

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 559**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2011 E 12173456 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2505654**

54 Título: **Cadena ligera común de ratón**

30 Prioridad:

**08.02.2010 US 302282 P**

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

**28.02.2017**

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;  
MURPHY, ANDREW J. y  
BUCKLER, DAVID R.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 603 559 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**

Cadena ligera común de ratón

**5 Campo de la invención**

Se proporciona un ratón modificado genéticamente que expresa anticuerpos que tienen una cadena ligera variable de ser humano/constante de ratón común asociada con cadenas pesadas variables de ser humano/constantes de ratón distintas. Se proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico humano a partir de las secuencias genéticas de la región variable humana de células B del ratón.

**Antecedentes**

Los anticuerpos comprenden típicamente un componente de cadena pesada homodimérica, donde cada monómero de cadena pesada se asocia con una cadena ligera idéntica. Los anticuerpos que tienen un componente de cadena pesada heterodimérica (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) son deseables como anticuerpos terapéuticos. Pero producir anticuerpos que tengan un componente de cadena ligera adecuado que se pueda unir satisfactoriamente con cada una de las cadenas pesadas de un anticuerpo biespecífico resulta problemático.

En una estrategia, se puede seleccionar una cadena ligera supervisando las estadísticas de utilización de todos los dominios variables de cadena ligera, identificando la cadena ligera que más se utiliza en anticuerpos humanos, y emparejando esa cadena ligera in vitro con las dos cadenas pesadas de especificidad diferente.

En otra estrategia, se puede seleccionar una cadena ligera observando las secuencias de cadena ligera de una biblioteca de fagos de presentación (por ejemplo, una biblioteca de fagos de presentación que comprenden las secuencias de la región variable de cadena ligera humana, por ejemplo, una biblioteca de ScFV humanos) y seleccionando la región variable de cadena ligera más usada comúnmente de la biblioteca. Entonces, la cadena ligera se puede ensayar en las dos cadenas pesadas diferentes de interés.

En otra estrategia, se puede seleccionar una cadena ligera ensayando una biblioteca de fagos de presentación de secuencias variables de cadena ligera utilizando las secuencias variables de cadena pesada de ambas cadenas pesadas de interés como sondas. Se puede seleccionar na cadena ligera que se asocia con ambas secuencias variables de cadena pesada como cadena ligera para las cadenas pesadas.

En otra estrategia, una cadena ligera candidata se puede alinear con las cadenas ligeras equivalentes de las cadenas pesadas, y se hacen modificaciones en la cadena ligera para que coincida estrechamente en las características de secuencia comunes con las cadenas ligeras equivalentes de ambas cadenas pesadas. Si se necesita minimizar las probabilidades de inmunogenicidad, las modificaciones preferiblemente darán como resultado secuencias que están presentes en cadenas ligeras humanas conocidas, de forma que sea improbable que el proceso proteolítico genere un epítipo para células T en base a los parámetros y métodos conocidos en la técnica para evaluar la probabilidad de inmunogenicidad (es decir, en sílice así como en ensayos húmedos).

Todas las estrategias anteriores se basan en métodos in vitro que incluye una serie de limitaciones a priori, por ejemplo, la identidad de secuencia, la capacidad para asociarse con cadenas pesadas específicas pre-seleccionadas, etc. Existe la necesidad en la técnica de composiciones y métodos que no se basen en la manipulación de las condiciones in vitro, sino que en su lugar emplee estrategias biológicamente más sensibles para producir proteínas de unión a epítipos humanos que incluyan una cadena ligera común.

**Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 ilustra una estrategia de dirección para reemplazar segmentos genéticos de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón con un gen de la región Vk1-39Jk5 humano.

La FIG. 2 ilustra una estrategia de dirección para reemplazar segmentos genéticos de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón con un gen de la región Vk3-20Jk1 humano.

La FIG. 3 ilustra una estrategia de dirección para reemplazar segmentos genéticos de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón con un gen de la región VpreB/Jλ5 humano.

**Sumario**

Se proporcionan ratones modificados genéticamente que expresan dominios humanos variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, donde los ratones tienen un repertorio variable de cadena ligera limitado. En particular, un ratón modificado genéticamente que expresa los dominios humanos variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, donde los dominios humanos variables de cadena ligera se expresan a partir de la secuencia genética humana de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL/JL) reordenada sencilla presente en la línea germinal del ratón que comprende una secuencia de la línea germinal de un segmento genético de una VL y una secuencia germinal del segmento genético de JL, estando dicha región variable de cadena ligera de

inmunoglobulina humana una Vk1-39/Jk, donde:

(a) el ratón carece de un locus de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina κ endógena de ratón que es capaz de reordenarse y formar un gen que codifica una región variable κ de ratón;

(b) el ratón expresa una cadena ligera de inmunoglobulina humana común para una pluralidad de cadenas pesadas humanas, la cadena ligera común que deriva de dicha secuencia del gen de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana.

(c) el ratón comprende una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de interés donde el anticuerpo que comprende dicha cadena ligera común, y cadena pesada derivada de una disposición de segmentos genéticos variables de cadena pesada (VH) de inmunoglobulina humana que se seleccionan de entre el grupo que consiste en los segmentos genéticos VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-59, y VH5-51; y

(d) un 90-100 % de los segmentos genéticos de ratón VH endógenos reordenados del ratón se han sustituido con una pluralidad de segmentos genéticos NH humanos no ordenados.

Además se proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a un antígeno de interés que comprende la inmunización del ratón proporcionado con el antígeno de interés y empleando una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina humana del ratón para producir el anticuerpo. También se proporciona el uso del ratón proporcionado para producir un anticuerpo. Adicionalmente se proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico humano donde el método comprende obtener secuencias genéticas de la región variable de inmunoglobulina humana de células B del ratón proporcionado y produciendo el anticuerpo con dichas secuencias.

Adicionalmente se proporciona el uso del ratón proporcionado para producir una célula que expresa un anticuerpo biespecífico humano, donde las secuencias de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo biespecífico humano se expresan de las secuencias genéticas de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana obtenidas de las células B del ratón.

También se proporciona el uso del ratón proporcionado para identificar un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana presente en una cadena pesada de inmunoglobulina que se asocia con la única cadena ligera.

También se hace referencia a un sistema biológico para generar un dominio variable humano de cadena ligera que se asocia y expresa con un repertorio diverso de dominios variables de cadena pesada humanos maduros de afinidad. También se hace referencia a métodos para producir proteínas de unión que comprenden dominios variables de inmunoglobulina, que comprenden la inmunización de ratones que tienen un repertorio de cadena ligera de inmunoglobulina limitado con un antígeno de interés, y el empleo de una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina del ratón en una proteína de unión que se une específicamente al antígeno de interés. Los métodos incluyen métodos para producir dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humanos adecuados para su uso en la producción de proteínas de unión al antígeno multiespecífico.

Los ratones modificados genéticamente que se proporcionan pueden seleccionar dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humanos maduros de afinidad derivados de un repertorio de segmentos genéticos de la región variable de cadena pesada humanos sin reordenar, donde los dominios variables de cadena pesada humanos maduros de afinidad se asocian expresan con un único dominio de cadena ligera humano derivado de un segmento genético de región variable de cadena ligera humana.

Los ratones modificados genéticamente que se proporcionan expresan un único dominio variable de cadena ligera humana, a partir de un único segmento genético de la región variable de cadena ligera humano.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende un único segmento genético de la región variable (VL) de cadena ligera de inmunoglobulina humana que es capaz de reordenar y codificar un dominio VL humano de una cadena ligera de inmunoglobulina. En otro caso, el ratón no comprende más de dos segmentos genéticos VL humanos que son capaces de reordenar y codificar un dominio VL humano de una cadena ligera de inmunoglobulina.

El ratón modificado genéticamente que se proporciona comprende un único segmento de la región variable (VL) de cadena ligera de inmunoglobulina humana (V/J) reordenado (es decir, un segmento V/J) que codifica un dominio VL humano de cadena ligera de inmunoglobulina.

En una realización, el segmento genético VL es un es un segmento genético Vk1-39Jk5 humano.

En una realización, el segmento genético VL humano está unido operativamente a una secuencia líder humana o de ratón. En una realización, la secuencia es una secuencia líder de ratón. En una secuencia específica, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder Vk3-7 de ratón.

En una realización, el segmento genético está unido operativamente a una secuencia promotora de inmunoglobulina. En una realización, la secuencia promotora es una secuencia promotora humana. En una realización específica, el promotor humano de inmunoglobulina es un promotor V $\kappa$ 3-15.

5 También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende un locus que no comprende un segmento genético VL endógeno de ratón que sea capaz de reordenarse para formar un gen de cadena ligera de inmunoglobulina, donde el locus VL comprende un único segmento genético VL humano que es capaz de reordenarse para codificar una región VL de un gen de cadena ligera. En un caso específico, el segmento genético VL humano es un segmento genético V $\kappa$ 1-39J $\kappa$ 5 humano.

10 En una realización, el locus VL comprende una secuencia líder flanqueada 5' (con respecto a la dirección transcripcional del segmento genético VL) por un promotor humano de inmunoglobulina y flanqueada 3' por un segmento genético VL humano que se reordena y codifica un dominio VL de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante de cadena ligera (CL) endógena de ratón. En una realización específica, el segmento genético VL está en el locus VL kappa ( $\kappa$ ) de ratón, y la CL de ratón es una CL  $\kappa$  de ratón.

15 En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina lambda ( $\lambda$ ) no funcional. En una realización específica, el locus  $\lambda$  comprende una eliminación de una o más secuencias del locus, donde la una o más eliminaciones hacen que el locus  $\lambda$  sea incapaz de reordenarse para formar un gen de cadena ligera. En otra realización todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos del locus  $\lambda$  se han eliminado.

En una realización, el locus VL del ratón modificado genéticamente es un locus  $\kappa$ , y el locus  $\kappa$  comprende un amplificador intrónico  $\kappa$  de ratón, un amplificador 3'  $\kappa$  de ratón, o ambos, el amplificador intrónico y el amplificador 3'.

25 En una realización, el ratón produce una cadena ligera que comprende un dominio VL somáticamente mutado derivado del segmento genético VL humano. En una realización, la cadena ligera comprende un dominio VL mutado somáticamente derivado del segmento genético VL humano, y una región CL  $\kappa$  de ratón. En una realización, el ratón no expresa una cadena ligera  $\lambda$ .

30 En una realización, el ratón modificado genéticamente es capaz de hipermutar somáticamente la secuencia de la región VL humana.

En una realización, el ratón comprende una célula que expresa una cadena ligera que comprende un dominio VL humano mutado somáticamente unido a una CL  $\kappa$  de ratón, donde la cadena ligera se asocia con una cadena pesada que comprende un dominio VH mutado somáticamente derivado de un segmento genético VH humano y donde la cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada (CH) de ratón.

35 En el ratón que se proporciona el 90-100 % de los segmentos genéticos VH endógenos de ratón no reordenados de ratón se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos no reordenados. El ratón puede comprender una sustitución de los segmentos genéticos VH endógenos de ratón con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos, donde los segmentos genéticos humanos están unidos operativamente al gen de la región CH de ratón, de manera que el ratón reordena los segmentos VH humanos y expresa una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio VH humano y un CH de ratón. En una realización específica todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos VH de ratón se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos no reordenados. En una realización, la sustitución es con al menos 19, al menos 39, o al menos 80 u 81 segmentos genéticos VH humanos no reordenados. En una realización, la sustitución es con al menos 12 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende una sustitución de todos los segmentos D y J de ratón con al menos un segmento D humano no reordenado y al menos un segmento J humano no reordenado. En una realización, el al menos un segmento D humano no reordenado se selecciona de entre D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, D7-27, y una combinación de los mismos. En una realización, el al menos un segmento J humano no reordenado se selecciona de entre J1, J3, J4, J5, J6, y una combinación de los mismos. En una realización específica el uno o más segmentos genéticos VH humanos se seleccionan de entre un segmento genético humano 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, y una combinación de los mismos.

40 El ratón proporcionado comprende una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés, donde el anticuerpo comprende dicha cadena ligera común y una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de un reordenamiento de segmentos genéticos variables (VH) de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un segmento genético VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-59, and VH5-51. En una realización, el ratón comprende una célula B que expresa una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno de interés, donde la proteína de unión comprende una cadena ligera derivada de un reordenamiento V $\kappa$ 1-39/J $\kappa$ 5 humano, y donde la célula comprende un gen de cadena pesada de inmunoglobulina reordenado derivado de un reordenamiento de segmentos genéticos humanos que se seleccionan de entre los segmentos genéticos VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH 4-39, VH4-59, y VH5-51. En una realización, el uno o más

segmentos genéticos VH humanos están reordenados con un segmento genético J humano de cadena pesada que se selecciona de entre J1, J3, J4, J5, y J6. En una realización, el uno o más segmentos genéticos J y VH humanos están reordenados con un segmento genético D humano que se selecciona de entre D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, y D7-27. En una realización específica, el gen de cadena ligera tiene 1, 2, 3, 4, o 5 o más hipermutaciones somáticas.

En una realización, el ratón comprende una célula B que comprende una secuencia genética de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina reordenada que comprende un segmento genético VH, JH y DH que se selecciona de entre VH 2-5 + JH1 + D6-6, VH3-23 + JH4 + D3, VH3-23 + JH4 + D3-10, VH3-30 + JH1 + D6-6, VH3-30 + JH3 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D1-7, VH3-30 + JH4 + D5-12, VH3-30 + JH4 + D6-13, VH3-30 + JH4 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D7-27, VH3-30 + JH5 + D3-22, VH3-30 + JH5 + D6-6, VH3-30 + JH5 + D7-27, VH4-39 + JH3 + D1-26, VH4-59 + JH3 + D3-16, VH4-59 + JH3 + D3-22, VH4-59 + JH4 + D3-16, VH5-51 + JH3 + D5-5, VH5-51 + JH5 + D6-13, y VH5-51 + JH6 + D3-16. En una realización específica, la célula B expresa una proteína de unión que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de cadena pesada de ratón, y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de cadena ligera de ratón.

En una realización, el segmento genético VL humano es un segmento genético Vk1-39Jk5 humano, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio VL derivado del segmento genético VL humano y (ii) una CL de ratón; donde la cadena ligera se asocia con la cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) una CH de ratón y (ii) un dominio VH humano mutado somáticamente derivado de un segmento genético VH humano que se selecciona de entre un segmento genético VH humano 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, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. En una realización, la CL es una CL  $\kappa$  de ratón.

También se hace referencia a un ratón que comprende ambos, el segmento genético Vk1-39Jk5 humano y el segmento genético Vk3-20Jk1 humano, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio VL derivado de un segmento genético Vk1-39Jk5 humano o un segmento genético Vk3-20Jk1 humano, y (ii) una CL de ratón; donde la cadena ligera está asociada con una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) una CH de ratón, y (ii) una VH humana mutada somáticamente derivada de un segmento genético VH humano que se selecciona de entre 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, un segmento VH humano 6-1, y una combinación de los mismos. En un ejemplo el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. En un caso la CL es una CL  $\kappa$  de ratón.

En el ratón que se proporciona el 90-100 % de los segmentos genéticos de ratón endógenos no reordenados del ratón se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos humanos no reordenados. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos de VH endógenos de ratón no reordenados se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos no reordenados. En una realización, la sustitución es con al menos 18, al menos 39, al menos 80, u 81 segmentos genéticos VH humanos no reordenados. En una realización, la sustitución es con al menos 12 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos genéticos VH humanos no reordenados.

En una realización, el ratón modificado genéticamente es una cepa C57BL, en una realización específica se selecciona 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/Ola. En una realización específica, el ratón modificado genéticamente 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 cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de 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 una CL  $\kappa$  de ratón y un dominio VL humano mutado somáticamente derivado de un segmento genético Vk1-39Jk5 humano o un segmento genético Vk3-20Jk1 humano, y una cadena pesada que comprende una CH de ratón y un dominio VH humano mutado somáticamente derivado de un segmento genético VH humano que se selecciona de entre 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 un segmento genético VH humano 6-1, 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 cadena ligera  $\kappa$  que comprende una sustitución de segmentos genéticos VL  $\kappa$  endógenos de ratón con el segmento genético Vk1-39Jk5 humano o el segmento genético Vk3-20Jk1 humano, y comprende una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos VH endógenos de ratón con un repertorio completo o sustancialmente completo de segmentos genéticos VH humanos.

También se hace referencia a una célula de ratón que se proporciona aislada de un ratón como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula es una célula ES. En otro ejemplo, la célula es un linfocito. En un

ejemplo, la célula B expresa una cadena pesada quimérica que comprende un dominio variable derivado de un segmento genético humano; y una cadena ligera derivada de un segmento Vk1-39/Jk5 humano, donde el dominio variable de la cadena pesada se fusiona a una región constante de ratón y el dominio variable de cadena ligera se fusiona a una región constante de ratón o humana.

5 También se hace referencia un hibridoma, donde el hibridoma se produce con una célula B de un ratón como se describe en el presente documento. En un caso específico, la célula B es de un ratón como se describe en el presente documento que se ha inmunizado con un inmunógeno que comprende un epítipo de interés, y la célula B expresa una proteína de unión que se une al epítipo de interés, la proteína de unión tiene un dominio VH humano mutado somáticamente y una CH de ratón, y tiene un dominio VL humano derivado de un segmento genético Vk1-39Jk5 humano y una CL de ratón.

También se hace referencia a un embrión de ratón donde el embrión comprende una célula ES donante que se deriva de un ratón como se describe en el presente documento.

