(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 770 424**

(51) Int. CI.:

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 14154967 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2738259**

(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:
01.07.2020

(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

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

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.

Antecedentes 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 son 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 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. Siguieron 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 transcromosómicos 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 una 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

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, se proporcionan células y ratones 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 deleción 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.

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.

Se describen 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.

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 deleciones), y los ratones macho pueden generar progenie mediante apareamiento. Los ratones macho pueden producir esperma que puede atravesar un útero de ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón.

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 deleciones), 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. La reducción de la fertilidad puede caracterizarse 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. La reducción de la fertilidad puede caracterizarse por un esperma que presenta un defecto de migración *in vivo*. La modificación genética que restaura en todo o en parte la reducción de la fertilidad puede ser una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o fragmento del mismo que es funcional en un ratón macho.

La modificación genética puede comprender sustituir los loci variables de la cadena pesada de inmunoglobulina endógena por los loci variables de la cadena pesada de inmunoglobulina de otras especies (*por ejemplo*, una especie no humana). La modificación genética puede comprender la inserción de los loci de la cadena pesada de inmunoglobulina ortóloga en los loci variables de la cadena pesada de inmunoglobulina endógena. La especie puede ser un ser humano. La modificación genética puede comprender la deleción de un locus variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina endógena en todo o en parte, en el que la deleción da como resultado una pérdida de la función endógena de ADAM6. La pérdida de la función de ADAM6 endógena puede asociarse con una reducción de la fertilidad en ratones macho.

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 deleción, una sustitución, *etc*.) en un locus de inmunoglobulina de ratón.

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.

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.

En un aspecto, se proporciona 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. En una realización, el ratón es un ratón macho y la funcionalidad comprende una fertilidad aumentada en comparación con un ratón que carece de un gen ADAM 6 endógeno funcional.

La proteína está codificada por una secuencia genómica localizada en un locus de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de inmunoglobulina es un locus de la cadena pesada. En una realización específica, el locus de la cadena pesada comprende al menos una V_H humana, al menos una D_H humana y al menos un segmento del gen J_H.

En una realización, el ratón comprende 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. En una realización específica, el ratón comprende 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. En una realización específica adicional, la quimera humana/de ratón o el transgén de la cadena ligera de rata comprende una secuencia de la región variable de la cadena humana reordenada en la línea germinal del ratón.

La secuencia ectópica de nucleótidos está localizada en un locus de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. El locus de inmunoglobulina es un locus de la cadena pesada. El locus de la cadena pesada comprende al menos una V_H humana, al menos una D_H humana y al menos un segmento del gen J_H humano.

En un aspecto, se proporciona 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. En una realización, la secuencia ectópica de nucleótidos confiere al ratón la capacidad de producir progenie que es comparable con la correspondiente a un ratón silvestre que incluye un gen ADAM6 endógeno funcional. En una realización, la secuencia confiere al ratón capacidad para formar un complejo de ADAM2 y/o ADAM3 y/o ADAM6 sobre la superficie de un espermatozoide del ratón. En una realización, la secuencia confiere 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.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos produce 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 raza produce en un periodo de tiempo de seis meses.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos produce 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 raza 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.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos produce 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.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos es un ratón macho, y el ratón macho produce esperma 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.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos, cuando copula con un ratón hembra, genera un esperma 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 esperma de un ratón de tipo silvestre.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia ectópica de nucleótidos produce 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.

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. Tras la reordenación, 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. 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.

En un aspecto, se proporcionan 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.

En una realización, los ratones macho comprenden un alelo ADAM6 endógeno no modificado individualmente u ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo en un locus de ADAM6 endógeno.

En una realización, el ratón macho comprende 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.

En una realización, los ratones macho comprenden 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.

En una realización, los ratones macho comprenden 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 es un segmento de gen humano. En una realización, la secuencia que codifica la ADAM6 de ratón o el ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma está entre los segmentos génicos V humanos; en una realización, el ratón comprende dos o más segmentos génicos V humanos, y la secuencia está situada entre el segmento final del gen V y el penúltimo segmento del gen V; en una realización, la secuencia está situada tras el segmento final del gen V y el primer segmento del gen D.

En un aspecto, se proporciona un ratón macho que carece de 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. En una realización, los ratones comprenden un gen ADAM6 de ratón ectópico o el ortólogo u homólogo o fragmento funcional del mismo que es funcional en un ratón macho.

En un aspecto, se proporcionan 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 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.

En una realización, los ratones comprenden 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. En una realización, la función de ADAM6 se transmite 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*, 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.

En una realización, los ratones macho que expresan la región variable de la inmunoglobulina humana o sus fragmentos funcionales comprenden una actividad de ADAM6 suficiente para conferir a los ratones macho la

capacidad de generar progenie mediante apareamiento con un ratón hembra y, en una realización, los ratones macho presentan una capacidad de generar progenie mediante apareamiento que en una realización es al menos del 25 %, en una realización, al menos del 30 %, en una realización al menos del 40 %, en una realización al menos del 50 %, en una realización al menos del 60 %, en una realización al menos del 70 %, en una realización al menos del 80 %, en una realización al menos del 90 %, y en una realización aproximadamente la misma que la de los ratones con uno o dos alelos endógenos de ADAM6 no modificados.

En una realización, los ratones macho expresan 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.

En un aspecto, se proporcionan 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 erradica 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 comprende además una secuencia de ácido nucleico ectópica que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o fragmento funcional de la misma.

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.

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_H1 y/o la región bisagra y/o C_H2 y/o C_H3 de un ser humano y/o ratón).

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 deleción, 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 deleción 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.

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 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.

En un aspecto, se proporciona 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. En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia endógena de ADAM6 de ratón o un fragmento funcional de la misma. En una realización, la secuencia endógena de ADAM6 de ratón comprende una secuencia que codifica ADAM6a y ADAM6b localizada en un ratón de silvestre entre el segmento 3' del gen V de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) 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).

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. ADAM6a y/o ADAM6b o uno de sus fragmento(s) funcionales puede estar 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_H de la mayoría de los ratones y la secuencia de señalización de la recombinación del segmento 5' de los genes D_H 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 SEC ID Nº: 1 y /o ADAM6b de la secuencia SEC ID Nº: 2. En una realización, el promotor ADAM6 de ratón es un promotor de la SEC ID Nº: 3. En una realización específica, el promotor de ADAM6 de ratón comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC 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 SEC 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 SEC 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 SEC 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.

En un aspecto, se proporciona un ratón que comprende una deleción de una secuencia endógena de nucleótidos que codifica una proteína ADAM6, una sustitución de un segmento endógeno del gen V_H de ratón con un segmento del gen V_H 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.

En una realización, el ratón comprende un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una deleción de una secuencia endógena de nucleótidos del locus de la inmunoglobulina que comprende un gen de ADAM6 endógeno, comprende 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.

En una realización, el ratón comprende 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 está comprendida, o es directamente adyacente a, la secuencia de nucleótidos que codifica el uno o más segmentos génicos V_H humanos. En una realización, el ratón comprende 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. En una realización, el ratón comprende además una sustitución de uno o más segmentos endógenos del gen J_H con uno o más segmento del gen J_H en el locus endógeno del gen J_H. En una realización, el ratón comprende 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. En una realización específica, la secuencia ectópica que codifica la proteína ADAM6 de ratón se coloca 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 VH humanos. En una realización específica, el ratón comprende 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 se coloca 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.

En una realización específica, el ratón comprende 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 está comprendida, o es directamente adyacente a, la secuencia de nucleótidos que codifica el uno o más segmentos génicos V_H humanos.

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 secuencia génica de la región constante de la 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.

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.

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.

En un aspecto, se proporciona 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.

La secuencia ectópica de nucleótidos que expresa la proteína ADAM6 de ratón está integrada en un locus de inmunoglobulina.

En un aspecto, se proporciona 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.

En una realización, el ratón comprende una pluralidad de segmentos génicos V humanos, una pluralidad de segmentos génicos D, y una pluralidad de segmentos J, En una realización, los segmentos génicos D son segmentos de los genes D humanos. En una realización, los segmentos de los genes J son segmentos de los genes J humanos. En una realización, el ratón comprende además una secuencia humanizada de la región constante de la cadena pesada, donde la inmunización comprende la sustitución de una secuencia seleccionada entre C_H1, bisagra, C_H2, C_H3, y una de sus combinaciones. En una realización específica, la cadena pesada se deriva 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_H2 de ratón, y una secuencia C_H3 de ratón. En otra realización específica, el ratón comprende además una secuencia de la región constante de la cadena ligera humana.

En una realización, el segmento del gen D está 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.

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.

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_H y el segmento 6-1 del gen V_H humano.

La secuencia de nucleótidos comprende una secuencia seleccionada procedente de una secuencia de ADAM6b de ratón o uno de sus fragmentos funcionales, y una secuencia de ADAM6a de ratón o uno de sus fragmentos funcionales.

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.

En una realización, el ratón comprende una sustitución de una secuencia del pseudogen ADAM6 humano entre los segmentos 1-2 de V_H y 6-1 de V_H del gen V humano con una secuencia de ADAM6 de ratón o uno de sus fragmentos funcionales.

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.

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_H 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_H humano.

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.

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. 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.

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.

En un aspecto, se proporciona un ratón que comprende una modificación en uno o más alelos endógenos de ADAM6.

Los ratones no pueden expresar una proteína ADAM6 funcional procedente de cada alelo endógeno de ADAM6, y los ratones comprenden una secuencia ectópica de ADAM6.

En una realización, los ratones no pueden expresar una proteína ADAM6 funcional procedente de cada alelo endógeno de ADAM6, y los ratones comprenden 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. En una realización específica, la secuencia ectópica de ADAM6 está 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*.). En una realización específica, la secuencia ectópica de ADAM6 está 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. En otra realización específica, se elimina la secuencia endógena V-D intergénica de 90 a 100 kb, y la secuencia ectópica de ADAM6 se coloca entre el segmento final del gen V y el primer gen D.

Se describe un ratón macho estéril, en el que el ratón comprende una deleción 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.

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.

El ratón puede carecer de los segmentos génicos endógenos de la cadena pesad 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_H, 13 segmentos de los genes D_H y cuatro segmentos de los genes J_H.

En un aspecto, se proporciona 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. En una realización preferida, las secuencias D_H y J_H y al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60, o al menos 80 secuencias de VH del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina están sustituidas por secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón. En una realización preferida adicional, las secuencias D_H, J_H, y todas las V_H del locus de la cadena pesada de la 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. En una realización preferida, las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón comprenden 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. En una realización preferida adicional, las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina no de ratón comprenden 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.

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.

La proteína ADAM6 o el ortólogo u el homólogo de la misma se puede expresar 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.

La secuencia de la región constante no humana puede ser una secuencia de roedor. El roedor se puede seleccionar entre un ratón, una rata, y un hámster.

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.

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.

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.

Se describe un método para mantener una raza de ratones, donde la raza 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.

La raza de ratón puede comprender una deleción 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.

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 raza criando repetidamente machos heterocigóticos con hembras que son silvestres u homocigóticas o heterocigóticas para la secuencia de la cadena pesada humana.

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.

El ratón puede comprender además una sustitución de las secuencias de la región variable de la cadena ligera λ y/o κ 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 λ y/o κ.

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 λ o κ (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 λ o κ 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 es un promotor transcripcionalmente activo. El promotor es un promotor ROSA26.

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 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.

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.

El vector director puede comprender además un promotor unido operativamente a la secuencia que codifica ADAM6 de ratón. El promotor puede ser el promotor ADAM6 de ratón.

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.

En un aspecto, se proporcionan células 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.

En un aspecto, se proporciona 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 comprende además una modificación de una secuencia génica endógena de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina. El ratón comprende 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.

En una realización, la célula es una célula totipotente, una célula pluripotente, o célula pluripotente inducida. En una realización específica, La célula es una célula ES de ratón.

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.

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.

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.

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.

En un aspecto, se proporciona 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 está en un locus de la inmunoglobulina de ratón. El locus de la inmunoglobulina de ratón comprende una sustitución de al menos una secuencia de la inmunoglobulina de ratón con al menos una secuencia de inmunoglobulina humana.

En un aspecto, se proporciona una célula pluripotente, pluripotente inducida, o totipotente derivada de un ratón que se describe en el presente documento. En una realización específica, la célula es un embriocitoblasto (ES) de ratón.

En un aspecto, se proporciona un tejido derivado de un ratón que se describe en el presente documento. En una realización, el tejido se deriva 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.

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.

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.

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.

Se describe un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, 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 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 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.

Los uno o más segmentos génicos de la cadena pesada de la inmunoglobulina en la dirección 5' y/o 3' del gen ADAM6 se pueden sustituir 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 comprende la célula progenitora modificada genéticamente se puede gestar para formar un ratón que comprende un genoma derivado de la célula progenitora modificada genéticamente. El hospedador puede ser un embrión. El hospedador se puede seleccionar entre un ratón premórula (por ejemplo, en un estadío de 8 o 4 células), un embrión tetraploide, un agregado de células embriónicas, o un blastocito.

Se describe 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 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 puede comprender un segmento génico variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (V_H). El segundo locus quimérico puede comprender un segmento génico variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana (V_L). En una realización específica, el segundo locus quimérico comprende un segmento del gen V_H humano o 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. El segundo locus quimérico se puede unir 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.

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.

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.

Se describe el uso de un ratón que se describe en el presente documento para preparar una línea celular inmortalizada.

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.

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.

El linfocito se puede derivar del bazo del ratón. El linfocito se puede derivar de un ganglio linfático del ratón. El linfocito se puede derivar de la médula ósea del ratón.

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.

La una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable puede comprender una secuencia de la región variable de la cadena pesada. La una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable puede 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 κ de la inmunoglobulina. La una o más secuencias de ácidos nucleicos de la región variable puede comprender una secuencia de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera κ.

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 pesad y de la región variable de la cadena ligera κ, 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 κ procedentes del linfocito B generando por tanto las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera κ.

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 pesad y de la región variable de la cadena ligera κ, 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 κ procedentes del linfocito B generando por tanto las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera κ.

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 pesad y de la región variable de la cadena ligera κ, 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 κ procedentes del linfocito B generando por tanto las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera κ. El uno o más anticuerpos marcados se pueden seleccionar a partir de una IgM, una IgG, y/o una de sus combinaciones.

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 κ. 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.

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 C_H1, una bisagra, C_H2, C_H3, C_H4, o una combinación de las mismas. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante de la inmunoglobulina κ. 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.

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.

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.

Cultivar 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 $F(ab)_2$, 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. En una realización, 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 se puede integrar en el genoma del ratón en una posición ectópica. La secuencia de ácido nucleico se puede integrar 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 se puede integrar 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 medicamente (*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 medicamente (*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. 1 B 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 κ 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 κ 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 deleción 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 VH humano (18hV_H BACvec) para la inserción inicial de segmentos génicos de la cadena pesada humana (Alelo híbrido 3hV_H-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 humano 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 κ de la inmunoglobulina de ratón que da como resultado la deleción de todos los segmentos génicos V_H, y de los segmentos de los genes Jκ (Alelo híbrido Igκ-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 κ de la inmunoglobulina de ratón que da como resultado la inserción de todos los segmentos génicos Vκ y Jκ humanos de la repetición y deleción proximales de un casete de selección final (Alelo híbrido 40hVκdHyg). 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 a B como $2/2^{\Delta\Delta Ct}$. ΔΔCT se ha calculado como pro[ΔCt(muestra) - medΔCt(control)] en el que ΔCt 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 medΔCt(control) es el promedio ΔCt 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_H 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 κ 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 κ. 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 κ 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_H-0_H-J_H (CDR3), demostrando la diversidad de la unión y las adiciones de nucleótidos. Las secuencias CDR3 de la cadena pesada se agrupan de acuerdo a la utilización del segmento de gen 0_H, la línea germinal del cual se proporciona encima de cada grupo en negrita. Se señalan segmentos génicos V_H 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_H humana). Se señalan segmentos de gen J_H de cada CDR3 de la cadena pesada en paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (*por ejemplo*, 3 es 3 de J_H humana). se muestran las SEC ID N^{os} de cada secuencia como sigue procediendo desde la parte superior a la parte inferior: SEC ID Nº: 21; SEC ID Nº: 22; SEC ID Nº: 23; SEC ID Nº: 24; SEC ID Nº: 25; SEC ID Nº: 26; SEC ID Nº: 27; SEC ID Nº: 28; SEC ID Nº: 29; SEC ID Nº: 30; SEC ID Nº: 31; SEC ID Nº: 32; SEC ID Nº: 33; SEC ID Nº: 34; SEC ID Nº: 35; SEC ID Nº: 36; SEC ID Nº: 37; SEC ID Nº: 38; SEC ID Nº: 39. La FIG. 7B muestra las secuencias CDR3 representativas de la cadena ligera de anticuerpos VELOCIMMUNE® seleccionados aleatoriamente alrededor de la unión Vκ-Jκ (CDR3), demostrando la diversidad de la unión y las adiciones de nucleótidos. Se señalan segmentos génicos Vκ de cada secuencia CDR3 de la cadena ligera en paréntesis en el extremo 5' de cada secuencia 5' (*por ejemplo*, 1-6 es 1-6 de Vκ humana). Se señalan segmentos de gen Jκ de cada CDR3 de la cadena ligera en paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (*por ejemplo*, 1 es 1 de Jκ humana). se muestran las SEC ID N^{os} de cada secuencia como sigue procediendo desde la parte superior a la parte inferior: SEC ID Nº: 40; SEC ID Nº: 41; SEC ID Nº: 42; SEC ID Nº: 43; SEC ID Nº: 44; SEC ID Nº: 45; SEC ID Nº: 46; SEC ID Nº: 47; SEC ID Nº: 48; SEC ID Nº: 49; SEC ID Nº: 50; SEC ID Nº: 51; SEC ID Nº: 52; SEC ID Nº: 53; SEC ID Nº: 54; SEC ID Nº: 55; SEC ID Nº: 56; SEC ID Nº: 57; SEC 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 (Igκ no inmunizada procedente de IgG), 36 (IgG inmunizada) o 36 secuencias (Igκ inmunizada procedente de IgG). Las barras sombreadas indican las localizaciones de C0Rs.

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 pseudogen A0AM6 humano (hADAM6Ψ) localizado entre los segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada humana 1-2 (V_H1-2) y 6-1 (V_H6-1). Se muestra un vector director para la recombinación homóloga bacteriana (Vector director hADAM6Ψ) para borrar un pseudogen 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 κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera κ humana que tienen un fragmento ectópico genómico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$). Se señala el porcentaje de linfocitos B inmaduros ($B220^{int}IgM^{+}$) y maduros ($B220^{high}IgM^{+}$) en cada gráfica de contorno.

La FIG. 14B muestra el número total de linfocitos B inmaduros ($B220^{int}IgM^{+}$) y maduros ($B220^{alto}IgM^{+}$) 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 κ 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 κ humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$).

La FIG. 15A muestra las gráficas de contorno de FACS de los linfocitos B clasificados $CD19^{+}$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 κ 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 κ 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 células pro-B ($CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$) y pre-B ($CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$) 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 ($CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$) y prelinfocitos B ($CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$) 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 κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera κ humana que tienen que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$).

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 κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera κ humana que tienen un fragmento ectópico genómico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$). Se señala el porcentaje de linfocitos B inmaduros ($CD19^{+}CD43^{-}$), prelinfocitos B ($CD19^{+}CD43^{int}$) y prolinfocitos B ($CD19^{+}CD43^{+}$) en cada gráfica de contorno.

La FIG. 16B muestra histogramas de linfocitos B inmaduros ($CD19^{+}CD43^{-}$) y de prelinfocitos B ($CD19^{+}CD43^{int}$) 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 κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y de ratones homocigóticos para establecer los loci génicos de la región variaba de la cadena pesada humana y la cadena ligera κ humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6 de ratón ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$).

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 κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera κ 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 IgA e Igκ 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 κ 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 κ 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 Igκ (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 κ 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 κ 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 κ ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y de ratones homocigóticos para determinar los loci génicos de la región variable de la cadena pesada humana y la cadena ligera κ 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 en 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 κ 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 κ 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 κ 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 κ 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 κ 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 κ 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 κ 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 κ 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-p (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 κ 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 deleción 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 deleción (*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; Jakobovits 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 κ mediante deleción 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-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromo some 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) inefficient interspecies interactions between human constant domains and mouse components of the B-cell 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); and (3) inefficient interspecies interactions between soluble human immunoglobulins and mouse Fc receptors that might reduce affinity selection (Rao et al., 2002, Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcgammaRIIB on germinal center cells: implications for selection of high affinity B cells, J Immunol 169:1859-1868) and immunoglobulin 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 ácidos nucleicos 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_H, D_H, y J_H en un locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina con uno o más segmentos de V_H, D_H, y J_H, donde el uno o más segmentos de V_H, D_H, y J_H 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_L humano y de J_L 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 κ 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®.

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 isotípicas que son el resultado de cambios de clase normales (*por ejemplo*, cambios *cis* isotípicos normales). Los ratones VELOCIMMUNE® inmunizantes dan como resultados sólidas inmunorespuestas 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 Vκ-Jκ) 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. 1 B). Específicamente, se han introducido las secuencias de genes V_H, D_H, J_H, Vκ y Jκ 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 genomanipulación VELOCIGENE® (véase, *por ejemplo,* Patente de los Estados Unidos. Nº 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_H 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 aparear 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 raza 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. Mantener la raza puede comprender evitar los problemas de infertilidad presentados por ratones macho homocigóticos para la sustitución.

Se describe un método para mantener una raza de ratón que se describe en el presente documento. La raza de ratón no necesita comprender una secuencia de ADAM6 ectópica, y en algunas realizaciones, la raza de ratón es homocigótica o heterocigótica para una inactivación genética (*por ejemplo*, una inactivación genética funcional) de ADAM6.

La raza 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 deleción 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 raza de ratón puede ser homocigótica o heterocigótica para una inactivación genética (*por ejemplo*, una inactivación genética funcional) o una deleción de un gen ADAM6.

La raza 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 raza 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 raza 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 raza 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 raza 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 raza de ratón.

Se describe un método que se proporciona para mantener una raza 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 raza de ratones a fin de generar ratones macho heterocigóticos, donde los ratones macho heterocigóticos se crían para mantener la modificación genética en la raza. La raza 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_H humano V_H1-2 y V_H6-1, parece ser un pseudogen (Figura 12). En ratones, existen dos genes ADAM6, ADAM6a y ADAM6b que se encuentran en una región intergénica entre los segmentos génicos VH y D_H, 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_H se eliminan o sustituyen, o cuando los segmentos de los genes D_H 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 estadíos 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 estadío 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 estadíos 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.

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 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 crearan secuencias novedosas de la secuencia de ratón colocando la secuencia en una 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$^{-/-}$. 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 deleción 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 segmentos endógenos del gen V_H con segmentos humanos del gen VH, 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_H 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 pseudogen 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.

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 ser debida 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 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % o más. En varias realizaciones, los animales no humanos se suplementas 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 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 raza 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, 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 raza o especie de rata, o, en una realización, de un ratón).

De esta manera, en algunas realizaciones, 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, comprende 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 raza 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 es 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 raza concreta, se puede obtener un ortólogo u homólogo de ADAM6 o su fragmento funcional de un ratón de otra raza, o de un ratón de una especie relacionada. El ortólogo o el homólogo de ADAM6 o su fragmento funcional se selecciona 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 esperma de un animal genéticamente modificado que carece de ADAM endógeno o del ortólogo o su fragmento de migar por un oviducto y fertilizar un óvulo de la misma especie de un animal genéticamente modificado.

En diversos aspectos, se pueden crear ratones que comprendan deleciones 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 raza 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 genomanipulación de BAC ha permitido la capacidad de realizar deleciones grandes, e inserciones grandes, en las células ES de ratón.

Los ratones que fabrican anticuerpos humanos han estados 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.

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 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 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 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.

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.

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 κ, Igκ) 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 Vκ-Jκ 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.

Los ratones VELOCIMMUNE® son posibles debido a que los segmentos génicos de la inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera κ 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.

En algunas realizaciones, la sustitución adicional de determinadas secuencias génicas de la región constante de ratón con secuencias génicas humanas (*por ejemplo*, la sustitución se 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 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 Vκ y Jκ para sustituir un segmento de tres megabases del locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina κ que contiene esencialmente todos los segmentos génicos Vκ y Jκ.

Los ratones con dichos loci de inmunoglobulina sustituidos pueden comprender una perturbación o deleción 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 pseudogen que parece ser un pseudogen 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 comprende una secuencia ADAM6a de ratón y una secuencia ADAM6b de ratón o sus fragmentos funcionales que pueden estar colocados entre V_H1-2 humano y V_H6-1 humano en un locus endógeno modificado de la cadena pesada. En una realización, la secuencia de ácido nucleico ectópica es la SEC 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 SEC ID Nº: 3 son opuestos con respecto a la dirección de la transcripción de los segmentos génicos V_H humanos que lo rodean.

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.

En un aspecto, se proporcionaron 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.

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 mVH, 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 κ de la inmunoglobulina (de mVκ y mJκ) con uno o más segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina (de hVκ y/o hJκ).

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 JH 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.

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

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 κ de la inmunoglobulina con al menos 40 segmentos génicos Vκ y cinco segmentos de los genes Jκ.

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 VH 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_H1-2 humano y el extremo 3' del locus de ADAM6 tiene aproximadamente 29.737 pb desde el extremo 5' del segmento génico V_H6-1 humano. En una realización específica, el locus de ADAM6 de ratón comprende la SEC 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_H humanos es entonces la siguiente (de la dirección 5' a la dirección 3' con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos V_H humanos): V_H1-2 humano - locus de ADAM6 de ratón - V_H6-1 humano. En una realización específica, El pseudogen ADAM6 entre V_H1-2 humano y V_H6-1 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_H 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_H humanos y el segmento 5' de la mayoría de genes D_H. Este puede ser el caso cuando el segmento 5' de la mayoría de genes D_H es de ratón o ser humano.

De manera similar, un ratón modificado con uno o más segmentos génicos V_L (*por ejemplo,* los segmentos Vκ o Vλ) que sustituyen todos o sustancialmente todos los segmentos endógenos del gen V_H 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_L humanos o entre los segmentos génicos V_L humanos y un segmento del gen DH (tanto humano como de ratón, *por ejemplo,* VA + m/hDH), o un segmento J (tanto humano como de ratón, *por ejemplo,* Vκ + J_H). En una realización, la sustitución incluye dos o más segmentos génicos V_L humanos, y el locus ADAM6 de ratón o su fragmento funcional está presente entre los dos segmentos 3' de la mayoría de genes V_L. En una realización específica, la disposición de los segmentos génicos V_L humano es entonces la siguiente (desde la dirección 5' a la dirección 3' con respecto a la dirección de la transcripción de los segmentos génicos humanos): V_L3'-1 humano - locus de ADAM6 - V_L3' 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_L 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_L humanos y el segmento 5' de la mayoría de genes D_H. Este puede ser el caso cuando el segmento 5' de la mayoría de genes D_H es de ratón o ser humano.

Se describe un ratón con una sustitución de uno o más segmentos endógenos del gen V_H de ratón, y que comprenden al menos un segmento endógeno del gen D_H de ratón. En dicho ratón, la modificación de los segmentos endógenos del gen V_H de ratón comprende una modificación de uno o más segmentos 3' de la mayoría de genes V_H, pero no de los segmentos 5' de la mayoría de genes D_H, cuando se tiene cuidado con el fin de que la modificación de los uno o más segmentos 3' de la mayoría de genes V_H 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_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_H humanos, y el ratón comprende uno o más segmentos endógenos del gen D_H y un locus endógeno de ADAM6 de ratón.

