(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 573 828**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2012** **E 12717033 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016** **EP 2701499**

(54) Título: **Animales no humanos que expresan anticuerpos con una cadena ligera común**

(30) Prioridad:

25.04.2011 US 201113093156

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2016

(73) Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

(72) Inventor/es:

MCWHIRTER, JOHN;
MACDONALD, LYNN;
STEVENS, SEAN;
DAVIS, SAMUEL;
BUCKLER, DAVID R.;
HOSIAWA, KAROLINA A. y
MURPHY, ANDREW J.

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 573 828 T3

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

DESCRIPCIÓN

Animales no humanos que expresan anticuerpos con una cadena ligera común

Área de la invención

Se proporciona un ratón genéticamente modificado que expresa anticuerpos que presentan una cadena ligera variable humana/constante de ratón asociada con diversas cadenas pesadas variables humanas/constantes de ratón. Se proporciona un método para elaborar un anticuerpo biespecífico a partir de secuencias de genes de la región variable de linfocitos B del ratón.

Antecedentes

Los anticuerpos habitualmente comprenden un componente homodimérico de la cadena pesada, en donde cada monómero de la cadena pesada está asociado a uno idéntico de la cadena ligera. Los anticuerpos que tienen un componente heterodimérico de la cadena pesada (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos) resultan deseables como anticuerpos terapéuticos. Pero elaborar anticuerpos biespecíficos con un componente de la cadena ligera adecuado que pueda asociarse de forma satisfactoria con cada una de las cadenas pesadas de un anticuerpo biespecífico, ha demostrado ser problemático.

En una aproximación, una cadena ligera podría ser seleccionada mediante estudio de la estadística de uso para todos los dominios variables de la cadena ligera, identificando la cadena más frecuentemente utilizada en anticuerpos humanos, y emparejando dicha cadena ligera *in vitro* con las dos cadenas pesadas de especificidad diferente.

En otra aproximación, una cadena ligera podría ser seleccionada observando secuencias de la cadena ligera en una genoteca de expresión en fago o “phage display” (*por ejemplo*, una genoteca de phage display que comprenda secuencias de la región variable de la cadena ligera, *por ejemplo*, una genoteca de scFv humana), y seleccionando de la genoteca la región variable de la cadena ligera más comúnmente utilizada). La cadena ligera puede entonces someterse a prueba en las dos cadenas pesadas diferentes de interés.

En otra aproximación, una cadena ligera podría ser seleccionada sometiendo a ensayo una genoteca de phage display de secuencias variables de la cadena ligera utilizando como sondas las secuencias variables de la cadena pesada de las dos cadenas pesadas de interés. Una cadena ligera que se asocia a ambas secuencias variables de la cadena pesada podría ser seleccionada como una cadena ligera para las cadenas pesadas.

En otra aproximación, una cadena ligera candidata podría ser alineada con las cadenas ligeras análogas de las cadenas pesadas, y las modificaciones se realizan en la cadena ligera para hacer coincidir más estrechamente las características de las secuencias comunes a las cadenas ligeras análogas de ambas cadenas pesadas. Si las probabilidades de inmunogenicidad necesitan ser minimizadas, las modificaciones preferiblemente dan como resultado secuencias que están presentes en secuencias conocidas de la cadena ligera, de tal manera que es poco probable que el proceso proteolítico genere un epítopo de linfocitos T en base a parámetros y métodos conocidos en el arte para evaluar la probabilidad de inmunogenicidad (*es decir,* ensayos *in silico* además de por vía húmeda).

Todas las aproximaciones anteriores se basan en métodos in vitro que incorpora una cantidad de limitaciones a priori, *por ejemplo*, la identidad de secuencias, la habilidad para asociarse con cadenas pesadas específicas preseleccionadas, etc. Existe la necesidad en el arte de composiciones y métodos que no se basen en manejar condiciones in vitro, sino que en su lugar empleen aproximaciones biológicamente más sensibles para fabricar proteínas humanas de unión a epítopos que incluyan una cadena ligera común.

Resumen

Se proporcionan ratones genéticamente modificados que expresan dominios variables de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina humana, en donde los ratones presentan un repertorio variable de la cadena ligera limitado. En particular, se proporciona un ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio variable de la cadena ligera (V_L) obtenido a partir de una secuencia de Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada que se encuentra presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vk no reordenado de la inmunoglobulina endógena y un segmento génico Jk no reordenado de la inmunoglobulina endógena; y en donde el dominio, o dominios, V_L humano está asociado con un dominio variable de la cadena pesada (V_H) obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. También se prevé el uso de un ratón de ese tipo en la fabricación de un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada (V_H) humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada selecciona de 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-

6/5 o 1-69/6-13/4. Además se proporciona un método de producción de un anticuerpo para un antígeno de interés que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada, seleccionado de 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4 que comprende: (a) inmunizar el ratón proporcionado con un antígeno de interés; (b) obtener del ratón un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada, seleccionado de 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4; y emplear la secuencia de la región variable de la inmunoglobulina obtenida en (b) en un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés.

También se proporciona un ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio variable de la cadena ligera humana (V_L) obtenido a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada que se encuentra presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vk de la inmunoglobulina endógena no reordenado y de un segmento génico Jk de la inmunoglobulina endógena no reordenado; y en donde el dominio, o dominios, V_L humano está asociado con un dominio variable de la cadena pesada humana (V_H) obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4. Se prevé además el uso de un ratón de ese tipo en la fabricación de un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana (V_H) obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4. Se prevé además el uso de un ratón de ese tipo en la fabricación de un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana (V_H) obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4. También se proporciona un método para producir un anticuerpo para un antígeno de interés que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4 que comprende: (a) inmunizar el ratón proporcionado con un antígeno de interés; (b) obtener del ratón un dominio variable de la cadena pesada humana obtenida de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4; y (c) emplear la secuencia de la región variable de la inmunoglobulina obtenida en (b) en un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés.

Se hace referencia además a un sistema biológico para generar un dominio variable de la cadena ligera humana que se asocia, y expresa, con un repertorio diverso de dominios variables de la cadena pesada humana con maduración de la afinidad. Se hace referencia además a métodos para la elaboración de proteínas de unión que comprendan dominios variables de inmunoglobulina, que comprenden inmunizar ratones que presentan un repertorio limitado de la cadena ligera de la inmunoglobulina con un antígeno de interés, y emplear una secuencia de genes de la región variable de la inmunoglobulina del ratón en una proteína de unión que se une específicamente al antígeno de interés. Entre los métodos se incluyen métodos para elaborar dominios variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana adecuados para su uso en la elaboración de proteínas de unión al antígeno multiespecíficas.

Los ratones genéticamente modificados proporcionados pueden seleccionar dominios variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana con maduración de la afinidad adecuados, obtenidos a partir de un repertorio de segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada humana no reordenadas, en donde los dominios variables de la cadena pesada con maduración de la afinidad se asocian y se expresan con un único dominio variable de la cadena ligera humana obtenido a partir de un segmento génico de la región variable de la cadena ligera humana. Se proporcionan también ratones modificados genéticamente que presentan una opción de dos segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera humana.

Se proporcionan ratones modificados genéticamente que expresan un repertorio limitado de dominios variables de la cadena ligera humana, o un único dominio variable de la cadena ligera humana, de un repertorio limitado de secuencias de la región variable de la cadena ligera humana. Los ratones se modifican mediante ingeniería genética para incluir una única secuencia V/J de la cadena ligera (o dos secuencias V/J) que expresan una región variable de una única cadena ligera (o que expresa cualquiera o ambas de dos regiones variables). Las secuencias reordenadas son una secuencia de Vκ1-39/Jκ5 humano reordenado, un Vκ3-20/Jκ1 humano reordenado, o ambos. Una cadena ligera que comprende la secuencia variable es capaz de emparejarse con una pluralidad de cadenas pesadas humanas con maduración de la afinidad, seleccionadas de manera clonal por el ratón, en donde las regiones variables de la cadena pesada se unen específicamente a diferentes epítopos.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que comprende un único segmento génico de la región variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina humana que es capaz de reordenarse con un segmento génico J humano (seleccionado de uno o una pluralidad de segmentos J_L) y que codifica un dominio V_L humano de una cadena ligera de la inmunoglobulina. En otro caso, el ratón comprende no más de dos segmentos génicos V_L, cada uno de los cuales es capaz de reordenarse con un segmento génico J humano (seleccionado de uno o de una pluralidad de segmentos J_L) y que codifican un dominio V_L humano de una cadena ligera de la inmunoglobulina.

En un caso, el único segmento génico V_L humano se encuentra operativamente enlazado a un segmento génico J_L seleccionado de Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4, y Jκ5, en donde el único segmento génico V_L humano es capaz de reordenarse para formar una secuencia que codifica un gen de la región variable de la cadena ligera con uno cualquiera o más segmentos génicos J_L humanos.

Además se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que comprende un locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina que no comprende un segmento génico V_L endógeno de ratón que sea capaz de reordenarse para formar un gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina, en donde el locus V_L comprende un segmento génico V_L humano que es capaz de reordenarse para codificar una región V_L de un gen de la cadena ligera. En un caso específico, el segmento génico V_L humano es un segmento génico Vκ1-39Jκ5 humano o un segmento génico Vκ3-20Jκ1 humano. Además, se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que comprende un locus V_L que no comprende un segmento génico V_L de ratón endógeno que sea capaz de reordenarse para formar un gen de la cadena ligera de la inmunoglobulina, en donde el locus V_L comprende no más de dos segmentos génicos V_L humanos que son capaces de reordenarse para codificar una región V_L de un gen de la cadena ligera. En un caso específico, los no más de 2 segmentos génicos V_L humanos son un segmento génico Vκ1-39Jκ5 humano y un segmento génico Vκ3-20Jκ1 humano.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente proporcionado comprende una única región variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina humana reordenada (V/J) (es decir, una región V_L/J_L) que codifica un dominio V_L humano de la cadena ligera de una inmunoglobulina. En otro aspecto, el ratón comprende no más de dos regiones V_L humanas reordenadas que son capaces de codificar un dominio V_L humano de una cadena ligera de la inmunoglobulina. Las secuencias reordenadas son una secuencia de Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada, un Vκ3-20/Jκ1 humano reordenado, o ambos.

En una realización específica, la región V_L es una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humano o una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humano. En una realización específica, el ratón tiene tanto una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humano y una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humano.

En una realización, el segmento génico V_L humano se encuentra ligado de manera operativa a una secuencia líder de ratón o humana. En una realización, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón. En una realización específica, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder de Vκ3-7 de ratón. En una realización específica, la secuencia líder se encuentra ligada de forma operativa a la secuencia V_L/J_L humana reordenada.

En una realización, el segmento génico V_L está ligado a la secuencia de un promotor de la inmunoglobulina. En una realización, la secuencia del promotor es una secuencia de un promotor humano. En una realización específica, el promotor de la inmunoglobulina humana es un promotor Vκ3-15 humano. En una realización específica, el promotor está ligado operativamente a la secuencia V_L/J_L humana reordenada.

También se hace referencia a un locus de la cadena ligera que comprende un extremo 5' de la secuencia líder flanqueado (con respecto a la dirección de transcripción de un segmento génico V_L) con un promotor de la inmunoglobulina humana, y un extremo 3' flanqueado con un segmento génico V_L humano que se reordena con un segmento J humano, y codifica un dominio V_L de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante de la cadena ligera (C_L) endógena de ratón. En una realización específica, el segmento génico V_L se encuentra en el locus Vk de ratón, y la C_L de ratón es un Ck de ratón.

En una realización, el locus de la cadena ligera comprende el extremo 5' con la secuencia líder flanqueado (con respecto a la dirección de transcripción de un segmento génico V_L) con un promotor de la inmunoglobulina humana, un extremo 3' flanqueado con una región V_L humana reordenada (secuencia V_L/J_L) y codifica un dominio V_L de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante de la cadena ligera (C_L) de ratón endógena. En una realización específica, la secuencia V_L/J_L humana reordenada se encuentra en el locus kappa (κ) de ratón, y la C_L de ratón es una Cκ de ratón.

En una realización, el locus V_L del ratón modificado es un locus de la cadena ligera κ, y el locus de la cadena ligera κ comprende un potenciador intrónico κ de ratón, un potenciador 3' κ de ratón, o ambos un potenciador intrónico y un potenciador 3'.

En una realización, el ratón comprende un locus de la cadena ligera lambda (λ) de la inmunoglobulina no funcional. En una realización específica, el locus de la cadena ligera λ comprende una deleción de una o más secuencias del locus, en donde dicha una o más deleciones convierten el locus de la cadena ligera λ en incapaz de reordenarse para formar un gen de la cadena ligera. En otra realización, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_L del locus de la cadena ligera λ son suprimidos.

En una realización, el ratón fabrica una cadena ligera que comprende un dominio V_L mutado somáticamente obtenido a partir del segmento génico V_L humano. En una realización, la cadena ligera comprende u dominio V_L

mutado somáticamente obtenido a partir del segmento génico V_L humano, y una región Cκ de ratón. En una realización, el ratón no expresa una cadena ligera λ.

En una realización, el ratón genéticamente modificado es capaz de producir la hipermutación somática de la secuencia de la región V_L humana.

En una realización, el ratón comprende una célula que expresa una cadena ligera que comprende un dominio V_L humano mutado somáticamente ligado a un Cκ de ratón, en donde la cadena ligera se asocia con una cadena pesada que comprende un dominio V_H mutado somáticamente obtenido a partir de un segmento génico V_H y en donde la cadena pesada comprende una región constante de la cadena pesada (C_H) de ratón. En una realización específica, la cadena pesada comprende un C_H1 de ratón, una región bisagra de ratón, un C_H2 de ratón, y un C_H3 de ratón. En una realización específica, la cadena pesada comprende un C_H1 humano, una región bisagra, un C_H2 de ratón, y un C_H3 de ratón.

En una realización, el ratón comprende un reemplaza de segmentos génicos V_H de ratón endógenos por uno o más segmentos génicos V_H humanos, en donde los segmentos génicos V_H humanos están operativamente ligados a un gen de la región C_H de ratón, de tal manera que el ratón reordena los segmentos génicos V_H humanos y expresa una cadena pesada de la inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio V_H humano y uno C_H de ratón. En una realización, el 90-100% de los segmentos génicos V_H de ratón no reordenados son reemplazados con al menos un segmento génico V_H humano no reordenado. En una realización específica, todos, o sustancialmente todos, de los segmentos génicos V_H endógenos de ratón son reemplazados por al menos un segmento génico V_H no reordenado. En una realización, el reemplazo se realiza con al menos 19, al menos 39, o al menos 80 u 81 segmentos génicos V_H humanos no reordenados. En una realización, el reemplazo se realiza con al menos 12 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de todos los segmentos D_H y J_H de ratón por al menos un segmento D_H humano no reordenado y al menos un segmento J_H humano no reordenado. En una realización, el al menos un segmento D_H humano no reordenado se selecciona de 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, 7-27, y una combinación de los mismos. En una realización, el al menos un segmento J_H humano no reordenado se selecciona de 1, 2, 3, 4, 5, 6, y una combinación de los mismos. En una realización específica, dicho uno, o más, segmento génico V_H humano se selecciona de 1-2, 1-8, 1-24, 1 - 69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento génico V_H humano 6-1, y una combinación de los mismos.

Se proporciona un ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio variable de la cadena ligera (V_L) humano obtenido a partir de una secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vκ endógeno de la inmunoglobulina y de un segmento génico Jκ endógeno de la inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio, o dominios, V_L humano está asociado a un dominio variable de la cadena pesada (V_H) humano obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. También se proporciona un ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio V_L humano obtenido a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vκ endógeno de la inmunoglobulina y un segmento génico Jκ endógeno de la inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio, o dominios, V_L humano está asociado a un dominio V_H humano obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

También se hace referencia a un ratón que comprende un linfocito B que expresa una proteína de unión que se une de forma específica a un antígeno de interés, en donde la proteína de unión comprende una cadena ligera obtenida a partir de un reordenamiento Vκ1-39/Jκ5 humano o un reordenamiento Vκ3-20/Jκ1 humano, y en donde el linfocito comprende un gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina reordenado obtenido a partir de un reordenamiento de segmentos génicos V_H humanos seleccionados de un segmento génico 1-69, 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 3-33, 3-53, 4-39, 4-59, y 5-51. En un caso, dicho uno o más segmentos génicos V_H humanos se reordenan con un segmento génico J_H de la cadena pesada humano seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, y 6. En un caso, dichos uno o más segmentos génicos V_H y J_H humanos se reordenan con un segmento génico D_H humano seleccionado de 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, y 7-27. En un caso específico, el gen de la cadena ligera presenta 1, 2, 3, 4, o 5 o más hipermutaciones somáticas.

En una realización, el ratón comprende un linfocito B que comprende una secuencia de genes de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina reordenada que comprende una región $V_H/D_H/J_H$ seleccionada de entre 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6- 6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1 -1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/3, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3- 30/5-12/4, 3-30/6-6/1 , 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7- 27/5, 3-30/7-27/6, 3-33/1 -7/4, 3-33/2-15/4, 4-39/1-26/3, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4,4-

59/3- 22/3, 5-51/3-16/6, 5-51/5-5/3, 5-51/6-13/5, 3-53/1-1/4, 1 -69/6-6/5, y 1 -69/6-13/4. En una realización específica, el linfocito B expresa una proteína de unión que comprende una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena pesada de ratón, y una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena ligera de ratón. En una realización, la región V_L humana reordenada es una secuencia Vκ1-39Jκ5 humana, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio V_L obtenido a partir de una secuencia V_L/J_L y (ii) un C_L de ratón; en donde la cadena ligera está asociada a una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) un dominio C_H de ratón y (ii) un dominio V_H humano mutado somáticamente obtenido a partir de un segmento génico V_H humano seleccionado de 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento génico V_H humano 6-1, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que se encuentra somáticamente mutada. En una realización, el C_L es un Ck de ratón. En una realización específica, el segmento génico V_H humano se selecciona de un segmento génico 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 4-59, 5-51, y 1-69. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente comprende una secuencia obtenida a partir de un segmento D_H seleccionado de 1-1, 1-7, 2-8, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, y 7-27. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente comprende una secuencia obtenida a partir de un segmento J_H seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, y 6. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente está codificado por una secuencia $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3-30/5-12/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7-27/5, 3-30/7-27/6, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4, 4-59/3-22/3, 5-51/5-5/3, 1-69/6-6/5, y 1-69/6-13/4.

En una realización, el ratón comprende un linfocito B que expresa una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno de interés, en donde la proteína de unión comprende una cadena ligera obtenida a partir de un reordenamiento Vκ1-39/Jκ5 humano, y en donde el linfocito comprende una secuencia de genes de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina reordenada que comprende una región $V_H/D_H/J_H$ seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6,1-69/6-6/5 y 1-69/6-13/4. En una realización específica, el linfocito B expresa una proteína de unión que comprende una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena pesada de ratón, y una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena ligera de ratón.

En una realización, la región V_L humana es una secuencia Vκ3-20Jκ1 humana, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio V_L obtenido a partir de la secuencia V_L/J_L humana reordenada, y (ii) un C_L de ratón; en donde la cadena ligera está asociada a una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) un C_H de ratón, y (ii) un V_H humano mutado somáticamente obtenido de un segmento génico V_H humano seleccionado de 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento génico V_H humano 6-1, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que se encuentra mutada somáticamente. En una realización, el C_L es un Ck de ratón. En una realización específica, el segmento génico V_H humano se selecciona a partir de un segmento génico 3-30, 3-33, 3-53, 4-39, y 5-51. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente comprende una secuencia obtenida a partir de un segmento D_H seleccionado de 1-1, 1-7, 1-26, 2-15, 3-3, 3-16, y 6-13. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente comprende una secuencia obtenida a partir de un segmento J_H seleccionado de 3, 4, 5, y 6. En una realización específica, el dominio V_H humano somáticamente mutado está codificado por una secuencia $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, 4-39/1-26/3, 5-51/3-16/6, 5-51/6-13/5, y 3-53/1-1/4.

En una realización, el ratón comprende un linfocito B que expresa una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno de interés, en donde la proteína de unión comprende una cadena ligera obtenida a partir de un reordenamiento Vκ3-20/Jκ1 humano, y en donde el linfocito comprende una secuencia de genes de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina reordenada que comprende una región $V_H/D_H/J_H$ seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, y 3-53/1-1/4. En una realización específica, el linfocito B expresa una proteína de unión que comprende una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena pesada de ratón, y una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena ligera de ratón.

En una realización, el ratón comprende tanto una secuencia Vκ1-39Jκ5 humana reordenada como una secuencia Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio V_L obtenido a partir de la secuencia Vκ1-39Jκ5 humana o la secuencia Vκ3-20Jκ1 humana, y (ii) un C_L de ratón; en donde la cadena ligera está asociada a una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) un C_H de ratón, y (ii) un V_H humano mutado somáticamente obtenido a partir de un segmento génico V_H humano seleccionado de 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento génico V_H humano 6-1, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que se encuentra mutada somáticamente. En una realización, el C_L es un Ck de ratón.

En diversas realizaciones, la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena pesada de ratón, y la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena ligera de ratón expresadas por el linfocito B, son análogas en el ratón. En diversas realizaciones, la cadena ligera quimérica y la cadena pesada quimérica expresada por el ratón, son análogas en el ratón.

En una realización, el 90-100% de los segmentos génicos V_H de ratón endógenos reordenados son reemplazados por al menos un segmento génico V_H humano reordenado. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón endógenos no reordenados son reemplazados por al menos un segmento génico V_H humano no reordenado. En una realización, el reemplazo se realiza con al menos 18, al menos 39, al menos 80, u 81 segmentos génicos V_H humanos no reordenados. En una realización, el reemplazo se realiza con al menos 12 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos génicos V_H humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos génicos V_H humanos no reordenados.

En una realización, el ratón genéticamente modificado es una cepa C57BL, en una realización específica seleccionada de entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/O1a. En una realización específica, el ratón genéticamente modificado es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac).

En una realización, el ratón expresa un anticuerpo quimérico inverso que comprende una cadena ligera, que comprende a su vez un C_k de ratón y un dominio V_L humano mutado somáticamente obtenido a partir de una secuencia Vκ1-39Jκ5 humana reordenada o una secuencia Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, y una cadena pesada que comprende un C_H de ratón y un dominio V_H humano mutado somáticamente obtenido a partir de un segmento génico V_H humano seleccionado de un segmento génico V_H humano 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5- 51, y 6-1, en donde el ratón no expresa un anticuerpo completamente de ratón y no expresa un anticuerpo completamente humano. En una realización, el ratón comprende un locus de la cadena ligera κ que comprende el reemplazo de segmentos de genes de la cadena ligera k endógenos de ratón por la secuencia Vκ1-39Jκ5 humana reordenada o la secuencia Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, y comprende un reemplazo de todos, o sustancialmente todos, los segmentos génicos VH de ratón con un repertorio completo o sustancialmente completo de segmentos génicos V_H humanos.

También se hace referencia a un ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina a partir de una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina reordenada en la línea germinal del ratón, en donde la cadena ligera de la inmunoglobulina comprende una secuencia variable humana.

En una realización, la línea germinal del ratón carece de un segmento génico V de la cadena ligera de la inmunoglobulina no reordenado funcional. En una realización, la línea germinal del ratón carece de un segmento génico J de la cadena ligera de la inmunoglobulina no reordenada funcional.

