



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 640**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05804338 .1**
96 Fecha de presentación : **23.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1814386**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **Procedimientos de estudio de la tolerancia en animales transgénicos MHC-II.**

30 Prioridad: **23.11.2004 GB 0425713**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2011

73 Titular/es: **ANTITOPE LIMITED**
Babraham Institute Babraham
Cambridge, GB

72 Inventor/es: **Baker, Matthew**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 640 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

Procedimientos de estudio de la tolerancia en animales transgénicos MHC-II

5 La presente invención se refiere a sistemas *in vivo* para probar la inmunogenicidad de variantes de proteínas. En particular, la invención se refiere a procedimientos que usan ratones transgénicos para moléculas MHC de clase II humano en los que tales ratones se hacen tolerantes a una proteína específica y luego se prueban con variantes de la proteína específica para la inducción de inmunogenicidad. Además, la presente invención se refiere a sistemas *in vivo* para seleccionar proteínas de una biblioteca de variantes de proteínas para inmunogenicidad reducida mediante los cuales ratones transgénicos MHC tolerizados se inyectan con bibliotecas de líneas celulares o partículas asociadas a diferentes proteínas variante seleccionándose *in vivo* líneas celulares específicas o partículas asociadas a proteínas variante con menor inmunogenicidad que otras proteínas en la biblioteca.

15 Los procedimientos actuales para probar proteínas farmacéuticas candidatas para posible inmunogenicidad en seres humanos están principalmente limitados porque las especies no humanas tienen moléculas de MHC (antígeno de histocompatibilidad mayor) diferentes de las de los seres humanos y, por tanto, las respuestas inmunitarias a proteínas inyectadas en animales de prueba no reflejan futuras respuestas inmunitarias a las mismas proteínas en seres humanos. Por tanto, es importante probar proteínas para inmunogenicidad usando tanto células humanas como células con MHC humano. Un enfoque particularmente valioso es probar proteínas en ensayos de proliferación de linfocitos T usando muestras de sangre humana. Sin embargo, este enfoque mide respuestas de linfocitos T a la proteína de prueba *in vitro* y hasta ahora se han demostrado procedimientos de inmunogenicidad no *in vitro* que producen la producción de anticuerpos como se producen *in vivo*. Enfoques alternativos podrían usar ratones tanto reconstituidos con linfocitos T y B humanos como ratones transgénicos en los que el MHC de ratón residente y, en algunos casos, las moléculas receptoras de linfocitos T, han sido sustituidos por homólogos humanos. Sin embargo, estos enfoques pueden no producir una predicción exacta de la inmunogenicidad en seres humanos debido a que no tienen en cuenta la tolerancia, especialmente la tolerancia en el sistema inmunitario humano a proteínas humanas normales. Por ejemplo, se esperaría que un ratón transgénico para MHC organizara una respuesta inmunitaria contra una proteína humana inyectada debido a que el ratón no sería tolerante a una proteína humana tal. Por tanto, existe la necesidad de procedimientos mejorados para facilitar la prueba de inmunogenicidad *in vivo* de proteínas y variantes de proteínas que tienen en cuenta la tolerancia normal a proteínas en la especie.

30 Wierda y col., *Toxicology*, 158 (2001), pág. 71-76, desvelan que ratones transgénicos tolerantes a proteínas humanas específicas pueden usarse para cribar variantes de proteínas humanas que no son inmunogénicas.

Geluka y col., *Biotherapy*, 10 (1998), pág. 191-196, desvelan cómo los ratones transgénicos HLA proporcionan un sistema modelo para uso en el desarrollo de ligandos de proteínas alterados en ratones.

35 Por tanto, en un primer aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para probar la inmunogenicidad de un antígeno variante que se deriva de un antígeno de un primer mamífero, en un segundo mamífero no humano, en el que

- i. dicho segundo mamífero es transgénico para moléculas MHC de clase II derivadas de dicho primer mamífero; y
- ii. dicho primer y segundo mamíferos son de diferentes especies;

comprendiendo dicho procedimiento

- 40
- (a) poner en contacto dicho segundo mamífero con el antígeno del primer mamífero de manera que dicho segundo mamífero se vuelva tolerante a dicho antígeno;
 - (b) poner en contacto dicho segundo mamífero tolerizado con dicho antígeno variante; y
 - (c) medir la inmunogenicidad de dicho antígeno variante en dicho segundo mamífero.

45 Se desvelan sistemas *in vivo* para probar, por ejemplo, la inmunogenicidad de proteínas y variantes de proteínas. Como se trata en este documento, el antígeno variante se deriva de un antígeno de mamífero. Los antígenos variantes pueden incluir secuencias de proteínas o de polipéptidos que tienen adiciones, deleciones o sustituciones o que se han derivatizado por medios químicos. El antígeno no es del mamífero transgénico no humano usado en el procedimiento.

50 En particular, la invención se refiere a procedimientos que usan ratones transgénicos para moléculas MHC de clase II humano que permiten la presentación de epítopes de linfocitos T humanos y la prueba de posible inmunogenicidad a proteínas humanas y variantes de proteínas en un origen de ratón.

En una realización de la presente invención, la tolerancia a una proteína humana se induce en ratones neonatales

que expresan genes MHC de clase II humano de la línea germinal (HLA-tg) inyectando bajas concentraciones (por ejemplo, equivalentes a cantidades fisiológicas encontradas en suero humano y/u otros tejido) de proteína. Las proteínas son preferentemente monoméricas y se administran intravenosamente en un tampón inmunológicamente 'inerte' tal como solución salina o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En tales sistemas, la frecuencia de

5 dosis para inducir la tolerancia variará dependiendo de la proteína a la que se induce tolerancia. Por ejemplo, las proteínas normalmente presentes a altas concentraciones en suero necesitan administrarse muy probablemente más frecuentemente para inducir tolerancia que aquellas normalmente encontradas a bajas concentraciones fisiológicas.

10 Preferentemente se usarán ratones inmaduros (por ejemplo, ratones neonatales) con el fin de garantizar que la proteína tolerizante esté presente durante el desarrollo de linfocitos T y, por tanto, induzca tolerancia central.