El ratón puede comprender la modificación de los segmentos 3' endógenos de la mayoría de genes V_H, y una modificación de uno o más segmentos endógenos del gen D_H 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) sustituir los segmentos 3' de la mayoría de genes V_H endógenos de ratón con uno o más segmentos génicos V_H 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_H 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 de ratón.

En diversos aspectos, emplear ratones que contienen una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo u homólogo o su homólogo funcional es 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*, con secuencias Vκ o Vλ) 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.

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 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 deleción 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.

En algunos aspectos, se proporcionan 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. En varias realizaciones, 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.

En un aspecto, se proporciona 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.

En una realización, el ratón comprende además una sustitución de una secuencia de nucleótidos C_H1 de ratón con una secuencia de nucleótidos C_H1 humana. En una realización, el ratón comprende además una sustitución de una secuencia de nucleótidos bisagra de ratón con una secuencia de nucleótidos bisagra humana. En una realización, el ratón comprende 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. En una realización, el ratón comprende 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. En una

realización específica, la V_L, J_L, y C_L son secuencias de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina. En una realización específica, el ratón comprende 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.

En un aspecto, se proporciona 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.

En una realización, el ratón comprende 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*, Jκ o Jλ), 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. En una realización, la región J es una región Jκ humana. En una realización, la región J es una región J_H humana. En una realización, la región J es una región JA humana. En una realización, la región V_L humana se selecciona entre una región VA humana y una región Vκ humana.

En realizaciones específicas, el ratón expresa un único anticuerpo de dominio variable que tiene una región constate de ratón o humana y una región variable de Vκ humana, D_H humana y Jκ humana; Vκ humana, una D_H humana, y una J_H humana; VA humana, D_H humana, y JA humana; VA humana, D_H humana, y una J_H humana; Vκ humana, D_H humana, y JA humana; VA humana, D_H humana, y Jκ humana. En una realización específica, las secuencias de reconocimiento de la recombinación están modificadas de tal manera que permiten que se produzcan redisposiciones productivas entre los segmentos génicos V, D, y J o entre los segmentos génicos V y J enumerados.

En un aspecto, se proporcionaron 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 JH con los segmentos de los genes JL humanos; en el que el ratón carece de CH1 y/o la región bisagra.

En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifica un dominio C_H1. En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifica una región bisagra. En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifica un dominio C_H1 y una región bisagra.

En una realización específica, el ratón expresa una proteína de unión que comprende un dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana (λ o κ) fusionado a un dominio C_H2 de ratón que se une a un dominio C_H3 de ratón.

En un aspecto, se proporcionaron 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 una realización, el ratón comprende una deleción de una secuencia génica de la región constante de la cadena pesada que codifica una región C_H1, una región bisagra, una región C_H1 y una región bisagra, o una región C_H1 y una región bisagra y una región C_H2.

En una realización, el ratón fabrica una única proteína de unión a un dominio variable que comprende un homodímero seleccionado a partir de los siguientes: (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; (c) V_H humano - C_H2 ratón - C_H3 ratón.

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.

El ratón puede comprender además un locus endógeno inactivado de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En una realización específica, el locus endógeno de la cadena ligera de la inmunoglobulina se puede seleccionar entre un locus de la cadena ligera κappa (κ) y lambda (λ). El ratón puede comprender un locus endógeno de la cadena ligera κ y un locus inactivado de la cadena ligera λ, 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 κ y un dominio de la cadena ligera A humana.

En un aspecto, se proporciona 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 la región constante de un ratón.

El anticuerpo quimérico se expresa a partir de un locus de inmunoglobulina. El dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo quimérico se expresa a partir de un locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina. El dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo quimérico puede expresarse a partir de un locus endógeno de la cadena ligera de inmunoglobulina reordenada. En una realización, el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo quimérico se expresa a partir 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).

En una realización específica, el transgén se expresa a través de un locus transcripcionalmente activo, *por ejemplo,* un locus ROSA26, *por ejemplo,* un murino (*por ejemplo*, ratón) un locus ROSA26.

En un aspecto, se proporciona 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.

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

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.

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.

Se describe un 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 ADAM6 o un homólogo u ortólogo o fragmento funcional de la misma.

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 familia Murinae. El roedor puede ser seleccionado entre un ratón, una rata, y un hámster.

Los dominios V_H y V_L se pueden unir 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 Vκ o un dominio VA.

En un aspecto, se proporciona 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.

La secuencia de la inmunoglobulina humana es una secuencia de la cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, la secuencia de inmunoglobulina comprende uno o más segmentos génicos V_H. En una realización, la

secuencia de inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos de los genes D_H. En una realización, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos de los genes J_H. En una realización, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos génicos V_H, uno o más segmentos de los genes D_H y uno o más segmentos de los genes J_H.

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 VH, 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.

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.

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.

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.

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_H1-69, V_H3-7, V_H3-11, V_H3-15, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-43, V_H3-48, 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_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.

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.

En una realización específica, la secuencia de inmunoglobulina humana comprende segmentos de los genes18 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.

En una realización, 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.

En varias realizaciones, la secuencia de la inmunoglobulina humana está unida operativamente con una región constante en la línea germinal del ratón. 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.

La secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana se localiza en un locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina en la línea germinal del animal no humano (por ejemplo, el roedor, *por ejemplo,* el ratón o rata o hámster).

En diversos aspectos, el animal no humano comprende 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. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina es una secuencia de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina. En una realización, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos génicos V_L. En una realización, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos de los genes J_L. En una realización, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana comprende uno o más segmentos génicos V_L y uno más segmentos de los genes J_L. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana comprende al menos segmentos de los genes 16 Vκ y cinco segmentos de los genes Jκ. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana comprende al menos segmentos de los genes 30 Vκ y cinco segmentos de los genes Jκ. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana comprende al menos segmentos de los genes 40 Vκ y cinco segmentos de los genes Jκ. En varias realizaciones, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana está unida operativamente con una región constante en la línea germinal del animal no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata o hámster). En una realización, la región constante es una región constante humana, quimérica humana/de roedor ratón, rata, o de hámster. En una realización específica, la región constante es una región constante de ratón o de rata. En una realización específica, la región constante es una región constante κ de ratón (mCκ) o una región constante κ de rata (rCκ).

En una realización, el ratón comprende una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vκ y del gen Jκ con al menos seis segmentos génicos Vκ y al menos un segmento del gen Jκ. En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vκ y Jκ se sustituyen con al menos 16 segmentos génicos Vκ humanos (Vκ humano) y al menos un segmento del gen Jκ. En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vκ y Jκ se sustituyen con al menos 30 segmentos génicos Vκ humanos, y al menos un segmento del gen Jκ. En una realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vκ y Jκ se sustituyen con al menos 40 segmentos génicos Vκ y al menos un segmento del gen Jκ. En una realización, el al menos un segmento del gen Jκ comprende dos, tres, cuatro, o cinco segmentos de los genes Jκ.

En una realización, los segmentos génicos Vκ comprenden Vκ 4-1, Vκ5-2, Vκ7-3, Vκ2-4, Vκ1-5, y Vκ1-6. En una realización, los segmentos génicos Vκ comprenden Vκ 3-7, Vκ1-8, Vκ1-9, Vκ2-10, Vκ3-11, Vκ1-12, Vκ1-13, Vκ2-14, Vκ3-15 y Vκ1-16. En una realización, los segmentos génicos Vκ comprenden Vκ 1-17, Vκ2-18, Vκ2-19, Vκ3-20, Vκ6-21, Vκ1-22, Vκ1-23, Vκ2-24, Vκ3-25, Vκ2-26, Vκ1-27, Vκ2-28, Vκ2-29, y Vκ2-30. En una realización, los segmentos génicos Vκ comprenden Vκ 3-31, Vκ1-32, Vκ1-33, Vκ3-34, Vκ1-35, Vκ2-36, Vκ1-37, Vκ2-38, Vκ1-39, y Vκ2-40.

En una realización específica, los segmentos génicos Vκ comprenden segmentos contiguos del gen κ de la inmunoglobulina que abarcan el locus de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina desde Vκ4-1 a Vκ2-40, y los segmentos de los genes Jκ comprenden segmentos contiguos del gen que abarcan el locus de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina desde Jκ1 a Jκ5.

En una realización, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana se localiza en un locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina en la línea germinal del animal no humano. En una realización específica, el locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina en la línea germinal del animal no humano es un locus de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina. En una realización, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana se localiza en un locus de la cadena ligera no de inmunoglobulina en la línea germinal del animal no humano que es transcripcionalmente activo. En una realización específica, el locus no de inmunoglobulina es 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

un ratón que se describe en el presente documento.

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 un ratón que se describe en el presente documento. El polipéptido puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo con una única cadena pesada. El polipéptido puede ser un fragmento de la región variable monocatenario (por ejemplo, un scFv).

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 del 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.

Ejemplos

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 está definida 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.

Ejemplo 1

Humanización de genes de la inmunoglobulina de ratón

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 κ 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 κ de la inmunoglobulina, respectivamente.

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 κ 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 ES 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 κ 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).

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 $3hV_H$ 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_H1-3 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, lOx*P). En la segunda etapa (Etapa 2) se introdujo un segundo casete exactamente en la dirección 3' desde el último segmento de J_H 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_H6 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-CeuI 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	Etapa	Descripción	Proceso
$3hV_H$	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 $3hV_H/27hD_H/9hJ_H$ en el BAC proximal de ratón CT7-302a07 para crear $3hV_H$ BACvec	BHR
DC	1	Insertar el casete en el extremo distal del locus de IgH de ratón utilizando el BAC CT7/253i20	BHR
$18hV_H$	1	Insertar el marcador specR en la dirección 3' terminal de la inserción de $3hV_H$ utilizando el BAC humano CTD-2572o2	BHR
	2	Insertar los sitios I-CeuI y Not que flanquean puroR en la dirección 5' terminal de la inserción de $3hV_H$	BHR
	3	Insertar el sitio Not en la dirección 3' del BAC Rel2-408p02 (~10 kb en la dirección 3' de V_H2-5)	BHR
	4	Insertar el sitio I-CeuI en la dirección 5' del BAC Rel2-408p02 (~23 kb en la dirección 5' de V_H1-18)	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 $3hV_H$	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 $18hV_H$	BHR
$39hV_H$	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 AscI que flanquean puroR en el extremo distal del BAC RP11-72n10	BHR
	5	Ligar un fragmento de 161kb procedente de la construcción de la etapa 4 en la construcción de la etapa 2 sustituyendo hygR	Ligadura
	6	Insertar los sitios neoR y AscI 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 $39hV_H$	BHR

(continuación)

BACvec	Etapa	Descripción	Proceso
53hV_H	1	Insertar specR en el extremo proximal del BAC CTD-3074b5 humano	BHR
	2	Insertar el sitio AscI en el extremo distal del BAC CTD-3074b5 humano	BHR
	3	Insertar los sitios hygR y AscI 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_H	BHR
70hV_H	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 AscI 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_H	Ligadura
80hV_H	1	Insertar los sitios I-CeuI y AscI 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_H	Ligadura

Tabla 2

BACvec	Etapa	Descripción	Proceso
Igκ-PC	1	Insertar el sitio *lox*P en el intrón J-C de ratón utilizando el BAC CT7-254m04	BHR
Igκ-DC	1	Insertar el sitio *lox*P en el extremo distal del locus Igκ de ratón utilizando el BAC CT7-302g12	BHR
6hVκ	1	Insertar el sitio PI-SceI = 400 pb en la dirección de hJκ5 en el BAC CTD-2366j12	BHR
	2	Insertar los sitios I-CeuI y AscI 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 mJκ utilizando el BAC CT7-254m04	BHR
	4	Insertar hIgVκIJκ en la dirección 5' de EnhκICκ 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 Igκ de ratón utilizando el locus Igκ 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 6hVκ	Ligadura
16hVκ	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 Igκ 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 16hVκ	Ligadura
30hVκ	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 Igκ de ratón utilizando el locus Igκ 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 30hVκ	Ligadura

(continuación)

BACvec	Etapa	Descripción	Proceso
40hVκ	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 40hVκ	Ligadura

Modificación de embriocitoblastos (ES) y generación de ratones. Se realizó el direccionamiento de células ES (F1 H4) utilizando el método de ingeniería genética VELOCIGENE® como se describe (Valenzuela *et al.,* 2003). 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_H, D_H y J_H 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. Nº 6.586.251 y Valenzuela et al., 2003).

El intrón entre los segmentos génicos J_H 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 lymphoidcells, 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_H-D_H-J_H humana y la región C_H 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 pesad 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_H y la unión distal se colocó algunos cientos en la dirección 5' del segmento 5' de la mayoría de genes VH del locus humano y aproximadamente 9 kb en la dirección 3' del segmento génico V_H1-86 de ratón, conocido también como J558.55. El segmento génico V_H1-86 (J558.55) es el segmento génico de la región variable más distal, notificado por ser un pseudogen 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_H, 27 D_H y 9 J_H humano insertados en el extremo proximal del locus IgH de ratón, con una deleción 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_H). Esta inserción grande de 144 kb y la deleción 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 deleción 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_H de ratón diferentes de V_H1-86 y todos los segmentos de los genes D_H 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_H de ratón se eliminaron en la Etapa A. se identificaron clones de células ES doblemente dirigidos en el mismo cromosoma impulsando el casete proximal $3hV_H$ 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 deleción 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 deleción 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 deleción que contenía el único sitio loxP restante. Además, Se confirmó la deleción mediante hibridación *in situ* (no se muestran los datos).

Se añadió el resto de la región variable de la cadena pesada humana al alelo $3hV_H$ 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 $3hV_H$. 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).

Tabla 3

Alelo híbrido	Secuencia humana	Construcción directora	Eficacia directora	% de utilización	V_H total	V_H funcional
$3hV_H$	144 kb	240 kb	0,2 %	5	3	3
$3hV_H$/DC	144 kb	110 kb	0,1 %	5	3	3
$3hV_H$-CRE	144 kb	-	8 %	5	3	3
$18hV_H$	340 kb	272 kb	0,1 %	25	18	12
$39hV_H$	550 kb	282 kb	0,2 %	60	39	25
$53hV_H$	655 kb	186 kb	0,4 %	65	53	29
$70hV_H$	850 kb	238 kb	0,5 %	90	70	39
$80hV_H$	940 kb	124 kb	0,2 %	100	80	43
$80hV_H$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 Vκ y Jκ con aproximadamente 0,5 Mb de la secuencia humana que contenía los segmentos proximales humanos de genes Vκ y Jκ de una manera similar a la de la cadena pesada (FIG. 1 B; 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 Vκ y Jκ de ratón con los Vκ proximales humanos y los segmentos de los genes Jκ 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 Vκ de ratón, que contiene todos los segmentos génicos Vκ y Jκ, 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 deleción de los 3 Mb restantes de la región Vκ 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_H total	V_H funcional
Igκ-PC	0	132 kb	1,1 %	-	-	-
Igκ-PC/DC	0	90 kb	0,4 %	-	-	-
Igκ-CRE	0	-	1 %	-	-	-
6hVκ	110 kb	122 kb	0,3 %	14	6	4
16hVκ	240 kb	203 kb	0,4 %	47	16	11
30hVκ	390 kb	193 kb	0,1 %	70	30	18
40hVκ	480 kb	185 kb	0,2 %	100	40	25
40hVκdHyg	480 kb	-	0,7 %	100	40	25

Ejemplo 2

Generación de ratones completamente inmunizados mediante combinación de múltiples alelos de inmunoglobulina humanizada

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 κ 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 JH humanos combinados con dieciséis segmentos génicos Vκ humanos y todos los segmentos de los genes Jκ humanos. Los ratones VE LOCIMMUNE® 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 Vκ, y ochenta V_H y cuarenta Vκ, 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 Vκ y Jκ, los anticuerpos producidos por todas las versiones de ratones VELOCIMMUNE® contienen regiones variables humanas unidas a regiones constantes de ratón. Los loci de la cadena ligera λ 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 κ de VELOCIMMUNE®.

Se generaron ratones doblemente homocigóticos para las humanizaciones de la cadena pesada de inmunoglobulina y las humanizaciones de la cadena ligera κ 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 pseudogen 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 pseudogen 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 κ,		
	V_H humano	Alelo	Gen V_H 5'	Vκ	Alelo	Gen Vκ 5'
V1	18	18hV_H	V_H1-18	16	16hVκ	Vκ1-16,
V2	39	39hV_H	V_H4-39	30	30hVκ	Vκ2-29
V3	80	80hV_H	V_H3-74	40	40hVκ	Vκ2-40

Ejemplo 3

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.

En resumen, suspensiones celulares procedentes de la médula ósea, bazo y timo se prepararon con métodos convencionales. Las células se resuspendieron a $5x10^5$ células/ml en tampón de tinción BD Pharmingen FACS, bloqueado con anticuerpo dirigido contra IgG de ratón CD16/32 (BDPharmingen), 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.

Los cócteles de anticuerpos para tinción de la médula ósea (A-D) fueron los siguientes: A: IgM^b-FITC dirigido contra IgG de ratón, IgM^a-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^b-FITC dirigido contra IgG de ratón, IgM^a-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.

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 $B220^+$ IgM^+ 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_H 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 VH 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 $B220^+$ IgM^+ 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".

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.

La humanización de los loci de la inmunoglobulina se llevó a cabo en una línea F1 ES (F1 H4, Valenzuela *et al.,* 2003), derivada de los embriones heterocigóticos 129S6lSvEvTac y C57BLl6NTac. Las secuencias génicas variables de la línea germinal de la cadena pesada humana se dirigieron hacia el alelo 129S6, que transporta el haplotipo $IgM^{a,}$ mientras que el alelo C576BLl6N no modificado de ratón tiene el haplotipo IgM^{b} . Estas formas alélicas de IgM se pueden distinguir mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos de los polimorfismos encontrados en los alelos IgM^{a} o IgM^{b} . 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^{a} (el alelo humanizado) o IgM^{b} (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^{a}) es aproximadamente proporcional al número de segmentos génicos de V_H 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_H, y un 50 % de los linfocitos B en ratones heterocigóticos VELOCIMMUNE® 2 y 3 (no se muestra), con 39 y 80 segmentos génicos V_H, 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 se 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; Tuaillon 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".

Los polimorfismos de las regiones Cκ no están disponibles en 129S6 o C57BLl6N 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 κ humanizados pueden evitar la expresión de los loci de cadena ligera κ de ratón. La relación entre el número de células que expresan la cadena ligera κ humanizada con respecto al número de células que expresan la cadena ligera λ de ratón resultó relativamente inalterada en los ratones VELOCIMMUNE® comparados con los ratones silvestres, independientemente del número de segmentos génicos de Vκ humana insertados en el locus de cadena ligera κ (FIG. 6, tercera fila desde la parte superior). Además, no se produjo incremento en el número de células doble positivas (κ y λ), lo que indica que la recombinación productiva en el loci de cadena ligera κ híbrido da como resultado una supresión correcta de la recombinación del loci de cadena ligera λ de ratón. Por el contrario, los ratones que contenían transgenes de cadena ligera κ integrados aleatoriamente junto con loci de cadena ligera κ de ratón inactivados pero con loci de cadena ligera λ de ratón mostraron valores fuertemente aumentados de la relación λ/κ (Jakobovits, 1998), lo que implica que los transgenes de la cadena ligera κ 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 κ o λ. 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 $CD43^{hi}$ $B220^{lo}$	pre-B $CD24^{hi}$ $B220^{lo}$	$B220^{lo}$ inmaduro IgM^{+}	Maduro $B220^{hi}$ IgM^{+}	$B220^{hi}$ IgM^{+} IgD^{+} emergente	B220hi IgM^{+} 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 κ 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 κ 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 $1x10^7$ - $2x10^7$ 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 SUPERSCRIPT™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen). Las reacciones se realizaron con 2-5 µl 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 κ, 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 ºC. 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 κ 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 ensamblo en cóntigos y se alineo 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 Vκ, Jκ. 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_H-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 $B220^+$ IgM^+ o las IgG^+ ($sIgG^+$) de la superficie se combinaron y se obtuvieron las secuencias de V_H y $V\kappa$ 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; falta de t o pseudogén). Asterisco: segmentos génicos con RSS defectivo. t: el segmento génico falta o pseudogén.

Tabla 7

V_H	Observado
1-18	3
1-17P	0
3-16*	0
3-15	13
3-13	9
3-11	6
3-9	8
1-8	6
3-7	2
2-5	2
1-3	0
1-2	11
6-1	5

J_H	Observado
1	2
2	1
3	8
4	33
5	5
6	16

D_H	Observado
1-1	1
2-2	2
3-3	4
4-4	0
5-5	0
5-18	4
6-6	5
1-7	7
2-8	0
3-9	4
3-10	2
4-11	1
5-12	1
6-13	3
1-14	0
2-15	0
3-16	1
4-17	0
6-19	2
1-20	2
2-21	1
3-22	0
4-23	2
5-24	1
6-25	1
1-26	6
7-27	10

$V\kappa$	Observado
1-16	2
3-15	1
1-12	5
3-11	1
1-9	5
1-8	2
3-7*	0
1-6	5
1-5	8
5-2	6
4-1	8

$J\kappa$	Observado
1	12
2	10
3	5
4	10
5	0

Tabla 8

V_H	Observado
7-81†	0
3-74†	0
3-73	1
3-72	2
2-70	2
1-69	3
3-66	1
3-64	1
4-61	1
4-59	10
1-58	0
3-53	0
5-51	5
3-49	2
3-48	7
1-46	1
1-45	0
3-43	10
4-39	4
3-38*	0
3-35*	0
4-34	8
3-33	14
4-31	4
3-30	13
4-28	0
2-26	0
1-24	3
3-23	18
3-21	0
3-20	0
1-18	4
1-17P	1
3-16*	0
3-15	13
3-13	6
3-11	5
3-9	31
1-8	7
3-7	11
2-5	1
1-3	0
1-2	6
6-1	9

D_H	Observado
1-1	7
2-2	8
3-3	9
4-4	4
5-5	6
5-18	6
6-6	29
1-7	30
2-8	4
3-9	8
3-10	10
4-11	4
5-12	5
6-13	17
1-14	2
2-15	3
3-16	4
4-17	3
6-19	8
1-20	3
2-21	1
3-22	5
4-23	2
5-24	2
6-25	2
1-26	17
7-27	7

J_H	Observado
1	2
2	8
3	26
4	95
5	11
6	58

V_K	Observado
2-40	1
1-39	34
1-37	2
1-33	35
2-30	8
2-29	2
2-28	7
1-27	5
2-24	7
6-21*	3
3-20	10
1-17	13
1-16	10
3-15	13
1-12	13
3-11	13
1-9	11
1-8	1
3-7*	0
1-6	6
1-5	7
5-2	0
4-1	21

J_K	Observado
1	50
2	37
3	28
4	64
5	22

Como se muestra en las Tablas 7 y 8, se utilizaron casi todos los segmentos génicos V_H, D_H, J_H, Vκ y Jκ 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 esperaría 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 ha demostrado que todos los segmentos génicos V_H, D_H, J_H, Vκ, y Jκ 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 complementareidad (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 Vκ y Jκ y genera una cantidad significativa de diversidad de repertorio antes de encontrar al antígeno. La unión es imprecisa debido a ambas deleciones 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 κ humana muestran poca o ninguna adición de sat CDR3, que se forma mediante la recombinación de los segmentos Vκ y Jκ (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 Vκ 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 esperaría que las secuencias de regiones variables procedentes de linfocitos B $sIgM^+$ predominantemente no expuestos tuvieran relativamente menos mutaciones que las secuencias variables procedentes de linfocitos B $sIgG^+$ B que han experimentado selección mediante antígeno.

Las secuencias de clones aleatorios VH o Vκ procedentes de linfocitos B sIgM+ o sIgG+ B procedentes de ratones VELOCIMMUNE® no inmunizados o linfocitos B $sIgG^+$ 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 sIgG+ procedentes de ratones VELOCIMMUNE® no inmunizados muestran más nucleótidos comparado con los linfocitos B $sIgM^+$ 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 Vκ derivadas de linfocitos B IgG^+ 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 µg 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 µg/m de antígeno durante la noche a 40 ºC y se bloquearon con albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, MO). Muestras en 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 determinaron 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 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.

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.

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 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.

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 ºC 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 la placa 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 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.

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).

Ejemplo 7

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.

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 deleción dirigida de un pseudogen ADAM6 humano (hADAM6Ψ) situado entre los segmentos génicos V_H1-2 and V_H6-1 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; SEC 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 pseudogen ADAM6 humano (hADAM6Ψ) situado entre los segmentos génicos V_H1-2 y V_H6-1 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 *lox*P para incluir brazos de homología conteniendo la secuencia genómica humana en las posiciones 3' del segmento génico V_H1-2 humano (en 5' con respecto a hADAM6Ψ) y a 5' del segmento génico V_H6-1 humano (en 3' con respecto a hADAM6Ψ; 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 pseudogen 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 deleción del pseudogen 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 deleción 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_H1-2 humano, ~800 pb de la secuencia genómica de ratón en dirección 3' del gen ADAM6b de ratón, el gen ADAM6b de ratón, ~4800 pb de la secuencia genómica en dirección 5' 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_H6-1 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 TAAAAAGGCA GGATTTGAAG CGATGGAAGA TGGGAGTACG GGGCGTTGGA AGACAAAGTG CCACACAGCG CAGCCTTCGT CTAGACCCCC GGGCTAACTA TAACGGTCCT AAGGTAGCGA G)GGGATGACAG ATTCTCTGTT CAGTGCACTC AGGGTCTGCC TCCACGAGAA TCACCATGCC CTTTCTCAAG ACTGTGTTCT GTGCAGTGCC CTGTCAGTGG (SEC 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 PISceI (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 CATCT GCTGA CATGAGGGCC GAAGTCAGGC TCCAGGCAGC GGGAGCTCCA CCGCGGTGGC GCCATTTCAT TAC CTCTTTC TCCGCACCCG ACATAGATAAAGCTT) ATCCCCCACC AAGCAAATCC CCCTACCTGG GGCCGAGCTT CCCGTATGTG GGAAAATGAA TCCCTGAGGT CGATTGCTGC ATGCAATGAA ATTCAACTAG (SEC ID Nº: 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, Patente de los Estados Unidos. N^{ros} 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.

Los ratones que contenían un locus de cadena pesada humanizado que incluía los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón se reprodujeron para conseguir una raza de ratón que incluía el eliminador FLPe (véase, *por ejemplo,* Rodriguez 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.

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 fertilizad del ratón ADAM6.

Ejemplo 8

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 humanos y la cadena ligera κ humana ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$) y tres ratones de 18-20 semanas de edad homocigóticos para la cadena pesada humana y la cadena ligera κ 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.

Para teñir las poblaciones celulares, 1 x 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.

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

Sangre periférica y bazo: anticuerpos contra IgG de ratón FITC-κ (187.1, BD Biosciences), PE-A (RML-42, BioLegend), PeCy7- IgM (II/41, eBioscience), PerCP-CyS.S-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 LSRII 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,

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 $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$ demostraron una población de células $CD43^{int}CD19^{+}$ mayor en comparación con los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ (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 $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$. En la periferia, las poblaciones de linfocitos B y T de los ratones $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$ parece normal y similar a la de los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$.

