

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 044**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/46** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2009 E 09751700 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2288623**

54 Título: **Procedimiento de generación de anticuerpos de dominio VL individual en animales transgénicos**

30 Prioridad:

**23.05.2008 US 55725 P**

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

**26.12.2013**

73 Titular/es:

**ABLEXIS, LLC (100.0%)  
409 Illinois Street  
San Francisco, CA 94158, US**

72 Inventor/es:

**SHIZUYA, HIROAKI y  
GREEN, LARRY**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 436 044 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

Procedimiento de generación de anticuerpos de dominio VL individual en animales transgénicos

**Referencia cruzada a la solicitud relacionada**

5 La presente solicitud reivindica prioridad de las Solicitud Provisional de Patente de EE.UU. N.º 61/055.725, presentada el 23 de mayo de 2008.

**Antecedentes****Campo técnico**

10 De manera general, la presente invención se refiere a anticuerpos de dominio variable individual que tienen un dominio variable de cadena ligera (VL) y más específicamente a anticuerpos de dominio VL individuales que comprenden un dominio VL humano, procedimientos de preparación, procedimientos de uso y a células no humanas transgénicas y animales que producen dichos anticuerpos.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 Las inmunoglobulinas convencionales contienen cuatro cadenas de polipéptidos; dos polipéptidos de cadena pesada idénticos (H) y dos polipéptidos de cadena ligera idénticos (L). Las cadenas L son bien  $\kappa$  o bien  $\lambda$ . Las terminaciones amino de cada cadena pesada y ligera contienen una región variable (VH y VL, respectivamente) y la región constante (C) está en la terminación carboxi. La región constante de cadena pesada (CH) contiene el dominio CH1, la región de bisagra y dominios CH2, CH3 y opcionalmente CH4. Los dominios CH2 y CH3 componen la región Fc de la cadena pesada. La región constante de cadena ligera más corta (CL) forma una asociación unida a disulfuro con el dominio CH1 de la cadena pesada. Las dos cadenas pesadas están unidas por medio de uno o más enlaces de disulfuro en la región de bisagra. Juntos y solos, los dominios CH1 y CL pueden influenciar la estabilidad *cis* de VH y VL pareados. La región FC actúa en *trans* para influenciar la resistencia de las actividades del sistema inmunológico por medio de unión a receptores Fc y para proporcionar una semivida larga en circulación. La cadena pesada del anticuerpo también media la superficie celular y los componentes críticos de señalización a través del desarrollo de células B y la maduración por medio de la membrana y las secuencias de señalización intracelulares que se pueden empalmar alternativamente sobre CH3 o CH4. El anticuerpo se muestra sobre la superficie de la célula B en el contexto del receptor de la célula B, que contiene otros miembros importantes de modulación de señal tales como  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ .

20 Además de los anticuerpos convencionales, los camélidos (por ejemplo, camellos, alpacas y llamas) y determinados peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones nodriza y tapicero) producen de forma natural anticuerpos de solo cadenas pesadas desprovistos de cadenas ligeras (véase la Figura 1). Los anticuerpos de solo cadenas pesadas son homodímeros de cadena pesada formados por dominios de VH y CH y son distintivos de los anticuerpos convencionales anteriormente mencionados de heterotetrámeros de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Un grupo de segmentos génicos VHH de camélidos, en lugar de segmentos génicos VH convencionales, dominan el repertorio de la región V usada en los anticuerpos de solo cadenas pesadas (revisado en De Genst y col. Dev. Comp. Immunol. 30: 187-198). Los genes VHH de camélidos tienen contrastes bien caracterizados que pueden compensar la cara hidrófoba expuesta de la región variable que, de lo contrario, se emparejaría con la región VL. Estos contrastes incluyen mutaciones de aminoácidos específicos y en ocasiones, una región CDR3 más larga que puede "cubrir" partes de la cara hidrófoba.

30 Los anticuerpos de solo cadena individual tal como los anticuerpos de solo cadenas pesadas de camélidos pueden tener utilidad terapéutica. Su tamaño pequeño frente a los anticuerpos convencionales convierte su producción en más sencilla y menos costosa y puede permitir una penetración más eficaz en los tejidos de la enfermedad tales como tumores sólidos. Además, se pueden aislar los dominios V y se pueden combinar usando técnicas de biología molecular para preparar nuevos formatos tales como moléculas bi-, tri- y quadri-específicas que podrían presentar utilidad terapéutica mejorada en comparación con los anticuerpos mono-específicos. Los dominios VH aislados a partir de los anticuerpos convencionales requieren el apareamiento VL y por tanto, son difíciles de expresar, pueden ser insolubles y pueden adolecer de pérdida de enlace al antígeno diana. De este modo, se desea una fuente fiable y rentable de diversos repertorios de anticuerpos de dominio V individual con unión de alta afinidad y buena solubilidad para el descubrimiento y desarrollo de fármacos terapéuticos.

45 La observación reciente sugiere que se pueden producir espontáneamente anticuerpos de solo cadenas pesadas, aunque ineficazmente, sin adquirir mutaciones de tipo VHH específicas en ratones deficientes de cadena ligera. Estos anticuerpos carecen de dominio CH1 debido a episodios raros de empalme aberrante desde el exón J hasta el exón CH1 (Zou y col., J. Exp. Med. 204: 3271-3283). Las células de ratón pueden expresar, mostrar en superficie y segregar anticuerpos de VHH de camélidos (Nguyen y col., Immunol. 109: 93-101; Zou y col., J. Immunol. 175: 3769-3779). Los ratones se han sometido a modificación genética con transgenes que portan genes VHH de camélido unidos operacionalmente a DH humano, JH y genes de región específica eliminados del dominio CH1 y mutantes por separado para el locus IgH de ratón endógeno funcional (mutante  $\mu$ MT) (Janssens y col. Proc. Nat.

Acad. Sci. 103: 15130-15135). Los ratones transgénicos reordenan el VHH de camélido a segmentos génicos DH-JH reordenados y expresan los anticuerpos de cadena pesada individual de DJ-C de VHH humano de camélidos quiméricos. No obstante, el uso de la región V de los anticuerpos de solo cadena H a partir de dichos ratones con fines terapéuticos requeriría la humanización de la mayoría de la región V, debido a su origen de secuencia de camélido. Además, no está claro el modo en el que estos transgenes soportan la reconstitución de los compartimientos de células B en desarrollo, el compartimiento de células B maduras y un repertorio inmunológico diferente primario y secundario.

Se han construido ratones transgénicos en un intento de someter a ensayo técnico una plataforma para la generación de anticuerpos humanos de solo cadenas pesadas. Estas construcciones transgénicas tienen genes VH, DH, JH y C<sub>μ</sub> y/o C<sub>δ</sub> humanos o de camélido que se eliminan del exón CH1 en un antecedente genético con un locus IgH endógeno no funcional (mutación μMT). Algunas de las construcciones de transgenes salvaron el desarrollo de las células B, bloquearon la reorganización del locus IgL y poblaron el compartimiento linfocitario secundario (Solicitud de Patente Internacional de N.º de Publicación WO 2004/0497794, WO 2006/008548 y WO 2007/096779). No obstante, el análisis más detallado de los compartimientos de las células B y los procedimientos de diversificación de secuencias sugirieron la necesidad de mejora para una utilización satisfactoria como plataforma para la generación de anticuerpos humanos de solo cadenas pesadas. Recientemente, se han creado transgenes de mayor tamaño con más contenido de VH humano (véase la Solicitud de Patente Internacional N.º. WO 2008/035216). Algunos de los genes VH incluidos presentaron mutaciones específicas basadas en modelos moleculares diseñadas para aumentar la solubilidad de un dominio VH no apareado con un dominio VL (véase Rothlisberger y col., J. Mol. Biol. (2005) 347: 773-789 y las referencias citadas en la misma). Todavía no está claro si las citadas mutaciones pueden compensar la insolubilidad de las regiones de VH aisladas.

La solicitud de patente de EE.UU. US 2006/280734 se refiere a un procedimiento para la generación de moléculas de inmunoglobulina de especificidad predeterminada. En particular, se describe un procedimiento para la re-dirigir la especificidad de unión a epítipo de uno o más anticuerpos usando dominios variables individuales que exhiben especificidad de unión a epítipo.

Un problema crítico a solucionar cuando se someten ratones a modificación para la expresión de anticuerpos de solo cadenas pesadas y el posterior uso para la generación de anticuerpos de solo cadenas pesadas de calidad terapéutica es un requisito para el despliegue satisfactorio y la señalización de receptores de células B (BCR) por parte de células B a través del desarrollo y las respuestas inmunológicas primaria y secundaria con el fin de generar un repertorio diverso de anticuerpos de alta afinidad. El BCR y su precursor pre-BCR comprenden cadenas de inmunoglobulinas, IgH, IgL y cadenas ligeras de sustituto. Se puede secretar el anticuerpo satisfactoriamente a la superficie celular, deber ser estable y soluble, su región variable debe encajar con el antígeno probablemente durante el desarrollo incipiente y sin duda durante las respuestas inmunológicas primaria y secundaria y los dominios intracelulares deben señalar de manera atenuada y temporalmente modulada si tiene lugar la sucesión de varias etapas de desarrollo. Además, un requisito para convertir los anticuerpos y sus derivados en sustancias terapéuticas satisfactorias es la capacidad para producirlos a gran escala y posteriormente concentrarlos y formularlos al tiempo que conservan una solubilidad en estado no agregado. Las diferentes construcciones transgénicas y procedimientos probados en ratones satisfacen inapropiadamente los requisitos complejos y la regulación de la respuesta inmunológica humoral con el fin de servir como plataforma útil para la generación de un repertorio diverso de anticuerpos humanos de dominio variable individual de calidad terapéutica que posteriormente tienen las características requeridas para la conversión en sustancias terapéuticas que se pueden producir y desarrollar clínicamente destinadas a humanos. De este modo, existe una necesidad aún por satisfacer en la técnica de dichos animales no humanos sometidos a modificación genética.

### Sumario breve

La presente invención describe nuevos anticuerpos de cadena individual quimérica que contienen una región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina humana y una región constante de cadena pesada no humana. En particular, los anticuerpos quiméricos de la presente invención están desprovistos del primer dominio CH1 constante. La presente invención además se refiere a células componentes de recombinación homóloga y mamíferos no humanos knock-in capaces de expresar los anticuerpos de dominio VL individual quiméricos y procedimientos de generación de las células y mamíferos no humanos knock-in. De manera más específica, la presente invención se refiere a procedimientos y kits que se refieren a anticuerpos de dominio VL individuales quiméricos.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo de dominio VL individual quimérico. El anticuerpo de dominio VL individual quimérico comprende un segmento de dominio VL humano, un segmento de dominio DH humano, un segmento de dominio JL humano y una región C de cadena pesada no humana. La región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento de dominio CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1.

En algunas realizaciones el segmento de dominio VL humano del anticuerpo de dominio VL individual quimérico es un segmento de dominio V<sub>K</sub> o un segmento de dominio V<sub>λ</sub>. En algunas realizaciones, los segmentos de dominio CH2 y CH3 no humanos son segmentos de dominio C<sub>γ</sub>. En algunas realizaciones, el segmento de dominio JL

humano es un segmento de dominio  $J\kappa$  o un segmento de dominio  $J\lambda$ . En algunas realizaciones del anticuerpo de dominio VL individual quimérico el anticuerpo de dominio VL individual comprende un homodímero. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio VL individual comprende un heterodímero.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido. El polinucleótido comprende segmentos génicos VL, DH y JL humanos unidos operativamente a una bisagra de región C de cadena pesada no humana, CH2 y segmentos génicos CH3. El polinucleótido codifica un anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo a como se ha definido anteriormente.

10 En algunas realizaciones del polinucleótido el segmento génico VL humano es un segmento génico  $V\kappa$ . En algunas realizaciones el segmento génico VL humano es un segmento génico  $V\lambda$ . En algunas realizaciones, los segmentos génicos CH3 y CH2 no humanos son segmentos génicos  $C\mu$ , en los que el polinucleótido comprende opcionalmente segmentos génicos  $C\gamma$  o segmentos génicos  $C\delta$ . En algunas realizaciones, el segmento génico JL humano es un segmento génico  $J\kappa$ . En algunas realizaciones, el segmento génico JL es un segmento génico  $J\lambda$ . En algunas realizaciones el polinucleótido comprende además un elemento regulador *cis* no humano. En algunas realizaciones, el polinucleótido además comprende una región de cambio no humana, siendo opcionalmente la región de cambio no humana  $S\mu$ . En algunas realizaciones el polinucleótido además comprende un 3 LCR no humano. En algunas realizaciones, el polinucleótido además comprende un  $E\mu$  no humano.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una célula de mamífero no humano. La célula de mamífero no humano tiene un genoma que comprende segmentos génicos de VL humano, DH y JL unidos operativamente a una región C de cadena pesada no humana. La región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1. El genoma codifica un anticuerpo de dominio VL individual quimérico como se ha definido anteriormente.

25 En algunas realizaciones de la célula de mamífero no humano el segmento génico VL humano es un segmento génico  $V\kappa$ . En algunas realizaciones el segmento génico VL humano es un segmento génico  $V\lambda$ . En algunas realizaciones los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos son segmentos génicos  $C\gamma$ , en los que la célula además comprende opcionalmente segmentos génicos  $C\mu$  y/o segmentos génicos  $C\delta$ . En algunas realizaciones el segmento génico JL es un segmento génico  $J\kappa$ . En algunas realizaciones el segmento génico JL es un segmento génico  $J\lambda$ .

30 En otro aspecto la invención proporciona un kit para producir una célula de mamífero no humano, competente con la recombinación homóloga que tiene un genoma que codifica un anticuerpo de dominio VL individual quimérico como se ha definido anteriormente. El kit comprende una primera construcción y una segunda construcción. En una primera realización, el kit comprende una primera construcción que comprende un segmento génico VL, un primer sitio loxP y un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo del segmento génico VL y el primer sitio loxP, en la que el primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo son homólogas con respecto a un primer conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno esta ubicado bien en la región VH endógena o bien en posición 5' con respecto a la región VH endógena. El kit de la primera realización comprende una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, un segmento génico JL humano, una región C de cadena pesada no humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en la que la región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en la que el segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto al segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que el extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótido de flanqueo del segundo sitio loxP corresponde a una secuencia 3' de la mayoría del gen VH endógeno 3' y el de la secuencia 3' de polinucleótido de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría de segmento 3' génico de región constante del locus IgH endógeno. En el kit de la primera realización la primera construcción o la segunda construcción además comprenden un segmento génico DH humano. El segmento génico DH se encuentra entre el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP, o el segmento génico DH se encuentra entre el segundo sitio loxP y el segmento génico JL humano. En una segunda realización, el kit comprende una primera construcción que comprende un segmento génico VL humano, un segmento génico DH humano, un segmento génico JL humano, un primer sitio loxP y un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean el segmento génico VL y el primer sitio loxP, en el que el segmento génico DH se encuentra entre el segmento génico VL humano y el segmento génico JL humano. El primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo al primer conjunto de secuencias de ADN endógeno. El primer conjunto de secuencias de ADN endógeno está ubicado bien en la región VH endógena o bien en posición 5' con respecto a la región VH endógena. El kit de la segunda realización comprende una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, una región C de cadena pesada no humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquea la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP. La región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en el que el segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto a un segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno. El extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótido de flanqueo del segundo sitio

loxP corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del gen 3' VH endógeno y el extremo 5' de la secuencia 3' del polinucleótido de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico de región constante en el locus IgH endógeno.

5 En algunas realizaciones del kit la primera construcción comprende además un primer marcador de selección y/o identificación y la segunda construcción comprende un segundo marcador de selección y/o identificación.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un mamífero no humano que tiene un genoma que comprende segmentos génicos JL, DH, VL humanos unidos operativamente a una región C de cadena pesada no humana. La región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1. El mamífero es capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico como se ha definido anteriormente.

15 En algunas realizaciones del mamífero no humano, el segmento génico VL humano es un segmento génico Vκ o un segmento génico Vλ. En algunas realizaciones, los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos son segmentos génicos Cμ, comprendiendo opcionalmente además el genoma segmentos génicos Cγ y/o segmentos génicos Cδ. En algunas realizaciones, los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos son segmentos génicos Cμ. En algunas realizaciones el segmento génico JL es un segmento génico Jκ. En algunas realizaciones, el segmento génico JL es un segmento génico Jλ. En algunas realizaciones, el mamífero es un ratón.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula de hibridoma capaz de producir el anticuerpo de dominio VL individual quimérico que se ha definido anteriormente. El hibridoma procede del mamífero no humano que se ha definido anteriormente.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir una célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga que comprende un gen que codifica el anticuerpo de dominio VL individual quimérico que se ha definido anteriormente o un mamífero no humano capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico como se ha definido anteriormente. El procedimiento comprende además las etapas de

25 (A) proporcionar una primera construcción que comprende un segmento génico VL humano, un primer sitio loxP y un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean el segmento de gen VL y el primer sitio loxP, en el que el primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo al primer conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que el primer conjunto de secuencias de ADN endógeno está ubicado bien en una región de VH endógena o bien en posición 5' con respecto a una región de VH endógena; introducir la primera construcción en el interior de una célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga y bien:

(1) sustituir una parte de la región VH endógena con el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en el que dicha parte de la región VH endógena comprende la secuencia de ADN entre dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno y en el que dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico VL, o

35 (2) sustituir una parte de la secuencia 5' con respecto a la región VH endógena con el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en la que dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico VL humano y en posición 5' del primer segmento génico VH endógeno; proporcionar una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, un segmento génico JL humano, una región C de cadena pesada no humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en el que dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en el que el segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto al segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que el extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótidos de flanqueo del sitio loxP corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno y el extremo 5' de la secuencia 3' de polinucleótidos de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico de la región constante del locus IgH endógeno; introducir dicha segunda construcción en el interior de la célula y bien:

40 (1) sustituir una parte del locus 3' IgH endógeno de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno con el segmento génico JL humano, la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en el que dicha parte del locus IgH endógeno comprende la secuencia de ADN entre dicho segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno y en el que dicho segundo sitio loxP está en posición 5' del segmento génico JL humano o bien

(2) sustituir una parte de la secuencia 3' endógena de la mayoría del segmento 3' génico de región constante endógena, en el que el sitio loxP está en posición 5' del segmento génico JL humano.

