

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 305**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2017 PCT/US2017/060006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018 WO18128691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2017 E 17863293 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3407709**

54 Título: **Animales no humanos que tienen un locus de cadena ligera lambda de inmunoglobulina modificado por ingeniería**

30 Prioridad:

**04.11.2016 US 201662417845 P**

**04.10.2017 US 201762567932 P**

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

**06.05.2021**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**GUO, CHUNGUANG;**  
**HARRIS, FAITH;**  
**VORONINA, VERA;**  
**MCWHIRTER, JOHN;**  
**LEVENKOVA, NATASHA;**  
**MACDONALD, LYNN;**  
**TU, NAXIN y**  
**MURPHY, ANDREW, J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 823 305 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Animales no humanos que tienen un locus de cadena ligera lambda de inmunoglobulina modificado por ingeniería

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el derecho de prioridad de la solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N.º de serie 62/417.845, presentada el 4 de noviembre de 2016, y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N.º de serie 62/567.932, presentada el 10 de octubre de 2017.

10

**Antecedentes**

Los anticuerpos humanos son la clase de agentes terapéuticos de crecimiento más rápido. De las tecnologías que se utilizan actualmente para su producción, el desarrollo de animales transgénicos (p. ej., roedores) modificados por ingeniería con material genético que codifica anticuerpos humanos, en su totalidad o en parte, ha revolucionado el campo de los anticuerpos monoclonales terapéuticos humanos para el tratamiento de diversas enfermedades. Aun así, es necesario el desarrollo de sistemas mejorados *in vivo* para generar anticuerpos monoclonales humanos que maximicen los repertorios de anticuerpos humanos en animales transgénicos hospedadores.

15

20 **Sumario**

En determinados aspectos, Se proporcionan en el presente documento sistemas mejorados *in vivo* para identificar y desarrollar nuevos anticuerpos y agentes terapéuticos basados en anticuerpos que pueden usarse para el tratamiento de una variedad de enfermedades que afectan a los seres humanos. Tal como se divulga en el presente documento, en determinadas realizaciones los roedores proporcionados en el presente documento, que tienen locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina (Ig) modificados por ingeniería que expresan, que producen o que contienen repertorios de anticuerpos caracterizados por cadenas ligeras que tienen regiones V $\lambda$  humanas, son útiles, por ejemplo, para explotar la diversidad de secuencias V $\lambda$  humanas en la identificación y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos basados en anticuerpos. En algunas realizaciones, los roedores descritos en el presente documento proporcionan sistemas mejorados *in vivo* para el desarrollo de anticuerpos y/o agentes terapéuticos basados en anticuerpos para la administración a seres humanos. En algunas realizaciones, roedores descritos en el presente documento proporcionan sistemas mejorados *in vivo* para el desarrollo de anticuerpos y/o agentes terapéuticos basados en anticuerpos que contienen dominios V $\lambda$  humanos caracterizados por un rendimiento mejorado en comparación con anticuerpos y/o agentes terapéuticos basados en anticuerpos obtenidos sistemas existentes *in vivo* sistemas que contienen secuencias de la región V $\lambda$  humana.

25

30

35

En determinados aspectos, se proporciona en el presente documento un roedor que tiene un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que contiene regiones variables y constantes de inmunoglobulina modificadas por ingeniería; que comprende además una región (o secuencia) reguladora modificada por ingeniería. En particular, se proporciona un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno que comprende:

40

- (a) uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos;
- (b) uno o más segmentos de genes J $\lambda$  humanos;
- (c) uno o más segmentos de genes C $\lambda$  humanos;
- 45 (d) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina (E $\lambda$ ) de roedor;
- (e) tres E $\lambda$  humanos; y
- (f) un segmento de gen C $\lambda$  de roedor,

45

en donde (a) y (b) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos de genes de región constante de (c) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno, y en donde (a) y ( b) también son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen C $\lambda$  de roedor de (f) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno.

50

55 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 segmentos de genes V $\lambda$  humanos.

55

60 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende de 5 a 25, 5 a 24, 5 a 23, 5 a 22, 5 a 21, 5 a 20, 5 a 19, 5 a 18, 5 a 17, 5 a 16, 5 a 15, 5 a 14, 5 a 13, 5 a 12, 5 a 11, 5 a 10, 5 a 9, 5 a 8, 5 a 7 o 5 a 6 segmentos de genes V $\lambda$  humanos. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende de 10 a 70, 10 a 69, 10 a 68, 10 a 67, 10 a 66, 10 a 65, 10 a 64, 10 a 63, 10 a 62, 10 a 61, 10 a 60, 10 a 59, 10 a 58, 10 a 57, 10 a 56, 10 a 55, 10 a 54, 10 a 53, 10 a 52, 10 a 51, 10 a 50, 10 a 49, 10 a 48, 10 a 47, 10 a 46, 10 a 45, 10 a 44, 10 a 43, 10 a 42, 10 a 41, 10 a 40, 10 a 39, 10 a 38, 10 a 37, 10 a 36, 10 a 35, 10 a 34, 10 a 33, 10 a 32, 10 a 31, 10 a 30, 10 a 29, 10 a 28, 10 a 27, 10

65

a 26, 10 a 25, 10 a 24, 10 a 23, 10 a 22, 10 a 21, 10 a 20, 10 a 19, 10 a 18, 10 a 17, 10 a 16, 10 a 15, 10 a 14, 10 a 13, 10 a 12, o 10 a 11 segmentos de genes V $\lambda$  humanos.

5 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende de 6 a 25, 7 a 25, 8 a 25, 9 a 25, 10 a 25, 11 a 25, 12 a 25, 13 a 25, 14 a 25, 15 a 25, 16 a 25, 17 a 25, 18 a 25, 19 a 25, 20 a 25, 21 a 25, 22 a 25, 23 a 25 o 24 a 25 segmentos de genes V $\lambda$  humanos. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende de 11 a 70, 12 a 70, 13 a 70, 14 a 70, 15 a 70, 16 a 70, 17 a 70, 18 a 70, 19 a 70, 20 a 70, 21 a 70, 22 a 70, 23 a 70, 24 a 70, 25 a 70, 26 a 70, 27 a 70, 28 a 70, 29 a 70, 30 a 70, 31 a 70, 32 a 70, 33 a 70, 34 a 70, 35 a 70, 36 a 70, 37 a 70, 38 a 70, 39 a 70, 40 a 70, 41 a 70, 42 a 70, 43 a 70, 44 a 70, 45 a 70, 46 a 70, 47 a 70, 48 a 70, 49 a 70, 50 a 70, 51 a 70, 52 a 70, 53 a 70, 54 a 70, 55 a 70, 56 a 70, 57 a 70, 58 a 70, 59 a 70, 60 a 70, 61 a 70, 62 a 70, 63 a 70, 64 a 70, 65 a 70, 66 a 70, 67 a 70, 68 a 70 o 69 a 70 segmentos de genes V $\lambda$  humanos.

15 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende de 6 a 24, 7 a 23, 8 a 22, 9 a 21, 10 a 20, 11 a 19, 12 a 18, 13 a 17, 14 a 16 o 15 a 16 segmentos de genes V $\lambda$  humanos. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende de 11 a 69, 12 a 68, 13 a 67, 14 a 66, 15 a 65, 16 a 64, 17 a 63, 18 a 62, 19 a 61, 20 a 60, 21 a 59, 22 a 58, 23 a 57, 24 a 56, 25 a 55, 26 a 54, 27 a 53, 28 a 52, 29 a 51, 30 a 50, 31 a 49, 32 a 48, 33 a 47, 34 a 48, 35 a 47, 36 a 46, 37 a 45, 38 a 44, 39 a 43, 40 a 42 o 41 a 42 segmentos de genes V $\lambda$  humanos.

20 En determinadas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende 5, 16 o 25 segmentos funcionales de genes V $\lambda$  humanos. En determinadas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende 10, 27 o 40 segmentos de genes V $\lambda$  humanos. En determinadas realizaciones, los segmentos de genes V $\lambda$  humanos incluyen segmentos de genes V $\lambda$  humanos consecutivos, ya que dichos segmentos de genes V $\lambda$  humanos aparecen en un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana de una célula humana.

25 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende al menos 5 segmentos de genes J $\lambda$  humanos (p. ej., pero sin limitación, 5 segmentos de genes J $\lambda$  humanos, 6 segmentos de genes J $\lambda$  humanos, 7 segmentos de genes J $\lambda$  humanos, 8 segmentos de genes J $\lambda$  humanos, etc.). En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende al menos 4 genes de la región C $\lambda$  humana (p. ej., pero sin limitación, 4 genes de la región C $\lambda$  humana, 5 genes de la región C $\lambda$  humana, 6 genes de la región C $\lambda$  humana, 7 genes de la región C $\lambda$  humana, 8 genes de la región C $\lambda$  humana, etc.). En determinadas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que comprende al menos 25 segmentos de genes V $\lambda$  humanos, al menos 5 segmentos de genes J $\lambda$  humanos y al menos 4 genes de la región C $\lambda$  humana en un alelo endógeno de cadena ligera Ig $\lambda$ . En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden sólo un gen de la región C $\lambda$  murina (p. ej., ratón o rata) (p. ej., un gen de la región C $\lambda$ 1 de ratón o un segmento de gen C $\lambda$ 1 de ratón) en un locus endógeno de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor. En algunas realizaciones, dicho locus de cadena ligera Ig $\lambda$  comprende además una región (o secuencia) de E $\lambda$  humano que se caracteriza por tres elementos de secuencia.

30 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden segmentos de genes V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos en un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor endógeno en configuración natural o de línea germinal. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados contienen segmentos de genes V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos en un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor endógeno en una configuración que no aparece de forma natural en un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina humana del genoma de la línea germinal de una célula humana.

35 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados contienen una secuencia de ADN en un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor endógeno que incluye una pluralidad de secuencias codificantes de V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos intercaladas (o yuxtapuestas, asociadas, etc.) con una secuencia no codificante de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados contienen una secuencia de ADN en un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor endógeno que incluya una pluralidad de secuencias codificantes de V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos intercaladas con una secuencia no codificante de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina de roedor (p. ej., murina).

40 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados se caracterizan por la expresión de anticuerpos a partir de locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor endógenos en el genoma de la línea germinal de dichos roedores, cuyos anticuerpos contienen dominios V $\lambda$  humanos y dominios C $\lambda$  humanos o de roedor. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados se caracterizan por un mayor uso de regiones V $\lambda$  humanas a partir de locus de cadenas ligeras  $\lambda$  de inmunoglobulina modificadas por ingeniería (p. ej., una relación  $\kappa$ : $\lambda$  de 60:40) en comparación con uno o más roedores modificados por ingeniería de referencia o de tipo silvestre (p. ej., pero sin limitación, una relación  $\kappa$ : $\lambda$  de 95:5).

En algunas realizaciones, se proporciona una célula de roedor aislada que es del roedor proporcionado.

65 También se divulga un roedor, célula de roedor o tejido de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno que comprende: (a) uno o más segmentos de genes V $\lambda$

humanos, (b) uno o más segmentos de genes Jλ humanos, y (c) uno o más segmentos de genes Cλ humanos, en donde (a) y (b) están operativamente unidos a (c) y un segmento de gen Cλ de roedor, y donde el locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende además: uno o más potenciadores de cadena ligera λ de inmunoglobulina (Eλ) de roedor y tres potenciadores de cadena ligera λ de inmunoglobulina (Eλ) humanos.

5 Un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende además tres Eλ humanos. En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende además un Eλ humano caracterizado por la presencia de tres elementos de secuencia. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende además un Eλ humano caracterizado por la presencia de tres elementos de secuencia que actúan (o funcionan) de forma modular.

10 En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende dos Eλ de roedor. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende dos Eλ de roedor. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende dos Eλ de ratón. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende un Eλ de ratón y un Eλ3-1 de ratón. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento no contiene (o carece de) un Eλ2-4 de ratón. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende dos Eλ de rata.

20 En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende una delección de segmentos de genes Vλ y Jλ endógenos, en su totalidad o en parte. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende una delección de segmentos de genes Vλ2-Vλ3-Jλ2-Cλ2 y segmentos de genes Vλ1-Jλ3-Cλ3-Jλ1. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende una delección de los segmentos de genes Vλ2-Vλ3-Jλ2-Cλ2-Jλ4P-Cλ4P y los segmentos de genes Vλ1-Vλ3-Jλ3P-Cλ3-Jλ1. En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende una delección de un Eλ2-4 de roedor. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende una delección de Vλ2, Vλ3, Jλ2, Cλ2, Jλ4P, Cλ4P, Eλ2-4, Vλ1, Jλ3, Jλ3P, Cλ3 y Jλ1. En algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende Cλ1, Eλ y Eλ3-1 como los únicos segmentos de genes o elementos de secuencia de roedor presentes.

35 En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende la inserción de los segmentos de genes Vλ humanos Vλ4-69 a Vλ3-1, al menos los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6, el segmento del gen Jλ humano Jλ7 y un segmento del gen Cλ1 de roedor. En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende la inserción de los segmentos de genes Vλ humanos Vλ5-52 a Vλ3-1, al menos los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6, el segmento del gen Jλ humano Jλ7 y un segmento del gen Cλ1 de roedor. En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno proporcionado en el presente documento comprende la inserción de los segmentos de genes Vλ humanos Vλ5-52 a Vλ1-40 y Vλ3-27 a Vλ3-1, al menos los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6, el segmento del gen Jλ humano Jλ7 y un segmento del gen Cλ1 de roedor. En algunas realizaciones determinadas, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre Vλ5-52 a Vλ1-40 y Vλ3-27 a Vλ3-1 humanos, ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3 y Jλ6-Cλ6, y ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba (o 5') del segmento del gen Jλ humano Jλ7.

50 En algunas realizaciones, un segmento de gen Cλ de roedor es o comprende un segmento de gen Cλ murino (p. ej., de ratón o rata). En algunas realizaciones, un segmento de gen Cλ de roedor es o comprende un segmento de gen Cλ de rata. En algunas realizaciones, un segmento de gen Cλ de roedor es o comprende un segmento de gen Cλ de ratón. En algunas realizaciones determinadas, un segmento de gen Cλ de roedor es un segmento del gen Cλ1 de ratón.

55 En algunas realizaciones, un gen Cλ de ratón comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a un gen Cλ de ratón seleccionado del grupo que consiste en un Cλ1 de ratón, Cλ2 de ratón y Cλ3 de ratón. En algunas realizaciones determinadas, un gen Cλ1 de ratón es o comprende la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones determinadas, un gen Cλ2 de ratón es o comprende la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones determinadas, un gen Cλ3 de ratón es o comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones determinadas, un gen Cλ de ratón comprende una secuencia que es idéntica a un gen Cλ1 de ratón.

60 En algunas realizaciones, un gen Cλ de rata comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a un gen Cλ de rata seleccionado del grupo que consiste en un gen Cλ1 de rata, Cλ2 de rata, Cλ3 de rata y un Cλ4 de rata. En algunas realizaciones determinadas, un gen Cλ1 de rata es o comprende la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones determinadas, un gen Cλ2 de rata es o comprende la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones determinadas, un gen Cλ3 de rata es o comprende la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones determinadas, un gen

CL4 de rata es o comprende la SEQ ID NO: 13.

5 En algunas realizaciones de un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados, el genoma de la línea germinal o el genoma de dicho roedor, célula de roedor o tejido de roedor comprende además (i) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; o (ii) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>k</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>k</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> humanos están operativamente unidos a una región C<sub>k</sub> de inmunoglobulina de roedor.

15 En algunas realizaciones, los uno o más segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos insertados reemplazan a los segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> de roedor. En determinadas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor es una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor endógena. En algunas realizaciones, un locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende la inserción de los segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos de V<sub>H</sub>3-74 a V<sub>H</sub>6-1, los segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos de D<sub>H</sub>1-1 a D<sub>H</sub>7-27 y los segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos J<sub>H</sub>1-J<sub>H</sub>6. En determinadas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece (se produce) de forma natural entre V<sub>H</sub>3-74 a V<sub>H</sub>6-1 humanos, ADN humano no codificante que aparece (se produce) de forma natural entre D<sub>H</sub>1-1 a D<sub>H</sub>7-27 humanos, y ADN humano no codificante que aparece (se produce) de forma natural entre J<sub>H</sub>1-J<sub>H</sub>6 humanos. En algunas realizaciones, un locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende la inserción de todos los segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos funcionales, todos los segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos funcionales y todos los segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos funcionales.

20 En algunas realizaciones, un locus de cadena pesada de inmunoglobulina carece de un gen Adam6 no humano endógeno. En algunas realizaciones, un locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende además una inserción de una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 no humanos. En algunas realizaciones, una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor se insertan entre un primer y un segundo segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos. En algunas realizaciones, un primer segmento de gen V<sub>H</sub> humano es V<sub>H</sub>1-2 humano y un segundo segmento de gen V<sub>H</sub> humano es V<sub>H</sub>6-1 humano. En algunas realizaciones, una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor se insertan entre un segmento de gen V<sub>H</sub> humano y un segmento de gen D<sub>H</sub> humano. En algunas realizaciones, una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor se insertan en el lugar de un pseudogén Adam6 humano.

30 En algunas realizaciones, los segmentos de genes V<sub>k</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>k</sub> humanos insertados reemplazan los segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> de roedor. En algunas realizaciones determinadas, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> humanos, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una región C<sub>k</sub> de inmunoglobulina de roedor es una región C<sub>k</sub> de roedor endógena. En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina comprende la inserción de la duplicación proximal de V<sub>k</sub>, en su totalidad o en parte, de un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera de inmunoglobulina κ comprende la inserción de los segmentos de genes V<sub>k</sub> humanos de V<sub>k</sub>2-40 a V<sub>k</sub>4-1 y los segmentos de genes J<sub>k</sub> humanos de J<sub>k</sub>1-J<sub>k</sub>5. En algunas realizaciones determinadas, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre V<sub>k</sub>2-40 a V<sub>k</sub>4-1 humanos, y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre J<sub>k</sub>1-J<sub>k</sub>5 humanos.

40 En algunas realizaciones de un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionado en el presente documento, el roedor, la célula de roedor o el tejido de roedor es heterocigoto u homocigoto para un locus de cadena pesada de inmunoglobulina como se describe en el presente documento (p. ej., un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno como se describe en el presente documento).

45 En algunas realizaciones de un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionado en el presente documento, el roedor, la célula de roedor o el tejido de roedor es heterocigoto u homocigoto para un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina como se describe en el presente documento (p. ej., un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógeno como se describe en el presente documento).

50 En algunas realizaciones de un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionado en el presente documento, el roedor, la célula de roedor o el tejido de roedor es heterocigoto u homocigoto para un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina como se describe en el presente documento (p. ej., un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno como se describe en el presente documento).

5 En algunas realizaciones de un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionado en el presente documento, el genoma de la línea germinal de dicho roedor, célula de roedor o tejido de roedor comprende además la inserción de una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 no humanos, y el animal es heterocigoto u homocigoto para dicha inserción.

En algunas realizaciones, una célula de roedor es un linfocito de roedor. En algunas realizaciones, una célula de roedor se selecciona de un linfocito B, célula dendrítica, macrófago, monocito y un linfocito T.

10 En algunas realizaciones, una célula de roedor es una célula madre embrionaria (ES, por sus siglas en inglés) de roedor. En determinadas realizaciones, una célula ES de roedor es una célula ES de ratón (p. ej., de una cepa 129, cepa C57BL, BALB/co una mezcla de las mismas). En algunas realizaciones determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es una mezcla de las cepas 129 y C57BL. En algunas realizaciones determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es una mezcla de las cepas 129, C57BL y BALB/c.

20 En algunas realizaciones, se proporciona el uso de una célula ES de roedor descrita en el presente documento para producir un roedor. En determinadas realizaciones, una célula ES de roedor es una célula ES de ratón y se usa para producir un ratón que comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina modificado por ingeniería como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, una célula ES de roedor es una célula ES de rata y se usa para producir una rata que comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina modificado por ingeniería como se describe en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, un tejido de roedor se selecciona de adiposo, vejiga, cerebro, mama, médula ósea, ojo, corazón, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, páncreas, plasma, suero, piel, bazo, estómago, timo, testículos, óvulo y una combinación de los mismos.

30 En algunas realizaciones, se proporciona una célula inmortalizada realizada, generada, producida u obtenida a partir de una célula o tejido de roedor aislados como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, se proporciona un embrión de roedor realizado, generado, producido u obtenido de una célula ES de roedor como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones determinadas, un embrión de roedor es un embrión de ratón; en algunas realizaciones, un embrión de rata.

35 En algunas realizaciones, se proporciona un kit que comprende un roedor, célula de roedor, tejido de roedor, célula inmortalizada, célula ES de roedor o embrión de roedor como se describe en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, se proporciona un kit como se describe en el presente documento para su uso en la fabricación y/o desarrollo de un fármaco (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) para terapia o diagnóstico.

En algunas realizaciones, se proporciona un kit como se describe en el presente documento para su uso en la fabricación y/o desarrollo de un fármaco (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

45 En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un animal no humano cuyo genoma de la línea germinal comprende el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería, comprendiendo el método:

50 (a) introducir un fragmento de ADN en una célula madre embrionaria de roedor, comprendiendo el fragmento de ADN una secuencia de nucleótidos que incluye:

- (i) uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos;
- (ii) uno o más segmentos de genes J $\lambda$  humanos;
- (iii) uno o más segmentos de genes C $\lambda$  humanos;
- 55 (iv) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina (E $\lambda$ ) de roedor;
- (v) tres E $\lambda$  humanos; y
- (vi) un segmento de gen C $\lambda$  de roedor;

60 en donde (i) y (ii) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos de genes de región constante de (iii) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno, y en donde (i) y (ii) también son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen C $\lambda$  de roedor de (vi) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno;

(b) obtener la célula madre embrionaria de roedor generada en (a); y

65 (c) crear un roedor utilizando la célula madre embrionaria de roedor de (b).

También se divulga un método para producir un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería, en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos, uno o más segmentos de genes  $J\lambda$  humanos y uno o más segmentos de genes  $C\lambda$  humanos, en donde el uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  y  $J\lambda$  humanos están operativamente unidos a un segmento de gen  $C\lambda$  de roedor y/o humano, y en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende además uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina ( $E\lambda$ ) de roedor, y tres potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina ( $E\lambda$ ) humanos, se proporciona, el método que comprende modificar el genoma de la línea germinal de un roedor para que comprenda un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina modificado por ingeniería que incluye la inserción de uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos, uno o más segmentos de genes  $J\lambda$  humanos y uno o más segmentos de genes  $C\lambda$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V\lambda$  y  $J\lambda$  humanos están operativamente unidos a un segmento de gen  $C\lambda$  humano y de roedor, y en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería comprende además uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina ( $E\lambda$ ) de roedor y tres potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina ( $E\lambda$ ) humanos, produciendo, de este modo, dicho roedor.

En algunas realizaciones de un método para producir un roedor proporcionado en el presente documento, uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos incluyen  $V\lambda 4-69$  a  $V\lambda 3-1$ ,  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 3-1$  o  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$ . En algunas realizaciones de un método para producir un roedor, uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos incluyen  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 1-40$  y/o  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$ . En algunas realizaciones determinadas de un método para producir un roedor, el uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 1-40$  y/o  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$  humanos. En algunas realizaciones de un método para producir un roedor, uno o más segmentos de genes  $J\lambda$  humanos y uno o más segmentos de genes  $C\lambda$  humanos incluyen los pares de segmentos de genes  $J\lambda-C\lambda$  humanos  $J\lambda 1-C\lambda 1$ ,  $J\lambda 2-C\lambda 2$ ,  $J\lambda 3-C\lambda 3$ ,  $J\lambda 6-C\lambda 6$  y el segmento del gen  $J\lambda 7$  humano. En algunas realizaciones determinadas de un método para producir un roedor, los pares de segmentos de genes  $J\lambda-C\lambda$  humanos  $J\lambda 1-C\lambda 1$ ,  $J\lambda 2-C\lambda 2$ ,  $J\lambda 3-C\lambda 3$  y  $J\lambda 6-C\lambda 6$  incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes  $J\lambda$  y  $C\lambda$  humanos, y el segmento del gen  $J\lambda 7$  humano incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba (o 5') de  $J\lambda 7$  humano.

En algunas realizaciones determinadas de un método de producción de un roedor proporcionado en el presente documento, la inserción de los segmentos de genes  $V\lambda$  humanos  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 1-40$  y  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$  incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los segmentos de genes  $V\lambda$  humanos, la inserción de pares de segmentos de genes  $J\lambda-C\lambda$  humanos  $J\lambda 1-C\lambda 1$ ,  $J\lambda 2-C\lambda 2$ ,  $J\lambda 3-C\lambda 3$  y  $J\lambda 6-C\lambda 6$  incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes  $J\lambda-C\lambda$  humanos, y la inserción del segmento del gen  $J\lambda 7$  humano incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba (o 5') de  $J\lambda 7$  humano.

En algunas realizaciones de un método para producir un roedor proporcionado en el presente documento, un segmento de gen  $C\lambda$  de roedor es un segmento del gen  $C\lambda 1$  de ratón.

En algunas realizaciones de un método para producir un roedor proporcionado en el presente documento, un fragmento de ADN comprende además uno o más marcadores de selección. En algunas realizaciones de un método para producir un roedor, un fragmento de ADN comprende además uno o más sitios de recombinación específicos de sitio. En algunas realizaciones determinadas de un método de producción de un roedor proporcionado en el presente documento, un fragmento de ADN comprende además uno o más conjuntos de sitios de recombinación específicos de sitio que se recombinan con la misma recombinasa. En algunas realizaciones determinadas de un método para producir un roedor, un fragmento de ADN comprende además uno o más conjuntos de sitios de recombinación específicos de sitio que se recombinan con diferentes recombinasas.

En algunas realizaciones de un método para producir un roedor proporcionado en el presente documento, se introduce un fragmento de ADN en una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende (i) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; o (ii) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  humanos están operativamente unidos a una región  $C_k$  de inmunoglobulina de roedor.

En algunas realizaciones de un método para producir un roedor proporcionado en el presente documento, se introduce un fragmento de ADN en una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende (i) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre; o (ii) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno de tipo

silvestre; y en donde el método comprende además una etapa de criar un ratón realizado, generado, producido u obtenido a partir de dicha célula madre embrionaria de roedor con un segundo ratón.

5 En algunas realizaciones de un método para producir un roedor proporcionado en el presente documento, la modificación del genoma de la línea germinal de un roedor para que comprenda un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina modificado por ingeniería se lleva a cabo en una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende además (i) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; o (ii) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  humanos están operativamente unidos a una región  $C_k$  de inmunoglobulina de roedor.

20 En algunas realizaciones determinadas de un método de producción de un roedor proporcionado en el presente documento, la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre el uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre el uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos. En algunas realizaciones determinadas de un método de producción de un roedor proporcionado en el presente documento, la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos.

30 En algunas realizaciones de un método para producir un roedor proporcionado en el presente documento, la modificación del genoma de la línea germinal de un roedor para que comprenda un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina modificado por ingeniería se lleva a cabo en una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende (i) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre; o (ii) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre; y en donde el método comprende además una etapa de criar un ratón realizado, generado, producido u obtenido a partir de dicha célula madre embrionaria de roedor con un segundo ratón.

40 En algunas realizaciones, un ratón como se describe en el presente documento tiene un genoma de la línea germinal que comprende locus de IgH e Igk de tipo silvestre, locus de IgH e Igk humanizados homocigotos o heterocigotos, cuyo locus de IgH humanizado homocigoto o heterocigoto contiene una secuencia que codifica Adam6 de roedor insertada, o un locus de IgH humanizado homocigoto o heterocigoto (con o sin inserción de la secuencia que codifica Adam6) y un locus de Igk homocigoto o heterocigoto inactivado.

45 En algunas realizaciones, se proporciona un roedor realizado, generado, producido, obtenido u obtenible a partir de un método como se describe en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un anticuerpo en un roedor, comprendiendo el método las etapas de (a) inmunizar a un roedor como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) mantener al roedor en condiciones suficientes para que el roedor produzca una respuesta inmunitaria al antígeno de interés, y (c) recuperar un anticuerpo del roedor, o una célula del roedor, que se une al antígeno de interés. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera lambda humana.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera lambda humana en un roedor, comprendiendo el método las etapas de (a) inmunizar a un roedor como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) mantener al roedor en condiciones suficientes para que el roedor produzca una respuesta inmunitaria al antígeno de interés, y (c) recuperar un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena ligera lambda humana a partir del roedor o una célula de roedor. En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada humana del roedor, o una célula de roedor.

60 En algunas realizaciones de un método para producir un anticuerpo o un ácido nucleico en un roedor, una célula de roedor es un linfocito B. En algunas realizaciones de un método para producir un anticuerpo o un ácido nucleico en un roedor, una célula de roedor es un hibridoma.

65 En algunas realizaciones de un método para producir un anticuerpo en un roedor, un anticuerpo recuperado de un roedor o una célula de roedor, que se une al antígeno de interés comprende un dominio variable de cadena pesada humana y un dominio variable de cadena ligera lambda humana.

5 En algunas realizaciones, a de un método para producir un anticuerpo o un ácido nucleico en un roedor, un dominio variable de cadena pesada humana incluye un segmento de gen  $V_H$  humano reordenado seleccionado del grupo formado por  $V_{H3-74}$ ,  $V_{H3-73}$ ,  $V_{H3-72}$ ,  $V_{H2-70}$ ,  $V_{H1-69}$ ,  $V_{H3-66}$ ,  $V_{H3-64}$ ,  $V_{H4-61}$ ,  $V_{H4-59}$ ,  $V_{H1-58}$ ,  $V_{H3-53}$ ,  $V_{H5-51}$ ,  $V_{H3-49}$ ,  $V_{H3-48}$ ,  $V_{H1-46}$ ,  $V_{H1-45}$ ,  $V_{H3-43}$ ,  $V_{H4-39}$ ,  $V_{H4-34}$ ,  $V_{H3-33}$ ,  $V_{H4-31}$ ,  $V_{H3-30}$ ,  $V_{H4-28}$ ,  $V_{H2-26}$ ,  $V_{H1-24}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-20}$ ,  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H3-15}$ ,  $V_{H3-13}$ ,  $V_{H3-11}$ ,  $V_{H3-9}$ ,  $V_{H1-8}$ ,  $V_{H3-7}$ ,  $V_{H2-5}$ ,  $V_{H7-4-1}$ ,  $V_{H4-4}$ ,  $V_{H1-3}$ ,  $V_{H1-2}$  y  $V_{H6-1}$ .

10 En algunas realizaciones, a de un método para producir un anticuerpo o un ácido nucleico en un roedor, un dominio variable de cadena ligera lambda humana incluye un segmento de gen  $V_L$  humano reordenado seleccionado del grupo que consiste en  $V_{L4-69}$ ,  $V_{L8-61}$ ,  $V_{L4-60}$ ,  $V_{L6-57}$ ,  $V_{L10-54}$ ,  $V_{L5-52}$ ,  $V_{L1-51}$ ,  $V_{L9-49}$ ,  $V_{L1-47}$ ,  $V_{L7-46}$ ,  $V_{L5-45}$ ,  $V_{L1-44}$ ,  $V_{L7-43}$ ,  $V_{L1-40}$ ,  $V_{L5-39}$ ,  $V_{L5-37}$ ,  $V_{L1-36}$ ,  $V_{L3-27}$ ,  $V_{L3-25}$ ,  $V_{L2-23}$ ,  $V_{L3-22}$ ,  $V_{L3-21}$ ,  $V_{L3-19}$ ,  $V_{L2-18}$ ,  $V_{L3-16}$ ,  $V_{L2-14}$ ,  $V_{L3-12}$ ,  $V_{L2-11}$ ,  $V_{L3-10}$ ,  $V_{L3-9}$ ,  $V_{L2-8}$ ,  $V_{L4-3}$  y  $V_{L3-1}$ .

15 En algunas realizaciones, se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un roedor, comprendiendo el método las etapas de (a) inmunizar a un roedor como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, (b) mantener al roedor en condiciones suficientes para que el roedor produzca una respuesta inmunitaria al antígeno de interés,

20 También se divulga un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno homocigoto que comprende la inserción de (i) los segmentos de genes  $V_L$  humanos  $V_{L4-69}$  a  $V_{L3-1}$ ,  $V_{L5-52}$  a  $V_{L3-1}$ ,  $V_{L3-27}$  a  $V_{L3-1}$ , o  $V_{L5-52}$  a  $V_{L1-40}$  y  $V_{L3-27}$  a  $V_{L3-1}$ , (ii) los pares de segmentos de genes  $J_L-C_L$  humanos  $J_{L1-C_{L1}}$ ,  $J_{L2-C_{L2}}$ ,  $J_{L3-C_{L3}}$  y  $J_{L6-C_{L6}}$ , (iii) el del gen segmento  $J_L$  humano  $J_{L7}$  y (iv) tres potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina humana (o un potenciador de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina humana que tiene tres elementos de secuencia); en donde (i) - (iv) están operativamente unidos entre sí y la inserción está arriba de un segmento de gen  $C_L$  de roedor, y en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno carece de un  $E_{L2-4}$  de inmunoglobulina de roedor endógeno.

30 En algunas realizaciones, se proporciona un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno que comprende:

- (i) los segmentos de genes  $V_L$  humanos  $V_{L5-52}$  a  $V_{L1-40}$  y  $V_{L3-27}$  a  $V_{L3-1}$ ;
- (ii) los pares de segmentos de genes  $J_L-C_L$  humanos  $J_{L1-C_{L1}}$ ,  $J_{L2-C_{L2}}$ ,  $J_{L3-C_{L3}}$  y  $J_{L6-C_{L6}}$ ;
- (iii) un segmento del gen  $J_L$  humano  $J_{L7}$ ;
- (iv) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina de roedor ( $E_L$ );
- 35 (v) tres  $E_L$  humanos; y
- (vi) un segmento de gen  $C_L$  de roedor,

40 en donde los segmentos de genes  $V_L$  humanos de (i) y los segmentos de genes  $J_L$  humanos de (ii) y (iii) son capaces de reordenarse para formar genes de la región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con los segmentos de genes  $C_L$  humanos de (ii) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno y los segmentos de genes  $V_L$  humanos de (i) y los segmentos de genes  $J_L$  humanos de (ii) y (iii) son capaces de reordenarse para formar genes de la región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen  $C_L$  de roedor de (vi) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno, y en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno carece de un  $E_{L2-4}$  de inmunoglobulina de roedor endógeno,

45 en donde los segmentos de genes  $V_L$  humanos  $V_{L5-52}$  a  $V_{L1-40}$  y  $V_{L3-27}$  a  $V_{L3-1}$  incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los segmentos de genes  $V_L$  humanos, los pares de segmentos de genes  $J_L-C_L$  humanos  $J_{L1-C_{L1}}$ ,  $J_{L2-C_{L2}}$ ,  $J_{L3-C_{L3}}$  y  $J_{L6-C_{L6}}$  incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes  $J_L-C_L$  humanos, y el ADN humano no codificante cadena arriba del segmento del gen  $J_L$  humano  $J_{L7}$  incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba del  $J_{L7}$  humano, y

50 en donde dicho roedor es homocigoto en el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno.

55 En algunas realizaciones determinadas de un roedor proporcionado, un gen (o segmento de gen)  $C_L$  de roedor es un gen (o segmento de gen)  $C_{J1}$  de ratón. En algunas realizaciones determinadas de un roedor proporcionado, un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende además potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina de roedor endógenos  $E_L$  y  $E_{L3-1}$ . En algunas realizaciones determinadas de un roedor proporcionado, un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende una delección de los segmentos de genes  $V_{L2-V_{L3}}$ - $J_{L2-C_{L2}}$ - $J_{L4P-C_{L4P}}$  y los segmentos de genes  $V_{L1-J_{L3}}$ - $J_{L3P-C_{L3}}$ - $J_{L1}$  de roedor endógenos.

60 En algunas realizaciones, se proporciona un roedor, una célula de roedor o tejido de roedor como se describe en el presente documento para su uso en la fabricación y/o desarrollo de un fármaco (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo) para terapia o diagnóstico.

65 En algunas realizaciones, se proporciona un roedor, una célula de roedor o tejido de roedor como se describe en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

En algunas realizaciones, se proporciona el uso de un roedor, células no humanas o tejidos no humanos como se describe en el presente documento en la fabricación y/o desarrollo de un fármaco o vacuna para su uso en medicina, tal como el uso como medicamento.

5 En algunas realizaciones, se proporciona el uso de un roedor o célula como se describe en el presente documento en la fabricación y/o desarrollo de un anticuerpo o fragmento del mismo.

10 En diversas realizaciones, un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados como se describe en el presente documento es un ratón, célula de ratón o tejido de ratón; en algunas realizaciones, una rata, célula de rata o tejido de rata. En algunas realizaciones, un ratón, célula de ratón o tejido de ratón como se describe en el presente documento comprende una base genética que incluye una cepa 129, una cepa BALB/c, una cepa C57BL/6, una cepa mixta 129xC57BL/6 o combinaciones de las mismas.

15 Como se usa en la presente solicitud, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Cualquier numeral usado en la presente solicitud usado con o sin "alrededor de" o "aproximadamente" pretende abarcar cualquier fluctuación normal apreciada por una persona habitualmente experta en la materia relevante.

### 20 Breve descripción del dibujo

El dibujo incluido en el presente documento, que está compuesto por las siguientes figuras, es solo para fines de ilustración y no de limitación.

25 La **Figura 1** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de una estrategia ejemplar para la construcción de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno modificado por ingeniería en un roedor caracterizado por la presencia de una pluralidad de secuencias codificantes de V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos que están operativamente unidas entre sí y operativamente unidas a una región C $\lambda$  de roedor (o gen C $\lambda$  de roedor). Tal como se representa gráficamente, se muestran cinco vectores de direccionamiento por separado (6286, 6571, 6596, 6597 y 6680) con diversas cantidades de material genético de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana y se insertan secuencialmente en un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor endógeno (p. ej., ratón) (mostrado en la parte superior). Se insertó un primer vector de direccionamiento (6286) cadena abajo de una región C $\lambda$ 1 de roedor y se construyó para que contuviera una región (o secuencia) potenciadora de Ig $\lambda$  humana modular (E $\lambda$ ) caracterizada por tres elementos de secuencia. Se insertó un segundo vector de direccionamiento (6571) cadena arriba de una región C $\lambda$ 1 de roedor y se modificó por ingeniería para que contuviera cinco segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales, cuatro pares de segmentos de genes J $\lambda$ -C $\lambda$  humanos funcionales y un segmento del gen J $\lambda$ 7 humano (J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 4-C $\lambda$ 4-J $\lambda$ 5-C $\lambda$ 5-J $\lambda$ 6-C $\lambda$ 6-J $\lambda$ 7 humanos). Los vectores de direccionamiento tercero (6596) y cuarto (6597) incluyeron conjuntos adicionales de segmentos de genes V $\lambda$  humanos adicionales (once y nueve, respectivamente) que se añaden secuencialmente al contenido total de los segmento de genes V $\lambda$  humanos del locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de ratón endógeno después del direccionamiento exitoso del primer vector de direccionamiento. Ambos vectores de direccionamiento incluían regiones de solapamiento (rectángulos rellenos con rayas) en los extremos 3' para facilitar la recombinación homóloga con el extremo 5' del vector de direccionamiento anterior una vez integrado en el locus de cadena ligera Ig $\lambda$  de ratón endógeno. También se muestra un quinto vector de direccionamiento alternativo (6680) que tiene el mismo material genético que el vector de direccionamiento 6597 excepto que este vector de direccionamiento alternativo incluía un brazo de homología 5' que tiene una secuencia que es idéntica a la secuencia 5' (o cadena arriba) de un segmento del gen V $\lambda$ 2 de roedor, facilitando así la delección de los segmentos de genes V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4P-C $\lambda$ 4P-E $\lambda$ 2-4-V $\lambda$ 1-j $\lambda$ 3-J $\lambda$ 3P-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1 endógenos tras la recombinación homóloga con el vector de direccionamiento. Salvo que se indique lo contrario, los símbolos cerrados indican segmentos y/o secuencias de genes de roedores, mientras que los símbolos abiertos indican segmentos y/o secuencias de genes humanos. También se muestran los sitios de reconocimiento de recombinación específicos de sitio (p. ej., *loxP*, *Frt*) que flanquean los casetes de selección (HYG: gen de resistencia a Higromicina [HYG<sup>R</sup>] bajo control transcripcional de un promotor de ubiquitina; NEO: gen de resistencia a Neomicina [NEO<sup>R</sup>] bajo control transcripcional de un promotor de ubiquitina). Las ubicaciones de las uniones de nucleótidos seleccionadas se marcan con una línea debajo de cada unión y cada una está indicada por la SEQ ID NO.

55 La **Figura 2** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de alelos de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor ejemplares después de la inserción secuencial de vectores de direccionamiento descritos en el alelo 1.6597 del Ejemplo: un alelo de cadena ligera Ig $\lambda$  que contiene 25 segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales, cuatro pares de segmentos de genes J $\lambda$ -C $\lambda$  humanos funcionales y un segmento del gen J $\lambda$ 7 humano operativamente unido a una región C $\lambda$  de roedor (p. ej., una región C $\lambda$ 1 de ratón), y cuyo locus de cadena ligera Ig $\lambda$  incluye además segmentos de genes V $\lambda$ -J $\lambda$ -C $\lambda$  endógenos, tres (es decir, E2.4, E y E3.1) regiones (o secuencias) potenciadoras de Ig $\lambda$  endógenas y una región (o secuencia) potenciadora de Ig $\lambda$  humana modular caracterizada por tres elementos de secuencia. Alelo 6680: un alelo de cadena ligera Ig $\lambda$  después de la delección específica de sitio de los segmentos de genes V $\lambda$ -J $\lambda$ -C $\lambda$  endógenos y el potenciador de Ig $\lambda$  E $\lambda$ 2-4, cuyo alelo de cadena ligera Ig $\lambda$  contiene 25 segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales, cuatro pares de segmentos de genes J $\lambda$ -C $\lambda$  humanos funcionales y un segmento del gen J $\lambda$ 7 humano operativamente unido a una región C $\lambda$  de roedor (p. ej., una región C $\lambda$ 1 de ratón), cuyo locus de cadena ligera Ig $\lambda$  incluye además dos (es decir, E y E3.1) regiones (o secuencias) potenciadoras de Ig $\lambda$  endógenas y una región (o secuencia, véase anteriormente) potenciadora de Ig $\lambda$  humana

modular. Salvo que se indique lo contrario, los símbolos cerrados indican segmentos y/o secuencias de genes de roedores, mientras que los símbolos abiertos indican segmentos y/o secuencias de genes humanos. Se muestran los sitios de reconocimiento de recombinación específicos de sitio (p. ej., Frt) que flanquean los casetes de selección (HYG: gen de resistencia a Higromicina [HYG<sup>R</sup>] bajo el control transcripcional de un promotor de ubiquitina). Las líneas discontinuas indican la región delecionada entre dos alelos de Igλ ilustrados. Las ubicaciones de las uniones de nucleótidos seleccionadas se marcan con una línea debajo de cada unión y cada una está indicada por la SEQ ID NO.

La **Figura 3** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de una estrategia ejemplar para la construcción de un locus de cadena ligera Igλ endógeno modificado por ingeniería en un roedor caracterizado por la presencia de una pluralidad de secuencias codificantes de Vλ, Jλ y Cλ humanos que están operativamente unidas entre sí y operativamente unidas a una región Cλ de roedor. Tal como se representa gráficamente, se muestran dos vectores de direccionamiento diferentes con diversas cantidades de material genético de un locus de cadena ligera Igλ humana y se insertan simultáneamente en un locus de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., ratón) modificado por ingeniería (mostrado en la parte superior) que contiene cinco segmentos de genes Vλ humanos, un grupo Jλ-Cλ humano y un gen Cλ1 de ratón. El vector de direccionamiento 6596 está modificado para eliminar un casete de selección de Neomicina e incorporar secuencias solapantes (rectángulos rellenos con rayas) en los extremos 5' y 3' para proporcionar regiones de homología para facilitar la recombinación con una secuencia humana correspondiente. Un segundo vector de direccionamiento está diseñado para contener una región de solapamiento en el extremo 3' de la construcción (rectángulos rellenos con rayas) que comparte homología de secuencia con el vector de direccionamiento 6596 modificado (vector de direccionamiento 6596 recortado), lo que facilita la recombinación homóloga con el extremo 5' del vector de direccionamiento 6596 recortado. Estos dos vectores de direccionamiento incluyen conjuntos adicionales de segmentos de genes Vλ humanos adicionales (once y nueve, respectivamente) que se suman secuencialmente al contenido total de segmentos de genes Vλ humanos del locus de cadena ligera Igλ de ratón endógeno después del direccionamiento exitoso de un primer vector de direccionamiento. El segundo vector de direccionamiento incluyó un brazo de homología 5' que tenía una secuencia que es idéntica a la secuencia 5' (o cadena arriba) de un segmento del gen Vλ2 de roedor, facilitando así la deleción de los segmentos de genes Vλ2-Vλ3-Jλ2-Cλ2-Jλ4P-Cλ4P-Eλ2-4-Vλ1-Jλ3-Jλ3P-Cλ3-Jλ1 endógenos tras la recombinación homóloga con el vector de direccionamiento. Los dos vectores de direccionamiento se someten a electroporación de manera conjunta con ARN guía (ARNg) para facilitar la integración en el locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería, que están marcados con una flecha cerca de cada ubicación de secuencia y cada uno indicado por SEQ ID NO. Salvo que se indique lo contrario, los símbolos cerrados indican segmentos y/o secuencias de genes de roedores, mientras que los símbolos abiertos indican segmentos y/o secuencias de genes humanos. También se muestran los sitios de reconocimiento de recombinación específicos de sitio (p. ej., *loxP*, Frt) que flanquean los casetes de selección (HYG: gen de resistencia a Higromicina [HYG<sup>R</sup>] bajo control transcripcional de un promotor de ubiquitina; NEO: gen de resistencia a Neomicina [NEO<sup>R</sup>] bajo control transcripcional de un promotor de ubiquitina). Las ubicaciones de las uniones de nucleótidos seleccionadas se marcan con una línea debajo de cada unión y cada una está indicada por la SEQ ID NO.

La **Figura 4** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de los alelos de cadena ligera Igλ de roedor de tipo silvestre y modificados por ingeniería ejemplares empleados en los experimentos descritos en el Ejemplo 3. Alelo de tipo silvestre: un locus de cadena ligera Igλ de ratón de tipo silvestre (véase también, p. ej., la Figura 2 de la Patente de EE.UU. N.º 9.006.511); Alelo 6571: un alelo de cadena ligera Igλ que contiene 5 segmentos de genes Vλ humanos funcionales, cuatro pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos funcionales y un segmento del gen Jλ7 humano operativamente unido a una región Cλ de roedor (p. ej., una región Cλ1 de ratón), y cuyo locus de cadena ligera Igλ incluye además segmentos de genes Vλ-Jλ-Cλ endógenos, tres regiones (o secuencias) potenciadoras de Igλ endógenas y una región (o secuencia, véase anteriormente) potenciadora de Igλ humana modular. Alelo 6597: véase anteriormente; Alelo 6680: véase anteriormente. Las ubicaciones de las uniones de nucleótidos seleccionadas se marcan con una línea debajo de cada unión y cada una está indicada por la SEQ ID NO.