En una realización, la línea germinal del ratón comprende no más de una, no más de dos, o no más de tres secuencias de la cadena ligera (V/J) reordenadas.

La secuencia de la cadena ligera κ se selecciona de una secuencia Vκ1-39/Jκ1 humana, una secuencia Vκ3-20/Jκ5 humana, y una combinación de las mismas. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera κ es una secuencia Vκ1 -39/Jκ5 humana. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera κ es una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana.

En una realización, el ratón comprende, además, es su línea germinal, una secuencia seleccionada de un potenciador intrónico κ de ratón en el extremo 5' con respecto a la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina reordenada, un potenciador κ de ratón en el extremo 3', y una combinación de los mismos.

En una realización, el ratón comprende un segmento génico V_H humano no reordenado, un segmento génico D_H humano no reordenado, y un segmento génico J_H humano no reordenado, en donde dichos segmentos génicos J_H son capaces de reordenarse para formar una secuencia de genes variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina ligada operativamente a una secuencia de genes constante de la cadena pesada. El ratón comprende una pluralidad de segmentos génicos V_H, D_H y J_H humanos. En una realización específica, los segmentos génicos V_H, D_H, y J_H humanos reemplazan a los segmentos génicos V_H, D_H, y J_H endógenos de ratón en el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón endógena. En una realización específica, el ratón comprende un reemplazo de todos, o sustancialmente todos, los segmentos génicos V_H, D_H, y J_H de ratón funcionales con todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H, D_H, y J_H humanos funcionales.

En una realización, el ratón expresa una cadena ligera de la inmunoglobulina comprende una secuencia constante de ratón. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende una secuencia constante humana.

En una realización, el ratón expresa una cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende una secuencia de ratón seleccionada de entre una secuencia C_H1, una secuencia bisagra, una secuencia C_H2, una secuencia C_H3, y una combinación de las mismas.

En una realización, el ratón expresa una cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende una secuencia humana seleccionada de entre una secuencia C_H1, una secuencia bisagra, una secuencia C_H2, una secuencia C_H3, y una combinación de las mismas.

En una realización, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina reordenada en la línea germinal del ratón está en un locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina endógena de ratón. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina reordenada en la línea germinal del ratón reemplaza todas, o sustancialmente todas, las secuencias V y J de la cadena ligera de ratón en el locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina endógena de ratón.

También se hace referencia a una célula de ratón, que es aislada de un ratón tal como de describe en la presente patente. En un ejemplo, la célula es una célula ES. En un ejemplo, la célula es un linfocito. En un ejemplo, el linfocito es un linfocito B. En un ejemplo, el linfocito B expresa una cadena pesada quimérica que comprende un dominio variable obtenida a partir de un segmento génico humano; y una cadena ligera obtenida a partir de una secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada, una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada, o una combinación de las mismas; en donde el dominio variable de la cadena pesada se fusiona con una región constante de ratón y el dominio variable de la cadena ligera se fusiona con una región constante humana o de ratón.

También se hace referencia a un linfocito B de ratón que es aislado de un ratón tal como se describe en la presente patente, en donde el linfocito B expresa una cadena pesada quimérica obtenida a partir de una secuencia VH/DH/JH humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 y 1-69/6-13/4; y una cadena ligera quimérica obtenida a partir de una secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada; en donde el dominio variable se fusiona con una región constante de ratón y el dominio variable de la cadena ligera se fusiona con una región constante de ratón.

También se hace referencia a un linfocito B de ratón que es aislado de un ratón según se describe en la presente patente, en donde el linfocito B expresa una cadena pesada quimérica obtenida a partir de una secuencia VH/DH/JH humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-1 5/4, y 3-53/1-1/4; y una cadena ligera quimérica obtenida a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada; en donde el dominio variable se fusiona con una región constante de ratón y el dominio variable de la cadena ligera se fusiona con una región constante de ratón.

En diversos ejemplos, las cadenas ligera y pesada quiméricas expresadas por el linfocito B aislado de un ratón, según se describe en la presente patente, son análogas en el ratón.

También se hace referencia a un hibridoma, en donde el hibridoma está elaborado con un linfocito B de un ratón, según se describe en la presente patente. En un ejemplo específico, el linfocito B procede de un ratón, tal como se describe en la presente patente, que ha sido inmunizado con un inmunógeno que comprende un epítopo de interés, y el linfocito B expresa una proteína de unión que se une al epítopo de interés, donde la proteína de unión tiene un dominio V_H humano mutado somáticamente y un dominio C_H de ratón, y tiene un dominio V_L humano obtenido a partir de Vκ1-39Jκ5 humano reordenado o Vκ3-20Jκ1 humano reordenado y un C_L de ratón.

También se hace referencia a un hibridoma que está elaborado con un linfocito B de un ratón, según se describe en la presente patente, en donde el hibridoma expresa una cadena pesada quimérica obtenida a partir de una secuencia $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 y 1-69/6-13/4; y una cadena ligera quimérica obtenida a partir de una secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada; en donde el dominio variable se fusiona con una región constante de ratón y el dominio variable de la cadena ligera se fusiona con una región constante de ratón.

También se hace referencia a un hibridoma que está elaborado con un linfocito B de un ratón, según se describe en la presente patente, en donde el hibridoma expresa una cadena pesada quimérica obtenida a partir de una secuencia $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, y 3-53/1-1/4; y una cadena ligera quimérica obtenida a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada; en donde el dominio variable se fusiona con una región constante de un ratón y el dominio variable de la cadena ligera se fusiona con una región constante de ratón.

En diversos ejemplos, las cadenas ligera y pesada quiméricas expresadas por el hibridoma que se elabora con un linfocito B de un ratón, según se describe en la presente patente, son análogas en el hibridoma. En diversos ejemplos, las cadenas ligera y pesada quiméricas expresadas por el hibridoma que se elabora con un linfocito B de un ratón según se describe en la presente patente son análogas en linfocito B del ratón.

También se hace referencia a un embrión de ratón, en donde el embrión comprende una célula ES donadora que se obtiene de ratón según se describe en la presente patente.

También se hace referencia a un vector de direccionamiento, que comprende, desde el extremo 5' hasta el 3' en la dirección de transcripción, en referencia a las secuencias de los brazos de homología de ratón del extremo 5' y 3' del vector, un brazo de homología de ratón del extremo 5', un promotor de la inmunoglobulina humana o de ratón, una secuencia líder humana o de ratón, y una región V_L humana seleccionada de entre un Vκ1-39Jκ5 humano reordenado o un Vκ3-20Jκ1 humano reordenado, y un brazo de homología del extremo 3'. En un ejemplo, los brazos de homología del extremo 5' y 3' dirigen el vector a una secuencia del extremo 5' con respecto a una secuencia potenciadora que está presente en el extremo 5' y proximal al gen Cκ de ratón. En un ejemplo, el promotor es un promotor de un segmento génico de la región variable de la inmunoglobulina humana. En un ejemplo específico, el promotor es un promotor Vκ3-15 humano. En un ejemplo, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón. En un ejemplo específico, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder VK3-7 de ratón.

También se hace referencia a un vector de direccionamiento según se describe anteriormente, pero en lugar del brazo de homología del extremo 5', el promotor humano o de ratón está flanqueado en el extremo 5' con un sitio de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio (SRRS, por sus siglas en inglés), y en lugar del brazo de homología de ratón del extremo 3', la región VL humana está flanqueada en el extremo 3' con un SRRS.

También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso fabricado por un ratón según se describe en la presente patente, en donde el anticuerpo quimérico inverso comprende una cadena ligera que comprende un V_L humano y un C_L de ratón, y una cadena pesada que comprende un V_H humano y un C_H de ratón.

También se proporciona un método de producción de un anticuerpo de interés que comprende un dominio variable de la cadena pesada humano obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4 que comprende:

(a) inmunizar el ratón proporcionado con un antígeno de interés;

(b) obtener a partir del ratón un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4; y

(c) emplear la secuencia de la región variable de la inmunoglobulina obtenida en (b) en un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés.

Adicionalmente, se proporciona un método para producir un anticuerpo para un antígeno de interés que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4 que comprende:

(a) inmunizar el ratón proporcionado con un antígeno de interés;

(b) obtener a partir del ratón un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4; y

(c) emplear la secuencia de la región variable de la inmunoglobulina obtenida en (b) en un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés.

También se hace referencia a un método para elaborar un anticuerpo, que comprende expresar en una célula (a) una primera secuencia de genes V_H de un ratón inmunizado tal como se describe en la presente patente fusionada con una secuencia de genes C_H; (b) una secuencia de genes V_L de un ratón inmunizado tal como se describe en la presente patente fusionada con una secuencia de genes C_L humana; y, (c) mantener la célula bajo condiciones suficientes para expresar un anticuerpo completamente humano, y aislar el anticuerpo. En un ejemplo, la célula comprende una segunda secuencia de un segundo ratón inmunizado, tal como se describe en la presente patente, fusionada con una secuencia de genes C_H, la primera secuencia de genes V_H codifica un dominio V_H que reconoce un primer epítopo, y la segunda secuencia de genes V_H codifica un dominio V_H que reconoce un segundo epítopo, en donde el primer epítopo y el segundo epítopo no son idénticos.

También se hace referencia a un método para la elaboración de una proteína de unión a epítopo, que comprende exponer a un ratón como el descrito en la presente patente a un inmunógeno que comprende un epítopo de interés, mantener el ratón bajo condiciones suficientes para que el ratón genere una molécula de inmunoglobulina que se una específicamente al epítopo de interés, y aislar la molécula de inmunoglobulina que se une específicamente al epítopo de interés; en donde la proteína de unión al epítopo comprende una cadena pesada que comprende un V_H humano mutado somáticamente y un C_H de ratón, asociada con una cadena ligera que comprende un C_L de ratón y un V_L humano obtenido a partir de Vκ1-39Jκ5 humana reordenada o Vκ3-20Jκ1 humana reordenada.

También se hace referencia a una célula que expresa una proteína de unión al epítopo en donde la célula comprende: (a) una secuencia de nucleótidos humana que codifica un dominio V_L humano que se obtiene a partir de un Vκ1-39Jκ5 humano reordenado o un Vκ3-20Jκ1 humano reordenado, en donde la secuencia de nucleótidos humana se fusiona (directamente o a través de un conector) a una secuencia de ADNc de un dominio constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina (por ejemplo, una secuencia de ADN del dominio constante κ humano); y, (b) una primera secuencia de nucleótidos V_H humana que codifica un dominio V_H obtenida a partir de una primera secuencia de nucleótidos V_H humana, en donde la primera secuencia de nucleótidos V_H humana se fusionan (directamente o a través de un conector) con una secuencia de ADNc de un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana; en donde la proteína de unión al epítopo reconoce un primer epítopo. En un ejemplo, la proteína de unión al epítopo se une al primer epítopo con una constante de disociación de menos de 10^{-6} M, menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M, menos de 10^{-10} M, menos de 10^{-11} M, o menos de 10^{-12} M.

En un ejemplo, la célula comprende una segunda secuencia de nucleótidos humana que codifica un segundo dominio V_H humano, en donde la segunda secuencia humana se fusiona (directamente o a través de un conector) con una secuencia de ADNc de un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, y en donde el segundo domino V_H humano no reconoce específicamente el primer epítopo (por ejemplo, muestra una constante de disociación de, por ejemplo, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, o mayor), y en donde la proteína de unión al epítopo reconoce el primer epítopo y el segundo epítopo, y en donde cada una, la primera y la segunda cadena pesada de la inmunoglobulina, se asocia con una cadena ligera idéntica de (a).

En un ejemplo, el segundo dominio V_H se une al segundo epítopo con una constante de disociación que es inferior a 10^{-6} M, inferior a 10^{-7} M, inferior a 10^{-8} M, inferior a 10^{-9} M, inferior a 10^{-10} M, inferior a 10^{-11} M, o inferior a 10^{-12} M.

En un ejemplo, la proteína de unión al epítopo comprende una primera cadena pesada de la inmunoglobulina y una segunda cadena pesada de la inmunoglobulina, cada una asociada con una cadena ligera idéntica obtenida a partir de una región V_L humana reordenada seleccionada de entre un Vκ1-39Jκ5 humano o un Vκ3-20Jκ1 humano, en donde la primera cadena pesada de la inmunoglobulina se une a un primer epítopo con una constante de disociación en un rango de nanomolar a picomolar, la segunda cadena pesada de la inmunoglobulina se une a un segundo epítopo con una constante de disociación en un rango de nanomolar a picomolar, el primer epítopo y el segundo epítopo no son idénticos, la primera cadena pesada de la inmunoglobulina no se une al segundo epítopo y o se une al segundo epítopo con una constante de disociación más débil que el rango micromolar (por ejemplo, el rango milimolar), la segunda cadena pesada de la inmunoglobulina no se une al primer epítopo o se une al primer epítopo con una constante de disociación más débil que el rango micromolar (por ejemplo, el rango milimolar), y uno o más de entre el V_L, el V_H de la primera cadena pesada de la inmunoglobulina, y el V_H de la segunda cadena pesada de la inmunoglobulina son somáticamente mutados.

En un ejemplo, la primera cadena pesada de la inmunoglobulina comprende un residuo de unión a la proteína A, y la segunda cadena pesada de la inmunoglobulina carece de un residuo de unión a la proteína A.

En un ejemplo, la célula se selecciona de CHO, COS, 293, HeLa, y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6™).

También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso que comprende un V_H humano y un dominio constante de la cadena pesada de ratón, un V_L humano y un dominio constante de la cadena ligera de ratón, en donde el anticuerpo se elabora mediante un proceso que comprende inmunizar a un ratón según se describe en la presente patente con un inmunógeno que comprende un epítopo, y el anticuerpo se une específicamente al epítopo del inmunógeno con el que el ratón fue inmunizado. En un ejemplo, el dominio V_L está somáticamente mutado. En un ejemplo, el dominio V_H está somáticamente mutado. En un ejemplo, tanto el dominio V_L como el dominio V_H están somáticamente mutados. En un ejemplo, el V_L está ligado a un dominio Cκ de ratón.

En un aspecto, en el ratón provisto, el ratón comprende segmentos génicos V_H humanos que reemplazan todos, o sustancialmente todos, los segmentos génicos V_H de ratón en el locus endógeno de la cadena pesada de ratón; donde no más de una o dos secuencias V_L/J_L de la cadena ligera humana reordenadas seleccionadas de un Vκ1-39/Jκ5 reordenado y un Vκ3-20/Jκ1 reordenado o una combinación de los mismos, reemplaza todos los segmentos génicos de la cadena ligera de ratón; en donde los segmentos génicos variables de la cadena pesada humana están ligados a un gen constante de ratón, y las secuencias de la cadena ligera humana reordenada están ligadas a un gen constante humano o de ratón.

También se hace referencia a una célula ES de ratón que comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de la cadena pesada de ratón con segmentos génicos variables de la cadena pesada humana, y no más de una o dos secuencias VL/JL de la cadena ligera humana reordenada, en donde los segmentos génicos variables de la cadena pesada humana están ligados a un gen constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, y las secuencias VL/JL de la cadena ligera humana reordenada están ligadas a un gen constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana o de ratón. En un ejemplo específico, el gen constante de la cadena ligera es un gen constante de ratón.

También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno elaborada por un ratón según se describe en la presente patente. En un ejemplo específico, la proteína de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de ratón, y una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina obtenida a partir de un segmento génico Vκ1-39 o un segmento génico Vκ3-20, en donde la región constante de la cadena ligera es una región constante de ratón.

También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno completamente humana elaborada a partir de una secuencia de genes de una región variable de la inmunoglobulina de un ratón según se describe en la presente patente, en donde la proteína de unión al antígeno comprende una cadena pesada completamente humana que comprende una región variable humana obtenida a partir de una secuencia de un ratón según se describe en la presente patente, y una cadena ligera completamente humana que comprende un Vκ1-39 o un Vκ3-20. En un ejemplo, la región variable de la cadena ligera comprende de una a cinco mutaciones somáticas. En un ejemplo, la región variable de la cadena ligera es una región variable de la cadena ligera análoga que está emparejada en un linfocito B del ratón con la región variable de la cadena pesada.

En un ejemplo, la proteína de unión al antígeno completamente humana comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, en donde la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada comprenden independientemente regiones variables no idénticas obtenidas a partir de un ratón según se describe en la presente patente, y en donde cada una de la primera y la segunda cadena pesada expresa a partir de una célula hospedadora, asociada con una cadena ligera humana obtenida a partir de un segmento génico Vκ1-39 o de un segmento génico Vκ3-20. En un ejemplo, la primera cadena pesada comprende una primera región variable de la cadena pesada que se une específicamente a un epítopo de un primer antígeno, y la segunda cadena pesada comprende una segunda región variable de la cadena pesada que se une específicamente a un segundo epítopo de un segundo antígeno. En un ejemplo específico, el primer antígeno y el segundo antígeno son diferentes. En un ejemplo específico, el primer antígeno y el segundo antígeno son iguales, y el primer epítopo y el segundo epítopo no son idénticos; en un ejemplo específico la unión del primer epítopo por parte de una primera molécula de la proteína de unión no bloquea la unión del segundo epítopo por parte de una segunda molécula de la proteína de unión.

En un ejemplo, una proteína de unión completamente humana, obtenida a partir de una secuencia de inmunoglobulina humana de un ratón según se describe en la presente patente, comprende una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina, en donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una primera región variable que no es idéntica a una región variable de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, y en donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un determinante de unión a la proteína A de tipo silvestre, y la segunda cadena pesada carece de un determinante de unión a la proteína A de tipo silvestre. En un ejemplo, la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a la proteína A en condiciones de aislamiento, y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina no se une a la proteína A, o bien se une a la proteína A en una unión al menos 10 veces, cien veces, o mil veces más débil que la unión de la primera cadena pesada a la proteína A en condiciones de aislamiento. En un ejemplo específico, la primera y la segunda cadena son isotipos IgG1, en donde la segunda cadena pesada comprende una modificación seleccionada de entre 95R (EU 435R), 96F (EU 436F), y una combinación de las mismas, y en donde la primera cadena pesada carece de tal modificación.

También se hace referencia a un método para elaborar una proteína de unión al antígeno biespecífica, que comprende exponer a un primer ratón según se describe en la presente patente a un primer antígeno de interés que comprende un primer epítopo, exponer a un segundo ratón según se describe en la presente patente a un segundo antígeno de interés que comprende un segundo epítopo, permitir que el primer y el segundo ratón, cada uno, monte respuestas inmunes a los antígenos de interés, identificar en el primer ratón una primera región variable de la cadena pesada humana que se une al primer epítopo del primer antígeno de interés, identificar en el segundo ratón una segunda región variable de la cadena pesada humana que se une al segundo epítopo del segundo antígeno de interés, elaborar un gen de la cadena pesada completamente humana que codifique una primera cadena pesada que se une al primer epítopo del primer antígeno de interés, elaborar un segundo gen de cadena pesada completamente humana que codifica una segunda cadena pesada que se une al segundo epítopo del segundo antígeno de interés, expresar la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada en una célula que expresa una única cadena ligera completamente humana obtenida a partir de un segmento génico Vκ1-39 humano o un segmento génico Vκ3-20 humano para formar una proteína de unión al antígeno biespecífica, y aislar la proteína de unión al antígeno biespecífica.

En un ejemplo, el primer antígeno y el segundo antígeno no son idénticos.

En un ejemplo, el primer antígeno y el segundo antígeno son idénticos, y el primer epítopo y el segundo epítopo no son idénticos. En un ejemplo, la unión de la primera región variable de la cadena pesada al primer epítopo no bloquea la unión de la segunda región variable de la cadena pesada al segundo epítopo.

En un ejemplo, el primer antígeno se selecciona de un antígeno soluble y un antígeno de la superficie celular (por ejemplo, un antígeno tumoral), y el segundo antígeno comprende un receptor de la superficie celular. En un ejemplo, el receptor de la superficie celular es un receptor de la inmunoglobulina. En un ejemplo específico, el receptor de la inmunoglobulina es un receptor Fc. En un ejemplo, el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo receptor de la superficie celular, y la unión de la primera cadena pesada al primer epítopo no bloquea la unión de la segunda cadena pesada al segundo epítopo.

En un ejemplo, el dominio variable de la cadena ligera comprende de 2 a 5 mutaciones somáticas. En un ejemplo, el dominio variable de la cadena ligera es una cadena ligera análoga mutada somáticamente expresada en un linfocito B del primer o del segundo ratón inmunizado, ya sea con el primer o con el segundo dominio variable de la cadena pesada.

En un ejemplo, la primera cadena pesada completamente humana porta una modificación de aminoácidos que reduce su afinidad con la proteína A, y la segunda cadena pesada completamente humana no comprende una modificación que reduzca su afinidad con la proteína A.

También se hace referencia a un anticuerpo o a un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana elaborado de acuerdo con la invención. En otro aspecto, se prevé el uso de un ratón según se describe en la presente patente para fabricar un anticuerpo completamente humano o un anticuerpo biespecífico completamente humano. Por tanto, también se prevé el uso de un ratón proporcionado a la hora de fabricar un anticuerpo que comprende un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. Además, se prevé el uso de un ratón proporcionado a la hora de fabricar un anticuerpo que comprende un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

En un ejemplo, un ratón, célula, o embrión modificado genéticamente descrito en la presente patente comprende un locus de la cadena ligera κ que mantiene elementos endógenos reguladores o de control, por ejemplo, un potenciador intrónico κ de ratón, un potenciador del extremo 3' κ de ratón, o tanto un potenciador intrónico como un potenciador del extremo 3', en donde los elementos reguladores o de control facilitan la mutación somática o la maduración de la afinidad de una secuencia expresada del locus de la cadena ligera κ.

También se hace referencia a un ratón que comprende una población de linfocitos B caracterizado por tener cadenas ligeras de inmunoglobulina obtenidas a partir de no más de un, o no más de dos, segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina reordenados o no reordenados, en donde el ratón muestra una relación de la cadena ligera κ:λ que es aproximadamente la misma que la de un ratón que comprende un componente de tipo silvestre de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina.

En un ejemplo, las cadenas ligeras de la inmunoglobulina se obtienen a partir de no más de uno, o no más de dos segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En una realización específica, las cadenas ligeras se obtienen a partir de no más de un segmento génico V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina reordenado.

En un ejemplo, el ratón muestra una relación de la cadena ligera κ:λ que es aproximadamente de 55:1 a 75:1, 60:1 a 70:1,63:1 a 68: 1, o aproximadamente de 65:1 a 67:1 en comparación con un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En un ejemplo específico, el ratón muestra una relación de la cadena ligera κ:λ que es de 66:1 en comparación con un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En un ejemplo, las cadenas ligeras de la inmunoglobulina obtenidas a partir de no más de uno, o no más de dos segmentos génicos V y J de la cadena ligera dela inmunoglobulina reordenados o no reordenados, incluyen los segmentos génicos Vκ y J humanos seleccionados de Vκ1-39 humano, Vκ3-20 humano, Jκ1 y Jκ5 humano. En un ejemplo específico, las cadenas ligeras de la inmunoglobulina se obtienen a partir de una única secuencia de la cadena ligera humana que comprende una secuencia Vκ1-39 humana.