Normalmente, a los ratones de hasta 6 semanas de edad se les darán administraciones repetidas cuando disminuya la producción de linfocitos T CD4+ y CD8+ maduros del timo (normalmente edad adulta). Habiendo establecido la tolerancia a la proteína de prueba o formas invariantes de las proteínas variante de prueba, los ratones tolerizados se inyectarán entonces con la proteína de prueba o variantes de proteínas y posteriormente se

15 probarán para inmunogenicidad contra la proteína de prueba o variantes de proteínas. En ratones con genes de inmunoglobulina intactos, la inmunogenicidad puede medirse mediante la producción de anticuerpos contra la proteína de prueba o variantes de proteínas. Alternativamente pueden realizarse otros ensayos relacionados con la inmunogenicidad tales como ensayos para medir las respuestas de linfocitos T o B específicos para la proteína de prueba usando sangre periférica, bazo o parche de Peyer de ratones HLA-tg tolerizados.

20 En otra realización de la presente invención, la tolerancia se induce en ratones retrocruzando ratones HLA-tg humanos con ratones que expresan un transgén humano para la proteína de interés. Por ejemplo, pueden producirse ratones HLA-tg humanos que expresan IgG humana que son tolerantes a IgG humana. Si la IgG humana no se expresa de una forma tal que se permita la mutación somática de la región variable (V), translocalización o transposiciones, o cambio en la región constante (C) por cambio de clase, entonces estos ratones serán tolerantes

25 a las secuencias de IgG humanas específicas expresadas, pero intolerantes a cierta mutación somática de la región variable V, translocalización o transposiciones o cambio en la región C por cambio de clase. Si la IgG humana se expresa de tal forma que se permita la mutación somática de la región variable V, translocalización o transposiciones o el cambio de clase de la región de C, entonces estos ratones no sólo no serán tolerantes a una IgG humana específica que contiene una secuencia de la región V y C de la línea germinal específica, sino también

30 a IgG humana que ha experimentado maduración por afinidad y es específica para cualquier antígeno.

Bajo estas condiciones es posible producir un ratón transgénico que expresa MHC de clase II humano endógeno y una proteína humana para la que puede lograrse la tolerancia central en el contexto de MHC de clase II humano. El número de copias del transgén humano (que codifica la proteína humana de interés) incorporadas en el genoma de

35 ratón o la eficiencia de expresión del transgén (determinada por diferentes factores tales como la eficiencia de transcripción y traducción, y la localización de transgenes dentro del genoma de ratón) determinará la cantidad de proteína expresada y puede variarse para generar ratones con diferentes niveles de expresión para el transgén humano de manera que sólo los ratones que expresan 'cantidades fisiológicas' del transgén se seleccionen para el retrocruzamiento con ratones HLA-tg.

Usando tanto el enfoque de inyección como de transgén para inducir tolerancia a proteínas humanas en ratones

40 HLA-tg se preferirá usar ratones que expresan un único alelo de MHC de clase II humano. Por tanto, los procedimientos descritos anteriormente se emplean para inducir tolerancia en un panel de ratones que cada uno expresa un único alotipo de MHC de clase II. Se seleccionarán múltiples ratones HLA-tg de forma que se logre la cobertura colectiva de una proporción tan grande como se requiera de alotipos de MHC de clase II humano. Se entenderá que dentro del alcance de la invención pueden emplearse otros procedimientos para convertir ratones

45 HLA-tg tolerantes a la proteína específica o variante de proteína de interés que incluyen procedimientos de inducción de leucocitos específicos tolerantes a la proteína específica, procedimientos para eliminar leucocitos específicos reactivos para la proteína específica y procedimientos para modular el sistema inmunitario durante la exposición a la proteína específica o variantes de forma que se induzca tolerancia. También se entenderá que, cuando sea posible, se preferirán ratones que no expresen homólogos de ratón de la proteína de prueba específica o variantes de proteínas para uso en la presente invención para evitar cualquier tolerancia inherente de estos

50 ratones a la proteína de prueba o variantes de proteínas.

Se entenderá que tales ratones HLA-tg tolerizados puede usarse en una variedad de formas para probar la inmunogenicidad de proteínas específicas o variantes de proteínas o para clasificar un conjunto de variantes de

55 proteínas para inmunogenicidad. En ratones tolerizados a una proteína específica, la inmunogenicidad puede probarse para variantes de esa proteína que incluyen variantes con cambios de aminoácidos dentro de la proteína, variantes con diferencias en modificaciones de aminoácidos tales como desamidación o glicosilación, diferencias de

formulación, diferencias físicas (por ejemplo, diferencias en la agregación) o cualquier otra diferencia que pueda producir inmunogenicidad. En particular, las consecuencias de una dosificación alta y prolongada pueden determinarse mediante la administración de la proteína de interés a concentraciones crecientes a ratones tolerizados. La inmunogenicidad relacionada con la vía de administración también puede investigarse cuando las proteínas puedan administrarse en diferentes localizaciones a ratones tolerizados y se evalúe la inmunogenicidad resultante. Se entenderá que el análisis de inmunogenicidad en ratones tolerizados puede realizarse mediante una variedad de procedimientos que incluyen prueba de muestras de sangre u otras muestras de tejido (tales como parche de Peyer, bazo) de ratones después de la inyección de la proteína de prueba o variantes de proteínas para anticuerpos (tales como por ELISA, RIPA, FACS y resonancia de plasmones superficiales), prueba de la proliferación o activación de linfocitos T, prueba de la producción de linfocitos T reactivos con proteína, por ejemplo, mediante la unión de complejos péptido-MHC específicos, prueba de linfocitos T o B midiendo la producción de citocinas, proliferación, expresión de marcadores de la superficie celular, flujo de Ca^{2+} , PCR o huella de ADN, prueba de la aparición de linfocitos B o T reactivos inmunitarios específicos, o por cualquier otro medio de prueba de inmunogenicidad. Se entenderá que el análisis de la inmunogenicidad en ratones tolerizados con genes de inmunoglobulina funcionales intactos puede realizarse mediante la inyección de una única proteína de prueba y la medición de la inmunogenicidad mediante la producción de anticuerpos, por ejemplo, midiendo la formación de anticuerpos que se unen a la proteína de prueba inyectada, o alternativamente mediante la inyección de una mezcla de proteínas de prueba o variantes de proteínas, por ejemplo, probando anticuerpos formados en respuesta a la mezcla inyectada para la unión a proteínas específicas o variantes de proteínas dentro de la mezcla (por ejemplo, inmunotransfiriendo sobre una matriz de proteínas de prueba o variantes de proteínas individuales; o aislando anticuerpos o secuencias de anticuerpos de los ratones inyectados y determinando la especificidad de unión de estos anticuerpos para la unión a proteínas de prueba o variantes de proteínas individuales).