Morfología del testículo y caracterización del esperma. 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 esperma, se examinó la morfología y el contenido de esperma 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, $H^{+/+}\kappa^{+/+}$; grupo 2: ratones heterocigóticos para los loci génicos variables de cadena pesada y cadena ligera κ humanos, $H^{+/-}\kappa^{+/+}$) 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 esperma, mientras que las secciones del epidídimo se examinaron para determinar la presencia de esperma.

En este experimento, no se observaron diferencias en el peso o morfología de los testículos entre los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ y los ratones $H^{+/-}\kappa^{+/+}$. Se observó el esperma 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 esperma se produce en los ratones en presencia y ausencia de ambos genes. Por tanto, no son probables defectos en la fertilidad de los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$macho debidos a la baja producción de esperma.

Motilidad y migración del esperma. Los ratones que carecen de otros miembros de la familia de genes ADAM son infértiles debido a defectos en la motilidad del esperma o migración. La migración del esperma se define como la capacidad del esperma para pasar del útero al oviducto, y normalmente es necesaria para la fertilización en ratones. Para determinar si la deleción de los ADAM6a y ADAM6b en ratones afecta este proceso, la migración y la motilidad del esperma se evaluaron en ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$.

En resumen, se obtuvo esperma 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 ($H^{+/-}\kappa^{+/+}$); (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 ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$); (3) ratones homocigóticos para los loci génicos variables de la cadena pesada humana y homocigóticos para para la cadena ligera κ silvestre ($H^{+/+}m\kappa$); y, (4) ratones CS7 BL/6 silvestres (WT). No se observaron anomalías significativas en el recuento espermático o en la movilidad global del esperma tras la inspección. En todos los ratones se observó dispersión del cúmulo, indicando que cada muestra de esperma pudo penetrar las células del cúmulo y unirse *in vitro* a la zona pelúcida. Estos resultados establecen que los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ tienen esperma 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 esperma de ratones como se ha descrito anteriormente. Se observaron un número ligeramente inferior de embriones escindidos para los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ el día posterior a IVF, así como un número reducido en el esperma unido a los óvulos. Estos resultados establecen que el esperma de ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+,}$ una vez expuesto a un óvulo, puede penetrar en el cúmulo y unirse a la zona pelúcida.

En otro experimento, la capacidad del esperma de los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ para migrar desde el útero y a través del oviducto se determinó en un ensayo de migración de esperma.

En resumen, un primer grupo de ratones hembra superovuladas (n=5) se emparejaron con machos $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ (n=5) y un segundo grupo de ratones hembra superovuladas (n=5) se emparejaron con machos $H^{+/-}\kappa^{+/+}$ (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 esperma. La migración del esperma 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 esperma, tanto en el útero como en ambos oviductos.

De las hembras emparejadas con los cinco machos $H^{+/+}\kappa^{+/+,}$ se encontró poco esperma en la solución del avado del oviducto. Las soluciones de lavado procedentes de los oviductos de las hembras emparejadas con los machos $H^{+/-}\kappa^{+/+}$ 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 $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$.

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 utero-tubal (UTJ). En secciones procedentes de hembras emparejadas con los ratones $H^{+/-}\kappa^{+/+,}$ se identificó esperma en la UTJ y en el oviducto.

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.

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

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.

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.

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 κ 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).

En resumen, Se purificaron linfocitos B $CD19^{+}$ B a partir de bazos 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 κ de ratón (mCκ). La Tabla 10 define las combinaciones de sonda de sentido directo/sentido contrario/TAQMAN™ MGB utilizadas en este experimento.

Tabla 10

V_H humana Secuencia (5'-3') SEC ID Nº:		
V_H6-1	Sentido directo: CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA Sentido contrario: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA Sonda: TCCAGGACTGGTGAAGC	6 7 8
V_H1-2	Sentido directo: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT Sentido contrario: GAGAACACAGAAGTGGATGAGATC	9 10 11
V_H3-23	Sentido directo: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG Sentido contrario: AACCCTGGTCAGAAACTGCCA Sonda: AGAGAAACAGTGGATACGT	12 13 14
V_H1-69	Sentido directo: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG Sentido contrario: GCTCGTGGATTTGTCCGC Sonda: CAGAGTCACGATTACC	15 16 17
mCκ	Sentido directo: TGAGCAGCACCCTCACGTT Sentido contrario: GTGGCCTCACAGGTATAGCTGTT Sonda: ACCAAGGACGAGTATGAA	18 19 20

En este experimento, se observó en las muestras analizadas la expresión de los cuatro genes V_H humanos. Además, los niveles de expresión fueron comparables entre los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ y $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$. Estos resultados demuestran que los genes V_H humanos que eran a la vez distales al sitio de la modificación (V_H3-23 y V_H1-69) y proximales al sitio de modificación (V_H1-2 y V_H6-1) 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

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 κ 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 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.

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-β (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 µg cada uno) se administró en una inmunización inicial mezclado con 10 µg de oligonucleótido CpG como adyuvante (Invivogen). El inmunógeno se administró en la almohadilla plantar (a.p.) en un volumen de 25 µl por ratón. Posteriormente, los ratones recibieron un refuerzo en la a.p. con 2,3 µg de antígeno junto con 10 µg de CpG y 25 µg 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 ºC. 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_2O_2 como sustrato. El sustrato se incubó durante veinte minutos y la reacción se detuvo con H_2SO_4 2 N (VWR) o H_3PO_4 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 ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$) fueron comparables a los generados por ratones que carecían de ADMA6a y ADAM6b y que tenían una cadena pesada humanizada ($H^{+/+}\kappa^{+/+}$). Además, Los bazos de ratones $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$ proporcionaron hibridomas positivos para el antígeno para todos los antígenos ensayados, incluyendo los anticuerpos de alta afinidad, a niveles comparables con los ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$. 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	Raza de ratón	Puntuación del antígeno
A	$H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$	76
A	$H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$	32
B	$H^{+/+}\kappa^{+/+}$	4
B	$H^{+/+}\kappa^{+/+}$	12
B	$H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$	41
B	$H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$	95

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+/+κ+/+ y H+/+$A6^{res}$κ+/+). 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 ºC. Las constantes cinéticas de velocidad de asociación (ka) y disociación (kd) 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_D) y semividas de disociación ($T_{\%}$) se calcularon a partir de las constantes cinéticas de la siguiente forma: K_D (M) = kd / ka; y $T_{\%}$ (min) = (ln2/(60*kd). Los resultados de los anticuerpos dirigidos contra el Antígeno B seleccionados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

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

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 $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$.

En resumen, para capturar los anticuerpos específicos del Antígeno A, anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra IgG de ratón (nº 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 minutes 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 ºC. 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_D) y las semividas disociativas (t½) a partir de las constantes cinéticas de la siguiente forma: K_D (M) = kd / ka; y $T_{\%}$ (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 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_D (M)	$T_{1/2}$ (min)	K_D (M)	$T_{1/2}$ (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
1A8	2,30E-09	4	7,40E-10	6

(continuación)

Anticuerpo	pH 7,2		pH 6,0	
	K_D (M)	$T_{1/2}$ (min)	K_D (M)	$T_{1/2}$ (min)
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

Como se muestra anteriormente, se obtuvieron anticuerpos de afinidad elevada de ambos ratones $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$ y $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ de una forma comparable. Entre los veinticinco anticuerpos representados en la Tabla 12, veinte producidos en ratones $H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$ demostraron un intervalo de afinidad de 0,5 nM a 1 µM, mientras que los cinco generados en ratones $H^{+/+}\kappa^{+/+}$ 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.

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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> RATONES ADAM6

<130> 210-001T3

<150> EP 12716101.6
<151> 24-02-2012

<150> PCT/US2012/026416
<151> 24-02-2012

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

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

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

<160> 58

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

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

<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
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 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
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
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 2

```
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
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

<220>
<223> sintética

<400> 3