55 en el que la primera construcción o la segunda construcción comprenden además un segmento génico DH humano y en el que el segmento génico DH está entre el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP o el segmento génico DH está entre el segundo sitio loxP y el segmento génico JL humano. El procedimiento además incluye las

etapas de

retirar la secuencia entre dicho primer sitio loxP y dicho segundo sitio loxP por medio de la CRE recombinasa y opcionalmente generar a partir de la célula un mamífero no humano capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico, o bien

- 5 (B) proporcionar una primera construcción que comprende un segmento génico VL humano, un segmento génico DH humano, un segmento génico JL humano, un primer sitio loxP, un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean el segmento génico VL y un primer sitio loxP, en el que el segmento génico DH está entre el segmento génico VL humano y el segmento génico JL humano, en el que dicho primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo a un primer conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno está ubicado bien en la región de VH endógeno o bien en posición 5' con respecto a la región de VH endógeno, introduciendo dicha primera construcción en el interior de una célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga y bien:

- 15 (1) sustituir una parte de la región VH endógena con el segmento génico VL humano, el segmento génico DH humano, el segmento génico JL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en el que dicha parte de la región VH endógena comprende la secuencia de ADN entre dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno y en el que dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico JL humano, o bien

- 20 (2) sustituir una parte de la secuencia 5' con respecto a la región VH endógena con el segmento génico VL humano, el segmento génico DH humano, el segmento génico JL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en la que dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico JL humano y en posición 5' del primer segmento génico VH endógeno, proporcionar una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, una región C de cadena pesada no humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en el que dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en el que dicho segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto al segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que el extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótido de flanqueo del segundo sitio loxP corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno y el extremo 5' de la secuencia 3' de polinucleótidos de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico de la región constante del locus IgH endógeno; introducir dicha segunda construcción en el interior de la célula y bien:

- 35 (1) sustituir una parte del locus 3' IgH endógeno de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno con la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en el que dicha parte del locus IgH endógeno comprende la secuencia de ADN entre dicho segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno y en el que dicho segundo sitio loxP está en posición 5' de la región C de cadena pesada, o bien

(2) sustituir una parte de la secuencia 3' endógena de la mayoría del segmento 3' génico de región constante endógena, en la que dicho sitio loxP está en posición 5' de la región C de cadena pesada no humana,

- 40 retirando la secuencia entre el primer sitio loxP y el segundo sitio loxP por medio de CRE recombinasa y opcionalmente generando a partir de la célula un mamífero no humano de knock-in capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico.

En algunas realizaciones del procedimiento la primera construcción además comprende un primer marcador de selección y/o identificación y la segunda construcción comprende un segundo marcador de selección y/o identificación.

- 45 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar un antígeno diana. El procedimiento comprende detectar el anticuerpo de dominio VL individual quimérico definido anteriormente con un agente de detección secundario que reconoce una parte del anticuerpo de dominio VL individual. Opcionalmente, la parte comprende un dominio constante del anticuerpo de dominio VL individual.

### Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos

- 50 La Figura 1 ilustra la composición de un anticuerpo dímero convencional (izquierda) que comprende cadenas Ig ligera y pesada y un anticuerpo de dominio V individual de camélido dímero (derecha) que comprende solo cadenas pesadas.

- 55 La Figura 2 muestra una primera etapa de una modificación de un locus IgH de ratón para codificar un anticuerpo de dominio VL individual que comprende un dominio VL humano. Las regiones VL humanas y el sitio loxP transportado por la construcción se introducen en el locus IgH por medio de recombinación homóloga y como resultado se sustituye una parte de las regiones de VH de ratón. La combinación de genes V y J puede ser cualquiera de las

alternativas presentadas. La combinación de los genes S y C puede ser cualquiera de las alternativas presentadas. En todos los genes C se ha eliminado CH1.

5 La Figura 3 ilustra la recombinación homóloga de dos BAC (BAC-1 y BAC-2) en *E. coli*. BAC-1 transporta los segmentos de ADN A-D y un gen de resistencia frente a canamicina. BAC-2 transporta los segmentos de ADN D-G y un gen resistente a ampicilina. Tras resolución, BAC recombinado (BAC-3) transporta los segmentos de ADN A-G.

10 La Figura 4 muestra una segunda etapa de la modificación de locus IgH de ratón para codificar un anticuerpo de dominio VL individual que comprende un dominio VL humano. Los dominios DH humano, J humano y C de ratón y un sitio loxP transportado por la construcción se introducen en el locus IgH de ratón por medio de recombinación homóloga y como resultado se sustituyen las regiones DH, JH y C de ratón. La recombinación de los genes V y J puede ser cualquiera de las alternativas presentadas. La combinación de los genes S y C puede ser cualquiera de las alternativas presentadas. En todos los genes C se ha eliminado CH1.

15 La Figura 5 muestra una tercera etapa de la modificación de locus IgH de ratón para codificar un anticuerpo de dominio VL individual que comprende un dominio VL humano. Las regiones VH de ratón que quedan se eliminan por medio de recombinación específica de sitio de CRE recombinasa en los dos sitios loxP introducidos en las dos primeras etapas (Figs. 2 y 4).

Las Figuras 6a y 6b ilustran seis regiones de dominio VL humanas ejemplares para un anticuerpo de dominio VL individual quimérico. Como se muestra, las regiones VL pueden ser V $\kappa$  o V $\lambda$  y las regiones J pueden ser J $\kappa$ , JH o J $\lambda$ .

20 La Figura 7 ilustra cuatro regiones constantes de ratón ejemplares para un anticuerpo de dominio VL individual quimérico. Como se muestra, la región C de cadena pesada de ratón puede inducir elementos reguladores *cis* (por ejemplo, E $\mu$  y/o 3'LCR), regiones de cambio (por ejemplo, S $\mu$  y/o S $\gamma$ ), regiones bisagra (por ejemplo, C $\mu$ , C $\delta$  y/o C $\gamma$ ) y dominios CH diferentes de CH1 (por ejemplo, C $\mu$ , C $\delta$  y/o C $\gamma$ ).

La Figura 8 muestra una configuración ejemplar de un locus de anticuerpo de dominio VL individual sometido a modificación y la correspondiente estructura de anticuerpo de dominio VL individual que tiene un dominio VL humano unido a una región C de cadena pesada de ratón.

## 25 Descripción detallada

Antes de describir determinadas realizaciones con detalle, debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es solo con fines de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención vendrá solo determinado por las reivindicaciones adjuntas.

30 Según se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique expresamente lo contrario. De este modo, por ejemplo, las referencias a una "proteína" incluyen una o más proteínas y/o composiciones del tipo descrito en la presente memoria que resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la presente descripción y similares.

35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que se comprende comúnmente por parte del experto ordinario en la técnica a la que pertenece la presente invención. Se pueden usar cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o en el ensayo de la invención, ya que se comprende que las variaciones y modificaciones quedan englobadas dentro del espíritu y alcance de la presente descripción.

40 Según se usa en la presente memoria, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (Ig) se refiere a moléculas de polipéptido producidas por células B que reconocen y se unen a antígenos específicos y que bien están unidas a membrana o son segregadas por la membrana. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, cuando se producen por un único clon de células B y por tanto reconocen el mismo epítipo, o policlonales, cuando reconocen uno o más epítipos del mismo antígeno. "Anticuerpo" o "inmunoglobulina" (Ig) también pueden incluir moléculas generadas *in vitro* procedentes de dominios variables naturales o sometidos a modificación o sus partes aisladas a partir de células B y posteriormente mostrados por medio de un huésped recombinante, por ejemplo, "bibliotecas" de anticuerpos mostradas en bacteriófagos, ribosomas, *E. coli*, levaduras, células de mamíferos sometidas a cultivo y similares.

45 Las moléculas de anticuerpo, o Ig, normalmente están formadas por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas unidas juntas a través de enlaces disulfuro. Ambas cadenas pesadas (IgH) y cadenas ligeras (IgL) contienen un dominio o región variable (V) o y un dominio o región constante (C). La región IgH V (VH) comprende copias múltiples de segmentos génicos variables (V), diversidad (D) y unión (J). La región IgL V (VL) comprende copias múltiples de segmentos génicos V y J. Las regiones VH y VL experimentan re-ordenación génica, por ejemplo, diferentes combinaciones de segmentos génicos se ordenan para formar las regiones IgH y IgL V, con el fin de desarrollar una especificidad de antígeno diferente en los anticuerpos. La región IgH C (CH) está formada por tres o cuatro dominios C (CH1, CH2, CH3 y opcionalmente CH4) y una región de bisagra. La región constante IgH determina el isotipo del anticuerpo, por ejemplo, IgM, IgA, IgE, IgD, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Debe apreciarse que

los mamíferos no humanos que codifican isotipos Ig múltiples serán capaces de experimentar cambio de clase de isotipo. Existen dos tipos de cadenas ligeras, Ig $\kappa$  e Ig $\lambda$ .

"Anticuerpo de cadena individual" y "anticuerpo de dominio variable individual" (anticuerpo SVD) se refieren bien a un monómero o bien a un dímero de una cadena Ig individual que tiene un dominio V y un dominio C. En particular, "anticuerpo de dominio VL individual" o "anticuerpo SVLD" se refiere a un anticuerpo SVD en el que el dominio V procede de una cadena ligera de Ig. En realizaciones preferidas, el anticuerpo SVLD está desprovisto de un dominio CH1. En otra realización, el dominio V procede de Ig $\kappa$ . Se puede usar un anticuerpo de SVLD o moléculas que comprenden uno de sus derivados, por ejemplo, una región variable aislada, con fines terapéuticos o se pueden marcar o identificar con moléculas tales como un agente citotóxico, un isótopo radioactivo, o fluoróforo para varias aplicaciones in vivo o ex vivo, tales como terapia de enfermedades de conjugado anticuerpo-fármaco, radioinmunoterapia e inmunohistoquímica.

Según se usa en la presente memoria, "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo sometido a translación a partir de una secuencia de polinucleótidos que contiene secuencias de polinucleótidos procedentes de diferentes cadenas de Ig. Las secuencias de polinucleótidos pueden proceder de especies diferentes. Un anticuerpo "humanizado" es uno que se produce por parte de una célula no humana o mamífero y comprende secuencias humanas. Los anticuerpos SVLD humanizados de la presente invención se pueden usar a partir de un mamífero no humano knock-in sometido a modificación para producir moléculas de anticuerpo SVLD humanizado. Los anticuerpos SVLD humanizados de la presente invención se pueden aislar a partir de un mamífero no humano que porta un transgén sometido a modificación para producir moléculas de anticuerpo SVLD humanizado. Los anticuerpos SVLD humanizados de la presente invención se pueden aislar bien a partir de un mamífero no humano knock-in sometido a modificación para producir moléculas de anticuerpo de SVLD humanizado o bien a partir de un mamífero no humano que porta un transgén integrado en un sitio diferente del locus Ig endógeno y sometido a modificación para producir moléculas de anticuerpo SVLD humanizado. En cualquier caso, se pueden inactivar uno o más locus Ig endógenos. Los anticuerpos SVLD humanizados son menos inmunogénicos en seres humanos cuando se comparan con los anticuerpos de solo cadenas ligeras o de solo cadenas pesadas preparados a partir de otras especies, por ejemplo, camello. Además, un anticuerpo SVLD humanizado puede comprender la región variable humana de un anticuerpo quimérico anexado a una región constante humana para producir un anticuerpo completamente humano.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable para describir una cadena de aminoácidos que se unen juntos por medio de enlaces químicos. Un polipéptido o proteína puede ser un anticuerpo, IgH, IgL, dominio V o uno de sus segmentos.

"Polinucleótido" se refiere a una cadena de ácidos nucleicos que están unidos juntos por medio de enlaces químicos. Polinucleótidos incluyen, pero sin limitarse a, ADN, ADNc, ARN, ARNm y secuencias de genes y segmentos.

"Locus" se refiere a una ubicación de un cromosoma que comprende uno o más genes, tal como un locus IgH o Ig $\kappa$ , los elementos reguladores *cis* y las regiones de unión a las que se unen los factores que actúan en *trans*. Según se usa en la presente memoria, "gen" o "segmento génico" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido específico o una de sus partes, tal como un dominio VL, un dominio CH2 o una región bisagra.

El término "endógeno" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que aparece de forma natural dentro de la célula o animal. "Ortólogo" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido correspondiente en otras especies, es decir, un dominio CH2 humano y un dominio CH2 de ratón. El término "singénico" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se encuentra en las mismas especies que se puede introducir en un animal de la misma especie, es decir, un segmento génico CH2 de ratón introducido en un locus IgH de ratón.

Según se usa en la presente memoria, el término "homólogo" o "secuencia homóloga" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que tiene una secuencia altamente similar, o un porcentaje de identidad elevado (por ejemplo, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) con respecto a otra secuencia de polinucleótidos o uno de sus segmentos. Por ejemplo, una construcción de ADN de la invención puede comprender una secuencia que sea homóloga a una parte de una secuencia de ADN endógena para facilitar la recombinación en una ubicación específica. La recombinación homóloga puede tener lugar en células procariotas o eucariotas.

Según se usa en la presente memoria, la "secuencia de flanqueo" o la "secuencia de ADN de flanqueo" se refieren a una secuencia de ADN adyacente a la secuencia de ADN no endógeno de una construcción de ADN que es homóloga a una secuencia de ADN endógena o a una secuencia no endógena previamente recombinada, o a una de sus partes. Las construcciones de ADN de la invención pueden tener una o más secuencias de flanqueo, por ejemplo, una secuencia de flanqueo sobre el extremo 3' y 5' de la secuencia no endógena o una secuencia de flanqueo sobre el extremo 3' o 5' de la secuencia no endógena.

La frase "célula competente con la recombinación homóloga" se refiere a una célula que es capaz de recombinar, de forma homóloga, fragmentos de ADN que contienen regiones de homología de solapamiento. Ejemplos de células competentes con la recombinación homóloga incluyen, pero sin limitarse a, células pluripotenciales inducidas, células pluripotenciales hematopoyéticas, bacterias, levaduras, varias estirpes celulares y células pluripotenciales

embrionarias (ES).

La expresión "organismo no humano" se refiere a procariontes y eucariontes, incluyendo plantas y animales. Las plantas de la invención incluyen, pero sin limitarse a, maíz, soja y trigo. Los animales no humanos incluyen, pero sin limitarse a, insectos, aves, reptiles y mamíferos.

5 "Mamífero no humano" se refiere a un animal diferente del ser humano que pertenece a la clase de los mamíferos. Ejemplos de mamíferos no humanos incluyen, pero sin limitarse a, primates no humanos, roedores, bovinos, camélidos, ovinos, equinos, perros, gatos, cabras, delfines, murciélagos, conejos y marsupiales. Un mamífero no humano preferido está basado principalmente en la conversión génica y/o la hipermutación somática para generar diversidad de anticuerpos, por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo, cerdo, oveja, cabra y vaca. Mamíferos no  
10 humanos particularmente preferidos son ratones.

El término "knock-in", "sometido a modificación genética" y "transgénico" se usan de manera intercambiable en la presente memoria y se refieren a un animal o célula no humana que comprende una secuencia de polinucleótidos, por ejemplo un transgén, procedente de otras especies incorporadas en su genoma. Por ejemplo, un ratón que contiene un segmento génico VL humano integrado en su genoma fuera del locus IgL de ratón endógeno es un ratón transgénico o knock-in; un ratón que contiene un segmento génico VL humano integrado en su genoma que  
15 sustituye un VL de ratón endógeno en el locus IgL de ratón endógeno es un ratón knock-in. En las células knock-in y mamíferos no humanos, la secuencia de polinucleótidos procedente de otras especies puede sustituir a la secuencia endógena correspondiente, u ortólogo, que se encuentra originalmente en la célula o en el mamífero no humano.

Una animal "humanizado", según se usa en la presente memoria se refiere a un animal no humano, por ejemplo, un ratón, que tiene una estructura genética compuesta que conserva secuencias génicas del ratón u otro animal no humano, además del o de los segmentos génicos y/o secuencias reguladoras génicas de la configuración genética original que ha sido sustituida por secuencias humanas análogas.

Según se usa en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico en la que se puede integrar otro fragmento de ácido nucleico sin pérdida de la capacidad de replicación del vector. Los vectores se pueden originar a partir de un virus, plásmido o de la célula de un organismo superior. Los vectores se utilizan para introducir ADN ajeno en una célula huésped, en la que el vector se replica.