La invención será particularmente apta para pruebas de inmunogenicidad de diferentes anticuerpos monoclonales humanos (o humanizados) o fragmentos de los mismos, por lo que los HLA-tg están tolerizados a las secuencias de anticuerpo monoclonal humano y por lo que tales ratones pueden entonces reaccionar con las mutaciones de la región variable asociadas a anticuerpos humanos con mutaciones somáticas (u otras mutaciones distintas de las de la línea germinal, translocalizaciones o transposiciones) en las regiones variables. En estos casos se preferirán ratones con genes de inmunoglobulina de ratón endógeno delecionados o que no se expresan. Como tal, la invención será particularmente adecuada para pruebas de inmunogenicidad comparativa de paneles o bibliotecas de anticuerpos monoclonales humanos o humanizados con el fin de identificar aquellos anticuerpos sin inmunogenicidad o con bajo nivel. En particular, la facilidad de la invención para probar mezclas de diferentes anticuerpos monoclonales humanos (o humanizados) o fragmentos de los mismos inyectados en el mismo ratón y para determinar, por ejemplo mediante inmunotransferencia, la inmunogenicidad de anticuerpos individuales dentro de la mezcla es especialmente adecuada para el rápido análisis de grandes bibliotecas de anticuerpos. Para anticuerpos expresados en partículas tales como bacteriófago, células u otras partículas, la invención engloba la inyección directa de bibliotecas de anticuerpos tras la expresión de la partícula, preferentemente (pero no esencialmente) cuando el ratón es tolerante a la partícula inyectada.

Como una extensión a la presente invención se entenderá que pueden usarse ratones HLA-tg adicionalmente transgénicos para la proteína o variantes de proteínas de interés para la generación de variantes de proteínas con tolerancia generada con respecto al origen de HLA específico, por ejemplo, HLA humano. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos pueden desarrollarse tras la inyección de un antígeno sobre un origen de HLA cuando la IgG humana de la línea germinal se expresa de tal forma que se permita la posterior mutación somática de la región V, translocalización o transposiciones o cambio de clase de la región C. Entonces, los ratones serán tolerantes en el contexto del HLA humano expresado en estos ratones a IgG humana que ha experimentado maduración por afinidad y es específica para cualquier antígeno. Entonces, esto puede reducir la posibilidad de que anticuerpos humanos generados dentro de tales ratones HLA-tg humanos sean no inmunogénicos en seres humanos.

Se entenderá que pueden usarse ratones HLA-tg tolerantes o transgénicos para la proteína o variantes de proteínas de interés en una variedad de aplicaciones de cribado de la inmunogenicidad referentes a la generación y la prueba de productos farmacéuticos para el hombre. Por ejemplo, además de medir la inmunogenicidad de variantes de proteínas, tales ratones HLA-tg pueden usarse para mapear regiones inmunogénicas o secuencias inmunogénicas dentro de proteínas o variantes de proteínas de interés. En particular pueden probarse péptidos que extienden parte o toda la secuencia de la proteína o variantes de proteínas de interés mediante inyección directa en ratones HLA-tg y posterior medición de la inmunogenicidad tal como por medición de la proliferación de linfocitos T a partir de suero o cepas aisladas de tejido. De esta forma, tales ratones HLA-tg serán particularmente útiles para el mapeo de epítopes de linfocitos T en las secuencias de proteínas o variantes de proteínas. Tales secuencias de epítopes de linfocitos T pueden entonces modificarse dentro de la proteína o variantes de proteínas con el fin de eliminar los epítopes antes de usar la proteína o variantes de proteínas como posibles productos farmacéuticos para el hombre.

Se entenderá que pueden usarse ratones HLA-tg tolerantes o transgénicos para la proteína o variantes de proteínas de interés en una variedad de formas para probar la inmunogenicidad de proteínas o variantes de proteínas de interés tras la inyección a diversas dosis, en diversas formulaciones, en diversos momentos de tiempo y para dosificaciones repetidas, a partir de diversos lotes de preparación que incluyen lotes de fabricación y en presencia de diversos agentes tanto coinyectados como presentes dentro de los ratones HLA-tg tales como agentes de enfermedad infecciosa, diversas otras células, otros productos farmacéuticos, agentes químicos/medioambientales y en ratones HLA-tg que están inmunodeprimidos o sometidos a diversos traumatismos, lesiones o enfermedades.

En otra extensión a la presente invención se usan ratones HLA-tg tolerizados a la proteína de interés para seleccionar directamente a partir de una biblioteca de proteínas variante aquellas proteínas con baja inmunogenicidad en comparación con otros miembros de la biblioteca. En una selección tal, la respuesta inmunogénica del ratón de HLA-tg a una proteína específica o variante de proteína conduce directamente a selección contra esa proteína o variante de proteína de forma que se enriquecen o se identifican otras proteínas con baja inmunogenicidad. Por ejemplo, anticuerpos inducidos por una proteína inmunogénica o variante de proteína se unen directamente a la proteína inmunogénica o variante de proteína como base para la selección contra esta variante. Pueden usarse varios procedimientos para lograr tal selección. Por ejemplo, podría usarse la inmunoglobulina en suero de ratones HLA-tg inyectados con una biblioteca de proteínas variante para preabsorber (por ejemplo, mediante inmunoprecipitación o inmunocromatografía) variantes inmunogénicas de proteínas de la biblioteca dejando menos variantes inmunogénicas o no inmunogénicas que podrían identificarse tanto al nivel molecular de proteínas (por ejemplo, mediante secuenciación o huella basada en espectrometría de masas) como en virtud de una partícula asociada a la variante, por ejemplo, una marca de secuencias de péptidos, una secuencia de ácidos nucleicos o cualquier otro código molecular usado para identificar la variante de proteína específica en la biblioteca. Podrían usarse otros procedimientos *in vitro* para identificar variantes con baja inmunogenicidad tales como los procedimientos en los que tales variantes se capturan sobre una fase sólida sólo cuando no está presente anticuerpo de ratón para interferir con el sitio de captura específico sobre la variante de proteína. Por ejemplo, en el caso de una biblioteca de IgG humanas podría usarse una preparación de antígeno de fase sólida para capturar anticuerpos en la que ninguna inmunoglobulina de ratón se ha unido al sitio de unión a antígeno sobre la IgG humana.

