

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 239**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2012** E 12186010 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** EP 2604625

54 Título: **Generación de moléculas de unión**

30 Prioridad:

26.09.2011 US 201161539116 P

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**MERUS N.V. (100.0%)
Yalelaan 62
3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**THROSBY, MARK;
LOGTENBERG, TON y
DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 636 239 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

Generación de moléculas de unión

Antecedentes de la invención

5 La capacidad de respuesta inmune de mamíferos para generar un amplio y diverso repertorio de anticuerpos en respuesta a un antígeno ha sido explotada para una gama de aplicaciones en el diagnóstico, terapia e investigación básica. En particular, los anticuerpos monoclonales, los productos de un único clon de células B, se han aplicado ampliamente debido a su especificidad bien definida y facilidad de producción. Típicamente, los anticuerpos monoclonales o la información genética que codifica anticuerpos monoclonales con especificidades deseables se obtienen a partir de las células B de animales o seres humanos que han sido inmunizados con antígeno o infectados por patógenos. Alternativamente, se pueden obtener anticuerpos monoclonales por uno de varios métodos basados en ADN recombinante para construir y detectar bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos expresados en la superficie de bacteriófagos o células eucariotas, o a partir de enfoques con sílice.

15 Los anticuerpos monoclonales han encontrado un uso creciente en terapia humana para el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo por ejemplo enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer. La inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales xenogénicos limita su uso en la terapia de enfermedades humanas. La exposición de los pacientes a anticuerpos xenogénicos produce a menudo efectos adversos o puede conducir a la neutralización y eliminación del anticuerpo aplicado, reduciendo así su eficacia farmacológica (Clark, 2000). La administración de anticuerpos monoclonales humanizados o completamente humanos a los pacientes generalmente disminuye las complicaciones mencionadas, en particular cuando las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos no contienen epítomos que estimulen células T. Los anticuerpos codificados por segmentos génicos V de cadena pesada y ligera de línea germinal humana no mutada, que contienen regiones CDR3 desprovistas de epítomos de células T representan ejemplos últimos de fármacos proteínicos con baja inmunogenicidad (Ruuls et al., 2008; Harding et al., 2010). Por lo tanto, para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos monoclonales son preferiblemente completamente humanos, no mutados y contienen pocos o ningún epítomo de células T para prevenir la formación de anticuerpos anti-fármaco.

30 Las células B de la sangre o de los órganos linfoides de los seres humanos se han utilizado como fuente de anticuerpos monoclonales terapéuticos. Desde el descubrimiento de la tecnología del hibridoma para la immortalización de células B murinas (Kohler et al., 1975) y la comprensión de que esta tecnología no podía replicarse fácilmente usando células B humanas, se han desarrollado varios métodos alternativos para la generación de anticuerpos monoclonales humanos. Tales métodos incluyen la transformación de células B a través de la infección por el virus de Epstein-Barr (Traglai et al., 2004), la activación a corto plazo y la expansión de células B humanas por estimulación con combinaciones de células estimuladoras, anticuerpos y citoquinas (Zubler 1987/Banchereau et al., 1991/Kim et al., 2001/Good et al., 2006, Ettinger et al., 2005) o transferencia de genes mediada por retrovirus (Kwakkenbos et al., 2010), la clonación de genes V de anticuerpo de células B humanas individuales por PCR (Wrammert et al., 2010/Meijer et al., 2006), y la identificación y selección de células B que secretan anticuerpos específicos de antígenos mediante ensayos de placas hemolíticas (Babcook et al., 1996). Las técnicas de immortalización o activación de células B humanas son compatibles con sólo algunas etapas de maduración de células B y, además, debido a su baja eficiencia (simplemente 1-3% de células B) no son adecuadas para la interrogación eficiente de todo el repertorio de anticuerpos específicos generados durante una respuesta inmune humana para anticuerpos con las características deseadas (Reddy et al., 2011).

45 La clonación de una célula, se ha utilizado un procedimiento en el que se colocan células B humanas individuales en placas de pozos de microtitulación para análisis, para eludir las bajas eficacias asociadas con procedimientos que requieren la activación y/o immortalización de células B para obtener anticuerpos monoclonales humanos. En este enfoque, se usa ARN de células B individuales para amplificar las regiones variables de la cadena pesada y ligera (VH, VL) de anticuerpos por PCR. Los genes VH y VL se insertan entonces en vectores de expresión adecuados para transfección en líneas celulares y posterior producción de fragmentos de anticuerpo recombinantes o IgG de longitud completa (Smith et al., 2009/Tiller et al., 2008). Alternativamente, los genes VH y VL amplificados pueden usarse directamente para la transcripción y traducción *in vitro* para generar cantidades diminutas de anticuerpos suficientes para el análisis de unión, pero no para evaluar la actividad funcional (Jiang et al., 2006). Usando estos procedimientos, la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes no está limitada a poblaciones de células B distintas y no depende de estimulación o immortalización previa. El principal desafío en este enfoque es la amplificación específica de genes de anticuerpos por RT-PCR de células individuales y la ocurrencia de contaminación cruzada durante el manejo de un gran número de reacciones de PCR. Otra limitación práctica es el número de células B individuales que se pueden manejar, que se restringe típicamente a varios miles, lo que impide un muestreo extenso del repertorio completo de anticuerpos generado durante una respuesta inmune. Finalmente, el método se restringe al análisis de células B humanas fácilmente accesibles, tales como las derivadas de sangre y médula ósea.

60 Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en el laboratorio, utilizando una de las plataformas para la selección que esencialmente imita la respuesta de anticuerpos *in vivo* (Hoogenboom, 2005). Por ejemplo, las tecnologías de presentación explotan grandes colecciones de

5 regiones variables de anticuerpos clonados expresadas en la superficie de partículas de fago, bacterias, células eucariotas o ribosomas para seleccionar anticuerpos que se unen a antígenos de interés (Ponsel et al., 2011/Clackson et al. 1991/Boder et al., 1997/Fuchs et al., 1991/Lee et al., 2007/Chao et al., 2006). Las regiones VH y VL insertadas en estos sistemas de presentación se combinan aleatoriamente para formar colecciones de sitios de unión a anticuerpos, es decir, fragmentos de anticuerpos IgG intactos, que requieren un plegado y montaje correctos, por ejemplo, en células procariotas para su recuperación mediante métodos de unión al antígeno. Los métodos de presentación no permiten la recuperación de anticuerpos de las bibliotecas a través de cribado funcional. En los enfoques de presentación, se anula el emparejamiento original de cadenas pesadas y ligeras y, además, se pierde ADN codificante de anticuerpo como resultado del uso de enzimas de restricción durante el procedimiento de clonación. El éxito de la recuperación de las especificidades deseadas del anticuerpo dentro de las técnicas de descubrimiento de anticuerpos *in vitro* depende no sólo del plegamiento y expresión exitosos de los fragmentos de anticuerpo recombinantes, por ejemplo, en células procariotas sino también en una gama de parámetros de cribado utilizados durante la selección de anticuerpos. Estos incluyen la naturaleza de la plataforma de presentación, la concentración de antígeno, la avidez de unión durante el enriquecimiento, el número de rondas de selección y el diseño y diversidad de las bibliotecas de anticuerpos (Hoogenboom 2005/Cobson et al., 2008/Persson et al., 2006). Por lo tanto, debido a procedimientos experimentales, los requisitos de plegamiento para la expresión de fragmentos de anticuerpo en células procariotas y parámetros que afectan al éxito de la recuperación de anticuerpos durante las selecciones, los sistemas de presentación no permiten la exploración completa de los repertorios de anticuerpos y no permiten el cribado funcional directo de anticuerpos humanos. De hecho, los fragmentos de anticuerpos específicos de antígeno pueden perderse durante rondas posteriores de selección de antígenos de bibliotecas de presentación en fagos (Ravn et al., 2010).

Se han construido ratones transgénicos que albergan colecciones de genes de anticuerpo humano para aliviar algunas de las restricciones asociadas con el uso de células B humanas como material de partida para la generación de anticuerpos monoclonales humanos (Lonberg 2005). Tales ratones pueden inmunizarse con cualquier antígeno y sus órganos linfoides son fácilmente accesibles para la recolección de células B. Una vez que el ratón transgénico ha sido inmunizado, pueden obtenerse los monoclonales mediante generación tradicional de hibridomas, mediante tecnologías de presentación o utilizando enfoques que implican la recolección, la siembra en placa y el cribado de células B, seguido por aislamiento de genes de mAb y clonación en líneas celulares de producción.

Para la generación de hibridomas, se recogen células B de órganos linfoides murinos y se fusionan con células de mieloma para formar líneas celulares secretoras de anticuerpos monoclonales inmortalizadas. La baja eficiencia de la fusión celular en la formación de hibridomas permite la interrogación de sólo una fracción del repertorio de anticuerpos y está restringida a poblaciones de células B que son susceptibles de fusión. Si no se forma un hibridoma satisfactorio, se hace difícil obtener el anticuerpo frente a antígenos estimulantes tales como proteínas de membrana. Por lo tanto, el aumento del número de hibridomas es un paso crucialmente importante en el cribado del repertorio de células B específicas de antígeno de ratones inmunizados y la obtención de anticuerpos monoclonales con alta afinidad, especificidad y actividad funcional deseada (Kato et al., 2011/Li et al. 1994, Crowe, 2009). En los protocolos de fusión más eficientes que implican la estimulación previa de células B y la electrofusión, aproximadamente 1 en 1000 células B se fusiona con éxito con una célula de mieloma para convertirse en un hibridoma que secreta anticuerpos (Kato et al., 2011). La tecnología de hibridoma y otros métodos de inmortalización de células B interrogan las células productoras de anticuerpos en las poblaciones celulares de células B pre-plasmáticas, específicamente en células B de memoria, o en blastos de plasma de corta vida en circulación (Wrarmert et al., 2008).

Se pueden usar células B de ratones transgénicos inmunizados con genes de anticuerpo humano para obtener colecciones de regiones VH y VL que se combinan aleatoriamente para formar bibliotecas de presentación combinatorio de fragmentos de anticuerpos humanos. Como se ha expuesto anteriormente, debido a procedimientos experimentales, los requisitos de plegado para la expresión de fragmentos de anticuerpo en células procariotas y parámetros que afectan al éxito de la recuperación de anticuerpos durante las selecciones, los sistemas de presentación no permiten la exploración completa de los repertorios de anticuerpos y no permiten el cribado funcional directo de anticuerpos monoclonales humanos. Se ha utilizado la secuenciación de alto rendimiento para la secuenciación de repertorios de anticuerpos derivados de células plasmáticas de médula ósea de ratones inmunizados con proteínas (Reddy et al., 2010). Se encontró que, en la población de células plasmáticas purificadas, los repertorios de VH y VL estaban altamente polarizados con las secuencias más abundantes representando 1-10% de todo el repertorio (Reddy et al., 2010). Los genes de VH y VL más abundantes se emparejaron al azar, expresados como moléculas de IgG y se cribaron para su unión al antígeno inmunizante. Una desventaja del apareamiento aleatorio es que sólo se encontró que el 4% de los anticuerpos así generados se unen al antígeno inmunizante. Estos anticuerpos tenían afinidades bajas y/o niveles de expresión deficientes y se observó con frecuencia agregación. La baja proporción de anticuerpos específicos podría mejorarse emparejando los genes de VH y VL con base en su frecuencia relativa en la recolección de secuencias. En ese caso, después de la expresión recombinante, se encontró que aproximadamente el 75% de los anticuerpos se unían al antígeno (Reddy et al., 2010). La desventaja del emparejamiento de VH/VL de acuerdo con las frecuencias relativas es que las colecciones de genes V obtenidos por secuenciación de alto rendimiento pueden contener secuencias de VH y VL que están presentes en frecuencias similares a pesar de que se derivan de diferentes clones de células B y por lo tanto pueden no representar un par natural y no pueden formar una molécula de anticuerpo funcional. El emparejamiento de

5 regiones VH y VL con base en la frecuencia es por lo tanto imprecisa y puede conducir a la generación y cribado de muchos anticuerpos que tienen pares VH/VL no coincidentes que codifican anticuerpos de baja afinidad o anticuerpos que no se unen al objetivo de interés. De hecho, se ha demostrado que el emparejamiento de VH/VL con base en frecuencias relativas produce una alta proporción de anticuerpos de afinidad modesta a baja (Reddy et al., 2010). Esto implica que el emparejamiento de VH/VL con base en la alta frecuencia de genes VH y VL presentes en grandes colecciones de secuencias no es predictivo para la generación de anticuerpos de alta afinidad. Por lo tanto, tal enfoque proporciona sólo pequeñas cantidades de combinaciones de VH/VL que codifican anticuerpos específicos de antígeno que generalmente se encontró que tienen afinidades bajas (Reddy et al., 2010).

15 Otra desventaja del método descrito por Reddy et al. es que se basaba en células plasmáticas como fuente de anticuerpos monoclonales específicos de antígeno. Las células plasmáticas representan sólo una pequeña subpoblación de células B que contribuyen a la diversidad de anticuerpos generada durante una respuesta inmune. Como resultado, no se recuperan anticuerpos específicos de antígenos producidos por otras poblaciones de células B durante una respuesta inmune. Estas poblaciones incluyen células plasmáticas de corta vida, células B de transición, células B de centro germinal y células B de memoria de IgM e IgG presentes en órganos linfoides. Al comparar los repertorios de anticuerpos en estas diversas poblaciones de células B, se observaron cambios significativos (Wu, et al., 2010) lo que implica que se captura un repertorio de anticuerpos más amplio cuando se incluyen más poblaciones de células B como fuente de VH/VL en secuenciación profunda.

20 Con base en lo anterior, se puede concluir que existe la necesidad de generar anticuerpos y enfoques de selección que faciliten la interrogación de repertorios de anticuerpos enteros para anticuerpos codificados por pares de VH/VL originales con características de unión deseables y actividades funcionales.

25 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa los 4 cebadores inversos CH1 de ratón y su posición dentro de la región CH1 se resaltan (1) CH1rev0 de ratón; (2) CH1rev1; (3) CH1rev2; (4) CH1rev3.

30 La Figura 2 representa la amplificación de VH con el cebador hacia adelante DO_1177 y diversos cebadores inversos CH1. Carril 1: DO_1171; Carril 2: DO_1172; Carril 3: DO_1173; Carril 4: DO_1174; Carril 5: control negativo.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la respuesta inmunitaria del huésped frente a la porción Fc de la proteína de fusión Fc-EGFR tras la inmunización.

La Figura 4 representa el título en suero de IgG específico de ErbB2 en ratones vacunados con ErbB2.

La Figura 5 representa el título en suero de IgG específico de HA en ratones vacunados con HA.

35 La Figura 6 representa la afinidad relativa de los sueros policlonales de IgG anti-ErbB2 de ratones vacunados con ErbB2 como se determinó mediante ELISA.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la comparación de los porcentajes de células B IgG por el total de células B de iLN totales por estrategia de vacunación y por antígeno.

40 La Figura 8 muestra un análisis nativo de SDS-PAGE de una preparación de anticuerpo biespecífico humano de VL simple purificado por proteína A. PM: peso molecular. Carril 1, anti-tiroglobulina x antifibrinógeno biespecífico.

45 La Figura 9 representa un análisis nativo de espectrometría de masas de un anticuerpo biespecífico humano VL simple purificado por proteína A para fibrinógeno y tiroglobulina producido por cotransfección de células HEK293. El pico principal de 144352 Da es la especie biespecífica de IgG heterodimérica (96% de IgG total), mientras que los picos menores de 144028 Da (3% de IgG total) y 142638 Da (1% de IgG total) son las especies de IgG parentales homodiméricas.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la potencia del mAb específico de EGFR para rescatar células A431 de la muerte celular inducida por EGF.

Sumario de la invención

50 Para recapitular, para la selección y cribado de todo el repertorio de anticuerpos producidos durante una respuesta inmune, es necesario explotar técnicas que permitan la recuperación eficiente de células B expandidas clonalmente, impulsadas por antígenos, de varios fenotipos y subpoblaciones y/o la información genética que codifica los anticuerpos correspondientes como pares VH/VL originales. La presente invención proporciona un método para interrogar eficiente y exhaustivamente el amplio espectro de anticuerpos generados por poblaciones de células B. Preferiblemente, estas diversas poblaciones de células B se obtienen a partir de animales transgénicos, por ejemplo, ratones, que albergan genes de anticuerpos humanos para facilitar la inmunización con cualquier antígeno deseable y generar anticuerpos para aplicación terapéutica en seres humanos. Estos ratones transgénicos tienen un repertorio limitado de VL, preferiblemente una única VL reordenada humana. El método es independiente de los procedimientos de immortalización o activación de células B, facilita el cribado de repertorios de anticuerpos a partir

5 de células B obtenidas esencialmente de todos los órganos linfoides y no requiere análisis de células B individuales. Preferiblemente, para analizar eficazmente todo el repertorio de anticuerpos generados durante una respuesta inmune, se analizan las células B de cada etapa de diferenciación y linaje y presentes en órganos linfoides relevantes tales como nódulos linfáticos, bazo y sangre para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales de especificidad deseada y características tales como afinidad y actividad funcional. Por lo tanto, el método puede dirigirse a toda la población de células B en órganos linfoides o enfocarse en subpoblaciones de células B que se distinguen con base en características fenotípicas tales como células B transicionales, células B de memoria, células de plasma de corta vida y similares. Además, el método permite el cribado directo de anticuerpos por las características de unión, así como la actividad funcional en el formato de anticuerpo relevante que es representativo para su eventual aplicación en terapia humana. La invención proporciona además métodos y medios para la producción de estos anticuerpos seleccionados en los formatos deseados, así como estos anticuerpos y sus propios usos. Estos usos incluyen arreglos, así como productos farmacéuticos.

Formas de realización

La invención proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones para producir una población definida de moléculas de unión, dicho método comprende al menos las siguientes etapas: a) proporcionar una población de células B que expresan un repertorio limitado de VL en el que esencialmente todas las células B portan al menos un VL, b) obtener ácidos nucleicos (ARN o ADN) de dichas células B, c) opcionalmente, amplificación de secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina en dicha muestra, d) secuenciación al menos parcial de todos los ácidos nucleicos obtenidos de la etapa b) o los productos de amplificación de la etapa c), e) realizar un análisis de frecuencia de las secuencias de la etapa d), f) seleccionar las secuencias deseadas de VH, g) proporcionar una célula huésped con al menos un vector que comprende al menos una de dichas secuencias de VH deseadas y/o al menos una secuencia de VL de dicho repertorio limitado de VL, h) cultivar dichas células huésped y permitir la expresión de polipéptidos de VH y/o VL, i) obtener dichas moléculas de unión. Alternativamente, las etapas c) y d) se pueden reemplazar o complementar mediante las etapas alternativas c' y d': c') construir una biblioteca de ADNc que se criba para las secuencias de ADN específicas de la región VH mediante sondeo con una sonda de ácido nucleico específica para las secuencias de las regiones VH y d') secuenciar al menos parcialmente los clones que contienen insertos de VH. Cuando se menciona VH o VL, también se prevén derivados funcionales y/o fragmentos de los mismos.

El término "obtención de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la etapa b) de la presente invención incluye cualquier método para recuperar la secuencia de nucleótidos de ácidos nucleicos que codifican secuencias de VH.

