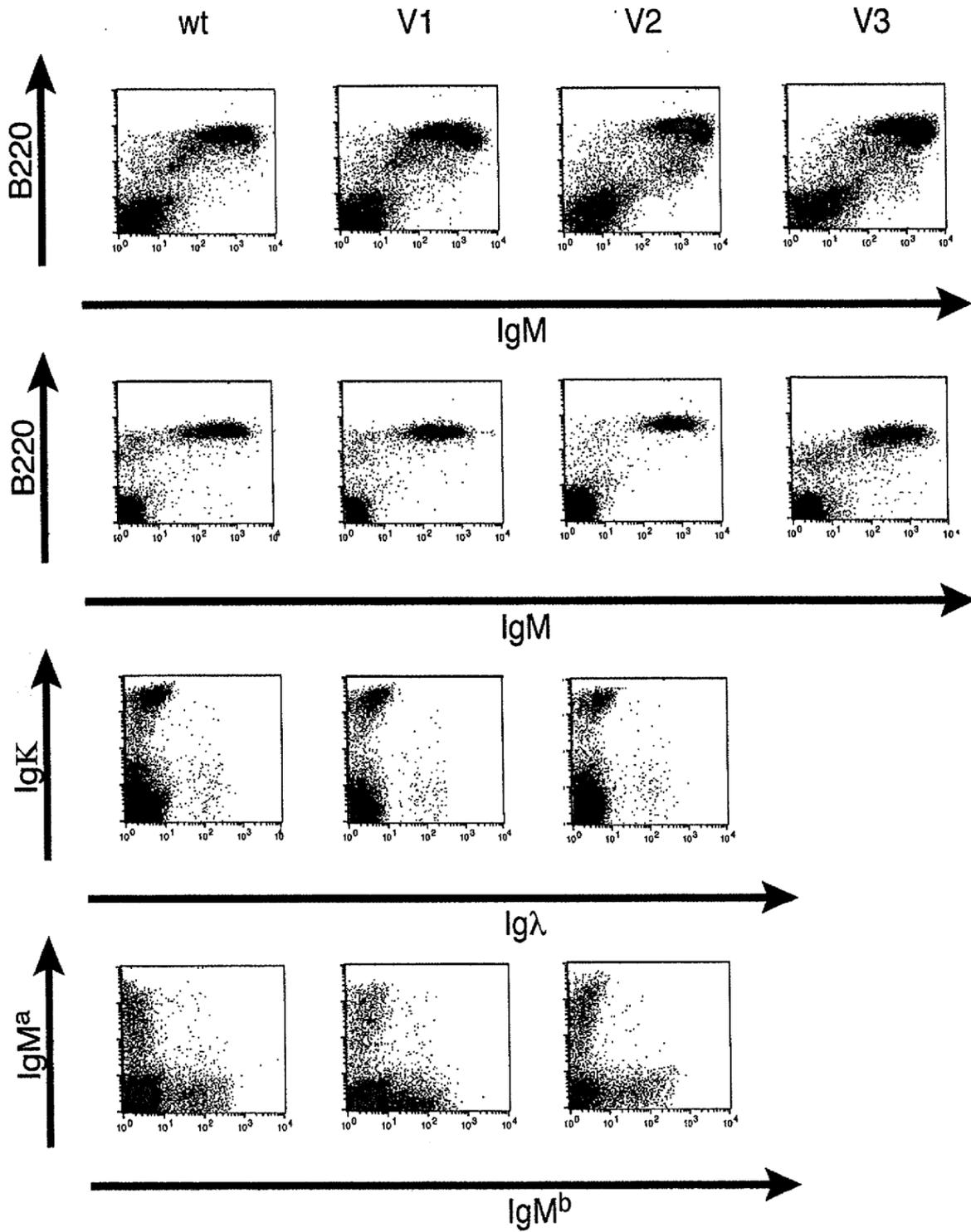


FIG. 6

3'V <sub>H</sub>	N	D <sub>H</sub>	N	5'J <sub>H</sub>
(3-72) GCTAG	(D <sub>H</sub> 1-26)	GGTATAGTGGGAGCTACTAC	AGGC	CTTTTGATATC (3)
(3-9) GCAAAAG		TAGTGGGgcCTAC	ACCT	ATGCTTTTGATATC (3)
(3-7) GCGAGAGA	CCCAGGGG	AGTGGGAGCTACTAC	GAGG	ACTTTGATATC (4)
(4-59) GCGAGAG	G	GGTATAGTGGGaaCTACT	CCT	CTTTGACTAC (4)
(3-23) GCGAAA	GGAC	AGTGGGAGC	C	CTGGTTTCGACCCC (5)
	CC	TAGTGGGAGCTACT		
(4-34) GCGAGAGG	(D <sub>H</sub> 1-7)	GGTATAACTGGAaCTAC	CGA	ATGCTTTTGATATC (3)
(1-2) GCGAGAG	AGGAG	GGTATAACTGGAaCT		ACTACTTTTGACTAC (4)
(3-23) GCGAAAGA	GA	TATAACTGGA	TGG	TACTTTTGACTAC (4)
(3-7) GCGAGAGA	G	GTATAACTGGAaCCaC	CCC	CTTTGACTAC (4)
(4-59) GCGAG	GGGA	ATAACTGGAaC	TTTTCTTTT	TTTGACTAC (4)
(4-39) GCGAGA	GG	TATAACTGGAaCT	CTCTGGG	CTTTTGACTAC (4)
		TAACTGGAaCT		
(3-30) GCGA	(D <sub>H</sub> 3-10)	GTATACTATGGTTCGGGAGTATTATAaC	CTC	TTGACTAC (4)
(1-2) GCGAGAGA	AAAGGGC	TACTATGGTTCGGGAG	GAAGGT	CTACGGTATGGaCGTC (6)
		TATTACTATGGTTCGGGAGTATTATAaC		
(1-2) GCGAGAGA	(D <sub>H</sub> 6-6)	GAGTATAGCAGCTCGTCC		CTTTTGACTAC (4)
(3-48) GCGAGA		GTATAGCAG	TG	TGACTAC (4)
(3-13) GCAAGAGA	GA	GAGTATAGCAGCTCGT	CTCGGG	TACTTTGACTAC (4)
	GG	ATAGgAGCTCGcCC		
(3-7) GCGAGAGA	(D <sub>H</sub> 7-27)	CTAACTGGGGa	AGG	CTAC (4)
(3-15) ACCAC	TCT	TGGGGa	GGG	TTTGACTAC (4)
(3-48) GCGAGA	CCA	TAACTGGGGa		CCg (5)
	GATA	GGGGa		

FIG. 7A

	3'Vk	N	5' Jk
(1-6)	CAACAGAGTTATAGTACCCCTCC	GGA	GACG(1)
(1-9)	CAACAGCTTAATAGTTACCCCTC		GGACG(1)
(1-9)	CAACAGCTTAATAGTTACC		ATTCACT(3)
(1-9)	CAACAttTAAATAGTTACCC		GCTCACT(4)
(3-15)	CAGCAGTATAATAACTGGCCTC		TCACT(4)
(1-17)	CTACAGCATAATAGTTACCC		GTGGACG(1)
(1-17)	CTACAGCATAATAGTTACCCCTC		GGACG(1)
(3-20)	CAGCAGTATGGTAGCTCACCTC		GGACG(1)
(2-30)	ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGACG(1)
(2-30)	ATGCAAGGtCACACTGGCC		GTACACT(2)
(2-30)	ATGCAAGGTACACACTGGCC		GCTCACT(4)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCCTCC		CACT(3)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCC		ATTCACT(3)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCC	CG	TCACT(4)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCC		GATCACC(5)
(1-37)	CAACGGAtTTACAATGCC	GA	CACC(5)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACCC	CA	TGTACACT(2)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACCCCTC		TCACT(4)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACTCCTCC		CACT(4)