Como una alternativa a procedimientos *in vitro* para la selección de variantes de proteínas de una biblioteca con baja inmunogenicidad, los procedimientos de selección *in vivo* pueden usarse cuando las variantes menos inmunogénicas o no inmunogénicas se seleccionen *in vivo*. La selección *in vivo* es en virtud de anticuerpos inducidos en el ratón de HLA-tg tolerizado tanto uniéndose a como eliminándose variantes específicas de la circulación o compartimento inyectado dentro del ratón o mediante destrucción directa o envolviéndose células vivas que expresan tales variantes o partículas unidas a tales variantes, por ejemplo, células vivas de mieloma en virtud de IgG de superficie o bacteriófago vivo por ADCC (citotoxicidad dependiente de anticuerpo) o CDC (citotoxicidad dependiente de complemento), o partículas inertes ligadas a variantes específicas por pinocitosis dependiente de anticuerpos. En un procedimiento básico, el ratón de HLA-tg se inyecta con la biblioteca de variantes de proteínas (por ejemplo, intravenosamente) y en un momento de tiempo seleccionado se hace un análisis de qué variantes de proteínas quedan todavía sin eliminar por la inmunoglobulina huésped. Este análisis puede realizarse, por ejemplo, purificando miembros de la biblioteca de variantes de proteínas en el momento de tiempo seleccionado e identificando variantes enriquecidas en la biblioteca tras la selección *in vivo*. Alternativamente, cuando las variantes de proteínas están asociadas a ácidos nucleicos (por ejemplo, dentro de una célula viva tal como un mieloma o bacteriófago), el análisis puede hacerse mediante amplificación directa y secuenciación de ADN de genes asociados a las variantes de proteínas enriquecidas o huella de ADN antes y después de la selección para identificar bandas en la huella enriquecida mediante la selección, proporcionando entonces tales bandas la posterior identificación de la variante de proteína enriquecida. En los casos en los que las variantes de proteínas se seleccionan de células vivas o partículas y en los que tales células o las propias partículas inducen inmunogenicidad, los ratones HLA-tg pueden tolerizarse a tales células o partículas, por ejemplo, mediante inyección o adición adicional al origen transgénico, u otros medios usados para evitar la interferencia de tales células y partículas en el procedimiento de selección para variantes de proteínas.

Un ejemplo de la invención es la selección *in vivo* de variantes de anticuerpos producidas por células vivas mediante la cual una población de células vivas tales como la biblioteca de células de mieloma de ratón (por ejemplo, hibridoma) que expresa IgG humanas o regiones V de anticuerpos que expresan células de bacteriófago se inyectan en ratones HLA-tg tolerizados. Estos ratones producirán anticuerpos para cualquier IgG humana inmunogénica producida por las células de mieloma inyectadas o bacteriófago y estos anticuerpos se unirán a la IgG de superficie, inhibiéndose así el crecimiento de células / infectividad de fago o conduciendo a la destrucción (mediante ADCC, CDC o endocitosis) de estas células o fago. En un modo tal, los ratones HLA-tg tolerizados se seleccionarán contra células de mieloma o bacteriófago que producen anticuerpos inmunogénicos y las células/anticuerpos productores de fago con baja o ninguna inmunogenicidad se enriquecerán de la población inyectada. Tales células/anticuerpos deseables productores de fago con baja o ninguna inmunogenicidad pueden

entonces recuperarse, por ejemplo, recuperando y cultivando células de mieloma enriquecidas, mediante el uso de clasificación de células usando tinción anti-Ig para clasificar células productoras de anticuerpos o amplificando fago seleccionado mediante infección ciclada de bacterias. Alternativamente, para células no inmortalizadas de mamífero tales como linfocitos B pueden usarse procedimientos de inmortalización y clonación convencionales
 5 tales como aquellos que implican la transformación de EBV o fusión de células u otros medios para inmortalizar antes de la clonación, o pueden usarse procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como PCR para aislar genes de la región V de los anticuerpos seleccionados. Además, el análisis comparativo de poblaciones de linfocitos T antes y después de la selección en ratones HLA-tg tolerizados puede usarse para identificar linajes de linfocitos B enriquecidos o el enriquecimiento de anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante PCR comparativa,
 10 huella de ADN comparativa o procedimientos de espectrometría de masas comparativa tales como EM-CL.

Se entenderá por los expertos en la materia que hay muchas variaciones de los procedimientos de la presente invención para probar la inmunogenicidad de proteínas y variantes de proteínas, pero que éstos deberán considerarse dentro del alcance de la presente invención que usa ratones HLA-tg tolerizados a una proteína específica o variantes de proteínas como origen para medir la inmunogenicidad de proteínas o para seleccionar
 15 proteínas con baja inmunogenicidad o ausente o para comparar y clasificar diferentes proteínas basándose en la inmunogenicidad. Se entenderá que los ratones HLA-tg tolerizados a proteínas específicas son ratones novedosos especialmente transgénicos con uno o más transgenes de proteína humana adicionales al transgén de HLA humano. En particular, son novedosos los ratones HLA-tg humanos con transgenes de IgG humana adicionales, que preferentemente codifican tantos loci de inmunoglobulinas de región variable de cadena ligera y pesada
 20 humana como sean posibles, y particularmente útiles en pruebas de inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales terapéuticos o en la selección *in vivo* de anticuerpos terapéuticos de una selección de variantes. Tales ratones pueden usarse en el cribado de proteínas para uso como agentes farmacéuticos o de diagnóstico *in vivo* para seres humanos, por lo que las proteínas con poca o ninguna inmunogenicidad se seleccionarían usando el mismo origen de HLA que estaría presente en seres humanos y usando niveles de tolerancia similares (si los hay) que cabría
 25 esperar en seres humanos. Se apreciará que podrían usarse organismos distintos de ratón cuando las moléculas de HLA humanas puedan proporcionarse tanto mediante transgénica como por otros medios tales como la inyección de células humanas presentadoras de antígeno. También se apreciará que para fines distintos de productos farmacéuticos humanos (por ejemplo, para productos farmacéuticos animales) también podría usarse orígenes de HLA distintos de humano con tolerancia inducida a proteínas de las especies usadas. Se apreciará que
 30 los animales HLA-tg tolerizados también podrían usarse como procedimientos para seleccionar proteínas o variantes de proteínas con alta inmunogenicidad para uso en vacunación.