El término "población definida de moléculas de unión" tal como se usa en la presente memoria se refiere a al menos dos anticuerpos que se unen a al menos un antígeno o epítipo de interés seleccionado. Preferiblemente, la población definida de moléculas de unión comprende al menos una porción significativa, preferiblemente al menos la mayoría y lo más preferiblemente esencialmente todas las moléculas de unión específicas dirigidas contra el antígeno o epítipo de interés generado durante una respuesta inmune. Más preferiblemente, una población de moléculas de unión comprende entre cientos y varios miles de moléculas de unión, que representan una porción significativa de anticuerpos únicos específicos del antígeno, presentes, por ejemplo, en un ratón inmunizado con dicho antígeno. La población de moléculas de unión de la presente invención puede tener diferentes especificidades y/o afinidades; es decir, puede unirse a diferentes epítopos del antígeno seleccionado o puede unirse al mismo epítipo con diferentes afinidades. El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria significa una proteína que contiene uno o más dominios que se unen a un epítipo sobre un antígeno, en donde dichos dominios se derivan o comparten homología de secuencia con la región variable de un anticuerpo. Los anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen varios isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de estos isotipos, o un derivado funcional y/o fragmento de estos. Ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos, inmunoconjugados y similares. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y similares. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier origen, incluyendo murino, de más de un origen, es decir, quiméricos, humanizados o totalmente humanos. Cuando se utiliza el término fragmento funcional y/o derivado en esta memoria descriptiva, se pretende transmitir que al menos una de las funciones, preferiblemente las funciones caracterizadoras de la molécula original, se conservan (en clase no necesariamente en cantidad). La unión a anticuerpos se define en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítipo del mismo está unido por el dominio de unión. La afinidad es una medida de la fuerza de unión a un antígeno o epítipo particular. La unión específica se define como la unión con afinidades (K_D) de al menos 1×10^{-5} M, más preferiblemente 1×10^{-7} M, más preferiblemente mayor a 1×10^{-9} M. Típicamente, los anticuerpos monoclonales para aplicación terapéutica pueden tener afinidades de hasta 1×10^{-10} M o incluso más altas.

El término "antígeno" tal como se utiliza en la presente memoria significa una sustancia o molécula que, cuando se introduce en el cuerpo, desencadena la producción de un anticuerpo por el sistema inmune. Un antígeno, entre otros, puede derivarse de organismos patógenos, células tumorales u otras células aberrantes, de haptenos, o incluso de estructuras propias. A nivel molecular, un antígeno se caracteriza por su capacidad para ser "unido" por el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. En ciertos aspectos de la presente invención también se pueden considerar como un "antígeno" mezclas de antígenos. Un antígeno comprenderá al menos un epítipo. El término

5 "epítopo", tal como se utiliza en la presente memoria, significa la parte de un antígeno que es reconocida por el sistema inmunológico, específicamente por anticuerpos, células B o células T. Aunque se cree usualmente que los epítomos se derivan de proteínas que no son propias, las secuencias derivadas del huésped que se pueden reconocer también se clasifican como epítomos/antígenos.

10 Una "población de células B" tal como se utiliza en la presente memoria puede ser cualquier colección de células B. Las células B pueden estar presentes como una subpoblación de otras células en una muestra. Puede derivarse de uno o más individuos de la misma o de diferentes especies. El término "población de células B" significa un grupo de células B obtenido de al menos un animal. En una realización preferida, una población de células B comprende esencialmente todas las células B esplénicas. En una realización más preferida, la población comprende esencialmente todas las células B obtenidas a partir de al menos un ganglio linfático. La población de células B
15 comprende células B obtenidas del bazo y/o al menos un ganglio linfático. En una realización particularmente preferida, una población de células B comprende esencialmente todas las células B obtenidas a partir de uno o más órganos linfoides que albergan las células B que se han expandido clonalmente como resultado de la estimulación del antígeno. Los métodos para obtener tales poblaciones de células B son conocidos en la técnica. De esta población de células B, esencialmente todas las células B portan al menos una VL. Esencialmente, todas las células B en la población de células B expresan un repertorio limitado de VL. En una realización más preferida, esencialmente todas las células B en la población de células B portan la misma VL.

El término "repertorio limitado de VL" usado aquí significa una cohorte restringida de regiones VL que soporta la generación de una respuesta inmune robusta tras la inmunización y permite el montaje eficiente de pares VH/VL originales con regiones VH identificadas mediante la construcción de mapas de calor de CDR3 de cadena pesada.
25 El repertorio limitado de VL comprende no más de 10, más preferiblemente no más de 3 o 2 regiones VL diferentes, limitando así adicionalmente el número de diferentes combinaciones de VH/VL y aumentando la frecuencia de los pares originales de VH/VL. En la realización más preferida, el repertorio limitado de VL comprende no más de una única región VL. La ventaja de una única VL es que todos los anticuerpos que se generan al encontrarse con un antígeno comparten la misma VL y se diversifican sólo en el uso de VH. Una VL se define por la combinación particular de los segmentos génicos V y J de la línea germinal y la región CDR3 e incluye variantes mutadas somáticamente de dicha VL. Por lo tanto, la población de células B que expresan un repertorio limitado de VL puede significar que se expresa menos de 10, o 3 o 2 VL o más preferiblemente una única VL. En una realización preferida, todas las VL en el repertorio limitado de VL son resistentes a los reordenamientos de ADN y/o a las hipermutaciones somáticas, preferiblemente, la VL tiene una secuencia de línea germinal. La secuencia de la línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se usa frecuentemente en el repertorio humano y tiene una capacidad superior para emparejarse con muchas regiones VH diferentes y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad. Una cadena ligera de la línea germinal más preferida es 012, preferiblemente la cadena ligera kappa de la línea germinal reordenada IgVK1-39*01/ IGJK1*01 (nomenclatura de acuerdo con la base de datos IMGT <http://www.imgt.org>) o un fragmento o un derivado funcional de la misma. Esta única VL también se conoce como VL común, o cadena ligera común. Obviamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena ligera de los que la secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena ligera en las que están presentes mutaciones (supresiones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales. Una "cadena ligera común" de acuerdo con la invención se refiere a cadenas ligeras que pueden ser idénticas o tener algunas diferencias de secuencia de aminoácidos conservando al mismo tiempo la especificidad de unión del anticuerpo. Es posible, por ejemplo, dentro del alcance de la definición de cadenas ligeras comunes como se usa en la presente memoria, preparar o encontrar cadenas ligeras que no son idénticas, pero siguen siendo funcionalmente equivalentes, por ejemplo, introduciendo y probando cambios conservadores de aminoácidos, cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen o sólo parcialmente a la especificidad de unión cuando se emparejan con la cadena pesada, y similares. Es un aspecto de la presente invención usar como VL única una cadena ligera idéntica que puede combinarse con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios funcionales de unión a antígenos (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al., 1998, Nissim et al. Al., 1994).

Los términos "amplificación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina" y "secuenciación (al menos parcialmente) de ácidos nucleicos" tienen sus significados habituales en la técnica.
55

El término "análisis de frecuencia" tiene su significado habitual en la técnica. Para una explicación más detallada del término, véase, por ejemplo, el ejemplo 1 de la presente invención.

El término "secuencias de VH deseadas" significa aquellas secuencias de VH que, con base en el análisis de frecuencia, se producen en respuesta a la exposición a un antígeno. Se supone que estos codifican regiones VH que son específicas para dicho antígeno. Típicamente, una respuesta inmune a un antígeno en un ratón implica la activación de aproximadamente 100 clones de células B diferentes (Poulsen et al., J Immunol 2011; 187; 4229-4235). Por lo tanto, es más preferido seleccionar los 100 clones más abundantes. Más prácticamente, se seleccionan al menos 20, preferiblemente alrededor de 50 clones abundantes.
60

Las "células huésped" de acuerdo con la invención pueden ser cualquier célula hospedadora capaz de expresar moléculas de ADN recombinante, incluyendo bacterias, levaduras, células vegetales, eucariotas con una preferencia
65

5 por células de mamífero. Particularmente cuando se desean formatos de anticuerpos mayores, las células bacterianas no son adecuadas y se prefieren las células de mamífero. En la técnica se conocen células huésped de mamífero adecuadas para la expresión de moléculas de anticuerpo.

Un aspecto de la invención es proporcionar un método de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente, que comprende además tomar una muestra de dichas células cultivadas, comprendiendo la muestra al menos uno de dichos anticuerpos y someter las muestras a al menos un ensayo funcional y seleccionar al menos una célula que exprese una molécula de unión con las características deseadas.

Un "ensayo funcional" tal como se usa en la presente memoria significa un ensayo para establecer propiedades tales como especificidad de unión, afinidad, actividad neutralizante, muerte de células tumorales, inhibición de la proliferación o cualquier otra característica o actividad funcional deseada de la molécula de unión producida de acuerdo con los métodos de la invención. Tales ensayos se usan para determinar tempranamente si los anticuerpos obtenidos son adecuados para el propósito deseado. Dicho objetivo deseado puede ser una aplicación de diagnóstico y/o terapéutica. En una realización de la invención, el método de acuerdo con las reivindicaciones comprende además la etapa de recoger los sobrenadantes de las células cultivadas, los sobrenadantes que contienen dichos anticuerpos y someter los sobrenadantes a al menos un ensayo funcional. Independientemente de un ensayo funcional como se ha descrito anteriormente, la presente invención también compila formas de determinar la identidad de los anticuerpos, utilizando métodos conocidos en la técnica.

Un aspecto de la invención es proporcionar un método de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente, que comprende además proporcionar a dicha célula huésped medios para la expresión de al menos una VH y VL en un formato de inmunoglobulina. Los formatos típicos de inmunoglobulinas y moléculas similares a anticuerpos que son adecuados para propósitos particulares son bien conocidos en la técnica. Para terapia, estas moléculas serían típicamente monoclonales completamente humanas (mono o biespecíficas, y/o mezclas de las mismas, es decir, Oligoclonics®). Para la obtención de imágenes estas moléculas serían típicamente fragmentos de anticuerpo, y así sucesivamente. Los formatos deseados incluyen, pero no se limitan a inmunoglobulinas intactas, formatos biespecíficos tales como DARTS^{MR}, BiTES^{MR}, anticuerpos biespecíficos de cadena ligera sencilla (Merchant et al., 1998) incluyendo biespecíficos modificados con CH3 tales como variantes botón en ojal o variantes de CH3 modificadas con carga, anticuerpos DVD-Ig (Wu et al., 2007), mezclas de anticuerpos (de Kruif et al., 2009) y similares. En un aspecto preferido, dicho formato deseado comprende al menos una molécula de inmunoglobulina, y/o al menos un anticuerpo biespecífico. En una realización preferida adicional, la población de células B que se proporciona para el método de acuerdo con las reivindicaciones está enriquecida para células B que expresan receptores de inmunoglobulina que se unen al antígeno. Dicho enriquecimiento puede ocurrir cuando una célula B encuentra antígeno (por ejemplo, cuando un ratón se inmuniza con un antígeno) y se activa para dividir para generar un clon de células B. Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método de acuerdo con las reivindicaciones que proporciona adicionalmente clones de células B en donde dicha recopilación de clones de células B comprende una colección de regiones VH que están enriquecidas para regiones VH que codifican anticuerpos dirigidos al antígeno o epítipo de interés. Dicho enriquecimiento de las regiones VH se obtiene preferiblemente mediante la inmunización de un ratón con antígeno. El enriquecimiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, tomando únicamente los clones de células B obtenidos a partir de animales expuestos al antígeno como población de partida que se seleccionan a través de un proceso de reconocimiento de antígeno, es decir, utilizando métodos de selección que comprenden antígeno recubierto o marcado. Típicamente, se seleccionan los 20 clones más abundantes, preferiblemente los 50 clones más abundantes, más preferiblemente los 100 clones más abundantes; más preferiblemente, se seleccionan los 200 clones más abundantes.

En una realización preferida, las regiones VH específicas del antígeno están relacionadas clonalmente. En otra realización preferida, la población de células B está altamente enriquecida en células B que expresan receptores de inmunoglobulina que se unen al antígeno. En este caso, la mayoría de las células B que se proporcionan serán específicas del antígeno y, por lo tanto, puede no ser necesaria una etapa de amplificación de todas las secuencias de ácido nucleico que codifican regiones VH y todos los ácidos nucleicos aislados de dichas células B pueden ser, al menos parcialmente, secuenciados directamente. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un método de acuerdo con las reivindicaciones, comprendiendo dicho método al menos la etapa de proporcionar una población de células B que expresan un repertorio limitado de VL en el que dichas células B comprenden una colección de regiones VH que se enriquecen para regiones VH que codifican anticuerpos dirigidos al antígeno o epítipo de interés.

Un aspecto de la invención es proporcionar un método de acuerdo con la invención, en donde dicha población de células B se obtiene a partir de un ratón transgénico que porta un repertorio limitado de VL, preferiblemente humano.

Un aspecto de la invención es proporcionar un método de acuerdo con la invención, en el que dicho ratón ha sido inmunizado de tal manera que se induce preferentemente la expansión clonal selectiva de células B que reaccionan con el antígeno o epítipo de interés.

Dicho repertorio limitado de VL consiste en menos de 10, o 3 o 2 VL. Lo más preferiblemente se expresa una única VL. En una realización preferida, todas las VL en el repertorio limitado de VL son resistentes a los reordenamientos de ADN y/o a las hipermutaciones somáticas, preferiblemente, la VL tienen una secuencia de línea germinal. La

5 secuencia de la línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se usa frecuentemente en el repertorio humano y tiene una capacidad superior para emparejarse con muchas regiones VH diferentes y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad. Una cadena ligera de línea germinal más preferida es 012.

10 En una realización particularmente preferida, dicho repertorio limitado de VL consta de una única VL humana reordenada, preferiblemente la cadena ligera kappa de línea germinal reordenada IgVK1-39*01/IGJK1*01 (nomenclatura de acuerdo con la base de datos IMGT [http:// www. imgt.org](http://www.imgt.org)) o un fragmento o un derivado funcional del mismo.

15 Un "protocolo de inmunización que provoca la expansión selectiva de células B" tal como se usa en la presente memoria significa que las inmunizaciones primarias y de refuerzo están diseñadas para causar expansiones selectivas de células B que producen anticuerpos que se unen al antígeno o epítipo de interés. El protocolo de inmunización puede usar, por ejemplo, diferentes formas o fragmentos del antígeno durante la inmunización primaria y cada inmunización subsiguiente de refuerzo. Por ejemplo, el antígeno puede expresarse en la membrana de una célula, una proteína recombinante, una proteína recombinante fusionada a otra proteína, un dominio de una proteína o un péptido de una proteína. El protocolo de inmunización puede incluir el uso de un adyuvante durante las
 20 inmunizaciones primarias y/o de refuerzo. En una realización preferida, se usa un adyuvante durante la inmunización primaria sólo para limitar el grado de expansión no específica de las células B espectadoras. Las células B espectadoras son células que se activan sin la etapa de unión del antígeno al receptor del anticuerpo expresado en la superficie de la célula B. Se conoce en la técnica que la inmunización con proteínas de fusión Fc, por ejemplo, a menudo da como resultado una respuesta anti-Fc robusta en la que hasta aproximadamente el 70% de todas las
 25 células B reaccionan a la parte Fc de la proteína de fusión en lugar de al antígeno de interés. En una realización particularmente preferida, se utiliza un protocolo de inmunización sin adyuvante para expandir preferentemente las células B que han sido activadas por el antígeno utilizado para la inmunización. Por lo tanto, un aspecto de la invención es proporcionar un método de acuerdo con las reivindicaciones, comprendiendo dicho método al menos la etapa de proporcionar una población de células B que expresan un repertorio limitado de VL, en el que dicha población de células B se obtiene a partir de un ratón transgénico que porta un repertorio limitado de VL, preferiblemente humano, en el que dicho ratón ha sido inmunizado con un antígeno, de manera que se induce preferentemente la expansión clonal selectiva de células B que reaccionan con el antígeno o epítipo de interés. Una forma preferida de inducir la expansión clonal selectiva de células B es la vacunación con tatuaje de ADN. El término "vacunación con tatuaje de ADN" se refiere a un procedimiento invasivo que implica una aguja vibratoria sólida cargada con ADN plasmídico que pinchan repetidamente la piel, hiriendo tanto la epidermis como la dermis superior y causando inflamación cutánea seguida de cicatrización (Bins 2005/Pokorna 2008).

En los ratones transgénicos con genes de anticuerpos humanos, se han introducido una pluralidad de regiones V de IgH humana y/o una pluralidad de regiones V de cadena ligera kappa de Ig humana en el genoma de los animales (Lonberg 2005). Tras la inmunización, estos ratones montan una respuesta inmune específica de antígeno que se diversifica en la utilización de la región V de cadena pesada y ligera. Se prevé que, tras la inmunización de estos ratones transgénicos con el antígeno, secuenciación de alto rendimiento, la clasificación de frecuencia de los genes VH y VL, la construcción de mapas de calor de CDR3 y emparejamiento aleatorio o guiado de la frecuencia de las regiones VH y VL produce una gran proporción de anticuerpos que se no se unen al antígeno o se unen con baja afinidad (Reddy et al., 2010). Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es utilizar animales transgénicos que albergan un repertorio restringido de cadenas ligeras de inmunoglobulina humana con fines de inmunización. Tales animales transgénicos que albergan un repertorio limitado de cadenas ligeras humanas se describen en el documento WO2009/157771. Preferiblemente, la cadena ligera kappa endógena se silencia funcionalmente en tales animales para minimizar el uso de cadenas ligeras murinas en anticuerpos generados en tales ratones. En una realización adicional, también se silencia funcionalmente la cadena ligera lambda endógena para reducir aún más el uso de cadenas ligeras murinas en anticuerpos. En una realización más preferida, los animales transgénicos que portan una única región VL humana reordenada que es resistente a la hipermutación somática se utilizan para inmunización para generar anticuerpos en los que los procesos de mutación somática y expansión y selección clonal actúan principalmente sobre las regiones VH del anticuerpo expresado en la membrana de una célula B. Por lo tanto, la secuenciación de alto rendimiento y la creación de mapas de calor de CDR3 para identificar las células B expandidas clonalmente dirigidas por antígeno y los anticuerpos que codifican pueden centrarse únicamente en regiones VH. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un método de acuerdo con las reivindicaciones, comprendiendo dicho método la etapa de proporcionar una población de células B, en donde dicha población de células B se obtiene a partir de un animal transgénico, preferiblemente un ratón, que porta un repertorio de VL limitado, preferiblemente humano, en el que dicho animal ha sido inmunizado con un antígeno. En una realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones, comprendiendo dicho método la etapa de proporcionar una población de células B, en la que dicha población de células B se obtiene a partir de un ratón transgénico que porta una única VL humana reordenada, preferiblemente la cadena ligera IGVK1-39 humana (documento WO2009/157771). La ventaja de esta cadena ligera IGVK1-39 humana de línea germinal es su inmunogenicidad anticipada reducida debido a la ausencia de aglutinantes fuertes de DRB1 no autónomos (WO2009/157771, ejemplo 19). Además, se sabe que esta cadena ligera es capaz de emparejarse con muchas regiones VH humanas diferentes. A través de una serie de mecanismos genéticos, el repertorio de VL del anticuerpo que se puede generar en un animal es virtualmente ilimitado.