```
gtcctaaggt agcgagggat gacagattct ctgttcagtg cactcagggt ctgcctccac 60
gagaatcacc atgccctttc tcaagactgt gttctgtgca gtgccctgtc agtggaaatc 120
tggagagcat gcttccatga gcttgtgagt agtatatcta gtaagccatg gctttgtgtt 180
aatggtgatg ttctacatac cagttctctg gcttaataat gaggtgatga ttctatgttc 240
ctgtaacgct tcctcaactg ggtcctaagt ctttcttcac tccatctatt cctctaagga 300
atgatcctga aaatcccatc acaaactata ggagatggga accatcaaaa aacacagtga 360
caaagaggtg ggaacgcatc agggttcagg aaccatattt taaaaagata tcgtaaataa 420
cttcttaaaa gagatataga caaatctcca ttaatacgga gaccagaggc ctaaggctaa 480
gaaccaatgg tggctcaagg tctcctgcta cccgaggagc aaacgtagag cagtttctaa 540
tgatttattt aaaatataga atcaaaagta ccagtttgca attttgaaag atttatttca 600
gcaatgcaac aacatcaggt ggtgccgagt ccaacacgtc ttatgtccca tgatataaac 660
aaaggccatc cagaactgtg gactggagtt ctaccttgtc ccctaatgac attcagattt 720
tttttccatt ctctttatct tagaggagac agggggctaa ctcattttac ttgtcctttg 780
cttgttcttg ccaagaacgt aaagcagctt gcaagtcttc aaacctaaat atcttagtaa 840
ctcctacacg agtggcaatg ccaaagagca gtgcaacaaa gaggaagtaa atacgaccaa 900
```

agagtattct taaatacact actggctcta ggttctgttt tattatgcgc ctttgaaccg 960
gaggggaccc actgtctatg ctcccactgt gtccctcttc tttgcacttt ggagggctcc 1020
aaccaaaatg gcaatggcaa ttccgacgat tgttacacac tcctctgaaa ttgcattttt 1080
ctggggtgca gtcataaccc aaacgagata aacttccatt gcaagctcct cgatcacaga 1140
acttacccct tgaacacggg gtaccatgtc tcaccaatcc agcatctgct gtttctgtcc 1200
cacgatgttc atcaagccca aagcaggtaa ccccagagat aaccgattga tggaatgaaa 1260
catgttcttg caaaaatgga agattggtga cattggtaca ctgcaacctt ccacacagct 1320
tgtcctgatc agcacaagca ttgaatgtga ggctttcttc tgctctagta caatgcccaa 1380
atcgaaaccg ttgtttgttg atgtcatagc acttaatatt agcattctta gcacttacac 1440
caaagatttc catgcattgt atgttgcgat cagtgcagtt acctttatag cagtaaccct 1500
cttctgagca tggtgtccca tcttgcagat aagtgtcatc tgggcaaatg aacttagagc 1560
cactacagta ctctggaaga tcacatatgt tctggatagg tctgcagagt gtcccagaag 1620
gactgtaagt gcaatttgca cagcataatt ctttatcaca aatgctacca ggtgttaacc 1680
tgcaatcatt tccacagcag ggatctgaat aacatgcctt ttgggagcca cagtcacact 1740
gctcattgtt atctactttg aagtttccac aaaacttata agtcaatgat gtattataat 1800
aaacatgacg gtcatagaaa agacatggca tcagatcagg agtattaagt atgttgctta 1860
tctctgcaag ggaacaattg ctgaaagcat ctgttaattg aggatttttg aacatgatgc 1920
aggtgttcct tctctggcag atacagtacc cctcatcatg ttttaggcct aaactccttc 1980
caacacgatt ggttattata atagataaaa ataaaggatt tcgaccatgt tgaccaagac 2040
aaattagggc tgagggagaa catatactcc tctcagctgg attaacagca tcatctcctg 2100
gcgaattctt gttaattata gctcctgcat caggcctaaa atgagcataa aatactctct 2160
catagaaagt atgagcctgc cctcctggaa ctcgaaaatc ttgtgaaaat ggatcagcct 2220
cggtatacac agtcatgaga aagacatagt accgcatatg aagattggtc agataggtgt 2280
ccattaaact aatgacttta aacaaatact caacagtaga tgaaagtttg tcacctccag 2340
aagcactata tacagaatgg gttgcttgaa agtggccttt tatagcagct ggatgtgtag 2400
cgtaattctt actagatagt ctgggagctc catctgcata ttccaatctg gaggagggag 2460
aacctgtatt atggctccag tgcttccatg cattcatagg ccctgtgtca tcagactcag 2520
atactatctg agaaacaagg tgttcaaagc tctgtgaatc attgaggggt ttgatttcat 2580
aggtaaggtt atccaacttt atgacccctg acaggccccc ataacaagta tccacagtga 2640
ccatggattg caggatcccc tccaggtagc caatatagta acaatctaca ggaaaaaagg 2700
ggtactccat ctgtaaggct ccttggtcat cttgagttgt cagcaacaag tgtctgggcc 2760
aaatgagtgt ctttctccgc aggtggatga tatgtctctg gccccgaaaa cgcaagctat 2820
acgagagcag tctttgtgct tgaagtcctt tggtatggta gatctccttc cgaggaataa 2880
ccacctccga tgagatgtaa cgccaagtgg gatggccttg agaacaccag actggaacca 2940
ggaggagcag ccagagtgca aatagcaaga ggaggaccct ggggaccaca ggtctttcca 3000
ctagcctcat gccccaggtc agagataaca tcctgggtgg agctaactcc ctctgctgtg 3060
gccactgcct ggtctagaaa atactgacag aggactaaaa acctcctcag gctcccaacc 3120
taagtggtta cccagacaac tggagttagg taacagtcac tgggtgtggc aggaattgag 3180
tctgaatgtg ttagctgagg ttgaggttaa atattgtcaa aagggatgtc tataaatgtg 3240
cctggacaag aaaagtcaga agcagcaagg agtgtctctg acaggctcaa tcctttcttt 3300
tctttttttg aagttcaaaa tatcatttcc acgtgaatgt atttggttcc cagtgtgact 3360
ctgggtctct ttctaggagt caatatttct ttatatcttg gctcatgttt ttcacagttg 3420
ttctaacttc ttgttttgtt ttgtttgttt gtttgtttga aagttagaag taaatactgt 3480
ctatattagc cttttagcta taaatgattg tttttatttc ttctaatcat gttttgtttg 3540
agttttggtt aaactattta caaatgagtt tttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag 3600
tttggagctt tctgttaata ttgtgttgtt gtttctccaa tattattaga cctgagaatt 3660
ctacctgggt acctgtgaac tccagaattt ttaaaaattc catctcttgg gaacattatc 3720
tctgaccccg tctgaggccg aagtggctgt ccccctccaa cctttagtat ctttctttcc 3780
tgactattgg gatttcttca agcaatcagg ctgatgggtt ctcagcagtg agaccagtag 3840
actgtcggta tgaacgtcga agagtctgcc acacactccg ggttcatcaa cagtgctttc 3900
gcgtctctta cttttgtaga aggaaatgca gcctctgagt tttctccaag aaatcattga 3960
tgaaagggtg aaaagatggg tatcacccgg agttcatgac aagccctggc tcagacacgt 4020
gagcaaggtc tacagcccca aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagataggag 4080
aaaaaaatgg gtagttggag ggttgatcaa cttacttcct ctcaaacata tatatctcat 4140
ctaagtgtgc aggggaaaac tctgtagaac tactgggata cctgctcacc cccaggagcc 4200
tcatgaataa gtctctgctt ctgccttgta gccatgagca ttactgcacc tgataccccc 4260
gcagcttcct agggaagagg gaggaagtga cttggccccc gtctggttaa ggtaagagga 4320
gataaatccc ttctcattga ttagggtgag aggggtcatg tgctctatca ttggtgaccc 4380
agttgggaca tgggtttata ccaaagtcat cactctgagg ttctgtgtac caccaggctg 4440
aactcccata tcctacatgg acataggaca acaccaagca gaaggaggtt ttaggactaa 4500
actgaaggac agagatgcgg tttctaaaca actagggagt gccagggcca gcctctctaa 4560
ccactatagg acactgtgga gtctggttac aaagagagat tactcaaggt ccttagcact 4620
gattacagag catatctcag atgccttctg ctgaccagat gtatctttgc ataatctgcc 4680
tatccagatt cagaaaattg atgccacata gccaagtgga ctttcaggaa cagacgattt 4740
aaaaacaggc agagagatgt gagagaaagg agaaggagag agagaaggga gagggagaga 4800

agagagaggg agacggagaa ggaaagaggg agaaggagaa ggagagaagg ggcatggaca 4860
gagggaggga cagaaggaga gaggagatag agaggggat aaggaagaag ggagggaggg 4920
agagagagag aaggctaagt ctttccatac ctgggtccca atacctctta taacccaagc 4980
acatggtttc acatatcaca atgcggttgg gatatagata actgtaaata cttgtgaaaa 5040
taatggggct gagatctggg gttttcatga tagtttcaaa gtcaccgtac tgactaaaac 5100
cttccactgg cccatctcca gcttcctaat ctgagggtat caaatttccc actaagtgtg 5160
tttagaaaga tctccacctt tttgcccttg tcttccagtg ccccacctac gttctggtct 5220
cccacatctg atgtcttctc agtgattctg gccctgcctg ctccacagct acaaacccct 5280
tcctataatg agctctgtgc tgagccatca tcctgaatca atccacctta agcagatgtt 5340
ttgcttattt ttcctgtgtc catactacag aggaaaggta ggcatgtaga agctgaagca 5400
tctcacctca ttccaagcac cctcagtctc taaatgtgcc cccttgtttc cagaagtgca 5460
acctcaagca tcttttattc attcatctta gagggccaca tgtgctgtag tgttataaga 5520
tgaaatttaa agcattaatt attcctaaca agccaattaa acaagccaaa aacattcatc 5580
agtcattccc atggaacctc tgaagcatct tcctgctcta accttgggtt ttccagggct 5640
gctctgggat cacaggagct gtcctgtcta ccagccatat aaaggcagac ctatcagaat 5700