15 En un aspecto, se hace referencia a un vector de direccionamiento, que comprende, desde 5' a 3' en la dirección transcripcional con referencia a las secuencias de los brazos de homología del ratón 5' y 3', un brazo de homología de ratón 5', un promotor de inmunoglobulina humano o de ratón, una secuencia líder humana o de ratón, y un segmento genético LCVR humano que es un segmento genético Vk1-39Jk5 humano, y un brazo de homología de ratón 3'. En un caso, los brazos de homología 5' y 3' dirigen el vector a una secuencia 5' con respecto a una secuencia amplificadora que está presente 5' y proximal al gen de la región constante  $\kappa$  de ratón. En un caso, el promotor es un promotor del segmento genético humano de la región variable de inmunoglobulina. En un caso específico, el promotor es un promotor Vk3-15 humano. En un caso, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón. En una realización específica, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder Vk3-7 de ratón.

25 En un caso, se proporciona un vector de direccionamiento como se describe anteriormente, pero en lugar del brazo de homología de ratón 5', el promotor humano o de ratón está flanqueado 5' con un sitio de reconocimiento de recombinasa específica del sitio (SRRS), y en lugar del brazo de homología de ratón 3', el segmento genético LCVR humano está flanqueado 3' por un SRRS.

30 También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso producido por un ratón como se describe en el presente documento, donde el anticuerpo quimérico inverso comprende una cadena ligera que comprende una CL de ratón y una VL humana, y la cadena pesada comprende una VH humana y una CH de ratón.

35 También se proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a un antígeno de interés que comprende inmunizar el ratón que se proporciona con un antígeno de interés, y emplear una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina humana del ratón para producir el anticuerpo.

40 También se hace referencia un método para producir un anticuerpo que se proporciona, que comprende la expresión en una única célula de (a) una primera secuencia genética VH de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia genética CH humana; (b) una secuencia genética VL de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia genética CL humana; y, (c) mantener la células bajo condiciones suficientes para expresar un anticuerpo humano completo, y aislar el anticuerpo. En un caso, la célula comprende una segunda secuencia genética VH de un segundo ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia genética CH humana, la primera secuencia genética codifica un dominio VH que reconoce un primer epítipo, y la segunda secuencia genética VH codifica un dominio VH que reconoce un segundo epítipo, donde el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos.

50 También se hace referencia a un método para producir una proteína de unión a un epítipo, que comprende la exposición de un ratón como se describe en el presente documento con un inmunógeno que comprende un epítipo de interés, mantener el ratón bajo condiciones suficientes para que el ratón genere una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente al epítipo de interés, y aislar la molécula de inmunoglobulina que se une específicamente al epítipo de interés; donde la proteína de unión al epítipo comprende una cadena pesada que comprende una VH humana mutada somáticamente y una CH de ratón, asociada con una cadena ligera que comprende una CL de ratón y una VL humana derivada de un segmento genético Vk1-39Jk5 humano.

60 También se hace referencia a una célula que expresa una proteína de unión al epítipo, donde la célula comprende: (a) una secuencia de nucleótidos VL humana que codifica un dominio VL humano derivado de un segmento genético Vk1-39Jk5 humano, donde la secuencia de nucleótidos VL humana está fusionada (directamente o mediante un enlazador) con una secuencia ADNc de un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana (por ejemplo, una secuencia ADN de un dominio constante  $\kappa$  humano); y, (b) una primera secuencia de nucleótido VH humana que codifica un dominio VH humano derivado de una primera secuencia de nucleótido VH humana, donde la primera secuencia de nucleótido VH humana está fusionada (directamente o mediante un enlazador) a una secuencia ADNc de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana; donde la proteína de unión al epítipo reconoce un primer epítipo. En un caso, la proteína de unión al epítipo se une al primer epítipo con una

constante de disociación menor de  $10^{-6}$  M, menor de  $10^{-8}$  M, menor de  $10^{-9}$  M, menor de  $10^{-10}$  M, menor de  $10^{-11}$  M, o menor de  $10^{-12}$  M.

5 En un caso, la célula comprende una segunda secuencia de nucleótido VH humana que codifica un segundo dominio VH humano, donde la segunda secuencia VH humana está fusionada (directamente o mediante un enlazador) a una secuencia ADNc de un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina humana, y donde el segundo dominio VH humano no reconoce específicamente el primer epítipo (por ejemplo, presenta una constante de disociación de, por ejemplo,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M, o más), y donde la proteína de unión al epítipo reconoce el primer epítipo y el segundo epítipo, y donde las primera y segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina se asocian cada una con una cadena ligera idéntica de (a).

En un caso, el segundo dominio VH se une al segundo epítipo con una constante de disociación que es menor de  $10^{-6}$  M, menor de  $10^{-8}$  M, menor de  $10^{-9}$  M, menor de  $10^{-10}$  M, menor de  $10^{-11}$  M, o menor de  $10^{-12}$  M.

15 En un caso, la proteína de unión al epítipo comprende una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina, que se asocian cada una de ellas con una cadena ligera idéntica derivada de un segmento genético VL humano que se selecciona de entre un segmento genético Vk1-39Jk5 humano o Vk3-20Jk1 humano, donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une al primer epítipo con una constante de disociación en un intervalo nanomolar a picomolar, la segunda cadena pesada de inmunoglobulina se une al segundo epítipo con una constante de disociación en el intervalo nanomolar a picomolar, el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos, la primera cadena pesada de inmunoglobulina no se une al segundo epítipo o se une al segundo epítipo con una constante de disociación más débil que el intervalo micromolar (por ejemplo, en el intervalo milimolar), la segunda cadena pesada de inmunoglobulina no se une al primer epítipo o se une al primer epítipo con una constante de disociación más débil que el intervalo micromolar (por ejemplo, en el intervalo milimolar), y uno o más de las VL, la VH de la primera cadena pesada de inmunoglobulina, y la VH de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, están mutadas somáticamente.

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

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

35 También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso, que comprende una VH humana y un dominio constante de cadena pesada de ratón, una VL humana y un dominio constante de cadena ligera de ratón, donde el anticuerpo se produce por un proceso que comprende la inmunización de un ratón como se describe en el presente documento con un inmunógeno que comprende un epítipo, y el anticuerpo se une específicamente al epítipo del inmunógeno con el que se inmunizó al ratón. En un caso, el dominio VL está mutado somáticamente. En un caso el dominio VH está mutado somáticamente. En un caso, ambos, el dominio VL y el dominio VH están mutados somáticamente. En un caso, el VL está unido a un dominio constante k de ratón.

45 En un aspecto, en el ratón que se proporciona, el ratón comprende segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada que sustituyen todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos variables de cadena pesada del ratón en el locus endógeno de ratón; no más de un segmento genético humano variable de cadena ligera es un segmento Vk1-39Jk5 reordenado, que sustituye todos los segmentos genéticos de ratón variables de cadena ligera; donde los segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada están unidos a un gen endógeno de ratón constante de cadena pesada, y el segmento genético humano variable de cadena ligera se une a un gen endógeno de ratón constante Ck.

50 También se hace referencia a una célula ES de ratón que comprende una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos de ratón variables de cadena pesada con segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada, y no más de uno o dos segmentos humanos V/J de cadena ligera reordenados, donde los segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada están unidos a un gen de ratón constante de cadena pesada de inmunoglobulina, y los segmentos humanos V/J de cadena ligera están unidos a un gen constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón o humano. En un caso específico, el gen constante de cadena ligera es un gen constante de ratón.

60 También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno producida por un ratón como se describe en el presente documento. En un caso específico, la proteína de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se fusiona con una región constante de ratón, y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana se deriva de un segmento genético Vk1-39 o un segmento genético Vk3-20, donde la región constante de la cadena ligera es una región constante de ratón.

65 También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno completamente humana que se produce a partir de un secuencia genética de región variable de inmunoglobulina de un ratón como se describe en el presente documento, donde la proteína de unión al antígeno comprende un cadena pesada completamente humana que

comprende una región variable humana que se deriva de una secuencia de un ratón como se describe en el presente documento, y una cadena ligera completamente humana que comprende una región variable Vk1-39. En un caso, la región variable de la cadena ligera comprende una a cinco mutaciones somáticas. En un caso, la región variable de cadena ligera es una región variable de cadena ligera equivalente que se empareja en una célula B de ratón con la región variable de cadena pesada.

En un caso, la proteína de unión al antígeno completamente humana comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, donde la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada comprenden regiones variables no idénticas que se derivan independientemente de un ratón como se ha descrito en el presente documento, y donde cada una de las primera y segunda cadenas pesadas que se expresan a partir de una célula huésped se asocian con una cadena ligera humana derivada de un segmento genético Vk1-39. En un caso la primera cadena pesada comprende una primera región variable de cadena pesada que se une específicamente a un primer epítipo de un primer antígeno, y la segunda cadena pesada comprende una segunda región variable de cadena pesada que se une específicamente a un segundo epítipo de un segundo antígeno. En un caso específico, el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo, y el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos; en un caso específico, la unión del primer epítipo por la primera molécula de la proteína de unión no bloquea la unión del segundo epítipo por una segunda molécula de la proteína de unión.

En un caso, una proteína de unión completamente humana que se deriva de una secuencia de inmunoglobulina humana de un ratón como se describe en el presente documento comprende una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina, 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 donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un determinante de unión a la proteína A tipo silvestre, y la segunda cadena pesada carece de un determinante de unión de proteína A tipo silvestre. En un caso, la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a la proteína A bajo condiciones de aislamiento, y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina no se une a la proteína A o se une a la proteína A al menos 10 veces, cien veces, o mil veces más débilmente que como se une la primera cadena pesada de inmunoglobulina a la proteína A bajo condiciones de aislamiento. En una realización específica, las primera y segunda cadenas pesadas son isotipos IgG1, donde la segunda cadena pesada comprende una modificación que se selecciona de entre 95R (EU 435R), 96F (EU 436F), y una combinación de los mismos, y donde la primera cadena pesada carece de tal modificación.

Se proporciona un método que es un método para producir un anticuerpo biespecífico humano, donde el método comprende la inmunización del ratón que se proporciona y produciendo el anticuerpo biespecífico utilizando secuencias genéticas humanas de la región variable de células B de ratón.

En un aspecto, el método para producir una proteína de unión al antígeno biespecífica comprende la exposición de un primer ratón como se proporciona a un primer antígeno de interés que comprende un primer epítipo, exponer un segundo ratón como se proporciona en el presente documento a un segundo antígeno de interés que comprende un segundo epítipo, permitir que el primer y segundo ratón tenga cada uno una respuesta inmunitaria a los antígenos de interés, identificar en el primer ratón una primera región variable de cadena pesada humana que se une con el primer epítipo del primer antígeno de interés, identificar en el segundo ratón una segunda región variable de cadena pesada humana que se une al segundo epítipo del segundo antígeno de interés, producir un primer gen de cadena pesada completamente humano que codifica una primera cadena pesada que se une al primer epítipo en el primer antígeno de interés, producir un segundo gen de cadena pesada completamente humano que codifica una segunda cadena pesada que se une al segundo epítipo 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 que se deriva de un segmento genético Vk1-39 humano para formar una proteína de unión al antígeno biespecífica, y aislar la proteína de unión al antígeno biespecífica.

En una realización, el primer antígeno y el segundo antígeno no son idénticos.

En una realización, el primer antígeno y el segundo antígeno son idénticos, y el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos. En una realización, la unión de la primera región variable de cadena pesada al primer epítipo no bloquea la unión de la segunda región variable de cadena pesada al segundo epítipo.

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

En una realización, el dominio variable de cadena ligera de la cadena ligera comprende 2 a 5 mutaciones somáticas. En una realización, el dominio variable de la cadena ligera es una cadena ligera mutada somáticamente equivalente que se expresa en una célula B del primer o segundo ratón inmunizado con o bien el primero o el segundo dominio



variable de cadena pesada.

En una realización, la primera cadena pesada completamente humana contiene una modificación de aminoácidos que reduce su afinidad por la proteína A, y la segunda cadena pesada completamente humana no comprende una modificación que reduzca su afinidad por la proteína A.

También se hace referencia a un anticuerpo o un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio humano variable de cadena pesada producido de acuerdo con la invención. En otro aspecto, se proporciona el uso de un ratón que se proporciona para producir un anticuerpo completamente humano o un anticuerpo biespecífico completamente humano.

Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento se pueden utilizar en conjunción con otra cualquiera, a menos de que se indique otra cosa o sea aparente por el contexto. Otras realizaciones llegarán a ser aparentes para los expertos en la técnica a partir de la revisión de la siguiente descripción.

### Descripción detallada

La presente invención no se limita a los métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, por lo que tales métodos y condiciones pueden variar. También se tiene que entender que la terminología que se utiliza en el presente documento es solamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende que sea limitante, aunque el ámbito de la presente invención se define por las reivindicaciones.

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos y frases utilizados en el presente documento incluyen los significados que los términos y frases han alcanzado en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o sea claramente aparente a partir del contexto en el que se utiliza el término o frase. Aunque se puede utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, se describen ahora métodos y materiales particulares.

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, incluye moléculas que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable (VH) de cadena pesada y una región constante (CH) de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable (VL) de cadena ligera y una región constante (CL) de cadena ligera. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de la cadena pesada se pueden abreviar como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la cadena ligera se pueden abreviar como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). La expresión anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  con respecto a su epítipo diana de aproximadamente  $10^{-9}$  M o menor (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M, o aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M). En una realización la  $K_D$  se mide por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™; en otra realización, la  $K_D$  se mide por ELISA.

La frase "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas no idénticas, que se unen específicamente cada cadena pesada a un epítipo diferente - o bien 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 el anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo generalmente será al menos una a dos o tres o cuatro regiones de unión al epítipo, o que se puede asociar con cada cadena pesada y es capaz de unirse a una o ambas cadenas pesadas por uno o ambos epítopos.

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las procariontes y eucariotas (célula única o múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, etc.), células micobacterianas, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insecto (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas, o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuádrimas. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, de hámster, de rata o de ratón. En algunas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona de entre las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula retiniana, Vero, CV1, 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 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y las líneas celulares derivadas 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, una célula PER.C6™).

La frase “región determinante de complementariedad” o el término “CDR”, incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir en un animal de tipo silvestre) aparecen entre dos regiones estructurales en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de célula T). Una CDR se puede codificar, por ejemplo, por una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por una célula B o una célula T intacta o madura. Una CDR puede estar mutada somáticamente (por ejemplo, varía de la secuencia codificada en la línea germinal de un animal), humanizada, y/o modificada con sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden codificarse por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada) pero son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de célula B, por ejemplo, como resultado de corte y empalme o conexión de las secuencias (por ejemplo, en la recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

El término “conservadora”, cuando se utiliza para describir una sustitución conservadora de aminoácidos, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R en la cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambia sustancialmente las propiedades de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de una región variable para unirse específicamente a un epítipo 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 alifáticas-hidroxilo 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 ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora 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 la sustitución de cualquier resto nativo en una proteína con alanina, como se utiliza, por ejemplo, en mutagénesis por selección de alanina. En algunas realizaciones, se produce una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad-log PAM250 desvelada 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 donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad log PAM250.

En algunas realizaciones, las posiciones de los restos en una cadena ligera o una cadena pesada de inmunoglobulina se diferencian por una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. En algunas realizaciones, las posiciones de los restos 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, una célula B) no son idénticas a una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se enumera en el presente documento, sino que se diferencia por una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

La frase “proteína de unión al epítipo” incluye una proteína que tiene al menos una CDR y que es capaz de reconocer selectivamente un epítipo, por ejemplo, es capaz de unirse a un epítipo con una  $K_D$  que es aproximadamente micromolar o más baja (por ejemplo una  $K_D$  que es aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M, o aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M). Las proteínas se unión al epítipo terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) frecuentemente necesitan una  $K_D$  que está en el intervalo nanomolar o picomolar.

La frase “fragmento funcional” incluye fragmentos de proteínas de unión al epítipo que se pueden expresar, segregar, y unir específicamente a un epítipo con una  $K_D$  que está al menos en el intervalo micromolar, intervalo nanomolar, o en el intervalo picomolar.

La expresión “línea germinal” incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina en una célula no mutada somáticamente, por ejemplo, una célula B o una pre-célula B o una célula hematopoyética no mutada somáticamente.

La frase “cadena pesada”, o “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una secuencia de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos de que se especifique otra cosa. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen, CDR, CDR y FR, y combinaciones de los mismos. Una cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable (desde el extremo N al extremo C), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que se capaz de reconocer específicamente un epítipo (por ejemplo, que reconoce un epítipo con una  $K_D$  en el intervalo micromolar, nanomolar, o picomolar), que es capaz de expresarse y segregarse a partir de una célula, y que comprende al menos una CDR.