En un ejemplo, el ratón muestra una relación de la cadena ligera κ:λ que es de aproximadamente 18:1 a 23:1 o aproximadamente de 19:1 a 22:1, en comparación con un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En un ejemplo, el ratón muestra una relación

de la cadena ligera κ:λ que es de 21:1, en comparación con un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En un ejemplo, el ratón muestra una relación de la cadena ligera κ:λ que es aproximadamente la misma o de 20:1, en comparación con un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de los segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina. En un ejemplo, las cadenas ligeras de la inmunoglobulina obtenidas a partir de no más de uno, o no más de dos segmentos génicos V y J de la cadena ligera de la inmunoglobulina reordenados o no reordenados, incluyen segmentos génicos Vκ y Jκ humanos seleccionados de Vκ1-39 humano, Vκ3-20 humano, Jκ1 humano y Jκ5 humano. En un ejemplo específico, las cadenas ligeras de la inmunoglobulina se obtienen a partir de una única secuencia de la cadena ligera humana que comprende una secuencia Vκ3-20 humana.

También se hace referencia a un ratón que expresa una cadena ligera de la inmunoglobulina obtenida a partir de no más de uno, o no más de dos secuencias Vκ/Jκ humanas, en donde el ratón comprende un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada humana, y el ratón muestra una relación de (a) linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina con una cadena ligera λ, con respecto a (b) linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina con una cadena ligera κ, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.

En un ejemplo, el ratón expresa una única cadena ligera κ obtenida a partir de una secuencia Vκ1-39Jκ5 humana, y la relación de linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina con una cadena ligera λ con respecto a los linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina con una cadena ligera κ es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20; en un ejemplo, la relación es de aproximadamente 1 a al menos aproximadamente 66; en una realización específica, la relación es de aproximadamente 1 a 66.

En un ejemplo, el ratón expresa una única cadena ligera obtenida a partir de una secuencia Vκ3-20Jκ5 humana, y la relación de linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina con una cadena ligera λ con respecto a linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina con una cadena ligera κ es aproximadamente de 1 a aproximadamente 20; en un ejemplo, la relación es aproximadamente de 1 a aproximadamente 21. En realizaciones específicas, la relación es de 1 a 20, o de 1 a 21.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que expresa una única cadena ligera κ reordenada, en donde el ratón comprende un locus de la cadena ligera λ funcional, y en donde el ratón expresa una población de linfocitos B que comprende células de Igκ+ que expresan una cadena ligera κ obtenida a partir de la misma única cadena ligera κ reordenada. En un ejemplo, el porcentaje de linfocitos B con Igκ+Igλ+ en el ratón es aproximadamente el mismo que en un ratón de tipo silvestre. En un ejemplo específico, el porcentaje de linfocitos B con Igκ+Igλ+ en el ratón es de aproximadamente un 2 a aproximadamente un 6 por ciento. En un ejemplo específico, el porcentaje de linfocitos B con Igκ+Igλ+ en un ratón en donde la única cadena ligera κ reordenada se obtiene a partir de una secuencia Vκ1-39Jκ5 reordenada, es de aproximadamente 2 a aproximadamente 3; en un ejemplo específico, aproximadamente 2,6. En una realización específica, el porcentaje de linfocitos B con Igκ+Igλ+ en un ratón en donde la única cadena ligera κ reordenada se obtiene a partir de una secuencia Vκ3-20Jκ1 es de aproximadamente 4 a aproximadamente 8; en una realización específica, aproximadamente 6.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado, en donde el ratón expresa una única cadena ligera κ reordenada obtenida a partir de un segmento génico Vκ y Jκ humano, en donde el ratón expresa una población de linfocitos B que comprende una única cadena ligera κ obtenida a partir de la secuencia de la única cadena ligera κ reordenada, en donde el ratón genéticamente modificado no se ha vuelto resistente a hipermutaciones somáticas. En una realización, al menos un 90% de las cadenas ligeras κ expresadas en un linfocito B de ratón muestran desde al menos una a aproximadamente cinco hipermutaciones somáticas.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que se modifica para expresar una única cadena ligera κ obtenida a partir de no más de una, o no más de dos secuencias de la cadena ligera κ reordenada, en donde el ratón muestra un uso de la cadena ligera κ que es aproximadamente dos veces o más, al menos tres veces o más, o al menos aproximadamente cuatro o más veces mayor que el uso de la cadena ligera κ mostrado por un ratón de tipo silvestre, o mayor que el uso de la cadena ligera κ mostrado por un ratón de la misma cepa que comprende un repertorio de los segmentos génicos de la cadena ligera κ. En un ejemplo específico, el ratón expresa la cadena ligera κ a partir de no más de una secuencia de la cadena ligera κ reordenada. En un ejemplo más específico, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1. En un ejemplo, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada es una secuencia Vκ1-39Jκ5. En un ejemplo, la secuencia de la cadena ligera κ es una secuencia Vκ3-20Jκ1.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que expresa una única cadena ligera κ obtenida a partir de no más de una, o no más de dos secuencias de la cadena ligera κ reordenada, en donde el ratón muestra un uso de la cadena ligera κ que es aproximadamente 100 veces o más, al menos aproximadamente 200 veces o más, al menos aproximadamente 300 veces o más, al menos aproximadamente 400 veces o más, al menos aproximadamente 500 veces o más, al menos aproximadamente 600 veces o más, al menos aproximadamente 700 veces o más, al menos aproximadamente 800 veces o más, al menos aproximadamente 900 veces o más, al menos

aproximadamente 1000 o más veces mayor que el mismo uso de la misma cadena ligera κ mostrado por un ratón que porta un locus de la cadena ligera κ humana completo o sustancialmente completo. En un ejemplo específico, el ratón que porta un locus de la cadena ligera κ humana completo o sustancialmente completo, carece de una secuencia de la cadena ligera κ de ratón no reordenada funcional. En un ejemplo específico, el ratón expresa la única cadena ligera κ a partir de no más de una secuencia de la cadena ligera κ reordenada. En un ejemplo, el ratón comprende una copia de una secuencia de la cadena ligera κ reordenada (por ejemplo, un heterocigoto). En una realización, el ratón comprende dos copias de una secuencia de la cadena ligera κ reordenada (por ejemplo, un homocigoto). En un ejemplo más específico, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1. En un ejemplo, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada es una secuencia Vκ1-39Jκ5. En un ejemplo, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada es una secuencia Vκ3-20Jκ1.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que expresa una única cadena ligera obtenida a partir de no más de una, o no más de dos secuencias de la cadena ligera reordenadas, en donde la cadena ligera en el ratón genéticamente modificado muestra un nivel de expresión que es al menos de 10 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 100 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 200 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 300 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 400 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 500 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 600 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 700 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 800 veces a aproximadamente 1.000 veces, o de 900 veces a aproximadamente 1.000 veces más elevada que la expresión de la misma cadena ligera reordenada mostrada por un ratón que porta un locus de la cadena ligera completo o sustancialmente completo. En un ejemplo, la cadena ligera comprende una secuencia humana. En un ejemplo específico, la secuencia humana es una secuencia κ. En un ejemplo, la secuencia humana es una secuencia λ. En un ejemplo, la cadena ligera es una cadena ligera completamente humana.

En un ejemplo, el nivel de expresión se caracteriza por cuantificar el ARNm de la secuencia de la cadena ligera transcrita, y compararlo con la secuencia de la cadena ligera transcrita de un ratón que porta un locus de la cadena ligera completo o sustancialmente completo.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que expresa una única cadena ligera κ obtenida a partir de no más de una, o no más de dos secuencias de la cadena ligera κ reordenada, en donde el ratón, después de su inmunización con el antígeno, muestra un título del suero que es comparable a un ratón de tipo silvestre inmunizado con el mismo antígeno. En un ejemplo específico, el ratón expresa una única cadena ligera κ a partir de no más de una secuencia de la cadena ligera κ reordenada. En un ejemplo, el título del suero está caracterizado como inmunoglobulina total. En un ejemplo específico, el título del suero está caracterizado como título específico de IgM. En un ejemplo específico, el título del suero está caracterizado como un título específico de IgG. En un ejemplo más específico, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1. En un ejemplo, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada es una secuencia Vκ1-39Jκ5. En un ejemplo, la secuencia de la cadena ligera κ reordenada es una secuencia Vκ3-20Jκ1.

También se hace referencia a un ratón genéticamente modificado que expresa una pluralidad de cadenas pesadas de inmunoglobulina asociadas a una única cadena ligera. En un ejemplo, la cadena pesada comprende una secuencia humana. En diversos ejemplos, la secuencia humana se selecciona a partir de una secuencia variable, un CH_1, una región bisagra, un CH_2, un CH_3, y una combinación de los mismos. En un ejemplo, la única cadena ligera comprende una secuencia humana. En diversos ejemplos, la secuencia humana se selecciona a partir de una secuencia variable, una secuencia constante, y una combinación de las mismas. En un ejemplo, el ratón comprende un locus de inmunoglobulina endógena inactivado y expresa la cadena pesada y/o la cadena ligera a partir de un transgén o episoma extracromosómico. En un ejemplo, el ratón comprende un reemplazo en un locus de ratón endógeno de algunos o de todos los segmentos génicos endógenos de la cadena pesada de ratón (es decir, V, D, J), y/o algunas o todas las secuencias constantes endógenas de la cadena pesada de ratón (por ejemplo, CH_1, región bisagra, CH_2, CH_3, o una combinación de los mismos), y/o algunas o todas las secuencias de la cadena ligera de ratón endógenas (por ejemplo, V, J, región constante, o una combinación de las mismas), con una o más secuencias de la inmunoglobulina humana.

También se hace referencia a un ratón adecuado para fabricar anticuerpos que tienen la misma cadena ligera, en donde todos o sustancialmente todos los anticuerpos elaborados en el ratón se expresan con la misma cadena ligera. En un ejemplo, la cadena ligera se expresa a partir de un locus de la cadena ligera endógeno.

También se hace referencia a un método para fabricar una cadena ligera para un anticuerpo humano, que comprende obtener a partir de un ratón tal como se describe en la presente patente una secuencia de la cadena ligera y una secuencia de la cadena pesada, y que emplea la secuencia de la cadena ligera y la secuencia de la cadena pesada en la fabricación de un anticuerpo humano. En un ejemplo, el anticuerpo humano es un anticuerpo biespecífico.

Cualquiera de las realizaciones aspectos descritos en la presente patente puede ser utilizado unos en conjunto con los otros, a menos que se indique de otro modo o resulte obvio de otro modo por el contexto. Otras realizaciones resultarán claras para los expertos en el arte a partir de la revisión de la consiguiente descripción.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 ilustra una estrategia de direccionamiento para reemplazar segmentos génicos endógenos de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón con una región génica Vκ1-39Jκ5 humana.

La FIG. 2 ilustra una estrategia de direccionamiento para reemplazar segmentos génicos endógenos de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón por una región génica Vκ3-20Jκ1 humana.

La FIG. 3 ilustra una estrategia de direccionamiento para reemplazar segmentos génicos endógenos de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón por una región génica VpreB/Jλ5 humana.

La FIG. 4 muestra el porcentaje de linfocitos B CD19+ (eje y) de sangre periférica para ratones de tipo silvestre (WT), ratones homocigotos para una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana reordenada (Vκ1-39Jκ5 HO) modificada por ingeniería genética y ratones homocigotos para una región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 reordenada humana modificada por ingeniería genética (Vκ3-20Jκ1 HO).

FIG. 5A muestra la expresión relativa del ARNm (eje y) de una cadena ligera obtenida de Vκ1-39 en un ensayo de PCR cuantitativa, utilizando sondas específicas para el enlace de una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 reordenada humana modificada por ingeniería genética (Sonda de enlace Vκ1-39Jκ5) y el segmento génico Vκ1-39 humano (Sonda Vκ1-39) en un homocigoto de ratón para un reemplazo de los segmentos génicos endógenos Vκ y Jκ con segmentos Vκ y Jκ humanos (Hκ), un ratón de tipo silvestre (WT), y un heterocigoto de ratón para una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana reordenada modificada por ingeniería genética (Vκ1-39Jκ5 HET). Las señales se normalizan a la expresión del Cκ de ratón. N.D.: no detectado.

La FIG. 5B muestra la expresión relativa del ARNm (eje -y) de una cadena ligera obtenida de Vκ1-39 en un ensayo de PCR cuantitativa utilizando sondas específicas para el enlace de una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana reordenada (sonda de enlace Vκ1-39Jκ5) y el segmento génico Vκ1-39 humano (Sonda Vκ1-39) en un homocigoto de ratón para un reemplazo de los segmentos génicos Vκ y Jκ endógenos con segmentos génicos Vκ y Jκ humanos (Hκ), un ratón de tipo silvestre (WT), y un homocigoto de ratón para una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana reordenada modificada por ingeniería genética (Vκ1-39Jκ5 HO). Las señales se normalizan a la expresión del Cκ de ratón.

La FIG. 5C muestra la expresión relativa del ARNm (eje -y) de una cadena ligera obtenida de Vκ3-20 en un ensayo de PCR cuantitativa utilizando sondas específicas para el enlace de una región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 humana reordenada (Sonda de enlace Vκ3-20Jκ1) y el segmento génico Vκ3-20 humano (Sonda Vκ3-20) en un homocigoto de ratón para un reemplazo de los segmentos génicos Vκ y Jκ con los segmentos génicos Vκ y Jκ (Hκ), un ratón de tipo silvestre (WT), y un heterocigoto (HET) y homocigoto (HO) de ratón para una región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 reordenada humana modificada por ingeniería genética. Las señales se normalizan a la expresión del Cκ de ratón.

La FIG. 6A muestra el título de IgM (izquierda) y IgG (derecha) en ratones de tipo silvestre (WT; N=2) y homocigotos para una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana reordenada modificada por ingeniería genética (Vκ1-39Jκ5 HO; N=2) inmunizados con β-galactosidasa.

La FIG. 6B muestra el título de la inmunoglobulina total (IgM, IgG, IgA) en ratones de tipo silvestre (WT; N=5) y en homocigotos de ratón para una región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 humana reordenada modificada por ingeniería genética (Vκ3-20Jκ1 HO; N=5), inmunizados con β-galactosidasa.

Descripción detallada

La presente invención no está limitada a los métodos en particular, y a las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. Ha de entenderse también que la terminología utilizada en la presente patente tiene el propósito de describir únicamente realizaciones concretas, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y frases utilizadas en la presente patente incluyen los significados que los términos y frases han alcanzado en el arte, a menos que se indique lo contrario claramente o que resulte claramente obvio por el contexto en el que el término o frase se utiliza. Aunque cualquier método o material similar o equivalente a los descritos en la presente patente pueden ser utilizados en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales en particular. Todas las publicaciones mencionadas se incorporan en la presente a modo de referencia.

El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente patente, incluye moléculas de inmunoglobulinas que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas

mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (V_H) y una región constante de la cadena pesada (C_H). La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (V_L) y una región constante de la cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones armazón (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (los CDR de la cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; los CDR de la cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El término anticuerpo de “alta afinidad” hace referencia a un anticuerpo que tiene una K_D con respecto a su epítopo diana de aproximadamente 10^{-9} M o menor (*por ejemplo*, de aproximadamente 1 x 10^{-9} M, 1 x 10^{-10} M, 1 x 10^{-11} M, o de aproximadamente 1 x 10^{-12} M). En una realización, la K_D se mide mediante resonancia de plasmones de superficie, *por ejemplo*, de BIACORE™; en otra realización, la K_D se mide mediante ensayo ELISA.

La frase “anticuerpo biespecífico” incluye un anticuerpo capaz de unirse de forma selectiva a dos o más epítopos. Los anticuerpos generalmente comprenden dos cadenas pesadas no idénticas, donde cada cadena pesada se une específicamente a un epítopo diferente – ya sea en dos moléculas diferentes (*por ejemplo,* epítopos diferentes en dos inmunógenos diferentes) o en la misma molécula (*por ejemplo,* diferentes epítopos en el mismo inmunógeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse de forma selectiva a dos epítopos diferentes (un primer epítopo y un segundo epítopo), la afinidad de la primera cadena pesada para el primer epítopo será al menos de una a dos o tres o cuatro o más órdenes de magnitud inferior a la afinidad de la primera cadena pesada para el segundo epítopo, y viceversa. Los epítopos ligados de forma específica por el anticuerpo biespecífico pueden en la misma o en una diana diferente (por ejemplo, en la misma o en una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden realizarse, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopos del mismo inmunógeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de la cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo inmunógeno pueden fusionarse a secuencias de ácidos nucleicos que codifican las mismas o diferentes regiones constantes de la cadena pesada, y tales secuencias pueden ser expresadas en una célula que expresa una cadena ligera de la inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de la cadena pesada, seguidas de (del extremo N-terminal al C-terminal) un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2, y un dominio C_H3, y una cadena ligera de la inmunoglobulina que o bien no confiere una especificidad de unión al epítopo pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o bien que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más epítopos enlazados por las regiones de unión al epítopo de la cadena pesada, o bien que puede asociarse con cada cadena pesada y posibilitar la unión de una o ambas cadenas pesadas a uno o ambos epítopos.

El término “célula” incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácidos nucleicos recombinantes. Las células incluyen aquellos procariotas y eucariotas (de una única célula o de múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli, Bacillus spp., Streptomyces spp.*, etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae, S. pombe, P. pastoris, P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células de animales no humanos, células humanas, o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunos casos, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata, o ratón. En algunos ejemplos, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-1 1 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula retiniana, Vero, CV1, de riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmicas), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular obtenida de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen vírico (por ejemplo, un célula PER.C6™).

La frase “región determinante de complementariedad”, o el término “CDR” incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de los genes de la inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones armazón en una región variables de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T). Una CDR puede ser codificada por, por ejemplo, una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por un linfocito B o un linfocito T naive o maduro. Una CDR puede estar somáticamente mutada (por ejemplo, variar a partir de una secuencia codificada en una línea germinal de un animal), humanizada, y/o modificada con sustituciones, adiciones, o deleciones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden ser codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácidos nucleicos no reordenada), pero son contiguas en una secuencia de ácidos nucleicos de linfocitos B, por ejemplo, como resultado del corte y empalme o la conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación de V-D-J para formar una cadena pesada CDR3).

El término “conservador” cuando se utiliza para describir una sustitución conservadora de aminoácidos, incluye la sustitución de un residuo de aminoácidos por otro residuo de aminoácidos que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la habilidad de una región variable para unirse de forma específica a un epítopo diana con una afinidad deseada. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales de hidroxilo alifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina, e histidina; cadenas laterales acidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores, incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservadora puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, tal como se utiliza en, por ejemplo, mutagénesis por escaneo de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de verosimilitud logarítmica PAM250 revelada en Gonnet et al. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45. En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de verosimilitud logarítmica PAM250.

En algunos ejemplos, las posiciones de los residuos en una cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina difieren en una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas realizaciones, las posiciones de los residuos en una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma (por ejemplo, un fragmento que permite la expresión y secreción a partir de, por ejemplo, un linfocito B) no son idénticas a una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se detalla en la presente patente, pero difiere en una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras.

La frase “proteína de unión al epítopo” incluye una proteína que tiene al menos una CDR y que es capaz de reconocer un epítopo de forma selectiva, por ejemplo es capaz de unirse a un epítopo con una K_D que es de un micromolar o menor (por ejemplo, una K_D que es de aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-9} M , 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, o aproximadamente 1×10^{-12} M). Las proteínas de unión al epítopo terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) requieren frecuentemente una K_D que está en el rango nanomolar o en el picomolar.

La frase “fragmento funcional” incluye fragmentos de proteínas de unión al epítopo que pueden ser expresadas, secretadas y unirse específicamente a un epítopo con una K_D en el rango micromolar, nanomolar, o picomolar. El reconocimiento específico incluye tener una K_D que se encuentre al menos en el rango micromolar, el rango nanomolar, o el rango picomolar.

El término “línea germinal” incluye referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de la inmunoglobulina en una célula mutada de forma no somática, *por ejemplo*, un linfocito B mutado de forma no somática o un linfocito pre-B o una célula hematopoyética.

La frase “cadena pesada”, o “cadena pesada de la inmunoglobulina” incluye una secuencia de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina de cualquier organismo. Los dominios variables de la cadena pesada incluyen tres CDR y cuatro regiones FR, a menos que se especifique de otro modo. Los fragmentos de las cadenas pesadas incluyen CDRs, CDRs y FRs, y combinaciones de las mismas. Una cadena pesada típica tiene, a continuación del dominio variable (desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal), un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2, y un dominio C_H3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que sea capaz de reconocer de forma específica un epítopo (por ejemplo, reconocer el epítopo con una K_D en el rango micromolar, nanomolar, o picomolar), que sea capaz de expresar y secretar a partir de una célula, y que comprenda al menos una CDR.

El término “identidad” cuando se utiliza en conexión con una secuencia incluye la identidad según de determina por una cantidad de algoritmos diferentes conocidos en el arte que pueden ser utilizados para medir la identidad de un nucleótido y/o una secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en la presente patente, las identidades se determinan utilizando un alineamiento con ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de huecos (gaps) de 10,0, una penalización por extensión de huecos de 0,1, y utilizar una matriz de similitud de Gonnet (programa MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias en comparación con respecto a la identidad de secuencias, dependerá de las secuencias en particular, pero en el caso de un dominio constante de la cadena ligera, la longitud debería contener una secuencia de suficiente longitud para plegarse en un dominio de la cadena ligera que sea capaz de auto-asociación para formar un dominio canónico constante de la cadena ligera, *por ejemplo*, capaz de formar dos láminas beta que comprenden hebras (conformaciones) beta y que son capaces de interactuar con al menos un dominio C_H1 de un humano o un ratón. En el caso de un dominio C_H1, la longitud de la secuencia debería contener una secuencia de suficiente longitud para

plegarse en un dominio C_H1 que sea capaz de formar dos láminas beta que comprendan hebras beta y que sean capaces de interactuar con al menos un dominio constante de la cadena ligera de un ratón o un humano.

La frase “molécula de inmunoglobulina” incluye dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas pueden ser idénticas o diferentes, y las cadenas ligeras pueden ser idénticas o diferentes.

La frase “cadena ligera” incluye una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de otro modo, incluye cadenas ligeras κ y λ humanas y una VpreB, además de cadenas ligeras de sustitución. Los dominios variables de la cadena ligera (V_L) incluyen habitualmente tres CDR de la cadena ligera y cuatro regiones armazón (FR), a menos que se especifique de otro modo. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal, un dominio V_L que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y un dominio constante de la cadena ligera. Las cadenas ligeras incluyen, *por ejemplo*, aquellas que no se unen de forma selectiva a un primer o un segundo epítopo enlazado de forma selectiva por la proteína de unión al epítopo en la que aparecen. Las cadenas ligeras también incluyen aquellas que se unen y reconocen, o ayudan a la cadena pesada a unirse a y reconocer, uno o más epítopos enlazados de forma selectiva por la proteína de unión al epítopo en la que aparecen. Las cadenas ligeras comunes son aquellas obtenidas a partir de una secuencia Vκ1-39Jκ5 humana reordenada o una secuencia Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, e incluye versiones mutadas somáticamente (*por ejemplo*, con maduración de la afinidad).

La frase “rango micromolar” pretende significar un rango de 1-999 micromolar; la frase "rango nanomolar " pretende significar un rango de 1-999 nanomolar; la frase "rango picomolar" pretende significar un rango de 1-999 picomolar.

