

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 369**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/031823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138680**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13713652 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2825036**

54 Título: **Anticuerpos de cadena ligera modificados mediante ingeniería con histidina y roedores modificados genéticamente para la generación de los mismos**

30 Prioridad:

**16.03.2012 US 201261611950 P**  
**13.12.2012 US 201261736930 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.08.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MCWHIRTER, JOHN;**  
**MACDONALD, LYNN y**  
**MURPHY, ANDREW, J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 679 369 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

Anticuerpos de cadena ligera modificados mediante ingeniería con histidina y roedores modificados genéticamente para la generación de los mismos.

5

**Campo de la invención**

En el presente documento se describe un animal no humano modificado genéticamente (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) que expresa anticuerpos capaces de unirse a un antígeno de una manera dependiente del pH.

10 En el presente documento se describe un método para hacer modificaciones a la secuencia de la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de un animal no humano, en el que las modificaciones incluyen la mutagénesis de residuos dentro del gen de la región variable de la cadena ligera, por ejemplo, nucleótidos que codifican uno o más aminoácidos dentro de una región determinante de la complementariedad (CDR, del inglés *complementary determining region*), para facilitar la expresión *in vivo* de anticuerpos que comprenden dominios de la cadena ligera que presentan unión a antígenos dependiente del pH. También se describen en el presente documento métodos para producir anticuerpos con unión a antígenos dependiente del pH.

15

**Antecedentes de la invención**

20 Los anticuerpos normalmente comprenden un componente de cadena pesada homodimérica, en el que cada monómero de la cadena pesada se asocia a una cadena ligera idéntica. Los anticuerpos que tienen un componente de cadena pesada heterodimérica (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) son deseables como anticuerpos terapéuticos. Pero la preparación de anticuerpos biespecíficos que tengan un componente de cadena ligera adecuado que pueda asociarse satisfactoriamente a cada una de las cadenas pesadas de un anticuerpo biespecífico ha demostrado ser problemática.

25

En un enfoque, una cadena ligera podría seleccionarse mediante el sondeo de estadísticas de uso para todos los dominios variables de la cadena ligera, la identificación de la cadena ligera empleada más frecuentemente en los anticuerpos humanos y el emparejamiento de esa cadena ligera *in vitro* con las dos cadenas pesadas de diferente especificidad.

30

En otro enfoque, una cadena ligera podría seleccionarse mediante la observación de secuencias de cadena ligera en una biblioteca de presentación en fagos (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos que comprende secuencias de la región variable de la cadena ligera humana, por ejemplo, una biblioteca de scFv humano) y la selección de la región variable de la cadena ligera utilizada más habitualmente de entre la biblioteca. Después, la cadena ligera puede someterse a ensayo en las dos cadenas pesadas diferentes de interés.

35

En otro enfoque, una cadena ligera podría seleccionarse sometiendo a ensayo una biblioteca de presentación en fagos de secuencias variables de la cadena ligera usando las secuencias variables de la cadena pesada de ambas cadenas pesadas de interés como sondas. Una cadena ligera que se asocia a ambas secuencias variables de la cadena pesada podría seleccionarse como una cadena ligera para las cadenas pesadas.

40

En otro enfoque, una cadena ligera candidata podría alinearse con las cadenas ligeras afines a las cadenas pesadas y se hacen modificaciones en la cadena ligera para hacer coincidir más estrechamente características de secuencia comunes a las cadenas ligeras afines de ambas cadenas pesadas. Si es necesario minimizar las posibilidades de inmunogenia, las modificaciones preferentemente dan como resultado secuencias que están presentes en secuencias conocidas de la cadena ligera humana, de manera que es poco probable que el procesamiento proteolítico genere un epítipo de linfocito T basándose en parámetros y métodos conocidos en la técnica para la evaluación de la probabilidad de inmunogenia (es decir, ensayos informáticos, así como ensayos en húmedo).

45

Todos los enfoques anteriores se basan en métodos *in vitro* que subsumen una serie de restricciones *a priori*, por ejemplo, identidad de secuencia, capacidad para asociarse a cadenas pesadas preseleccionadas específicas, etc. Existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos que no se basen en la manipulación de condiciones *in vitro*, sino que, en su lugar, empleen enfoques más biológicamente sensatos a la preparación de proteínas de unión a epítopos humanos que incluyan una cadena ligera común.

50

Además, los anticuerpos terapéuticos, por ejemplo, los anticuerpos terapéuticos biespecíficos, tienen algunas limitaciones en cuanto a que con frecuencia requieren dosis elevadas para conseguir la eficacia deseada. Esto en parte se debe al hecho de que se internalizan complejos antígeno-anticuerpo en el endosoma y son objeto de degradación lisosómica en un proceso denominado aclaramiento mediado por diana. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos y composiciones que conduzcan a un reciclaje de anticuerpos más eficiente, por ejemplo, el reciclaje de anticuerpos biespecíficos, y eviten la degradación del anticuerpo promoviendo la disociación de complejos antígeno-anticuerpo en el compartimento endosómico sin comprometer la especificidad y afinidad del anticuerpo hacia el antígeno.

55

60

65

El documento WO2011097603 describe un ratón de cadena ligera común. El documento EP2275443 describe una molécula de unión a antígeno capaz de unirse a dos o más moléculas de antígeno repetidamente. El documento WO2011111007 describe anticuerpos con unión a antígeno dependiente del pH. El documento WO09203918 y el documento US5545806 describen animales no humanos transgénicos capaces de producir anticuerpos heterólogos. Chaparro-Riggers et al (*JBC*, 287: 11090-11097, 2012) describe el aumento de la semivida en suero y la prolongación de la disminución del colesterol in vivo mediante la modificación del anticuerpo con unión sensible al pH a PCSK9. Igawa et al (*Nat Biotech* 28: 1203-1207, 2010) describe que el reciclaje de anticuerpos mediante la unión a antígeno dependiente del pH modificada mejora la duración de la neutralización del antígeno.

## 10 Sumario de la invención

La invención proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su línea germinal, en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno, un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana derivada de una secuencia Vk1-39/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina, y en el que

20 (i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia del gen Vk1-39/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

(a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas;

25 (b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o

(c) en las posiciones 106, 108 y 111; o

30 (ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el Vk3-20/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

(a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;

35 (b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o

(c) en las posiciones 105, 106 y 109;

en el que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.

40 La invención proporciona también un método de obtención del roedor de la invención, en el que el método comprende reemplazar todas las secuencias génicas de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina funcionales en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno en el roedor con la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como una secuencia génica de región constante de cadena ligera de roedor endógena en el locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno.

50 La invención proporciona adicionalmente un método de generación de un anticuerpo que presenta unión dependiente del pH a un antígeno de interés que comprende:

inmunizar un roedor de la invención, o un roedor obtenido mediante el método de obtención de un roedor de la invención con un antígeno de interés; y

55 obtener una célula B que expresa un anticuerpo que se une al antígeno de interés con una afinidad deseada a un pH neutro mientras que muestra una unión reducida al antígeno de interés a un pH ácido y, opcionalmente, (a) usar la célula B para formar un hibridoma o (b) aislar el ADN que codifica el anticuerpo de la célula B o hibridoma y poner el ADN en vectores de expresión y transfectar los vectores en una célula hospedadora.

60 La invención proporciona adicionalmente una célula de roedor aislada del roedor de la invención, o aislada de un roedor obtenido mediante el método de la invención, en la que la célula comprende una única secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y deriva de una secuencia Vk1-39/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, y en la que

65

(i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia del gen Vk1-39/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

5 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111, y una combinación de las mismas

(b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o

(c) en las posiciones 106, 108 y 111; o

10 (ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el Vk3-20/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

15 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;

(b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o

(c) en las posiciones 105, 106 y 109;

20 en la que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.

La invención proporciona adicionalmente un hibridoma hecho a partir de una célula B aislada del roedor de la invención, o un roedor obtenido mediante el método de la invención, en el que el hibridoma comprende un locus de

25 cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y deriva de una secuencia Vk1-39/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, y en el que

30 (i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia del gen Vk1-39/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

35 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111, y una combinación de las mismas

(b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o

(c) en las posiciones 106, 108 y 111; o

40 (ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el Vk3-20/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

45 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;

(b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o

(c) en las posiciones 105, 106 y 109;

50 en el que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.

La invención proporciona adicionalmente una célula ES que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende, en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno, una única secuencia

55 génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y derivada de una secuencia Vk139/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, y en la que

(i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia del gen Vk1-39/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

60 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111, y una combinación de las mismas

(b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o

65

(c) en las posiciones 106, 108 y 111; o

(ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el Vk3-20/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

(a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;

(b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o

(c) en las posiciones 105, 106 y 109;

en la que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.

En un aspecto, en el presente documento se describe un sistema biológico para la generación de un anticuerpo o un dominio variable de anticuerpo que se une a un antígeno diana a un pH neutro, pero presenta una unión reducida del mismo antígeno a un pH ácido (por ejemplo, pH 5,0-6,0). El sistema biológico comprende un animal no humano, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) que tiene una secuencia de cadena ligera reordenada (por ejemplo, un V-J reordenado) que comprende una o más modificaciones con histidina. En diversos aspectos, las una o más modificaciones con histidina están en el codón CDR3 de la cadena ligera. En diversos aspectos, el animal no humano comprende un locus de inmunoglobulina de cadena pesada humano o humanizado. En diversos aspectos, el animal no humano comprende un reemplazo de segmentos de genes variables de cadena pesada no humanos endógenos con uno o más segmentos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  de cadena pesada humanos en el que los segmentos humanos están unidos operativamente a una región constante de inmunoglobulina no humana. En diversos aspectos, en el presente documento se describen animales no humanos con cadenas ligeras universales que comprenden dominios variables de cadena ligera con sustituciones de residuos no de histidina por residuos de histidina. En diversos aspectos estos animales no humanos de cadena ligera universal modificada con histidina (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones) se denominan ratones de cadena ligera universal-histidina, ratones ULC-histidina (por sus siglas en inglés) o ratones HULC (por sus siglas en inglés).

Por tanto, en un aspecto, en el presente documento se describe un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su línea germinal un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende secuencias de segmentos  $V_L$  y  $J_L$  humanos, en el que la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, la única secuencia reordenada de región variable de inmunoglobulina humana está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina no humana. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina no humana es una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina endógena. En un aspecto, el animal no humano carece de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina no reordenada funcional. En un aspecto, el locus de cadena ligera de inmunoglobulina está en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina no humano endógeno.

En un aspecto, el animal comprende adicionalmente en su línea germinal un locus de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una secuencia génica de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina no reordenada que comprende segmentos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos unidos operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es una secuencia génica de región constante de cadena pesada no humana. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógena. En un aspecto, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina está en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.

En un aspecto, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina es en la secuencia de nucleótidos que codifica una región determinante de la complementariedad (CDR). En un aspecto, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina es en la secuencia de nucleótidos que codifica una CDR3. En un aspecto, la sustitución es de uno, dos, tres, cuatro o más codones CDR3. En un aspecto, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprendida en el locus de cadena ligera de inmunoglobulina deriva de un segmento génico Vk1-39 o Vk3-20 humano. En un aspecto, la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada deriva de una secuencia génica Vk1-39/Jk5 o Vk3-20/Jk1 reordenada. En una realización, la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada deriva de una secuencia génica Vk1-39/Jk5 reordenada y la secuencia génica Vk1-39/Jk5 comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En otra realización, la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada deriva de una secuencia génica Vk3-20/Jk1 reordenada y la secuencia génica Vk3-20/Jk1 comprende un reemplazo de al menos

uno codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas.

5 En un aspecto, el animal no humano que se describe en el presente documento comprende una población de células B en respuesta a un antígeno de interés que se enriquece para anticuerpos que presentan una disminución en la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) a un pH ácido, en comparación al pH neutro, de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces o al menos aproximadamente 30 veces. En un aspecto, la disminución de la  $t_{1/2}$   
10 a un pH ácido, en comparación con un pH neutro, es de aproximadamente 30 veces o más.

15 En un aspecto, el animal expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana con una sustitución de al menos un residuo no de histidina con un residuo de histidina en una posición de aminoácido codificada por el al menos un codón sustituido en la secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. En un aspecto, el animal expresa un anticuerpo que conserva una sustitución de al menos un residuo no de histidina con un residuo de histidina en un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana expresado, a pesar de hipermutaciones somáticas.

20 En un aspecto, el animal no humano es un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un roedor, por ejemplo, una rata o un ratón. En un aspecto, el animal no humano es un ratón. Por tanto, en un aspecto, en el presente documento también se describe un ratón modificado genéticamente que comprende en su línea germinal un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende secuencias de segmentos  $V_L$  y  $J_L$  humanos, en las que  
25 la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, el ratón carece de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina no reordenada funcional.

30 En un aspecto, la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana en la línea germinal del ratón está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina se selecciona entre una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de rata o de ratón. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es una secuencia de ratón. En un aspecto, el locus de cadena ligera de inmunoglobulina está en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón endógeno.  
35

40 En un aspecto adicional, el ratón también comprende en su línea germinal un locus de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una secuencia no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende segmentos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  unidos operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de rata o ratón. En un aspecto, la secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es una secuencia de ratón. En un aspecto, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina está en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno.

45 En un aspecto, el ratón comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina en el que la sustitución es en la secuencia de nucleótidos que codifica una CDR. En un aspecto, la sustitución es en un codón CDR3, por ejemplo, en uno, dos, tres, cuatro o más codones CDR3. En un aspecto, el locus de cadena ligera de inmunoglobulina del ratón comprende la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana derivada de un segmento génico  $V_{k1-39}$  o  $V_k 3-20$  humano, por ejemplo, la única  
50 secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina deriva de una secuencia génica  $V_{k1-39}/J_{k5}$  o  $V_{k3-20}/J_{k1}$  reordenada. En una realización, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina deriva de una secuencia génica  $V_{k1-39}/J_{k5}$  reordenada y la secuencia  $V_{k1-39}/J_{k5}$  comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En una  
55 realización, dicho reemplazo se diseña para reemplazar histidinas en las posiciones 105, 106, 108 y 111. En otra realización, dicho reemplazo se diseña para reemplazar histidinas en las posiciones 106, 108 y 111.

60 En otra realización, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina deriva de una secuencia génica  $V_{k3-20}/J_{k1}$  reordenada y la secuencia  $V_{k3-20}/J_{k1}$  comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas. En una realización, dicho reemplazo se diseña para reemplazar histidinas en las posiciones 105, 106, 107 y 109. En otra realización, dicho reemplazo se diseña para reemplazar histidinas en las posiciones 105, 106 y 109.

65 En un aspecto, el ratón que se describe en el presente documento comprende una población de células B en respuesta a un antígeno de interés que se enriquece para anticuerpos que presentan una disminución en la

semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) a un pH ácido, en comparación con un pH neutro, de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente de 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces o al menos aproximadamente 30 veces. En un aspecto, la disminución de la  $t_{1/2}$  a un pH ácido, en comparación con un pH neutro, es de aproximadamente 30 veces o más.

En un aspecto, el ratón que se describe en el presente documento expresa una población de anticuerpos específicos de antígeno en respuesta a un antígeno de interés, en la que todos los anticuerpos comprenden (a) dominios variables de cadena ligera de inmunoglobulina derivados de la misma única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y (b) cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden dominios variables de cadena pesada derivados de un repertorio de segmentos V, D y J de cadena pesada humana.

En el presente documento también se describe un locus no humano, por ejemplo, locus de ratón, que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende secuencias de segmentos  $V_L$  y  $J_L$  humanos, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, el locus está comprendido en la línea germinal de un animal no humano. En un aspecto, el locus comprende la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana derivada de un segmento génico Vk1-39 o Vk3-20 humano, por ejemplo, derivado de una secuencia génica Vk1-39/Jk5 o Vk3-20/Jk1 reordenada. En un aspecto, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana presente en el locus deriva de la secuencia Vk1-39/Jk5 reordenada, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina se diseña para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En otro aspecto, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana presente en el locus deriva de la secuencia Vk3-20/Jk1 reordenada, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina se diseña para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas. En diversos aspectos, los loci no humanos que se describen en el presente documento pueden generarse usando métodos que se describen a continuación para producir un animal no humano modificado genéticamente.

En otro aspecto más, en el presente documento se describe un método para producir un animal no humano que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina modificado genéticamente en su línea germinal, en el que el método comprende la modificación de un genoma de un animal no humano para suprimir o hacer no funcionales segmentos V y J de cadena ligera de inmunoglobulina endógenos en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina, y poner en el genoma una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, dicho método da como resultado un animal no humano modificado genéticamente que comprende una población de células B enriquecida para anticuerpos que presentan una unión dependiente del pH al antígeno de interés. En un aspecto, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana puesta en el genoma deriva de una secuencia génica Vk1-39 o Vk3-20 humana, por ejemplo, una secuencia génica Vk1-39/Jk5 o Vk3-20/Jk1 reordenada. Por tanto, en la realización en la que la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana deriva de una secuencia génica Vk1-39/Jk5 reordenada, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina se diseña para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En una realización en la que la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana deriva de una secuencia génica Vk3-20/Jk1 reordenada, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina se diseña para expresar una histidina en la una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas.

En otro aspecto, en el presente documento se describe un método de generación de un anticuerpo que presenta unión dependiente del pH a un antígeno de interés que comprende (a) generar un ratón que se describe en el presente documento (por ejemplo, un ratón que comprende en su línea germinal un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende secuencias de segmentos  $V_L$  y  $J_L$  humanos y una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina en su secuencia reordenada de región variable de cadena ligera), (b) inmunizar el ratón con un antígeno de interés y (c) seleccionar un anticuerpo que se une al antígeno de interés con una afinidad deseada a un pH neutro mostrando al mismo tiempo una unión reducida al antígeno a un pH ácido. En un aspecto, el método da como resultado una generación de un anticuerpo que presenta una  $t_{1/2}$  a pH ácido y 37 °C de aproximadamente 2 minutos o menos. En un aspecto, el método da como resultado una generación de un anticuerpo que muestra una disminución en la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) a un pH ácido, en comparación con un pH neutro, de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces o al menos aproximadamente 30 veces.

En otros aspectos, en el presente documento se describen métodos adicionales de generación de un anticuerpo que presenta unión dependiente del pH a un antígeno de interés. Un método de este tipo comprende (a) seleccionar un primer anticuerpo que se una a un antígeno de interés con una afinidad deseada, (b) modificar una secuencia de nucleótidos de cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo para que comprenda una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, (c) expresar una cadena pesada de inmunoglobulina del primer anticuerpo y la cadena ligera de inmunoglobulina modificada en una célula y (d) seleccionar un segundo anticuerpo expresado en la célula que conserve una afinidad deseada por el antígeno de interés a pH neutro y muestre una unión reducida al antígeno de interés a un pH ácido. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo comprende una única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana. En un aspecto, el primer anticuerpo se genera en un animal no humano, por ejemplo, un ratón, que comprende una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina derivada de una única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y la modificación de la cadena ligera de inmunoglobulina en la única secuencia reordenada de región variable de inmunoglobulina humana. En un aspecto, el primer anticuerpo se genera en un animal no humano, por ejemplo, un ratón, que comprende adicionalmente una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina derivada de un repertorio de segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos. En un aspecto, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana se selecciona entre la secuencia génica Vk1-39/Jk5 y Vk3-20/Jk1. En una realización, en la que la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana es Vk1-39/Jk5, la modificación en la secuencia de nucleótidos de cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo se hace en el codón CDR3 en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En una realización en la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana es Vk3-20/Jk1, la modificación en la secuencia de nucleótidos de cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo se hace en el codón CDR3 en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas.

En un aspecto, el método de generación de un anticuerpo que presenta unión dependiente del pH a un antígeno de interés que se describe en el presente documento da como resultado un anticuerpo que muestra una disminución en la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) a un pH ácido, en comparación con un pH neutro, de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente de 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces o al menos aproximadamente 30 veces. En un aspecto, el método de generación del anticuerpo da como resultado un anticuerpo que presenta una  $t_{1/2}$  a pH ácido y 37 °C de aproximadamente 2 minutos o menos.

Cualquiera de las realizaciones y los aspectos que se describen en el presente documento pueden usarse en combinación entre sí, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. Otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra una alineación de aminoácidos de cadenas ligeras derivadas de Vk1-39 humanas de diversos anticuerpos específicos de antígeno (anticuerpos A-K). Los residuos de histidina (H) ubicados dentro de cada secuencia de cadena ligera están en negrita. Diversas regiones de cadena ligera (región marco conservada y CDR) se indican encima de la alineación.

La FIG. 2 ilustra las combinaciones y ubicaciones de residuos de histidina introducidos mediante ingeniería genética en la región CDR3 de cadenas ligeras derivadas de Vk1-39 humanas mediante mutagénesis. Se incluyen las secuencias de ácido nucleico correspondientes. Se muestran en negrita los residuos de histidina introducidos a través de mutagénesis y los residuos de ácido nucleico correspondientes. Las posiciones de los aminoácidos (105, 106, etc.) se basan en una numeración singular descrita en Lefranc et al. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77 y que también puede observarse en [www.imgt.org](http://www.imgt.org).

La FIG. 3 ilustra el nivel de expresión de anticuerpos en ng/ml detectada en los sobrenadantes de células CHO transfectadas con ácidos nucleicos que codificaban cinco (1-5) cadenas pesadas diferentes y cadenas ligeras derivadas de Vk1-39 que tenían residuos de histidina introducidos mediante ingeniería genética en los lugares indicados (véase el eje Y) en la CDR3.