Las **Figuras 5A y 5B** muestran gráficos de contorno representativos que indican esplenocitos seleccionados de células sueltas (A) que muestran la expresión de CD19 (eje y) y CD3 (eje x), y el número absoluto de células por bazo (B) recolectadas de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés).

Las **Figuras 6A y 6B** muestran gráficos de contorno representativos que indican linfocitos B maduros y de transición en esplenocitos seleccionados por CD19<sup>+</sup> (A) que muestran la expresión de IgD (eje y) e IgM (eje x), y el número absoluto de células por bazo (B) cosechadas de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT). Las subpoblaciones específicas de linfocitos B se indican en cada gráfico de puntos (p. ej., maduro, de transición).

Las **Figuras 7A y 7B** muestran gráficos de contorno representativos que indican expresión de Igλ de ratón (mIgλ, eje y), Igk de ratón (mIgk, eje x) o Igλ humana, (hIgλ, eje y) en esplenocitos seleccionados por CD19<sup>+</sup> cosechados de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT).

Las **Figuras 8A y 8B** muestran gráficos de contorno representativos que indican médula ósea seleccionada de células sueltas (A) que muestran la expresión de CD19 (eje y) y CD3 (eje x), y el número absoluto de células por fémur (B) recolectadas de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés).

Las **Figuras 9A y 9B** muestran gráficos de contorno representativos que indican médula ósea seleccionada de

CD19<sup>+</sup>IgM<sup>low</sup>B220<sup>int</sup> (A) que muestran la expresión de c-kit (eje y) y CD43 (eje x), y el número absoluto de células por fémur (B) recolectadas de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés). Las subpoblaciones de linfocitos B específicas se indican en cada gráfico de puntos (p. ej., Pro-B, pre-B).

5 Las **Figuras 10A y 10B** muestran gráficos de contorno representativos que indican médula ósea seleccionada de CD19<sup>+</sup> (A) que muestran la expresión de IgM (eje y) y B220 (eje x), y el número absoluto de células por fémur (B) recolectadas de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés). Las subpoblaciones específicas de linfocitos B se indican en cada gráfico de puntos (p. ej., inmaduro, maduro, pre y pro-B).

10 Las **Figuras 11A y 11B** muestran gráficos de contorno representativos que indican médula ósea inmadura (seleccionada de CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>int</sup>) que muestran la expresión de Igλ de ratón (mIglλ, eje y), Igκ de ratón (mIlgκ, eje x) o Igλ humana (hIglλ, eje y) de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT).

15 Las **Figuras 12A y 12B** muestran gráficos de contorno representativos que indican médula ósea madura (seleccionada de CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) que muestran la expresión de Igλ de ratón (mIglλ, eje y), Igκ de ratón (mIlgκ, eje x) o Igλ humana (hIglλ, eje y) de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT).

20 La **Figura 13** muestra el porcentaje medio representativo de linfocitos B que expresan Igκ (% de κ C) y que expresan Igλ humana (% de λC hum) en el bazo, médula ósea inmadura (BM inmadura) y médula ósea madura (BM madura) de cepas de ratones modificados por ingeniería seleccionadas como se describe en el presente documento. Los datos se presentan como valores medios con la desviación estándar también indicada. 6680HO/VIHO/Adam6 HO: una cepa de ratón modificada por ingeniería que contiene un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería homocigoto diseñado para contener 25 segmentos de genes Vλ humanos funcionales, cuatro pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos funcionales y un segmento del gen Jλ7 humano operativamente unido a una región Cλ de roedor (p. ej., una región Cλ1 de ratón), cuyo locus de cadena ligera Igλ incluye además dos regiones (o secuencias) potenciadoras de Igλ endógenas y una región (o secuencia, véase anteriormente) potenciadora de Igλ humana modular; y locus de IgH e Igκ humanizados homocigotos, cuyo locus de IgH humanizado homocigoto contenía una secuencia codificante de Adam6 de roedor insertada (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940; 6889HO/VI HO/Adam6 HO: una cepa de ratón modificada por ingeniería que contiene un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería homocigoto que contiene 25 segmentos de genes Vλ humanos funcionales, cuatro pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos funcionales y un segmento del gen Jλ7 humano operativamente unido a una región Cλ de roedor (p. ej., una región Cλ1 de ratón), cuyo locus de cadena ligera Igλ incluye además dos regiones (o secuencias) potenciadoras de Igλ endógenas y una región (o secuencia, véase anteriormente) potenciadora de Igλ humana modular; y locus de IgH e Igκ humanizados homocigotos, cuyo locus de IgH humanizado homocigoto contenía una secuencia codificante de Adam6 de roedor insertada (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940). El número de ratones para cada cohorte de genotipo mostrada incluyó al menos tres y hasta ocho animales por grupo.

30 Las **Figuras 14A y 14B** muestran inmunotransferencias representativas (transferencias Western) de SDS-PAGE en condiciones no reductoras utilizando suero aislado de ratones modificados por ingeniería homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6680 (6680HO) y compañeros de camada de tipo silvestre (WT) que indican la expresión de cadenas ligeras λ de ratón (B, imagen derecha) o humanas (A, imagen izquierda); cada muestra se cargó en carriles a un volumen de 1,5 µl de suero. PHS: suero humano agrupado a un volumen de 0,25 µl (Labquip Ltd N.º de Cat 9101A). Los pesos moleculares en Kd se indican a la derecha de cada imagen de gel.

35 La **Figura 15A** muestra el uso del segmento de genes Vλ humanos (arriba) y Jλ humanos (abajo) representativo en secuencias cebadas con Cλ humano amplificadas a partir de ARN aislado de esplenocitos cosechados de ratones 6889HET (n = 5).

La **Figura 15B** muestra el uso representativo de segmentos de genes Vλ humanos en secuencias cebadas con Cλ de ratón amplificadas a partir de ARN aislado de esplenocitos cosechados de ratones 6889HET (n = 5).

40 La **Figura 15C** muestra el uso del segmento de genes Vλ humanos (arriba) y Jλ humanos (abajo) representativo en secuencias cebadas con Cλ humano amplificadas a partir de ARN aislado de esplenocitos cosechados de ratones 6889HO/VI HO/Adam6 HO (n = 6). La **Figura 15D** muestra el uso representativo de segmentos de genes Vλ humanos en secuencias cebadas con Cλ de ratón amplificadas a partir de ARN aislado de esplenocitos cosechados de ratones 6889HO/VI HO/Adam6 HO (n = 6).

45 Las **Figuras 16A y 16B** muestran títulos representativos de IgG total (A) e IgG (B) específica de antígeno en suero en los días 0 y 22 recogidos de ratones inmunizados heterocigotos para la inserción de los vectores de direccionamiento 6597 (6597HET, n = 6) o 6680 (6680HET, n = 6) y controles de tipo silvestre inmunizados (WT, n = 6).

50 Las **Figuras 17A-C** muestran los títulos de cadena ligera λ humana representativa (hIglλ, izquierda), de cadena ligera λ de ratón (mIglλ, centro) y de cadena ligera κ de ratón (mIlgκ, derecha) en IgG específica de antígeno en suero en los días 0 y 22 recogidos de ratones inmunizados heterocigotos para la inserción de los vectores de direccionamiento 6597 (6597HET, n = 6) o 6680 (6680HET, n = 6) y controles de tipo silvestre inmunizados (WT, n = 6).

55 Las **Figuras 18A y 18B** muestran gráficos de contorno representativos que indican esplenocitos seleccionados de células sueltas (izquierda) que muestran la expresión de CD19 (eje y) y CD3 (eje x), y linfocitos B totales por bazo (derecha) cosechados de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6889 (6889HO VI HO Adam6 HO) y ratones modificados por ingeniería de referencia (VI). 6889HO/VI HO/Adam6 HO: véase

anteriormente; VI: una cepa de ratones modificada por ingeniería que contiene locus IgH e Igk humanizados homocigotos, cuyo locus de IgH humanizado homocigoto contenía una secuencia codificante de Adam6 de roedor insertada (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940). Los esplenocitos de células sueltas vivos se definieron mediante tinción de viabilidad (Thermo Fisher).

5 La **Figura 19** muestra gráficos de contorno representativos que indican la expresión de Igλ humana (hIgλ, eje y) e Igk de ratón (mlgk, eje x) en esplenocitos seleccionados de CD19<sup>+</sup> cosechados de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6889 (6889HO VI HO Adam6 HO) y ratones modificados por ingeniería de referencia (VI). 6889HO/VI HO/Adam6 HO: véase anteriormente; VI: véase anteriormente.

10 La **Figura 20** muestra gráficos de contorno representativos que indican linfocitos seleccionados de células sueltas de la médula ósea que muestran la expresión de IgM (eje y) y B220 (eje x) cosechados de fémures de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6889 (6889HO VI HO Adam6 HO) y ratones modificados por ingeniería de referencia (VI). 6889HO/VI HO/Adam6 HO: véase anteriormente; VI: véase anteriormente. Las subpoblaciones de linfocitos B maduros e inmaduros se indican en cada gráfico de contorno.

15 La **Figura 21** muestra gráficos de contorno representativos que indican médula ósea inmadura (seleccionada de CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>int</sup>, columna izquierda) y madura (seleccionada de CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>, columna derecha) que muestra la expresión de Igλ humana (hIgλ, eje y) e Igk de ratón (mlgk, eje x) de ratones homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6889 (6889HO VI HO Adam6 HO) y ratones modificados por ingeniería de referencia (VI). 6889HO/VI HO/Adam6 HO: véase anteriormente; VI: véase anteriormente.

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS SELECCIONADAS EN EL LISTADO DE SECUENCIAS

### ADN de Cλ1 de ratón (SEQ ID NO: 1):

GCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTTCCACCTTCCTCTGAAGAGCT  
CGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGATTTCTACCCAGGTGT  
GGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACCTCAGGGTATGGAGAC  
AACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTGAC  
CCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACCTCA  
TGAAGGTCACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCCTGCTGACTGTTCC

25

### Aminoácido DE Cλ1 de ratón (SEQ ID NO: 2):

GQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVVDWKVDGTPVTQGMETTQ  
PSKQSNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSQVTHEGHTVEKSLRADCS

### 30 ADN de Cλ2 de ratón (SEQ ID NO: 3):

GTCAGCCCAAGTCCACTCCCCTCTCACCGTGTTCACCTTCCTCTGAGGAGCT  
CAAGGAAAACAAGCCACACTGGTGTGTCTGATTTCCAACCTTTCCCGAGTGG  
TGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTACACCTATCACCCAGGGTGTGGACAC  
TTCAAATCCCACCAAAGAGGGCAACAAGTTCATGGCCAGCAGCTTCCTACATTT  
GACATCGGACCAGTGGAGATCTCACAAAGTTCATGGCCAGCAGCTTCCTACATTT  
AGGGGACACTGTGGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTCTC

35

### Aminoácido DE Cλ2 de ratón (SEQ ID NO: 4):

GQPKSTPTLTVFPPSSEELKENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPITQGVDTSNP  
TKEGNKFMSSFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDTVEKSLSPAACL

### ADN de Cλ3 de ratón (SEQ ID NO: 5):

GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACCATGTTTCCACCTTCCCCTGAGGAGCT  
CCAGGAAAACAAAGCCCACTCGTGTGTCTGATTTCCAATTTTTCCCAAGTGGT  
5 GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTACACCTATCACCCAGGGTGTGGACACT  
TCAAATCCCACCAAAGAGGACAACAAGTACATGGCCAGCAGCTTCTTACATTTG  
ACATCGGACCAGTGGAGATCTCACAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAA  
GGGGACACTGTGGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTCTC

**Aminoácido DE Cλ3 de ratón (SEQ ID NO: 6):**

GQPKSTPTLTMFPPSPEELQENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPITQGVDTSNP  
5 TKEDNKYMASSFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDTVEKSLSPAACL

**ADN de Cλ1 de rata (SEQ ID NO: 7):**

GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCACCTTCAACTGAGGAGCT  
CCAGGGAAACAAAGCCCACTGGTGTGTCTGATTTCTGATTTCTACCCGAGTGAT  
GTGGAAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTGCACCTATCTCCCAGGGTGTGGACACT  
GCAAATCCCACCAAACAGGGCAAACAATAACATCGCCAGCAGCTTCTTACGTTTG  
ACAGCAGAACAGTGGAGATCTCGCAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAA  
10 GGGAAACTGTGGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTGTC

**Aminoácido DE Cλ1 de rata (SEQ ID NO: 8):**

GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAWKANGAPISQGVDTAN  
15 PTKQGNKYIASSFLRLTAEQWRSRNSFTCQVTHEGNTVEKSLSPAECV

**ADN de Cλ2 de rata (SEQ ID NO: 9):**

ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCTGTTCCCACCTTCCTCTGAAGAGCT  
CAAGACTGACAAGGCTACACTGGTGTGTATGGTGACAGATTTCTACCCTGGTGTT  
ATGACAGTGGTCTGGAAGGCAGATGGTACCCCTATCACTCAGGGTGTGGAGACT  
ACCCAGCCTTTCAAACAGAACAACAAGTACATGGCTACCAGCTACCTGCTTTTG  
ACAGCAAAGCATGGGAGACTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCACACTCACGAA  
20 GAGAACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGAGTGTTC

**Aminoácido DE Cλ2 de rata (SEQ ID NO: 10):**

DQPKATPSVTLFPPSSEELKTDKATLVCMVTDYFPGVMTVVWKADGTPITQGVETT  
20 QPFKQNNKYMATSYLLLTAKAWETHSNYSCQVTHEENTVEKSLSRAECS

**ADN de Cλ3 de rata (SEQ ID NO: 11):**

GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCACCTTCAACTGAGGAGCT  
CCAGGGAAACAAAGCCCACTGGTGTGTCTGATTTCTGATTTCTACCCGAGTGAT  
GTGGAAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTGCACCTATCTCCCAGGGTGTGGACACT  
GCAAATCCCACCAAACAGGGCAAACAATAACATCGCCAGCAGCTTCTTACGTTTG  
ACAGCAGAACAGTGGAGATCTCGCAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAA  
25 GGGAAACTGTGGAAAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAGTGTGTC

**Aminoácido DE Cλ3 de rata (SEQ ID NO: 12):**

GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAWKANGAPISQGVDTAN  
PTKQGNKYIASSFLRLTAEQWRSRNSFTQCQVTHEGNTVEKSLSPAECV

**ADN de C14 de rata (SEQ ID NO: 13):**

ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCTGTTCCCACCTTCCTCTGAAGAGCT  
CAAGACTGACAAGGCTACACTGGTGTGTATGGTGACAGATTTCTACCCTGGTGT  
ATGACAGTGGTCTGGAAGGCAGATGGTACCCCTATCACTCAGGGGTGTGGAGACT  
ACCCAGCCTTTCAAACAGAACAACAAGTACATGGCTACCAGCTACCTGCTTTTG  
ACAGCAAAGCATGGGAGACTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCCTCACGAA  
GAGAACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGTGAGTGTTC

5

**Aminoácido DE C14 de rata (SEQ ID NO: 14):**

DQPKATPSVTLFPPSSEELKTDKATLVCMVTDYFPGVMTVVWKADGTPITQGVETT  
QPFKQNNKYMATSYLLLTAKAWETHSNYSCQVTHEENTVEKSLSRAECS

10

**Definiciones**

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas al presente documento y no está limitado por determinadas realizaciones descritas en el presente documento.

15

En general, los términos usados en el presente documento están de acuerdo con su significado entendido en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario. A continuación, se proporcionan definiciones explícitas de determinados términos; significados de estos y otros términos en casos particulares a lo largo de esta memoria descriptiva serán claros para los expertos en la materia a partir del contexto. A lo largo de la memoria descriptiva se establecen definiciones adicionales para los siguientes y otros términos.

20

**Administración:** como se usa en el presente documento, incluye la administración de una composición a un sujeto o sistema (p. ej., a una célula, órgano, tejido, organismo o componente relevante o conjunto de componentes de los mismos). El experto en la materia apreciará que la vía de administración puede variar dependiendo, por ejemplo, del sujeto o sistema al que se administra la composición, de la naturaleza de la composición, del propósito de la administración, etc. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la administración a un sujeto animal (p. ej., a un ser humano o un roedor) puede ser bronquial (incluyendo por instilación bronquial), bucal, entérica, interdérmica, intraarterial, intradérmica, intragástrica, intramedular, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intraventricular, mucosa, nasal, oral, rectal, subcutánea, sublingual, tópica, traqueal (incluyendo por instilación intratraqueal), transdérmica, vaginal y/o vítea. En algunas realizaciones, la administración puede implicar una dosificación intermitente. En algunas realizaciones, la administración puede implicar una dosificación continua (p. ej., perfusión) durante al menos un período de tiempo seleccionado.

25

30

**Mejorar:** como se usa en el presente documento, incluye la prevención, reducción o paliación de un estado o una mejora en el estado de un sujeto. La mejora incluye, pero no requiere la recuperación completa o la prevención completa de una enfermedad, trastorno o afección.

35

**Aproximadamente:** tal como se aplica a uno o más valores de interés, incluye un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En determinadas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que se encuentran comprendidos entre el 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, el 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo por el contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un posible valor).

40

**Biológicamente activo:** como se usa en el presente documento, se refiere a una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, *in vitro* o *in vivo* (p. ej., en un organismo). Por ejemplo, un agente que, cuando está presente en un organismo, tiene un efecto biológico dentro de ese organismo, se considera biológicamente activo. En realizaciones particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina normalmente porción "biológicamente activa".

45

**Comparable:** como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc., que pueden no ser idénticos entre sí, pero que son lo suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos, de modo que se puedan extraer conclusiones razonablemente basándose en las diferencias o similitudes observadas. Las personas expertas en la materia entenderán, en el contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia dada para dos o más de estos agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. para considerarse comparable.

50

**Conservativa:** como se usa en el presente documento, se refiere a casos en los que se describe una sustitución conservativa de aminoácidos, incluyendo una sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que

tiene un grupo R de la cadena lateral con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor para unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: cadenas laterales alifáticas tales como glicina (Gly, G), alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L) e isoleucina (Ile, I); cadenas laterales alifáticas hidroxiladas tales como serina (Ser, S) y treonina (Thr, T); cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina (Asn, N) y glutamina (Gln, Q); cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) y triptófano (Trp, W); cadenas laterales básicas tales como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R) e histidina (His, H); cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E); y cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína (Cys, C) y metionina (Met, M). Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina (Val/Leu/Ile, V/L/I), fenilalanina/tirosina (Phe/Tyr, F/Y), lisina/arginina (Lys/Arg, K/R), alanina/valina (Ala/Val, A/V), glutamato/aspartato (Glu/Asp, E/D) y asparagina/glutamina (Asn/Gln, N/Q). En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución de cualquier resto natural en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz logarítmica de probabilidades PAM250 divulgada en Gonnet, G.H. *et al.*, 1992, Science 256:1443-1445. En algunas realizaciones, una sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz logarítmica de probabilidades PAM250.

**Control:** como se usa en el presente documento, se refiere al significado entendido en la técnica de un "control" que es un patrón con el que se comparan los resultados. Normalmente, los controles se usan para aumentar la integridad en los experimentos mediante el aislamiento de variables con el fin de llegar a una conclusión sobre dichas variables. En algunas realizaciones, un control es una reacción o ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción o ensayo de prueba para proporcionar un elemento de comparación. Un "control" también incluye un "animal de control". Un "animal de control" puede tener una modificación como se describe en el presente documento, una modificación que es diferente como se describe en el presente documento, o ninguna modificación (es decir, un animal de tipo silvestre). En un experimento, se aplica una "prueba" (es decir, una variable que se está probando). En un segundo experimento, no se aplica el "control", la variable que se está probando. En algunas realizaciones, un control es un control histórico (es decir, de una prueba o ensayo realizado previamente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). En algunas realizaciones, un control es o comprende un registro impreso o salvado de otro modo. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

**Derivado de:** cuando se usa en relación con un gen de región variable reordenado o un dominio variable "derivado de" una región variable no reordenada y/o segmentos de genes de región variable no reordenados se refiere a la capacidad de rastrear la secuencia del gen de región variable o dominio variable reordenado hasta un conjunto de segmentos de genes de región variable no reordenados que se reordenaron para formar el gen de región variable reordenado que expresa el dominio variable (contabilizando, cuando corresponda, diferencias de corte y empalme y mutaciones somáticas). Por ejemplo, un gen de región variable reordenado que ha sufrido una mutación somática no cambia el hecho de que deriva de los segmentos de genes de región variable no reordenados.

**Interrupción:** como se usa en el presente documento, se refiere al resultado de un evento de recombinación homóloga con una molécula de ADN (p. ej., con una secuencia homóloga endógena tal como un gen o locus génico). En algunas realizaciones, una interrupción puede lograr o representar una inserción, delección, sustitución, reemplazo, mutación sin sentido, o un cambio de marco de lectura de una o unas secuencias de ADN, o cualquier combinación de los mismos. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, p. ej., exones, que puede ser de un origen distinto de la secuencia endógena (p. ej., una secuencia heteróloga). En algunas realizaciones, una interrupción puede aumentar la expresión y/o la actividad de un gen o producto génico (p. ej., de un polipéptido codificado por un gen). En algunas realizaciones, una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o producto génico. En algunas realizaciones, una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico codificado (p. ej., un polipéptido codificado). En algunas realizaciones, una interrupción puede cortar o fragmentar un gen o un producto génico codificado (p. ej., un polipéptido codificado). En algunas realizaciones, una interrupción puede extender un gen o un producto génico codificado. En algunas de tales realizaciones, una interrupción puede lograr el ensamblaje de un polipéptido de fusión. En algunas realizaciones, una interrupción puede afectar al nivel, pero no actividad, de un gen o producto génico. En algunas realizaciones, una interrupción puede afectar a la actividad, pero no nivel, de un gen o producto génico. En algunas realizaciones, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel de un gen o producto génico. En algunas realizaciones, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre la actividad de un gen o producto génico. En algunas realizaciones, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o producto génico.

**Determinar, medir, evaluar, valorar, ensayar y analizar:** se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier forma de medición, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas. El ensayo puede ser relativo o absoluto. "Ensayando la presencia de" puede ser determinar la cantidad de algo presente y/o determinar si está o no presente o ausente.

**Locus endógeno o gen endógeno:** como se usa en el presente documento, se refiere a un locus genético encontrado en un organismo parental o de referencia antes de la introducción de una interrupción, delección, reemplazo, alteración o modificación como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un locus endógeno tiene una secuencia encontrada en la naturaleza. En algunas realizaciones, un locus endógeno es un locus de tipo silvestre. En algunas realizaciones, un locus endógeno es un locus modificado por ingeniería. En algunas realizaciones, un organismo de referencia es un organismo de tipo silvestre. En algunas realizaciones, un organismo de referencia es un organismo modificado por ingeniería. En algunas realizaciones, un organismo de referencia es un organismo criado

en laboratorio (ya sea de tipo silvestre o modificado por ingeniería).

**Promotor endógeno:** como se usa en el presente documento, se refiere a un promotor que está asociado de manera natural, p. ej., en un organismo de tipo silvestre, con un gen endógeno.

5 **Modificado por ingeniería:** como se usa en el presente documento se refiere, en general, al aspecto de haber sido manipulado por la mano del hombre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polinucleótido puede considerarse que está "*modificado por ingeniería*" cuando dos o más secuencias que no están unidas entre sí en ese orden en la naturaleza se manipulan por la mano del hombre para unirse directamente entre sí en el polinucleótido modificado por ingeniería. En algunas de tales realizaciones particulares, un polinucleótido modificado por ingeniería puede comprender que una secuencia reguladora que se encuentra en la naturaleza en asociación operativa con una primera secuencia codificante pero no en asociación operativa con una segunda secuencia codificante, está unida por la mano del hombre de modo que está operativamente asociada con la segunda secuencia codificante. Como alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, la primera y segunda secuencias de ácido nucleico que codifican cada una de ellas elementos o dominios polipeptídicos que en la naturaleza no están unidos entre sí pueden unirse entre sí en un único polinucleótido modificado por ingeniería. Comparativamente, en algunas realizaciones, una célula u organismo puede considerarse que está "*modificado por ingeniería*" si se ha manipulado de manera que se altere su información genética (p. ej., se ha introducido nuevo material genético que no estaba previamente presente, o se ha alterado o eliminado material genético previamente presente). Como es una práctica común y lo entienden los expertos en la materia, la descendencia de un polinucleótido o célula modificados por ingeniería se denominan normalmente "*modificado por ingeniería*" a pesar de que la manipulación real se realizó en una entidad anterior. Asimismo, como apreciarán los expertos en la materia, están disponibles una variedad de metodologías a través de las cuales se puede lograr "*modificación por ingeniería*" como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, "*modificación por ingeniería*" puede implicar la selección o el diseño (p. ej., de secuencias de un ácido nucleico, secuencias polipeptídicas, células, tejidos y/u organismos) mediante el uso de sistemas informáticos programados para realizar análisis o comparación, o de otro modo para analizar, recomendar y/o seleccionar secuencias, alteraciones, etc.). Como alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, "*modificar por ingeniería*" puede implicar el uso de metodologías de síntesis química y/o tecnologías de ácidos nucleicos recombinantes *in vitro* tales como, por ejemplo, amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., mediante la reacción en cadena de la polimerasa), hibridación, mutación, transformación, transfección, etc., y/o cualquiera de una variedad de metodologías de apareamiento controlado. Como apreciarán los expertos en la materia, una variedad de tales técnicas establecidas (p. ej., para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección, etc.) son bien conocidas en la técnica y se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y/o analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, p. ej., Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 and Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Manipulation, 5ª ed., ed. By Old, R.W. y S.B. Primrose, Blackwell Science, Inc., 1994.

35 **Funcional:** como se usa en el presente documento, se refiere a una forma o fragmento de una entidad (p. ej., un gen o segmento de gen) que muestra una propiedad particular (p. ej., forma parte de una secuencia codificante) y/o actividad. Por ejemplo, en el contexto de las inmunoglobulinas, los dominios variables están codificados por segmentos genéticos exclusivos (es decir, V, D y/o J) que se ensamblan (o recombinan) para formar secuencias codificantes funcionales. Cuando están presentes en el genoma, los segmentos de genes están organizados en grupos, aunque se producen variaciones. Un segmento de gen "*funcional*" es un segmento de gen representado en una secuencia expresada (es decir, un dominio variable) para el que se ha aislado (es decir, clonado) el ADN genómico correspondiente e identificado por secuencia. Algunas secuencias de segmentos de genes de inmunoglobulina contienen marcos de lectura abiertos y se consideran funcionales aunque no están representadas en un repertorio expresado, mientras que otras secuencias de segmentos de genes de inmunoglobulina contienen mutaciones (p. ej., mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, etc.) dando como resultado un codón de parada y/o una secuencia cortada que subsecuentemente hace que tales secuencias de segmentos de genes sean incapaces de realizar las propiedades y/o actividades asociadas con una secuencia o secuencias no mutadas. Tales secuencias no están representadas en secuencias expresadas y, por lo tanto, se clasifican como pseudogenes.

45 **Gen:** como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN en un cromosoma que codifica un producto (p. ej., un producto de ARN y/o un producto polipeptídico). En algunas realizaciones, un gen incluye una secuencia codificante (es decir, una secuencia que codifica un producto particular). En algunas realizaciones, un gen incluye una secuencia no codificante. En algunas realizaciones particulares, un gen puede incluir tanto secuencia codificante (p. ej., exónica) como no codificante (p. ej., intrónica). En algunas realizaciones, un gen puede incluir una o más secuencias reguladoras (p. ej., promotores, potenciadores, etc.) y/o secuencias de intrones que, por ejemplo, pueden controlar o afectar a uno o más aspectos de la expresión génica (p. ej., expresión específica del tipo celular, expresión inducible, etc.). Con fines de claridad, los presentes inventores destacamos que, tal como se usa en la presente divulgación, el término "*gen*" generalmente se refiere a una porción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido o fragmento del mismo; el término puede incluir opcionalmente secuencias reguladoras, como resultará evidente a partir del contexto para los expertos en la materia. Esta definición no pretende excluir la aplicación del término "*gene*" a las unidades de expresión que no codifican proteínas, sino más bien para aclarar que, en la mayoría de los casos, el término como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido.

65 **Heterólogo:** como se usa en el presente documento, se refiere a un agente o entidad de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, gen o producto génico presente en una célula u organismo en particular, el término aclara que el polipéptido, gen o producto génico relevante: 1) se modificó por ingeniería por la

mano del hombre; 2) se introdujo en la célula u organismo (o un precursor de los mismos) a través de la mano del hombre (p. ej., mediante ingeniería genética); y/o 3) no se produjo de forma natural por ni está presente en la célula u organismo relevante (p. ej., el tipo de célula u organismo relevante). "*Heterólogo*" también incluye un polipéptido, gen o producto génico que normalmente está presente en una célula u organismo natural particular, pero se ha alterado o modificado, por ejemplo, por mutación o colocación bajo el control de elementos reguladores asociados de forma no natural y, en algunas realizaciones, no endógenos (p. ej., un promotor).

**Célula hospedadora:** como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico o proteína. Las personas capacitadas al leer esta divulgación comprenderán que dichos términos se refieren no solo a la célula en cuestión en particular, sino también se usa para referirse a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, ser idéntica a la célula precursora, pero todavía están incluidas dentro del alcance de la frase "*célula hospedadora*". En algunas realizaciones, una célula hospedadora es o comprende una célula procariota o eucariota. En general, una célula hospedadora es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o proteína heterólogo, independientemente del Reino de vida al que esté designada la célula. Las células ejemplares incluyen las de procariotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (p. ej., cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (p. ej., SF-9, SF-21, células de insectos infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células de roedores, células humanas, o fusiones de células tal como, por ejemplo, híbridomas o cuadromas. En algunas realizaciones, una célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas realizaciones, una célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (p. ej., CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (p. ej., COS-7), célula de la retina, Vero, CV1, de riñón (p. ej., HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (p. ej., BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, una célula comprende uno o más genes víricos, p. ej., una célula de la retina que expresa un gen vírico (p. ej., una célula PER.C6®). En algunas realizaciones, una célula hospedadora es o comprende una célula aislada. En algunas realizaciones, una célula hospedadora es parte de un tejido. En algunas realizaciones, una célula hospedadora es parte de un organismo.

**Identidad:** como se usa en el presente documento en relación con una comparación de secuencias, se refiere a la identidad como se determina por una serie de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas realizaciones, las identidades descritas en el presente documento se determinan utilizando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) empleando una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1, y utilizando una matriz de similitud de Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

**In vitro:** como se usa en el presente documento se refiere a eventos que se producen en un ambiente artificial, p. ej., en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo pluricelular.

**In vivo:** como se usa en el presente documento se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo pluricelular, tal como un ser humano y/o un roedor. En el contexto de sistemas basados en células, la expresión puede utilizarse para referirse a eventos que se producen en una célula viva (al contrario que, por ejemplo, sistemas *in vitro*).

**Aislado:** como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia y/o entidad (1) que se ha separado de al menos algunos de los componentes a los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) que se ha diseñado, producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de al menos aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de aproximadamente el 99 % de los otros componentes a los que estaban asociadas inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados se separan del 10 % al 100 %, 15 %-100 %, 20 %-100 %, 25 %-100 %, 30 %-100 %, 35 %-100 %, 40 %-100 %, 45 %-100 %, 50 %-100 %, 55 %-100 %, 60 %-100 %, 65 %-100 %, 70 %-100 %, 75 %-100 %, 80 %-100 %, 85 %-100 %, 90 %-100 %, 95 %-100 %, 96 %-100 %, 97 %-100 %, 98 %-100 %, o 99 %-100 % de los otros componentes a los que estaban asociados inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados se separan del 10 % al 100 %, 10 %-99 %, 10 %-98 %, 10 %-97 %, 10 %-96 %, 10 %-95 %, 10 %-90 %, 10 %-85 %, 10 %-80 %, 10 %-75 %, 10 %-70 %, 10 %-65 %, 10 %-60 %, 10 %-55 %, 10 %-50 %, 10 %-45 %, 10 %-40 %, 10 %-35 %, 10 %-30 %, 10 %-25 %, 10 %-20 %, o 10 %-15 % de los otros componentes a los que estaban asociados inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados se separan del 11 % al 99 %, 12 %-98 %, 13 %-97 %, 14 %-96 %, 15 %-95 %, 20 %-90 %, 25 %-85 %, 30 %-80 %, 35 %-75 %, 40 %-70 %, 45 %-65 %, 50 %-60 %, o 55 %-60 % de los otros componentes a los que estaban asociados inicialmente.

En algunas realizaciones, los agentes aislados son aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de aproximadamente el 99 % puros. En algunas realizaciones, los agentes aislados son el 80 %-99 %, 85 %-99 %, 90 %-99 %, 95 %-99 %, 96 %-99 %, 97 %-99 %, o 98 %-99 % puro. En algunas realizaciones, los agentes aislados son el 80 %-99 %, 80 %-98 %, 80 %-97 %, 80 %-96 %, 80 %-95 %, 80 %-90 %, u 80 %-85 % puro. En algunas realizaciones, los agentes aislados son el 85 %-98 %,

90 % -97 %, o 95 % -96 % puro. En algunas realizaciones, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas realizaciones, como entenderán los expertos en la materia, una sustancia todavía puede considerarse "aislada" o incluso "pura", después de haberse combinado con otros componentes determinados tales como, por ejemplo, uno o más transportadores o excipientes (p. ej., tampón, disolvente, agua, etc.); en dichas realizaciones, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir dichos transportadores o excipientes. Por proporcionar un solo ejemplo, en algunas realizaciones, un polímero biológico tal como un polipéptido o polinucleótido que se produce en la naturaleza se considera "aislado" cuando: a) en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con alguno o con todos los componentes que lo acompañan en su estado natural en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie de la especie que lo produce en la naturaleza; o c) se expresa o está asociado de otro modo con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido que se sintetiza químicamente, o se sintetiza en un sistema celular diferente al que lo produce en la naturaleza, se considera un polipéptido "aislado". Como alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un polipéptido que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido "aislado" en la medida en que se haya separado de otros componentes: a) con los que está asociado en la naturaleza; y/o b) con los que estaba asociado cuando se produjo inicialmente.

**Locus o locus:** como se usa en el presente documento, se refiere a una o unas ubicaciones específicas de un gen (o secuencia significativa), secuencia de ADN, secuencia que codifica un polipéptido, o posición en un cromosoma del genoma de un organismo. Por ejemplo, un "locus de inmunoglobulina" puede referirse a la ubicación específica de un segmento de gen de inmunoglobulina (p. ej., V, D, J o C), secuencia de ADN de segmento de gen de inmunoglobulina, secuencia que codifica un segmento de gen de inmunoglobulina, o posición de segmento de gen de inmunoglobulina en un cromosoma del genoma de un organismo que se ha identificado en cuanto al lugar donde reside dicha secuencia. Un "locus de inmunoglobulina" puede comprender un elemento regulador de un segmento de gen de inmunoglobulina, incluyendo, pero sin limitación, un potenciador, un promotor, secuencia o región reguladora 5' y/o 3' o una combinación de los mismos. Un "locus de inmunoglobulina" puede comprender ADN que normalmente reside entre segmentos de genes en un locus de tipo silvestre, pero el ADN en sí mismo carece de un segmento de gen de inmunoglobulina (p. ej., una secuencia de ADN de inmunoglobulina que reside de forma natural entre un grupo de segmentos de genes V y un grupo de segmentos de genes J, una secuencia de ADN de inmunoglobulina que reside de forma natural entre un grupo de segmentos de genes J y un gen de región constante, o una secuencia de ADN de inmunoglobulina que reside de forma natural en 3' de un gen de región constante). Los expertos en la materia apreciarán que los cromosomas pueden, en algunas realizaciones, contener cientos o incluso miles de genes y demuestran la colocalización física de locus genéticos similares cuando se comparan entre diferentes especies. Dichos locus genéticos pueden describirse como que tienen sintenia compartida.

**Animal no humano,** como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier organismo vertebrado que no es un ser humano. El animal no humano proporcionado es un roedor, tal como una rata o un ratón.

**Ácido nucleico:** como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es un compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena oligonucleotídica a través de un enlace fosfodiéster. Como quedará claro por el contexto, en algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a restos de ácido nucleico individuales (p. ej., nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a una cadena oligonucleotídica que comprende restos de ácido nucleico individuales. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es o comprende ARN; en algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es o comprende ADN. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es, comprende, o consiste en uno o más restos de ácido nucleico naturales. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es, comprende, o consiste en uno o más análogos de ácido nucleico. En algunas realizaciones, un análogo de ácido nucleico difiere de un "ácido nucleico" en el sentido de que no utiliza una cadena principal fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es, comprende, o consiste en uno o más "ácidos nucleicos peptídicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal. Como alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un "ácido nucleico" tiene uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamida en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es, comprende, o consiste en uno o más nucleósidos naturales (p. ej., adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina). En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es, comprende o consiste en uno o más análogos de nucleósidos (p. ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas y combinaciones de las mismas). En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" comprende uno o más azúcares modificados (p. ej., 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa) en comparación con los de los ácidos nucleicos naturales. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico funcional tal como un ARN o un polipéptido. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" incluye uno o más intrones. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" incluye uno o más exones. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" se prepara mediante uno o más aislamientos de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en una plantilla complementaria (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en una célula o sistema recombinante y síntesis química. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" tiene al menos, p. ej., pero sin limitación, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o

más restos de longitud. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es monocatenario; en algunas realizaciones, un "ácido nucleico" es bicatenario. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. En algunas realizaciones, un "ácido nucleico" tiene actividad enzimática.

5 **Operativamente unido:** como se usa en el presente documento, se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, los segmentos de genes de la región variable no reordenados están "operativamente unidos" a un gen de región constante contiguo si los segmentos de genes de región variable no reordenados son capaces de reordenarse para formar un gen de región variable reordenado que se expresa junto con el gen de región constante como una cadena polipeptídica de una proteína de unión a antígeno. Una secuencia de control "operativamente unida" a una secuencia codificante se une de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Las secuencias "operativamente unidas" incluyen tanto las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés como las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a distancia para controlar un gen de interés (o secuencia de interés). La expresión "secuencia de control de expresión" incluye secuencias de polinucleótidos, que son necesarias para afectar la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las que están unidas. Las "secuencias de control de expresión" incluyen, secuencias de iniciación de la transcripción, de terminación, promotoras y potenciadoras adecuadas; señales de procesamiento del ARN eficaces tales como las señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de los polipéptidos; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de polipéptidos. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador. Por ejemplo, en procariontes, dichas secuencias de control incluyen generalmente una secuencia de promotor, de un sitio de unión al ribosoma y de terminación de la transcripción, mientras que en eucariotes, normalmente tales secuencias de control incluyen secuencias de promotor y de terminación de la transcripción. La expresión "secuencias de control" está destinado a incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

10 **Condiciones fisiológicas:** como se usa en el presente documento, se refiere a su significado entendido en la técnica que hace referencia a las condiciones en las que las células u organismos viven y/o se reproducen. En algunas realizaciones, la expresión incluye condiciones del medio externo o interno que pueden producirse en la naturaleza para un organismo o sistema celular. En algunas realizaciones, condiciones fisiológicas son aquellas condiciones presentes en el cuerpo de un animal humano o no humano, especialmente aquellas condiciones presentes en y/o dentro de un sitio quirúrgico. Las condiciones fisiológicas normalmente incluyen, p. ej., un intervalo de temperatura de 20-40 °C, presión atmosférica de 1, pH de 6-8, concentración de glucosa de 1-20 mM, concentración de oxígeno a niveles atmosféricos y gravedad tal como se encuentra en la tierra. En algunas realizaciones, las condiciones en un laboratorio se manipulan y/o mantienen en condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, las condiciones fisiológicas se encuentran en un organismo.

15 **Polipéptido:** como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que se produce en la naturaleza. En algunas realizaciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que no se produce en la naturaleza. En algunas realizaciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que contiene porciones que se producen en la naturaleza por separado unas de otras (es decir, de dos o más organismos diferentes, por ejemplo, porciones humanas y no humanas). En algunas realizaciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que está modificada por ingeniería en el sentido de diseñada y/o producida mediante la acción de la mano del hombre. En algunas realizaciones, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia que no se produce en la naturaleza (p. ej., una secuencia que está diseñada y/o producida mediante la acción de la mano del hombre para codificar dicho polipéptido).

20 **Recombinante:** como se usa en el presente documento, tiene la intención de referirse a polipéptidos que están diseñados, modificados por ingeniería, preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, polipéptidos aislados de una biblioteca recombinante, combinatoria de polipéptidos humanos (Hoogenboom, H. R., 1997, TIB Tech. 15:62-70; Azzazy, H. y W.E. Highsmith, 2002, Clin. Biochem. 35:425-45; Gavilondo, J. V. y J.W. Larrick, 2002, BioTechniques 29:128-45; Hoogenboom H. y P. Chames, 2000, Immunol. Today 21:371-8) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulinas humanas (véase, p. ej., Taylor, L. D. *et al.*, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-95; Kellermann, S-A. y L.L. Green, 2002, Curr. Opin. Biotechnol. 13:593-7; Little, M. *et al.*, 2000, Immunol. Today 21:364-70; Osborn, M.J. *et al.*, 2013, J. Immunol. 190:1481-90; Lee, E-C. *et al.*, 2014, Nat. Biotech. 32(4):356-63; Macdonald, L.E. *et al.*, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5147-52; Murphy, A.J. *et al.*, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-8) o polipéptidos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique cortar y empalmar elementos de secuencia seleccionados entre sí. En algunas realizaciones, uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados están diseñados *in silico*. En algunas realizaciones, uno o más de dichos elementos de secuencia seleccionados son el resultado de mutagénesis (p. ej., *in vivo* o *in vitro*) de un elemento de secuencia conocido, p. ej., de una fuente natural o sintética. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un polipéptido recombinante comprende secuencias que se encuentran en el genoma de un organismo fuente de interés (p. ej., ser humano, ratón, etc.). En algunas realizaciones, un polipéptido recombinante tiene una secuencia de aminoácidos que fue el resultado de mutagénesis (p. ej., *in vitro* o *in vivo*, por

ejemplo, en un roedor), de modo que las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos recombinantes son secuencias que, mientras se originan de y se relacionan con secuencias de polipéptidos, pueden no existir de forma natural dentro del genoma de un animal roedor *in vivo*.

**Referencia:** como se usa en el presente documento, se refiere a un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia patrón o de control o valor patrón o de control contra el cual se compara un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas realizaciones, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se prueba y/o se determina sustancialmente de manera simultánea con la prueba o determinación de un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas realizaciones, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia es una referencia histórica, opcionalmente incorporada en un medio tangible. En algunas realizaciones, una referencia puede referirse a un control. Una "referencia" también incluye un "animal de referencia". Un "animal de referencia" puede tener una modificación como se describe en el presente documento, una modificación que es diferente a la descrita en el presente documento o ninguna modificación (es decir, un animal de tipo silvestre). Normalmente, como entenderían los expertos en la materia, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se determina o caracteriza en condiciones comparables a las utilizadas para determinar o caracterizar un agente, animal (p. ej., un mamífero), cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés.

**Reemplazo:** como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso a través del cual una secuencia de un ácido "reemplazada" (p. ej., un gen) que se encuentra en un locus del hospedador (p. ej., en un genoma) se elimina de ese locus, y se localiza en su lugar un ácido nucleico de "reemplazo" diferente. En algunas realizaciones, la secuencia del ácido nucleico reemplazada y las secuencias del ácido nucleico de reemplazo son comparables entre sí en que, por ejemplo, son homólogas entre sí y/o contienen elementos correspondientes (p. ej., elementos que codifican proteínas, elementos reguladores, etc.). En algunas realizaciones, una secuencia de un ácido nucleico reemplazada incluye uno o más de un promotor, un potenciador, un sitio donante de corte y empalme, un sitio aceptor de corte y empalme, un intrón, un exón, una región no traducida (UTR); en algunas realizaciones, una secuencia de un ácido nucleico de reemplazo incluye una o más secuencias codificantes. En algunas realizaciones, una secuencia de un ácido nucleico de reemplazo es un homólogo o variante (p. ej., mutante) de la secuencia de un ácido nucleico reemplazada. En algunas realizaciones, una secuencia de un ácido nucleico de reemplazo es un ortólogo u homólogo de la secuencia reemplazada. En algunas realizaciones, una secuencia de un ácido nucleico de reemplazo es o comprende una secuencia de ácido nucleico humana. En algunas realizaciones, incluyendo cuando la secuencia de un ácido nucleico de reemplazo es o comprende una secuencia de un ácido nucleico humana, la secuencia del ácido nucleico reemplazada es o comprende una secuencia de roedor (p. ej., una secuencia de ratón o rata). En algunas realizaciones, incluyendo cuando la secuencia de un ácido nucleico de reemplazo es o comprende una secuencia de un ácido nucleico humana, la secuencia de un ácido nucleico reemplazada es o comprende una secuencia humana. En algunas realizaciones, una secuencia de un ácido nucleico de reemplazo es una variante o mutante (es decir, una secuencia que contiene una o más diferencias de secuencia, p. ej., sustituciones, en comparación con la secuencia reemplazada) de la secuencia reemplazada. La secuencia de un ácido nucleico así colocada puede incluir una o más secuencias reguladoras que son parte de la secuencia del ácido nucleico fuente utilizada para obtener la secuencia así colocada (p. ej., promotores, potenciadores, regiones 5' o 3' no traducidas, etc.). Por ejemplo, en diversas realizaciones, un reemplazo es una sustitución de una secuencia endógena por una secuencia heteróloga que da como resultado la producción de un producto génico a partir de la secuencia de un ácido nucleico así colocada (que comprende la secuencia heteróloga), pero no la expresión de la secuencia endógena; un reemplazo es de una secuencia genómica endógena con una secuencia de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una función similar a un polipéptido codificado por la secuencia endógena (p. ej., la secuencia genómica endógena codifica un polipéptido de dominio variable de roedor, en su totalidad o en parte, y el fragmento de ADN codifica uno o más polipéptidos de dominio variable humano, en su totalidad o en parte). En diversas realizaciones, un segmento de gen de inmunoglobulina de roedor endógeno o fragmento del mismo se reemplaza con un segmento de gen de inmunoglobulina humana o fragmento del mismo.