El término “identidad” cuando se utiliza en conexión con secuencia, incluye la identidad como se determina por un número de diferentes algoritmos que se conocen en la técnica y que se pueden utilizar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos y aminoácidos. En algunas realizaciones escritas en el presente documento, las identidades se determinan utilizando un alineamiento ClustalW v.1.83 (lento) empleando una falta de huecos abierta de 10,0, una falta de hueco extendida de 0,1, y utilizando una matriz de similitud de Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de secuencias dependerá de las secuencias en particular, pero en el caso de un dominio constante de cadena ligera, la longitud debería contener una secuencia de longitud suficiente para plegarse en un dominio constante de cadena ligera que es capaz de auto-asociarse para formar un dominio constante de cadena ligera canónico, por ejemplo, que sea capaz de formar dos láminas beta que comprendan láminas beta y capaces de interactuar con al menos un dominio CH de un ser humano o un ratón. En el caso de un dominio CH1, la longitud de secuencia debería contener una secuencia de suficiente longitud para plegarse en un dominio CH1 que sea capaz de formar dos láminas beta que comprenden cadenas beta y capaz de interactuar con al menos un dominio constante de cadena ligera de un ratón o un ser 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 cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos de que se especifique otra cosa incluye cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  humanas y una VpreB, así como cadenas ligeras equivalentes. Los dominios variables (VL) de cadena ligera incluyen típicamente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones estructurales (FR), a menos de que se especifique otra cosa. En general, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino al término carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y un dominio constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras incluyen, por ejemplo, las que no se unen selectivamente ni a un primer ni a un segundo epítipo unido selectivamente a una proteína de unión al epítipo en la que aparecen. Las cadenas ligeras también incluyen las que se unen y reconocen, o ayudan a la cadena pesada en la unión y reconocimiento, de uno o más epítopos unidos a una proteína de unión al epítipo en la que aparecen. Las cadenas ligeras comunes se las derivadas de un segmento genético Vk1-39Jk5 humano o un segmento genético Vk3-20Jk1 humano, e incluyen versiones mutadas somáticamente (por ejemplo, de afinidad madurada) de las mismas.

La frase “intervalo micromolar” pretende significar 1-999 micromolar; la frase “intervalo nanomolar” pretende significar 1-999 nanomolar; la frase “intervalo picomolar” pretende significar 1-999 picomolar.

La frase “mutado somáticamente” incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de una célula B que ha sufrido un cambio de clase, donde la secuencia del ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia CDR o FR de cadena pesada) de la célula B que está cambiada de clase no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico de la célula B antes del cambio de clase, tal como por ejemplo, una diferencia en una secuencia de ácido nucleico de CDR o estructural entre una célula B que no ha sufrido un cambio de clase y una célula B que ha sufrido un cambio de clase. “Mutado somáticamente” incluye la referencia a secuencias de ácido nucleico de células B de afinidad madurada que no son idénticas a las correspondientes secuencias de la región variable de inmunoglobulina correspondiente en las células B que no son de afinidad madurada (es decir, secuencias en el genoma de las células germinales). La frase “mutado somáticamente” incluye también la referencia a una secuencia de ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina de una célula B tras la exposición de la célula B a un epítipo de interés, donde la secuencia de ácido nucleico se diferencia de la secuencia de ácido nucleico correspondiente antes de la exposición de la célula B al epítipo de interés. La frase “mutado somáticamente” se refiere a secuencias de los anticuerpos que se han generado en un animal, por ejemplo, un ratón que tiene secuencias de ácido nucleico de la región variable de inmunoglobulina humana, en respuesta a un desafío inmunógeno, y que resultan de los procesos de selección operativos inherentemente en tal animal.

La expresión “no reordenado”, en referencia a una secuencia de ácido nucleico, 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 (modificadas como se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en una secuencia desde el extremo N al extremo C (a menos de que se indique otra cosa): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

## **60 Cadena ligera común**

Los esfuerzos anteriores para producir proteínas de unión al epítipo multiespecíficas útiles, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, fueron obstaculizados por una variedad de problemas que frecuentemente compartían un paradigma común: la selección o manipulación in vitro de secuencias para modificar racionalmente, o para modificar por medio de ensayo y error, un formato adecuado para emparejar una inmunoglobulina humana biespecífica heterodimérica. Desafortunadamente, la mayoría si no todas las estrategias de modificación in vitro proporcionan extensamente fijos

*ad hoc* que son adecuados, como mucho, para moléculas individuales. Por otra parte, los métodos *in vivo* que emplean organismos complejos para seleccionar los emparejamientos apropiados que sean capaces de dar lugar a una terapéutica en seres humanos no se han conseguido.

5 En general, las secuencias nativas de ratón no son frecuentemente una buena fuente para las secuencias terapéuticas humanas. Por al menos esta razón, generar regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que se empareje con una cadena ligera común humana tiene una utilidad práctica limitada. Más esfuerzos de modificación *in vitro* se emplearían en un proceso de ensayo y error para intentar humanizar las secuencias variables de cadena pesada de ratón mientras que se espera que mantengan la especificidad y afinidad por el  
10 epítipo mientras que se mantiene la capacidad para acoplarse con la cadena ligera humana común, con un resultado incierto. Al final de tal proceso, el producto final puede mantener alguna de la especificidad y afinidad, y se asocia con la cadena ligera común, pero en último término la inmunogenicidad en un ser humano probablemente tenía un grave riesgo.

15 Por lo tanto, un ratón adecuado para producir una terapéutica humana incluiría un gran repertorio adecuado de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada en lugar de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de la cadena pesada. Los segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada deberían ser capaces de reorganizarse y recombinarse con el dominio constante de cadena pesada endógena del ratón para formar una cadena pesada quimérica inversa (es decir, una cadena pesada  
20 que comprende un dominio variable humano y una región constante de ratón). La cadena pesada debería ser capaz de cambiar de clase y de hipermutación somática de forma que un gran repertorio adecuado de dominios variables de cadena pesada esté disponible para el ratón, para seleccionar uno que se puede asociar con el limitado repertorio de regiones variables de cadena ligera humanas.

25 Un ratón que selecciona una cadena ligera común para una pluralidad de cadenas pesadas tiene una utilización práctica. En varias realizaciones, los anticuerpos que se expresan en un ratón que solo pueda expresar una cadena ligera común tendrán cadenas pesadas que se pueden asociar y expresar con una cadena ligera idéntica o sustancialmente idéntica... Esto es particularmente útil en la producción de anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, tal ratón se puede inmunizar con un primer inmunógeno para generar una célula B que exprese un anticuerpo que  
30 se une específicamente a un primer epítipo. El ratón (o un ratón genéticamente igual) se puede inmunizar con un segundo inmunógeno para generar una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente al segundo epítipo. Las regiones variables pesadas se pueden clonar a partir de las células B y expresarse con la misma región constante de cadena pesada, y la misma cadena ligera, y se expresa en una célula para producir un anticuerpo biespecífico, donde el componente de cadena ligera del anticuerpo biespecífico se ha seleccionado por medio de un  
35 ratón para asociarse y expresarse con el componente de cadena ligera.

Los inventores han modificado genéticamente un ratón para que genere cadenas ligeras de inmunoglobulina que ese emparejarán adecuadamente con una familia más diversa de cadenas pesadas, que incluyen cadenas pesadas cuyas regiones variables parten de secuencias de la línea germinal, por ejemplo, regiones variables con afinidad  
40 madurada o mutadas somáticamente. En varias realizaciones, el ratón se concibe para emparejar dominios variables humanos de cadena ligera con dominios variables humanos de cadena pesada que comprenden mutaciones somáticas, por lo tanto haciendo posible una ruta de proteínas de unión de alta afinidad adecuadas para su uso como terapéutica humana.

45 El ratón modificado genéticamente, por medio del largo y complejo proceso de selección de anticuerpos en un organismo, hace las elecciones biológicamente apropiadas para el emparejamiento de una colección diversa de dominios humanos variables de cadena pesada con un número limitado de opciones de dominios humanos variables de cadena ligera. Con el fin de conseguir esto, el ratón se modifica para que presente un único dominio humano variable de cadena ligera en conjunción con una amplia diversidad de opciones de dominios humanos variables de  
50 cadena pesada. Al desafiar con un inmunógeno, el ratón maximiza el número de soluciones en su repertorio para desarrollar un anticuerpo contra el inmunógeno, limitado en gran manera o únicamente por el número de opciones de cadena ligera en su repertorio. En varias realizaciones, esto incluye permitir al ratón que consiga mutaciones somáticas compatibles del dominio variable de cadena ligera que sin embargo serán compatibles con una variedad relativamente grande de dominios humanos variables de cadena pesada, incluyendo en particular los dominios  
55 humanos variables de cadena pesada mutados somáticamente.

Para conseguir un repertorio limitado de opciones de cadena ligera, el ratón se modifica para convertir en no funcional o sustancialmente no funcional su capacidad para producir, o reordenar, un dominio variable de cadena ligera nativo de ratón. Esto se puede conseguir, por ejemplo, eliminando los segmentos genéticos de la región  
60 variable de cadena ligera de ratón. El locus endógeno del ratón se puede modificar entonces por un segmento genético del gen humano de la región variable de la cadena ligera exógeno adecuado de elección, unido adecuadamente al dominio constante de cadena ligera endógeno de ratón, de manera tal que los segmentos genéticos exógenos humanos de la región variable pueden reordenarse y recombinarse con el gen endógeno de ratón de la región constante de la cadena ligera y formar un gen (humano variable, constante de ratón) de cadena  
65 ligera quimérico inverso reordenado. En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es capaz de mutarse somáticamente. En varias realizaciones, para maximizar la capacidad de la región variable de cadena ligera

para adquirir mutaciones somáticas, se retiene el amplificador(es) adecuado en el ratón. Por ejemplo, al modificar un locus  $\kappa$  de ratón para sustituir los segmentos genéticos de la región variable  $\kappa$  endógena de ratón con segmentos genéticos humanos de la región variable  $\kappa$ , se mantienen funcionalmente el amplificador intrónico  $\kappa$  del ratón y el amplificador  $\kappa$  3' del ratón, o no se destruyen.

5 El ratón modificado genéticamente proporcionado expresa un repertorio limitado de cadenas ligeras (variables humanas, constantes de ratón) quiméricas inversas asociadas con una diversidad de cadenas pesadas (variables humanas, constantes de ratón) quiméricas inversas. En varias realizaciones, los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera  $\kappa$  se eliminan y se sustituyen con segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena ligera, unidos operativamente al gen de la región constante  $\kappa$  endógena del ratón. En realizaciones para maximizar la hipermutación somática de los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena ligera, el amplificador intrónico  $\kappa$  de ratón y el amplificador  $\kappa$  3' de ratón se mantienen. En varias realizaciones, el ratón también comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  no funcional, o una eliminación del mismo o una eliminación que convierte el locus en incapaz para producir una cadena ligera  $\lambda$ .

15 Por lo tanto un ratón modificado genéticamente que expresa dominios variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana, donde los dominios variable de cadena ligera humana se expresan a partir de una única secuencia genética de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (VL/JL) reordenada presente en la línea germinal del ratón que comprende una secuencia de la línea germinal de un segmento genético VL y una secuencia germinal de un segmento genético JL, siendo dicha región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada  $V\kappa 1-39/J\kappa$ , donde:

- 25 (a) el ratón carece de un locus de la región variable de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógena de ratón que sea capaz de reordenar y formar un gen que codifique una región variable  $\kappa$  de ratón;
- (b) el ratón expresa una cadena ligera de inmunoglobulina humana común para una pluralidad de cadenas pesadas humanas, derivada la cadena ligera común de dicha secuencia genética de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana.
- 30 (c) el ratón comprende una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de interés, donde el anticuerpo comprende dicha cadena ligera común y una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de un reordenamiento de segmentos genéticos variables (VH) de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un segmento genético VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-59, y VH5-51; y
- (d) el 90-100 % de los segmentos genéticos VH de ratón endógenos no reordenados del ratón se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos no reordenados.

35 El ratón modificado genéticamente que se proporciona, en varias realizaciones, comprende un locus de la región variable de cadena ligera que carece de un segmento genético endógeno del ratón variable de cadena ligera y que comprende un segmento genético humano variable, en una realización una secuencia V/J humana reordenada, unida operativamente a una región constante de ratón, donde el locus es capaz de sufrir una hipermutación somática, y donde el locus expresa una cadena ligera que comprende la secuencia V/J humana unida a una región constante de ratón. Por lo tanto, en varias realizaciones, el locus comprende un amplificador 3'  $\kappa$  de ratón, que se correlación con un nivel normal, o de tipo silvestre, de hipermutación somática.

45 El ratón modificado genéticamente en varias realizaciones cuando se inmuniza con un antígeno de interés genera células B que muestran una diversidad de reordenamientos de regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana que expresa y funciona con una cadena ligera reordenada, incluyendo realizaciones donde la cadena ligera comprende regiones variables de cadena ligera humana que comprenden, por ejemplo, 1 a 5 mutaciones somáticas. En varias realizaciones, las cadenas ligeras humanas que se expresan de esta manera son capaces de asociarse y expresarse con cualquier región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se expresa en el ratón.

#### **Proteínas de unión al epítipo que se unen a más de un epítipo**

55 Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para producir proteínas de unión que se unan a más de un epítipo con alta afinidad, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Las ventajas de la invención incluyen la capacidad para seleccionar adecuadamente cadenas de cadena pesada de inmunoglobulina de alta unión (por ejemplo, afinidad madurada) cada una de las cuales se asociará con una única cadena ligera.

60 La síntesis y expresión de proteínas de unión biespecífica han sido problemáticas, en parte debido a problemas asociados con la identificación de una cadena ligera adecuada que se pueda asociar y expresar con dos cadenas pesadas diferentes, y en parte debido a problemas de aislamiento. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento permiten un ratón modificado genéticamente para seleccionar, por medio de procesos por otra parte naturales, una cadena ligera adecuada que se puede asociar y expresar con más de una cadena pesada, que incluye cadenas pesadas que están mutadas somáticamente (por ejemplo, de afinidad madurada). Las secuencias VL y VH humanas de células B adecuadas de ratones inmunizados como se describen en el presente documento que expresan anticuerpos de afinidad madurada que tienen cadenas pesadas quiméricas inversas (es decir,

- variables humanas y constantes de ratón) se pueden identificar y clonar en fase en un vector de expresión con una secuencia genética humana de la región constante adecuada (por ejemplo, una IgG1 humana). Se pueden preparar dos de tales construcciones, donde cada construcción codifica un dominio variable de cadena pesada humano que se une a un epítipo diferente. Uno de las VL humanas (por ejemplo, Vk1-39Jk5 humano o Vk3-20Jk1 humano), de la secuencia de la línea germinal o de una célula B donde la secuencia se ha mutado somáticamente, se pueden fusionar en fase con un gen humano de la región constante adecuado (por ejemplo, un gen constante κ humano). Estas tres construcciones ligeras y pesadas completamente humanas se pueden situar en una célula adecuada para su 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 la separación fácil de estas tres especies principales, se modifica una de las cadenas pesadas para omitir el determinante de unión a la proteína A, dando como resultado una afinidad diferencial de una proteína de unión homodimérica de una proteína de unión heterodimérica. Las composiciones y métodos que se dirigen a este problema se describen en el documento 12/832.838, presentada el 25 de junio de 2010, titulada "Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format," publicada como el documento US 2010/0331527A1.
- En un caso, se hace referencia a una proteína de unión al epítipo como se describe en el presente documento, donde las secuencias VL y VH humanas se derivan de los ratones descritos en el presente documento que se ha inmunizado con un antígeno que comprende un epítipo de interés.
- También se hace referencia una proteína de unión al epítipo que comprende un primer y segundo polipéptido, el primer polipéptido comprende, desde el extremo N al extremo C, una primera región de unión al epítipo que se une selectivamente a un primer epítipo, seguido por una región constante que comprende una primera región CH3 de una IgG humana que se selecciona de entre IgG1, IgG2, IgG4, y una combinación de las mismas; y, un segundo polipéptido que comprende, del extremo N al extremo C, una segunda región de unión al epítipo que se une selectivamente a un segundo epítipo, seguido por una región constante que comprende una segunda región CH3 de una IgG humana seleccionada de entre IgG1, IgG2, IgG4, y una combinación de las mismas, donde la segunda región CH3 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio CH3 a la proteína A.
- En un caso, la segunda región CH3 comprende una modificación H95R (por la numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). En otra realización, la segunda región CH3 comprende además una modificación Y96F (IMGT; Y436F por EU).
- En un caso, la segunda región CH3 es de una IgG1 humana modificada, y comprende además una modificación que se selecciona de entre el grupo que consiste en D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I por EU).
- En un caso, la segunda región CH3 es de una IgG2 humana modificada, y comprende además una modificación que se selecciona de entre el grupo que consiste en N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I por EU).
- En un caso, la segunda región CH3 es de una IgG4 humana modificada, y comprende además una modificación que se selecciona de entre el grupo que consiste en Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por EU).
- Un método para producir una proteína de unión al epítipo que se une a más de un epítipo es inmunizar un primer ratón de acuerdo con la invención con un antígeno que comprende un primer epítipo de interés, donde el ratón comprende un locus de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que no contiene una VL endógena del ratón que sea capaz de reordenarse y formar una cadena ligera, donde en locus endógeno del ratón variable de cadena ligera de inmunoglobulina hay un único segmento genético VL humano unido operativamente al gen endógeno del ratón de la región constante de cadena ligera, y el segmento genético VL humano es un Vk1-39Jk5 humano, y los segmentos genéticos endógenos del ratón VH se han sustituido en parte o totalmente con segmentos genéticos VH humanos, tal que las cadenas pesadas de inmunoglobulinas producidas por el ratón son solamente o sustancialmente cadenas pesadas que comprenden dominios variables humanos y dominios constantes de ratón. Cuando se inmuniza, tal ratón producirá un anticuerpo quimérico inverso que comprende solo un dominio humano variable de cadena ligera (por ejemplo, Vk1-39Jk5 humano). Una vez que se identifica la célula B que codifica una VH que se une al epítipo de interés, se puede recuperar (por ejemplo, por PCR) la secuencia de nucleótidos de la VH (y opcionalmente, la VL) y clonarse en una construcción de expresión en fase con un dominio humano constante de inmunoglobulina adecuado. Este proceso se puede repetir para identificar un segundo dominio VH que se une a un segundo epítipo, y se puede recuperar una segunda secuencia genética VH y clonarse en un vector de expresión en fase con un segundo dominio constante de inmunoglobulina adecuado. El primer y segundo dominios constantes de inmunoglobulina pueden ser el mismo isotipo o diferente, y se puede modificar uno de los dominios constantes de inmunoglobulina (pero no el otro) como se describe en el presente documento o en el documento US 2010/0331527A1, y se puede expresar la proteína de unión al epítipo, por ejemplo, como se describe en el documento US 2010/0331527A1.
- También se hace referencia a un método para producir una proteína de unión al epítipo biespecífico, que comprende la identificación de una primera secuencia de nucleótidos VH humana (VH1) de afinidad madurada (por

ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) a partir de un ratón como se describe en el presente documento, identificar una segunda secuencia de nucleótidos VH humana (VH2) de afinidad madurada (por ejemplo que comprende una o más hipermutaciones somáticas) a partir de un ratón como se describe en el presente documento, clonar la VH1 en fase con una cadena pesada humana que carece de una modificación del determinante de proteína A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar una cadena pesada 1 (HC1), clonar la VH2 en fase con una cadena pesada humana que comprende un determinante de Proteína A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar una cadena pesada 2 (HC2), introducir un vector de expresión que comprende HC1 y el mismo vector de expresión o uno diferente que comprende HC2 dentro de la célula, donde la célula también expresa una cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende un Vk1-39 humano/Jk5 humano o un Vk3 humano/20Jk1 humano que se fusiona a un dominio humano constante de cadena ligera, permitiendo a la célula que exprese una proteína de unión al epítipo biespecífica que comprende un dominio VH codificado por VH1 y un dominio VH codificado por VH2, y aislar la proteína de unión al epítipo biespecífica en base a su capacidad diferencial de unirse a la Proteína A en comparación con la proteína de unión al epítipo homodimérica. En un caso específico, la HC1 es una IgG1, y la HC2 es una IgG1 que comprende la modificación H95R (IMGT; H435R por EU) y comprende además la modificación Y96F (IMGT; Y436F por EU). En un caso, el dominio VH codificado por VH1, el dominio VH codificado por VH2, o ambos, están mutados somáticamente.