La FIG. 4 es una transferencia western que muestra la expresión de anticuerpos humanos específicos de antígeno seleccionados que contenían cadenas ligeras modificadas mediante ingeniería genética con histidina en sobrenadantes de células CHO.

Las FIG. 5A-5E muestran la cinética de unión para cadenas pesadas seleccionadas (1-5) de anticuerpos específicos de antígeno emparejados con diversas cadenas ligeras modificadas mediante ingeniería genética con histidina a un pH neutro (7,4) y uno (5,75). Se muestran diversos parámetros cinéticos incluyendo  $k_A$ ,  $K_D$ ,  $K_D$  y  $t_{1/2}$ . SU = sin unión.

La FIG. 6 muestra parámetros cinéticos ( $K_D$  y  $t_{1/2}$ ) para anticuerpos que comprenden cadena ligera universal parental o cadena ligera universal modificada mediante ingeniería genética con histidina emparejada con cadenas pesadas indicados (2, 3 y 6). Las sustituciones con histidina conducen a una fuerte dependencia del pH en varios anticuerpos. Se hicieron sustituciones con histidina en CDR3 para convertir la secuencia  $^{105}\text{QQSYSTP}_{111}$  (SEQ ID NO: 3) en  $^{105}\text{HHSYSTH}_{111}$  (SEQ ID NO: 5). Nótese que SU = sin unión detectada ( $K_D > 10$  micromolar).

La FIG. 7 muestra la secuencia y las propiedades (% de contenido de GC, N, % de desapareamiento,  $T_m$ ) de cebadores de mutagénesis seleccionados utilizados para introducidos mediante ingeniería genética residuos de histidina en CDR3 de una secuencia reordenada de cadena ligera  $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa 5}$  humana. Se incluyen los SEQ ID NO para estos cebadores utilizados en el Listado de secuencias que se incluye en la Tabla a continuación. F = cebador directo, R = cebador inverso.

Las FIG. 8A-8B muestran una estrategia general para la construcción de vectores de dirección para la introducción mediante ingeniería genética de residuos de histidina en una secuencia reordenada de región variable de cadena ligera humana derivada de región variable de  $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa 5}$  para hacer un ratón modificado genéticamente que exprese anticuerpos que contengan la cadena ligera humana modificada. Las FIG. 8C-8D muestran la introducción del vector de dirección para sustituciones ULC-H105/106/108/111 en células ES y la generación de ratones heterocigotos a partir de las mismas; mientras que las FIG. 8E-8F muestran la introducción del vector de dirección para sustituciones ULC-H106/108/111 en células ES y la generación de ratones heterocigotos a partir de las mismas. Los diagramas no se presentan a escala. A menos que se indique lo contrario, las formas rellenas y las líneas continuas representan una secuencia de ratón, las formas vacías y las líneas dobles representan una secuencia humana.

La FIG. 9 muestra títulos de antisuero contra inmunógeno de los ratones heterocigotos para la cadena ligera universal de histidina (HULC) (con 4 sustituciones de His - ratones HULC 1927; con 3 sustituciones de His - ratones HULC 1930) y animales de tipo silvestre en una segunda extracción de sangre.

La FIG. 10 es una comparación del número de clones positivos para antígeno totales y el número de clones positivos para antígeno que presentaban unión a antígeno sensible al pH, obtenidos a partir de fusiones de hibridoma de HULC heterocigotos (1927 frente a 1930) y ratones TS. La figura incluye datos para dos ratones para cada tipo de ratón ("ratón 1" y "ratón 2").

Las FIG. 11A-11C muestran sensogramas de experimentos de unión por resonancia de plasmón superficial en los que a anticuerpos monoclonales (AA, BB, CC, DD, HH, GG, NN y OO) de ratones TS o HULC heterocigotos se les permitió asociarse al inmunógeno a pH neutro (pH 7,4), seguido de un cambio a un tampón con pH de 7,4 o 6,0 para la fase de disociación. Las líneas individuales en cada gráfico representan las respuestas de unión a diferentes concentraciones de los anticuerpos respectivos. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Los valores de semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) se indican encima de los respectivos sensogramas y el cambio en número de veces ( $t_{1/2}$ ) se incluye a la derecha de cada sensograma. Los anticuerpos AA, BB, CC, DD, HH y GG eran de ratones HULC 1927 heterocigotos usando cadena ligera sustituida con His, NN es de ratón HULC 1927 heterocigoto usando cadena ligera TS y OO es de un ratón TS (Véase la Tabla 4 para aclaraciones).

La FIG. 12 muestra posiciones de residuos de histidina introducidos mediante ingeniería genética en la región CDR3 de cadenas ligeras derivadas de  $V_{\kappa 3-20}$  mediante mutagénesis. Se muestran en negrita residuos de histidina introducidos a través de mutagénesis y residuos de ácido nucleico correspondientes. Las posiciones de aminoácidos (105, 106, etc.) se basan en una numeración singular descrita en Lefranc et al. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27:55-77 y que también puede observarse en [www.imgt.org](http://www.imgt.org).

La FIG. 13 muestra la secuencia y las propiedades (% de contenido de GC, N, % de desapareamiento,  $T_m$ ) de cebadores de mutagénesis seleccionados utilizados para introducidos mediante ingeniería genética residuos de histidina en CDR3 de una secuencia reordenada de cadena ligera  $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa 1}$  humana. Se incluyen los SEQ ID NO para estos cebadores utilizados en el Listado de secuencias que se incluye en la Tabla a continuación. D = cebador directo, I = cebador inverso.

Las FIG. 14A-14B muestran una estrategia general para la construcción de vectores de dirección para la introducción mediante ingeniería genética de residuos de histidina en una secuencia reordenada de región variable de cadena ligera humana derivada de región variable de  $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa 1}$  para hacer un ratón modificado genéticamente que exprese anticuerpos que contengan la cadena ligera humana modificada. La FIG. 14C muestra la introducción del vector de dirección para sustituciones ULC-Q105H/Q106H/Y107H/S109H en células ES y la generación de ratones heterocigotos a partir de las mismas; mientras que la FIG. 14D muestra la introducción del vector de dirección para sustituciones ULC-Q105H/Q106H/S109H en células ES y la generación de ratones heterocigotos a partir de las mismas. Los diagramas no se presentan a escala. A menos que se indique lo contrario, las formas rellenas y las líneas continuas representan una secuencia de ratón, las formas vacías y las líneas dobles representan una secuencia humana.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

5 En el presente documento se describen animales no humanos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, hámsters, etc.) modificados genéticamente que comprenden en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican moléculas de anticuerpos humanos que presentan unión a antígeno dependiente del pH, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que codifica anticuerpos que presentan unión a antígeno dependiente del pH; embriones, células y tejidos que comprenden las mismas; métodos de fabricación de las mismas; así como métodos de uso de las mismas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos y frases utilizados en el presente documento incluyen los significados que los términos y frases han alcanzado en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente por el contexto en el que se usa el término o frase.

15 El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H, del inglés *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, del inglés *light*) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada ( $C_H$ ). La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera ( $C_L$ ). Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, del inglés *framework region*). Cada dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR de cadena pesada puede abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). La expresión anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  con respecto a su epítipo diana de aproximadamente  $10^{-9}$  M o inferior (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M o aproximadamente  $1 \times 10^{-12}$  M). En una realización,  $K_D$  se mide por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™; en otra realización,  $K_D$  se mide por ELISA.

35 La frase "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítipos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas no idénticas, uniéndose cada cadena pesada específicamente a un epítipo diferente - ya sea en dos moléculas diferentes (por ejemplo, diferentes epítipos en dos inmunógenos diferentes) o en la misma molécula (por ejemplo, diferentes epítipos en el mismo inmunógeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítipos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo será generalmente al menos uno o dos o tres o cuatro o más órdenes de magnitud menor que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo y viceversa. Los epítipos unidos específicamente por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diferente (por ejemplo, en la misma proteína o en una diferente). Los anticuerpos biespecíficos ejemplares incluyen aquellos con una primera cadena pesada específica para un antígeno tumoral y una segunda cadena pesada específica para un marcador citotóxico, por ejemplo, un receptor de Fc (por ejemplo, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, etc.) o un marcador de linfocitos T (por ejemplo, CD3, CD28, etc.). Adicionalmente, el segundo dominio variable de cadena pesada puede estar sustituido con un dominio variable de cadena pesada que tiene una especificidad deseada diferente. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con una primera cadena pesada específica para un antígeno tumoral y una segunda cadena pesada específica para una toxina pueden emparejarse con el fin de entregar una toxina (por ejemplo, saporina, alcaloide de la vinca, etc.) a una célula tumoral. Otros anticuerpos biespecíficos de ejemplo incluyen aquellos con una primera cadena pesada específica para un receptor activador (por ejemplo, receptor de células B, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIA, Fc $\alpha$ RI, receptor de linfocitos T, etc.) y una segunda cadena pesada específica para un receptor inhibidor (por ejemplo, Fc $\gamma$ RIIB, CD5, CD22, CD72, CD300a, etc.). Dichos anticuerpos biespecíficos pueden construirse para afecciones terapéuticas asociadas a la activación de células (por ejemplo, la alergia y el asma). Pueden hacerse anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas pesadas que reconocen diferentes epítipos del mismo inmunógeno. Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítipos del mismo inmunógeno pueden fusionarse a secuencias de ácidos nucleicos que codifican la misma o diferentes regiones constantes de cadena pesada, y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas que tienen cada una tres CDR de cadena pesada, seguidas de (del extremo N al extremo C) un dominio  $C_{H1}$ , una bisagra, un dominio  $C_{H2}$  y un dominio  $C_{H3}$ , y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a epítipo pero que puede asociarse a cada cadena pesada, o que puede asociarse a cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítipos unidos por las regiones de unión a epítipo de cadena pesada, o que puede asociarse a cada cadena pesada y permitir la unión de una o las dos cadenas pesadas a uno o los dos epítipos.

65

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariotas y eucariotas (de una sola célula o de múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas con baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona entre las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), células retinianas, Vero, CV1, de riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, células L, células C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, células de Sertoli, células 3A BRL, células HT1080, células de mieloma, células tumorales y una estirpe celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6™).

La frase "región determinante de la complementariedad", o la expresión "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones marco conservadas en una región variable de una cadena ligera o una pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T). Una CDR puede estar codificada, por ejemplo, por una secuencia de línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por una célula B o un linfocito T vírgenes o maduros. Una CDR puede mutarse somáticamente (por ejemplo, puede variar de una secuencia codificada en la línea germinal de un animal), humanizarse y/o modificarse con sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de línea germinal) que no están contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada) pero que están contiguas en una secuencia de ácido nucleico de la célula B, por ejemplo, como resultado de corte y empalme o conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una cadena pesada CDR3).

El término "conservadora", cuando se usa para describir una sustitución conservadora de aminoácidos, incluye la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de una región variable para unirse específicamente a un epítipo diana con una afinidad deseada. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen las cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; las cadenas laterales alifáticas-hidroxilo tales como serina y treonina; las cadenas laterales que contiene amida tales como asparagina y glutamina; las cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; las cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; las cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y las cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución conservadora de aminoácidos puede ser la sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa, por ejemplo, en mutagénesis de rastreo con alanina. En algunas realizaciones, se hace una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de log de PAM250-probabilidad desvelada en Gonnet et al. (1992) , *Science* 256:1443-1445. En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservadora en la que la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de log de PAM250-probabilidad.

En algunas realizaciones, las posiciones de residuos en una cadena ligera o una cadena pesada de inmunoglobulina difieren en una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. En algunas realizaciones, las posiciones de residuos en una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma (por ejemplo, un fragmento que permite la expresión y secreción desde, por ejemplo, una célula B) no son idénticas a las de una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se enumera en el presente documento, sino que difiere en una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

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

La frase "fragmento funcional" incluye fragmentos de proteínas de unión a epítipo que pueden expresarse, secretarse y unirse específicamente a un epítipo con una  $K_D$  en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar. El reconocimiento específico incluye tener una  $K_D$  que esté al menos en el intervalo micromolar, el intervalo nanomolar

o el intervalo picomolar.

La expresión "línea germinal" en referencia a una secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina incluye una secuencia de ácido nucleico que puede pasarse a la progenie.

5 La frase "cadena pesada" o "cadena pesada de inmunoglobulina" incluye una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, de cualquier organismo. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique lo contrario. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR y combinaciones de los mismos. Una cadena pesada típica tiene, después del dominio variable (del extremo N al extremo C), un dominio C<sub>H</sub>1, una bisagra, un dominio C<sub>H</sub>2 y un dominio C<sub>H</sub>3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que sea capaz de reconocer específicamente un epítipo (por ejemplo, reconocer el epítipo con una K<sub>D</sub> en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que sea capaz de expresar y secretar desde una célula y que comprenda al menos una CDR. Un dominio variable de cadena pesada está codificado por una secuencia génica de región variable, que generalmente comprende segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> derivados de un repertorio de segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> presentes en la línea germinal. Pueden encontrarse secuencias, ubicaciones y nomenclatura para segmentos de cadena pesada V, D y J para diversos organismos en la base de datos IMGT, [www.imgt.org](http://www.imgt.org).

20 El término "identidad", cuando se usa en relación con una secuencia, incluye la identidad según se determina mediante una serie de diferentes algoritmos conocidos en la técnica que puede usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótido y/o de aminoácidos. En algunas realizaciones que se describen en el presente documento, las identidades se determinan usando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) empleando una penalización de hueco abierto de 10,0, una penalización por prolongación de hueco de 0,1, y usando una matriz de similitud Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de las secuencias dependerá de las secuencias particulares, pero en el caso de un dominio constante de cadena ligera, la longitud debería contener una secuencia de suficiente longitud para plegarse en un dominio constante de cadena ligera que sea susceptible de autoasociación para formar un dominio constante de cadena ligera canónico, por ejemplo, capaz de formar dos láminas beta que comprendan cadenas beta y capaz de interactuar con al menos un dominio C<sub>H</sub>1 de un ser humano o un ratón. En el caso de un dominio C<sub>H</sub>1, la longitud de la secuencia debería contener una secuencia de suficiente longitud para plegarse en un dominio C<sub>H</sub>1 que sea capaz de formar dos láminas beta que comprendan cadenas beta y capaz de interactuar con al menos un dominio constante de cadena ligera de un ratón o un ser humano.

35 La frase "molécula de inmunoglobulina" incluye dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas pueden ser idénticas o diferentes y las cadenas ligeras pueden ser idénticas o diferentes.

40 La "cadena ligera" frase incluye una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye las cadenas ligeras kappa y lambda humanas y una VpreB, así como cadenas ligeras sustitutas. Los dominios variables de cadena ligera normalmente incluyen tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco conservadas (FR), a menos que se especifique lo contrario. En general, una cadena ligera de longitud completa incluye, del extremo amino al extremo carboxilo, un dominio variable que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y una región constante de cadena ligera. Un dominio variable de cadena ligera está codificado por una secuencia génica de región variable de cadena ligera, que comprende, en general, segmentos V<sub>L</sub> y J<sub>L</sub>, derivados de un repertorio de segmentos V y J presentes en la línea germinal. Pueden encontrarse secuencias, ubicaciones y nomenclatura para segmentos de cadena ligera V y J para diversos organismos en la base de datos IMGT, [www.imgt.org](http://www.imgt.org). Las cadenas ligeras incluyen aquellas, por ejemplo, que no se unen selectivamente ya sea a un primer o un segundo epítipo unido selectivamente por la proteína de unión a epítipo en la que aparecen. Las cadenas ligeras también incluyen aquellas que se unen y reconocen, o ayudan a la cadena pesada con la unión y el reconocimiento de, uno o más epítopos unidos selectivamente por la proteína de unión a epítipo en la que aparecen. Las cadenas ligeras comunes o universales incluyen aquellas derivadas de un gen Vk1-39Jk5 humano o un gen Vk3-20Jk1 humano, e incluyen versiones mutadas somáticamente (por ejemplo, maduras por afinidad) de las mismas.

55 La frase "intervalo micromolar" pretende significar 1-999 micromolar; la frase "intervalo nanomolar" pretende significar 1-999 nanomolar; la frase "intervalo picomolar" pretende significar 1-999 picomolar.

60 La frase "mutado somáticamente" incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de una célula B que ha experimentado cambio de clase, en la que la secuencia de ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina (por ejemplo, secuencia de nucleótidos que codifica un dominio variable de cadena pesada o que incluye una secuencia CDR o FR de cadena pesada) en la célula B cambiada de clase no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico en la célula B antes del cambio de clase, tal como, por ejemplo, una diferencia en una secuencia de ácido nucleico de CDR o región marco conservada entre una célula B que no ha experimentado cambio de clase y una célula B que ha experimentado cambio de clase. "Mutado somáticamente" incluye la referencia a secuencias de ácidos nucleicos de células B maduras por afinidad que no son idénticas a las secuencias de región variable de

inmunoglobulina correspondientes en células B que no están maduras por afinidad (es decir, secuencias en el genoma de células de la línea germinal). La frase "mutado somáticamente" también incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de región variable de inmunoglobulina de una célula B después de la exposición de la célula B a un epítipo de interés, en la que la secuencia de ácido nucleico difiere de la secuencia de ácido nucleico correspondiente antes de la exposición de la célula B al epítipo de interés. La frase "mutado somáticamente" se refiere a secuencias de anticuerpos que se han generado en un animal, por ejemplo, un ratón que tiene secuencias de ácidos nucleicos de región variable de inmunoglobulina humana, en respuesta a una exposición inmunógena, y que son resultado de los procesos de selección operativos inherentemente en un animal de este tipo.

El término "no reordenado", con referencia a una secuencia de ácido nucleico, incluye secuencias de ácidos nucleicos que existen en la línea germinal de una célula animal.

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

La expresión "unido operativamente" se refiere a una relación en la que los componentes unidos operativamente funcionan de la manera pretendida. En un caso, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína puede estar unida operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, secuencia promotora, potenciadora, silenciadora, etc.) con el fin de conservar la regulación transcripcional apropiada. En un caso, una secuencia de ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina (o segmentos V(D)J) puede estar unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico de una región constante de inmunoglobulina con el fin de permitir la recombinación apropiada entre las secuencias en una secuencia de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina.

El término "reemplazo" en referencia al reemplazo de genes se refiere a la colocación de material genético exógeno en un locus genético endógeno, reemplazando de este modo todo o una porción del gen endógeno con una secuencia de ácido nucleico ortóloga u homóloga.

"Funcional" como se usa en el presente documento, por ejemplo, en referencia a un polipéptido funcional, incluye un polipéptido que conserva al menos una actividad biológica asociada normalmente a la proteína nativa. En otro caso, un segmento génico de inmunoglobulina funcional puede incluir un segmento génico variable que sea susceptible de reordenación productiva para generar una secuencia génica de inmunoglobulina reordenada.

"PH neutro" incluye un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0, por ejemplo, un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,4, por ejemplo, entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,4, por ejemplo, el pH fisiológico. "PH ácido" incluye un pH de 6,0 o inferior, por ejemplo, un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, un pH entre aproximadamente 5,75 y aproximadamente 6,0, por ejemplo, un pH de los compartimentos endosómicos o lisosómicos.

### **Residuos de histidina modificados mediante ingeniería genética en genes de cadena de inmunoglobulina**

Los inventores han descubierto que puede hacerse animales no humanos que expresan anticuerpos que son capaces de unirse a un antígeno de una manera dependiente del pH haciendo modificaciones de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina en una o más posiciones a lo largo de la secuencia de la cadena ligera. Se describen métodos para hacer modificaciones en la línea germinal de un animal no humano de manera que el animal exprese histidinas en CDR de anticuerpos. En particular, se describen métodos para hacer modificaciones en una secuencia variable de cadena ligera de inmunoglobulina en la línea germinal del ratón. La secuencia de la región variable, por ejemplo, de las cadenas ligeras, normalmente muestran hipermutación somática a lo largo de la secuencia de la región variable y, en algunos casos, dichas mutaciones pueden dar como resultado una sustitución de residuos de histidina (véase, por ejemplo, la FIG. 1). Dichas mutaciones pueden ocurrir incluso en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que son las regiones de los dominios variables responsables de la unión a antígeno. En algunos casos, dichas mutaciones pueden dar como resultado anticuerpos que muestran una unión a antígeno dependiente del pH, por ejemplo, una unión a antígeno reducida a un pH ácido en comparación con la unión a antígeno a un pH neutro. Dicha unión a antígeno dependiente del pH se desea ya que puede permitir que el anticuerpo se una al antígeno fuera de la célula, y, cuando se internalice en un endosoma, libere el antígeno y se recicle de nuevo a la superficie para unirse a otro antígeno, evitando el aclaramiento mediado por la diana. Se han publicado enfoques para la introducción de residuos de histidina para conseguir este efecto mediante el uso de una mutagénesis por rastreo de *his aleatoria* para diseñar mediante ingeniería genética propiedades de unión dependientes del pH en anticuerpos anti-IL-6R (documento US 2011/0111406 A1). Sin embargo, la mutagénesis aleatoria de residuos de anticuerpo puede dar como resultado una afinidad reducida del anticuerpo al antígeno. Un animal no humano modificado genéticamente para la expresión de una sustitución con histidina en la secuencia del anticuerpo permite la generación de anticuerpos de alta afinidad en respuesta a un antígeno de interés que, debido a la modificación o modificaciones con histidina, también mostrarían una unión a antígeno dependiente del pH.