También entenderán los expertos en la materia que hay muchas variaciones de los procedimientos de la presente invención para seleccionar proteínas o variantes de proteínas para baja inmunogenicidad mediante una amplia gama de procedimientos de prueba o de aislamiento *in vitro* o *in vivo*, pero que éstos deberán considerarse dentro
 35 del alcance de la presente invención que usa ratones HLA-tg tolerizados a la proteína específica o variantes de proteínas como un origen para tal selección. También se entenderá que los análisis o la selección de proteínas o variantes de proteínas por ratones HLA-tg tolerizados requerirá normalmente el análisis paralelo o la selección en una gama de alotipos de HLA de origen normalmente mediante un panel de ratones transgénicos con diferentes genotipos de HLA alotípicos. Para la selección de proteínas o variantes de proteínas para uso en seres humanos se desea un intervalo de alotipos de MHC representado en al menos el 50% de la población humana con el fin de
 40 evitar la selección de proteínas en demasiados pocos alotipos que podría conducir a inmunogenicidad una vez la proteína se inyectara en seres humanos con otros alotipos no presentes en los ratones usados para el análisis o la selección.

También entenderán los expertos en la materia que la presente invención no debería limitarse al uso de ratones transgénicos, sino que también podría incluir otros animales convertidos en transgénicos para MHC de clase II humano y usados de la misma forma para medir la inmunogenicidad de variantes de proteínas o para seleccionar
 45 variantes de proteínas con baja inmunogenicidad. También se entenderá que la presente invención no debería limitarse a proteínas y podría aplicarse a la medición de la inmunogenicidad de variantes de no proteína o para seleccionar variantes de no proteína con baja inmunogenicidad tales como productos químicos orgánicos,
 50 productos químicos inorgánicos, alérgenos, cosméticos, contaminantes medioambientales, agentes infecciosos y productos alimenticios. También se entenderá que la presente invención podría usarse para el desarrollo y la prueba de vacunas para uso humano, por ejemplo, en la determinación de epítopes de linfocitos T eficaces para uso en vacunas humanas, en el cribado de vacunas de subunidades o de ADN eficaces, en la prueba de diferentes formulaciones de vacuna y vías de administración para la futura eficacia en seres humanos y en la prueba de
 55 posibles vacunas para la prevención de o la inducción de respuestas inmunitarias contra agentes de enfermedad tales como enfermedad infecciosa, cáncer e inflamación, por lo que tales enfermedades se introducen o se inducen en los ratones (u otros animales) antes de la prueba de las posibles vacunas. También se entenderá que los animales transgénicos HLA-tg podrían ser, además de MHC de clase II humano, transgénicos para componentes individuales o combinaciones de los mismos de otras moléculas humanas del sistema inmunitario tales como

receptor de linfocitos T, MHC de clase I, CD4, CD8 y otras citocinas o receptores, en cada caso para introducir componentes adicionales del sistema inmunitario humano hacia la imitación de un intervalo de diferentes acontecimientos moleculares en relación con la inmunidad humana. Del mismo modo podrían trasplantarse animales con una o más células del sistema inmunitario humano para facilitar una respuesta inmunitaria humana a una proteína de prueba o no proteína.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos de prueba inmunogénicos / no inmunogénicos.

El anticuerpo de prueba inmunogénico elegido para el estudio fue el anticuerpo quimérico anti-TNF α conocido como Remicade® (Le y col., US6277969) con regiones variables derivadas del anticuerpo cA2 de ratón (denominado en lo sucesivo "Remicade"). Otro anticuerpo de prueba usado fue un anticuerpo anti-HER2 humanizado conocido como Herceptin® (Carter y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol 89 (1992) p4285, documento US5821337) (denominado en lo sucesivo Herceptin). El anticuerpo de control no inmunogénico usado fue un derivado de Herceptin (denominado en lo sucesivo "GLH" = Herceptin® de la línea germinal) que incorpora las secuencias de Vh3-53 y Vk 012 de la línea germinal humana.

Se realizaron técnicas de ADN recombinante y anticuerpos usando procedimientos muy conocidos en la técnica y, según sea apropiado, instrucciones del proveedor para usar enzimas y anticuerpos usados en estos procedimientos. Las fuentes de procedimientos generales incluyeron Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, vol. 1-3, eds. Sambrook y Russel (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, John Wiley and Sons; y Antibodies, A Laboratory Manual, eds. Harlow y Lane (1988), Cold Spring Harbor. Las secuencias correspondientes a Remicade®, Herceptin® y las regiones V del anticuerpo GLH se crearon usando, para cada cadena, ocho oligonucleótidos sintéticos de 30-60 aminoácidos de longitud que codificaban las secuencias VH y VL humanas enteras. Los oligonucleótidos de VH y VL separados se fosforilaron primero, se mezclaron a relaciones molares iguales, se calentaron a 94°C durante 5 min en un ciclador térmico seguido de enfriamiento a 65°C e incubación a 65°C durante 2 min. Las incubaciones continuaron luego a 45°C durante 2 min, 35°C durante 2 min, 25°C durante 2 min y 4°C durante 30 min. Entonces, los oligonucleótidos se ligaron usando ADN ligasa T4 (Life Technologies, Paisley, RU) a 14°C durante 18 horas.