FIG. 7B

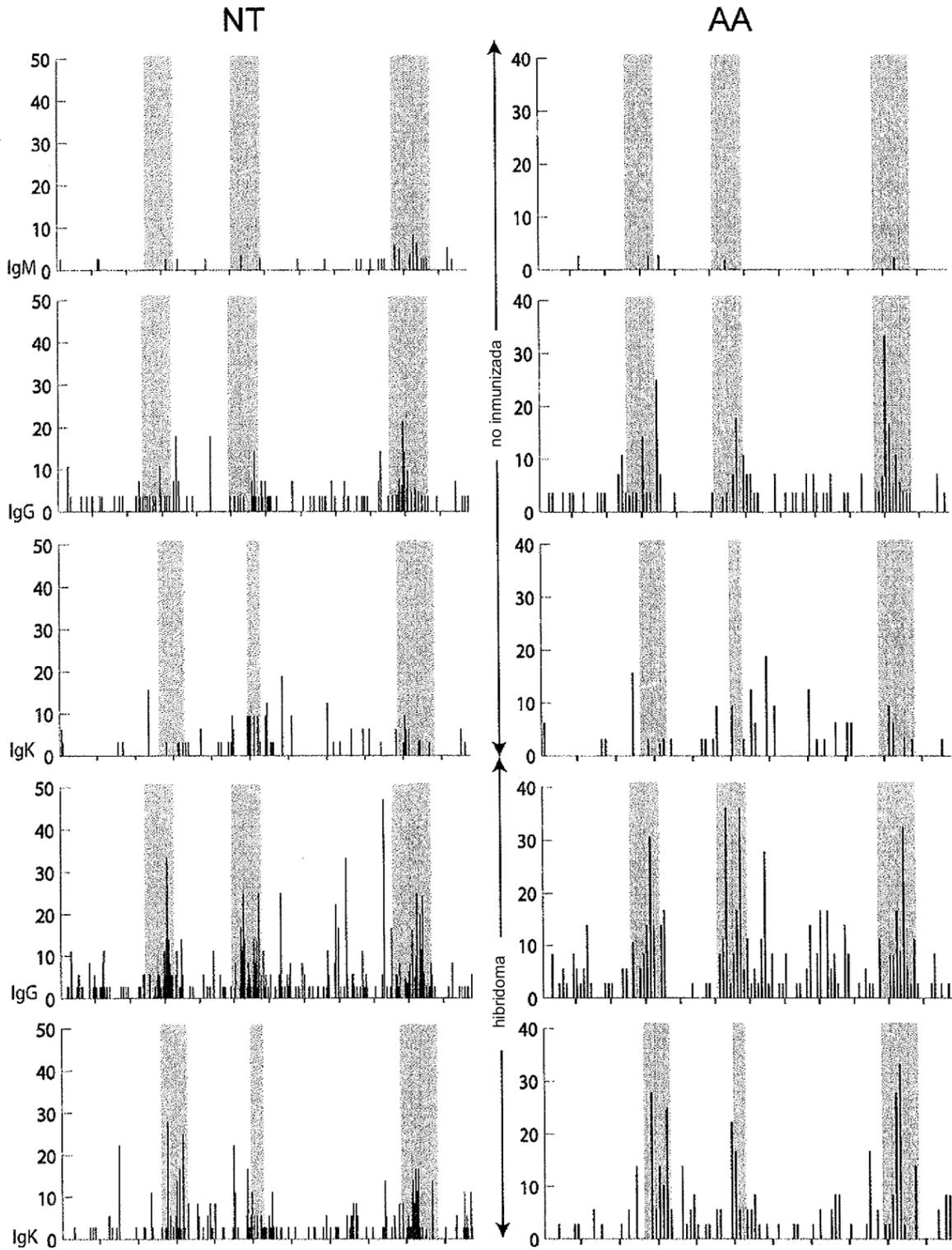


FIG. 8

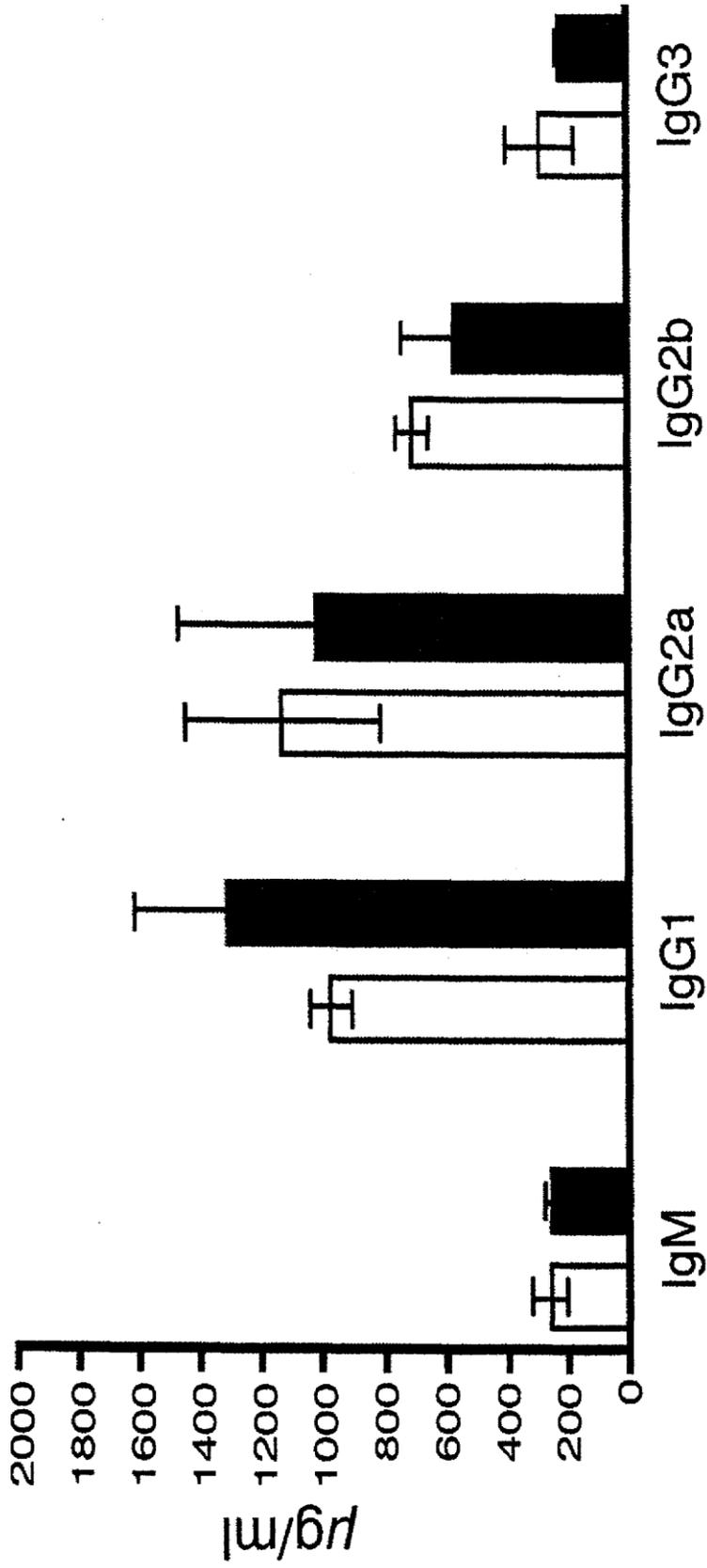


FIG. 9A

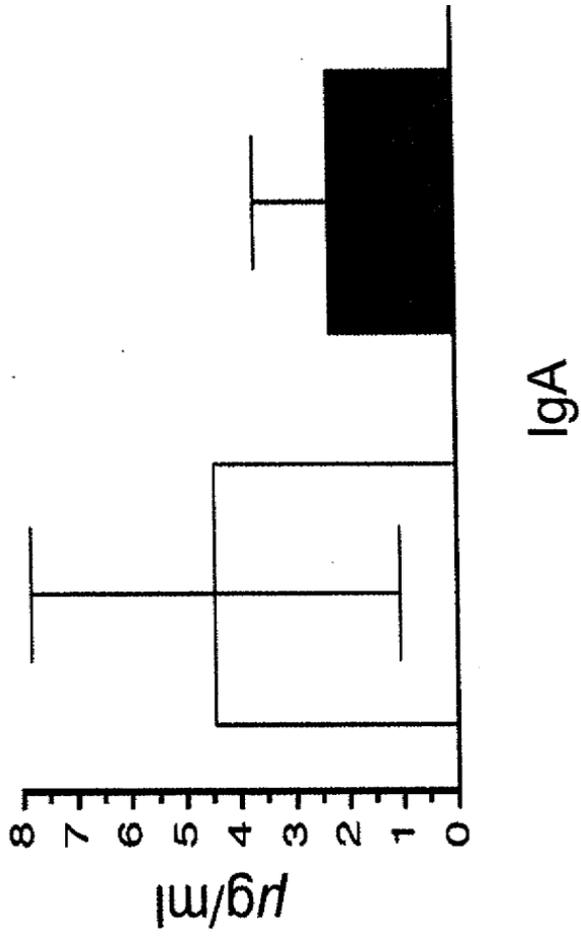


FIG. 9B

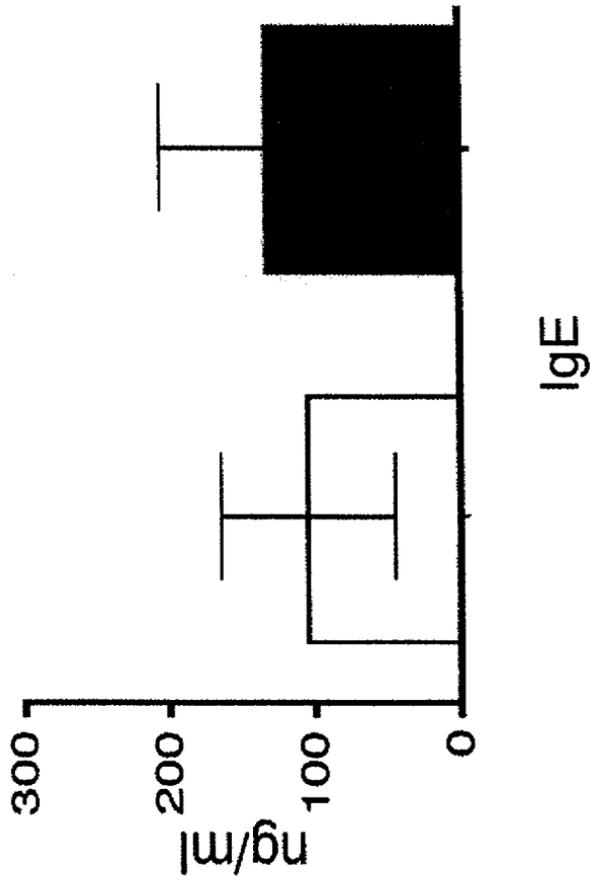