Un vector puede contener un agente de polinucleótido, que puede facilitar la manipulación del polinucleótido, incluyendo la introducción del polinucleótido en la célula diana. El vector puede ser un vector de clonación, que es útil para mantener el polinucleótido, o puede ser un vector de expresión, que contiene, además del polinucleótido, elementos reguladores útiles para la expresión del polinucleótido y en el que el polinucleótido codifica un péptido, para expresar un péptido codificado en una célula particular. Un vector de expresión puede contener elementos de expresión necesarios para lograr, por ejemplo, una transcripción retardada del polinucleótido de codificación, o los elementos reguladores se pueden unir operativamente al polinucleótido antes de ser clonados para dar lugar al vector.

35 Generalmente, un vector de expresión (o el polinucleótido) contiene o codifica una secuencia de promotor, que puede proporcionar una expresión constitutiva o, si se desea, inducible o específica de tejido o específica de etapa de desarrollo del polinucleótido de codificación, una secuencia de reconocimiento poli-A y un sitio de reconocimiento de ribosoma o un sitio de entrada interna de ribosoma u otros elementos reguladores tales como un potenciador, que pueden ser específicos de tejido. El vector también puede contener elementos necesarios para la replicación en un sistema huésped procarionte y eucarionte o en ambos, según se desee. Dichos vectores, que incluyen vectores de plásmido y vectores víricos tales como bacteriófagos, baculovirus, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus vacina y alfa virus y vectores asociados a adenovirus, se conocen bien y se pueden adquirir a partir de una fuente comercial (Promega, Madison, Wis; Stratagen, La Jolla Calif.; GIBCO/BRL, Gaithersburg Md.) o pueden ser construidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Meth. Enzymol. Vol. 185, Goeddel, ed. (Academic Press, Inc. 1990); Jolly, Canc. Gene Ther. 1:51-64, 1994; Flotte, J. Bioenerg. Biomemb 25:37-42, 1993; Kirshenbaum y col., J. Clin. Invest 92:381-387, 1993).

Un vector de ADN utilizado en el procedimiento de la invención puede contener marcadores de selección positivos y negativos. Los marcadores positivos y negativos pueden ser genes que cuando se expresan confieren resistencia a fármacos a las células que expresan estos genes. Marcadores de selección apropiados pueden incluir, pero sin limitarse a: Km (gen resistente a canamicina), tetA (gen resistente a tetraciclina) y G418 (gen resistente a neomicina). Estos marcadores de selección también pueden ser genes metabólicos que pueden convertir una sustancia en una sustancia tóxica. Por ejemplo, la timidina cinasa génica cuando se expresa convierte el fármaco ganciclovir en un producto tóxico. De este modo, el tratamiento de las células con ganciclovir puede afectar negativamente a los genes que no expresan la timidina cinasa.

55 En un aspecto relacionado, los marcadores de selección pueden ser "marcadores identificables", tales como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteínas de tipo GFP y luciferasa.

Diversos tipos de vectores se encuentran disponibles en la técnica y pueden incluir, pero sin limitarse a, vectores bacterianos, víricos y de levaduras. Un vector de ADN puede ser cualquier vector de ADN apropiado, incluyendo un plásmido, cósmido, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) o cromosoma artificial procedente de p1 (PAC). En determinadas realizaciones, el vector de ADN es un BAC. Los diferentes vectores de ADN se escogen como apropiados por el tamaño del ADN insertado en la construcción. En una realización, las construcciones de ADN son cromosomas artificiales bacterianos o sus fragmentos.

La expresión "cromosoma artificial bacteriano" o "BAC" según se usa en la presente memoria se refiere a un vector de ADN bacteriano. En determinadas realizaciones preferidas la invención proporciona un sistema de clonación BAC. Los BAC, tales como aquellos derivados de *E. coli*, se pueden utilizar para introducir, eliminar o sustituir secuencias de ADN de células no humanas u organismos por medio de recombinación homóloga. El vector, pBAC, basado en el factor-F de plásmido de copia individual de *E. coli* puede mantener el ADN genómico complejo tan grande como 350 kb y más grande en forma de BAC (véase Shizuya y Kouros-Mehr, *Keio J Med* 2001, 50(1):26-30). Los análisis y la caracterización de miles de BAC indican que los BAC son mucho más estables que los cósmidos o los YAC. Además, la evidencia sugiere que los clones de BAC representan el genoma humano de manera mucho más precisa que los cósmidos o los YAC. Los BAC se describen con más detalles en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.ºs 10/659.034 y 61/012.701. Debido a esta capacidad y estabilidad del ADN genómico en *E. coli*, ahora se usan los BAC ampliamente por parte de muchos científicos en tareas de secuenciación así como en estudios de genómica y genómica funcional. Debido a su estabilidad genética superior con respecto a los vectores tales como YAC y a su capacidad superior para acomodar tamaños de inserto muy grandes con respecto a los vectores tales como plásmidos, los BAC son un vector preferido para la clonación y manipulación de ADN del locus de inmunoglobulina.

Se han aislado fragmentos de ADN que contenían un locus Ig a incorporar en el mamífero no humano a partir de especies de mamíferos y de humanos antes de la humanización del locus. Las bibliotecas genómicas basadas en BAC procedentes de especies que incluyen humanos y ratón se encuentran disponibles a nivel comercial. Se han caracterizado muchas bibliotecas de BAC disponibles de manera que se han establecidos mapeos de BAC individuales para dar lugar a solapamientos contiguos que abarcan el locus Ig. Además, los BAC que abarcan el locus Ig se pueden identificar por medio de consulta en las bibliotecas con sondas específicas. Se pueden generar fácilmente dichas sondas específicas de Ig por medio de procedimientos conocidos en la técnica tales como PCR. Se han secuenciado los locus de Ig humano y de ratón y la información es de dominio público, lo que permite un diseño apropiado de cebadores para la amplificación de PCR de regiones de Ig específicas. Tras la recuperación de BAC que abarcan el locus Ig, se puede establecer un mapeo de los BAC para dar lugar a solapamientos usando técnicas normalizadas tales como mapeo de fragmento de restricción, secuenciación terminal, etc. Los BAC que se solapan se pueden recombinar de manera adicional en *E. coli* para generar fragmentos continuos más grandes del locus Ig. Los BAC que portan partes del locus Ig procedentes de diferentes especies se pueden recombinar para crear un mamífero de parte humana, por ejemplo, una región V, D y J y una parte de mamífero no humano, por ejemplo, una región C de ratón. El locus Ig quimérico resultante comprende segmentos génicos humanos unidos operativamente a los segmentos génicos Ig de mamífero no humano para producir un locus Ig funcional, en el que el locus es capaz de experimentar reordenación génica, expresión, mostrarse en superficie, señalización y secreción y de este modo producir un repertorio diversificado de anticuerpos SVD quiméricos.

Se puede llevar a cabo una primera etapa de recombinación en una cepa de *E. coli* que es deficiente de actividad *sbcb*, *sbcc*, *recB*, *recC* o *recD* y tiene una mutación sensible a la temperatura en *recA*. Tras la etapa de recombinación, se aísla una construcción de ADN recombinado, presentando la construcción las diferentes secuencias y orientaciones que se han descrito.

Las regiones usadas para la recombinación de BAC deberían presentar una longitud que permita la recombinación homóloga. Por ejemplo, las regiones de flaqueo pueden ser de aproximadamente 0,1 a 19 kb y normalmente de aproximadamente 1 kb a 15 kb, o de aproximadamente 2 kb a 10 kb.

Es posible someter a modificación, de manera individual, un locus Ig completo que contiene, en unión operativa, uno o más genes de región V, opcionalmente uno o más genes de región D, uno o más genes de región J, al menos un gen de región constante incluyendo los exones de la membrana y las regiones intracelulares y los elementos reguladores cis tales como potenciadores, por ejemplo, regiones de control de locus 3',  $E_{\mu}$  para un locus IgH, MAR y opcionalmente una región de cambio, dos de los cuales se requieren aguas arriba de dos o más regiones constantes para la recombinación de cambio de clase del transgén. Se podría usar dicho BAC para la micro-inyección pronuclear con el fin de preparar un transgén al azar insertado, someterlo a transfección para dar lugar a ES u otros tipos de células para inserción aleatoria, o anejarlo con secuencias de dirección a partir del genoma del animal no humano con el fin de conducir la inserción de homólogos, es decir dirigida, al interior del genoma, por ejemplo, sustituyendo todo o parte del locus Ig ortólogo endógeno. Se podrían usar las células ES con inserción aleatoria o dirigida de dicho transgén para generar ratones transgénicos. Se podría usar el núcleo de la célula ES u otro tipo de células para derivar animales clonados.

El procedimiento para recombinar BAC para preparar BAC más grandes y/o adaptados que comprenden partes del locus Ig requiere que una célula bacteriana, tal como *E. coli*, se transforme con un BAC que porte un primer locus Ig,

una de sus partes, o alguna otra secuencia de diana. El BAC que contiene *E. coli* se transforma posteriormente con un vector de recombinación (por ejemplo, un plásmido o BAC) que comprende el segmento génico Ig deseado para ser introducido en el ADN diana, por ejemplo, un dominio V $\kappa$  humano que se ha de unir a una región del locus IgH de ratón, presentando ambos vectores una región de identidad de secuencia. Esta región compartida de identidad en presencia de recA funcional en *E. coli* actúa de mediadora del entrecruzamiento entre el segmento génico Ig del vector de recombinación y el segmento génico Ig del mamífero no humano del BAC. La selección y la resolución de BAC homogéneamente recombinados pueden utilizar marcadores que se puede escoger y/o identificar incorporados en los vectores. Se pueden purificar fácilmente los BAC humanizados y de ratón-humano quimérico a partir de *E. coli* y se pueden usar para producir células no humanas transgénicas y knock-in y animales por medio de la introducción de ADN siguiendo varios procedimientos conocidos en la técnica y seleccionando y/o identificando los eventos de integración ya sean aleatorios o dirigidos.

El término "construcción" según se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de ADN, creado artificialmente por medio de ingeniería genética o recombinación. En una realización, las construcciones de ADN se someten a linealidad antes de la recombinación. En otra realización, las construcciones de ADN no se someten a linealidad antes de la recombinación.

Según se usa en la presente memoria, loxP y CRE se refieren a un sistema de recombinación de sitio específico procedente del bacteriófago P1. Los sitios loxP son secuencias de 34 nucleótidos. Cuando el ADN está flanqueado en un lado por un sitio loxP y se expone a recombinación mediada por CRE, se elimina el ADN que interviene y los dos sitios loxP se resuelven en uno. El uso del sistema CRE/lox, incluyendo los sitios lox de secuencia variable, para ingeniería genética en muchas especies, incluyendo ratones, está bien documentado. Se puede emplear un sistema similar, que emplea sitios frt y recombinasa flp procedente de *S. cerevisiae*, con resultados similares en células de cultivo. Según se usa en la presente memoria, cualquier implementación de CRE/loxP para mediar los episodios de eliminación en células de mamíferos de cultivo también puede estar mediada por el sistema flp/frt.

Según se usa en la presente memoria, "inmunizar" o "inmunización" o "inmunizante" se refieren a la exposición del sistema inmunológico adaptativo de un animal a un antígeno. Se puede introducir el antígeno usando varias rutas de administración, tales como inyección, inhalación o ingestión. Tras una segunda exposición al mismo antígeno, se mejora la respuesta inmunológica adaptativa, es decir, la respuesta de las células T y células B.

"Antígeno" se refiere a un péptido, polisacárido, lípido o polinucleótido que se reconoce por parte del sistema inmunológico adaptativo. Ejemplos de antígenos incluyen, pero sin limitarse a, componentes de la pared celular bacteriana, polen y factor rh. "Antígeno diana" se refiere a un antígeno de péptido, lípido, polisacárido o polinucleótido que se reconoce por parte del sistema inmunológico y que se escoge para producir una respuesta inmunológica frente a un agente infeccioso específico, molécula extra-celular o molécula intra-celular o molécula objeto de detección bien in vivo o ex vivo. El listado de posibles antígenos diana es amplio e incluyen, pero sin limitarse a, componentes bacterianos y víricos, antígenos específicos de tumores, citocinas y receptores de la superficie celular.

La expresión "sustancia farmacéutica" o "fármaco farmacéutico" según se usa en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia farmacológica, sustancia terapéutica o agente biológico activo que se puede administrar a un sujeto o paciente. En determinadas realizaciones el sujeto es un animal y preferentemente un mamífero, del modo más preferido un ser humano.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere generalmente a cualquier material que puede acompañar al fármaco farmacéutico que no provoca una reacción adversa en el sistema inmunológico del sujeto.

El término "administrar", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier modo de transferir, suministrar, introducir o transportar un fármaco farmacéutico u otro agente, tal como un antígeno diana, a un sujeto. Dichos modos incluyen, pero sin limitarse a, administración tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal y subcutánea.

La presente invención describe anticuerpos SVLD y un procedimiento para producir una célula de mamífero no humano componente de recombinación homóloga que comprende un genoma que codifica el anticuerpo de dominio VL individual quimérico que se ha definido anteriormente. Los anticuerpos de cadena individual que comprenden un dominio VL en lugar de un dominio VH o VHH son un tipo enteramente nuevo de anticuerpos con nuevos repertorios de diversidad.

### Organismos transgénicos

Se pueden producir organismos transgénicos por medio de procedimientos de introducción directa de ADN, tales como micro-inyección, en el interior de células de embriones en desarrollo tanto de plantas como de animales. También se pueden generar organismos transgénicos por medio de la introducción de ADN en el interior de células sometidas a cultivo usando las células para derivar animales a través de procedimientos conocidos en la técnica, tales como por medio de micro-inyección de células pluripotenciales embrionarias para dar lugar a blastocitos o clonación. La incorporación de marcadores de selección con el ADN introducido aumenta la eficacia permitiendo el

enriquecimiento de las células que incorporan al ADN ajeno. Los animales transgénicos de la invención incluyen, pero sin limitarse a, insectos, aves, reptiles y mamíferos no humanos. En realizaciones particulares, el mamífero no humano es un ratón.

5 En una realización, se describe un procedimiento para producir un célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga que incluye generar una construcción de ADN quimérico que comprende uno o más segmentos de dominio VL humano, uno o más segmentos de dominio DH humano, uno o más segmentos de dominio J genómico humano, al menos una región C de cadena pesada no humana que carece sustancial o completamente de un segmento de dominio CH1 y que incluye una bisagra, un CH2 y un segmento de dominio CH3 (y CH4 para C $\mu$ ) y opcionalmente uno o más exones para las regiones de la membrana y las regiones intracelulares y elementos reguladores cis tales como una región de cambio, potenciadores, por ejemplo regiones de control de locus 3', E $\mu$  para un locus IgH, MARs. Si existen una o más regiones C que se recombinan por medio de recombinación de cambio de clase, por ejemplo C $\mu$  hasta C $\gamma$ , entonces las regiones S $\mu$  y S $\gamma$  estarán en unión operativa con la región C que codifica las secuencias. En una realización preferida, la región de aguas abajo de la mayoría de la región 3' J de ortólogo y a través de C $\mu$  estará en configuración de línea germinal. La región de control de locus 3'(LCR) se anexará aguas abajo de los exones de la región 3'C. Los procedimientos para la inactivación del exón CH1 incluyen la eliminación de todos los exones o sus partes funcionales.

Se introducirá la construcción anterior en una célula ES animal no humana y posteriormente se introducirá la célula ES en un blastocito de un animal no humano, produciéndose de este modo un blastocito quimérico, e implantando el blastocito quimérico en una animal no humano pseudo-preñado, de manera que el animal no humano pseudo-preñado proporciona un animal no humano humanizado quimérico que genera un anticuerpo SLVD. Se reproduce el animal quimérico para generar descendencia transgénica que produciría el anticuerpo SLVD. En un aspecto, la construcción de ADN comprende ADN genómico de línea germinal humana, en el que el ADN genómico de línea germinal codifica los segmentos génicos VL, DH y JH o JL. En otro aspecto, se logra la introducción en el interior del genoma por medio de integración aleatoria. En un aspecto relacionado, la inserción aleatoria se puede llevar a cabo por medio de inyección pronuclear. La inyección pronuclear es el procedimiento más común usado para crear ratones transgénicos. Este procedimiento implica recoger huevos fertilizados en la etapa celular individual. Durante una breve ventana de tiempo, los pronúcleos que contienen el material genético procedentes de la cabeza de espermia y el huevo son visibles dentro del protoplasma. En esta etapa, se inyecta una construcción de ADN sometido a linealidad en el interior de uno de los pronúcleos. Posteriormente, los huevos inyectados se transfieren al interior de los oviductos de un ratón de acogida pseudo-preñado. Generalmente, de 10 a 20 % de las crías nacidas de madres de acogida ha integrado el ADN inyectado en sus genomas, convirtiéndose de este modo en transgénicos. Cada cría es un ratón de acogida único, ya que el ADN se integra al azar en el genoma. Se pueden co-inyectar dos o más construcciones diferentes y se producirá la co-integración. A una frecuencia relativamente elevada, las construcciones se co-integrarán con la orientación deseada para que se produzca la unión de forma operativa. De este modo, es posible co-inyectar una construcción de ADN que porta un repertorio de genes VL humanos con una construcción de ADN que porta J, DH humano y genes de región constante no humanos, estando sustancialmente todo el exón CH1 eliminado y con elementos reguladores cis y cabría esperar que las dos construcciones se co-integraran para producir un transgén VL-DH-J-C unido de forma operativa.