5 En un aspecto de acuerdo con la invención, el método de acuerdo con las reivindicaciones comprende además la etapa de proporcionar a la célula huésped medios para la expresión de al menos una VH y VL en un formato de inmunoglobulina. Esto significa que las secuencias de VH y VL seleccionadas se expresan junto con otras secuencias de modo que los formatos de anticuerpo pueden expresarse dentro de la célula huésped. En una realización, después de la selección de VH adecuadas, se producen mezclas de anticuerpos por una sola célula mediante la introducción de al menos 2 cadenas pesadas diferentes y una cadena ligera común en una célula (WO2004/009618). En otra realización, después de la selección de las regiones VH adecuadas, al menos dos cadenas pesadas diferentes se modifican de tal manera que se favorece la heterodimerización de cadenas pesadas con respecto a la homodimerización. Alternativamente, la modificación genética es tal que se favorece la homodimerización sobre la heterodimerización. Ejemplos de tales cadenas pesadas modificadas genéticamente son, por ejemplo, los constructos de protuberancia y cavidad (botón en ojal) como se describe en el documento WO 98/050431, o las variantes de carga descritas (Gunasekaran et al., 2010) o WO2009/089004 o WO2006/106905.

Otro aspecto de la invención es proporcionar un método de acuerdo con las reivindicaciones, en el que dichos anticuerpos tienen un efecto deseado de acuerdo con un ensayo de cribado funcional, comprendiendo además el método la etapa de tomar los sobrenadantes de dichas células cultivadas, comprendiendo dichos sobrenadantes dichos anticuerpos, someter los sobrenadantes a al menos un ensayo de cribado funcional y seleccionar al menos una célula que expresa un anticuerpo con las características deseadas. Preferiblemente, dicha célula huésped comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común que es capaz de emparejarse con dicha VH deseada, de manera que los anticuerpos producidos comprendan cadenas ligeras comunes, como se ha descrito anteriormente. En realizaciones específicas, dicha etapa de cultivo y dicha etapa de cribado del método se realizan con al menos dos clones. El método puede incluir opcionalmente un ensayo para medir los niveles de expresión de los anticuerpos que se producen. Tales ensayos son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen ensayos de concentración de proteínas, ensayos específicos de inmunoglobulina tales como ELISA, RIA y similares.

También se proporciona el uso de al menos dos anticuerpos que pueden obtenerse por un método de acuerdo con la invención en la preparación de mezclas de anticuerpos, que comprenden preferiblemente anticuerpos biespecíficos.

Otro aspecto de la invención es proporcionar el uso de al menos dos anticuerpos que pueden obtenerse con un método de acuerdo con la invención, en una serie de ensayos que comprenden uno o más análisis de cribado funcional para anticuerpos biespecíficos, con lo que cada ensayo comprende células cultivadas que producen un anticuerpo biespecífico en el sobrenadante, con lo que la prevalencia de dicho anticuerpo biespecífico en el sobrenadante es al menos 90% más prevalente que la de anticuerpos mono-específicos, y por lo que el sobrenadante se utiliza para el ensayo funcional del anticuerpo biespecífico.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la invención proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones para producir una población definida de moléculas de unión, comprendiendo dicho método al menos las siguientes etapas: a) proporcionar una población de células B que expresan un repertorio limitado de VL en el que esencialmente todas dichas células B portan al menos una VL, b) aislamiento de los ácidos nucleicos de dichas células B, c) amplificación de secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina en dicha muestra, d) secuenciación al menos parcial de esencialmente todos los productos de amplificación, e) realizar un análisis de frecuencia de todas las secuencias de la etapa d), f) seleccionar las secuencias de VH deseadas, g) proporcionar una célula huésped con al menos un vector que comprende al menos una de dichas secuencias de VH deseadas y al menos una secuencia de VL de dicho repertorio limitado de VL, h) cultivar dichas células huésped y permitir la expresión de polipéptidos de VH y VL, i) obtener dichas moléculas de unión. Alternativamente, se pueden reemplazar las etapas c) y d) por las etapas alternativas c' y d': c') construir una biblioteca de ADNc que se criba para las secuencias de ADN específicas de la región VH mediante sondeo con una sonda de ácido nucleico específica para las secuencias de las regiones VH y d') secuenciación al menos parcial de clones que contienen insertos de VH. Cuando se menciona VH o VL, también se prevén derivados funcionales y/o fragmentos de los mismos.

La presente invención describe entre otros un método para producir al menos dos anticuerpos, en el que el punto de partida es una población de células B que expresa un repertorio restringido de regiones variables de cadena ligera (VL) y un repertorio diversificado de regiones variables de cadena pesada (VH). El repertorio de la región VL puede restringirse por ejemplo limitando el número de genes V y J disponibles durante la recombinación en un animal transgénico o insertando una o unas pocas regiones VL previamente reordenadas en el genoma de un animal transgénico, reduciendo o aboliendo la tasa de mutación somática que ocurre en la región VL o por una combinación de estas estrategias (WO2009/157771). Las regiones VH pueden diversificarse por recombinación de segmentos génicos V, D y J y mutación somática. Tras la inmunización, se obtienen colecciones de secuencias de ácidos nucleicos de cadena pesada a partir de células B en los órganos linfoides de animales transgénicos, se someten a secuenciación de alto rendimiento y se analizan para clasificar todas las cadenas pesadas únicas con base en la frecuencia y para clasificar HCDR3 con base en la longitud, porcentaje de identidad y frecuencia para construir mapas de calor de HCDR3. La información de la secuencia de nucleótidos se utiliza para clasificar las regiones VH

5 de acuerdo con su frecuencia en la colección y las secuencias que ocurren frecuentemente, representando asimismo regiones VH expresadas en células B que han experimentado expansión clonal como resultado de la estimulación del antígeno, son clonadas en vectores de expresión conjuntamente con una de las regiones VL presentes en el repertorio restringido. Utilizando un repertorio restringido de VL, se simplifica mucho la búsqueda de pares VH/VL originales porque no es necesario recuperar, analizar o clasificar la información de la secuencia de VL del animal inmunizado; en el caso de que el repertorio restringido de VL original comprenda una única VL, todas las combinaciones de VH/VL representarán pares originales tal como se utilizan en células B *in vivo*. En caso de que el repertorio restringido original de VL contenía unas pocas regiones VL, la combinación con las regiones VH clasificadas produce sólo pequeñas colecciones de combinaciones de VH/VL que pueden ser cribadas rápidamente por la actividad de unión y funcional.

15 Los vectores de expresión que contienen las regiones VH y VL se usan para transfectar células para obtener rápidamente anticuerpos para ensayos de unión y cribado funcional. Pueden obtenerse diferentes formatos de anticuerpos utilizando vectores de expresión que contienen diferentes elementos genéticos que, por ejemplo, impulsan la formación de fragmentos de anticuerpos o anticuerpos con diferentes isotipos, anticuerpos biespecíficos, mezclas de anticuerpos o anticuerpos que han modificado regiones variables o constantes para funciones efectoras modificadas o semivida modificada, o contienen sitios de unión adicionales, carecen de secuencias de aminoácidos que tengan un efecto perjudicial sobre el desarrollo, la producción o la formulación de anticuerpos tales como sitios de glicosilación y desamidación.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: Análisis de secuencia profunda y clasificación de frecuencia de genes VH expresados en células B de bazo murino usando cebadores específicos de la familia VH

Este ejemplo describe el uso de secuenciación de alto rendimiento para recuperar y analizar el repertorio de regiones VH del anticuerpo expresadas en el bazo de ratones de tipo silvestre inmunizados con los antígenos ErbB2 o ErbB3. Debido a que la inmunización enriquecerá la población de células B para los clones dirigidos contra el inmunógeno, se anticipa que la secuenciación de un gran número de transcritos de VH identifica estos clones de células B, ya que estarán presentes dentro de la población en frecuencias más altas. En este ejemplo, aproximadamente 25.000 genes de la región VH del bazo de un solo ratón inmunizado se recuperan mediante secuenciación de alto rendimiento y se clasifican en función de la frecuencia.

35 Se recogieron bazos de ratones inmunizados ya sea con el antígeno ErbB2 o ErbB3 usando tatuaje de ADN (véase el ejemplo 6). Se preparó una única suspensión de células de acuerdo con técnicas estándar. Se aislaron células B de esta suspensión de células únicas esplénicas en un procedimiento MACS de dos etapas usando materiales de Miltenyi Biotec (<http://www.miltenyibiotec.com/en/default.aspx>). Brevemente, se aislaron células B esplénicas eliminando primero las células que no son de tipo B, seguido por selección positiva de células B. Las células que no son de tipo B se eliminaron mediante marcación de células T, células NK, células mieloides, células plasmáticas y eritrocitos con un cóctel de anticuerpos biotinilados (Tabla 1) y subsecuente incubación con microperlas de estreptavidina. A continuación, se eliminaron las células que no son de tipo B sobre una columna LD. El flujo a través, que contenía la fracción de células B enriquecida, se marcó con microperlas magnéticas usando anticuerpos anti-IgG2ab y anti-IgG2ab conjugados con FITC (Tabla 1) seguido de marcación con microperlas anti-FITC (Miltenyi Biotec, Cat. N° 130-048-701). Posteriormente, las células marcadas con IgG se seleccionaron positivamente sobre una columna LS (Miltenyi Biotec, Cat. N° 130-042-401). Se realizaron procedimientos MACS de acuerdo con manuales específicos del kit/microperlas suministrados por Miltenyi. La pureza de las células B aisladas se determinó por análisis FACS de acuerdo con técnicas estándar utilizando los anticuerpos enumerados en la Tabla 2.

Tabla 1: anticuerpos para marcar células que no son de tipo B

Ab #	Antígeno	Etiqueta	Clon	Proveedor	Cat. N°
Ab0064	IgG1	FITC	A85-1	Becton Dickinson	553443
Ab0131	IgG2ab	FITC	R2-40	Becton Dickinson	553399
Ab0158	CD138	Biotina	281-2	Becton Dickinson	553713
Ab0160	CD3E	Biotina	145-2C11	eBioscience	13-0031
Ab0161	Ly-6G	Biotina	RB6-8C5	eBioscience	13-5921
Ab0162	TER-119	Biotina	TER-119	eBioscience	13-5921
Ab0163	CD49b	Biotina	DX5	eBioscience	13-5971
Ab0164	CD11b	Biotina	M1/70	eBioscience	13-0112

Tabla 2: anticuerpos para análisis FACS

Ab #	Antígeno	Etiqueta	Clon	Proveedor	Cat. N°
Ab0064	IgG1	FITC	A85-1	Becton Dickinson	553443
Ab0131	IgG2ab	FITC	R2-40	Becton Dickinson	553399
Ab0067	CD138	APC	281-2	Becton Dickinson	558626
Ab0160	IgM	PE-CY7	II/41	eBioscience	25579082
Ab0161	IgD	PE	11-26	eBioscience	12599382
Ab0162	CD19	PerCP-cy5.5	1D3	eBioscience	45019382
Ab0163	B220	Aloficocianina-eFluor 780	RA3-6B2	eBioscience	47045282

- 5 Para extraer los ácidos nucleicos de las células B, las células se lisaron en Trizol LS (Invitrogen). Se preparó ARN y se sintetizó ADNc de acuerdo con técnicas estándar. Los cebadores diseñados para la amplificación de los repertorios de VH murinos se tomaron como material de partida y se modificaron para su uso en la secuenciación de alto rendimiento 454 mediante la adición de secuencias del cebador 454 (cebador 454 hacia adelante: CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG; cebador 454 inverso: CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG). Las secuencias completas de cebadores para la amplificación por PCR de los repertorios de VH murinos se muestran en las Tablas 3 y 4.
- 10

Tabla 3: Los cebadores 454 Phusion hacia delante, completos. La parte de fusión (CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAG) está en cursiva, en negrita está la parte 5' de los genes VH.

nombre	secuencia	oscilación
mIGHV1A_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAGKTCMAGCTGCAGCAGTC	K=15%T/85%G M=15%A/85%C
mIGHV1B_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGSAGRTCCASCTGCAGCAGTC	SI=5%G/95%C R=5%A/95%G S2=95%G/5%C
mIGHV1C_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGSAGGTCCAGCTHCAGCAGTC	S=50%C/50%G H=33%A/33%C/33%T
mIGHV1D_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGSAGRTCCAGCTGCAACAGTC	S=80%G/20%C R=15%A/85%G
mIGHV1E_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGCAKGTCCAACCTGCAGCAGCC	K=15%T/85%G
mIGHV1F_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGCAGGCTTATCTACAGCAGTC	
mIGHV1G_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGCAGCGTGAGCTGCAGCAGTC	
mIGHV2_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGCAGGTGCAGMTGAAGSAGTC	M=15%A/85%C S=50%C/50%G
mIGHV3_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGSAKRTGCAGCTTCAGGAGTC	S=80%G/20%C K=50%G/50%T R=15%A/85%G
mIGHV4_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAGGTGAAGCTTCTCCAGTC	
mIGHV5A_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAAAGTGM WGCTGGTGGAGTC	M=15%A/85%C W=80%A/20%T
mIGHV5B_464	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAVGTGAAGCTSGTGGAGTC	V=20%C/40%G/40%A S=80%G/20%C
mIGHV6A_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAAAGTGAARMITTGAGGAGTC	R=50%A/50%G M=50%A/50%C
mIGHV6B_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGATGTAAGCTGGAAGTGTGTC	
mIGHV6C_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAGGAGCTGGATGAGTC	
mIGHV7_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAGGTGMAGCTGRTGGAAATC	M=50%A/50%C R=50%A/50%G
mIGHV8_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGCAGRTTACTCWGAASAGTC	R=50%A/50%G W=20%A/80%T S=80%G/20%C
mIGHV9_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGCAGATCCAGTTSGTRCAGTC	S=80%G/20%C R=15%A/85%G
mIGHV10_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAGGTGCAGCTTGTGAGTC	
mIGHV11_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGGAAAGTGCAGCTGTTGGAGAC	
mIGHV13_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGSAGGTGCAGCTKG TAGAGAC	S=50%C/50%G K=50%G/50%T
mIGHV15_454	CGTATCGCCTCCCTCGGCGCCATCAGCAGGTTACCTACAACAGTC	

Tabla 4: Los cebadores 454 Phusion inversos, completos. La parte de fusión (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG) está en cursiva. La parte específica para los segmentos J murinos está en negrita.

Nombre	secuencia
mlGHJ1_454	<i>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG</i> GAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
mlGHJ2b_454	<i>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG</i> GAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC
mlGHJ3_454	<i>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG</i> GCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC
mlGHJ4b_454	<i>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG</i> GAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC

- 5 En la PCR, los cuatro cebadores JH inversos se mezclaron en proporciones iguales antes de su uso. Los cebadores hacia adelante no se mezclaron, por lo que se realizaron 22 reacciones de PCR. Los productos de reacción de PCR se analizaron en gel y se esperaba que rindieran productos de PCR de 350 a 400 pares de bases de longitud. Algunos productos de PCR se mezclaron con base en la frecuencia de genes VH en los repertorios normales (Tabla 5, a continuación). Se esperaba que las intensidades de las bandas sobre gel correspondieran con las relaciones enumeradas en esta tabla y cuando este era el caso, los productos de PCR se mezclaron para secuenciación con base en los volúmenes. Cuando las intensidades de las bandas sobre gel no correspondían a las proporciones indicadas en la Tabla 5, se podrían ajustar bandas sobre o subrepresentadas. Como la secuenciación de alto rendimiento también identifica el cebador y la reacción de PCR, las proporciones siempre pueden "ajustarse" después de la secuenciación y la frecuencia de cada gen VH por reacción de PCR analizada.

Tabla 5: Productos de PCR que pueden agruparse.

Nombre de la agrupación	Porcentaje (%)
1A	39
1B	
1CD	
1EFG	
2	4
3/4	7
5	15
6	1
7/8	10
9	16
10/11	6
13/15	2

- 15 El análisis de las secuencias se realizó con el fin de clasificar todos los genes VH únicos de un único animal, inmunización y/o población celular en frecuencia:
- Se analizaron las secuencias crudas para identificar aquellas que codifican un marco de lectura abierto de la región VH que contiene al menos HCDR3 más una secuencia marco vecina para identificar la VH. Preferiblemente, el marco de lectura abierto de la región VH contiene CDR1 para el marco 4
- 20
- Todas las secuencias se tradujeron en secuencias de aminoácidos.
 - Todas las secuencias se agruparon con base en la secuencia idéntica de la proteína HCDR3.
 - Todas las agrupaciones se clasificaron en función del número de secuencias VH en cada grupo.

- 5 - Una alineación de todas las secuencias en cada grupo se hizo con base en las secuencias de proteínas op, en donde las diferencias con la línea germinal VH y germinal JH están indicados. Todas las secuencias idénticas en la alineación se agrupan de nuevo.

10 Esto proporciona información sobre el gen VH que ocurre con más frecuencia dentro de un grupo CDR3. Este gen puede tener diferencias en comparación con la línea germinal como resultado de la hipermutación somática. Este gen se elige para la construcción y expresión con el gen VL común.

15 Se realizó la secuenciación de alto rendimiento utilizando secuenciación Roche 454 en muestras de un ratón inmunizado individual. Otros métodos de secuenciación de alto rendimiento están disponibles para un experto en la materia y también son adecuados para la aplicación en el método. En total, se usaron 118.546 lecturas de secuencia como un conjunto de datos sin procesar para identificar primero secuencias que representaban regiones VH de longitud completa o porciones de las mismas que codificaban al menos 75 aminoácidos. Para cada secuencia dentro de este conjunto, se identificaron los marcos 2-4 y todas las 3 regiones CDR como se describe (Al-Lazikani et al., 1997). Posteriormente, se sometieron las secuencias a una serie de criterios incluyendo la presencia de un residuo canónico de cisteína, la ausencia de codones de detención y la longitud mínima para cada una de las regiones CDR. Todas las regiones VH que cumplen estos criterios se agruparon a continuación para identificar la frecuencia en la que se utilizan cada CDR3 única, generando así mapas de calor de CDR3 de cadena pesada. A continuación, todos los clones idénticos en cada grupo CDR3 se agruparon y alinearon con la secuencia de VH de línea germinal. Este análisis permite la identificación de genes VH abundantemente utilizados en grandes repertorios. Aunque este análisis puede llevarse a cabo manualmente, el uso de un algoritmo que incluye las instrucciones anteriores facilita enormemente el proceso de análisis (Reddy et al., 2010).

25 Un total de 18.659 grupos fueron identificados dentro de las 30.995 secuencias de VH anotadas y se encontró que 2.733 grupos que tenía más de un miembro. Además, 123 grupos tenían más de 20 miembros. Los primeros 40 grupos de estos se muestran en la Tabla 6. Nueve grupos tenían más de 100 miembros. El número de 30.000 secuencias es más que suficiente, ya que muchos clones aparecen sólo una vez y los experimentos están dirigidos a identificar clones frecuentes. De hecho, menos de 30.000 secuencias funcionaría bastante bien. Los alineamientos de los dos grupos más grandes demostraron la presencia del 100% de los genes de la línea germinal y variantes que contenían mutaciones a través del gen VH (datos no mostrados).

Tabla 6: Ejemplo de grupos identificados por CDR3 único.