### 20 Genes VH humanos que se expresan con una VL humana común

Se expresó una variedad de regiones variables humanas a partir de anticuerpos de afinidad madurada producidos contra cuatro antígenos diferentes con o su cadena ligera equivalente, o al menos una de las cadenas ligeras humanas seleccionadas de entre Vk1-39Jk5 humana, Vk3-20Jk1 humana o VpreBJλ5 humana (véase el Ejemplo 1). Para los anticuerpos contra cada uno de los antígenos, se emparejaron satisfactoriamente las cadenas pesadas de alta afinidad mutadas somáticamente de diferentes familias genéticas con las regiones de la línea germinal humana Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 reordenadas y se segregaron a partir de las células que expresaban las cadenas pesada y ligera. Para Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1, se expresaron favorablemente los dominios VH derivados de las siguientes familias VH humanas: 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 lo tanto un ratón que se modifica para expresar un repertorio limitado de dominios VL humanos a partir de uno o ambos Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 generará una población diversa de dominios VH humanos mutados somáticamente a partir de locus VH modificado genéticamente para sustituir los segmentos genéticos VH de ratón por segmentos genéticos VH humanos.

Los ratones modificados genéticamente para expresar cadenas pesadas de inmunoglobulina quiméricas inversas (variables humanas, constantes de ratón) que se asocian con una única cadena ligera reordenada (por ejemplo, una Vk1-39/J o una Vk3-20/J), cuando se inmunizan con un antígeno de interés, generan células B que comprenden una diversidad de reordenamientos del segmento V humano y expresan una diversidad de anticuerpos específicos de antígeno con alta afinidad con diversas propiedades con respecto a su capacidad para bloquear la unión del antígeno a su ligando, y con respecto a su capacidad para unirse a variantes del antígeno (véase los Ejemplos 5 a 10).

Por lo tanto, los ratones y métodos descritos en el presente documento son útiles para producir y seleccionar dominios humanos variables de cadena pesada, que incluyen dominios humanos variables de cadena pesada mutados somáticamente, que resultan de una diversidad de reordenamientos, que muestran una amplia variedad de afinidades (que incluyen las que muestran una  $K_D$  de aproximadamente nanomolar o menos), una amplia variedad de especificidades (que incluyen la unión a diferentes epítopos del mismo antígeno), y que se asocian y se expresan con la misma o sustancialmente la misma región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para describir a los expertos habituados en la técnica cómo hacer y utilizar los métodos y composiciones de la invención, y no se pretende limitar el ámbito de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero se debería contar con algunos errores experimentales o desviaciones. A menos de que se indique otra cosa, las partes son partes por peso, el peso molecular es el peso molecular medio, las temperaturas se indican en grados Celsius, y la presión es o está cerca de la atmosférica.

### 55 Ejemplos

#### 60 Ejemplo 1. Identificación de las regiones humanas variables de cadena pesada que se asocian con regiones humanas variables de cadena ligera seleccionadas

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

65 Los métodos para generar anticuerpos humanos en ratones modificados genéticamente se conocen (véase por ejemplo, el documento US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®). La tecnología

VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón modificado genéticamente que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas unidas operativamente a loci endógenos del ratón de región constante de 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 pesada y ligera de los anticuerpos producidos a partir de un ratón VELOCIMMUNE® son completamente humanos. Inicialmente los anticuerpos quiméricos de alta afinidad que se aíslan tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se describe posteriormente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan por sus características deseables, que incluyen la afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se sustituyen con una región constante humana deseable para generar un anticuerpo completamente humano que contiene un isotipo no IgM, por ejemplo, un IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo silvestre o modificado. Aunque la región constante que se selecciona puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión al antígeno con alta afinidad y la especificidad de diana residen en la región variable.

Se inmunizó un ratón VELOCIMMUNE® con un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis (Antígeno C) y se asilaron los anticuerpos humanos específicos del antígeno y se secuenciaron con respecto a la utilización del gen V utilizando las técnicas de referencia que se reconocen en la técnica. Los anticuerpos seleccionados se clonaron en regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas y se seleccionaron 69 cadenas pesadas para emparejarlas con una de las tres cadenas ligeras humanas: (1) la cadena ligera κ equivalente unida a una región constante κ humana, (2) una línea germinal Vκ1-39Jκ5 humana reordenada unida a una región constante κ humana, o (3) una línea germinal Vκ3-20Jκ1 humana reordenada unida a una región constante κ humana. Cada pareja de cadena pesada y cadena ligera se co-transfectaron en células CHO-K1 utilizando técnicas de referencia. La presencia de anticuerpo en el sobrenadante se detectó por anti-IgG humana en un ensayo ELISA. El título de anticuerpos (ng/ml) se determinó para cada pareja de cadena pesada/cadena ligera y se compararon los títulos de las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal reordenadas con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada emparejada con la cadena ligera equivalente) y se calculó el porcentaje del título nativo (Tabla 1). V<sub>H</sub>: gen variable de cadena pesada. ND: expresión no detectada bajo las condiciones experimentales en curso.

V <sub>H</sub>	Título de anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje del título nativo	
	LC Equivalente	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	-
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



Tabla 1					
V <sub>H</sub>	Título de anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje del título nativo	
	LC Equivalente	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
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
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

V <sub>H</sub>	Título de anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje del título nativo	
	LC Equivalente	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
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, los ratones VELOCIMMUNE® se inmunizaron con varios antígenos diferentes y las cadenas pesadas de anticuerpos humanos específicos del antígeno que se seleccionaron, se ensayaron en cuanto a su capacidad para emparejarse con diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas (como se ha descrito anteriormente). Los antígenos que se utilizan en este experimento incluyen 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 superficie celular (Antígeno D). Los anticuerpos específicos del antígeno se aislaron de los ratones en 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 que se seleccionaron se emparejaron con su cadena ligera equivalente o con la región de la línea germinal Vκ1-39Jκ5 humana reordenada. Cada par de cadenas pesada/ligera se co-transfectó en células CHO-K1 y se detectó la presencia del anticuerpo en el sobrenadante por anti-IgG humana en un ensayo ELISA. El título de anticuerpos (μg/ml) se determinó para cada emparejamiento de cadena pesada/cadena ligera y se compararon los títulos de diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada emparejada con la cadena ligera equivalente) y se calculó el porcentaje del título nativo (Tabla 2). V<sub>H</sub>: gen variable de cadena pesada. V<sub>κ</sub>: gen variable de cadena ligera κ. ND: expresión no detectada bajo las condiciones experimentales en curso.

Antígeno	Anticuerpo	V <sub>H</sub>	V <sub>κ</sub>	Título (mg/ml)			Porcentaje de título nativo
				V <sub>H</sub> Sola	V <sub>H</sub> + V <sub>κ</sub>	V <sub>H</sub> + 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

Tabla 2							
Antígeno	Anticuerpo	V <sub>H</sub>	V <sub>K</sub>	Título (mg/ml)			Porcentaje de título nativo
				V <sub>H</sub> Sola	V <sub>H</sub> + V <sub>K</sub>	V <sub>H</sub> + V <sub>K</sub> 1-39Jk5	
	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

Tabla 2							
Antígeno	Anticuerpo	V <sub>H</sub>	V <sub>K</sub>	Título (mg/ml)			Porcentaje de título nativo
				V <sub>H</sub> Sola	V <sub>H</sub> + V <sub>K</sub>	V <sub>H</sub> + V <sub>K1-39Jk5</sub>	
D	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
	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 de estos experimentos demuestran que las cadenas pesadas de alta afinidad, mutadas somáticamente de diferentes familias genéticas eran capaces de emparejarse con regiones V<sub>K1-39Jk5</sub> y V<sub>K3-20Jk1</sub> de la línea germinal humana reordenadas y se segregaban a partir de la célula como una molécula de anticuerpo normal. Como se muestra en la Tabla 1, el título de anticuerpo aumentaba aproximadamente un 61 % (42 de 69) de cadenas pesadas cuando se emparejaban con la cadena ligera V<sub>K1-39Jk5</sub> humana reordenada y aproximadamente un 29 % (20 de 69) de cadenas pesadas cuando se emparejaban con la cadena ligera V<sub>K3-20Jk1</sub> humana reordenada en comparación con la cadena ligera equivalente el anticuerpo parental. Para aproximadamente el 20 % (14 de 69) de las cadenas pesadas, ambas cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas conferían un aumento de la expresión cuando se compara a la cadena ligera equivalente del anticuerpo parental. Como se muestra en la Tabla 2, la región V<sub>K1-39Jk5</sub> de la línea germinal humana reordenada confería un aumento de la expresión de varias cadenas pesadas específicas para un intervalo de diferentes clases de antígeno en comparación con la cadena ligera equivalente de los anticuerpos parentales. El título de anticuerpo aumentaba más de dos veces en aproximadamente un 35 % (15/43) de las cadenas pesadas en comparación con la cadena ligera equivalente de los anticuerpos parentales. Para dos cadenas pesadas (315 y 316), el aumento era mayor de diez veces en comparación con el anticuerpo parental. En todas las cadenas pesadas que mostraban un aumento de la expresión con respecto a la cadena ligera equivalente del anticuerpo parental, la familia tres de cadenas pesadas (V<sub>H3</sub>) estaba sobre-representada en comparación con otras familias genéticas de la región variable de cadena pesada. Esto demuestra una relación favorable de las cadenas pesadas V<sub>H3</sub> humanas para emparejarse con cadenas ligeras V<sub>K3-20Jk1</sub> y V<sub>preB/Jλ5</sub> de la línea germinal humana reordenadas.

### Ejemplo 2. Generación de un locus de cadena ligera de la línea germinal humana reordenado

Se produjeron varios vectores dirigidos a la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada utilizando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N° 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 clones de Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC) genómicos de ratón 302g12 y 254m04 (Invitrogen). Utilizando estos dos clones BAC, se modificaron construcciones genómicas para que contuvieran una única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada y se insertó en un locus de cadena ligera κ endógena que se había modificado genéticamente previamente para eliminar los segmentos genéticos de unión y variable κ endógena.

### A. Construcción de vectores que se dirigen a la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada

Se produjeron tres diferentes regiones de cadena ligera de la línea germinal humana reordenadas utilizando técnicas de biología molecular de referencia. Los segmentos genéticos variables humanos utilizados para construir estas tres regiones incluían la secuencia Vk1-39Jk5 humana reordenada, una secuencia Vk3-20Jk1 humana reordenada y una secuencia VpreBJλ5 humana reordenada.

Un segmento de ADN que contiene el exón 1 (que codifica el péptido líder) y el intrón 1 del gen Vk3-7 del ratón se produjo por síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies). Se incluyó parte de la región sin traducir 5' hasta un sitio de restricción enzimática BlnI de origen natural. Los exones de los genes Vk1-39 y Vk3-20 humanos se amplificaron por PCR a partir de las bibliotecas de BAC genómicos humanos. Los cebadores directos tenían una extensión 5' que contenía el sitio receptor de corte y empalme del intrón 1 del gen Vk3-7 del ratón. El cebador inverso que se utiliza para la PCR de la secuencia Vk1-39 humana incluye una extensión que codifica el Jk5 humano, mientras que el cebador inverso utilizado para la PCR de la secuencia Vk3-20 humana incluía una extensión que codificaba el Jk1 humano. La secuencia VpreBJλ5 humana se produjo por síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies). Una parte del intrón Jk-Ck humano incluyendo el sitio donante de corte y empalme se amplificó por PCR a partir del plásmido pBS-296-HA18-PISceI. El cebador directo de la PCR incluía una extensión que codificaba parte de una secuencia Jk5, Jk1 o λ5 humanas. El cebador inverso incluía un sitio PI-SceI, que se había modificado genéticamente anteriormente en el intrón.

El exón 1/intrón 1 Vk3-7 de ratón, los exones de cadena ligera variable humanos, y los fragmentos de intrón Jk-Ck humanos se cosieron juntos por solapamiento de extensiones de PCR, se digirieron con BlnI y PI-SceI, y se ligaron en el plásmido pBS-296-HA18-PISceI, que contenía el promotor del segmento genético variable Vk3-15 humano. Un casete de higromicina flanqueado por sitios loxP (floxado) dentro del plásmido pBS-296-HA18-PISceI se sustituyó con un casete de higromicina con sitios FRT flanqueado por los sitios NotI y Ascl. El fragmento NotI/PI-SceI de este plásmido se ligó en el ratón modificado genéticamente BAC 254m04, que contenía parte del intrón Jk-Ck de ratón, el exón Ck de ratón, y aproximadamente 75 kb de secuencia genómica corriente abajo del locus κ de ratón que proporcionaba un brazo de homología 3' para la recombinación homóloga en las células ES de ratón. El fragmento NotI/Ascl de este BAC se ligaba entonces en un ratón modificado genéticamente BAC 302g12, que contenía un casete de neomicina con sitios FRT y aproximadamente 23 kb de secuencia genómica corriente arriba del locus κ endógeno para la recombinación homóloga en células ES de ratón.

### B. Vector de direccionamiento de Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada (Figura 1)

Los sitios de restricción enzimática se introdujeron en los extremos 5' y 3' de una inserción de cadena ligera modificada para la clonación en un vector de direccionamiento; un sitio Ascl en el extremo 5' y un sitio PI-SceI en el extremo 3'. Con el sitio Ascl 5' y el sitio PI-SceI 3' la construcción dirigida de 5' a 3' se incluía un brazo de homología 5' que contenía una secuencia 5' del locus de cadena ligera κ de ratón que se obtiene del clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con sitios FRT, una secuencia genómica que incluye un promotor Vk3-15 humano, una secuencia líder del segmento genético variable Vk3-7 de ratón, una secuencia de intrón del segmento genético variable Vk3-7 de ratón, una fase de lectura abierta de una región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón Jk-Ck humano, y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia 30 del segmento genético Jk5 endógeno de ratón del clon BAC 254m04 de ratón (Figura 1, en el centro). Los genes y/o secuencias corriente arriba el locus de cadena ligera κ endógeno de ratón y corriente abajo de la mayoría del segmento genético Jk 3' (por ejemplo, el amplificador 3' endógeno) no se modificaban por la construcción dirigida (véase la Figura 1). La secuencia del locus Vk1-39Jk5 humano modificado genéticamente se muestra en la SEC ID N° 1.

La inserción dirigida de región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada en el ADN BAC se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores localizados en las secuencias de la región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia de intrón 3' de la secuencia líder Vk3-7 de ratón se confirmó con los cebadores ULC-m1F (AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG; SEC ID N° 2) y ULC-m1R (TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA; SEC ID N° 3). La fase de lectura abierta de la región Vk1-39 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1633-h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGCA; SEC ID N° 4) y 1633-h2R (TGCAAAGTGG ATGCAGCATAG; SEC ID N° 5). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (GGTGGAGAGG CTATTCGGC; SEC ID N° 6) y neoR (GAACACGGCG GCATCAG; SEC ID N° 7). El ADN BAC dirigido se utilizó entonces para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricas que expresan una región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones celulares ES positivos se confirmaron por selección TAQMAN™ y cariotipaje utilizando sondas específicas para la región de cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada insertada en el locus endógeno. En resumen, la sonda neoP (TGGGCACAACAGACAATCGG CTG; SEC ID N° 8) que se une con el gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (CCATTATGATGCTCCATGCC TCTCTGTTC; SEC ID N° 9) que se une con la secuencia del intrón 3' a la secuencia líder Vk3-7 de ratón, y la sonda 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT; SEC ID N° 10) que se une con la fase de lectura abierta Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada. Los clones

celulares ES positivos se utilizaron entonces para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresaban la región de cadena ligera Vk1-39Jk5 de la línea germinal.