Por tanto, en diversos aspectos en el presente documento se describe un animal no humano modificado

genéticamente (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) que comprende en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, una secuencia de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende modificaciones que dan como resultado que el animal expresa anticuerpos capaces de unirse a antígenos de una manera dependiente del pH. En un aspecto, el animal no humano comprende modificaciones en la secuencia de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (por ejemplo, secuencia del segmento V<sub>L</sub> y/o J<sub>L</sub>) que comprenden sustituciones en al menos un codón no de histidina con un codón de histidina (en algunos casos, también pueden denominarse "sustitución con histidina", "sustitución con codón de histidina" o similares). En un aspecto, el animal comprende al menos una sustitución de un codón no de histidina con un codón de histidina en una secuencia de nucleótidos de una región determinante de la complementariedad (CDR, por ejemplo, CDR1, CDR2 y/o CDR3) de una cadena ligera de inmunoglobulina humana. En un aspecto, la sustitución es en un codón CDR3. En un aspecto, la cadena ligera es una cadena ligera κ. En un aspecto, el animal expresa una cadena de ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, una CDR de cadena ligera, por ejemplo, una CDR3 de cadena ligera, que comprende una sustitución de al menos un aminoácido con una histidina. En otro aspecto, la cadena ligera es una cadena ligera λ. En otro aspecto más, el ratón comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina en las cadenas ligeras tanto κ como λ.

El residuo de histidina está codificada por dos codones diferentes, CAT y CAC (residuos de ácido desoxirribonucleico). Por tanto, un codón no de histidina puede sustituirse con un CAT o un CAC. La sustitución se diseña mediante ingeniería genética en un codón que en su configuración de línea germinal (es decir, estado no mutado somáticamente) no codifica un residuo de histidina.

En un aspecto una cadena ligera es una cadena ligera universal (también denominada una cadena ligera común). Como se describe en las Solicitudes de Patente de los EE.UU. N.º 13/022.759, 13/093.156, 13/412.936 y 13/488.628 (Publicaciones de Solicitud de los EE.UU. N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 y 2013/0045492), un animal no humano (por ejemplo, un ratón) que selecciona una cadena ligera común para una pluralidad de cadenas pesadas tiene una utilidad práctica. En diversos aspectos, los anticuerpos expresados en un animal no humano que comprende solamente una cadena ligera común tendrán cadenas pesadas que pueden asociarse y expresarse con una cadena ligera idéntica o sustancialmente idéntica. Esto es particularmente útil en la preparación de anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, un animal de este tipo puede inmunizarse con un primer inmunógeno para generar una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente a un primer epítipo. El animal (o un animal genéticamente igual) pueden inmunizarse con un segundo inmunógeno para generar una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente al segundo epítipo. Las regiones de cadena pesada variable pueden clonarse a partir de las células B y expresarse con la misma región constante de cadena pesada y la misma cadena ligera (por ejemplo, una cadena ligera común) en una célula para producir un anticuerpo biespecífico, en el que el componente de cadena pesada del anticuerpo biespecífico se ha seleccionado por un animal para que se asocie y se exprese con el mismo componente de cadena ligera. En diversos aspectos descritos, las regiones variables de los ratones modificados genéticamente son regiones variables humanas.

Por tanto, se modificó mediante ingeniería genética un ratón que es capaz de generar cadenas ligeras de inmunoglobulina que se emparejarán convenientemente con una familia muy diversa de cadenas pesadas, incluyendo cadenas pesadas cuyas regiones variables humanas se apartan de las secuencias de línea germinal, por ejemplo, regiones variables maduras por afinidad o mutadas somáticamente. En diversos aspectos, el ratón se idea para emparejar dominios variables de cadena ligera humanos con dominios variables de cadena pesada humanos que comprenden mutaciones somáticas, permitiendo de este modo una vía a proteínas de unión de alta afinidad adecuadas para su uso como agentes terapéuticos de uso humano.

El ratón modificado mediante ingeniería genética, a través del proceso largo y complejo de selección de anticuerpos dentro de un organismo, hace elecciones biológicamente apropiadas en el emparejamiento de una colección diversa de dominios variables de cadena pesada humanos con un número limitado de opciones de cadenas ligeras humanas. Con el fin de conseguir esto, el ratón se modifica mediante ingeniería genética para presentar un número limitado de opciones de dominios variables de cadena ligera humanos junto con una amplia diversidad de opciones de dominios variables de cadena pesada humanos. Tras la exposición con un inmunógeno, el ratón maximiza el número de soluciones en su repertorio para desarrollar un anticuerpo para el inmunógeno, limitado en gran parte o únicamente por el número u opciones de cadena ligera en su repertorio. En diversos aspectos, esto incluye permitir que el ratón consiga mutaciones somáticas adecuadas y compatibles del dominio variable de cadena ligera que, sin embargo, será compatible con una diversidad relativamente grande de dominios variables de cadena pesada humanos, incluyendo, en particular, dominios variables de cadena pesada humanos mutados somáticamente.

El ratón de cadena ligera común modificado mediante ingeniería genética descrito en las Publicaciones de Solicitud de los EE.UU. N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 y 2013/0045492 comprendían una secuencia de ácido nucleico que codificaba un repertorio limitado de opciones de cadena ligera, por ejemplo, una cadena ligera común o universal "ULC (del inglés *universal light chain*" que comprendía no más de dos segmentos V<sub>L</sub> o una sola secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana. Para conseguir dicho repertorio limitado, se modificó mediante ingeniería genética un ratón para volver no funcional o sustancialmente no funcional su capacidad para hacer, o reorganizar, un dominio variable de cadena ligera de ratón nativo. En un aspecto, esto se consiguió, por ejemplo, mediante la supresión de los segmentos génicos de región variable de

cadena ligera del ratón. Como se ha descrito anteriormente, el locus endógeno de ratón después puede modificarse mediante segmentos génicos de región variable de cadena ligera humanos adecuados exógenos de elección, unidos operativamente al dominio constante de cadena ligera de ratón endógeno, de manera que los segmentos génicos de región variable humanos exógenos pueden combinarse con el gen de la región constante de cadena ligera de ratón endógeno y formar un gen de cadena ligera quimérico inverso reordenado (variable humana, constante de ratón). En diversos aspectos, la región variable de cadena ligera es capaz de mutarse somáticamente. En diversos aspectos, para maximizar la capacidad de la región variable de cadena ligera para adquirir mutaciones somáticas, el potenciador o potenciadores apropiados se conservan en el ratón. En un aspecto, en la modificación de un locus de cadena ligera  $\kappa$  de ratón para reemplazar segmentos génicos de cadena ligera  $\kappa$  de ratón con segmento génicos de cadena ligera  $\kappa$  humanos, el potenciador intrónico  $\kappa$  de ratón y el potenciador 3'  $\kappa$  de ratón se mantienen funcionalmente o ininterrumpidos.

Por tanto, se describió un ratón modificado genéticamente que expresa un repertorio limitado de cadenas ligeras quiméricas (variable humana, constante de ratón) inversas asociadas a una diversidad de cadenas pesadas quiméricas (variable humana, constante de ratón) inversas. En diversos aspectos, los segmentos génicos de cadena ligera  $\kappa$  de ratón endógenos se suprimen y se reemplazan con una única (o dos) región de cadena ligera humana reordenada, unida operativamente al gen  $C\kappa$  de ratón endógeno. En aspectos, para maximizar la hipermutación somática de la región de cadena ligera humana reordenada, el potenciador intrónico  $\kappa$  de ratón y potenciador 3'  $\kappa$  de ratón se mantienen. En diversos aspectos, el ratón también comprende un locus de cadena ligera  $\lambda$  no funcional o una delección del mismo o una delección que hace que el locus sea incapaz de hacer una cadena ligera  $\lambda$ .

Los anticuerpos generados en ratón de cadena ligera universal en respuesta a diversos antígenos que fueron capaces de utilizar un repertorio diverso de secuencias de región variable de cadena pesada, que comprende un repertorio diverso de segmentos  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$ . Los anticuerpos generados en dicho ratón ULC modificado mediante ingeniería genética son útiles para diseñar anticuerpos terapéuticos biespecíficos; sin embargo, como con cualquier otro anticuerpo, cada anticuerpo biespecífico puede unirse solamente a una diana durante su vida útil en el plasma; el anticuerpo se internaliza en un endosoma y se dirige a la degradación lisosómica. Estudios han demostrado que el FcRn receptor de Fc $\gamma$  de tipo MHC de clase I es capaz de rescatar inmunoglobulinas de la degradación lisosómica devolviéndola mediante reciclaje a la superficie celular desde el endosoma de clasificación. Simister y Mostov (1989) *An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. Nature 337: 184-87*. Como se ha explicado anteriormente, para mejorar la eficiencia del reciclaje de anticuerpos, son beneficiosas modificaciones adicionales de las secuencias de anticuerpos, por ejemplo, modificaciones que dan como resultado la disminución de la unión a antígeno a pH ácido (por ejemplo, el pH del endosoma), al tiempo que conservan la afinidad y la especificidad anticuerpo-antígeno a pH neutro (por ejemplo, el pH fisiológico). Los animales no humanos que se describen en el presente documento, en los que se sustituyen residuos no de histidina por residuos de histidina en la secuencia de una cadena ligera universal, son beneficiosos porque son capaces de producir anticuerpos de alta afinidad basados en el formato de cadena ligera universal que también muestran unión dependiente del pH, por ejemplo, muestran una unión reducida al antígeno a un pH ácido frente al pH neutro.

Por tanto, en un aspecto, en el presente documento se describe un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) que comprende en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, un repertorio limitado de regiones variables de cadena ligera humanas o una única región variable de cadena ligera humana, de un repertorio limitado de segmentos génicos variables de cadena ligera humanos, en los que la región variable de cadena ligera humana o las regiones variables de cadena ligera humanas comprenden al menos una sustitución de un codón no de histidina por un codón de histidina. En algunos aspectos, a condición de que los animales no humanos se modifiquen genéticamente para incluir un único segmento génico no reordenado de región variable de cadena ligera humano (o dos segmentos génicos de región variable de cadena ligera humanos) que se reordena para formar un gen reordenado de región variable de cadena ligera humano (o dos genes reordenada de región variable de cadena ligera) que expresa una única cadena ligera (o que expresa una ambas de dos cadenas ligeras), en el que el gen o genes de región variable de cadena ligera comprenden una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. Los dominios variables reordenados de cadena ligera humanos codificadas por este gen o genes de región variable de cadena ligera sustituidos con histidina son capaces de emparejarse con una pluralidad de cadenas pesadas humanas maduras por afinidad seleccionadas por los animales, en los que las regiones variables de cadena pesada se unen específicamente a epítopos diferentes. En diversos aspectos, la al menos una sustitución de un residuo no de histidina con un residuo de histidina da como resultado una cadena ligera humana reordenada que, cuando se expresa con una cadena pesada afín, se une a su antígeno de una manera dependiente del pH.

Se describen animales modificados genéticamente que expresan un repertorio limitado de dominios variables de cadena ligera humanos o un único dominio variable de cadena ligera humano, de un repertorio limitado de secuencias génicas de región variable de cadena ligera humanas, en el que las secuencias génicas de región variable comprenden al menos una sustitución de un codón no de histidina con un codón de histidina. En algunos aspectos, los animales descritos se modifican genéticamente para incluir una única secuencia de cadena ligera humana V/J (o dos secuencias V/J) que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y expresa una región variable de una única cadena ligera (o que expresan una o ambas de dos regiones variables). En un aspecto, una cadena ligera que comprende la secuencia variable es capaz de

emparejarse con una pluralidad de cadenas pesadas humanas maduras por afinidad seleccionadas clonalmente por el animal, en la que las regiones variables de cadena pesada se unen específicamente a epítopos diferentes. En un aspecto, el anticuerpo se une a su antígeno o antígenos de una manera dependiente del pH. En un aspecto, la única secuencia de cadena ligera humana V/J se selecciona entre Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1. En un aspecto, las dos secuencias V/J son Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1. En un aspecto, las secuencias Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 son secuencias V/J reordenadas.

En un aspecto, se describe en el presente documento un animal no humano modificado genéticamente que comprende un único segmento génico V<sub>L</sub> de cadena ligera de inmunoglobulina humana que es capaz de reordenarse con un segmento génico J<sub>L</sub> humano (seleccionado entre uno o una pluralidad de segmentos J<sub>L</sub>) y que codifica un dominio variable humano de una cadena ligera de inmunoglobulina, en el que el único segmento génico V<sub>L</sub> de cadena ligera de inmunoglobulina humana y/o segmento génico J<sub>L</sub> humano comprenden una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En otro aspecto, en el presente documento se describe un ratón modificado genéticamente que comprende no más de dos segmentos génicos V<sub>L</sub> humanos, cada uno de los cuales es capaz de reordenarse con un segmento génico J<sub>L</sub> humano (seleccionado entre uno o una pluralidad de segmentos J<sub>L</sub>) y que codifica un dominio variable humano de una cadena ligera de inmunoglobulina, en el que cada uno de los no más de dos segmentos génicos V<sub>L</sub> y/o el segmento génico J<sub>L</sub> comprenden una sustitución de al menos un residuo no de histidina con un residuo de histidina.

En el presente documento también se describe un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, una única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende secuencias V<sub>L</sub> y J<sub>L</sub> humanas en el que la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana deriva de secuencias génicas V<sub>L</sub> y J<sub>L</sub> de línea germinal humana, excepto por la sustitución o sustituciones con histidina. En un aspecto, la cadena ligera de inmunoglobulina humana es una cadena κ de inmunoglobulina humana. Por tanto, en un aspecto, la secuencia génica V<sub>L</sub> humana se selecciona entre Vk1-39 y Vk3-20. En un aspecto, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende una secuencia reordenada Vk1-39/J o Vk3-20/J. En un aspecto, la secuencia génica J<sub>L</sub> humana se selecciona entre Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5. En un aspecto la secuencia J<sub>L</sub> humana se selecciona entre Jk1 y Jk5. En un aspecto, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana se selecciona entre Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 (por ejemplo, excepto por la sustitución o sustituciones con histidina). En un aspecto alternativo, la cadena ligera de inmunoglobulina humana es una cadena λ humana.

En un aspecto, la sustitución de al menos un codón no de histidina por un codón de histidina es en la secuencia de nucleótidos que codifica una región determinante de la complementariedad (CDR) del dominio variable de cadena ligera. En un aspecto, la sustitución de al menos un codón no de histidina por un codón de histidina es en la secuencia de nucleótidos que codifica CDR1, CDR2 o CDR3 del dominio variable de cadena ligera. En un aspecto específico, la sustitución es en la secuencia de nucleótidos que codifica CDR3.

En un aspecto, la sustitución es de al menos un codón no de histidina por un codón de histidina en el codón CDR3 de la secuencia génica de la región variable de la cadena ligera humana. En una realización, la sustitución es de uno, dos, tres, cuatro o más codones CDR3. En la realización en la que la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada es una región variable Vk1-39Jk5, el reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina comprende un reemplazo en una posición en la secuencia génica de la cadena ligera de inmunoglobulina que codifica CDR3 diseñada para expresar una histidina en la posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En una realización, la sustitución se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105 y 106. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105 y 111. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105 y 108. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 108 y 111. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 106 y 108. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 106 y 108. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 106 y 111. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 108 y 111. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 106, 108 y 111. En otra realización más, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 106, 108 y 111. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 106 y 111. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 106, 108 y 111. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de las regiones CDR3 sustituidas con histidina se muestran en la alineación de secuencias de la FIG. 2 y se expone en las SEQ ID NO: 4-33. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de CDR3 de tipo silvestre (representadas en la FIG. 2) se exponen en las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente.

En la realización en la que la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada es una región variable Vk3-20Jk1, el reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina comprende un reemplazo en una posición en la secuencia génica de la cadena ligera de inmunoglobulina que codifica la región CDR3 que se diseña para expresar una histidina en la posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una

combinación de las mismas. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105 y 106. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105 y 107. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105 y 109. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 106 y 107. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 106 y 109. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 107 y 109. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 106 y 107. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 107 y 109. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 106, 108 y 111. En una realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 106 y 109. En otra realización, el reemplazo se diseña para expresar histidinas en las posiciones 105, 106, 107 y 109. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de las regiones CDR3 sustituidas con histidina de ejemplo se representan en la alineación de secuencias de la FIG. 12 y se expone en las SEQ ID NO: 76-79. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de CDR3 de tipo silvestre (representadas en la FIG. 12) se exponen en las SEQ ID NO: 74 y 75, respectivamente.

Las posiciones de aminoácidos (105, 106, etc.) se basan en una numeración singular descrita en Lefranc et al. (2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77 y que también puede observarse en [www.imgt.org](http://www.imgt.org).

En un aspecto, el segmento génico  $V_L$  humano está unido operativamente a una secuencia líder humana o no humana. En un aspecto, la secuencia líder es una secuencia líder no humana. En un aspecto específico, la secuencia líder no humana es una secuencia líder Vk3-7 de ratón. En un aspecto específico, la secuencia líder está unido operativamente a un segmento génico  $V_L$  humano no reordenado. En un aspecto específico, la secuencia líder está unido operativamente a una secuencia  $V_L/J_L$  humana reordenada. Por tanto, en un aspecto específico, la única secuencia génica de región variable reordenada Vk1-39/Jk5 o Vk3-20/Jk1 que comprende al menos una sustitución con histidina está unida operativamente a una secuencia líder Vk3-7 de ratón.

En un aspecto, el segmento génico  $V_L$  está unido operativamente a una secuencia promotora de inmunoglobulina. En un aspecto, la secuencia promotora es una secuencia promotora humana. En un aspecto específico, el promotor de inmunoglobulina humana es un promotor Vk3-15 humano. En un aspecto específico, el promotor está unido operativamente a un segmento génico  $V_L$  humano no reordenado. En un aspecto específico, el promotor está unido operativamente a una secuencia  $V_L/J_L$  humana reordenada. Por tanto, en un aspecto específico, la única secuencia génica de región variable reordenada Vk1-39/Jk5 o Vk3-20/Jk1 que comprende al menos una sustitución con histidina está unida operativamente al promotor Vk3-15 humano.

En un aspecto, el locus de cadena ligera comprende una secuencia líder flanqueada en 5' (con respecto a la dirección transcripcional de un segmento génico  $V_L$ ) con un promotor de inmunoglobulina humana y flanqueada en 3' con un segmento génico  $V_L$  humano que se reorganiza con un segmento  $J_L$  humano y codifica un dominio variable de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante de cadena ligera no humana endógena ( $C_L$ ). En un aspecto específico, los segmentos génicos  $V_L$  y  $J_L$  son en el locus Vk no humano y la  $C_L$  no humana es una Ck no humana (por ejemplo, Ck de ratón. En un aspecto específico, la secuencia de región variable está unida operativamente a la secuencia de región constante no humana, por ejemplo, la secuencia génica Ck no humana.

En un aspecto, el locus de la cadena ligera comprende una secuencia líder flanqueada en 5' (con respecto a la dirección transcripcional de un segmento génico  $V_L$ ) con un promotor de inmunoglobulina humana y flanqueada en 3' con una secuencia de región variable humana reordenada (secuencia  $V_L/J_L$ ) y codifica un dominio variable de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante de cadena ligera no humana endógena ( $C_L$ ). En un aspecto específico, la secuencia  $V_L/J_L$  reordenada humana está en el locus kappa ( $\kappa$ ) no humano y la  $C_L$  no humana es una Ck no humana. En un aspecto específico, la secuencia de región variable humana reordenada está unida operativamente a la secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina no humana, por ejemplo, la secuencia génica Ck no humana. En un aspecto, la secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina no humana es una secuencia no humana endógena. En un aspecto, el animal no humano es un ratón y la secuencia génica Ck es una secuencia génica Ck de ratón. En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina está en el locus de cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, de ratón) no humano endógeno (locus  $\kappa$ ). Se presentan aspectos ejemplares del locus en las FIG. 8C, 8E, 14C y 14D.

En un aspecto, el animal no humano modificado genéticamente es un ratón y el locus de región variable del ratón es un locus de cadena ligera  $\kappa$ , y el locus de cadena ligera  $\kappa$  comprende un potenciador intrónico  $\kappa$  de ratón, un potenciador 3'  $\kappa$  de ratón o tanto un potenciador intrónico como un potenciador 3'.