La frase “mutado somáticamente” incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleicos de un linfocito B que has sufrido una conmutación de clase, en donde la secuencia de ácidos nucleicos de una región variable de la inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada o que incluye una secuencia de la CDR o FR de la cadena pesada) en el linfocito B con conmutación de clase no es idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos en el linfocito B previamente a la conmutación de clase, tal como, por ejemplo, una diferencia en una CDR o una secuencia de ácidos nucleicos de una región armazón entre un linfocito B que no ha sufrido conmutación de clase y un linfocito B que ha sufrido conmutación de clase. “Somáticamente mutado” incluye la referencia a secuencias de ácidos nucleicos de linfocitos B con maduración de la afinidad que no son idénticos a secuencias de la región variable de la inmunoglobulina correspondientes, en los linfocitos B que no tienen maduración de la afinidad (es decir, secuencias en el genoma de células de la línea germinal). La frase “somáticamente mutado” incluye además la referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de la región variable de la inmunoglobulina de un linfocito B después de la exposición del linfocito B a un epítopo de interés, en donde la secuencia de ácidos nucleicos difiere de la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos previamente a la exposición del linfocito B al epítopo de interés. La frase “somáticamente mutado” hace referencia a secuencias de anticuerpos que han sido generadas en un animal, por ejemplo, un ratón que tiene secuencias de ácidos nucleicos de la región variable de la inmunoglobulina humana, en respuesta a una prueba de exposición a un inmunógeno, y que es el resultado de los procesos de selección inherentemente operativos en dicho animal.

El término “no reordenado”, en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos, incluye secuencias de ácidos nucleicos que existen en la línea germinal de una célula animal.

La frase “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina (modificada según se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal (a menos que se indique de otro modo): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Cadena ligera común

Los esfuerzos previos para elaborar proteínas de unión al epítopo multiespecíficas de utilidad, *por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos, se han visto obstaculizados por una variedad de problemas que frecuentemente comparten un paradigma común: la selección o manipulación *in vitro* de secuencias para modificar por ingeniería genética de forma racional, o para modificar por ingeniería genética mediante prueba de ensayo y error, un formato adecuado para emparejar una inmunoglobulina humana biespecífica heterodimérica. Desafortunadamente, la mayoría, si no todas, las aproximaciones de ingeniería genética *in vitro* proporcionan correcciones *ad hoc* en gran medida que son adecuadas, en todo caso, para moléculas individuales. Por otro lado, no se han realizado métodos *in vivo* para emplear organismos complejos para seleccionar apareamientos apropiados que sean capaces de conducir a la terapéutica en humanos.

En general, las secuencias nativas de ratón frecuentemente no resultan una buena fuente para secuencias terapéuticas humanas. Por al menos esa razón, generar regiones variables de la inmunoglobulina de cadena pesada

que se empareje con una cadena ligera común, es de una utilidad práctica limitada. Se consumirían más esfuerzos *in vitro* en un proceso de ensayo y error para intentar humanizar las secuencias variables de la cadena pesada de ratón, mientras se espera mantener la especificidad y la afinidad del epítopo a la vez que mantener la habilidad para acoplarse a la cadena ligera humana común, con un resultado incierto. Al final de dicho proceso, el producto final puede mantener algo de especificidad, y asociarse con la cadena ligera común, pero finalmente la inmunogenicidad en un humano probablemente continuaría siendo un profundo riesgo.

Por lo tanto, un ratón adecuado para elaborar una terapéutica humana incluiría un repertorio adecuadamente grande de segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada humana, en lugar de segmentos génicos variables endógenos de la cadena pesada de ratón. Los segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada humana deberían poder reordenarse y recombinarse con un dominio constante endógeno de la cadena pesada de ratón para formar una cadena pesada quimérica inversa (es decir, una cadena pesada que comprende un dominio variable humano y una región constante de ratón). La cadena pesada debería ser capaz de conmutación de clase y de hipermutación para que un repertorio adecuadamente grande de los dominios variables de la cadena pesada esté disponible para que el ratón seleccione uno que pueda asociarse con el limitado repertorio de las regiones variables de la cadena ligera humana.

Un ratón que seleccione una cadena ligera común para una pluralidad de cadenas pesadas tiene utilidad práctica. En diversas realizaciones, los anticuerpos que expresan en un ratón que únicamente pueden expresar una cadena ligera común, tendrán cadenas pesadas que se puedan asociar y expresar con una cadena ligera idéntica o sustancialmente idéntica. Esto resulta particularmente útil en la elaboración de anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, un ratón de este tipo puede ser inmunizado con un primer inmunógeno para generar un linfocito B que exprese un anticuerpo que se una específicamente a un primer epítopo. El ratón (o un ratón genéticamente igual) puede ser inmunizado con un segundo inmunógeno para generar un linfocito B que exprese un anticuerpo que se une específicamente al segundo epítopo. Las regiones variables pueden ser clonadas a partir de linfocitos B y expresadas con la misma región constante de la cadena pesada, y la misma cadena ligera, y expresadas en una célula para elaborar un anticuerpo biespecífico, en donde el componente de cadena ligera del anticuerpo biespecífico ha sido seleccionado por un ratón para asociarse y expresar con el componente de cadena ligera.

Los inventores han modificado por ingeniería genética un ratón para generar cadenas ligeras de inmunoglobulina que se emparejarán de forma adecuada con una familia bastante diversa de cadenas pesadas, incluyendo cadenas pesadas cuyas regiones variables se alejan de las secuencias de la línea germinal, *por ejemplo*, regiones variables con madurez de la afinidad o mutadas somáticamente. En diversas realizaciones, el ratón está concebido para emparejar dominios variables de la cadena ligera humana con dominios variables de la cadena pesada humana que comprenden mutaciones somáticas, posibilitando de ese modo una ruta hacia proteínas de unión de alta afinidad adecuadas para su uso como terapéutica en humanos.

El ratón modificado por ingeniería genética, a través de los largos y complejos procesos de la selección de anticuerpos en el interior de un organismo, realiza elecciones biológicamente apropiadas a la hora de emparejar una diversa colección de dominios variables de la cadena pesada humana con un número limitado de opciones de cadena ligera humana. Para lograr esto, el ratón se modifica por ingeniería genética para presentar un limitado número de opciones de dominios variables de la cadena ligera humana, en conjunto con una amplia diversidad de opciones de dominios variables de la cadena pesada humana. Tras una prueba de provocación con un inmunógeno, el ratón maximiza el número de soluciones en su repertorio para desarrollar un anticuerpo para el inmunógeno, limitado en gran medida o únicamente por el número de opciones de cadena ligera en su repertorio. En diversas realizaciones, esto incluye permitir que el ratón logre mutaciones adecuadas y compatibles del dominio variable de la cadena ligera que serán, sin embargo, compatibles con una variedad relativamente grande de dominios variables de la cadena pesada humana, incluyendo en particular dominios variables de la cadena pesada humana mutados somáticamente.

Para lograr un repertorio limitado de opciones de la cadena ligera, el ratón está modificado por ingeniería genética para volver no funcional o sustancialmente no funcional, su habilidad para elaborar, o reordenar, un dominio variable nativo de la cadena ligera de ratón. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante deleción de los segmentos génicos de la región variable de la cadena ligera del ratón. El locus endógeno del ratón puede entonces ser modificado mediante un segmento génico exógeno de la región variable de la cadena ligera humana de elección, operativamente ligado al dominio constante endógeno de la cadena ligera de ratón, de tal manera que los segmentos génicos exógenos de la región variable humana puedan combinarse con el gen endógeno de la región constante de la cadena ligera de ratón y formar un gen de cadena ligera quimérico inverso reordenado (variable humano, constante de ratón). En diversas realizaciones, la región variable de la cadena ligera puede ser mutada somáticamente. En diversas realizaciones, para maximizar la habilidad de la región variable de la cadena ligera para adquirir mutaciones somáticas, se mantiene en el ratón el potenciador o potenciadores adecuados. Por ejemplo, a la hora de modificar un locus de la cadena ligera κ de ratón para reemplazar segmentos génicos endógenos de la cadena ligera κ de ratón con segmentos génicos de la cadena ligera κ humana, el potenciador intrónico κ de ratón y el potenciador 3' de ratón se mantienen o no se alteran funcionalmente.

Se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética que expresa un repertorio limitado de cadenas ligeras quiméricas inversas (variable humana, constante de ratón) asociadas con una diversidad de cadenas pesadas quiméricas inversas (variable humana, constante de ratón). En diversas realizaciones, los segmentos génicos endógenos de la cadena ligera κ de ratón se eliminan y se reemplazan con una única (o con dos) región de la cadena ligera humana reordenada, ligada operativamente al gen Cκ endógeno de ratón. En realizaciones para maximizar la hipermutación somática de la región de la cadena ligera reordenada, se mantienen el potenciador intrónico κ de ratón y el potenciador 3' de ratón. En diversas realizaciones, el ratón también comprende un locus de la cadena ligera λ no funcional, o una deleción del mismo o una deleción que vuelve el locus incapaz de fabricar una cadena ligera λ.

Por lo tanto, se proporciona un ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio de la región variable (V_L) de la cadena ligera humana obtenido a partir de una secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vk endógeno de inmunoglobulina no reordenado, y de un segmento endógeno Jk de inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio, o dominios, V_L humano se asocia con un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenida a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. También se proporciona un ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio variable de la cadena ligera humana (V_L) obtenido a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vk endógeno de la inmunoglobulina no reordenado y un segmento génico endógeno Jk de la inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio, o dominios, V_L se asocia con un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

El ratón modificado por ingeniería genética proporcionado en diversas realizaciones, comprende un locus de la región variable de la cadena ligera que carece de los segmentos génicos endógenos V_L y J_L de la cadena ligera de ratón, y que comprende una región variable de la cadena ligera humana reordenada, que es una secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada o una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana, operativamente ligada a una región constante de ratón, en donde el locus es capaz de sufrir hipermutación somática, y en donde el locus expresa una cadena ligera que comprende la secuencia V_L/J_L ligada a una región constante de ratón. Por tanto, en diversas realizaciones el locus comprende un potenciador κ 3' de ratón, lo que está correlacionado con un nivel de hipermutación somática normal o de tipo silvestre.

El ratón modificado por ingeniería genética, en diversas realizaciones cuando se inmuniza con un antígeno de interés genera linfocitos B que muestran una diversidad de reordenamientos de las regiones variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana que expresan y funcionan con una o con dos cadenas ligeras reordenadas, incluyendo realizaciones en las que dichas una o dos cadenas ligeras comprenden regiones variables de la cadena ligera humana que comprenden, por ejemplo, de 1 a 5 mutaciones somáticas. En diversas realizaciones, las cadenas ligeras humanas expresadas de esta forma son capaces de asociarse y expresar con cualquier región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina expresada en el ratón. En un ejemplo, el ratón genéticamente modificado comprende un linfocito B que expresa un dominio V_L humano obtenido a partir de una secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vk endógeno de la inmunoglobulina no reordenado y de un segmento génico Jk endógeno de la inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio, o dominios, variable (V_L) de la cadena ligera humana está asociado con un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. En otro ejemplo, el ratón modificado genéticamente comprende un linfocito B que expresa un dominio variable (V_L) de la cadena ligera humana obtenido a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vk endógeno de la inmunoglobulina no reordenado y de un segmento génico Jk endógeno de la inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio, o dominios, V_L humano está asociado con un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ reordenada humana seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

Proteínas de unión al epítopo que se unen a más de un epítopo

Las composiciones y métodos descritos en la presente patente pueden ser utilizados para elaborar proteínas de unión que se unan a más de un epítopo con una alta afinidad, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Entre las ventajas de la invención se incluyen la habilidad para seleccionar cadenas de inmunoglobulina de cadena pesada con unión adecuadamente alta (por ejemplo, con maduración de la afinidad), cada una de las cuales se asociará con una única cadena ligera.

La síntesis y expresión de proteínas de unión biespecíficas ha sido problemática, en parte debido a factores asociados con la identificación de una cadena ligera adecuada que pueda asociarse y expresar con dos cadenas

pesadas diferentes, y en parte debido a factores de aislamiento. Los métodos y composiciones descritos en la presente patente permiten que un ratón modificado genéticamente seleccione, a través de procesos por lo demás naturales, una cadena ligera adecuada que pueda asociarse y expresar con más de una cadena pesada, incluyendo cadenas pesadas que son somáticamente mutadas (por ejemplo, con madurez de la afinidad). Las secuencias V_L y V_H humanas de linfocitos B adecuados de ratones inmunizados según se describe en la presente patente, que expresan anticuerpos con madurez de la afinidad que tienen cadenas pesadas quiméricas inversas (es decir, variable humana y constante de ratón), pueden ser identificadas y clonadas en un marco en un vector de expresión con una secuencia de genes de la región constante humana adecuada (por ejemplo, una IgG1 humana). Pueden prepararse dos constructos de este tipo, en donde cada constructo codifica un dominio variable de la cadena pesada humana que se une a un epítopo diferente. Uno de los V_L humanos (por ejemplo, Vκ1-39Jκ5 humano o Vκ3-20Jκ1 humano), en la secuencia de la línea germinal o de un linfocito B en donde la secuencia ha sido somáticamente mutada, puede ser fusionado en un marco a un gen de la región constante humano adecuado (por ejemplo, un gen constante k humano). Estos tres constructos ligeros y pesados completamente humanos pueden situarse en una célula adecuada para la expresión. La célula expresará dos especies principales: una cadena pesada homodimérica con la cadena ligera idéntica, y una cadena pesada heterodimérica con la cadena ligera idéntica. Para permitir una fácil separación de estas especies principales, una de las cadenas pesadas se modifica para omitir un determinante de unión a la proteína A, lo que da como resultado una afinidad diferencial de una proteína de unión homodimérica, de una proteína de unión heterodimérica. Las composiciones y métodos que abordan este tema se describen en USSN 12/832,838, presentada el 25 de Junio de 2010, titulada "Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format," publicada como US 2010/0331527A1.

En un ejemplo, se hace referencia a una proteína de unión al epítopo según se describe en la presente patente, en donde las secuencias humanas V_L y V_H se obtienen a partir de ratones descritos en la presente patente que han sido inmunizados con un antígeno que comprende un epítopo de interés.

También se hace referencia a una proteína de unión al epítopo que comprende un primer y un segundo polipéptido, donde el primer polipéptido comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una primera región de unión a un primer epítopo que se une selectivamente a un primer epítopo, seguido de una región constante que comprende una primera región C_H3 de una IgG humana seleccionada de entre IgG1, IgG2, IgG4, y una combinación de las mismas; y un segundo polipéptido que comprende, del extremo N-terminal al extremo C-terminal, una segunda región de unión al epítopo que se une selectivamente a un segundo epítopo, seguido de una región constante que comprende una segunda región C_H3 de una IgG humana seleccionada de entre IgG1, IgG2, IgG4, y una combinación de las mismas, en donde la segunda región C_H3 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio C_H3 a la proteína A.

En un ejemplo, la segunda región C_H3 comprende una modificación H95R (según la numeración de exones de IMGT; H435R según la numeración de la UE). En otra realización, la segunda región C_H3 comprende además una modificación Y96F (IMGT; Y436F de la UE).

En un ejemplo, la segunda región C_H3 es de una IgG1 humana modificada, y además comprende una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I de la UE).

En un ejemplo, la segunda región C_H3 es de una IgG2 humana modificada, y además comprende una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste en N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I de la UE).

En un ejemplo, la segunda región C_H3 es de una IgG4 humana modificada, y además comprende una modificaciónseleccionada de entre el grupo que consiste en Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V4221 de la UE).

Un método para elaborar una proteína de unión al epítopo que se una a más de un epítopo, consiste en inmunizar un primer ratón de acuerdo a la invención un antígeno que comprende un primer epítopo de interés, en donde el ratón comprende un locus endógeno de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina que no contiene un V_L endógeno de ratón que sea capaz de reordenar y formar una cadena ligera, en donde en el locus endógeno de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón se encuentra una única región V_L humana reordenada ligada operativamente al gen endógeno de la región constante de la cadena ligera de ratón, y la región V_L humana reordenada se selecciona de una Vκ1-39Jκ5 humana y una Vκ3-20Jκ1 humana, y los segmentos génicos V_H endógenos de ratón han sido reemplazados en su totalidad o en parte con segmentos génicos V_H humanos, de tal manera que las cadenas pesadas de inmunoglobulina elaboradas por el ratón son única o sustancialmente cadenas pesadas que comprenden dominios variables humanos y dominios constantes de ratón. Cuando se inmuniza, un ratón de este tipo fabricará un anticuerpo quimérico inverso, que comprende únicamente uno o dos dominios variables de la cadena ligera humana (por ejemplo, uno de Vκ1-39Jκ5 humano o uno de Vκ3-20Jκ humano). Una vez que se identifica que un linfocito B codifica un V_H que se une al epítopo de interés, la secuencia de nucleótidos del V_H (y, de manera opcional, el V_L) puede ser recuperada (por ejemplo, por PCR) y clonarse en un constructo de expresión en un marco con un dominio constante de inmunoglobulina humano

adecuado. Este proceso puede ser repetido para identificar un segundo dominio que se une a un segundo epítopo, y una segunda secuencia de genes V_H puede ser recuperada y clonada en un vector de expresión en un marco para un segundo dominio constante de inmunoglobulina adecuado. El primer y el segundo dominio constante de la inmunoglobulina pueden ser un isotipo igual o diferente, y uno de los dominios constantes de la inmunoglobulina (pero no el otro), puede modificarse según se describe en la presente patente o en la US 2010/0331527A1, y una proteína de unión al epítopo puede ser expresada en una célula adecuada y aislada en base a su afinidad diferencial para la proteína A, en comparación con una proteína de unión al epítopo homodimérica, por ejemplo, según se describe en la patente US 2010/0331527A1.

También se hace referencia a un método que se prevé para elaborar una proteína de unión al epítopo biespecífica, que comprende identificar una primera secuencia de nucleótidos V_H (V_H1) humana con madurez de la afinidad (por ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) de un ratón según se describe en la presente patente, identificar una segunda secuencia de nucleótidos V_H (V_H2) humana con madurez de la afinidad (por ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) de un ratón según se describe en la presente patente, clonar V_H1 en un marco con una cadena pesada humana que carece de una modificación determinante de la proteína A, según se describe en US 2010/0331527A1 para formar una cadena pesada 1 (HC1), clonar V_H2 en un marco con una cadena pesada humana que comprende un determinante de la Proteína A según se describe en US 2010/0331527A1 para formar la cadena pesada 2 (HC2), introducir un vector de expresión que comprende HC1 y el mismo o un vector de expresión diferente que comprende HC2 en una célula, en donde la célula además expresa una cadena ligera de la inmunoglobulina humana que comprende un Vκ1-39 humano/Jκ5 humano o un Vκ3-20 humano/Jκ1 humano fusionado con un dominio constante de la cadena ligera humana, permitiendo que la célula exprese una proteína de unión al epítopo biespecífica que comprende un dominio V_H codificado por V_H1 y un dominio V_H codificado por V_H2, y aislar la proteína de unión al epítopo biespecífica en base a su habilidad diferencial para unirse a la Proteína A en comparación con una proteína de unión al epítopo homodimérica monoespecífica. En un ejemplo específico, HC1 es una IgG1, y HC2 es una IgG1 que comprende la modificación H95R (IMGT; H435R de la UE), y además comprende la modificación Y96F (IMGT; Y436F de la UE). En un ejemplo, el dominio V_H codificado por V_H1, el dominio V_H codificado por V_H2, o ambos, están somáticamente mutados.

Genes humanos V_H que se expresan con una V_L humana común

Una variedad de regiones variables humanas de anticuerpos con madurez de la afinidad creados contra cuatro antígenos diferentes fueron expresadas bien con su cadena ligera análoga, o bien al menos una de las cadenas ligeras humanas seleccionadas de Vκ1-39Jκ5 humana, Vκ3-20Jκ1 humana, o VpreBJλ5 humana (ver Ejemplo 1). Para los anticuerpos para cada uno de los antígenos, unas cadenas pesadas, mutadas somáticamente y con alta afinidad, de diferentes familias de genes se emparejaron con éxito con las regiones Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenadas, y se secretaron a partir de células que expresan las cadenas pesada y ligera. Para Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1, los dominios V_H obtenidos a partir de las siguientes familias de genes V_H humanos se expresaron favorablemente: 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, y 6-1. Por tanto, un ratón que se modifica por ingeniería genética para expresar un repertorio limitado de dominios V_L humanos a partir de uno o ambos de Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1, generará una población diversa de dominios V_H humanos mutados somáticamente a partir de un locus V_H modificado para reemplazar segmentos génicos V_H de ratón con segmentos génicos V_H humanos.

Los ratones modificados por ingeniería genética para expresar cadenas pesadas de la inmunoglobulina quiméricas inversas (variable humana, constante de ratón), asociadas con una única cadena ligera reordenada (por ejemplo, una Vκ1-39/J o una Vκ3-20/J), cuando se inmunizaron con un antígeno de interés, generaron linfocitos B que comprendían una diversidad de reordenamientos V_H humanos y expresaron una diversidad de anticuerpos específicos del antígeno de alta afinidad con diversas propiedades con respecto a su habilidad para bloquear la unión del antígeno a su ligando, y con respecto a su habilidad para unirse a variantes del antígeno (ver los Ejemplos del 5 al 10).

Por tanto, los ratones y métodos descritos en la presenta patente son de utilidad a la hora de elaborar y seleccionar dominios variables de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que incluyen dominios variables de la cadena pesada humana mutados somáticamente, que son el resultado de una diversidad de reordenamientos, que muestran una amplia variedad de afinidades (incluyendo mostrar una K_D en aproximadamente el rango nanomolar o inferior), una amplia variedad de especificidades (incluyendo la unión a diferentes epítopos del mismo antígeno), y que se asocian y expresan con la misma, o sustancialmente la misma región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina humana.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en el arte cómo realizar y utilizar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deberían considerarse algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es, o está cerca de, la presión atmosférica.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir cómo realizar y utilizar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. A menos que se indique de otro modo, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es, o está cerca de, la presión atmosférica.

Ejemplo 1

Identificación de las regiones V_H que se asocian con regiones V_L humanas seleccionadas

Se construyó un sistema de expresión *in vitro* para determinar si una única cadena ligera de la línea germinal humana podría ser co-expresada con cadenas pesadas humanas de anticuerpos humanos específicos del antígeno.

Se conocen métodos para generar anticuerpos humanos en ratones modificados genéticamente (ver, *por ejemplo*, la patente US 6,596,541, de Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®). La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón genéticamente modificado que tiene un genoma que comprende regiones variables de la cadena ligera y pesada humana ligadas operativamente a locus endógenos de la región constante de ratón, de tal manera que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos producidos a partir de un ratón VELOCIMMUNE® son completamente humanos. Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Tal como se describe más adelante, los anticuerpos se caracterizan y se seleccionan para que presenten características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar un anticuerpo completamente humano que contiene un isotipo no IgM, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo silvestre o modificada. Mientras que la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con un uso específico, las características de unión al antígeno con alta afinidad y la especificidad diana residen en la región variable.