De manera alternativa, las células ES que contienen la región de cadena ligera Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada se transfectaron con una construcción que expresa FLP con el fin de retirar el casete de neomicina con el sitio FRT que se introduce por la construcción dirigida. Opcionalmente, el casete de neomicina se elimina cruzando los ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

### 10 C. Vector de direccionamiento de Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada (Figura 2)

De manera similar, un locus de cadena ligera modificado genéticamente que exprese una región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada se produjo utilizando una construcción dirigida que incluye, desde 5' a 3', un brazo de homología 5' que contiene una secuencia 5' del locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno de ratón que se obtiene de un clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con sitio FRT, una secuencia genómica que incluye el promotor Vk3-15 humano, una secuencia líder del segmento genético variable Vk3-7 de ratón, una secuencia intrón del segmento genético variable Vk3-7 de ratón, una fase de lectura abierta de una región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón Jk-Ck humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia 30 del segmento genético Jk5 endógeno del ratón que se obtiene de un clon BAC 254m04 de ratón (Figura 2, en el centro). La secuencia del locus Vk3-20Jk1 humano modificado genéticamente se muestra en la SEC ID N° 11.

La inserción dirigida de la región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada en el ADN BAC se confirmó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores localizados en secuencias de la región de cadena ligera Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia de intrón 3' de la secuencia líder Vk3-7 del ratón se confirmó con cebadores ULCm1 F (SEC ID N° 2) y ULC-m1 R (SEC ID N° 3). La fase de lectura abierta de la región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; SEC ID N° 12) y 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; SEC ID N° 13). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEC ID N° 6) y neoR (SEC ID N° 7). El ADN BAC dirigido se utilizó entonces para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que generaban ratones quiméricos que expresen la cadena ligera Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones celulares ES positivos se confirmaron por selección Taqman™ y cariotipaje utilizando sondas específicas para la región de cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada insertada en el locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno. En resumen, la sonda neoP (SEC ID N° 8) que se une con el gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (SEC ID N° 9) que se une en la secuencia líder Vk3-7 de ratón, y la sonda 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG; SEC ID N° 14) que se une con la fase de lectura abierta Vk3-20Jk1 humana. Los clones ES positivos se utilizaron entonces para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresan la región de cadena ligera Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana.

De manera alternativa, las células ES que contienen la región de cadena ligera Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana se puede transfectar con una construcción que exprese FLP con el fin de eliminar el casete de neomicina con sitio FRT introducido por la construcción dirigida. Opcionalmente el casete de neomicina se puede eliminar cruzando los ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

### D. Vector de direccionamiento de VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada (Figura 3)

De manera similar, un locus de cadena ligera modificado genéticamente que exprese una región VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada se produjo utilizando una construcción dirigida que incluye, desde 5' a 3', un brazo de homología 5' que contiene una secuencia 5' del locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno de ratón que se obtiene de un clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con sitio FRT, una secuencia genómica que incluye el promotor Vk3-15 humano, una secuencia líder del segmento genético variable Vk3-7 de ratón, una secuencia intrón del segmento genético variable Vk3-7 de ratón, una fase de lectura abierta de una región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón Jk-Ck humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia 30 del segmento genético Jk5 endógeno del ratón que se obtiene de un clon BAC 254m04 de ratón (Figura 3, en el centro). La secuencia del locus Vk3-20Jk1 humano modificado genéticamente se muestra en la SEC ID N° 15.

La inserción dirigida de la región VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada en el ADN BAC se confirmó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores localizados en secuencias de la región de cadena ligera VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia de intrón 3' de la secuencia líder Vk3-7 del ratón se confirmó con cebadores ULCm1 F (SEC ID N° 2) y ULC-m1 R (SEC ID N° 3). La fase de lectura abierta de la región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1616-h1F (TGTCCTCGGC CCTTGA; SEC ID N° 16) y 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCT; SEC

ID N° 17). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEC ID N° 6) y neoR (SEC ID N° 7). El ADN BAC dirigido se utilizó entonces para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que generaban ratones quiméricos que expresen la cadena ligera VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada.

5 Los clones celulares ES positivos se confirmaron por selección TAQMAN™ y cariotipaje utilizando sondas específicas para la región de cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada insertada en el locus de cadena ligera κ endógeno. En resumen, la sonda neoP (SEC ID N° 8) que se une con el gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (SEC ID N° 9) que se une en la secuencia líder Vk3-7 de ratón, y la sonda 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTGGTTCCT; SEC ID N° 17) que se une con la fase de lectura abierta VpreBJλ5 humana. Los clones ES positivos  
10 se utilizaron entonces para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresan la región de cadena ligera Vk3-20Jk1 de la línea germinal.

De manera alternativa, las células ES que contienen la región de cadena ligera VpreBJλ5 de la línea germinal humana se puede transfectar con una construcción que exprese FLP con el fin de eliminar el casete de neomicina con sitio FRT introducido por la construcción dirigida. Opcionalmente el casete de neomicina se puede eliminar cruzando los ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

### 20 **Ejemplo 3. Generación de ratones que expresan una única cadena ligera de la línea germinal humana reordenada**

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se utilizaron como células ES donantes y se introducen en embriones de ratón en estadio de 8 células por el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N° 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 VELOCIMICE®  
25 contenían independientemente una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana modificada, una región de cadena ligera Vk3-20Jk1 o una región de cadena ligera VpreBJλ5 se identificaron por genotipaje utilizando un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detecta la presencia de la única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

30 Las crías se genotipan y se seleccionan las crías heterocigotas para la única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada para caracterización de la expresión de la región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

### 35 **Ejemplo 4. Cruzamiento de ratones que expresan una única cadena ligera de la línea germinal humana reordenada**

#### **A. Anulación (KO) de Igλ endógena.**

40 Para optimizar el uso del locus de cadena ligera modificada, los ratones que contenían una de las regiones de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se cruzan con otro ratón que contiene una eliminación en el locus de cadena ligera λ endógeno. De esta manera la progenie obtenida expresará, como su única cadena ligera, la región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada como se ha descrito en el Ejemplo 2. El cruzamiento se lleva a cabo por técnicas de referencia reconocidas en la técnica y, de manera alternativa, por un criador comercial (por ejemplo, The Jackson Laboratory). Las cepas de ratón que contienen un locus de cadena ligera modificada y una eliminación del locus de cadena ligera λ endógeno se seleccionan por la presencia de la  
45 única región de cadena ligera y la ausencia de las cadenas ligeras λ endógenas del ratón.

#### **B. Locus endógeno humanizado de cadena pesada**

50 Los ratones que contienen un locus de cadena ligera de la línea germinal humana modificado genéticamente se cruzan con ratones que contienen una sustitución del locus del gen variable de cadena pesada endógeno de ratón con el locus genético variable de cadena pesada humana (véase, el documento 6.596.541; the VELOCIMMUNE® mouse, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). El ratón VELOCIMMUNE® comprende un genoma que comprende un  
55 genoma que comprende regiones variables de cadena pesada humanas unidas operativamente a loci de región constante endógena del ratón tal que el ratón produce anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada humana y una región constante de cadena pesada de ratón en respuesta a una estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos se aísla y está unido operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada humanas. El ADN se expresa entonces en una célula capaz de expresar la cadena pesada completamente humana del anticuerpo.

60 Se obtienen ratones que contienen una sustitución del locus VH endógeno de ratón con el locus VH humano y una única región VL 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 (VH humana y VL de ratón) con una única cadena humana ligera (VL humana y CL de ratón) tras la inmunización con un antígeno de interés. Las secuencias de nucleótidos VH y VL de las células B que expresan los anticuerpos se identifican y los

anticuerpos completamente humanos se producen por la fusión de las secuencias de nucleótidos VH y VL con las secuencias de nucleótidos CH y CL humanas en un sistema de expresión adecuado.

**Ejemplo 5. Generación de anticuerpos de ratones que expresan cadenas pesadas humanas y una región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada**

Tras cruzar los ratones que contienen la región de cadena ligera humana modificada con varias cepas deseadas que contienen modificaciones y eliminaciones de otros loci de Ig endógena (como se describe en el Ejemplo 4), se pueden inmunizar los ratones seleccionados con un antígeno de interés.

En general, un ratón VELOCIMMUNE® que contiene una de las regiones únicas de cadena ligera de la línea germinal humana reordenadas se desafía con un antígeno, y se recuperan las células linfáticas (tal como las células B) del suero de los animales. Las células linfáticas se fusionan con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares inmortales de hibridoma, y tales líneas celulares de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos que contienen variables de cadena pesada humana y cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas que son específicas contra el antígeno que se utilizó para la inmunización. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y la cadena ligera se aíslan y se unen a regiones constantes isotípicas de la cadena pesada y la cadena ligera. Debido a la presencia de las secuencias endógenas de ratón y cualquiera de los elementos que actúan cis adicionales presentes en el locus endógeno, la única cadena ligera de cada anticuerpo se mutar somáticamente. Esto añade una diversidad adicional al repertorio específico del antígeno que comprende una única cadena ligera y secuencias de cadena pesada distintas. Las secuencias de anticuerpo clonadas resultantes se expresan posteriormente en una célula, tal como una célula CHO. De manera alternativa, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos del antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se identifican directamente a partir de los linfocitos específicos del antígeno.

Inicialmente, se aíslan los anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se describe anteriormente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan según sus características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se sustituyen con una región constante humana deseada para generar un anticuerpo completamente humano que contiene una cadena pesada humana mutada somáticamente y una única cadena ligera derivada de una región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada de la invención. Las regiones constantes humanas adecuadas incluyen, por ejemplo, IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificadas.

Se inmunizaron distintas cohortes de ratones VELOCIMMUNE® que contenían una sustitución del locus endógeno de ratón de cadena pesada con segmentos genéticos V, D, y J humanos y una sustitución del locus de cadena ligera  $\kappa$  con la región de cadena ligera Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana modificada o la región de la cadena ligera Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana (descritas anteriormente) con una proteína de receptor de superficie celular humano (Antígeno E). El antígeno E se administra directamente en la almohadilla plantar de los ratones con seis proteínas (Antígeno E). El antígeno E se administra directamente en la almohadilla plantar del ratón con seis inyecciones consecutivas cada 3-4 días. Se mezclaron dos a tres microgramos de Antígeno E con 10  $\mu\text{g}$  de oligonucleótido CpG (nº de Cat. tIrl-modn - oligonucleótido ODN1826; InVivogen, San Diego, CA) y 25  $\mu\text{g}$  de Adju-Phos (gel adyuvante de fosfato de aluminio, nº Cat. H-71639-250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) antes de la inyección. Se pusieron un total de seis inyecciones antes del refuerzo con antígeno final, que se ponía 3-5 días antes del sacrificio. Se recolectaron extracciones de sangre tras la 4ª y 6ª inyección y se controló la respuesta inmunitaria de anticuerpos por inmunoensayo específico del antígeno de referencia.

Cuando se consigue una respuesta inmunitaria deseada se recolectan los esplenocitos 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 exploran y seleccionan para identificar las líneas celulares que producen anticuerpos con cadenas ligeras comunes específicas del Antígeno E. Utilizando esta técnica, se obtienen varios anticuerpos con cadena ligera común específicos anti-Antígeno E (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de cadena pesada humanos, el mismo dominio de cadena ligera humana, y dominios constantes de ratón).

De manera alternativa, se aíslan directamente anticuerpos anti-Antígeno E de cadena ligera común a partir de células B positivas al antígeno sin fusión a células de mieloma, como se describe en el documento U.S. 2007/0280945A1. Utilizando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-Antígeno E de cadena ligera común completamente humana (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de cadena pesada completamente humanos, o bien una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 humana modificada o una región de cadena ligera Vk3-20Jk1 humana modificada, y dominios constantes humanos).

Las propiedades biológicas de los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E que se genera de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen con detalle en las secciones que se exponen posteriormente.



**Ejemplo 6. Utilización del segmento genético de cadena pesada en anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno**

5 Para analizar la estructura de los anticuerpos humanos con cadena ligera común anti-Antígeno E que se producen, se clonaron y secuenciaron los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo. A partir de las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos previstas de los anticuerpos, se identificó la utilización genética para la región variable de cadena pesada (HCVR) de anticuerpos seleccionados con cadena ligera común que se obtenían a partir de ratones VELOCIMMUNE® que contenían o bien la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana modificada o la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 humana modificada. Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4, que demuestran que los ratones de acuerdo con la invención generan anticuerpos con una cadena ligera común específica de antígeno a partir una variedad de segmentos genéticos humanos de cadena pesada, debido a una variedad de reordenamientos, cuando se emplean o un ratón que expresa una cadena ligera derivada de solo Vκ1-39 humana o una cadena ligera derivada de Vκ3-20 humana. Los segmentos genéticos V<sub>H</sub> humanos de las 2, 3, 4 y 5 familias reordenadas con una variedad de segmentos D<sub>H</sub> humanos y segmentos J<sub>H</sub> humanos producen anticuerpos específicos del antígeno.

<b>Tabla 3</b>			
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vκ1-39Jκ5 común</b>			
<b>Anticuerpo</b>	<b>HCVR</b>		
	<b>V<sub>H</sub></b>	<b>D<sub>H</sub></b>	<b>J<sub>H</sub></b>
2952	2-5	6-6	1
3022	3-23	3-10	4
3028	3-23	3-3	4
2955	3-30	6-6	1
3043	3-30	6-6	3
3014	3-30	1-7	4
3015	3-30	1-7	4
3023	3-30	1-7	4
3024	3-30	1-7	4
3032	3-30	1-7	4
3013	3-30	5-12	4
3042	3-30	5-12	4
2985	3-30	6-13	4
2997	3-30	6-13	4
3011	3-30	6-13	4
3047	3-30	6-13	4
3018	3-30	6-6	4
2948	3-30	7-27	4
2987	3-30	7-27	4
2996	3-30	7-27	4
3005	3-30	7-27	4
3012	3-30	7-27	4
3020	3-30	7-27	4
3021	3-30	7-27	4
3025	3-30	7-27	4

<b>Tabla 3</b>			
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común</b>			
<b>Anticuerpo</b>	<b>HCVR</b>		
	<b>V<sub>H</sub></b>	<b>D<sub>H</sub></b>	<b>J<sub>H</sub></b>
3030	3-30	7-27	4
3036	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5
2949	3-30	6-6	5
2950	3-30	6-6	5
2954	3-30	6-6	5
2978	3-30	6-6	5
3016	3-30	6-6	5
3017	3-30	6-6	5
3033	3-30	6-6	5
3041	3-30	6-6	5
3004	3-30	7-27	5
3010	4-59	3-16	3
3019	4-59	3-16	3
2964	4-59	3-22	3
3027	4-59	3-16	4
3046	5-51	5-5	3

<b>Tabla 4</b>			
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk3-20Jk1 común</b>			
<b>Anticuerpo</b>	<b>HCVR</b>		
	<b>V<sub>H</sub></b>	<b>D<sub>H</sub></b>	<b>J<sub>H</sub></b>
2968	4-39	1-26	3
2975	5-51	6-13	5
2972	5-51	3-16	6

**Ejemplo 7. Determinación de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno por ensayo Luminex™**

- 5 Se ensayaron noventa y ocho anticuerpos con cadena ligera común humanos que se producían contra el Antígeno E en cuanto a su capacidad para bloquear la unión de ligando natural del antígeno E (Ligando Y) al antígeno E en un ensayo basado en perlas.
- 10 Se conjugó el dominio extracelular (ECD) del antígeno E con dos marcadores de epítipo myc y un marcador 6x histidina (Antígeno E-mmH) y se acoplaron mediante grupo amino a las microsferas carboxiladas a una concentración de 20 µg/ml en tampón MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente seguido por la desactivación de las perlas con Tris 1 M a pH 8,0 seguido por lavado en PBS con un 0,05 % (v/v) de Tween-20. Luego se bloquearon las perlas con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía un 2 % (p/v) de BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa filtro de 96 pocillos, se diluyeron 1:15 los sobrenadantes que
- 15 contenían los anticuerpos con cadena ligera común específicas del Antígeno E, en el tampón. Se preparó un control

negativo que contenía un sobrenadante falso con los mismos componentes de los medios como sobrenadante de anticuerpo. Se añadieron perlas marcadas con antígeno E a los sobrenadantes y se incubaron durante una noche a 4 °C. Se añadió proteína Ligando Y biotinilada a una concentración final de 0,06 M y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Se determinó la unión del ligando Y biotinilado a las perlas marcadas con Antígeno E-myc-myc-6His con R-Ficoeritrina conjugada con Estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD) seguido por la medición con un analizador basado en citometría de flujo Luminex™. Se retó La intensidad de fluorescencia media de fondo (MFI) de una muestra sin Ligando Y de todas las muestras. Se calculó el porcentaje de bloqueo dividiendo la resta de la MFI 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 ensayaron los mismo 98 anticuerpos con cadena ligera común humanos que se producen contra el Antígeno E en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a perlas marcadas con Ligando Y.

En resumen, el Ligando Y acoplado por el grupo amino a microesferas carboxiladas a una concentración de 20 µg/ml diluidas en tampón MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente seguido por la desactivación de las perlas con Tris 1 M a pH 8 y luego se lavó con PBS con 0,05 % (v/v) de Tween-20. Luego se bloquearon las con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía un 2 % p/v) de BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa filtro de 96 pocillos, se diluyeron 1:15 en tampón los sobrenadantes que contenían anticuerpos con cadena ligera común específica de Antígeno E. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante falso con los mismos componentes del medio como sobrenadante de anticuerpo. Se añadió mmH-Antígeno E biotinilado a una concentración final de 0,42 nM y se incubó durante una noche a 4 °C. Las perlas marcadas con Ligando Y se añadieron entonces a la mezcla de anticuerpo/Antígeno E y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La detección de la unión de mmH-Antígeno E biotinilado con perlas con Ligando E se determinó con R-Ficoeritrina conjugada con Estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD) seguido por la medición con un analizador basado en citometría de flujo Luminex™. Se restó la intensidad de fluorescencia media de fondo (MFI) de una muestra sin Antígeno E de todas las muestras. Se calculó el porcentaje de bloqueo dividiendo la resta de la MFI del fondo de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante de 100.