FIG. 9C

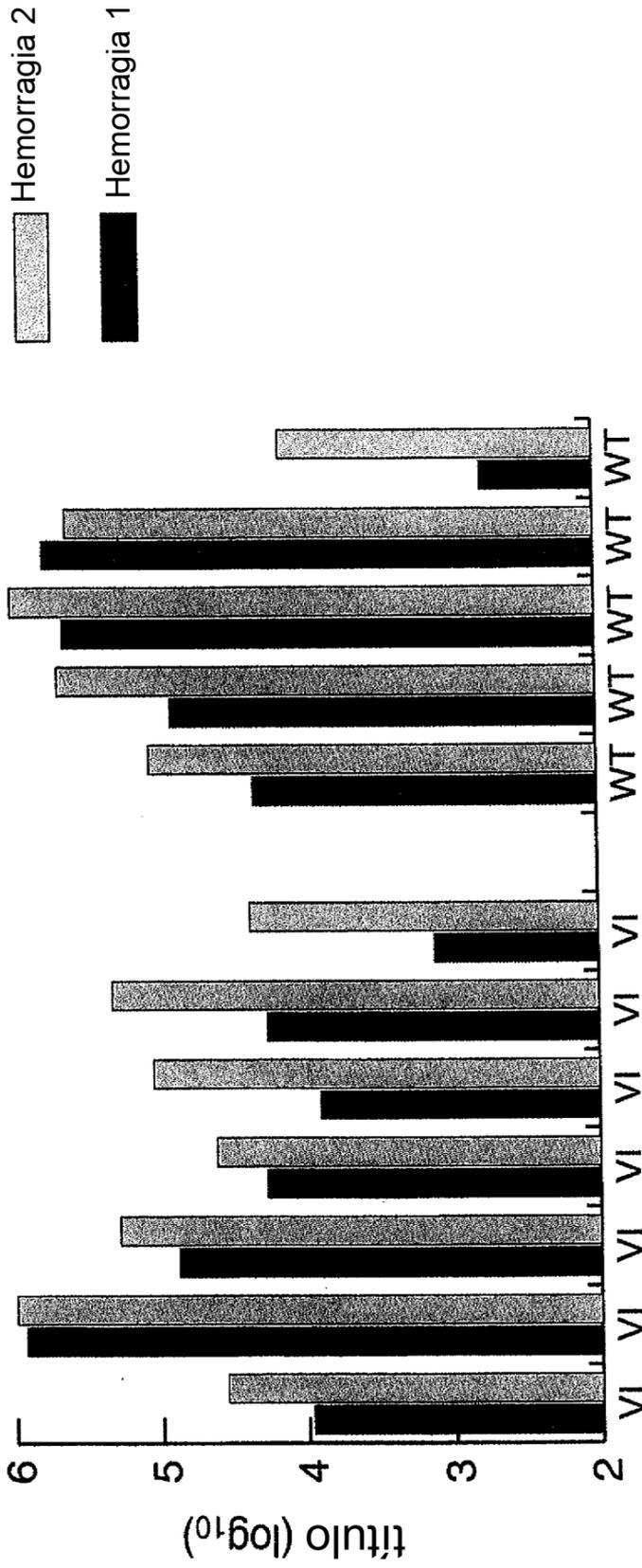


FIG. 10A

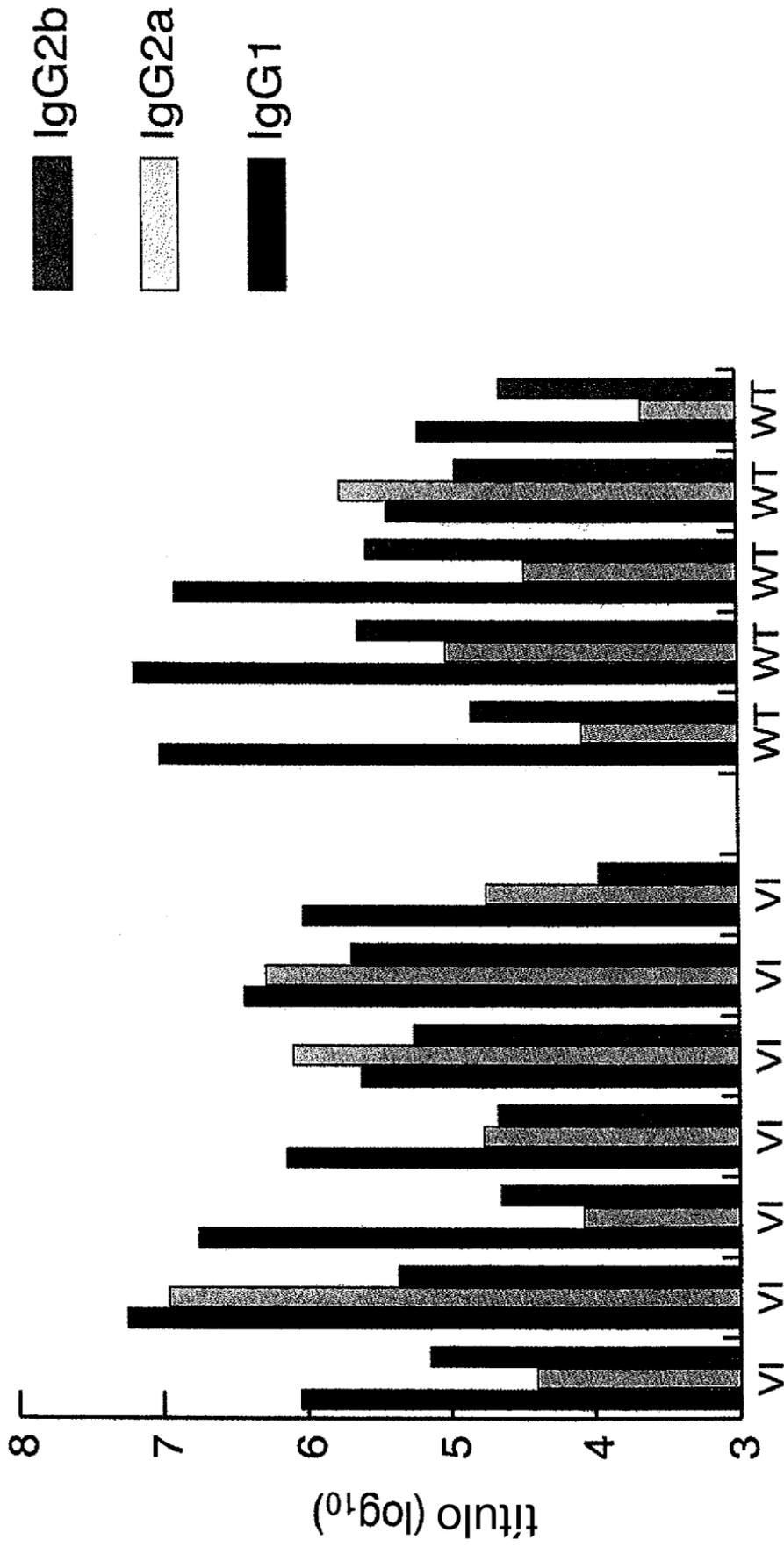


FIG. 10B

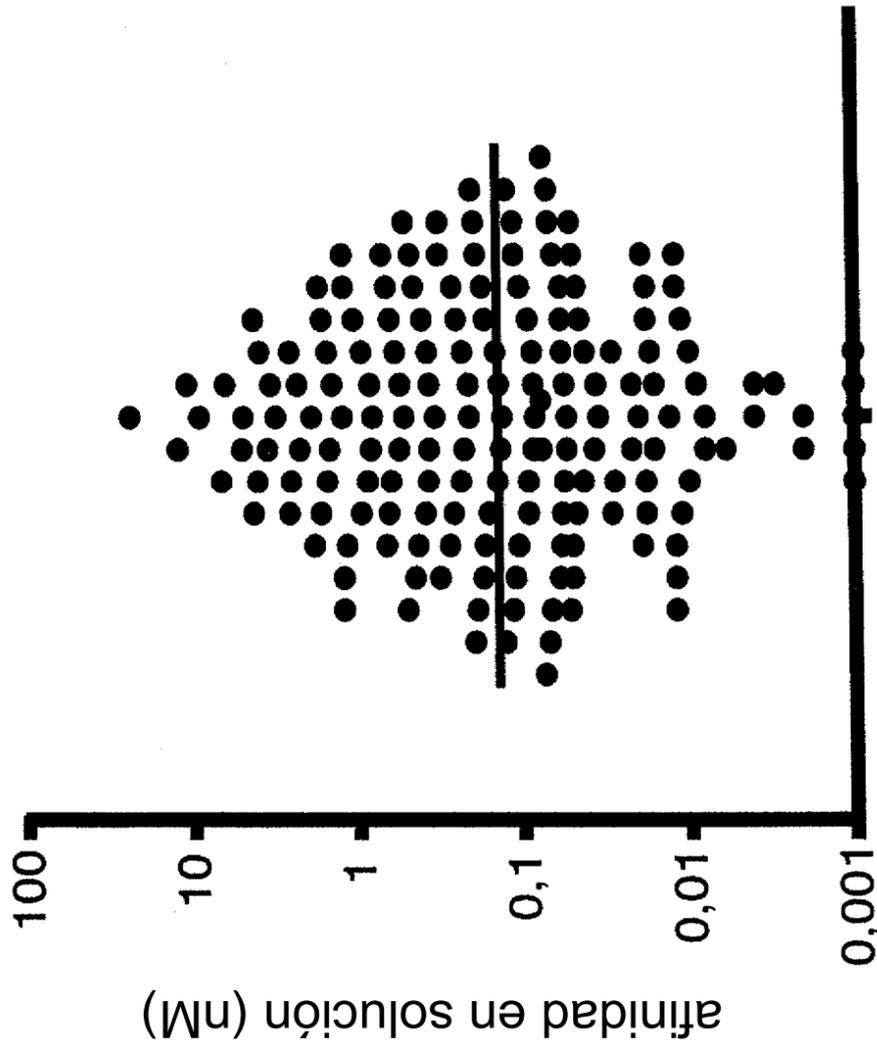


FIG. 11A