Un ratón VELOCIMMUNE® fue inmunizado con un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis (Antígeno C) y unos anticuerpos humanos específicos del antígeno se aislaron y secuenciaron para determinar el uso del gen V, utilizando técnicas estándar reconocidas en el arte. Los anticuerpos seleccionados fueron clonados en regiones constantes de la cadena ligera y pesada humana, y se seleccionaron 69 cadenas pesadas para emparejarse con una de tres cadenas ligeras humanas: (1) la cadena ligera κ análoga ligada a una región constante κ humana, (2) una Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada ligada a una región constante κ humana, o (3) una Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada ligada a una región constante κ humana. Cada par de cadena pesada y cadena ligera fue co-transfectado en células CHO-K1 utilizando técnicas estándar. Se detectó la presencia de un anticuerpo en el sobrenadante mediante un IgG anti-humano en un ensayo ELISA. Se determinó el título de anticuerpos (ng/ml) para cada par de cadena pesada/cadena ligera, y los títulos con las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal reordenadas se compararon con los títulos obtenidos con la molécula del anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada con la cadena ligera análoga), y se calculó el porcentaje de título nativo (Tabla 1). V_H: gen variable de la cadena pesada. ND: ninguna expresión detectada bajo las actuales condiciones experimentales.

Tabla 1

V_H	Título del Anticuerpo (ng/mL)			Porcentaje de Título nativo	
	CL análoga	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-15	63	23	11	36,2	17,5
1-2	103	53	ND	51,1	-
3-23	83	60	23	72,0	27,5
3-33	15	77	ND	499,4	-
4-31	22	69	17	309,4	76,7
3-7	53	35	28	65,2	53,1
-	22	32	19	148,8	89,3
1-24	3	13	ND	455,2	-
3-33	1	47	ND	5266,7	-

Tabla 1 (continuación)

V_H	Título del Anticuerpo (ng/mL)			Porcentaje de Título nativo	
	CL análoga	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-33	58	37	ND	63,1	-
-	110	67	18	60,6	16,5
3-23	127	123	21	96,5	16,3
3-33	28	16	2	57,7	7,1
3-23	32	50	38	157,1	119,4
-	18	45	18	254,3	101,7
3-9	1	30	23	2508,3	1900,0
3-11	12	26	6	225,9	48,3
1-8	16	ND	13	-	81,8
3-33	54	81	10	150,7	19,1
-	34	9	ND	25,9	-
3-20	7	14	54	203,0	809,0
3-33	19	38	ND	200,5	-
3-11	48	ND	203	-	423,6
-	11	23	8	212,7	74,5
3-33	168	138	182	82,0	108,2
3-20	117	67	100	57,5	86,1
3-23	86	61	132	70,7	154,1
3-33	20	12	33	60,9	165,3
4-31	69	92	52	133,8	75,0
3-23	87	78	62	89,5	71,2
1-2	31	82	51	263,0	164,6
3-23	53	93	151	175,4	285,4
-	11	8	17	75,7	151,4
3-33	114	36	27	31,6	23,4
3-15	73	39	44	53,7	59,6
3-33	1	34	16	5600,0	2683,3
3-9	58	112	57	192,9	97,6
3-33	67	20	105	30,1	157,0
3-33	34	21	24	62,7	70,4
3-20	10	49	91	478,4	888,2
3-33	66	32	25	48,6	38,2
3-23	17	59	56	342,7	329,8
-	58	108	19	184,4	32,9
-	68	54	20	79,4	29,9

Tabla 1 (continuación)

V_H	Título del Anticuerpo (ng/mL)			Porcentaje de Título nativo	
	CL análoga	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-33	42	35	32	83,3	75,4
-	29	19	13	67,1	43,9
3-9	24	34	29	137,3	118,4
3-30/33	17	33	7	195,2	43,1
3-7	25	70	74	284,6	301,6
3-33	87	127	ND	145,1	-
6-1	28	56	ND	201,8	-
3-33	56	39	20	69,9	36,1
3-33	10	53	1	520,6	6,9
3-33	20	67	10	337,2	52,3
3-33	11	36	18	316,8	158,4
3-23	12	42	32	356,8	272,9
3-33	66	95	15	143,6	22,5
3-15	55	68	ND	123,1	-
-	32	68	3	210,9	10,6
1-8	28	48	ND	170,9	-
3-33	124	192	21	154,3	17,0
3-33	0	113	ND	56550,0	-
3-33	10	157	1	1505,8	12,5
3-33	6	86	15	1385,5	243,5
3-23	70	115	22	163,5	31,0
3-7	71	117	21	164,6	29,6
3-33	82	100	47	122,7	57,1
3-7	124	161	41	130,0	33,5

En un experimento similar, se inmunizaron ratones VELOCIMMUNE® con diversos antígenos diferentes y las cadenas pesadas de anticuerpos humanos específicos del antígeno seleccionadas se sometieron a ensayo para determinar su habilidad para emparejarse con diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenada (según se describe anteriormente). Los antígenos utilizados en el experimento incluían una enzima implicada en la homeostasis del colesterol (Antígeno A), una hormona sérica implicada en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Antígeno B), un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis (Antígeno C) y un receptor de la superficie celular (Antígeno D). Los anticuerpos específicos del antígeno fueron aislados de ratones de cada grupo de inmunización, y se clonaron y secuenciaron las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada. A partir de la secuencia de las cadenas pesada y ligera, se determinó el uso del gen V y las cadenas pesadas seleccionadas fueron emparejadas bien con su cadena ligera análoga, o bien con una región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada. Cada par de cadena pesada/cadena ligera fue co-transfectado en células CHO-K1 y se detectó la presencia de un anticuerpo en el sobrenadante mediante una IgG anti-humana en un ensayo ELISA. Se determinó el título de anticuerpos (μg/ml) para cada par de cadena pesada/cadena ligera, y los títulos con las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal reordenadas se compararon con los títulos obtenidos con la molécula del anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada emparejada con la cadena ligera análoga), y se calculó el porcentaje de título nativo (Tabla 2). VH: gen variable de la cadena pesada. Vκ: gen variable de la cadena ligera κ. ND: ninguna expresión detectada bajo las actuales condiciones experimentales.

Tabla 2

Antígeno	Anticuerpo	V_H	Vκ	Titulo (µg/ml)			Porcentaje del Título Nativo
				V_H solo	V_H+Vκ	Vκ + Vκ1-39Jκ5	
A	320	1-18	2-30	0,3	3,1	2,0	66
	321	2-5	2-28	0,4	0,4	1,9	448
	334	2-5	2-28	0,4	2,7	2,0	73
	313	3-13	3-15	0,5	0,7	4,5	670
	316	3-23	4-1	0,3	0,2	4,1	2174
	315	3-30	4-1	0,3	0,2	3,2	1327
	318	4-59	1-17	0,3	4,6	4,0	86
B	257	3-13	1-5	0,4	3,1	3,2	104
	283	3-13	1-5	0,4	5,4	3,7	69
	637	3-13	1-5	0,4	4,3	3,0	70
	638	3-13	1-5	0,4	4,1	3,3	82
	624	3-23	1-17	0,3	5,0	3,9	79
	284	3-30	1-17	0,3	4,6	3,4	75
	653	3-33	1-17	0,3	4,3	0,3	7
	268	4-34	1-27	0,3	5,5	3,8	69
	633	4-34	1-27	0,6	6,9	3,0	44
C	730	3-7	1-5	0,3	1,1	2,8	249
	728	3-7	1-5	0,3	2,0	3,2	157
	691	3-9	3-20	0,3	2,8	3,1	109
	749	3-33	3-15	0,3	3,8	2,3	62
	750	3-33	1-16	0,3	3,0	2,8	92
	724	3-33	1-17	0,3	2,3	3,4	151
	706	3-33	1-16	0,3	3,6	3,0	84
	744	1-18	1-12	0,4	5,1	3,0	59
	696	3-11	1-16	0,4	3,0	2,9	97
	685	3-13	3-20	0,3	0,5	3,4	734
	732	3-15	1-17	0,3	4,5	3,2	72
	694	3-15	1-5	0,4	5,2	2,9	55
	743	3-23	1-12	0,3	3,2	0,3	10
	742	3-23	2-28	0,4	4,2	3,1	74
	693	3-23	1-12	0,5	4,2	4,0	94
	136	3-23	2-28	0,4	5,0	2,7	55
	155	3-30	1-16	0,4	1,0	2,2	221
	163	3-30	1-16	0,3	0,6	3,0	506
	171	3-30	1-16	0,3	1,0	2,8	295

Tabla 2 (continuación)

Antígeno	Anticuerpo	V_H	Vκ	Titulo (µg/ml)			Porcentaje del Título Nativo
				V_H solo	V_H+Vκ	Vκ + Vκ1-39Jκ5	
D	145	3-43	1-5	0,4	4,4	2,9	65
	49	3-48	3-11	0,3	1,7	2,6	155
	51	3-48	1-39	0,1	1,9	0,1	4
	159	3-7	6-21	0,4	3,9	3,6	92
	169	3-7	6-21	0,3	1,3	3,1	235
	134	3-9	1-5	0,4	5,0	2,9	58
	141	4-31	1-33	2,4	4,2	2,6	63
	142	4-31	1-33	0,4	4,2	2,8	67

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos demuestran que las cadenas pesadas con alta afinidad, somáticamente mutadas de diferentes familias de genes son capaces de emparejarse con las regiones Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenadas y ser secretadas a partir de la célula como una molécula de anticuerpo normal. Como se muestra en la Tabla 1, el título de anticuerpos se vio incrementado en aproximadamente un 61% (42 de 69) de las cadenas pesadas cuando se emparejaron con la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana reordenada, y aproximadamente un 29% (20 de 69) de las cadenas pesadas cuando se emparejaron con la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, en comparación con la cadena ligera análoga del anticuerpo parental. Para aproximadamente un 20% (14 de 69) de las cadenas pesadas, ambas cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas confirieron un incremento en la expresión en comparación con la cadena ligera análoga del anticuerpo parental. Tal como se muestra en la Tabla 2, la región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada confirió un incremento en la expresión de diversas cadenas pesadas específicas para un rango de diferentes clases de antígenos, en comparación con la cadena ligera análoga para los anticuerpos parentales. El título de anticuerpos se incrementó en más del doble para aproximadamente el 35% (15/43) de las cadenas pesadas, en comparación con la cadena ligera análoga de los anticuerpos parentales. Para dos cadenas pesadas (315 y 316), el incremento fue más de diez veces mayor en comparación con el anticuerpo parental. Dentro de todas las cadenas pesadas que mostraron un incremento en la expresión en relación a la cadena ligera análoga del anticuerpo parental, las cadenas pesadas de la familia tres (VH3) están sobre-representadas en comparación con otras familias de genes de la región variable de la cadena pesada. Esto demuestra una relación favorable de las cadenas pesadas VH3 humanas para emparejarse con las cadenas ligeras Vκ1-39Jκ5 and Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenadas.

Ejemplo 2

Generación de un locus de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenado

Se elaboraron diversos vectores de direccionamiento de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada utilizando tecnología VELOCIGENE® (ver, por ejemplo, la patente estadounidense Nº 6,586,251 y Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659), para modificar los clones 302g12 y 254m04 (Invitrogen) de Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC) genómico de ratón. Utilizando estos dos clones BAC, se modificaron por ingeniería genética unos constructos genómicos para contener una única región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada y se insertaron en un locus de la cadena ligera κ endógeno que fue previamente modificado para eliminar los segmentos génicos endógenos de unión y variables κ.

Construcción de vectores de direccionamiento de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. Tres regiones diferentes de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se elaboraron utilizando técnicas estándar de biología molecular reconocidas en el arte. Entre los segmentos génicos variables humanos utilizados para construir estas tres regiones se incluyen una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humano reordenado, una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humano reordenado y una secuencia de VpreBJλ5 humano reordenado.

Se realizó un segmento de ADN que contiene un exón 1 (que codifica el péptido líder), y un intrón 1 del gen Vκ3-7 de ratón mediante síntesis de ADN de novo (Integrated DNA Technologies). Se incluyó parte de la región 5' no traducida hasta el sitio de una enzima de restricción BlpI de origen natural. Los exones de los genes Vκ1-39 y Vκ3-20 se amplificaron mediante PCR a partir de las genotecas BAC genómicas humanas. Los cebadores directos

presentaron una extensión en el extremo 5' que contenía el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 1 del gen Vκ3-7 de ratón. El cebador inverso utilizado para la PCR de la secuencia de Vκ1-39 humano incluía una extensión que codifica el Jκ5 humano, mientras que el cebador inverso utilizado para la PCR de la secuencia de Vκ3-20 humano incluía una extensión que codifica el Jκ1 humano. La secuencia VpreBJλ5 humana fue elaborada mediante síntesis de ADN de novo (Integrated DNA Technologies). Una parte del intrón Jκ-Cκ humano que incluye el sitio donador de corte y empalme, fue amplificado por PCR a partir del plásmido pBS-296-HA18-PIScel. El cebador directo incluía una extensión que codifica parte de ya sea una secuencia Jκ5, Jκ1, o bien Jλ5 humana. El cebador inverso incluía un sitio PI-ScelI, que fue modificado por ingeniería genética previamente en el intrón.

El exón1/intrón 1 de ratón, los exones de la cadena ligera variables humanos, y los fragmentos del intrón Jκ-Cκ humanos fueron unidos entre sí mediante PCR de extensión solapada, digeridos con BlpI y PI-ScelI, y ligados en un plásmido pBS-296-HA18-PIScel, que contenía el promotor del segmento génico variable Vκ3-15 humano. Se reemplazó un casete de higromicina con un sitio LOX dentro del plásmido pBS-296-HA18-PIScel por un casete de higromicina con un sitio FRT flanqueado por sitios NotI y AscI. El fragmento NotI/PI-ScelI de este plásmido fue ligado en un BAC 254m04 de ratón modificado, que contenía parte del intrón Jκ-Cκ de ratón, el exón Cκ de ratón, y aproximadamente 75 kb de secuencia genómica aguas abajo del locus κ de ratón, que proporcionó un brazo de homología en el extremo 3' para la recombinación homóloga en células ES de ratón. El fragmento NotI/AscI de este BAC se ligó entonces en un BAC 302g12 de ratón modificado, que contenía un casete de neomicina con un sitio FRT y aproximadamente 23 kb de secuencia genómica aguas arribe del locus κ endógeno para la recombinación homóloga en células ES de ratón.

Vector de direccionamiento de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenado (FIG. 1). Se introdujeron sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de un inserto de la cadena ligera modificada por ingeniería genética para la clonación en un vector de direccionamiento: un sitio AscI en el extremo 5' y un sitio PI-ScelI en el extremo 3'. Dentro del sitio AscI del extremo 5' y del sitio PI-ScelI del extremo 3' el constructo de direccionamiento del extremo 5' al 3' incluía un brazo de homología 5' que contiene una secuencia 5' con respecto al locus endógeno de la cadena ligera κ de ratón, obtenido a partir del clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con un sitio FRT, una secuencia genómica que incluye el promotor Vκ3-15 humano, una secuencia líder del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia de intrones del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, un marco de lectura abierto de una región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una parte del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología del extremo 3' que contiene una secuencia 3' del segmento Jκ5 endógeno de ratón obtenido a partir de un clon BAC 254m04 de ratón (Figura 1, centro). Los genes y/o secuencias aguas arriba del locus endógeno de la cadena ligera κ de ratón y aguas abajo del segmento génico Jκ más 3' (por ejemplo, potenciador 3' endógeno), no fueron modificados por el constructo de direccionamiento (ver Figura 1). La secuencia del locus Vκ1-39Jκ5 humano modificado por ingeniería genética se muestra en la SEQ ID NO:1.

La inserción dirigida de la región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada en un ADN BAC,se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores localizados en secuencias dentro de la región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia de intrones 3' con respecto a la secuencia líder del Vκ3-7 de ratón fue confirmada con los cebadores ULC-m1F (AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG; SEQ ID NO:2) y ULC-m1R (TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA; SEQ ID NO:3). El marco de lectura abierto de la región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana fue confirmado con los cebadores 1633-h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A; SEQ ID NO:4) y 1633-h2R (TGCAAACTGG ATGCAGCATA G; SEQ ID NO:5). El casete de neomicina fue confirmado con los cebadores neoF (GGTGGAGAGG CTATTCGGC; SEQ ID NO:6) y neoR (GAACACGGCG GCATCAG; SEQ ID NO:7). El ADN BAC diana se utilizó entonces para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresan una región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada.

Se confirmaron clones de células ES positivos mediante cribado y estudios de cariotipo de TAQMAN™, utilizando sondas específicas para la región Vκ1-39Jκ5 de la cadena ligera modificada por ingeniería genética insertada en el locus endógeno. En pocas palabras, la sonda neoP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; SEQ ID NO:8) que se une dentro de un gen marcador de neomicina, una sonda ULC-m1 P (CCATTATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC; SEQ ID NO:9) que se une dentro de la secuencia de intrones 3' con respecto a la secuencia líder de Vκ3-7 de ratón, y una sonda 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT; SEQ ID NO:10) que se une dentro del marco de lectura abierto de Vκ1-39Jκ5 reordenado de la línea germinal humana. A continuación se utilizaron clones de células ES positivos para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresan la región de la cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal.

De forma alternativa, las células ES que portan la región de la cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana, son transfectadas con un constructo que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina con un sitio FRT introducido mediante el constructo de direccionamiento. Opcionalmente, el casete de neomicina es eliminado criando ratones que expresan recombinasa FLP (por ejemplo, US 6,774,279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

Vector de direccionamiento de Vκ3-20Jκ1 reordenado de la línea germinal humana (FIG. 2). De forma similar, se realizó un locus de la cadena ligera modificado por ingeniería genética que expresa una región Vκ3-20Jκ1 reordenada de la línea germinal humana, utilizando un constructo de direccionamiento que incluía, del extremo 5' al extremo 3', un brazo de homología en el extremo 5' que contenía una secuencia 5' con respecto al locus endógeno de la cadena ligera κ de ratón obtenido a partir de un clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con un stio FRT, una secuencia genómica que incluía el promotor Vκ3-15 humano, una secuencia líder del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia de intrones del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, un marco de lectura abierto de una región Vκ3-20Jκ1 reordenada de la línea germinal humana, una secuencia genómica que contenía una parte del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología en el extremo 3' que contenía una secuencia 3' del segmento génico Jκ5 de ratón obtenido a partir de un clon BAC 254m04 de ratón (Figura 2, centro). La secuencia del locus Vκ3-20Jκ1 humano modificado por ingeniería genética se muestra en la SEQ ID NO:11.

La inserción dirigida de la región Vκ3-20Jκ1 reordenada de la línea germinal humana en ADN BAC fue confirmada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores localizados en secuencias en el interior de la región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 reordenada de la línea germinal humana. En pocas palabras, la secuencia de intrones 3' con respecto a la secuencia líder de Vκ3-7 de ratón fue confirmada con los cebadores ULCm1 F (SEQ ID NO:2) y ULC-m1 R (SEQ ID NO:3). El marco de lectura abierto de la región Vκ3-20Jκ1 reordenada de la línea germinal humana fue confirmado con los cebadores 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; SEQ ID NO:12) y 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; SEQ ID NO:13). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEQ ID NO:6) y neoR (SEQ ID NO:7). El ADN BAC dirigido se utilizó a continuación para electroporar células de ratón ES a células ES creadas modificadas para generar ratones quiméricos que expresan la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 reordenada de la línea germinal humana.

Se confirmaron clones de células ES positivos mediante cribado y estudio de cariotipo de TAQMAN™ utilizando sondas específicas para la región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 modificada por ingeniería genética insertada en el locus endógeno de la cadena ligera κ. En resumen, una sonda neoP (SEQ ID NO:8) que se une dentro del gen marcador de neomicina, una sonda ULC-m1 P (SEQ ID NO:9) que se une dentro de la secuencia líder del Vκ3-7 de ratón, y una sonda 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG; SEQ ID NO:14) que se une dentro del marco de lectura abierto del Vκ3-20Jκ1 humano. A continuación se utilizaron clones de células ES positivos para implantar ratones hembra. Se produjo una camada de crías que expresan la región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana.

De forma alternativa, las células ES que portan una región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana pueden ser transfectadas con un constructo que expresa FLP, para eliminar el casete de neomicina con un sitio FRT introducido por el constructo de direccionamiento. Opcionalmente, el casete de neomicina puede ser eliminado criando ratones que expresen FLP recombinasa (por ejemplo, US 6,774,279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

Vector de direccionamiento de VpreBJλ5 reordenado de la línea germinal humana (FIG. 3). De forma similar, se realizó un locus de la cadena ligera modificado por ingeniería genética que expresa una región VpreBJλ5 reordenada de la línea germinal humana, utilizando un constructo de direccionamiento que incluía, del extremo 5' al extremo 3', un brazo de homología en el extremo 5' que contenía una secuencia 5' con respecto al locus endógeno de la cadena ligera κ de ratón obtenido a partir de un clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con un stio FRT, una secuencia genómica que incluía el promotor Vκ3-15 humano, una secuencia líder del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia de intrones del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, un marco de lectura abierto de una región VpreBJλ5 reordenada de la línea germinal humana, una secuencia genómica que contenía una parte del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología en el extremo 3' que contenía una secuencia 3' del segmento génico Jκ5 endógeno de ratón obtenido a partir de un clon BAC 254m04 de ratón (Figura 3, centro). La secuencia del locus VpreBJλ5 humano modificado por ingeniería genética se muestra en la SEQ ID NO:15.

La inserción dirigida de la región VpreBJλ5 reordenada de la línea germinal humana en ADN BAC fue confirmada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores localizados en secuencias en el interior de la región de la cadena ligera VpreBJλ5 reordenada de la línea germinal humana. En pocas palabras, la secuencia de intrones 3' con respecto a la secuencia líder de Vκ3-7 de ratón fue confirmada con los cebadores ULCm1 F (SEQ ID NO:2) y ULC-m1 R (SEQ ID NO:3). El marco de lectura abierto de la región VpreBJλ5 reordenada de la línea germinal humana fue confirmado con los cebadores 1616-h1F (TGTCCTCGGC CCTTGGA; SEQ ID NO:16) y 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCCT; SEQ ID NO:17). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEQ ID NO:6) y neoR (SEQ ID NO:7). El ADN BAC dirigido se utilizó a continuación para electroporar células de ratón ES a células ES creadas modificadas para generar ratones quiméricos que expresan la cadena ligera VpreBJλ5 reordenada de la línea germinal humana.

Se confirmaron clones de células ES positivos mediante cribado y estudio de cariotipo de TAQMAN™ utilizando sondas específicas para la región de la cadena ligera VpreBJλ5 modificada por ingeniería genética insertada en el

locus endógeno de la cadena ligera κ. En resumen, una sonda neoP (SEQ ID NO:8) que se une dentro del gen marcador de neomicina, una sonda ULC-m1 P (SEQ ID NO:9) que se une dentro de la secuencia líder del Vκ3-7 de ratón, y una sonda 1616h1P (ACAATCCGCC TCACCTGCAC CCT; SEQ ID NO:18) que se une dentro del marco de lectura abierto del VpreBJλ5 humano. A continuación se utilizaron clones de células ES positivos para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresan una región de la cadena ligera de la línea germinal.