Las Tablas 5 y 6 muestran el porcentaje de bloqueo del os 98 anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E ensayadas en ambos ensayos Luminex™. ND: no determinado bajo las condiciones experimentales en curso.

En el primer experimento Luminex™ descrito anteriormente, se ensayaron 80 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Ligando Y a las perlas marcadas con Antígeno E. De estos 80 anticuerpos con cadena ligera común, 68 demostraban > 50 % de bloqueo, mientras que 12 demostraban < 50 % de bloqueo (6 con 25-50 % de bloqueo y 6 con < 25 % de bloqueo). Para los 18 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada, 12 demostraban > 50 % de bloqueo, mientras que 6 demostraban < 50 % de bloqueo (3 el 25-50 % de bloqueo y 17 con < 25 % de bloqueo) de la unión del ligando Y a las perlas marcadas con Antígeno E.

En el segundo experimento Luminex™ descrito anteriormente, se ensayaron los mismos 80 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada en cuanto a su capacidad de unión del Antígeno E a perlas marcadas con Ligando Y. De estos 80 anticuerpos con cadena ligera común, 36 demostraron > 50 % de bloqueo (27 con un 25-50 % de bloqueo y 17 con < 25 % de bloqueo). Para los 18 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada, 1 demostraba > 50 % de bloqueo, mientras que < 50 % de bloqueo (5 con el 25-50 % de bloqueo y 12 con < 25 % de bloqueo) de unión del Antígeno E a las perlas marcadas con Ligando Y.

Los datos de las tablas 5 y 6 establecen que los reordenamientos descritos en las Tablas 3 y 4 generan anticuerpos con cadena ligera común específica del Antígeno E que bloquean la unión del Ligando Y a su receptor equivalente Antígeno E con varios grados de eficacia, lo que es consistente con los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E de las tablas 3 y 4 que comprende anticuerpos con especificidad de epítipo solapada o no solapada con respecto al antígeno E.

Tabla 5		
Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común		
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

<b>Tabla 5</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vκ1-39Jκ5 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E</b>	<b>% de bloqueo de Antígeno E en solución</b>
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	17,5	15,4

<b>Tabla 5</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vκ1-39Jκ5 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E</b>	<b>% de bloqueo de Antígeno E en solución</b>
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

<b>Tabla 5</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vκ1-39Jκ5 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E</b>	<b>% de bloqueo de Antígeno E en solución</b>
3036	74,7	32,7
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

<b>Tabla 6</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vκ3-20Jκ1 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E</b>	<b>% de bloqueo de Antígeno E en solución</b>
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

**Ejemplo 8. Determinación de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno por ELISA**

5 Los anticuerpos con cadena ligera común humanos que aparecen contra al Antígeno E se ensayaron en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a una superficie revestida con el Ligando Y en un ensayo ELISA.

10 Se revistió con Ligando Y placas de 96 pocillos a una concentración de 2 µg/ml en PBS y se incubaron durante una noche seguido por el lavado 4 veces con PBS con un 0,05 % de Tween-20. La placa se bloqueó entonces con PBS

(Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía un 0,5 % (p/v) de BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) durante una hora a temperatura ambiente. En una placa distinta se diluyeron 1:10 los sobrenadantes que contenían anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E en tampón. Se utilizó un sobrenadante falso con los mismos componentes que los anticuerpos como control negativo. Se añadió Antígeno E-mmH (descrito anteriormente) a una concentración final de 0,150 nM y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla de anticuerpo/Antígeno E-mmH se añadió entonces a la placa que contenía el Ligando Y y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La detección del Antígeno E-mmH unido al Ligando Y se determinó con una peroxidasa de rábano rusticano (HRP) conjugada con un anticuerpo anti-Penta-His (Qiagen, Valencia, CA) y se desarrolló por respuesta colorimétrica de referencia utilizando un sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Jose, CA) neutralizado por ácido sulfúrico. Se leyó la absorbancia a una DO450 durante 0,1 s. Se restó la absorbancia de fondo de una muestra sin Antígeno E de todas las muestras. Se calculó el porcentaje de bloqueo dividiendo la MFI con el fondo sustraído de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor del resultado de 100.

15 Las Tablas 7 y 8 muestran el porcentaje de bloqueo de los 98 anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E ensayados en el ensayo ELISA. ND: no determinado bajo las condiciones experimentales en curso.

20 Como se describe en el presente Ejemplo, de los 80 anticuerpos con cadena ligera común que contenían una cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada que se ensayaron en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a una superficie revestida con Ligando Y, 22 demostraron > 50 % de bloqueo, mientras que 58 demostraron < 50 % de bloqueo (20 con un 25-50 % de bloqueo y 38 con < 25 % de bloqueo). Para los 18 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada, 1 demostraba > 50 % de bloqueo, mientras que 17 demostraban < 50 % de bloqueo (5 con 25-50 % de bloqueo y 12 < 25 % de bloqueo) de la unión del Antígeno E a la superficie revestida con el Ligando Y.

25 Estos resultados también son consistentes con el grupo de anticuerpos con cadena ligera común específica de Antígeno E que comprende anticuerpos que especificidad de epítipo solapada o no solapada con respecto al Antígeno E.

<b>Tabla 7</b>	
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común</b>	
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo del Antígeno E en solución</b>
2948	21,8
2948G	22,9
2949	79,5
2949G	71,5
2950	80,4
2950G	30,9
2952	66,9
2952G	47,3
2954	55,9
2954G	44,7
2955	12,1
2955G	25,6
2964	34,8
2964G	47,7
2978	90,0
2978G	90,2
2982	59,0
2982G	20,4

<b>Tabla 7</b>	
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común</b>	
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo del Antígeno E en solución</b>
2985	10,5
2985G	ND
2987	31,4
2987G	ND
2996	29,3
2996G	ND
2997	48,7
2997G	ND
3004	16,7
3004G	3,5
3005	87,2
3005G	54,3
3010	74,5
3010G	84,6
3011	19,4
3011G	ND
3012	45,0
3012G	12,6
3013	39,0
3013G	9,6
3014	5,2
3014G	17,1
3015	23,7
3015G	10,2
3016	78,1
3016G	37,4
3017	61,6
3017G	25,2
3018	40,6
3018G	14,5
3019	94,6
3019G	92,3
3020	80,8
3020G	ND
3021	7,6



<b>Tabla 7</b>	
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común</b>	
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo del Antígeno E en solución</b>
3021G	20,7
3022	2,4
3022G	15,0
3023	9,1
3023G	19,2
3024	7,5
3024G	15,2
3025	ND
3025G	13,9
3027	61,4
3027G	82,7
3028	40,3
3028G	12,3
3030	ND
3030G	9,5
3032	ND
3032G	13,1
3033	77,1
3033G	32,9
3036	17,6
3036G	24,6
3041	59,3
3041G	30,7
3042	39,9
3042G	16,1
3043	57,4
3043G	46,1

<b>Tabla 8</b>	
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk3-20Jk1 común</b>	
<b>Anticuerpo</b>	<b>% de bloqueo del Antígeno E en solución</b>
2968	68,9
2968G	15,2
2969	10,1
2969G	23,6

Tabla 8	
Anticuerpos con cadena ligera Vκ3-20Jκ1 común	
Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en solución
2970	34,3
2970G	41,3
2971	6,3
2971G	27,1
2972	9,6
2972G	35,7
2973	20,7
2973G	23,1
2974	ND
2974G	22,0
2975	8,7
2975G	19,2
2976	4,6
2976G	26,7

**Ejemplo 9. Determinación de afinidad por BIAcore™ para los anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno**

5 Se determinaron las constantes de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) para sobrenadantes con anticuerpos seleccionados por SPR (Resonancia de plasmones superficiales) utilizando un dispositivo T100 BIAcore™ (GE Healthcare). Todos los datos se obtuvieron utilizando HBS-EP (10 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 0,3 mM de EDTA, un 0,05 % de Tensioactivo P20, pH 7,4) tanto los tampones de ejecución y de muestras, a 25 °C. Los anticuerpos se capturaron de las muestras de sobrenadante brutas sobre una superficie de un chip sensor CM5 derivado previamente con una alta densidad de anticuerpos anti-Fc humano utilizando química de acoplamiento a grupos amino de referencia.

10 Durante la etapa de captura, se inyectaron los sobrenadantes a través de la superficie anti-Fc humano con una tasa de flujo de 3  $\mu$ l/min, durante un total de 3 minutos. La etapa de captura continuaba con una inyección de o bien el tampón de ejecución o el analito a una concentración de 100 nM durante 2 minutos con una tasa de flujo de 35  $\mu$ l/min. La disociación del antígeno del anticuerpo capturado se controló durante 6 minutos. El anticuerpo capturado se eliminó con una breve inyección de glicina 10 mM, pH 1,5. Todos los sensogramas se referenciaron doblemente restando los sensogramas de las inyecciones de tampón de los sensogramas de analito, eliminando de esta manera los artefactos producidos por la disociación del anticuerpo de la superficie de captura. Los datos de la unión de cada anticuerpo se ajustó a un modelo de unión 1:1 con transporte de masa utilizando el software de evaluación T100 de BIAcore v2.1. Los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

20 Las afinidades de unión de los anticuerpos con cadena ligera común comprenden los reordenamientos que se muestran en las Tablas 3 y 4 varían, mostrando casi todos una  $K_D$  en el intervalo nanomolar. Los datos de afinidad son consistentes con los anticuerpos con cadena ligera común que resultan de la asociación combinatoria de dominios variables reordenados descritos en las Tablas 3 y 4 que son de alta afinidad, seleccionados por clones, y mutados somáticamente. Emparejados con los datos mostrados previamente, los anticuerpos con cadena ligera común descritos en las Tablas 3 y 4 comprenden una colección de distintos anticuerpos de alta afinidad que

25 muestran especificidad para uno o más epítomos en el Antígeno E.

<b>Tabla 9</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>100 nM de Antígeno E</b>	
	<b>K<sub>D</sub> (nM)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> (min)</b>
2948	8,83	28
2948G	95,0	1
2949	3,57	18
2949G	6,37	9
2950	4,91	17
2950G	13,6	5
2952	6,25	7
2952G	7,16	4
2954	2,37	24
2954G	5,30	9
2955	14,4	6
2955G	12,0	4
2964	14,8	6
2964G	13,0	9
2978	1,91	49
2978G	1,80	58
2982	6,41	19
2982G	16,3	9
2985	64,4	9
2985G	2,44	8
2987	21,0	11
2987G	37,6	4
2996	10,8	9
2996G	24,0	2
2997	7,75	19
2997G	151	1
3004	46,5	14
3004G	1,93	91
3005	2,35	108
3005G	6,96	27
3010	4,13	26
3010G	2,10	49

<b>Tabla 9</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>100 nM de Antígeno E</b>	
	<b>K<sub>D</sub> (nM)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> (min)</b>
3011	59,1	5
3011 G	41,7	5
3012	9,71	20
3012G	89,9	2
3013	20,2	20
3013G	13,2	4
3014	213	4
3014G	36,8	3
3015	29,1	11
3015G	65,9	0
3016	4,99	17
3016G	18,9	4
3017	9,83	8
3017G	55,4	2
3018	11,3	36
3018G	32,5	3
3019	1,54	59
3019G	2,29	42
3020	5,41	39
3020G	41,9	6
3021	50,1	6
3021 G	26,8	4
3022	25,7	17
3022G	20,8	12
3023	263	9
3023G	103	5
3024	58,8	7
3024G	7,09	10
3025	35,2	6
3025G	42,5	8
3027	7,15	6
3027G	4,24	18
3028	6,89	37

<b>Tabla 9</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>100 nM de Antígeno E</b>	
	<b>K<sub>D</sub> (nM)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> (min)</b>
3028G	7,23	22
3030	46,2	7
3030G	128	3
3032	53,2	9
3032G	13,0	1
3033	4,61	17
3033G	12,0	5
3036	284	12
3036G	18,2	10
3041	6,90	12
3041 G	22,9	2
3042	9,46	34
3042G	85,5	3
3043	9,26	29
3043G	13,1	22

<b>Tabla 10</b>		
<b>Anticuerpos con cadena ligera Vk3-20Jk1 común</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>100 nM de Antígeno E</b>	
	<b>K<sub>D</sub> (nM)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> (min)</b>
2968	5,50	8
2968G	305	0
2969	34,9	2
2969G	181	1
2970G	12,3	3
2971G	32,8	22
2972	6,02	13
2972G	74,6	26
2973	5,35	39
2973G	11,0	44
2974	256	0
2974G	138	0
2975	38,0	2

Tabla 10		
Anticuerpos con cadena ligera Vk3-20Jk1 común		
Anticuerpo	100 nM de Antígeno E	
	K <sub>D</sub> (nM)	T <sub>1/2</sub> (min)
2975G	134	1
2976	6,73	10
2976G	656	8

**Ejemplo 10. Determinación de especificidades de unión de anticuerpos con cadena ligera común específica de antígeno por ensayo Luminex™**

- 5 Se ensayaron los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E en cuanto a su capacidad para unirse al ECD del Antígeno E y variantes de ECD Antígeno E, que incluyen el ortólogo de mono *Cynomolgus* (*Mf* Antígeno E), que se diferencia de la proteína humana en aproximadamente el 10 % de sus restos de aminoácidos; una eliminación mutante de Antígeno E que carece de los últimos 10 aminoácidos del extremo C del ECD (Antígeno E-ΔCT); y dos mutantes que contenían una sustitución de alanina en localizaciones sospechosas de interacción con el
- 10 Ligando Y (Antígeno E-Ala1 y Antígeno E-Ala2). Las proteínas de Antígeno E se produjeron en células CHO que contenían cada una un marcador myc-myc-His en el extremo C.

15 Para los estudios de unión, se capturó la proteína Antígeno E ECD o una variante de la proteína (descrito anteriormente) de 1 ml de medio de cultivo por incubación durante 2 h a temperatura ambiente con  $1 \times 10^6$  perlas microesféricas (Luminex™) revestidas covalentemente con un anticuerpo monoclonal anti-myc (MAb 9E10, línea celular de hibridoma CRL-1729™; ATCC, Manassas, VA).

20 Las perlas se lavaron entonces con PBS antes de su uso. Los sobrenadantes que contenían los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E se diluyeron 1:4 en tampón y se añadieron a placas filtro de 96 pocillos. Un sobrenadante falso sin anticuerpo se utilizó como control negativo. Las perlas que contenían las proteínas de Antígeno E capturado se añadieron entonces a las muestras de anticuerpo (3000 perlas por pocillo) y se incubaron durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las perlas de muestra se lavaron y se detectó la unión de anticuerpos con cadena ligera común con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con R-ficoeritina. La intensidad de fluorescencia de las perlas (aproximadamente se contaron 100 perlas para cada muestra de anticuerpo unido a cada

25 proteína de Antígeno E) se midió con un analizador basado en citometría Luminex™, y se registró la intensidad media de fluorescencia (MFI) para al menos 100 perlas que se contaron por interacción perla/anticuerpo. Los resultados se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11					
Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común					
Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	<i>Mf</i> Antígeno E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499

Tabla 11					
Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común					
Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E- $\Delta$ CT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Mf Antígeno E
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
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
3011 G	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
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

Tabla 11					
Anticuerpos con cadena ligera Vk1-39Jk5 común					
Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E- $\Delta$ CT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Mf Antígeno E
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
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519



Tabla 11					
Anticuerpos con cadena ligera Vκ1-39Jκ5 común					
Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Mf Antígeno E
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

Tabla 12					
Anticuerpos con cadena ligera Vκ3-20Jκ1 común					
Anticuerpo	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 con anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E mostraban una unión altamente específica a las perlas unidas al Antígeno E-ECD. En estas perlas, el sobrenadante falso de control negativo daba como resultado una señal insignificante ( $< 10$  MFI) cuando se combina con la muestra de perlas con el Antígeno E-ECD, mientras que los sobrenadantes que contenían anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E mostraban una fuerte señal de unión (MFI media de 2627 para los 98 sobrenadantes con anticuerpo; MFI  $> 500$  para 91/98 muestras de anticuerpo).
- 5
- 10 Como se mide en cuanto a la capacidad de los anticuerpos seleccionados con cadena ligera común anti-Antígeno E, se determinó la unión relativa de los anticuerpos con las variantes. Las cuatro variantes de Antígeno E cuando se capturaron con perlas Luminex™ anti-myc como se describe anteriormente para los estudios de unión con el Antígeno E-ECD nativo, y se determinaron las relaciones de unión relativas ( $MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}}$ ). Para los 98 sobrenadantes con anticuerpos con cadena ligera común que se muestran en las Tablas 11 y 12, las relaciones medias ( $MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}}$ ) son diferentes para cada variante, probablemente reflejando diferentes cantidades de captura de las proteínas en las perlas (relaciones medias de 0,61, 2,9, 2,0, y 1,0 para Antígeno E-ΔCT, Antígeno E-Ala1, Antígeno E-Ala2 y Mf Antígeno E, respectivamente). Para cada variante de proteína, la unión
- 15

para un subgrupo de los 98 anticuerpos con cadena ligera común ensayados mostraba una unión muy reducida, indicando la sensibilidad de la mutación que caracterizaba una variante determinada. Por ejemplo, 19 de las muestras de anticuerpo con cadena ligera común del *Mf* Antígeno E con  $MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}} < 8\%$ . Mientras que muchos de estos grupos incluyen anticuerpos con una afinidad alta o moderadamente alta (5 con  $K_D < 5$  nM, 15 con  $K_D < 50$  nM), es probable que la señal más baja para este grupo sea como resultado de la sensibilidad a las diferencias de secuencia (epítipo) entre el Antígeno E-ECD nativo u una variante determinada más que por afinidades más bajas.