**Sustancialmente:** como se usa en el presente documento, se refiere a la condición cualitativa de mostrar la extensión o el grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto habitual en la materia biológica comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o transcurren hasta completarse o consiguen o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible carencia de completitud inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

**Homología sustancial:** como se usa en el presente documento, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "sustancialmente homólogas" si contienen restos homólogos en las posiciones correspondientes. Los restos homólogos pueden ser restos idénticos. Como alternativa, los restos homólogos pueden ser restos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como es bien conocido por los expertos en la materia, determinados aminoácidos se clasifican normalmente como aminoácidos "hidrófobos" o "hidrófilos", y/o que tienen cadenas laterales "polares" o "no polares". La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo con frecuencia puede considerarse una sustitución "homóloga". Las clasificaciones típicas de aminoácidos se resumen en la siguiente tabla.

Alanina	Ala	A	No polar	Neutro	1,8
Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5

Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
Cisteína	Cys	C	No polar	Neutro	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro	-3,5
Glicina	Gly	G	No polar	Neutro	-0,4
Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2
Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutro	4,5
Leucina	Leu	L	No polar	Neutro	3,8
Lisina	Lys	K	Polar	Positivo	-3,9
Metionina	Met	M	No polar	Neutro	1,9
Fenilalanina	Phe	F	No polar	Neutro	2,8
Prolina	Pro	P	No polar	Neutro	-1,6
Serina	Ser	S	Polar	Neutro	-0,8
Treonina	Thr	T	Polar	Neutro	-0,7
Triptófano	Trp	W	No polar	Neutro	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro	-1,3
Valina	Val	V	No polar	Neutro	4,2

Aminoácidos ambiguos	3 letras	1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de aminoácidos o de los ácidos nucleicos se pueden comparar utilizando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias nucleotídicas y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Se describen programas ejemplares de este tipo en Altschul, S. F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul, S.F. *et al.*, 1996, Meth. Enzymol. 266:460-80; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D. y B.F.F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener *et al.* (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132, Humana Press, 1998. Además de identificar secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente normalmente proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas realizaciones, se considera que dos secuencias son sustancialmente homólogas si al menos, p. ej., pero sin limitación, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus restos correspondientes son homólogos en un tramo de restos relevante. En algunas realizaciones, el tramo relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante es al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más restos. En algunas realizaciones, el tramo relevante incluye restos contiguos a lo largo de una secuencia completa. En algunas realizaciones, el tramo relevante incluye restos discontinuos a lo largo de una secuencia completa, por ejemplo, restos no contiguos reunidos por la conformación plegada de un polipéptido o una porción del mismo. En algunas realizaciones, el tramo relevante es al menos, p. ej., pero sin limitación, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más restos.

**Identidad sustancial:** como se usa en el presente documento, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la materia, generalmente se considera que dos secuencias son "*sustancialmente idénticas*" si contienen restos idénticos en las posiciones correspondientes. Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de aminoácidos o de los ácidos nucleicos se pueden comparar utilizando cualquiera de una diversidad de algoritmos, incluidos los disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para secuencias nucleotídicas y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Se describen programas ejemplares de este tipo en Altschul, S. F. *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul, S.F. *et al.*, 1996, Meth. Enzymol. 266:460-80; Altschul, S.F. *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D. y B.F.F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener *et al.* (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132, Humana Press, 1998. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente normalmente proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunas realizaciones, se considera que dos secuencias son sustancialmente idénticas si al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, el 99 % o más de sus restos correspondientes son idénticos en un tramo de restos relevante. En algunas realizaciones, un tramo de restos relevante es una secuencia completa. En algunas realizaciones, un tramo de restos relevante es, p. ej., pero sin limitación, al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más restos.

**Construcción de direccionamiento o vector de direccionamiento:** como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula polinucleotídica que comprende una región de direccionamiento. Una región de direccionamiento comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal diana y proporciona la integración de la construcción de direccionamiento en una posición dentro del

genoma de la célula, tejido o animal mediante recombinación homóloga. Las regiones de direccionamiento que se dirigen utilizando sitios de reconocimiento de recombinasas específicos de sitio (p. ej., sitios *loxP* o *Frt*) también se incluyen y describen en el presente documento. En algunas realizaciones, una construcción de direccionamiento como se describe en el presente documento comprende además una secuencia de un ácido nucleico o gen de interés particular, un marcador seleccionable, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de los ácido nucleico que permiten la recombinación mediada por la adición exógena de proteínas que ayudan en o facilitan la recombinación que implica dichas secuencias. En algunas realizaciones, una construcción de direccionamiento como se describe en el presente documento comprende además un gen de interés en su totalidad o en parte, donde el gen de interés es un gen heterólogo que codifica un polipéptido, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de una proteína codificada por una secuencia endógena. En algunas realizaciones, una construcción de direccionamiento como se describe en el presente documento comprende además un gen humanizado de interés, en su totalidad o en parte, en donde el gen humanizado de interés codifica un polipéptido, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de un polipéptido codificado por una secuencia endógena. En algunas realizaciones, una construcción de direccionamiento (o vector de direccionamiento) puede comprender una secuencia de un ácido nucleico manipulada por la mano del hombre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede construir una construcción de direccionamiento (o vector de direccionamiento) para que contenga un polinucleótido modificado por ingeniería o recombinante que contenga dos o más secuencias que no están unidas entre sí en ese orden en la naturaleza, pero que sean manipuladas por la mano del hombre para unirse directamente entre sí en el polinucleótido modificado por ingeniería o recombinante.

**Transgén o construcción transgénica:** como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de un ácido nucleico (que codifica, p. ej., un polipéptido de interés, en su totalidad o en parte) que se ha introducido en una célula por la mano del hombre, tal como por los métodos descritos en el presente documento. Un transgén puede ser parcial o totalmente heterólogo, es decir, extraño, al animal o célula transgénicos en donde se introduce. Un transgén puede incluir una o más secuencias reguladoras de la transcripción y cualquier otro ácido nucleico, tal como intrones o promotores, que puede ser necesario para la expresión de una secuencia de un ácido nucleico seleccionada.

**Animal transgénico, animal transgénico no humano o Tg<sup>+</sup>:** se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier roedor de origen no natural en el que una o más de las células del roedor contienen ácido nucleico heterólogo y/o gen que codifica un polipéptido de interés, en su totalidad o en parte. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una "animal transgénico" o "animal transgénico no humano" se refiere a un roedor que contiene un transgén o una construcción transgénica como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se introduce un ácido nucleico y/o gen heterólogo en la célula, directa o indirectamente mediante introducción en una célula precursora, mediante manipulación genética deliberada, tal como por microinyección o por infección con un virus recombinante. La expresión manipulación genética no incluye las técnicas clásicas de reproducción, sino que está dirigido a la introducción de moléculas de ADN recombinante. Esta molécula puede estar integrada dentro de un cromosoma, o puede ser un ADN que se replica extracromosómicamente. El término "Tg<sup>+</sup>" incluye animales que son heterocigotos u homocigotos para un ácido nucleico y/o gen heterólogo, y/o animales que tienen copias únicas o múltiples de un ácido nucleico y/o gen heterólogo.

**Variante:** como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia, pero difiere estructuralmente de la entidad de referencia en la presencia o nivel de uno o más restos químicos en comparación con la entidad de referencia. En muchas realizaciones, una "variante" también difiere funcionalmente de su entidad de referencia. En general, que una entidad en particular se considera adecuadamente como una "variante" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Como apreciarán los expertos en la materia, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene determinados elementos estructurales característicos. Una "variante", por definición, es una entidad química distinta que comparte uno o más de estos elementos estructurales característicos. Por proporcionar solo un par de ejemplos, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característico compuesto por una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas entre sí en un espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, o un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico compuesto de una pluralidad de restos de nucleótidos que tienen posiciones designadas entre sí en el espacio lineal o tridimensional. En otro ejemplo, una "polipéptido variante" puede diferir de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en los restos químicos (p. ej., hidratos de carbono, lípidos, etc.) unidos covalentemente a la cadena principal polipeptídica. En algunas realizaciones, un "polipéptido variante" muestra una identidad de secuencia general con un polipéptido de referencia que es al menos el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, el 97 % o el 99 %. Como alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un "polipéptido variante" no comparte al menos un elemento de secuencia característico con un polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un polipéptido de referencia tiene una o más actividades biológicas. En algunas realizaciones, un "polipéptido variante" comparte una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un "polipéptido variante" carece de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas realizaciones, un "polipéptido variante" muestra un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. En muchas realizaciones, se considera que un polipéptido de interés es una "variante" de un polipéptido precursor si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del precursor a excepción de un pequeño número de modificaciones de la secuencia en posiciones particulares. Normalmente, menos del 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, o 2 % de los restos de la variante están sustituidos en comparación con el precursor. En algunas realizaciones, una "variante" tiene, p. ej., pero sin limitación, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 restos sustituidos en comparación con un precursor. Con frecuencia, una "variante" tiene un número muy pequeño (p.

ej., menos de 5, 4, 3, 2 o 1) de restos funcionales sustituidos (es decir, restos que participan en una actividad biológica particular). Asimismo, una "variante" normalmente no tiene más de, p. ej., pero sin limitación, 5, 4, 3, 2 o 1 adiciones o deleciones y, con frecuencia, no tiene adiciones ni deleciones, en comparación con el precursor. Por otra parte, cualquier adición o deleción son normalmente inferiores a aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, y comúnmente son menos de aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 restos. En algunas realizaciones, un polipéptido precursor o de referencia es uno que se encuentra en la naturaleza. Como se entenderá por los expertos en la materia, una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular pueden encontrarse comúnmente en la naturaleza, particularmente cuando el polipéptido de interés es un polipéptido de agente infeccioso.

**Vector:** como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unida. En alguna realización, los vectores son capaces de replicación y/o expresión extracromosómica de los ácidos nucleicos a los que están unidos en una célula hospedadora tal como una célula eucariota y/o procarionta. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes unidos operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

**Tipo silvestre:** como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad que tiene una estructura y/o actividad como se encuentra en la naturaleza en un estado o contexto "normal" (en contraste con mutante, enfermo, alterado, etc.). Los expertos en la materia apreciarán que los genes y polipéptidos de tipo silvestre con frecuencia existen en múltiples formas diferentes (p. ej., alelos).

### Descripción detallada de determinadas realizaciones

En determinados aspectos, se proporcionan en el presente documento, entre otras cosas, roedores manipulados por ingeniería que tienen material genético heterólogo que codifica dominios variables humanos y, en algunas realizaciones, dominios constantes humanos, cuyo material genético heterólogo comprende secuencias de genes V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  (es decir, segmentos de genes) humanos y otras secuencias humanas que proporcionan el reordenamiento y expresión adecuados de anticuerpos que tienen una porción humana y una porción de roedor o anticuerpos que tienen una secuencia que es sustancialmente o sustancialmente totalmente humana. En diversas realizaciones, el roedor modificado por ingeniería proporcionado contiene material genético heterólogo que se inserta de tal manera que los anticuerpos que contienen cadenas ligeras que tienen un dominio V $\lambda$  humano y un dominio C $\lambda$  humano o de roedor se expresen en el repertorio de anticuerpos del animal roedor. Adicionalmente, los roedores modificados por ingeniería proporcionados contienen material genético heterólogo que está insertado de tal manera que los anticuerpos que contienen cadenas ligeras que tienen un dominio V $\lambda$  humano y un dominio C $\lambda$  humano o de roedor se expresan a partir de locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificados por ingeniería que incluyen regiones potenciadoras (o secuencias) de Ig $\lambda$  humana y de roedor en el genoma de la línea germinal del roedor.

Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, se contempla que las realizaciones de los roedores como se describe en el presente documento proporcionen un sistema *in vivo* mejorado que aproveche la expresión de anticuerpos que contienen dominios V $\lambda$  humanos para la producción de anticuerpos terapéuticos. También se contempla que las realizaciones de los roedores como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, proporcionen formas alternativas de modificación por ingeniería de locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que contienen material genético heterólogo para el desarrollo de agentes terapéuticos basados en anticuerpos humanos (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos, agentes aglutinantes multiespecíficos, scFv, polipéptidos de fusión, etc.) para las dianas de la enfermedad que están asociadas con respuestas de anticuerpos sesgadas (p. ej., respuestas de anticuerpos caracterizadas por una proporción abrumadora de cadenas ligeras  $\kappa$  o  $\lambda$ ). Por lo tanto, las realizaciones de los roedores como se describe en el presente documento son particularmente útiles para el desarrollo de anticuerpos humanos contra dianas asociadas con una inmunogenicidad deficiente (p. ej., virus) debido, en parte, a repertorios y/o respuestas de anticuerpos distorsionados.

En particular, en determinados aspectos, la presente divulgación describe la producción de un roedor, tal como una rata o un ratón, teniendo el roedor un genoma de la línea germinal que contiene un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería, es decir, en algunas realizaciones, caracterizado por la introducción de una pluralidad de secuencias de genes V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos en enlace operativo a una región C $\lambda$  de roedor dando como resultado la expresión de anticuerpos que contienen cadenas ligeras que incluyen un dominio V $\lambda$  humano y un dominio C $\lambda$  humano o de roedor. Tal como se describe en el presente documento, la producción de tal locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería da como resultado la expresión de anticuerpos que contienen cadenas ligeras que incluyen un dominio V $\lambda$  humano y un dominio C $\lambda$  humano o de roedor de dicho locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería en el genoma de la línea germinal del roedor. El genoma de la línea germinal de los roedores proporcionados, en algunas realizaciones, comprende además (1) locus de IgH e Igk humanizados o (2) un locus de IgH humanizado y locus de cadena ligera Igk funcionalmente silenciados o de otro modo convertidos en no funcionales. Los roedores proporcionados, tal como se describe en el presente documento, expresan repertorios de anticuerpos que contienen cadenas ligeras Ig $\lambda$  que incluyen dominios V $\lambda$  humanos.

los roedores como se describe en el presente documento contienen secuencias de cadenas ligeras Ig $\lambda$  humanas y de roedor dentro de un único locus de cadena ligera Ig $\lambda$ . En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el

presente documento contienen secuencias de cadena ligera Ig $\lambda$  humana y murina (p. ej., de ratón o rata) dentro de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$ . En muchas realizaciones de roedores como se describe en el presente documento, las secuencias de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor son o comprenden secuencias murinas (p. ej., ratón o rata).

- 5 En algunas realizaciones, las secuencias de las cadenas ligeras Ig $\lambda$  incluyen ADN intergénico que es de origen humano y/o murino (p. ej., ratón o rata). En algunas realizaciones, las secuencias de las cadenas ligeras Ig $\lambda$  incluyen ADN intergénico que es sintético y se basa en una secuencia fuente que es de origen humano o murino (p. ej., ratón o rata). En algunas realizaciones, dicho ADN intergénico es del mismo locus de inmunoglobulina en donde se coloca, inserta, sitúa o modifica por ingeniería el ADN intergénico (p. ej., ADN intergénico de Ig $\lambda$  en un locus de cadena ligera
- 10 Ig $\lambda$ ). En algunas realizaciones determinadas, los roedores como se describe en el presente documento contienen un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería que contiene ADN intergénico que incluye la secuencia o secuencias de cadena ligera Ig $\lambda$  de origen roedor (p. ej., secuencia de cadena ligera Ig $\lambda$  de ratón o rata).

15 En diversas realizaciones, un locus de IgH humanizado contiene una pluralidad de segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos operativamente unidos a una región constante de IgH de roedor (p. ej., una región constante de IgH de roedor endógena que incluye uno o más genes de región constante de IgH tal como, por ejemplo, IgM, IgG, etc.). En diversas realizaciones, un locus de cadena ligera de Igk humanizado contiene una pluralidad de segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> humanos operativamente unidos a una región constante de Igk de roedor. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados tienen un genoma de la línea germinal que incluye los locus (o alelos) de inmunoglobulina

20 representados en un dibujo proporcionado en el presente documento (p. ej., véanse las Figuras 1, 2, 3 y/o 4). Dichos roedores modificados por ingeniería proporcionan una fuente de anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos humanos y/o ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos humanos, y proporcionan un sistema *in vivo* mejorado adecuado para explotar secuencias V $\lambda$  humanas para la producción de anticuerpos terapéuticos humanos.

25 Tal como se describe en el presente documento, en determinadas realizaciones, se proporcionan roedores que tienen un genoma que contiene una pluralidad de segmentos de genes de cadena ligera  $\lambda$  humana (p. ej., V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$ ) en lugar de segmentos de genes de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina de roedor en locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógenos, e incluyen ADN intergénico no codificante humano entre los segmentos de genes de la región variable humana. En algunas realizaciones, los roedores proporcionados en el presente documento tienen un genoma que además comprende segmentos de genes de la región variable de cadena pesada (es decir, V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub>)

30 y de cadena ligera  $\kappa$  (p. ej., V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub>) humanos en lugar de los segmentos de genes de la región variable de cadena pesada (es decir, V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub>) y de cadena ligera  $\kappa$  (p. ej., V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub>) de roedor en los locus de cadena pesada y ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógenos, respectivamente. En muchas realizaciones, los segmentos de genes de inmunoglobulina humana (pesados y/o ligeros) se modifican por ingeniería con ADN intergénico humano (es decir, ADN intergénico de inmunoglobulina humano no codificante) que está naturalmente asociado con dichos segmentos de genes (es decir, ADN genómico no codificante asociado con dichos segmentos de genes que aparece de forma natural en un locus de inmunoglobulina humana de una célula humana). Dicho ADN intergénico incluye, por ejemplo,

35 promotores, secuencias líder y secuencias señal de recombinación que permiten la recombinación y expresión adecuadas de los segmentos de genes humanos en el contexto de dominios variables de anticuerpos. Los expertos comprenden que los locus de inmunoglobulinas de roedores también contienen dicho ADN intergénico no codificante y que, al leer esta divulgación, se puede emplear otro ADN intergénico humano o de roedor en la construcción de tales locus de inmunoglobulina modificados por ingeniería que dan como resultado la misma expresión de dominios variables humanos en el contexto de anticuerpos en el roedor. Dichos locus de inmunoglobulina modificados por

40 ingeniería similares solo necesitan contener las secuencias codificantes humanas (es decir, exones) de los segmentos de genes humanos deseados, o una combinación de segmentos de genes humanos, para lograr la expresión de anticuerpos que contienen dominios variables humanos.

45 Se describen varios aspectos de determinadas realizaciones con más detalle en las siguientes secciones, cada uno de los cuales puede aplicarse a cualquier aspecto o realización como se describe en el presente documento. El uso de secciones no es para limitación, y el uso de "o" medio "y/o" a menos que se indique lo contrario.

#### *Repertorios de anticuerpos en roedores*

55 Las inmunoglobulinas (también llamadas anticuerpos) son glucoproteínas grandes (~ 150 kD), en forma de Y que son producidas por las linfocitos B del sistema inmunitario del hospedador para neutralizar antígenos extraños (p. ej., virus, bacterias, etc.). Cada inmunoglobulina (Ig) se compone de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, cada una de las cuales tiene dos componentes estructurales: un dominio variable y un dominio constante. Los dominios variables de cadena pesada y ligera difieren en los anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B,

60 pero son iguales para todos los anticuerpos producidos por un linfocito B o un clon de linfocitos B únicos. Los dominios variables de cadena pesada y ligera de cada anticuerpo juntos comprenden la región de unión a antígeno (o sitio de unión a antígeno). Las inmunoglobulinas pueden existir en diferentes variedades que se denominan isotipos o clases en función de las regiones (o dominios) constantes de cadena pesada que contienen. El dominio constante de cadena pesada es idéntico en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en anticuerpos de diferentes isotipos. La siguiente tabla resume los nueve isotipos de anticuerpos en ratón y hombre (ser humano).

65

Ratón	Humano
IgM	IgM
IgD	IgD
IgG1	IgG1
IgG2a	IgG2
IgG2b	IgG3
IgG2c	IgG4
IgG3	IgE
IgE	IgA1
IgA	IgA2

- Se han identificado isotipos adicionales en otras especies. Los isotipos confieren propiedades biológicas especializadas al anticuerpo debido a las diferentes características estructurales entre los diferentes isotipos y se encuentran en diferentes ubicaciones (células, tejidos, etc.) dentro del cuerpo de un animal. Inicialmente, los linfocitos B producen IgM e IgD con regiones de unión a antígeno idénticas. Tras la activación, los linfocitos B cambian a diferentes isotipos mediante un proceso denominado cambio de clase, que implica un cambio del dominio constante del anticuerpo producido por el linfocito B mientras que los dominios variables permanecen iguales, conservando así la especificidad al antígeno del anticuerpo original (linfocito B).
- 5 Dos locus separados (Igk e Igl) contienen los segmentos de genes que codifican las cadenas ligeras de los anticuerpos y muestran exclusión tanto alélica como isotípica. Las proporciones de expresión de los linfocitos B  $\kappa+$  a  $\lambda+$  varían entre especies. Por ejemplo, los humanos demuestran una relación de aproximadamente 60:40 ( $\kappa:\lambda$ ). En ratones y ratas, se observa una relación de 95:5 ( $\kappa:\lambda$ ). Curiosamente, la relación  $\kappa:\lambda$  observada en gatos (5:95) es opuesta a la de ratones y ratas. Se han realizado varios estudios para dilucidar las posibles razones detrás de estas relaciones observadas y se ha propuesto tanto la complejidad del locus (es decir, el número de segmentos de genes, en particular, segmentos de genes V) como la eficacia del reordenamiento de segmentos de genes como justificación. El locus de cadena  $\lambda$  ligera de inmunoglobulina humana se extiende sobre 1000 kb y contiene aproximadamente 70 segmentos de genes V $\lambda$  (29 a 33 funcionales) y siete pares de segmentos de genes J $\lambda$ -C $\lambda$  (cuatro a cinco funcionales) organizados en tres grupos (véase, p. ej., la Fig. 1 de la Patente de EE.UU. N.º 9.006.511). La mayoría de las regiones V $\lambda$  observadas en el repertorio de anticuerpos expresados están codificadas por segmentos de genes contenidos dentro del grupo más próximo (es decir, grupo A). El locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina de ratón es sorprendentemente diferente del locus humano y, dependiendo de la cepa, contiene solo unos pocos segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  organizados en dos grupos de genes distintos (véase, p. ej., la Fig. 2 de la Patente de EE.UU. N.º 9.006.511).
- 10 El desarrollo de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades humanas se ha centrado en gran medida en la creación de líneas de roedores modificados por ingeniería, en particular, líneas de roedores modificados por ingeniería, albergando cantidades variables de material genético en sus genomas correspondientes a genes de inmunoglobulinas humanas (revisado en, p. ej., Brüggenmann, M. *et al.*, 2015, Arch. Immunol. Ther. Exp. 63:101-8). Los esfuerzos iniciales para crear tales líneas de roedores transgénicos se centraron en la integración de porciones de locus de inmunoglobulinas humanas que podrían, por sí solos, apoyar la recombinación de segmentos de genes y la producción de cadenas pesadas y/o ligeras que fueran completamente humanas mientras se inactivaban los locus de inmunoglobulinas endógenos (véase p. ej., Brüggenmann, M. *et al.*, 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 86:67-09-13; Brüggenmann, M. *et al.*, 1991, Eur. J. Immunol. 21:1323-6; Taylor, L.D. *et al.*, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Davies, N.P. *et al.*, 1993, Biotechnol. 11:911-4; Green, L.L. *et al.*, 1994, Nat. Genet. 7:13-21; Lonberg, N. *et al.*, 1994, Nature 368:856-9; Taylor, L.D. *et al.*, 1994, Int. Immunol. 6:579-91; Wagner, S.D. *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24:2672-81; Fishwild, D.M. *et al.*, 1996, Nat. Biotechnol. 14:845-51; Wagner, S.D. *et al.*, 1996, Genomics 35:405-14; Mendez, M.J. *et al.*, 1997, Nat. Genet. 15:146-56; Green, L.L. *et al.*, 1998, J. Exp. Med. 188:483-95; Xian, J. *et al.*, 1998, Transgenics 2:333-43; Little, M. *et al.*, 2000, Immunol. Today 21:364-70; Kellermann, S.A. y L.L. Green, 2002, Cur. Opin. Biotechnol. 13:593-7). En particular, algunos esfuerzos han incluido la integración de secuencias de cadena ligera Igl humana (véase, p. ej., las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2002/0088016 A1, 2003/0217373 A1 y 2011/0236378 A1; las Patentes de EE.UU. N.º 6.998.514 y 7.435.871; Nicholson, I.C. *et al.*, 1999, J. Immunol. 163:6898-906; Popov, A.V. *et al.*, 1999, J. Exp. Med. 189(10):1611-19). Tales esfuerzos se han centrado en la integración aleatoria de cromosomas artificiales de levadura que contienen secuencias V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanas creando así cepas de ratón que expresan cadenas ligeras  $\lambda$  completamente humanas (es decir, variable humana y constante humana). Esfuerzos más recientes han empleado estrategias similares usando construcciones que también contienen secuencias V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanas (Osborn, M.J. *et al.*, 2013, J. Immunol. 190:1481-90; Lee, E.-C. *et al.*, 2014, Nat. Biotech. 32(4):356-63).
- 15 Otros esfuerzos más han incluido la inserción específica de segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos en los locus de las cadenas ligeras de Ig de roedores endógenos ( $\kappa$  y  $\lambda$ ) de modo que dichos segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos estén operativamente unidos a regiones constantes de cadena ligera de Ig endógenas (véase, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 9.006.511, 9.012.717, 9.029.628, 9.035.128, 9.066.502, 9.150.662 y 9.163.092). En tales animales, todos los segmentos de genes V $\lambda$  humanos de los grupos A y B y uno o cuatro segmentos de genes J $\lambda$  humanos se insertaron en los locus de las cadenas ligeras Igl e Igl endógenos. Como resultado, varios segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

diferentes demostraron un reordenamiento adecuado en ambos locus de cadenas ligeras de Ig de roedor modificados por ingeniería para formar dominios V $\lambda$  humanos funcionales que se expresaron en el contexto de las regiones tanto C $\kappa$  como C $\lambda$  en cadenas las ligeras del repertorio de anticuerpos de roedores (véase, p. ej., la Tabla 7 y las Figuras 11-13 de la Patente de EE.UU. N.º 9.006.511). En particular, los ratones que tenían locus de cadena ligera Ig $\kappa$  modificados por ingeniería que albergaban segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos demostraron una relación  $\kappa$ : $\lambda$  de aproximadamente 1:1 en el compartimento esplénico (véase, p. ej., la Tabla 4 de la Patente de EE.UU. N.º 9.006.511). De hecho, ambas cepas de ratones modificados por ingeniería (es decir, locus de las cadenas ligeras Ig $\kappa$  modificados por ingeniería o Ig $\lambda$  modificados por ingeniería) demostraron que los dominios V $\lambda$  humanos podrían expresarse a partir de locus de cadenas ligeras de Ig endógenos en roedores, que normalmente muestran un gran sesgo en la expresión de las cadenas ligeras (véase anteriormente). La presente invención se basa en el reconocimiento de que se pueden producir otras estructuras de locus de las cadenas ligeras de Ig modificados por ingeniería para maximizar el uso de segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos en repertorios de anticuerpos para dianas terapéuticas en roedores, en particular, en comparación con roedores que contienen un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  que carece de la complejidad y calidad fuerte (p. ej., ratones y ratas) normalmente asociadas con un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana (es decir, que aparece en una célula humana). Tales estructuras alternativas de locus de cadenas ligeras de Ig modificados por ingeniería proporcionan la capacidad para determinar repertorios de anticuerpos exclusivos que son el resultado de su diseño.

La presente divulgación describe, entre otras cosas, la producción exitosa de un roedor cuyo genoma de la línea germinal contiene un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno modificado por ingeniería que comprende una pluralidad de segmentos de genes V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos en enlace operativo a una región constante de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor. En particular, la presente divulgación demuestra específicamente la producción exitosa de un roedor modificado por ingeniería que expresa anticuerpos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes de roedor, cuyos anticuerpos incluyen cadenas ligeras que contienen un dominio V $\lambda$  humano. Tal como se describe en el presente documento, la expresión de tales cadenas ligeras se logra mediante la inserción de dicha pluralidad de segmentos de genes V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno. También, tal como se describe en el presente documento, los roedores proporcionados se modifican por ingeniería, en algunas realizaciones, para que la expresión de cadenas ligeras que contienen dominios V $\lambda$  endógenos se inactive (p. ej., mediante delección génica). Por lo tanto, la presente divulgación, en al menos algunas realizaciones, abarca el desarrollo de un sistema *in vivo* mejorado para la producción de anticuerpos humanos proporcionando un roedor modificado por ingeniería que contiene un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería de manera alternativa que da como resultado un repertorio de anticuerpos expresados que contienen dominios V $\lambda$  humanos.

#### 35 *Insertos de ADN*

Normalmente, una molécula polinucleotídica que contiene secuencias de cadena Ig $\lambda$  humana, (p. ej., V $\lambda$ , J $\lambda$ , C $\lambda$  y potenciadores de Ig $\lambda$ ) o porción o porciones de las mismas se inserta en un vector, preferentemente un vector de ADN, para replicar la molécula polinucleotídica en una célula hospedadora.

40 Las secuencias de cadena ligera Ig $\lambda$  humana, pueden clonarse directamente a partir de secuencias o fuentes conocidas (p. ej., bibliotecas) o sintetizarse a partir de secuencias de línea germinal diseñadas *en silico* basándose en secuencias publicadas disponibles en GenBank u otras bases de datos disponibles públicamente (p. ej., IMGT). Como alternativa, las bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés) pueden proporcionar secuencias de ADN de inmunoglobulina de interés (p. ej., segmentos de genes V $\lambda$  humanos, pares de segmentos de genes J $\lambda$ -C $\lambda$  humanos, regiones o secuencias de E $\lambda$  humanos, y combinaciones de los mismos). Las bibliotecas de BAC pueden contener un tamaño de inserto de 100-150 kb y son capaces de albergar insertos de hasta 300 kb (Shizuya, *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:8794-8797; Swiatek, *et al.*, 1993, Genes and Development 7:2071-2084; Kim, *et al.*, 1996, Genomics 34 213-218). Por ejemplo, se ha descrito una biblioteca de BAC humana que alberga tamaños de inserto promedio de 164-196 kb (Osoegawa, K. *et al.*, 2001, Genome Res. 11(3):483-96; 50 Osoegawa, K. *et al.*, 1998, Genomics 52:1-8, Artículo N.º GE985423). Se han construido bibliotecas de BAC genómicas humanas y de ratón y están disponibles comercialmente (p. ej., ThermoFisher). Las bibliotecas genómicas de BAC también pueden servir como fuente de secuencias de ADN de inmunoglobulina así como de regiones de control transcripcional.

55 Como alternativa, se pueden aislar, clonar y/o transferir secuencias de ADN de inmunoglobulina a partir de cromosomas artificiales de levadura (YAC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, se ha determinado la secuencia de nucleótidos del locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana (véase, p. ej., Dunham, I. *et al.*, 1999, Nature 402:489-95). Adicionalmente, los YAC se han empleado previamente para ensamblar un transgén de locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana (véase, p. ej., Popov, A.V. *et al.*, 1996, Gene 177:195-201; Popov, A.V. *et al.*, 1999, J. Exp. Med. 189(10): 60 1611-19). Se puede clonar y contener un locus completo de cadena ligera Ig $\lambda$  (humano o de roedor) dentro de varios YAC. Si se emplean múltiples YAC y contienen regiones de homología solapante, pueden recombinarse dentro de cepas hospedadoras de levadura para producir una única construcción que represente el locus completo o porciones deseadas del locus (p. ej., una región a la que se dirige un vector de direccionamiento). Los brazos de YAC pueden modificarse adicionalmente con casetes de selección de mamíferos mediante retroadaptación para ayudar a introducir 65 las construcciones en células madre embrionarias o embriones mediante métodos conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Las secuencias de ADN y aminoácidos de segmentos de genes de cadena ligera Igλ humana para su uso en la construcción de un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento pueden obtenerse de bases de datos publicadas (p. ej., GenBank, IMG, etc.) y/o de secuencias de anticuerpos publicadas. Los insertos de ADN que contienen segmentos de genes de cadena ligera Igλ humana, en algunas realizaciones, comprenden una o más secuencias (o regiones) potenciadoras de cadena ligera Igλ humana. Los insertos de ADN, en algunas realizaciones, comprenden una secuencia (o región) potenciadora de cadena ligera Igλ humana que incluye uno o más elementos de secuencia, p. ej., uno, dos, tres, etc. En algunas realizaciones determinadas, los insertos de ADN comprenden una secuencia (o región) potenciadora de cadena ligera Igλ humana, denominada Eλ humana que tiene tres elementos de secuencia distintos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una Eλ humana como se describe en el presente documento es modular y uno o más elementos de secuencia funcionan juntos como una secuencia (o región) potenciadora. En algunas realizaciones determinadas, los insertos de ADN que contienen secuencias potenciadoras de cadena ligera Igλ humana comprenden secuencias potenciadoras de cadena ligera Igλ humana operativamente unidas a una secuencia de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., una secuencia de región constante de cadena ligera Igλ de roedor). En algunas realizaciones determinadas, los insertos de ADN que contienen secuencias potenciadoras de cadena ligera Igλ humana comprenden secuencias potenciadoras de cadena ligera Igλ humana operativamente unidas a una secuencia de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., una secuencia de región constante de cadena ligera Igλ de roedor) y operativamente unidas a uno o más segmentos de genes Vλ humanos, uno o más pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos y/o uno o más segmentos de genes Jλ humanos. En algunas realizaciones determinadas, los insertos de ADN que contienen secuencias potenciadoras de cadena ligera Igλ humana comprenden secuencias potenciadoras de cadena ligera Igλ humana operativamente unidas a una secuencia de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., una secuencia de región constante de cadena ligera Igλ de roedor), uno o más segmentos de genes Vλ humanos, uno o más segmentos de genes Jλ humanos y uno o más segmentos de genes Cλ humanos.

Los insertos de ADN se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar un inserto de ADN como parte de un plásmido más grande. Tal preparación permite la clonación y selección de las construcciones correctas de una manera eficaz como se conoce en la técnica. Los insertos de ADN que contienen secuencias de cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, como se describe en el presente documento, se pueden ubicar entre sitios de restricción convenientes en el plásmido para que puedan aislarse fácilmente de las secuencias de plásmido restantes para su incorporación en un roedor deseado.

Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y la transformación de los organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariontas como para células eucariotas, así como procedimientos de recombinación generales, véase *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Manipulation*, 5ª ed., ed. By Old, R.W. y S.B. Primrose, Blackwell Science, Inc., 1994 and *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., ed. by Sambrook, J. *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.

#### 40 *Vectores de direccionamiento*

Se pueden emplear vectores de direccionamiento para introducir un inserto de ADN en un locus diana genómico y comprenden un inserto de ADN y brazos de homología que flanquean dicho inserto de ADN. Los vectores de direccionamiento pueden ser de forma lineal o circular, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los vectores de direccionamiento pueden ser ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Para facilitar la referencia, los brazos de homología se denominan en el presente documento brazos de homología 5' y 3' (es decir, cadena arriba y cadena abajo). Esta terminología se refiere a la posición relativa de los brazos de homología a un inserto de ADN dentro de un vector de direccionamiento. Los brazos de homología 5' y 3' corresponden a regiones dentro de un locus diana o a una región dentro de otro vector de direccionamiento, que se denominan en el presente documento "secuencia diana 5'" y "secuencia diana 3'", respectivamente. En algunas realizaciones, los brazos de homología también pueden funcionar como una secuencia diana 5' o 3'.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento emplean dos, tres o más vectores de direccionamiento que son capaces de recombinarse entre sí. En diversas realizaciones, los vectores de direccionamiento son vectores de direccionamiento grandes (LTVEC, por sus siglas en inglés) como se describe en otra parte del presente documento. En dichas realizaciones, el primer, el segundo y el tercer vector de direccionamiento comprenden cada uno un brazo de homología 5' y 3'. El brazo de homología 3' del primer vector de direccionamiento comprende una secuencia que se solapa con el brazo de homología 5' del segundo vector de direccionamiento (es decir, secuencias solapantes), que permite la recombinación homóloga entre el primer y el segundo LTVEC.

En el caso de métodos de doble direccionamiento, un brazo de homología 5' de un primer vector de direccionamiento y un brazo de homología 3' de un segundo vector de direccionamiento son homólogos a los segmentos correspondientes dentro de un locus genómico diana (es decir, una secuencia diana) que promueve la recombinación homóloga del primer y segundo vector de direccionamiento con los segmentos genómicos correspondientes y modifica el locus genómico diana.

En el caso de métodos de triple direccionamiento, un brazo de homología 3' de un segundo vector de direccionamiento comprende una secuencia que se solapa con un brazo de homología 5' de un tercer vector de direccionamiento (es decir, secuencias solapantes), que permite la recombinación homóloga entre el segundo y el tercer LTVEC. El brazo de homología 5' del primer vector de direccionamiento y el brazo de homología 3' del tercer vector de direccionamiento son homólogos a los segmentos correspondientes dentro del locus genómico diana (es decir, la secuencia diana), que promueve la recombinación homóloga del primer y tercer vector de direccionamiento con los segmentos genómicos correspondientes y modifica el locus genómico diana.

Un brazo de homología y una secuencia diana o dos brazos de homología "*corresponden*" o son "*correspondientes*" entre sí cuando las dos regiones comparten un nivel suficiente de identidad de secuencia entre sí para actuar como sustratos para una reacción de recombinación homóloga. El término "*homología*" incluye secuencias de ADN que son idénticas o comparten identidad de secuencia con una secuencia correspondiente. La identidad de secuencia entre una secuencia diana dada y el brazo de homología correspondiente que se encuentra en un vector de direccionamiento (es decir, secuencia solapante) o entre dos brazos de homología puede ser cualquier grado de identidad de secuencia que permita que se produzca la recombinación homóloga. Por proporcionar un solo ejemplo, una cantidad de identidad de secuencia compartida por un brazo de homología de un vector de direccionamiento (o un fragmento del mismo) y una secuencia diana de otro vector de direccionamiento o una secuencia diana de un locus genómico diana (o un fragmento del mismo) puede ser, p. ej., pero sin limitación, al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad de secuencia, de manera que las secuencias experimenten una recombinación homóloga.

Por otra parte, una región correspondiente de homología entre un brazo de homología y una secuencia diana correspondiente puede tener cualquier longitud que sea suficiente para promover la recombinación homóloga en el locus genómico diana. Por ejemplo, un brazo de homología dado y/o la secuencia diana correspondiente puede comprender regiones correspondientes de homología que tienen, p. ej., pero sin limitación, al menos alrededor de 5-10 kb, 5-15 kb, 5-20 kb, 5-25 kb, 5-30 kb, 5-35 kb, 5-40 kb, 5-45 kb, 5-50 kb, 5-55 kb, 5-60 kb, 5-65 kb, 5-70 kb, 5-75 kb, 5-80 kb, 5-85 kb, 5-90 kb, 5-95 kb, 5-100 kb, 100-200 kb, o 200-300 kb de longitud o más (tal como se describe en otra parte del presente documento) de modo que un brazo de homología tenga suficiente homología para experimentar una recombinación homóloga con una o unas secuencias diana correspondientes dentro de un locus genómico diana de la célula o dentro de otro vector de direccionamiento. En algunas realizaciones, un brazo de homología dado y/o la secuencia diana correspondiente comprende regiones correspondientes de homología que tienen, p. ej., pero sin limitación, al menos alrededor de 10-100 kb, 15-100 kb, 20-100 kb, 25-100 kb, 30-100 kb, 35-100 kb, 40-100 kb, 45-100 kb, 50-100 kb, 55-100 kb, 60-100 kb, 65-100 kb, 70-100 kb, 75-100 kb, 80-100 kb, 85-100 kb, 90-100 kb, o 95-100 kb de longitud o más (tal como se describe en otra parte del presente documento) de modo que un brazo de homología tenga suficiente homología para experimentar una recombinación homóloga con una o unas secuencias diana correspondientes dentro de un locus genómico diana de la célula o dentro de otro vector de direccionamiento.

Las secuencias solapantes de un brazo de homología 3' de un primer vector de direccionamiento y un brazo de homología 5' de un segundo vector de direccionamiento o de un brazo de homología 3' de un segundo vector de direccionamiento y un brazo de homología 5' de un tercer vector de direccionamiento pueden ser de cualquier longitud que sea suficiente para promover la recombinación homóloga entre dichos vectores de direccionamiento. Por ejemplo, una secuencia solapante dada de un brazo de homología puede comprender regiones solapantes correspondientes que tienen al menos aproximadamente 1-5 kb, 5-10 kb, 5-15 kb, 5-20 kb, 5-25 kb, 5-30 kb, 5-35 kb, 5-40 kb, 5-45 kb, 5-50 kb, 5-55 kb, 5-60 kb, 5-65 kb, 5-70 kb, 5-75 kb, 5-80 kb, 5-85 kb, 5-90 kb, 5-95 kb, 5-100 kb, 100-200 kb, o 200-300 kb de longitud o más, de modo que una secuencia solapante de un brazo de homología tenga suficiente homología para experimentar recombinación homóloga con una secuencia solapante correspondiente dentro de otro vector de direccionamiento. En algunas realizaciones, una secuencia solapante dada de un brazo de homología comprende una región solapante que tiene al menos de aproximadamente 1-100 kb, 5-100 kb, 10-100 kb, 15-100 kb, 20-100 kb, 25-100 kb, 30-100 kb, 35-100 kb, 40-100 kb, 45-100 kb, 50-100 kb, 55-100 kb, 60-100 kb, 65-100 kb, 70-100 kb, 75-100 kb, 80-100 kb, 85-100 kb, 90-100 kb, o 95-100 kb de longitud o más, de modo que una secuencia solapante de un brazo de homología tenga suficiente homología para experimentar recombinación homóloga con una secuencia solapante correspondiente dentro de otro vector de direccionamiento. En algunas realizaciones, una secuencia solapante es de 1-5 kb, ambos inclusive. En algunas realizaciones, una secuencia solapante es de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 70 kb, ambos inclusive. En algunas realizaciones, una secuencia solapante es de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 70 kb, ambos inclusive. En algunas realizaciones, una secuencia solapante es de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 50 kb, ambos inclusive. En algunas realizaciones, una secuencia solapante es de al menos 10 kb. En algunas realizaciones, una secuencia solapante es de al menos 20 kb. Por ejemplo, una secuencia solapante puede ser de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 5 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 15 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 15 kb a aproximadamente 20 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 25 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 25 kb a aproximadamente 30 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 30 kb a aproximadamente 35 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 35 kb a aproximadamente 40 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 40 kb a aproximadamente 45 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 45 kb a aproximadamente 50 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 50 kb a aproximadamente

60 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 60 kb a aproximadamente 70 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 70 kb a aproximadamente 80 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 80 kb a aproximadamente 90 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 90 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 120 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 120 kb a aproximadamente 140 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 140 kb a aproximadamente 160 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 160 kb a aproximadamente 180 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 180 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 200 kb a aproximadamente 220 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 220 kb a aproximadamente 240 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 240 kb a aproximadamente 260 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 260 kb a aproximadamente 280 kb, inclusive, o de aproximadamente 280 kb a aproximadamente 300 kb, ambos inclusive. Por proporcionar un solo ejemplo, una secuencia solapante puede ser de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 60 kb, ambos inclusive. Como alternativa, una secuencia solapante puede ser de al menos 1 kb, al menos 5 kb, al menos 10 kb, al menos 15 kb, al menos 20 kb, al menos 25 kb, al menos 30 kb, al menos 35 kb, al menos 40 kb, al menos 45 kb, al menos 50 kb, al menos 60 kb, al menos 70 kb, al menos 80 kb, al menos 90 kb, al menos 100 kb, al menos 120 kb, al menos 140 kb, al menos 160 kb, al menos 180 kb, al menos 200 kb, al menos 220 kb, al menos 240 kb, al menos 260 kb, al menos 280 kb, o al menos 300 kb.

Los brazos de homología pueden corresponder, en algunas realizaciones, a un locus que es natural de una célula (p. ej., un locus diana), o de manera alternativa pueden corresponder a una región de un segmento de ADN heterólogo o exógeno que se integró en el genoma de la célula, incluyendo, por ejemplo, transgenes, casetes de expresión, o regiones heterólogas o exógenas de ADN. Como alternativa, los brazos de homología pueden corresponder, en algunas realizaciones, a una región en un vector de direccionamiento en una célula. En algunas realizaciones, los brazos de homología de un vector de direccionamiento pueden corresponder a una región de un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial humano o cualquier otra región modificada por ingeniería que se encuentra en una célula hospedadora apropiada. Aún adicionalmente, los brazos de homología de un vector de direccionamiento pueden corresponder a o derivar de una región de una biblioteca de BAC, una biblioteca de cósmidos o una biblioteca de fagos P1. En algunas realizaciones determinadas, los brazos de homología de un vector de direccionamiento corresponden a un locus que es natural, heterólogo o exógeno a un procarionta, una levadura, un pájaro (p. ej., pollo), un mamífero no humano, un roedor, un ser humano, una rata, un ratón, un hámster un conejo, un cerdo, un bovino, un ciervo, una oveja, una cabra, un gato, un perro, un hurón, un primate (p. ej., tití común, macaco), un mamífero domesticado, un mamífero para agricultura o cualquier otro organismo de interés. En algunas realizaciones, los brazos de homología corresponden a un locus de la célula que no direccionable usando un método convencional o que puede dirigirse únicamente de forma incorrecta o únicamente con una eficacia significativamente baja en ausencia de una muesca o rotura de doble hebra inducida por un agente nucleasa (p. ej. Proteína Cas). En algunas realizaciones, los brazos de homología derivan de ADN sintético.

En algunas realizaciones, uno de los brazos de homología 5' o 3' de un vector o vectores de direccionamiento corresponde a un locus genómico dirigido mientras que el otro de los brazos de homología 5' o 3' corresponde a una región en otro vector de direccionamiento.

En algunas realizaciones, los brazos de homología 5' y 3' de un vector o vectores de direccionamiento corresponden a un genoma dirigido. Como alternativa, los brazos de homología pueden ser de un genoma relacionado. Por ejemplo, un genoma dirigido es un genoma de ratón de una primera cepa, y los brazos de direccionamiento son de un genoma de ratón de una segunda cepa, en donde la primera cepa y la segunda cepa son diferentes. En determinadas realizaciones, los brazos de homología son del genoma del mismo animal o son del genoma de la misma cepa, p. ej., el genoma dirigido es un genoma de ratón de una primera cepa, y los brazos de direccionamiento son de un genoma de ratón del mismo ratón o de la misma cepa.