A cada una de las mezclas de oligonucleótidos de VH y VL se añadieron oligonucleótidos adicionales que codificaban una secuencia de flanqueo en 5' que incluía una secuencia de Kozak, la secuencia de péptidos señal conductora y el intrón conductor, y la secuencia de flanqueo en 3' que incluía la secuencia de sitios de corte y empalme e intrones, y se hibridaron como anteriormente. Los casetes de expresión de VH y VL producidos se clonaron como fragmentos HindIII a BamHI en el vector de plásmido pUC19 y se confirmó toda la secuencia de ADN. Éstos se transfirieron a los vectores de expresión pSVgpt y pSVhyg (Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (1989) 3833-3837) que incluyen IgG1 humana o regiones constantes κ humanas, respectivamente, y marcadores para la selección en células de mamífero.

La línea de células huésped para la expresión de anticuerpos fue NS0, un mieloma de ratón productor de no inmunoglobulina obtenido de la Colección europea de cultivos de células animales, Porton, RU (ECACC nº 85110503). Los vectores de expresión de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células NS0 por electroporación. Las colonias que expresaron el gen gpt se seleccionaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10%, 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido micofenólico y 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de xantina. Los clones de células transfectadas se cribaron para la producción de anticuerpo humano por ELISA para IgG humana. Los anticuerpos se purificaron usando Prosep®-A (Millipore, Watford, RU) y la concentración se determinó por ELISA para IgGk humana (Farmacia Biotech, St Albans, RU). Los anticuerpos Remicade, Herceptin y GLH purificados se probaron para la unión en dos ensayos, uno usando TNF α humano inmovilizado en un ELISA convencional (descrito en el documento WO 03/042247A2) y otro usando la inhibición de la línea SK-BR-3 de células de tumor de mama humano HER2+ como se describe por 4D5 (Hudziak y col., Mol. Cell. Biol., (marzo de 1989) p1165-1172). El anticuerpo Remicade mostró la unión esperada a TNF α humano en el ensayo de ELISA, pero sin inhibición de células SK-BR-3. Herceptin no se unió a TNF α humano, a la vez que mostró la inhibición de la proliferación de células SK-BR-3. El anticuerpo GLH no mostró ni unión a TNF α humano ni inhibición de células SK-BR-3.

Ejemplo 2. Ratones transgénicos HLA humanos que carecen de expresión de inmunoglobulina de ratón.

Se obtuvieron ratones transgénicos HLA-DR1 humanos que carecían MHC de clase II de ratón (Altmann, D.M. y col., J Exp Med 181 (1995) 867-875) de Imperial College, Londres, RU. Éstos se cruzaron con ratones que carecían de la cadena pesada de inmunoglobulina (C Δ -/-) obtenidos de Babraham Institute, Cambridge, RU (Bruggeman, documento EP0438474B1) y se seleccionaron ratones con el genotipo deseado de HLA-DR1 +/- humano, MHC de clase II -/- de ratón y Ig C Δ -/- de ratón (denominados en lo sucesivo ratones "hu DR+ / IgC Δ -/-"). Entonces, estos

ratones hu DR+ / IgCΔ-/- se cruzaron adicionalmente con ratones que carecían de cadenas ligeras de inmunoglobulina (λκ-/-, Babraham Institute) y se seleccionaron ratones con el genotipo deseado de HLA-DR1 +/+ humano, MHC de clase II -/- de ratón, Ig CΔ-/- de ratón y λκ -/- de ratón (denominados en lo sucesivo ratones "hu DR+ /IgCΔ-/-λκ-/-").

5 **Ejemplo 3.** Inducción de tolerancia neonatal

Los anticuerpos Remicade, Herceptin y GLH se dializaron y se diluyeron a 500 µg/ml en PBS y se centrifugaron a 20.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se inyectó intraperitonealmente una dosis tolerizante de 50 µl de anticuerpos individuales en ratones hu DR+ / IgCΔ-/- neonatales en el plazo de 30 horas después del nacimiento (= día 0). Los ratones de control se inyectaron con 50 µl de PBS. Luego se inyectaron subcutáneamente 5 µg de dosis de los anticuerpos tanto Remicade, Herceptin como GLH junto con 5 µg de control de KLH en emulsión de 200 MPL + TDM total (adyuvante de RAS-Ribi, código de producto R-700, Corixa Corp, Hamilton, MT, EE.UU.) en los días 10, 16 y 24. En el día 32 los ratones se sacrificaron para ensayos de proliferación de linfocitos T. Se prepararon esplenocitos purificados con Ficoll agotados de glóbulos rojos y se cultivaron a 5×10^6 células en matraces T25 con anticuerpo o blastos de LPS irradiados con gamma pulsados con KLH como se describe por Loirat, D., y col., J Immunol., 165 (2000) 4748-4755. Después de 7 días de cultivo, las células se sembraron a 5×10^5 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos de fondo plano con anticuerpo o blastos de LPS irradiados pulsados con KLH y se incubaron durante otras 72 h en RPMI completo + SBF al 3%. Las células se pulsaron durante las 16 h finales con 1 µCi por pocillo de ^3H -timidina y se recogieron sobre esterillas de filtración con un colector TOMTEC (PE Applied Biosystems, Warrington, RU). La radiactividad se midió sobre un contador de microperlas (PE Applied Biosystems) y los resultados se expresaron como un índice de estimulación (IE) de cpm para el anticuerpo o tratamientos de KLH frente a controles de PBS.

Estos resultados mostraron IE>2 no significativo para animales tolerizados con los anticuerpos Remicade, Herceptin y GLH y luego se expusieron al mismo anticuerpo respectivo en adyuvante. Sin embargo, las respuestas de linfocitos T (IE>2) se observaron en 5 de 10 ratones en animales tolerizados para IgG humana policlonal purificada (hulgG) y luego se expusieron al anticuerpo Remicade. A diferencia, las respuestas (IE>2) se detectaron en sólo 1 de 10 ratones tolerantes a hulgG después de la exposición a GLH, mientras que para animales tolerizados con Herceptin no se detectó respuesta (IE>2) después de la exposición a GLH. Herceptin indujo respuestas en 3 ó 1 de 10 ratones tolerantes a hulgG o GLH, respectivamente. Todos los ratones respondieron fuertemente a KLH en adyuvante produciendo fuertes respuestas específicas para KLH en el 90% de los ratones. Estos resultados demostraron la satisfactoria inducción de tolerancia neonatal en ratones hu DR+ / IgCΔ-/- a anticuerpos Remicade, Herceptin y GLH individuales de forma que la exposición a los mismos anticuerpos dejó de inducir respuestas de proliferación de linfocitos T.