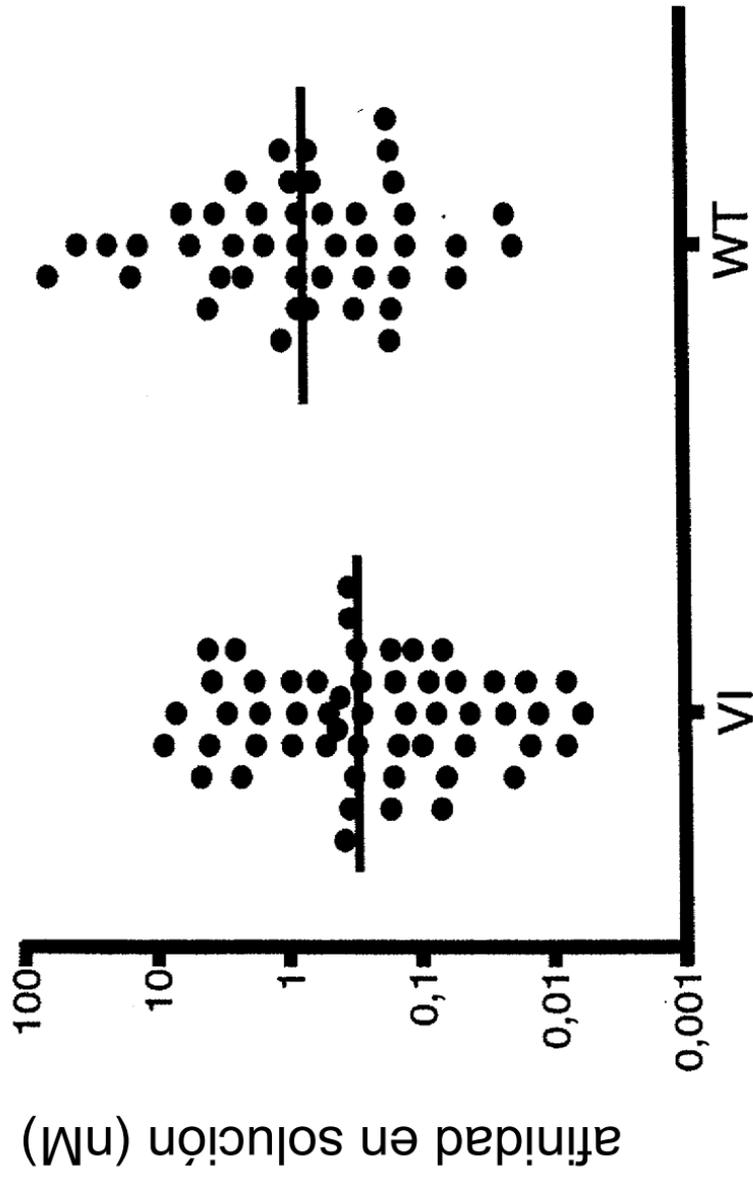


FIG. 11B

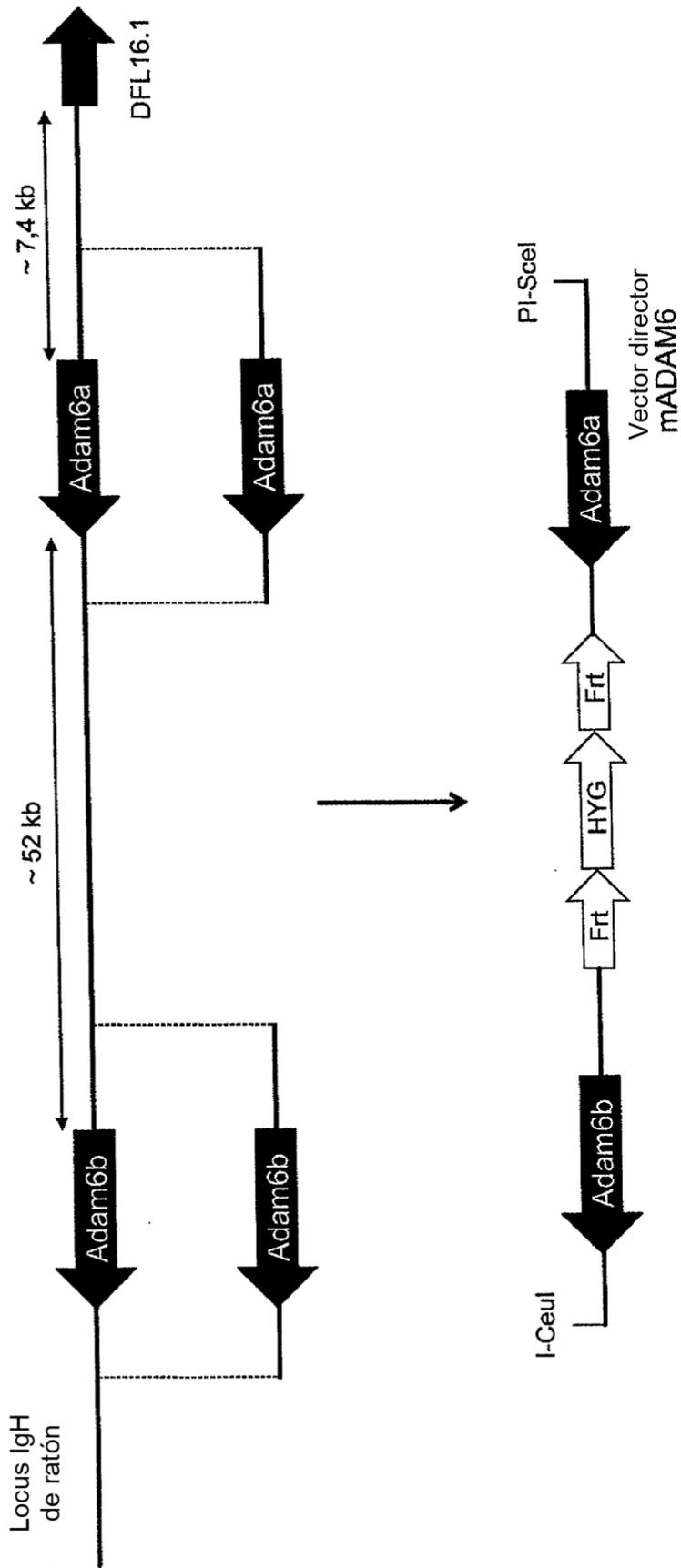


FIG. 12

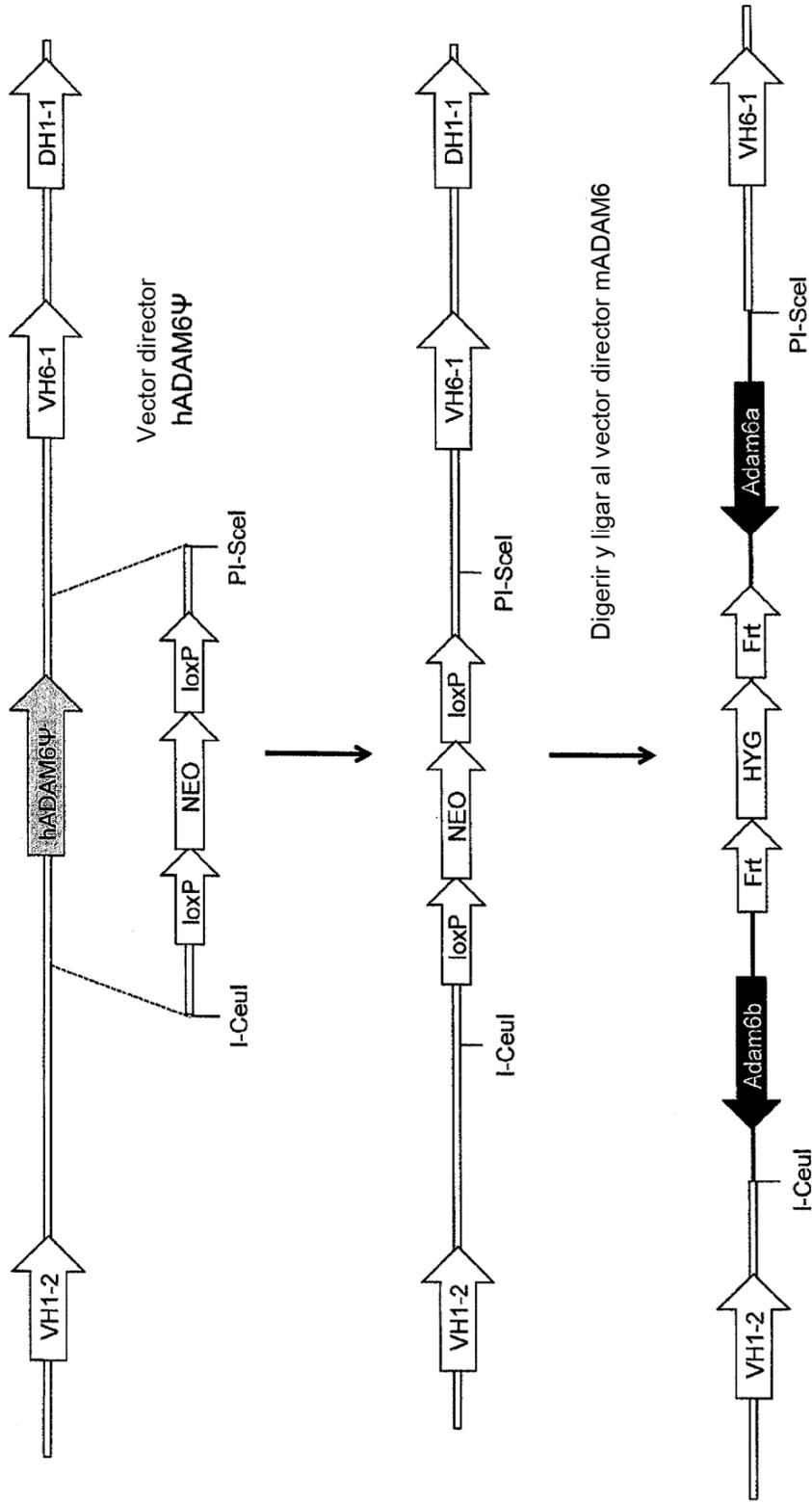


FIG. 13

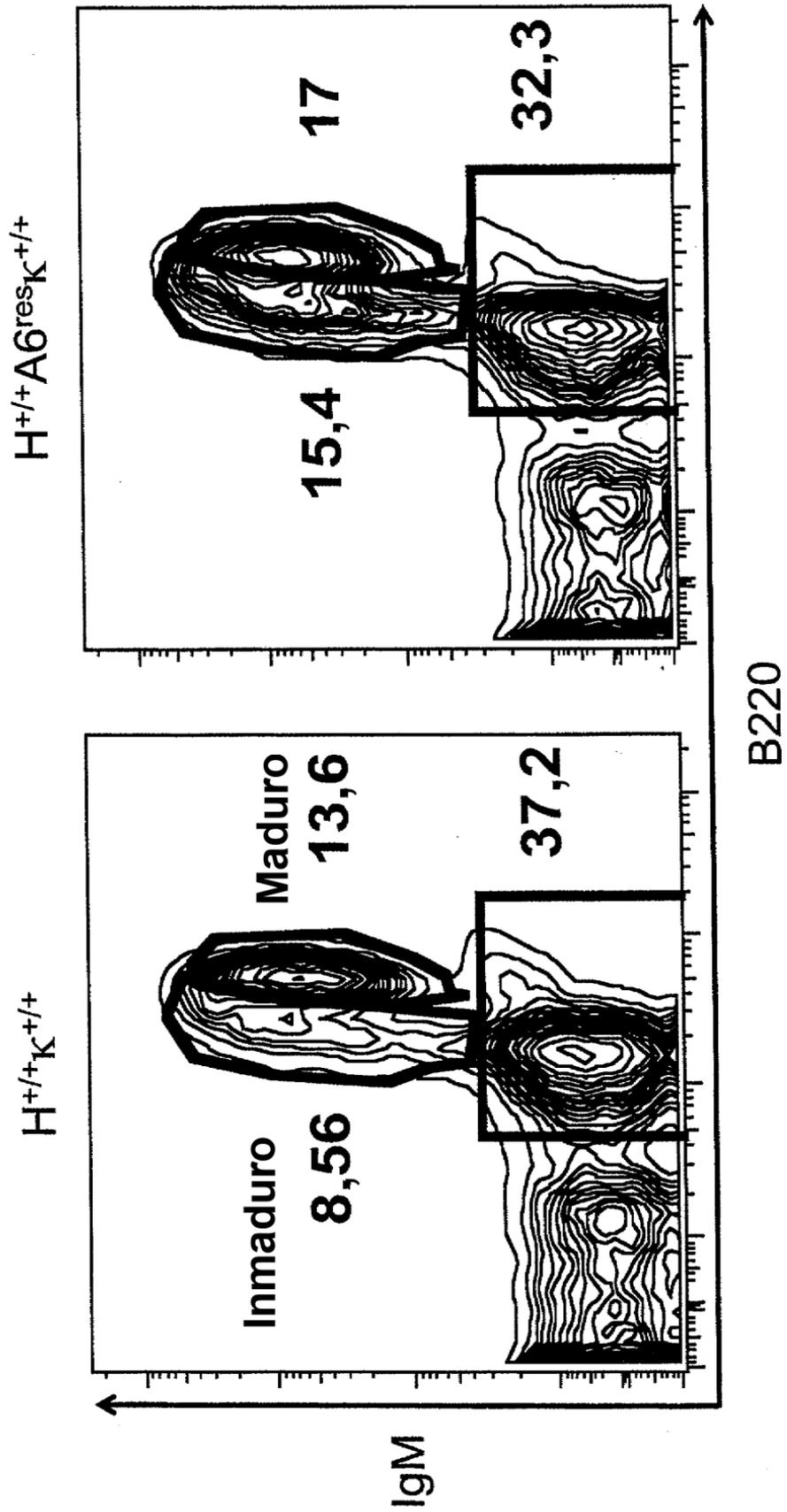