En un aspecto, el animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, una rata o un ratón) comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina lambda ( $\lambda$ ) no funcional. En un aspecto específico, el locus de cadena ligera  $\lambda$  comprende una delección de una o más secuencias del locus, en el que las una o más delecciones vuelven al locus de cadena ligera  $\lambda$  incapaz de reordenación para formar un gen de cadena ligera. En otro aspecto, se suprimen todos o sustancialmente todos los segmentos génicos  $V_L$  del locus de cadena ligera  $\lambda$ . En un aspecto, el animal no humano

- (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) comprende una secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y carece de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina no reordenada funcional, por ejemplo, una región variable de cadena ligera no reordenada endógena. En un aspecto, la secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana sustituida con histidina, reordenada, reemplaza la secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina no reordenada endógena.
- En un aspecto, el animal hace una cadena ligera que comprende un dominio variable mutado somáticamente derivado de una secuencia de región variable humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, la cadena ligera comprende un dominio variable mutado somáticamente derivado de una secuencia de región variable humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y una región C<sub>k</sub> humana. En un aspecto, el animal no humano no expresa una cadena ligera λ .
- Un experto en la materia apreciará que, aunque la sustitución o sustituciones de al menos un residuo no de histidina con un residuo de histidina se modifica genéticamente en la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana, debido a hipermutaciones somáticas, no todos los anticuerpos que se generan en el animal no humano modificado genéticamente van a albergar ese residuo o residuos de histidina en la posición o posiciones modificadas mediante ingeniería genética. Sin embargo, la generación de un amplio repertorio de anticuerpos en el animal no humano permitirá seleccionar anticuerpos específicos de antígeno generados *in vivo* que muestren alta afinidad por un antígeno de interés que conserven al mismo tiempo las modificaciones con histidina introducidas en la línea germinal y, preferentemente, presenten unión a antígeno dependiente del pH.
- Por tanto, en un aspecto, el animal conserva al menos un aminoácido histidina introducido por sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina en su gen de región variable. En un aspecto, el animal conserva todas o sustancialmente todas las sustituciones con histidina en su dominio variable de cadena ligera mutada somáticamente que se introdujeron en su gen de región variable.
- En un aspecto, el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento también comprende en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina no reordenada que comprende secuencias de segmento génico V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub>. En un aspecto, las secuencias de segmento génico V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> son secuencias de segmento génico V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanas y la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina no reordenada es una región variable de cadena pesada humana. En un aspecto, las secuencias de segmento génico V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanas están unidas operativamente a la secuencia de región constante de cadena pesada no humana. En un aspecto, la secuencia de región constante de cadena pesada no humana es una secuencia de región constante de cadena pesada no humana endógena. En un aspecto, las secuencias de segmento génico de cadena pesada humanas están en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina no humana endógeno. En un aspecto, la secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana comprendida en un animal no humano también comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina por un codón de histidina.
- En un aspecto, el animal no humano que se describe en el presente documento expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región constante de cadena ligera no humana. En un aspecto, el animal no humano expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región constante de cadena ligera humana.
- En un aspecto, el animal no humano que se describe en el presente documento expresa una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una secuencia no humana seleccionado entre una secuencia C<sub>H1</sub>, una secuencia bisagra, una secuencia C<sub>H2</sub>, una secuencia C<sub>H3</sub> y una combinación de las mismas.
- En un aspecto, el animal no humano expresa una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una secuencia humana seleccionada entre una secuencia C<sub>H1</sub>, una secuencia bisagra, una secuencia C<sub>H2</sub>, una secuencia C<sub>H3</sub> y una combinación de las mismas.
- En el aspecto en el que el animal comprende una única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, la secuencia reordenada de cadena ligera de inmunoglobulina en la línea germinal del animal está en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina no humano endógeno. En un aspecto específico, la secuencia reordenada de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina en la línea germinal del animal reemplaza todas o sustancialmente todas las secuencias de segmento V y J de cadena ligera no humanas endógenas en el locus de cadena ligera de inmunoglobulina no humano endógeno.
- En un aspecto, el animal no humano comprende un reemplazo de segmentos génicos V<sub>H</sub> endógenos con uno o más segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos, en el que los segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos están unidos operativamente a un gen de la región C<sub>H</sub> no humana, de manera que el animal no humano reordena los segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos

y expresa una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio V<sub>H</sub> humano y una C<sub>H</sub> no humana. En un aspecto, el 90-100 % de los segmentos génicos V<sub>H</sub> no humanos no reordenados se reemplazan con al menos un segmento génico V<sub>H</sub> humano no reordenado. En un aspecto específico, todos o sustancialmente todos (por ejemplo, el 90-100 %) los segmentos génicos V<sub>H</sub> no humanos endógenos se reemplazan con al menos un segmento génico V<sub>H</sub> humano no reordenado. En un aspecto, el reemplazo es con al menos 19, al menos 39 o al menos 80 o 81 segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos no reordenados. En un aspecto, el reemplazo es con al menos 12 segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos no reordenados funcionales. En un aspecto, el animal no humano comprende un reemplazo de todos los segmentos D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> no humanos con al menos un segmento D<sub>H</sub> humano no reordenado y al menos un segmento J<sub>H</sub> humano no ordenado. En un aspecto, el animal no humano comprende un reemplazo de todos los segmentos D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> no humanos con todos los segmentos D<sub>H</sub> humanos no reordenados y todos los segmentos J<sub>H</sub> humanos no reordenados.

Un animal no humano, por ejemplo un ratón, que comprende en su genoma, por ejemplo en su línea germinal, un repertorio limitado de regiones variables de cadena ligera de inmunoglobulina humana, por ejemplo, una única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada (por ejemplo, Vκ1-39/Jκ5 o Vκ3-20/Jκ1), con una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y un repertorio diverso de segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos no reordenados es capaz de generar proteínas de unión a antígeno codificadas por secuencias de región variable de cadena pesada derivadas de diversas permutaciones de los segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos no reordenados, en las que los segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> presentes en las secuencias variables de cadena pesada derivan de todos o sustancialmente todos los segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos funcionales presentes en el genoma del animal. Se describen diversas posibilidades disponibles para secuencias de dominio variable de cadena pesada expresadas en las células, por ejemplo, células B, de los animales modificados genéticamente que se describen en el presente documento (es decir, derivados de combinaciones de diversos segmentos V, D y J humanos funcionales) en las Publicaciones de Solicitud de los EE.UU. N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 y 2013/0045492. En diversos aspectos, la secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende la sustitución o sustituciones de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y la secuencia no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana están comprendidas en la línea germinal del animal no humano.

En un aspecto, el animal no humano comprende una copia de uno o ambas de la secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende la sustitución o sustituciones de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y la secuencia no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, el animal no humano comprende dos copias de uno o ambas de la secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende la sustitución o sustituciones de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y la secuencia no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Por tanto, el animal no humano puede ser homocigoto o heterocigoto para una o ambas la secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende la sustitución o sustituciones de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y la secuencia no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana.

Además de animales no humanos modificados genéticamente que comprenden en su genoma una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, una única secuencia reordenada génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina) que comprende la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina (por ejemplo, en CDR3 de la cadena ligera), en el presente documento también se describen animales no humanos modificados genéticamente que comprenden una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina con una o más adiciones/inserciones de codón o codones de histidina, de manera que el dominio variable expresado comprende un aminoácido o aminoácidos adicionales que, si no se somete a hipermutación somática, es una histidina.

El animal no humano modificado genéticamente que comprende una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana con una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina que se describe en el presente documento puede seleccionarse entre un grupo que consiste en un ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primate (por ejemplo, tití, macaco de la India). Para los animales no humanos, en los que células ES genéticamente modificables adecuadas no están fácilmente disponibles, se emplean métodos distintos de los que se describen en el presente documento para producir un animal no humano que comprenda la modificación genética. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, la modificación de un genoma de células no ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y el empleo de transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un oocito, y la gestación de la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

En un aspecto, el animal no humano es un mamífero. En un aspecto, el animal no humano es un mamífero pequeño, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. En un aspecto, el animal modificado genéticamente es un roedor. En un aspecto, el roedor se selecciona entre un ratón, una rata y un hámster. En una realización, el roedor se selecciona entre la superfamilia Muroidea. En un aspecto, el animal modificado genéticamente es de una familia

seleccionada entre Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas del Nuevo Mundo y ratones, ratones de campo), Muridae (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de roca, ratas con cola, ratas de Madagascar y ratones), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirones espinosos) y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas de bambú y zokors). En una realización específica, el roedor modificado genéticamente se selecciona entre un ratón o una rata verdaderos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso y una rata crestada. En una realización, el ratón modificado genéticamente es de un miembro de la familia Muridae. En un aspecto, el animal es un roedor. En una realización específica, el roedor se selecciona entre un ratón y una rata. En una realización, el animal no humano es un ratón.

En una realización específica, el roedor es un ratón de una cepa de C57BL seleccionada entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En otra realización, el ratón es una cepa de 129 seleccionada entre el grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing et al (1999) *Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome* 10: 836, véase también, Auerbach et al (2000) *Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines*). En una realización específica, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa de 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de cepas de 129 mencionadas anteriormente o una mezcla de cepas de BL/6 mencionadas anteriormente. En una realización específica, la cepa de 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización, el ratón es una cepa de BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa de BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

En una realización, el roedor es una rata. En una realización, la rata se selecciona entre una rata Wistar, una cepa de LEA, una cepa de Sprague Dawley, una cepa de Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. En una realización, la cepa de rata es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas entre el grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

Por tanto, en un aspecto, el animal no humano modificado genéticamente es un roedor. En un aspecto, el animal no humano modificado genéticamente es una rata o un ratón. En un aspecto, el animal es un ratón. Por tanto, en un aspecto, en el presente documento se describe un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, una única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada que comprende secuencias génicas V<sub>L</sub> y J<sub>L</sub> humanas, en el que la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada comprende al menos una sustitución de codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, el ratón carece de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina no reordenada funcional (por ejemplo, carece de secuencias de segmentos génicos V y J no reordenados funcionales). En un aspecto, la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada con sustitución o sustituciones con codón de histidina es la región variable Vk1-39/Jk o Vk3-20/Jk. En un aspecto la secuencia de segmento J se selecciona entre Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5. En un aspecto, la secuencia de segmento J es Jk1 o Jk5. En una realización, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina es en la secuencia de nucleótidos que codifica una región CDR3. En una realización, en la que la secuencia de región variable reordenada es la secuencia Vk1-39/Jk5, la sustitución o sustituciones con histidina se diseñan para que se expresen en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En otra realización, en la que la secuencia de región variable reordenada es la secuencia Vk3-20/Jk1, la sustitución o sustituciones con histidina se diseñan para que se expresen en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas. En una realización, la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada con codón o codones de histidina sustituidos está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de inmunoglobulina de ratón endógena (por ejemplo, la secuencia del gen C<sub>k</sub>). En un aspecto, el ratón comprende adicionalmente en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, una región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina no reordenada que comprende segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos. En un aspecto, los segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos están unidos operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógena. En diversos aspectos, la secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la sustitución o sustituciones de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y la secuencia no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana están comprendidas en la línea germinal del ratón.

En el presente documento también se describen vectores de dirección para la generación de animales no humanos modificados genéticamente, por ejemplo, ratones, que se describen en el presente documento. En un aspecto, se describe un vector de dirección que comprende, de 5' a 3' en la dirección transcripcional con referencia a las secuencias de los brazos de homología de ratón 5' y 3' del vector, un brazo de homología de ratón 5', un promotor de inmunoglobulina humano o de ratón, una secuencia líder humano o de ratón, una región variable humana seleccionada entre un Vk1-39Jk5 humano reordenado o un Vk3-20Jk1 humano reordenado y que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y un brazo de homología 3' de ratón. En un aspecto, los brazos de homología 5' y 3' dirigen el vector a una secuencia 5' con respecto a una secuencia potenciadora que está presente en 5' y próxima al gen C<sub>k</sub> de ratón. En otro aspecto, el vector de dirección

comprende un brazo de homología de ratón 5' seguido de un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación, promotor de inmunoglobulina humano o de ratón, secuencia líder humana o de ratón, una región variable humana seleccionada entre un Vk1-39Jk5 humano reordenado o un Vk3-20Jk1 humano reordenado y que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, seguido del brazo de homología de ratón 3' que comprende potenciadores de ratón y una región constante secuencias (Ck).

Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción de dirección para facilitar la selección de células (por ejemplo, células ES) que han integrado la construcción de interés. Se conoce en la técnica una serie de casetes de selección adecuados. Por lo general, un casete de selección permite la selección positiva en presencia de un antibiótico en particular (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, Spec, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, lo que permite la delección del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasas. Son sitios de recombinación habitualmente utilizados *loxP* y *Frt*, reconocidos por enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica.

En un aspecto, el promotor es un promotor de segmento génico de región variable de inmunoglobulina humana. En un aspecto específico, el promotor es un promotor Vk3-15 humano. En un aspecto, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón. En un aspecto específico, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder Vk3-7 de ratón. Se presentan aspectos de ejemplo de los vectores de dirección en las FIG. 8B y 14B.

En un aspecto, un vector de dirección es como se ha descrito anteriormente, pero en lugar del brazo de homología de ratón 5' el promotor humano o de ratón está flanqueado en 5' con un sitio de reconocimiento de recombinasa específico de sitio (SRRS, del inglés *site-specific recombinase recognition site*) y en lugar del brazo de homología 3' la región V<sub>L</sub> humana está flanqueada en 3' con un SRRS.

En el presente documento también se describen métodos para producir animales no humanos modificados genéticamente (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas) que se describen en el presente documento. En un aspecto, el método para producir un animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento utiliza un vector de dirección, hecho usando tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en células ES e introduciendo clones de células ES dirigidos en un embrión de ratón usando tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos. Pueden introducirse modificaciones con histidina en el vector de dirección usando una diversidad de técnicas de biología molecular, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o síntesis de ADN de novo. Tras la finalización de la dirección de gens, se exploran células ES de animales no humanos modificados genéticamente para confirmar la incorporación satisfactoria de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión de polipéptido exógeno. Son conocidas numerosas técnicas por los expertos en la materia, e incluyen (pero no se limitan a) transferencia Southern, PCR larga, PCT cuantitativa (por ejemplo, PCR en tiempo real usando TAQMAN®), hibridación *in situ* por fluorescencia, transferencia Northern, citometría de flujo, análisis Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, pueden identificarse animales no humanos (por ejemplo, ratones) que llevan la modificación genética de interés mediante la detección de la pérdida del alelo de ratón y/o la ganancia de alelo humano usando una modificación del ensayo de alelo descrita en Valenzuela et al. (2003) *High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech.* 21 (6): 652-659. Otros ensayos que identifican una secuencia específica de nucleótidos o de aminoácidos en los animales modificados genéticamente son conocidos por los expertos en la materia.

Por tanto, en un aspecto, el método de generación de animales no humanos modificados genéticamente comprende reemplazar una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina en el animal con una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (que comprende segmentos génicos V<sub>L</sub> y J<sub>L</sub> humanos) en el que la secuencia génica de región variable de inmunoglobulina humana comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina es en la secuencia de nucleótidos que codifica una región CDR, por ejemplo, una región CDR3.

En un aspecto, el método de generación de animales no humanos modificados genéticamente que se describe en el presente documento comprende reemplazar una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina en el animal con una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende secuencias de segmentos V<sub>L</sub> y J<sub>L</sub> humanos, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de inmunoglobulina humana comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, la sustitución es de uno, dos, tres, cuatro o más codones CDR3. En un aspecto, la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana se basa en la secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de línea germinal humana seleccionada entre Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1. Por tanto, en una realización, en la que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana deriva de Vk1-39Jk5, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina se diseña para expresar una histidina en las posiciones seleccionadas entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas. En una realización, en la que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina deriva de Vk3-20k1, el reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina se diseña para expresar una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una

combinación de las mismas.

En otro aspecto, el método de generación de un animal no humano que se describe en el presente documento (es decir, que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina modificado genéticamente que se describe en el presente documento) comprende modificar un genoma de un animal no humano para suprimir o volver no funcionales segmentos V y J de cadena ligera de inmunoglobulina endógena en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina y ubicar en el genoma una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, el método da como resultado o sustituciones de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina. En un aspecto, el método da como resultado un animal no humano modificado genéticamente que comprende una población de células B enriquecida para anticuerpos que presentan unión dependiente del pH a un antígeno de interés.

En algunos aspectos, los métodos de generación de animales no humanos modificado genéticamente que se describen en el presente documento comprenden reemplazar una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina con una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende la sustitución o sustituciones de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina en el animal, que también comprende reemplazar una secuencia génica de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina no humana endógena con una secuencia génica de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que comprende al menos uno de cada una o un repertorio de secuencias  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanas como se ha descrito anteriormente. En un aspecto, con el fin de generar un animal no humano que comprende un reemplazo de secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena con una secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y un reemplazo de secuencia génica de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina no humana endógena con una secuencia génica de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana, el animal con el reemplazo de la secuencia génica de región variable de cadena ligera se reproduce a un animal con reemplazo de secuencia génica de región variable de cadena pesada.

Los inventores describen en el presente documento animales no humanos modificados mediante ingeniería genética (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratas o ratones) que expresan proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, que comprenden una cadena ligera universal, por ejemplo, una cadena ligera universal humana (por ejemplo, una cadena ligera derivada de una única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada) que comprende una o más modificaciones con histidina, en los que las proteínas de unión a antígeno presentan una unión a antígeno dependiente del pH de un antígeno diana. Los animales se modifican mediante ingeniería genética para incluir una CDR3 de cadena ligera que comprende una o más modificaciones con histidina. En diversos aspectos, la CDR3 de cadena ligera comprende dos, tres o cuatro o más residuos de histidina en una agrupación.

En un aspecto, en el presente documento se describe un animal no humano modificado mediante ingeniería genética (por ejemplo, un ratón o una rata) que comprende una población de células B caracterizada por una presencia potenciada de histidinas en cadenas ligeras de inmunoglobulina, por ejemplo, dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, CDR de inmunoglobulina, en comparación con un animal de tipo silvestre. En un aspecto, la potenciación de la presencia de histidina es de aproximadamente 2 a 4 veces. En un aspecto, la potenciación de histidinas es de aproximadamente 2 a 10 veces.

En un aspecto, en el presente documento se describe un animal no humano modificado mediante ingeniería genética que comprende una población de anticuerpos específicos de antígeno que expresan un residuo o residuos de histidina como resultado de modificaciones de codones en la secuencia génica de región variable de cadena ligera y muestra unión dependiente del pH al antígeno diana. En un aspecto, estos animales comprenden una población de células B que están enriquecidas para anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos específicos de antígeno, que muestran propiedades de unión dependientes del pH (por ejemplo, disminución de la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ), a pH ácido frente a pH neutro) en comparación con una población de anticuerpos específicos de antígeno generados en animales que no comprenden una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina en la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que se describe en el presente documento. En un aspecto, el enriquecimiento de anticuerpos específicos de antígeno que presentan propiedades de unión a antígeno dependiente del pH generadas en los animales modificado mediante ingeniería genética que se describen en el presente documento en comparación con animales similares que sí comprenden sustituciones con histidina en la región variable de cadena ligera es superior a aproximadamente 2 veces, por ejemplo, superior a aproximadamente 5 veces, por ejemplo, superior a aproximadamente 10 veces. Por tanto, los animales modificados genéticamente que se describen en el presente documento están enriquecidos en anticuerpos con propiedades de reciclaje de anticuerpos mejoradas, lo que se desea con el fin de reducir el aclaramiento mediado por diana, así como para reducir la frecuencia de dosis y/o dosificación de una proteína de unión a antígeno terapéutica desarrollada basándose en dicho formato de anticuerpo generado *in vivo*.

Por tanto, en el presente documento se describe una proteína de unión a antígeno, generada en animales no humanos modificados genéticamente que se describen en el presente documento, en la que la proteína de unión a antígeno muestra unión a antígeno dependiente del pH. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno es un

anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo específico de antígeno. En un aspecto, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera humano derivado de un reordenamiento de segmentos génicos variables de cadena ligera de inmunoglobulina humana en el que al menos un codón no de histidina se sustituyó por un codón de histidina en la secuencia del gen de la línea germinal y en el que el anticuerpo conserva al menos una sustitución con histidina en su dominio variable de cadena ligera humano expresado. En un aspecto, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera humano derivado de una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana, en el que la secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera solo comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y en el que el anticuerpo conserva al menos una sustitución con histidina en su dominio variable de cadena ligera expresado. En un aspecto, el anticuerpo comprende una cadena ligera derivada de un reordenamiento Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1 humano, en el que la secuencia génica Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1 humana comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y en el que el anticuerpo conserva al menos una sustitución con histidina en su dominio variable de cadena ligera expresado. En algunos aspectos, el anticuerpo conserva todas o sustancialmente todas las sustituciones con histidina en su dominio variable de cadena ligera expresado. En un aspecto, la sustitución es de tres codones no de histidina con tres codones de histidina en la secuencia de nucleótidos que codifica CDR3 de la secuencia génica de región variable de cadena ligera y el anticuerpo conserva las tres sustituciones con histidina en su dominio variable de cadena ligera expresado. En un aspecto, la sustitución es de cuatro codones no de histidina con cuatro codones de histidina en la secuencia de nucleótidos que codifica CDR3 de la secuencia génica de región variable de cadena ligera y el anticuerpo conserva tres o cuatro sustituciones con histidina en su dominio variable de cadena ligera expresado.

En un aspecto, la cadena ligera del anticuerpo comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena ligera no humana, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena ligera endógena. Además, el anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo específico de antígeno, generado en un animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento también comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada humano derivado de un reordenamiento de segmentos V, D y J de cadena pesada humanos. Pueden seleccionarse segmentos V, D y J de cadena pesada humanos entre un repertorio de segmentos de cadena pesada humana presentes en el locus de cadena pesada no humano endógeno, por ejemplo, al menos un segmento V funcional, al menos un segmento D funcional y al menos un segmento J funcional, por ejemplo, hasta un repertorio completo de segmentos V, D y J humanos funcionales. Pueden obtenerse posibles reordenamientos de ejemplo de segmentos variables de cadena pesada humanos de un listado de segmentos V, D y J humanos funcionales en la base de datos IMGT y de las Publicaciones de Solicitud de los EE.UU. N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192309 y 2013/0045492. Además, en un aspecto, la cadena pesada del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada no humana, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada no humana endógena. En un aspecto, la región constante de cadena pesada no humana endógena comprende dominios C<sub>H</sub>1, bisagra, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. En un aspecto, el anticuerpo es un isotipo IgG, IgE, IgD, IgM o IgA.