Un brazo de homología de un vector de direccionamiento puede tener cualquier longitud que sea suficiente para promover un evento de recombinación homóloga con una secuencia diana correspondiente, incluyendo, por ejemplo, de al menos 1-5 kb, ambos inclusive, 5-10 kb, ambos inclusive, 5-15 kb, ambos inclusive, 5-20 kb, ambos inclusive, 5-25 kb, ambos inclusive, 5-30 kb, ambos inclusive, 5-35 kb, ambos inclusive, 5-40 kb, ambos inclusive, 5-45 kb, ambos inclusive, 5-50 kb, ambos inclusive, 5-55 kb, ambos inclusive, 5-60 kb, ambos inclusive, 5-65 kb, ambos inclusive, 5-70 kb, ambos inclusive, 5-75 kb, ambos inclusive, 5-80 kb, ambos inclusive, 5-85 kb, ambos inclusive, 5-90 kb, ambos inclusive, 5-95 kb, ambos inclusive, 5-100 kb, ambos inclusive, 100-200 kb, ambos inclusive, o 200-300 kb, ambos inclusive, de longitud o más. En algunas realizaciones, un brazo de homología de un vector de direccionamiento tiene una longitud que es suficiente para promover un evento de recombinación homóloga con una secuencia diana correspondiente que es de al menos 1-100 kb, ambos inclusive, 5-100 kb, ambos inclusive, 10-100 kb, ambos inclusive, 15-100 kb, ambos inclusive, 20-100 kb, ambos inclusive, 25-100 kb, ambos inclusive, 30-100 kb, ambos inclusive, 35-100 kb, ambos inclusive, 40-100 kb, ambos inclusive, 45-100 kb, ambos inclusive, 50-100 kb, ambos inclusive, 55-100 kb, ambos inclusive, 60-100 kb, ambos inclusive, 65-100 kb, ambos inclusive, 70-100 kb, ambos inclusive, 75-100 kb, ambos inclusive, 80-100 kb, ambos inclusive, 85-100 kb, ambos inclusive, 90-100 kb, ambos inclusive, o 95-100 kb, ambos inclusive, de longitud o más. Tal como se describe en el presente documento, los vectores de direccionamiento grandes pueden emplear brazos de direccionamiento de mayor longitud.

Pueden emplearse agentes nucleasa (p. ej., sistemas CRISPR/Cas) en combinación con vectores de direccionamiento para facilitar la modificación de un locus diana (p. ej., un locus de cadena ligera Igλ). Dichos agentes nucleasa pueden

promover la recombinación homóloga entre un vector de direccionamiento y un locus diana. Cuando se emplean agentes nucleasa en combinación con un vector de direccionamiento, el vector de direccionamiento puede comprender brazos de homología 5' y 3' correspondientes a secuencias diana 5' y 3' ubicadas en suficiente proximidad a un sitio de escisión por nucleasas para promover la aparición de un evento de recombinación homóloga entre secuencias diana y brazos de homología en una muesca o rotura de doble hebra en el sitio de escisión por nucleasas. La expresión "sitio de escisión por nucleasas" incluye una secuencia de ADN en la que un agente nucleasa crea una muesca o una rotura de doble hebra (p. ej., un sitio de escisión Cas9). Las secuencias diana dentro de un locus dirigido que corresponden a los brazos de homología 5' y 3' de un vector de direccionamiento están "ubicadas en suficiente proximidad" a un sitio de escisión por nucleasas si la distancia es tal que promueve la aparición de un evento de recombinación homóloga entre las secuencias diana 5' y 3' y los brazos de homología tras una muesca o rotura de doble hebra en el sitio de reconocimiento. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, las secuencias diana correspondientes a los brazos de homología 5' y/o 3' de un vector de direccionamiento están dentro de un nucleótido de un sitio de reconocimiento dado o están dentro de al menos 10 nucleótidos hasta aproximadamente 14 kb de un sitio de reconocimiento dado. En algunas realizaciones, un sitio de escisión por nucleasas está inmediatamente adyacente a al menos una o ambas secuencias diana.

La relación espacial de las secuencias diana que corresponden a los brazos de homología de un vector de direccionamiento y un sitio de escisión por nucleasas puede variar. Por ejemplo, las secuencias diana se pueden ubicar en 5' con respecto a un sitio de escisión por nucleasas, las secuencias diana se pueden ubicar en 3' con respecto a un sitio de reconocimiento, o las secuencias diana pueden flanquear un sitio de escisión por nucleasas.

El uso combinado de un vector de direccionamiento (que incluye, por ejemplo, un vector de direccionamiento grande) con un agente nucleasa puede dar como resultado una eficacia de direccionamiento aumentada en comparación con el uso de un vector de direccionamiento solo. Por ejemplo, cuando se usa un vector de direccionamiento junto con un agente nucleasa, la eficacia de direccionamiento de un vector de direccionamiento se puede incrementar al menos al doble, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, al menos diez veces o dentro de un intervalo formado por estos números enteros, tal como 2-10 veces en comparación con el uso de un vector de direccionamiento solo.

Algunos vector de direccionamiento son "vectores de direccionamiento grandes" o "LTVEC", que incluye vectores de direccionamiento que comprenden brazos de homología que corresponden a y derivan de secuencias de un ácido nucleico más grandes que las utilizadas normalmente por otros enfoques destinados a realizar recombinación homóloga en células. Un LTVEC puede tener, por ejemplo, al menos 10 kb de longitud, o la suma total de un brazo de homología 5' y un brazo de homología 3' puede ser, por ejemplo, al menos 10 kb. Los LTVEC también incluyen vectores de direccionamiento que comprenden insertos de ADN más grandes que los utilizados normalmente por otros enfoques destinados a realizar recombinación homóloga en células. Por ejemplo, los LTVEC hacen posible la modificación de grandes locus que no pueden acomodarse por los vectores de direccionamiento tradicionales basados en plásmidos debido a sus limitaciones de tamaño. Por ejemplo, un locus dirigido puede ser (es decir, los brazos de homología 5' y 3' pueden corresponder a) un locus de una célula que no direccionable usando un método convencional o que puede dirigirse únicamente de forma incorrecta o únicamente con una eficacia significativamente baja en ausencia de una muesca o rotura de doble hebra inducida por un agente nucleasa (p. ej. Proteína Cas).

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento emplean dos o tres LTVEC que son capaces de recombinarse entre sí y con un locus genómico diana en un evento de recombinación de tres o cuatro vías. Tales métodos hacen posible la modificación de grandes locus que no se pueden lograr usando un solo LTVEC.

Ejemplos de LTVEC incluyen vectores derivados de un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial humano o un cromosoma artificial de levadura (YAC). Se describen ejemplos de LTVEC y métodos para producirlos, p. ej., en las Patentes de EE.UU. N.º 6.586.251, 6.596.541 y N.º 7.105.348; y en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2002/036789. Los LTVEC pueden tener forma lineal o circular.

Los LTVEC pueden tener cualquier longitud, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 300 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 50 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 50 kb a aproximadamente 75 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 75 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 100 kb a 125 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 125 kb a aproximadamente 150 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 150 kb a aproximadamente 175 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 175 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 200 kb a aproximadamente 225 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 225 kb a aproximadamente 250 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 250 kb a aproximadamente 275 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 275 kb a aproximadamente 300 kb, ambos inclusive. Como alternativa, un LTVEC puede ser de al menos 10 kb, al menos 15 kb, al menos 20 kb, al menos 30 kb, al menos 40 kb, al menos 50 kb, al menos 60 kb, al menos 70 kb, al menos 80 kb, al menos 90 kb, al menos 100 kb, al menos 150 kb, al menos 200 kb, al menos 250 kb, al menos 300 kb, al menos 350 kb, al menos 400 kb, al menos 450 kb, o al menos 500 kb o más. El tamaño de un LTVEC puede, en algunas realizaciones, ser demasiado grande para permitir la exploración de eventos de direccionamiento mediante ensayos convencionales, p. ej., transferencia southern y PCR de largo alcance (p. ej., 1 kb a 5 kb).

En algunas realizaciones, un LTVEC comprende un inserto de ADN que varía de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 20 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 30 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 30 kb a aproximadamente 40 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 40 kb a aproximadamente 50 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 60 kb a aproximadamente 70 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 80 kb a aproximadamente 90 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 90 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 110 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 120 kb a aproximadamente 130 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 130 kb a aproximadamente 140 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 140 kb a aproximadamente 150 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 150 kb a aproximadamente 160 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 160 kb a aproximadamente 170 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 170 kb a aproximadamente 180 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 180 kb a aproximadamente 190 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 190 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive. En algunas realizaciones, un inserto de ADN puede variar entre aproximadamente 5 kb y aproximadamente 10 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 20 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 40 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 40 kb a aproximadamente 60 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 60 kb a aproximadamente 80 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 80 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 150 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 150 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 200 kb a aproximadamente 250 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 250 kb a aproximadamente 300 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 300 kb a aproximadamente 350 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 350 kb a aproximadamente 400 kb, ambos inclusive. En algunas realizaciones, un LTVEC comprende un inserto de ADN que varía de aproximadamente 400 kb a aproximadamente 450 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 450 kb a aproximadamente 500 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 500 kb a aproximadamente 550 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 550 kb a aproximadamente 600 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 600 kb a aproximadamente 650 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 650 kb a aproximadamente 700 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 700 kb a aproximadamente 750 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 750 kb a aproximadamente 800 kb, ambos inclusive.

En algunas realizaciones, la suma total de un brazo de homología 5' y un brazo de homología 3' de un LTVEC es de al menos 10 kb. En algunas realizaciones, un brazo de homología 5' de un o unos LTVEC varía de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, y/o un brazo de homología 3' de un o unos LTVEC varía de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive. La suma total de los brazos de homología 5' y 3' puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 kb a aproximadamente 5 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 20 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 30 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 30 kb a aproximadamente 40 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 40 kb a aproximadamente 50 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 50 kb a aproximadamente 60 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 60 kb a aproximadamente 70 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 70 kb a aproximadamente 80 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 80 kb a aproximadamente 90 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 90 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 110 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 110 kb a aproximadamente 120 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 120 kb a aproximadamente 130 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 130 kb a aproximadamente 140 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 140 kb a aproximadamente 150 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 150 kb a aproximadamente 160 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 160 kb a aproximadamente 170 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 170 kb a aproximadamente 180 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 180 kb a aproximadamente 190 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 190 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive. Como alternativa, cada brazo de homología puede ser, en algunas realizaciones, de al menos 5 kb, al menos 10 kb, al menos 15 kb, al menos 20 kb, al menos 30 kb, al menos 40 kb, al menos 50 kb, al menos 60 kb, al menos 70 kb, al menos 80 kb, al menos 90 kb, al menos 100 kb, al menos 110 kb, al menos 120 kb, al menos 130 kb, al menos 140 kb, al menos 150 kb, al menos 160 kb, al menos 170 kb, al menos 180 kb, al menos 190 kb, o al menos 200 kb. De forma análoga, la suma total de los brazos de homología 5' y 3' puede ser en algunas realizaciones, de al menos 5 kb, al menos 10 kb, al menos 15 kb, al menos 20 kb, al menos 30 kb, al menos 40 kb, al menos 50 kb, al menos 60 kb, al menos 70 kb, al menos 80 kb, al menos 90 kb, al menos 100 kb, al menos 110 kb, al menos 120 kb, al menos 130 kb, al menos 140 kb, al menos 150 kb, al menos 160 kb, al menos 170 kb, al menos 180 kb, al menos 190 kb, o al menos 200 kb.

En algunas realizaciones, un LTVEC y un inserto de ADN están diseñados para permitir una delección de una secuencia endógena en un locus diana de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 20 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 40 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 40 kb a aproximadamente 60 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 60 kb a aproximadamente 80 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 80 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 150 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 150 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 200 kb a aproximadamente 300 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 300 kb a aproximadamente 400 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 400 kb a aproximadamente 500 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 500 kb a aproximadamente 600 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 600 kb a aproximadamente 700 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 700 kb a aproximadamente 800 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 500 kb a aproximadamente 1 Mb, ambos inclusive,

de aproximadamente 1 Mb a aproximadamente 1,5 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 1,5 Mb a aproximadamente 2 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 2 Mb a aproximadamente 2,5 Mb, ambos inclusive, o de aproximadamente 2,5 Mb a aproximadamente 3 Mb, ambos inclusive. Como alternativa, una deleción puede ser de aproximadamente 3 Mb a aproximadamente 4 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 4 Mb a aproximadamente 5 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 5 Mb a aproximadamente 10 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 10 Mb a aproximadamente 20 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 Mb a aproximadamente 30 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 30 Mb a aproximadamente 40 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 40 Mb a aproximadamente 50 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 50 Mb a aproximadamente 60 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 60 Mb a aproximadamente 70 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 70 Mb a aproximadamente 80 Mb, ambos inclusive, de aproximadamente 80 Mb a aproximadamente 90 Mb, ambos inclusive, o de aproximadamente 90 Mb a aproximadamente 100 Mb, ambos inclusive. Como alternativa, una deleción puede ser de al menos 10 kb, al menos 20 kb, al menos 30 kb, al menos 40 kb, al menos 50 kb, al menos 60 kb, al menos 70 kb, al menos 80 kb, al menos 90 kb, al menos 100 kb, al menos 150 kb, al menos 200 kb, al menos 250 kb, al menos 300 kb, al menos 350 kb, al menos 400 kb, al menos 450 kb, o al menos 500 kb o más.

En algunas realizaciones, un LTVEC y un inserto de ADN están diseñados para permitir una inserción en un locus diana de una secuencia de un ácido nucleico exógena que varía de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 10 kb a aproximadamente 20 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 20 kb a aproximadamente 40 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 40 kb a aproximadamente 60 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 60 kb a aproximadamente 80 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 80 kb a aproximadamente 100 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 150 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 150 kb a aproximadamente 200 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 200 kb a aproximadamente 250 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 250 kb a aproximadamente 300 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 300 kb a aproximadamente 350 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 350 kb a aproximadamente 400 kb, ambos inclusive. Como alternativa, una inserción puede ser, en algunas realizaciones, de aproximadamente 400 kb a aproximadamente 450 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 450 kb a aproximadamente 500 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 500 kb a aproximadamente 550 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 550 kb a aproximadamente 600 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 600 kb a aproximadamente 650 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 650 kb a aproximadamente 700 kb, ambos inclusive, de aproximadamente 700 kb a aproximadamente 750 kb, ambos inclusive, o de aproximadamente 750 kb a aproximadamente 800 kb, ambos inclusive. Como alternativa, una inserción puede ser, en algunas realizaciones, al menos 10 kb, al menos 20 kb, al menos 30 kb, al menos 40 kb, al menos 50 kb, al menos 60 kb, al menos 70 kb, al menos 80 kb, al menos 90 kb, al menos 100 kb, al menos 150 kb, al menos 200 kb, al menos 250 kb, al menos 300 kb, al menos 350 kb, al menos 400 kb, al menos 450 kb, o al menos 500 kb o más.

En otros casos más, un inserto de ADN y/o una región de un locus endógeno que se está siendo alterado, delecionado, dirigido, modificado, modificado por ingeniería, etc., tiene al menos 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 nucleótidos o al menos 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 11 kb, 12 kb, 13 kb, 14 kb, 15 kb, 16 kb, 17 kb, 18 kb, 19 kb, 20 kb o más. En algunas realizaciones, un inserto de ADN y/o una región de un locus endógeno que se está siendo alterado, delecionado, dirigido, modificado, modificado por ingeniería, etc. es de nucleótidos a 20 kb, 200 nucleótidos a 20 kb, 300 nucleótidos a 20 kb, 400 nucleótidos a 20 kb, 500 nucleótidos a 20 kb, 600 nucleótidos a 20 kb, 700 nucleótidos a 20 kb, 800 nucleótidos a 20 kb, 900 nucleótidos a 20 kb, 1 kb a 20 kb, 2 kb a 20 kb, 3 kb a 20 kb, 4 kb a 20 kb, 5 kb a 20 kb, 6 kb a 20 kb, 7 kb a 20 kb, 8 kb a 20 kb, 9 kb a 20 kb, 10 kb a 20 kb, 11 kb a 20 kb, 12 kb a 20 kb, 13 kb a 20 kb, 14 kb a 20 kb, 15 kb a 20 kb, 16 kb a 20 kb, 17 kb a 20 kb, 18 kb a 20 kb, o 19 kb a 20 kb. En algunas realizaciones, un inserto de ADN y/o una región de un locus endógeno que se está siendo alterado, delecionado, dirigido, modificado, modificado por ingeniería, etc. es de 100 nucleótidos a 19 kb, 100 nucleótidos a 18 kb, 100 nucleótidos a 17 kb, 100 nucleótidos a 16 kb, 100 nucleótidos a 15 kb, 100 nucleótidos a 14 kb, 100 nucleótidos a 13 kb, 100 nucleótidos a 12 kb, 100 nucleótidos a 11 kb, 100 nucleótidos a 10 kb, 100 nucleótidos a 9 kb, 100 nucleótidos a 8 kb, 100 nucleótidos a 7 kb, 100 nucleótidos a 6 kb, 100 nucleótidos a 5 kb, 100 nucleótidos a 4 kb, 100 nucleótidos a 3 kb, 100 nucleótidos a 2 kb, 100 nucleótidos a 1 kb, 100 nucleótidos a 900 nucleótidos, 100 nucleótidos a 800 nucleótidos, 100 nucleótidos a 700 nucleótidos, 100 nucleótidos a 600 nucleótidos, 100 nucleótidos a 500 nucleótidos, 100 nucleótidos a 400 nucleótidos, 100 nucleótidos a 300 nucleótidos o 100 nucleótidos a 200 nucleótidos. En algunas realizaciones, un inserto de ADN y/o una región de un locus endógeno que se está siendo alterado, delecionado, dirigido, modificado, modificado por ingeniería, etc. es de 200 nucleótidos a 19 kb, 300 nucleótidos a 18 kb, 400 nucleótidos a 17 kb, 500 nucleótidos a 16 kb, 600 nucleótidos a 15 kb, 700 nucleótidos a 14 kb, 800 nucleótidos a 13 kb, 900 nucleótidos a 12 kb, 1 kb a 11 kb, 2 kb a 10 kb, 3 kb a 9 kb, 4 kb a 8 kb, 5 kb a 7 kb, o 5 kb a 6 kb.

*Roedores proporcionados*

En determinados aspectos, se proporcionan roedores que expresan anticuerpos que contienen cadenas ligeras que incluyen una secuencia de cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, que son el resultado de la integración de material genético que corresponde al menos a una porción de un locus de cadena ligera Igλ humana, y que codifica al menos un dominio Vλ humano (es decir, una secuencia Vλ-Jλ humana reordenada), en el lugar de las correspondientes secuencias de cadena ligera de Igλ de roedor en el genoma de la línea germinal del roedor, en particular, ratas o ratones.

Una secuencia de cadena ligera Igλ humana, en algunas realizaciones, comprende material genético de un locus de cadena ligera Igλ humana, en donde la secuencia de cadena ligera Igλ humana codifica una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la porción codificada del material genético del locus de cadena ligera Igλ humana.

5 En algunas realizaciones, una secuencia de cadena ligera Igλ humana como se describe en el presente documento comprende al menos un segmento de genes Vλ humanos y al menos un segmento de genes Jλ humano, y una o más secuencias necesarias para promover el reordenamiento (p. ej., secuencias señal de recombinación) de dicho al menos un segmento de genes Vλ humanos con dicho al menos un segmento de genes Jλ humanos para formar una secuencia Vλ-Jλ humana reordenada funcional que codifica un dominio Vλ humano. En muchas realizaciones, una

10 secuencia de cadena ligera Igλ humana comprende una pluralidad de segmentos de genes Vλ humanos y una o más secuencias necesarias para promover el reordenamiento de dichos segmentos de genes Vλ humanos con al menos un segmento de genes Jλ humanos. En muchas realizaciones, una secuencia de cadena ligera Igλ humana como se describe en el presente documento es una secuencia genómica de un locus de cadena ligera Igλ humana (p. ej., aislada y/o clonada de un cromosoma artificial bacteriano) y contiene una pluralidad de segmentos de genes Vλ

15 humanas en configuración de línea germinal. En algunas realizaciones, una secuencia de cadena ligera Igλ humana comprende secuencias Vλ, Jλ y Cλ humanas en configuración de línea germinal (es decir, como dichas secuencias Vλ, Jλ y Cλ humanas aparecen en un locus de cadena ligera Igλ en una célula humana). En algunas realizaciones, una secuencia de cadena ligera Igλ humana es o comprende una secuencia humana que aparece en el dibujo (p. ej., véase las Figuras 1-4). En algunas realizaciones, una secuencia de cadena ligera Igλ humana codifica un polipéptido de cadena ligera Igλ, en su totalidad o en parte, cuyo polipéptido de cadena ligera Igλ aparece en una inmunoglobulina, en particular, una inmunoglobulina que se expresa por un linfocito B humano. También se proporcionan roedores, embriones, células y construcciones de direccionamiento para producir roedores, embriones de roedores y células que contienen dicha secuencia de cadena ligera Igλ humana en lugar de una secuencia de cadena ligera Igλ de roedor correspondiente (p. ej., un locus endógeno de cadena ligera Igλ de roedor).

25 En algunas realizaciones, se inserta una secuencia de cadena ligera Igλ humana en el lugar de una secuencia de cadena ligera Igλ de roedor correspondiente dentro del genoma de la línea germinal de un roedor. En algunas realizaciones, se inserta una secuencia de cadena ligera Igλ humana cadena arriba de una secuencia de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., una secuencia de región constante de cadena ligera Igλ de roedor). En algunas realizaciones, se inserta una secuencia de cadena ligera Igλ humana en medio de una o más secuencias de cadena ligera Igλ de roedor de modo que dicha secuencia de cadena ligera Igλ humana se yuxtapone con secuencias de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., véanse las Figuras 1, 2, 3 y/o 4).

35 En algunas realizaciones, no se delecionan una o más secuencias (o porción de las mismas) de cadena ligera Igλ de roedor de locus de cadena ligera Igλ de roedor. En algunas realizaciones, una o más secuencias de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., Vλ, Jλ y/o Cλ) de un locus de cadena ligera Igλ de roedor están alteradas, desplazadas, perturbadas, eliminadas o reemplazadas con, entre otras cosas, una secuencia de cadena ligera Igλ humana como se describe en el presente documento (p. ej., una secuencia que incluye uno o más segmentos de genes Vλ humanos, uno o más segmentos de genes Jλ humanos, uno o más segmentos de genes Cλ humanos, o combinaciones de los mismos)

40 operativamente unidos a una región constante de cadena ligera Igλ de roedor, y uno o más elementos potenciadores y/o reguladores de un locus de cadena ligera Igλ de roedor. En algunas realizaciones, todo o sustancialmente todo un locus de cadena ligera Igλ de roedor se reemplaza con una o más secuencias de cadena ligera Igλ humana (como se describe en el presente documento) que está operativamente unido a una región constante de cadena ligera Igλ de roedor y uno o más elementos potenciadores y/o reguladores de cadena ligera Igλ de roedor de un locus de cadena ligera Igλ de roedor. En algunas realizaciones determinadas, uno o más genes de región constante de cadena ligera Igλ de roedor no se delecionan o reemplazan en un roedor que incluye una secuencia de cadena ligera Igλ humana como se describe en el presente documento. Para dar un ejemplo no limitante, en el caso de una inserción de una secuencia de cadena ligera Igλ humana que se inserta en un locus de cadena ligera Igλ de roedor, dicha inserción se realiza de manera que se mantenga la integridad de las secuencias de cadena ligera Igλ de roedor cerca del punto de inserción (p. ej., una región constante de cadena ligera Igλ de roedor y/o una región o secuencia potenciadora de cadena ligera Igλ de roedor). Por lo tanto, tales roedores tienen una región constante de cadena ligera Igλ de tipo silvestre. En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera Igλ de roedor que está alterado, desplazado, interrumpido, delecionado, reemplazado o modificado por ingeniería genética con una o más secuencias de cadena ligera Igλ humana como se describe en el presente documento es un locus de cadena ligera Igλ murino (p. ej., ratón o rata). En algunas realizaciones, se inserta una secuencia de cadena ligera Igλ humana en una copia (es decir, alelo) de un locus de cadena ligera Igλ de roedor de las dos copias de dicho locus de cadena ligera Igλ de roedor, dando lugar a un roedor que es heterocigoto con respecto a la secuencia de cadena ligera Igλ humana. En algunas realizaciones, se proporciona un roedor que es homocigoto para un locus de cadena ligera Igλ que incluye una secuencia de cadena ligera Igλ humana como se describe en el presente documento.

60 En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera Igλ de roedor modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende segmentos de genes Vλ, Jλ y Cλ humanos operativamente unidos a una región constante de cadena ligera Igλ de roedor y uno o más potenciadores de cadena ligera Igλ de roedor (opcionalmente también pueden estar presentes elementos reguladores de cadena ligera Igλ de roedor). En algunas realizaciones, un locus de cadena ligera Igλ de roedor modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende segmentos de genes Vλ, Jλ y Cλ humanos operativamente unidos a una región constante de cadena ligera Igλ de

65

roedor, uno o más potenciadores de cadena ligera Igλ de roedor) (opcionalmente elementos reguladores de cadena ligera Igλ de roedor) y tres potenciadores y/o elementos reguladores de cadena ligera Igλ humana.

5 En algunas realizaciones, un roedor contiene un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento que se integra aleatoriamente en su genoma (p. ej., como parte de una secuencia de cadena ligera Igλ humana integrada aleatoriamente). Por lo tanto, tales roedores pueden describirse como que tienen un transgén de cadena ligera Igλ humana que contiene una pluralidad de segmentos de genes Vλ, Jλ y/o Cλ humanos configurados de tal manera que dichos segmentos de genes Vλ, Jλ y/o Cλ humanos son capaces de reordenarse y codificar una cadena ligera Igλ, en su totalidad o en parte, de un anticuerpo en el repertorio expresado del roedor. Un locus o transgén de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento puede detectarse usando una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo, PCR, transferencia Western, transferencia Southern, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), o un ensayo de ganancia o pérdida de alelo. En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento es heterocigoto con respecto a un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento es hemocigoto con respecto a un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento contiene una o más copias de un transgén o locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento contiene un locus de cadena ligera Igλ como se muestra en el Dibujo (p. ej., véanse las Figuras 1, 2, 3 y/o 4).

25 En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones y métodos para producir roedores cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería que incluye una o más secuencias de cadena ligera Igλ humana (p. ej., segmentos de genes Vλ, Jλ y/o Cλ humanos) en lugar de secuencias de cadena ligera Igλ de roedor, incluidas las secuencias que codifican cadena ligera Igλ humana que incluyen formas polimórficas específicas de segmentos Vλ, Jλ y/o Cλ humanos (p. ej., Alelos o variantes V y/o J específicos), incluyendo composiciones y métodos para producir roedores que expresan anticuerpos que comprenden cadenas ligeras Igλ que contienen dominios variables humanos y dominios constantes humanos o de roedor, ensamblados a partir de un locus de cadena ligera Igλ que contiene segmentos Vλ, Jλ y Cλ humanos operativamente unidos a una región constante de cadena ligera Igλ de roedor. En algunas realizaciones, también se proporcionan composiciones y métodos para producir roedores que expresan dichos anticuerpos bajo el control de una o más secuencias potenciadoras endógenas y/o una o más reguladoras endógenas. En algunas realizaciones, también se proporcionan composiciones y métodos para producir roedores que expresan dichos anticuerpos bajo el control de una o más secuencias potenciadoras heterólogas y/o una o más reguladoras heterólogas.

35 En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen insertar una secuencia que codifica una cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, cadena arriba de una región constante de cadena ligera Igλ de roedor (p. ej., una región Cλ murina) para que se exprese un anticuerpo, cuyo anticuerpo se caracteriza por la presencia de una cadena ligera que contiene al menos un dominio Vλ humano y, en algunas realizaciones, un dominio Vλ y Cλ humanos, y se expresa tanto en la superficie de los linfocitos B como en el suero sanguíneo de un roedor.

45 En algunas realizaciones, los métodos incluyen la inserción en serie de material genético que corresponde a un locus de cadena ligera Igλ humana. En algunas realizaciones, el material genético que corresponde a un locus de cadena ligera Igλ humana puede ser sintético o genómico (p. ej., clonado a partir de un cromosoma artificial bacteriano). En algunas realizaciones, el material genético que corresponde a un locus de cadena ligera Igλ humana puede diseñarse a partir de fuentes y/o cromosomas artificiales bacterianos publicados de modo que dicho material genético contiene segmentos Vλ, Jλ y/o Cλ humanos en una orientación que es diferente de la que aparece en un locus de cadena ligera Igλ humana, aunque dicho material genético todavía contiene secuencias para soportar el reordenamiento de dichos segmentos Vλ, Jλ y/o Cλ humanos para codificar una cadena ligera Igλ funcional. Por proporcionar un solo ejemplo, el material genético que corresponde a un locus de cadena ligera Igλ humana se puede diseñar utilizando la guía proporcionada en el presente documento para construir una secuencia de cadena ligera Igλ humana que contenga segmentos Vλ, Jλ y/o Cλ humanos en un orden y/o disposición que es diferente en el que aparece en un locus de cadena ligera Igλ humana de una célula humana. En dicho un ejemplo, el contenido de segmentos Vλ, Jλ y/o Cλ humanos sería equivalente a los segmentos correspondientes en una célula humana, sin embargo, el orden y la disposición serían diferentes. Cuando se construye un locus de cadena ligera Igλ humana para la generación de un roedor como se describe en el presente documento, las secuencias señal de recombinación necesarias pueden configurarse de modo que los segmentos humanos puedan reordenarse correctamente y formar una cadena ligera Igλ funcional. Se puede encontrar orientación para la configuración de la línea germinal de segmentos y secuencias de cadena ligera Igλ humana necesarios para una recombinación adecuada en *Molecular Biology of B Cells*, Londres: Elsevier Academic Press, 2004, Ed. Honjo, T., Alt, F.W., Neuberger, M. Capítulos 4 (págs. 37-59) y 5 (61-82).

65 En algunas realizaciones, la inserción en serie incluye múltiples inserciones de porciones de material genético heterólogo en un solo clon de células ES. En algunas realizaciones, la inserción en serie incluye inserciones secuenciales de porciones de material genético heterólogo en sucesivos clones de células ES.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 11.822 pb de ADN cadena abajo de una región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata) de modo que dicho ADN esté operativamente unido a dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata), cuyo ADN incluye una o más regiones (o secuencias) potenciadoras de cadena ligera Igλ humana. En algunas realizaciones determinadas, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 11.822 pb de ADN que comprende tres regiones (o secuencias) potenciadoras de cadena ligera Igλ humana, en donde dichas tres regiones (o secuencias) potenciadoras de cadena ligera Igλ humana se insertan cadena abajo de dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata).

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 125.473 pb de ADN cadena arriba de una región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata) de modo que dicho ADN esté operativamente unido a dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ3-10, Vλ3-9, Vλ2-8, Vλ4-3, Vλ3-1, los pares de segmentos Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6 y el segmento del gen Jλ humano Jλ7. En algunas realizaciones determinadas, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 11.822 pb de ADN que comprende una o más regiones (o secuencias) potenciadoras de cadena ligera Igλ humana, cuyas una o más regiones (o secuencias) potenciadoras de cadena ligera Igλ humana se insertan cadena abajo de dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata).

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 171.458 pb de ADN cadena arriba de una región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata) de modo que dicho ADN esté operativamente unido a dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ2-11, Vλ3-12, Vλ2-14, Vλ3-16, Vλ3-19, Vλ3-21, Vλ3-22, Vλ2-23, Vλ3-25 y Vλ3-27. En algunas realizaciones determinadas, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 171.458 pb de ADN cadena arriba de un segmento de gen Vλ3-10 humano que está operativamente unido a una región Cλ1 murina (p. ej., de ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ2-11, Vλ3-12, Vλ2-14, Vλ3-16, Vλ3-19, Vλ3-21, Vλ3-22, Vλ2-23, Vλ3-25 y Vλ3-27.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 121.188 pb de ADN cadena arriba de una región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata) de modo que dicho ADN esté operativamente unido a dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ3-27, Vλ1-36, Vλ5-37, Vλ5-39, Vλ1-40, Vλ7-43, Vλ1-44, Vλ5-45, Vλ7-46, Vλ1-47, Vλ9-49, Vλ1-51 y Vλ5-52. En algunas realizaciones determinadas, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 121.188 pb de ADN cadena arriba de un segmento de gen Vλ3-27 humano que está operativamente unido a una región Cλ1 murina (p. ej., de ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ3-27, Vλ1-36, Vλ5-37, Vλ5-39, Vλ1-40, Vλ7-43, Vλ1-44, Vλ5-45, Vλ7-46, Vλ1-47, Vλ9-49, Vλ1-51 y Vλ5-52.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 121.188 pb de ADN cadena arriba de una región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata) de modo que dicho ADN esté operativamente unido a dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ3-27, Vλ1-36, Vλ5-37, Vλ5-39, Vλ1-40, Vλ7-43, Vλ1-44, Vλ5-45, Vλ7-46, Vλ1-47, Vλ9-49, Vλ1-51 y Vλ5-52, y cuyo ADN incluye un brazo de homología que incluye una secuencia que está 5' de un segmento de gen Vλ2 de ratón. En algunas realizaciones determinadas, los métodos incluyen la inserción de aproximadamente 121.188 pb de ADN cadena arriba de un segmento de gen Vλ3-27 humano que está operativamente unido a una región Cλ1 murina (p. ej., de ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ3-27, Vλ1-36, Vλ5-37, Vλ5-39, Vλ1-40, Vλ7-43, Vλ1-44, Vλ5-45, Vλ7-46, Vλ1-47, Vλ9-49, Vλ1-51 y Vλ5-52 y cuyo ADN incluye un brazo de homología que incluye una secuencia de ratón que está 5' de un segmento de gen Vλ2 de ratón para dirigir la delección de una secuencia genómica de Igλ de ratón (p. ej., un locus de cadena ligera Igλ) tras la recombinación homóloga con dicho fragmento de ADN.

La inserción de segmentos de genes Vλ, Jλ y/o Cλ humanos adicionales puede conseguirse usando los métodos descritos en el presente documento para complementar adicionalmente la diversidad de un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos pueden incluir la inserción de aproximadamente 300 kb de ADN cadena arriba de una región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata) de modo que dicho ADN esté operativamente unido a dicha región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ10-54, Vλ6-57, Vλ4-60, Vλ8-61 y Vλ4-69. En dichas realizaciones, dicho ADN se inserta cadena arriba de un segmento de gen Vλ5-52 humano que está operativamente unido a una región Cλ1 murina (p. ej., ratón o rata), cuyo ADN incluye los segmentos de genes Vλ humanos Vλ10-54, Vλ6-57, Vλ4-60, Vλ8-61 y Vλ4-69. En algunas realizaciones determinadas, dicho ADN incluye un gen VpreB humano. Los segmentos Vλ humanos adicionales descritos anteriormente pueden clonarse directamente a partir de clones de BAC disponibles comercialmente y disponerse en fragmentos de ADN más pequeños utilizando técnicas recombinantes descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica. Como alternativa, los segmentos de genes Vλ humanos adicionales descritos anteriormente pueden sintetizarse en un fragmento de ADN y agregarse a un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería genética como se describe anteriormente. De forma análoga, se pueden obtener segmentos de genes Jλ y/o Cλ humanos adicionales a partir de clones de BAC disponibles comercialmente o sintetizarlos directamente a partir de secuencias publicadas. También, las regiones (o secuencias) potenciadoras de cadena ligera Igλ endógenas pueden deleccionarse de un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento. En cualquiera de las Figuras 1, 2, 3 y 4 se expone una ilustración ejemplar que muestra un locus de cadena ligera Igλ de roedores, como se describe en el presente documento.

5 Cuando sea adecuado, una secuencia de cadena ligera Igλ humana (es decir, una secuencia que contiene segmentos de genes Vλ, Jλ y/o Cλ) que codifica una cadena ligera Igλ, en su totalidad o en parte, puede modificarse por separado para incluir codones que están optimizados para la expresión en un roedor (p. ej., véanse las Patentes de E.E.U.U. N.º 5.670.356 y 5.874.304). Las secuencias con codones optimizados son secuencias sintéticas y preferentemente  
 10 codifican el polipéptido idéntico (o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de longitud completa que tiene sustancialmente la misma actividad que el polipéptido de longitud completa) codificado por el polinucleótido precursor sin codones optimizados. En algunas realizaciones, una secuencia de cadena ligera Igλ humana que codifica una cadena ligera Igλ, en su totalidad o en parte, puede incluir por separado una secuencia alterada para optimizar el uso de codones para un tipo de célula particular (p. ej., una célula de roedor). Por ejemplo, los codones de cada  
 15 secuencia de nucleótidos que se insertan en el genoma de un roedor pueden optimizarse para su expresión en una célula del roedor. Tal secuencia puede describirse como una secuencia con codones optimizados.

En algunas realizaciones, la inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, emplea una modificación mínima del genoma de la línea germinal de un roedor como se describe en el presente documento y da como resultado la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras que son humanas, en su totalidad o en parte. Se conocen en la técnica métodos para generar roedores modificados por ingeniería, incluyendo con genes desactivados y con inserción de genes, (véase, p. ej., Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc., 2000). Por ejemplo, la generación de roedores transgénicos puede implicar opcionalmente la interrupción de los locus genéticos de uno o más genes (o segmentos de gen) de roedor endógenos y la introducción de uno o más genes (o segmentos de gen o secuencias de nucleótidos) heterólogos en el genoma de roedor, en algunas realizaciones, en la misma ubicación que un gen (o segmentos de gen) de roedor endógeno. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, se introduce cadena arriba de un gen de región constante de cadena ligera Igλ murina (p. ej., de ratón o rata) de un transgén de cadena ligera Igλ insertado aleatoriamente en el genoma de la línea  
 20 germinal de un roedor. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, se introduce cadena arriba de un gen de región constante de cadena ligera Igλ murina (p. ej., de ratón o rata) de un locus de cadena ligera Igλ endógeno en el genoma de la línea germinal de un roedor; en algunas realizaciones determinadas, un locus de cadena ligera Igλ endógeno se altera, modifica o modifica por ingeniería para que contenga segmentos de genes de Igλ humanos (p. ej., Vλ, Jλ y/o Cλ) operativamente unidos a una región Cλ1 de roedor.  
 25  
 30

En las Figuras 1-4 se proporciona una ilustración esquemática (no a escala) de locus de cadena ligera Igλ modificados por ingeniería ejemplares. En particular, las Figuras 1 y 3 exponen estrategias ejemplares para la construcción de locus de cadenas ligeras Igλ modificadas por ingeniería caracterizadas por la inserción de secuencias de nucleótidos que contienen una pluralidad de segmentos Vλ, Jλ y Cλ. Como se ilustra en la Figura 1, un fragmento de ADN que contiene una secuencia (o región) Eλ humana se inserta cadena abajo de una región Cλ de roedor mediante recombinación homóloga. Este fragmento de ADN contiene un casete de selección de Neomicina (p. ej., un gen de resistencia a neomicina [NEO<sup>R</sup>] flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinación *loxP*) situado 3' con respecto a la secuencia Eλ humana, que contiene tres elementos Eλ humanos modificados por ingeniería cadena abajo (o 3') de la región Cλ1 de roedor. También se ilustra en la Figura 1 un fragmento de ADN que contiene una primera porción de segmentos Vλ humanos, un conjunto de pares de segmentos Jλ-Cλ humanos (p. ej., Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6 humanos) y un segmento Jλ7 humano se inserta cadena arriba de una región Cλ1 de roedor mediante recombinación homóloga. Como se ilustra, un casete de selección de Higromicina (p. ej., un gen de resistencia a higromicina [HYG<sup>R</sup>] flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinación Frt) se coloca en el extremo 5' del vector de direccionamiento y cadena arriba de la secuencia de cadena ligera Igλ humana que se encuentra en el vector de direccionamiento. El casete de selección de Higromicina se elimina mediante recombinación homóloga con los vectores de direccionamiento posteriores descritos en la sección de ejemplos a continuación. A continuación, el vector de direccionamiento se somete a electroporación en células madre embrionarias (ES) de roedor para crear un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende el locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería. Una vez que se confirma un clon positivo de células ES de roedor, los otros vectores de direccionamiento representados se someten a electroporación de forma sucesiva y se confirman en cada etapa para completar la construcción del locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería (véase la Figura 2). El vector de direccionamiento final puede diseñarse con (vector de direccionamiento 6680) o sin (vector de direccionamiento 6597) un brazo de homología que dirige la delección de segmentos de cadena ligera Igλ endógenos mediante recombinación homóloga que da como resultado dos posibles alelos de cadena ligera Igλ modificados por ingeniería (Figura 2). Adicionalmente, cualquier casete de selección restante puede delecionarse según se desee mediante una delección mediada por recombinasas. En la Figura 3 se expone una estrategia alternativa para insertar segmentos de genes Vλ humanos adicionales en un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería utilizando ARN guía (ARNg).  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

60 Una vez que se inserta una secuencia de cadena ligera Igλ humana cadena arriba de una región constante de cadena ligera Igλ no humana de un clon BAC, se crea un vector de direccionamiento para la integración en un locus de cadena ligera Igλ. El clon BAC dirigido con una secuencia de cadena ligera Igλ humana para crear un vector de direccionamiento puede contener ADN genómico flanqueante 5' y/o 3' de origen murino (p. ej., ratón o rata). Como alternativa o adicionalmente, un clon BAC dirigido con una secuencia de cadena ligera Igλ humana para crear un vector de direccionamiento puede contener ADN genómico flanqueante 5' y/o 3' de origen humano de modo que se cree una región de solapamiento con una secuencia de cadena ligera Igλ humana. De esta manera, se habilita el  
 65

direccionamiento sucesivo de múltiples clones BAC modificados por ingeniería (p. ej., véase la Figura 1). Los vectores de direccionamiento finales se incorporan en un locus de cadena ligera Igλ en el genoma de una célula madre embrionaria de roedor. En algunas realizaciones, los vectores de direccionamiento como se describe en el presente documento se incorporan en un locus de cadena ligera Igλ en el genoma de la línea germinal de una célula de roedor que además contiene ADN genómico de V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos (p. ej., que contiene una pluralidad de segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos) operativamente unidos con uno o más genes de región constante de IgH y/o ADN genómico de V<sub>K</sub> y J<sub>K</sub> humanos (p. ej., que contiene una pluralidad de segmentos de genes V<sub>K</sub> y J<sub>K</sub> humanos) operativamente unidos con un gen de región constante Igκ (p. ej., véanse las Patente de EE.UU. N.º 8.502.018, 8.642.835, 8.697.940 y 8.791.323).

Se introduce un vector de direccionamiento en células madre embrionarias de roedor (p. ej., ratón) mediante electroporación, de modo que la secuencia que se encuentra en el vector de direccionamiento se inserta en el genoma de las células madre embrionarias de roedor y da como resultado la capacidad de que una célula de roedor o roedor (p. ej., un ratón) exprese anticuerpos que tienen cadenas ligeras Igλ humanas, en su totalidad o en parte. Tal como se describe en el presente documento, se genera un roedor transgénico donde se ha creado un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería en la línea germinal del genoma del roedor (p. ej., un locus de cadena ligera Igλ endógeno que contiene una secuencia de cadena ligera Igλ humana operativamente unida a una región Cλ de roedor endógena como se describe en el presente documento). Los anticuerpos se expresan en la superficie de los linfocitos B de roedor y en el suero de dicho roedor, cuyos anticuerpos se caracterizan por cadenas ligeras que tienen dominios Vλ humanos y, en algunas realizaciones, dominios Vλ y Cλ humanos. Cuando un locus de cadena ligera Igλ endógeno en la línea germinal del genoma del roedor no está dirigido por el vector de direccionamiento, un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería se inserta preferentemente en una ubicación diferente a la de un locus de cadena ligera Igλ de roedor endógeno (p. ej., transgén insertado aleatoriamente).

La creación de un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería en un roedor como se describe anteriormente proporciona una cepa de roedor modificado por ingeniería que produce anticuerpos que incluyen cadenas ligeras Igλ expresadas a partir de dicho locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería que tiene un dominio Vλ humano y, en algunas realizaciones, dominios Vλ y Cλ humanos. Aprovechando la presencia de un locus de IgH modificado por ingeniería que incluye una pluralidad de segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos operativamente unidos a genes de región constante de IgH, se crea una cepa de roedor modificada por ingeniería que produce anticuerpos y componentes de anticuerpos para el desarrollo de agentes terapéuticos basados en anticuerpos humanos. Por lo tanto, se realiza una única cepa de roedor modificada por ingeniería que tiene la capacidad de proporcionar un sistema alternativo *in vivo* para explotar dominios Vλ humanos para el desarrollo de nuevos medicamentos basados en anticuerpos para tratar enfermedades humanas.

En algunas realizaciones, el genoma de un roedor como se describe en el presente documento comprende además (p. ej., mediante cruzamiento o estrategias de direccionamiento de genes múltiples) una o más regiones variables de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina humana como se describe en las Patentes de E.E.U.U N.º 8.502.018, 8.642.835, 8.697.940 y 8.791.323. Como alternativa, el locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento se puede modificar por ingeniería en una célula madre embrionaria que comprende locus de IgH y/o Igk humanizados, o un roedor que comprende el locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería descrito en el presente documento se puede reproducir con otro roedor que comprende locus de IgH y/o Igk humanizados. Se conocen varios de dichos animales que comprenden locus de IgH y/o Igk humanizados, p. ej., una cepa VELOCIMMUNE® (véase, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.502.018 y/o 8.642.835), una cepa XENOMOUSE™ (véanse, p. ej., Mendez, M.J. *et al.*, 1997, Nat. Genetics 15(2): 146-56 y Jakobovits, A. *et al.*, 1995, Ann. NY Acad. Sci. 764:525-35). La homocigosidad del locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento se puede lograr posteriormente mediante reproducción. Como alternativa, en el caso de un transgén de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería insertado aleatoriamente (descrito anteriormente), las cepas de roedores se pueden seleccionar en función de, entre otras cosas, la expresión de dominios Vλ humanos del transgén.

Como alternativa, y/o adicionalmente, en algunas realizaciones, el genoma de la línea germinal de un roedor como se describe en el presente documento comprende además un locus de cadena ligera Igk endógeno delecionado, inactivado, funcionalmente silenciado o de otro modo no funcional. Pueden lograrse modificaciones genéticas para delecionar o producir un gen o locus genético no funcional usando métodos descritos en el presente documento y/o métodos conocidos en la técnica.

Se puede identificar un roedor fundador transgénico basándose en la presencia de un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería en su genoma de la línea germinal y/o en la expresión de anticuerpos que tienen una secuencia de cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, en tejidos o células del roedor. A continuación, se puede utilizar un roedor fundador transgénico para criar roedores adicionales que porten el locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería, creando así una cohorte de roedores que porte cada uno una o más copias de un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería. Por otra parte, los roedores transgénicos que portan un locus de cadena ligera Igλ modificado como se describe en el presente documento pueden cruzarse con otros roedores transgénicos que portan otros transgenes (p. ej., genes de inmunoglobulina humana) según se desee.