tacaccagac ttctcaccat agactataaa agccagaata tcctggacag atgttataca 5760
gaaactaaga gaacacaaat gccagcccag gctactatac ccagcaaaac tctcaattac 5820
catcgatgaa gaaaccaaga tattccatta caagtccaaa tttacacaat atctttccat 5880
aaatccagcc ctacaaagga tagcagatgg aaaactccaa cacaggtagg aaaactacac 5940
cctagaaaga gcactaaagt aatcatcttt caacacactc aaaagaagat aaccacacaa 6000
acataattcc acctctaaca acaaaaataa agtaggcaac aatcactatt ccttaatatc 6060
tcttttaaca tcaatggact caattctcca ataaaaagac atagactaac agactgaata 6120
cataaacagg acacagcatt ttgctgcata aagcaaacac agcgttactt ttttttttct 6180
aaatgacatt ttttattaga tattgtcttt attgacattt caaatgttat ccccttttcct 6240
ggtttaccct ctgaaatccc ctatctcctc cccctccccc tgctcaccaa tccacccact 6300
cccacttcca ggccctggca atcccctata tttgggcata gagccttcac aggaccaagg 6360
tactctcctt gcattgatga ccaactagtc cattctctgc tacaaatgca gctagatcta 6420
tgagtcccac catgttttct tttgttggtg gtttcatgcc agggagctct tggagtactg 6480
attggttcat attgttgttc tccctatggg gttacaaaac ccttcaactt cttgggtcct 6540
ttctctggct gcctcattgg ggaccttgtg cgaagtccaa tggatgactg tgagcatcca 6600
cttctgtatt tgccaggcac tggcagagcc tctcagaaga cagctatatc aagatcctgg 6660
cagcaagctc ttgttggtat ccacaaaagt gtctggtggt tgtctatggg atggatcccc 6720
aaaggggcag tctctggatg gtcattcctt cagtctctgt tccacacttt gtctctttaa 6780
ctccttccat gactatttta ttcctccctc taagaaggac cgaagtattc atactttggt 6840
cttccttctt gaaattcatg tgttttgtga attgtatctt tgatattccg aacttctggg 6900
ctaatatcca cttatcagtg agtgaatatc atgtgtgttc ttatgtgatt gagttacctc 6960
actcaggatg atatcctcca gaaccatcca tttgtctaag aatttaatga attcattgtt 7020
tttaatagct gaggagtact ccattgtgta aatgtaccac attttctgta cccattgttc 7080
tcttgaggga catctgggtt ctttaaagct tctggacatt aaatataagg ctgctatgga 7140
aatagtggag aatgtgtcct tattacatgt tggagcatct tctgggtata tgcccaggag 7200
tgctattgct ggatcctctg atagtactat gtccaatttt ctgaggaact gccaaactga 7260
tttacagagt ggttgtacca gcttgcaatt ccaccagcaa tggagaaatg ttccccttcc 7320
tccacatcct caccaacatc tgctgtcacc tcaatttgtt cttagtgatt cagacaggtg 7380
tgaggtggaa tatcagggtt gtttggcatt tccctgatga ctagtgatat tgaaaaaaat 7440
tttaagtgtt tctcagccat tcagtattct tcagttgaga attcactgtt tagctctgta 7500
ctcaggtttt tttaataggg ttatttggtt ttctggagtc taacgtcttg aattctttct 7560
atatattgga tattagccct ctgtcatatt taggattggt aaagatcttt cccaatatgt 7620
tggctgcctt tttgtgtcct ttgccttaca gaaccttttt aattttatga ggtcccattt 7680
gctaattctt cattttacag cacaagccat tggtgttctg ttcaaaaatc tttccccctg 7740
aaccctatct tcgaggatct tccccacttt ctcctctata agtttcagtg tctctattat 7800
tgtgctgagg ggtaccgaag ttcctattcc gaagttccta ttctctagaa agtataggaa 7860
cttccctagg gtttaaaccc gcggtggagc tctgatgtgg gaacgcttca gtgttcagga 7920
accatatgat ttatttaaaa tatagaatca aaagtaccaa tttgcagttt tgaaagattt 7980
attccagtgt aagcattagc aatgcaccaa catcaggtga tttctgaatc caacacgtct 8040
tatgtcctca tgatattaaa aaaaaaaaaa ggccatccag aactgtgaac ttgagttcta 8100
ccttgttccc tactgacatt cagattttct tttttgcatt ctctttatct tacaggagac 8160
aggaggggag ggctaactca ttttactttg gcttgtccct tgctggtcct tgcccagaac 8220
gtaaagtagc ttgcaagtct tcaaatctaa aaatcttagt aactcctaca cgagtggcaa 8280
tgccaaagag cagtgcaaca aagaggaagt aaatacgacc aaagagtatt cttaaataca 8340
ccactggctc ttgtttttgt tttattgtgt gcctttgaac tggaggggac ccactgtcta 8400
tgctcccact tagtccctct tctttgcact ctggaggctt ccaaccaaaa tgacaatggc 8460
aattccgatg attgttacac actcctctaa aactgcattt ttctggggtg cagtcataac 8520
ccaaatgaga taaacttcca ctgcaagctc cttgatcaca gaacttactt ttggagcagg 8580
gggtaccatg tctcaccatt ccagcatctg ttgtttctgt cccacgatgt tcatcaagcc 8640
caaagcaggt aaacccagag ataatcgatt gatggaatga aacatgttct tgcaaatatg 8700

gaagattggt gacattggta cactgcaacc ttccacacag cttgtcctga tcagcacaag 8760
cattgaatgt gaggctttct tctgctctag tacaatgccc aaatcgaaac cgttgtttgt 8820
tgatgtcata gcacttaata ttagcattct tagcacttac accaaagatt tccatgcatt 8880
gtatgttgcg atcagtgcag ttacctttat agcagtaacc atcttctgag catggtgtcc 8940
catcttgcag ataagtgtca tctgggcaaa tgtatttagt cccattacag tactctggaa 9000
gatcacatat gttctggata ggtctgcaga gtgtcccaga aggactgtaa gtgcaatttg 9060
cacagcataa ttctttatca caaatgctac caggtgttaa cctgcaatca tttccacagc 9120
agggatctga ataacatgcc ttttgggagc cacagtcaca ctgctcatcg ttatctactt 9180
tgaagtttcc acaaaactta taagtcaatg atgtattata ataaacatga cggtcataga 9240
aaagacatgg catcagacca ggagtattaa gtatgttgct tatctctgca agggaacaat 9300
tgctgaaagc atctgttaat tgaggatgtc tgaacataat gcaggtgttc cttctctggc 9360
agacacagta cccctcatca tattttaagc ctaaactcct tccaacacga ttggttatta 9420
taggagataa aaataaagga tttcgatcat atttaccaat acaaattagg gctaaggaag 9480
aacatatact cctctcagct ggattaacct ggttatcttg tggcccatac ttattaagta 9540
aaactcctgc atcaggctta aatttattat aaaagactga cacatagtaa ttataagccg 9600
accctcctgg aactgcaaac tcaagtcgaa atggatcaga attggtgtac acagtcatga 9660
gaaagacata gtaccgcata tgaagattgg tcagataggt gtccattaaa ctaatgactt 9720
gaaacaaata cccaacagta gatgaaagtt tgtcacctgc agcagaatta tatacagaat 9780
tggttgcttg aaagtggcct tttatagcag ctggatgtgt agcgtagttc ttactagata 9840
ttctgggagc tccatctgca tattccaatc tggaggaggg agaacctgta ttatggctcc 9900
agtgcttcca tgcattcata ggccctgtgt catcagactc agatactatc tgagaaacaa 9960
ggtgttcaaa gctctgtgaa tcattgaggg gtttgatttc ataggtaagg tcatctaact 10020
tcatgacccc tgacaggccc ccataacaag tatccacagt gaccatggat tgtgggatcc 10080
cctccaggta gccaatatag taacaatcta caggaaaaaa ggggtaatcc atctgtaagg 10140
ctccttggtc atcttgagtt gtcagcaaca agtgtctggg ccaaatgagt gtctttctcc 10200
gcaggtggat gatatgtctc tggccccgaa aatgcaagct atatgagagc agtctttgtg 10260
cttgaagtcc tttggtatgg tagatctcct tccgaggaat aaccacctcc gatgagatgt 10320
aacgccaagt aggatggcct tgagaacacc agactggaac caggaggagc agccagagtg 10380
caaatagcaa gaggaggacc ctggggacca caggtctttc cactagcctc atgccccagg 10440
tcagagataa catcctgggt ggagctaaat ccctctgctg tggccactgc ctggtctaga 10500
aaatactgac agaggactaa aaacctcctc aggctcccaa cctaagtggt tacccagaca 10560
actggagtta ggtaacagtc actgggtgtg gcaggaattg agtctgaatg tgttagctga 10620
ggttgaggtt aaatattgtc aaaagggatg tctataaatg tgcctggaca agaaaagtca 10680
gaagcagcaa ggagtgtctc tgacaggctc aatcctttct tttctttttt tgaagttcaa 10740
aatatcattt ccacgtgaat gtatttggtt cccagtgtga ctctgggtct ctttctagga 10800
gtcaatattt ctttatatct tggctcatgt ttctcacagt tgttctaatt tcttgttttg 10860
ttttgtttgt ttgtttgaac gttagtagta aatactgtct atattagcct tttagctata 10920
aatgattgtt tttatttctt ctaatcatat tttgtttgag ttttggttaa actatttaca 10980
aatgagtttt tttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag tttggagctt tctgttaata 11040
ttgtgttgtt atttttccaa tattattaga cctgagaatt ctatctgggt acctgtgaac 11100
tctagaattt ttaaaaattc catctcttgg gaacattacc tctgaccccg tctgaggccg 11160
aagtggctgt ccccctccaa cctttagtat ctttctttcc tgactattgg gatttcttca 11220
agcaatcagg ctgatgggtt ctcagcagtg agaccagtag actgccggta tgaacgtcga 11280
agagactgcc acacactcca ggttcatcaa cagtgctttc gcgtctctta cttttgtaga 11340
aggaaaagca gcctctgagt tatctccaag aaatcattaa tgaaagagtt aaaagatggg 11400