Por tanto, en un aspecto, en el presente documento se describe una proteína de unión generada en los animales no humanos modificados genéticamente que se describen en el presente documento, en la que la proteína de unión comprende una cadena ligera quimérica inversa que comprende (a) un dominio variable de cadena ligera derivado de un reordenamiento Vk1-39Jk5 humano que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, en el que la cadena ligera conserva al menos una sustitución con histidina en su dominio variable de cadena ligera expresado y (b) una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena ligera no humana, por ejemplo, de ratón, en la que la cadena ligera está asociada a una cadena pesada quimérica inverso que comprende (a) un dominio variable de cadena pesada derivado de un reordenamiento de segmentos V, D y J humano, en el que los segmentos V, D y J se seleccionan entre un repertorio de segmentos V, D y J humanos presentes en el animal y (b) una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada no humana, por ejemplo, de ratón. En un aspecto, el repertorio de segmentos V, D y J humanos comprende al menos un segmento V funcional, al menos un segmento D funcional y al menos un segmento J funcional, por ejemplo, hasta un repertorio completo de segmentos V, D y J humanos funcionales. En un aspecto, la cadena pesada y los dominios constantes de cadena ligera son regiones constantes de cadena pesada y ligera endógenas. En un aspecto, los dominios variables de cadena pesada y ligera son dominios mutados somáticamente. En un aspecto, el dominio de cadena ligera mutado somáticamente conserva al menos una sustitución con histidina introducida en la secuencia de la línea germinal. En algunos aspectos, el dominio de cadena ligera mutado somáticamente conserva todas o sustancialmente todas las sustituciones con histidina introducidas en la secuencia de la línea germinal. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno muestra propiedades de unión a antígeno dependientes del pH.

En otro aspecto, en el presente documento se describe una proteína de unión generada en los animales no humanos modificados genéticamente que se describen en el presente documento, en los que la proteína de unión comprende una cadena ligera quimérica inversa que comprende (a) un dominio variable de cadena ligera derivado de un reordenamiento Vk3-20Jk1 humano que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, en el que la cadena ligera conserva al menos una sustitución con histidina en su dominio variable de cadena ligera expresado y (b) una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena ligera no humana, por ejemplo, de ratón, en la que la cadena ligera se asociada a una cadena pesada quimérica inversa que

comprende (a) un dominio variable de cadena pesada derivado de un reordenamiento de segmentos V, D y J humanos, en el que los segmentos V, D y J se seleccionan entre un repertorio de segmentos V, D y J humanos presentes en el animal y (b) una secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada no humana, por ejemplo, de ratón. En un aspecto, el repertorio de segmentos V, D y J humanos comprende al menos un segmento V funcional, al menos un segmento D funcional y al menos un segmento J funcional, por ejemplo, hasta un repertorio completo de segmentos V, D y J humanos funcionales. En un aspecto, las regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera son regiones constantes de cadena pesada y ligera endógenas. En un aspecto, los dominios variables de cadena pesada y ligera son dominios mutados somáticamente. En un aspecto, el dominio de cadena ligera mutado somáticamente conserva al menos una sustitución con histidina introducida en la secuencia de la línea germinal. En algunos aspectos, el dominio de cadena ligera mutado somáticamente conserva todas o sustancialmente todas las sustituciones con histidina introducidas en la secuencia de la línea germinal. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno muestra propiedades de unión a antígeno dependientes del pH.

En un aspecto, en el presente documento también se describe una célula B del animal transgénico que se describe en el presente documento, que comprende en su línea germinal una secuencia de región variable de cadena ligera humana modificada con histidina, por ejemplo, una única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera humana modificada con histidina, que se describe en el presente documento y expresa una proteína de unión a antígeno que se describe en el presente documento. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, expresado en la célula B conserva al menos un residuo de histidina introducido en la línea germinal y muestra propiedades de unión a antígeno dependientes del pH. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, expresada en la célula B conserva todos o sustancialmente todos los residuos de histidina introducidos en la línea germinal y muestra propiedades de unión a antígeno dependientes del pH.

En diversos aspectos, el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento comprende una secuencia génica de región variable de cadena ligera humana, por ejemplo, una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana (por ejemplo, la secuencia Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1) que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina (o una adición de un codón de histidina en la secuencia de la línea germinal). Estas adiciones o sustituciones dan como resultado un animal no humano que comprende una población de células B enriquecidas para proteínas de unión a antígenos con propiedades de unión dependientes de pH para sus antígenos. En un aspecto, las proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, generados en los animales no humanos que se describen en el presente documento en respuesta a la estimulación por antígeno muestra una unión a antígeno dependiente del pH mientras que presentan una alta afinidad por el antígeno a pH neutro, por ejemplo, a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0, por ejemplo, un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,4, por ejemplo, de entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,4, por ejemplo, un pH fisiológico. En un aspecto, la afinidad de la proteína de unión a antígeno por su antígeno, expresada como una constante de disociación ( $K_D$ ) a un pH neutro es inferior a  $10^{-6}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-8}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-9}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-10}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-11}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-12}$  M.

En un aspecto, una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, generada en el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento, muestra una unión reducida a su antígeno en pH ácido (por ejemplo, a un pH de 6,0 o inferior, por ejemplo, un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, un pH de entre aproximadamente 5,75 y aproximadamente 6,0, por ejemplo, un pH de compartimentos endosómicos o lisosómicos) en comparación con un pH neutro. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, el anticuerpo, generada en el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento, no presenta ninguna unión a antígeno en pH ácido, mientras que conserva la unión al antígeno a pH neutro. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno generada por el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento, tiene una disminución en la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) a un pH ácido, en comparación con la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) de la proteína de unión a antígeno a un pH neutro de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces o al menos aproximadamente 30 veces. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno expresada por el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 37 °C de aproximadamente 2 min o menos. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno expresada por el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 37 °C de menos de aproximadamente 1 min. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno expresada por el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 25 °C de aproximadamente 2 min o menos. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno expresada por el animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 25 °C de menos de aproximadamente 1 min.

Los parámetros cinéticos, tales como las constantes de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) y semividas disociativas ( $t_{1/2}$ ), pueden calcularse a partir de la velocidad cinética constante como:  $K_D$  (M) =  $k_d/k_a$ ; y  $t_{1/2}$  (min) =  $\ln 2/(60 \cdot kd)$ .

En un aspecto, la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, generada en los animales no humanos

modificados genéticamente que se describen en el presente documento, presenta una unión aumentada a la molécula de FcRn. Como se ha descrito anteriormente, FcRn es un receptor presente en el interior del compartimiento endosómico que es capaz de unirse a inmunoglobulinas a un pH ácido y reciclarlas de nuevo a la superficie. La detección de moléculas de anticuerpo en los animales no humanos modificados genéticamente que se describen en el presente documento presenta una oportunidad única para seleccionar anticuerpos con tres parámetros beneficiosos: alta afinidad por un antígeno, unión a antígeno dependiente del pH (con una unión a antígeno más débil a pH ácido) y una unión aumentada a FcRn.

En un aspecto, un animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento comprende una población de células B en respuesta a un antígeno que produce y se enriquece en proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, que, cuando se reformatean en productos terapéuticos, presentan una semivida aumentada en suero tras la administración de una dosis terapéutica a un sujeto sobre una población de células B equivalente producida en respuesta al mismo antígeno en los animales no humanos que no comprenden una modificación o modificaciones con histidina en sus secuencias génicas de región variable de cadena ligera humanas. Por tanto, en un aspecto, una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, producido en respuesta a un antígeno de interés en un animal no humano modificado genéticamente que se describe en el presente documento, cuando se reformatea en productos terapéuticos, presenta una semivida en suero aumentada tras la administración de una dosis terapéutica a un sujeto durante una semivida en suero de una proteína de unión a antígeno (cuando reformatear en un producto terapéutico y se administra a la misma dosis terapéutica) con respecto a la que se produjo en respuesta al mismo antígeno en un animal no humano que no comprendía ninguna modificación o modificaciones con histidina en su secuencia génica de región variable de cadena ligera humana. En algunos aspectos, el aumento de la semivida en suero es de aproximadamente 2 veces, por ejemplo, aproximadamente 5 veces, por ejemplo, aproximadamente 10 veces, por ejemplo, aproximadamente 15 veces, por ejemplo, aproximadamente 20 veces o superior.

En un aspecto, se describe en el presente documento una célula pluripotentes, pluripotente inducidas o totipotente derivada de un no humano como se describe en el presente documento. En un aspecto específico, la célula es una célula madre embrionaria (ES, del inglés *embryonic stem*).

En un aspecto, se proporciona un tejido derivado de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un aspecto, el tejido deriva de bazo, ganglios linfáticos o médula ósea de un animal no humano como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se describe en el presente documento un núcleo derivado de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un aspecto, el núcleo es de una célula diploide que no es una célula B.

En un aspecto, en el presente documento se describe una célula no humana que se aísla de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento. En un aspecto, la célula es una célula ES. En una realización, la célula es un linfocito. En un aspecto, el linfocito es una célula B. En un aspecto, la célula B expresa una cadena pesada quimérica que comprende un dominio variable derivado de un segmento génico humano; y una cadena ligera derivada de una secuencia Vk1-39/J humana reordenada con una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, una secuencia Vk3-20/J humana reordenada con una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina o una combinación de las mismas y que comprende adicionalmente una sustitución de al menos un aminoácido codificado en la línea germinal para una histidina; en la que el dominio variable de cadena pesada se fusiona con una región constante de cadena pesada humana o no humana y el dominio variable de cadena ligera se fusiona con una región constante de cadena ligera humana o no humana.

En un aspecto, en el presente documento se describe un hibridoma, en el que el hibridoma se hace con una célula B de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un aspecto específico, la célula B es de un ratón como se describe en el presente documento que se ha inmunizado con un inmunógeno que comprende un epítipo de interés, y la célula B expresa una proteína de unión que se une al epítipo de interés, la proteína de unión tiene un dominio variable de cadena pesada humano mutado somáticamente y una C<sub>H</sub> de ratón, y tiene un dominio de cadena ligera variable humano derivado de un Vk1-39Jk5 humano reordenado con una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina o un Vk3-20Jk1 humano reordenado con una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y un C<sub>L</sub> de ratón, en el que el dominio de cadena ligera humana comprende una sustitución de al menos un aminoácido codificado en la línea germinal con una histidina.

En el presente documento también se describe una célula que expresa una proteína de unión a antígeno generada en los animales no humanos que se describen en el presente documento. En un aspecto, la célula se selecciona entre CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6<sup>TM</sup>).

En un aspecto, en el presente documento se describe un embrión no humano, en el que el embrión comprende una célula ES de donante que deriva de un animal no humano como se describe en el presente documento.

Los animales no humanos que se describen en el presente documento son útiles para generar células B que expresan anticuerpos que tienen histidinas en una CDR3. Un animal que ubica histidinas en una CDR3 es útil para producir anticuerpos en general, y, en particular, es útil para desarrollar anticuerpos que se unen a una diana con afinidad suficiente a, o alrededor de, un pH neutro, pero que o bien no se unen o se unen más débilmente a la misma diana a un pH ácido.

El animal no humano es útil para generar regiones variables de anticuerpos que pueden usarse para hacer, por ejemplo, proteínas de unión terapéuticas humanas que se unen a sus objetivos por dominios de inmunoglobulina variable humana que comprenden las histidinas en una CDR3. La unión alterada a un pH inferior en algunas circunstancias permitirá una renovación más rápida debido a que el agente terapéutico se unirá a una diana en la superficie de una célula, se internalizará en un endosoma y se disociará más fácilmente o más rápidamente de la diana en el endosoma, de modo que el agente terapéutico pueda reciclarse para unirse a otra molécula diana más (por ejemplo, sobre otra célula o la misma celda). En algunas circunstancias, esto dará como resultado la capacidad de dosificar el agente terapéutico a una dosis inferior o dosificar el agente terapéutico con menos frecuencia. Esto es particularmente útil cuando no es deseable dosificar con frecuencia o administrar por encima de una cierta dosis, por razones de seguridad o de toxicidad. Como resultado, la semivida sérica del anticuerpo terapéutico aumentará cuando se administre a un sujeto.

El animal no humano, por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata, es útil en un método para aumentar el número de células B en un animal que presenta una región variable de anticuerpo que tiene una CDR3 con una o más histidinas en el mismo. El animal no humano es útil para generar secuencias de anticuerpos que presentarán unión a antígeno dependiente del pH. El animal no humano es útil para generar un mayor número de secuencias de anticuerpos, como resultado de una única inmunización, en las que los anticuerpos presentarán unión a antígeno dependiente del pH.

#### **Proteínas de unión a antígeno y métodos para generar las mismas**

En un aspecto, en el presente documento también se describen métodos para generar proteínas de unión a antígenos humanas, por ejemplo, anticuerpos, que presentan unión a antígeno dependiente del pH, a partir de los animales no humanos modificados genéticamente que se describen en el presente documento con métodos convencionales utilizados en la técnica.

Se han descrito varias técnicas para la producción de anticuerpos. Por ejemplo, en varios aspectos se producen anticuerpos quiméricos en ratones como se describen en el presente documento. Pueden aislarse anticuerpos directamente a partir de células B de un ratón inmunizado (por ejemplo, véase el documento US 2007/0280945A1) y/o las células B del ratón inmunizado pueden usarse para producir hibridomas (Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256: 495-497). El ADN que codifica los anticuerpos (cadenas pesadas y/o ligeras humanas) de animales no humanos como se describen en el presente documento se aísla fácilmente y se secuencia usando técnicas convencionales. El hibridoma y/o las células B derivadas de animales no humanos como se describen en el presente documento sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ubicarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias no humanas. De este modo, una vez que se determinan secuencias de ácidos nucleicos de anticuerpos con las características deseadas, por ejemplo, afinidad, epítipo, unión a antígeno dependiente del pH, etc., y las secuencias génicas de región constante no humanas se reemplazan con una secuencia de región constante humana deseada para generar un anticuerpo completamente humano que contiene un isotipo no IgM, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Por tanto, en un aspecto, en el presente documento se describe un método de generación de un anticuerpo que presenta propiedades de unión a antígeno dependiente del pH que comprenden generar un animal no humano (por ejemplo, un ratón) como se describe en el presente documento, inmunizar un ratón con un antígeno de interés, permitir que un animal no humano monte una respuesta inmunitaria al antígeno y seleccionar en el animal no humano un anticuerpo específico de antígeno que presente propiedades de unión a antígeno dependiente del pH, por ejemplo, la unión más débil al antígeno a un pH ácido que a uno neutro.

En el presente documento también se describen métodos de producción de proteínas de unión a antígeno multi-específicas, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas. Estas son moléculas capaces de unirse a más de un epítipo con alta afinidad. Las ventajas de la invención incluyen la capacidad de seleccionar adecuadamente cadenas de inmunoglobulina de cadena pesada de alta unión (por ejemplo, afinidad madurada) cada una de las cuales se asociará a una única cadena ligera. Además, las ventajas de la invención incluyen la capacidad de generar una proteína de unión a antígeno multi-específica, por ejemplo, biespecífica, que presenta unión a antígeno dependiente del pH.

Debido a la naturaleza dual de los anticuerpos biespecíficos (es decir, pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido

diana, véase, por ejemplo, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147: 60-69; Kufer et al, 2004, *Trends Biotechnol* 22: 238-244), ofrecen muchas ventajas útiles para la aplicación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden usarse para la citotoxicidad redirigida (por ejemplo, para destruir células tumorales), como un adyuvante de vacuna, para entregar agentes trombolíticos a coágulos, para convertir profármacos activados por enzimas en un sitio diana (por ejemplo, un tumor), para tratar enfermedades infecciosas, para dirigir complejos inmunitarios a receptores de superficie celular o para entregar inmunotoxinas a células tumorales.

Los anticuerpos biespecíficos que se describen en el presente documento también pueden usarse en varios métodos de ensayo terapéuticos y no terapéuticos y/o de diagnóstico, tales como, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de dos sitios, inmunodiagnóstico *in vitro* o *in vivo* de diversas enfermedades (por ejemplo, cáncer), ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Otros usos para los anticuerpos biespecíficos serán evidentes para los expertos en la materia.

Se han publicado varias técnicas para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos a partir del cultivo celular recombinante. Sin embargo, la síntesis y la expresión de proteínas de unión biespecíficas han sido problemáticas, en parte debido a problemas asociados a la identificación de una cadena ligera adecuado que pueda asociarse y expresarse con dos cadenas pesadas diferentes y en parte debido a problemas de aislamiento. En diversos aspectos, las composiciones y métodos que se describen en el presente documento proporcionan la ventaja de anticuerpos biespecíficos de longitud completa que no requieren ninguna modificación o modificaciones especiales para mantener la estructura de inmunoglobulina tradicional mediante el aumento de la estabilidad/interacción de los componentes. En varios aspectos, dicha modificación o modificaciones han demostrado ser engorrosas y ser un obstáculo para el desarrollo de la tecnología de anticuerpos biespecíficos y su uso potencial en el tratamiento de enfermedades humanas. Por tanto, en diversos aspectos, a través de proporcionar una estructura de inmunoglobulina natural (es decir, de longitud completa) que tenga la propiedad añadida de múltiples especificidades, los anticuerpos biespecíficos de longitud completa mantienen sus funciones efectoras críticas de las que carecían los fragmentos biespecíficos anteriores y proporcionan adicionalmente agentes terapéuticos que demuestran el parámetro farmacocinético importante de una semivida más larga.

Los métodos y composiciones que se describen en el presente documento permiten que un ratón modificado genéticamente seleccione, a través de procesos de otro modo naturales, una cadena ligera adecuada que pueda asociarse y expresarse con más de una cadena pesada, incluyendo cadenas pesadas que estén mutadas somáticamente (por ejemplo, maduradas por afinidad), en los que la cadena ligera confiere adicionalmente a la proteína de unión a antígeno su propiedad de unión a antígeno dependiente del pH. Las secuencias de región variable humana de cadena pesada y ligera de células B adecuadas de ratones inmunizados como se describe en el presente documento que expresan anticuerpos de afinidad madurada que tienen cadenas pesadas químicas inversas (es decir, variable humana y constante de ratón) pueden identificarse y clonarse en fase en un vector de expresión con una secuencia génica de región constante humana adecuada (por ejemplo, una IgG1 humana). Pueden prepararse dos construcciones de este tipo, en las que cada construcción codifica un dominio variable de cadena pesada humano que se une a un epítipo diferente. Una de las regiones variables de cadena ligera humanas (por ejemplo, Vk1-39Jk5 humano o Vk3-20Jk1 humano), que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, puede fusionarse en fase con un gen de región constante de cadena ligera humana adecuado (por ejemplo, un gen constante  $\kappa$  humano). Estas tres construcciones pesadas y ligeras totalmente humanas pueden ubicarse en una célula adecuada para la expresión. La célula expresará dos especies principales: una cadena pesada homodimérica con la cadena ligera idéntica y una cadena pesada heterodimérica con la cadena ligera idéntica. Para permitir una separación fácil de estas especies principales, una de las cadenas pesadas se modifica para omitir un determinante de unión a proteína A, dando como resultado una afinidad diferencial de una proteína de unión homodimérica con respecto a una proteína de unión heterodimérica. Se describen composiciones y métodos que abordan este problema en el documento USSN 12/832.838, presentado el 25 de junio de 2010, titulado "*Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format*", publicado como documento US 2010/0331527A1. Una vez que se selecciona la especie que comprende la cadena pesada heterodimérica con una cadena ligera idéntica, esta proteína de unión a antígeno bi-específica puede explorarse para confirmar la retención de su propiedad de unión a antígeno dependiente del pH.

En un aspecto, en el presente documento se describe una proteína de unión a epítipo como se describe en el presente documento, en la que las secuencias de región variable de cadena ligera y de cadena pesada humanas derivan de animales que se describen en el presente documento que se han inmunizado con un antígeno que comprende un epítipo de interés.

En un aspecto, se proporciona una proteína de unión a epítipo que comprende un primer y un segundo polipéptido, comprendiendo el primer polipéptido, del extremo N-terminal al C-terminal, una primera región de unión a epítipo que se une selectivamente a un primer epítipo, seguida de una región constante que comprende una primera región  $C_{H3}$  de una IgG humana seleccionado entre IgG 1, IgG2, IgG4 y una combinación de las mismas; y, un segundo polipéptido que comprende, del extremo N-terminal al C-terminal, una segunda región de unión a epítipo que se une selectivamente a un segundo epítipo, seguida de una región constante que comprende una segunda región  $C_{H3}$  de una IgG humana seleccionada entre IgG 1, IgG2, IgG4 y una combinación de las mismas, en la que la segunda región  $C_{H3}$  comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio  $C_{H3}$  a la proteína A. Se

describen diversas modificaciones de este tipo, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de los EE.UU. N.º 2010/0331527 y 2011/0195454.