En otro aspecto, el procedimiento incluye recombinar una primera construcción de ADN que incluye secuencias de ADN humanizado, flanquear las secuencias de ADN homólogas a las secuencias endógenas en la células objeto de transformación, de manera que una o más secuencias codifiquen uno o más marcadores de selección y clonar el ADN de vector. En un aspecto, las secuencias de ADN de flanqueo sirven como secuencia de sustrato para la recombinación homóloga con secuencias de ADN endógeno presentes en las células dianas componentes con la recombinación homóloga tal como las células pluripotenciales embrionarias. En otro aspecto, se clona una construcción de ADN en un vector BAC y puede incluir genes para receptáculos de expresión de marcadores aptos para identificación y selección tales como YFP, GFP, RFP, G418 y resistencia a higromicina y secuencias humanas flanqueadas por secuencias de animal no humano que son homólogas con respecto a las secuencias de animales no humanos endógenos.

Las regiones que flanquean las secuencias de ADN humanizado y sometido a modificación a introducir en la invención deberían presentar una longitud que permita la recombinación homóloga. Por ejemplo, en células ES de ratón, la longitud mínima de la región de flanqueo es de aproximadamente 1-2 kb para una frecuencia de recombinación aceptable. Se puede usar una longitud menor de región de flanqueo; no obstante, puede dar como resultado una frecuencia de recombinación más baja. Se pueden usar longitudes de región de flanqueo, por ejemplo, de aproximadamente 5-10 kb, aproximadamente 10-20 kb, aproximadamente 20-50 kb o más y pueden dar como resultado una frecuencia de recombinación más elevada.

Para la recombinación homóloga, se somete la construcción se hace lineal antes de la recombinación. Cuando la construcción contiene un marcador de selección, las células animales no humanas que no reciben la construcción se pueden eliminar. Desde el punto de vista de la introducción diana, se escogen los marcadores de selección que se colocan dentro de la secuencia de ADN que se somete a recombinación homóloga para dar lugar al genoma. Después de la recombinación homóloga se deberían perder los marcadores de selección ubicados sobre los extremos de las secuencias usadas para el procedimiento de dirección dentro del genoma y por tanto pueden ser

5 marcadores de selección negativos. Se puede confirmar la recombinación homóloga detectando la alteración del locus diana endógeno por medio de procedimientos cualitativos tales como ensayos de inmunotransferencia de Southern para evaluar el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, cambios en el tamaño del fragmento PCR a través de la unión por integración etc. o por medio de procedimientos cuantitativos para detectar la pérdida del carácter de homocigoto del locus nativo, por ejemplo, qPCR.

10 Se pueden usar las células ES diana para generar los animales no humanos quiméricos de la invención por medio de procedimientos normalizados en la técnica, tales como micro-inyección directa para dar lugar a un blastocito de un animal no humano o agregación de mórula. Los blastocitos inyectados o las mórulas agregadas se pueden introducir posteriormente en un animal huésped pseudo-preñado para generar un animal no humano humanizado quimérico para el huésped y las células introducidas. Posteriormente, se reproducen los ratones quiméricos para producir descendencia transgénica.

15 Se pueden usar dichos procedimientos con cualquier animal no humano para el que se encuentran disponibles células ES. En una realización, las células ES son células ES de ratón, el animal no humano es un ratón y los procedimientos de la invención se usan para crear un ratón humanizado.

Se puede usar el procedimiento de la invención con cualquier animal no humano para el que se pueden cultivar células in vitro y para el que se encuentre disponible un procedimiento de clonación. Dichos animales incluyen ovejas, cabras, vacas, ratones, cerdos, gatos, conejos, macaco de la India, rata y perro.

### Anticuerpos

20 Se pueden inmunizar los animales que portan locus modificado con antígenos diana usando varias técnicas conocidas en la materia. Se pueden seleccionar antígenos diana para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno particular, tal como varios tipos de cáncer, injerto frente a enfermedad de huésped, enfermedad cardiovascular y trastornos asociados, enfermedades neurológicas y trastornos, trastornos autoinmunitarios e inflamatorios e infecciones por patógenos. En otras realizaciones, se pueden seleccionar los antígenos diana para desarrollar un anticuerpo SVLD que resultaría útil como agente de diagnóstico para la  
25 detección de uno de los trastornos o enfermedades anteriores.

Se pueden recuperar repertorios específicos de antígeno a partir de ratones inmunizados por medio de tecnología de hibridoma, RT-PCR de célula individual para células B escogidas, por medio de tecnologías de exhibición de anticuerpos y otros procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para recuperar anticuerpos SVLD a partir de hibridomas procedentes de ratón, se segrega un anticuerpo SVLD de VL humano-bisagra de ratón+CH2+CH3 en el sobrenadante del cultivo y se puede purificar por medios conocidos en la técnica tales como cromatografía en columna usando proteína A o proteína G. Se puede usar dicho anticuerpo SVLD purificado para el ensayo posterior y la caracterización del anticuerpo con el fin de determinar la potencia in vitro e in vivo, la afinidad, el epítipo, etc.  
30

Además, debido a que se puede detectar con reactivos de detección de región constante anti-ratón, el anticuerpo SVLD de VL humano-bisagra de ratón- CH2-CH3 puede resultar útil para ensayos de inmunología de tejidos humanos con el fin de evaluar la distribución de tejidos y la expresión del antígeno diana. Esta característica de los anticuerpos quiméricos de la presente invención permite la confirmación de especificidad del anticuerpo SVLD con respecto a los anticuerpos completamente humanos debido a los retos ocasionales para usar agentes de detección de región constante anti-humanos frente a tejidos que contienen Ig humano normal.  
35

Las regiones variables humanas de los anticuerpos SVLD se pueden recuperar y se pueden someter a secuenciación por medio de procedimientos normalizados. Los genes, ya sean ADN genómico o ADNc, de los dominios VL humanos se pueden recuperar por varios procedimientos de biología molecular, tal como PCR o RT-PCR y posteriormente se pueden anexar a ADN que codifica las partes de bisagra humana-CH2-CH3 de la región constante, produciendo de este modo el anticuerpo SVD completamente humano. La región Fc humana anexada permitiría un periodo largo de validez en circulación cuando se produce la administración en seres humanos.  
40 También se pueden usar para la expresión otros procedimientos de producción tales como ascitis que usa células de hibridoma en ratones, animales transgénicos que segregan el anticuerpo en el interior de leche o huevos y plantas transgénicas que forman el anticuerpo en la fruta, raíces u hojas.  
45

Las regiones variables humanas clonadas de los anticuerpos SVLD no requieren el formateo con una región de Fc humana. Se pueden formatear las regiones variables SVD aisladas con otra variable SVD aislada de la misma especificidad de enlace o diferente, se pueden separar por medio de agentes de enlace de aminoácido que codifican ADN de longitudes deseadas para permitir una unión diferente, por ejemplo, intra-molecular a dos epítipos diferentes sobre la misma diana, inter-molecular al mismo epítipo sobre dianas di- o tri- homoméricas, o inter-molecular a dos epítipos diferentes sobre dos dianas estrechamente relacionadas. Se pueden escoger dos dominios variables diferentes de SVLD unidos uno a otro para que tengan especificidades diferentes, uno frente a la  
50 diana de enfermedad y uno a una molécula de "sujeción" de larga duración para conferir un periodo de validez larga en circulación.  
55

Se puede liofilizar el anticuerpo SVLD purificado o su derivado para el almacenamiento o se puede formular para dar

lugar a varias disoluciones conocidas en la técnica, en cuanto a solubilidad y estabilidad y que sean coherentes con una administración segura en animales, incluyendo humanos. Se puede usar el anticuerpo SVLD recombinante purificado para una caracterización adicional usando ensayos in vitro de eficacia, afinidad, especificidad, etc. Además, se puede administrar el anticuerpo SVLD purificado a humanos con fines clínicos tales como terapias y diagnósticos para varias enfermedades y trastornos.

Se pueden aislar los diferentes fragmentos de los anticuerpos SVLD VL humano-bisagra endógena-CH2-CH3 por medio de procedimientos que incluyen escisión enzimática, tecnologías recombinantes, etc., con varios fines que incluyen reactivos, diagnósticos y terapéuticos. Se puede aislar el ADNc para los dominios variables humanos a partir de los mamíferos no humanos sometidos a modificación anteriormente descritos, específicamente a partir de ARN procedente de órganos linfoides secundarios tales como ganglios linfáticos o del bazo y los ADNc VL implementados en diferentes sistemas de exhibición de anticuerpos tales como fagos, ribosomas, *E. coli*, levaduras, mamíferos, etc. Los mamíferos knock-in pueden ser carentes de tratamiento inmunológico o se pueden haber inmunizado de forma óptima frente a un antígeno de elección. Usando cebadores de PCR apropiados, tales como 5' en la región principal o el entorno 1 del dominio variable, se pueden recuperar las regiones VL somáticamente maduras con el fin de mostrar solo el repertorio maduro de afinidad. Se pueden seleccionar los anticuerpos mostrados frente al antígeno diana para recuperar eficazmente los anticuerpos SVLD completamente humanos específicos de antígeno y de elevada afinidad.

#### Procedimientos de uso

Se pueden administrar los anticuerpos SVLD purificados de la presente invención a un sujeto para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno particular, tal como varios tipos de cáncer, injerto frente a enfermedad de huésped, enfermedad cardiovascular y trastornos asociados, enfermedades neurológicas y trastornos, trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, alergias e infecciones por patógenos. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

Se pueden administrar las composiciones de anticuerpo SVLD a sujetos en concentraciones de aproximadamente 0,1 a 100 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 1 a 10 mg/ml. Se puede administrar una composición de anticuerpo SVLD por vía tópica, oral, intranasal, inhalación en los pulmones ya sea nasal u oralmente, o por medio de inyección, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Un modo de administración es inyección intravenosa. La administración puede ocurrir en una inyección individual o una infusión a lo largo del tiempo, es decir, de aproximadamente 10 minutos a 24 horas, preferentemente de 30 minutos a aproximadamente 6 horas. Se puede administrar una dosis eficaz en un instante o por medio de una serie de inyecciones. Se pueden administrar dosificaciones repetidas dos veces al día, una vez al día, una vez a la semana, una vez al mes, o una vez cada tres meses, dependiendo del período de validez del anticuerpo SVLD así como también de las indicaciones clínicas. Se puede continuar la terapia durante períodos de tiempo largos, incluso en ausencia de cualquier síntoma.

La composición de anticuerpo SVLD puede contener anticuerpos de múltiples isotipos o anticuerpos de un isotipo individual. La composición de anticuerpo SVLD puede contener anticuerpos SVLD quiméricos no modificados, o los anticuerpos SVLD pueden haberse modificado, por ejemplo, por vía química o enzimática. De este modo, la composición de anticuerpo puede contener homodímeros de anticuerpo SVLD intactos o una cadena individual de anticuerpo SVLD, o sus fragmentos.

Una composición de SVLD purificada puede comprender más de uno dominio variable de SVLD como homodímero, heterodímero, trímero, tetrámero u orden superior. Los dominios variables de SVLD múltiples se pueden conectar de varias formas conocidas en la técnica. Un conector preferido es un agente de unión de oligopéptido. Ajustando la longitud de la composición de aminoácidos del agente de unión, la unión de los dominios variables múltiples puede estar más o menos impedida especialmente, influenciando de este modo el mecanismo de unión a los antígenos diana. Por ejemplo, en el caso de dos dominios variables SVLD diferentes unidos, que unen epítopos diferentes de la misma molécula, se pueden diseñar el agente de unión para llevar a cabo una unión intra-molecular o se pueden diseñar para llevar a cabo una unión inter-molecular si el antígeno es un complejo. Si se prefiere una unión intra-molecular, la molécula bivalente que contiene los dos SVLD puede llevar a cabo la formación del complejo de antígeno, dando como resultado una eliminación más rápida del antígeno en circulación.

La administración de una composición de anticuerpo frente a un agente infeccioso, solo o en combinación con otro agente terapéutico, tiene como resultado la eliminación del agente infeccioso a partir del sujeto. La administración de una composición de anticuerpo reduce el número de organismos infecciosos presentes en el sujeto de 10 a 100 veces y preferentemente 1000 veces.

Similarmente, la administración de una composición de anticuerpo frente a células cancerígenas, sola o en combinación con otro agente quimioterapéutico, tiene como resultado la eliminación de algunas o todas las células cancerígenas a partir del sujeto. La administración de una composición de anticuerpo reduce el número de células cancerígenas presente en el sujeto de 10 a 100 veces y preferentemente 1000 veces.

En determinados aspectos de la invención, también se puede utilizar un anticuerpo SVLD para unir y neutralizar moléculas antigénicas, ya sean solubles o unidas a la superficie celular. Dicha neutralización puede mejorar la

eliminación de la molécula antigénica de la circulación. Las moléculas antigénicas diana para neutralización incluyen, pero sin limitarse a, toxinas, moléculas endocrinas, citocinas, quimioquinas, proteínas complementarias, bacterias, virus, hongos y parásitos.

5 También se contempla que se puede usar un anticuerpo SVLD de la presente invención para mejorar o inhibir la señalización del receptor de superficie celular. Se puede utilizar un anticuerpo SVLD específico para un receptor de superficie celular como agente terapéutico o como herramienta de investigación. Ejemplos de receptores de superficie celular incluyen, pero sin limitarse a, receptores de células inmunológicas, receptores de adenosina, receptores adrenérgicos, receptores de angiotensina, receptores de dopamina y de serotonina, receptores de quimioquina, receptores de citocina y receptores de histamina.

10 En otras realizaciones, se pueden usar un anticuerpo SVLD como agente de diagnóstico para la detección de una de las enfermedades o trastornos anteriores. Se puede detectar un anticuerpo SVLD quimérico usando un agente de detección secundario que reconoce una parte del anticuerpo, tal como un dominio C. En particular, la parte reconocida puede ser un dominio CH2 o un dominio CH3. Los ensayos inmunohistoquímicos, tales como la evaluación de la distribución de tejidos del antígeno diana, pueden aprovechar la naturaleza quimérica de una anticuerpo SVLD de la presente invención. Por ejemplo, cuando se evalúa una muestra de tejido humano, el reactivo de agente de detección secundario reconoce la parte no humana de la molécula de anticuerpo SVLD, reduciendo de este modo la unión de fondo o no específica a las moléculas Ig humanas que puedan estar presentes en la muestra de tejido. En realizaciones relacionadas, el anticuerpo SVLD puede marcarse directamente o se puede identificar con, por ejemplo, un fluoróforo o isótopo radioactivo por medio de procedimientos conocidos en la técnica.

## 20 Kits

La presente invención también proporciona kits que se refieren a cualquiera de los anticuerpos y/o procedimientos descritos en la presente memoria. Un kit de la presente invención puede proporcionar además instrucciones de uso de un anticuerpo y envase.

25 Un kit de la presente invención puede incluir dispositivos, reactivos, recipientes y otros componentes. Además, un kit de la presente invención puede también requerir el uso de un aparato, instrumento o dispositivo, incluyendo un ordenador.

## Ejemplos

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero no limiten la invención.

### Ejemplo 1

#### 30 Incorporación de BAC grandes a células pluripotenciales embrionarias

La recombinación homóloga en *E. coli* creando BAC más grandes se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº. de Publicación 2004/0128703. Se pueden usar dichos procedimientos preparando BAC con insertos de ADN más grandes que el representado por el tamaño medio de los insertos actualmente disponibles en las bibliotecas de BAC. Dichos insertos de gran tamaño pueden comprender ADN que representa genes Ig humanos tales como  $V_{\kappa}$  y  $V_{\lambda}$ . Los insertos de ADN pueden también comprender ADN que representa el locus Ig endógeno que incluye parte o la totalidad de los genes de región constante, que posteriormente se pueden modificar.

40 Un BAC a introducir en las células ES puede estar formado por ADN de Ig humano flanqueado por un lado por 1kb a 10 kb a 100 kb o más de ADN de ratón procedente del genoma de ratón endógeno en la célula ES. Posteriormente, el BAC sustituye una parte del genoma de ratón endógeno por medio de recombinación homóloga dando lugar al ADN diana sobre el cromosoma diana de las células ES, sustituyendo el ADN de ratón endógeno entre los ADN de flanco, que son sitios diana, con el ADN humano sometido a modificación entre los ADNs de flanco sobre el BAC. Por ejemplo, por medio de la construcción de un BAC en *E. coli* que contenga ADN Ig humano que contenga regiones variables humanas flanqueadas sobre el extremo 5' por ADN de ratón que corresponde a la región 5' del locus VH de ratón y flanqueado en la posición 3' por ADN de ratón que corresponde a una región dentro de la asociación VH de ratón, e introduciendo el BAC purificado en las células ES de ratón permitiendo la recombinación homóloga, se sustituirían los genes VH de ratón correspondientes por los genes VL humanos deseados (véase la Figura 2). La longitud de la región del ADN endógeno a sustituir viene dictada por la distancia entre los dos segmentos de ratón de flanco sobre el BAC. La distancia no es igual a la longitud actual entre los segmentos de ratón del BAC; en lugar de ello es la distancia entre los segmentos de ratón del cromosoma de ratón endógeno. Se puede calcular la distancia a partir de las bases de datos de genómica, tal como UCSC Genomic Bioinformatics, NCBI y otras conocidas en la técnica.

50 Los BAC que comprenden genes de región variable humanos también pueden comprender genes de región D humanos e incluso genes de región J humanos. Además, uno o ambos de los ADN endógenos de flanco del genoma de ratón pueden corresponder al ADN 5' de los genes VH de ratón endógenos. El otro ADN endógeno de flanco (3') puede corresponder al ADN bien de la asociación de gen VH de ratón o bien aguas abajo de la misma.