Grupo #	# de secuencias idénticas	HCDR3
Grupo 001	337	YSNYWYFDV
Grupo 002	212	GGLRGYFDV
Grupo 003	130	YDSNYWYFDV
Grupo 004	124	TYDNYGGWFAY
Grupo 005	116	AGLLGRWYFDV
Grupo 006	116	RDY
Grupo 007	113	RFGFPY
Grupo 008	103	AITTVVATDY
Grupo 009	102	AYYYGGDY
Grupo 010	99	SGPYYSIRYFDV
Grupo 011	91	SEGSSNWWYFDV
Grupo 012	89	GTLRWYFDV
Grupo 013	76	DFYGSSYWYFDV
Grupo 014	75	DNWDWYFDV
Grupo 015	73	FYDYALYFDV
Grupo 016	72	GNYGSSYFDY
Grupo 017	72	WKVDYFDY

Grupo 018	70	GGYWYFDV
Grupo 019	69	YKSNYWYFDV
Grupo 020	66	LLPYWYFDV
Grupo 021	64	SYYGSSYWYFDV
Grupo 022	63	GGYYGSRDFDY
Grupo 023	63	DYDWYFDV
Grupo 024	61	TYNNYGGWFAY
Grupo 025	57	GGLYYDYPFAY
Grupo 026	57	WGDYDDPFDY
Grupo 027	56	DYYGSSYWYFDV
Grupo 028	55	EATY
Grupo 029	52	YGSSYWYFDV
Grupo 030	52	WGYGSKDAMDY
Grupo 031	51	WGRELGNFYDY
Grupo 032	49	YGNWYFDV
Grupo 033	48	TVTTGIYYAMDY
Grupo 034	48	HYYSNYVWWYFDV
Grupo 035	47	GALRGYFDV
Grupo 036	47	HYYGSTWFAY
Grupo 037	45	LGAYGNFDY
Grupo 038	44	REFAY
Grupo 039	43	EAAYYFDY
Grupo 040	43	GSLRGYFDV

- 5 Ejemplo 2: Análisis de secuencia profunda y clasificación de la frecuencia de los genes VH expresados en células B de bazo IgG+ de murino usando un solo conjunto de cebadores.

En este ejemplo, se usó un cebador específico para la región constante CH1 de IgG para interrogar el repertorio de secuencias de genes VH expresadas en células B de memoria IgG+ en el bazo de ratones inmunizados con la proteína de fusión ErbB2-Fc. En el extremo 5' del ARNm, se hibridó un cebador de oligonucleótido con un tramo de guanina triple que se añadió a cada ARNm mediante una transcriptasa inversa de MMLV. Este cebador 5' introduce un sitio de cebado en el extremo 5' de todos los ADNc. Utilizando este enfoque, las amplificaciones de todas las regiones VH expresadas en células B IgG+ se pueden hacer usando el cebador 5' y el cebador CH1, evitando un sesgo potencial introducido por el uso de un gran número de cebadores específicos de la familia VH y enfocando el análisis en una población de células B que ha sufrido aparentemente activación y cambio de isotipo como resultado de la estimulación con antígeno. Se inmunizaron ratones C57BL/6 de tipo silvestre por vía intraperitoneal con proteína ErbB2-Fc (1129ER, R&D System) disuelta en adyuvante Titermax Gold (TMG, Sigma Aldrich, T2684) en los días 0, 14 y 28 y con ErbB2-Fc en PBS en el día 42. Se purificaron células B esplénicas totales el día 45 mediante el procedimiento MACS como se detalla en el Ejemplo 1. La fracción de células B esplénicas totales de ratones inmunizados satisfactoriamente, determinada por los títulos de anticuerpo en suero en ELISA, contenía 5-10% de células B IgG+. Este material se usó para optimizar las condiciones de la PCR.

Los ratones transgénicos que contienen la cadena ligera HuVK1-39 humana, como se describe en (WO2009/157771), se inmunizaron con la proteína de fusión EGFR-Fc (R&D Systems, Cat. N° 334-ER) emulsionada en adyuvante Titermax Gold (TMG, Sigma Aldrich, T2684) o, como control, con adyuvante Titermax Gold emulsionado con PBS en un intervalo de 14 días. Este último grupo se incluyó para identificar el repertorio de VH de

5 células B que es sensible solo al adyuvante. Los ratones se inmunizaron tres veces con emulsión de EGFR-Fc/adyuvante o emulsión adyuvante solo en los días 0, 14 y 28. El día 35, se determinó el título en suero de anti-EGFR mediante FACS usando procedimientos estándar. Los ratones que habían desarrollado el día 35 un título en suero > 1/1.000 recibieron un refuerzo intraperitoneal final con proteína EGFR-Fc disuelta en PBS el día 42 seguido de recogida del bazo el día 45 para aislamiento de células B esplénicas. Las células B esplénicas se aislaron del bazo total por selección positiva usando perlas magnéticas específicas de CD19 de ratón. Se lisó la fracción de células B esplénica en Trizol LS para aislar el ARN total.

Después del aislamiento de ARN, se preparó ADNc (población de células de ratones transgénicos de cadena ligera HuVK1-39 y muestra simulada y de control/ensayo con una población celular similar) utilizando transcriptasa inversa MMLV en presencia de cebadores CH1 rev 0, 1, 2 o 3 de ratón, junto con MMLV 454 fw (Tabla 7). Se ensayaron cuatro cebadores diferentes para identificar el que resultó en rendimientos óptimos de ADNc y productos de PCR; se diseñó MMLV para contener el fragmento 3' GGG similar a los cebadores Clontech, eliminando los sitios de clonación, pero añadiendo las secuencias de 454 (Kit de Amplificación de ADN SMARTer^{MR} RACE, Cat. N° 634924, Clontech).

Como control, se preparó también ADNc utilizando el protocolo estándar de Clontech; el kit de síntesis de ADNc SMARTerPCR utilizando el oligo SMARTer II A junto con los cebadores CH1 rev 0, 1, 2 o 3 específicos del gen (Kit de Amplificación de ADNc SMARTer^{MR} RACE, Cat. N° 634924, Clontech). Usando procedimientos estándar, se determinaron el número óptimo de ciclos de PCR y la combinación óptima de cebadores. Se siguió el protocolo de Clontech para las condiciones de PCR.

A continuación, se amplificó el material de los ratones transgénicos inmunizados de cadena ligera HuVK1-39 y ratones inmunizados de manera simulada bajo condiciones óptimas. Preferiblemente, se llevaron a cabo las amplificaciones con un cebador inverso secuencia arriba del cebador utilizado en la síntesis de ADNc para obtener un producto PCR más específico (PCR anidada). Se clonó ADNc en pJET de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit de clonación de PCR CloneJET, Fermentas # K1232) y 100 clones de la secuencia de Sanger. El producto de PCR del material derivado de los animales inmunizados e inmunizados en forma simulada se purificó y se usó para secuenciación con 454. Los datos se analizaron y se usaron para construir mapas de calor de CDR3 y se construyeron como se describe en el ejemplo 1.

Tabla 7: Cebadores utilizados en este estudio. El cebador MMLV 454 fw híbrido en el extremo 5' del ARNm. La posición de los cebadores CH1 rev se indica en la Figura 1.

número	Nombre	Secuencia
DO_116 5	MMLV 454 fw	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGG
DO_116 6	454 fw	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG
DO_116 7	CH1 rev 0 de ratón	TGATGGGGGTGTTGTTTTGG
DO_116 8	CH1 rev 1 de ratón	CAGGGGCCAGTGGATAGAC
DO_116 9	CH1 rev 2 de ratón	GCCCTTGACCAGGCATCC
DO_116 0	CH1454 rev 0 de ratón	CTGGACAGGGATCCAGAGTTC
DO_117 1	de ratón CH1454 rev 1	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATGGGGGTGTTGTTTTGG</u>
DO_117 2	de ratón CH1454 rev 2	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGGGGCCAGTGGATAGAC</u>
DO_117 3	de ratón CH1454 rev 3	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCCCTTGACCAGGCATCC</u>
DO_117 4	oligo smart IV	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGGACAGGGATCCAGAGTTC</u>
DO_117 5	oligo corto smart IV	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT GGCCATTACGGCCGGG
DO_117 6	5PCR cebador 454	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGG
DO_117 7		CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGA AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

5	Leyendas:	secuencia 5' de 454	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG
		secuencia 3' de 454	<u>CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG</u>
		secuencia SMART	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
		Sfil	GGCCATTACGGCC

10 Los resultados de estos experimentos producen mapas de calor de CDR3 de cadena pesada que representan secuencias usadas por células B que han sufrido activación y cambio de isotipo como resultado de la estimulación por antígeno. Las secuencias de la región VH presentes en los grupos de ocurrencia más frecuente derivados de ratones transgénicos que contienen la cadena ligera IGVK1-39 humana se pueden utilizar para combinarse con la secuencia de cadena ligera IGVK1-39 humana para colecciones de anticuerpos monoclonales humanos enriquecidos por anticuerpos específicos para EGFR.

15 Ejemplo 3: Análisis de secuencia profunda y clasificación de frecuencia de genes VH expresados en células B de bazo de IgG+ murino sin cebadores específicos de la familia VH

Para este ejemplo, el objetivo fue optimizar la tecnología de secuenciación profunda de genes VH de IgG utilizando amplificaciones con base en cebadores que amplifican todas las cadenas pesadas de Ig y por lo tanto evitar el sesgo potencial introducido por los cebadores específicos de la familia VH.

20 La amplificación del gen VH del anticuerpo para generación de una biblioteca de presentación en fagos utiliza cebadores que añaden sitios de restricción para la clonación con genes VH en la posición requerida dentro de los genes. Esto requiere sitios de hibridación del cebador dentro de los genes VH y, por lo tanto, cebadores específicos de la familia VH. En el ejemplo 1 se usaron tales secuencias de cebador. Un inconveniente del uso de los cebadores de la familia VH es que amplifican un subconjunto de todos los genes VH en el repertorio. Como se utiliza una gran colección de cebadores y reacciones de PCR para amplificar todos los genes y los productos PCR se mezclan después, esto dará lugar a un sesgo de las relaciones de los genes VH originalmente presentes en las muestras y, por lo tanto, una representación por encima/debajo de los genes VH en el repertorio final secuenciado. Para eludir estos problemas en este estudio se utilizó el protocolo de amplificación RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc) en combinación con un conjunto de cebadores específicos de IgG1-CH1. Se utilizó el kit para RACE SMARTer (Clontech; Catálogo N° N 634923 y Catalogo N° 634924) que acopla un adaptador sintético 5' con el ARNm. La enzima RT SMARTScribe produce una copia del transcrito de ARN. La RT SMARTScribe inicia la síntesis de ADNc a partir del ARNm de IgG en un cebador antisentido que reconoce una secuencia conocida en el ARNm de IgG tal como la cola poli A en este estudio.

35 Cuando la enzima RT SMARTScribe alcanza el extremo 5' del molde de ARN de IgG, añade 3 a 5 residuos al extremo 3' del ADNc de la primera cadena. El oligo IIA El SMARTer contiene un tramo terminal de bases modificadas que hibridan con esta cola extendida añadida por la RT SMARTScribe, lo que permite que el oligo sirva como molde para la RT. Posteriormente, la RT SMARTScribe cambia los moldes de la molécula de ARNm por el oligo IIA SMARTer, generando una copia completa de ADNc bicatenaria del ARN original con la secuencia SMARTer adicional en el extremo. A continuación, para la amplificación por PCR del ADNc de VH, se aplican un oligo que hibrida con la secuencia 5' SMART en un extremo del ADNc (5' PCR primer 454) y un cebador específico de IgG-CH1 en el otro extremo del ADNc (Tabla 8). De este modo, se amplifican las regiones VH de las cadenas pesadas de IgG con una sola combinación de cebadores, independientemente de los cebadores específicos de la familia VH, y en este caso se utilizó un cebador específico para la región constante CH1 de IgG para interrogar el repertorio de las secuencias del gen VH expresadas en las células B de memoria IgG+ en el bazo de ratones inmunizados con la proteína de fusión ErbB2-Fc. En el mejor de los casos, el cebador inverso específico de IgG-CH1 debe hibridar tan cerca posible del gen VH para aumentar la probabilidad de que pueda secuenciarse el gen VH completo.

45 Las muestras para secuenciación profunda se obtuvieron a partir de dos ratones transgénicos inmunizados que portaban la cadena ligera humana huVk1-39; los ratones se numeraron como ratón 1145 y ratón 1146. En resumen, se inmunizaron los ratones transgénicos que contenían la cadena ligera HuVK1-39 humana, como se describe en (WO2009/157771), con la proteína de fusión EGFR-Fc (R&D Systems, Cat. N° 334-ER) emulsionada en adyuvante Titermax Gold (TMG, Sigma Aldrich, T2684). Los ratones se inmunizaron tres veces con emulsión de EGFR-Fc/adyuvante en los días 0, 14 y 28. El día 35, se determinó el título del suero anti-EGFR mediante FACS usando procedimientos estándar. Los ratones que habían desarrollado el día 35 un título en suero > 1/1.000 recibieron un refuerzo intraperitoneal final con proteína EGFR-Fc disuelta en PBS el día 42 seguido por la recolección del bazo el día 45 para el aislamiento de células B esplénicas. Se aislaron células B esplénicas del bazo total por selección positiva usando perlas magnéticas específicas de CD19 de ratón. Se lisó a fracción de células B esplénica en Trizol LS para aislar el ARN total de acuerdo con procedimientos estándar.

60 El ADNc se sintetizó a partir de estas muestras de ARN usando el kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE de acuerdo con las instrucciones del fabricante para llegar al denominado ADNc listo para RACE. Este ADNc listo para RACE se amplificó posteriormente por PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se utilizó el cebador

- 5 diseño, Eurofins proporcionó la secuenciación con la tecnología GS FLX+, donde la longitud de lectura es de 600-700 pb en promedio.

La secuenciación profunda reveló más de 50.000 lecturas por ratón y los datos se analizaron como se explica en el ejemplo 1. La Tabla 10 proporciona los 25 grupos más grandes de dos de las muestras analizadas.

Tabla 10: El tamaño del grupo, la secuencia de HCDR3 y los genes VH utilizados se presentan a partir de muestras de ADNc de ratón 1145 y del ratón 1146. El #/25 proporciona la frecuencia del gen VH en 25 grupos.

Muestra 145				Muestra 146					
Nombre	Tamaño grupo	Secuencia de CDR3	Gen VH	#/25	Nombre	Tamaño	CDR3	VH	#/25
Grupo 001	1243	HYSDYPYFDY	J558.66.165	19	Grupo 001	2570	EGRGNYPFDY	36-60.6.70	2
Grupo 002	858	YGDYINNVDY	J558.66.165		Grupo 002	1791	DYSYAMDY	J559.12.162	1
Grupo 003	543	GFYGYDF	7183.19.36	1	Grupo 003	1251	MRLYYGIDSSYWYFDV	3609.7.153	3
Grupo 004	376	LDTIVEDWYLDV	J558.66.165		Grupo 004	905	MRLFYGSRYSYWYFDV	3609.7.153	
Grupo 005	335	LDTIVEDWYFDV	J558.66.165		Grupo 005	841	SYYYGSRESYD	J558.53.146	1
Grupo 006	320	YGDYSNYVDY	J558.66.165		Grupo 006	614	GKYYPYFDY	J558.12.102	2
Grupo 007	313	TRQFRLRDFDY	J558.83.189		Grupo 007	515	WGSSGY	J558.55.149	1
Grupo 008	290	FDYGSTQDYAMDY	J558.66.165	1	Grupo 008	477	TGYNNYGSRFYI	J558.18.108	3
Grupo 009	213	SGNYDFYPMDY	J558.66.165	1	Grupo 009	441	RLVDY	J558.67.166	3
Grupo 010	205	RLVEY	J558.66.166		Grupo 010	378	WWFLRGVYVMDY	J558.85.191	4
Grupo 011	197	YGDYSNNVDY	J558.66.165		Grupo 011	306	TGYNNYGSRFYI	J558.18.108	
Grupo 012	194	LDDGYPWFAY	J558.55.149	1	Grupo 012	303	RLVEY	J558.67.166	
Grupo 013	182	LSDYGSSAYLYLDV	J558.66.165		Grupo 013	291	RLIEY	J558.67.166	
Grupo 014	180	QVDYYGSSYWYFDV	J558.66.165		Grupo 014	291	GDWYFDV	VGAM.8-3-61	2
Grupo 015	179	LGYGSSYL YFDV	J558.66.165		Grupo 015	265	RQFLLGVYAMDY	J558.85.191	
Grupo 016	175	LGYGSIYL YFDV	J558.66.165		Grupo 016	237	RHFLLGVYAMDY	J558.85.191	
Grupo 017	168	LTDYGSPTYW FFDV	J558.66.165		Grupo 017	230	EGRVTLLDY	36-60.6.70	
Grupo 018	162	LDYYGSSYGWYFDV	J558.66.165		Grupo 018	216	GDWYFDY	VGAM.8-3-61	
Grupo 019	162	YGDYINSVDY	J558.66.165		Grupo 019	212	MRLFYGSSYSYWYFDV	3609.7.153	
Grupo 020	159	YTDYINSVDY	J558.66.165		Grupo 020	203	GSGYVYAMDY	VGAM3.8-4-71	1
Grupo 021	156	LDTIVEDWYFDV	J558.66.165		Grupo 021	200	GTTAYYAMDY	VGAM3.8-3-61	2
Grupo 022	148	DYYGSSYGFYD	VGAM66.165	1	Grupo 022	197	TGYNNYGSRFAY	J558.18.108	
Grupo 023	147	IYNSLIMDY	J558.66.165		Grupo 023	182	GKYYPYFDY	J558.12.102	
Grupo 024	143	LGYGSSYWYFDV	J558.66.165		Grupo 024	163	GTTSYAMDY	VGAM3.8-3-61	
Grupo 025	142	GGYYPYAMDY	J558.12.102	1	Grupo 025	153	RGSYGTCTFDY	J558.85.191	
Total	7.190	Diferente VH	# de VH diferente	7	Total	13.232	# de VH diferente		12

5 Los resultados de la Tabla 10 muestran que diferentes genes VH se amplificaron y secuenciaron en los procedimientos de PCR y secuenciación profunda. La muestra 1145 contiene muchos grupos dentro de los 25 grupos más grandes que usan el gen J558.66.165. La muestra 1146 contiene una gran diversidad de genes VH con 12 genes VH diferentes en los que cada uno está presente entre una y cuatro veces dentro de los 25 grupos más grandes. Estos resultados sugieren que el método permite una amplificación y un análisis imparcial de los repertorios de VH de IgG.

10 Para concluir, estos experimentos dieron lugar a una clasificación de los VH más frecuentes que representan secuencias usadas por células B que han sufrido activación y cambio de isotipo como resultado de la estimulación por antígeno. Las secuencias de la región VH presentes en los grupos más frecuentes derivados de los ratones transgénicos que contienen la cadena ligera IGVK1-39 humana se pueden utilizar para combinar con la secuencia de la cadena ligera IGVK1-39 humana con colecciones de anticuerpos monoclonales humanos enriquecidos con anticuerpos específicos para EGFR.

Ejemplo 4: Estrategias de inmunización para la construcción de mapas de calor de confiables de CDR3 de VH

20 Está disponible una amplia gama de métodos de inmunización que utilizan varios formatos de antígeno en combinación con un adyuvante para optimizar la respuesta inmunitaria específica de antígeno en animales. Para la clasificación de los genes de cadena pesada de uso frecuente que representan óptimamente las regiones VH a partir de células B que se han expandido como resultado de la estimulación con el antígeno de interés, es crítico que se utilicen protocolos de inmunización que enfocan la respuesta inmune en dicho antígeno o incluso en un epítipo de dicho antígeno. Por lo tanto, el uso de antígenos fusionados o acoplados a proteínas portadoras (tales como proteínas de fusión Fc o proteínas acopladas a portadores tales como Hemocianina lapa de ojo de cerradura, conocidas en la técnica) debe evitarse o restringirse a una única etapa en el procedimiento de inmunización como una única inmunización primaria o una inmunización de refuerzo única. Se espera que incluso una activación limitada de células B mediante el uso de proteínas portadoras o de fusión o adyuvante pueda aparecer en secuencias de VH clasificadas/mapas de calor de HCDR3, contaminando así el análisis. Idealmente, las inmunizaciones se realizan con "antígenos esencialmente puros". El presente ejemplo demuestra que la inmunización única o repetida con un antígeno fusionado a una porción Fc efectivamente da lugar a la expansión de células B irrelevantes, es decir, células B que reaccionan con la porción Fc en lugar de con el antígeno de interés.