Un método para la producción de una proteína de unión a epítipo que se una a más de un epítipo y presente una propiedad de unión a epítipo dependiente del pH es inmunizar un primer ratón de acuerdo con la invención con un antígeno que comprenda un primer epítipo de interés, en el que el ratón comprende (1) un locus de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno que no contenga una secuencia génica de región variable de cadena ligera de ratón endógena que sea capaz de reordenar y formar una cadena ligera, en el que en el locus de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón endógeno es una única región variable de cadena ligera humana reordenada unida operativamente al gen de región constante de cadena ligera endógeno de ratón, y la región variable de cadena ligera humana reordenada se selecciona entre un Vk1-39Jk5 humano y un Vk3-20Jk1 humano que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina y (2) los segmentos génicos V<sub>H</sub> de ratón endógenos se han reemplazado en su totalidad o en parte con segmentos génicos V<sub>H</sub> humanos, de manera que las cadenas pesadas de inmunoglobulina producidas por el ratón son únicamente o sustancialmente cadenas pesadas que comprenden dominios variables humanos y dominios constantes de ratón. Cuando está inmunizado, un ratón de este tipo producirá un anticuerpo quimérico inverso, que comprende solo uno de los dos dominios variables de cadena ligera humanos (por ejemplo, uno de Vk1-39Jk5 humano o Vk3-20Jk1 humano, por ejemplo, que comprenden una sustitución de al menos un aminoácido con una histidina). Habitualmente, se conservará al menos algunos de los residuos de histidina sustituidos introducidos en la secuencia de la línea germinal en el anticuerpo quimérico inverso. Una vez que se identifica una célula B que codifica un dominio variable de cadena pesada que se une al epítipo de interés y expresa un anticuerpo que presenta propiedades de unión a antígeno dependientes del, la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (y, opcionalmente, la región variable de la cadena ligera) puede recuperarse (por ejemplo, mediante PCR) y puede clonarse en una construcción de expresión en fase con una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana adecuada. Este proceso puede repetirse para identificar un segundo dominio variable de cadena pesada que se una a un segundo epítipo y una segunda secuencia génica de región variable de cadena pesada puede recuperarse y clonarse en un vector de expresión en fase a una segunda secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana adecuada. Los dominios constantes de inmunoglobulina primero y segundo codificados por la secuencia génica de región constante pueden ser iguales o diferentes del isotipo y uno de los dominios constantes de inmunoglobulina (pero no el otro) pueden modificarse como se describe en el presente documento o en el documento US 2010/0331527A1 y una proteína de unión a epítipo puede expresarse en una célula adecuada y aislarse basándose en su afinidad diferencial por la proteína A en comparación con una proteína de unión a epítipo homodimérica, por ejemplo, como se describe en el documento US 2010/0331527A1.

Por tanto, en diversos aspectos, después del aislamiento del ADN y la selección de las secuencias de ácido nucleico primera y segunda que codifican los dominios variables de cadena pesada humanos primero y segundo que tienen las especificidades/afinidades deseadas y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de cadena ligera humano (una secuencia de línea germinal reordenada o una secuencia de cadena ligera aislada de un animal no humano como se describe en el presente documento) y comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, las tres secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas se expresan para formar el anticuerpo biespecífico usando técnicas recombinantes que están ampliamente disponibles en la técnica. Con frecuencia, el sistema de expresión de elección implicará un vector de expresión de células de mamíferos y hospedador de manera que el anticuerpo biespecífico se glucosila adecuadamente (por ejemplo, en el caso de anticuerpos biespecíficos que comprenden dominios de anticuerpo que están glucosilados). Sin embargo, las moléculas también pueden producirse en los sistemas de expresión procariotas. Normalmente, la célula hospedadora se transforma con ADN que codifica tanto el primer dominio variable de cadena pesada humano, el segundo dominio variable de cadena pesada humano, el dominio de cadena ligera humano en un único vector o en vectores independientes. Sin embargo, es posible expresar el primer dominio variable de cadena pesada humano, el segundo dominio variable de cadena pesada humano y el dominio de cadena ligera humano (los componentes de anticuerpos biespecíficos) en sistemas de expresión independientes y acoplar los polipéptidos expresados in vitro. En diversos aspectos, el dominio de cadena ligera humana deriva de una secuencia de línea germinal, excepto por la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, por ejemplo, en un codón CDR. En diversos aspectos, el dominio de cadena ligera humano comprende no más de uno, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro o no más de cinco hipermutaciones somáticas dentro la secuencia variable de cadena ligera del dominio de cadena ligera. En algunos aspectos, las hipermutaciones somáticas no alteran la presencia de al menos un residuo de histidina introducido en la secuencia de la línea germinal de región variable de cadena ligera.

En diversos aspectos, el ácido o ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifican las dos cadenas pesadas y la única cadena ligera humana con una sustitución de al menos un codón no de histidina con una histidina se inserta en un vector replicable para la clonación adicional (amplificación del ADN) y/o para la expresión. Hay disponibles muchos vectores y generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. Cada componente puede seleccionarse de forma individual o basándose en la elección de una célula hospedadora u otros criterios determinados experimentalmente. Se conocen varios ejemplos de cada componente en la técnica.

Los vectores de expresión y clonación por lo general contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y se une operativamente a las secuencias de ácido nucleico que codifican cada uno o todos los componentes del anticuerpo biespecífico. Un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales son bien conocidos. Estos promotores se unen operativamente al ADN que codifica el anticuerpo biespecífico mediante la eliminación del promotor del ADN original mediante digestión con enzimas de restricción e inserción de la secuencia promotora aislada en el vector.

Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica los componentes de anticuerpos biespecíficos. Los vectores de expresión adecuados para diversas realizaciones incluyen los que proporcionan la expresión transitoria en células de mamíferos de ADN que codifica el anticuerpo biespecífico. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficientemente en una célula hospedadora, de manera que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Los sistemas de expresión transitorios, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula hospedadora, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por ADN clonados, así como para la detección rápida de anticuerpos biespecíficos que tengan especificidades/afinidades de unión deseadas o las características de migración en gel deseadas con respecto a los anticuerpos parentales que tienen homodímeros de los dominios variables de cadena pesada humanos primero o segundo.

En diversos aspectos, una vez que el ADN que codifica los componentes del anticuerpo biespecífico se ensamblan en el vector o vectores deseados como se ha descrito anteriormente, se introducen en una célula hospedadora adecuada para la expresión y recuperación. La transfección de las células hospedadoras puede realizarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica apropiadas para la célula hospedadora seleccionada (por ejemplo, electroporación, microinyección nuclear, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina, etc.).

En diversos aspectos, se elige una célula hospedadora que se adapte mejor al vector de expresión que contiene los componentes y permita la producción más eficiente y favorable de la especie de anticuerpo biespecífico. Las células hospedadoras de ejemplo para la expresión incluyen las de procariontes y eucariotas (de una sola célula o de múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas con *baculovirus*, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En diversos aspectos, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En diversos aspectos, la célula es eucariota y se selecciona entre las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), células retinianas, Vero, CV1, de riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, células L, células C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, células de Sertoli, células 3A BRL, células HT1080, células de mieloma, células tumorales y una estirpe celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En diversos aspectos, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6™).

Las células hospedadoras de mamífero utilizadas para producir el anticuerpo biespecífico pueden cultivarse en una diversidad de medios. Los medios disponibles en el mercado, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Los medios pueden complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes por lo general a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento en las concentraciones apropiadas, como es sabido por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son, en diversas realizaciones, las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos en la materia.

El anticuerpo biespecífico puede recuperarse del medio de cultivo en forma de un polipéptido secretado, aunque también puede recuperarse del lisado de células hospedadoras cuando se produce directamente sin una señal secretora. Si el anticuerpo biespecífico está unido a la membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100).

Después del aislamiento, un anticuerpo biespecífico que comprende dos cadenas pesadas humanas y una única cadena ligera humana derivada de una secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana seleccionada entre las secuencias Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 que comprenden una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, se explora para determinar su capacidad para presentar unión dependiente del pH a uno, preferentemente ambos de sus antígenos. La capacidad de los anticuerpos biespecíficos para unirse sus antígenos de forma diferente a pH neutro y ácido de (por ejemplo, su capacidad para demostrar una  $t_{1/2}$  reducida a pH ácido en comparación con a pH neutro) puede determinarse mediante una diversidad de técnicas disponibles en la técnica y que se describen en los siguientes ejemplos, por ejemplo, el ensayo BIACORE™.

#### **Métodos adicionales para la generación de proteínas de unión a antígeno con unión a antígeno dependiente de pH**

En el presente documento se describen diversos métodos de generación de proteínas de unión a antígeno con propiedades de unión a antígeno dependientes del pH en animales no humanos modificados genéticamente que se describen en el presente documento. En el presente documento también se describen métodos de generación de proteínas de unión a antígeno con propiedades de unión a antígeno dependientes del pH *in vitro*. Dichos métodos pueden implicar la generación de diversos componentes de las proteínas de unión a antígeno *in vivo* en animales no humanos modificados genéticamente y después la modificación y el reensamblaje de los mismos *in vitro* fuera de un organismo en forma de complejos de proteínas expresados en cultivos celulares de mamíferos.

En un aspecto, el método de generación de proteínas de unión a antígeno con propiedades de unión a antígeno dependientes del pH utiliza una secuencia de proteína de unión a antígeno, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo, que se genera en un ratón que comprende un repertorio limitado de segmentos V y J de región variable de cadena ligera, por ejemplo, segmentos V y J de región variable de cadena ligera humanos, ratón de "cadena ligera universal" o "cadena ligera común" (ratón "ULC"), tal como el ratón que se describe en las Publicaciones de Solicitud de los EE.UU. N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 y 2013/0045492. En un aspecto, el método de generación de proteínas de unión a antígeno con propiedades de unión a antígeno dependientes del pH utiliza una secuencia de proteína de unión a antígeno que se genera en un ratón que comprende una única secuencia génica de región variable de cadena ligera humana reordenada. En un aspecto, el método utiliza una proteína de unión a antígeno generada en un ratón que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana seleccionada entre Vk1-39Jk5 humana y Vk3-20Jk1 humana.

En un aspecto, el método para generar una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, con las propiedades de unión a antígeno dependiente del pH comprende la selección de un primer anticuerpo que se une a un antígeno de interés (por ejemplo, se une a un antígeno de interés con una afinidad deseada), la modificación de una secuencia de nucleótidos de cadena ligera de inmunoglobulina del primer anticuerpo para que comprenda una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, la expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina del primer anticuerpo y la cadena ligera de inmunoglobulina modificada en una célula y la selección de un segundo anticuerpo expresado en la célula que conserva la unión al antígeno de interés (por ejemplo, conserva la afinidad deseada para el antígeno de interés) a pH neutro y muestra una unión reducida al antígeno de interés a un pH ácido.

En un aspecto, el método para generar una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, con propiedades de unión a antígeno dependiente del pH comprende la selección de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo (por ejemplo, obtenido de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, por ejemplo, un ratón ULC) que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana en la que el anticuerpo se une a un antígeno de interés (por ejemplo, se une a un antígeno de interés con una afinidad deseada); la modificación de la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera de inmunoglobulina de manera que la secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana solo comprenda una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina; la expresión de la cadena pesada de inmunoglobulina seleccionada y la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la sustitución de al menos un aminoácido con una histidina en su dominio variable; y seleccionar un anticuerpo que conserve la unión al antígeno de interés a un pH neutro (por ejemplo, que conserve la afinidad deseada para el antígeno de interés) al tiempo que muestra una unión reducida al antígeno de interés a un pH ácido. En diversos aspectos, la cadena pesada de inmunoglobulina deriva de un reordenamiento de segmentos génicos variables de cadena pesada humanos (segmentos V, D y J humanos).

En un aspecto, el método para generar una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, con propiedades de unión a antígeno dependiente del pH comprende (1) inmunizar un animal no humano, por ejemplo, un ratón, que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana y un repertorio de segmentos génicos no reordenados variables de cadena pesada humanos (segmentos V, D y J) con un antígeno de interés y permitir que un ratón monte una respuesta inmunitaria a dicho antígeno, (2) seleccionar en el animal no humano, por ejemplo, en el ratón, un anticuerpo que se una al antígeno de interés con una afinidad deseada, (3) aislar del animal no humano, por ejemplo, del ratón, una secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo que se une al antígeno de interés con una afinidad deseada, (4)

determinar la secuencia de nucleótidos de dicha cadena pesada, (5) modificar una secuencia de nucleótidos de una cadena ligera de inmunoglobulina que contiene la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada humana para que comprenda una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, (6) expresar la cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo que se une al antígeno de interés con una afinidad deseada y la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la modificación con histidina en una célula y (7) determinar si el anticuerpo expresado en la célula conserva la unión al antígeno a un pH neutro, mostrando al mismo tiempo una unión reducida a un pH ácido. En un aspecto, el anticuerpo expresado en la célula presenta una afinidad deseada para el antígeno deseado a pH neutro. En diversos aspectos, la cadena pesada de inmunoglobulina deriva de un reordenamiento segmentos génicos variables de cadena pesada humanos (segmentos V, D y J humanos).

En un aspecto, el ratón que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana es un ratón "ULC" de cadena ligera universal o cadena ligera común que se describe en, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de los EE.UU. N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 y 2013/0045492. En un aspecto, la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana se selecciona entre la secuencia Vk1-39Jk5 humana y la secuencia Vk3-20Jk1 humana.

En un aspecto, el antígeno de interés se selecciona entre un antígeno soluble, un antígeno de superficie celular (por ejemplo, un antígeno tumoral) y un receptor de superficie celular. En un aspecto específico, el receptor de superficie celular es un receptor de inmunoglobulina. En un aspecto específico, el receptor de inmunoglobulina es un receptor de Fc.

En un aspecto, la afinidad deseada de un anticuerpo para un antígeno expresada como una constante de disociación ( $K_D$ ) a un pH neutro es inferior a  $10^{-6}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-1}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-9}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-10}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-11}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-12}$  M.

Como se ha explicado anteriormente, los ratones ULC, en un aspecto, comprenden una única secuencia génica reordenada variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y expresan anticuerpos en respuesta al antígeno, en los que la afinidad de los anticuerpos al antígeno está mediada principalmente a través de las cadenas pesadas de sus anticuerpos. Estos ratones comprenden un repertorio de segmentos (V, D y J) variables de cadena pesada humanos, que se reordenan para codificar un dominio variable de cadena pesada humano de un anticuerpo que también comprende la cadena ligera derivada de la única secuencia reordenada variable de cadena ligera humana. En un aspecto, tras la exposición al antígeno, estos ratones utilizan el repertorio diverso de segmentos (V, D y J) variables de cadena pesada humanos para generar un anticuerpo con afinidad y especificidad para el antígeno. Por tanto, tras la exposición al antígeno, la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo generado en los ratones ULC puede aislarse y utilizarse para generar una proteína de unión deseada que comprenda también una cadena ligera de inmunoglobulina derivada de la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (por ejemplo, la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana con una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina).

En un aspecto de los ratones ULC, el 90-100 % de los segmentos génicos  $V_H$  no humanos no reordenados se reemplazan con al menos un segmento génico  $V_H$  humano no reordenado. En un aspecto específico, todos o sustancialmente todos (por ejemplo, el 90-100 %) los segmentos génicos  $V_H$  no humanos endógenos se reemplazan con al menos un segmento génico  $V_H$  humano no reordenado. En un aspecto, el reemplazo es con al menos 19, al menos 39 o al menos 80 o 81 segmentos génicos  $V_H$  humanos no reordenados. En un aspecto, el reemplazo es con al menos 12 segmentos génicos  $V_H$  humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos génicos  $V_H$  humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos génicos  $V_H$  humanos no reordenados funcionales. En un aspecto, el animal no humano comprende un reemplazo de todos los segmentos  $D_H$  y  $J_H$  no humanos con al menos un segmento  $D_H$  humano no reordenado y al menos un segmento  $J_H$  humano no ordenado. En un aspecto, el animal no humano comprende un reemplazo de todos los segmentos  $D_H$  y  $J_H$  no humanos con todos los segmentos  $D_H$  humanos no reordenados y todos los segmentos  $J_H$  humanos no reordenados. Por tanto, el ratón ULC utiliza un repertorio diverso de segmentos génicos de región variable humanos (segmentos V, D y J) para generar un anticuerpo en respuesta al antígeno de interés.

Una vez que se determina la cadena pesada del anticuerpo que se une al antígeno de interés con la afinidad deseada, la secuencia de nucleótidos de cadena pesada se aísla y se secuencia. La secuencia se clona en un vector para su expresión en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, células eucariotas, por ejemplo, células CHO. En un aspecto, la secuencia de una región constante de cadena pesada humana se clona corriente abajo de la secuencia de región variable de cadena pesada humana aislada del ratón (por ejemplo, del ratón ULC).

En un aspecto, el método de generación de una proteína de unión a antígeno con propiedades de unión a antígeno dependiente del pH comprende modificar una secuencia de nucleótidos de cadena ligera de inmunoglobulina, en particular la secuencia de la única región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada, para que comprenda una sustitución de al menos un codón de no de histidina con un codón de histidina. Se conocen en la técnica diversas técnicas para la modificación de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, la mutagénesis

dirigida al sitio. Además, una secuencia de nucleótidos que comprende la sustitución con histidina deseada puede sintetizarse de novo.

En un aspecto, la sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina comprende una sustitución que da como resultado la expresión de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de histidina. En un aspecto, la sustitución o sustituciones da como resultado la expresión de tres o cuatro residuos de histidina. En un aspecto, la sustitución o sustituciones es en la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. En un aspecto, la sustitución o sustituciones es en el codón CDR, por ejemplo, en el codón CDR1, CDR3 y/o CDR3. En un aspecto, la sustitución o sustituciones es en el codón CDR3.

En una realización, en la que la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de inmunoglobulina comprende la secuencia génica Vk1-39Jk5, y la sustitución o sustituciones es en el codón CDR3, la sustitución da como resultado la expresión de una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y combinaciones de las mismas. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 106, 108 y 111. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105 y 106. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105 y 108. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105 y 111. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 106 y 108. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 106 y 111. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 108 y 111. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 106 y 108. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 106 y 111. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 108 y 111. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 106, 108 y 111. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de regiones CDR3 Vk1-39Jk5 que comprenden diversas sustituciones con histidina se representan en la FIG. 2 y se incluyen en el listado de secuencias.

En una realización, en la que la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de inmunoglobulina comprende la secuencia génica Vk3-20Jk1, y la sustitución o sustituciones es en el codón CDR3, la sustitución da como resultado la expresión de una histidina en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y combinaciones de las mismas. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 106, 107 y 109. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105 y 106. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105 y 107. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105 y 109. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 106 y 107. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 106 y 109. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 107 y 109. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 106 y 107. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 106 y 109. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 105, 107 y 109. En una realización, las sustituciones dan como resultado la expresión de histidinas en las posiciones 106, 107 y 109. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos seleccionadas de regiones CDR3 Vk3-20Jk1 que comprenden diversas sustituciones con histidina se representan en la FIG. 12 y se incluyen en el listado de secuencias.

Una vez que la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, el dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana se modifica para incluir residuos de histidina en las posiciones deseadas, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera se clona en un vector para la expresión en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, células eucariotas, por ejemplo, células CHO. En un aspecto, la secuencia de una región constante de cadena ligera humana se clona corriente abajo de la secuencia de nucleótidos modificada de la región variable humana.

En un aspecto, los vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de inmunoglobulina humana modificada y la cadena pesada de inmunoglobulina humana seleccionada se coexpresan en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo, una célula hospedadora eucariota, por ejemplo, células CHO, para generar una proteína de unión a antígeno. Se conocen en la técnica diversas células hospedadoras que pueden usarse para la expresión y se mencionan en toda la presente memoria descriptiva.

Una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, generado en la célula hospedadora puede secretarse en el sobrenadante celular, que se analiza para la expresión apropiada y determinar la afinidad por el antígeno original a pH neutro. La proteína de unión a antígeno también puede recuperarse del lisado celular, o, si está unida a la membrana, liberarse de la membrana usando un detergente adecuado (por ejemplo, Triton-X). La proteína de unión a antígeno con las características deseadas puede purificarse.

En un aspecto, la proteína de unión a antígeno que comprende una modificación o modificaciones con histidina conserva la afinidad para el antígeno que es comparable a la afinidad para el antígeno de la misma proteína de unión a antígeno (original) que no comprende una modificación o modificaciones con histidina. En un aspecto, la

afinidad de la proteína de unión a antígeno modificada con histidina para el antígeno de interés expresada como una constante de disociación ( $K_D$ ) a un pH neutro es inferior a  $10^{-6}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-8}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-9}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-10}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-11}$  M, por ejemplo, inferior a  $10^{-12}$  M.

5 En un aspecto, la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, que comprende modificaciones con histidina que se describen en el presente documento presenta propiedades de unión al antígeno dependiente de pH. En una realización, la proteína de unión a antígeno que comprende modificaciones con histidina posee propiedades dependientes del pH potenciadas superiores a una proteína de unión a antígeno equivalente sin las modificaciones con histidina (proteína de unión a antígeno de la misma secuencia de aminoácidos excepto por las modificaciones con histidina). En un aspecto, la proteína de unión a antígeno que se describe en el presente documento conserva la unión al antígeno a pH neutro (por ejemplo, conserva afinidad deseada para el antígeno a pH neutro), mientras que presenta una unión reducida a un pH ácido. En un aspecto, la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, el anticuerpo, que se describe en el presente documento, no presenta ninguna unión a antígeno a pH ácido, mientras que conserva la unión al antígeno a pH neutro. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno que se describe en el presente documento, tiene una disminución de la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) a un pH ácido, en comparación con la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) de la proteína de unión a antígeno a un pH neutro, de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces o al menos aproximadamente 30 veces. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 37 °C de aproximadamente 2 min o menos. En una realización, una proteína de unión a antígeno que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 37 °C de menos de aproximadamente 1 min. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 25 °C de aproximadamente 2 min o menos. En un aspecto, una proteína de unión a antígeno que se describe en el presente documento tiene una  $t_{1/2}$  a un pH ácido y 25 °C de menos de aproximadamente 1 min.