En algunas realizaciones, los roedores transgénicos también pueden producirse para que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada, directa, inducible y/o específica de tipo celular del transgén o secuencia o secuencias integrados. Por ejemplo, los roedores, como se describe en el presente documento, pueden modificarse por ingeniería para que contengan una secuencia que codifique una cadena ligera Igλ humana, en su totalidad o en parte, de un anticuerpo que se expresa condicionalmente (p. ej., revisado en Rajewski, K. *et al.*, 1996, J. Clin. Invest. 98(3):600-3). Los sistemas ejemplares incluyen el sistema de recombinasa *Cre/loxP* del bacteriófago PI (véase, p. ej., Lakso, M. *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6) y el sistema de recombinasa FLP/Frt de *S. cerevisiae* (O'Gorman, S. *et al.*, 1991, Science 251:1351-5). Dichos animales pueden proporcionarse mediante la construcción de animales transgénicos "dobles", p. ej., al aparear dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que comprende una modificación seleccionada (p. ej., un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento) y el otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa (p. ej., una recombinasa Cre).

los roedores como se describe en el presente documento se pueden preparar como se describe anteriormente, o usando métodos conocidos en la técnica, para comprender genes humanos, humanizados o modificados por ingeniería de otro modo adicionales, con frecuencia dependiendo del uso previsto del roedor. Se puede introducir material genético de dichos genes humanos, humanizados o modificados por ingeniería mediante la alteración adicional del genoma de las células (p. ej., células madre embrionarias) que tienen las modificaciones o alteraciones genéticas como se describe anteriormente o mediante técnicas de reproducción conocidas en la técnica con otras cepas modificadas genéticamente o modificadas por ingeniería, según se desee. En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se preparan para comprender además genes o segmentos de genes de cadena ligera IgH y/o Igk humana transgénicos (véanse, Murphy, A.J. *et al.*, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158; la Patente de EE.UU. N.º 8.502.018; la Patente de EE.UU. N.º 8.642.835; la Patente de EE.UU. N.º 8.697.940; la Patente de EE. UU. N.º: 8.791.323; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU: N.º 2013/0096287 A1).

En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento pueden prepararse mediante la introducción de un vector de direccionamiento descrito en el presente documento en una célula de una cepa modificada. Por proporcionar un solo ejemplo, un vector de direccionamiento, tal como se describe anteriormente, puede introducirse en un ratón VELOCIMMUNE®. Los ratones VELOCIMMUNE® expresan anticuerpos que tienen dominios variables completamente humanos y dominios constantes de ratón. En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se preparan para comprender además genes de inmunoglobulina humana (genes de región variable y/o constante). En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento comprenden un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento y material genético de una especie heteróloga (p. ej., seres humanos), donde el material genético codifica, en su totalidad o en parte, uno o más dominios variables de cadena pesada y/o ligera Igk humana.

Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, los roedores que comprenden un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento pueden comprender además (p. ej., mediante cruzamiento o estrategias de direccionamiento de genes múltiples) una o más modificaciones como se describe en Murphy, A.J. *et al.*, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-8; Macdonald, L.E. *et al.*, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5147-52; Patentes de EE.UU. N.º 8.502.018, 8.642.835, 8.697.940 y 8.791.323. En algunas realizaciones, un roedor que comprende un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento se cruza con un roedor que comprende un locus de región variable de cadena ligera IgH y/o Igk humanizado (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.502.018, 8.642.835, 8.697.940 y/o 8.791.323). En algunas realizaciones, un roedor que comprende un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento se cruza con un roedor que comprende un locus de región variable de IgH y/o Igk humanizado (véanse, p. ej., en las Patentes de EE.UU. N.º 8.502.018, 8.642.835, 8.697.940 y/o 8.791.323;) y un locus de cadena ligera Igk endógeno inactivado (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 9.006.511, 9.012.717, 9.029.628, 9.035.128, 9.066.502, 9.150.662 y 9.163.092).

Aunque las realizaciones que describen la construcción de un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería en un ratón (es decir, un ratón con un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería genética caracterizado por la presencia de una pluralidad de segmentos de genes Vλ, Jλ y Cλ humanos enlazados operativamente con una región Cλ de ratón de modo que se expresen los anticuerpos que contienen cadenas ligeras Igλ en su totalidad o en parte) se analizan ampliamente en el presente documento, también se proporcionan otros roedores que comprenden un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería. Dichos roedores incluyen cualquiera de los que pueden modificarse genéticamente para expresar anticuerpos como se describe en el presente documento, incluyendo, p. ej., mamíferos, p. ej., ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (p. ej., vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primate (p. ej., tití común, macaco), etc. Por ejemplo, para aquellos roedores para los que no se dispone fácilmente de células ES genéticamente modificables adecuadas, se emplean otros métodos para producir un roedor no humano que comprenda la modificación genética. Dichos métodos incluyen, p. ej., modificar el genoma de una célula no ES (p. ej., un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés) para transferir el genoma genéticamente modificado a una célula adecuada, p. ej., un oocito, y gestar la célula modificada (p. ej., el oocito modificado) en un roedor en las condiciones adecuadas para formar un embrión.

Los métodos para modificar el genoma de la línea germinal de un roedor incluyen, p. ej., emplear una nucleasa de dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés), o una proteína Cas (es decir, un sistema CRISPR/Cas) para incluir el locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento. Se puede encontrar orientación sobre métodos para modificar el genoma de la línea germinal de un roedor en, p. ej., las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 14/747.461 (presentada el 23 de junio de 2015), 14/948.221 (presentada el 20 de noviembre de 2015) y 14/974.623 (presentada el 18 de diciembre de 2015).

En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento se selecciona de un ratón, una rata, y un hámster. En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento se selecciona de la superfamilia Muroidea. En algunas realizaciones determinadas, un roedor genéticamente modificado como se describe en el presente documento se selecciona de un verdadero ratón o rata (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata con cresta. En algunas realizaciones determinadas, un roedor como se describe en el presente documento se selecciona de un ratón y una rata. En algunas realizaciones, el roedor como se describe en el presente documento, es un ratón.

En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento es un roedor que es un ratón de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En algunas realizaciones determinadas, un ratón como se describe en el presente documento es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (p. ej., 129S1/SV, 129S1/Svlm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, p. ej., Festing *et al.*, 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach, W. *et al.*, 2000, Biotechniques 29(5): 1024-1028, 1030, 1032). En algunas realizaciones determinadas, un ratón genéticamente modificado es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En algunas realizaciones determinadas, un ratón como se describe en el presente documento es una mezcla de cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones determinadas, una cepa 129 de la mezcla como se describe en el presente documento es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En algunas realizaciones, un ratón como se describe en el presente documento es una cepa BALB, p. ej., cepa BALB/c. En algunas realizaciones, un ratón como se describe en el presente documento es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

En algunas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento es una rata. En algunas realizaciones determinadas, una rata como se describe en el presente documento se selecciona de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. En algunas realizaciones determinadas, una cepa de rata como se describe en el presente documento es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

Una célula pluripotente y/o totipotente de rata puede ser de cualquier cepa de rata, incluyendo, por ejemplo, una cepa de rata ACI, una cepa de rata Dark Agouti (DA), una cepa de rata Wistar, una cepa de rata LEA, una cepa de rata Sprague Dawley (SD), o una cepa de rata Fischer tal como Fisher F344 o Fisher F6. También se pueden obtener células pluripotentes y/o totipotentes de rata a partir de una cepa derivada de una mezcla de dos o más cepas enumeradas anteriormente. Por ejemplo, la célula pluripotente y/o totipotente de rata puede ser de una cepa DA o una cepa ACI. La cepa de rata ACI se caracteriza por tener agutí negro, con vientre y patas blancas y un haplotipo RTlavI. Dichas cepas están disponibles en una variedad de fuentes, incluyendo Harlan Laboratories. Un ejemplo de una línea de células ES de rata de una rata ACI es una célula ES de rata ACI.G1. La cepa de rata Dark Agouti (DA) se caracteriza por tener una capa de agutí y un haplotipo RTlavI. Dichas ratas están disponibles en una variedad de fuentes, incluyendo Charles River y Harlan Laboratories. Ejemplos de una línea de células ES de rata de una rata DA son la línea de células ES de rata DA.2B y la línea de células ES de rata DA.2C. En algunas realizaciones, las células pluripotentes y/o totipotentes de rata son de una cepa de rata consanguínea (véase, p. ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2014-0235933 A1, publicada el 21 de agosto de 2014).

#### *Realizaciones Ejemplares Específicas - Locus de IgH modificados por ingeniería*

En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento y además comprenden locus (o alelos) de IgH modificados por ingeniería caracterizados por la presencia de una pluralidad de segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos dispuestos en configuración de línea germinal y operativamente unidos a regiones constantes de IgH, potenciadores y regiones reguladoras de roedor. En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende uno o más segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos operativamente unidos a una región constante de IgH de roedor.

En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más (p. ej., 41,42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, etc.) segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente

5 todos los segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos funcionales encontrados los segmentos de los genes V<sub>H</sub>3-74 humanos y los segmentos de los genes V<sub>H</sub>6-1 humanos, ambos inclusive, de un locus de IgH humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos V<sub>H</sub>3-74, V<sub>H</sub>3-73, V<sub>H</sub>3-72, V<sub>H</sub>2-70, V<sub>H</sub>1-69, V<sub>H</sub>3-66, V<sub>H</sub>3-64, V<sub>H</sub>4-61, V<sub>H</sub>4-59, V<sub>H</sub>1-58, V<sub>H</sub>3-53, V<sub>H</sub>5-51, V<sub>H</sub>3-49, V<sub>H</sub>3-48, V<sub>H</sub>1-46, V<sub>H</sub>1-45, V<sub>H</sub>3-43, V<sub>H</sub>4-39, V<sub>H</sub>4-34, V<sub>H</sub>3-33, V<sub>H</sub>4-31, V<sub>H</sub>3-30, V<sub>H</sub>4-28, V<sub>H</sub>2-26, V<sub>H</sub>1-24, V<sub>H</sub>3-23, V<sub>H</sub>3-21, V<sub>H</sub>3-20, V<sub>H</sub>1-18, V<sub>H</sub>3-15, V<sub>H</sub>3-13, V<sub>H</sub>3-11, V<sub>H</sub>3-9, V<sub>H</sub>1-8, V<sub>H</sub>3-7, V<sub>H</sub>2-5, V<sub>H</sub>7-4-1, V<sub>H</sub>4-4, V<sub>H</sub>1-3, V<sub>H</sub>1-2 y V<sub>H</sub>6-1.

10 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende 5, 10, 15, 20, 25 o más (p. ej., 26, 27, etc.) segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos funcionales encontrados los segmentos de los genes D<sub>H</sub>1-1 humanos y los segmentos de los genes D<sub>H</sub>7-27 humanos, ambos inclusive, de un locus de IgH humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de los genes D<sub>H</sub> humanos D<sub>H</sub>1-1, D<sub>H</sub>2-2, D<sub>H</sub>3-3, D<sub>H</sub>4-4, D<sub>H</sub>5-5, D<sub>H</sub>6-6, D<sub>H</sub>1-7, D<sub>H</sub>2-8, D<sub>H</sub>3-9, D<sub>H</sub>3-10, D<sub>H</sub>5-12, D<sub>H</sub>6-13, D<sub>H</sub>2-15, D<sub>H</sub>3-16, D<sub>H</sub>4-17, D<sub>H</sub>6-19, D<sub>H</sub>1-20, D<sub>H</sub>2-21, D<sub>H</sub>3-22, D<sub>H</sub>6-25, D<sub>H</sub>1-26 y D<sub>H</sub>7-27.

20 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería genética comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos funcionales. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos funcionales encontrados los segmentos de los genes J<sub>H</sub>1 humano y J<sub>H</sub>6 humano, ambos inclusive, de un locus de IgH humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de IgH modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos J<sub>H</sub>1, J<sub>H</sub>2, J<sub>H</sub>3, J<sub>H</sub>4, J<sub>H</sub>5 y J<sub>H</sub>6.

25 En algunas realizaciones, una región constante de IgH de roedor incluye uno o más genes de región constante de IgH de roedor tales como, por ejemplo, inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina E (IgE) e inmunoglobulina A (IgA). En algunas realizaciones determinadas, una región constante de IgH de roedor incluye una IgM de roedor, genes de la región constante de IgD de roedor, IgG3 de roedor, IgG1 de roedor, IgG2b de roedor, IgG2a de roedor, de IgE de roedor y de IgA de roedor. En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a uno o más potenciadores de IgH de roedor (es decir, secuencias potenciadoras o regiones potenciadoras). En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a una o más regiones reguladoras (o secuencias reguladoras) de IgH de roedor. En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a uno o más potenciadores (o secuencia potenciadora) de IgH de roedor y una o más regiones reguladoras (o secuencia reguladora) de IgH de roedor.

40 En algunas realizaciones, un locus de IgH modificado por ingeniería como se describe en el presente documento no contiene un gen Adam6 endógeno. En algunas realizaciones, un locus de IgH modificado por ingeniería como se describe en el presente documento no contiene un gen Adam6 endógeno (o secuencia que codifica de Adam6) en la misma posición genómica de la línea germinal que se encuentra en un genoma de la línea germinal de un roedor de tipo silvestre de la misma especie. En algunas realizaciones, un locus de IgH modificado por ingeniería como se describe en el presente documento no contiene un pseudogén Adam6 humano. En algunas realizaciones, un locus de IgH modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende la inserción de al menos una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más polipéptidos Adam6 no humanos (p. ej., roedor). Dicha inserción puede estar fuera de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina modificado por ingeniería como se describe en el presente documento (p. ej., cadena arriba de un segmento de gen V<sub>H</sub> más 5'), dentro de un locus de IgH modificado por ingeniería o en cualquier otro lugar del genoma de la línea germinal de un roedor (p. ej., una secuencia que codifica Adam6 no humana introducida al azar, célula o tejido).

50 En diversas realizaciones, un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados como se describe en el presente documento no expresa de manera detectable, en su totalidad o en parte, una región V<sub>H</sub> de roedor endógena en una molécula de anticuerpo. En diversas realizaciones, un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados como se describe en el presente documento no contiene (o carece o contiene una delección de) una o más secuencias de nucleótidos que codifican, en su totalidad o en parte, una región V<sub>H</sub> de roedor endógena (p. ej., V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y/o J<sub>H</sub>) en una molécula de anticuerpo. En diversas realizaciones, un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados como se describe en el presente documento tiene un genoma de la línea germinal que incluye una delección de los segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> de roedor endógenos, en su totalidad o en parte. En diversas realizaciones, un roedor proporcionado es fértil.

60 Se puede encontrar orientación para la creación de vectores de direccionamiento, células de roedor y animales que albergan dichos locus (o alelos) de IgH modificados por ingeniería en, p. ej., las patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940. Los expertos en la materia conocen una variedad de tecnologías, conocidas en la técnica, para realizar dicha ingeniería y/o manipulación genética de genomas de roedor o para de otro modo preparar, proporcionar o fabricar tales secuencias para introducirlas en el genoma de la línea germinal de roedor.

65

*Realizaciones Ejemplares Específicas - Locus de cadena ligera Igk modificados por ingeniería*

5 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento y comprenden además locus (o alelos) de cadena ligera Igk modificados por ingeniería caracterizados por la presencia de una pluralidad de segmentos de genes Vk y Jk humanos dispuestos en configuración de línea germinal y operativamente unidos a una región constante de cadena ligera Igk no humana, potenciadores y regiones reguladoras de Igk. En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende uno o más segmentos de genes Vk humanos y uno o más segmentos de genes Jk humanos operativamente unidos a una región constante de Igk de roedor (Ck).

10 En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende al menos segmentos de genes Vk humanos que aparecen en el grupo variable distal (o brazo distal, o duplicación distal) de un locus de cadena ligera Igk humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende al menos segmentos de genes Vk humanos que aparecen en el grupo variable proximal (o brazo proximal, o duplicación proximal) de un locus de cadena ligera Igk humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende segmentos de genes Vk humanos que aparecen en los grupos variables distales y proximales de un locus de cadena ligera Igk humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes Vk humanos funcionales que se encuentran entre los segmentos de los genes Vk2-40 (o Vk3D-7) humano y Vk4-1 humano, ambos inclusive, de un locus de cadena ligera Igk humana que aparece en la naturaleza.

25 En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o más (p. ej., 36, 37, 38, 39, 40 etc.) segmentos de genes VK humanos. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende los segmentos de genes VK humanos Vk3D-7, Vk1D-8, Vk1D-43, VK3D-11, Vk1D-12, Vk1D-13, Vk3D-15, Vk1D-16, Vk1D-17, Vk3D-20, Vk6D-21, Vk2D-26, Vk2D-28, Vk2D-29, Vk2D-30, Vk1D-33, Vk1D-39, Vk2D-40, Vk2-40, Vk1-39, Vk1-33, Vk2-30, Vk2-28, Vk1-27, Vk2-24, Vk6-21, Vk3-20, VK1-17, Vk1-16, Vk3-15, Vk1-12, Vk3-11, Vk1-9, Vk1-8, Vk1-6, Vk1-5, Vk5-2 y Vk4-1. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes VK humanos Vk3D-7, Vk1D-8, Vk1D-43, Vk3D-11, Vk1D-12, Vk1D-13, Vk3D-15, Vk1D-16, Vk1D-17, Vk3D-20, Vk6D-21, Vk2D-26, Vk2D-28, Vk2D-29, Vk2D-30, Vk1D-33, Vk1D-39 y Vk2D-40. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes VK humanos Vk2-40, Vk1-39, Vk1-33, Vk2-30, Vk2-28, Vk1-27, Vk2-24, Vk6-21, Vk3-20, Vk1-17, Vk1-16, Vk3-15, Vk1-12, Vk3-11, Vk1-9, Vk1-8, Vk1-6, Vk1-5, Vk5-2 y Vk4-1.

40 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende 1, 2, 3, 4, 5 o más segmentos de genes Jk humanos funcionales. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes Jk humanos funcionales que se encuentran entre los segmentos de los genes Jk1 humano y Jk5 humano, ambos inclusive, de un locus de cadena ligera Igk humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes Jk humanos Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5.

45 En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes Vk y Jk humanos están operativamente unidos a uno o más potenciadores (es decir, secuencias potenciadoras o regiones potenciadoras) de cadena ligera Igk de roedor. En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes Vk y Jk humanos están operativamente unidos a una o más regiones reguladoras (o secuencias reguladoras) de cadena ligera Igk de roedor. En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes Vk y Jk humanos están operativamente unidos a uno o más potenciadores (o secuencias potenciadoras o regiones potenciadoras) de cadena ligera Igk de roedor y una o más regiones reguladoras (o secuencias reguladoras) de cadena ligera Igk de roedor.

55 En algunas realizaciones, una región Ck de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería incluye una región Ck de roedor tal como, por ejemplo, una región Ck de ratón o una región Ck de rata. En algunas realizaciones determinadas, una región Ck de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Igk modificado por ingeniería es o comprende una región Ck de ratón de una base genética que incluye una cepa 129, una cepa BALB/c, una cepa C57BL/6, una cepa mixta 129xC57BL/6 o combinaciones de las mismas.

60 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento y comprenden además locus (o alelos) de cadena ligera Igk inactivados.

65 En diversas realizaciones, un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados como se describe en el presente documento no expresa de manera detectable, en su totalidad o en parte, una región Vk de roedor endógena en una molécula de anticuerpo. En diversas realizaciones, un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados como se describe en el presente documento no contiene (o carece o contiene una delección de) una o

más secuencias de nucleótidos que codifican, en su totalidad o en parte, una región V $\kappa$  de roedor endógena en una molécula de anticuerpo. En diversas realizaciones, un roedor, célula de roedor o tejido de roedor proporcionados como se describe en el presente documento tiene un genoma de la línea germinal que incluye una delección de los segmentos de genes V $\kappa$  y J $\kappa$  de roedor endógenos, en su totalidad o en parte.

5 Se puede encontrar orientación para la creación de vectores de direccionamiento, células de roedor y animales que albergan dichos locus (o alelos) de cadena ligera Ig $\kappa$  modificados por ingeniería en, p. ej., las patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940. Los expertos en la materia conocen una variedad de tecnologías, conocidas en la técnica, para realizar dicha ingeniería y/o manipulación genética de genomas de roedores o para, de otro modo, preparar, proporcionar o fabricar tales secuencias para introducir las en el genoma de la línea germinal de roedores.

#### *Realizaciones Ejemplares Específicas - Locus de cadena ligera Ig $\lambda$ modificados por ingeniería*

15 En algunas realizaciones, los roedores proporcionados comprenden un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería caracterizado por la presencia de una pluralidad de segmentos de genes V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  dispuestos en configuración de línea germinal e insertados cadena arriba de, y operativamente unidos a, un segmento de gen C $\lambda$  de roedor (o gen de la región C $\lambda$ ). Tal como se describe en el presente documento, dicho locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería incluye además tres regiones potenciadoras (o secuencias potenciadoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  humana. Un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos y uno o más segmentos de genes J $\lambda$  humanos operativamente unidos a una región constante (C $\lambda$ ) de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende segmentos de genes V $\lambda$  humanos que aparecen en al menos el grupo A de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana; en algunas realizaciones, el grupo A y grupo B de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana; en algunas realizaciones determinadas, el grupo A, grupo B y grupo C de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana.

25 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende 5, 10, 15, 20, 25, 30 o más (p. ej., 31, 32, 33, 34, 35, etc.) segmentos de genes V $\lambda$  humanos. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales que se encuentran entre los segmentos de los genes V $\lambda$ 4-69 humano y V $\lambda$ 3-1 humano, ambos inclusive, de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales que se encuentran entre los segmentos de los genes V $\lambda$ 5-52 humano y V $\lambda$ 3-1 humano, ambos inclusive, de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales que se encuentran entre los segmentos de los genes V $\lambda$ 3-27 humano y V $\lambda$ 3-1 humano, ambos inclusive, de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende los segmentos de genes V $\kappa$  humanos V $\kappa$ 4-69, V $\kappa$ 8-61, V $\kappa$ 4-60, V $\kappa$ 6-57, V $\kappa$ 10-54, V $\kappa$ 5-52, V $\kappa$ 1-51, V $\kappa$ 9-49, V $\kappa$ 1-47, V $\kappa$ 7-46, V $\kappa$ 5-45, V $\kappa$ 1-44, V $\kappa$ 7-43, V $\kappa$ 1-40, V $\kappa$ 5-39, V $\kappa$ 5-37, V $\kappa$ 1-36, V $\kappa$ 3-27, V $\kappa$ 3-25, V $\kappa$ 2-23, V $\kappa$ 3-22, V $\kappa$ 3-21, V $\kappa$ 3-19, V $\kappa$ 2-18, V $\kappa$ 3-16, V $\kappa$ 2-14, V $\kappa$ 3-12, V $\kappa$ 2-11, V $\kappa$ 3-10, V $\kappa$ 3-9, V $\kappa$ 2-8, V $\kappa$ 4-3 y V $\kappa$ 3-1. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales de V $\lambda$ 5-52 a V $\lambda$ 1-40 y de V $\lambda$ 3-27 a V $\lambda$ 3-1.

45 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más segmentos de genes J $\kappa$  humanos funcionales. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes J $\lambda$  humanos funcionales que se encuentran entre los segmentos de los genes J $\lambda$ 1 humano y J $\lambda$ 7 humano, ambos inclusive, de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes J $\lambda$  humanos J $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3, J $\lambda$ 6 y J $\lambda$ 7.

55 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más segmentos de genes C $\lambda$  humanos funcionales. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende todos o sustancialmente todos los segmentos de genes  $\lambda$  humanos funcionales que se encuentran entre los segmentos de los genes C $\lambda$ 1 humano y C $\lambda$ 7 humano, ambos inclusive, de un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana que aparece en la naturaleza. En algunas realizaciones determinadas, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería comprende al menos los segmentos de genes C $\lambda$  humanos C $\lambda$ 1, C $\lambda$ 2, C $\lambda$ 3 y C $\lambda$ 6.

60 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería no contiene las mismas regiones potenciadoras (o secuencias potenciadoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor que aparecen en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  de tipo silvestre. En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería carece de al menos una región potenciadora (o secuencia potenciadora) de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor, en su totalidad o en parte (p. ej., un potenciador de Ig $\lambda$  2-4 o E $\lambda$ 2-4).

65

- En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos están operativamente unidos a uno o más potenciadores (es decir, secuencias potenciadoras o regiones potenciadoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor y uno o más potenciadores (es decir, secuencias potenciadoras o regiones potenciadoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  humana. En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos están operativamente unidos a una o más regiones reguladoras (o secuencias reguladoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor. En algunas realizaciones, dichos segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  humanos están operativamente unidos a uno o más potenciadores (o secuencias potenciadoras o regiones potenciadoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor, uno o más potenciadores (es decir, secuencias potenciadoras o regiones potenciadoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  humana y una o más regiones reguladoras (o secuencias reguladoras) de cadena ligera Ig $\lambda$  de roedor.
- En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento no contiene un gen VpreB humano (o una secuencia que codifica el gen VpreB humano).
- En algunas realizaciones, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería incluye una región C $\lambda$  de roedor tal como, por ejemplo, una región C $\lambda$  de ratón o una región C $\lambda$  de rata. En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería es o comprende una región C $\lambda$  de ratón de una base genética que incluye una cepa 129, una cepa BALB/c, una cepa C57BL/6, una cepa mixta 129xC57BL/6 o combinaciones de las mismas.
- En algunas realizaciones, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 (C $\lambda$ 1 de ratón), SEQ ID NO: 3 (C $\lambda$ 2 de ratón) o SEQ ID NO: 5 (C $\lambda$ 3 de ratón). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 1 (C $\lambda$ 1 de ratón), SEQ ID NO: 3 (C $\lambda$ 2 de ratón) o SEQ ID NO: 5 (C $\lambda$ 3 de ratón). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento es o comprende la secuencia de una región C $\lambda$ 1 de ratón.
- En algunas realizaciones, una región C $\lambda$  de roedor codificada por una secuencia colocada en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 (C $\lambda$ 1 de ratón), SEQ ID NO: 4 (C $\lambda$ 2 de ratón) o SEQ ID NO: 6 (C $\lambda$ 3 de ratón). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor codificada por una secuencia colocada en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 2 (C $\lambda$ 1 de ratón), SEQ ID NO: 4 (C $\lambda$ 2 de ratón) o SEQ ID NO: 6 (C $\lambda$ 3 de ratón). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor codificada por una secuencia colocada en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento es o comprende un polipéptido de la región C $\lambda$ 1 de ratón.
- En algunas realizaciones, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 7 (C $\lambda$ 1 de rata), SEQ ID NO: 9 (C $\lambda$ 2 de rata), SEQ ID NO: 11 (C $\lambda$ 3 de rata) o SEQ ID NO: 13 (C $\lambda$ 4 de rata). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 7 (C $\lambda$ 1 de rata), SEQ ID NO: 9 (C $\lambda$ 2 de rata), SEQ ID NO: 11 (C $\lambda$ 3 de rata) o SEQ ID NO: 13 (C $\lambda$ 4 de rata). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor de un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento es o comprende la secuencia de una región C $\lambda$ 1 de rata.
- En algunas realizaciones, una región C $\lambda$  de roedor codificada por una secuencia colocada en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 8 (C $\lambda$ 1 de rata), SEQ ID NO: 10 (C $\lambda$ 2 de rata), SEQ ID NO: 12 (C $\lambda$ 3 de rata) o SEQ ID NO: 14 (C $\lambda$ 4 de rata). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor codificada por una secuencia colocada en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 8 (C $\lambda$ 1 de rata), SEQ ID NO: 10 (C $\lambda$ 2 de rata), SEQ ID NO: 12 (C $\lambda$ 3 de rata) o SEQ ID NO: 14 (C $\lambda$ 4 de rata). En algunas realizaciones determinadas, una región C $\lambda$  de roedor codificada por una secuencia colocada en un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento es o comprende un polipéptido de la región C $\lambda$ 1 de rata.
- En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el

5 presente documento se caracteriza por la presencia de una o más uniones de secuencias de nucleótidos exclusivas (o combinaciones de uniones de secuencias exclusivas) que son el resultado de la inserción de material genético humano correspondiente a una secuencia (genómica o sintética) de cadena ligera Igλ humana en el lugar de o dentro de una secuencia de cadena ligera Igλ de roedor en un locus endógeno. Las uniones de secuencias de nucleótidos ejemplares se establecen en la SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:128 y SEQ ID NO:129.

10 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende una o más de la SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:128 y SEQ ID NO:129.

15 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende la SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122 y SEQ ID NO:123.

20 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende la SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122 y SEQ ID NO:123.

En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende la SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:128 y SEQ ID NO:129.

25 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende la SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:126 y SEQ ID NO:127.

30 En algunas realizaciones, un locus (o alelo) de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento comprende la SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:124 y SEQ ID NO:125.

35 Se puede encontrar orientación segmentos de genes Vλ, Jλ y Cλ humanos en, p. ej., Lefranc, M.P., 2000, Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes, Current Protocols in Immunology, N.º de Suplemento, 40:A.1p.1-A.1p.37. Entre otras cosas, la presente divulgación demuestra que la presencia de segmentos de genes Vλ y Jλ humanos en los locus (o alelos) de cadena ligera Igλ aumenta la diversidad del repertorio de cadenas ligeras de un roedor proporcionado en comparación con la diversidad de las cadenas ligeras en el repertorio de anticuerpos expresados de un roedor que no comprende tales alelos de cadena ligera Igλ modificados por ingeniería.

#### 40 *Métodos*

En determinados aspectos, los roedores como se describe en el presente documento pueden emplearse para producir un anticuerpo humano y/o una secuencia de un ácido nucleico que codifica anticuerpos humanos, cuyo anticuerpo humano comprende dominios variables derivados de secuencias de los ácidos nucleicos codificadas por material genético de una célula de un roedor como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un roedor como se describe en el presente documento se inmuniza con un antígeno de interés en condiciones y durante un tiempo suficiente para que el roedor desarrolle una respuesta inmunitaria a dicho antígeno de interés. Los anticuerpos se aíslan del roedor (o una o más células, p. ej., uno o más linfocitos B) así inmunizado y se caracterizan usando varios ensayos que miden, por ejemplo, afinidad, especificidad, mapeo de epítomos, capacidad para bloquear la interacción ligando-receptor, activación del receptor de inhibición, etc. En diversas realizaciones, los anticuerpos producidos por los roedores como se describe en el presente documento comprenden uno o más dominios variables humanos que derivan de una o más secuencias de nucleótidos de región variable humana aisladas del roedor. En algunas realizaciones, los anticuerpos antifármaco (p. ej., anticuerpo antiidiotipo) se pueden generar en los roedores como se describe en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento proporcionan un sistema *in vivo* mejorado y una fuente de materiales biológicos (p. ej., células) para producir anticuerpos humanos que son útiles para una variedad de ensayos. En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se usan para desarrollar agentes terapéuticos que se dirigen a un polipéptido de interés (p. ej., un polipéptido transmembrana o secretado) y/o modular una o más actividades asociadas con dicho polipéptido de interés y/o modular las interacciones de dicho polipéptido de interés con otros compañeros de unión (p. ej., un ligando o polipéptido receptor). Por ejemplo, en diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se utilizan para desarrollar agentes terapéuticos que se dirigen a uno o más polipéptidos receptores, modulan la actividad del polipéptido receptor y/o modulan las interacciones del polipéptido receptor con otros compañeros de unión. En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se utilizan para identificar, explorar y/o desarrollar agentes terapéuticos candidatos (p. ej., anticuerpos, ARNip, etc.) que se unen a uno o más

polipéptidos de interés. En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se utilizan para explorar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos (p. ej., anticuerpos, ARNip, etc.) que bloquean la actividad de uno o más polipéptidos de interés o que bloquean la actividad de uno o más polipéptidos receptores de interés. En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se utilizan para determinar el perfil de unión de antagonistas y/o agonistas de uno o más polipéptidos de interés. En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se utilizan para determinar el epítipo o epítipos de uno o más anticuerpos terapéuticos candidatos que se unen a uno o más polipéptidos de interés.

En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se utilizan para determinar los perfiles farmacocinéticos de uno o más candidatos de anticuerpos humanos. En diversas realizaciones, uno o más roedores como se describe en el presente documento y uno o más roedores de control o de referencia se exponen cada uno a uno o más candidatos de anticuerpos humanos en diversas dosis (p. ej., 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/mg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, o 50 mg/kg o más). Los anticuerpos terapéuticos candidatos pueden dosificarse mediante cualquier vía de administración deseada, incluyendo las vías de administración parenteral y no parenteral. Las vías parenterales incluyen, p. ej., intravenosa, intraarterial, intraportal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intracerebroventricular, intracraneal, intrapleural u otras vías de inyección. Las vías no parenterales incluyen, p. ej., oral, nasal, transdérmica, pulmonar, rectal, bucal, vaginal, ocular. La administración también puede ser por infusión continua, administración local, liberación sostenida a partir de implantes (geles, membranas o similares) y/o inyección intravenosa. La sangre se aísla de roedores (humanizada y de control) en varios momentos (p. ej., 0 h, 6 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, o hasta 30 o más días). Se pueden realizar diversos ensayos para determinar los perfiles farmacocinéticos de los anticuerpos terapéuticos candidatos administrados utilizando muestras obtenidas de los roedores como se describe en el presente documento, que incluyen, pero sin limitación, IgG total, respuesta de anticuerpos antiterapéuticos, aglutinación, etc.

En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se utilizan para medir el efecto terapéutico de bloquear o modular la actividad de un polipéptido de interés y el efecto sobre la expresión génica como resultado de cambios celulares o, en el contexto de un polipéptido receptor, la densidad de un polipéptido receptor en la superficie de las células de los roedores. En diversas realizaciones, un roedor como se describe en el presente documento o las células aisladas del mismo se exponen a un agente terapéutico candidato que se une a un polipéptido de interés y, después de un período de tiempo posterior, se analizan para determinar los efectos sobre procesos celulares específicos asociados con dicho polipéptido de interés, por ejemplo, interacciones ligando-receptor o transducción de señales.

En determinados aspectos, los roedores como se describe en el presente documento expresan dominios variables de anticuerpos humanos, por lo tanto, se pueden generar células, líneas celulares y cultivos celulares para que sirvan como fuente de dominios variables de anticuerpos humanos para su uso en ensayos de unión y funcionales, p. ej., para analizar la unión o función de un antagonista o agonista, particularmente cuando el antagonista o agonista es específico para un antígeno humano de interés o específico para un epítipo que funciona en la interacción (unión) ligando-receptor. En diversas realizaciones, los epítipos unidos por anticuerpos terapéuticos candidatos o ARNip se pueden determinar usando células aisladas de los roedores como se describe en el presente documento.

Las células de los roedores proporcionados se pueden aislar y utilizar de forma ad hoc, o se pueden mantener en cultivo durante muchas generaciones. En diversas realizaciones, las células de un roedor proporcionado se immortalizan (p. ej., mediante el uso de un virus) y se mantienen en cultivo indefinidamente (p. ej., en cultivos en serie).

En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento proporcionan un sistema *in vivo* para la generación de variantes de dominios variables de anticuerpos humanos que se unen a un polipéptido de interés (p. ej., variantes de dominios VL humanos). Dichas variantes incluyen dominios variables de anticuerpos humanos que tienen una funcionalidad deseada, especificidad, baja reactividad cruzada con un epítipo común compartido por dos o más variantes de un polipéptido de interés. En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento se emplean para generar paneles de dominios variables de anticuerpos humanos que contienen una serie de dominios variables variantes que se seleccionan para una funcionalidad deseada o mejorada.

En determinados aspectos, los roedores como se describe en el presente documento proporcionan un sistema *in vivo* para generar bibliotecas de regiones variables de anticuerpos humanos (p. ej., una biblioteca de dominios VL humanos). Dichas bibliotecas proporcionan una fuente para secuencias de regiones variables de cadenas pesadas y/o ligeras que pueden injertarse en diferentes regiones Fc basándose en una función efectora deseada, utilizada como fuente para la maduración por afinidad de la secuencia de región variable utilizando técnicas conocidas en la técnica (p. ej., mutagénesis dirigida al sitio, PCR propensa a errores, etc.) y/o utilizada como fuente de componentes de anticuerpos para la generación de moléculas terapéuticas basadas en anticuerpos tales como, por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos (es decir, una molécula modificada por ingeniería utilizando componentes de anticuerpos, p. ej., un scFv), agentes de unión multispecíficos (p. ej., agentes de unión biespecíficos) y proteínas de fusión (p. ej., anticuerpos de dominio único, scFv, etc.).

En algunos aspectos, los roedores como se describe en el presente documento proporcionan un sistema *in vivo* para

el análisis y prueba de un fármaco o vacuna. En diversas realizaciones, se puede suministrar un fármaco o vacuna candidatos a uno o más roedores como se describe en el presente documento, seguido de una monitorización de los roedores para determinar una o más de las respuestas inmunitarias al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o la vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección y/o uno o más síntomas de una enfermedad o afección. Los métodos ejemplares utilizados para determinar el perfil de seguridad incluyen mediciones de toxicidad, concentración de dosis óptima, respuesta a anticuerpos (es decir, antifármacos), eficacia del fármaco o vacuna y posibles factores de riesgo. Dichos fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en dichos roedores.

La eficacia de la vacuna se puede determinar de varias formas. Brevemente, los roedores como se describe en el presente documento se vacunan usando métodos conocidos en la técnica y luego se exponen con una vacuna o se administra una vacuna a roedores ya infectados. La respuesta de un roedor o roedores a una vacuna se puede medir monitorizando y/o realizando uno o más ensayos en, el o los roedores (o las células aisladas de los mismos) para determinar la eficacia de la vacuna. La respuesta de un roedor o roedores a la vacuna se compara luego con los animales de control, utilizando una o más medidas conocidas en la técnica y/o descritas en el presente documento.

La eficacia de la vacuna puede determinarse además mediante ensayos de neutralización vírica. Brevemente, los roedores como se describe en el presente documento se inmunizan y el suero se recoge varios días después de la inmunización. Se incuban previamente diluciones en serie de suero con un virus durante el cual los anticuerpos en el suero que son específicos para el virus se unirán a él. A continuación, se añade la mezcla de virus/suero a células permisivas para determinar la infectividad mediante un ensayo de placa o ensayo de microneutralización. Si los anticuerpos en el suero neutralizan el virus, hay menos placas o unidades de luciferasa relativas más bajas en comparación con un grupo de control.

En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento producen dominios variables de anticuerpos humanos y, por lo tanto, proporcionan un sistema *in vivo* para la producción de anticuerpos humanos para su uso en aplicaciones de diagnóstico (p. ej., inmunología, serología, microbiología, patología celular, etc.). En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento pueden usarse para producir dominios variables de anticuerpos humanos que se unen a sitios antigénicos relevantes para la identificación de cambios celulares tales como, por ejemplo, expresión de marcadores de superficie celular específicos indicativos de cambios patológicos. Dichos anticuerpos se pueden conjugar con diversas entidades químicas (p. ej., un trazador radiactivo) y se pueden emplear en diversos ensayos *in vivo* y/o *in vitro* como se desee.

En algunas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento proporcionan un sistema *in vivo* mejorado de desarrollo y selección de anticuerpos humanos para su uso en oncología y/o enfermedades infecciosas. En diversas realizaciones, los roedores como se describe en el presente documento y roedores de control (p. ej., que tienen una modificación genética que es diferente a la descrita en el presente documento o sin modificación genética, es decir, de tipo silvestre) se les puede implantar un tumor (o células tumorales) o infectarse con un virus (p. ej., gripe, VIH, VHC, VPH, etc.). Después de la implantación o infección, los roedores pueden ser administrados con un agente terapéutico candidato. Se puede permitir que el tumor o virus se establezca el tiempo suficiente en una o más ubicaciones dentro de los roedores antes de la administración de un agente terapéutico candidato. Como alternativa, y/o adicionalmente, la respuesta inmunitaria puede monitorizarse en dichos roedores para caracterizar y seleccionar posibles anticuerpos humanos que puedan desarrollarse como agentes terapéuticos.

#### *Kits*

También se describe un paquete o kit que comprende uno o más envases llenos con al menos un roedor, célula de roedor, fragmento de ADN, vector de direccionamiento, o cualquier combinación de los mismos, como se describe en el presente documento. Los kits se pueden utilizar en cualquier método aplicable (p. ej., un método de investigación). Opcionalmente asociado a dicho envase o envases puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja (a) la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos, (b) instrucciones de uso, y/o (c) un contrato que rige la transferencia de materiales y/o productos biológicos (p. ej., un roedor o una célula de roedor como se describe en el presente) entre dos o más entidades y combinaciones de las mismas.

Otras características de determinadas realizaciones resultarán evidentes en el curso de las siguientes descripciones de realizaciones ejemplares, que se dan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de las mismas.

#### *Realizaciones Ejemplares Adicionales*

Se proporciona un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno que comprende:

- (a) uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos;
- (b) uno o más segmentos de genes J $\lambda$  humanos;
- (c) uno o más segmentos de genes C $\lambda$  humanos;

- (d) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina (E $\lambda$ ) de roedor;
- (e) tres E $\lambda$  humanos; y
- (f) un segmento de gen C $\lambda$  de roedor,

5 en donde (a) y (b) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos de genes de región constante de (c) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno, y en donde (a) y ( b) también son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen C $\lambda$  de roedor de (f) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno.

10 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende dos E $\lambda$  de roedor.

En algunas realizaciones, los dos E $\lambda$  de roedor son un E $\lambda$  de ratón y un E $\lambda$ 3-1 de ratón.

15 En algunas realizaciones, el genoma de la línea germinal comprende además (i) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; o (ii) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera k de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>k</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>k</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> humanos están operativamente unidos a una región C<sub>k</sub> de inmunoglobulina de roedor.

20 de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera k de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>k</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>k</sub> humanos, cuyos segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> humanos están operativamente unidos a una región C<sub>k</sub> de inmunoglobulina de roedor.

25 En algunas realizaciones, la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos, uno o más segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos reemplazan los segmentos de genes V<sub>H</sub> y D<sub>H</sub> de roedor.

30 En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre segmentos de genes V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la inserción de uno o más segmentos de genes V<sub>k</sub> humanos y uno o más segmentos de genes J<sub>k</sub> humanos reemplaza los segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> de roedor.

35 En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los segmentos de genes V<sub>k</sub> y J<sub>k</sub> humanos, y combinaciones de los mismos.

40 En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor es una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor endógena.

En algunas realizaciones, en donde la región C<sub>k</sub> de roedor es una región C<sub>k</sub> de roedor endógena.

45 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende una delección de segmentos de genes V $\lambda$  y J $\lambda$  endógenos, en su totalidad o en parte.

En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende una delección de los segmentos de genes V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2 y los segmentos de genes V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1.

50 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende una delección de los segmentos de genes V $\lambda$ 2-V $\lambda$ 3-J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2-J $\lambda$ 4P-C $\lambda$ 4P y los segmentos de genes V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3-J $\lambda$ 3P-C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1.

En algunas realizaciones, el segmento de gen C $\lambda$  de roedor es un segmento de gen C $\lambda$ 1 de ratón.

55 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende una delección de un E $\lambda$ 2-4 de roedor.

En algunas realizaciones, el roedor no expresa de forma detectable cadenas ligeras  $\lambda$  de inmunoglobulina endógenas.

60 En algunas realizaciones, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende la inserción de los segmentos de genes V<sub>H</sub> humanos de V<sub>H</sub>3-74 a V<sub>H</sub>6-1, los segmentos de genes D<sub>H</sub> humanos de D<sub>H</sub>1-1 a D<sub>H</sub>7-27 y los segmentos de genes J<sub>H</sub> humanos J<sub>H</sub>1-J<sub>H</sub>6.

65 En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre V<sub>H</sub>3-74 a V<sub>H</sub>6-1 humanos, ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre D<sub>H</sub>1-1 a D<sub>H</sub>7-27 humanos, y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre J<sub>H</sub>1-J<sub>H</sub>6 humanos.

En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina comprende la inserción de la duplicación proximal de  $V\kappa$ , en su totalidad o en parte, de un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina humana.

5 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina comprende la inserción de los segmentos de genes  $V\kappa$  humanos de  $V\kappa 2-40$  a  $V\kappa 4-1$  y los segmentos de genes  $J\kappa$  humanos de  $J\kappa 1-J\kappa 5$ .

En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $V\kappa 2-40$  a  $V\kappa 4-1$  humanos, y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $J\kappa 1-J\kappa 5$  humanos.

10 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende la inserción de los segmentos de genes  $V\lambda$  humanos  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 1-40$  y  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$ , al menos los pares de segmentos de genes  $J\lambda-C\lambda$  humanos  $J\lambda 1-C\lambda 1$ ,  $J\lambda 2-C\lambda 2$ ,  $J\lambda 3-C\lambda 3$ ,  $J\lambda 6-C\lambda 6$ , el segmento del gen  $J\lambda$  humano  $J\lambda 7$  y un segmento del gen  $C\lambda 1$  de roedor.

15 En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 1-40$  y  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$  humanos, ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes  $J\lambda-C\lambda$  humanos  $J\lambda 1-C\lambda 1$ ,  $J\lambda 2-C\lambda 2$ ,  $J\lambda 3-C\lambda 3$  y  $J\lambda 6-C\lambda 6$ , y ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba (o 5') del segmento del gen  $J\lambda$  humano  $J\lambda 7$ .

20 En algunas realizaciones, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina carece de un gen  $Adam6$  de roedor endógeno.

25 En algunas realizaciones, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende además una inserción de una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos  $Adam6$  de roedor.

En algunas realizaciones, las una o más secuencias de nucleótidos se insertan entre un primer y un segundo segmento de gen  $V_H$  humano.

30 En algunas realizaciones, las una o más secuencias de nucleótidos se insertan en el lugar de un pseudogén  $Adam6$  humano.

En algunas realizaciones, el primer segmento de gen  $V_H$  humano es  $V_H 1-2$  humano y el segundo segmento de gen  $V_H$  humano es  $V_H 6-1$  humano.

35 En algunas realizaciones, las una o más secuencias de nucleótidos se insertan entre un segmento de gen  $V_H$  humano y un segmento de gen  $D_H$  humano.

40 En algunas realizaciones, el roedor es heterocigoto u homocigoto para el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.

En algunas realizaciones, el roedor es heterocigoto u homocigoto para el locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno.

45 En algunas realizaciones, el roedor es heterocigoto u homocigoto para el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno.

En algunas realizaciones, el roedor es una rata o un ratón.

50 En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento una célula de roedor aislada del roedor proporcionado.

En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento una célula inmortalizada producida a partir de una célula de roedor proporcionada en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, la célula de roedor es una célula madre embrionaria de roedor.

En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un embrión de roedor generado a partir de una célula madre embrionaria de roedor proporcionada en el presente documento.

60 En algunas realizaciones, también se proporciona un método para producir un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería, comprendiendo el método:

el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno, comprendiendo el método:

65 (a) introducir un fragmento de ADN en una célula madre embrionaria de roedor, comprendiendo el fragmento de

ADN una secuencia de nucleótidos que incluye:

- 5 (i) uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos;  
 (ii) uno o más segmentos de genes J $\lambda$  humanos;  
 (iii) uno o más segmentos de genes C $\lambda$  humanos;  
 (iv) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina (E $\lambda$ ) de roedor;  
 (v) tres E $\lambda$  humanos; y  
 (vi) un segmento de gen C $\lambda$  de roedor;

10 en donde (i) y (ii) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos de genes de región constante de (iii) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno, y en donde (i) y (ii) también son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen C $\lambda$  de roedor de (vi) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno;

- 15 (b) obtener la célula madre embrionaria de roedor generada en (a); y  
 (c) crear un roedor utilizando la célula madre embrionaria de roedor de (b).