De forma alternativa, las células ES que portan una región de la cadena ligera VpreBJλ5 reordenada de la línea germinal humana pueden ser transfectadas con un constructo que expresa FLP, para eliminar el casete de neomicina con un sitio FRT introducido por el constructo de direccionamiento. Opcionalmente, el casete de neomicina puede ser eliminado criando ratones que expresen FLP recombinasa (por ejemplo, US 6,774,279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

Ejemplo 3

Generación de ratones que expresan una única cadena ligera humana reordenada

Las células ES diana descritas anteriormente se utilizaron como células ES donadoras y se introdujeron en un embrión de ratón en un estado de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, la US Pat. No. 7,294,754 y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25(1):91-99.). Los ratones VELOCIMICE® que portan independientemente una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana, una región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 o una región de la cadena ligera VpreBJλ5 se identifican mediante genotipado utilizando una modificación de ensayos específicos de alelo (Valenzuela et al., supra) que detecta la presencia de la única región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

Las crías son genotipadas y se selecciona una cría heterocigota u homocigota para la única región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada, para caracterizar la expresión de la región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

Citometría de flujo. La expresión de la región de la cadena ligera humana reordenada en el repertorio de anticuerpos normal de ratones de cadena ligera común se validó mediante análisis de la expresión de la inmunoglobulina κ y λ en esplenocitos y en sangre periférica de ratones de cadena ligera común. Se elaboraron suspensiones celulares de bazos cultivados y sangre periférica de ratones de tipo silvestre (n=5), ratones heterocigotos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5 (n=3), homocigotos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5 (n=3), heterocigotos de cadena ligera común Vκ3-20κ1 (n=2), y homocigotos de cadena ligera común Vκ3-20Jκ1 (n=2), utilizando métodos estándar y se colorearon con CD19+, Igλ+ e Igκ+ utilizando anticuerpos marcados con fluorescencia (BD Pharmigen).

En resumen, $1x10^6$ se incubaron con CD16/CD32 anti-ratón (clon 2.4G2, BD Pharmigen) en hielo durante 10 minutos, seguido por el marcado con el siguiente coctel de anticuerpos durante 30 minutos en hielo: CD19 anti-ratón conjugado con APC (clon 1D3, BD Pharmigen), CD3 anti-ratón conjugado con PerCP-Cy5.5 (clon 17A2, BioLegend), Igκ anti-ratón conjugado con FITC (clon 187.1, BD Pharmigen), Igλ anti-ratón conjugada con PE (clon RML-42, BioLegend). A continuación de la tinción, las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 2%. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo y se analizaron con FlowJo. Acotamiento de subpoblaciones de interés (Gating): linfocitos B totales (CD19+CD3-), Igκ+ linfocitos B (Igκ+Igλ-CD19+CD3-), Igλ+ linfocitos B (IgK-Igλ+CD19+CD3-). Los datos reunidos a partir de muestras de sangre y esplenocitos demostraron resultados similares. La Tabla 3 expone el porcentaje de linfocitos B CD19+ positivos de sangre periférica de un ratón representativo de cada grupo, que son Igλ+, Igκ+, o Igλ+Igκ+. El porcentaje de linfocitos B CD19+ en sangre periférica de ratones de tipo silvestre o “wild type” (WT) y homocigotos para la cadena ligera común Vκ1-39Jκ5 o Vκ3-20Jκ1 se muestran en la FIG. 4.

Tabla 3

Ratón	Linfocitos B CD19+		
	Igλ+	Igκ+	Igλ+Igκ+
Tipo silvestre	4,8	93	0,53
Vκ1-39Jκ5	1,4	93	2,6
Vκ3-20Jκ1	4,2	88	6

Expresión de cadena ligera común. La expresión de cada cadena ligera común (Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1) se analizó en ratones heterocigotos y homocigotos utilizando un ensayo de PCR cuantitativa (por ejemplo, de TAQMAN™).

En resumen, se purificaron los linfocitos B CD19+ de los bazos de ratón de tipo silvestre homocigotos para un reemplazo de los locus de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera κ de ratón, con los locus de la región variable de la cadena ligera κ y de la cadena pesada humanas correspondientes (Hκ, además de ratones homocigotos y heterocigotos para cada región de la cadena ligera humana reordenada (Vκ1-39Jκ5 o Vκ3-20Jκ1) utilizando Microperlas de CD19 de ratón (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se purificó el ARN total de linfocitos B CD19+ utilizando un Mini Kit RNeasy (de Qiagen) según las especificaciones del fabricante y se eliminó el ARN genómico utilizando tratamiento en columna de DNasa libre de RNasa (Qiagen). 200 ng de ARNm fueron transcritos de forma inversa en ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc First Strand (Invitrogen) y el ADNc resultante se amplificó con el Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todas las reacciones se elaboraron utilizando el sistema de detección de secuencias ABI 7900 (Applied Biosystems), utilizando cebadores y sondas MGB Taqman MGB que abarcan (1) el enlace de Vκ-Jκ para ambas cadenas ligeras comunes, (2) el gen Vκ solo (es decir Vκ1-39 y Vκ3-20), y (3) la región Cκ de ratón. La Tabla 4 expone las secuencias de los cebadores y sondas empleados para este ensayo. La Expresión relativa se normalizó a la expresión de la región Cκ de ratón. Los resultados se muestran en la FIG. 5A, 5B y 5C.

Tabla 4

Región	Descripción del Cebador/Sonda (5'-3')	SEQ. ID Nos:
Enlace de Vκ1-39Jκ5	(sentido) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	19
	(anti-sentido) GTTTAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	20
	(sonda) CCTCCGATCA CCTTC	21
Vκ1-39	(sentido) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	22
	(anti- sentido) ATGGGACCCC ACTTTGCA	23
	(sonda) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	24
Enlace de Vκ3-20Jκ1	(sentido) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	25
	(anti- sentido) TGATTTCCAC CTTGGTCCCT T	26
	(sonda) TAGCTCACCT TGGACGTT	27
Vκ3-20	(sentido) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	28
	(anti- sentido) GACCCACTGC CACTGAACCT	29
	(sonda) CCACTGGCAT CCC	30
Ck de ratón	(sentido) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	31
	(anti- sentido) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	32
	(sonda) ACCAAGGACG·AGTATGAA	33

Anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno. Se inmunizaron ratones de cadena ligera común que portaban o bien una cadena ligera común Vκ1-39Jκ5 o Vκ3-20Jκ1 en el locus endógeno de la cadena ligera κ de ratón, con β-galactosidasa y se midió el título de anticuerpos.

En resumen, se emulsionó β-galactosidasa (Sigma) en adyuvante titermax (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se inmunizaron ratones de tipo silvestre(n=7), homocigotos de cadena ligera común V_κ1-39J_κ5 (n=2) y homocigotos de cadena ligera común V_κ3-20J_κ1 (n=5), mediante inyección subcutánea con 100 µg de β-galactosidasa/Titermax. Los ratones se reforzaron dos veces mediante inyección subcutánea, en intervalos de 3 semanas, con 50 µg de β-galactosidasa/Titermax. Después del segundo refuerzo, se recogió sangre de ratones anestesiados utilizando sangrado retro-orbital en tubos separadores de suero (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Para medir anticuerpos IgM o IgG anti-β-galactosidasa, se recubrieron placas de ELISA (Nunc) con 1 µg/mL de β-galactosidasa durante la noche a 4°C. El exceso de antígeno se lavó antes de bloquearlo con PBS con BSA al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones en serie a las placas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente antes del lavado. Las placas se incubaron entonces con anti-IgM (Southern Biotech) o anti-IgG (Southern Biotech) conjugado con HRP durante una hora a temperatura ambiente. A continuación de otro lavado, las placas se desarrollaron con sustrato TMB (BD Biosciences). Las reacciones se detuvieron con 1 N de ácido sulfúrico y se tomaron lecturas del OD450 utilizando un Lector de placas Victor X5

(Perkin Elmer). Los datos se analizaron con GraphPad Prism y la señal se calculó como la dilución de suero que es dos veces superior al fondo. Los resultados se muestran en la FIG. 6A y 6B.

Como se muestra en este ejemplo, la relación de los linfocitos B κ/λ tanto en el compartimento esplénico como en el periférico de ratones de la cadena ligera común Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 demostró un patrón cercano al tipo silvestre (Tabla 3 y FIG. 4). Los ratones de la cadena ligera común VpreBJκ5, sin embargo, demostraron menos linfocitos B periféricos, de los cuales aproximadamente el 1-2% expresan la región de la cadena ligera humana modificada por ingeniería genética (datos no mostrados). Los niveles de expresión de las regiones de la cadena ligera humana reordenada Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 del locus endógeno de la cadena ligera κ eran elevados en comparación con un locus endógeno de la cadena ligera κ que contiene un reemplazo completo de los segmentos génicos Vκ y Jκ de ratón con segmentos génicos Vκ y Jκ humanos (FIG. 5A, 5B y 5C). Los niveles de expresión de la región de la cadena ligera humana reordenada VpreBJκ5 demostraron una expresión elevada similar del locus endógeno de la cadena ligera κ tanto en ratones heterocigotos y homocigotos (datos no mostrados). Esto demuestra que en directa competición con los locus endógenos de la cadena ligera de ratón λ, κ, o ambos, una única secuencia VL/JL reordenada humana puede producir un mejor de nivel de expresión que el tipo silvestre del locus endógeno de la cadena ligera κ y dan lugar a una frecuencia normal de linfocitos B en sangre y esplénicos. Además, la presencia de un locus de la cadena ligera κ modificada por ingeniería genética con una secuencia Vκ1-39Jκ5 humana o Vκ3-20Jκ1 fue bien tolerada por los ratones y parece funcionar en la forma de las de tipo silvestre representando una parte sustancial del repertorio de la cadena ligera en el componente humoral de la respuesta inmune (FIG 6A y 6B).

Ejemplo 4

Cría de ratones que expresan una única cadena ligera de la línea germinal humana reordenada

Este ejemplo describe diversas cepas diferentes de un ratón genéticamente modificado que pueden ser engendrados en cualquiera de los ratones de cadena ligera común descritos en la presente patente para crear múltiples cepas de ratón modificado genéticamente que albergan múltiples locus de inmunoglobulina modificada genéticamente.

Knockout (KO) de la Igλ. Para optimizar el uso del locus de la cadena ligera modificada por ingeniería genética, los ratones portadores de regiones de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada son engendrados en otro ratón que contiene una deleción en el locus endógeno de la cadena ligera λ. De esta manera, la progenie obtenida expresará, como su única cadena ligera, la región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada, según se describe en el Ejemplo 2. La cría se realiza mediante técnicas estándar reconocidas en el arte y, alternativamente, mediante un criador comercial (por ejemplo, The Jackson Laboratory). Las cepas de ratón que portan un locus de la cadena ligera modificado por ingeniería genética y una deleción del locus endógeno de la cadena ligera λ, se someten a cribado para detectar la presencia de la úncia región de la cadena ligera y la ausencia de cadenas ligeras λ endógenas de ratón.

Locus de la cadena pesada endógena humanizada. Los ratones que portan un locus de la cadena pesada de la línea germinal humana modificado por ingeniería genética, se engendran con ratones que contienen un reemplazo del locus del gen variable de la cadena pesada de ratón endógena con el locus del gen variable de la cadena pesada humana (ver el documento US 6,596,541; el ratón VELOCIMMUNE®, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). El ratón VELOCIMMUNE® consta de un genoma que comprende regiones variables de la cadena pesada humana operativamente ligadas a los locus de la región constante de ratón endógena, de tal manera que el ratón produce anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada humana y una región constante de la cadena pesada de ratón en respuesta a una estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos está aislado y operativamente ligado al ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada humana. El ADN se expresa entonces en una célula capaz de expresar la cadena completamente humana del anticuerpo.

Se obtienen ratones que portan un reemplazo del locus V_H endógeno de ratón con el locus C_H humano y una única región V_L de la línea germinal humana reordenada en el locus de la cadena ligera κ endógena. Se obtienen anticuerpos quiméricos inversos que contienen cadenas pesadas mutadas somáticamente (V_H humano y C_H de ratón) con una única cadena ligera humana (V_L humana y C_L de ratón C_L) tras la inmunización con un antígeno de interés. Las secuencias de nucleótidos V_H y V_L de los linfocitos B que expresan anticuerpos se identifican y se elaboran anticuerpos completamente humanos mediante fusión de las secuencias de nucleótidos V_H y V_L con las secuencias de nucleótidos C_H y C_L humanas en un sistema de expresión adecuado.

Generación de anticuerpos de ratones que expresan cadenas pesadas humanas y una región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada

Después de criar ratones que contienen la región de la cadena ligera humana modificada por ingeniería genética para obtener diversas cepas que contienen modificaciones y deleciones de otros locus de Ig endógenos (según se describe en el Ejemplo 4), los ratones seleccionados se pueden inmunizar con un antígeno de interés.

Generalmente, un ratón VELOCIMMUNE® que contiene una de las regiones de la única cadena ligera de la línea germinal humana reordenada es expuesto a un antígeno, y se recuperan células linfáticas (tales como los linfocitos B) del suero de los animales. Las células linfáticas se fusionan con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortal, y tales líneas celulares de hibridoma son cribadas y seleccionadas para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que contienen regiones variables de la cadena pesada y cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenada que son específicas al antígeno utilizado para la inmunización. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y la cadena ligera es aislado y ligado a regiones constantes isotípicas deseables de la cadena pesada y la cadena ligera. Debido a la presencia de secuencias de ratón endógenas y cualquier elemento adicional que actúa en cis presentes en el locus endógeno, la única cadena ligera de cada anticuerpo puede ser somáticamente mutada. Esto añade una diversidad adicional al repertorio específico del antígeno que comprende una única cadena ligera y diversas secuencias de la cadena pesada. Las secuencias del anticuerpo clonado resultante se expresan posteriormente en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos del antígeno o los dominios de las cadenas ligera y pesada se identifican directamente a partir de linfocitos específicos del antígeno.

Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad con una región variable humana y una región constante de ratón. Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para presentar características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón son reemplazadas con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano que contiene una cadena pesada humana somáticamente mutada y una única cadena ligera obtenida a partir de una región de la cadena ligera de la línea germinal humana de la invención. Las regiones constantes humanas adecuadas incluyen, por ejemplo IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificada.

Se inmunizaron cohortes diferentes de ratones VELOCIMMUNE® que contienen un reemplazo del locus de la cadena pesada de ratón endógena con segmentos génicos humanos VH, DH, y JH, y un reemplazo del locus de la cadena ligera κ endógena de ratón o bien con la región de la cadena ligera humana Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal modificada por ingeniería genética, o bien con la región de la cadena ligera humana Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal modificada por ingeniería genética (descrita anteriormente), con una proteína receptora de la superficie celular (Antígeno E). El antígeno E es administrado directamente en la planta de la pata de los ratones con seis inyecciones consecutivas cada 3-4 días. Dos o tres microorganismos del Antígeno E se mezclan con 10 µg de oligonucleótido CpG (oligonucleótido Cat # tlrl-modn - ODN1826; InVivogen, San Diego, CA) y 25 µg de Adju-Phos (adyuvante de gel de fosfato de aluminio, Cat# H-71639-250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark) previamente a la inyección. Se proporciona un total de seis inyecciones previamente a la retirada final del antígeno, que se administra 3-5 días previos al sacrificio. Se recogen extracciones de sangre después de la 4ª y la 6ª inyección y se monitoriza la respuesta inmune del anticuerpo mediante un inmunoensayo específico del antígeno estándar.

Cuando se logra una respuesta inmune deseada los esplenocitos se cosechan y se fusionan con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se someten a cribado y se seleccionan para identificar líneas celulares que producen anticuerpos de la cadena ligera común específicos del antígeno E. Utilizando esta técnica se obtienen diversos anticuerpos específicos anti-antígeno de la cadena ligera común (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de la cadena pesada humana, el mismo dominio variable de la cadena ligera humana, y dominios constantes de ratón).

De forma alternativa, se aíslan anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común a partir de linfocitos B positivos en antígenos sin fusión con células de mieloma, según se describe en la patente U.S. 2007/0280945A1, incorporada específicamente en la presente patente a modo de referencia en su totalidad. Utilizando este método, se obtuvieron diversos anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de la cadena pesada humana, ya sea una región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana modificada por ingeniería genética o una región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 humana modificada por ingeniería genética, y dominios constantes humanos)

Las propiedades biológicas de los ejemplos de anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común generados de acuerdo a los métodos de este Ejemplo se describen en detalle en las secciones expuestas más adelante.

Ejemplo 6

Uso de un segmento génico de la cadena pesada en los anticuerpos de la cadena ligera común específicos del antígeno

Para analizar la estructura de los anticuerpos de la cadena ligera común anti-Antígeno E humanos producidos, se clonaron y secuenciaron ácidos nucleicos que codifican regiones variables de anticuerpos de la cadena pesada. A partir de las secuencias de ácidos nucleicos y de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos previstas, se identificó el uso de los genes para la región variable de la cadena pesada (HCVR) de los anticuerpos de la cadena ligera común seleccionados obtenidos a partir de ratones VELOCIMMUNE® inmunizados que contienen ya sea la región de la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana modificada por ingeniería genética o bien la región de la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 humana modificada por ingeniería genética. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6, los cuales demuestran que los ratones de acuerdo a la invención generan anticuerpos de la cadena ligera específicos del antígeno a partir de una variedad de segmentos génicos de la cadena pesada humana, debido a una variedad de reordenamientos, cuando se emplea o bien un ratón que expresa una cadena ligera a partir de únicamente un Vκ1-39- humano o bien una cadena ligera obtenida a partir de Vκ3-20- humano. Los segmentos génicos VH humanos de las familias 2, 3, 4, y 5 se reordenan con una variedad de segmentos DH y segmentos JH humanos para producir anticuerpos específicos del antígeno.

Tabla 5

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5								
Anticuerpo	HCVR				Anticuerpo	HCVR		
	V_H	D_H	J_H			V_H	D_H	J_H
2952	2-5	6-6	1		6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1		6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1		2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5		2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4		3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4		3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4		5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4		6002	3-30	6-13	4
6011	3-23	7-27	4		6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4		6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4		6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4		6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4		6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4		6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4		6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4		6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4		6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4		2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4		2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5		2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5		3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5		3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2		3020	3-30	7-27	4
3013	3-30	5-12	4		3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4		3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1		3030	3-30	7-27	4

Tabla 5 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5								
Anticuerpo	HCVR				Anticuerpo	HCVR		
	V_H	D_H	J_H			V_H	D_H	J_H
3043	3-30	6-6	3		3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4		5997	3-30	7-27	4
2949	3-30	6-6	5		6033	3-30	7-27	4
2950	3-30	6-6	5		3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5		6028	3-30	7-27	6
2978	3-30	6-6	5		3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5		3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5		6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5		6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5		6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5		6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5		6037	4-59	3-16	3
6004	3-30	6-6	5		2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5		3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5		3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5		6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5		6006	1-69	6-6	5
6023	3-30	6-6	5		6008	1-69	6-13	4

Tabla 6

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ3-20Jκ1								
Anticuerpo	HCVR				Anticuerpo	HCVR		
	V_H	D_H	J_H			V_H	D_H	J_H
5989	3-30	3-3	3		5992	4-39	1-26	3
5994	3-33	1-7	4		2975	5-51	6-13	5
5985	3-33	2-15	4		2972	5-51	3-16	6
5987	3-33	2-15	4		5986	5-51	3-16	6
5995	3-33	2-15	4		5993	5-51	3-16	6
2968	4-39	1-26	3		5996	5-51	3-16	6
5988	4-39	1-26	3		5984	3-53	1-1	4
5990	4-39	1-26	3					

Ejemplo 7

Determinación del bloqueo de la habilidad de anticuerpos de la cadena ligera común específicos del antígeno mediante ensayo con LUMINEX™

Se sometieron a ensayo noventa y ocho anticuerpos de la cadena ligera común humana generados contra el antígeno E para determinar su habilidad para bloquear la unión del ligando natural del Antígeno E (Ligando Y) al antígeno E en un ensayo con perlas.

El dominio extracelular (ECD) del antígeno E se conjugó con dos etiquetas del epítopo myc y una etiqueta de 6X histidina (Antígeno E-mmH), y se acopló con amina a microesferas carboxiladas en una concentración de 20 µg/mL en tampón de MES. La mezcla fue incubada durante dos horas a temperatura ambiente, seguido de la desactivación de perlas con 1 M Tris pH 8,0, seguido por un lavado en PBS con Tween-20 al 0,05% (v/v). Las perlas se bloquearon entonces con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 2% (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa filtrante de 96 pocillos, se diluyeron los sobrenadantes que contenían anticuerpos de la cadena ligera común específicos del Antígeno E, en una relación 1:15 en solución tampón. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante mock con los mismos componentes de los medios que para el sobrenadante del anticuerpo. Se añadieron perlas marcadas con antígeno E a los sobrenadantes y se incubaron durante la noche a 4°C. Se añadió una proteína con un Ligando Y biotinilado a una concentración final de 0,06 nM y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La detección del Ligando Y biotinilado enlazado a perlas marcadas con Antígeno E-myc-myc-6His se determinó con R-Ficoeritrina conjugada con Estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD), seguido por la medición en un analizador LUMINEX™ basado en citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia (MFI) de fondo de una muestra sin el Ligando Y fue restada de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo se calculó mediante la división de la MFI restada del fondo de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante de 100.

En un experimento similar, se sometieron a ensayo los mismos anticuerpos de la cadena ligera común generados contra el Antígeno E para determinar su habilidad para bloquear la unión del Antígeno E a las perlas marcadas con el Ligando Y.

En resumen, el Ligando Y fue acoplado con amina a microesferas carboxiladas en una concentración de 20 µg/mL diluida en un tampón de MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente seguido por la desactivación de perlas con 1 M Tris pH 8, y a continuación lavado en PBS con Tween-20 al 0,05% (v/v). Las perlas se bloquearon entonces con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 2% (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa filtrante de 96 pocillos, se diluyeron los sobrenadantes que contenían anticuerpos de la cadena ligera común específicos del Antígeno E, en una relación 1:15 en solución tampón. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante mock con los mismos componentes de los medios que para el sobrenadante del anticuerpo. Se añadieron perlas marcadas con antígeno E a los sobrenadantes y se incubaron durante la noche a 4°C. Se añadió un Antígeno EmmH biotinilado a una concentración final de 0,42 nM y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Las perlas marcadas con el Ligando Y se añadieron a continuación a la mezcla de anticuerpo/antígeno y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La detección del Antígeno E-mmH biotinilado enlazado al Ligando Y se determinó con R-Ficoeritrina conjugada con Estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD), seguido por la medición en un analizador LUMINEX™ basado en citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia (MFI) de fondo de una muestra sin el Antígeno E fue restada de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo se calculó mediante la división de la MFI restada del fondo de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante de 100.

Las Tablas 7 y 8 muestran el porcentaje de bloqueo para todos los 98 anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común sometidos a prueba en ambos ensayos con LUMINEX™. ND: no determinado bajo las actuales condiciones experimentales.