En un aspecto, la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, el anticuerpo, que comprende modificaciones con histidina que se describen en el presente documento, presenta una semivida aumentada en suero tras la administración de una dosis terapéutica a un sujeto en comparación con una semivida en suero tras la administración de una dosis terapéutica equivalente de proteína de unión a antígeno que no comprende modificaciones con histidina (por ejemplo, la proteína de unión a antígeno original que no comprende modificaciones con histidina). En algunos aspectos, el aumento de la semivida en suero tras la administración de una dosis de la proteína de unión a antígeno que comprende modificaciones con histidina que se describen en el presente documento durante una semivida en suero tras la administración de la misma dosis de la proteína de unión a antígeno que no comprende modificaciones con histidina es de aproximadamente 2 veces, por ejemplo, aproximadamente 5 veces, por ejemplo, aproximadamente 10 veces, por ejemplo, aproximadamente 15 veces, por ejemplo, aproximadamente 20 veces o superior. En un aspecto, la semivida en suero es de al menos aproximadamente 1 día, por ejemplo, al menos aproximadamente 2 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 7 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 14 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 30 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 días.

Además de los métodos *in vitro* para la generación de proteínas de unión a antígeno con propiedades de unión a antígeno dependientes del pH descritos anteriormente, en el presente documento también que se describen proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, generadas mediante dicho método. Además, dicho método puede utilizarse para generar proteína de unión a anticuerpo multi-específicas, por ejemplo, biespecíficas, mediante la selección de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina humana diferentes que se unen a una cadena ligera común (universal) en un ratón, la determinación de las secuencias de nucleótidos de la cadenas pesadas, la modificación de cadena ligera universal para que comprenda sustituciones con histidina como se ha descrito anteriormente y la coexpresión de dos cadenas pesadas humanas con una única cadena ligera universal modificada con histidina en una célula hospedadora. Diversas etapas para la generación de una proteína de unión a antígeno descrita anteriormente pueden ser aplicables al método de generación de una proteína de unión a antígeno biespecífica. La proteína de unión a antígeno biespecífica, que se confirma que posee la afinidad para el antígeno o antígenos y las propiedades de unión a antígeno dependientes del pH deseadas, puede purificarse. Por tanto, en el presente documento se describen anticuerpos biespecíficos que comprenden dos cadenas pesadas humanas y una única cadena ligera humana que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera humana codificada por un gen de región variable humano, por ejemplo, el gen de región variable humano Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1 que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina.

En el presente documento también se describen construcciones utilizadas en la producción de una proteína de unión a antígeno que comprenden cadena pesada de inmunoglobulina humana y cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprenden sustituciones con histidina. En el presente documento también se describen células hospedadoras que expresan proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos, que se describen en el presente documento.

65

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de describir a los expertos habituales en la materia cómo hacer y usar los métodos y composiciones que se describen, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su divulgación. Se han hecho esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que son bien conocidos por los expertos habituales en la materia (técnicas de clonación molecular, etc.). A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o una cercana a la misma.

### Ejemplo 1. Identificación de residuos de histidina en cadenas ligeras humanas específica de antígeno

La generación de un ratón de cadena ligera común (por ejemplo, ratón de cadena ligera común Vk1-39 o Vk3-20) y anticuerpos específicos de antígeno en esos ratones se describe en las Solicitudes de Patente de los EE.UU. N.º 13/022.759, 13/093.156 y 13/412.936 (Publicaciones N.º 2011/0195454, 2012/0021409 y 2012/0192300, respectivamente). Brevemente, se hizo un vector de dirección de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela et al. (2003) *High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech.* 21 (6): 652-659) para modificar clones de cromosoma artificial bacteriano (BAC, del inglés *Bacterial Artificial Chromosome*) genómicos de ratón y se diseñaron mediante ingeniería genética construcciones genómicas para contener una única región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada e insertada en un locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno que se había modificado previamente para suprimir los segmentos génicos variables y de unión  $\kappa$  endógenos. Después, se usó el ADN de BAC dirigido para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresaran una región Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1 de línea germinal humana reordenada. Se usaron células ES dirigidas como células ES donadoras y se introdujeron en un embrión de ratón en etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007) *F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech.* 25 (1): 91-99). Se identificaron VELOCIMICE® que llevaban independientemente una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1 de línea germinal humana modificada mediante ingeniería genética mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela et al., citado anteriormente) que detecta la presencia de la única región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada.

Los ratones que llevan un locus de cadena ligera de línea germinal humana modificado mediante ingeniería genética (ratones ULC) se reprodujeron con ratones que contenían un reemplazo del locus del gen variable de cadena pesada de ratón endógeno con el locus del gen variable de cadena pesada humana (véase el documento US 6.596.541; *the VELOCIMMUNE® mouse*, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.).

El ratón VELOCIMMUNE® que contenía una única región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada se expuso a un antígeno de interés y los anticuerpos que comprendían una cadena ligera universal (por ejemplo, Vk1-39Jk5) se aislaron y se secuenciaron. Las secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras seleccionadas (A-K) de anticuerpos humanos específicos de antígeno generadas en un ratón de cadena ligera Vk1-39Jk5 común se alinearon. Se identificaron las mutaciones de histidina en las CDR de cadenas ligeras derivadas de Vk1-39 para un número seleccionado de anticuerpos humanos específicos de antígeno (FIG. 1). La secuencia de aminoácidos parcial del dominio variable Vk1-39Jk5 de línea germinal se muestra encima de las alineaciones y se expone en la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos del dominio variable completa se expone en la SEQ ID NO: 80.

### Ejemplo 2. Modificación mediante ingeniería genética y caracterización de anticuerpos de cadena ligera universal humana sustituida con histidina

#### *Ejemplo 2.1. Modificación mediante ingeniería genética de residuos de histidina en una cadena ligera reordenada humana de línea germinal*

Se introdujeron mediante ingeniería genética residuos de histidina en una cadena ligera Vk1-39Jk5 humana reordenada usando cebadores de mutagénesis dirigida al sitio diseñados específicamente para introducir residuos de histidina modificados mediante ingeniería genética en las posiciones Q105, Q106, Y108 y P111 de la cadena ligera Vk1-39Jk5 humana. Se realizó una mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas moleculares conocidas en la técnica (por ejemplo, QuikChange II XL Site Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies). Las ubicaciones de los residuos modificados mediante ingeniería genética en la CDR3 se muestran en la FIG. 2, las secuencias de ácido nucleico de CDR3 sustituido con histidina representadas en la FIG. 2 se exponen en las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 (las secuencias de aminoácidos correspondiente se exponen en las SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 33). Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la CDR3 de Vk1-39Jk5 reordenada de línea germinal se exponen en las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente.

*Ejemplo 2.2. Construcción y expresión de cadenas ligeras modificadas mediante ingeniería genética con histidina*

Se construyeron cadenas ligeras derivadas de Vk1-39 humana que contenían residuos de histidina introducidos mediante ingeniería genética de línea germinal hechos de acuerdo con el Ejemplo 2 y se emparejaron con diversas cadenas pesadas humanas (marcadas 1-5), específicas para un receptor de superficie celular humano, para analizar la expresión en células CHO. Las cinco cadenas pesadas humanas específicas para un receptor de superficie celular humano que se emparejaron con cadenas ligeras derivadas de Vk1-39 sustituidas con histidina se obtuvieron de ratones que tenían una única cadena ligera humana reordenada (una cadena ligera reordenada Vk1-39/Jk5 humana; véase el documento US2011/0195454A1).

*Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA):* Se detectó la secreción de anticuerpos desde células CHO usando un ELISA Fc, para las cadenas ligeras con modificaciones con histidina indicadas con cinco cadenas pesadas diferentes. Las secuencias de cadena ligera y pesada (excepto las modificaciones) se generaron en ratones que tenían una única cadena ligera humana reordenada (por ejemplo, una cadena ligera reordenada Vk1-39/Jk5 humana; véase el documento US2011/0195454A1). El anticuerpo de captura era de cabra anti-IgG humana y el anticuerpo de detección era de cabra anti-HRP (específica de Fc gamma) humana. Los resultados se muestran en la FIG. 3. ULC + pesada: cadena pesada específica y cadena ligera derivada de Vk1-39 humana sin modificar. Como se muestra en la FIG. 3, se detectó expresión en casi todos los mutantes.

*Inmunotransferencia de proteínas.* La expresión en sobrenadantes de células CHO de cadenas pesadas específicas de antígeno emparejadas con cadenas ligeras modificadas mediante ingeniería genética con histidina se analizó adicionalmente mediante transferencia Western. Las muestras se desarrollaron en un gel de tris al 4-12 %-glicina. Los resultados usando una cadena pesada seleccionada (cadena pesada 3) se muestran en la FIG. 4. ULC se refiere a una cadena ligera derivada de Vk1-39 humana reordenada (como se ha descrito anteriormente).

*Ejemplo 2.3. Determinación de la afinidad de unión de cadenas ligeras modificadas mediante ingeniería genética con histidina*

Se determinaron constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ), semividas disociativas ( $t_{1/2}$ ) y otros parámetros cinéticos para sobrenadantes de anticuerpos seleccionados mediante SPR (resonancia de plasmón superficial) usando un instrumento BIACORE™ T200 (GE Healthcare). La cinética se midió a pH 7,4 y a pH 5,75. Los resultados se muestran en las FIG. 5E - 5A.

Se obtuvieron valores numéricos para las propiedades de unión cinéticas (por ejemplo,  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_D$ ,  $t_{1/2}$ , etc.) de anticuerpos que se unen a inmunógeno a pH neutro (pH 7,4) y a pH ácido (pH 5,75) usando un biosensor de resonancia de plasmón superficial a tiempo real (Biacore T200). Un chip sensor Biacore CM5 se derivatizó con un anticuerpo de ratón anti-Fc humano para capturar anticuerpos del sobrenadante. Después, se inyectó una única concentración (50 nM) de inmunógeno sobre la superficie capturada por anticuerpo a un caudal de 30  $\mu$ l/min. La asociación anticuerpo-antígeno se controló durante 2,5 minutos y después la disociación del antígeno del anticuerpo capturado se controló durante 8 minutos. Las constantes de velocidad cinética de asociación ( $k_a$ ) y disociación ( $k_d$ ) se determinaron mediante procesamiento y ajuste de los datos a una unión 1:1 con un modelo de transporte de masa usando el software Biacore T200 Evaluación versión 1.0. Se calcularon constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) y semividas disociativas ( $t_{1/2}$ ) a partir de constantes de velocidad cinética como:  $K_D (M) = k_d/k_a$ ; y  $t_{1/2} (min) = (\ln 2)/(60 * k_d)$ .

Como se muestra en la FIG. 5, en un ensayo de unión de anticuerpo a un receptor de superficie celular, dos de cinco anticuerpos con cadenas ligeras comunes modificadas con histidina (CDR3 modificadas con histidina de cadenas ligeras Vk1-39/Jk5) que se emparejaron con las cadenas pesadas humanas específicas de antígeno, presentaron unión al antígeno (por ejemplo, a un receptor de superficie celular) con afinidades diferentes a pH 7,4 y pH 5,75. Son deseables anticuerpos con modificaciones con histidina que conserven la unión a pH 7,4, pero que presenten una unión baja o ninguna unión detectable a pH 5,75. Son deseables anticuerpos con modificación con histidina que presenten una  $t_{1/2}$  reducida a pH 5,75 en comparación con pH 7,4.

Los datos de unión a antígeno para tres anticuerpos que comprenden cadenas ligeras comunes modificadas con histidina y tres cadenas pesadas específicas de antígeno (marcados 2, 3 y 6) a diferentes pH se resume adicionalmente en la FIG. 6. Estos anticuerpos presentaron una caída significativa en la unión a antígeno a pH 5,75 en comparación con a pH 7,4, como se demuestra, por ejemplo, mediante la reducción en la  $t_{1/2}$  o la no unión detectada a pH 5,75.

**Ejemplo 3. Modificación mediante ingeniería genética y caracterización de ratón modificado genéticamente que comprende una cadena ligera universal Vk1-39Jk5 sustituida con histidina**

*Ejemplo 3.1. Construcción de vector de dirección para residuos de histidina introducidos mediante ingeniería genética en una cadena región variable de cadena ligera humana reordenada*

Se produce un ratón transgénico que contiene un gen de cadena ligera humana reordenada que tiene residuos de histidina introducidos mediante ingeniería genética en una región CDR de la cadena ligera humana usando vectores de dirección hechos mediante técnicas de clonación molecular convencionales conocidas en la técnica.

5 Brevemente, se producen diversos vectores de dirección de cadena ligera de línea germinal humana reordenada usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela et al. (2003) *High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis*, *Nature Biotech.* 21 (6): 652-659) para modificar el ADN de cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés) genómicos de ratón para que contenga una única región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada y se inserte en un locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno que se modificó previamente para suprimir la variable  $\kappa$  endógena y unir los segmentos génicos. La región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada se modifica en una o más posiciones de nucleótidos dentro de la secuencia de la cadena ligera para codificar residuos de histidina que normalmente no están presentes en las ubicaciones respectivas de la secuencia de línea germinal. Los vectores de dirección se someten a electroporación en células madre embrionarias (ES) de ratón y se confirman usando un ensayo de PCR cuantitativa (por ejemplo, TAQMAN™).

Específicamente, se muestra una estrategia para la construcción de estos vectores de dirección en las FIG. 8A - 8F. Un plásmido utilizado para generar un vector de dirección para el ratón de cadena ligera (universal) común ("ratón ULC", descrito en, por ejemplo, el documento US2011/0195454A1), que contenía pBS + FRT-Ub-Hyg-FRT + líder Vk3-7 de ratón + Vk1-39Jk5 humana se modificó mediante mutagénesis dirigida al sitio (Kit QuickChange II XL) para reemplazar Q105, Q106, Y108 y P111 o P106, Y108 y P111 con residuos de histidina en la región CDR3 usando cebadores de mutagénesis dirigida al sitio que se muestran en la FIG. 7 (véase la FIG. 8A para esta etapa de modificación mediante ingeniería genética). Los vectores resultantes (H105/106/108/111 y H106/108/111) se modificaron adicionalmente y se ligaron en un vector que comprende región constante Igk de ratón, potenciadores de ratón, un brazo de homología 3' de ratón y un casete SPEC (FIG. 8B). La modificación adicional implicó la ligadura en un vector que llevaba el brazo 5' de ratón y que comprendía casete Frt-Ub-NEO-Frt (FIG. 8B). Los vectores de dirección resultantes se sometieron a electroporación en células ES que comprendían la delección del locus variable de Igk de ratón (que comprendía  $\kappa$  variable y la unión de segmentos génicos) (FIG. 8C-8F).

30 Se confirmaron clones de células ES positivas mediante el uso de una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) usando sondas específicas para la región de cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada mediante ingeniería genética insertada en el locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno. Se muestran cebadores y sondas utilizados en el ensayo en la Tabla 1 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias; las ubicaciones de las sondas se representan en las FIG. 8C-8F.

35

**Tabla 1: Cebadores y sondas utilizados para la exploración de células ES**

Nombre de la sonda	Ensayo	Secuencia de sonda	Cebador 5'	Cebador 3'
Neo	GOA	TGGGCACAACA GACAATCGGCTG (SEQ ID NO: 38)	GGTGGAGAGG CTATTCGGC (SEQ ID NO: 39)	GAACACGGCGG CATCAG (SEQ ID NO: 40)
ULC-m1	GOA	CCATTATGATGC TCCATGCCTCTC	AGGTGAGGGT ACAGATAAGTG	TGACAAATGCCC TAATTATAGTGAT
		TGTTC (SEQ ID NO: 41)	TTATGAG (SEQ ID NO: 42)	CA (SEQ ID NO: 43)
1633h2 (específica de Vk1-39Jk5)	GOA	ATCAGCAGAAAC CAGGGAAAGCCC CT (SEQ ID NO: 44)	GGGCAAGTCA GAGCATTAGCA (SEQ ID NO: 45)	TGCAAAGTGGAT GCAGCATAG (SEQ ID NO: 46)
mIgKd2	Retención	GGCCACATTCCA TGGGTTC (SEQ ID NO: 47)	GCAAAACAAAA CCACTGGCC (SEQ ID NO: 48)	CTGTTCTCTAAA ACTGGACTCCAC AGTAAATGGAAA (SEQ ID NO :49)
mIgKp15	Retención	GGGCACTGGATA CGATGTATGG (SEQ ID NQ:50)	CACAGCTTGTG CAGCCTCC (SEQ ID NO: 51)	AGAAGAAGCCTG TACTACAGCATCC GTTTTACAGTCA (SEQ ID NO: 52)

El casete de selección NEO introducido mediante las construcciones de dirección se suprimió mediante la transfección de células ES con un plásmido que expresa FLP (FIG. 8C y 8E). Opcionalmente, el casete de neomicina puede retirarse mediante la reproducción de ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se conserva en los ratones.

40

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se usaron como células ES donadoras y se introdujeron en un embrión de ratón en etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Patente de los

EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymiro et al. (2007) *F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech.* 25 (1): 91-99. Se produjeron VELOCIMICE® que llevaban independientemente un gen de cadena ligera humana modificado mediante ingeniería genética que contenía residuos de histidina mutados en una o más posiciones a lo largo de la secuencia, a partir de células ES dirigidas descritas anteriormente.

Se genotiparon crías y se seleccionaron crías heterocigotas para la cadena ligera humana modificada con histidina mediante ingeniería genética para caracterizar la expresión de la cadena ligera y las capacidades de unión de los anticuerpos expresados. Se enumeran cebadores y sondas para el genotipado de ratones que comprenden específicamente un gen de cadena ligera universal ya sea con tres (H106/108/111; "1930") o cuatro (H105/105/108/111; "1927") modificaciones con histidina en la Tabla 2 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias. Los ratones que contienen la modificación con histidina en sus cadenas ligeras universales se denominan en el presente documento ratones "HULC" (ratones de cadena ligera universal con histidina).

**Tabla 2: Cebadores y sondas utilizados para el genotipado**

Nombre de la sonda	Ensayo	Secuencia de sonda	Cebador 5'	Cebador 3'
1927jxn3	GOA 1927 (4 His) específico de ratón	ACCATAGTCACA GTACCCA (SEQ ID NO: 53)	AGCAGTCTGCA ACCTGAAGATTT (SEQ ID NO: 54)	CCCTTGGCCGAA GGTGAT (SEC ID NO:55)
1930jxn3	GOA 1930 (3 His) específico de ratón	ATAGTCACAGTA CCCATCC (SEQ ID NO: 56)	AGTCTGCAACC TGAAGATTTTGC (SEQ ID NO: 57)	CCCTTGGCCGAA GGTGAT (SEQ ID NO: 58)

*Ejemplo 3.2. Análisis de la respuesta inmunitaria a antígeno en ratones con cadenas ligeras universales sustituidas con histidina*

Se usó un receptor de superficie celular ("antígeno A") como el inmunógeno para inmunizar ratones que eran heterocigotos para la expresión de una cadena ligera kappa humana pre-ordenada utilizando Vk1-39 y Jk5 que tiene 4 sustituciones con histidina en CDR3 (en lo sucesivo en el presente documento "HULC 1927") o heterocigoto para la expresión de una cadena ligera kappa humana pre-ordenada utilizando Vk1-39 y Jk5 que tiene 3 sustituciones con histidina en CDR3 (en lo sucesivo en el presente documento "HULC1930") o ratones TS homocigotos. Se recogió suero preinmunitario de los ratones antes del inicio de la inmunización. El inmunógeno se administró a 2,35 µg de proteína para la inmunización de sensibilización inicial mezclado con 10 µg de oligonucleótido CpG como adyuvante (Invivogen) en un volumen de 25 µl a través de la almohadilla plantar (a.p.). Posteriormente, los ratones se reforzaron a través de la misma vía con 2,35 µg de antígeno A junto con 10 µg de CpG y 25 µg de Adju-Phos (Brenntag) como adyuvantes los días 3, 6, 11, 13, 17, 20 para un total de 6 refuerzos. Los ratones se sangraron en los días 15 y 22 después de la 4<sup>ª</sup> 6<sup>ª</sup> impulso, respectivamente. Su antisuero se sometió a ensayo para determinar los títulos de anticuerpos para el Antígeno A.