En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un método para producir un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería, comprendiendo el método:

modificar el genoma de la línea germinal del roedor para que comprenda un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería que incluye una inserción de:

- 25 (i) uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos;  
 (ii) uno o más segmentos de genes J $\lambda$  humanos;  
 (iii) uno o más segmentos de genes C $\lambda$  humanos;  
 (iv) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina (E $\lambda$ ) de roedor;  
 (v) tres E $\lambda$  humanos; y  
 30 (vi) un segmento de gen C $\lambda$  de roedor,

en donde (i) y (ii) son capaces de reordenarse para formar genes de la región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos génicos de región constante de (iii) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno y (i) y (ii) también son capaces de reordenarse para formar genes de la región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen de región constante  $\lambda$  de roedor de (vi) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, el uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos incluyen V $\lambda$ 5-52 a V $\lambda$ 1-40 y/o V $\lambda$ 3-27 a V $\lambda$ 3-1.

40 En algunas realizaciones, el uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre V $\lambda$ 5-52 a V $\lambda$ 1-40 y/o V $\lambda$ 3-27 a V $\lambda$ 3-1 humanos.

En algunas realizaciones, el uno o más segmentos de genes J $\lambda$  humanos y el uno o más segmentos de genes C $\lambda$  humanos incluyen los pares de segmentos de genes J $\lambda$ -C $\lambda$  humanos J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3, J $\lambda$ 6-C $\lambda$ 6 y el segmento del gen J $\lambda$ 7 humano.

En algunas realizaciones, los pares de segmentos de genes J $\lambda$ -C $\lambda$  humanos J $\lambda$ 1-C $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2-C $\lambda$ 2, J $\lambda$ 3-C $\lambda$ 3 y J $\lambda$ 6-C $\lambda$ 6 incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes J $\lambda$  y C $\lambda$  humanos, y el segmento del gen J $\lambda$ 7 humano incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural 50 cadena arriba (o 5') de J $\lambda$ 7 humano.

En algunas realizaciones, el segmento de gen C $\lambda$  de roedor es un segmento de gen C $\lambda$ 1 de ratón.

55 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende tres E $\lambda$  humanos.

En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende dos E $\lambda$  de roedor.

En algunas realizaciones, los dos E $\lambda$  de roedor son un E $\lambda$  de ratón y un E $\lambda$ 3-1 de ratón.

60 En algunas realizaciones, el fragmento de ADN comprende además uno o más marcadores de selección.

En algunas realizaciones, el fragmento de ADN comprende además uno o más sitios de recombinación específicos de sitio.

65 En algunas realizaciones, el fragmento de ADN de (a) se introduce en una célula madre embrionaria de roedor cuyo

genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; o un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  humanos están operativamente unidos a una región  $C_k$  de inmunoglobulina de roedor.

En algunas realizaciones, el fragmento de ADN de (a) se introduce en una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre; o un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre; y en donde el método comprende además una etapa de cruzar un ratón producido a partir de dicha célula madre embrionaria de roedor con un segundo ratón.

En algunas realizaciones, la modificación del genoma de la línea germinal de un roedor para que comprenda un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina modificado por ingeniería se lleva a cabo en una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende además un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; o un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  humanos están operativamente unidos a una región  $C_k$  de inmunoglobulina de roedor.

En algunas realizaciones, la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre el uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre el uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos.

En algunas realizaciones, la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos.

En algunas realizaciones, la modificación del genoma de la línea germinal de un roedor para que comprenda un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina modificado por ingeniería se lleva a cabo en una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre; o un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno de tipo silvestre; y en donde el método comprende además una etapa de cruzar un ratón producido a partir de dicha célula madre embrionaria de roedor con un segundo ratón.

En algunas realizaciones, el segundo ratón tiene un genoma de la línea germinal que comprende locus de IgH e Igk de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, el segundo ratón tiene un genoma de la línea germinal que comprende locus de IgH e Igk humanizados homocigotos o heterocigotos, cuyo locus de IgH humanizado homocigoto o heterocigoto contiene una secuencia que codifica Adam6 de roedor insertada.

En algunas realizaciones, el segundo ratón tiene un genoma de la línea germinal que comprende un locus de IgH humanizado homocigoto o heterocigoto y un locus Igk homocigótico o heterocigoto inactivado.

En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un método para producir un anticuerpo en un roedor, comprendiendo el método las etapas de (1) inmunizar el roedor proporcionado con un antígeno de interés; (2) mantener al roedor en condiciones suficientes para que el roedor produzca una respuesta inmunitaria al antígeno de interés; y (3) recuperar un anticuerpo del roedor, o una célula de roedor, que se une al antígeno de interés.

En algunas realizaciones, el roedor tiene un genoma de la línea germinal que comprende además: un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de

- genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; o un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor; y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_k$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_k$  humanos, cuyos segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  humanos están operativamente unidos a una región  $C_k$  de inmunoglobulina de roedor.
- 5
- 10 En algunas realizaciones, la célula de roedor es un linfocito B.
- En algunas realizaciones, la célula de roedor es un hibridoma.
- 15 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende la inserción de los segmentos de genes  $V_\lambda$  humanos  $V_{\lambda 5-52}$  a  $V_{\lambda 1-40}$  y  $V_{\lambda 3-27}$  a  $V_{\lambda 3-1}$ , los pares de segmentos de genes  $J_\lambda$ - $C_\lambda$  humanos  $J_{\lambda 1}$ - $C_{\lambda 1}$ ,  $J_{\lambda 2}$ - $C_{\lambda 2}$ ,  $J_{\lambda 3}$ - $C_{\lambda 3}$ ,  $J_{\lambda 6}$ - $C_{\lambda 6}$  y el segmento del gen  $J_\lambda$  humano  $J_{\lambda 7}$ .
- 20 En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $V_\lambda$ ,  $V_{\lambda 5-52}$  a  $V_{\lambda 1-40}$  y  $V_{\lambda 3-27}$  a  $V_{\lambda 3-1}$  humanos, ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes  $J_\lambda$ - $C_\lambda$  humanos  $J_{\lambda 1}$ - $C_{\lambda 1}$ ,  $J_{\lambda 2}$ - $C_{\lambda 2}$ ,  $J_{\lambda 3}$ - $C_{\lambda 3}$  y  $J_{\lambda 6}$ - $C_{\lambda 6}$ , y ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba (o 5') del segmento del gen  $J_\lambda$  humano  $J_{\lambda 7}$ .
- En algunas realizaciones, el segmento de gen  $C_\lambda$  de roedor es un segmento de gen  $C_{\lambda 1}$  de ratón.
- 25 En algunas realizaciones, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende la inserción de los segmentos de genes  $V_H$  humanos de  $V_{H3-74}$  a  $V_{H6-1}$ , los segmentos de genes  $D_H$  humanos de  $D_{H1-1}$  a  $D_{H7-27}$  y los segmentos de genes  $J_H$  humanos  $J_{H1}$ - $J_{H6}$  y cuyos segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos están operativamente unidos a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor endógena.
- 30 En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $V_{H3-74}$  a  $V_{H6-1}$  humanos, ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $D_{H1-1}$  a  $D_{H7-27}$  humanos, y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $J_{H1}$ - $J_{H6}$  humanos.
- 35 En algunas realizaciones, los segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos reemplazan a los segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  de roedor.
- 40 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina comprende la inserción de los segmentos de genes  $V_k$  humanos de  $V_{k2-40}$  a  $V_{k4-1}$  y los segmentos de genes  $J_k$  humanos de  $J_{k1}$ - $J_{k5}$ , y los segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  humanos están operativamente unidos a una región  $C_k$  de inmunoglobulina de roedor endógena.
- En algunas realizaciones, la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $V_{k2-40}$  a  $V_{k4-1}$  humanos, y ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $J_{k1}$ - $J_{k5}$  humanos.
- 45 En algunas realizaciones, los segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  humanos reemplazan a los segmentos de genes  $V_k$  y  $J_k$  de roedor.
- En algunas realizaciones, el genoma de la línea germinal del roedor comprende además la inserción de una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor.
- 50 En algunas realizaciones, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina carece de un gen Adam6 de roedor endógeno.
- En algunas realizaciones, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina comprende además una inserción de una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor.
- 55 En algunas realizaciones, la una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor se insertan entre un primer y un segundo segmentos de genes  $V_H$  humanos.
- 60 En algunas realizaciones, el primer segmento de gen  $V_H$  humano es  $V_{H1-2}$  humano y el segundo segmento de gen  $V_H$  humano es  $V_{H6-1}$  humano.
- En algunas realizaciones, la una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor se insertan en el lugar de un pseudogén Adam6 humano.
- 65 En algunas realizaciones, la una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos Adam6 de roedor se insertan entre un segmento de gen  $V_H$  humano y un segmento de gen  $D_H$  humano.

En algunas realizaciones, el anticuerpo recuperado del roedor, o una célula de roedor, que se une al antígeno de interés comprende un dominio variable de cadena pesada humana y un dominio variable de cadena ligera lambda humana.

5 En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada humana incluye un segmento de gen  $V_H$  humano reordenado seleccionado del grupo formado por  $V_{H3-74}$ ,  $V_{H3-73}$ ,  $V_{H3-72}$ ,  $V_{H2-70}$ ,  $V_{H1-69}$ ,  $V_{H3-66}$ ,  $V_{H3-64}$ ,  $V_{H4-61}$ ,  $V_{H4-59}$ ,  $V_{H1-58}$ ,  $V_{H3-53}$ ,  $V_{H5-51}$ ,  $V_{H3-49}$ ,  $V_{H3-48}$ ,  $V_{H1-46}$ ,  $V_{H1-45}$ ,  $V_{H3-43}$ ,  $V_{H4-39}$ ,  $V_{H4-34}$ ,  $V_{H3-33}$ ,  $V_{H4-31}$ ,  $V_{H3-30}$ ,  $V_{H4-28}$ ,  $V_{H2-26}$ ,  $V_{H1-24}$ ,  $V_{H3-23}$ ,  $V_{H3-21}$ ,  $V_{H3-20}$ ,  $V_{H1-18}$ ,  $V_{H3-15}$ ,  $V_{H3-13}$ ,  $V_{H3-11}$ ,  $V_{H3-9}$ ,  $V_{H1-8}$ ,  $V_{H3-7}$ ,  $V_{H2-5}$ ,  $V_{H7-4-1}$ ,  $V_{H4-4}$ ,  $V_{H1-3}$ ,  $V_{H1-2}$  y  $V_{H6-1}$ .

10 En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena ligera lambda humana incluye un segmento de gen  $V_L$  humano reordenado seleccionado del grupo que consiste en  $\lambda 4-69$ ,  $V_{\lambda 8-61}$ ,  $V_{\lambda 4-60}$ ,  $V_{\lambda 6-57}$ ,  $V_{\lambda 10-54}$ ,  $V_{\lambda 5-52}$ ,  $V_{\lambda 1-51}$ ,  $V_{\lambda 9-49}$ ,  $V_{\lambda 1-47}$ ,  $V_{\lambda 7-46}$ ,  $V_{\lambda 5-45}$ ,  $V_{\lambda 1-44}$ ,  $V_{\lambda 7-43}$ ,  $V_{\lambda 1-40}$ ,  $V_{\lambda 5-39}$ ,  $V_{\lambda 5-37}$ ,  $V_{\lambda 1-36}$ ,  $V_{\lambda 3-27}$ ,  $V_{\lambda 3-25}$ ,  $V_{\lambda 2-23}$ ,  $V_{\lambda 3-22}$ ,  $V_{\lambda 3-21}$ ,  $V_{\lambda 3-19}$ ,  $V_{\lambda 2-18}$ ,  $V_{\lambda 3-16}$ ,  $V_{\lambda 2-14}$ ,  $V_{\lambda 3-12}$ ,  $V_{\lambda 2-11}$ ,  $V_{\lambda 3-10}$ ,  $V_{\lambda 3-9}$ ,  $V_{\lambda 2-8}$ ,  $V_{\lambda 4-3}$  y  $V_{\lambda 3-1}$ .

En algunas realizaciones, el roedor es un ratón o una rata.

20 En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno homocigoto que comprende: (i) los segmentos de genes  $V_L$  humanos  $V_{\lambda 5-52}$  a  $V_{\lambda 1-40}$  y  $V_{\lambda 3-27}$  a  $V_{\lambda 3-1}$ , (ii) los pares de segmentos de genes  $J_L-C_L$  humanos  $J_{\lambda 1-C_{\lambda 1}}$ ,  $J_{\lambda 2-C_{\lambda 2}}$ ,  $J_{\lambda 3-C_{\lambda 3}}$  y  $J_{\lambda 6-C_{\lambda 6}}$ , (iii) el segmento del gen  $J_L$  humano  $J_{\lambda 7}$ , y (iv) tres potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina humana; en donde (i)-(iv) están operativamente unidos entre sí y (i)-(iii) están cadena arriba de un segmento de gen  $C_L$  de roedor, y en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno carece de un  $E_{\lambda 2-4}$  de inmunoglobulina de roedor endógeno, los segmentos de genes  $V_L$  humanos  $V_{\lambda 5-52}$  a  $V_{\lambda 1-40}$  y  $V_{\lambda 3-27}$  a  $V_{\lambda 3-1}$  incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los segmentos de genes  $V_L$  humanos, los pares de segmentos de genes  $J_L-C_L$  humanos  $J_{\lambda 1-C_{\lambda 1}}$ ,  $J_{\lambda 2-C_{\lambda 2}}$ ,  $J_{\lambda 3-C_{\lambda 3}}$  y  $J_{\lambda 6-C_{\lambda 6}}$  incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes  $J_L-C_L$  humanos, y el segmento del gen  $J_L$  humano  $J_{\lambda 7}$  incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba (o 5') de  $J_{\lambda 7}$  humano.

En algunas realizaciones, el segmento de gen  $C_L$  de roedor es un segmento de gen  $C_{\lambda 1}$  de ratón.

35 En algunas realizaciones, el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende además potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina de roedor endógenos  $E_{\lambda}$  y  $E_{\lambda 3-1}$ .

En algunas realizaciones, el locus endógeno de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina comprende una delección de los segmentos de genes  $V_{\lambda 2-V_{\lambda 3}-J_{\lambda 2}-C_{\lambda 2}-J_{\lambda 4P}-C_{\lambda 4P}}$  de roedor endógenos y segmentos de genes  $V_{\lambda 1}-J_{\lambda 3}-J_{3P_{\lambda}}-C_{\lambda 3}-J_{\lambda 1}$ .

40 En algunas realizaciones, el roedor es una rata o un ratón.

### Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir al experto en la materia cómo producir y utilizar los métodos y composiciones descritos en el presente documento, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores de la presente divulgación consideran su invención. A menos que se indique lo contrario, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

#### 50 **Ejemplo 1. Construcción de un vector de direccionamiento para modificar por ingeniería de un locus de cadena ligera $Ig\lambda$ de roedor**

Este ejemplo ilustra métodos ejemplares para construir un vector de direccionamiento para la inserción en el genoma de un roedor, tal como un roedor (p. ej., un ratón). Los métodos descritos en este ejemplo demuestran la producción de un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $Ig\lambda$  modificado por ingeniería. En particular, este ejemplo demuestra la construcción de una serie de vectores de direccionamiento para modificar por ingeniería un locus de cadena ligera  $Ig\lambda$  endógeno en un roedor para que el roedor exprese y/o produzca anticuerpos que incluyen cadenas ligeras  $Ig\lambda$  que tienen dominios variables humanos y de roedor o, en algunas realizaciones, dominios constantes humanos de dicho locus de cadena ligera  $Ig\lambda$  endógeno en el genoma de la línea germinal del roedor. Como se describe a continuación, se inserta una serie de vectores de direccionamiento que contienen cantidades variables de material genético que corresponde a un locus de cadena ligera  $Ig\lambda$  humana (es decir, secuencias potenciadoras de  $V_L$ ,  $J_L$ ,  $C_L$  y de  $Ig\lambda$  humanas) en un locus de cadena ligera  $Ig\lambda$  de roedor endógeno. En particular, dicho material genético se inserta cadena arriba de un gen (o segmento de gen)  $C_L$  de roedor de modo que los segmentos de genes  $V_L$ ,  $J_L$  y  $C_L$  humanos están operativamente unidos a dicho gen  $C_L$  de roedor. Los métodos descritos en este ejemplo proporcionan la conservación y/o delección de segmentos (o secuencias) de genes de  $Ig\lambda$  de roedor endógenos. En las Figuras 1-4 se expone una ilustración esquemática ejemplar de una serie de vectores de

direccionamiento para construir un locus de cadena ligera Igλ endógeno modificado por ingeniería.

Se creó una serie de vectores de direccionamiento que contienen varias cantidades de secuencias (o regiones) potenciadoras de Vλ, Jλ, Cλ y de Igλ humanas para la inserción en un locus de cadena ligera Igλ de roedor utilizando tecnología VELOCIGENE® (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.*, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-9) y técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Los métodos descritos en este ejemplo se pueden emplear para utilizar cualquier secuencia potenciadora, o combinación de secuencias (o fragmentos de secuencia) de Vλ, Jλ, Cλ e Igλ humanas, según se desee. La Tabla 1 expone breves descripciones de cada vector de direccionamiento ilustrado en la Figura 1.

Brevemente, se unieron aproximadamente 12 kb (11.822 pb) de secuencia genómica de Igλ humana a partir del clon CTD-2502m16 del cromosoma artificial bacteriano (BAC) humano en el clon RP23-60e14 de BAC de ratón. Este clon de BAC de ratón se modificó por ingeniería para acortar el clon de BAC en aproximadamente 90 kb, insertar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción AsiSI y PI-SceI exclusivos cadena abajo de un gen Cλ1 de ratón y reemplazar el gen de resistencia a Cloranfenicol (CM<sup>R</sup>) original con el gen de resistencia a Espectinomicina (Spec<sup>R</sup>) y el sitio de restricción I-CeuI exclusivo mediante dos etapas consecutivas de recombinación homóloga bacteriana (BHR, por sus siglas en inglés) antes de la unión con la secuencia genómica de Igλ humana. El clon CTD-2502m16 de BAC humano también se modificó mediante dos etapas consecutivas de BHR para recortar aproximadamente 53 kb de secuencia humana del extremo 3' con un casete de selección de Neomicina y un sitio de restricción PI-SceI exclusivo, y recortar un gen CM<sup>R</sup> y aproximadamente 101,5 kb de secuencia humana del extremo 5' con un casete de Higromicina y un sitio de restricción AsiSI exclusivo, colocando así el sitio AsiSI y el casete de selección de Neomicina aproximadamente 2885 pb cadena arriba y aproximadamente 1418 pb cadena abajo, respectivamente, de la región potenciadora humana modular (véase, p. ej., Asenbauer, H. y H.G. Klobeck, 1996, Eur. J. Immunol. 26(1): 142-50). La secuencia genómica de Igλ humana contenía aproximadamente 7,5 kb correspondientes a una región (o secuencia) potenciadora de Igλ humana (Eλ), que es modular y contiene tres elementos de secuencia (Figura 1; Asenbauer, H. y H.G. Klobeck, 1996, Eur. J. Immunol. 26(1): 142-50), y 2,9 kb y 1,4 kb de secuencia flanqueante 5' y 3', respectivamente, así como un casete de selección de Neomicina (es decir, un gen de resistencia a Neomicina [NEO<sup>R</sup>] bajo el control transcripcional de un promotor de ubiquitina y flanqueado por sitios *loxP*). Los clones de BAC humanos y de ratón modificados se digirieron con sitios AsiSI y PI-SceI y se unieron entre sí. Después de la unión al clon BAC de ratón modificado por ingeniería, el vector de direccionamiento resultante contenía aproximadamente 39.166 pb de secuencia de ratón tal como un brazo de homología 5' e incluía los segmentos de genes de Igλ de ratón Vλ1, Jλ3, Jλ3P, Cλ3, Jλ1 y Cλ1 (vector de direccionamiento 6286, Figura 1). El brazo de homología 3' (aproximadamente 30.395 pb) incluía un potenciador de Igλ de ratón (mEλ). Por razones de simplicidad, en la representación del vector de direccionamiento 6286 en la Figura 1, no se muestran los brazos de homología de ratón. La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento dio como resultado la inserción de las tres secuencias potenciadoras de Igλ humanas, así como las secuencias flanqueantes 5' y 3' sin ninguna delección de secuencia de ratón. La delección del casete de selección de Neomicina mediada por recombinasas se logró en células ES mediante la expresión transitoria de recombinasa Cre (véanse, p. ej., Lakso, M. *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6; Orban, P.C. *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6861-5; Gu, H. *et al.*, 1993, Cell 73(6):1155-64; Araki, K. *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:160-4; Dymecki, S.M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93(12):6191-6).

Se modificó por ingeniería una segunda construcción (vector de direccionamiento 6571) para incluir un grupo de cinco segmentos de genes Vλ humanos funcionales y sustancialmente todo un grupo de Jλ-Cλ humanos (es decir, Jλ1-Cλ1-Jλ2-Cλ2-Jλ3-Cλ3-Jλ4-Cλ4-Jλ5-Cλ5-Jλ6-Vλ6-hJλ7) abarcando alrededor de 125.473 pb, que se obtuvo del clon CTD-2079i4 de BAC humano. Para construir el vector de direccionamiento, primero se reemplazó un gen Cλ7 humano en el clon CTD-2079i4 de BAC humano por BHR con un gen Cλ1 de ratón y aproximadamente 1588 pb de secuencia flanqueante, que se amplificó mediante PCR utilizando el clon RP23-60e14 de BAC de ratón como plantilla. Después se unió un brazo de homología 5' que contenía aproximadamente 37.161 pb de secuencia de ratón que corresponden a la secuencia 5' de un gen Cλ1 de ratón en el clon RP23-60e14 de BAC de ratón al clon CTD-2079i4 de BAC humano modificado que contenía el gen Cλ1 de ratón sintético utilizando sitios de reconocimiento por enzimas de restricción I-CeuI y PI-SceI exclusivos introducidos por separado en clones BAC tanto de ratón como humanos por BHR. Este brazo de homología 5' contenía los segmentos de genes Vλ1, Jλ3, Jλ3P, Cλ3 y Jλ1 de ratón (Figura 1). El brazo de homología 3' contenía aproximadamente 9.189 pb de secuencia humana correspondiente a dos de los Eλ humanos del vector de direccionamiento 6286 (Figura 1).

Se diseñó una tercera construcción (vector de direccionamiento 6596) para que contuviera once segmentos de genes Vλ humanos funcionales adicionales. Este vector de direccionamiento contenía aproximadamente 171.458 pb de secuencia humana del clon RP11-761L13 de BAC. Mediante diseño, los tres segmentos de genes Vλ humanos se incluyeron para proporcionar una homología de solapamiento 3' (de aproximadamente 33.469 pb) con el vector de direccionamiento 6571. Tal como se describe anteriormente, se unió un brazo de homología 5' que contenía aproximadamente 37.161 pb de secuencia de ratón al extremo 5' del fragmento de ADN que contenía los segmentos de genes Vλ humanos utilizando sitios de reconocimiento por enzimas de restricción I-CeuI y AsclI exclusivos introducidos por separado en clones BAC tanto de ratón como humanos por BHR.

Se modificó por ingeniería una cuarta construcción (vector de direccionamiento 6597) para que contuviera nueve segmentos de genes Vλ humanos funcionales adicionales. Este vector de direccionamiento contenía

aproximadamente 121.188 pb de secuencia humana de dos clones de BAC, RP11-22L18 y RP11-761L13. Tal como se describe anteriormente, el extremo 3' de esta secuencia humana contenía segmentos de genes Vλ humanos adicionales que proporcionaban homología de solapamiento 3' con el vector de direccionamiento 6596 (aproximadamente 27.468 pb). Como se describe anteriormente para los vector de direccionamiento 6571 y 6596, el brazo de homología 5' de aproximadamente 37.161 pb que contenía la secuencia de ratón del clon RP23-60e14 de BAC se unió al extremo 5' de la secuencia humana utilizando sitios de reconocimiento por enzimas de restricción I-CeuI y Ascl exclusivos introducidos por separado en clones BAC tanto de ratón como humanos por BHR

De manera similar, se diseñó una quinta construcción (vector de direccionamiento 6680) para que contuviera los mismos nueve segmentos de genes Vλ humanos funcionales adicionales que el vector de direccionamiento 6597, excepto que se cambió el brazo de homología 5' para permitir la delección del locus de cadena ligera Igλ de ratón mediante recombinación homóloga. Este brazo de homología 5' contenía aproximadamente 22.298 pb del clon RP23-15m16 de BAC de ratón y se unió al extremo 5' de la secuencia humana (fragmento de ~ 121.188 pb, *supra*) utilizando los sitios de reconocimiento por enzimas de restricción I-CeuI y Ascl exclusivos introducidos por separado en clones BAC tanto de ratón como humanos por BHR Este brazo de homología 5' contiene la secuencia 5' de ratón de un segmento del gen Vλ2 de ratón, que, tras la recombinación homóloga, deleciona eficazmente el locus de cadena ligera Igλ de ratón. Este vector de direccionamiento contenía la misma homología de solapamiento 3' que el vector de direccionamiento 6597 (descrito anteriormente). La Figura 2 ilustra los diferentes alelos que resultan de la inserción de los vectores de direccionamiento 6597 o 6680.

De manera similar, se creó una cepa de ratón modificada por ingeniería adicional mediante la electroporación conjunta de dos vectores de direccionamiento diferentes en células ES con la ayuda del uso de ARN guías (ARNg) utilizando un sistema CRISPR/Cas9 (Figura 3), véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N.º 9.228.208 (otorgada el 5 de enero de 2016) y las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US 2015-0159174 A1 (presentada el 15 de octubre de 2014), US 2015-0376650 A1 (presentada el 5 de junio de 2015), US 2015-0376628 A1 (presentada el 23 de junio de 2015), US 2016-0060657 A1 (presentada el 30 de octubre de 2015), US 2016-0145646 A1 (presentada el 20 de noviembre de 2015) y US 2016-0177339 A1 (presentada el 18 de diciembre de 2015). Las células ES tenían un genoma heterocigoto para la inserción de la construcción del vector de direccionamiento 6571.

Brevemente, como se muestra en la Figura 3, un vector de direccionamiento 6596 recortado (es decir, sin un brazo de homología 5' ni un casete como se describe anteriormente) se diseñó para que contuviera aproximadamente un brazo de homología 3' de 33 kb que incluye la secuencia de solapamiento que corresponde a tres segmentos de genes Vλ humanos en el vector de direccionamiento 6571, una secuencia de aproximadamente 111 kb que comprende 11 segmentos de genes Vλ humanos adicionales, y una secuencia de aproximadamente 27 kb que contiene un solo segmento de genes Vλ humanos y sirve como una región de solapamiento con el segundo vector de direccionamiento. El segundo vector de direccionamiento (vector de direccionamiento 6680) comprende la misma secuencia de región de solapamiento de aproximadamente 27 kb colocada en el extremo 3' del vector de direccionamiento, una secuencia de aproximadamente 94 kb que comprende nueve segmentos de genes Vλ humanos adicionales, un casete de selección de Neomicina (p. ej., un gen de resistencia a neomicina [NEO<sup>R</sup>] bajo control transcripcional de un promotor de ubiquitina flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinación Frt) y un brazo de homología λ de ratón 5' de aproximadamente 22 kb. Las células ES empleadas en la electroporación de estos dos vectores de direccionamiento tenían un genoma heterocigoto para la inserción del vector de direccionamiento 6571 (Figura 3). Estas células ES se sometieron a electroporación de manera conjunta con los dos vectores de direccionamiento descritos anteriormente junto con un ARN guía (ARNg) que se dirige al gen de resistencia a Higromicina del vector de direccionamiento 6571 en la secuencia de nucleótidos CGACCTGATG CAGCTCTCGG (SEQ ID NO: 130) y dos ARNg que se dirigen una región cadena arriba de un segmento del gen Vλ2 de ratón (es decir, 3' de un segmento del gen Vλ2 de ratón en la hebra negativa; ARNg1: GTACATCTTG TCTTCAACGT, SEQ ID NO: 139, aproximadamente 1000 pb cadena arriba de Vλ2 de ratón; ARNg2: GTCCATAATT AATGTAGTTA C, SEQ ID NO:140, aproximadamente 380 pb cadena arriba de Vλ2 de ratón) y promueven roturas de doble hebra en estas secuencias. Los dos vectores diana sometidos a electroporación de manera conjunta se insertaron mediante recombinación homóloga en el genoma de las células ES en la secuencia de Higromicina, reemplazando la región que contiene y rodea el casete de selección de Higromicina. Las células ES resultantes contenían un locus de Igλ endógeno modificado por ingeniería que incluía una región variable de inmunoglobulina humana que comprende 25 segmentos de genes Vλ humanos funcionales operativamente unidos a un grupo de Jλ-Cλ humanos, un segmento del gen Jλ7 humano y operativamente unidos a un gen Cλ1 de ratón (Figura 3).

Los vectores de direccionamiento descritos anteriormente se introdujeron en células madre embrionarias (ES) de ratón para construir el locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería. Los clones de células ES positivos se confirmaron después de la inserción de cada vector de direccionamiento en el genoma de las células ES (véase a continuación) antes de la inserción del siguiente vector de direccionamiento. En algunos casos, se crearon cepas intermedias para el análisis fenotípico.

Tabla 1. Sumario de Vectores de Direccionamiento

Nombre	Secuencia de hIgλ aproximada	Descripción
--------	------------------------------	-------------

## ES 2 823 305 T3

---

6286	11.822 pb	Inserción de E $\lambda$ humanos en el locus de Ig $\lambda$ de ratón
6571	125.473 pb	Inserción de cinco segmentos de genes V $\lambda$ humanos funcionales y parte del grupo de genes J $\lambda$ -C $\lambda$ humanos
6596	171.458 pb	Inserción de once segmentos de genes V $\lambda$ humanos funcionales adicionales
6597	121.188 pb	Inserción de nueve segmentos de genes V $\lambda$ humanos funcionales adicionales

(continuación)

Nombre	Secuencia de hlgλ aproximada	Descripción
6680	121.188 pb	Inserción de nueve segmentos de genes Vλ humanos funcionales adicionales y deleción de segmentos de genes de Igλ de ratón
6889	121.188 pb	Inserción de nueve segmentos de genes Vλ humanos funcionales adicionales y deleción de segmentos de genes de Igλ de ratón mediante la inserción simultánea de dos vector de direccionamiento y ARN guía

La secuencia de nucleótidos a través de los puntos de unión seleccionados después de la inserción de los vectores de direccionamiento descritos anteriormente se confirmó mediante secuenciación. Los puntos de unión seleccionados indicados en las Figuras 1-4 se proporcionan a continuación.

5

- SEQ ID NO: 117 CCCTATTCACTGAGTTCTGGAAGCTCTGCTATTTCCATGATCGTT  
CACACTGACCCCTGTTGATCCTACCGGTACCGAAGTTCCTATTC  
CGAAGTTCCTA
- SEQ ID NO: 118 TTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCG  
CGCCGATGTACATCAGTTCAGTCTGGAAAGGTGGAACAGCTCC  
AGGTGAAGGCAGG
- SEQ ID NO: 119 CTCTACGGGTGATGTTTCATCTAAGGTGACAGGAGTCAGTGAGG  
GCTTCTCAAGCTTTATCTATGTCTGGGTGCGGAGAAAGAGGTAAT  
GAAATGGCACTCGAGCCCTGCTGGTGCCTTCTGTTGTATCCACG  
CCTTCAGTAGATTTGATGA
- SEQ ID NO: 120 GAGTTTTTCCCTTTCCTGTCTGTCTCGAAGGCTAAGGTCTAAGCCT  
GTCTGGTCACACTAGGTAAGAATTTCTTTCTTCTCTAGATGCT  
TTGTCTCATTTC
- SEQ ID NO: 121 TATGTCACTGGAATTTAGAGTAGTGTGTGGAATGTCTTGGCAAC  
CTGGACACGCGTCCCTGGCACCCAGTGAGAAAGTGGCCCTGAGG  
GAGAGGCTCATAG
- SEQ ID NO: 122 AGCAGCCGACATTTAGCAAAGAGGATTGGAAAATGAACCCCCC  
CTTAAAATACAGTTAAACACAGAGGAGGGAGCAAACCGGTATA  
ACTTCGTATAATGT
- SEQ ID NO: 123 ATGCTATACGAAGTTATGTCTGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTAC  
CATCTATGTCTGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGTCTCA  
TTCCTTCCCTGTCTCAAGGCATAATGGTTCAATATGCACCTGTA
- SEQ ID NO: 124 TTCTCTCCAAGACTTGAGGTGCTTTTTGTTGTATACTTTCCCTTT  
CTGTATTCTGCTTCATACCTATACTGGTACCGAAGTTCCTATTCC  
GAAGTTCCTA
- SEQ ID NO: 125 TTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCG  
CGCCTGCCATTTCACTTCTTTCTCCGCACCCGACATAGATA  
AGCTTTGGATTGGATTCAGTGAGCAAGAATTCACAAACACAAT  
GGACTTATC
- SEQ ID NO: 126 TTCTCTCCAAGACTTGAGGTGCTTTTTGTTGTATACTTTCCCTTT  
CTGTATTCTGCTTCATACCTATACTGGTACCGAAGTTCCTATTCC  
GAAGTTCCTA
- SEQ ID NO: 127 TTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCG  
CGCCCCCTGCTGGTGCCTTTTGTGTATCCACGCCTTCAGTAG  
ATTTGATGATGC

SEQ ID NO: 128 TTCTCTCCAAGACTTGAGGTGCTTTTTGTTGTATACTTTCCCTTT  
CTGTATTCTGCTTCATACCTATACTGGTACCGAAGTTCCTATTCC  
GAAGTTCCTA

SEQ ID NO: 129 TTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCG  
CGCCGATGTACATCAGTTCAGTCTGGAAAGGTGGAACAGCTCC  
AGGTGAAGGCAGG

En la construcción de locus modificados por ingeniería, en particular, locus de inmunoglobulinas modificados por ingeniería, los inventores reconocieron que algunos segmentos de genes V $\lambda$  humanos pueden faltar en determinados haplotipos y, por lo tanto, no están representados en clones de BAC seleccionados que abarcan un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana. Por proporcionar un solo ejemplo, un informe ha proporcionado evidencia de que los alelos descubiertos más recientemente contienen inserción/delección de uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos en el grupo B del locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana en comparación con los alelos informados anteriormente (p. ej., V $\lambda$ 1-50, V $\lambda$ 5-48, V $\lambda$ 5-45 y V $\lambda$ 5-39 humanos; véase Moraes, J.C. y G.A. Passos, 2003, Immunogenetics 55(1):10-5). Por lo tanto, los inventores han diseñado una estrategia para incluir segmentos de genes V $\lambda$  humanos que faltan en un clon de BAC particular usado para el diseño y la construcción de vectores de direccionamiento.

Brevemente, los clones de BAC humanos se mapean en el locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana mediante secuenciación final. En particular, utilizando el ensamblaje GRCh37/hg19 (UCSC Genome Browser, Human Feb.2009) se identifica que los clones BAC humanos RP11-34614, CTD-2523F21 y CTD-2523E22 abarcan una región del grupo B del locus de cadena ligera Ig $\lambda$  humana que incluye V $\lambda$ 7-46 a V $\lambda$ 1-36 humanos. Por ejemplo, uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos que faltan (p. ej., V $\lambda$ 5-39, V $\lambda$ 5-37 y/o V $\lambda$ 1-36) se pueden insertar en un vector de direccionamiento descrito anteriormente (6680 o 6889) usando uno cualquiera de estos clones BAC identificados para que contenga uno o más segmentos de genes V $\lambda$  humanos que se desean para la inserción. Por ejemplo, el clon CTD-2523F21 de BAC se modifica reemplazando el 3' con un casete de selección (p. ej., gen de resistencia a higromicina [HYG<sup>R</sup>] bajo control transcripcional de un promotor de ubiquitina) flanqueado por sitios de reconocimiento por recombinasas (p. ej., lox2372) y un brazo de homología 3' de ~ 27 kb que tiene una secuencia solapante con el vector de direccionamiento 6597 (véase anteriormente). El extremo 5' del clon BAC humano sirve como brazo de homología 5' que tiene una secuencia solapante con el vector de direccionamiento 6680 o 6889, facilitando así, la recombinación homóloga y la inserción de cualquier segmento de gen V $\lambda$  humanos que falte junto con el casete de selección. Puede emplearse una última etapa opcional de expresión transitoria de una recombinasa (p. ej., Cre) para eliminar el casete de selección.

### Ejemplo 2. Generación de roedores que tienen un locus de cadena ligera Ig $\lambda$ modificado por ingeniería

Este ejemplo demuestra la producción de un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno que comprende la inserción de una pluralidad de secuencias V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanas, cuyas secuencias V $\lambda$ , J $\lambda$  y C $\lambda$  humanas están operativamente unidas a un gen (o segmento de gen) C $\lambda$  de roedor y dicho locus de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno incluye además uno o más potenciadores de Ig $\lambda$  humanos (E $\lambda$ ). En algunas realizaciones, dicho locus de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno incluye una delección de una o más regiones (o secuencias) potenciadoras de cadena ligera Ig $\lambda$  endógenas. Tales roedores se caracterizan, en algunas realizaciones, por expresión de cadenas ligeras Ig $\lambda$ , que son completamente humanas (es decir, dominios variables y constantes humanos).

La inserción dirigida de los vectores de direccionamiento descrita en el Ejemplo 1 se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa. El ADN de BAC dirigido, confirmado por reacción en cadena de la polimerasa, se introdujo después en células madre embrionarias (ES) de ratón híbridas F1 (129S6SvEvTac/C57BL6NTac) mediante electroporación seguida de cultivo en medio de selección. En algunas realizaciones, las células ES utilizadas para la electroporación de la serie de vectores de direccionamiento pueden tener un genoma de la línea germinal que incluye locus de IgH e Igk de tipo silvestre, locus de IgH e Igk humanizados homocigotos, cuyo locus de IgH humanizado homocigoto contenía una secuencia codificante de Adam6 de roedor insertada (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940), o un locus de IgH humanizado homocigoto (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940, *supra*) y un locus de Igk inactivado homocigoto. En otras realizaciones, después de que las células ES dirigidas como se describe en el presente documento se utilicen para generar ratones (véase a continuación), los ratones resultantes que comprenden un locus de Ig $\lambda$  humana modificado por ingeniería como se describe en el presente documento se utilizan para reproducirse con ratones que comprenden locus de IgH e Igk humanizados, cuyo locus de IgH humanizado contiene una secuencia que codifica Adam6 de roedor insertada (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940, *supra*), o un locus de IgH humanizado (véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940, *supra*) y un locus de Igk inactivado. Las colonias resistentes a fármacos se recogieron 10 días después de la electroporación y se exploraron mediante TAQMAN™ y cariotipificación para determinar el direccionamiento correcto como se describe anteriormente (Valenzuela *et al.*, *supra*; Friendewey, D. *et al.*, 2010, Methods Enzymol. 476:295-307). La Tabla 2 expone conjuntos de cebadores/sondas ejemplares utilizados para explorar clones de células ES positivos (F: cebador directo; R: cebador inverso; P: sonda).

Se utilizó el método VELOCIMOUSE® (DeChiara, TM *et al.*, 2010, *Methods Enzymol.* 476:285-294; DeChiara, T.M., 2009, *Methods Mol. Biol.* 530:311-324; Poueymirou *et al.*, 2007, *Nat. Biotechnol.* 25:91-99), en donde se inyectaron células ES dirigidas en embriones Swiss Webster en estadio de 8 células sin compactar, para producir ratones sanos de la generación F0 totalmente derivados de células ES heterocigotos para el alelo de cadena ligera Igλ modificado.  
 5 Se cruzaron ratones heterocigotos de generación F0 con ratones C57B16/NTac para generar heterocigotos F1 que se entrecruzaron para producir animales de generación F2 para análisis fenotípicos.

Tomado en conjunto, este ejemplo ilustra la generación de un roedor (p. ej., un ratón) cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería caracterizado por la presencia de una pluralidad de secuencias Vλ, Jλ y Cλ humanas operativamente unidas a un gen Cλ de roedor, cuyo locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería incluye secuencias (o regiones) potenciadoras de cadena ligera Igλ endógenas de roedor y humanas. La estrategia descrita en el presente documento para insertar secuencias Vλ, Jλ y Cλ humanas, en un locus de cadena ligera Igλ de roedor endógeno permite la construcción de un roedor que expresa anticuerpos que contienen dominios Vλ humanos fusionados con un dominio Cλ humano o de roedor. Tal como se describe en el presente documento, dichos dominios Vλ humanos se expresan a partir de locus de cadena ligera Igλ endógenos en el genoma de la línea germinal de roedor.  
 10  
 15

Tabla 2. Conjuntos de cebador/sonda representativos para la exploración de clones de células ES positivos

Nombre		Secuencia (5'-3')
mIgLC1p3	F	GCATGGCCTAGAGATAACAAGAC (SEQ ID NO:15)
	R	GGCCTTGGATAACCTCAGGATAC (SEQ ID NO:16)
	P	TCCATCCCAATAGATCTCATTCTTCCC (SEQ ID NO: 17)
HSS1-1	F	CCCTGTCAAGTCTCCAAGGTTG (SEQ ID NO:18)
	R	CACTGTGGCCCAAGGATCAC (SEQ ID NO:19)
	P	CACTCTGCCAGGGAGTGTCTGG (SEQ ID NO:20)
LoLjxn1	F	GCATGGCCTAGAGATAACAAGACTG (SEQ ID NO:21)
	R	GTGCTCTTCCCTTGGGAGA (SEQ ID NO:22)
	P	TCCATCCCAATAGAGCGATCGCA (SEQ ID NO:23)
Neo	F	GGTGGAGAGGCTATTTCGGC (SEQ ID NO:24)
	R	GAACACGGCGGCATCAG (SEQ ID NO:25)
	P	TGGGCACAACAGACAATCGGCTG (SEQ ID NO:26)
hIgL2	F	AGCTGAATGGAAACAAGGCAA (SEQ ID NO:27)
	R	GGAGACAATGCCCCAGTGA (SEQ ID NO:28)
	P	TGACATGAACCATCTGTTTCTCTCGACAA (SEQ ID NO:29)
hIgL4	F	CCACCGCCAAGTTGACCTC (SEQ ID NO:30)
	R	TGAAGGACTAAGGCCAGGATAG (SEQ ID NO:31)
	P	AGTACAGCAAGGGCCCAGCCT (SEQ ID NO:32)
hIgL5	F	TGGCTCAGTGACAAGAGTC (SEQ ID NO:33)
	R	CCAGGGACACAGCCTTTGC (SEQ ID NO:34)
	P	TGCATTGCAGAGACCAGGGACC (SEQ ID NO:35)
Hyg	F	TGCGGCCGATCTTAGCC (SEQ ID NO:36)
	R	ACGAGCGGGTTTCGGCCCATTC (SEQ ID NO:37)
	P	TTGACCGATTCTTTCGGG (SEQ ID NO:38)
Hyg D	F	TGTCGGGCGTACACAAATCG (SEQ ID NO:39)
	R	GGGCGTCGGTTTCCACTATC (SEQ ID NO:40)
	P	CCGTCTGGACCGATGGCTGTGT (SEQ ID NO:41)
Hyg U	F	CGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTG (SEQ ID NO:42)
	R	CACGCCCTCTACATCGAA (SEQ ID NO:43)
	P	AGTTTCGACAGCGTGTCCGACCTGA (SEQ ID NO:44)
mIgL1	F	AACAACCGAGCTCCAGGTGT (SEQ ID NO:45)
	R	AGGGCAGCCTTGTCTCCAA (SEQ ID NO:46)
	P	CCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTG (SEQ ID NO:47)

ES 2 823 305 T3

(continuación)

Nombre		Secuencia (5'-3')
mlgL6	F	GGAGGTCAGGAATGAGGGAC (SEQ ID NO:48)
	R	CACTTGCTCACTGCAAAAGCA (SEQ ID NO:49)
	P	TGTGGGATTTTGGAAATTCTATCTCACTGATAGGAAAAG (SEQ ID NO:50)
mlgL10	F	GCAGAGAGGATTCAAGAGCTGG (SEQ ID NO: 51)
	R	TTTTTGCAATGCTTCACCTGA (SEQ ID NO:52)
	P	CAGGTGTCTGTATTGGAGGTCAATGGCA (SEQ ID NO:53)
mlgL11	F	GATTTGCTGAGGGCAGGGT (SEQ ID NO:54)
	R	CCCCAAGTCTGATCCTTCCTT (SEQ ID NO:55)
	P	CCTTCATACTCTTGCATCCTCCCTTCTCCA (SEQ ID NO:56)
mlgL12	F	GCTGACCAACGATCGCCTAA (SEQ ID NO:57)
	R	TAAGCGCCACACTGCACCT (SEQ ID NO:58)
	P	TTCTTCTCTTCTGTGACTCAATTATTTGTGGACA (SEQ ID NO:59)
mlgL13	F	AACTGCTGATGCACTGGGC (SEQ ID NO:60)
	R	TGAATGCATGGAGTTGGCC (SEQ ID NO:61)
	P	TCTCCTTTGCAGTGGCTTAATTAGCTGAGTCA (SEQ ID NO:62)
1467hT11	F	CCCTGGTGAAGCATGTTTGC (SEQ ID NO:63)
	R	TGTGGCCTGTCTGCCTTACG (SEQ ID NO:64)
	P	CCAAGCAGGAGGTGCTCAGTTCCCAA (SEQ ID NO:65)
1467hT12	F	GGGACAGGTGAAGGGCCTATC (SEQ ID NO:66)
	R	TGGTCCACAGGATGCAGTTG (SEQ ID NO:67)
	P	CGCACCTGTATCTAACCAGTCCCAGCATC (SEQ ID NO:68)
1467hT13	F	CACACCTAGACCCCGGAAGTC (SEQ ID NO:69)
	R	TCGCTTTGCCAGTTGATTCTC (SEQ ID NO:70)
	P	TCCACACTGTCCGGCTGGGAGCTCA (SEQ ID NO:71)
1468h1	F	CGCTTCAATGACCCAACCA (SEQ ID NO:72)
	R	TGTTGAAACGTAATCCCCAATG (SEQ ID NO:73)
	P	CTCCCACCAGGTGCCACATGCA (SEQ ID NO:74)
1468h2	F	GGGCTACTTGAGGACCTTGCT (SEQ ID NO:75)
	R	GACAGCCCTTACAGAGTTTGGAA (SEQ ID NO:76)
	P	CAGGGCCTCCATCCCAGGCA (SEQ ID NO:77)
1468h3	F	AGTGCAAACAGCAAGATGAGATCT (SEQ ID NO:78)
	R	GGCGCTGAGCAGAAAACAA (SEQ ID NO:79)
	P	AGACCACCAAGAAGGCCAGAGTGACC (SEQ ID NO:80)
1468h5	F	AAGACCAGGAGCTCTGCCTAAGT (SEQ ID NO:81)
	R	CCCATCACGAAGTGAAGTTGAG (SEQ ID NO:82)
	P	CCCCAGTGTGTGAATCACTCTACCCTCC (SEQ ID NO:83)
1468h6	F	CCCTTCATGATGCTTTGTCATC (SEQ ID NO:84)
	R	GTAGTGGCAAAGGCAGATTCCT (SEQ ID NO:85)
	P	CCTTCACTCCCCGAATGCCCTCC (SEQ ID NO:86)
6596V3-25-1	F	GCCCTGCTCCAGTCTTATTCC (SEQ ID NO:87)
	R	CTGCGTCTGGGCTTTGCT (SEQ ID NO:88)
	P	CCACAGATCCCAAGTTGAGCCTGC (SEQ ID NO:89)
6596V3-22-1	F	GTGAGCGGTACCCTGGAATC (SEQ ID NO:90)
	R	AGCCTCGTCTTCGGTCAGGAC (SEQ ID NO:91)
	P	TGAACGATTCTCTGGGTCCACC (SEQ ID NO:92)
6596V3-21-1	F	CCTGAGCCAGGATGGAATGAAG (SEQ ID NO:93)
	R	GGCCGTGATTTAAGAGTTGTTAG (SEQ ID NO:94)
	P	ACTGTGGACCCCAGATAATTCCCCTG (SEQ ID NO:95)
6596VLdetect-1	F	GAGTGCAGTGGCAGAATCTTG (SEQ ID NO:96)
	R	GGCAGGGAGCATTGGTAGA (SEQ ID NO:97)
	P	TACTGAAATCTCAGCCTCCCAGGC (SEQ ID NO:98)

(continuación)

Nombre		Secuencia (5'-3')
6596V3-19-1	F	TGGCTCCAGCTCAGGAAAV (SEQ ID NO:99)
	R	CCCGGGAGTTACAGTAATAGTCA (SEQ ID NO:100)
	P	CACAGCTTCCTTGACCATCACTGGG (SEQ ID NO:101)
6597_h3'arm1	F	CCAGCCCACCCAATTATGCTA (SEQ ID NO:102)
	R	GCGTTTAGGGCCAGGTACAAAT (SEQ ID NO:103)
	P	TGGATCTGTCAAACACTTTCAGAGCA (SEQ ID NO:104)
6597_h3'arm2	F	GAGGCTGCAGGGATGTAAC (SEQ ID NO:105)
	R	CCCATTCCAGGTCCAATTCTCA (SEQ ID NO:106)
	P	TTTGTAAAGTGCATAACACAGACCCTGA (SEQ ID NO:107)
66805'Arm1	F	GGGTACAATGAGACAAGAATCAGA (SEQ ID NO:108)
	R	GAAAGGCAAACACAAGTCACAGATG (SEQ ID NO:109)
	P	TCAGCCCTCTGGAATGTAAGGATCA (SEQ ID NO:110)
66805'Arm2	F	GCTGCATCTTCTCAAGTCTTTAAGT (SEQ ID NO:111)
	R	GGGAACCAGTCAGGAATCATAAC (SEQ ID NO:112)
	P	TAAGCAGACCTATGCATCGCTCA (SEQ ID NO:113)
hlgLVpre2-8	F	GTGCTCCTTGTTCCCTTCACAG (SEQ ID NO:114)
	R	CTGAAGCATCTGCACCATCAAATC (SEQ ID NO:115)
	P	CCACCCACATGTGCCCGTGTG (SEQ ID NO:116)

### Ejemplo 3. Evaluación fenotípica de roedores que tienen un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería

- 5 Este ejemplo demuestra la caracterización de diversas poblaciones de células inmunitarias en roedores (p. ej., ratones) modificados por ingeniería para contener un locus de cadena ligera Igλ endógeno como se describe anteriormente. En particular, este ejemplo demuestra específicamente que los roedores que tienen un locus de cadena ligera Igλ endógeno modificado por ingeniería como se describe en el presente documento muestran un desarrollo de linfocitos B similar en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre. En particular, varios roedores modificados por ingeniería que albergan diferentes cantidades de material genético que corresponden a un locus de cadena ligera Igλ humana expresan cada uno de forma detectable cadenas ligeras Igλ que tienen dominios variables humanos y dominios constantes humanos o de roedor en la superficie de los linfocitos B de roedores.