tatcacccgg agttcatgac aagccctggc tcagacacgt gagcaaggtc tacagcccca 11460
aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagatagaag aaaaaaatgg gtggttggag 11520
ggttgatcaa cttacttcct ctcaaacata tatatctcat ctaagtgtgc aggggaaaac 11580
tctgtaggac tactgggatt gttattatca ttattattat tattattatt attattatta 11640
ttattattat tattaactta aggcatttta ttagatattt tcttcattta gttttcaaat 11700
gttatccccg gaacctccta tactctctcc ctgccctgct ccccaaccca cccactccta 11760
catcctggcc ctggcattcc cctatactgt ggcagatgat cttcgtaaga ccaagagcct 11820
ttcctcccat tgatggccta ctaggctatc ctcttttaca tatgcaacta gagtcacagc 11880
tctggggagg tattgcttag ttcatattgt ttttcctcct atagggttgc agatcccttt 11940
agctccttgg gtactttctc tagctcctcc attgggggcc ctgtgttcca tccaatagat 12000
gactgtgagc atccacttct gtatttgcca ggtattggca tggatcttac tgcaccttct 12060
gaactctcta agcagctttc ctggtcacct ccaggagcct catgaataag tctctgcttc 12120
ccccttgtgg ctatgagcat tactgcacct gatacaccct gcagcttcct agggaagagg 12180
gaggaagtgg cttggcccct gtctggttaa ggtaagagga gataaatccc ttctcatgaa 12240
ttagggtgag aagggtcatg tgctctatca ttggtgacca acttggggac atgggcttat 12300
acagtcatca ctctgaggct ctgtgtacca ccagactgaa ctcccatatc ctacatgcac 12360
ataggacaac accaagtaga aggaggtttt aggactaaac tgaaggacag agatggggtt 12420
tctaaacaac tagggagtgc cagggccagc ctctctaacc actataggac actatggagt 12480
ctggttacaa agagagatta ctcaaggtcc ttagcactga ttacagagca tatctcagat 12540
gccttctgct 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 gggtcccaat acctcttata acccaagcac atggtttcag atatcacaat 12900
gcggttggga tatagataac tgtaaatact tgtgaaaata atggggctga gatctggggt 12960
tttcatgata gtttcaaagt cactgtactg actaaaacct tccactggcc catctccagc 13020
ttgttaatct gagggtatca aatttcccac taagtgtgtt tagaaagatc tccacctttt 13080
tgccctagtc ttccagtgcc ccacctacgt tctggtctcc cacatctgat gtcttctcag 13140
tgattctggc cctgcctgct ccacagctac aaaccccttc ctataatgag ctctgtgctg 13200
agccatcatc ctgaatcaat ccaccttaag cagatgtttt gcttattttt cctgtgtcca 13260
tactacagag gaagggtagg catgtagaag ctgaggcatc tcatctcact ctaagcaccc 13320
tcagtctcta aatgtgcccc tttgtttcca gcagttcagc ctcaagcatc ttttattcac 13380
tcgtcttaga gggacacatg tgctgtagtg ttataagatg aaatttaaag cattagttat 13440
tcccaacaag ccaattaaac aagccaaaaa cattcatcag tcattcccat ggaacctctg 13500
aagcatcttc ctgctctaac cttgagtttc ctagggctgc tgtgggatca caggagctgt 13560
cctgtttacc agcctatcct gtcccacggg attcagttat tagtgggtgc gaggggacc 13620
gcaaacctgg aagaaaatgg gattggaaga gaaaagagaa acgaagacca agtagatctt 13680
ttcctatcaa ggtcttcgtt tattaggctg aggtgcctgg tgtaaagcat gcatcgcggg 13740
gaataggaag gggtcgaggg ggaattttac aaagaacaaa gaagcgggca tctgctgaca 13800
tgagggccga agtcaggctc caggcagcgg gagctccacc gcggtggcgc catttcatta 13860
cctctttctc cgcacccgac atagataaag ctta 13894

<210> 4
<211> 251
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 4

ccagcttcat tagtaatcgt tcatctgtgg taaaaaggca ggatttgaag cgatggaaga 60
tgggagtacg gggcgttgga agacaaagtg ccacacagcg cagccttcgt ctagaccccc 120
gggctaacta taacggtcct aaggtagcga ggggatgaca gattctctgt tcagtgcact 180
cagggtctgc ctccacgaga atcaccatgc cctttctcaa gactgtgttc tgtgcagtgc 240
cctgtcagtg g 251

<210> 5
<211> 245
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 5

aggggtcgag ggggaatttt acaaagaaca aagaagcggg catctgctga catgagggcc 60
gaagtcaggc tccaggcagc gggagctcca ccgcggtggc gccatttcat tacctctttc 120
tccgcacccg acatagataa agcttatccc ccaccaagca aatcccccta cctggggccg 180
agcttcccgt atgtgggaaa atgaatccct gaggtcgatt gctgcatgca atgaaattca 240
actag 245

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 6
caggtacagc tgcagcagtc a 21

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 7
ggagatggca caggtgagtg a 21

<210> 8
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 8
tccaggactg gtgaagc 17

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

<220>
<223> sintética

<400> 9
tagtcccagt gatgagaaag agat 24

<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 10
gagaacacag aagtggatga gate 24

<210> 11
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 11
tgagtccagt ccaggga 17

<210> 12
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 12
aaaaattgag tgtgaatgga taagagtg 28

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 13
aaccctggtc agaaactgcc a 21

<210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 14
agagaaacag tggatacgt 19

<210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 15
aactacgcac agaagttcca gg 22

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 16
gctcgtggat ttgtccgc 18

<210> 17
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 17
cagagtcacg attacc 16

<210> 18
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 18
tgagcagcac cctcacgtt 19

<210> 19
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 19
gtggcctcac aggtatagct gtt 23

<210> 20
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 20
accaaggacg agtatgaa 18

<210> 21
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 21
gctagtagtg gggcctacag gccttttgat ate 33

<210> 22
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 22
gcaaaagccc aggggagtgg gagctactac acctatgctt ttgatatc 48

<210> 23
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 23
gegagagagg gtatagtggg aactactgag gaetttgatt ac 42

<210> 24
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 24
gcgagaggga cagtgggagc cctctttgac tac 33

<210> 25
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 25
gcgaaaccta gtgggagcta ctcctggttc gacccc 36

<210> 26
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 26
gcgagaggag gagggtataa ctggaactcg aatgcttttg atatc 45

<210> 27
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 27
gcgagaggat ataactggaa ctactttgac tac 33

<210> 28
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 28
gcgaaagagt ataactggaa ccactggtac tttgactac 39

<210> 29
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 29
gcgagagaga taactggaac ccccttgac tac 33

<210> 30
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 30
gcgaggggat ataactggaa cttttctttt tttgactac39

<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

<220>
<223> sintética

<400> 32
gcgaaaaggg ctactatggt tcggggagct cttgactac 39

<210> 33
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 33
gcgagagata ttactatggt tcggggagtt attataacga aggtctacgg tatggacgtc 60

<210> 34
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 34
gcgagagagt atagcagctt tgactac 27

<210> 35
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 35
gcgagagaga gtatagcagc tcgttgtgac tac 33

<210> 36
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 36
gcaagagagg ataggagctc gcccctcggg tactttgact ac 42

<210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 37
gcgagagatc ttggggaagg ctac 24

<210> 38
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 38
accacccata actggggagg gtttgactac 30

<210> 39