Tabla 7

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5		
Anticuerpo	% de Bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
2948	81,1	47,8
2948G	38,6	ND
2949	97,6	78,8

Tabla 7 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5		
Anticuerpo	% de Bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
2949G	97,1	73,7
2950	96,2	81,9
2950G	89,8	31,4
2952	96,1	74,3
2952G	93,5	39,9
2954	93,7	70,1
2954G	91,7	30,1
2955	75,8	30,0
2955G	71,8	ND
2964	92,1	31,4
2964G	94,6	43,0
2978	98,0	95,1
2978G	13,9	94,1
2982	92,8	78,5
2982G	41,9	52,4
2985	39,5	31,2
2985G	2,0	5,0
2987	81,7	67,8
2987G	26,6	29,3
2996	87,3	55,3
2996G	95,9	38,4
2997	93,4	70,6
2997G	9,7	7,5
3004	79,0	48,4
3004G	60,3	40,7
3005	97,4	93,5
3005G	77,5	75,6
3010	98,0	82,6
3010G	97,9	81,0
3011	87,4	42,8
3011G	83,5	41,7
3012	91,0	60,8
3012G	52,4	16,8
3013	80,3	65,8
3013G 1	7,5	15,4

Tabla 7 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5		
Anticuerpo	% de Bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
3014	63,4	20,7
3014G	74,4	28,5
3015	89,1	55,7
3015G	58,8	17,3
3016	97,1	81,6
3016G	93,1	66,4
3017	94,8	70,2
3017G	87,9	40,8
3018	85,4	54,0
3018G	26,1	12,7
3019	99,3	92,4
3019G	99,3	88,1
3020	96,7	90,3
3020G	85,2	41,5
3021	74,5	26,1
3021G	81,1	27,4
3022	65,2	17,6
3022G	67,2	9,1
3023	71,4	28,5
3023G	73,8	29,7
3024	73,9	32,6
3024G	89,0	10,0
3025	70,7	15,6
3025G	76,7	24,3
3027	96,2	61,6
3027G	98,6	75,3
3028	92,4	29,0
3028G	87,3	28,8
3030	6,0	10,6
3030G	41,3	14,2
3032	76,5	31,4
3032G	17,7	11,0
3033	98,2	86,1
3033G	93,6	64,0
3036	74,7	32,7

Tabla 7 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5		
Anticuerpo	% de Bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
3036G	90,1	51,2
3041	95,3	75,9
3041G	92,4	51,6
3042	88,1	73,3
3042G	60,9	25,2
3043	90,8	65,8
3043G	92,8	60,3

Tabla 8

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ3-20Jκ1		
Anticuerpo	% de Bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
2968	97,1	73,3
2968G	67,1	14,6
2969	51,7	20,3
2969G	37,2	16,5
2970	92,2	34,2
2970G	92,7	27,2
2971	23,4	11,6
2971G	18,8	18,9
2972	67,1	38,8
2972G	64,5	39,2
2973	77,7	27,0
2973G	51,1	20,7
2974	57,8	12,4
2974G	69,9	17,6
2975	49,4	18,2
2975G	32,0	19,5
2976	1,0	1,0
2976G	50,4	20,4

En el primer experimento con LUMINEX™ descrito anteriormente, 80 anticuerpos de la cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 modificada por ingeniería genética, se sometieron a ensayo para determinar su habilidad para bloquear la unión del Ligando Y a perlas marcadas con el Antígeno E. De estos 80 anticuerpos de la cadena ligera común, 68 demostraron un bloqueo de >50%, mientras que 12 demostraron un bloqueo de <50% (6 un bloqueo de un 25-50% y 6 un bloqueo de <25%). Para los 18 anticuerpos de la cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 modificada por ingeniería genética, 12 demostraron un bloqueo de >50%, mientras que 6 demostraron un bloqueo de <50% (3 un bloqueo del 25-50% y 3 un bloqueo de <25%) de la unión del Ligando Y a las perlas marcadas con el Antígeno E.

En el segundo experimento con LUMINEX™ descrito anteriormente, los mismos 80 anticuerpos de la cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 modificada por ingeniería genética, se sometieron a ensayo para determinar su habilidad para bloquear la unión del Antígeno E a perlas marcadas con el Ligando Y. De estos 80 anticuerpos de la cadena ligera común, 36 demostraron un bloqueo de >50%, mientras que 44 demostraron un bloqueo de <50% (27 un bloqueo de un 25-50% y 17 un bloqueo de <25%). Para los 18 anticuerpos de la cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 modificada por ingeniería genética, 1 demostró un bloqueo de >50%, mientras que 17 demostraron un bloqueo de <50% (5 un bloqueo del 25-50% y 12 un bloqueo de <25%) de la unión del Antígeno E a las perlas marcadas con el Ligando Y.

Los datos de las Tablas 7 y 8 establecen que los reordenamientos descritos en las Tablas 5 y 6 generaron anticuerpos anti-Antígeno E específicos de la cadena ligera común que bloquearon la unión del Ligando Y a su receptor análogo el Antígeno E, con diversos grados de eficacia, lo que es compatible con los anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común de las Tablas 5 y 6 que comprenden anticuerpos con especificidad del epítopo con solapamiento y sin solapamiento con respecto al Antígeno E.

Ejemplo 8

Determinación de la habilidad de bloqueo de anticuerpos de la cadena ligera común específicos del antígeno mediante ELISA

Los anticuerpos de la cadena ligera común humana generados contra el Antígeno E se sometieron a ensayo para determinar su habilidad para bloquear la unión del Antígeno E a una superficie recubierta con un Ligando Y en un ensayo ELISA.

Se recubrió Ligando Y sobre placas de 96 pocillos en una concentración de 2 µg/mL diluido en PBS y se incubó durante la noche, seguido por un lavado cuatro veces en PBS con Tween-20 al 0,05%. La placa se bloqueó entonces con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 0,5% (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) durante una hora a temperatura ambiente. En una placa separada, se diluyeron sobrenadantes que contenían anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común en una relación de 1:10 en solución tampón. Se utilizó un sobrenadante mock con los mismos componentes de los anticuerpos como control negativo. Se añadió Antígeno E-mmH (descrito anteriormente) a una concentración final de 0,150 nM y se incubó a temperatura ambiente. La mezcla de anticuerpo/antígeno E-mmH se añadió a continuación a la placa que contenía el Ligando Y, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La detección del Antígeno E-mmH enlazado al Ligando Y se determinó con peroxidasa de rábano (HRP) conjugada a un anticuerpo anti-Penta-His (Qiagen, Valencia, CA) y se desarrolló mediante respuesta colorimétrica utilizando sustrato tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Jose, CA) neutralizado por ácido sulfúrico. Se leyó la absorbancia en OD450 durante 0,1 sec. La absorbancia de una muestra sin Antígeno E se restó de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo fue calculado mediante división de la MFI restada del fondo de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante de 100.

Las Tablas 9 y 10 muestran el porcentaje de bloqueo durante todos los 98 anticuerpos de la cadena ligera sometidos a prueba en el ensayo ELISA. ND: no determinado bajo las actuales condiciones experimentales.

Tabla 9

Anticuerpos de cadena ligera común V_κ1-39J_κ5			
Anticuerpo	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución	Anticuerpo	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
2948	21,8	3015	23,7
2948G	22,9	3015G	10,2
2949	79,5	3016	78,1
2949G	71,5	3016G	37,4
2950	80,4	3017	61,6
2950G	30,9	3017G	25,2
2952	66,9	3018	40,6

Tabla 9 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común $V_{\kappa}1$-39$J_{\kappa}5$			
Anticuerpo	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución	Anticuerpo	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
2952G	47,3	3018G	14,5
2954	55,9	3019	94,6
2954G	44,7	3019G	92,3
2955	12,1	3020	80,8
2955G	25,6	3020G	ND
2964	34,8	3021	7,6
2964G	47,7	3021G	20,7
2978	90,0	3022	2,4
2978G	90,2	3022G	15,0
2982	59,0	3023	9,1
2982G	20,4	3023G	19,2
2985	10,5	3024	7,5
2985G	ND	3024G	15,2
2987	31,4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13,9
2996	29,3	3027	61,4
2996G	ND	3027G	82,7
2997	48,7	3028	40,3
2997G	ND	3028G	12,3
3004	16,7	3030	ND
3004G	3,5	3030G	9,5
3005	87,2	3032	ND
3005G	54,3	3032G	13,1
3010	74,5	3033	77,1
3010G	84,6	3033G	32,9
3011	19,4	3036	17,6
3011G	ND	3036G	24,6
3012	45,0	3041	59,3
3012G	12,6	3041G	30,7
3013	39,0	3042	39,9
3013G	9,6	3042G	16,1
3014	5,2	3043	57,4
3014G	17,1	3043G	46,1

Tabla 10

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ3-20Jκ1			
Anticuerpo	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución	Anticuerpo	% de Bloqueo de Antígeno E en Solución
2968	68,9	2972G	35,7
2968G	15,2	2973	20,7
2969	10,1	2973G	23,1
2969G	23,6	2974	ND
2970	34,3	2974G	22,0
2970G	41,3	2975	8,7
2971	6,3	2975G	19,2
2971 G	27,1	2976	4,6
2972	9,6	2976G	26,7

Según se describe en este Ejemplo, de los 80 anticuerpos de la cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 modificada por ingeniería genética, se sometieron a ensayo para determinar su habilidad para bloquear la unión del Antígeno E a una superficie recubierta con el Ligando Y, 22 demostraron un bloqueo de >50%, mientras que 58 demostraron un bloqueo de <50% (20 un bloqueo de un 25-50% y 38 un bloqueo de <25%). Para los 18 anticuerpos de la cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 modificada por ingeniería genética, uno demostró un bloqueo de >50%, mientras que 17 demostraron un bloqueo de <50% (5 un bloqueo del 25-50% y 12 un bloqueo de <25%) de la unión del Antígeno E a una superficie recubierta con el Ligando Y.

Estos resultados son compatibles también con el conjunto de anticuerpos de la cadena ligera común específicos del Antígeno E que comprende anticuerpos con especificidad del epítopo con solapamiento o sin solapamiento con respecto al Antígeno E.

Ejemplo 9

Determinación de afinidad con BIACORE™ de anticuerpos de la cadena ligera común específicos del antígeno

Se determinaron las constantes de disociación de equilibrio (K_D) para sobrenadantes de anticuerpos seleccionados mediante SPR (Resonancia de plasmones de superficie) utilizando un instrumento BIACORE™ T100 (GE Healthcare). Todos los datos fueron obtenidos utilizando HBS-EP (10mM Hepes, 150mM NaCl, 0,3mM EDTA, 0,05% de tensioactivo P20, pH 7,4) tanto como tampón de migración como tampón de carga, a 25°C. Los anticuerpos fueron capturados a partir de muestras de sobrenadante crudo en la superficie de un chip sensor CM5 previamente derivada con anticuerpos con anticuerpos Fc anti-humanos de alta densidad utilizando química de acoplamiento con amina estándar. Durante la etapa de captura, los sobrenadantes fueron inyectados a través de la superficie Fc anti-humana a una tasa de flujo de 3 µL/min, durante un total de 3 minutos. A la etapa de captura le siguió una inyección de o bien tampón de migración o bien analito, a una concentración de 100 nM durante 2 minutos, a una tasa de flujo de 35 µL/min. La disociación del antígeno a partir del anticuerpo capturado fue monitorizada durante 6 minutos. El anticuerpo capturado fue eliminado mediante una breve inyección de 10 mM de glicina, pH 1,5. Todos los sensogramas se referenciaron dos veces sustrayendo los sensogramas de las inyecciones de tampón de los sensogramas del analito, eliminando de ese modo artefactos causados por la disociación del anticuerpo de la superficie de captura. Los datos de unión para cada anticuerpo se ajustó a un modelo en una relación 1:1 con transporte de masa utilizando el software BIAcore T100 Evaluation software v2.1. Los resultados se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Anticuerpo	100 nM de Antígeno E		Anticuerpo	100 nM de Antígeno E	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)		K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)
2948	8,83	28	3015	29,1	11
2948G	95,0	1	3015G	65,9	0
2949	3,57	18	3016	4,99	17
2949G	6,37	9	3016G	18,9	4
2950	4,91	17	3017	9,83	8
2950G	13,6	5	3017G	55,4	2
2952	6,25	7	3018	11,3	36
2952G	7,16	4	3018G	32,5	3
2954	2,37	24	3019	1,54	59
2954G	5,30	9	3019G	2,29	42
2955	14,4	6	3020	5,41	39
2955G	12,0	4	3020G	41,9	6
2964	14,8	6	3021	50,1	6
2964G	13,0	9	3021G	26,8	4
2978	1,91	49	3022	25,7	17
2978G	1,80	58	3022G	20,8	12
2982	6,41	19	3023	263	9
2982G	16,3	9	3023G	103	5
2985	64,4	9	3024	58,8	7
2985G	2,44	8	3024G	7,09	10
2987	21,0	11	3025	35,2	6
2987G	37,6	4	3025G	42,5	8
2996	10,8	9	3027	7,15	6
2996G	24,0	2	3027G	4,24	18
2997	7,75	19	3028	6,89	37
2997G	151	1	3028G	7,23	22
3004	46,5	14	3030	46,2	7
3004G	1,93	91	3030G	128	3
3005	2,35	108	3032	53,2	9
3005G	6,96	27	3032G	13,0	1
3010	4,13	26	3033	4,61	17
3010G	2,10	49	3033G	12,0	5

Tabla 11 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Anticuerpo	100 nM de Antígeno E		Anticuerpo	100 nM de Antígeno E	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)		K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)
3011	59,1	5	3036	284	12
3011G	41,7	5	3036G	18,2	10
3012	9,71	20	3041	6,90	12
3012G	89,9	2	3041G	22,9	2
3013	20,2	20	3042	9,46	34
3013G	13,2	4	3042G	85,5	3
3014	213	4	3043	9,26	29
3014G	36,8	3	3043G	13,1	22

Tabla 12

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ3-20Jκ1					
Anticuerpo	100 nM de Antígeno E		Anticuerpo	100 nM de Antígeno E	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)		K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)
2968	5,50	8	2973	5,35	39
2968G	305	0	2973G	11,0	44
2969	34,9	2	2974	256	0
2969G	181	1	2974G	138	0
2970G	12,3	3	2975	38,0	2
2971G	32,8	22	2975G	134	1
2972	6,02	13	2976	6,73	10
2972G	74,6	26	2976G	656	8

Las afinidades de unión de los anticuerpos de la cadena ligera común que comprenden los reordenamientos mostrados en las Tablas 5 y 6 varían, donde prácticamente todos muestran una K_D en el rango nanomolar. Los datos de afinidad son compatibles con los anticuerpos de la cadena ligera común que son el resultado de la asociación combinatoria de dominios variables reordenados descritos en las Tablas 5 y 6 que son de alta afinidad, seleccionados clonalmente, y somáticamente mutados. Acoplados a los datos mostrados previamente, los anticuerpos de la cadena ligera común descritos en las Tablas 5 y 6 comprenden una colección de diversos anticuerpos de alta afinidad que muestra la especificidad para uno o más epítopos en el Antígeno E.

Ejemplo 10

La determinación de las especificidades de unión de los anticuerpos de la cadena ligera común específicos del antígeno mediante ensayo con LUMINEX™

Se sometieron a ensayo anticuerpos anti-antígeno E de la cadena ligera común para determinar su habilidad para unirse al ECD del Antígeno E y a las variantes del ECD del Antígeno E, incluyendo el ortólogo del mono cynomolgus (*Mf* Antígeno E), que difiere de la proteína humana en aproximadamente un 10% de sus residuos de aminoácidos; un mutante de deleción del Antígeno E carece los últimos 10 aminoácidos del extremo C-terminal del ECD (Antígeno

E-ΔCT); y dos mutantes que contienen una sustitución de alanina en presuntas localizaciones de la interacción con el Ligando Y (Antígeno E-Ala1 y Antígeno E-Ala2). Las proteínas del Antígeno E fueron producidas en células CHO y cada una contenía una etiqueta myc-myc-His C-terminal.

Para los estudios de unión, se capturó una proteína ECD del Antígeno E o proteína variante (descrita anteriormente) de 1 mL de medio de cultivo mediante incubación durante 2 hr a temperatura ambiente con 1 x 10^8 perlas de microesferas (LUMINEX™) recubiertas covalentemente con un anticuerpo monoclonal anti-myc (MAb 9E10, línea celular de hibridoma CRL-1729™; ATCC, Manassas, VA). Las perlas se lavaron entonces con PBS antes de su uso. Los sobrenadantes que contenían anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común fueron diluidos en una relación de 1:4 en una solución tampón y se añadieron a placas filtrantes de 96 pocillos. Se utilizó un sobrenadante mock sin ningún anticuerpo como control negativo. Las perlas que contenían las proteínas de Antígeno E capturadas se añadieron entonces a las muestras de anticuerpo (3000 perlas por pocillo) y se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las perlas de muestra se lavaron, y el anticuerpo de la cadena ligera común enlazado se detectó con un anticuerpo anti-humano conjugado con R-ficoeritrina. La intensidad de fluorescencia de las perlas (aproximadamente 100 perlas contadas para cada muestra de anticuerpo que se une a cada proteína del Antígeno E), se midió con un analizador basado en citometría de flujo LUMINEX™, y se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI) para al menos 100 perlas contadas por interacción perla/anticuerpo. Los resultados se muestran en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Antígeno	Intensidad Media de Fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	*Mf* Antígeno E
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718

Tabla 13 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Antígeno	Intensidad Media de Fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	*Mf* Antígeno E
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173

Tabla 13 (continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Antígeno	Intensidad Media de Fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	*Mf* Antígeno E
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041 G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

Tabla 14

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ3-20Jκ1					
Antígeno	Intensidad Media de Fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	*Mf* Antígeno E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

Los sobrenadantes anti-Antígeno E del anticuerpo de la cadena ligera común mostraron una unión altamente específica a las perlas ligadas al Antígeno E-ECD. Para estas perlas, el sobrenadante mock de control negativo, dio como resultado una señal poco significativa (<10 MFI) cuando se combina con la muestra de perlas de Antígeno E-ECD, mientras que los sobrenadantes que contenían anticuerpos anti-Antígeno E de la línea ligera común mostraron una señal de unión fuerte (MFI media de 2627 para 98 sobrenadantes de anticuerpos; MFI > 500 para 91/98 muestras de anticuerpos).

Como medida de la habilidad de los anticuerpos anti-Antígeno E de la cadena ligera común seleccionados para identificar diferentes epítopos del ECD del Antígeno E, se determinó la unión relativa de los anticuerpos a las variantes. Todas las cuatro variantes del Antígeno E fueron capturadas para las perlas anti-myc LUMINEX™, según se ha descrito anteriormente para los estudios de unión del Antígeno E-ECD nativo, y se determinaron las relaciones de unión relativa ($MFI_{variante}/MFI_{Antígeno\ E\text{-}ECD}$). Para los 98 sobrenadantes de anticuerpos de la cadena ligera sometidos a ensayo que se muestran en las Tablas 12 y 13, las relaciones medias ($MFI_{variante}/MFI_{Antígeno\ E\text{-}ECD}$) fueron diferentes para cada variante, probablemente reflejando diferentes cantidades de captura de proteínas en las perlas (relaciones medias de 0,61, 2,9, 2.0, y 1,0 para el Antígeno E-ΔCT, para el Antígeno E-Ala1, para el Antígeno E-Ala2, y Mf Antígeno E, respectivamente). Para cada variante de proteína, la unión para un subgrupo de los 98 anticuerpos sometidos a ensayo de la cadena ligera mostró una unión muy reducida, indicando sensibilidad a la mutación que caracteriza una variante dada. Por ejemplo, 19 de las muestras de anticuerpos de la cadena ligera común enlazados al Mf Antígeno E con $MFI_{variante}/MFI_{Antígeno\ E\text{-}ECD}$ de <8%. Debido a que muchos en este grupo incluyen anticuerpos de afinidad elevada o moderadamente elevada (5 con una K_D < 5nM, 15 con K_D < 50 nM), es probable que la señal inferior para este grupo es el resultado de la sensibilidad a las diferencias de secuencias entre el Antígeno E-ECD nativo y una variante determinada más que de afinidades inferiores.

Estos datos establecen que los anticuerpos de la cadena ligera común descritos en las Tablas 5 y 6 representan un grupo diverso de anticuerpos de la cadena ligera común específicos del Antígeno E que reconocen específicamente más de un epítopo en el Antígeno E.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MONCK, Myrna A. WONG, Man Yi ZHANG, Kai

<120> FORMULACIONES CON VISCOSIDAD REDUCIDA

<130> PU64606

<150> 61/473,131
<151> 2011-04-07
<160> 2

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Heavy Chain of anti-IL5 mAb

<400> 1

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

```
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
Lys
```

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anti-IL5 mAb.

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Val His Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

REIVINDICACIONES

1. Ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio variable (V_L) de la cadena ligera humana obtenido de una secuencia Vκ39/Jκ5 humana que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece de un segmento génico Vκ endógeno de inmunoglobulina no reordenado y un segmento génico Jκ endógeno de inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio o dominios V_L humano está asociado a un dominio variable (V_H) de la cadena pesada obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4.

2. Ratón según la reivindicación 1, en donde:

(a) la secuencia Vκ39/Jκ5 humana está operativamente ligada a una secuencia de la región Cκ ratón;

(b) una secuencia que codifica el dominio V_H humano está operativamente ligado a una secuencia que codifica una secuencia de la región constante (C_H) de la cadena pesada de ratón seleccionada de entre una región C_H1, una región bisagra, una C_H2, una C_H3, o una combinación de las mismas; o

(c) el dominio V_H humano es expresado a partir de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina.

3. Ratón según la reivindicación 1, en donde todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vκ y Jκ de ratón son reemplazados por la secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada.

4. Ratón según la reivindicación 1, en donde la secuencia Vκ1-39/Jκ5 humana reordenada está operativamente ligada a una secuencia de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina seleccionada de entre una secuencia de ratón, rata o humana.

5. Ratón genéticamente modificado que comprende un linfocito B que expresa un dominio variable (V_L) de la cadena ligera humana obtenido a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada que está presente en la línea germinal del ratón, en donde el ratón carece un segmento génico endógeno Vκ de inmunoglobulina no reordenado y un segmento génico endógeno Jκ de inmunoglobulina no reordenado; y en donde el dominio o dominios V_L humano está asociado con un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

6. Ratón según la reivindicación 5, en donde:

(a) la secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana está operativamente ligada a una secuencia de la región Cκ de ratón;

(b) una secuencia que codifica el dominio V_H humano está operativamente ligado a una secuencia que codifica una secuencia de la región C_H de ratón seleccionada de entre C_H1, una región bisagra, una C_H2, una C_H3, o una combinación de las mismas; o

(c) el dominio V_H humano es expresado a partir de un locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina.

7. Ratón según la reivindicación 5, en donde todos o sustancialmente todos los segmentos génicos Vκ y Jκ de ratón son reemplazados por la secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada.

8. Ratón según la reivindicación 5, en donde la secuencia Vκ3-20/Jκ1 humana reordenada está operativamente ligada a una secuencia de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina seleccionada de entre una secuencia de ratón, rata o humana.

9. Ratón según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ratón comprende un locus de la cadena ligera lambda (λ) de inmunoglobulina no funcional.

10. Uso del ratón según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 9 en la elaboración de un anticuerpo que comprende un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4.

11. Uso según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

12. Uso del ratón según cualquiera de las reivindicaciones 5-9 en la elaboración de un anticuerpo que comprende un dominio variable (V_H) de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

13. Uso según la reivindicación 12, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 13, en donde la producción se realiza mediante un método que comprende los pasos de expresar los dominios variables de la cadena pesada humana en una única célula.

15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde las cadenas pesadas del anticuerpo son completamente humanas.

16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10, 11, 14, o 15, en donde las cadenas pesadas que comprenden los dominios variables de la cadena pesada se emparejan con una cadena ligera que comprende el dominio V_L humano obtenido a partir de una secuencia Vκ1-39/Jκ humana reordenada.

17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en donde las cadenas pesadas que comprenden los dominios variables de la cadena pesada se emparejan con una cadena ligera que comprende el dominio V_L humano obtenido a partir de una secuencia Vκ3-20/Jκ humana reordenada.

18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 10-17, en donde el dominio, o dominios, variable de la cadena pesada humana se seleccionan inmunizando el ratón con un antígeno de interés, determinando las secuencias de los dominios variables de la cadena pesada humana expresada por el ratón, y expresando las secuencias en la célula.