FIG. 14A

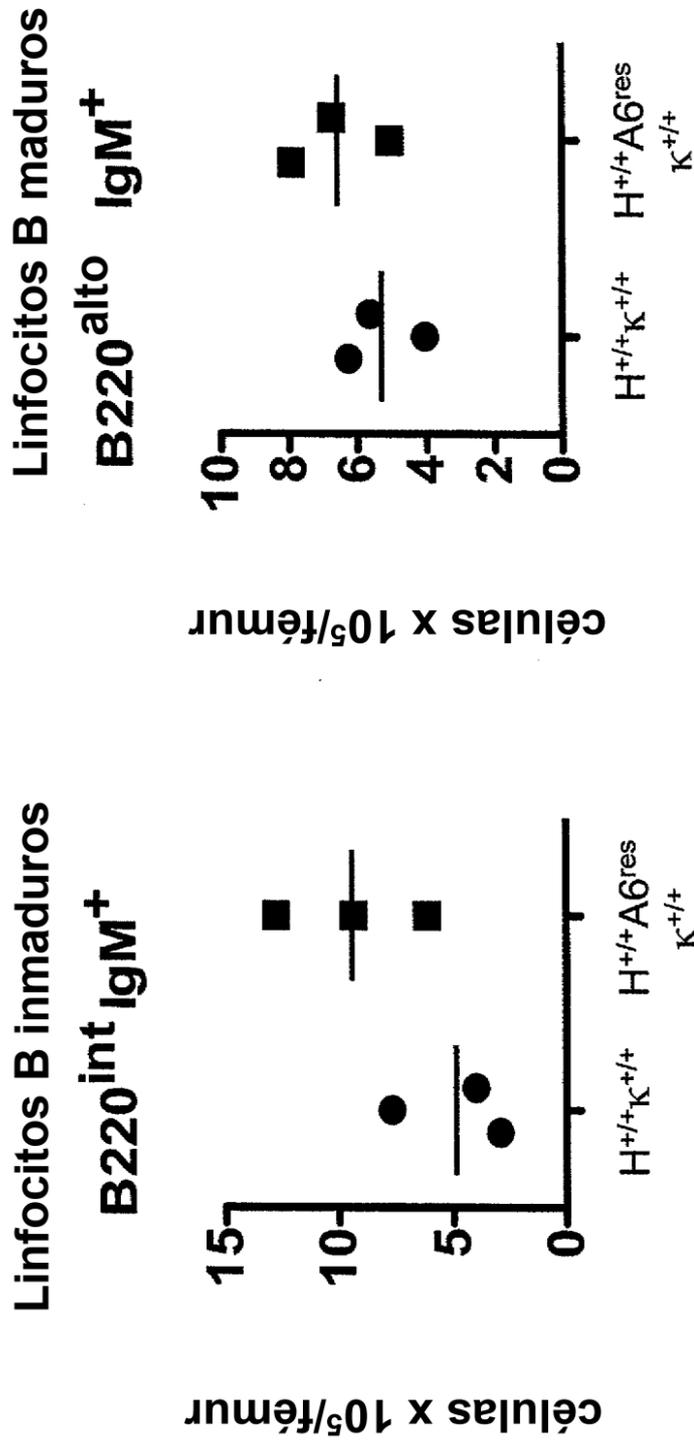


FIG. 14B

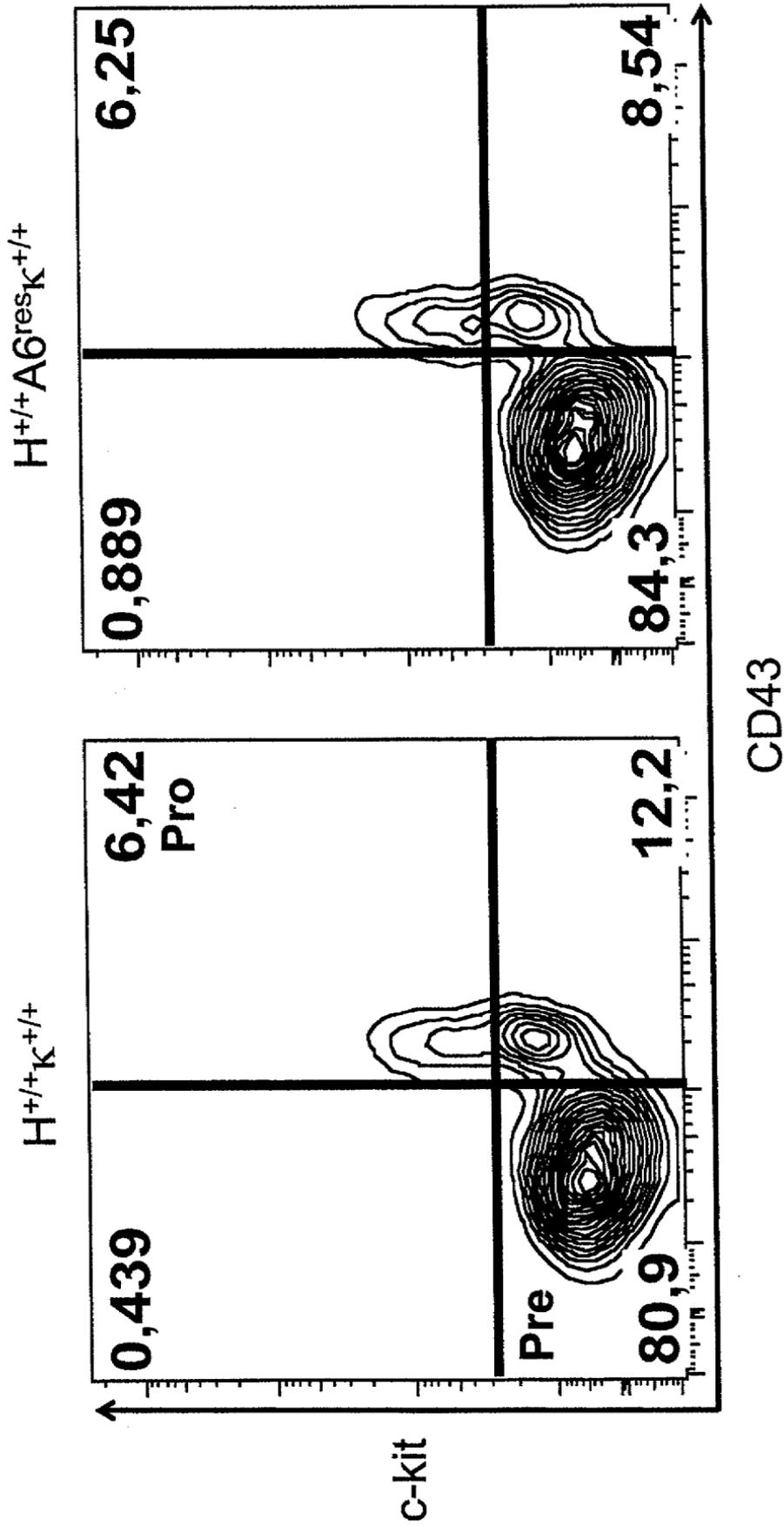


FIG. 15A

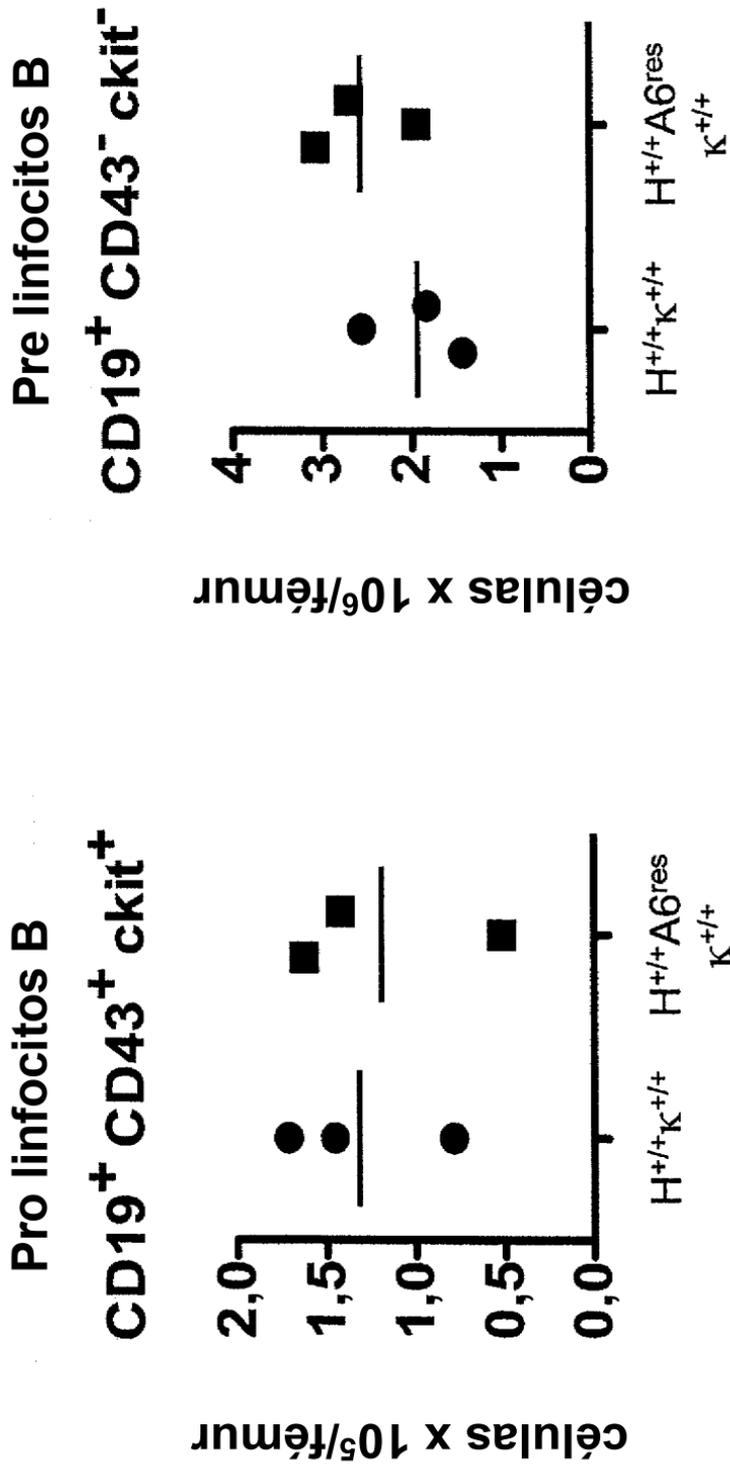


FIG. 15B