Estos datos establecen que los anticuerpos con cadena ligera común descritos en las Tablas 3 y 4 representan además un grupo diverso de anticuerpos con cadena ligera común específicos de Antígeno E que reconocen específicamente más de un epítipo sobre el Antígeno E.

### Aspectos de la divulgación

(1) Un ratón, que comprende:

(a) una sustitución del locus endógeno de ratón de la región variable de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina en todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos endógenos de ratón de la región variable de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina por un segmento genético V $\kappa$ 1-39/J humano, un segmento genético V $\kappa$ 3-20/J humano, o una combinación de los mismos, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante  $\kappa$  de ratón; y,

(b) una sustitución de todos o sustancialmente todos los locus genéticos endógenos de ratón de la región variable de cadena pesada por una pluralidad de segmentos genéticos de la región variable de cadena pesada humana, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidos operativamente a un gen constante de cadena pesada de ratón, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenarse y formar un gen de cadena pesada quimérica humano/de ratón reordenado.

(2) El ratón de (1), donde el ratón carece de locus endógeno de ratón de la región variable de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina que es capaz de reordenarse y formar un gen que codifica una región variable  $\kappa$  de ratón.

(3) El ratón de (1), que comprende adicionalmente un amplificador  $\kappa$  intrónico de ratón 5' con respecto a la región constante de cadena ligera de ratón.

(4) El ratón de (1), que comprende adicionalmente un amplificador  $\kappa$  3' de ratón.

(5) El ratón de (1), donde la pluralidad de segmentos genéticos de la región variable de cadena pesada humana comprende un segmento que se selecciona de entre un segmento genético de región variable de inmunoglobulina humana 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-1 1, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, a 6-1.

(6) El ratón de (1), donde la pluralidad de segmentos genéticos de región variable de cadena pesada humana comprende un segmento que se selecciona de entre un segmento genético D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, D7-27, y una combinación de los mismos.

(7) El ratón de (1), donde el ratón comprende una célula B que comprende una secuencia genética reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un gen de región variable de cadena pesada humana derivada de un segmento genético VH que se selecciona de entre un segmento genético VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-39, VH4-59, VH5-51, y se deriva de un segmento genético D que se selecciona de entre un D1-7, D1-26, D3-3, D3-16, D3-10, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, and D7-27.

(8) El ratón de (1), donde el segmento genético V $\kappa$ 1-39 humano está presente en un reordenamiento con un segmento genético J $\kappa$ 5 humano.

(9) El ratón de la reivindicación (1), donde el segmento genético V $\kappa$ 3-20 humano está presente en un reordenamiento con un segmento genético J $\kappa$ 1 humano.

(10) Un método para seleccionar una región variable humana para producir un anticuerpo biespecífico, que comprende:

(a) inmunizar un ratón modificado genéticamente con un antígeno de interés, donde el ratón comprende (i) una sustitución del locus endógeno de ratón de la región variable de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina de todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos endógenos de ratón de la región variable de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina por un segmento genético V $\kappa$ 1-39/J humano, un segmento genético V $\kappa$ 3-20/J humano, o una combinación de los mismos, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante  $\kappa$  de ratón; y (ii) una sustitución de todos o sustancialmente todos los locus genéticos endógenos de ratón de región variable de cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de región variable de cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidas operativamente a un gen endógeno de ratón de constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenarse y formar un gen humano/de ratón quimérico de cadena pesada;

(b) permitir que el ratón desarrolle una respuesta inmunitaria al antígeno de interés; y

(c) identificar un linfocito seleccionado por clonación del ratón que expresa un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés, y obtener del linfocito o el anticuerpo una secuencia de nucleótidos que codifican una región variable de cadena pesada humana que se une específicamente al antígeno de interés; y

(d) emplear la secuencia de nucleótido de (c) en la producción de un anticuerpo biespecífico.

(11) El método de (10), donde el ratón carece de un locus de región variable de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno de ratón que es capaz de reordenarse y formar un gen que codifica una región variable  $\kappa$  de ratón.

5 (12) El método de (10), que comprende además un amplificador  $\kappa$  intrónico de ratón 5' con respecto a la región constante de cadena ligera de ratón.

(13) El método de (10), que comprende además, un amplificador de ratón  $\kappa$  3'.

10 (14) El método de (10), donde la pluralidad de segmentos genéticos de la región variable de cadena pesada humana comprende un segmento que se selecciona de entre los segmentos genéticos de la región variable de inmunoglobulina humana 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, a 6-1.

(15) El método de (10), donde la pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada comprende un segmento que se selecciona de entre un segmento genético D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-6, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, D7-27, y una combinación de los mismos.

15 (16) El método de (10), donde el ratón comprende una célula B que comprende una secuencia genética reordenada de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un gen de la región variable de cadena pesada humana derivado de un segmento genético VH que se selecciona de entre VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-39, VH4-59, VH5-51, y que se deriva de un segmento genético D que se selecciona de entre un D1 -7, D1 -26, D3-3, D3-16, D3-10, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, and D7-27.

20 (17) El método de (10), donde el segmento genético V $\kappa$ 1-39 humano está presente en una reordenación con un segmento genético J $\kappa$ 5 humano.

(18) El método de (10), donde el segmento genético V $\kappa$ 3-20 humano está presente en una reordenación con un segmento genético J $\kappa$ 1 humano.

25 (19) El método de (10), donde las etapas de (a) a (d) se llevan a cabo una primera vez para un primer antígeno de interés para generar una primera secuencia de región variable de cadena pesada humana, y las etapas (a) hasta (d) se llevan a cabo una segunda vez para un segundo antígeno de interés para generar una segunda secuencia de región variable de cadena pesada humana, y donde la primera secuencia de región variable de cadena pesada humana se expresa fusionada con una primera región constante de cadena pesada humana para formar una primera cadena pesada humana, la segunda secuencia de la región variable de cadena pesada humana se expresa fusionada con una segunda región constante de cadena pesada humana para formar una segunda cadena pesada humana, donde la primera y segunda cadenas pesadas humanas se expresan en presencia de una única cadena ligera humana derivada de un segmento genético V $\kappa$ 1 -39 o a V $\kappa$ 3-20.

30 (20) El método de (19), donde la primera cadena pesada humana comprende una modificación que elimina o reduce sustancialmente la afinidad de la primera cadena pesada humana a la proteína A, y la segunda cadena pesada humana mantiene la capacidad para unirse a la proteína A.

35 (21) El método de (20), donde la modificación que elimina o reduce sustancialmente la afinidad de la primera cadena pesada humana a la proteína A se selecciona de entre 95R (EU 435R), a 96F (EU 436F), y una combinación de las mismas.

#### 40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MCWHIRTER, John  
 MACDONALD, Lynn  
 STEVENS, Sean  
 45 DAVIS, Samuel  
 MURPHY, andrax J.

<120> Cadena ligera común de ratón

50 <130> 0802A-WO

<140> A asignar  
 <141>

55 <150> 61/302.282  
 <151> 08-2-2010

<160> 18

60 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1  
 <211> 3155  
 <212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 1

5

ES 2 603 559 T3

ggcgogcogt agctttgaat tttaaacatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60  
 tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120  
 atgatagaag tgtagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgcct acaacaacta 180  
 cctgggattg aaaacttctt cccttgctct agtcctttct tctacaccta ctccacatc 240  
 atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatccogg aaagagcaaa aaagacttcc 300  
 ttagaggtgt cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360  
 gaggaagagc agagcttgta aatttttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420  
 acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480  
 tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540  
 aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600  
 gctttccttc agccagttag ogttcagttt ttggatcacc attgcacaca tatacccagc 660  
 atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720  
 attgtattgt attttctct tatatcatct tcttcttctg tcattaataaa aaaaccgttc 780  
 aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840  
 ttgaccogat gaatatgttt otttgccaga catagtctc atttccaagg taacaagcct 900  
 gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttctt tattgtcctg 960  
 gggcaagaat aagacaaaag ataacagggg agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020  
 gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080  
 tgagttagac agggatgggt gggaaatgatt gaagggtgta gtacttttagc acagattaa 1140  
 accaaatcat taggatttaa agagttgtgt agagtttagt aaggaaaagc cttagaatta 1200  
 aatttggctg oggataaaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260  
 agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata tttataaat aaaaacaaaa 1320  
 ttaattgccg catacataat gtccgaata ctattgtaaa tgttttatct tatttcttct 1380  
 aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440  
 accgagacac agggaaagta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agcatggag 1500  
 cctctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560  
 caaagagggg atgtggctgg gttaatggaa agcttaacag ccctcagaaa acattactaa 1620  
 caagcaaatg aaaggtgtat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680

tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaaa 1740  
 acacagcttt ttatattggt cttaacaggc ttgtgccaaa catcttctgg gtggatttag 1800  
 gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctca 1860  
 caotcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920  
 gtgcagagag gaagaagcag gtggctcttg cagctgaaag ctocagctgat ttgcatatgg 1980  
 agtcattata caacatocca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040  
 ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100  
 gggttccagg tgagggtaaa gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160  
 ccatgcctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtctcc 2220  
 ccagtcacct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280  
 aatgaaaagg tctctgctg tgaaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340  
 atcattccag gtgcagatg tgacatccag atgaccagc ctccatcctc cctgtctgca 2400  
 tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta 2460  
 aattggatc agcagaaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcattccag 2520  
 ttgcaaagtg gggtoaccatc aaggttcagt ggcagtgat ctgggacaga tttcactctc 2580  
 accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt 2640  
 acccctccga tcaacttogg ccaagggaca cgaactggaga ttaaacgtaa gtaatttttc 2700  
 actattgtct tctgaaattt gggctctgat gccagttatt acttttagag gcttaaatag 2760  
 gagtttggtg aagattggta aatgagggca tttaaagatt gccatgggtt gcaaaaagtt 2820  
 aactcagctt caaaaatgga tttggagaaa aaaagattaa attgctctaa actgaatgac 2880  
 acaaagtaaa aaaaaaaagt gtaactaaaa aggaaccctt gtattttctaa ggagcaaaag 2940  
 taaatttatt tttgttcaact cttgccaat attgtattgg ttgttgctga ttatgcatga 3000  
 tacagaaaag tggaaaaata cattttttag tctttctccc ttttgtttga taaattattt 3060  
 tgtcagacaa caataaaaat caatagcacg ccctaagatc tagatgcatg ctogagtgcc 3120  
 atttcattac ctctttctcc gcacccgaca tagat 3155

<210> 2  
 <211> 28  
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
5	<400> 2	
	aggtgagggt acagataagt gttatgag	28
	<210> 3	
10	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Sintética	
	<400> 3	
	tgacaaatgc cctaattata gtgatca	27
	<210> 4	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Sintética	
	<400> 4	
	gggcaagtca gagcattagc a	21
30	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 5	
40	tgcaactgg atgcagcata g	21
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 6	
50	ggtggagagg ctattcggc	19
	<210> 7	
	<211> 17	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
60	<400> 7	
	gaacacggcg gcatcag	17
	<210> 8	
65	<211> 23	
	<212> ADN	

# ES 2 603 559 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sintética

5

<400> 8  
tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

<210> 9  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Sintética

15

<400> 9  
ccattatgat gctccatgcc tctctgttc 29

20

<210> 10  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Sintética

<400> 10  
atcagcagaa accagggaaa gccct 26

30

<210> 11  
<211> 3166  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Sintética

<400> 11

ES 2 603 559 T3

ggcgcgcggt agctttgaat tttaaacatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60  
 tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120  
 atgatagaag tgtagcataa atctatgaaa aattccattt cctgtgcctt acaacaacta 180  
 octgggattg aaaacttctt ccttgcctct agtcccttct tctacaccta cttccacatc 240  
 atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatcccg aaagagcaaa aaagacttcc 300  
 tttagagggt cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360  
 gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttocactgta tttcctaaca 420  
 acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480  
 tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540  
 aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagaccocaa tgtaatacag 600  
 gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcaacaca tataccagc 660  
 atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720  
 attgtattgt attttctct tatatcatct tcttcttctg tcattaaaaa aaaacogttc 780  
 aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840  
 ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtcctc atttocaagg taacaagcct 900  
 gaaaaaatta taotggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttctt tattgtcctg 960  
 gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020  
 gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080  
 tgagttagac agggatgggt gggaaatgatt gaagggtgta gtacttttagc acagattaag 1140  
 accaaatcat taggatttaa agagttgtgt agagttagt aagggaaaagc cttagaatta 1200  
 aatttggctg cggataaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260  
 agtaatftta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata tttataaat aaaaacaaaa 1320  
 ttaattgccg catacataat gtcctgaata ctattgtaaa tgttttatct ttttcttct 1380  
 aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440  
 accgagacac agggaaagtt agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500  
 catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560  
 caaagagggg atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga cctcagaaa acattactaa 1620  
 caagcaaatg aaaggtgtat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatoga 1680  
 tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaaa 1740  
 acacagcttt ttatattggt cttaacaggc ttgtgccaaa catcttctgg gtggatttag 1800  
 gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagttota 1860  
 cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920  
 gtgcagagag gaagaagcag gtggtctttg cagctgaaag ctgagctgat ttgcatatgg 1980  
 agtcattata caecatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040  
 ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100  
 gggttccagg tgagggtaaca gataagtgtt atgagcaacc totgtggcca ttatgatgct 2160  
 ccatgcctct ctgtttctga tcaactataat tagggcattt gtcactgggt ttaagtttcc 2220  
 ccagtcctct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaatttta 2280  
 aatgaaaagg tctctgctg tgaaggcttt taagatata taaaataat ctttgtgttt 2340  
 atcattccag gtgccagatg tataccaccg gagaaattgt gttgacgcag tctccaggca 2400  
 cctgtctttt gtctccaggg gaaagagcca cctctcctg cagggccagt cagagtgtta 2460  
 gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggtcccagg ctctcatct 2520  
 atggtgcctc cagcagggcc actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggctcggga 2580  
 cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg tattactgtc 2640  
 agcagtatgg tagctcactt tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgta 2700  
 agtaatttt cactattgtc ttctgaaatt tgggtctgat ggccagtatt gactttttaga 2760  
 ggcttaataa ggagtttggg aaagattggg aaatgagggc atttaagatt tgccatgggt 2820  
 tgcaaaagtt aaactcagct tcaaaaatgg atttggagaa aaaaagatta aattgctcta 2880  
 aactgaatga cacaagtaa aaaaaaaaaa tgtaactaaa aaggaacctt tgtatttota 2940

aggagcaaaa gtaaatttat ttttgttccac tottgccaaa tattgtattg gttgttgcgtg 3000  
 attatgcatg atacagaaaa gtggaaaaat acatttttta gtctttctcc cttttgtttg 3060  
 ataaattatt ttgtcagaca acaataaaaa tcaatagcac gcctaagat ctgatgcat 3120  
 gctcagatgc catttcatta cctctttctc cgcaccogac atagat 3166

<210> 12  
 <211> 19



ES 2 603 559 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5 <223> Sintética  
 <400> 12  
 tccaggcacc ctgtcttg 19

10 <210> 13  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Sintética

<400> 13  
 20 aagtagctgc tgctaacct ctgact 26

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintética

<400> 14  
 30 aaagagccac cctctcctgc aggg 24

<210> 15  
 <211> 3187  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

40 <400> 15

```

ggcgcgccgt agctttgaat tttaaacatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60
tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120
atgatagaag tgtagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgcct acaacaacta 180
cctgggattg aaaacttctt cccttgctct agtctttctt tctacaceta cttccacatc 240
atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatcccgg aaagagcaaa aaagacttcc 300
ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360
gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420
acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480
tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540
aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagaccaa tgtaatacag 600
gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tatacccagc 660
atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720
attgtattgt attttctct tatatcatct tcttcttctg tcattaataaa aaaaccgttc 780
aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840
  