15 Brevemente, los bazo y fémures se recolectaron de cepas de ratones modificados por ingeniería seleccionadas homocigotas o heterocigotas para los alelos de cadena ligera Igλ representados en la Figura 4 y compañeros de camada de tipo silvestre. La médula ósea se recogió de los fémures mediante lavado abundante con solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS, Gibco) con suero bovino fetal al 2,0 % (FBS). Los glóbulos rojos de las preparaciones de bazo y médula ósea se lisaron con tampón de lisis ACK (Gibco) seguido de lavado con 1xPBS con FBS al 2,0 %. Las células aisladas ( $1 \times 10^6$ ) se incubaron con cócteles de anticuerpos seleccionados durante 30 min a +4 °C (véase la Tabla 3).

Tabla 3. Anticuerpos para la tinción celular analizados por citometría de flujo

Anticuerpo	Marcador	Proveedor	Clon
<i>Médula ósea</i>			
anti-CD43 de ratón	FITC	BioLegend	1B11
anti-c-kit de ratón	EP	BioLegend	2B8
anti-IgM de ratón	PeCy7	eBiosciences	II/41
anti-IgD de ratón	PerCP-Cy5.5	BioLegend	11-26c.2a
anti-CD3 de ratón	PB	BioLegend	17-A2
anti-B220 de ratón/humano	APC	eBiosciences	RA3-6B2
anti-CD19 de ratón	APC-H7	BD	1D3
<i>Médula ósea</i>			
anti-Igk de ratón	FITC	BD	187,1
anti-Igλ de ratón	EP	BioLegend	RML-42
anti-IgM de ratón	PeCy7	eBiosciences	II/41
anti-B220 de ratón/humano	PerCP-Cy5.5	BD	RA3-6B2

(continuación)

Anticuerpo	Marcador	Proveedor	Clon
anti-CD3 de ratón	PB	BioLegend	17-A2
anti-Igλ humana	APC	Biolegend	MHL-38
anti-CD19 de ratón	APC-H7	BD	1D3
<i>Bazo</i>			
anti-Igκ de ratón	FITC	BD	187,1
anti-Igλ de ratón	EP	BioLegend	RML-42
anti-IgM de ratón	PeCy7	eBiosciences	II/41
anti-IgD de ratón	PerCP-Cy5.5	BioLegend	11-26c.2a
anti-CD3 de ratón	PB	BioLegend	17-A2
anti-Igλ humana	APC	Biolegend	MHL-38
anti-CD19 de ratón	APC-H7	BD	1D3

Después de la tinción, las células se lavaron y fijaron en formaldehído al 2 %. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo BD FORTESSA™ y se analizaron con el programa informático FLOWJO™. Los resultados representativos se exponen en las Figuras 5-13 y 18-21. Se obtuvieron datos similares para otras cepas representadas en la Figura 4, pero solo se muestran las cepas indicadas seleccionadas.

Los resultados demostraron que cada cepa que alberga diferentes cantidades de material genético que corresponde al locus de cadena ligera Igλ humana, demostraron perfiles de población de células inmunitarias similares en los compartimentos esplénico y de médula ósea. En particular, como se desprende de los datos que se muestran en las Figuras 5-7, los ratones modificados por ingeniería demostraron un número similar de linfocitos B CD19<sup>+</sup> esplénicos, poblaciones similares de linfocitos B maduros y de transición en el bazo, uso similar de kappa en el bazo, y poblaciones de linfocitos B foliculares y en la zona marginal similares a las de los controles de sus compañeros de camada de tipo silvestre. Adicionalmente, los ratones que contienen un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería como se describe en el presente documento en presencia de locus de IgH humanizados y de Igκ humanizados adicionales no demostraron diferencias importantes en el desarrollo de linfocitos B en comparación con ratones que contienen locus de IgH humanizados y de Igκ humanizados solos (p. ej., véanse las Figuras 18A y 18B). También, como se muestra en los ratones representados en las Figuras 8-12, los ratones modificados por ingeniería tenían número de linfocitos B CD19<sup>+</sup>, pro-, pre-, maduros e inmaduros similares y uso de kappa similar en la médula ósea como los controles de sus compañeros de camada de tipo silvestre. En la Figura 13 se proporciona un resumen de la expresión de cadena ligera en cepas modificadas por ingeniería seleccionadas (homocigotas - HO; heterocigotas - HET) en comparación con sus controles de compañeros de camada de tipo silvestre. Los ratones homocigotos para un locus de Igλ humanizado modificado por ingeniería como se describe en el presente documento, y también homocigoto para los locus de IgH e Igκ humanizados y homocigotos para la secuencia que codifica Adam6 de roedor demostraron una mayor utilización del locus lambda (aproximadamente 40 %) en comparación con la utilización periférica normal (p. ej., 5 % en el bazo) de lambda conocida para ratones de tipo silvestre (véanse columnas para ratones 668OH/VI HO/Adam6 HO y 6689HO/VI HO/Adam6 HO, Figura 13). También, se detectó una pequeña proporción de linfocitos B Igλ positivos de ratón (~ 3-5 %) en estos ratones, lo que confirma que el gen Cλ de ratón dentro del locus de cadenas ligeras λ modificado por ingeniería también se expresa en el contexto de cadenas ligeras λ funcionales en estos ratones.

#### Ejemplo 4. Expresión de anticuerpos en roedores que tienen un locus de cadena ligera Igλ modificado

Este ejemplo demuestra la expresión de anticuerpos de roedores, cuyos anticuerpos contienen cadenas ligeras caracterizadas por la presencia de regiones Vλ humanas y regiones Cλ humanas o de roedor, y cuyas cadenas ligeras se expresan a partir de un locus de cadena ligera Igλ de roedor endógeno modificado por ingeniería. En particular, este ejemplo demuestra específicamente la expresión de anticuerpos en el suero de roedores cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera Igλ endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes Vλ humanos, uno o más segmentos de genes Jλ humanos y uno o más segmentos de genes Cλ humanos, cuyos segmentos de genes Vλ, Jλ y Cλ humanos están operativamente unidos a un gen Cλ de roedor, y cuyo locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende además uno o más potenciadores de cadena ligera Igλ (Eλ) de roedor y uno o más potenciadores de cadena ligera Igλ (Eλ) humanos.

Brevemente, se extrajo sangre de cepas de ratones modificados por ingeniería seleccionadas y de compañeros de camada de tipo silvestre (véase el Ejemplo 3). El suero se separó de la sangre usando tubos Eppendorf centrifugados a 9000 rcf durante cinco minutos a 4 °C. El suero recogido se usó para inmunotransferencia para identificar la expresión de cadena ligera de Ig de los anticuerpos. Los sueros de los ratones se diluyeron 1,5:10 en PBS (sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) y se ejecutaron en geles Novex Tris-Glicina al 4-20 % en condiciones reductoras y no reductoras. Los geles se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las transferencias se bloquearon durante la noche con leche desnatada al 5 % en solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05 % (TBST, Sigma). Las membranas de PVDF se expusieron a diferentes anticuerpos primarios (anti-hIgλ de ratón conjugado con HRP (Southern Biotech); anti-mIgλ de cabra conjugado con HRP, Southern Biotech)

diluidos 1:1.000 en leche desnatada al 0,1 % en TBST durante una hora a temperatura ambiente. Las transferencias se lavaron cuatro veces durante diez minutos por lavado y se revelaron durante un minuto con el reactivo de detección por transferencia western Amersham ECL (GE Healthcare Life Sciences) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. A continuación, se obtuvieron imágenes de las transferencias utilizando el sistema de documentación en gel de cámara CCD refrigerado ImageQuant LAS-4000 de GE Healthcare. Las imágenes se capturaron a intervalos de 15 segundos hasta que se capturaron 20 imágenes o las imágenes estuvieron completamente expuestas, lo que ocurriera primero. Los resultados representativos se exponen en la Figura 14A y 14B. Los resultados demostraron que todas las cepas modificadas por ingeniería expresaron niveles detectables de anticuerpos que contienen cadenas ligeras Igλ humanas en sus sueros (Figura 14 y datos no mostrados).

#### **Ejemplo 5. Uso de segmentos de genes humanos en roedores que tienen un locus de cadena ligera Igλ modificado por ingeniería**

Este ejemplo demuestra el uso de genes humanos en cadenas ligeras de anticuerpos expresados en roedores (p. ej., ratones) modificados por ingeniería para que contengan un locus de cadena ligera Igλ endógeno como se describe en el presente documento. El uso de segmentos de genes de Igλ humanos en cepas de roedores modificadas por ingeniería seleccionadas descritas anteriormente se determinó mediante análisis de repertorio de anticuerpos por Secuenciación de Nueva Generación.

Brevemente, se recolectaron esplenocitos de ratones heterocigotos para la inserción de 25 segmentos de genes Vλ humanos funcionales, 4 grupos de Jλ-Cλ humanos funcionales, y un segmento del gen Jλ7 humano cadena arriba de un gen Cλ1 de ratón, y un potenciador de Igλ humano insertado entre el gen Cλ1 de ratón y un potenciador de Igλ de ratón endógeno 3.1 (6889, ratones heterocigotos como en la Figura 4). Los linfocitos B se enriquecieron positivamente a partir de esplenocitos totales mediante perlas magnéticas anti-CD19 de ratón y columnas MACS (Miltenyi Biotech). Se aisló el ARN total de los linfocitos B esplénicos usando el kit RNeasy Plus (Qiagen).

Se realizó la transcripción inversa con un cebador oligo-dT seguido de PCR específica del gen para generar ADNc que contenía secuencias de región constante de Igλ humana (Cλ1, Cλ2, Cλ3 y Cλ6), así como el ADNc que contenía la secuencia Cλ1 de ratón, utilizando el kit de amplificación de ADNc SMARTer™ RACE (Clontech). Durante la transcripción inversa, una secuencia de ADN específica (PIIA: 5'-CCCATGTACT CTGCGTTGAT ACCACTGCTT-3', SEQ ID NO: 133) se fijó al extremo 3' de los ADNc recién sintetizados. Los ADNc se purificaron mediante el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (Clontech), después se amplificaron aún más utilizando un cebador inverso complementario a PIIA (5' - AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTACAT - 3') emparejado con un cebador específico de Cλ humano (5'-CACYAGTGTG GCCTTGTTGG CTTG-3', SEQ ID NO: 131) y un cebador específico de Cλ1 de ratón (5'-CACCAAGTGTG GCCTTGTTAG TCTC-3', SEQ ID NO:132).

A continuación, los amplicones purificados se amplificaron mediante PCR utilizando un cebador específico de PIIA (5'-GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGCTCTTCCG ATCTAAGCAG TGGTATCAAC GCAGAGT-3', SEQ ID NO: 134) y un cebador específico de Cλ humano anidado (5'-ACACTCTTTC CCTACACGAC GCTCTTCCGA TCTCAGAGGA GGGCGGGAAC AGAGTG-3', SEQ ID NO: 135) o un cebador específico de Cλ1 de ratón anidado (5'-ACACTCTTTC CCTACACGAC GCTCTTCCGA TCTAAGGTGG AAACAGGGTG ACTGATG-3', SEQ ID NO: 136). Los productos de la PCR entre 450-690 pb se aislaron y recogieron mediante Pippin Prep (SAGE Science). Estos fragmentos se amplificaron adicionalmente mediante PCR utilizando los siguientes cebadores: 5'-AATGATACGG CGACCACCGA GATCTACACX XXXXACACT CTTTCCCTAC ACGACGCTCT TCCGATC-3', SEQ ID NO: 137 y 5'-CAAGCAGAAG ACGGCATACG AGATXXXXXG TGACTGGAGT TCAGACGTGT GCTCTTCCGA TCT-3', SEQ ID NO: 138 ("XXXXXX" es una secuencia de índice de 6 pb para permitir la multiplexación de muestras para secuenciación). Los productos de PCR entre 490 pb-710 pb se aislaron y recogieron mediante Pippin Prep, después se cuantificaron por qPCR usando un kit de cuantificación de bibliotecas KAPA (KAPA Biosystems) antes de cargarlo en el secuenciador MiSeq (Illumina) para secuenciar (v3, 600 ciclos).

Para análisis bioinformático, las secuencias de Illumina resultantes se desmultiplexaron y recortaron para mejorar la calidad. Después, se ensamblaron y anotaron las lecturas de pares de extremos solapantes mediante la instalación local de igblast (NCBI, v2.2.25 +). Las lecturas se alinearon con la base de datos de segmentos Vλ y Jλ de la línea germinal humana y de ratón y se clasificaron para obtener el mejor resultado. Una secuencia se marcó como ambigua y se eliminó del análisis cuando se detectaron múltiples mejores resultados con idéntica puntuación. Se desarrolló un conjunto de scripts de perl para analizar resultados y almacenar datos en la base de datos mysql. Los resultados representativos se exponen en las Figuras 15A (cebados con Cλ humano) y 15B (cebados con Cλ de ratón).

En otro experimento, se analizaron linfocitos B esplénicos recolectados de ratones (n = 3) homocigotos para la inserción del vector de direccionamiento 6889 (6889HO/VI HO/Adam6 HO, véase anteriormente) para el uso de segmentos de genes de Igλ humanos mediante análisis del repertorio de anticuerpos por secuenciación de nueva generación (descrito anteriormente). El ARNm aislado de linfocitos B esplénicos se amplificó por 5'RACE usando cebadores para regiones constantes de mCλ de ratón (n = 3) y hCλ humano (n = 3) y se secuenció usando MiSeq. Los resultados representativos se exponen en las Figuras 15C (cebados con Cλ humano) y 15B (cebados con Cλ de ratón).

Los ratones generados utilizando el vector de direccionamiento 6889 (es decir, la electroporación conjunta de dos vectores de direccionamiento y ARNg) demostraron la expresión de los 25 segmentos de genes V $\lambda$  humanos funcionales. Adicionalmente, la expresión de los segmentos de genes V $\lambda$  humanos de los linfocitos B de estos ratones demostró frecuencias similares en los linfocitos B aislados en comparación con los segmentos de genes V $\lambda$  humanos observados en la sangre del cordón humano. Tomado en conjunto, este ejemplo demuestra que los roedores que contienen locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificados por ingeniería como se describe en el presente documento en sus genomas de la línea germinal expresan cadenas ligeras Ig $\lambda$  que contienen secuencias de Ig $\lambda$  humanas en linfocitos B. Adicionalmente, dichas secuencias de Ig $\lambda$  humanas pueden distinguirse fácilmente en cadenas ligeras que contienen un dominio C $\lambda$  de ratón o humano.

### Ejemplo 6. Producción de anticuerpos en roedores modificados por ingeniería

Este ejemplo demuestra la producción de anticuerpos en un roedor que comprende un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno modificado por ingeniería como se describe anteriormente usando un antígeno de interés (p. ej., una proteína de membrana de un solo paso o de múltiples pasos, etc.). Los métodos descritos en este ejemplo, o los métodos de inmunización bien conocidos en la técnica, se puede usar para inmunizar roedores que contienen un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  endógeno modificado por ingeniería como se describe en el presente documento con polipéptidos o fragmentos de los mismos (p. ej., péptidos derivados de un epítipo deseado), o una combinación de polipéptidos o fragmentos de los mismos, según se desee.

Se exponen cohortes de ratones que tienen un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento y un locus de IgH humanizado (descrito anteriormente), o un locus de cadena ligera Ig $\lambda$  modificado por ingeniería como se describe en el presente documento y locus de cadena ligera IgH e IgK humanizados (descritos anteriormente) con un antígeno de interés usando métodos de inmunización conocidos en la técnica. La respuesta inmunitaria del anticuerpo se monitoriza mediante un inmunoensayo ELISA (es decir, título en suero). Cuando se consigue una respuesta inmunitaria deseada, los esplenocitos (y/u otro tejido linfático) se recolectan y fusionan con células de mieloma de ratón para conservar su viabilidad y formar líneas de células de hibridoma inmortales. Las líneas de células de hibridoma se exploran (p. ej., mediante un ensayo ELISA) y se seleccionan para identificar las líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos específicos de antígeno. Los hibridomas pueden caracterizarse adicionalmente por su afinidad de unión relativa e isotipo, según se desee. Utilizando esta técnica y el inmunógeno descrito anteriormente, se obtienen varios anticuerpos quiméricos específicos de antígeno (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de roedor).

El ADN que codifica los dominios variables de cadena pesada y las cadenas ligeras puede aislarse y unirse a isotipos deseables (dominios constantes) de cadena pesada y cadena ligera para la preparación de anticuerpos completamente humanos. Dicha proteína de anticuerpo puede producirse en una célula, tal como una célula CHO. Después, los anticuerpos completamente humanos se caracterizan por su afinidad de unión relativa y/o actividad neutralizante del antígeno de interés.

El ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas puede aislarse directamente de linfocitos específicos de antígeno. Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen un dominio variable humano y un dominio constante de roedor y se caracterizan y seleccionan por características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítipo, etc. Los dominios constantes de roedor se reemplazan con un dominio constante humano deseado para generar anticuerpos completamente humanos. Aunque el dominio constante seleccionado puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de diana residen en el dominio variable. Los anticuerpos específicos de antígeno también se aíslan directamente de linfocitos B antígeno positivos (de ratones inmunizados) sin fusión con células de mieloma, como se describe en, p. ej., la Patente de EE.UU. N.º 7.582.298. Usando este método, se produjeron varios anticuerpos específicos de antígeno completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos).

En un experimento, se inmunizaron ratones 6597het (n = 6) y 6680het (n = 6) mediante la administración en la almohadilla plantar con un dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de polipéptido receptor para determinar la respuesta inmunitaria en ratones modificados por ingeniería.

Brevemente, los ratones se cebaron con 2,35  $\mu$ g de antígeno (polipéptido receptor ECD) más 10  $\mu$ g de adyuvante CpG (Invivogen ODN1826). Los ratones se reforzaron siete veces con 2,35  $\mu$ g de antígeno (polipéptido receptor ECD), 10  $\mu$ g de adyuvante CpG y 25  $\mu$ g de Adju-Phos (Brenntag). Dos días después de la última inyección, se extrajo sangre de cepas de ratones modificados por ingeniería y controles seleccionados. El suero se separó de la sangre usando tubos colectores de sangre capilar Mictrotainer (BD n.º de catálogo 365967) con centrifugación a 9000 rcf durante cinco minutos a 4 °C. Se realizaron ensayos ELISA en suero para determinar IgG total (Figura 16A), IgG específica de antígeno (Figura 16B), títulos de mIgk (Figura 17C) mIg $\lambda$  (Figura 17B) e hIg $\lambda$  (Figura 17A).

Para un ensayo ELISA de IgG total, se recubrieron placas Maxisorp (Nunc) con 1  $\mu$ g/ml de anti-IgG+IgM<sup>+</sup>IgA de ratón de cabra H&L (Abcam) en DPBS (con Ca y Mg) por pocillo y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron cuatro veces en PBS-T (PBS sin Ca o Mg más Tween-20 al 0,1 %) y se bloquearon en PBS-T

con BSA al 1 % durante una hora a temperatura ambiente. El suero se diluyó diez veces (comenzando a 1:100 y terminando a 1:10<sup>9</sup>) en PBS-T con BSA al 0,1 % y se diluyó patrón de IgG de ratón (Sigma) tres veces (comenzando con 1 µg/ml y terminando en 0,05 ng/ml) en PBS-T con BSA al 0,1 %. Se añadieron 100 µl de cada dilución patrón y de muestra a la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, seguido de lavado cuatro veces en PBS-T. Se añadieron 100 µl de anti-IgG de ratón de cabra ads-HRP humano (Southern Biotech) diluido 1:2500 a cada pocillo, y las placas se incubaron durante una hora. Las placas se lavaron cuatro veces en PBS-T y se añadieron 100 µl de reactivo de sustrato TMB (BD Biosciences) a cada pocillo durante diez minutos. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 1N por pocillo y se midió la adsorción a 450 nm. Los datos se analizaron en GraphPad Prism y se ajustaron a una curva de cuatro parámetros.

Para un ELISA específico de antígeno, se recubrieron placas Maxisorp (Nunc) con 1 µg/ml de antígeno en DPBS (con Ca y Mg) por pocillo y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron cuatro veces en PBS-T y se bloquearon en Sea Block (ThermoFisher) diluido 1:2 en PBS-T durante una hora a temperatura ambiente. El suero se diluyó (como anteriormente) en Sea Block diluido 1:5 en PBS-T. Se añadió cada dilución de muestra a cada placa y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después, las placas se lavaron cuatro veces en PBS-T. Se añadieron 100 µl de anti-IgG de ratón de cabra ads-HRP humano (Southern Biotech) diluido 1:2500, anti-mIgκ-HRP de cabra (Southern Biotech) diluido 1:4000, anti-mIgλ-HRP de cabra (Southern Biotech) diluido 1:4000, o anti-hIgλ de ratón de cabra ads-HRP (Southern Biotech) diluido 1:4000 a cada pocillo, y las placas se incubaron durante una hora. Las placas se lavaron cuatro veces en PBS-T y se desarrollaron como se describe anteriormente. Los resultados representativos se exponen en las Figuras 16 y 17.

Tomado en conjunto, este ejemplo demuestra específicamente que los roedores modificados por ingeniería para que contengan locus de cadena ligera Igλ como se describe en el presente documento generan fuertes respuestas de anticuerpos a la inmunización con un antígeno de interés. Adicionalmente, dichos roedores modificados por ingeniería demuestran niveles de IgG totales y específica de antígeno comparables a los controles de tipo silvestre, lo que confirma la capacidad de una respuesta inmunitaria fuerte en estos animales modificados por ingeniería. De hecho, los títulos de hIgλ fueron más fuertes que los títulos de mIgλ tras la inmunización (Figura 17A y 17B). Por lo tanto, los roedores modificados por ingeniería como se describe en el presente documento proporcionan una mejora sistema *in vivo* mejorado de generación de anticuerpos para el desarrollo de agentes terapéuticos basados en anticuerpos humanos, en particular, agentes terapéuticos basados en anticuerpos humanos que utilizan secuencias de cadena ligera Igλ humana.

## EQUIVALENTES

Los expertos en la materia apreciarán que diversas alteraciones, modificaciones y mejoras de la presente divulgación se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la materia.

El uso de términos ordinales tales como "primero/a", "segundo/a", "tercero/a", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de una reivindicación no denota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de un elemento de una reivindicación respecto de otro, o el orden temporal para llevar a cabo los actos de un método, sino que se utilizan simplemente como marcadores para distinguir un elemento de una reivindicación que tiene un determinado nombre de otro elemento que tiene el mismo nombre (salvo por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de la reivindicación.

Los artículos "un" y "una" en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse que incluyen los referentes en plural. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean en o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea o es relevante de otro modo para un producto o proceso dado. La invención también incluye realizaciones en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado. Asimismo, ha de comprenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introduce en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, en su caso, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto en la materia que surgiría una contradicción o incoherencia. Cuando los elementos se presentan como listas, (p. ej., en el grupo Markush o en un formato similar) debe entenderse que también se divulga cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento o elementos pueden eliminarse del grupo. Debería comprenderse que, en general, cuando la invención o los aspectos de la invención, se refieren a que comprende elementos, características, particulares, etc., determinadas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, dichos elementos, características, etc. Por motivos de simplicidad, estas realizaciones no se han establecido de forma específica en todos los casos en el presente documento con tantas palabras. También debe entenderse que cualquier realización o aspecto de la invención puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se menciona en la memoria descriptiva.

Los expertos en la materia apreciarán los estándares típicos de desviación o error atribuibles a los valores obtenidos en ensayos u otros procesos como se describe en el presente documento.

**REIVINDICACIONES**

1. Un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno que comprende:

- 5 (a) uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos;  
 (b) uno o más segmentos de genes  $J\lambda$  humanos;  
 (c) uno o más segmentos de genes  $C\lambda$  humanos;  
 (d) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina ( $E\lambda$ ) de roedor;  
 10 (e) tres  $E\lambda$  humanos; y  
 (f) un segmento de gen  $C\lambda$  de roedor,

en donde (a) y (b) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos de genes de región constante de (c) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno, y en donde (a) y (b) también son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen  $C\lambda$  de roedor de (f) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno.

2. El roedor de la reivindicación 1, en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende dos  $E\lambda$  de roedor, en donde, opcionalmente, los dos  $E\lambda$  de roedor son un  $E\lambda$  de ratón y un  $E\lambda$ 3-1 de ratón.

3. El roedor de la reivindicación 1 o 2, en donde el genoma de la línea germinal comprende además:

- 25 (i) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, en donde el uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, el uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y el uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de cadena pesada humana reordenados que se expresan junto con un segmento de gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor como cadenas pesadas de proteínas de unión a antígeno; o  
 30 (ii) un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno que comprende una inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos, en donde el uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, el uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y el uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos son capaces de reordenarse para formar genes de  
 35 región variable de cadena pesada humana reordenados que se expresan junto con un segmento de gen de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor como cadenas pesadas de proteínas de unión a antígeno, y un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno que comprende una inserción de uno o más segmentos de genes  $V_\kappa$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_\kappa$  humanos, en donde el uno o más segmentos de genes  $V_\kappa$  humanos y el uno o más segmentos de genes  $J_\kappa$  humanos son capaces de reordenarse  
 40 para formar genes de región variable  $\kappa$  humana reordenados que se expresan junto con un segmento de gen  $C_\kappa$  de inmunoglobulina de roedor como cadenas ligeras  $\kappa$  de proteínas de unión a antígeno.

4. El roedor de la reivindicación 3, en donde:

- 45 (a) la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_H$  humanos, uno o más segmentos de genes  $D_H$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_H$  humanos reemplaza los segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$  de roedor, en donde opcionalmente la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre segmentos de genes  $V_H$ ,  $D_H$ , y  $J_H$  humanos y combinaciones de los mismos; y/o  
 50 (b) la inserción de uno o más segmentos de genes  $V_\kappa$  humanos y uno o más segmentos de genes  $J_\kappa$  humanos reemplaza los segmentos de genes  $V_\kappa$  y los segmentos de genes  $J_\kappa$  de roedor, en donde opcionalmente la inserción incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los segmentos de genes  $V_\kappa$  y los segmentos de genes  $J_\kappa$  humanos y combinaciones de los mismos.

5. El roedor de la reivindicación 3 o 4, en donde:

- 55 (a) la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor es una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor endógena; y/o  
 (b) la región  $C_\kappa$  de inmunoglobulina de roedor es una región  $C_\kappa$  de inmunoglobulina de roedor endógena.

6. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno comprende una delección de segmentos de genes  $V\lambda$  y segmentos de genes  $J\lambda$  endógenos, en donde la delección de los segmentos de genes  $V\lambda$  y los segmentos de genes  $J\lambda$  endógenos es en su totalidad o en parte.

7. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el segmento de gen  $C\lambda$  de roedor de (f) es un segmento de gen  $C\lambda$  de ratón.

8. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde:

- (a) el locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno comprende una inserción de la duplicación proximal de  $V\kappa$ , en su totalidad o en parte, de un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina humana; y/o
- (b) el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno carece de un gen  $Adam6$  de roedor endógeno, en donde opcionalmente el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno comprende además una inserción de una o más secuencias de nucleótidos que codifican uno o más polipéptidos  $ADAM6$  de roedor;
- (c) el roedor es homocigoto en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno; y/o
- (d) el roedor es homocigoto en el locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno.

9. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde:

- (a) el roedor es homocigoto en el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno; y/o
- (b) el roedor es una rata o un ratón.

10. Una célula de roedor aislada del roedor de acuerdo con la reivindicación 1.

11. La célula de roedor aislada de la reivindicación 10, en donde la célula de roedor es una célula madre embrionaria de roedor.

12. Un método para producir un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería, comprendiendo el método:

(a) introducir un fragmento de ADN en una célula madre embrionaria de roedor, comprendiendo el fragmento de ADN una secuencia de nucleótidos que incluye:

- (i) uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos;
- (ii) uno o más segmentos de genes  $J\lambda$  humanos;
- (iii) uno o más segmentos de genes  $C\lambda$  humanos;
- (iv) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina ( $E\lambda$ ) de roedor;
- (v) tres  $E\lambda$  humanos; y
- (vi) un segmento de gen  $C\lambda$  de roedor;

en donde (i) y (ii) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos de genes de región constante de (iii) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno, y en donde (i) y (ii) también son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen  $C\lambda$  de roedor de (vi) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno;

- (b) obtener la célula madre embrionaria de roedor generada en (a); y
- (c) crear el roedor utilizando la célula madre embrionaria de roedor de (b).

13. Un método para producir un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería, comprendiendo el método:

modificar el genoma de la línea germinal del roedor para que comprenda el locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno modificado por ingeniería que incluye una inserción de:

- (i) uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos;
- (ii) uno o más segmentos de genes  $J\lambda$  humanos;
- (iii) uno o más segmentos de genes  $C\lambda$  humanos;
- (iv) uno o más potenciadores de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina ( $E\lambda$ ) de roedor;
- (v) tres  $E\lambda$  humanos; y
- (vi) un segmento de gen  $C\lambda$  de roedor,

en donde (i) y (ii) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con segmentos de genes de región constante de (iii) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno y en donde (i) y (ii) también son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de  $\lambda$  humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen de región constante  $\lambda$  de roedor de (vi) como cadenas ligeras  $\lambda$  de proteínas de unión a antígeno.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde

- (a) el uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos incluyen  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 1-40$  y/o  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$  humanos, en donde, opcionalmente, el uno o más segmentos de genes  $V\lambda$  humanos incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre  $V\lambda 5-52$  a  $V\lambda 1-40$  y/o  $V\lambda 3-27$  a  $V\lambda 3-1$  humanos;
- (b) el uno o más segmentos de genes  $J\lambda$  humanos y el uno o más segmentos de genes  $C\lambda$  humanos incluyen los

- 5 pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6 y un segmento del gen Jλ7 humano, en donde, opcionalmente los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3 y Jλ6-Cλ6 incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos y el segmento del gen Jλ7 humano incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba (o 5') de Jλ7 humano;
- (c) el segmento de gen Cλ de roedor es un segmento de gen Cλ de ratón; y/o
- (d) el locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno comprende dos Eλ de roedor, en donde, opcionalmente, los dos Eλ de roedor son un Eλ de ratón y un Eλ3-1 de ratón.
- 10 15. Un método para producir un anticuerpo en un roedor, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) inmunizar al roedor de la reivindicación 1 con un antígeno de interés;
- (b) mantener al roedor en condiciones suficientes para que el roedor produzca una respuesta inmunitaria al antígeno de interés; y
- 15 (c) recuperar el anticuerpo del roedor, o una célula del roedor, que se une al antígeno de interés.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde el roedor es una rata o un ratón.
17. Un roedor cuyo genoma de la línea germinal comprende un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno que comprende:
- 20 (i) los segmentos de genes Vλ humanos Vλ5-52 a Vλ1-40 y Vλ3-27 a Vλ3-1;
- (ii) los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3 y Jλ6-Cλ6;
- (iii) un segmento del gen Jλ humano Jλ7;
- 25 (iv) uno o más potenciadores de cadena ligera λ de inmunoglobulina (Eλ) de roedor;
- (v) tres Eλ humanos; y
- (vi) un segmento de gen Cλ de roedor,
- 30 en donde los segmentos de genes Vλ humanos de (i) y los segmentos de genes Jλ humanos de (ii) y (iii) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de λ humana reordenados que se expresan junto con los segmentos de genes Cλ humanos de (ii) como cadenas ligeras λ de proteínas de unión a antígeno y los segmentos de genes Vλ humanos de (i) y los segmentos de genes Jλ humanos de (ii) y (iii) son capaces de reordenarse para formar genes de región variable de λ humana reordenados que se expresan junto con el segmento de gen Cλ de roedor de (vi) como cadenas ligeras λ de proteínas de unión a antígeno, y en donde el locus de cadena ligera λ de
- 35 inmunoglobulina endógeno carece de un Eλ2-4 de inmunoglobulina de roedor endógeno, en donde los segmentos de genes Vλ humanos Vλ5-52 a Vλ1-40 y Vλ3-27 a Vλ3-1 incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los segmentos de genes Vλ humanos, los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3 y Jλ6-Cλ6 incluyen ADN humano no codificante que aparece de forma natural entre los pares de segmentos de genes Jλ-Cλ humanos, y el ADN humano no codificante cadena arriba del segmento de gen Jλ humano
- 40 Jλ7 incluye ADN humano no codificante que aparece de forma natural cadena arriba del Jλ7 humano, y en donde dicho roedor es homocigoto en el locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina endógeno.
18. El roedor de la reivindicación 17, en donde el roedor es una rata o un ratón.

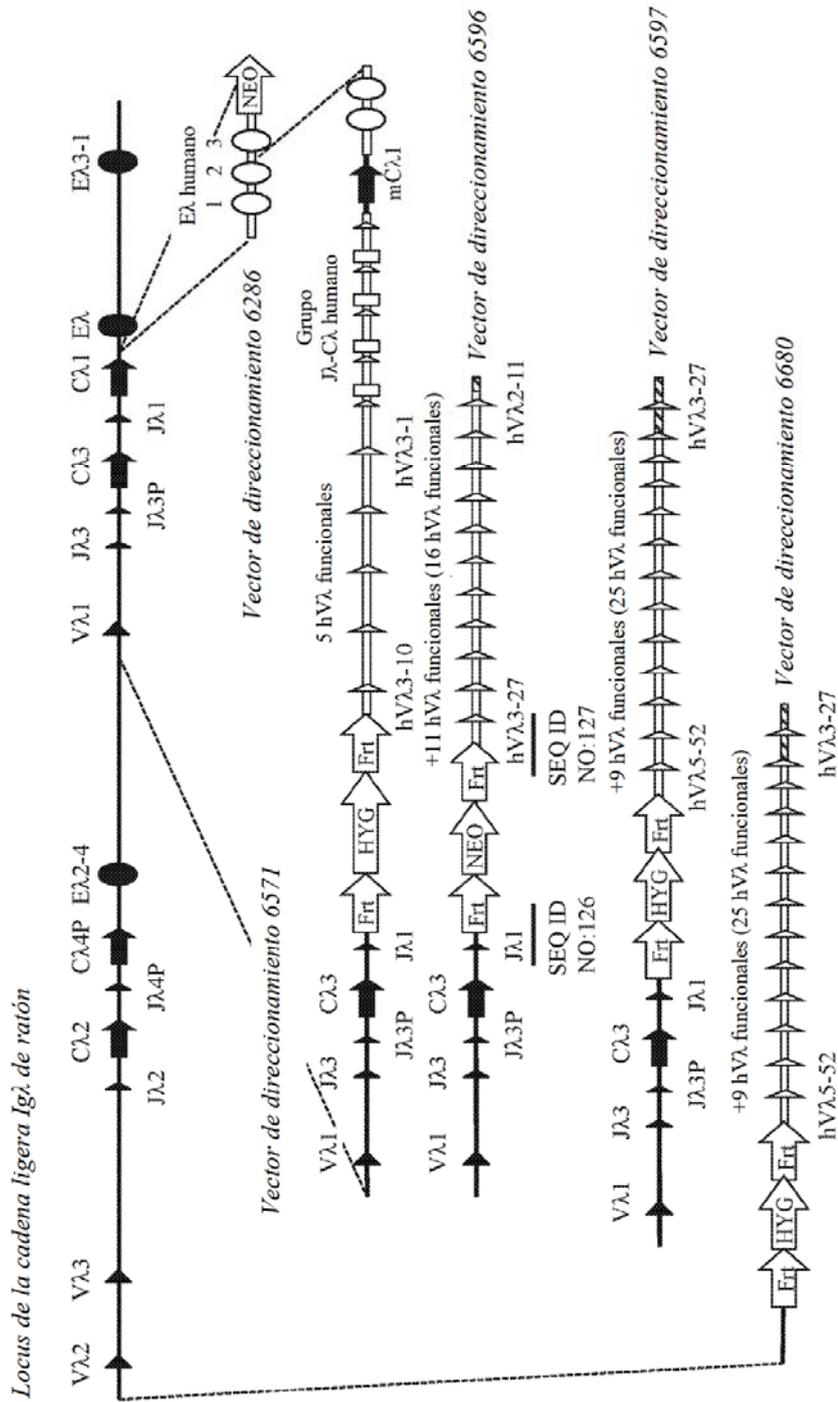


Figura 1

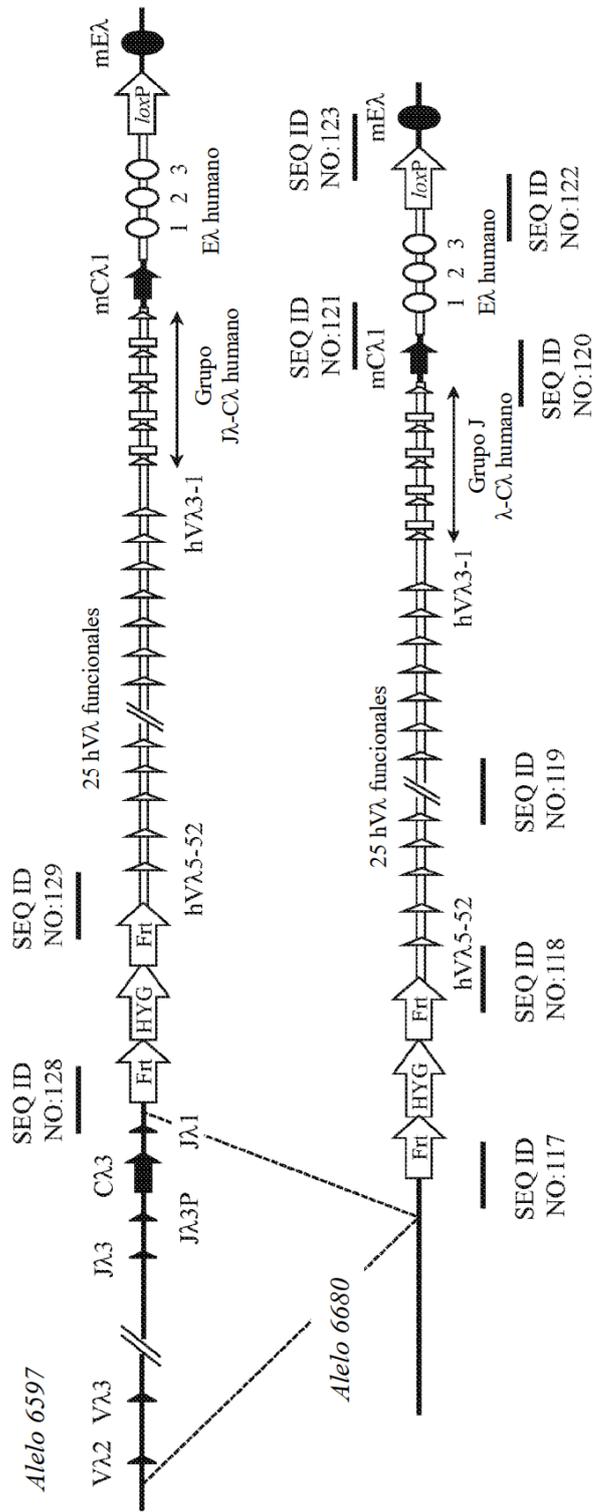


Figura 2





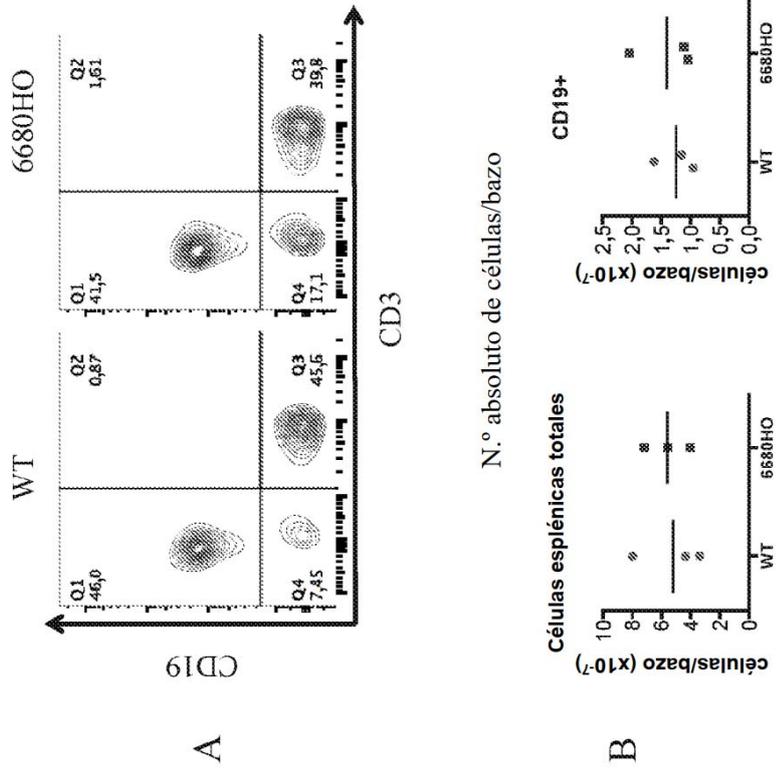


Figura 5

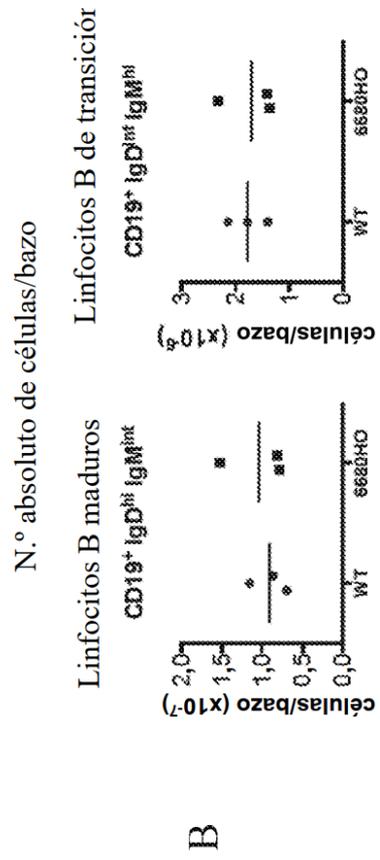
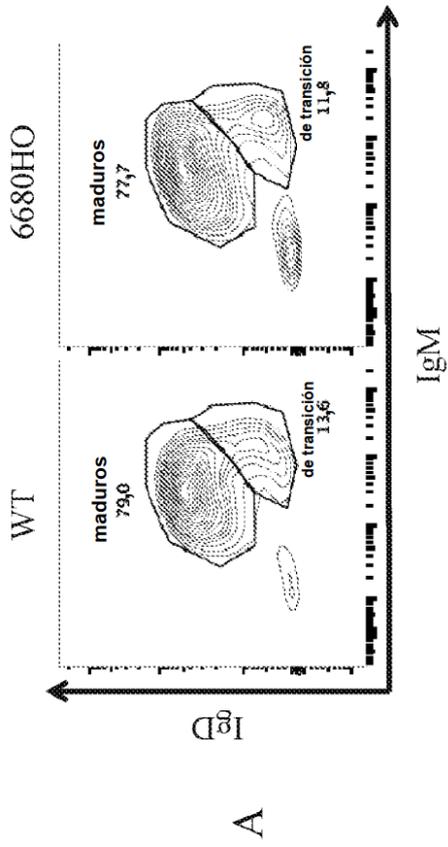