19. Método de producción de un anticuerpo para un antígeno de interés que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4 que comprende:

(a) inmunizar el ratón según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 con un antígeno de interés;

(b) obtener del ratón un dominio variable de la cadena pesada humana obtenida a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4; y

(c) emplear la secuencia de la región variable de inmunoglobulina obtenida en (b) en un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés.

20. Método de producción de un anticuerpo para un antígeno de interés que comprende un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4 que comprende:

(a) inmunizar el ratón según cualquiera de las reivindicaciones 5-8 con un antígeno de interés;

(b) obtener del ratón un dominio variable de la cadena pesada humana obtenido a partir de una región $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada de entre 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4; y

(c) emplear la secuencia de la región variable de inmunoglobulina obtenida en (b) en un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés.

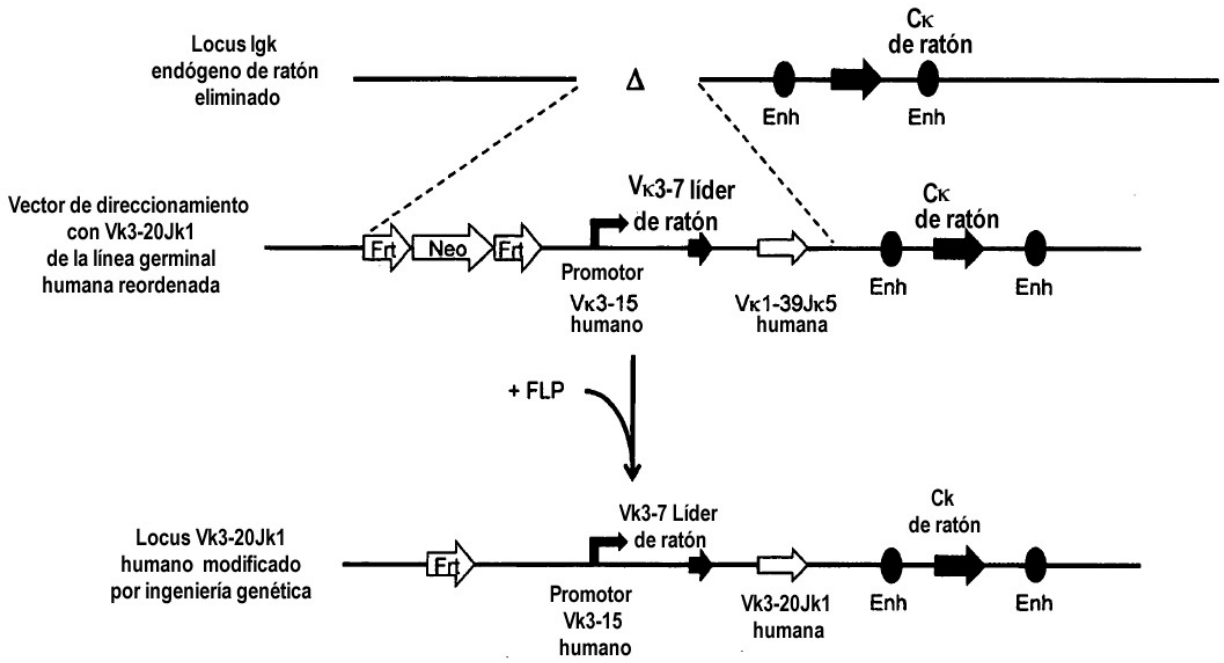
Locus Igk
endógeno de ratón
eliminado
Δ
Cκ
de ratón
Enh
Enh
Vector de direccionamiento
con Vk3-20Jk1
de la línea germinal
humana reordenada
Frt
Neo
Frt
Vκ3-7 líder
de ratón
Promotor
Vκ3-15
humano
Vκ1-39Jκ5
humana
Cκ
de ratón
Enh
Enh
+ FLP
Locus Vk3-20Jk1
humano modificado
por ingeniería genética
Frt
Vk3-7 Líder
de ratón
Promotor
Vk3-15
humano
Vk3-20Jk1
humana
Ck
de ratón
Enh
Enh

FIG. 1

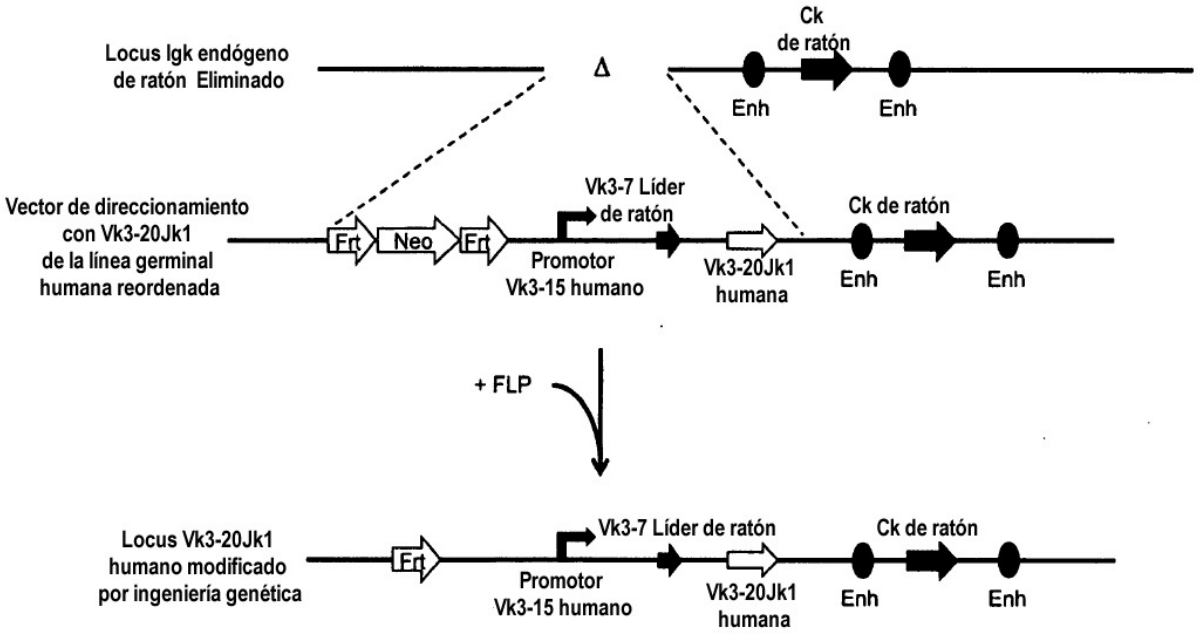
Locus Igk endógeno
de ratón Eliminado
Δ
Ck
de ratón
Enh
Enh
Vector de direccionamiento
con Vk3-20Jk1
de la línea germinal
humana reordenada
Frt
Neo
Frt
Vk3-7 Líder
de ratón
Promotor
Vk3-15 humano
Vk3-20Jk1
humana
Ck de ratón
Enh
Enh
+ FLP
Locus Vk3-20Jk1
humano modificado
por ingeniería genética
Frt
Vk3-7 Líder de ratón
Promotor
Vk3-15 humano
Vk3-20Jk1
humana
Ck de ratón
Enh
Enh

FIG. 2

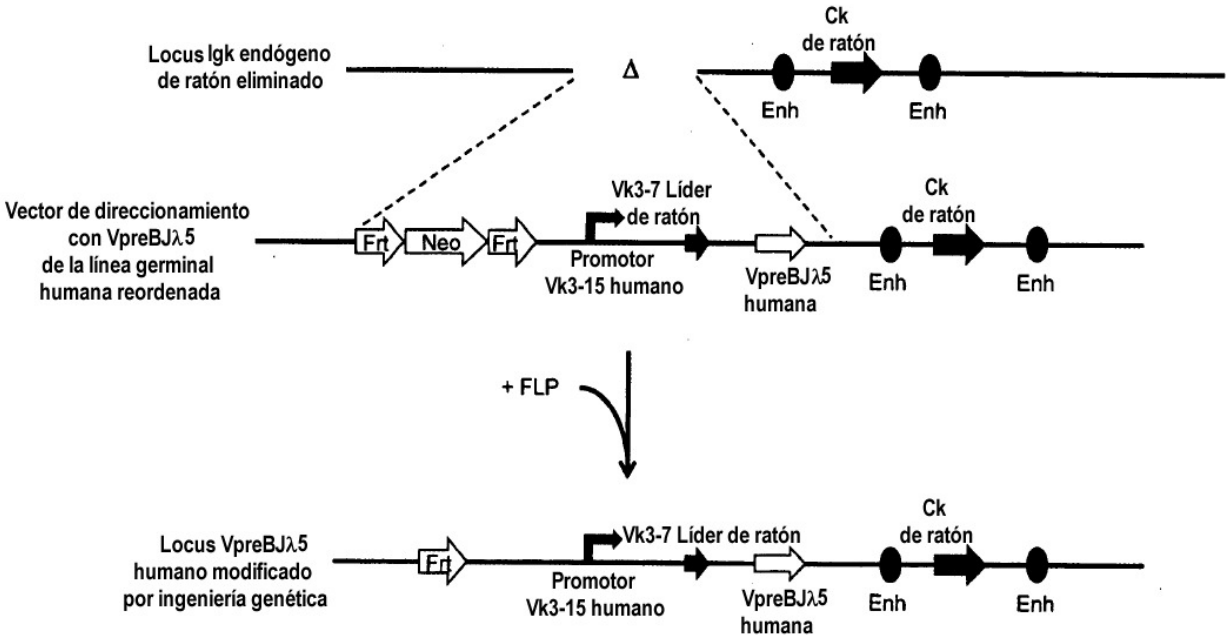
Locus Igk endógeno
de ratón eliminado
Δ
Ck
de ratón
Enh
Enh
Vector de direccionamiento
con VpreBJλ5
de la línea germinal
humana reordenada
Frt
Neo
Frt
Vk3-7 Líder
de ratón
Promotor
Vk3-15 humano
VpreBJλ5
humana
Ck
de ratón
Enh
Enh
+ FLP
Locus VpreBJλ5
humano modificado
por ingeniería genética
Frt
Vk3-7 Líder de ratón
Promotor
Vk3-15 humano
VpreBJλ5
humana
Ck
de ratón
Enh
Enh

FIG. 3

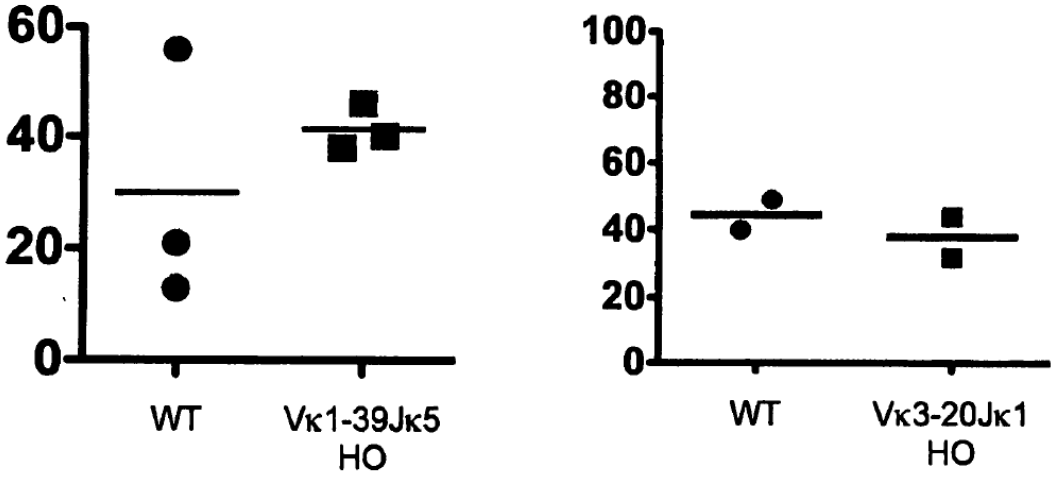

FIG. 4

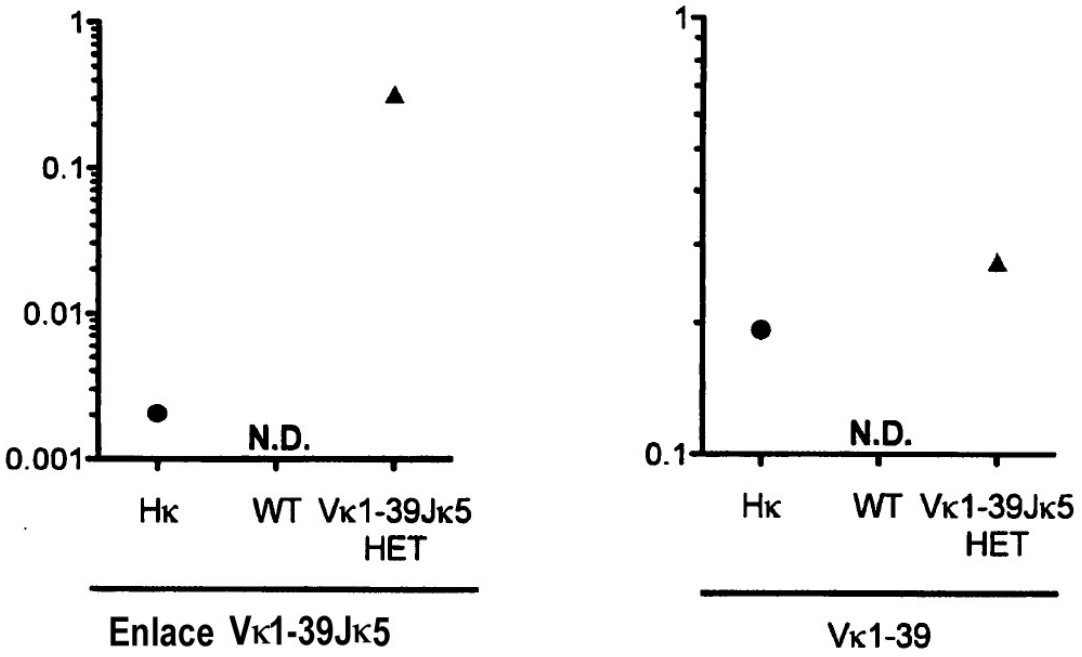
1
0.1
0.01
0.001
N.D.
Hκ
WT
Vκ1-39Jκ5
HET
Enlace Vκ1-39Jκ5
1
0.1
N.D.
Hκ
WT
Vκ1-39Jκ5
HET
Vκ1-39

FIG. 5A

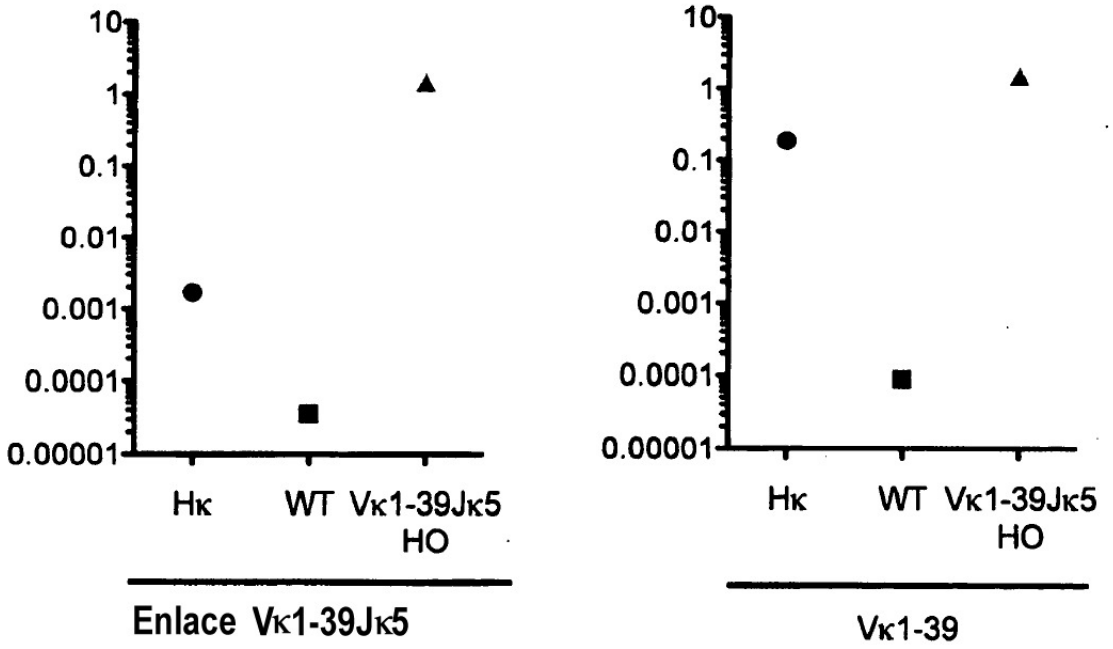
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
Hκ
WT
Vκ1-39Jκ5 HO
Enlace Vκ1-39Jκ5
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
Hκ
WT
Vκ1-39Jκ5 HO
Vκ1-39

FIG. 5B

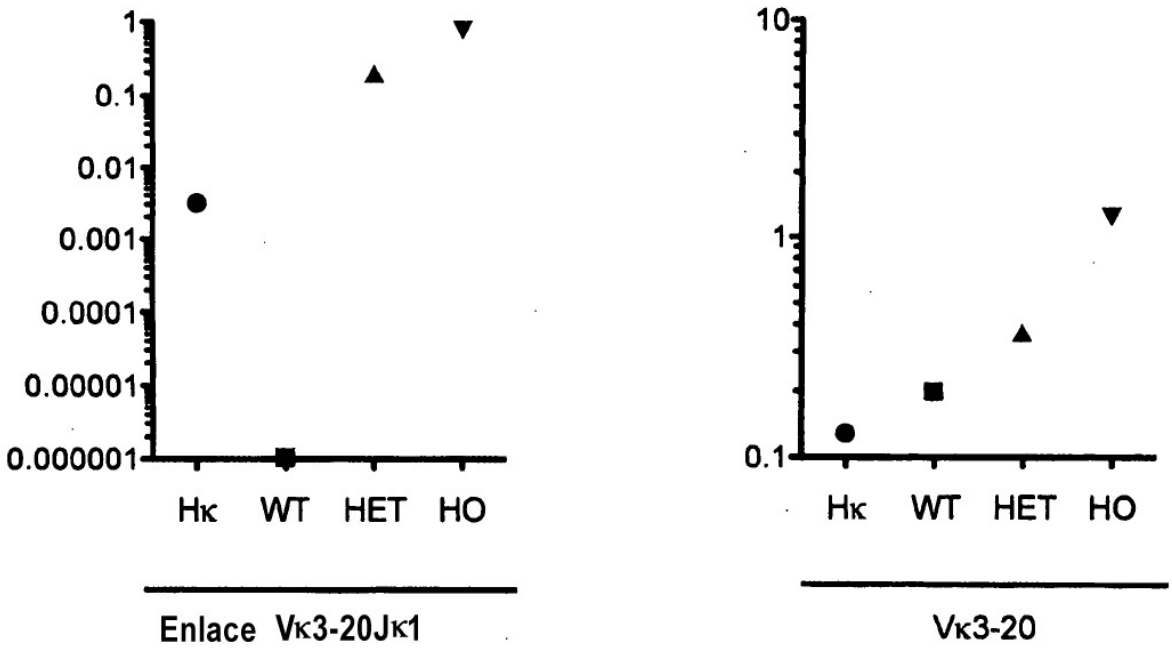
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
0.000001
Hκ
WT
HET
HO
Enlace Vκ3-20Jκ1
10
1
0.1
Hκ
WT
HET
HO
Vκ3-20

FIG. 5C

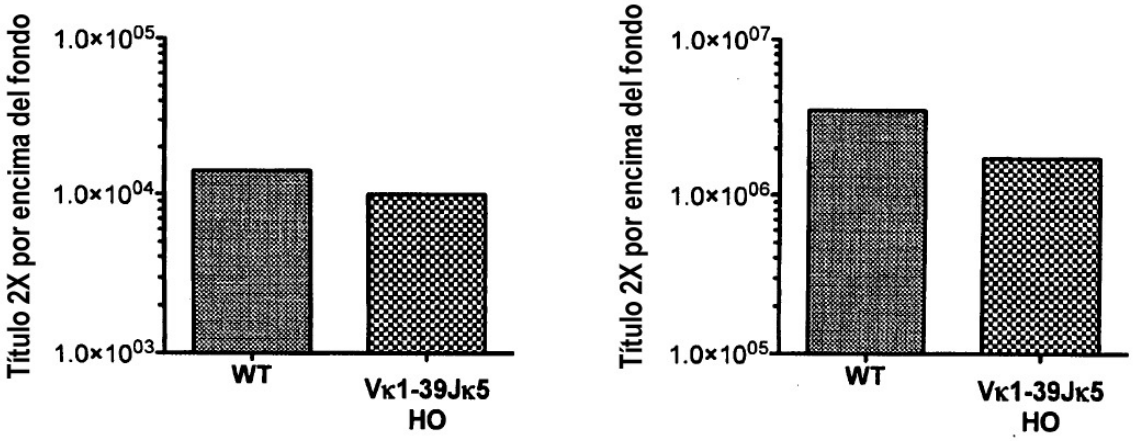
Título 2X por encima del fondo
1.0×10^05
1.0×10^04
1.0×10^03
WT
Vκ1-39Jκ5
HO
Título 2X por encima del fondo
1.0×10^07
1.0×10^06
1.0×10^05
WT
Vκ1-39Jκ5
HO

FIG. 6A

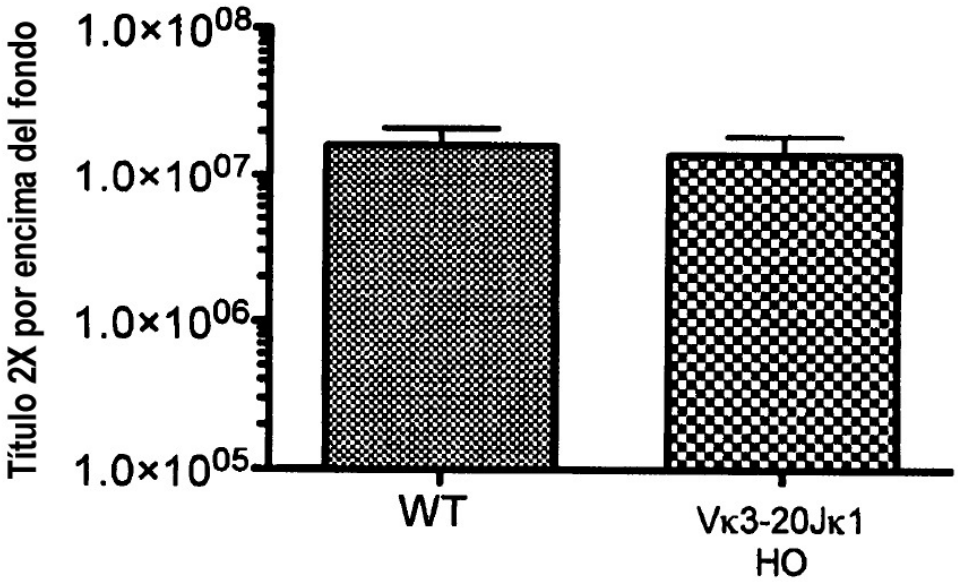
Título 2X por encima del fondo
1.0×10^08
1.0×10^07
1.0×10^06
1.0×10^05
WT
Vκ3-20Jκ1
HO

FIG. 6B