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 39
gcgagagata ggggaccg 18

<210> 40
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 40
caacagagtt atagtacccc tccggagacg 30

<210> 41
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 41
caacagctta atagttaccc tcggacg 27

<210> 42
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 42
caacagctta atagttacca ttcact 26

<210> 43
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 43
caacatttta atagttaccc gctcact 27

<210> 44
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 44
cagcagtata ataactggcc tctcact 27

<210> 45
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 45
ctacagcata atagttaccc gtggacg 27

<210> 46
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 46
ctacagcata atagttaccc tcggacg 27

<210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 47
cagcagtatg gtagctcacc tcggacg 27

<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

<220>
<223> sintética

<400> 49
atgcaaggtt cacactggcc gtacact 27

<210> 50
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 50
atgcaaggta cacactggcc gctcact 27

<210> 51
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 51
caacagtatg ataatctccc tcccact 27

<210> 52
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 52
caacagtatg ataatctccc attcact 27

<210> 53
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 53
caacagtatg ataatctccc cgtcact 27

<210> 54
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 54
caacagtatg ataatctccc gatcacc 27

<210> 55
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 55
caacggattt acaatgccga cacc 24

<210> 56
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 56
caacagagtt acagtacccc catgtacact 30

<210> 57
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 57
caacagagtt acagtacccc tctcact 27

<210> 58
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 58
caacagagtt acagtactcc tcccact 27

REIVINDICACIONES

1. Un ratón que expresa anticuerpos, en el que cada cadena pesada en los anticuerpos expresados comprende una región variable humana y una región constante de ratón, en donde el ratón expresa también:

(i) una proteína ADAM6a de ratón o un ortólogo o unhomólogo de la misma que es funcional en un ratón macho; y
(ii) una proteína ADAM6b de ratón o un ortólogo o un homólogo de la misma que es funcional en un ratón macho,

en donde las proteínas ADAM6a y ADAM6b o los ortólogos o los homólogos de las mismas se expresan a partir de una secuencia de ácido nucleico integrada que está presente dentro del locus endógeno de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón que comprende al menos un segmento V_H humano, al menos un segmento D_H humano y al menos un segmento J_H humano,
en donde el ratón carece de un gen Adam6 endógeno funcional.

2. El ratón de la reivindicación 1, en el que los anticuerpos producidos por el ratón carecen de una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón.

3. El ratón de la reivindicación 1, en donde el ratón tiene un genoma que comprende una deleción de uno o más segmentos de la región variable de la inmunoglobulina de ratón y la inserción de los segmentos de la región variable de la inmunoglobulina humana, y en donde el ratón carece de un locus de ADAM6 endógeno de ratón funcional.

4. El ratón de la reivindicación 3, en el que los segmentos D_H y J_H de ratón y al menos 3, al menos 10, al menos 20, al menos 40, al menos 60, o al menos 80 segmentos de V_H del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón están sustituidos por segmentos de la región variable de la inmunoglobulina humana.

5. El ratón de la reivindicación 3, en el que todos los segmentos D_H, J_H y V_H de ratón del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón están sustituidos por segmentos de la región variable de la inmunoglobulina humana.

6. El ratón de la reivindicación 5, en el que dicha secuencia de ácido nucleico integrada está presente:

(a) inmediatamente adyacente al extremo 3' de los segmentos V_H humanos;
(b) entre dos segmentos V_H humanos; o
(c) entre dos segmentos V_H en aproximadamente 20 kb hasta aproximadamente 40 kb del extremo 3' de los segmentos V_H humanos insertados.

7. El ratón de la reivindicación 5, en el que la sustitución incluye segmentos V_H humanos V_H1-2 y V_H6-1 y dicha secuencia de ácido nucleico integrada está presente corriente abajo del segmento V_H1-2 y corriente arriba del segmento V_H6-1.

8. Una célula aislada o un tejido aislado de un ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

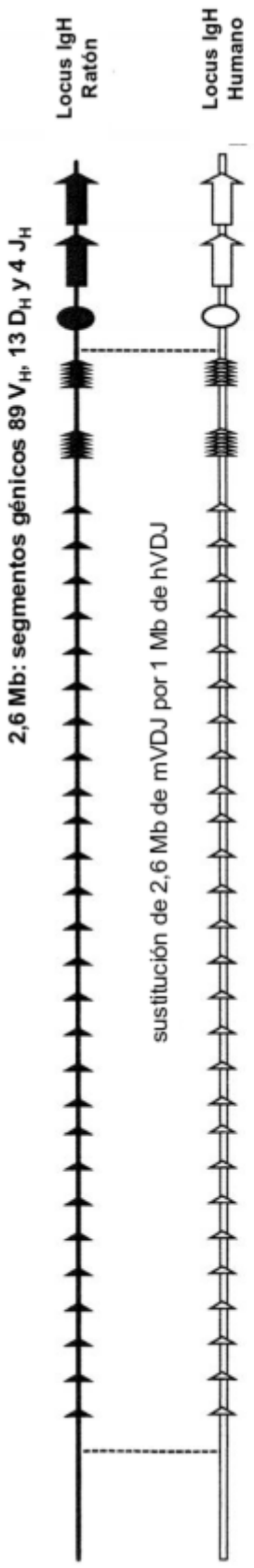
Locus IgH Ratón
Locus IgH Humano
2,6 Mb: segmentos génicos 89 V_H, 13 D_H y 4 J_H
sustitución de 2,6 Mb de mVDJ por 1 Mb de hVDJ

FIG. 1A

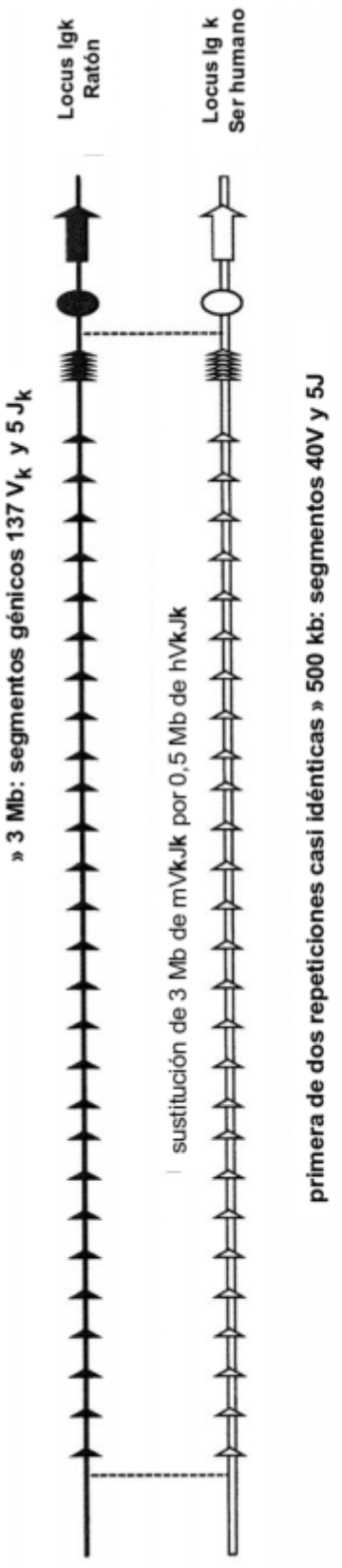
Locus Igk
Ratón
Locus Ig k
Ser humano
» 3 Mb: segmentos génicos 137 V_k y 5 J_k
sustitución de 3 Mb de mVkJk por 0,5 Mb de hVkJk
primera de dos repeticiones casi idénticas » 500 kb: segmentos 40V y 5J

FIG. 1B

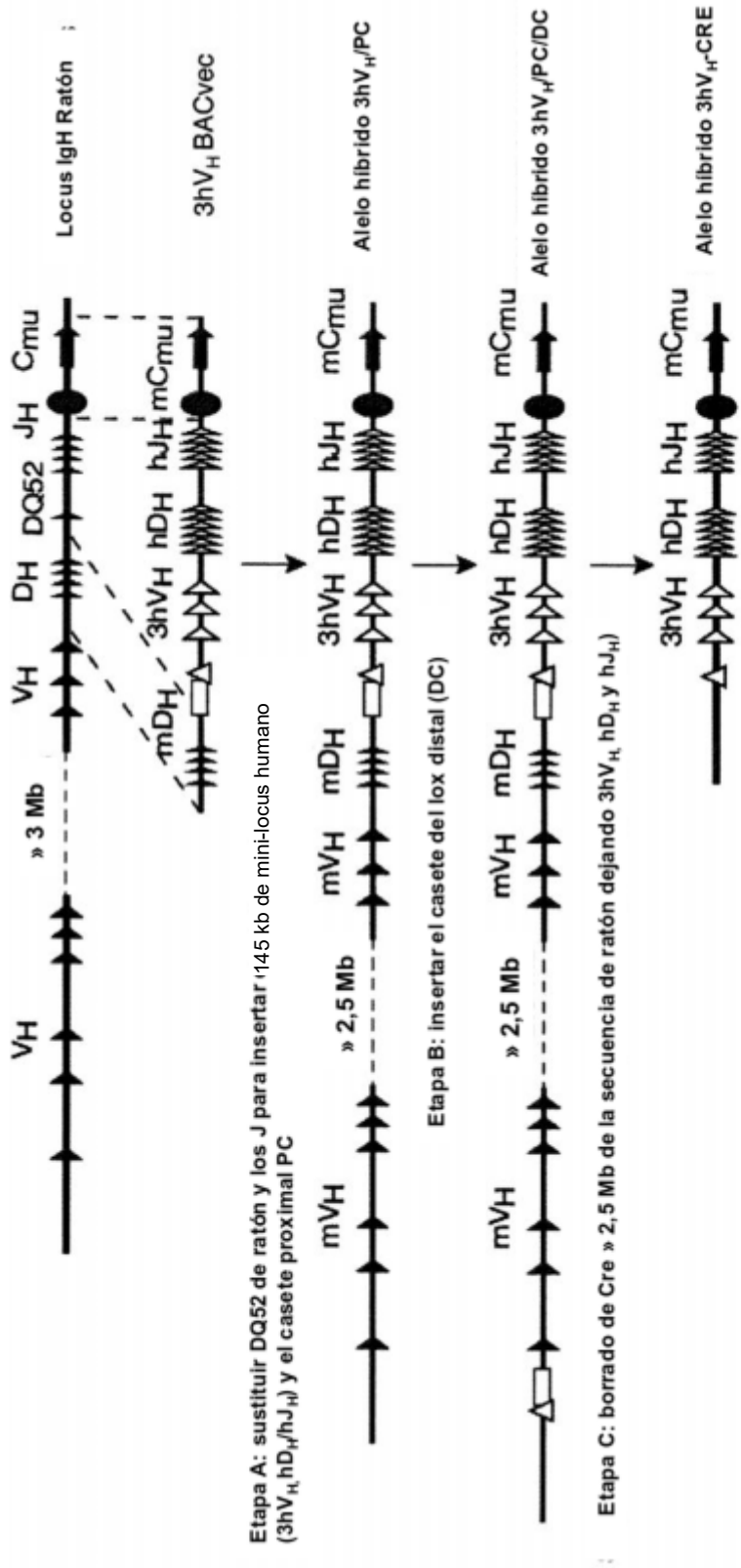
Locus IgH Ratón
» 3 Mb
VH
DH
DQ52
JH
Cmu
3hVH hDH hJH mCmu
3hVH BACvec
Etapa A: sustituir DQ52 de ratón y los J para insertar ~145 kb de mini-locus humano (3hVH, hDH/hJH) y el casete proximal PC
mVH
» 2,5 Mb
mDH
Alelo híbrido 3hVH/PC
Etapa B: insertar el casete del lox distal (DC)
Alelo híbrido 3hVH/PC/DC
Etapa C: borrado de Cre » 2,5 Mb de la secuencia de ratón dejando 3hVH, hDH y hJH)
Alelo híbrido 3hVH-CRE

FIG. 2A

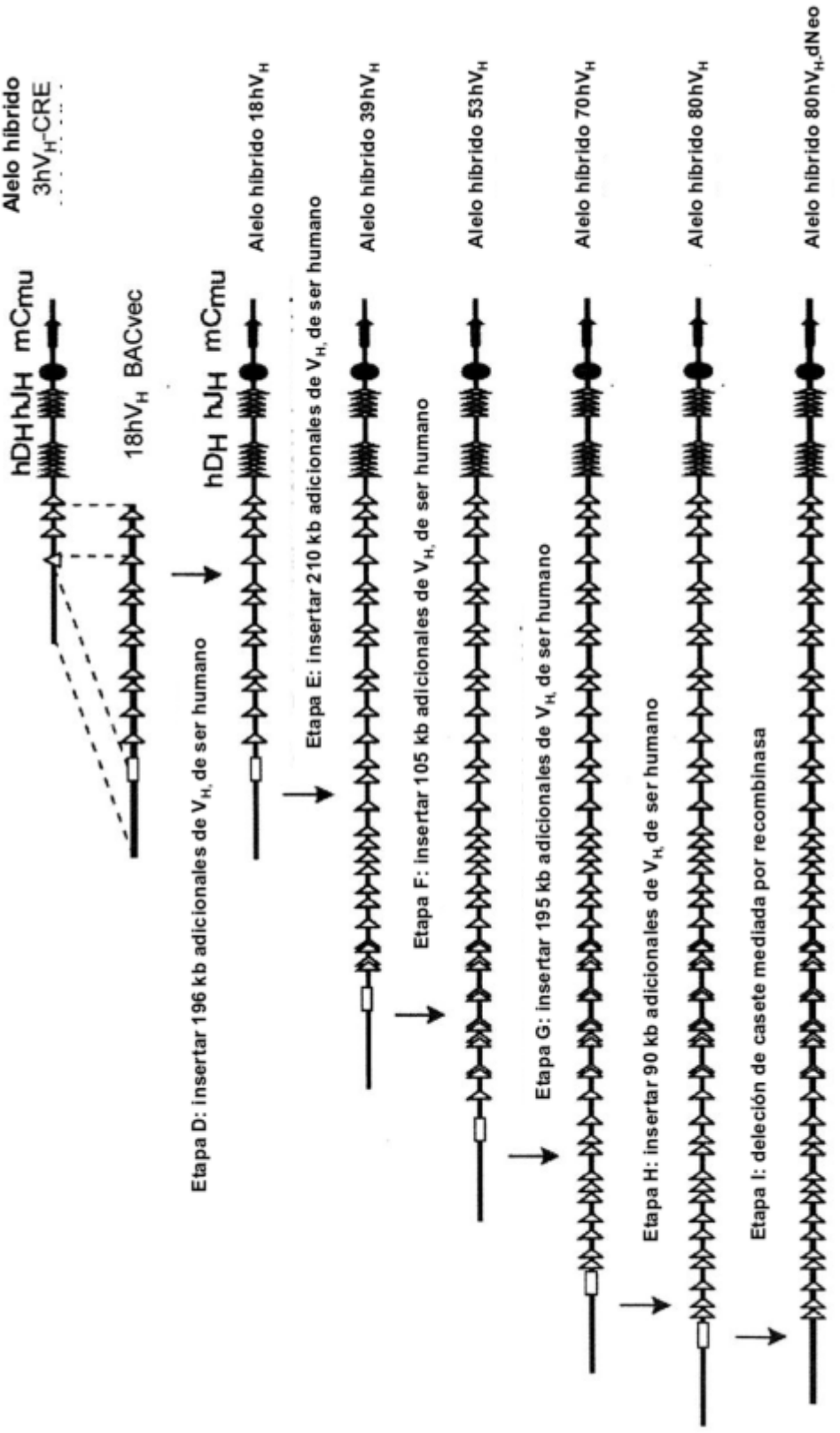
Alelo híbrido
3hV$_H$-CRE
hDH hJH mCmu
18hV$_H$ BACvec
Etapa D: insertar 196 kb adicionales de V$_H$ de ser humano
hDH hJH mCmu
Alelo híbrido 18hV$_H$
Etapa E: insertar 210 kb adicionales de V$_H$ de ser humano
Alelo híbrido 39hV$_H$
Etapa F: insertar 105 kb adicionales de V$_H$ de ser humano
Alelo híbrido 53hV$_H$
Etapa G: insertar 195 kb adicionales de V$_H$ de ser humano
Alelo híbrido 70hV$_H$
Etapa H: insertar 90 kb adicionales de V$_H$ de ser humano
Alelo híbrido 80hV$_H$
Etapa I: deleción de casete mediada por recombinasa
Alelo híbrido 80hV$_H$-dNeo

FIG. 2B

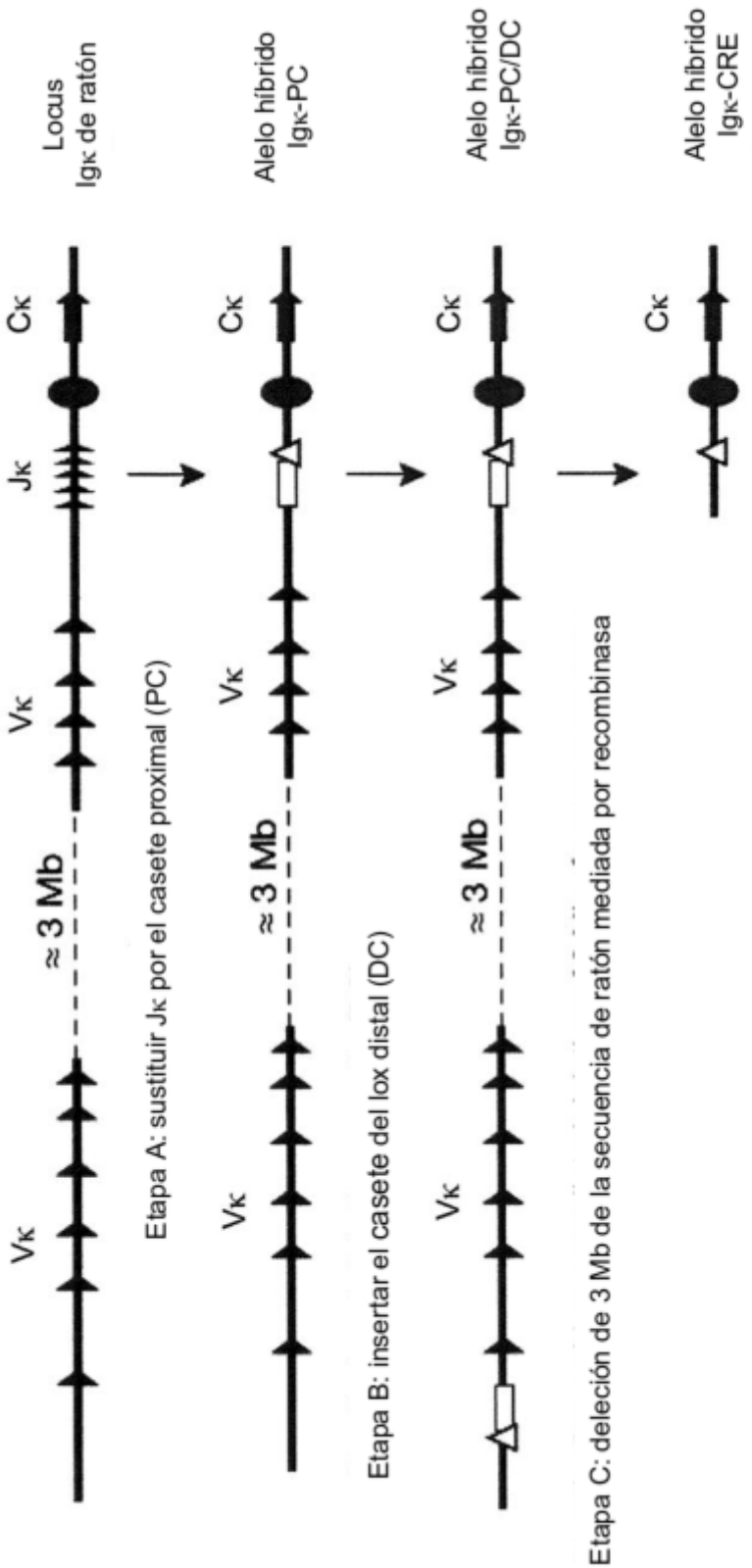
Locus
Igκ de ratón
Vκ
≈ 3 Mb
Vκ
Jκ
Cκ
Etapa A: sustituir Jκ por el casete proximal (PC)
Alelo híbrido
Igκ-PC
Vκ
≈ 3 Mb
Vκ
Cκ
Etapa B: insertar el casete del lox distal (DC)
Alelo híbrido
Igκ-PC/DC
Vκ
≈ 3 Mb
Vκ
Cκ
Etapa C: deleción de 3 Mb de la secuencia de ratón mediada por recombinasa
Alelo híbrido
Igκ-CRE
Cκ

FIG. 2C

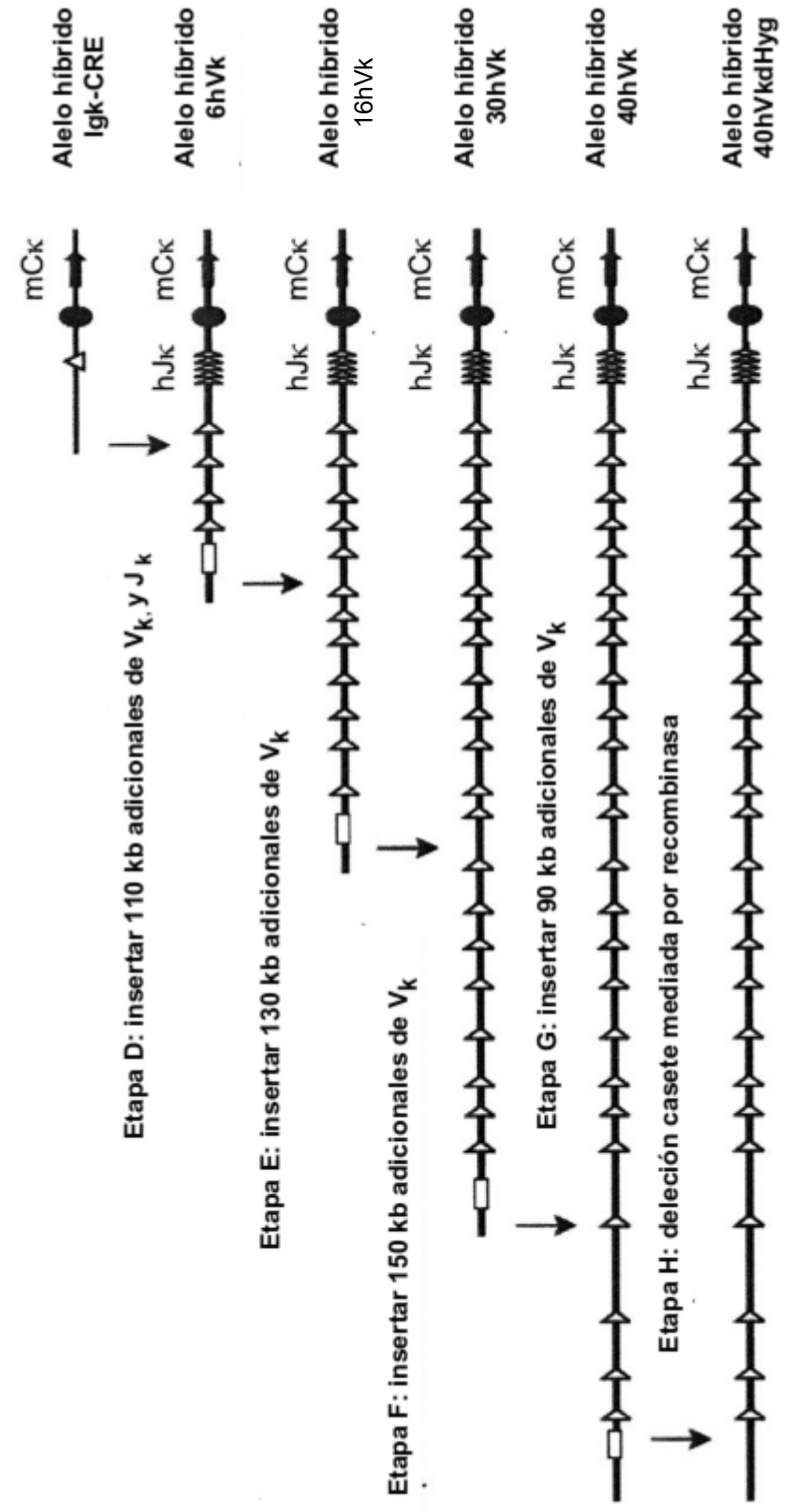
Alelo híbrido Igk-CRE
Alelo híbrido 6hVk
Alelo híbrido 16hVk
Alelo híbrido 30hVk
Alelo híbrido 40hVk
Alelo híbrido 40hVkdHyg
mCκ
hJκ
Etapa D: insertar 110 kb adicionales de Vκ, y Jκ
Etapa E: insertar 130 kb adicionales de Vκ
Etapa F: insertar 150 kb adicionales de Vκ
Etapa G: insertar 90 kb adicionales de Vκ
Etapa H: deleción casete mediada por recombinasa

FIG. 2D