25 Se inmunizaron ratones transgénicos VL humanos individuales (grupo 1) y ratones de tipo silvestre (grupo 2) con la línea celular tumoral A431 que sobreexpresa EGFR el día 0 y el día 14 (2×10^6 células A431 en 200 μ L de PBS), seguido de inmunización ip con la proteína de fusión Fc-EGFR emulsionada en Titermax Gold. El día 35, se recogió suero y se ensayó en ELISA por la presencia de anticuerpos anti-Fc.

30 Como control, se inmunizó un tercer grupo de ratones que comprendían tanto ratones transgénicos VL humanos individuales como ratones de tipo silvestre (grupo 3) con proteína de fusión Fc-EGFR sólo en los días 0, 14, 28, 42 y 52. En el día 56, se recogió el suero y se ensayó en ELISA por la presencia de anticuerpos anti-Fc.

35 Los resultados (Figura 3) muestran que incluso después de una sola inmunización con Fc-EGFR, se detectan anticuerpos contra la porción Fc en los grupos 1 y 2. Aunque los niveles de anticuerpos anti-Fc en estos dos grupos eran inferiores a los niveles de anti-Fc observados en el grupo 3, las regiones VH que codifican estos anticuerpos anti-Fc se encontrarán en mapas de calor de CDR3, contruidos como se describe en el ejemplo 1. Si se desea, dichos aglomerantes específicos de Fc pueden ser evitados usando esencialmente antígenos puros tales como en el tatuaje de ADN o por eliminación de aglutinantes específicos de Fc de la población de células B antes del análisis de la secuencia de VH.

Ejemplo 5: Vacunación con ADN mediante tatuaje

40 La vacunación con ADN aprovecha el ADN plasmídico que codifica un antígeno proteico para inducir una respuesta inmune contra dicho antígeno proteico. No hay necesidad de purificación de las proteínas para la inmunización y las proteínas, incluidas las proteínas de membrana, se expresan en su configuración natural en una membrana celular (Jechlinger et al., 2006/Quaak et al., 2008/Stevenson et al., 2004).

45 En este ejemplo, se ha utilizado la vacunación con tatuaje de ADN, un procedimiento invasivo que implica una aguja vibratoria sólida cargada con ADN plasmídico que pincha repetidamente la piel, lesionando tanto la epidermis como la dermis superior y provocando inflamación cutánea seguida de cicatrización (Bins 2005/Pokorna 2008). Aquí se usaron estrategias de vacunación con tatuaje de ADN para inducir respuestas de anticuerpos en ratones. El objetivo fue evaluar la calidad de la respuesta de anticuerpos en ausencia o presencia de adyuvante. Como se describe en el ejemplo 4, para la construcción de mapas de calor de CDR3 adecuados, es deseable centrar la respuesta del anticuerpo en el antígeno de interés, omitiendo el uso de un adyuvante que provoca la expansión clonal de células B no deseadas.

50 Para la vacunación con tatuaje, se usaron plásmidos que codifican ErbB2 humano y plásmidos que codifican hemaglutinina (HA) del virus de la influenza. Se ensayaron tres estrategias de vacunación con tatuaje de ADN para optimizar el cebado y el refuerzo de la respuesta inmune: (A) vacunación con ADN del vector que codifica al antígeno ErbB2 o HA, (B) vacunación con ADN del vector que codifica ErbB2 o HA junto con un adyuvante o (C)

5 vacunación de refuerzo con cebador heterólogo con ADN que codifica ErbB2 o HA seguido por un refuerzo con proteína ErbB2 o HA purificada en adyuvante TM Gold. Además, se inmunizaron ratones del grupo control (grupo D) con ErbB2 o HA purificadas en adyuvante TM Gold. Para establecer un protocolo optimizado de vacunación con tatuaje de ADN se utilizaron los siguientes protocolos de inmunización:

10 Grupo A (sólo ADN): En este grupo, se vacunaron los ratones los días 0, 3 y 6 con ADN plasmídico que codifica ErbB2 o HA en ausencia de adyuvante seguido de un refuerzo con el mismo ADN después de cuatro semanas. No se utilizó adyuvante.

15 Grupo B (ADN + adyuvante genético): Para probar si un coadyuvante aumenta el cebado de la respuesta inmune humoral, se vacunó conjuntamente el ADN plasmídico que codifica la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1) con el ADN plasmídico ErbB2 o HA. Se ha demostrado que TBK1 actúa como un adyuvante para vacunación con ADN usando una pistola de genes (Ishii et al., 2009). La comparación del grupo B con el grupo A revelará qué impacto tiene el adyuvante genético en la generación de anticuerpos específicos para HA o ErbB2. Los animales del grupo B fueron vacunados con ADN en los mismos puntos de tiempo que los del grupo A. Para examinar la contribución del adyuvante genético en el cebado del sistema inmune, se mezcló el ADN plasmídico que codifica TBK-1 en una relación 1: 1 con pVAX1-ErbB2 o pVAX1-HA y posteriormente se administró mediante tatuaje de ADN. Con este fin, los ratones se vacunan con 20 µg de pTBK-1 y 20 µg de pVAX1-ErbB2 o pVAX1-HA en 10 µL de PBS.

25 Grupo C (ADN + proteína): En este grupo se ensayó un protocolo de refuerzo con cebador heterólogo con tatuaje de ADN seguido por refuerzo de proteína en forma intraperitoneal (ip) para examinar si se requiere un refuerzo final de proteína para inducir un título de IgG en suero específico de antígeno > 1/1000 y si este refuerzo es necesario para inducir en forma eficiente las células B de memoria esplénica. La inyección ip es la vía de inmunización directa al bazo. Por lo tanto, mediante el primer cebado del sistema inmunológico mediante vacunación con ADN, se presenta ErbB2 o HA al sistema inmune como proteína expresada *in vivo*. Posteriormente, se reforzó el sistema inmunológico cebado con ErbB2 o HA en adyuvante a través de la ruta de inyección ip para inducir una reacción inmune sistémica. La comparación del grupo C con A revela el impacto del refuerzo sistémico sobre 1) el título en suero de IgG específico de antígeno y 2) sobre la generación del compartimiento de células B de memoria esplénica.

30 La inmunización y el primer refuerzo con pVAX1-ErbB2 o pVAX1-HA se llevaron a cabo de acuerdo con el esquema descrito para el grupo A. Posteriormente, los ratones se refuerzan el día 28 y el día 42 con 20 µg de proteína en 200 µL de emulsión de adyuvante Titermax Gold o en 200 µL PBS, respectivamente, administrados vía inyección ip. Para vacunación con HA se inyectaron ratones con 20 µg de HA (Meridian life Science Inc, Cat. Nº R01249). Para ErbB2, se inyectaron ratones con 20 µg de una proteína ErbB2 truncada: el dominio extracelular (ECD, aa23-652) de ErbB2 fusionada a la cola de FC (sistemas de I + D, Cat. Nº 1129ER).

35 Grupo D (proteína): En este grupo de control se vacunaron ratones en forma ip con ErbB2 o HA en adyuvante. El material de este grupo sirvió como control positivo para el análisis de las muestras de los grupos A-C. El día 0, 14 y 28 se vacunaron los ratones con 20 µg de ErbB2 o HA en 200 µL de emulsión de adyuvante Titermax Gold. Para el refuerzo final, los ratones recibieron 20 µg de ErbB2 o HA disueltos en 200 µL de PBS.

40 El título en suero y la afinidad se determinaron después de cada refuerzo mediante ELISA y FACS respectivamente usando protocolos estándar (Middendorp et al., 2002). Para estudiar la maduración de afinidad durante el protocolo de vacunación, se determinó por ELISA la afinidad relativa del suero de IgG específico de antígeno policlonal. La eficacia y calidad de la inducción de células B de memoria al final de cada estrategia de vacunación fue examinada por FACS en bazo y drenando un ganglio linfático inguinal (iLN) como se describe (Middendorp et al., 2002).

45 Todos los ratones inmunizados con ADN de ErbB2 desarrollaron un título en suero de IgG anti-ErbB2 > 10.000 después de dos rondas de inmunización (Figura 4A-C), indicando que dos rondas de inmunización de ADN a través de tatuaje son suficientes para inducir una respuesta de anticuerpo anti-ErbB2 fuerte. Los resultados muestran que los ratones inmunizados con proteínas desarrollan un título en suero de IgG anti-ErbB2 fuerte el día 21 (Figura 4D).

50 Una tercera ronda de inmunización el día 28 con ADN (grupos A1 y B1) dio como resultado un aumento adicional del título en suero de IgG anti-ErbB2 el día 35 (siete días después de la tercera ronda de vacunación) y el día 45 (punto final) (Figura 4A y 4B). En el grupo B1 se encontró que la administración conjunta del vector de expresión ErbB2 (grupo A1) junto con un adyuvante de ADN (el vector pBoost3 que codifica la proteína TBK1) reforzaría la respuesta del anticuerpo contra ErbB2. La comparación del título en suero anti-ErbB2 en el tiempo mostró que los ratones en los grupos A1 y B1 desarrollaron un título en suero anti-ErbB2 comparable (Figura 4E-G). Esto indicaba que para el antígeno ErbB2 la administración conjunta del vector pBoost3 no mejoró el título en suero de IgG anti-ErbB2 policlonal. Los ratones del grupo C1 recibieron primero dos rondas de inmunización (día 0 y 14) con ADN seguido de un refuerzo (el día 28) con proteína ErbB2-Fc emulsionada con adyuvante Titermax Gold. Este refuerzo de proteína el día 28 dio lugar a un fuerte aumento del título en suero de IgG anti-ErbB2 el día 35 (después de la tercera inmunización el día 28) y el día 45 (punto final) (Figura 4C). El día 35, el título en suero del grupo C1 (ADN - proteína) fue mayor comparado con el de los ratones vacunados únicamente con ADN (grupos A1 y B1) y marginalmente inferior comparado con los ratones inmunizados sólo con proteína (grupo D1). El día 45, los títulos en suero de los grupos C1 (ADN y proteína) y D1 (sólo proteína) eran comparables.

5 Todos los ratones que se inmunizaron con el antígeno HA a través de las cuatro estrategias de vacunación desarrollaron un fuerte título en suero de IgG anti-HA el día 21 (datos no mostrados) y 35 (Figura 5). El título en suero de IgG anti-HA entre las estrategias de ADN (grupo A2) y ADN + adyuvante (grupo B2) era comparable. Por otra parte, la vacunación con ADN seguido de un refuerzo con la proteína HA emulsionada con Titermax Gold (grupo C2) o tres veces la inmunización con proteína (grupo 02) produjo un título en suero mayor que la vacunación con ADN solamente. En resumen, las similitudes y diferencias entre los cuatro grupos de ratones vacunados con antígeno HA fueron comparables a los resultados observados para los ratones vacunados con ErbB2 en términos del título en suero de IgG específico de antígeno.

15 Para comparar adicionalmente las estrategias de vacunación, se comparó el suero de IgG anti-ErbB2 policlonal con base en la afinidad relativa. La afinidad relativa se midió en muestras de suero el día 45, obtenidas tres días después del refuerzo final. La afinidad relativa se determinó por ELISA incubando a una dilución de suero fija en una titulación de antígeno ErbB2 comenzando con 0,5 µg/ml. La dilución fija de suero seleccionada se basó en la dilución del suero en la que los sueros alcanzaron la meseta usando una concentración fija de antígeno ErbB2 en ELISA (0,5 µg/ml). La dilución fija de suero fue de 1:1.500 para los grupos A1 y B1 y de 1:20.000 para los grupos C1 y D1. Para comparar los grupos individuales, se calculó y se representó gráficamente la unión relativa con base en la reducción de la absorbancia frente al intervalo de dilución del antígeno. Para cada concentración de antígeno se calculó la unión relativa, se ajustó la DO de 0,5 µg/ml al 100%.

25 Primero se comparó la vacunación con ADN con (grupo B1) y sin adyuvante de ADN (grupo A1) (Figura 6A). No se observó ninguna diferencia en la unión relativa entre los grupos que recibieron ADN (grupo A1) o ADN + adyuvante (grupo B1). Esto indica que el adyuvante de ADN no aumentaba la afinidad del suero policlonal. Además, para comparar la contribución del cebado de la respuesta inmune con el ADN seguido de un refuerzo de proteínas se compararon los sueros de ADN-proteína (grupo C1) y proteína (grupo D1) (Figura 6B). La unión relativa fue significativamente mayor para el grupo C1 que para el grupo D1 ($p < 0,001$ con las concentraciones de antígeno 0,0625 y 0,0313 µg/ml). Esto sugiere que la afinidad relativa del suero policlonal fue en promedio más alta para ratones en el grupo C1 que para ratones en el grupo D1.

30 Aislamiento y análisis de tejidos de ratones inmunizados: Las fracciones de ganglios linfáticos inguinales totales y esplénicos totales de ratones vacunados con ErbB2 y HA se recogieron y se guardaron en Trizol LS. Se aisló el drenaje del ganglio linfático inguinal de la pata tatuada y se guardó en Trizol LS. Además, se enriqueció la fracción de células B esplénicas con IgG por MACS de ratones inmunizados usando la estrategia C1 y C2. Finalmente, se determinó la fracción de las células B esplénicas IgG+ en todos los ratones vacunados con ErbB2 y HA. Para aislar las células B IgG+ se realizó una purificación por MACS en dos etapas. En la primera etapa se agotaron las células que no son de tipo B utilizando anticuerpos específicos de células que no son de tipo B biotiniladas. En la segunda etapa, se enriquecieron las células B esplénicas con IgG utilizando anticuerpos específicos anti-IgG1 y anti-IgG2ab. La Tabla 11 presenta una visión general de sobre qué ratones se aislaron las células B esplénicas con IgG (IgG1 e IgG2ab). La pureza de las fracciones de IgG aisladas se determinó mediante FACS utilizando anticuerpos específicos de células B y específicos de IgG1/IgG1b. El % de células B con Ig se determinó mediante tinción de una fracción de células que alteran I etapa de agotamiento. La Tabla 11 resume el rendimiento y la pureza de las fracciones de células B IgG+ aisladas por ratón y antígeno utilizados para la inmunización.

Tabla 11: Rendimiento y pureza de las fracciones aisladas de células B IgG+

Estrategia y grupo experimental	Antígeno	Número del animal	% de células B/gama total de linfocitos	% de células B IgG /gama de células B	Células IgG totales (E+0,6)
ADN y proteína	ErbB2	31	68,46	30,27	1,36
ADN y proteína	ErbB2	32	67,37	39,96	1,76
ADN y proteína	ErbB2	33	20,78	61,75	3,63
ADN y proteína	ErbB2	34	72,97	73,67	1,17
ADN y proteína	ErbB2	35	86,67	77,34	ND
ADN y proteína	ErbB2	36	84,98	82,12	ND
ADN y proteína	ErbB2	37	85,03	74,32	ND
ADN y proteína	HA	38	90,41	55,48	2,09
ADN y proteína	HA	40	92,60	49,09	1,17
ADN y proteína	HA	41	86,03	47,02	0,84

ES 2 636 239 T3

ADN y proteína	HA	42	88,46	46,99	1,21
----------------	----	----	-------	-------	------

- 5 Para examinar qué protocolo produce la mejor inducción del compartimento de células B de memoria, se examinó el tamaño del compartimento de células B IgG en el bazo y el iLN por cada estrategia de vacunación mediante FACS. Se utilizó un cóctel de monoclonales anti-IgG1-FITC y anti-IgG2ab-FITC para visualizar la fracción de células B IgG. La Tabla 12 da una visión general de los porcentajes de células B dentro de la gama de linfocitos y los porcentajes de células B IgG dentro de la fracción de células B por ratón y tejido.

Tabla 12: Fracción de células B IgG+ en el bazo y ganglio linfático de ratones vacunados con ErbB2

Grupo	Número del animal	Bazo		iLN	
		% de células B/gama de linfocitos	% de células B IgG+/gama de linfocitos	% de células B/gama de linfocitos	% de células B IgG+/gama de linfocitos
ADN (A1)	1	57,50	1,27	58,26	1,86
ADN (A1)	2	51,81	1,09	51,09	2,80
ADN (A1)	3	54,05	1,32	58,93	2,43
ADN (A1)	4	54,06	1,73	55,24	2,93
ADN (A1)	5	54,93	2,72	53,78	6,45
ADN (A1)	6	58,68	1,98	53,89	2,90
ADN (A1)	7	56,46	5,92	52,01	10,74
ADN + Adyuvante (B1)	17	49,05	4,33	51,04	7,02
ADN + Adyuvante (B1)	17	55,84	1,55	53,80	4,38
ADN + Adyuvante (B1)	18	44,13	4,05	54,78	6,31
ADN + Adyuvante (B1)	19	34,99	5,56	53,39	15,47
ADN + Adyuvante (B1)	20	51,81	1,41	60,30	2,40
ADN + Adyuvante (B1)	21	54,13	1,21	56,35	2,84
ADN + Adyuvante (B1)	22	58,34	2,11	62,29	1,80
ADN + proteína (C1)	31	48,99	6,26	54,12	6,49
ADN + proteína (C1)	32	49,76	7,38	51,79	7,67
ADN + proteína (C1)	33	45,94	12,76	45,14	4,19
ADN + proteína (C1)	34	30,50	16,07	44,83	10,91
ADN + proteína (C1)	35	43,48	26,62	44,60	8,16
ADN + proteína (C1)	36	41,12	24,07	45,13	11,00
ADN + proteína (C1)	37	30,50	21,10	30,82	9,17

- 10 Los ratones del grupo C1 (DNA-proteína) que recibieron un refuerzo ip correcto con la proteína ErbB2-Fc el día 28 (ratones 35-37) tenían la mayor fracción de células B IgG+ por población de células B esplénicas. Esto se esperaba ya que la inyección ip es la vía directa del antígeno al bazo. Los porcentajes de células B IgG+ en el iLN del grupo A1 (ADN) y B1 (DNA + adyuvante) oscilaron entre 1,8-15,47 con una fracción de células B IgG+ promediada de 4,3 y 5,7 para el grupo A1 o B1, respectivamente. De manera interesante, los ratones del grupo A1 y B1 con la fracción más alta de células B IgG+ en el iLN también contenían un mayor porcentaje de células B IgG+ esplénicas. El análisis de los porcentajes de células B IgG en el iLN de los ratones vacunados con HA mostró que estos ratones tenían en promedio porcentajes comparables de células B IgG+ por todas las células B de iLN encontradas en los
- 15

5 grupos A1 y B1. Los porcentajes promediados de células B IgG+ en el iLN de ratones vacunados con ADN (grupo A2) y en los ratones vacunados con ADN + adyuvante (grupo B2) fueron 5,0 y 3,0, respectivamente. La Figura 7 presenta una comparación de los porcentajes de células B IgG / células B de iLN por estrategia de vacunación y por antígeno. En resumen, estos datos mostraron que el drenaje del iLN del ADN solamente (grupo A) de ratones
 10 vacunados con ADN + adyuvante (grupo B) tenía una fracción significativa de células B IgG+. Los ratones que recibieron un refuerzo de proteína (grupo C) contenían una mayor población de células B IgG+ en el bazo y en el iLN.