Figura 6

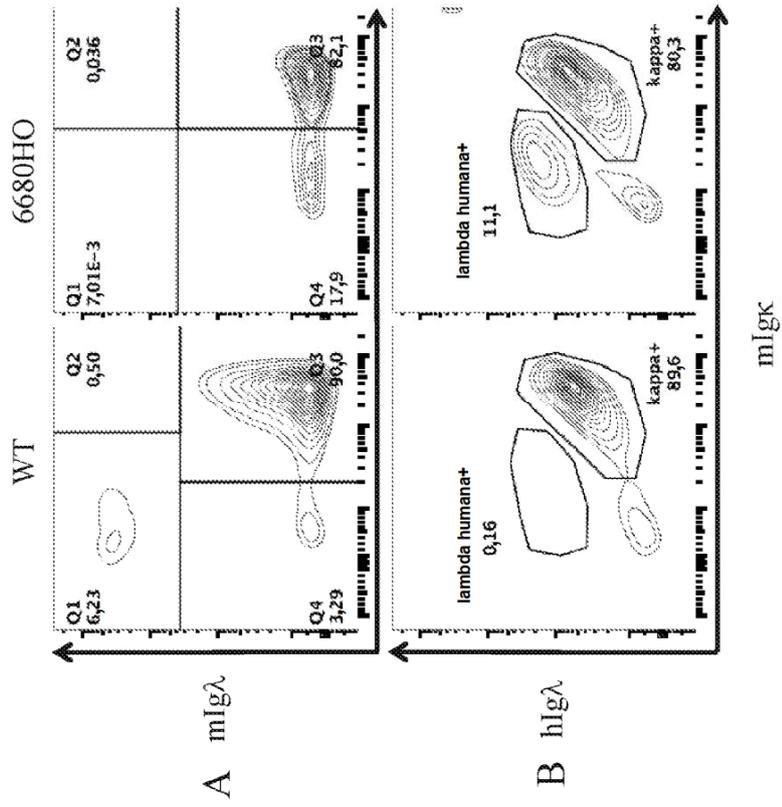


Figura 7

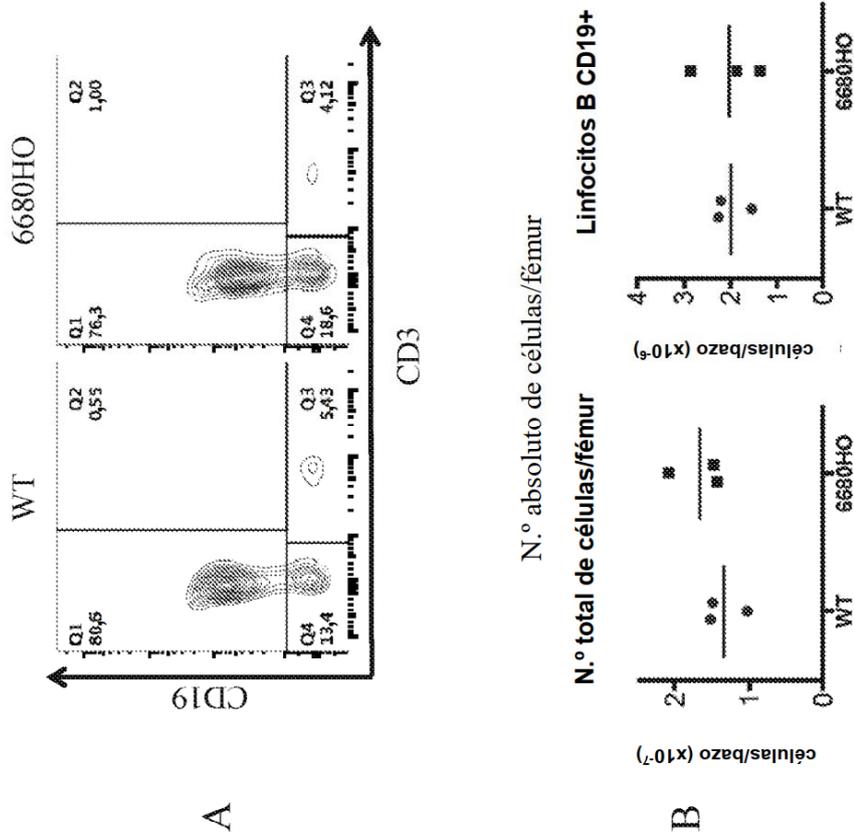


Figura 8

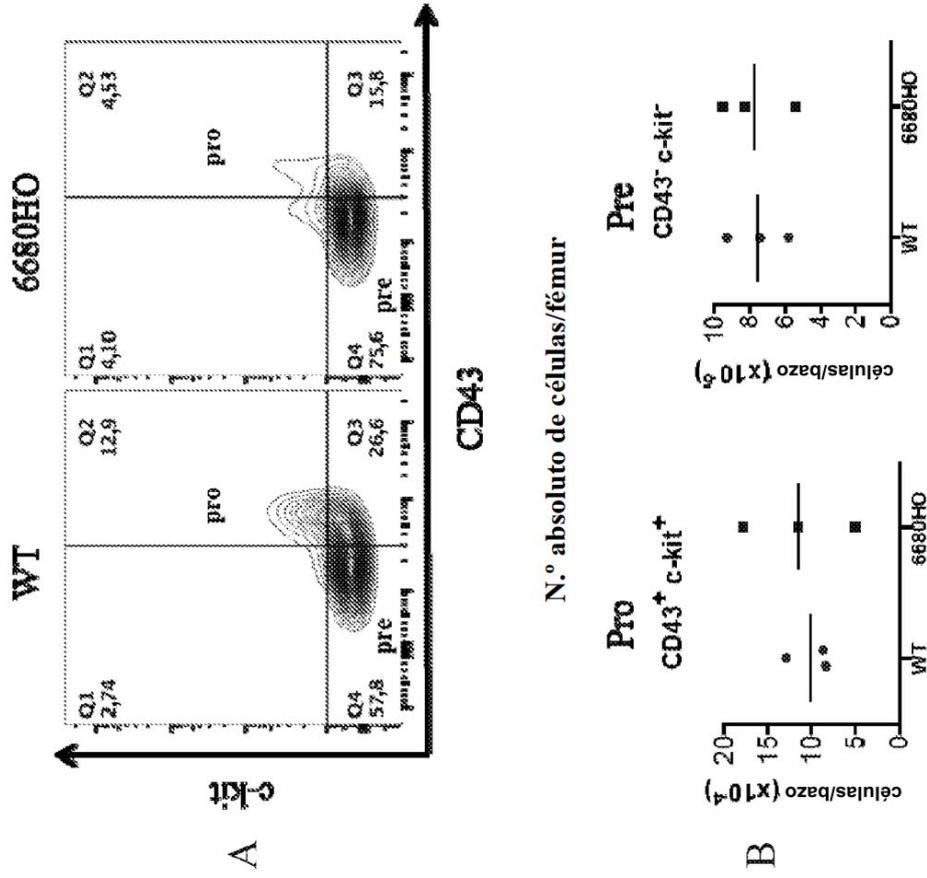
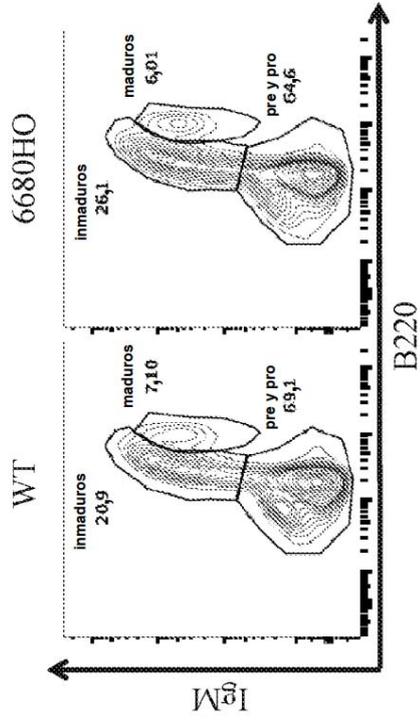
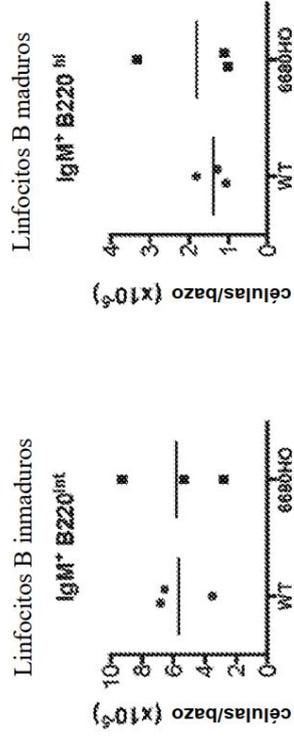


Figura 9



A

N.º absoluto de células/fémur



B

Figura 10

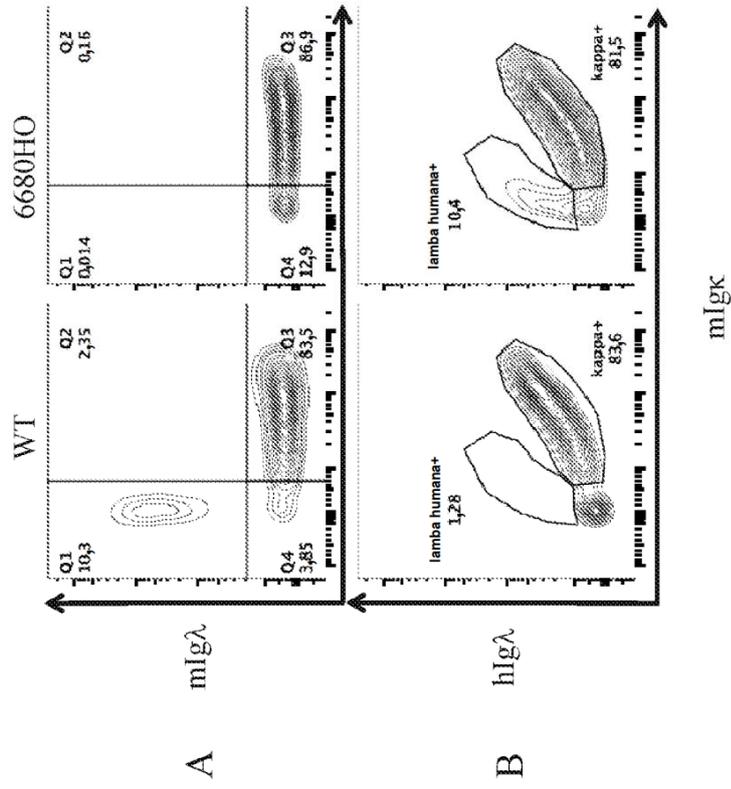


Figura 11

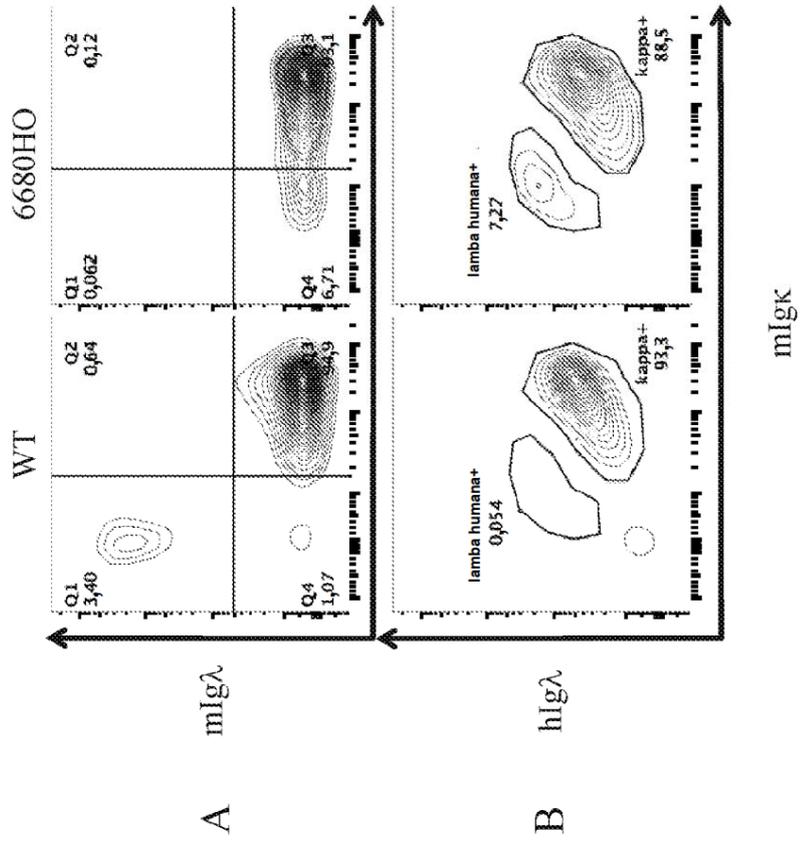


Figura 12

<b>bazo</b>	<b>6571HET</b>	<b>6571HO</b>	<b>6597HET</b>	<b>6680HET</b>	<b>6680HO</b>	<b>6680HO VI HO Adam6 HO</b>	<b>6889HET</b>	<b>6889HO VI HO Adam6 HO</b>
% de κ C	92 ± 0,4	81 ± 1,1	84 ± 0,4	87 ± 0,5	82 ± 2,2	67 ± 7,6	87 ± 0,7	59 ± 2,1
% de λC hum	2,2 ± 0	7,1 ± 0,1	12,4 ± 0,5	9,9 ± 0,5	10 ± 1,1	28 ± 8,2	6,6 ± 0,3	37 ± 2,2

<b>BM inmadura</b>	<b>6571HET</b>	<b>6571HO</b>	<b>6597HET</b>	<b>6680HET</b>	<b>6680HO</b>	<b>6680HO VI HO Adam6 HO</b>	<b>6889HET</b>	<b>6889HO VI HO Adam6 HO</b>
% de κ C	88 ± 0,2	84 ± 1,6	86 ± 0,4	83 ± 1,3	77 ± 2,4	54 ± 13	80 ± 0,7	52 ± 3,2
% de λC hum	3,3 ± 0,0	3,2 ± 0,3	7,2 ± 0,3	9,7 ± 1,2	12 ± 1,0	33 ± 8,6	7,3 ± 0,6	43 ± 2,8

<b>BM madura</b>	<b>6571HET</b>	<b>6571HO</b>	<b>6597HET</b>	<b>6680HET</b>	<b>6680HO</b>	<b>6680HO VI HO Adam6 HO</b>	<b>6889HET</b>	<b>6889HO VI HO Adam6 HO</b>
% de κ C	90 ± 0,8	92 ± 0,7	89 ± 0,5	92 ± 1,3	88 ± 1,2	76 ± 6,3	89 ± 0,5	66 ± 1,7
% de λC hum	2,7 ± 0,0	5,6 ± 0,7	8,9 ± 0,5	7,6 ± 0,9	6,8 ± 0,8	16 ± 5,4	5,2 ± 0,4	31 ± 1,6

Figura 13

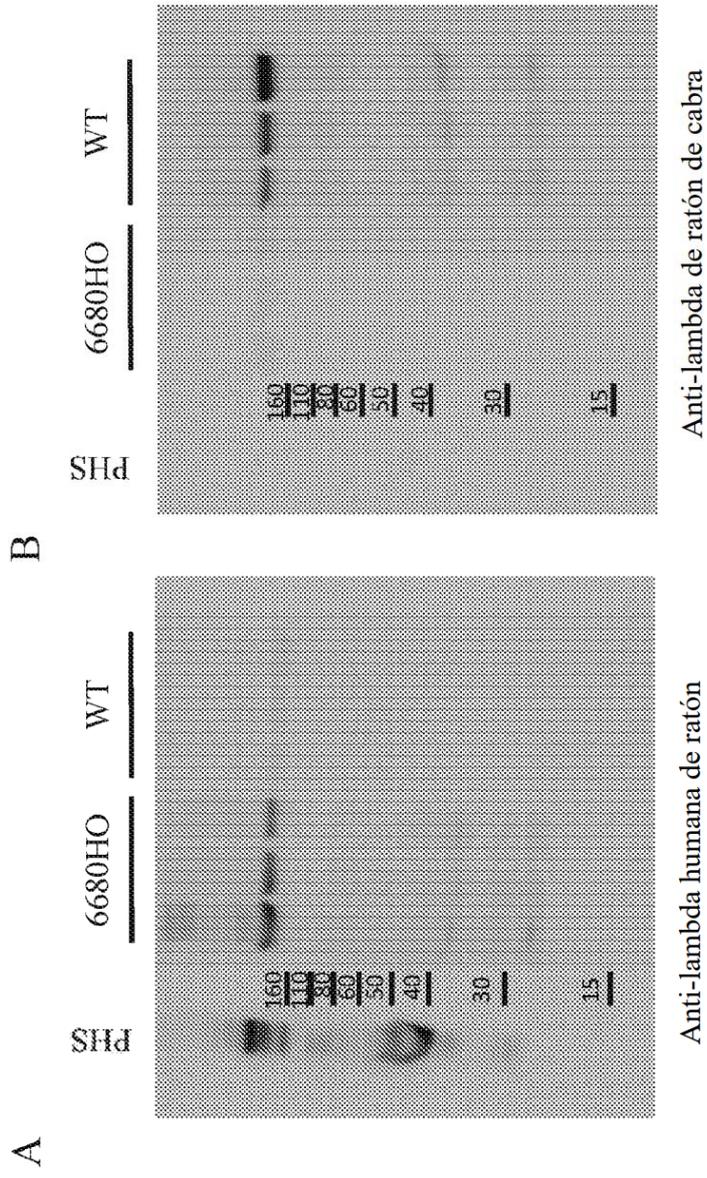


Figura 14

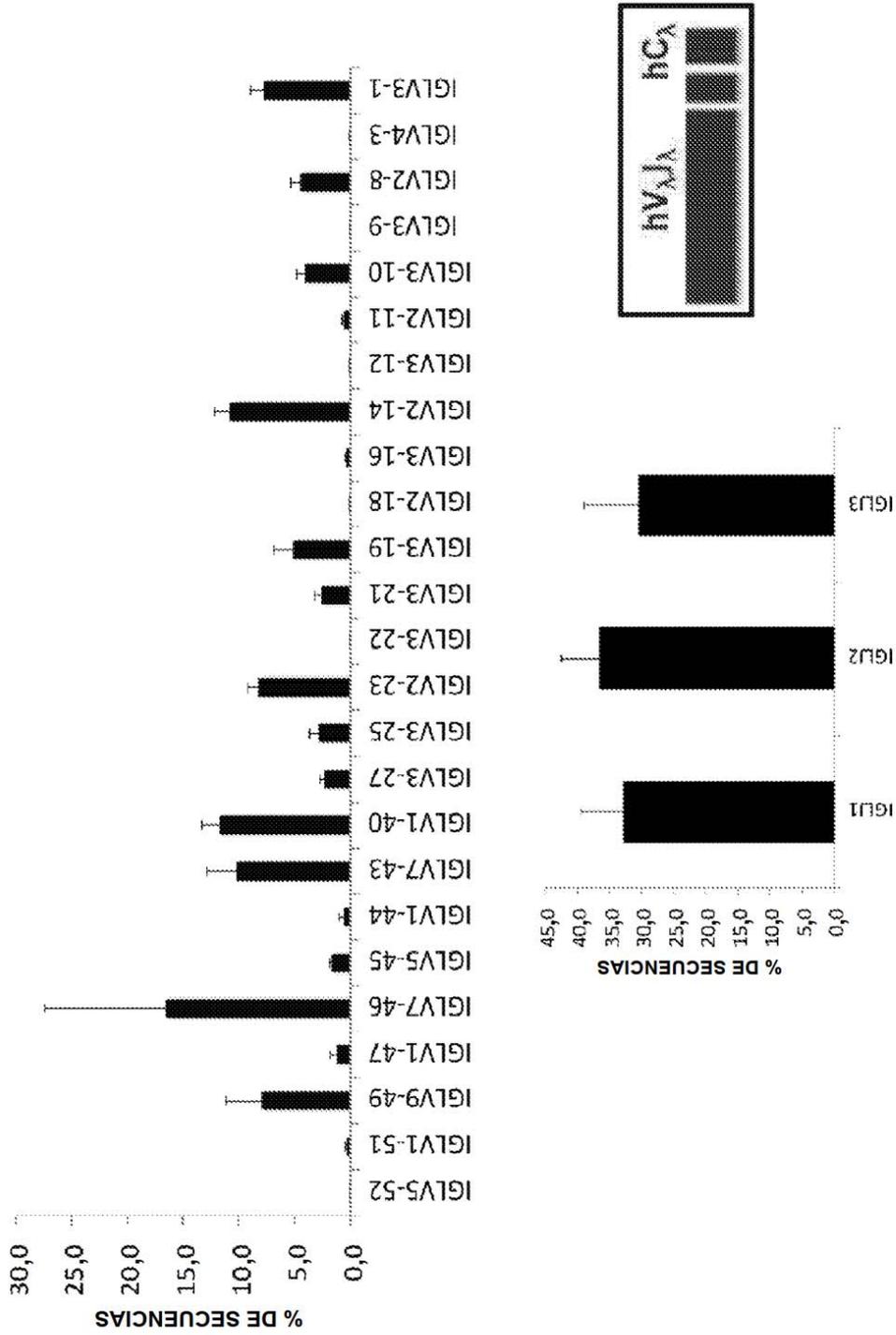


Figura 15 A

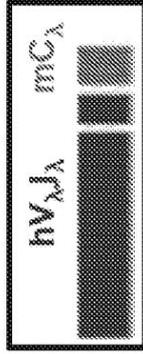


Figura 15 B

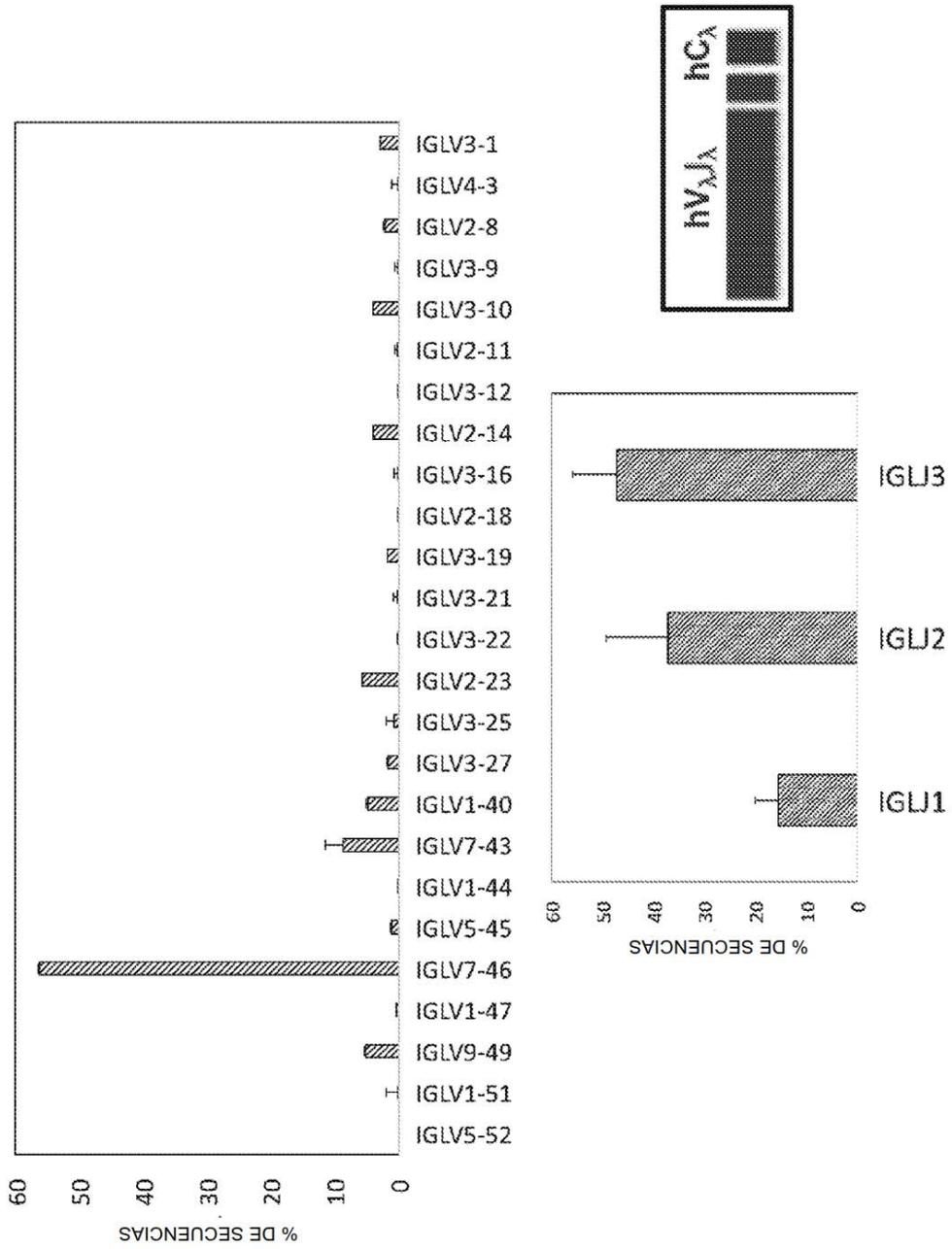


Figura 15 C

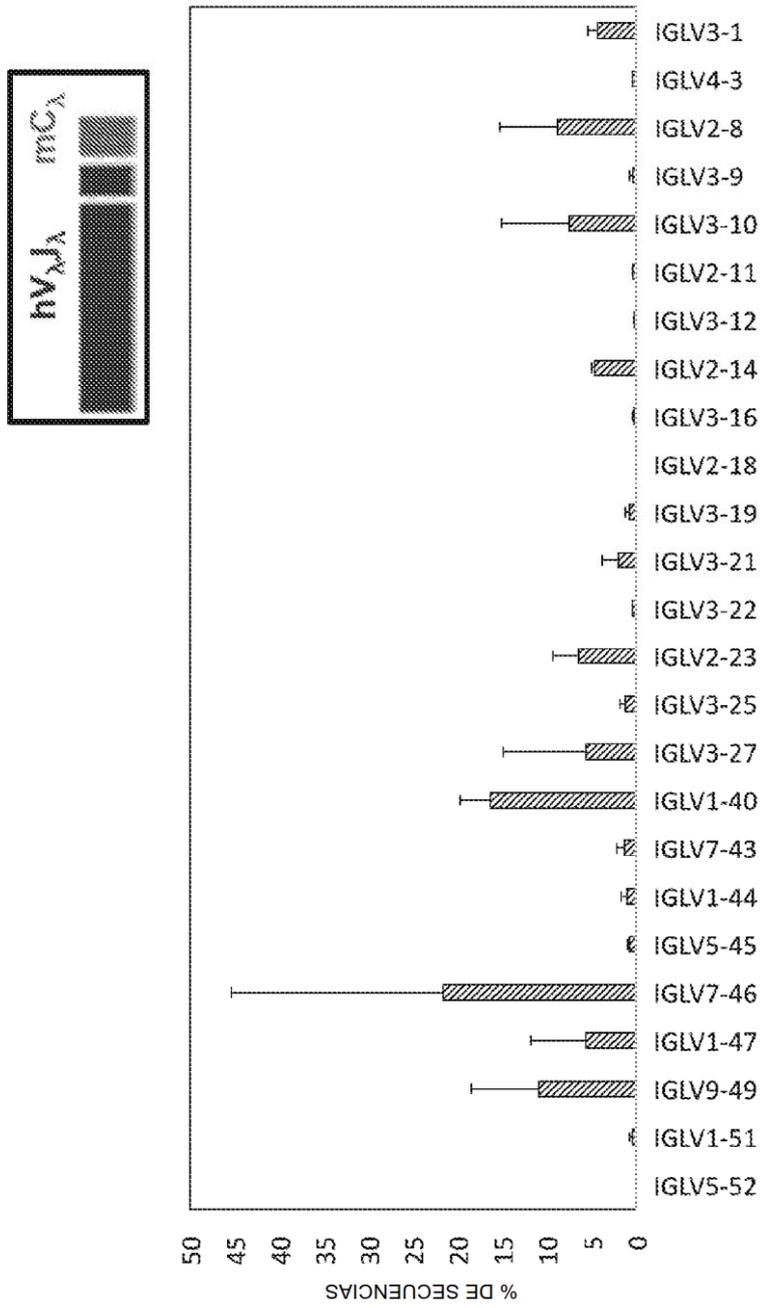


Figura 15 D

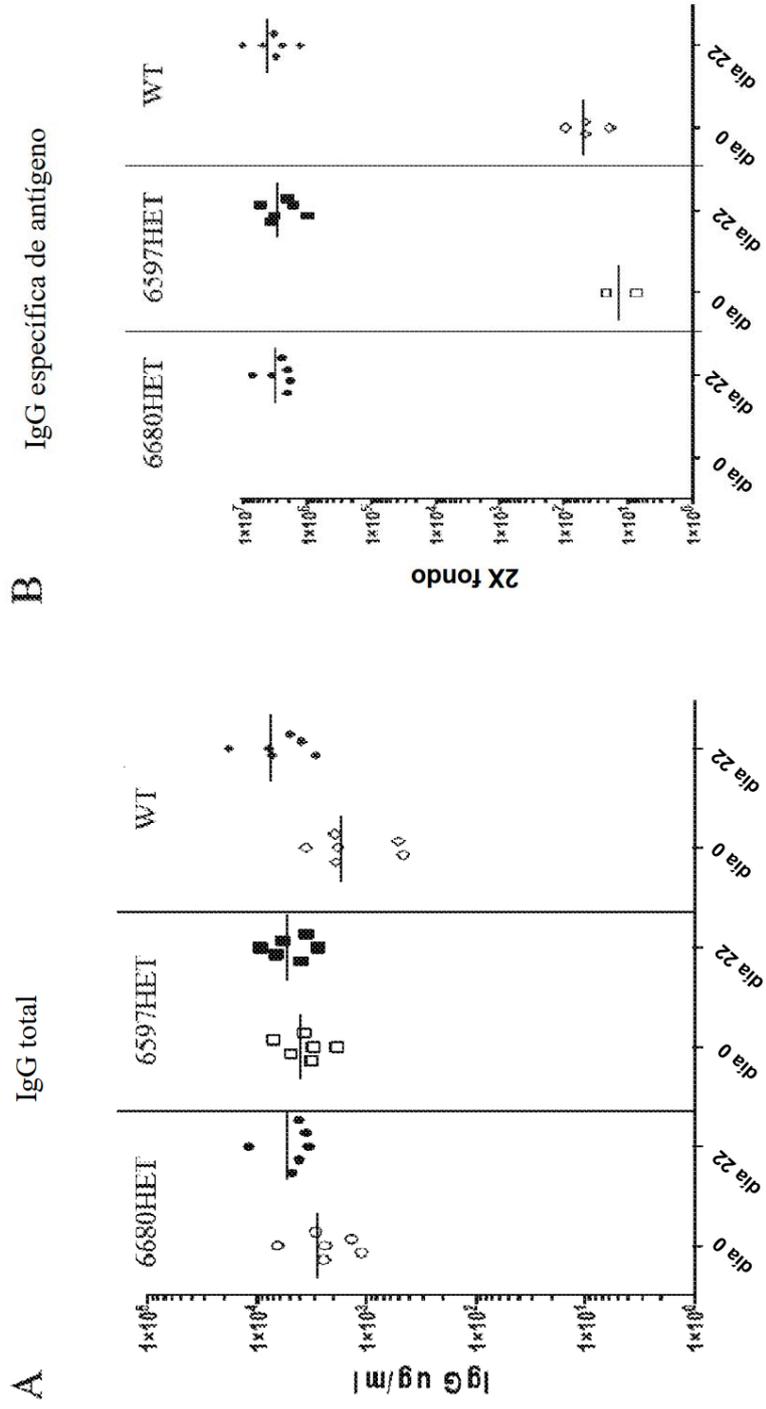


Figura 16

Título de hI $\gamma$  en IgG  
específica de antígeno

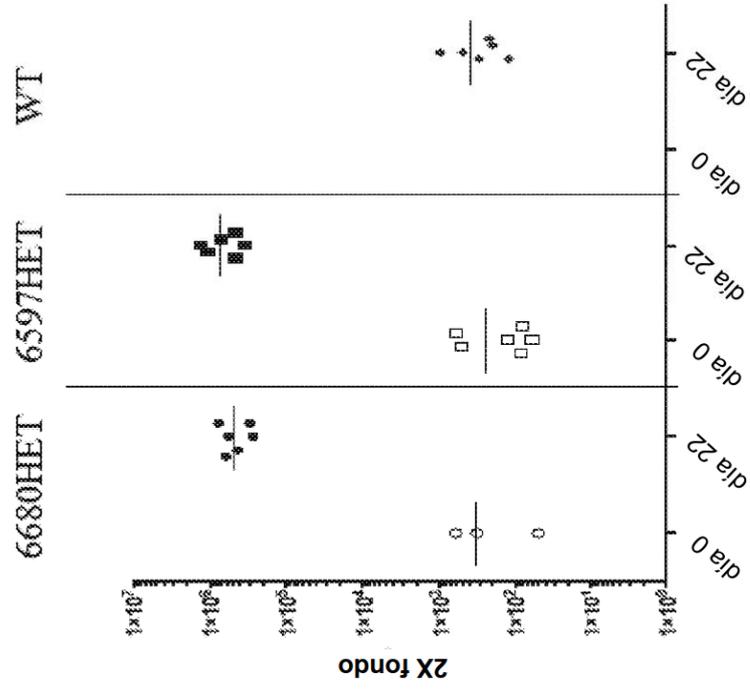


Figura 17 A

Título de mIgλ en IgG  
específica de antígeno

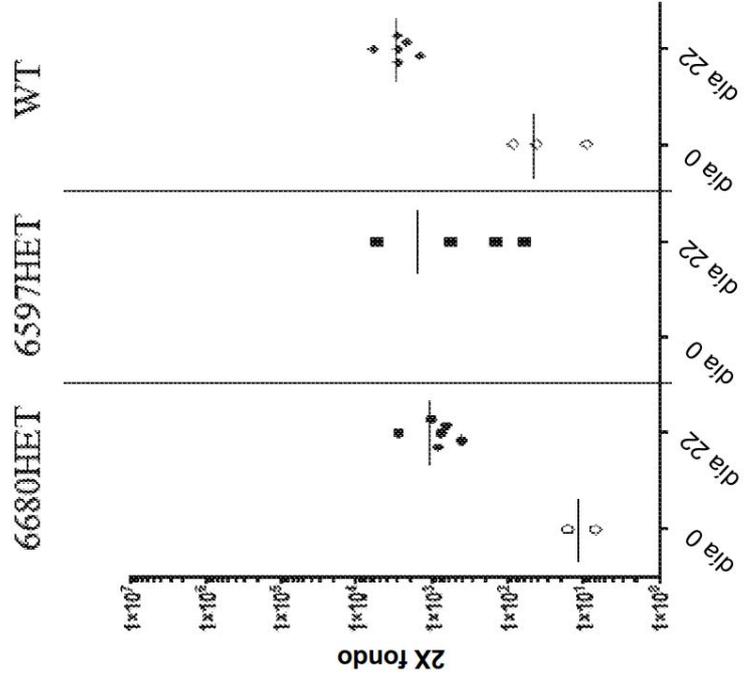


Figura 17 B

Título de mIgk en IgG  
específica de antígeno

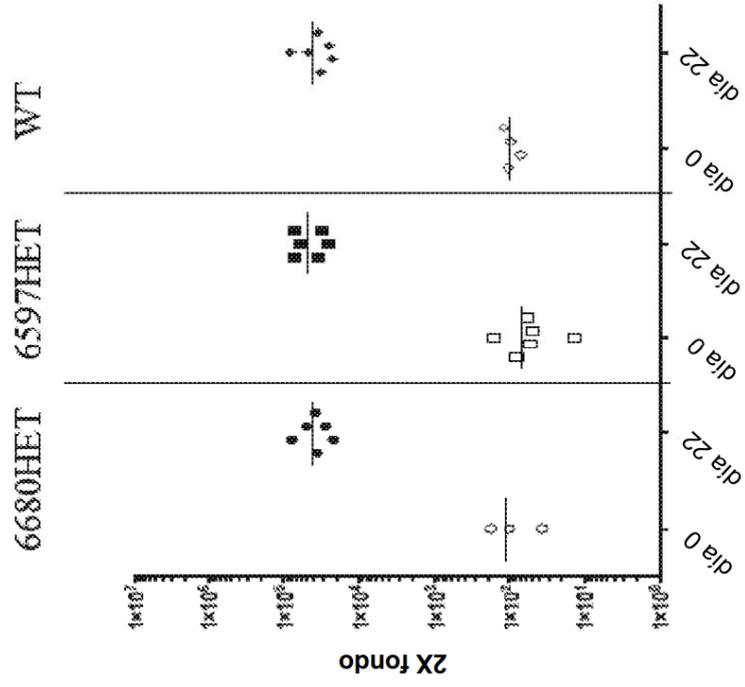


Figura 17 C

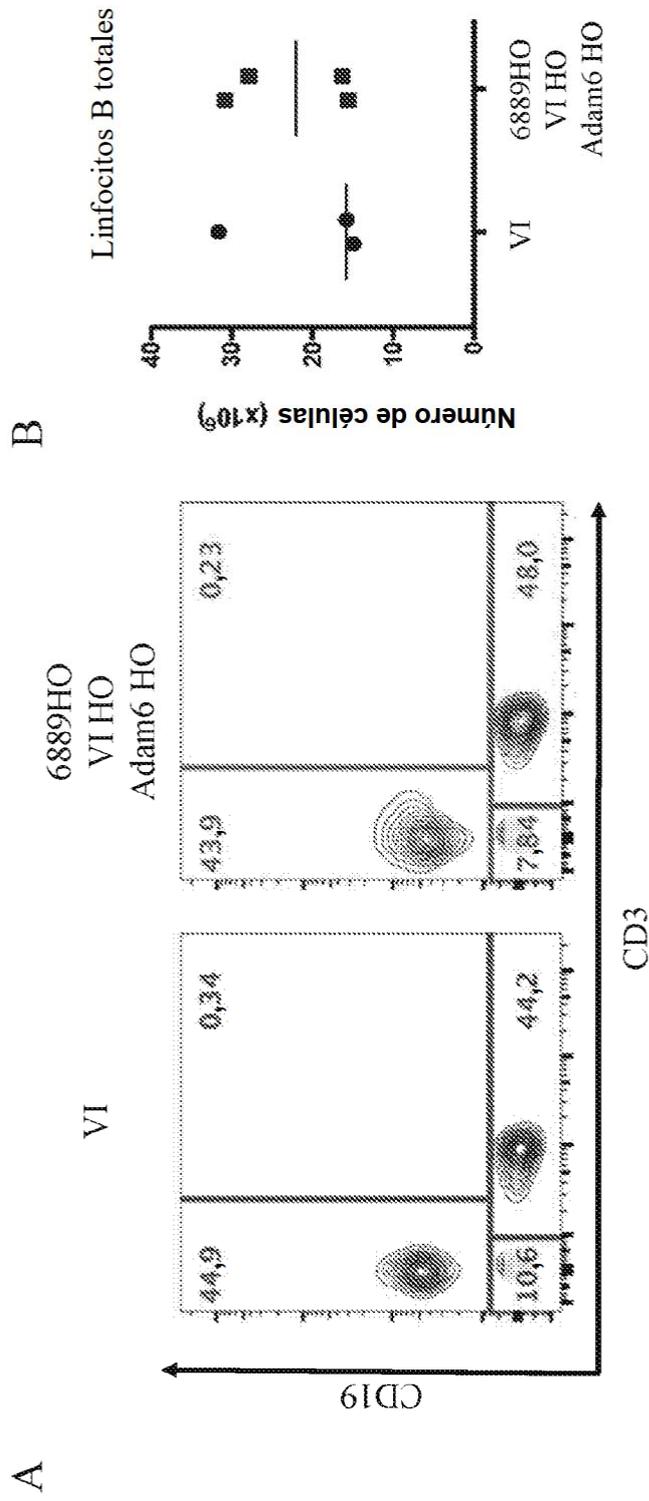


Figura 18

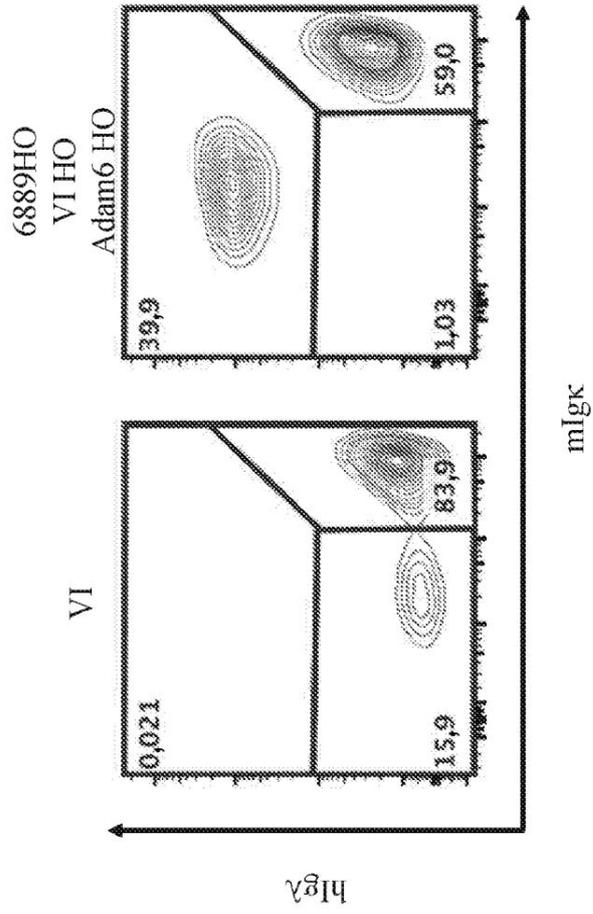


Figura 19

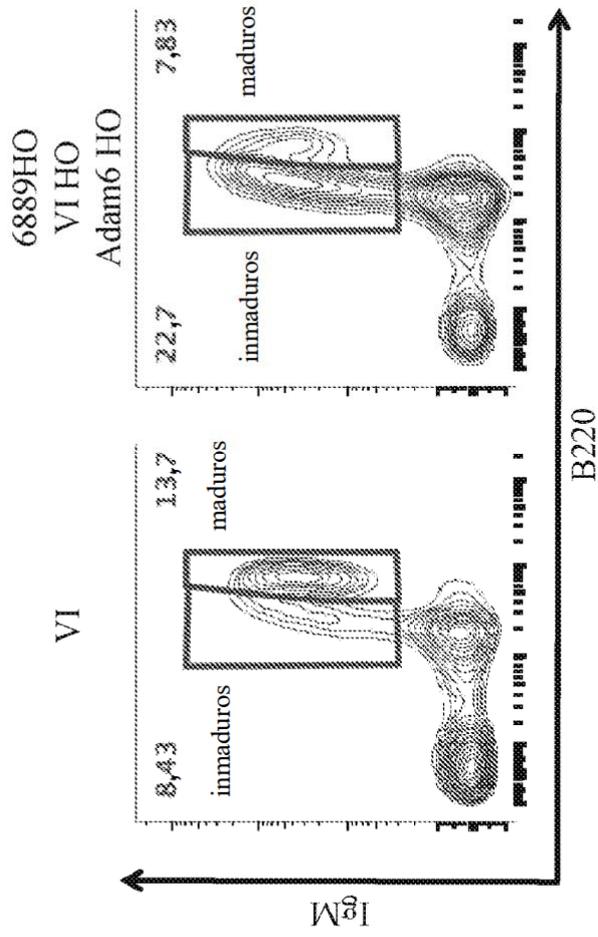


Figura 20

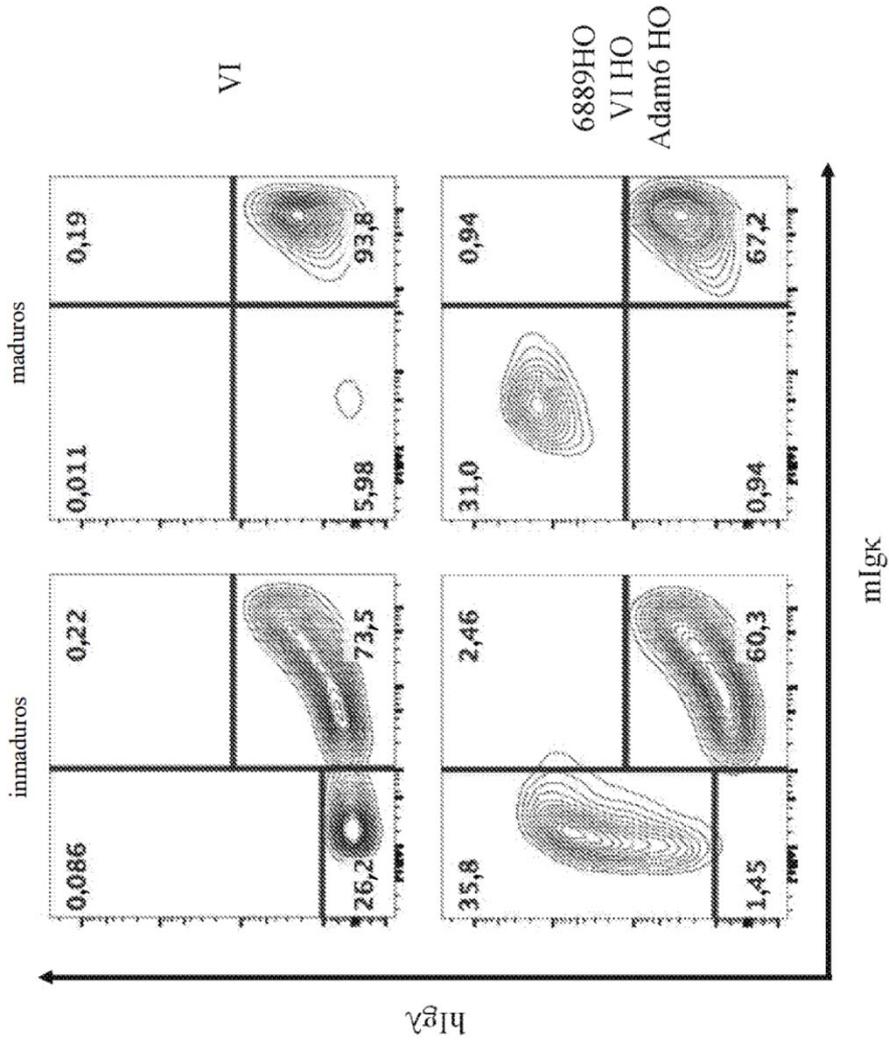


Figura 21