```

ES 2 603 559 T3

```

ttgaccogat gaatatgttt ottingcaga catagtctc atttccaagg taacaagcct 900
gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggt agcttttcct tattgtcctg 960
gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020
gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtacttttagc acagattaag 1140
accaaatcat taggatttaa agagttgtgt agagtttagt aaggaaaagc cttagaatta 1200
aatttggctg cggataaaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260
agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata ttaataaat aaaaacaaaa 1320
ttaattgccg catacataat gtcctgaata ctattgtaaa tgttttatct tatttccttt 1380
aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
accgagacac agggaagtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500
catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560
caaagagggg atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620
caagcaaatg aaagggtgat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680
tccaataatg caottaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaaa 1740
acacagcttt ttatattggt cttaacaggc ttgtgcaaaa catcttctgg gtggatttag 1800
gtgattgagg agaagaaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctca 1860
cactcagaet gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
gtgcagagag gaagaagcag gtgggtctttg cagctgaaag ctacagctgat ttgcatatgg 1980
agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100
gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160
ccatgcctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcaactgggt ttaagtctcc 2220
ccagtcccct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340
atcattocag gtgccagatg tgttgtggtc ctcagccggt gctgcatcag ccgccggcca 2400
tgtctcggc ccttgggaacc acaatccgcc tcacctgcac cctgaggaac gaccatgaca 2460
tcgggtgtgta cagcgtctac tggtaaccagc agaggccggg ccacctccc aggttcctgc 2520
tgagatatatt ctacacaatca gacaagagcc agggcccca ggtccccct cgttctctg 2580
gatccaaaga tgtggccagg aacaggggtt atttgagcat ctctgagctg cagcctgagg 2640
acgaggctat gtattaactgt gctatgcata actcagtgac gcatgtgttt ggcagoggga 2700
cccagctcac cgttttaagt aagtaatttt tcaactattgt cttctgaaat ttgggtctga 2760
tggccagtat tgacttttag aggcttaaat aggagtttgg taaagattgg taaatgaggg 2820
catttaagat ttgccaatgg ttgcaaaaagt taaactcagc ttcaaaaatg gatttggaga 2880
aaaaaagatt aaattgctct aaactgaatg acacaaaagta aaaaaaaaaa gtgtaactaa 2940
aaaggaaccc ttgtatttct aaggagcaaaa agtaaattta tttttgttca ctcttgccaa 3000
atattgtatt ggttgtttgct gattatgcat gatacagaaa agtggaaaaa tacatttttt 3060
agtctttctc ccttttgttt gataaattat ttigtcagac aacaataaaa atcaatagca 3120
cgccctaaga totagatgca tgctcgagtg ccatttcatt acctctttct ccgcaccoga 3180
catagat 3187

```

5 <210> 16  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 16  
 tgcctcggc ccttggga 17

15 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 17

# ES 2 603 559 T3

ccgatgcat ggtcgttct 20

5 <210> 18  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 18  
acaatccgcc tcacctgcac cct 23

**REIVINDICACIONES**

1. Un ratón modificado genéticamente que expresa dominios variables humanos de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, donde los dominios variables de cadena ligera humana se expresan a partir de una única secuencia genética de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (VL/JL) reordenada presente en la línea germinal del ratón que comprende una secuencia de línea germinal de un segmento genético VL y una secuencia de la línea germinal de un segmento genético JL, estando dicha región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana una Vk1-39/Jk reordenada, donde:
- (a) el ratón carece de un locus de región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que es capaz de reordenar y formar un gen que codifica una región variable κ de ratón;
- (b) el ratón expresa una cadena ligera de inmunoglobulina humana común para una pluralidad de cadenas pesadas humanas, derivada la cadena ligera común de dicha secuencia genética de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana;
- (c) el ratón comprende una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de interés, donde el anticuerpo comprende dicha cadena ligera común y una cadena pesada de inmunoglobulina de un reordenamiento de segmentos genéticos (VH) variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un segmento genético VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-59, and VH5-51; y
- (d) el 90-100 % de los segmentos genéticos VH endógenos de ratón reordenados del ratón se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos reordenados.
2. El ratón modificado genéticamente de la reivindicación 1, donde el ratón comprende una sustitución del 90 a 100 % de los segmentos genéticos VH reordenados del ratón con:
- (i) al menos 12 segmentos genéticos VH reordenados humanos funcionales;
- (ii) al menos 18 segmentos genéticos VH reordenados humanos;
- (iii) al menos 39 segmentos genéticos VH reordenados humanos;
- (iv) al menos 80 segmentos genéticos VH reordenados humanos; o
- (v) al menos 81 segmentos genéticos VH reordenados humanos.
3. El ratón modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ratón expresa:
- (a) una cadena pesada que comprende un dominio variable de inmunoglobulina humana y una región constante de inmunoglobulina de ratón; y/o
- (b) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón y una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana y un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón.
4. El ratón modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el segmento genético VL humano está unido operativamente a una secuencia promotora de inmunoglobulina.
5. El ratón modificado genéticamente de la reivindicación 4, donde la secuencia promotora de inmunoglobulina es una secuencia promotora de inmunoglobulina humana.
6. Un método para producir un anticuerpo que se une a un antígeno de interés que comprende inmunizar un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con el antígeno de interés y emplear una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina humana del ratón para producir el anticuerpo.
7. El método de la reivindicación 6, que comprende:
- expresar en una única célula: (a) una primera secuencia genética de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se ha inmunizado, donde la secuencia genética de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana está fusionada con una secuencia genética de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana; y (b) una secuencia genética de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana de un ratón de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 que se ha inmunizado, donde la secuencia genética de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana está fusionada con una secuencia genética de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana;
- mantener la célula en condiciones suficientes para expresar un anticuerpo humano completo; y
- aislar el anticuerpo
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la célula comprende una segunda secuencia genética de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que se ha inmunizado, donde la segunda secuencia genética de la región variable de cadena

- pesada de inmunoglobulina humana está fusionada con una secuencia genética de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana, donde la primera secuencia genética de la región variable de cadena pesada codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que reconoce un primer epítipo, y la segunda secuencia genética de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que reconoce un segundo epítipo, y donde el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos.
- 5
9. El uso de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la producción de un anticuerpo.
- 10
10. El uso de la reivindicación 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico humano.
11. Un método para producir un anticuerpo biespecífico humano, donde el método comprende obtener secuencias genéticas de la región variable de inmunoglobulina humana a partir de células B de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y producir el anticuerpo con dichas secuencias.
- 15
12. El uso de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para producir una célula que expresa un anticuerpo biespecífico humano, donde ellas secuencias de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo biespecífico humano se expresan a partir de secuencias genéticas de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana obtenidas de células B del ratón.
- 20
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la célula comprende:
- (a) una secuencia genética de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que codifica un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana derivado de un segmento genético Vk1-39Jk humano, donde la secuencia genética de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana está fusionada, directamente o por medio de un enlazador, a una secuencia genética de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana, que da como resultado un gen que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina humana;
- 25
- (b) una primera secuencia genética de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que codifica un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana, donde la primera secuencia genética de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana se fusiona, directamente o por medio de un enlazador, a una secuencia genética de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humanas, dando como resultado un gen que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina humana, donde el primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana reconoce un primer epítipo; y
- 30
- (c) una segunda secuencia genética de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que codifica un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana, donde la segunda secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana se fusiona, directa o por medio de un enlazador, a una secuencia genética de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana, dando como resultado un gen que codifica una segunda cadena pesada de inmunoglobulina humana donde el segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana reconoce un segundo epítipo y no reconoce específicamente el primer epítipo.
- 35
- 40
- donde la primera y segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina se asocian cada una con la cadena ligera de inmunoglobulina de (a).
- 45
14. El uso de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para identificar un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana presente en una cadena pesada de inmunoglobulina que se asocia con la única cadena ligera.

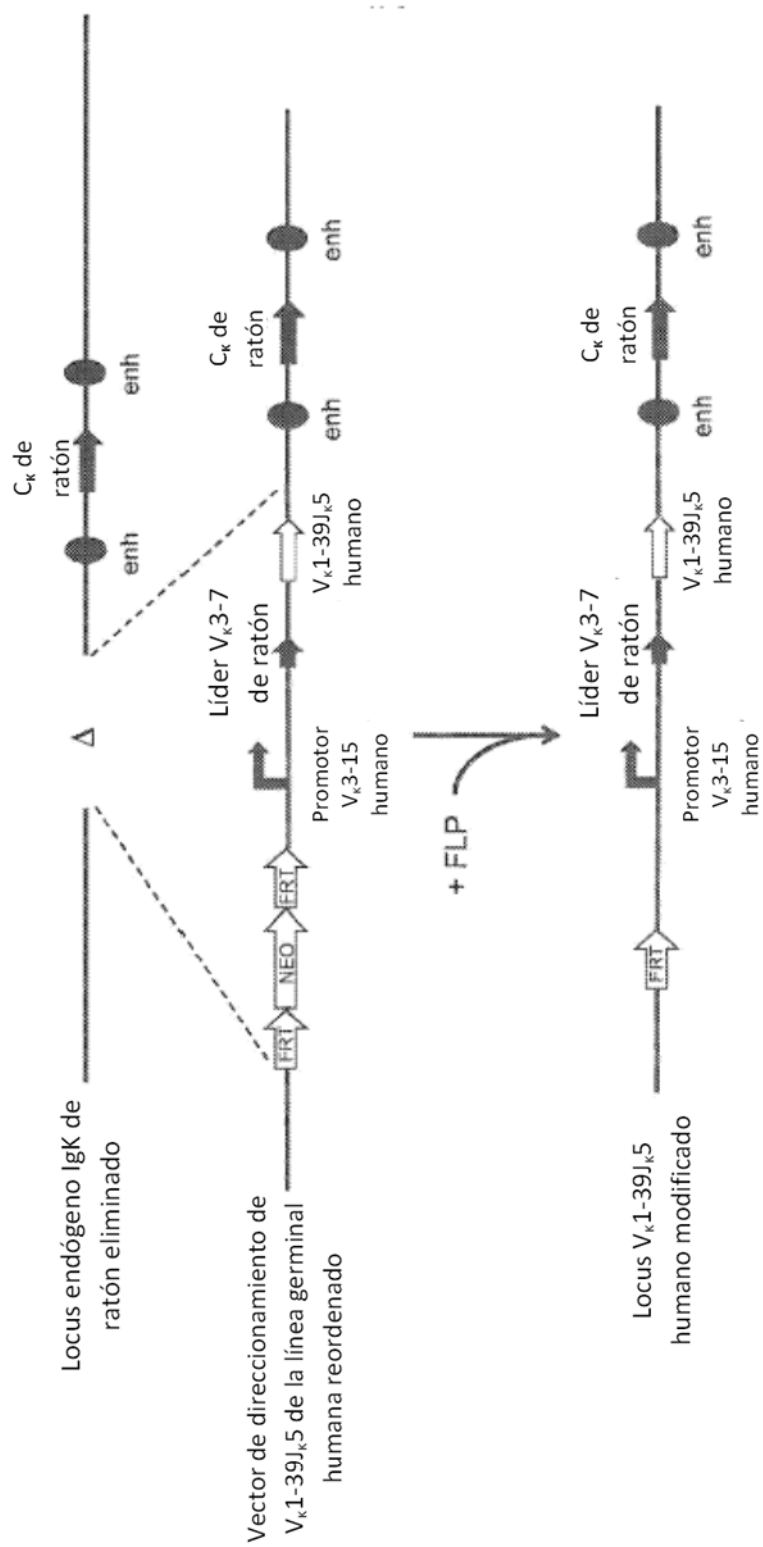


Figura 1

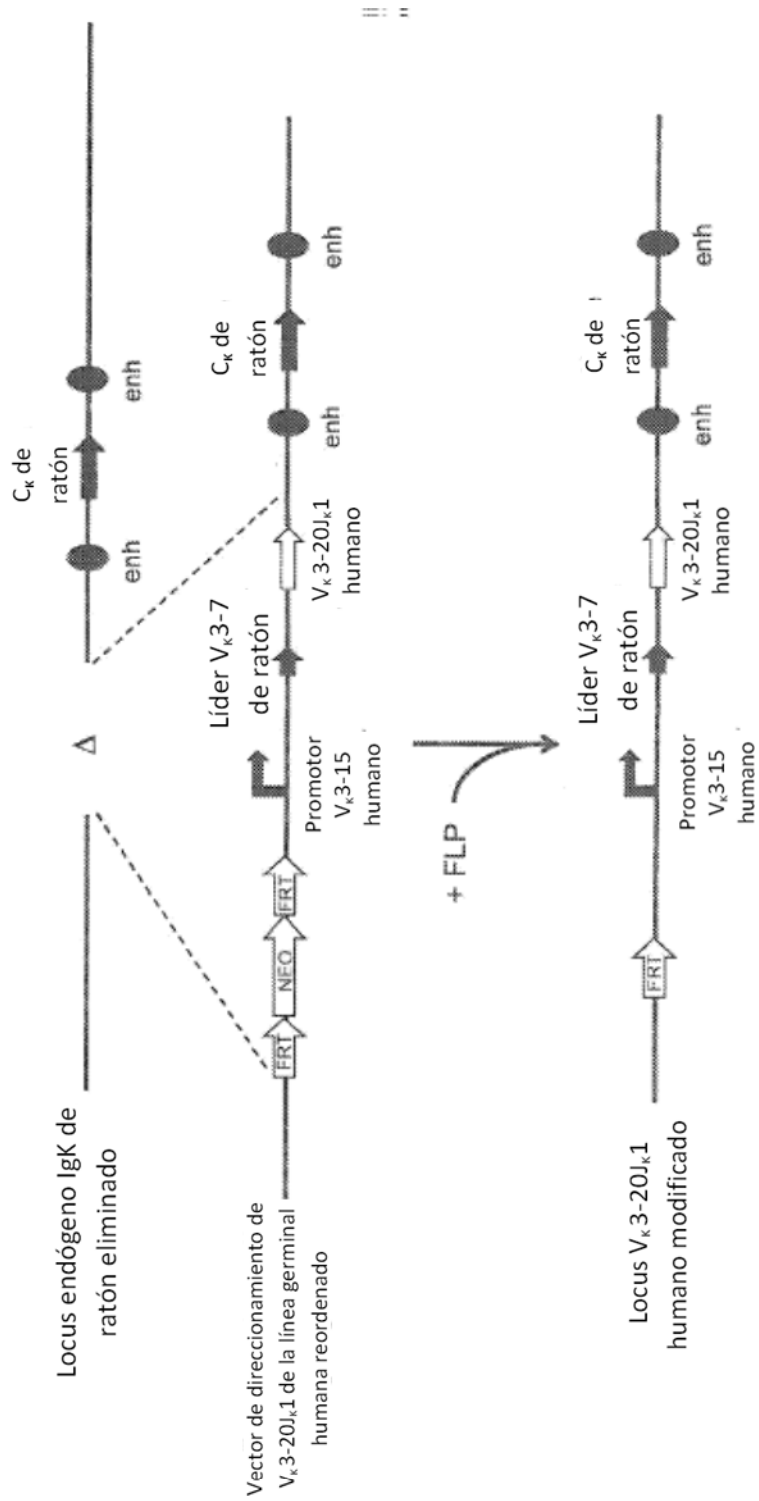


Figura 2

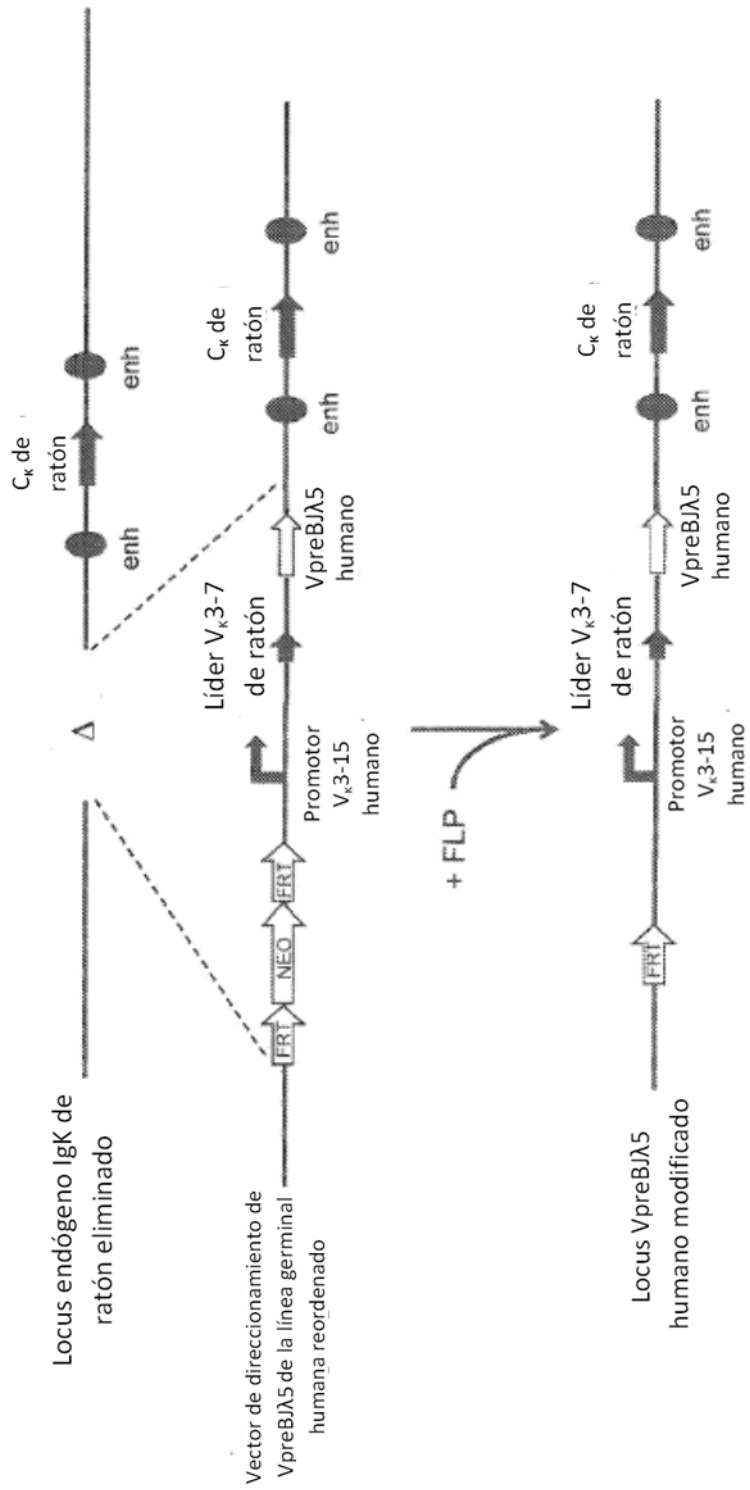


Figura 3