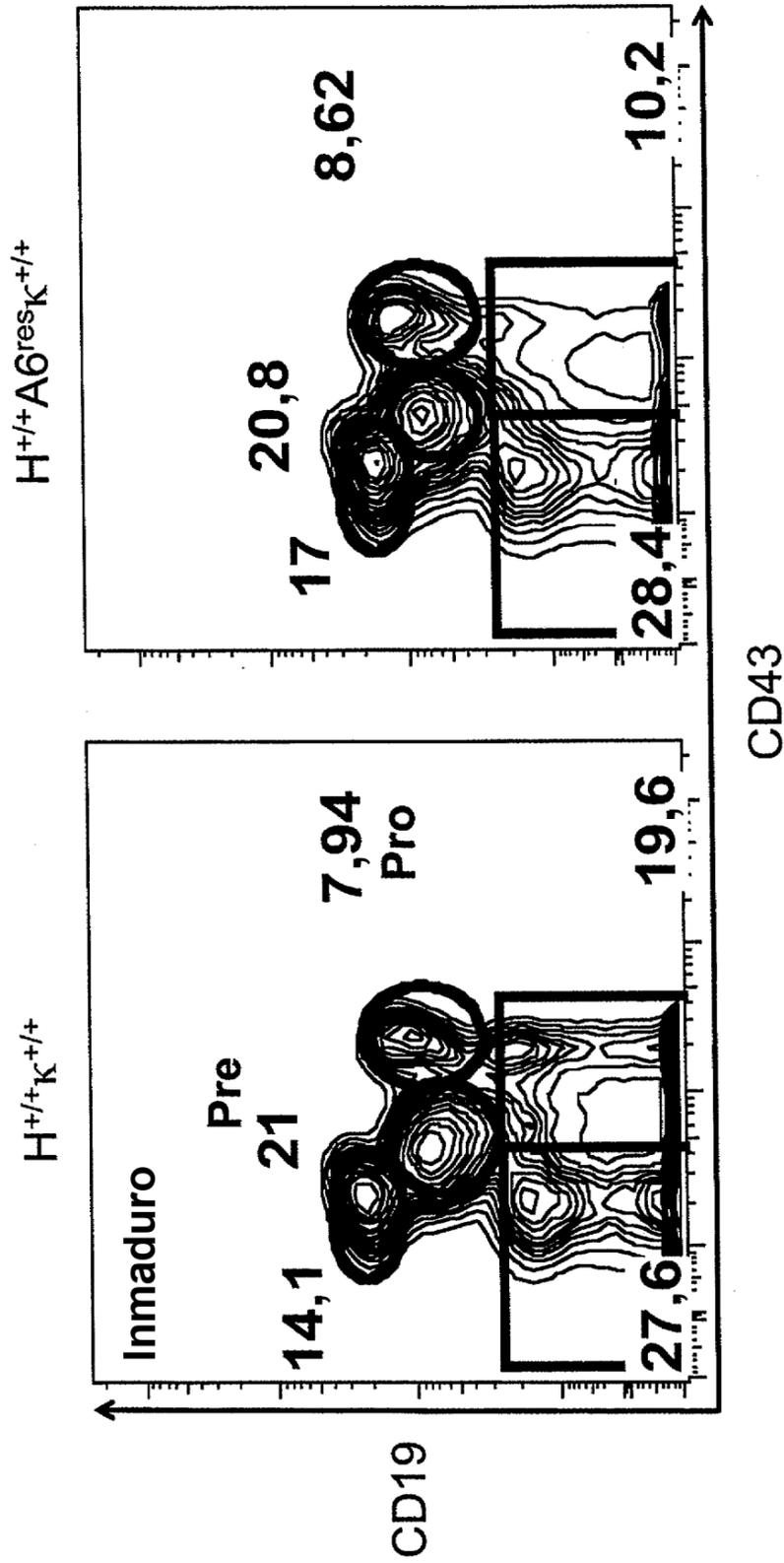


FIG. 16A

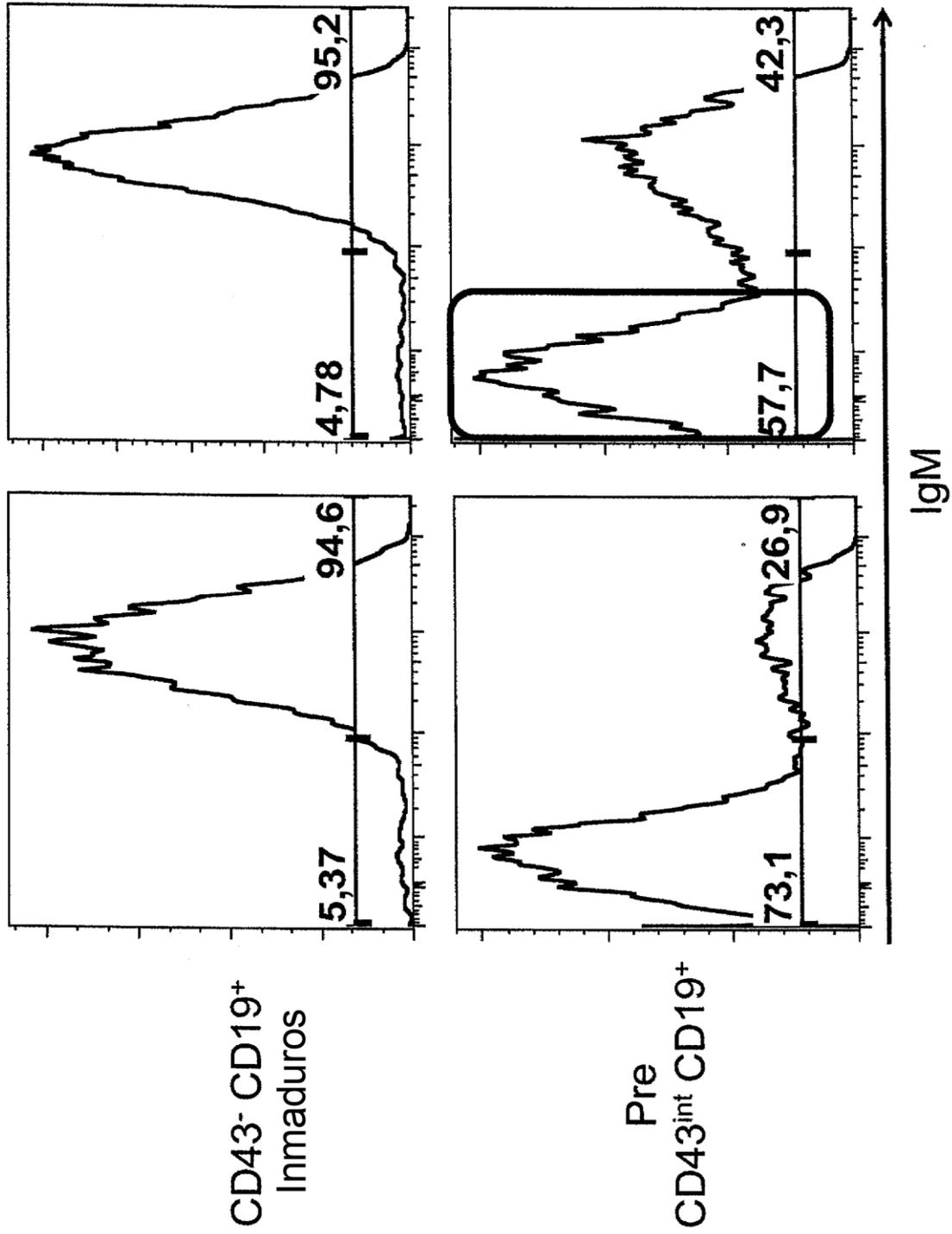


FIG. 16B

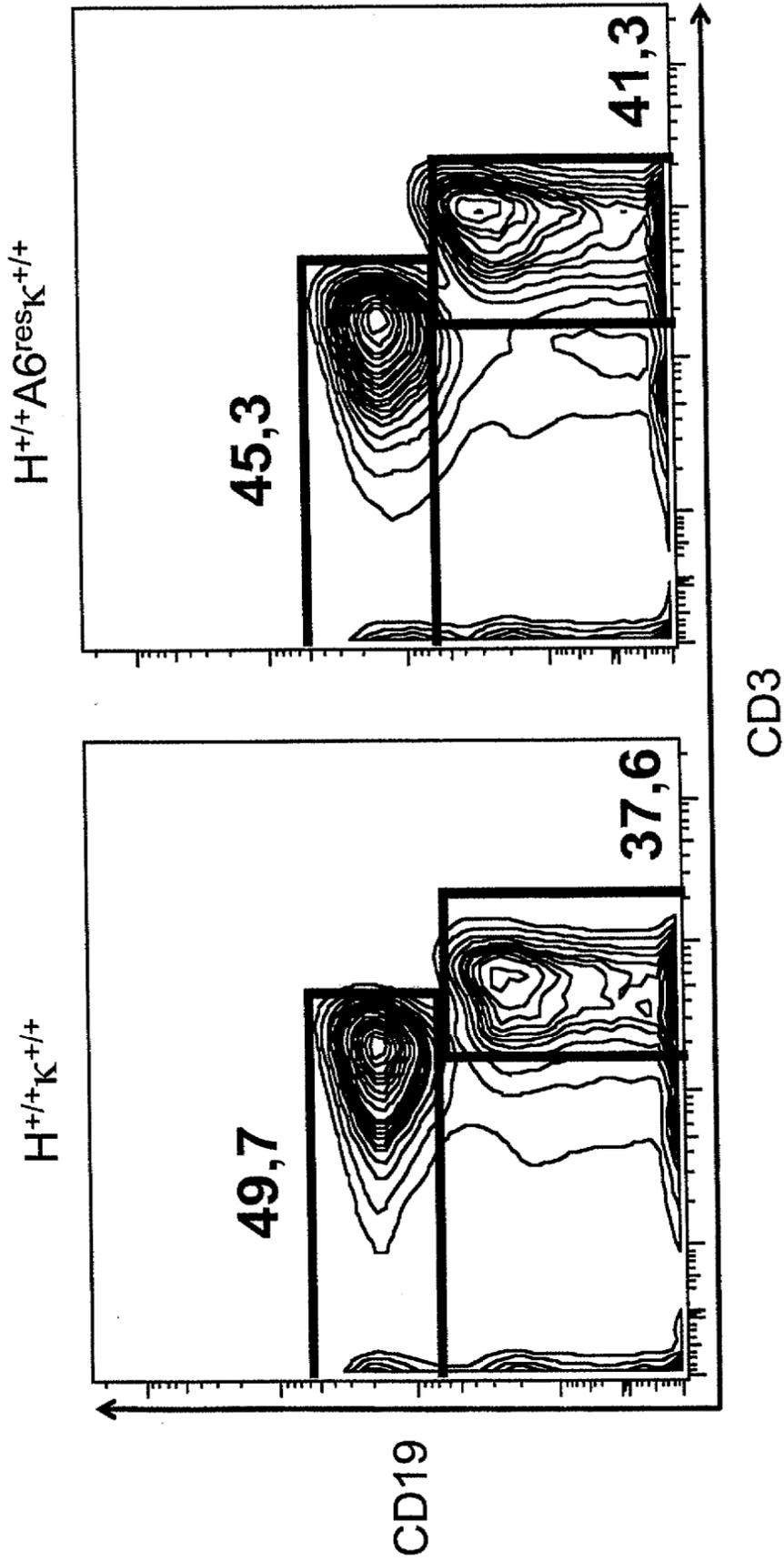


FIG. 17A

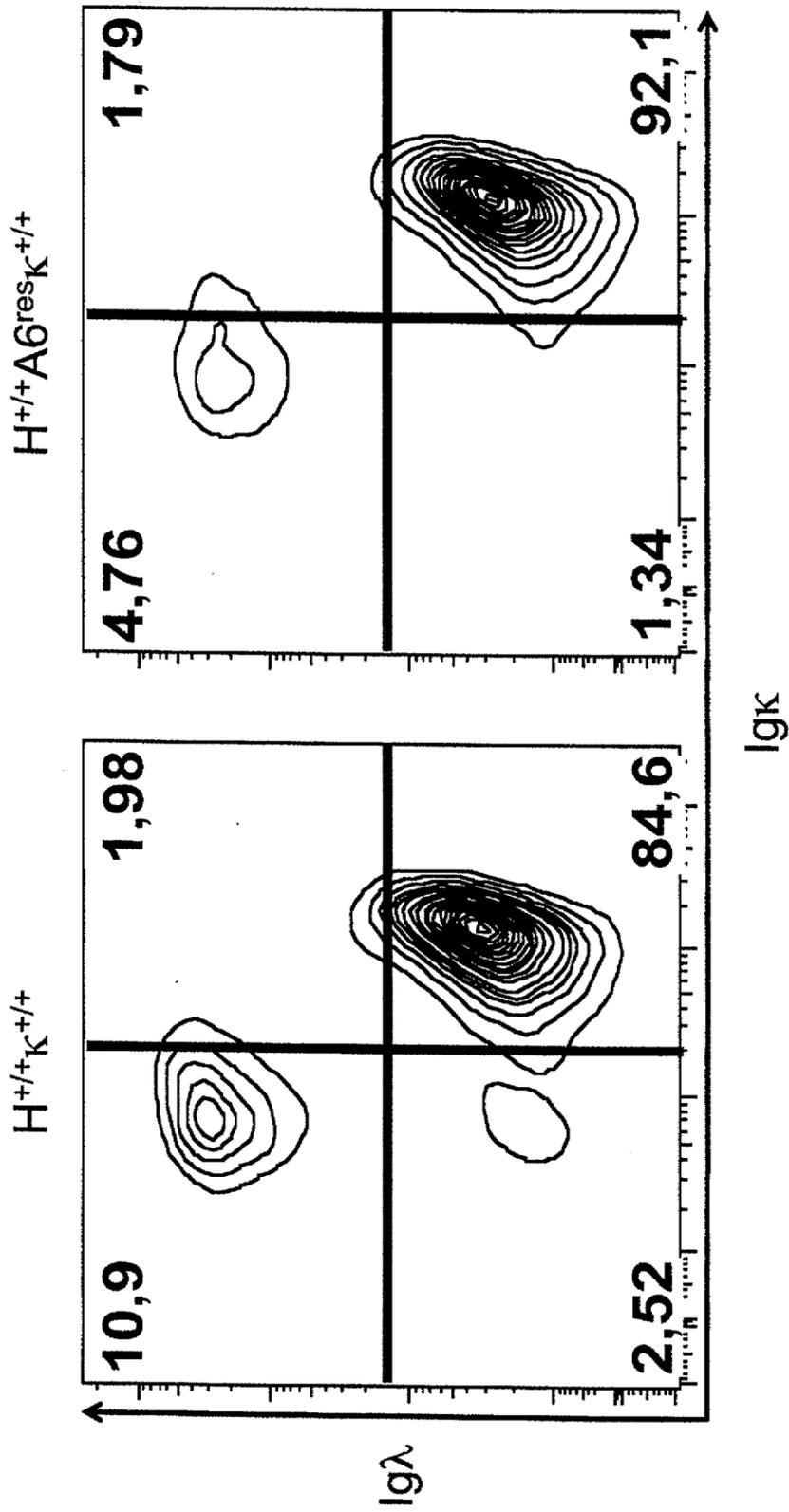


FIG. 17B