Se concluye que los ratones que fueron vacunados con ADN o vacunados con ADN y reforzados con proteína desarrollaron un fuerte título en suero de IgG específico de antígeno. La afinidad relativa de los sueros contra ErbB2 se puede mejorar significativamente utilizando un protocolo de inmunización con ADN + proteína en lugar de un
 15 protocolo de inmunización con proteína. La pequeña variación del título de antígeno en suero con IgG entre ratones individuales vacunados con ADN muestra que el método de tatuaje de ADN se ha llevado a cabo de manera consistente. La vacunación con ADN con ERbB2 y HA dio como resultado una fuerte respuesta de anticuerpos específicos de antígeno.

Se informó que el efecto adyuvante del ADN plasmídico está mediado por su estructura de doble cadena, que activa las vías de señalización inmune innatas dependientes de T_{bk1} en ausencia de HR (Ishii et al., 2008). Por lo tanto, se esperaba que la administración conjunta de un plásmido que expresa T_{bk1} reforzara adicionalmente la
 20 inmunogenicidad inducida por la vacuna de ADN. En nuestro entorno, no se observó un efecto beneficioso de la administración conjunta del vector pBoost3 que codifica T_{bk1}. La administración conjunta de pBoost3 junto con el vector que codifica el antígeno no resultó en un título en suero más alto, una mayor afinidad relativa o una formación mejorada de células B IgG.

El análisis FACS mostró que el drenaje de iLN en un ratón vacunado con sólo ADN (grupo A y B) contiene una fracción significativa de células B IgG+. Sin embargo, el número de células B IgG que se pueden aislar de un solo drenaje de iLN es muy limitado debido al tamaño de un iLN. Además, la fracción de células B IgG+ en el iLN variaba
 30 significativamente entre ratones individuales vacunados con ADN. Esto podría ser el resultado de la variación en la administración de ADN a través de un tatuaje de ADN. Curiosamente, los ratones con un alto porcentaje de células B IgG+ en el iLN también tuvieron un mayor porcentaje de células esplénicas IgG+ B. Otra estrategia para obtener un mayor número de células B IgG+ es reforzar los ratones vacunados con ADN una vez con la proteína emulsionada en Titermax Gold. Los ratones que se vacunaron con ADN y proteína (grupo C) desarrollaron una fracción significativa de células B IgG+ esplénicas (además de una gran fracción de células B IgG+ en el iLN). Si no
 35 hay ninguna proteína disponible para las inmunizaciones de refuerzo, los ratones pueden recibir un refuerzo con células que expresan el antígeno o partículas similares a virus que expresan el antígeno. En conclusión, la vacunación con ADN a través de un tatuaje de ADN es una estrategia de vacunación efectiva y robusta para inducir una respuesta inmune humoral específica de antígeno. Los ratones que fueron vacunados con sólo ADN (grupo A) desarrollaron una fracción detectable de células B IgG+.

40 Ejemplo 6: Construcción de vectores eucariotas para la producción eficiente de anticuerpos monoclonales humanos biespecíficos de una sola VL

Un aspecto de la presente invención se refiere a la posibilidad de utilizar información de secuencias a partir de análisis de frecuencia de genes VH y/o mapas de calor de HCDR3 para generar paneles de anticuerpos en un
 45 formato terapéutico deseable y cribar aquellos anticuerpos para la unión y/o actividad funcional. Un formato de este tipo es una molécula de IgG biespecífica. Las moléculas de IgG convencionales están compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Las cadenas pesadas son polipéptidos formados a partir de dominios separados: una región VH para el reconocimiento del antígeno, el dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. El emparejamiento de las cadenas pesadas para formar un homodímero es el resultado de interacciones de alta afinidad entre los dominios CH3, donde después del acoplamiento covalente de
 50 las dos cadenas pesadas como resultado de la formación de un puente disulfuro entre cisteínas en la región bisagra de las cadenas pesadas.

La región CH3 se ha utilizado para introducir sustituciones de aminoácidos que inhiben la formación de homodímeros (emparejamiento de cadenas pesadas con una región CH3 idéntica) al tiempo que se promueve la heterodimerización (emparejamiento de 2 cadenas pesadas diferentes con regiones CH3 complementarias, modificadas genéticamente). Esto ha dado lugar a una formación heterodímera eficaz tras la coexpresión de
 55 cadenas pesadas modificadas con CH3 (Gunasekaran et al., 2010; WO2006/106905; WO2009/089004).

En este ejemplo, se han construido y probado vectores de expresión para la producción eficiente de anticuerpos biespecíficos de una sola VL. La estrategia general es que los constructos genéticos que codifican 2 anticuerpos diferentes se cotransfectan en una sola célula. Utilizando regiones CH3 complementarias modificadas
 60 para las dos cadenas pesadas diferentes, se favorece la formación de heterodímeros (anticuerpos biespecíficos) sobre la formación de homodímeros (anticuerpos mono-específicos). Anteriormente, se demostró que la combinación de K409D:K392D en el dominio CH3 de una cadena pesada en combinación con D399'K:E356'K en el dominio CH3 de la segunda cadena (por lo tanto, denominadas regiones CH3 complementarias modificadas) dirige la heterodimerización de regiones constantes de cadena pesada humana en una molécula biespecífica modificada

5 (Gunasekaran, 2010). Se utilizaron los mismos pares de aminoácidos en las regiones CH3 de constructos que codifican anticuerpos IgG de una sola VL para establecer si esto daría como resultado la producción eficiente de anticuerpos monoclonales IgG humanos biespecíficos de una sola VL mediante heterodimerización.

10 El gen VL IGVK1-39 reordenado único se clonó en un vector de expresión eucariota que contiene las regiones constantes gamma1 y kappa humanas, esencialmente como se describe en (Throsby et al., 2008/de Kruij et al., 2009). El vector MV1201 contiene ADN que codifica un dominio CH3 con las sustituciones de aminoácidos K409D:K392D en combinación con una región VH que codifica un anticuerpo monoclonal con una sola VL humana específico para fibrinógeno. El vector MV1200 contiene ADN que codifica un dominio CH3 con las sustituciones de aminoácidos D399K: E356K en combinación con una región VH que codifica un único anticuerpo monoclonal humano de una sola VL específico para tiroglobulina (Gunasekaran et al., 2010/de Kruij et al. 2009).

15 MV1201 y MV 1200 se cotransfectaron en células HEK293T y se expresaron transitoriamente como se describe en (de Kruij et al., 2009). Después de 13 días, se recogieron los sobrenadantes y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A usando protocolos estándar. La IgG purificada con proteína A se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reducidas y no reductoras; la tinción de proteínas en el gel se llevó a cabo con azul coloidal. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 8. En SDS-PAGE no reductor, se detectó una banda
20 única con un peso molecular de 150 kD, mostrando que con estos constructos se formaron hetero y/o homodímeros y no medias moléculas que consisten en una combinación de cadenas pesadas/ligeras no emparejadas.

Después de la purificación en proteína A, se usó espectrometría de masas para identificar las diferentes especies de IgG producidas por las células transitoriamente transfectadas. Como se muestra en la Figura 9, el sobrenadante contenía 96% de IgG heterodimérica y 3% y 1% de cada uno de los anticuerpos monoclonales parentales. Por lo tanto, estos sobrenadantes de la proteína A pueden usarse inmediatamente para el cribado de la actividad de unión y/o ensayos funcionales de anticuerpos biespecíficos.
25

Ejemplo 7: Generación de anticuerpos biespecíficos específicos para los antígenos tumorales ErbB1 y ErbB2 y análisis de la muerte de células tumorales e inhibición de la proliferación de células tumorales

30 ErbB1 y ErbB2 son receptores del factor de crecimiento que juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión del tumor. Las combinaciones de anticuerpos monoclonales contra ErbB1 y ErbB2 han mostrado efectos sinérgicos en modelos animales de cáncer (Larbouret et al., 2007) y por lo tanto representan terapéuticas prometedoras para el tratamiento de cáncer en seres humanos. En este ejemplo, se demuestra que, tras la inmunización, se pueden obtener anticuerpos monoclonales humanos a partir de ratones transgénicos con una única cadena ligera humana mediante secuenciación de alto rendimiento y creación de mapas de calor de CDR3 y que las combinaciones de anticuerpos ErbB1 e ErbB2 con efecto aditivo y/o sinérgico se puede identificar rápidamente mediante el cribado *in vitro*.
35

Los ratones transgénicos con una única cadena ligera humana se inmunizan con ADN y proteína ErbB2 tal como se describe en el ejemplo 5. Usando los mismos protocolos, se inmuniza otro grupo de ratones con ADN y proteínas ErbB1 usando los mismos procedimientos. Para los ratones inmunizados con ErbB1 y ErbB2, se aíslan los bazo y se analiza el repertorio VH de células B IgG+ mediante secuenciación de alto rendimiento como se describe en los ejemplos 1 y 2. Después de la construcción de mapas de calor de CDR3, se seleccionan los mejores 100 grupos de secuencia de VH para cada uno de los ratones inmunizados con ErbB1 y ErbB2 para un análisis posterior. Para la recolección de secuencias de VH de ErbB1 y ErbB2, se clonan las secuencias de VH representativas de cada grupo, éste es el gen VH que está presente con más frecuencia dentro de un grupo, que puede ser un gen de línea germinal o un gen que contiene mutaciones, en un vector de expresión que contiene la cadena ligera única y la mutación CH3; las VH de ErbB1 en MV1200 y las VH de ErbB2 en MV1201. Las células HEK293 se transfectan transitoriamente con todas las 2.500 combinaciones (50 veces 50) de los grupos de secuencia clonados de VH de ErbB1 y ErbB2 usando los constructos de expresión que dirigen la heterodimerización para formar anticuerpos biespecíficos ErbB1 x ErbB2 como se describe en el ejemplo 6. Después de 13 días se recolectan sobrenadantes de cultivo y se purifican usando cromatografía de afinidad de proteína A. La IgG purificada se usa en ensayos funcionales de muerte de células tumorales e inhibición de la proliferación de células tumorales conocidos en la técnica.
40
45
50

Después de la identificación de anticuerpos biespecíficos ErbB1 x ErbB2 con potente actividad antitumoral, las colecciones de secuencias de VH presentes en los grupos que tienen una CDR3 idéntica o similar y que se usan en los anticuerpos biespecíficos funcionales se pueden desconvolucionar adicionalmente utilizando el mismo enfoque para encontrar los miembros de VH en la colección que produjo la actividad antitumoral más potente.
55

Ejemplo 8: Secuenciación profunda y análisis de diversidad de HCDR3 a partir de muestras obtenidas de células B esplénicas de ratones no inmunizados frente a ratones inmunizados

60 Para demostrar que la expansión selectiva de clones identificados por secuencias únicas de HCDR3 tras la inmunización se puede analizar mediante secuenciación profunda, se sometieron las células B esplénicas de ratones no inmunizados e inmunizados a enriquecimiento de células B como se ha descrito anteriormente. Los

5 ácidos nucleicos se aislaron y, cuando fue necesario se amplificaron como se describió anteriormente y se envió el ADNc a Eurofins para secuenciación de alto rendimiento.

Se inmunizaron ratones transgénicos para huVK1-39 y para un minilocus de cadena pesada (HC) humana con proteína solamente (fusionada a Fc) o utilizando inmunizaciones alternantes celulares y de proteínas (con células que expresan el mismo antígeno en su superficie). Se utilizaron cMet y EGFR como antígenos en este ejemplo (dos animales por grupo):

Grupo A: cMet-Fc en adyuvante Titermax Gold (TMG) en los días 0, 14 y 28, y cMet-Fc en PBS el día 47.

Grupo B: cMet-Fc en TMG en los días 0, 14 y 28, células MKN45 en PBS el día 49 y cMet-Fc en PBS el día 64.

Grupo C: EGFR-Fc en TMG en los días 0, 14 y 28, y EGFR-Fc en PBS el día 54.

Grupo D: EGFR-Fc en TMG en los días 0, 14 y 28, células A431 en PBS el día 49 y EGFR-Fc en PBS el día 64.

15 Las dosis utilizadas fueron 20 µg de proteína en 125 µl de TMG, 20 µg de proteína en 200 µl de PBS y 2 x 10E6 células en 200 µl de PBS. Los ratones transgénicos no inmunizados tenían aproximadamente la misma edad que los ratones inmunizados al momento del sacrificio (16 semanas, tres ratones en total).

Se recogieron los bazos de todos los ratones (para los ratones inmunizados tres días después de la última inmunización) y se procesaron como se describe en el Ejemplo 2. Para poder secuenciar muchas muestras diferentes en una mezcla con costos reducidos, se añadió una etiqueta de identificación de material (MID) específica para cada ratón en el extremo 5' de cada cebador utilizado en la amplificación por PCR de ADNc junto con la secuencia SMART (como se detalla en el Ejemplo 2). Por lo tanto, la adición de una etiqueta de MID permitió la combinación de material de varios ratones después de la amplificación por PCR y antes de la secuenciación con 454. Por lo tanto, se ajustaron los cebadores para la amplificación para incluir secuencias complementarias de la etiqueta de MID (Tabla 3).

Para ratones no inmunizados, se enriquecieron las suspensiones de células de bazo para células B usando microperlas anti-CD19 (Miltenyi Biotec, cat. N° 130-052-201) y luego se clasificaron por citometría de flujo para aislar células B maduras sin procesar con antígeno que expresan IgM o IgD. Esto se hizo clasificando células B positivas para CD19, positivas para B220, positivas para huVK1-39 y negativas para cadena ligera de ratón y discriminando éstas en fracciones de células positivas para IgM o positivas para IgD. En los cebadores inversos utilizados para la síntesis de ADNc, se usaron secuencias que se hibridaban ya sea con secuencias codificantes de IgM o IgD (Error! No se encontró la fuente de referencia). Para poder realizar la secuenciación combinada para diferentes muestras, se usaron etiquetas de MID para identificar material de diferentes muestras (Tabla 14).

35 Tabla 13: Cebadores utilizados para material de secuenciación profunda de ratones inmunizados (una etiqueta de MID por ratón).

Etiqueta de MID	Secuencia*	Tipo de cebador	Nombre del cebador
MID-01	<u>ACGAGT</u> GCGT AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID1-fw
MID-01	<u>ACGAGT</u> GCGTCAGGGGCCAGTGGATAGAC	Inverso	mIgG-CH1-MID1-rev
MID-02	<u>ACGCTCGACA</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID2-fw
MID-02	<u>ACGCTCGACA</u> CAGGGGCCAGTGGATAGAC	Inverso	mIgG-CH1-MID2-rev
MID-03	<u>AGACGCACTC</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID3-fw
MID-03	<u>AGACGCACTC</u> CAGGGGCCAGTGGATAGAC	Inverso	mIgG-CH1-MID3-rev
MID-04	<u>AGCACTGTAG</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID4-fw
MID-04	<u>AGCACTGTAG</u> CAGGGGCCAGTGGATAGAC	Inverso	mIgG-CH1-MID4-rev
MID-05	<u>ATCAGACACG</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID5-fw
MID-05	<u>ATCAGACACG</u> CAGGGGCCAGTGGATAGAC	Inverso	mIgG-CH1-MID5-rev
MID-06	<u>ATATCGCGAG</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID6-fw
MID-06	<u>ATATCGCGAG</u> CAGGGGCCAGTGGATAGAC	Inverso	mIgG-CH1-MID6-rev
MID-07	<u>CGTGTCTCTA</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID7-fw

MID-07	<u>CGTGTCTCTACAGGGGCCAGTGGATAGAC</u>	Inverso	mlgG-CH1-MID7-rev
MID-08	<u>CTCGCGTGTCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT</u>	Hacia adelante	SMART-MID7-fw
MID-08	<u>CTCGCGTGTCCAGGGGCCAGTGGATAGAC</u>	Inverso	mlgG-CH1-MID8-rev

* La secuencia de la etiqueta de MID está subrayada; la secuencia SMART está en negrita; la secuencia de HC constante de IgG en letra normal.

Tabla 14: Cebadores usados para el material de secuenciación profunda de ratones no inmunizados (una etiqueta de MID por población celular por ratón)

Fracción celular*	Etiqueta de MID	Secuencia**	Tipo de cebador	Nombre del cebador
Células B IgM ^{ALTO} ratón 1	MID-04	<u>AGCACTGTAG</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG T	Hacia adelante	SMART-MID4-fw
Células B IgM ^{ALTO} ratón 1	MID-04	<u>AGCACTGTAGGGCCACCAGATTCTTATCAGAC</u>	Inverso	mouse IgM-CH1-MID4-rev
Células B IgD ^{ALTO} ratón 1	MID-05	<u>ATCAGACACG</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG T	Hacia adelante	SMART-MID5-fw
Células B IgD ^{ALTO} ratón 1	MID-05	<u>ATCAGACACGCAGTTCTGAGGCCAGCACAGTG</u>	Inverso	mouse IgD-CH1-MID5-rev
Células B IgM ^{ALTO} ratón 2	MID-10	<u>TCTCTATGCG</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID10-fw
Células B IgM ^{ALTO} ratón 2	MID-10	<u>TCTCTATGCGGGCCACCAGATTCTTATCAGAC</u>	Inverso	mouse IgM-CH1-MID10-rev
Células B IgD ^{ALTO} ratón 2	MID-11	<u>TGATACGTCT</u> AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-M D11-fw
Células B IgD ^{ALTO} ratón 2	MID-11	<u>TGATACGTCTCAGTTCTGAGGCCAGCACAGTG</u>	Inverso	mouse IgD-CH1-MID11-rev
Células B IgM ^{ALTO} ratón 3	MID-16	<u>TCACGTA</u> CTAAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Hacia adelante	SMART-MID16-fw
Células B IgM ^{ALTO} ratón 3	MID-16	<u>TCACGTA</u> CTAGGCCACCAGATTCTTATCAGAC	Inverso	mouse IgM-CH1-MID16-rev

Células B IgD ^{ALTO} ratón 3	MID-17	<u>CGTCTAGTACAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG</u> T	Hacia adelante	SMART-MID17-fw
Células B IgD ^{ALTO} ratón 3	MID-17	<u>CGTCTAGTACCAGTTCTGAGGCCAGCACAGTG</u>	Inverso	mouse gD-CH1-M ID17-rev
* Células B seleccionadas para expresión de solamente LC de huVK1-39 LC.				
** La secuencia de la etiqueta de MID está subrayada; la secuencia SMART está en negrita; las secuencias constantes de IgD o IgM en letra normal.				

- 5 Para el análisis de los resultados de secuenciación, se usaron algoritmos diseñados a medida para la identificación y alineación de genes VH de las regiones HCDR3. En resumen, los datos de la secuencia en bruto se importaron a un programa de ordenador dedicado, que tradujo todas las secuencias de nucleótidos en seis marcos de lectura potencial de proteína, cada uno de los cuales fue sometido a los siguientes criterios de filtro secuencial para encontrar genes VH humanos correctos y completos:
- 10 - Se rechazaron secuencias más cortas de 75 aminoácidos, ya que se consideró como la longitud mínima para identificar positivamente los genes VH.
- Se rechazaron secuencias sin dos cisteínas canónicas, ya que éstas se usaron para identificar genes VH y marcos de lectura.
- 15 - Los marcos 1 a 4 se buscaron con base en la homología con genes VH en una base de datos. Si uno o más de estos marcos no se encontraron, la secuencia fue rechazada.
- CDR1, 2 y 3 se identificaron con base en las regiones marco identificadas. La secuencia se rechazó cuando un codón de parada estaba presente en una o más de las CDR.