En el caso de que ambos ADN de flaqueo estén en posición 5' de la asociación del gen VH de ratón, el ADN humano sustituirá al ADN 5' de ratón endógeno de los genes V de ratón. En caso de que un ADN de flaqueo esté en posición 5' de la asociación de gen VH de ratón endógeno y el otro se encuentre bien en posición 3' de la asociación de gen VH 5' de ratón o incluso de la asociación de gen JH o DH de ratón, se podría sustituir parte o la totalidad de la asociación del ge VH de ratón e incluso del gen D y J, dependiendo de la ubicación del ADN diana de flaqueo 3'.

El ADN genómico que comprende los genes de región constante puede ser de origen de ratón y puede estar sometido a modificación, con las variaciones deseadas tal como la eliminación del dominio CH1 de todas las regiones constantes de ratón. Además, se puede eliminar parte de las regiones C de ratón, por ejemplo, C $\mu$ , C $\delta$ , todas menos una de C $\gamma$ , C $\epsilon$  y/o C $\alpha$ , de manera que el LCR 3' de ratón endógeno estaría más cerca que la proximidad de línea germinal con respecto a la mayoría de la región constante gamma 3' y tras recombinación homóloga dando lugar al genoma, llevando a cabo la eliminación de los genes C $\mu$ , C $\delta$ , todos menos uno de C $\gamma$ , C $\epsilon$  y/o C $\alpha$  endógenos. Un aspecto de esta estrategia general de eliminación de secuencias por medio de BAC diana es que no se requieren ni las secuencias de recombinación específicas del sitio ni las recombinasas específicas de sitio, por ejemplo, los sitios lox y la CRE recombinasa, dirigiendo los ADN dando lugar al genoma ni se requieren para la eliminación de los ADN. Alternativamente, se puede usar el flaqueo de los sitios loxP y la CRE recombinasa, u otras recombinadas específicas de sitio, eliminando los genes que intervienen de acuerdo con un plan.

## Ejemplo 2

### Recombinación homóloga de BAC en *E. coli*

Un vector BAC está basado en el factor-F encontrado en *E. coli*. El factor-F y el vector BAC procedente del mismo se mantienen como plásmidos de copia baja, que generalmente se encuentran en forma de una o dos copias por células dependiendo de su ciclo de vida. Tanto el factor-F como el vector BAC muestran el fenotipo fi<sup>+</sup> que excluye una copia adicional del plásmido en la célula. Por medio de este mecanismo, cuando *E. coli* ya transporta y mantiene un BAC y después se introduce una BAC adicional en *E. coli*, la célula mantiene solo un BAC, ya sea el BAC existente previamente en la misma o el BAC externo introducido de nuevas. Esta característica resulta extremadamente útil aislando selectivamente BAC recombinados homológamente como se ha descrito anteriormente.

La recombinación homóloga en *E. coli* requiere el producto génico RecA funcional. En este ejemplo, el gen RecA tiene una mutación sensible a la temperatura de manera que la proteína RecA solo es funcional cuando la temperatura de incubación se encuentra por debajo de 37 °C. Cuando la temperatura de incubación está por encima de 37 °C, la proteína RecA no es funcional o tiene una actividad reducida en gran medida en su recombinación. Esta recombinación sensible a la temperatura permite la manipulación de la función de RecA de *E. coli* activando la recombinación homóloga condicional solo cuando se desee. También es posible obtener, seleccionar o someter a modificación mutaciones sensibles al frío de la proteína Rec A de manera que la proteína solo sea funcional por encima de una determinada temperatura, por ejemplo, 37 °C. En esa condición, *E. coli* se desarrollaría a una temperatura más baja, aunque con un tiempo de generación más lento y se podría adaptar la recombinación por medio de la incubación por encima de 37 °C durante un corto período de tiempo, con el fin de permitir solo un intervalo corto de recombinación.

La recombinación homóloga de *E. coli* se lleva a cabo proporcionando sustratos de ADN de solapamiento que se encuentran en dos BAC circulares. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 3, el primer BAC (BAC 1) transporta los segmentos contiguos desde A hasta D y el segundo BAC (BAC 2) transporta los segmentos contiguos desde D hasta G. El segmento D transportado por ambos BAC es el segmento de solapamiento cuando tiene lugar el entrecruzamiento de ADN y como resultado de ellos se produce una fracción recombinante que transporta los segmentos contiguos desde A hasta G. El segmento D de solapamiento puede ser natural como en los dos BAC que portan segmentos de solapamiento de ADN genómico. Alternativamente, el segmento D de solapamiento puede someterse a modificación en la ubicación correcta usando procedimientos conocidos en la técnica tal como la inserción de transposón.

BAC1 descrito anteriormente es uno que ya está presente en la célula y cuando se introduce BAC2 en la misma, bien BAC1 o bien BAC2 puede existir en la célula, no ambos BAC. Tras la electroporación de BAC2 en la célula, se debería rebajar la temperatura por debajo de 37 °C permitiendo la actividad de RecA condicional, mediando de este modo en la recombinación homóloga. Si BAC1 y BAC2 tienen un marcador apto para selección cada uno y los marcadores son diferentes de manera distintiva, por ejemplo BAC1 porta Kan<sup>R</sup> (un gen que confiere resistencia frente a canamicina) y BAC2 porta Amp<sup>R</sup> (un gen que proporciona resistencia frente a ampicilina), solo el BAC recombinante se desarrolla en presencia de ambos antibióticos Kan y Amp.

Debido a que existen dos segmentos génicos D en la región separada del BAC recombinante, se debe retirar el segmento D flanqueado por dos vectores de acuerdo con una de las siguientes dos formas; una es por medio de recombinación homóloga en cualquiera de los vectores o en la región D y la otra se lleva a cabo por medio de la

recombinación específica de sitio loxP por parte de la recombinasa Cre. El BAC-3 sometido a resolución tiene ahora el estiramiento contiguo desde A hasta G con una copia individual de D.

### Ejemplo 3

#### Diseño de BAC en *E. Coli*

5 Tal y como se describe en la Patente de EE.UU. Nº. de Publicación 2004/0128703, la manipulación de BAC de *E. coli* proporciona una herramienta potente para la adaptación fina del ADN genómico transportado en BAC. Por ejemplo, sustituyendo parte o la totalidad de los genes de segmento VH de ratón con VL humano en el locus IgH de ratón endógeno, se prepara un BAC de ratón modificado en *E. coli* y posteriormente se usa para la recombinación homóloga en las células ES. Por ejemplo, en el BAC diana, los segmentos génicos VL humanos deseados, por  
10 ejemplo,  $V_{\kappa}$  y  $V_{\lambda}$ , están flanqueados en el lado 5' por ADN 5' de ratón de la mayoría del gen 5' VH de ratón y sobre el lado 3' del ADN que contiene el gen VL humano por medio de ADN de ratón bien de la asociación de genes VH de ratón o bien de 3' con respecto a la asociación de genes VH de ratón (véase la Figura 2).

Esta sustitución se lleva a cabo similarmente en *E. coli* usando un procedimiento de recombinación homóloga secuencial con BAC de solapamiento para la asociación de genes VL humanos con el fin de crear una asociación unida contigua. La asociación de genes VL también se podría recombinar con regiones D humanas y/o regiones J e  
15 incluso se podría eliminar CH1 de las regiones CH de ratón. Recombinando un BAC que porta ADN genómico de ratón con uno que porta ADN humano, careciendo ambos de cualquier homología de origen natural ya que proceden de especies diferentes, se puede someter una secuencia sintética de homología a modificación como se comenta en el Ejemplo 2. Esto se llevaría a cabo introduciendo ADN de flanqueo en ambos lados del ADN objeto de inserción. El  
20 BAC modificado resultante tiene un segmento configurado de línea germinal que comprende la región de VL humano.

Los cambios finamente adaptados tales como la eliminación del exon CH1 de la región constante, incluyendo los cambios tan pequeños como los cambios de codon individual o nucleótido individual y la introducción de secuencias para la actividad de recombinasa específica de sitio, se pueden someter a modificación dando lugar a la sustitución  
25 de ADN por medio de técnicas conocidas en la materia de recombinación de BAC. Por ejemplo, se publica ADN que comprende la secuencia genómica de línea germinal natural de la región constante de ratón. A su vez, se puede manipular, por medio de simulación computacional, la secuencia de un gen de región constante de línea germinal individual tal como la eliminación del exon CH1. Este ADN se puede sintetizar usando vendedores comerciales. Alternativamente, se puede recuperar por medio de procedimientos conocidos en la técnica tales como PCR que usa  
30 cebadores situados recuperando productos 5' y 3' del exon CH1 en el gen de la región C de interés y ligar esos fragmentos unos a otros en unión operativa. Alternativamente, el ADN genómico del gen de la región C de interés se puede recuperar a partir de bibliotecas genómicas disponibles a nivel comercial, se puede subclonar el fragmento y se puede eliminar el gen CH1 usando digestiones apropiadas de enzima de restricción seguidas de unión de los fragmentos 5' y 3' preparando un gen de región C unida de forma operativa eliminada de CH1.

35 Los segmentos génicos eliminados de CH1 se ensamblan a través de cualquier medio en el que ADN codifica la región C unida operativamente, pudiéndose insertar en el BAC en la posición diseñada de forma precisa por medio de recombinación homóloga como se ha comentado anteriormente. Por ejemplo, una construcción sintetizada químicamente para la región C que carece del exon CH1 se encuentra flanqueada por brazos secuenciales de ratón que, en el genoma del ratón, flanquean el ADN que se une a la región CH1. Se recombina la construcción en *E. coli*  
40 con el BAC de ratón original en un lado o en otro del homólogo que flanquea las secuencias de ADN de ratón y tras la recombinación y la resolución, se prepara un BAC que codifica una región constante de ratón en la que se ha eliminado CH1.

### Ejemplo 4

#### Diseños de BAC para sustituir el locus IgH endógeno

45 Modificando un locus de ratón IgH de manera que codifique un anticuerpo de dominio VL individual quimérico se preparan dos construcciones por separado. Las construcciones juntas comprenden ADN para, en orden 5'-3', segmentos génicos VL humanos, opcionalmente uno o más segmentos génicos DH humanos, uno o más segmentos génicos J humanos, un potenciador  $E_{\mu}$  intrónico de ratón, al menos una región S y al menos un gen de región C en el que se ha eliminado el exon CH1 o de lo contrario se ha inactivado funcionalmente tal como por medio de la  
50 eliminación del sitio de unión a Bip y que contiene la transmembrana y los exones intracelulares y la región de control del locus 3' (véase Figuras. 2, 4-5). El primer conducto comprende al menos una secuencia de gen VL humano en configuración de línea germinal y un sitio loxP. Las secuencias VL humana y loxP están flanqueadas por dos secuencias de ADN de ratón. Una de las secuencias de flanqueo es homóloga con respecto a una parte del genoma 5' de ratón del locus VH y la otra (3') secuencia de flanqueo es homóloga con respecto a una parte del locus VH de ratón. El sitio loxP está en posición 5' del ADN de ratón de flanqueo 3'. Tras la recombinación  
55 homóloga con el locus IgH de ratón, las secuencias de VL humano y loxP sustituyen la parte del VH de ratón que corresponde al ADN entre las regiones homólogas del locus IgH de ratón (véase Figura 2). La primera construcción también puede contener al menos un gen de segmento DH humano e incluso al menos un gen de segmento J

humano. Los ADNs de ratón de flaqueo pueden ambos corresponder a ADN 5' endógeno de la mayoría del gen 5' de segmento VH de ratón endógeno.

La segunda construcción tiene, de 5' a 3', un sitio loxP, al menos un gen de segmento DH humano (si no ha incluido la totalidad de genes de segmento DH humano en la primera construcción), al menos un gen de segmento J humano (si no se ha incluido la totalidad de los genes de segmento JH humano en la primera construcción) y una región constante de cadena pesada de ratón (véase la Figura 4). La región constante de ratón incluye una secuencia de bisagra, una secuencia CH2 y una secuencia CH3, pero está sustancial o completamente desprovista de un gen CH1 ya que no contiene una secuencia CH1 funcional. Además, la región constante de ratón puede incluir elementos reguladores *cis*, una o más regiones de cambio y un LCR 3'. Se anexa un empalme de secuencia única de tamaño fácilmente producido por medio de PCR, por ejemplo, 500 pb y no presente en el genoma de ratón y no transportado sobre el BAC, por ejemplo, una beta-lactamasa, en la posición 3' del LCR de ratón 3'. El loxP y las secuencias de región constante de ratón están flanqueados por dos secuencias de ADN de ratón que corresponden a una región 5' de la región DH de ratón y una región 3' del LCR 3', de manera que tras la recombinación homóloga con el locus IgH de ratón, el DH humano, J humano y las secuencias de la región constante de ratón sustituyen el ADN entre las dos secuencias de flaqueo. Los ADNs de flaqueo también pueden estar ubicados de manera que lleven a cabo la inserción diana por medio de recombinación homóloga en el interior del locus en cualquier posición que abarque 3' del sitio de inserción 3' de la primera construcción y 3' del LCR 3'.

La modificación de esta construcción de BAC se logra usando técnicas explicadas en los Ejemplos 1-3 y otras técnicas conocidas en la materia de la recombinación de BAC (véase Heintz. Nat. Rev. Neurosci (2001) 2: 861-870 y las referencias de la misma). Las bibliotecas de BAC configurado de línea germinal bien caracterizadas de ADN genómico para los genomas humano y de ratón se encuentran disponibles a nivel comercial. Por ejemplo, Open Biosystems (Thermo Scientific, Huntsville, AL EE.UU) comercializa BAC humanos mapeados que cubren todo el genoma humano. La confirmación de que dos BAC objeto de recombinación se solapan de hecho (por ejemplo, un "segmento de tipo D" (no confundir con un gen DH) en la Figura 2 y en el Ejemplo 2) se logra por medios conocidos en la técnica, tales como secuenciación directa de los extremos que supuestamente se solapan para cada BAC y posteriormente confirmación de la identidad de la secuencia.

De esta forma, se puede generar cualquier combinación de segmentos de gen VL humano, J humano y CH de ratón. Las secuencias VL humanas pueden ser  $V_{\kappa}$  o  $V_{\lambda}$  y las secuencias J humanas pueden ser JH,  $J_{\kappa}$  o  $J_{\lambda}$  (véase las Figuras 6a y 6b). Se puede someter la región constante a modificación para tener dominios  $C_{\mu}$ ,  $C_{\delta}$  y  $C_{\gamma}$ ; dominios  $C_{\mu}$  y  $C_{\gamma}$ ; o solo un dominio  $C_{\gamma}$ , cada uno de los cuales carecería de un dominio CH1 funcional tal como por medio de eliminación de todo el exon CH1 (véase la Figura 7).

El contenido del gen  $V_{\kappa}$  humano es redundante, con aproximadamente 25 genes  $V_{\kappa}$  humanos únicos representados aproximadamente 2 veces, con una asociación proximal orientada con la misma orientación 5'-3' a medida que el gen  $J_{\kappa}$  y  $C_{\kappa}$  y la asociación se duplican siguiendo una orientación invertida distal. Esta asociación duplicada invertida representa solo alrededor de 10 % del repertorio  $V_{\kappa}$  expresado en seres humanos. De este modo, es posible capturar la diversidad proporcionada por el repertorio  $V_{\kappa}$  humano completo incluyendo solo una de las dos asociaciones de genes duplicadas en la construcción BAC 1.

En seres humanos, existen aproximadamente 30 genes  $V_{\lambda}$  funcionales aguas arriba de 7 asociaciones  $J_{\lambda}$ - $C_{\lambda}$ . El repertorio  $V_{\lambda}$  humano se puede agrupar en tres asociaciones: A, B y C. La asociación A, la más próxima a los pares J-C, es la que se usa con más frecuencia, seguida de la B y posteriormente la asociación C. Se pueden incorporar una, dos o tres de estas asociaciones  $V_{\lambda}$ . La estrategia de la presente memoria permite someter a modificación cualquiera o la totalidad de las asociaciones  $V_{\lambda}$  humanas dando lugar al genoma de ratón y sustituyendo el VH endógeno. Se emparejan  $J_{\lambda}$  con  $C_{\lambda}$  en una configuración única con respecto al locus de inmunoglobulina. Existen 7 pares  $J_{\lambda}$ - $C_{\lambda}$  en seres humanos. El  $J_{\lambda}$  humano se puede re-configurar dando lugar a una asociación contigua de 1-7  $J_{\lambda}$  por medio de varios procedimientos conocidos en la técnica, tales como síntesis de ADN que comprende los genes  $J_{\lambda}$  incluyendo sus secuencias de señalización-recombinación en unión operativa.

## Ejemplo 5

### Introducción de BAC en las células

En la preparación para la introducción en las células ES, se pueden recombinar receptáculos de expresión de mamíferos sobre los BAC. Dichos receptáculos transportan genes con elementos reguladores necesarios tales como promotores, potenciadores y sitios de poli-adenilación para la expresión de genes en células de mamíferos, tales como células ES de ratón. Los genes sobre el receptáculo pueden ser marcadores seleccionables tales como genes resistentes a fármacos para fármacos tales como G418, higromicina, puromicina, timidina cinasa e hipoxantina fosforibosil transferasa y marcadores identificables tales como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP) y luciferasa. Se usan dichos marcadores seleccionando e identificando células en cuyo interior se ha introducido BAC y sometido a recombinación homóloga.