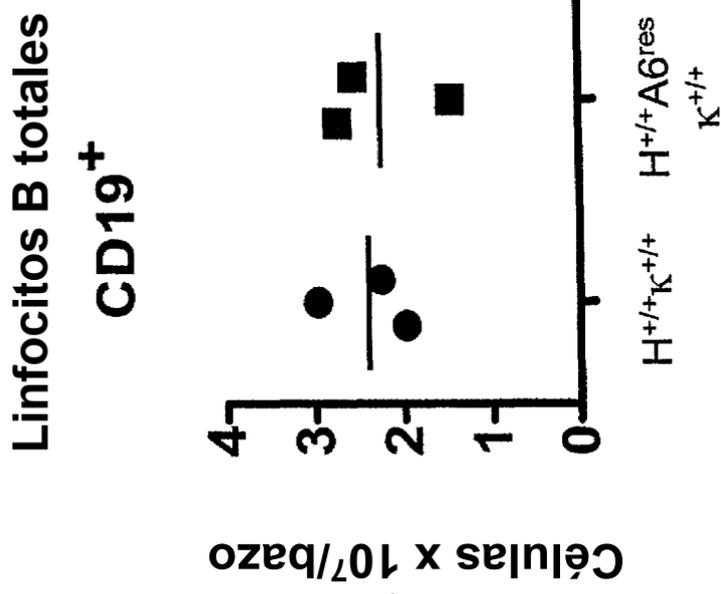


FIG. 17C

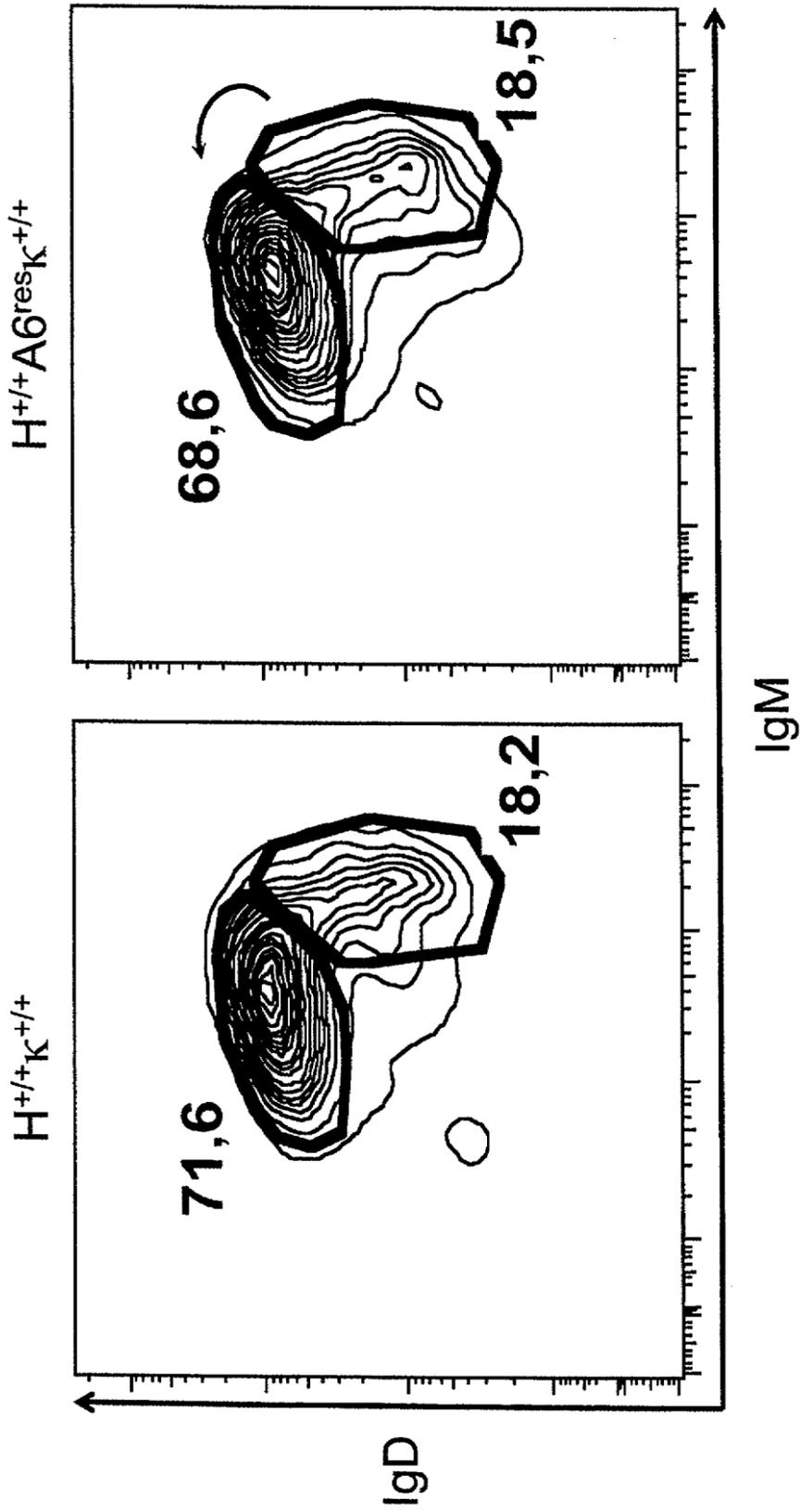


FIG. 18A

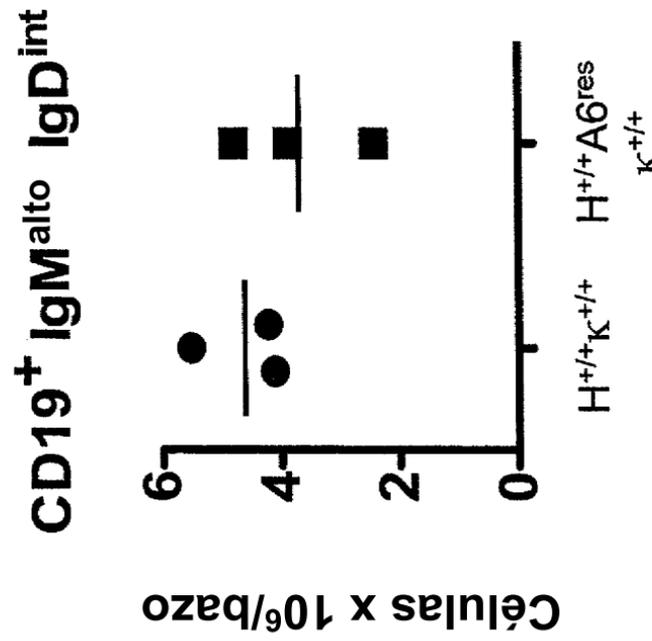
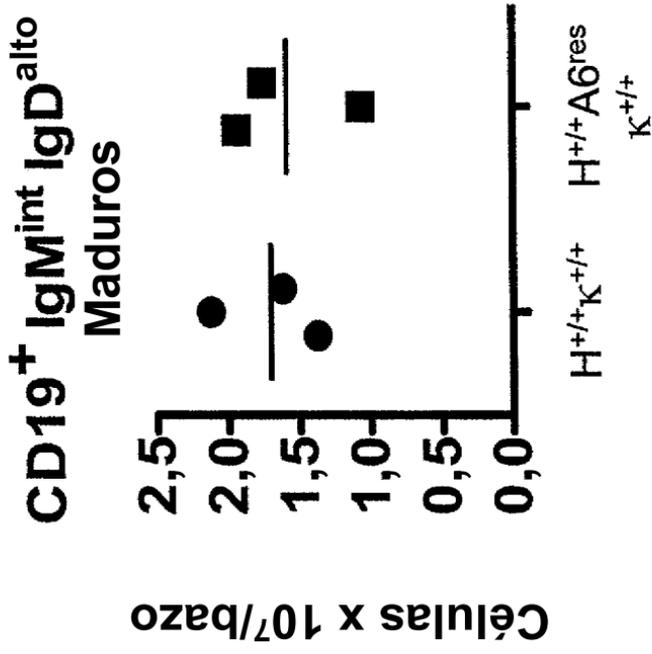