20 Las secuencias que pasaron estos criterios se clasificaron como las secuencias de VH anotadas. Todas las secuencias de VH seleccionadas se sometieron a otro algoritmo para agruparlas en grupos con una HCDR3 100% idéntica.

25 Estos datos dieron como resultado los genes VH anotados y estos genes VH se agruparon con base en la secuencia de HCDR3. Para analizar la expansión selectiva de las regiones HCDR3 en genes VH en ratones inmunizados frente a ratones no inmunizados, los resultados se tabularon y se expresaron como la proporción de regiones VH anotadas sobre grupos con regiones idénticas de HCDR3 (Tabla 15). Para facilitar la interpretación, los resultados para las fracciones de células B separadas de ratones no inmunizados se agruparon de manera que la relación se pudo analizar para todas las células B maduras sin procesar con antígeno.

Tabla 15: Datos de secuenciación profunda de ratones inmunizados frente a los no inmunizados.

Inmunización	Población analizada de células B	Regiones VH anotadas	Grupos con HCDR3 idéntica	Relación VH/grupos
Ninguna	Total de células B maduras*	39.626	30.716	1,3
Ninguna	Total de células B maduras*	6.102	5.676	1,1
Ninguna	Total de células B maduras*	9.128	8.437	1,1
Proteína cMet	Total de células B	34.327	2.757	12,5
Proteína cMet	Total de células B	90.049	4.511	20,0
Proteína cMet y células	Total de células B	19.645	3.233	6,1
Proteína cMet y células	Total de células B	75.838	4.557	16,6
Proteína EGFR	Células B IgG ⁺	46.924	4518	10,4
Proteína EGFR	Células B IgG ⁺	3.799	1201	3,2

Proteína EGFR y células	Total de células B	60.979	3526	17,3
Proteína EGFR y células	Total de células B	43.631	2452	17,8
* Células B que expresan ya sea IgM o IgD.				

5 A partir de la tabla 15 puede observarse fácilmente que el número de grupos con HCDR3 idéntico en ratones no
 inmunizados está en el orden del número de genes VH anotados, que se refleja en relaciones de VH/grupo cercanas
 a 1,0. Esto implica que en estos ratones no había ningún desencadenante para la expansión selectiva de células B
 que portarían VH con ciertas regiones HCDR3, como se esperaría en ausencia de un estímulo inmunogénico. Por el
 10 contrario, en ratones inmunizados la relación de regiones VH sobre grupos con HCDR3 idéntico es, aunque variable
 entre ratones individuales, mucho más alta y las relaciones de VH/grupo oscilan entre 3,2 a 20,0. Por lo tanto, en
 ratones inmunizados está presente en alta frecuencia una gran fracción de secuencias de HCDR3 en el repertorio
 probablemente como resultado de expansión clonal de células B reactivas al antígeno debido a la inmunización de
 los ratones. Esto indica que las regiones VH de alta frecuencia son los clones que son específicos para el antígeno
 de interés y sugiere que extraer estos genes VH y su expresión como Fab o IgG junto con la cadena ligera común
 15 producirá anticuerpos con especificidad por el antígeno. Los datos de que esto es realmente el caso se muestran en
 el Ejemplo 9. La funcionalidad de estos anticuerpos específicos de antígeno puede ser posteriormente probada en
 ensayos funcionales.

Ejemplo 9

20 Secuencia profunda de repertorios de VH y generación de mapas de calor de HCDR3 a partir de ratones
 inmunizados que expresan una cadena ligera común.

Como se desprende del Ejemplo 8, una gran fracción de secuencias de HCDR3 está presente con una alta
 frecuencia en el repertorio de VH de ratones inmunizados que portan una cadena ligera común frente a ratones no
 inmunizados. En el presente ejemplo, se extrajo el repertorio de estos genes VH más frecuentemente usados de
 ratones inmunizados para encontrar dominios de unión derivados de cadena pesada específicos de antígeno que,
 25 tras combinación con la cadena ligera común, producirán anticuerpos funcionales contra el objetivo de interés.

Se generó y procesó material de ratones que portan el transgén huVK1-39 y un minilocus de HC humano tras la
 inmunización con cMet o EGFR (proteína-Fc o proteína-Fc que alternan con células que expresan las respectivas
 proteínas en su superficie; dos ratones por estrategia de modo que ocho en total) como se describe en el Ejemplo 8.

30 La secuenciación profunda y el análisis del repertorio de VH incluyendo el agrupamiento basado en la identidad de
 HCDR3 reveló un total de 287.920 secuencias que podrían agruparse en 813 grupos únicos. Todas las secuencias
 en un grupo se derivaron del mismo gen VH de línea germinal. Los grupos que contenían más de 50 VH (con
 HCDR3 idéntico al nivel de aminoácidos, pero por lo demás diferentes regiones de VH) se recogieron en una base
 de datos para repertorios de todos los ocho ratones. Esto se hizo ya que se observó superposición (limitada) de
 35 secuencias de HCDR3 entre los repertorios de los ocho ratones. Las secuencias de VH se clasificaron entonces por
 identidad de longitud de HCDR3 y de secuencia de HCDR3. A continuación, se agruparon además las secuencias
 de HCDR3 con base en la probabilidad de un VDJ único (es decir, si HCDR3 en diferentes grupos contenía una
 diferencia de < 2 aminoácidos, entonces se consideraban parte del mismo grupo y se agruparon). Este proceso se
 realizó manualmente en una hoja de cálculo de Excel, pero podría ser mejor realizado con base en la alineación de
 40 secuencias de nucleótidos de HCDR3. Las herramientas para facilitar esto están en desarrollo. Esto resultó en un
 total de 399 grupos con el mismo número de secuencias totales. A continuación, los grupos se alinearon en función
 de su tamaño (es decir, el número total de secuencias en el grupo) y se seleccionaron los ~100 mejores grupos para
 cada objetivo seleccionado. Esto dio como resultado un total de 228 secuencias únicas: 134 de ratones inmunizados
 con cMet y 94 de ratones inmunizados con EGFR. Finalmente, para seleccionar la secuencia de nucleótidos a clonar
 45 nuevamente como una IgG de cada grupo, se analizó la alineación de la secuencia de aminoácidos de VH para cada
 grupo y se eligió la secuencia más frecuente en el grupo para clonar nuevamente.

Las secuencias de nucleótidos correspondientes se recuperaron, se modificaron para contener sitios de restricción
 para la clonación en un vector de expresión y para la eliminación de sitios de restricción excesivos mediante
 mutación silenciosa y después se sintetizaron de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la
 materia. Los genes sintetizados se clonaron a granel en un vector para expresión en el formato de IgG1 humano
 50 incluyendo la cadena ligera común de huVK1-39. De los clones obtenidos, se escogieron 400 clones mediante
 procedimientos estándar y se secuenciaron, y se repitió la clonación a granel para secuencias faltantes o incorrectas
 hasta que se recuperó >90% del repertorio de 228. El ADN se recuperó y transfirió transitoriamente a una línea
 celular de producción de anticuerpos. Los métodos usados para modificar secuencias, sintetizar ADN, clonar,
 secuenciar y producir IgG por transfección son todos conocidos en la técnica.

55 La concentración de IgG de las producciones se determinó usando tecnología de Octet (FortéBIO) de acuerdo con
 las instrucciones del fabricante para la cuantificación básica con un chip sensor de proteína A con regeneración
 (FortéBIO, cat. N° 18-0004/-5010/-5012/-5013). Los 228 IgG se sometieron posteriormente a ensayos para la unión

5 específica de antígeno por ELISA a una concentración de 5 µg/ml. De las secuencias ensayadas, se encontró que 16 de 110 (15%) se unen específicamente a cMet y 6 de 88 (7%) a EGFR. Los otros grupos frecuentes representan, en su gran mayoría, anticuerpos dirigidos a la parte Fc del antígeno. Debe observarse que la cola Fc de las proteínas de fusión Fc puede ser particularmente inmunogénica (Ling 1987, *Immunology*, vol. 62, parte 1, páginas 1-6). Dado que estas secuencias se derivaron de material de ratones inmunizados con proteínas de fusión Fc en adyuvante, una gran parte de la respuesta humoral se dirigirá a la cola Fc (véanse los Ejemplos 3 y 4). La unión a células que expresan el antígeno en su superficie se realizó solamente para IgG con dominios de unión derivados de ratones que se inmunizaron con proteína y células, usando células MKN45 que expresan cMet o células A431 que expresan EGFR. Todas las IgG procedentes de ratones inmunizados con células que teñían cMet o EGFR en ELISA también teñieron células que expresan los respectivos antígenos (datos no mostrados). Se espera que tras la inmunización con antígeno puro tal como a través de tatuaje de ADN, el porcentaje de clones específicos de antígeno aumentará aún más.

Para caracterizar funcionalmente la IgG específica de EGFR, se ensayó su potencia para inhibir la muerte celular inducida por EGF de células A431 (Gulli et al., 1996, *Cell Growth Diff* 7, páginas 173-178). De los 5 mAb anti-EGFR ensayados, 3 mostraron inhibir la muerte de células A431 inducida por EGF (Figura 10). Las IgG específicas de cMet se ensayaron en cuanto a la funcionalidad determinando su capacidad para competir con varios anticuerpos de referencia obtenidos de la literatura (de patente) para la unión a cMet en un ELISA competitivo de unión. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pozos con cMet-Fc y luego se incubaron con un exceso de uno de varios anticuerpos de referencia. Posteriormente, se añadieron aglutinantes específicos de cMet marcados, seguido por un anticuerpo de detección marcado con peroxidasa que reconoció los aglutinantes de cMet unidos. Este último se detectó utilizando TMB como sustrato. De los 10 mAb cMet ensayados, se demostró que 7 compiten por la unión de cMet con anticuerpos de referencia.

Por lo tanto, mediante el uso de métodos de secuenciación profunda se puede identificar un amplio panel de diversos VH específicos de antígeno que representan un uso diverso de VH, diversos HCDR3 y maduración clonal.

Referencias

- 30 Babcook JS, Leslie KB, Olsen OA, Salmon RA, Schrader JW. A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 7843-8 (1996).
- Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E. & Rousset, F. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* 251, 70-72 (1991).
- 35 Bins, A.D., et al., A rapid and patent DNA vaccination strategy defined by in vivo monitoring of antigen expression. *Nat Med* 11: 899-904 (2005).
- Boder, E.T. & Wittrup, K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotech.* 15, 553-557 (1997).
- 40 Cobough, C.W., Almagro, J.C., Pogson, M., Iverson, B. & Georgiou, G. Synthetic antibody libraries focused towards peptide ligands. *J. Mol. Biol.* 378, 622-633 (2008).
- Chao, G. et al. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat. Protoc.* 1, 755-768 (2006).
- Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 273, 927-948 (1997).
- 45 Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628 (1991).
- Clark. Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? *Immunol Today*, 21: 397-402 (2000).
- Crowe Jr. Recent advances in the study of human antibody responses to influenza virus using optimized human hybridoma approaches. *Vaccine* 27 (Suplemento 6), G47 (2009).
- 50 Ettinger et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* 175, 7867-7879 (2005).
- Feldhaus, M.J. et al. Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat. Biotechnol.* 21: 163-170 (2003).
- 55 Fuchs, P., Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T. & Little, M. Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*-fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. *Biotechnology* 9:1369-1372 (1991).

- 5 Ge X, Mazor Y, Hunicke-Smith SP, Ellington AD, Georgiou G: Rapid construction and characterization of synthetic antibody libraries without DNA amplification. *Biotechnol Bioeng* 106: 347-357 (2010).
- Good, K.L., Bryant, V.L. & Tangye, S.G. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J. Immunol.* 177: 5236-5247 (2006).
- 10 Green, L.L. et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet.* 7: 13-21 (1994).
- Glanville J, Zhai W, Berka J, Telman D, Huerta G, Mehta GR, Ni I, Mei L, Sundar PD, Day GMR et al.: Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20216-20221 (2009).
- Gunasekaran et al. *J. Biol. Chem.* 285: 19637-46. (2010)
- 15 Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs.* 2: 256-65 (2010).
- Harvey, B.R. et al. Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from *Escherichia coli*-expressed libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9193-9198 (2004).
- Hoogenboom, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23, 1105-1116 (2005).
- 20 Ishii, K.J., et al., TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*, 451: 725-9 (2008).
- Jacob, J., et al., Activity of DNA vaccines encoding self or heterologous Her-2/neu in Her-2 or neu transgenic mice. *Cell Immunol.* 240: 96-106 (2006).
- Jacob, I.B., et al., Combining human and rat sequences in her-2 DNA vaccines blunts immune tolerance and drives antitumor immunity. *Cancer Res* 70: 119-28 (2010).
- 25 Jechlinger, W., Optimization and delivery of plasmid DNA for vaccination. *Expert Rev Vaccines* 5: 803-25 (2006).
- Jiang X, Suzuki H, Hanai Y, Wada F, Hitomi K, Yamane T, Nakano H. A novel strategy for generation of monoclonal antibodies from single B cells using rt-PCR technique and in vitro expression. *Biotechnol Prog.* 22: 979-88 (2006).
- 30 Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Obata T, Kondo S, Kinoshita K, Kadowaki S, Takahashi K, Sugiyama T, Kishi H et al.: A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nat Med* 15: 1088-1092 (2009).
- Kato M, Sasamori E, Chiba T, Hanyu Y. Cell activation by CpG ODN leads to improved electrofusion in hybridoma production. *J Immunol Methods.* 2011 Aug 22. [Publicación electrónica ya disponible]
- 35 Kim, C.H. et al. Sub specialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J. Exp. Med.* 193: 1373-1381 (2001).
- Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497 (1975).
- 40 de Kruif J, Kramer A, Visser T, Clements C, Nijhuis R, Cox F, van der Zande V, Smit R, Pinto D, Throsby M, Logtenberg T. Human immunoglobulin repertoires against tetanus toxoid contain a large and diverse fraction of high-affinity promiscuous V(H) genes. *J Mol Biol.* 387: 548-58 (2009).
- Kwakkenbos, M.J. et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat. Med.* 16: 123-128 (2010).
- 45 Larbouret C, Robert B, Navarro-Teulon I, Thezenas S, Ladjemi M, Morisseau S, et al. In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. *Clin Cancer Res.* 13: 3356-62 (2007).
- Lee, C.M.Y., Iorno, N., Sierro, F. & Christ, D. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat. Protoc.* 2: 3001-3008 (2007).
- Li, L.H., Hui, S.W. Characterization of PEG-mediated electrofusion of human erythrocytes. *Biophys. J.* 67: 2361 (1994).
- 50 Ling et al. *Immunology* 1987, vol. 6 parte 1, 1-6

- 5 Lonberg, N. et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368: 856-859 (1994).
- Love, J.C., Ronan, J.L., Grotenbreg, G.M., van der Veen, A.G. & Ploegh, H.L. A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. *Nat. Biotechnol.* 24: 703-707 (2006).
- 10 Manz, R.A., Hauser, A.E., Hiepe, F. & Radbruch, A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 367-386 (2005).
- Mao H, Graziano JJ, Chase TM, Bentley CA, Bazirgan OA, Reddy NP, Song BD, Smider W. Spatially addressed combinatorial protein libraries for recombinant antibody discovery and optimization. *Nat Biotechnol.* 28: 1195-202 (2010).
- 15 Mazor, Y., Blarcom, T.V., Mabry, R., Iverson, B.L. & Georgiou, G. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 25: 563-565 (2007).
- Meijer, P.-J. et al. Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing. *J. Mol. Biol.* 358: 764-772 (2006).
- Middendorp, S., G.M. Dingjan, y R.W. Hendriks, Impaired precursor B cell differentiation in Bruton's tyrosine kinase-deficient mice. *J Immunol* 168: 2695-703 (2002).
- 20 Mohapatra, S. & San Juan, H. Designer monoclonal antibodies as drugs: the state of the art. *Exp. Rev. Clin. Immunol.* 4: 305-307 (2008).
- Ogunniyi AO, Story CM, Papa E, Guillen E, Love JC: Screening individual hybridomas by micro-engraving to discover monoclonal antibodies. *Nat Protoc* 4: 767-782 (2009).
- 25 Persson, H., Lantto, J. & Ohlin, M. A focused antibody library for improved hapten recognition. *J. Mol. Biol.* 357: 607-620 (2006).
- Pokorna, D., I. Rubio, and M. Muller, DNA-vaccination via tattooing induces stronger humeral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genet Vaccines Ther.* 6: 4 (2008).
- Ponsel D, Neugebauer J, Ladetzki-Baehs K, Tissot K. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. *Molecules.* 16: 3675-700 (2011).
- 30 Quark, S.G., et al., GMP production of pDfRMA IT for vaccination against melanoma in a phase I clinical trial. *Eur J Pharm Biopharm*, 70: 429-38 (2008).
- Ravn U, Gueneau F, Baerlocher L, Osteras M, Desmurs M, Malinge P, Magistrelli G, Farinelli L, Kosco-Vilbois MH, Fischer N: By-passing in vitro screening-next generation sequencing technologies applied to antibody display and in silico candidate selection. *Nucleic Acids Res* 38:e193 (2010).
- 35 Reddy ST, Ge X, Miklos AE, Hughes RA, Kang SH, Hoi KH, Chrysostomou C, Hunicke-Smith SP, Iverson BL, Tucker PW, Ellington AD, Georgiou G. Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable gene repertoire of plasma cells. *Nat Biotechnol.* 28: 965-9 (2010).
- Reddy ST, Georgiou G. Systems analysis of adaptive immunity by utilization of high-throughput technologies. *Curr Opin Biotechnol.* 4: 584-9 (2011).
- 40 Ruuls SR, Lammerts van Bueren JJ, van de Winkel JG, Parren PW. Novel human antibody therapeutics: the age of the Umabs. *Biotechnol J.* 3: 1157-71 (2008).
- Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L. & Plückthun, A. Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J. Immunol. Methods* 231: 119-135 (1999).
- 45 Schmidlin H, Diehl SA, Blom B. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol.* 30: 277-85 (2009).
- Shapiro-Shelef, M. & Calame, K. Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 230-242 (2005).
- Smith K, Garman L, Wrammert J, Zheng N-Y, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC: Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat Protoc.* 4: 372-384 (2009).
- 50 Stevenson, F.K., et al., DNA vaccines to attack cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 101 Suplemento 2: páginas 14646-52 (2004).
- Story CM, Papa E, Hu C-CA, Ronan JL, Herlihy K, Ploegh HL, Love JC: Profiling antibody responses by multiparametric analysis of primary B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17902-17907 (2008).