Estos resultados demuestran la inducción de respuestas de linfocitos T significativas al anticuerpo inmunogénico Remicade en ratones tolerantes a hulgG. Pareció que Herceptin era menos inmunogénico (tasa de respuesta del 30%) que Remicade (tasa de respuesta del 50%), mientras que GLH dejó de inducir respuestas en ratones tolerantes a hulgG o Herceptin. Este ejemplo ilustra una gran parte de la invención en el uso de ratones transgénicos para HLA-DR humanos y convertidos en tolerantes a inmunoglobulinas específicas que es paralelo a la tolerancia de seres humanos a inmunoglobulinas humanas. Entonces, tales ratones transgénicos pueden usarse para probar diversos anticuerpos monoclonales para la inducción de inmunogenicidad en ratones HLA-DR humanos transgénicos tolerizados para inmunoglobulinas específicas de ratones como sustituto para probar tales anticuerpos en seres humanos. El ejemplo muestra que el anticuerpo Remicade, que es significativamente inmunogénico en seres humanos, induce inmunogenicidad significativa en tales ratones HLA-DR humanos tolerizados transgénicos. En experimentos de seguimiento adicionales se usó una preparación de globulina humana para tolerizar ratones hu DR+ / IgCΔ-/- como en el Ejemplo 3 y estos ratones se expusieron luego a los anticuerpos Remicade, Herceptin y GLH. Los resultados mostraron que con tolerancia a anticuerpos individuales la inyección de Remicade produjo IE>2 en >30% de ratones, mientras Herceptin y GLH no mostraron IE>2 en ningún animal.

Ejemplo 4. Producción de ratones transgénicos de Ig humana.

Se cruzaron ratones transgénicos para IgM/κ humana (ratones de cuatro características, Nicolson y col., J Immunol., 163 (1999) 6898-6906) con ratones hu DR+ / IgCΔ-/-λκ- (Ejemplo 2) y se seleccionaron ratones con el genotipo deseado de IgM/κ humano, HLA-DR1 +/+ humano, MHC de clase II -/- de ratón, Ig CΔ-/- de ratón y λκ -/- de ratón (denominados en lo sucesivo ratones "hu IgCΔ-/-κ-/-").

Ejemplo 5. Pruebas de inmunogenicidad en ratones transgénicos de Ig humana.

Se generó un anticuerpo de control para pruebas de inmunogenicidad en ratones hu IgM/κ usando genes de VH1-2 y Vk4.1 humanos de la línea germinal conjuntamente con D1.7/J4 para VH y Jk4 para Vk (denominado en lo sucesivo el anticuerpo "VH1-2/Vk4.1"). Se generó un anticuerpo IgG1/κ humano recombinante como en el Ejemplo

1 y este anticuerpo y el anticuerpo Remicade del Ejemplo 1 se sometieron ambos a digestión con pepsina para generar un fragmento Fab₂ dimérico para inyección. Antes de la digestión, los anticuerpos se dializaron en tampón acetato sódico 0,2 M a pH 4,0 y luego se ajustaron a 2 mg/ml. Se añadieron 20 µg/ml de pepsina (Sigma, Poole, Dorset, RU) en un volumen igual de tampón acetato sódico 0,2 M a pH 4,0 y se incubaron durante 6 h a 37°C. Se añadió la base Trizma® 2 M (Sigma) para ajustar a pH 7 y las digestiones se comprobaron por electroforesis en gel. Los digestos de anticuerpos se dializaron durante la noche en PBS y luego se aplicaron a dos columnas Sephadex 75 secuenciales (Pharmacia) para aislar fragmentos Fab₂.

Se inmunizaron ratones hu IgM/k con tanto 50 µg de VH1-2/Vk4.1 como fragmentos Fab₂ de Remicade en CFA y se reforzaron 4, 8 y 12 semanas cada uno con 50 µg de los fragmentos Fab₂ en IFA. La producción de anticuerpos IgM/k humanos se probó por placas de microtitulación de PVC de recubrimiento durante la noche a 37°C con tanto 5 µg/ml de VH1-2/Vk4.1, fragmentos Fab₂ de Remicade como con un control de anticuerpo GLH completo (Ejemplo 1) en PBS. Las muestras de suero se diluyeron en PBS, suero de pollo al 5% y Tween-20 al 0,5%, luego se incubaron en los pocillos durante 1 h a temperatura ambiente y, después de lavarse, se añadió Fc-HRP de IgM anti-humana (Pharmacia) en el mismo tampón durante 1 h, seguido de adición de ABTS (Sigma) durante 30 minutos y medición de DO a 415 nm. Este experimento mostró la inducción de fuertes títulos de anticuerpos IgM específicos para el fragmento Fab₂ de Remicade en animales inmunizados con Fab₂ de Remicade, pero no la inducción de anticuerpos contra VH1-2/Vk4.1 en ratones inmunizados con Fab₂ VH1-2/Vk4.1, demostrándose así la inmunogenicidad de Remicade en ratones con un origen de inmunoglobulina humana / HLA-DR humano. Este ejemplo ilustra una gran parte de la invención en el uso de ratones transgénicos para genes de HLA-DR humano y de inmunoglobulina humana de forma que estos ratones son tolerantes a un intervalo de secuencias variables de la región de inmunoglobulina humana que es paralelo a la tolerancia de seres humanos a un intervalo de secuencias variables de la región de inmunoglobulina humana. Tales ratones transgénicos pueden entonces usarse para probar diversos anticuerpos monoclonales para la inducción de inmunogenicidad como sustituto para probar tales anticuerpos en seres humanos. El ejemplo muestra que el anticuerpo Remicade induce inmunogenicidad significativa en tales ratones HLA-DR/Ig+ humanos transgénicos, que es paralelo al hallazgo en seres humanos de que la inmunogenicidad a Remicade® se induce en una proporción significativa de pacientes inmunocompetentes.

Ejemplo 6. Selección de anticuerpos en ratones transgénicos de Ig humana.