FIG. 18B

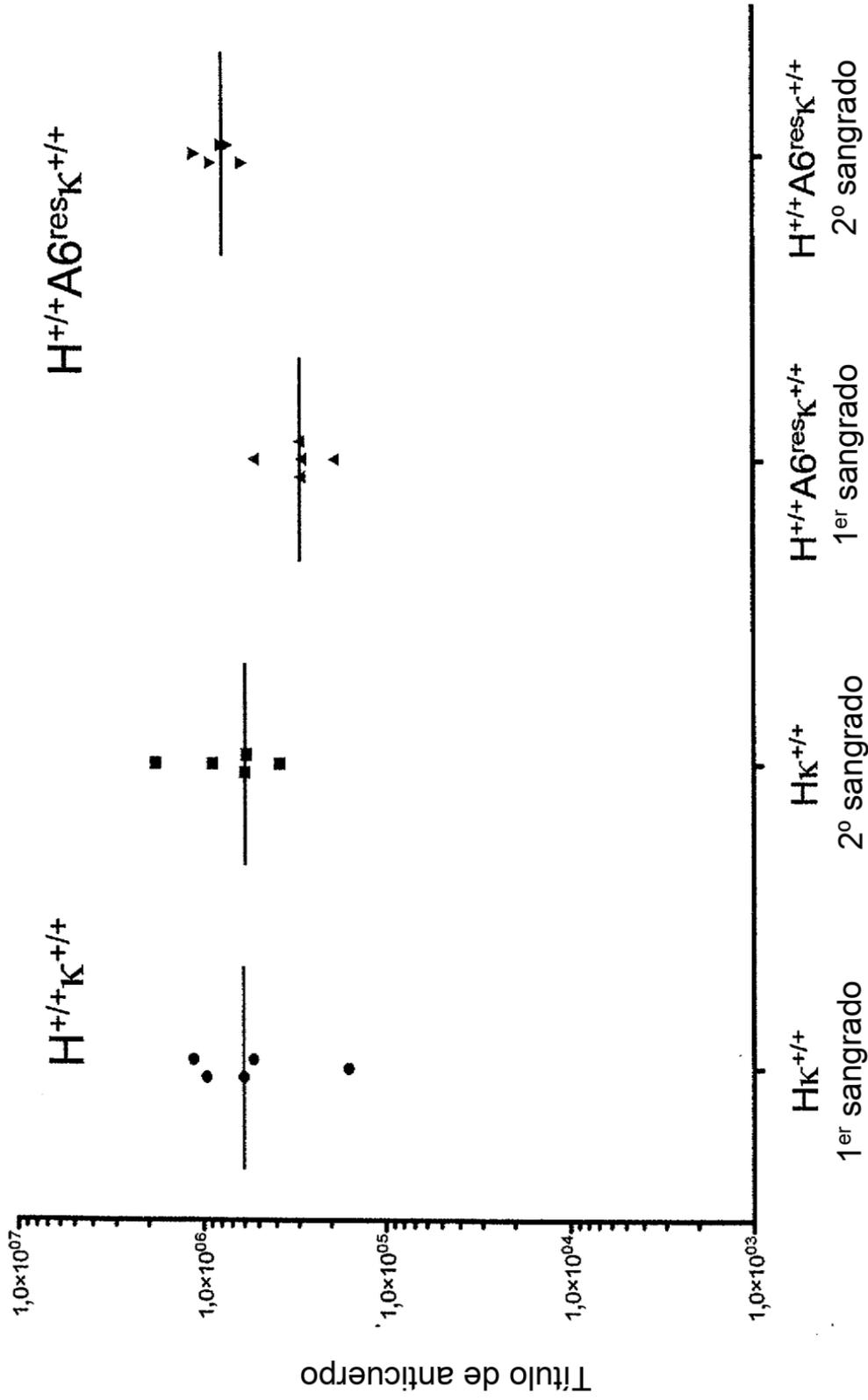


FIG. 19

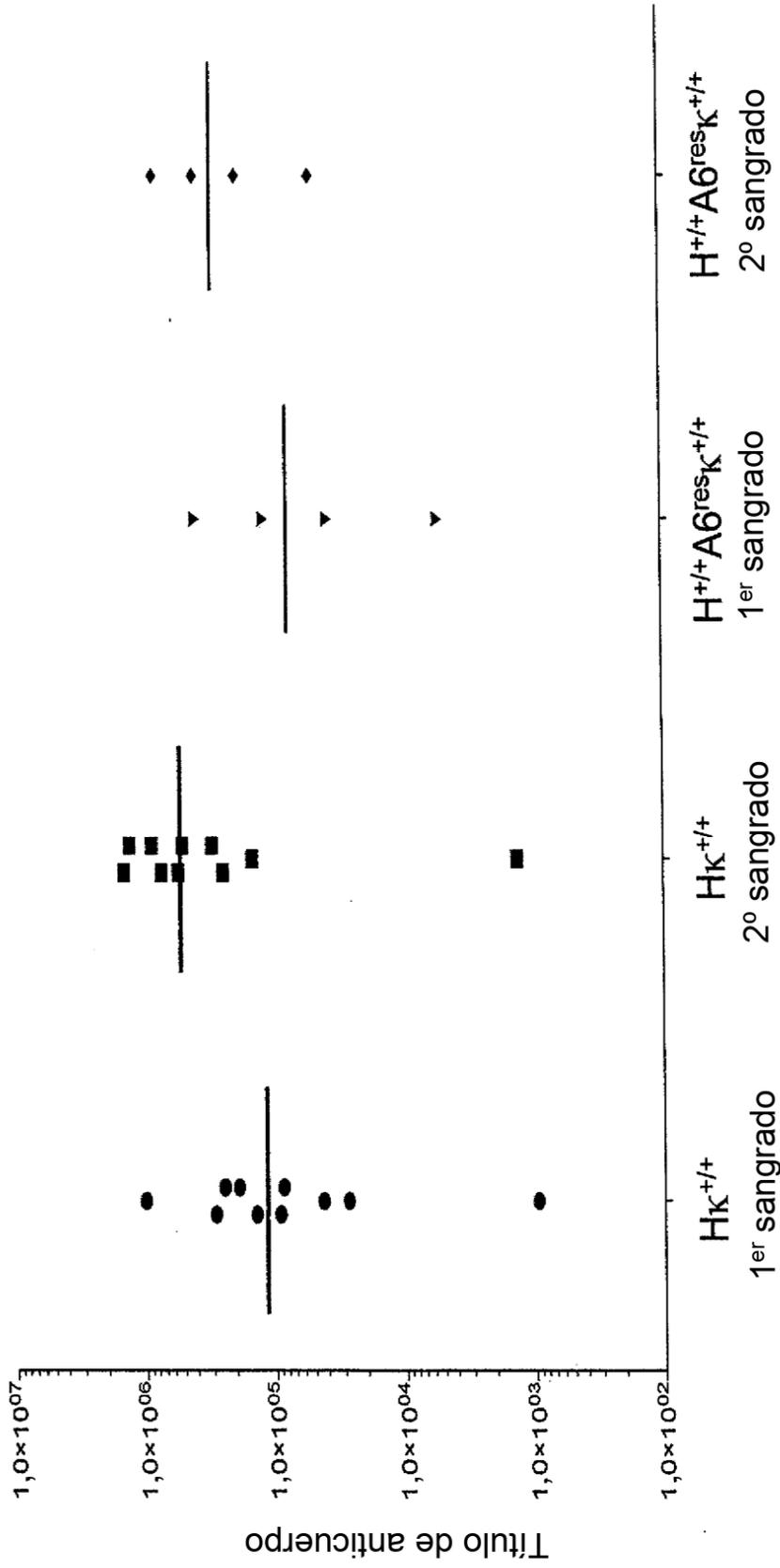


FIG. 20

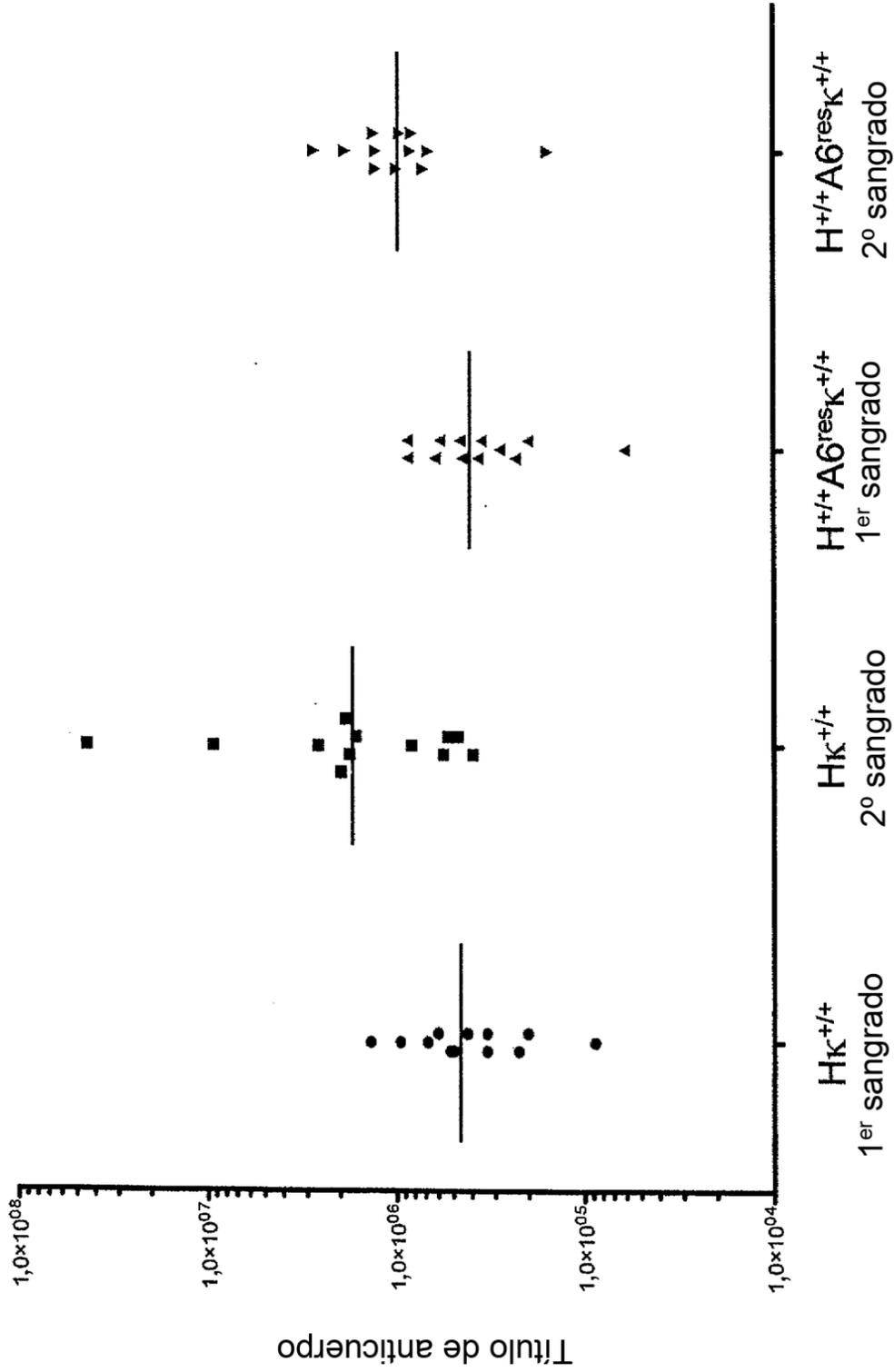


FIG. 21

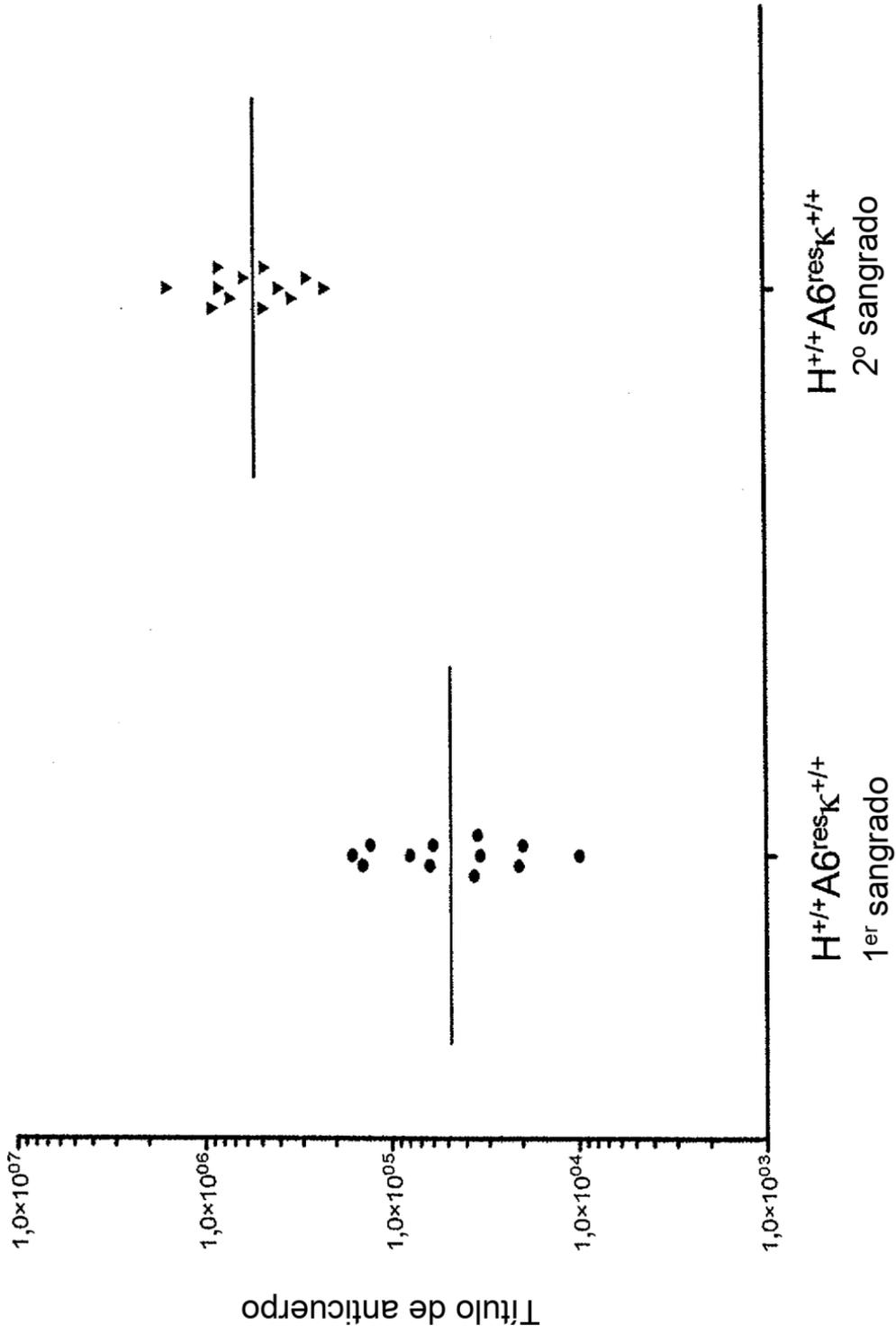


FIG. 22