Para la introducción en las células ES, se purifica ADN de BAC a partir de *E. coli* y ADN genómico de *E. coli* por

medio de procedimientos conocidos en la técnica, tales como el procedimiento de lisis alcalina, kits de purificación de ADN comercial, gradiente de densidad CsCl, gradiente de sacarosa, o electroforesis de gel de agarosa, que pueden estar seguido de tratamiento con agarosa. Con el fin de someter a linealidad el ADN purificado, posteriormente se digiere por medio de NotI. Los dos sitios de NotI flanquean el sitio de clonación sobre el vector BAC y de este modo, la digestión de NotI separa el inserto del vector.

Aunque el sitio NotI es extremadamente raro en el ADN genómico de inmunoglobulina humana y de ratón, si la construcción de ADN de BAC contiene uno o más sitios de NotI, se introducirán sitios para otras enzimas de restricción extrañas tales como Ascl, AsiSI, FseI, PaeI, PmeI, SbfI y SwaI, endonucleasas de dirección tales como I-CeuI, I-SceI, P1-PsPI, P1-SceI o terminasa lamda, en el área de unión entre el inserto y el vector. Esto se puede conseguir por medio de transposón, recombinación homóloga y otros procedimientos de clonación. El ADN sometido a tratamiento lineal, normalmente 0,1-10 µg de ADN dependiendo del tamaño, se introduce en las células del mamífero, tales como las células ES, por medio de procedimientos conocidos en la técnica tales como transfección, lipofección, electroporación, precipitación de Ca o micro-inyección nuclear directa.

### Ejemplo 6

#### Selección de células ES tras la recombinación homóloga

Identificando las células de mamíferos, tales como las células ES, que son el resultado de la recombinación homóloga, se usan ensayos cualitativos. En primer lugar, se someten a proliferación células en presencia de un fármaco para el que se representa el gen de resistencia a fármaco sobre el BAC introducido, con el fin de seleccionar las células que sean transportadas de forma estable por parte del BAC (véase Figura 2, que ilustra un recombinante homólogo que se seleccionaría por la resistencia frente a G418). El BAC también puede transportar un marcador de selección negativo tal como una timidina cinasa seleccionando en contra los integrantes aleatorios. Alternativamente, se podrían escoger los clones positivos para un marcador de resistencia a fármaco y se pueden duplicar en placas, por ejemplo, una sometiendo a ensayo de resistencia a fármaco y la otra sometiendo a ensayo de sensibilidad a fármaco. De manera óptima, BAC también podría transportar un marcador identificable tal como un GEP o RFP aproximadamente adyacente al marcador seleccionable. Los clones GFP<sup>+</sup> o RFP<sup>+</sup> se podrían detectar por medio de FACS o microscopía de fluorescencia. Ambos marcadores positivos seleccionables e identificables son internos con respecto al ADN diana de flanqueo de manera que se tienen que integrar de manera estable en el interior del genoma junto con el ADN de sustitución.

Con el fin de confirmar la recombinación homóloga sobre los clones seleccionados (resistentes a fármaco) e identificados (por ejemplo, GFP<sup>+</sup>), se recupera el ADN genómico a partir de clones aislados y se lleva a cabo el análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) por medio de una técnica tal como inmunotransferencia de Southern con sonda de ADN a partir del locus endógeno, estableciendo dicha sonda el mapeado exterior de la región sustituida. El análisis de RFLP muestra diferencias alélicas entre los dos alelos, el ADN endógeno y el ADN entrante, cuando la recombinación homóloga tiene lugar por medio de la introducción de un nuevo sitio de restricción en el ADN de sustitución. Debido a que los brazos de ADN de flanqueo pueden ser grandes y difíciles de resolver por medio de electroforesis de gel de agarosa normalizada, se pueden usar geles de agarosa de bajo porcentaje o electroforesis de gel CHEF. Alternativamente, se puede someter a modificación a propósito un sitio de restricción dando lugar al ADN de sustitución sobre el BAC durante la modificación de *E. coli* modificando un fragmento convenientemente dimensionado que abarca la unión del ADN introducido y el ADN endógeno, tras la digestión de restricción y que engloba la secuencia de sonda diseñada.

Se puede utilizar un citómetro de flujo con capacidad de clasificación de células clasificando y reteniendo las células basado en la presencia de señales procedentes de una proteína fluorescente y la ausencia de señal procedente de otra (GFP<sup>+</sup>RFP<sup>-</sup> en la Figura 2). Similarmente, se pueden usar marcadores de resistencia a fármacos. Ya sea en el ensayo dual de selección de fármaco o en la identificación dual de marcador fluorescente, los ensayos son de naturaleza cualitativa.

Una vez que se han identificado los clones recombinados homológamente que incorporan el primer vector diana BAC en la ubicación precisa, se avanza al menos uno de estos clones hasta una segunda ronda de recombinación homóloga empleando principios similares para la selección e identificación (véase la Figura 4). Nótese que se usará un marcador de selección positiva diferente del usado seleccionando la primera introducción BAC (por ejemplo, higromicina en la Figura 4). Similarmente, se usará un marcador de identificación positiva diferente (RFP en la Figura 4). Debido a que los genes de región C de ratón modificados y los elementos reguladores cis podrían ser un sustrato para la recombinación homóloga además de la región de flanqueo 3', puede ser necesario que el número de clones seleccionados positivamente objeto de identificación no sea grande para encontrar los clones diana de forma correcta. Con el fin de facilitar la clonación, se incorporará una única secuencia no encontrada en el genoma de ratón o por el contrario duplicada sobre el BAC, al BAC durante la recombinación en *E. coli*. Esta secuencia única se ubicará justo en 5' de la secuencia diana de flanqueo 3' y será de un tamaño que se pueda detectar de forma sencilla por medio de PCR, por ejemplo, 500 pb.

Una vez que se han identificado los clones recombinados homológamente que incorporan el segundo vector diana BAC en la ubicación precisa, se separan los BAC primero y segundo por medio de una cantidad de ADN endógeno

que interviene a partir del locus IgH de ratón. Se determina la cantidad y el contenido de este ADN endógeno que interviene por medio de la localización del ADN de flanco 3' sobre el primer BAC y del ADN de flanco 5' sobre el segundo BAC. Esta parte que queda de la secuencia de VH de ratón que interviene, presente entre los sitios loxP que se introdujeron por medio de la recombinación homóloga, se retira por medio de CRE recombinasa (Figura 5).

5 Se puede expresar la CRE recombinasa de forma transitoria en clones que presentan ambos insertos de BAC dirigidos de forma correcta. La CRE recombinasa actúa de forma eficaz y precisa sobre los sitios loxP, eliminando en ellos el ADN que interviene entre dichos sitios. La eliminación del ADN de ratón que interviene también eliminará el marcador identificable insertado en el genoma. De este modo, se puede identificar los clones para la eliminación completa por medio de citometría de flujo. La confirmación de la eliminación y la unión precisa de los dos BAC, la posición 3' del primer BAC unida a la posición 5' del segundo BAC, se puede detectar por medio de inmunotransferencia de Southern como se ha descrito anteriormente.

10 Si se usan los clones ES en la etapa 2 derivando los ratones transgénicos, se puede retirar el ADN de IgH de ratón que interviene criando los ratones transgénicos en cuanto al primer BAC y se puede co-integrar y separar el segundo BAC por medio del ADN IgH de ratón que interviene, modificando los ratones genéticamente con el fin de expresar la CRE recombinasa, ya sea de forma sistémica o específica en la línea germinal. Un elevado porcentaje de la descendencia de estos ratones de reproducción cruzada portará la eliminación con mediación de CRE del ADN de IgH que interviene dando como resultado BAC primero y segundo co-unidos de forma operativa.

15 Tras la retirada de la secuencia de VH de ratón que queda, el locus modificado codifica un anticuerpo de dominio VL individual quimérico que comprende segmentos génicos de VL humano, DH y J unidos a uno o más de los genes de región constante de ratón que carecen de CH1. La Figura 8 ilustra una combinación variante de la estructura de locus SVLD. Los segmentos génicos variables SVLD de las Figuras 6a y 6b se pueden combinar con las estructuras de región constante de la Figura 7 en todas las combinaciones posibles para la estructura final de locus SVLD.

#### 20 Ejemplo 7

**25 Derivación de mamíferos no humanos transgénicos que producen anticuerpos SVLD procedentes de células modificadas**

Se micro-inyectan las células ES con el locus SVLD modificado deseado que sustituye al locus IgH endógeno en blastocitos huésped y se implantan en el interior de madres de acogida pseudo-preñadas usando procedimientos establecidos. Se identifican los ratones quiméricos por medio de marcadores tales como procedimientos de color de revestimiento o procedimientos moleculares tales como PCR. Se aparean los ratones quiméricos con las hembras produciendo descendencia transgénica de los locus SVLD. También se pueden usar las células ES derivando ratones transgénicos por medio del uso de técnicas de agregación de mórula. También se pueden derivar los animales transgénicos por medio de técnicas de clonación establecidas tales como transferencia nuclear.

30 Se someten a reproducción cruzada los animales transgénicos de generación que se comprueba que son hemigóticos en cuanto al locus SVLD modificado, con el fin de generar animales homocigóticos en cuanto al locus SVLD modificado. Se pueden aparear tanto los animales hemigóticos como los homocigóticos con animales con alteraciones adicionales posiblemente ventajosas de otros locus, tal como locus Igκ y/o Igλ endógeno inactivado, o genes de cadena ligera de sustituto o Vλ preB inactivados y posteriormente reproducir estos ratones de reproducción cruzada con el fin de crear animales homocigóticos tanto para el locus SVLD como para el/los locus inactivado(s).

#### 40 Ejemplo 8

**Derivación de anticuerpos SVLD procedentes de animales no humanos transgénicos**

Los animales no humanos transgénicos, ya sean hemigóticos o preferentemente homocigóticos en cuanto al locus de SVLD modificado, tendrán el desarrollo de la células B dirigido por el anticuerpo SVLD en el contexto del receptor de células B. Se evitará la expresión de las cadenas de IgH normalizadas ya que el locus se sustituye y se evita la expresión de cadena de IgL. Se pueden inmunizar los animales no humanos transgénicos en cuanto al locus SVLD con antígenos diana por medio de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen la preparación de un antígeno más adyuvante (por ejemplo, Freund completo e incompleto, TiterMax, CpG) por medio de inyección, por ejemplo, sub-cutánea, intraperitoneal (IP) o en el interior de las almohadillas de las patas durante el curso de inyecciones múltiples programadas para provocar una respuesta inmunológica sólida primaria y secundaria.

50 Se recuperan las células del órgano linfóide apropiadas para la ruta de inyección, por ejemplo, bazo para IP o ganglio linfático de drenaje para la almohadilla de las patas y se enriquecen opcionalmente en cuanto a células B con separación de perlas magnéticas y se fusionan con asociados de fusión de mieloma por medio de polietilenglicol o fusión de electrocélulas preparando hibridomas, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, se pueden someter las células B a cultivo en varios medios que soportan la proliferación y la segregación de anticuerpos y se identifica el anticuerpo SVLD con unión de antígeno con las características deseadas en los sobrenadantes de los cultivos resultantes.

5 Se pueden aislar e inmortalizar las células B que segregan el anticuerpo SVLD de interés o se puede recuperar el dominio variable que codifica el anticuerpo SVLD molecularmente por medio de técnicas tales como RT-PCR de célula individual. Se pueden recuperar las regiones variables de SVLD del animal no humano transgénico en masa usando procedimientos de PCR y se pueden exhibir in vitro sobre bacteriófagos, ribosomas, *E. coli*, levaduras, células de mamíferos, etc., usando procedimientos establecidos. Se pueden comparar dichas bibliotecas, bien sin modificar o de afinidad madurada, con el antígeno in vitro con el fin de identificar las regiones V SVLD que se unen al antígeno de interés. Se pueden recuperar los anticuerpos SVLD humanos o sus partes que comprenden regiones variables SLVD humanas y se pueden clonar, por vía celular o molecular y tras la expresión y el posible formateo adicional, se pueden usar con varios fines tales como fines terapéuticos o diagnósticos.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un anticuerpo de dominio VL individual quimérico que comprende un segmento de dominio VL humano, un segmento de dominio DH humano, un segmento de dominio JL humano, una región C de cadena pesada no humana, en el que la región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento de dominio CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1.
- 2.- El anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
- (1) el segmento de dominio VL humano es un segmento de dominio  $V_{\kappa}$  o un segmento de dominio  $V_{\lambda}$ ;
- (2) los segmentos de dominio CH2 y CH3 no humanos son segmentos de dominio  $C_{\gamma}$ ; o
- (3) el segmento de dominio JL humano es un segmento de dominio  $J_{\kappa}$  o un segmento de dominio  $J_{\lambda}$ .
- 10 3.- El anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde
- (1) dicho anticuerpo de dominio VL individual comprende un homodímero; o
- (2) dicho anticuerpo de dominio VL individual comprende un heterodímero.
- 15 4. Un polinucleótido que comprende segmentos génicos VL, DH y JL humanos unidos operativamente a una bisagra de región C de cadena pesada no humana y segmentos génicos CH2 y CH3, en donde dicho polinucleótido codifica un anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 5.- El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, en donde
- (1) el segmento génico VL humano es un segmento génico  $V_{\kappa}$  o un segmento génico  $V_{\lambda}$ ;
- (2) los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos son segmentos génicos  $C_{\mu}$  y el polinucleótido además comprende opcionalmente segmentos génicos  $C_{\gamma}$  o segmentos génicos  $C_{\delta}$ ;
- 20 (3) los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos no son segmentos génicos  $C_{\mu}$ ;
- (4) el segmento génico JL humano es un segmento génico  $J_{\kappa}$  o un segmento génico  $J_{\lambda}$ ;
- (5) el polinucleótido además comprende un elemento regulador *cis* no humano;
- (6) el polinucleótido además comprende una región de cambio no humana, en la que opcionalmente dicha región de cambio no humana es  $S_{\mu}$ ;
- 25 (7) el polinucleótido comprende además un LCR 3' no humano; o
- (8) el polinucleótido comprende además un  $E_{\mu}$  no humano.
- 30 6. Una célula de mamífero no humano que tiene un genoma que comprende segmentos génicos VL, DH y JL humanos unidos operativamente a una región C de cadena pesada no humana, en la que dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en la que dicho genoma codifica un anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 7.- La célula de acuerdo con la reivindicación 6, en la que
- (1) el segmento génico VL humano es un segmento génico  $V_{\kappa}$  o un segmento génico  $V_{\lambda}$ ;
- (2) los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos son segmentos génicos  $C_{\gamma}$ , en la que la célula opcionalmente comprende además segmentos génicos  $C_{\mu}$  y/o segmentos génicos  $C_{\delta}$ ; o
- 35 (3) el segmento génico JL humano es un segmento génico  $J_{\kappa}$  o un segmento génico  $J_{\lambda}$ .
- 8.- Un kit para producir una célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga que tiene un genoma que codifica un anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- 40 bien:
- (1) una primera construcción que comprende un segmento génico VL humano, un primer sitio loxP y un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean el segmento génico VL y el primer sitio loxP, en donde dicho primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto a un primer conjunto

de secuencias de ADN endógeno, en donde dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno está ubicado bien en una región de VH endógena o bien en posición 5' con respecto a una región de VH endógena y

5 (2) una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, un segmento génico JL humano, una región C de cadena pesada no humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en donde dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en donde dicho segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto a un segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que el extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótidos de flanqueo del segundo sitio loxP corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del gen 3' VH endógeno y el extremo 5' de la secuencia 3' de polinucleótidos de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico de región constante del locus IgH endógeno,

10 en el que la primera construcción o la segunda construcción además comprenden un segmento génico DH humano y en el que el segmento génico DH está entre el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP o el segmento génico DH está entre el segundo sitio loxP y el segmento génico JL humano;

15 o bien:

(1) una primera construcción que comprende un segmento génico VL humano, un segmento génico DH humano, un segmento génico JL humano, un primer sitio loxP y un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean el segmento génico VL y el primer sitio loxP, en donde el segmento génico DH está entre el segmento 20 génico VL humano y el segmento génico JL humano, en donde dicho primer conjunto de secuencias polinucleotídicas de flanqueo es homólogo con respecto a un primer conjunto de secuencias de ADN endógeno y en donde dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno está ubicado bien en una región de VH endógena o bien en posición 5' con respecto a una región de VH endógena y

25 (2) una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, una región C de cadena pesada no humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en donde dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en el que dicho segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto a un segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno, en donde el extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótidos de 30 flanqueo del segundo sitio loxP corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del gen 3' VH endógeno y el extremo 5' de la secuencia 3' de polinucleótidos de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia 3' endógena de la mayoría del segmento 3' génico de región constante del locus IgH endógeno.

9.- Un mamífero no humano que tiene un genoma que comprende segmentos génicos VL, DH y JL humanos, unidos operativamente a una región C de cadena pesada no humana, en donde dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en el que dicho mamífero es capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1.

10.- El mamífero no humano de acuerdo con la reivindicación 9, en el que:

(1) el segmento génico VL humano es un segmento génico  $V_{\kappa}$  o un segmento génico  $V_{\lambda}$ ;

40 (2) los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos son segmentos génicos  $C_{\mu}$ , en donde el genoma opcionalmente comprende además segmentos génicos  $C_{\gamma}$  y/o segmentos génicos  $C_{\delta}$ ;

(3) los segmentos génicos CH2 y CH3 no humanos no son segmentos génicos  $C_{\mu}$ ;

(4) el segmento génico JL humano es un segmento génico  $J_{\kappa}$  o un segmento génico  $J_{\lambda}$ ; o

(5) el mamífero es un ratón.