Muestras de 100 mg de VH1-2/Vk4.1 y fragmentos Fab₂ de Remicade en PBS (del Ejemplo 5) tanto se coinyectaron como se inyectaron individualmente intravenosamente en ratones hu IgM/k. La administración repetida se realizó después de 10 días y 20 días después de la dosis inicial. 2 horas después de la dosis final se analizó el suero de ratón para la presencia o la ausencia de VH1-2/Vk4.1 o fragmentos Fab₂ de Remicade. Se centrifugó suero recogido a 20.000 g durante 15 minutos a 4°C y luego se dializó durante la noche en PBS. Entonces, los fragmentos de Fab₂ se purificaron usando Sephadex 75 como se describe en el Ejemplo 5 y se probaron como una serie de dilución para la unión a TNFα humano como en el Ejemplo 1 usando Fab-HRP anti-humano (Pharmacia). Los resultados mostraron que para ratones coinyectados con VH1-2/Vk4.1 y fragmentos Fab₂ de Remicade el Fab₂ recuperado estuvo compuesto >95% por VH1-2/Vk4.1 en todos los ratones probados. Estos resultados indican que el Fab₂ de Remicade más inmunogénico se había eliminado del sistema sanguíneo en comparación con el VH1-2/Vk4.1 menos inmunogénico. Es posible que este efecto sea debido a una formación de complejos inmunitarios con Fab₂ de Remicade que facilitan una eliminación más rápida que VH1-2/Vk4.1. Este ejemplo ilustra la capacidad de HLA-tg tolerizado para seleccionar anticuerpos con baja inmunogenicidad a partir de una mezcla con otros anticuerpos que inducen inmunogenicidad significativa.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para probar la inmunogenicidad de un antígeno variante que se deriva de un antígeno de un primer mamífero, en un segundo mamífero no humano, en el que
- 5 i. dicho segundo mamífero es transgénico para moléculas MHC de clase II derivadas de dicho primer mamífero; y
- ii. dicho primer y segundo mamíferos son de diferentes especies; comprendiendo dicho procedimiento
- 10 (a) poner en contacto dicho segundo mamífero con el antígeno del primer mamífero de manera que dicho segundo mamífero se vuelva tolerante a dicho antígeno;
- (b) poner en contacto dicho segundo mamífero tolerizado con dicho antígeno variante; y
- (c) medir la inmunogenicidad de dicho antígeno variante en dicho segundo mamífero.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el contacto con el antígeno va a lograrse introduciendo en dicho segundo mamífero uno o más constructos de expresión que codifican el antígeno de mamífero.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho antígeno es una proteína soluble.
- 15 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho antígeno es una proteína humana soluble.
5. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho antígeno es un anticuerpo monoclonal y en el que dicho segundo mamífero se pone en contacto con una forma monomérica soluble del mismo.
6. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho antígeno es una preparación de anticuerpo policlonal de mamífero y en el que dicho segundo mamífero se pone en contacto con una forma soluble del mismo
- 20 7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la proteína está en adyuvante.
8. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso para probar vacunas humanas.
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el mamífero no humano es un roedor.
- 25 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el roedor es un ratón y las moléculas MHC de clase II de mamífero son humanas, por ejemplo, HLA-DR humano.
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho ratón transgénico es un ratón neonatal puesto en contacto con dicho antígeno hasta 6 semanas, pero preferentemente en el plazo de 32 horas desde el nacimiento con el fin de inducir tolerancia a dicho antígeno.
- 30 12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el antígeno de mamífero es un antígeno humano.
13. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el antígeno de mamífero es un antígeno no humano.
- 35 14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que dicho ratón transgénico se modifica para eliminar o convertir en inactivo cualquier gen de ratón que expresa dicho antígeno o variantes de dicho antígeno.
15. Un procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho ratón transgénico se convierte entonces en tolerante a dicho antígeno, cuyo antígeno es una proteína de no ratón, antes de exponerse a y la medición de la inmunogenicidad de una o más variantes de la proteína de no ratón.
- 40 16. Un procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicha proteína de no ratón es inmunoglobulina humana y dicha(s) proteína(s) de variante son anticuerpos monoclonales o policlonales de prueba.
17. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho ratón transgénico codifica cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humana.
- 45 18. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que la inmunogenicidad se mide usando suero de dicho mamífero transgénico para probar la inducción de anticuerpos contra los anticuerpos monoclonales o policlonales de prueba o proteínas de prueba.

19. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que la inmunogenicidad se mide con ensayos de proliferación de linfocitos T o de activación de linfocitos T usando sangre o muestras de tejido de ratón como fuente de linfocitos T de ratón.
- 5 20. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que la inmunogenicidad humana se mide probando la producción de linfocitos T reactivos para proteína, por ejemplo, mediante la unión de complejos de péptido-MHC específicos, probando linfocitos T o B midiendo la producción de citocinas, proliferación, expresión de marcadores de la superficie celular, flujo de Ca^{2+} , PCR o huella de ADN o probando la aparición de linfocitos B o T reactivos inmunitarios específicos.
- 10 21. El uso de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para probar la inmunogenicidad de una biblioteca de antígenos variantes.
22. El uso según la reivindicación 21, en el que los antígenos variantes son antígenos humanos.
23. El uso según la reivindicación 22, en el que los antígenos humanos son proteínas.
24. El uso según la reivindicación 21, en el que los antígenos variantes son antígenos no humanos.
25. El uso según la reivindicación 24, en el que los antígenos no humanos son proteínas.
- 15 26. El uso según la reivindicación 23, en el que las proteínas son una biblioteca de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.
- 20 27. El uso según la reivindicación 21, en el que los antígenos humanos de variante se seleccionan directamente probando anticuerpos inducidos por la mezcla de antígenos humanos de variante para determinar los anticuerpos inducidos por antígenos humanos de variante individuales o preabsorbiendo la mezcla de antígenos humanos de variante con anticuerpos inducidos por la mezcla.
28. El uso según la reivindicación 21, en el que los antígenos humanos de variante están unidos a partículas y tales partículas se usan para identificar variantes individuales.
29. El uso según la reivindicación 21, en el que los antígenos humanos de variante están unidos a células vivas y tales células vivas se usan para identificar variantes individuales.
- 25 30. El uso según las reivindicaciones 21 y 27-29, en el que uno o más antígenos variantes se derivan de un anticuerpo.