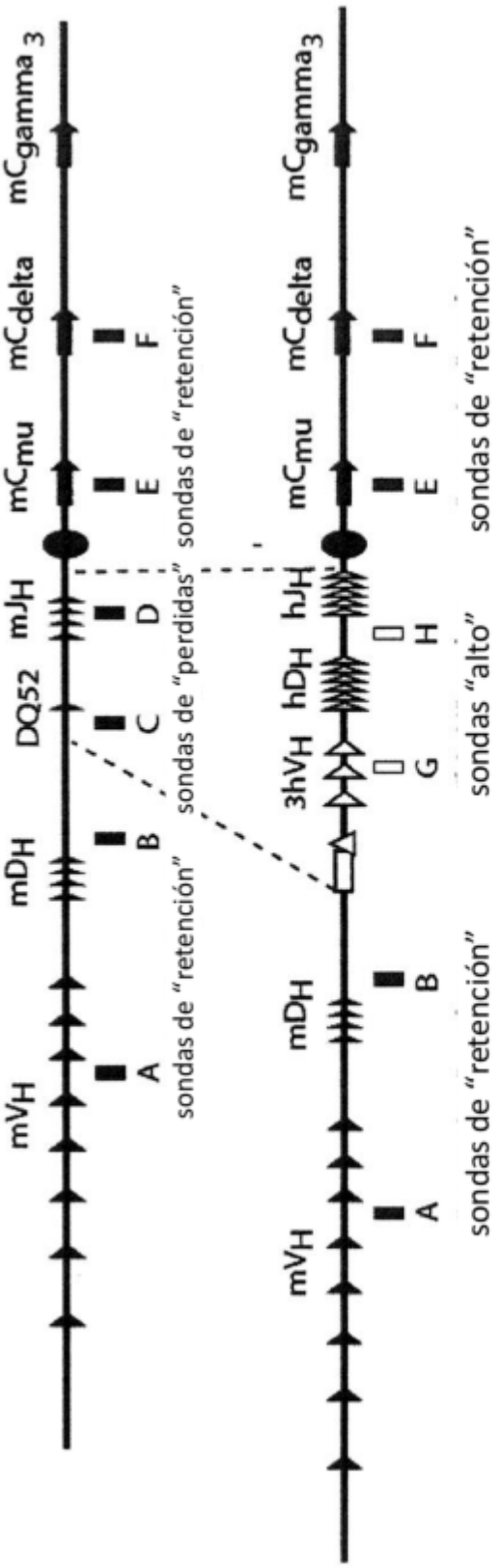
mVH
mDH
DQ52
mJH
mCmu
mCdelta
mCgamma 3
A
B
C
D
E
F
sondas de "retención"
sondas de "perdidas"
sondas de "retención"
mVH
mDH
3hVH
hDH
hJH
mCmu
mCdelta
mCgamma3
A
B
G
H
E
F
sondas de "retención"
sondas "alto"
sondas de "retención"

FIG. 3A

		A	B	C	D	E	F	G	H
ES parenteral	Número de copia teórico	2	2	2	2	2	2	0	0
	Número de copia observado	1,9	1,8	2,1	1,8	1,9	1,8	<0,01	<0,04
ES modificado	Número de copia teórico	2	2	1	1	2	2	1	1
	Número de copia observado	1,9	2,4	1,0	1,0	2,0	1,9	+	+

FIG. 3B

	núm. 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

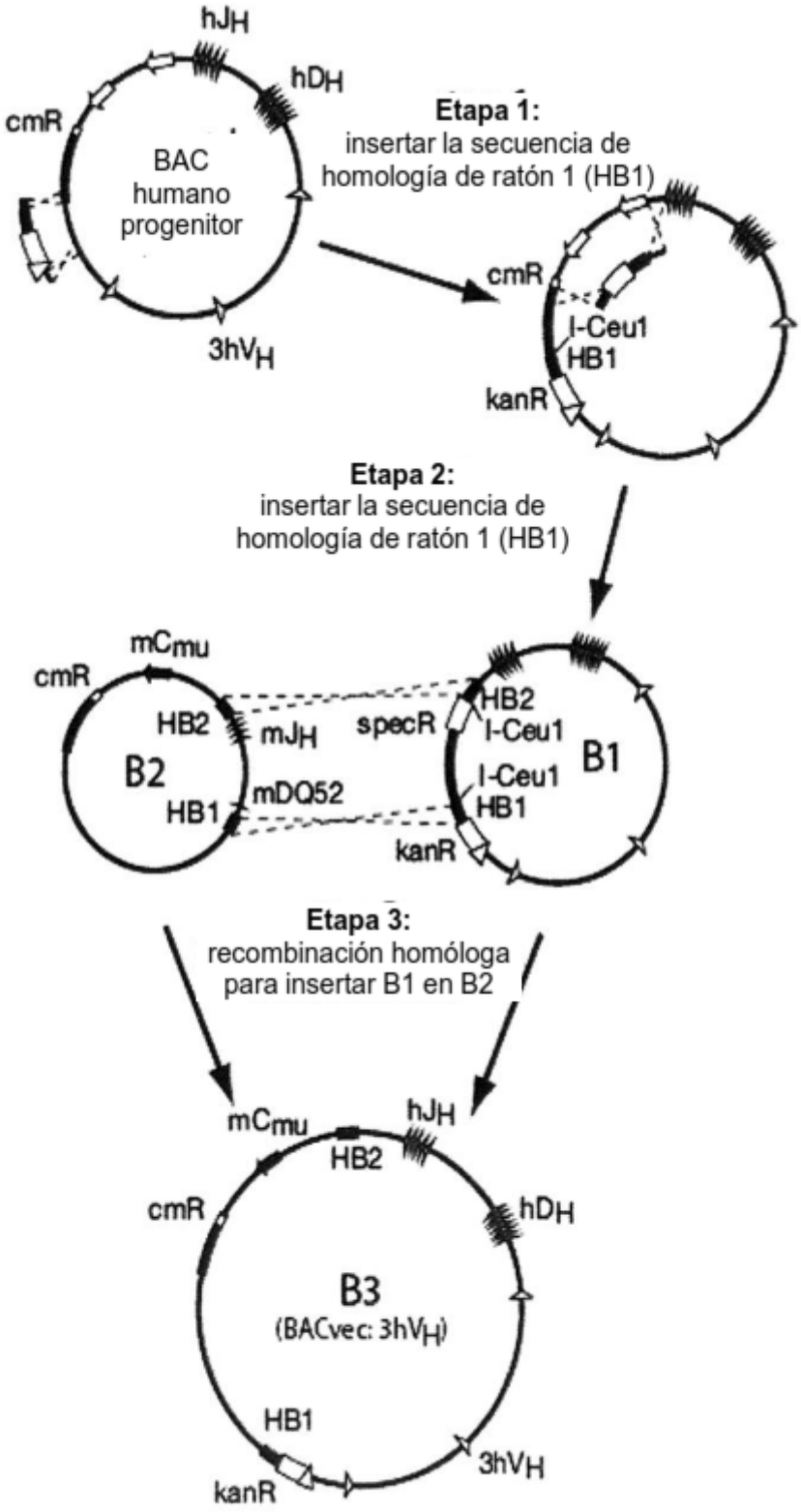
hJH
hDH
cmR
BAC
humano
progenitor
3hVH
Etapa 1:
insertar la secuencia de
homología de ratón 1 (HB1)
cmR
I-Ceu1
HB1
kanR
Etapa 2:
insertar la secuencia de
homología de ratón 1 (HB1)
mCmu
cmR
HB2
mJH
B2
HB1
mDQ52
specR
HB2
I-Ceu1
B1
I-Ceu1
HB1
kanR
Etapa 3:
recombinación homóloga
para insertar B1 en B2
mCmu
hJH
HB2
cmR
hDH
B3
(BACvec: 3hVH)
HB1
kanR
3hVH

FIG. 4A

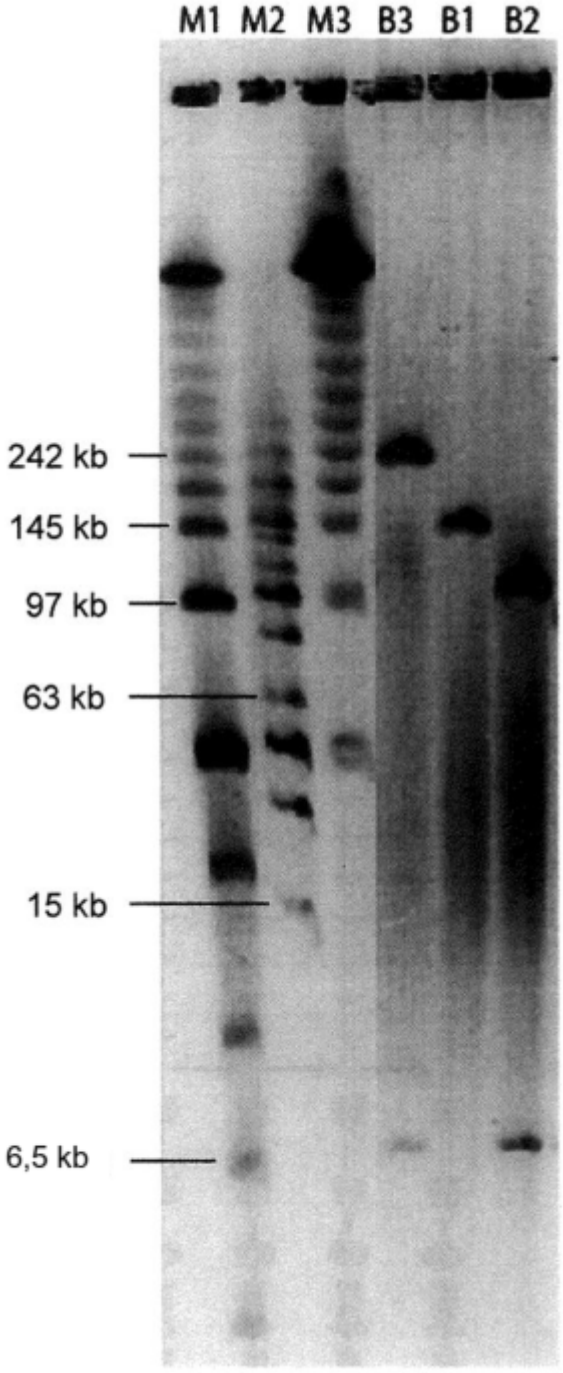

FIG. 4B

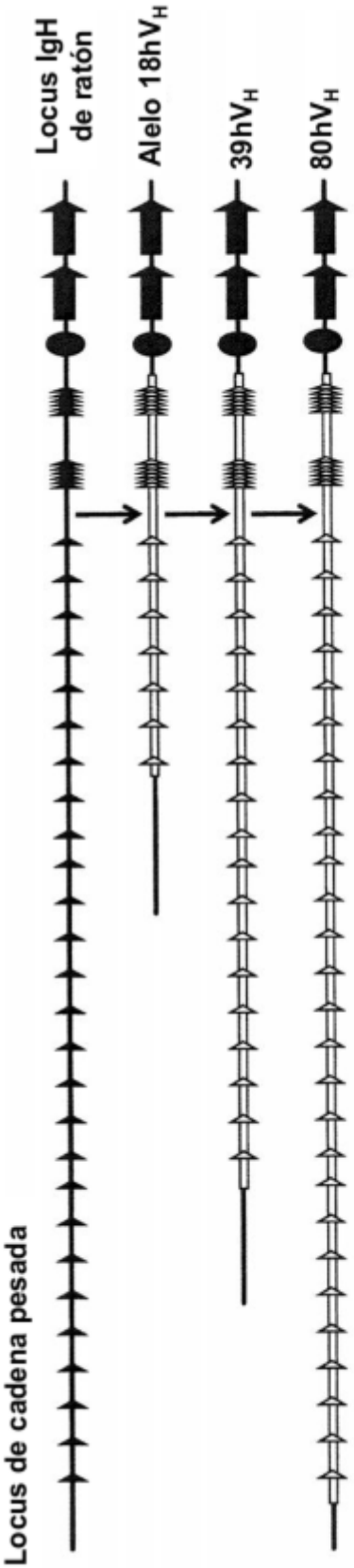
Locus de cadena pesada
Locus IgH de ratón
Alelo 18hV$_H$
39hV$_H$
80hV$_H$

FIG. 5A

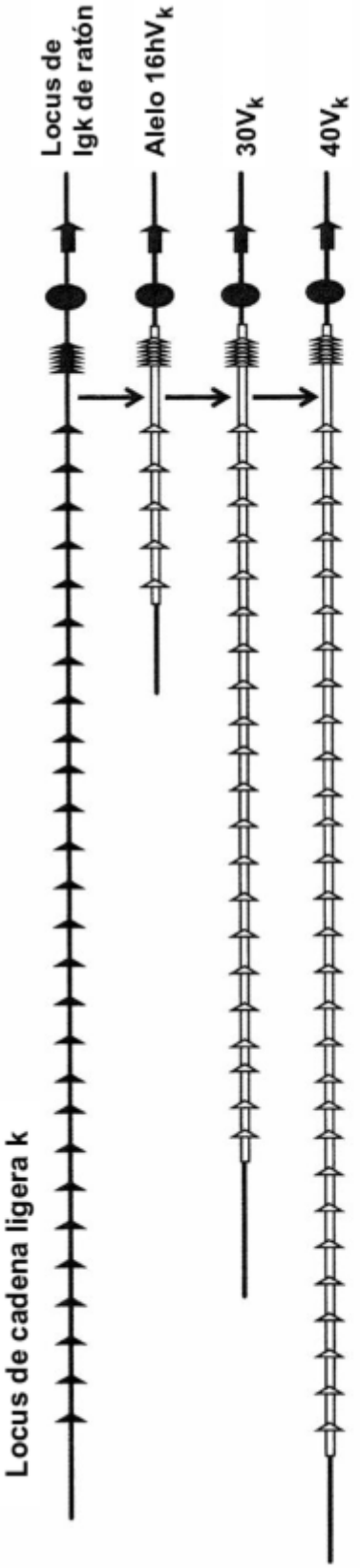
Locus de cadena ligera k
Locus de Igk de ratón
Alelo 16hV$_k$
30V$_k$
40V$_k$

FIG. 5B

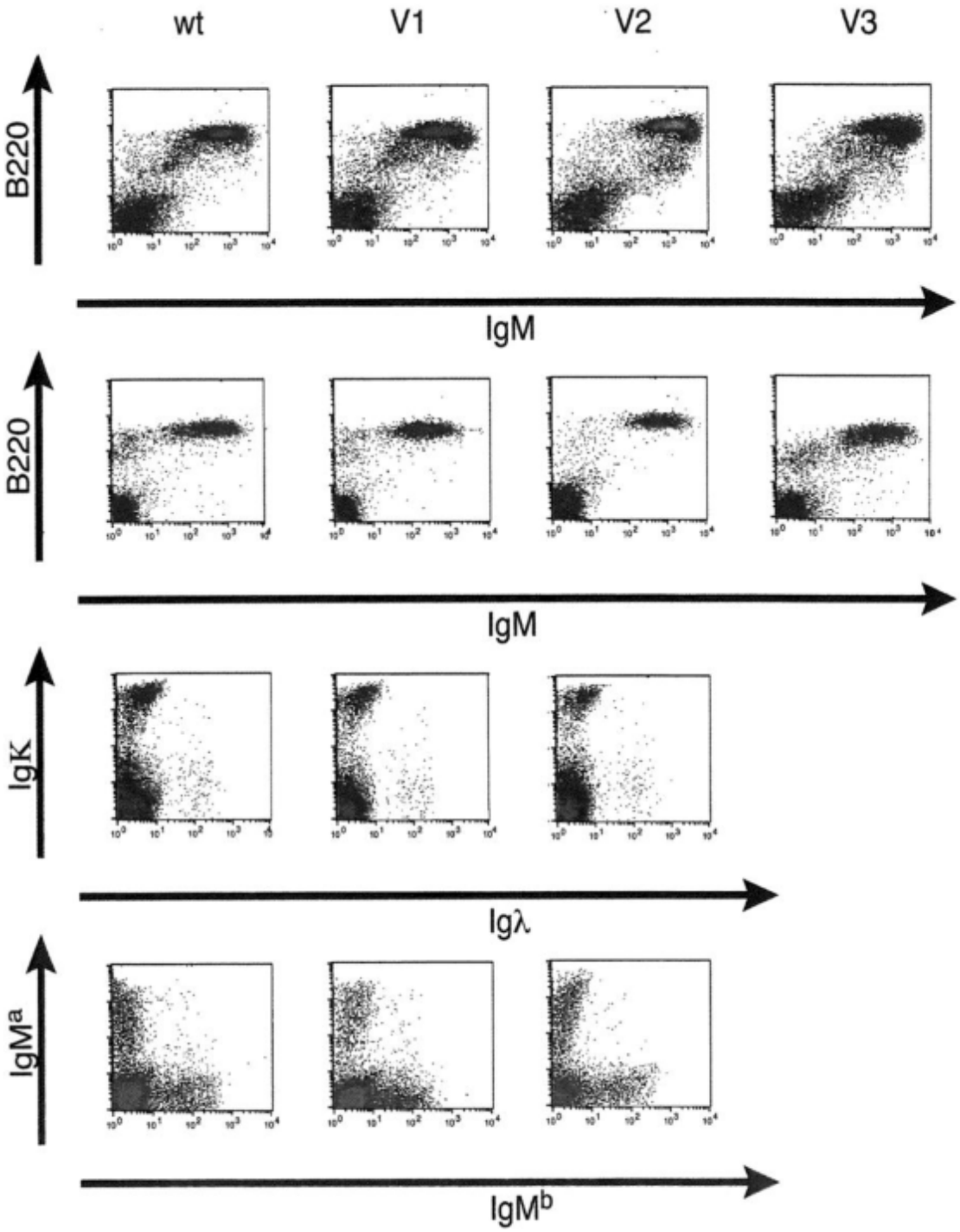

FIG. 6

3'V_H	N	D_H	N	5' J_H
		(D_H 1-26) **GGTATAGTGGGAGCTACTAC**		
(3-72) GCTAG		TAGTGGGgcCTAC	AGGC	CTTTTGATATC(3)
(3-9) GCAAAAG	CCCAGGGG	AGTGGGAGCTACTAC	ACCT	ATGCTTTTGATATC(3)
(3-7) GCGAGAGA	G	GGTATAGTGGGAaCTACT	GAGG	ACTTTGAtTAC(4)
(4-59) GCGAGAG	GGAC	AGTGGGAGC	CCT	CTTTGACTAC(4)
(3-23) GCGAAA	CC	TAGTGGGAGCTACT	C	CTGGTTCGACCCC(5)
		(D_H 1-7) **GGTATAACTGGAACTAC**		
(4-34) GCGAGAGG	AGGAG	GGTATAACTGGAACT	CGA	ATGCTTTTGATATC(3)
(1-2) GCGAGAG	GA	TATAACTGGA		ACTACTTTGACTAC(4)
(3-23) GCGAAAGA		GTATAACTGGAACcAC	TGG	TACTTTGACTAC(4)
(3-7) GCGAGAGA	G	ATAACTGGAAC	CCC	CTTTGACTAC(4)
(4-59) GCGAG	GGGA	TATAACTGGAACT	TTTCTTTT	TTTGACTAC(4)
(4-39) GCGAGA	GG	TAACTGGAACT	CTCTGGG	CTTTGACTAC(4)
	(D_H 3-10)	**GTATTACTATGGTTCGGGGAGTTATTATAAC**		
(3-30) GCGA	AAAGGGC	TACTATGGTTCGGGGAG	CTC	TTGACTAC(4)
(1-2) GCGAGAGA		TATTACTATGGTTCGGGGAGTTATTATAAC	GAAGGT	CTACGGTATGGACGTC(6)
		(D_H 6-6) **GAGTATAGCAGCTCGTCC**		
(1-2) GCGAGAGA		GTATAGCAG		CTTTGACTAC(4)
(3-48) GCGAGA	GA	GAGTATAGCAGCTCGT	TG	TGACTAC(4)
(3-13) GCAAGAGA	GG	ATAGgAGCTCGcCC	CTCGGG	TACTTTGACTAC(4)
		(D_H 7-27) **CTAACTGGGGA**		
(3-7) GCGAGAGA	TCT	TGGGGA	AGG	CTAC(4)
(3-15) ACCAC	CCA	TAACTGGGGA	GGG	TTTGACTAC(4)
(3-48) GCGAGA	GATA	GGGGA		CCg(5)

FIG. 7A

	3'Vκ	N	5' Jκ
(1-6)	CAACAGAGTTAtAGTACCCCTCC	GGA	GACG(1)
(1-9)	CAACAGCTTAATAGTTACCCTC		GGACG(1)
(1-9)	CAACAGCTTAATAGTTACC		ATTCACT(3)
(1-9)	CAACAttTTAATAGTTACCC		GCTCACT(4)
(3-15)	CAGCAGTATAATAACTGGCCTC		TCACT(4)
(1-17)	CTACAGCATAATAGTTACCC		GTGGACG(1)
(1-17)	CTACAGCATAATAGTTACCCTC		GGACG(1)
(3-20)	CAGCAGTATGGTAGCTCACCTC		GGACG(1)
(2-30)	ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGACG(1)
(2-30)	ATGCAAGGTtCACACTGGCC		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)	CAACAGAGTTACAGTACCCC	CA	TGTACACT(2)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACCCCTC		TCACT(4)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACtCCTCC		CACT(4)

FIG. 7B

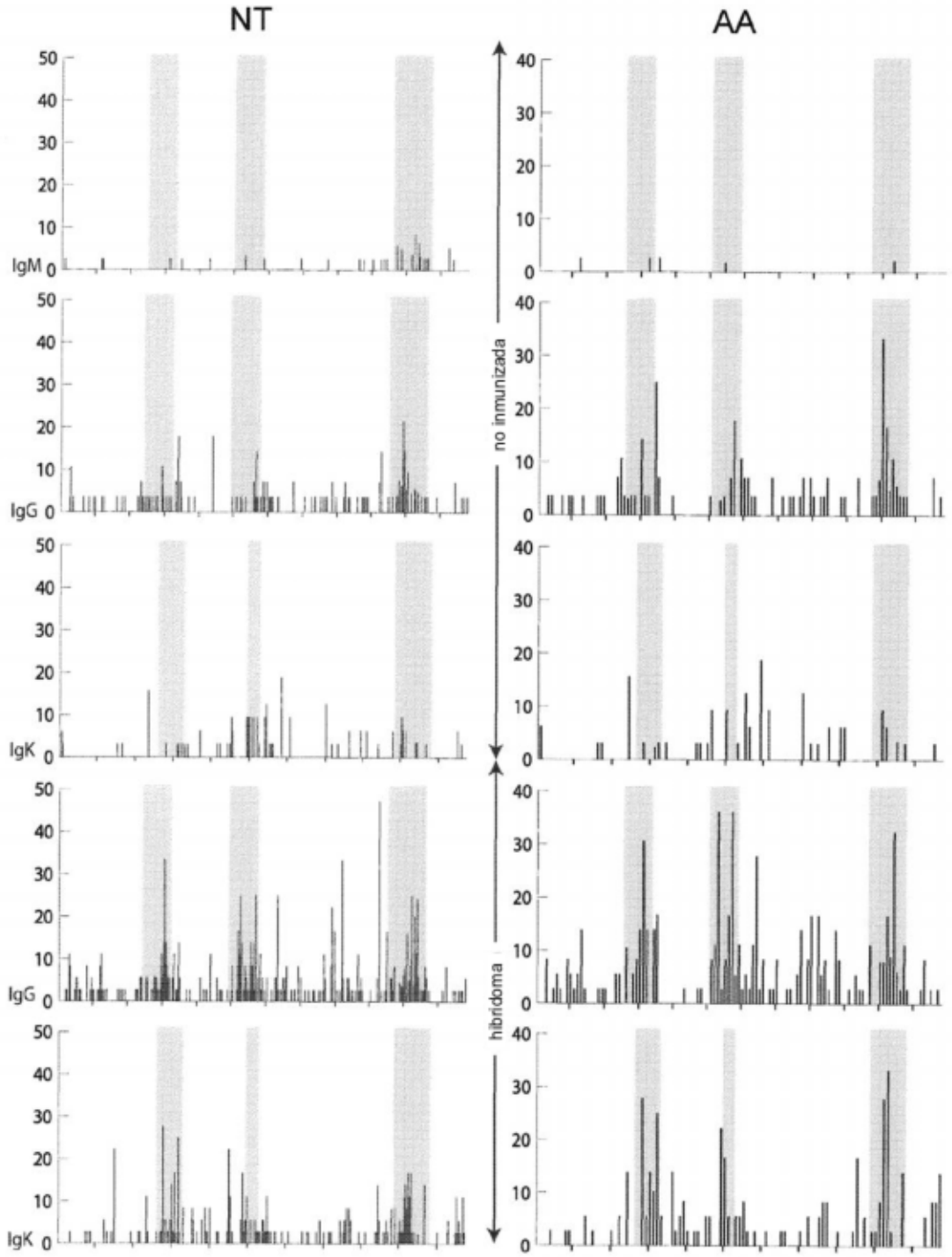
NT
AA
IgM
IgG
IgK
IgG
IgK
no inmunizada
hibridoma
0
10
20
30
40
50

FIG. 8

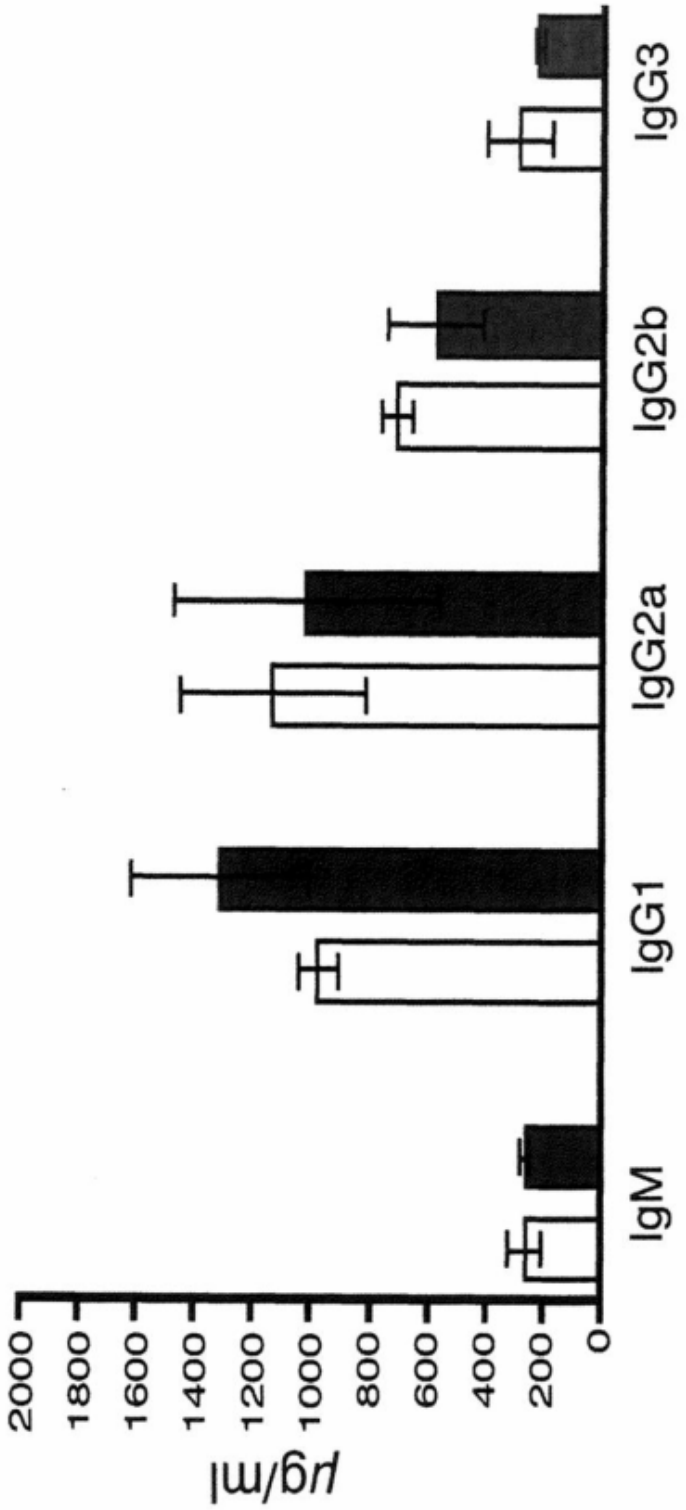
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
µg/ml
IgM
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgG3

FIG. 9A

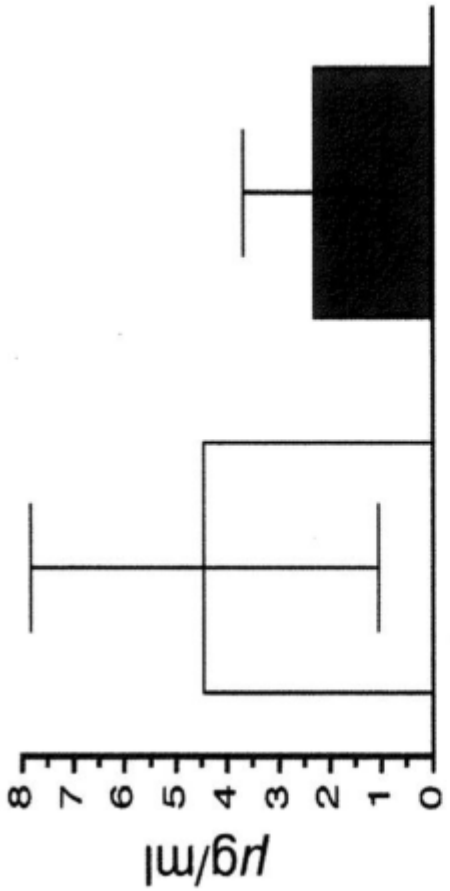

FIG. 9B

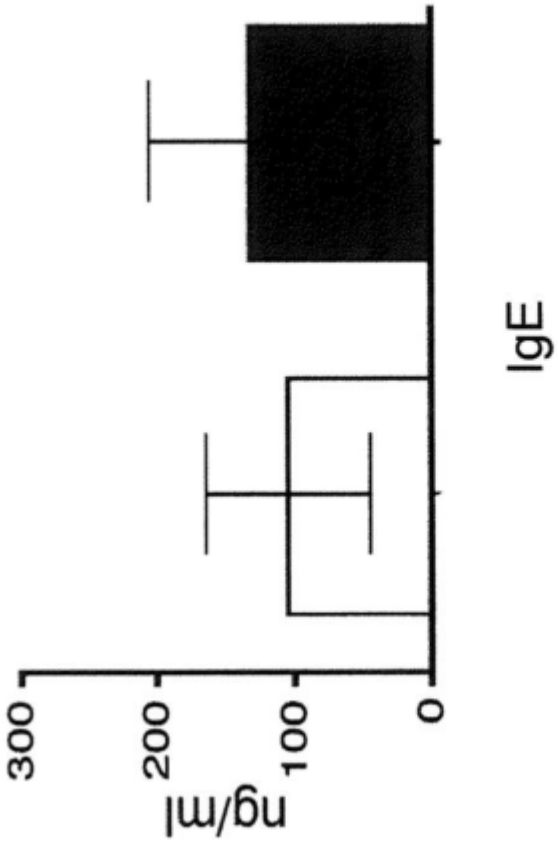

FIG. 9C

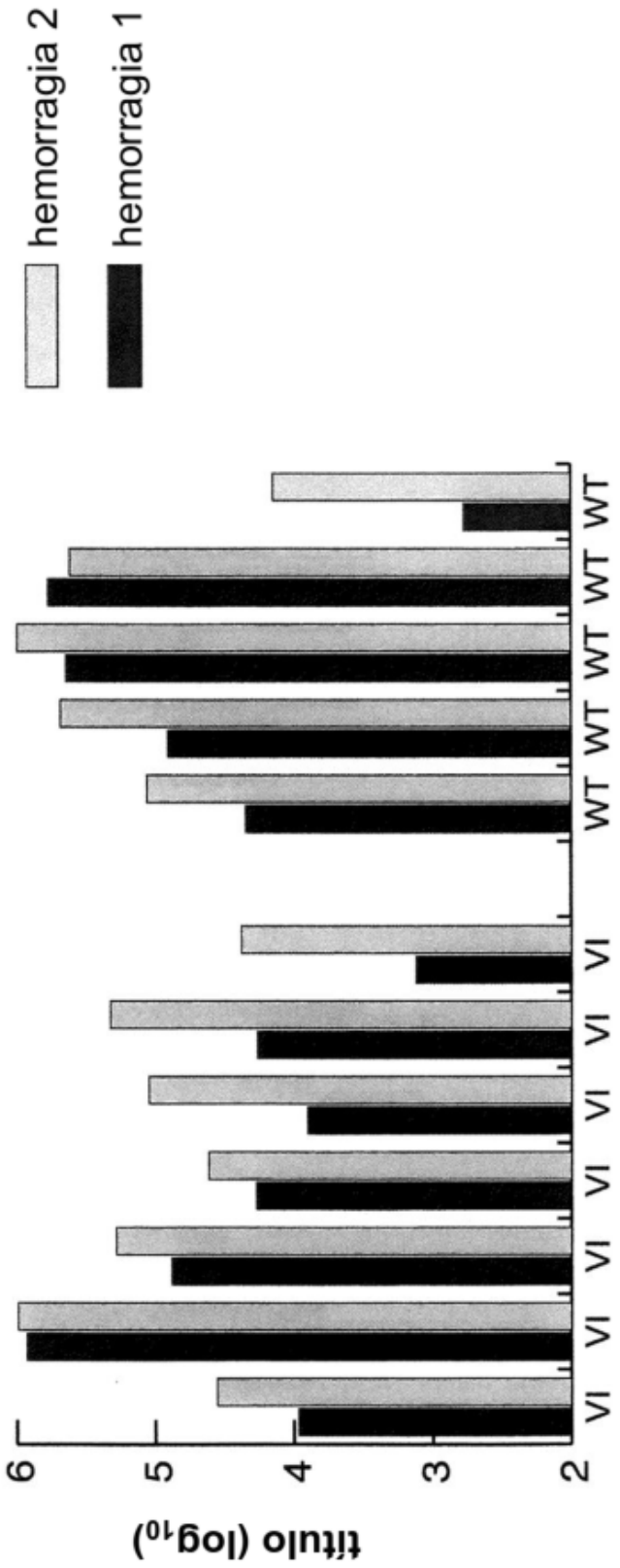
hemorragia 2
hemorragia 1
título (log_{10})
6
5
4
3
2
VI
VI
VI
VI
VI
VI
VI
WT
WT
WT
WT
WT

FIG. 10A

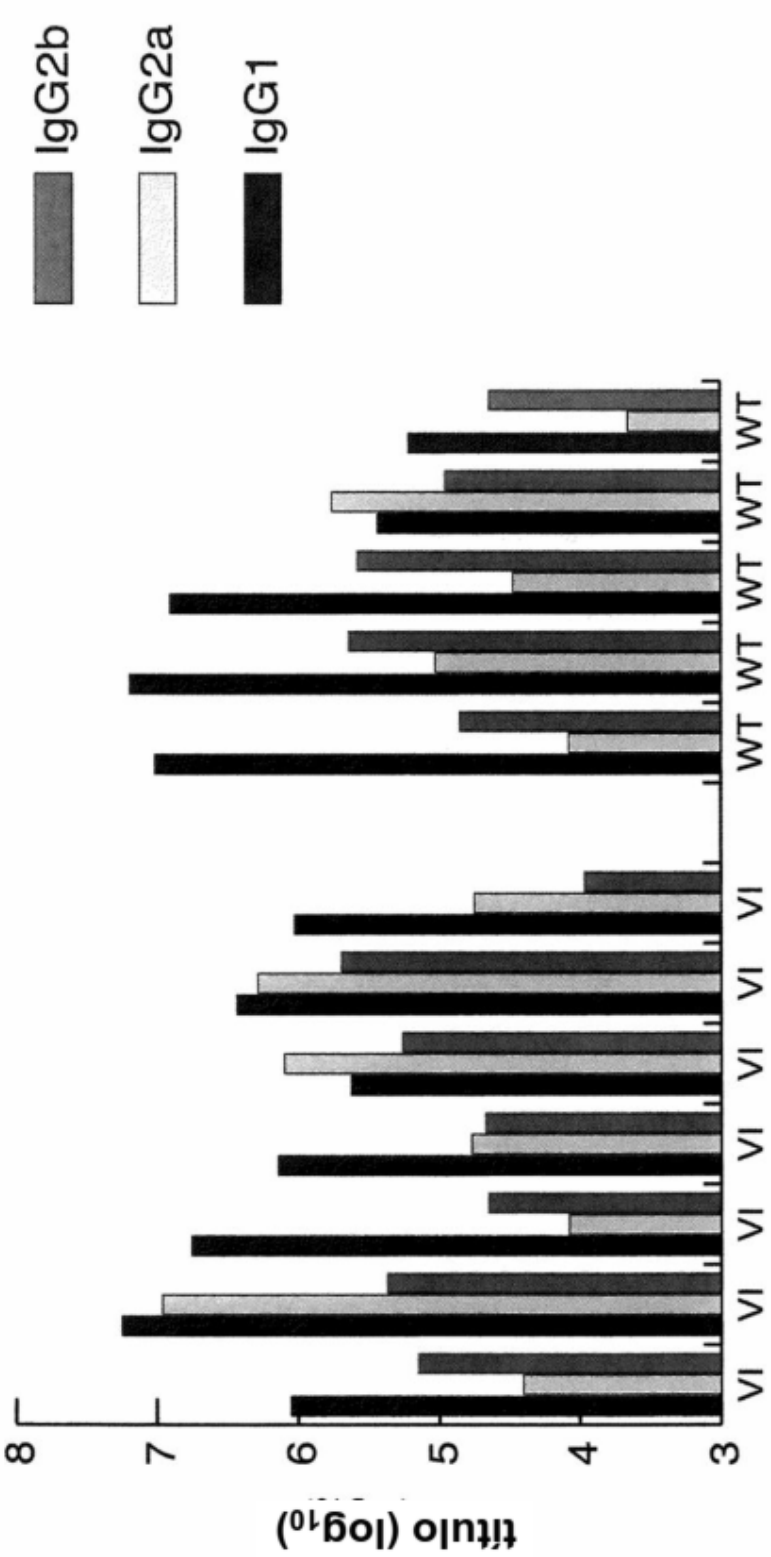
IgG2b
IgG2a
IgG1
título (log10)
8
7
6
5
4
3
VI VI VI VI VI VI VI VI WT WT WT WT WT WT

FIG. 10B

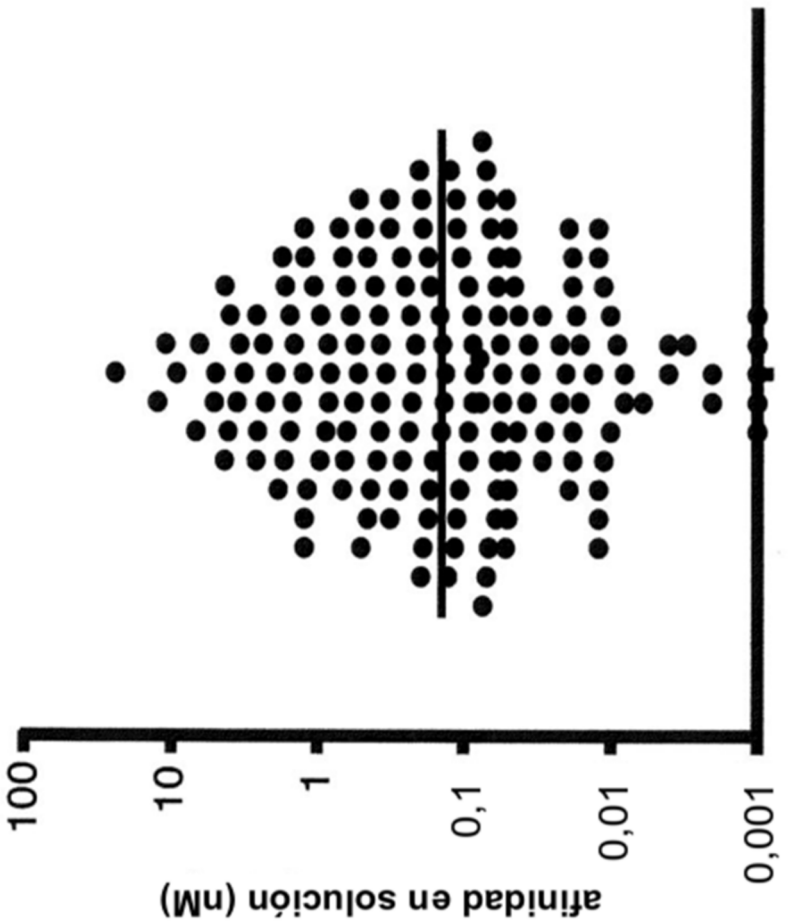

FIG. 11A

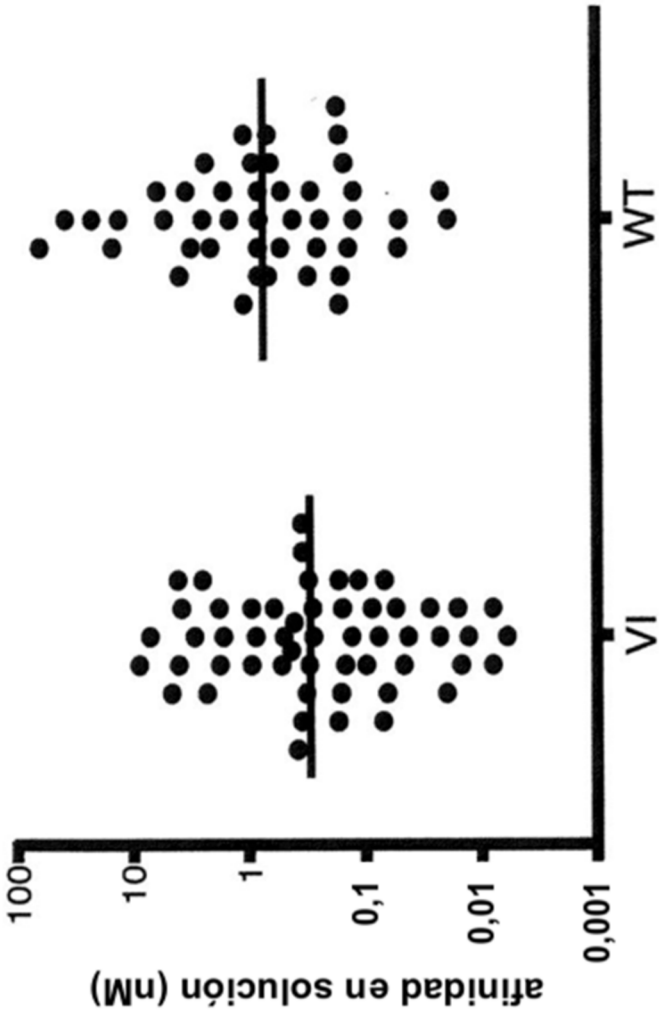

FIG. 11B

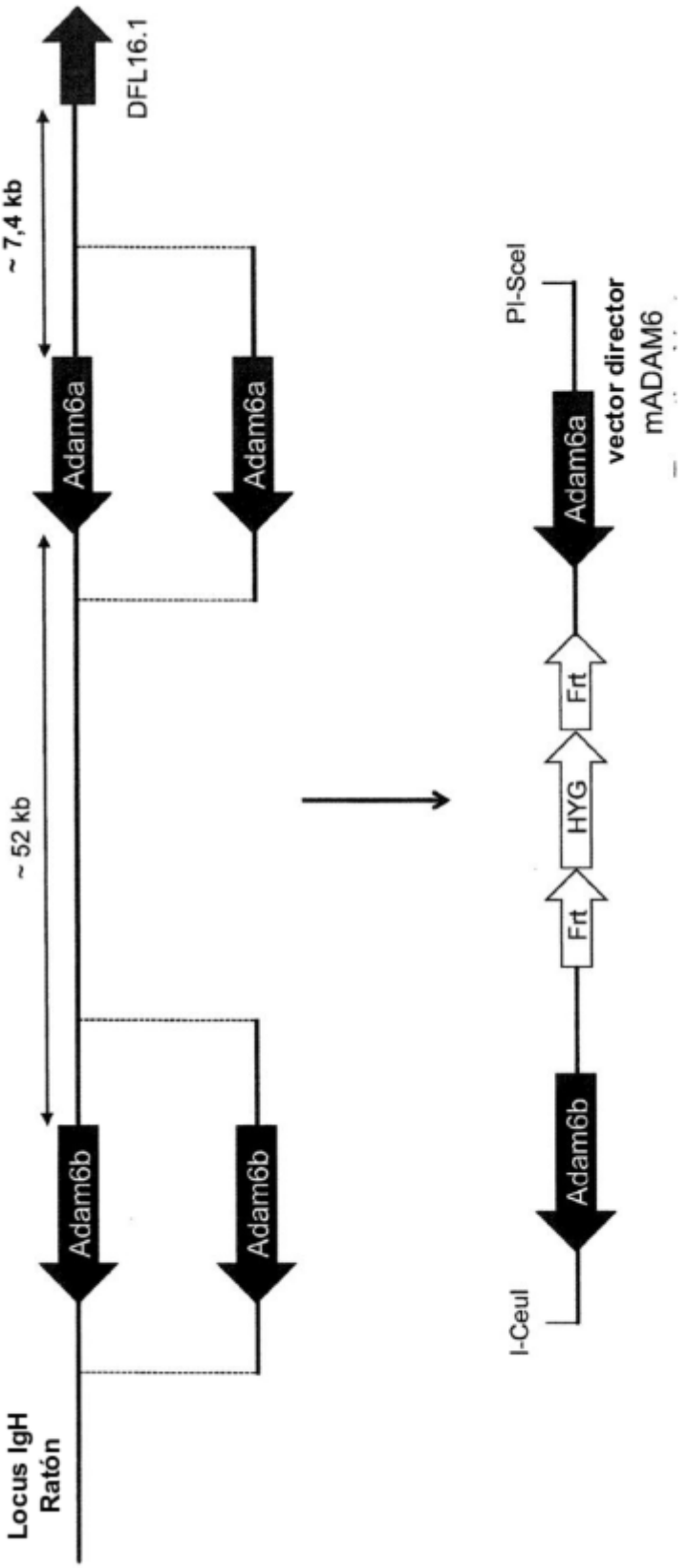
DFL16.1
~ 7,4 kb
Adam6a
Adam6a
~ 52 kb
Adam6b
Adam6b
Locus IgH
Ratón
PI-SceI
Adam6a
vector director
mADAM6
Frt
HYG
Frt
Adam6b
I-CeuI

FIG. 12

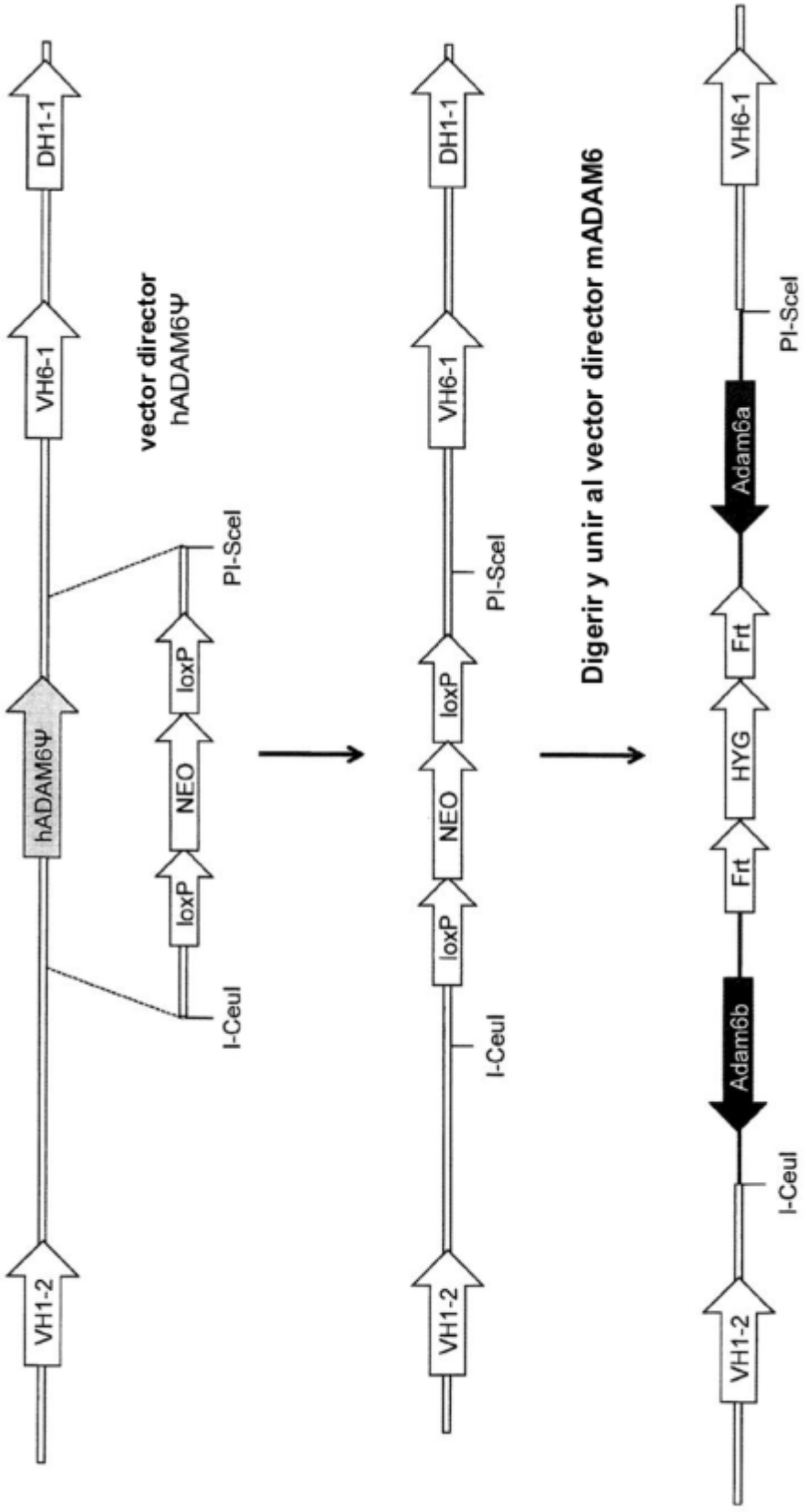
DH1-1
VH6-1
hADAM6Ψ
VH1-2
vector director
hADAM6Ψ
PI-SceI
loxP
NEO
loxP
I-CeuI
DH1-1
VH6-1
loxP
NEO
loxP
PI-SceI
I-CeuI
VH1-2
Digerir y unir al vector director mADAM6
VH6-1
PI-SceI
Adam6a
Frt
HYG
Frt
Adam6b
I-CeuI
VH1-2

FIG. 13

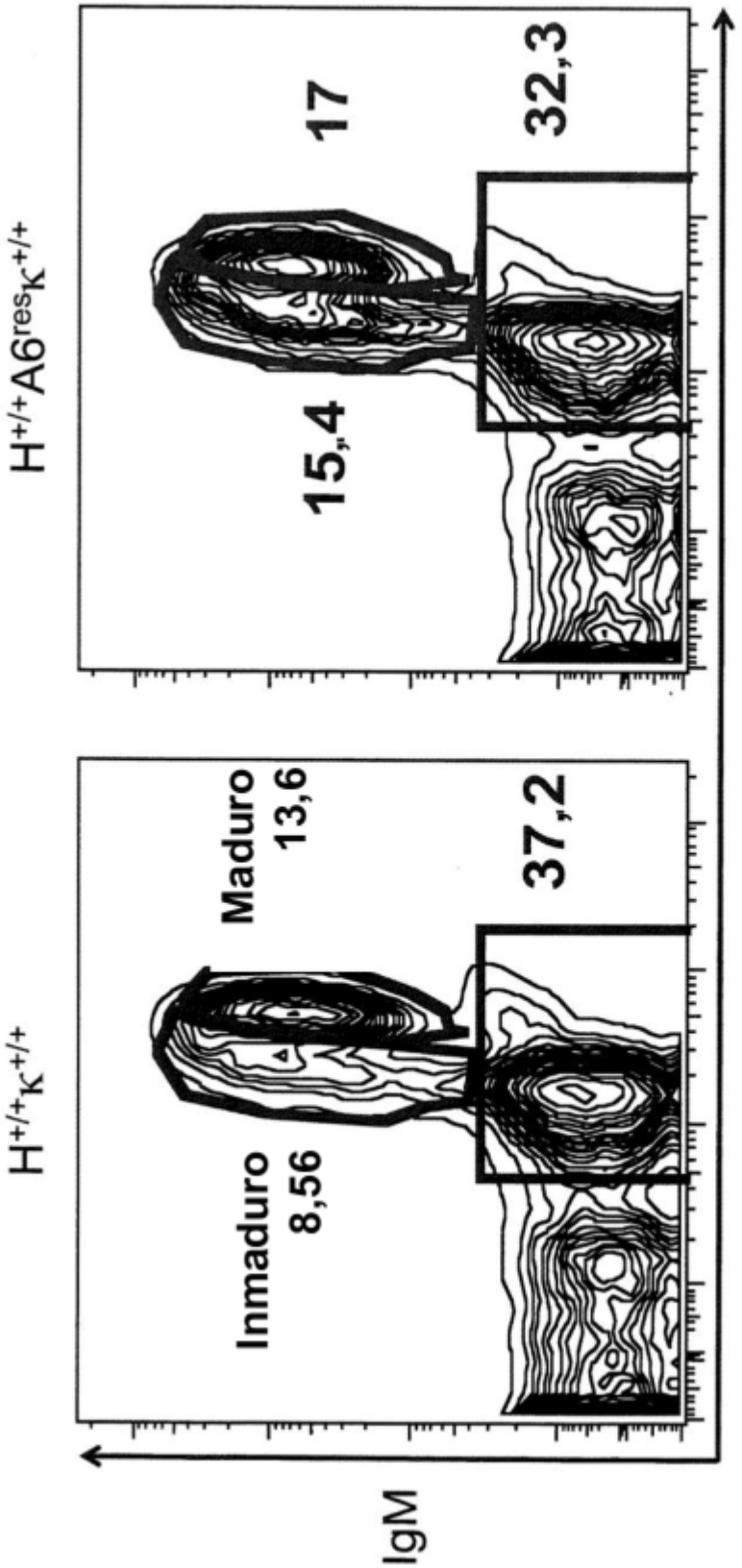

FIG. 14A

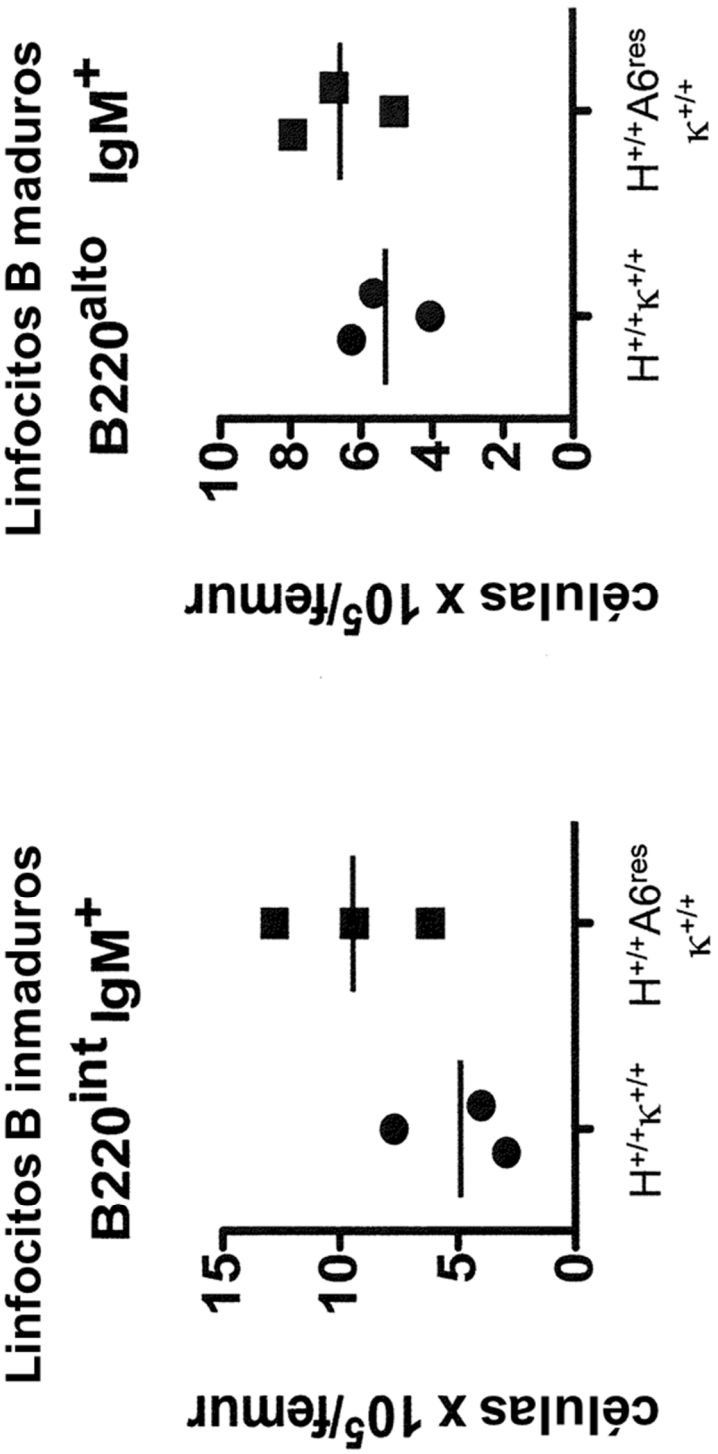
Linfocitos B inmaduros
B220int IgM+
células x 10⁵/fémur
15
10
5
0
H+/+κ+/+
H+/+A6res κ+/+
Linfocitos B maduros
B220alto IgM+
células x 10⁵/fémur
10
8
6
4
2
0
H+/+κ+/+
H+/+A6res κ+/+

FIG. 14B

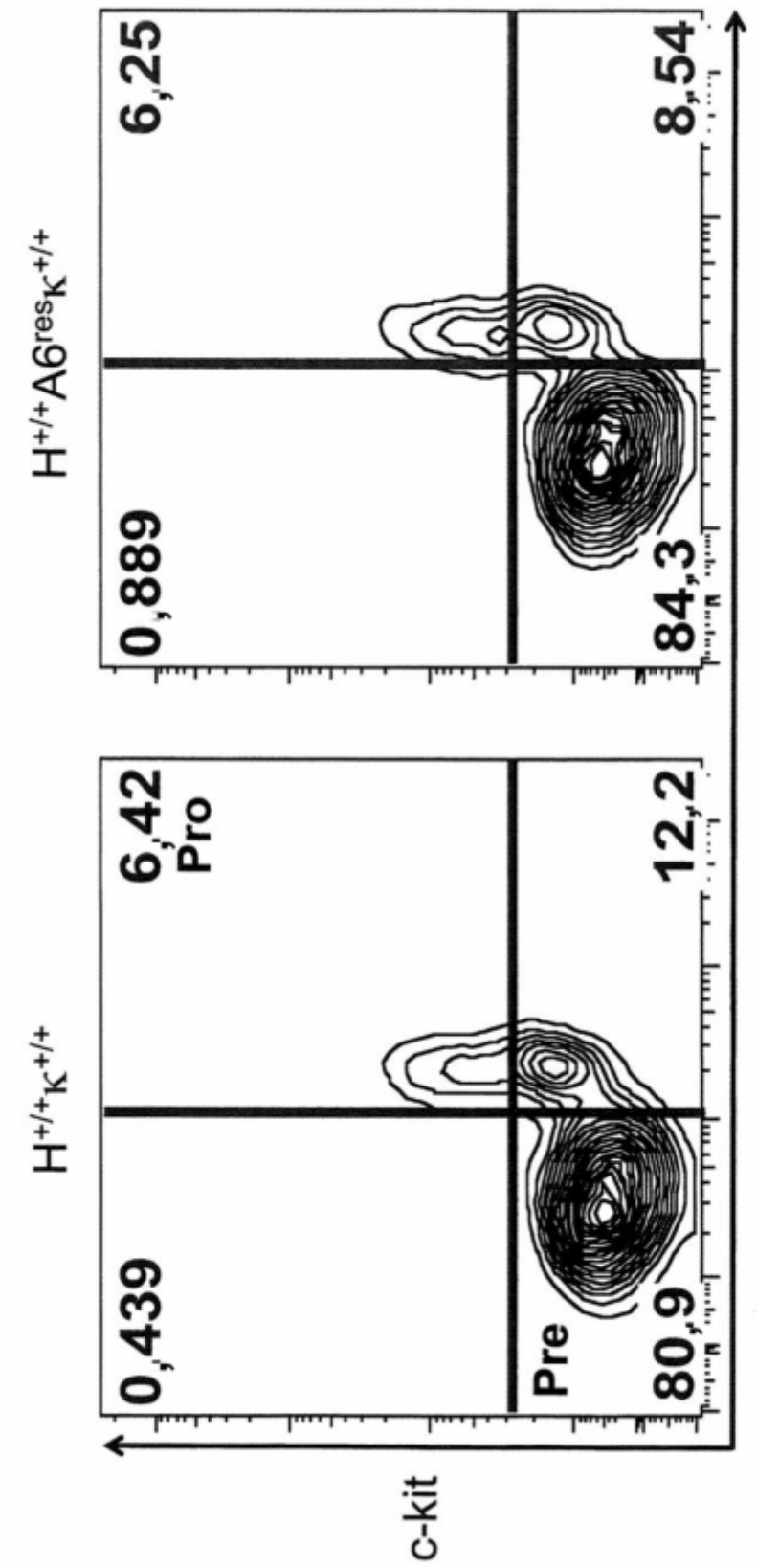

FIG. 15A

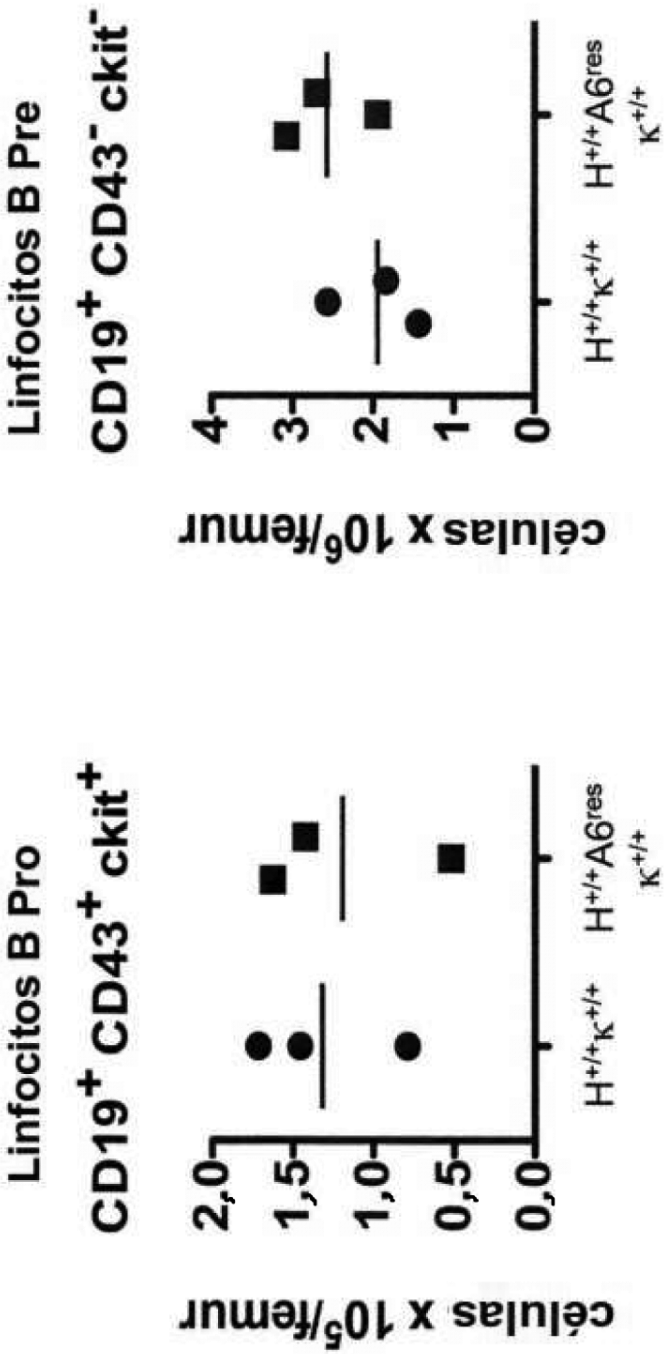
Linfocitos B Pro
CD19+ CD43+ ckit+
células x 10⁵/fémur
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
H+/+κ+/+
H+/+A6res κ+/+
Linfocitos B Pre
CD19+ CD43- ckit-
células x 10⁶/fémur
4
3
2
1
0
H+/+κ+/+
H+/+A6res κ+/+

FIG. 15B

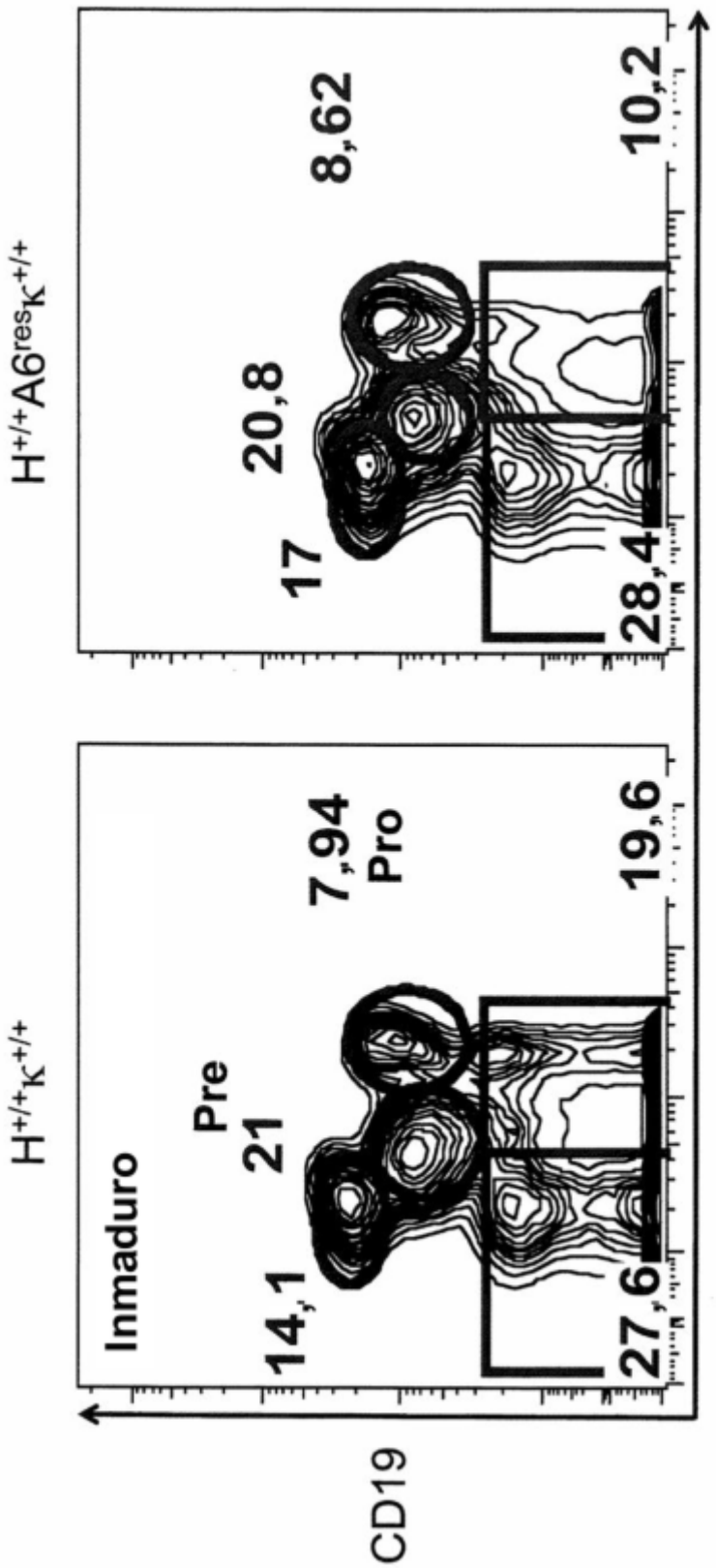
H+/+κ+/+
H+/+A6resκ+/+
Inmaduro
Pre
Pro
14,1
21
7,94
27,6
19,6
17
20,8
8,62
28,4
10,2
CD19
CD43

FIG. 16A

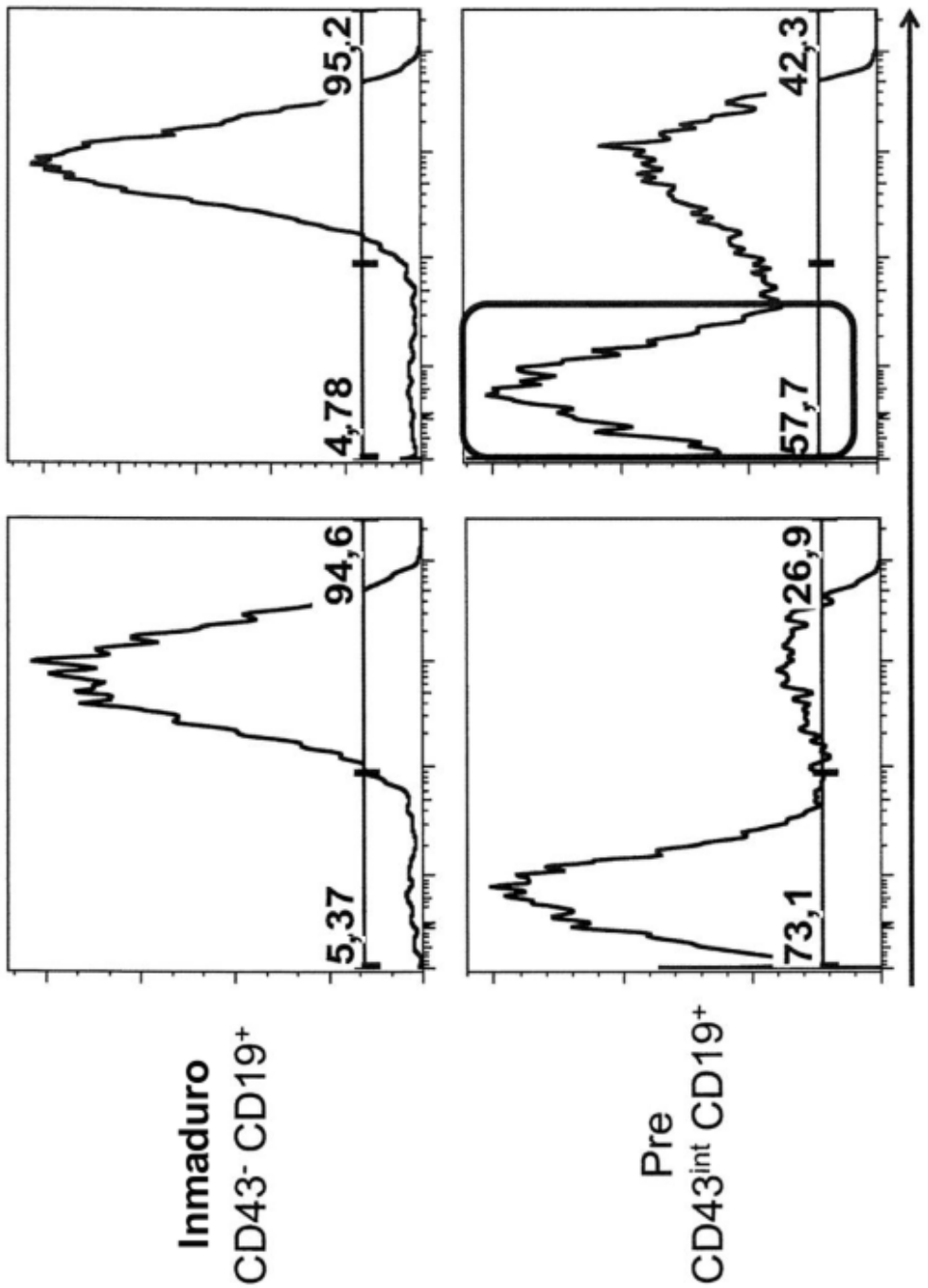
Inmaduro
CD43- CD19+
Pre
CD43int CD19+
5,37
94,6
4,78
95,2
73,1
26,9
57,7
42,3
IgM

FIG. 16B

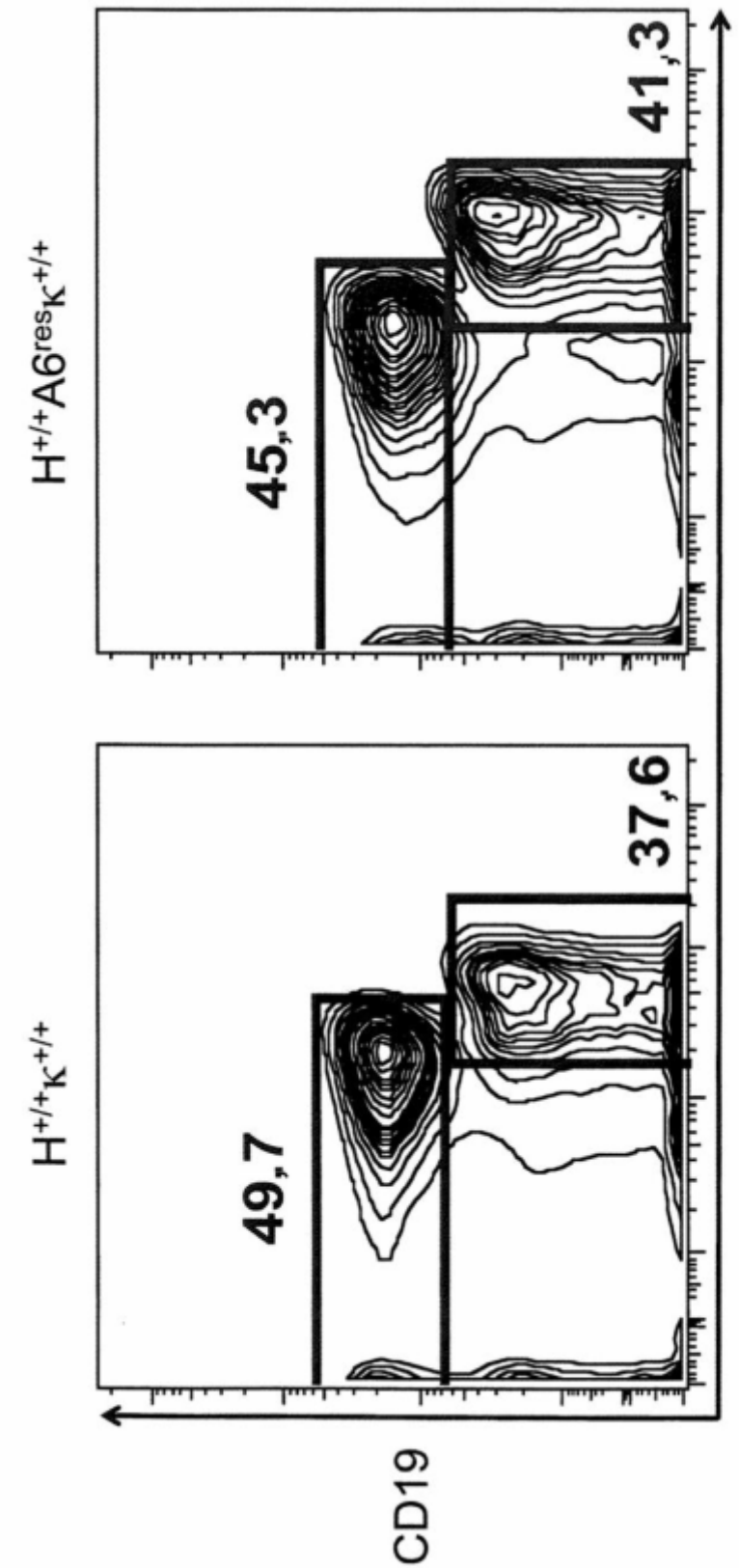

FIG. 17A

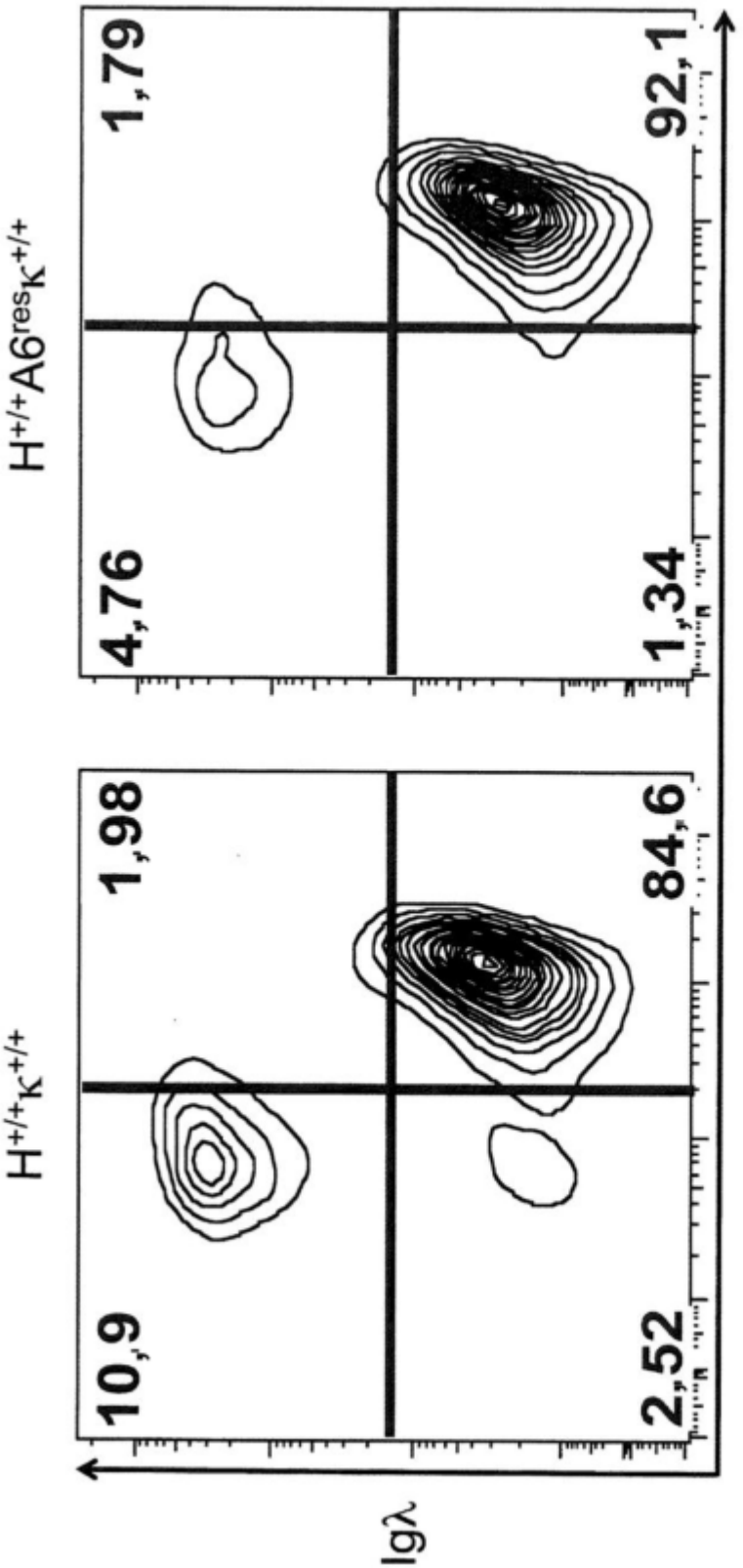

FIG. 17B

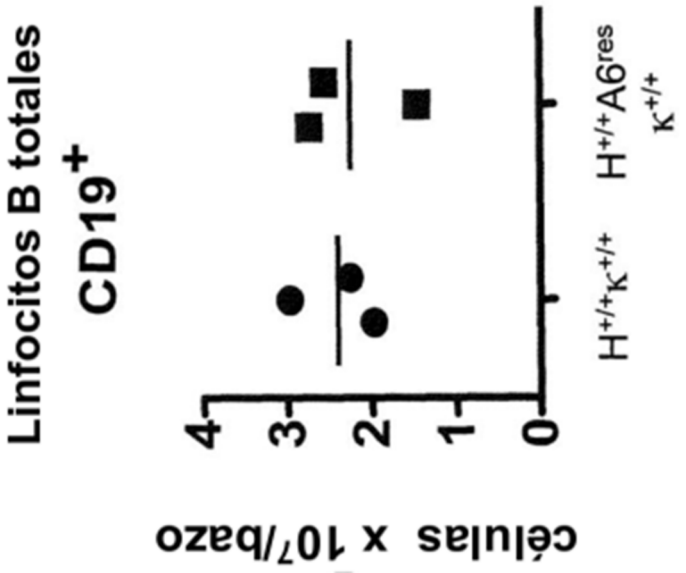
Linfocitos B totales
CD19+
células x 10⁷/bazo
4
3
2
1
0
H+/+κ+/+
H+/+A6res
κ+/+

FIG. 17C

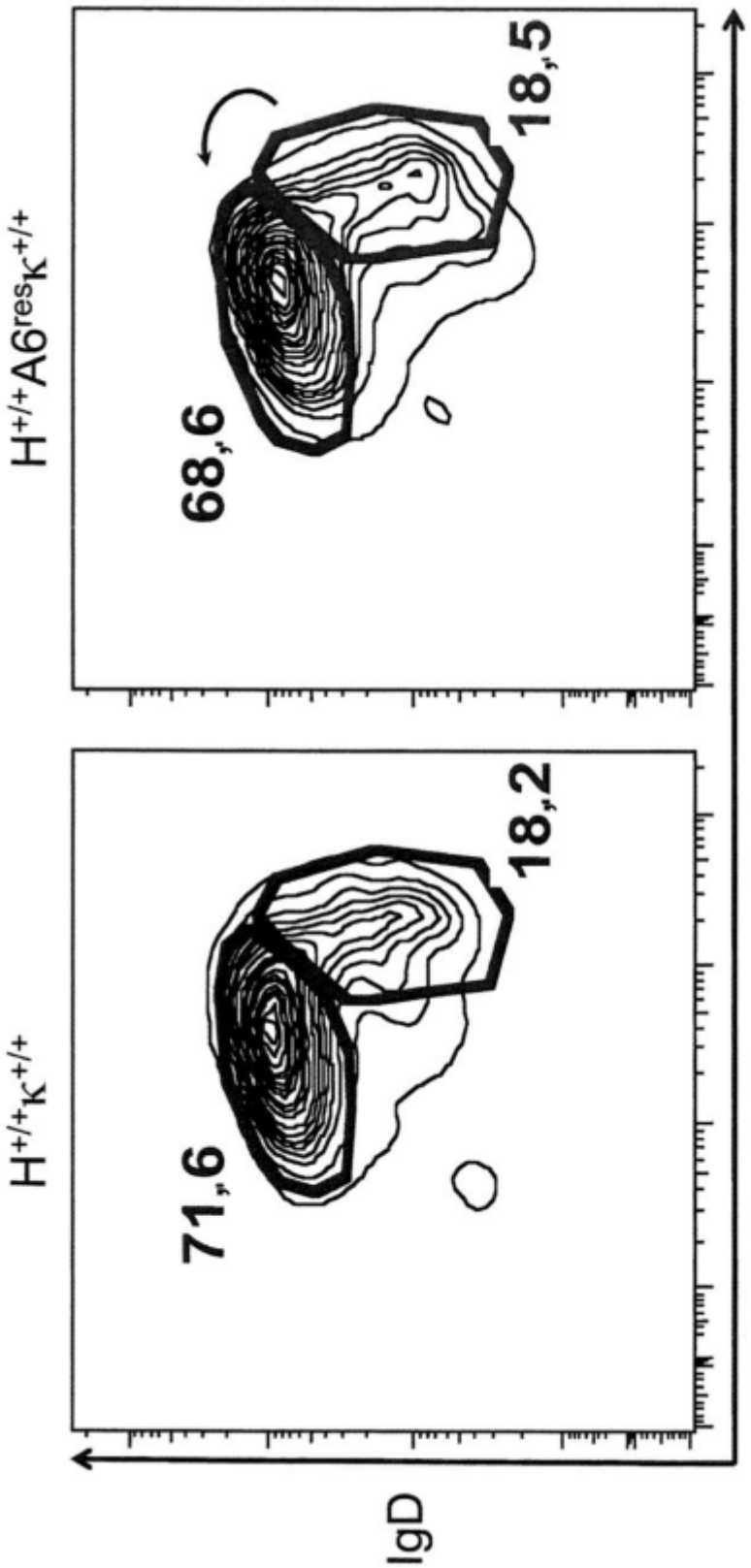

FIG. 18A

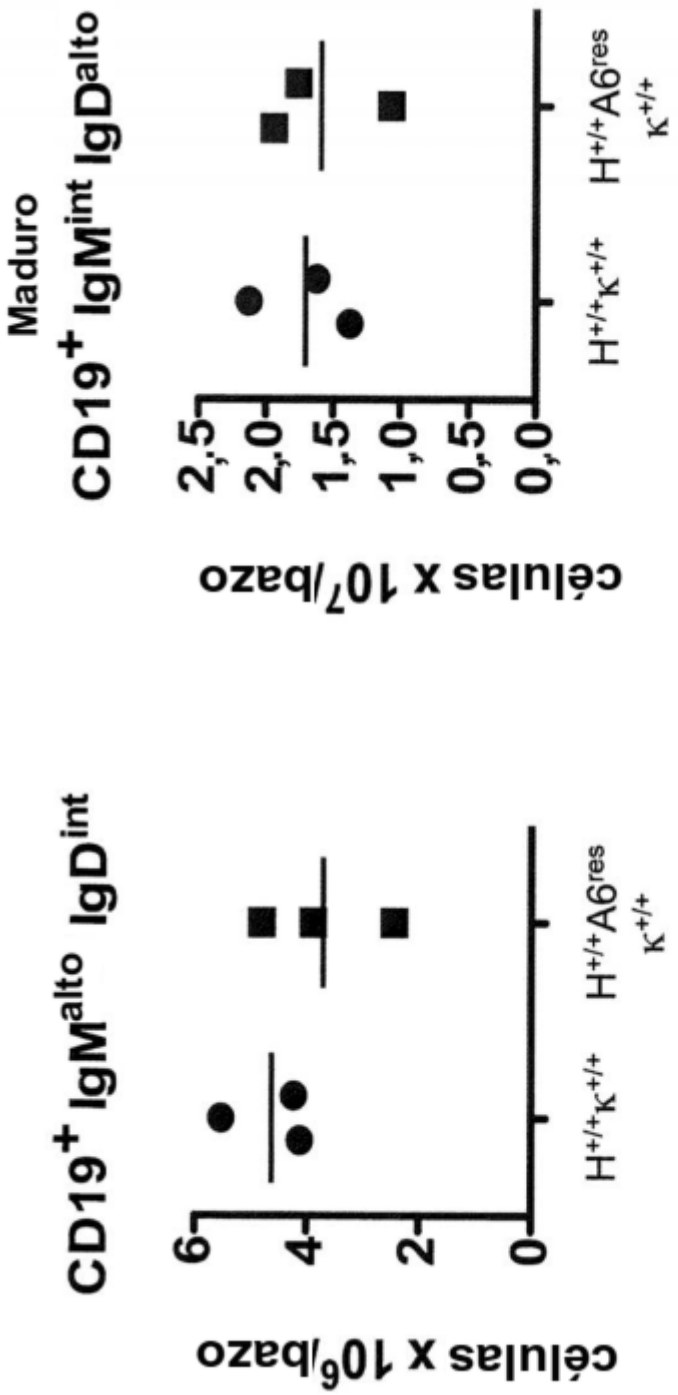
Maduro
CD19+ IgMint IgDalto
células x 10⁷/bazo
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
H+/+κ+/+
H+/+A6res κ+/+
CD19+ IgMalto IgDint
células x 10⁶/bazo
6
4
2
0
H+/+κ+/+
H+/+A6res κ+/+

FIG. 18B

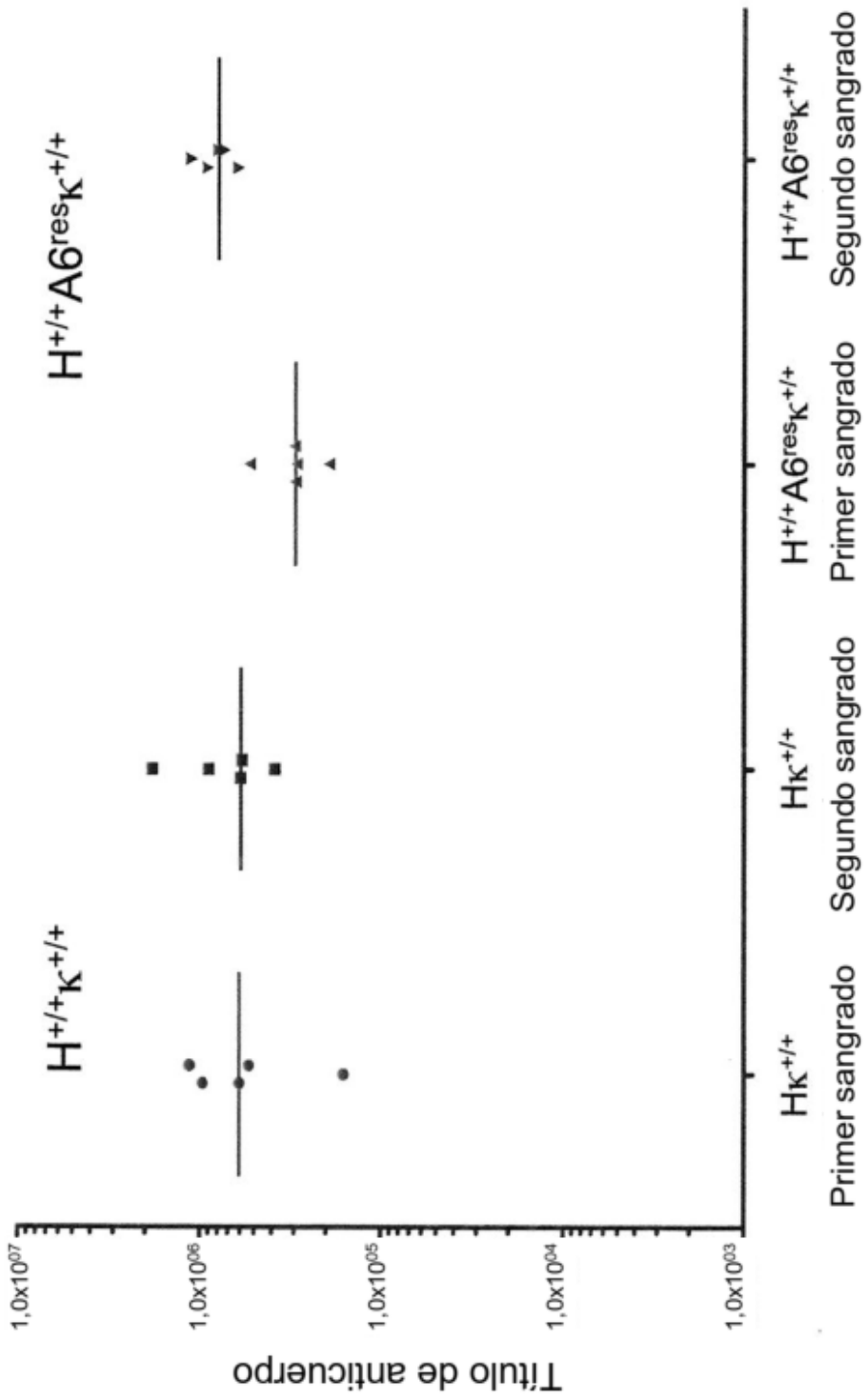
Título de anticuerpo
1,0x10^07
1,0x10^06
1,0x10^05
1,0x10^04
1,0x10^03
H+/+κ+/+
H+/+A6resκ+/+
Hκ+/+
Primer sangrado
Hκ+/+
Segundo sangrado
H+/+A6resκ+/+
Primer sangrado
H+/+A6resκ+/+
Segundo sangrado

FIG. 19

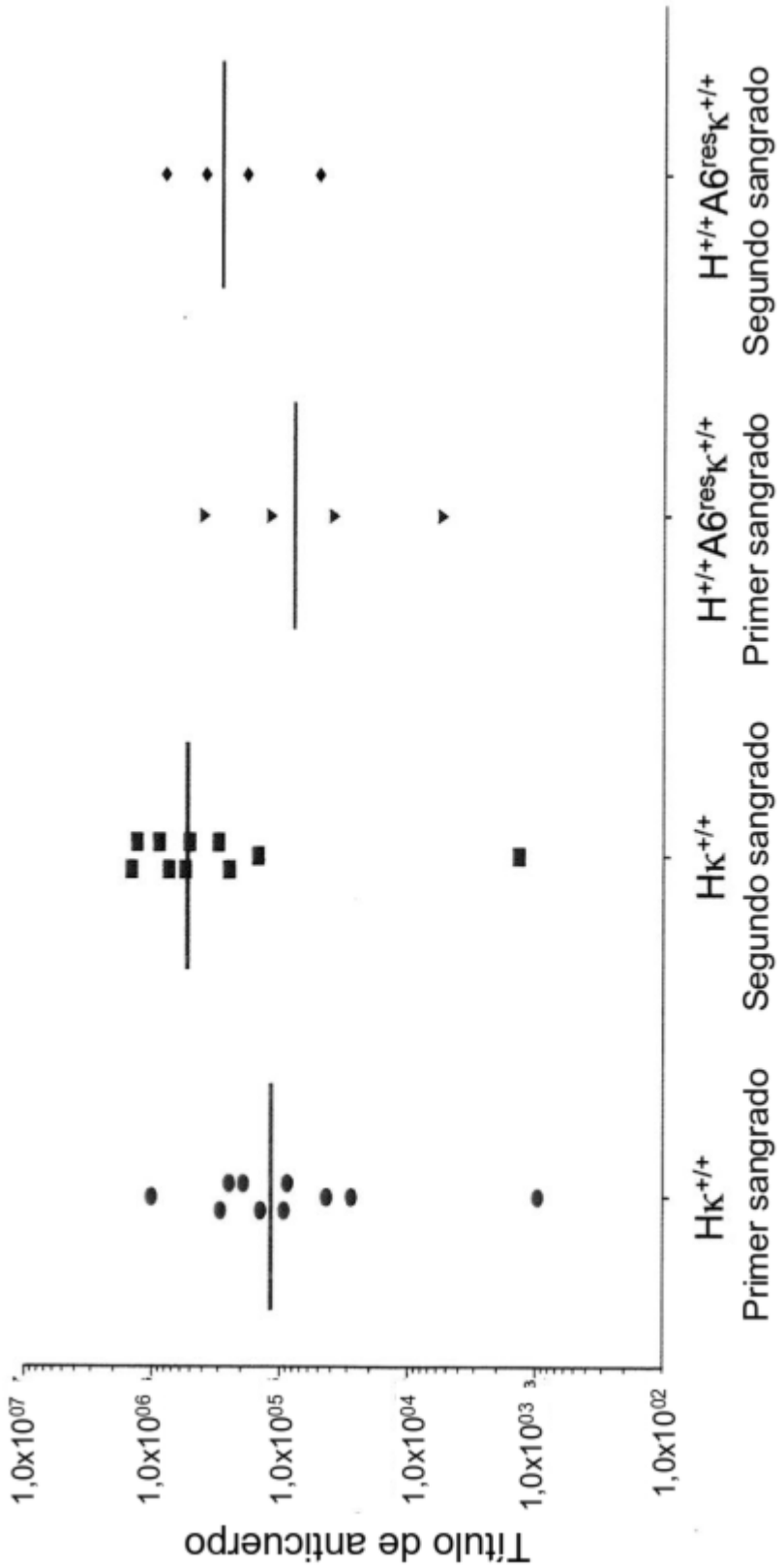
Título de anticuerpo
1,0x10^07
1,0x10^06
1,0x10^05
1,0x10^04
1,0x10^03
1,0x10^02
Hκ+/+ Primer sangrado
Hκ+/+ Segundo sangrado
H+/+A6resκ+/+ Primer sangrado
H+/+A6resκ+/+ Segundo sangrado

FIG. 20

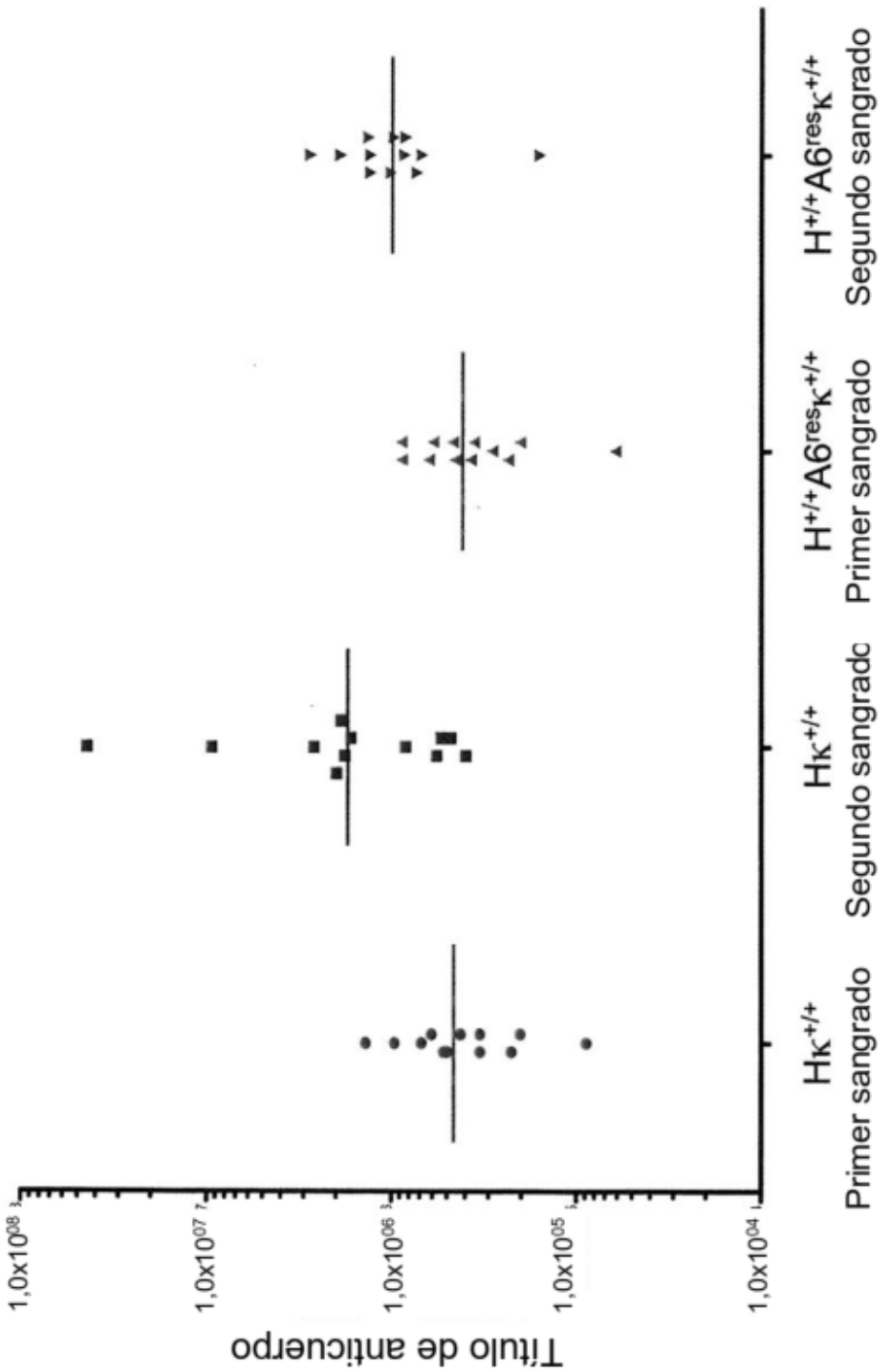
Título de anticuerpo
1,0x10^08
1,0x10^07
1,0x10^06
1,0x10^05
1,0x10^04
Hκ+/+
Primer sangrado
Hκ+/+
Segundo sangrado
H+/+A6resκ+/+
Primer sangrado
H+/+A6resκ+/+
Segundo sangrado

FIG. 21

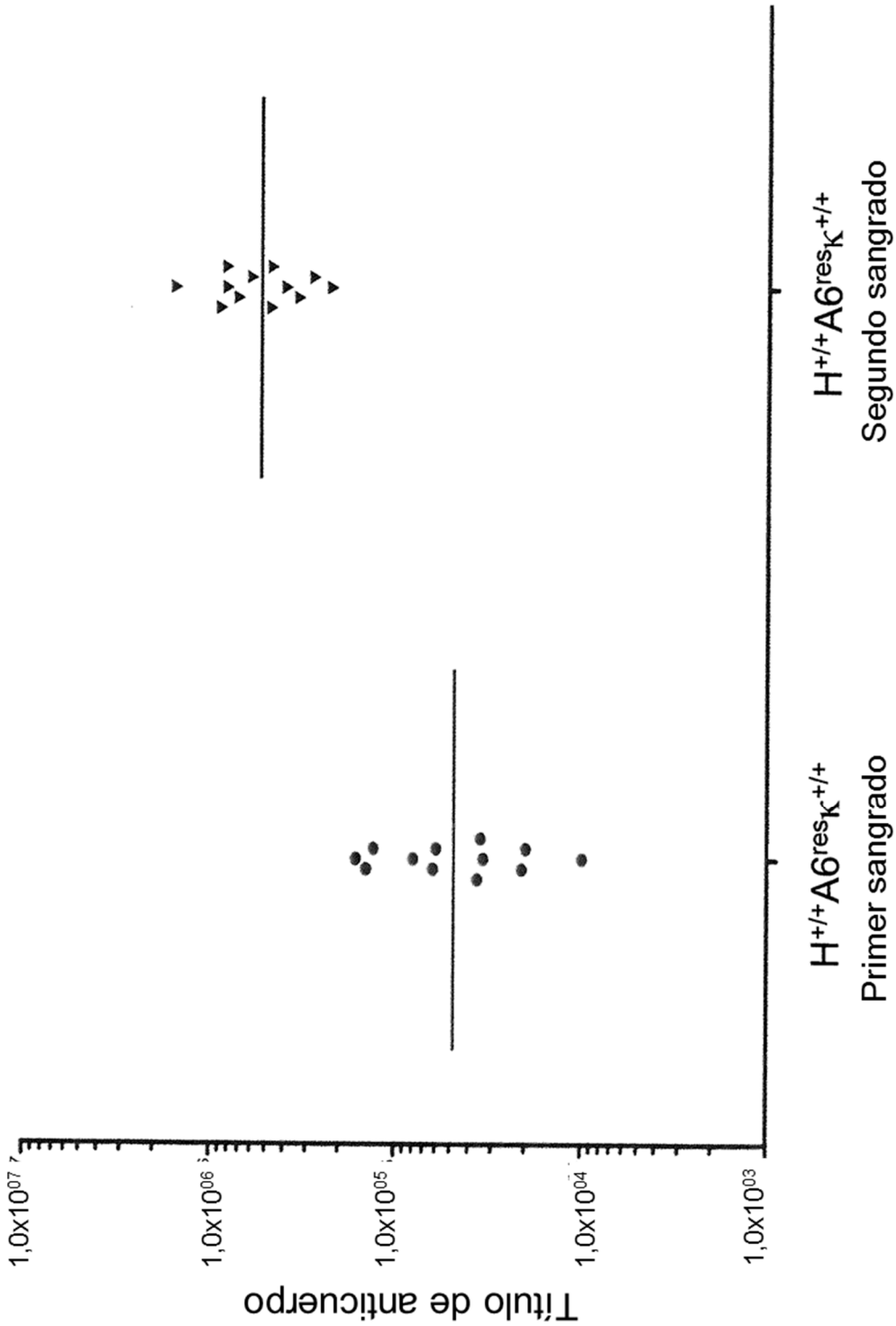
Título de anticuerpo
1,0x10^07
1,0x10^06
1,0x10^05
1,0x10^04
1,0x10^03
H+/+A6resκ+/+
Primer sangrado
H+/+A6resκ+/+
Segundo sangrado

FIG. 22