45 11.- Una célula de hibridoma capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el hibridoma procede de un mamífero no humano de acuerdo con la reivindicación 9.

12.- Un procedimiento para producir una célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga que comprende un genoma que codifica el anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con la reivindicación 1 o un mamífero no humano capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico de 50 acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

(A) proporcionar una primera construcción que comprende un segmento génico VL, un primer sitio loxP y un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean el segmento génico VL y el primer sitio loxP, en donde dicho primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto a un primer conjunto

de secuencias de ADN endógeno, en el que dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno está ubicado bien en una región de VH endógena o bien en posición 5' con respecto a una región de VH endógena;

introducir dicha primera construcción en una célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga y bien:

5 (1) sustituir una parte de la región VH endógena con el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en el que dicha parte de la región VH endógena comprende la secuencia de ADN entre dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno y en donde dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico VL humano, o

10 (2) sustituir una parte de la secuencia 5' con respecto a la región VH endógena con el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en donde dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico VL humano y en posición 5' del primer segmento génico VH endógeno;

proporcionar una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, un segmento génico JL humano, una región C de cadena pesada no humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en el que dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en donde dicho segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto al segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que el extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótidos de flanqueo del segundo sitio loxP corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno y el extremo 5' de la secuencia 3' de polinucleótidos de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico de la región constante del locus IgH endógeno;

15  
20

introducir dicha segunda construcción en el interior de la célula y bien:

25 (1) sustituir una parte del locus 3' IgH endógeno de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno con el segmento génico JL humano, la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en el que dicha parte del locus IgH endógeno comprende la secuencia de ADN entre dicho segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno y en donde dicho segundo sitio loxP está en posición 5' del segmento génico JL humano o bien

(2) sustituir una parte de la secuencia 3' endógena de la mayoría del segmento 3' génico de región constante endógena, en donde dicho segundo sitio loxP está en posición 5' del segmento génico JL humano,

30 en donde la primera construcción o la segunda construcción comprende además un segmento génico DH humano y en donde el segmento génico DH está entre el segmento génico VL humano y el primer sitio loxP o el segmento génico DH está entre el segundo sitio loxP y el segmento génico JL humano;

retirar la secuencia entre dicho primer sitio loxP y dicho segundo sitio loxP por medio de la CRE recombinasa; y

opcionalmente generar a partir de la célula un mamífero no humano capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico, o bien

35 (B) proporcionar una primera construcción que comprende un segmento génico VL humano, un segmento génico DH humano, un segmento génico JL humano, un primer sitio loxP, y un primer conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean el segmento génico VL y el primer sitio loxP, en donde el segmento génico DH está entre el segmento génico VL humano y el segmento génico JL humano, en donde dicho primer conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto a un primer conjunto de secuencias de ADN endógeno, en donde dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno está ubicado bien en la región de VH endógeno o bien en posición 5' con respecto a la región de VH endógeno;

40

introducir dicha primera construcción en el interior de una célula de mamífero no humano competente con la recombinación homóloga y bien:

45 (1) sustituir una parte de la región VH endógena con el segmento génico VL humano, el segmento génico DH humano, el segmento génico JL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en donde dicha parte de la región VH endógena comprende la secuencia de ADN entre dicho primer conjunto de secuencias de ADN endógeno y en donde dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico JL humano, o bien

50 (2) sustituir una parte de la secuencia 5' con respecto a la región VH endógena con el segmento génico VL humano, el segmento génico DH humano, el segmento génico JL humano y el primer sitio loxP por medio de recombinación homóloga, en la que dicho primer sitio loxP está en posición 3' de dicho segmento génico JL humano y en posición 5' del primer segmento génico VH endógeno;

proporcionar una segunda construcción que comprende un segundo sitio loxP, una región C de cadena pesada no

- humana y un segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos que flanquean la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en donde dicha región C de cadena pesada no humana comprende una bisagra, un CH2 y un segmento génico CH3 y está sustancial o completamente desprovista de un segmento de dominio CH1 y en el que dicho segundo conjunto de secuencias de polinucleótidos de flanqueo es homólogo con respecto al
- 5 segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno, en el que el extremo 3' de la secuencia 5' de polinucleótidos de flanqueo del segundo sitio loxP corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno y el extremo 5' de la secuencia 3' de polinucleótidos de flanqueo del segmento génico CH3 corresponde a una secuencia endógena 3' de la mayoría del segmento 3' génico de la región constante del locus IgH endógeno;
- introducir dicha segunda construcción en el interior de la célula y bien:
- 10 (1) sustituir una parte del locus 3' IgH endógeno de la mayoría del segmento 3' génico VH endógeno con la región C de cadena pesada no humana y el segundo sitio loxP, en donde dicha parte del locus IgH endógeno comprende la secuencia de ADN entre dicho segundo conjunto de secuencias de ADN endógeno y en el que dicho segundo sitio loxP está en posición 5' de la región C de cadena pesada, o bien
- 15 (2) sustituir una parte de la secuencia 3' endógena de la mayoría del segmento 3' génico de región constante endógena, en la que dicho sitio loxP está en posición 5' de la región C de cadena pesada no humana;
- retirar la secuencia entre el primer sitio loxP y el segundo sitio loxP por medio de CRE recombinasa; y
- opcionalmente generar a partir de la célula un mamífero no humano de knock-in capaz de producir un anticuerpo de dominio VL individual quimérico.
- 20 13.- El kit de acuerdo con la reivindicación 8 o el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la primera construcción comprende un primer marcador de selección y/o identificación y en el que la segunda construcción comprende un segundo marcador de selección y/o identificación.
- 25 14.- Un procedimiento para detectar un antígeno diana que comprende detectar el anticuerpo de dominio VL individual quimérico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con un agente de detección secundario que reconoce una parte del anticuerpo de dominio VL individual, en donde la parte opcionalmente comprende un dominio constante del anticuerpo de dominio VL individual.

Domínios de Ab frente a V-Individual

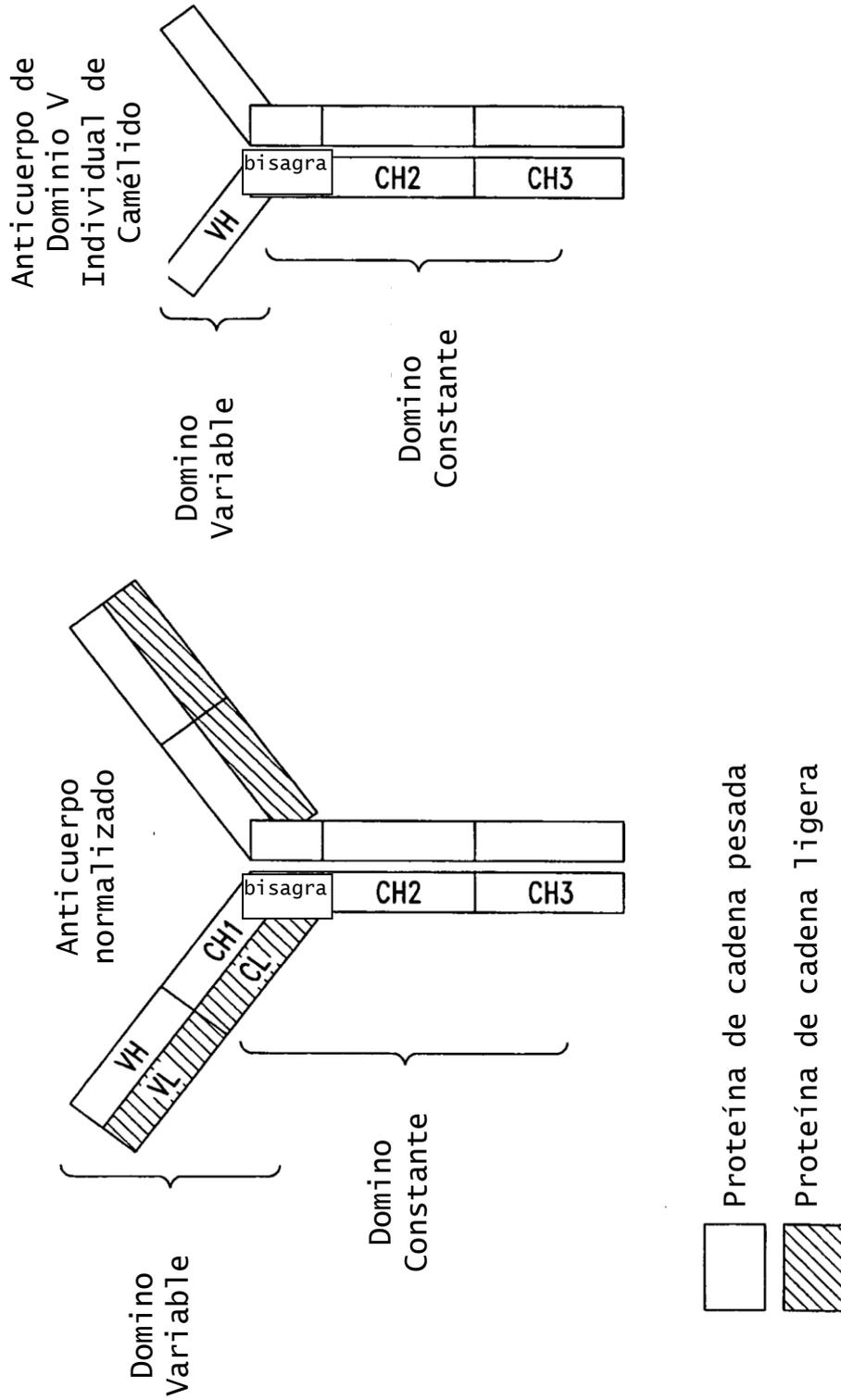
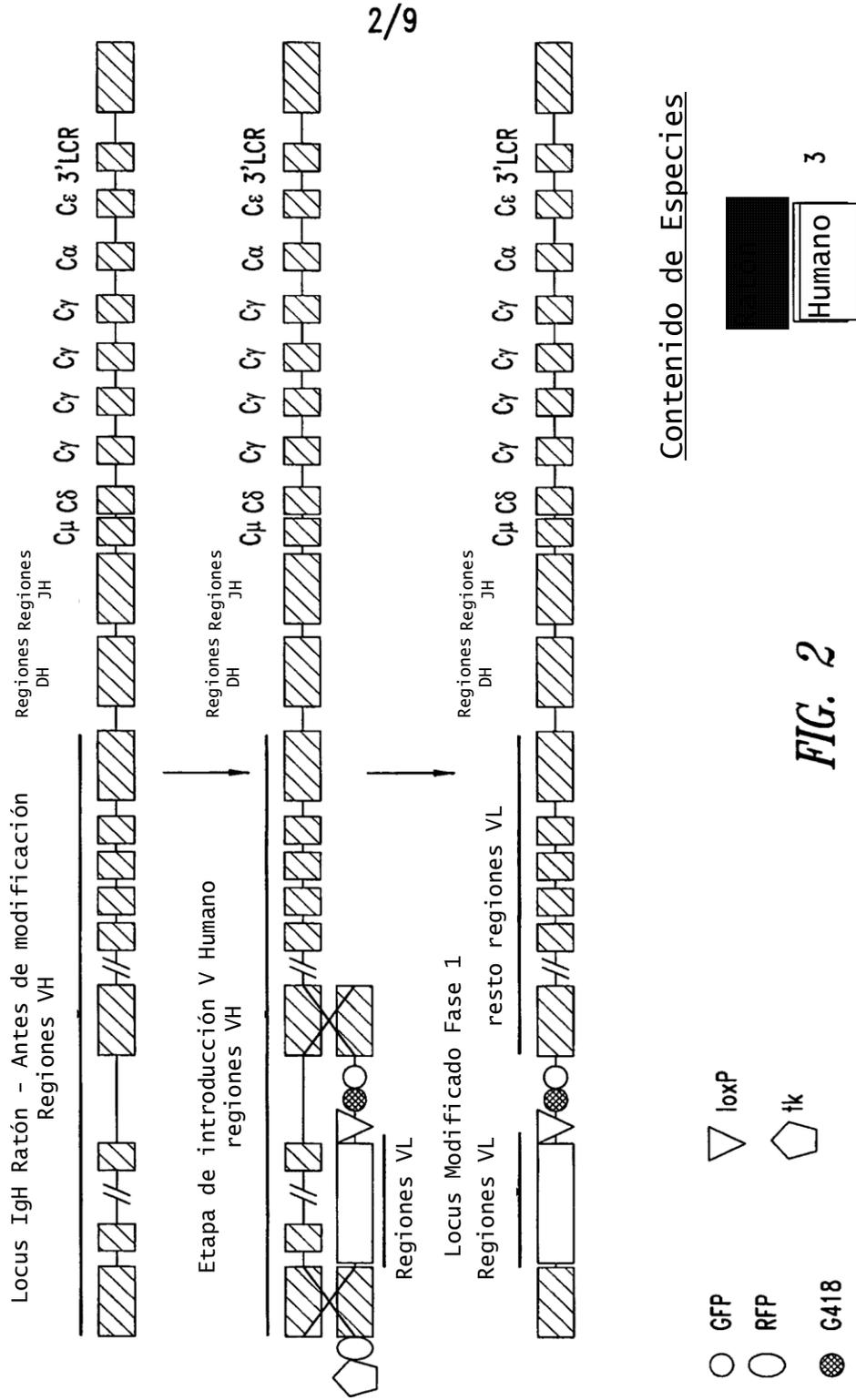


FIG. 1

Modificación Locus SVD - Etapa 1



Contenido de Especies

FIG. 2

3

BAC recombinantes en *E. coli*

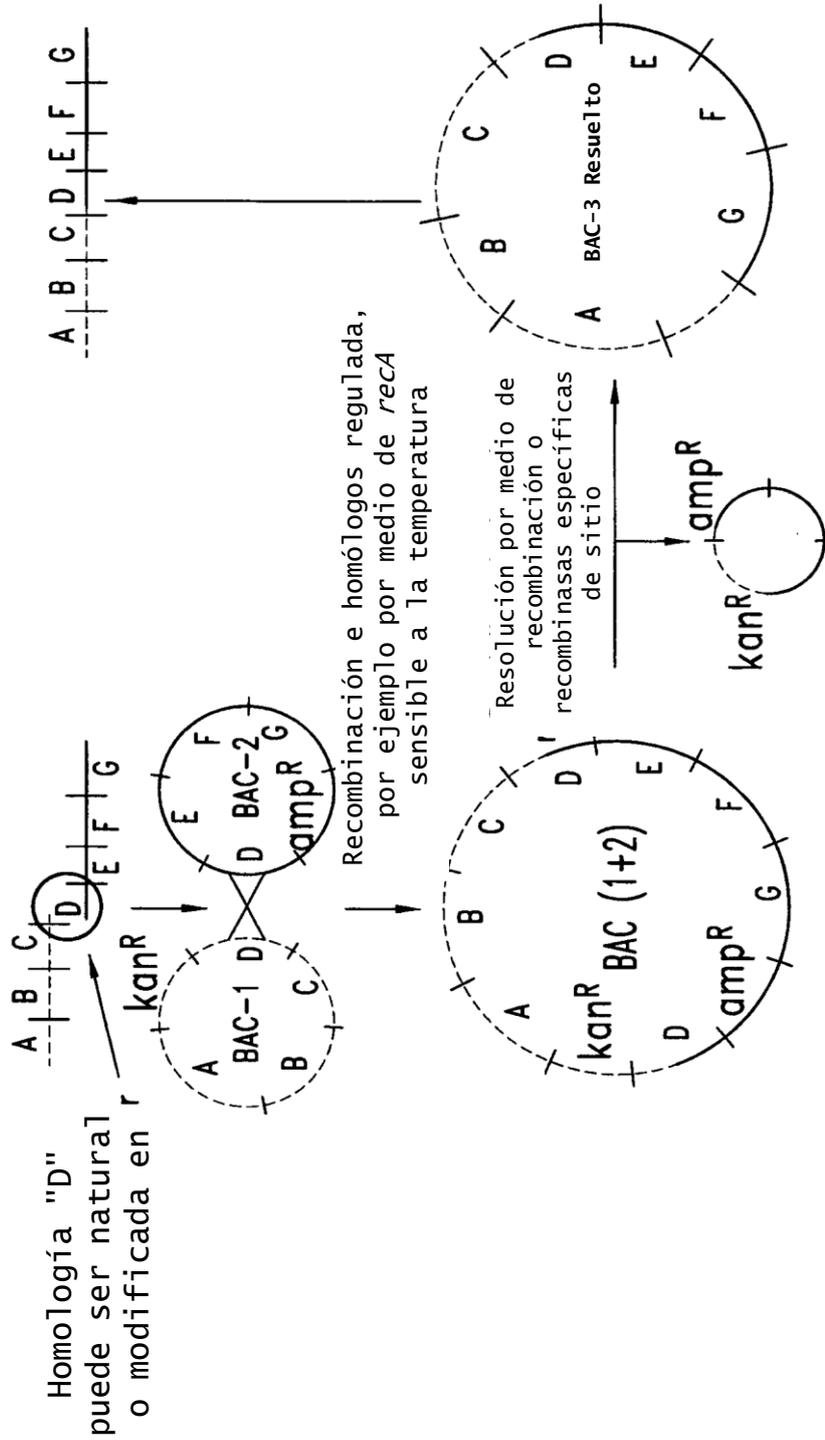
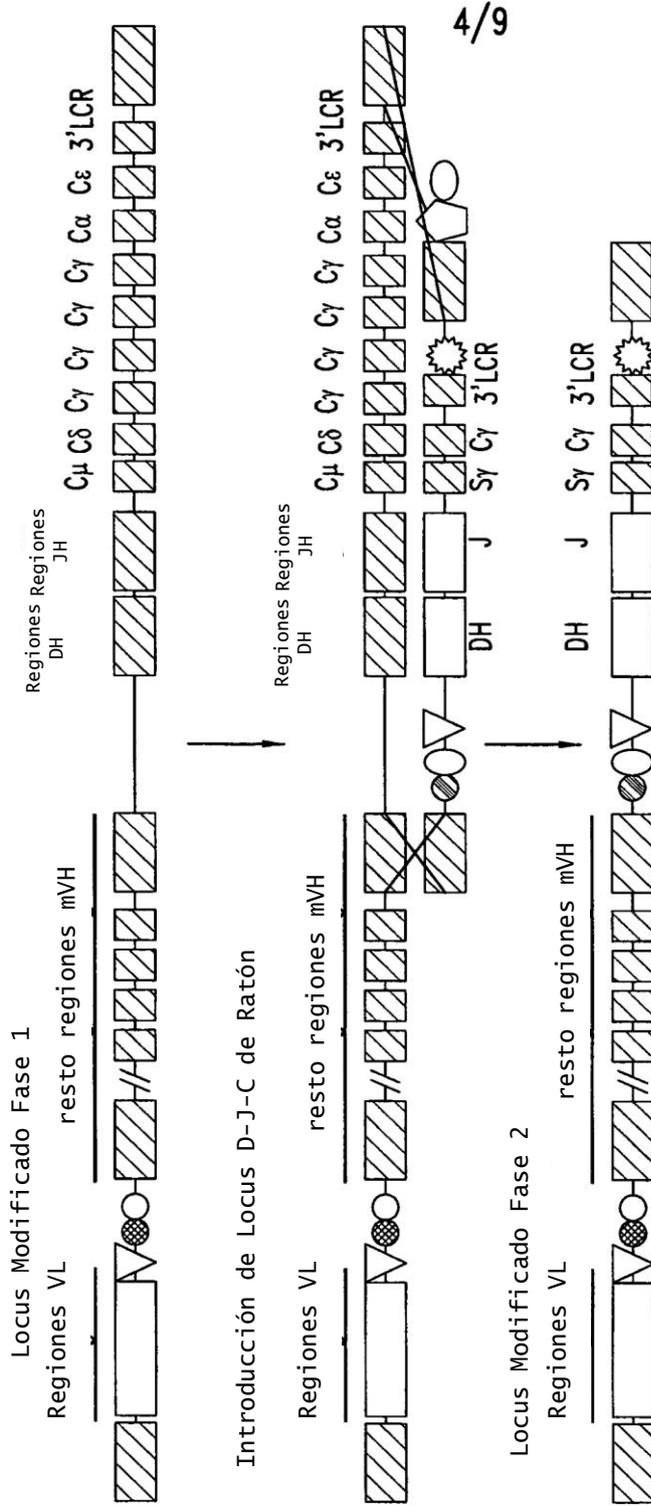