- 5 Tajiri K, Kishi H, Tokimitsu Y, Kondo S, Ozawa T, Kinoshita K, Jin A, Kadowaki S, Sugiyama T, Muraguchi A: Cell microarray analysis of antigen-specific B-cells: single cell analysis of antigen receptor expression and specificity. *Cytometry* 71: 961-967 (2007).
- Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuji M, Nussenzweig MC, Wardemann H: Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329: 112-124 (2008).
- 10 Tokimitsu Y, Kishi H, Kondo S, Honda R, Tajiri K, Motoki K, Ozawa T, Kadowaki S, Obata T, Fujiki S et al.: Single lymphocyte analysis with a microwell array chip. *Cytometry* 71: 1003-1010 (2007).
- Throsby, M., Geuijen, C., Goudsmit, J., Bakker, A. Q., Korimbocus, J., Kramer, R. A. et al. Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile virus. *J. Virol.* 80, 6982-6992 (2006).
- 15 Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M.R., Murphy, B.R., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* 10, 871 (2004).
- Weeratna, R., Comanita, L., Davis, H.L. CPG ODN allows lower dose of antigen against hepatitis B surface antigen in BALB/c mice. *Immunol. Cell Biol.* 81: 59 (2003).
- 20 Whittington, P.J., et al., DNA vaccination controls Her-2+ tumors that are refractory to targeted therapies. *Cancer Res*, 68: 7502-11 (2008).
- Wrammert, J. et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453: 667-671 (2008).
- 25 Wu, C., Hua Ying, Grinnell, C., Bryant, S., Miller, R., et. al., Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin *Nature Biotechnology* 25, 1290 - 1297 (2007).
- Yu, X., McGraw, P.A., House, F.S., Crowe Jr., J.E. An optimized electrofusion-based protocol for generating virus specific human monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 336, 142 (2008).
- 30 Zubler RH, Werner-Favre C, Wen L, Sekita K, Straub C. Theoretical and practical aspects of B-cell activation: murine and human systems. *Immunol Rev.* 99: 281-99 (1987).

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para producir al menos dos anticuerpos que se unen a un antígeno o epítipo seleccionado de interés, dicho método comprende al menos las siguientes etapas:
- 10 a) proporcionar una población de células B que expresan un repertorio limitado de VL que comprende no más de 10 VL diferentes, en las que esencialmente todas las citadas células B portan al menos una VL, en donde dicha población de células B se obtiene a partir de un animal transgénico no humano que porta un repertorio limitado de VL, en donde dicho repertorio limitado de VL consiste en menos de 10 VL, en donde dicho animal no humano ha sido inmunizado con dicho antígeno, y en donde dicha población de células B comprende células B obtenidas del bazo y/o al menos un ganglio linfático,
- b) obtener ácidos nucleicos a partir de dichas células B,
- 15 c) opcionalmente, amplificación de secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina en dicha muestra,
- d) secuenciación al menos parcial de esencialmente todos los ácidos nucleicos obtenidos de la etapa b) o los productos de amplificación de etapa c),
- e) realizar un análisis de frecuencia de las secuencias de VH de la etapa d), que comprende secuencias de CDR3 de cadena pesada,
- 20 f) seleccionar las 20 secuencias de VH más abundantes,
- g) proporcionar células huésped con al menos un vector que comprende al menos una de dichas secuencias de VH y al menos una secuencia de VL de dicho repertorio limitado de VL,
- h) cultivar dichas células huésped y permitir la expresión de polipéptidos de VH y VL,
- i) obtener dichos anticuerpos.
- 25 2. Un método para producir al menos dos anticuerpos que se unen a un antígeno o epítipo de interés seleccionado, dicho método comprende al menos las siguientes etapas:
- 30 a) proporcionar una población de células B que expresan un repertorio limitado de VL que comprende no más de 10 VL diferentes, en las que esencialmente todas las citadas células B portan al menos una VL, en donde dicha población de células B se obtiene a partir de un animal transgénico no humano que porta un repertorio limitado de VL, en donde dicho repertorio limitado de VL consiste de menos de 10 VL, en el que dicho animal no humano ha sido inmunizado con dicho antígeno, y en donde dicha población de células B comprende células B obtenidas del bazo y/o al menos un ganglio linfático,
- b) obtener ácidos nucleicos a partir de dichas células B,
- 35 c) opcionalmente, amplificación de secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina en dicha muestra,
- d) secuenciación al menos parcial de esencialmente todos los ácidos nucleicos obtenidos de la etapa b) o los productos de amplificación de la etapa c),
- e) realizar un análisis de frecuencia de las secuencias de VH de la etapa d), que comprende secuencias de CDR3 de cadena pesada,
- 40 f) seleccionar las 20 secuencias de VH más abundantes,
- g) proporcionar células huésped con al menos un vector que comprende al menos una de dichas secuencias de VH, en donde dichas células huésped comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común que es capaz de emparejarse con dicha VH,
- h) cultivar dichas células huésped y permitir la expresión de polipéptidos de VH y VL,
- 45 i) obtener dichos anticuerpos.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además tomar una muestra de dichas células cultivadas, comprendiendo la muestra al menos uno de dichos anticuerpos, y someter la muestra a al menos un ensayo funcional, y seleccionar al menos una célula que expresa un anticuerpo con la especificidad de unión deseada, afinidad, actividad neutralizante, actividad de muerte de células tumorales y/o actividad de inhibición de la proliferación.
- 50

- 5 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o 3, que comprende además proporcionar dichas células huésped con medios para la expresión de dicha al menos una VH y VL en un formato de inmunoglobulina.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho formato de inmunoglobulina comprende al menos un anticuerpo monoespecífico, y/o al menos un anticuerpo biespecífico.
- 10 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho repertorio limitado de VL consta de una única VL.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho repertorio limitado de VL consiste en una única VL humana reordenada, preferiblemente la cadena ligera de IGKV1-39 humana.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha población de células B se obtiene a partir de un ratón transgénico que ha sido inmunizado con un antígeno.
- 15 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se seleccionan las 50 secuencias de VH más abundantes.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se seleccionan las 100 secuencias de VH más abundantes.
- 20 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se seleccionan las 200 secuencias de VH más abundantes.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además preparar mezclas de anticuerpos, preferiblemente que comprende anticuerpos biespecíficos.

Figura 1

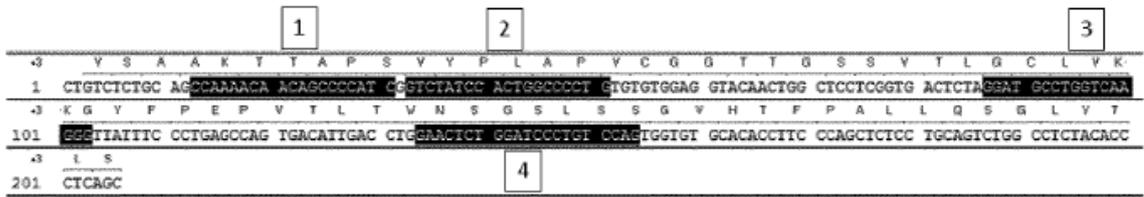


Figura 2

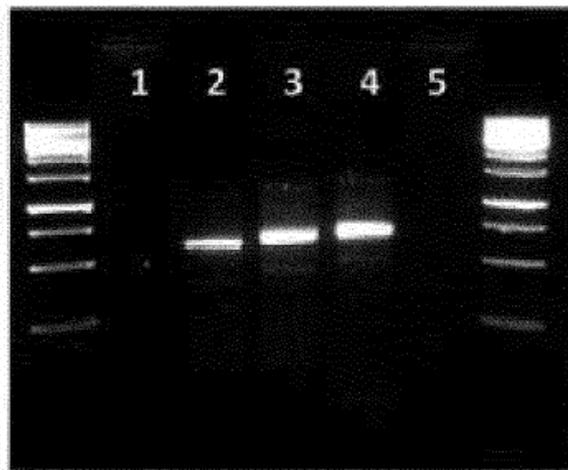


Figura 3

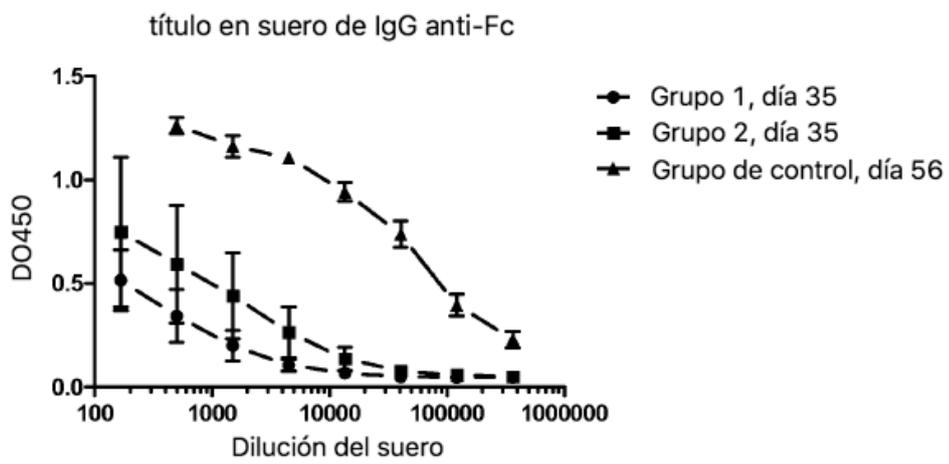


Figura 4

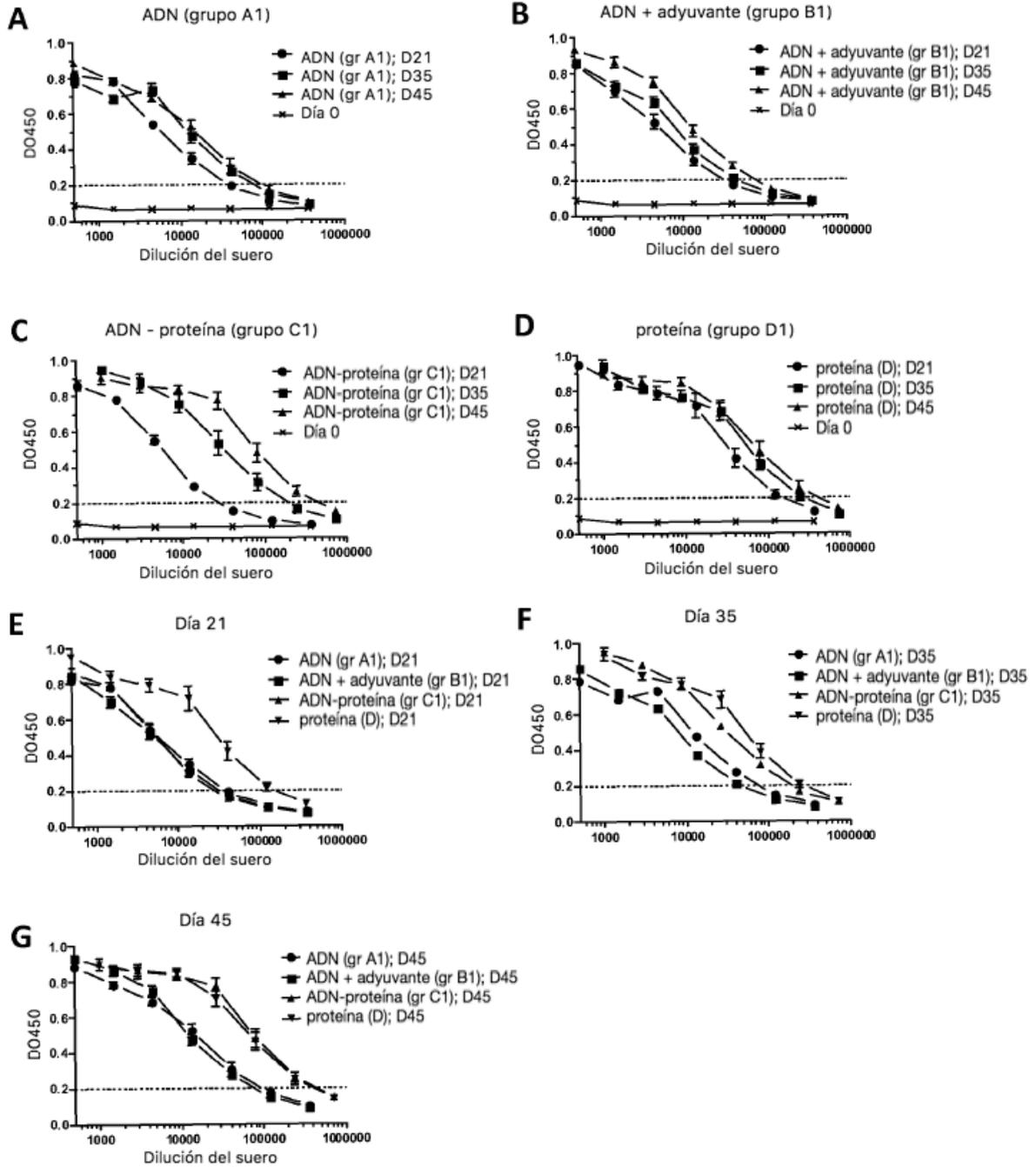


Figura 5

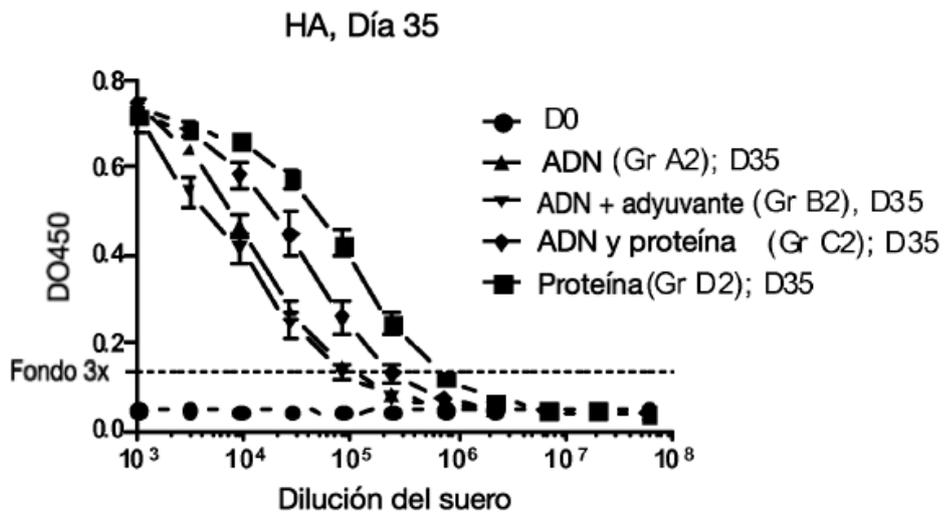


Figura 6

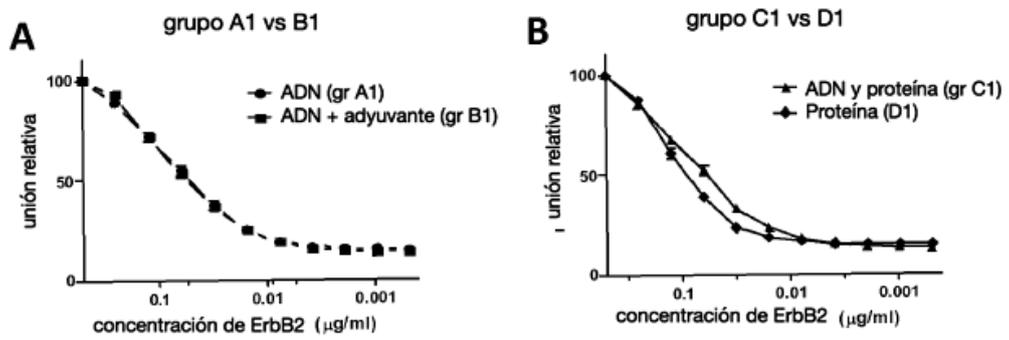


Figura 7

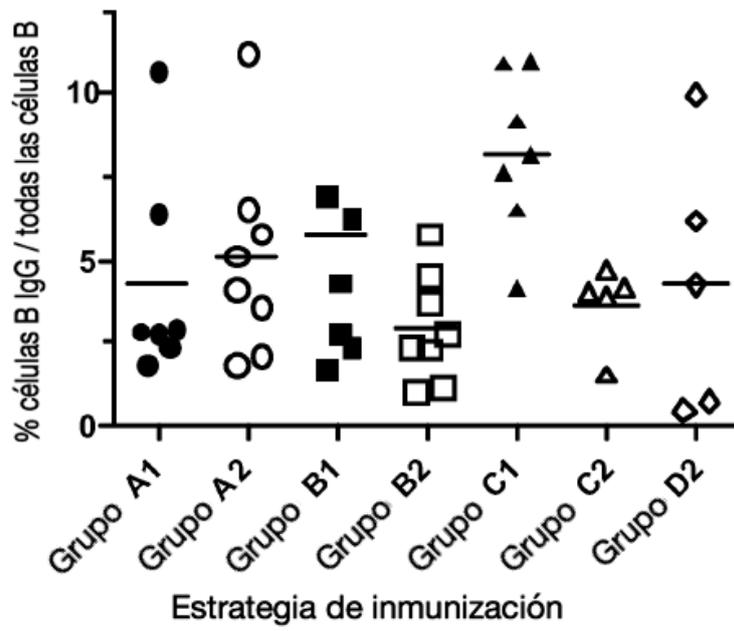


Figura 8

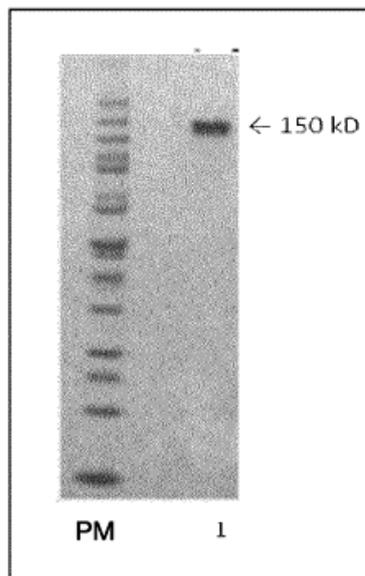


Figura 9

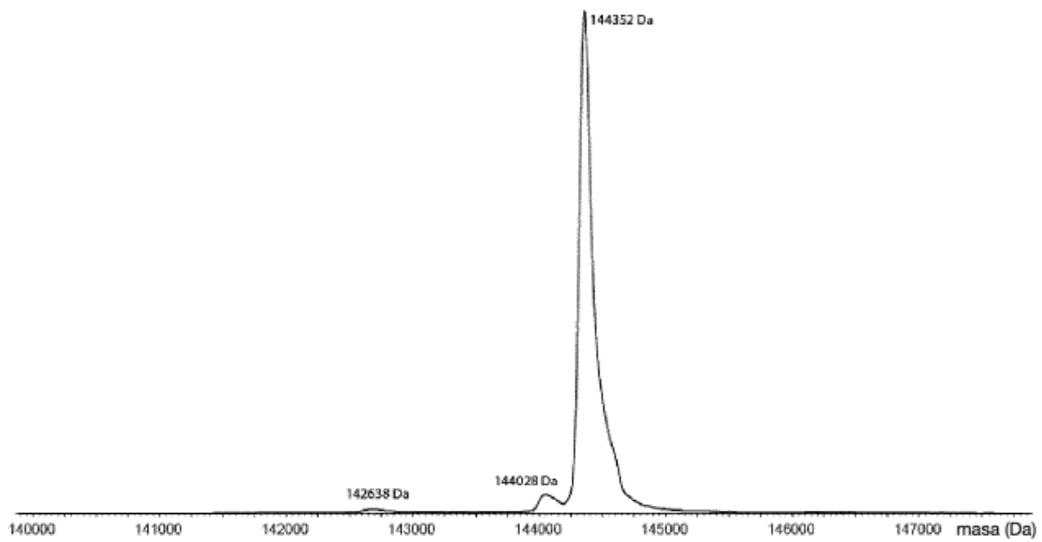


Figura 10