FIG. 3

Modificación Locus SVD - Etapa 2



4/9

Secuencia de empalme para detección PCR

- GFP
- loxP
- RFP
- YFP
- Higromicina
- tk
- G418

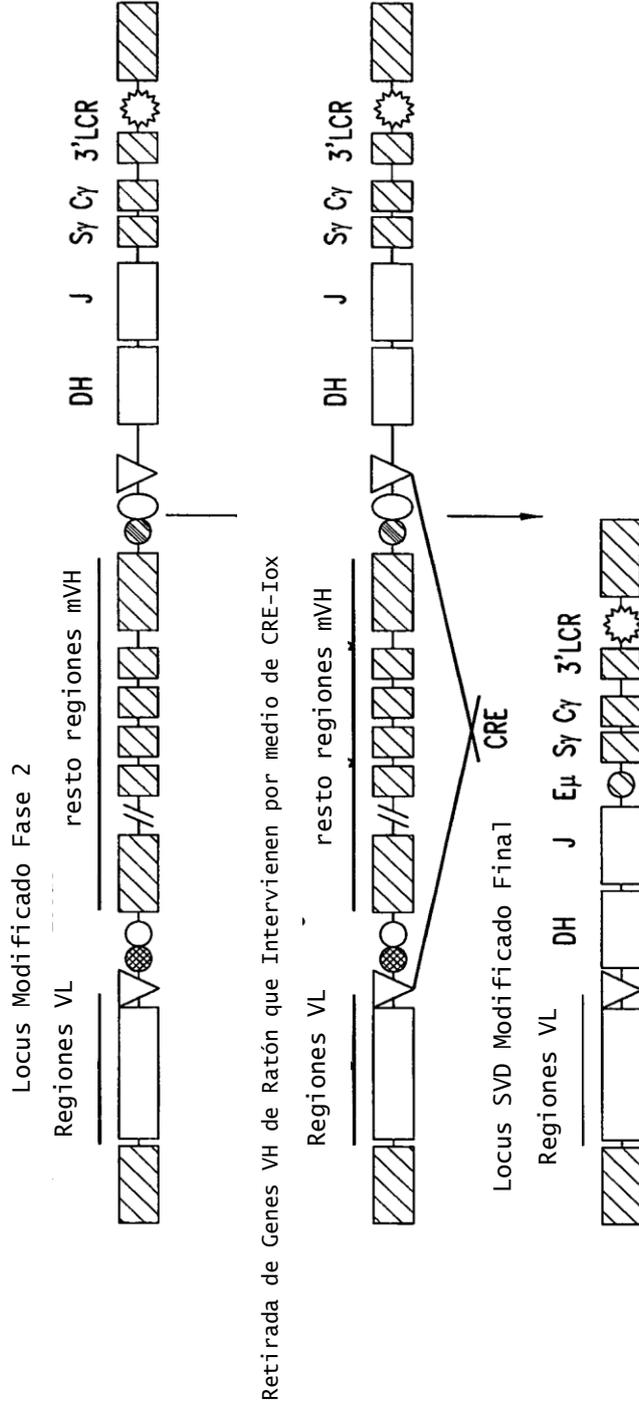
Contenido de Especies

	Humano
--	--------

5

FIG. 4

Modificación Locus SVD - Etapa 3



5/9

Contenido de Especies



6

FIG. 5

Variantes para SVLD Humano  
 Genes de Combinación de Dominio Variable

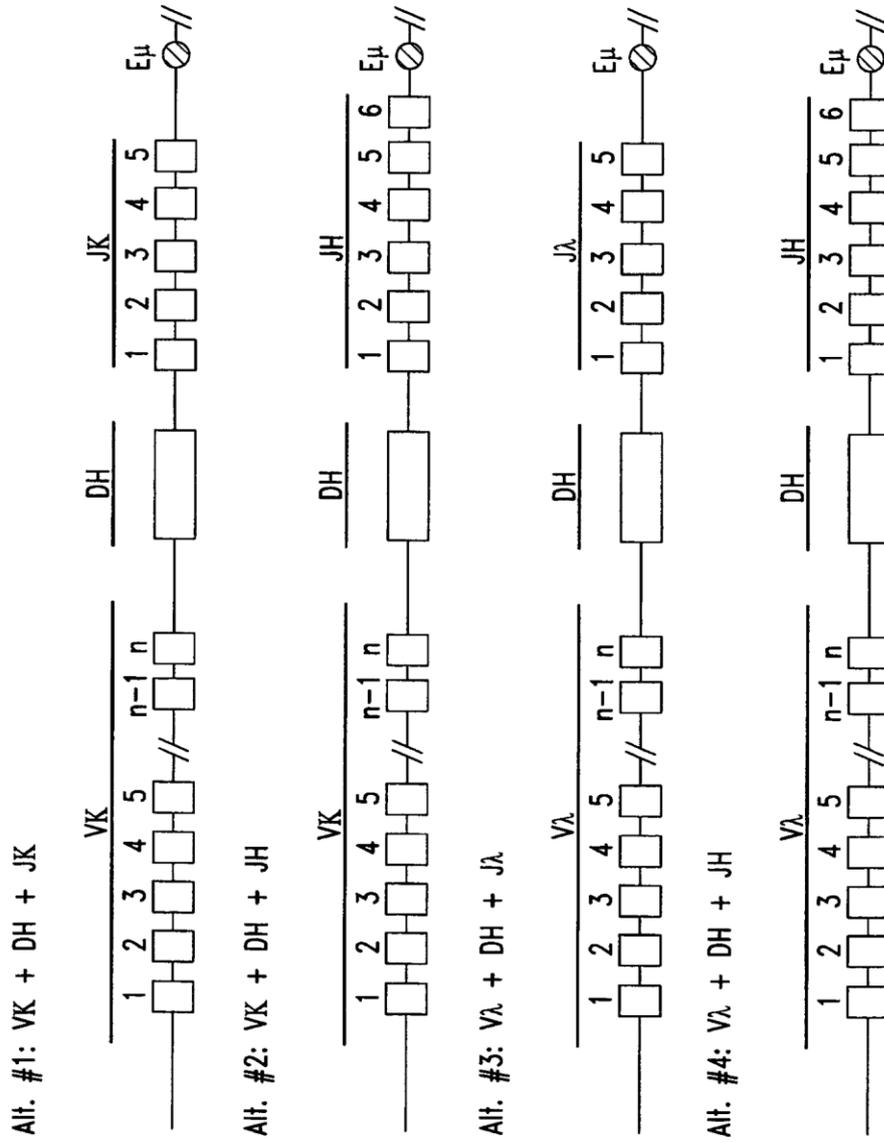
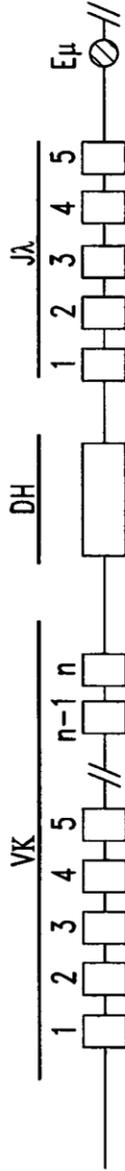


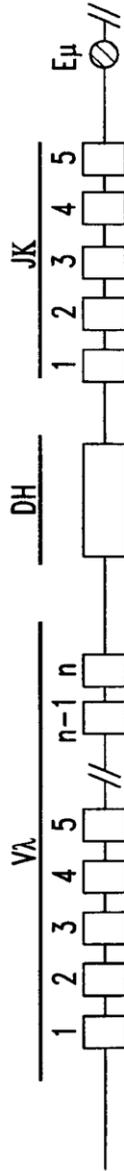
FIG. 6A

Variantes para SVLD Humano  
Genes de Combinación de Dominio Variable

Alt. #5: VK + DH + J $\lambda$



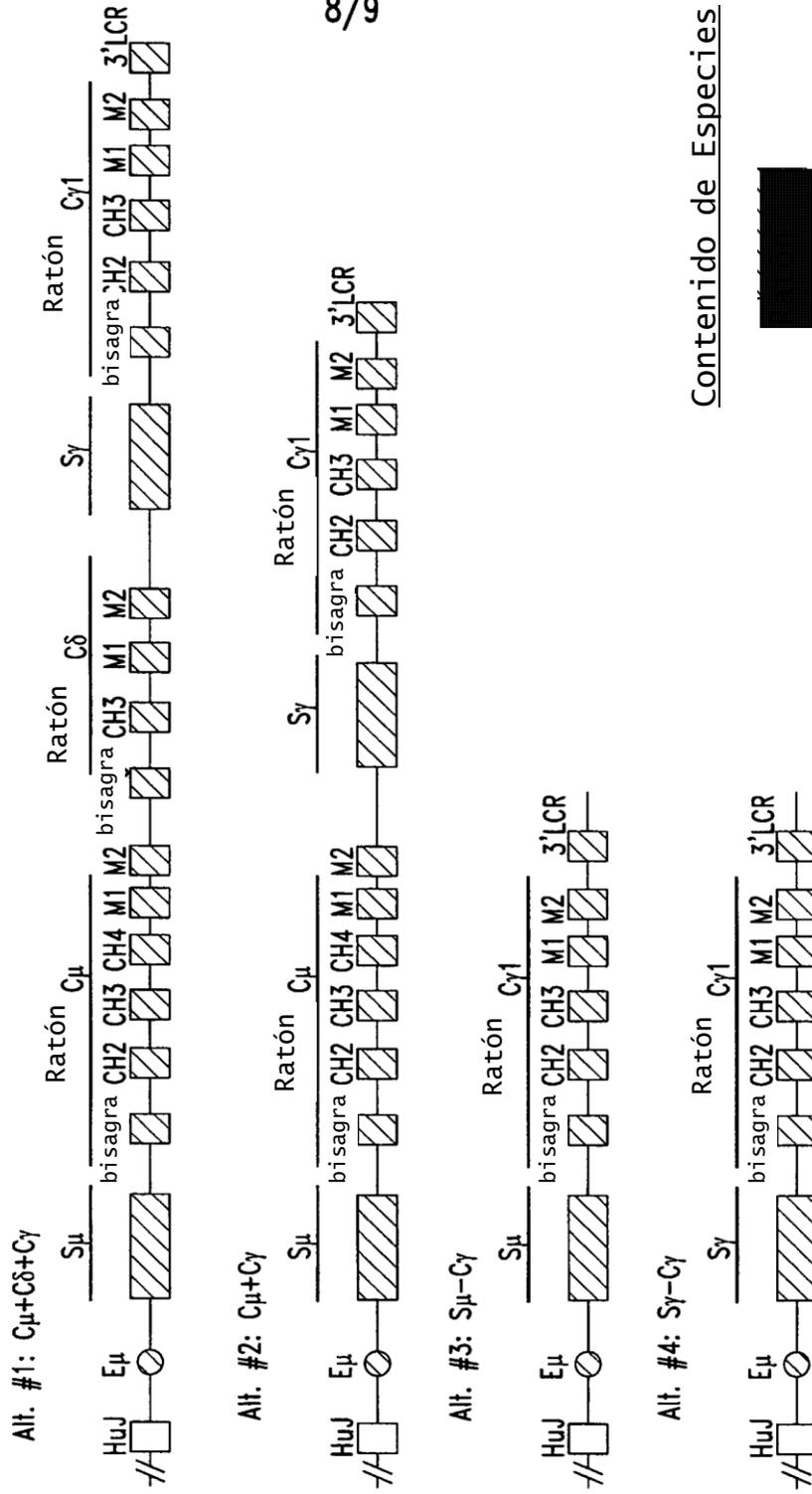
Alt. #6: V $\lambda$  + DH + JK



Humano

*FIG. 6B*

Variantes para Modificación de Región Constante



8/9

FIG. 7

Una Combinación Variante para Estructura de Locus Ig de SVLD

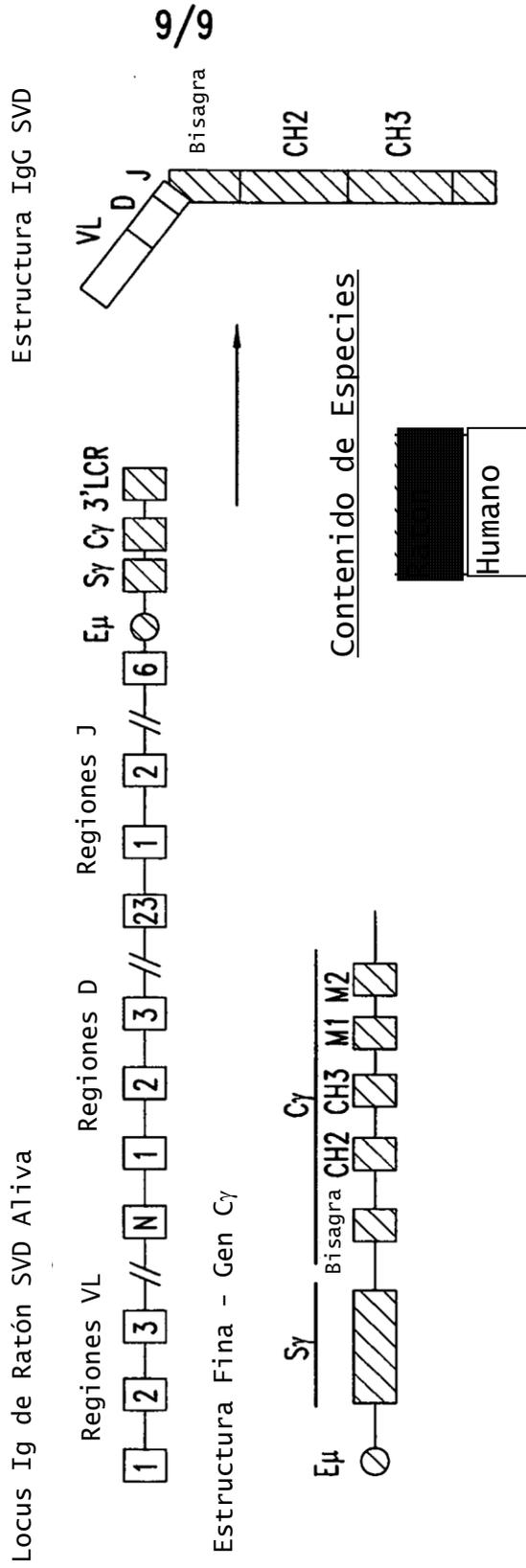


FIG. 8