Se determinaron títulos séricos de anticuerpos contra inmunógeno mediante un ELISA convencional. Para realizar el ELISA, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo Scientific) a 2 µg/ml con Antígeno A en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Irvine Scientific) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBS-T, Sigma-Aldrich) cuatro veces usando un lavador de placas (Molecular Devices). Las placas después se bloquearon con 250 µl de albúmina sérica bovina al 0,5 % (BSA, Sigma-Aldrich) en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron cuatro veces con PBS-T. Se diluyeron en serie sueros de ratones inmunizados y sueros pre-inmunitarios tres veces en BSA al 0,5 %-PBS partiendo de 1:300 o 1:1000, se añadieron a las placas bloqueadas por duplicado y después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los dos últimos pocillos se dejan en blanco para usarse como control de anticuerpo secundario (control de fondo). Después, las placas se lavaron de nuevo cuatro veces con PBS-T en un lavador de placas. Después se añadió anticuerpo secundario conjugado anti-IgG de ratón de cabra-Fc-peroxidasa de rábano (HRP), (Jackson Immunoresearch) a las placas a una dilución 1:5000/1:10000 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron ocho veces con PBST y se desarrollaron usando TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato. El sustrato se incubó durante 20 min y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, VWR, n.º de cat BDH3500-1) o ácido fosfórico 1 N (JT Baker, n.º de cat 7664-38-2). Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (Victor, Perkin Elmer) a 450 nm. Los títulos de anticuerpos se calcularon usando el software GraphPad Prism.

La respuesta inmunitaria inducida en ratones contra el inmunógeno inyectado se representa como títulos de anticuerpos, que se define como el recíproco de la dilución más alta de suero a la que la absorbancia de unión a antígeno es dos veces superior al nivel de fondo. Por tanto, cuanto mayor sea el número, mayor es la respuesta inmunitaria humoral contra el inmunógeno. Los títulos de anticuerpos inducidos contra el inmunógeno fueron muy altos en ambas cepas de ratones HULC y en los ratones TS, sin diferencias significativas observadas entre las cepas (FIG. 9).

*Ejemplo 3.3. Generación de anticuerpos monoclonales sensibles al pH*

5 Cuando se consiguió una respuesta inmunitaria deseada contra el inmunógeno en ambas cepas de ratones HULC y en los ratones TS, se recogieron esplenocitos de cada cepa de ratón y se fusionan con células de mieloma de ratón para generar células de hibridoma, que se dejaron crecer en placas de 96 pocillos. Después de 10 días de crecimiento, se exploraron sobrenadantes de cada pocillo que contenía células de hibridoma mediante ELISA específico de inmunógeno para identificar muestras de unión a antígeno positivas. Para el ELISA, se recubrieron placas de micro-titulación de 96 pocillos con 1 µg/ml de un anticuerpo policlonal anti-myc (Novus Biologicals, n.º NB600-34) durante la noche a 4 °C para inmovilizar el antígeno marcado con myc, seguido de bloqueo con una solución de BSA al 0,5 % (p/v) en PBS. Las placas se lavaron, las soluciones de antígeno se añadieron a las placas a una concentración de 1 µg/ml y se dejó que se unieran a la placa recubierta durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron sobrenadantes de células de hibridoma a los pocillos a una dilución 1:50 y se dejó que se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos a la placa se detectaron usando un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch, n.º 115-035-164). Se añadieron sustratos de TMB a las placas (BD Biosciences, n.º 51-2606KC/51-2607KC) y se desarrollaron señales colorimétricas de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La absorbancia se registró a 450 nm en un lector de placas Victor Wallac. Las muestras positivas para antígeno definidas como que tenían una DO igual o superior a 0,5 (teniendo el valor basal una DO de aproximadamente 0,1) se sometieron a exploración de afinidad usando un biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real (Biacore 4000).

20 Se registraron parámetros de unión cinéticos (por ejemplo,  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_D$ ,  $t_{1/2}$ , etc.) para la unión del anticuerpo al inmunógeno a pH neutro (pH 7,4) y a pH ácido (pH 6,0). Un chip sensor Biacore CM4 se derivatizó con un anticuerpo de Fc anti-ratón de cabra policlonal para capturar anticuerpos a partir del sobrenadante. Después, se inyectó una única concentración (100 nM) de inmunógeno sobre la superficie capturada por anticuerpo a un caudal de 30 µl/min. La asociación anticuerpo-antígeno se controló durante 1,5 minutos y, después, la disociación del antígeno del anticuerpo capturado se controló durante 2,5 minutos. Las constantes cinéticas de velocidad de asociación ( $k_a$ ) y de disociación ( $k_d$ ) se determinaron mediante procesamiento y ajuste de datos a una unión 1:1 con un modelo de transporte de masa usando el software Biacore 4000 Evaluation versión 1.0. Se calcularon constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) y semividas disociativas ( $t_{1/2}$ ) a partir de las constantes de velocidad cinéticas como:  $K_D$  (M) =  $k_d/k_a$ ; y  $t_{1/2}$  (min) =  $\ln 2/(60 \cdot k_d)$ . Un conjunto de muestras que mostraron una disminución de la unión a pH 6,0 en comparación con la del pH 7,4 (pH sensible) así como un conjunto de muestras de control que no mostró cambios de velocidad significativos entre el pH 7,4 y el pH 6,0 (controles insensibles a pH) se seleccionaron para producirlos mediante clonación. La FIG. 10 representa la comparación del número de positivos para antígeno totales y el número de positivos para antígeno que muestran una unión a antígeno sensible al pH para ratones HULC y TS.

40 Entre los positivos para antígeno, se produjeron de forma monoclonal 18 y 7 clones aislados de dos ratones HULC1927 heterocigotos y dos HULC1930 respectivamente, y 1 clon del ratón TS. Los sobrenadantes de los hibridomas monoclonales se sometieron al análisis de velocidad de disociación (velocidad de disociación) del antígeno a pH neutro y bajo y se usaron sedimentos celulares para la secuenciación de ADN de dominio variable de cadena ligera.

*Ejemplo 3.4. Secuenciación e hipermutaciones somáticas en la región CDR3 de ratones de cadena ligera universal con histidina basada en Vk1-39Jk5*

45 Se usaron sedimentos celulares de hibridomas monoclonales de ratones HULC y TS para la secuenciación de ADN del dominio variable de cadena ligera. De los 26 clones hechos de forma monoclonal (véase el Ejemplo 3.3 anterior) y sometidos a secuenciación, se confirmó que 15 usaban una cadena ligera de ratón HULC o TS (MM y NN, véase la Tabla 4). 14 clones derivaron de ratones heterocigotos HULC (ratones1927 o 1930) y 1 derivó de un ratón TS (OO, véase la Tabla 4).

55 De las 14 muestras positivas para antígeno derivadas de ratones heterocigotos HULC, 12 de los anticuerpos monoclonales utilizaron su cadena ligera HULC correspondiente, mientras que 2 utilizaron una cadena ligera de ratón TS. Todos menos uno de los anticuerpos que utilizaron HULC conservaron la totalidad de las mutaciones con histidina introducidas como se muestra en la Tabla 3 (anticuerpo en cursiva). La secuenciación del clon AA produjo 2 secuencias HULC diferentes, lo que se refleja mediante dos entradas en la Tabla 3.

**Tabla 3: Número de inserciones de histidina e hipermutaciones somáticas conservadas en secuencias de cadena ligera de clones que utilizan la cadena ligera de HULC**

		Secuencias de cadena ligera de ratones que utilizan HULC		
Nombre del clon	Cepa de ratón	n.º de mutaciones de His conservadas en CDR3	n.º de hipermutaciones somáticas en la región marco conservada	n.º de hipermutaciones somáticas en CDR
AA (Secuencia 1)	1927	4	3	0

		Secuencias de cadena ligera de ratones que utilizan HULC		
Nombre del clon	Cepa de ratón	n.º de mutaciones de His conservadas en CDR3	n.º de hipermutaciones somáticas en la región marco conservada	n.º de hipermutaciones somáticas en CDR
AA (Secuencia 2)	1927	4	1	1
BB	1927	4	3	3
CC	1927	4	0	0
DD	1927	3	1	1
EE	1927	4	2	2
FF	1927	4	0	1
GG	1927	4	1	1
HH	1927	4	2	0
II	1930	3	1	1
JJ	1930	3	4	5
KK	1930	3	1	2
LL	1930	3	1	0

*Ejemplo 3.5. Unión dependiente del pH de anticuerpos monoclonales generados en ratones de cadena ligera universal con histidina basada en Vk1-39Jk5*

- 5 Con el fin de evaluar adicionalmente las características de unión dependiente del pH de los anticuerpos monoclonales aislados de ratones HULC y TS, se realizaron experimentos de unión en los que la fase de asociación anticuerpo/antígeno se observó a pH neutro y la fase de disociación anticuerpo/antígeno se observó a pH ya sea neutro o ácido.
- 10 Un chip sensor Biacore CM4 se derivatizó con un anticuerpo de conejo anti-Fc de ratón policlonal. Se capturaron sobrenadantes de anticuerpos monoclonales sobre la superficie de sensor anti-Fc de ratón. Se inyectaron dos concentraciones del inmunógeno, 50 nM (por duplicado) y 16,7 nM, sobre la superficie capturada con anticuerpo monoclonal a un caudal de 30 µl/min. La asociación antígeno-anticuerpo se controló a pH 7,4 durante 4 minutos y después se controló la disociación de antígeno del anticuerpo monoclonal capturado durante 15 minutos a pH 7,4 o
- 15 6,0. Se determinaron constantes de velocidad de disociación ( $k_d$ ) mediante procesamiento y ajuste de datos usando el software de ajuste de curva Scrubber versión 2.0 y se muestran en la Tabla 4. Se calcularon semividas disociativas ( $t_{1/2}$ ) a partir de las constantes de velocidad de disociación como:  $t_{1/2}$  (min) =  $(\ln 2/k_d)/60$  y se muestran en la Tabla 4. Se muestran gráficamente sensogramas que representan las características de asociación/disociación de varios anticuerpos enumerados en la Tabla 4 en diversas condiciones de pH en la FIG. 11. Las líneas
- 20 individuales en cada gráfico representan las respuestas de unión a diferentes concentraciones de los anticuerpos respectivos. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Los valores de semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) se indican encima de los respectivos sensogramas. La respuesta se mide en UR.

Tabla 4. Constantes de velocidad disociación ( $k_d$ ) y semividas disociativas ( $t_{1/2}$ ) de anticuerpos HULC o TS monoclonales que se unen a su inmunógeno a pH neutro y bajo.

Nombre del clon	Cadena ligera utilizada	Asociación a pH 7,4/Disociación a pH 7,4				Asociación a pH 7,4/Disociación a pH 6				Relación de pH 6,0/pH 7,4	
		Captura de mAb neutro	Inmunógeno 50 nM unido (UR)	$k_d$ (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	Captura de mAb bajo	Inmunógeno 50 nM unido (UR)	$k_d$ (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	$k_d$	$t_{1/2}$
AA	HULC (1927)	129	70	5,60E-05	206	122	73	2,18E-04	53	3,9	0,3
BB	HULC (1927)	350	165	6,00E-04	19	378	185	2,20E-03	5	3,7	0,3
CC	HULC (1927)	611	251	2,03E-04	57	545	226	6,68E-03	2	33,0	0,03
DD	HULC (1927)	182	75	3,55E-04	33	168	74	6,44E-04	18	1,8	0,6
HH	HULC (1927)	268	92	1,36E-04	85	251	91	5,39E-04	21	4,0	0,3
GG	HULC (1927)	353	110	2,78E-04	42	328	102	8,97E-04	13	3,2	0,3
FF	HULC (1927)	334	202	4,79E-05	241	364	220	6,90E-05	167	1,4	0,7
EE	HULC (1927)	339	124	5,08E-04	23	299	120	4,66E-04	25	0,9	1,1
II	HULC (1930)	387	174	1,22E-04	95	334	147	2,14E-04	54	1,8	0,6
JJ	HULC (1930)	363	14	9,83E-04	12	333	12	5,30E-04	22	0,5	1,9
KK	HULC (1930)	490	303	7,41E-05	156	484	295	1,29E-04	90	1,7	0,6
LL	HULC (1930)	636	41	3,09E-04	37	597	36	5,77E-04	20	1,9	0,5
MM*	TS (de ratón1927)	245	6	NA	NA	203	6	NA	NA	NA	NA
NN	TS (de ratón1927)	394	231	5,26E-04	22	378	231	9,35E-04	12	1,8	0,6
OO	TS	413	89	2,94E-04	39	400	83	3,57E-04	32	1,2	0,8

\* Los valores de  $k_d$  y  $t_{1/2}$  no se pudieron determinar debido a la baja señal de unión a antígeno

#### Ejemplo 4. Modificación mediante ingeniería genética de ratón modificado genéticamente que comprende una cadena ligera universal Vk3-20Jk1 sustituida con histidina

Un ratón que comprende una cadena ligera Vk3-20Jk1 común se generó como se describe en, por ejemplo, las Solicitudes de Patente de los EE.UU. N.º 13/022.759, 13/093.156, 13/412.936 y 13/488.628 (Publicaciones N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300 y 2013/0045492, respectivamente) y en el Ejemplo 1 anterior. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera Vk3-20Jk1 universal de línea germinal se expone en la SEQ ID NO: 59.

Se introdujeron sustituciones de histidina en el vector de dirección de cadena ligera universal Vk3-20Jk1 y ratones generados a partir del mismo usando una estrategia similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 3 para ratones de cadena ligera universal modificada con histidina Vk1-39Jk5 (HULC 1927 y 1930).

Brevemente, la estrategia para generar un vector de dirección de cadena ligera universal Vk3-20Jk1 modificado con histidina se resume en las FIG. 14A-14D. Un plásmido utilizado para generar un vector de dirección para ratón de cadena ligera común (universal) ("ratón ULC", se describe en, por ejemplo, el documento US2011/0195454A1), que contenía pBS + FRT-Ub-Hyg-FRT + líder Vk3-7 de ratón + Vk3-20Jk1 humano se modificó mediante mutagénesis dirigida al sitio (Kit QuickChange Lightning) para reemplazar Q105, Q106, Y107 y S109 o Q105, Q106 y S109 (véase la alineación en la FIG. 12) con residuos de histidina en la región CDR3 usando cebadores de mutagénesis dirigida al sitio que se muestran en la FIG. 13 (véase la FIG. 14A para esta etapa de modificación mediante ingeniería genética). Los vectores resultante (H105/106/107/109 y H105/106/109) se modificaron adicionalmente y se ligaron en un vector que comprendía región constante Igk de ratón, potenciadores de ratón, un brazo de homología 3' de ratón y un casete SPEC (FIG. 14B). La modificación adicional implicó la ligadura en un vector que llevaba un brazo de ratón 5' y que comprendía casete Frt-UB-NEO-Frt (FIG. 14B). Los vectores de dirección resultantes se sometieron a electroporación en células ES que comprendían la supresión del locus variable Igk de ratón (que comprende segmentos génicos variables y de unión  $\kappa$ ) (FIG. 14C-14D).

Se confirmaron clones de células ES positivas mediante el uso de una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) usando sondas específicas para la región de cadena ligera Vk3-20k1J1 modificada mediante ingeniería genética insertada en el locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno. Se muestran cebadores y sondas utilizados en el ensayo en la Tabla 5 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias; las ubicaciones de las sondas se representan en las FIG. 14C-14D.

Tabla 5: Cebadores y sondas utilizados para explorar células ES

Nombre de la sonda	Ensayo	Secuencia de sonda	Cebador 5'	Cebador 3'
Neo	GOA	TGGGCACAACA GACAATCGGCTG (SEQ ID NO: 38)	GGTGGAGAGG CTATTCGGC (SEQ ID NO: 39)	GAACACGGCGG CATCAG (SEQ ID NO: 40)
ULC-m1	GOA	CCATTATGATGCT CCATGCCTCTCT GTTC (SEQ ID NO: 41)	AGGTGAGGGT ACAGATAAGTG TTATGAG (SEQ ID NO: 42)	TGACAAATGCC TAATTATAGTGAT CA (SEQ ID NO: 43)
1635h2 (especifico de Vk3- 20Jk1)	GOA	AAAGAGCCACCC TCTCCTGCAGGG (SEQ ID NO: 65)	TCCAGGCACCC TGTCTTTG (SEQ ID NO: 66)	AAGTAGCTGCTG CTAACACTCTGAC T (SEQ ID NO: 67)
mIgKd2	Retención	GGCCACATTCCA TGGGTTC (SEQ ID NO: 47)	GCAAACAAAA CCACTGGCC (SEQ ID NO: 48)	CTGTTCTCTAAA ACTGGACTCCAC AGTAAATGGAAA (SEQ ID NO: 49)
mIgKp15	Retención	GGGCACTGGATA CGATGTATGG (SEQ ID NO: 50)	CACAGCTTGTG CAGCCTCC (SEQ ID NO: 51)	AGAAGAAGCCTG TACTACAGCATCC GTTTTACAGTCA (SEQ ID NO: 52)

El casete de selección NEO introducido mediante las construcciones diana se suprime mediante la transfección de células ES con un plásmido que expresa FLP (FIG. 14C y 14 RE). Opcionalmente, el casete de neomicina puede retirarse mediante la reproducción de ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se conserva en los ratones.

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se usaron como células ES donadoras y se introdujeron en un embrión de ratón en etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymiro et al. (2007) *F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech.* 25 (1): 91-99. Se produjeron VELOCIMICE® que llevaban independientemente un gen de cadena ligera humana modificado mediante ingeniería genética que contenía residuos de histidina mutados en una o más posiciones a lo largo de la secuencia, a partir de células ES dirigidas descritas anteriormente.

Se genotiparon crías y se seleccionaron crías heterocigotas para la cadena ligera humana modificada con histidina mediante ingeniería genética para caracterizar la expresión de la cadena ligera y las capacidades de unión de los anticuerpos expresados. Se enumeran cebadores y sondas para el genotipado de ratones que comprenden específicamente un gen de cadena ligera universal ya sea con tres (H105/106/109; "6183") o cuatro (H105/105/108/111; "6181") modificaciones con histidina en la Tabla 6 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias. Los ratones que contienen la modificación con histidina en sus cadenas ligeras universales se denominan en el presente documento ratones "HULC" (ratones de cadena ligera universal con histidina).

Tabla 6: Cebadores y sondas utilizados para el genotipado

Nombre de la sonda	Ensayo	Secuencia de la sonda	Cebador 5'	Cebador 3'
hVI494-1	GOA 6181 (4 His específico de ratón)	CTGTCATCACCATG G (SEQ ID NO: 68)	GCAGACTGGAG CCTGAAGATTTT (SEQ ID NO: 69)	CCGAACGTCCAAGG TGAGTG (SEQ ID NO: 70)
hVI495-1	GOA 6183 (3 His) específico de ratón	TACTGTCATCACT ATGG (SEQ ID NO: 71)	GCAGACTGGAG CCTGAAGATTTT (SEQ ID NO: 72)	CCGAACGTCCAA GGTGAGTG (SEQ ID NO: 73)

Se inmunizan ratones con antígeno de interés y se someten a ensayo para determinar la capacidad de generar anticuerpos con unión dependiente del pH.

#### Ejemplo 5. Reproducción de ratones que comprenden un ratón de cadena ligera universal humana reordenada sustituida con histidina (HULC)

Este Ejemplo describe varias otras cepas de ratón modificado genéticamente que pueden reproducirse a cualquiera de los ratones HULC que se describen en el presente documento para crear múltiples cepas de ratón modificado

genéticamente que alberga múltiples loci de inmunoglobulina modificados genéticamente.

5 *Gen inactivado (KO, del inglés knockout) de IgA endógeno.* Para optimizar el uso del locus de cadena ligera modificado mediante ingeniería genética, uno cualquiera de los animales HULC descritos anteriormente (por ejemplo, que comprende cadena ligera universal sustituida con histidina Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1) puede reproducirse a otro ratón que contiene una delección en el locus de cadena ligera  $\lambda$  endógeno. De esta manera, la progenie obtenida expresará, como su única cadena ligera, la región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada sustituida con histidina como se describe en los Ejemplos 3 y 4 anteriores. La reproducción se realiza mediante técnicas convencionales reconocidas en la técnica y, como alternativa, por un criador comercial (por ejemplo, The Jackson Laboratory). Se exploran cepas de ratón que llevan un locus de cadena ligera sustituida con histidina modificada mediante ingeniería genética y una delección del locus de cadena ligera  $\lambda$  endógeno se exploran para determinar la presencia de la única región de cadena ligera y la ausencia de cadenas ligeras  $\lambda$  de ratón endógeno.

15 *Locus de cadena pesada endógeno humanizado.* Se reproducen ratones que llevan un locus de cadena ligera de línea germinal humana modificado mediante ingeniería genética (ratones HULC) con ratones que contienen un reemplazo del locus de gen variable de cadena pesada de ratón endógeno con el locus de gen variable de cadena pesada humana (véase el documento US 6.596.541; *the VELOCIMMUNE® mouse*, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). El ratón VELOCIMMUNE® comprende un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada humana unidas operativamente a loci de región constante de ratón endógeno de manera que el ratón produce anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena pesada humana y una región constante de cadena pesada de ratón en respuesta a la estimulación antigénica.

25 Se obtienen ratones que llevan un reemplazo del locus de región variable de cadena pesada de ratón endógeno con el locus de región variable de cadena pesada humana y una única región variable de cadena ligera humana reordenada sustituida con histidina en el locus de cadena ligera  $\kappa$  endógeno. Se obtienen anticuerpos quiméricos inversos que contienen cadenas pesadas mutadas somáticamente (dominio variable de cadena pesada humana y  $C_H$  de ratón) con una única cadena ligera humana sustituida con histidina (HULC, dominio variable de cadena ligera humana y  $C_L$  de ratón) tras la inmunización con un antígeno de interés. Se identifican anticuerpos humanos dependientes de pH generados en dichos ratones usando aislamiento de anticuerpos y métodos de exploración conocidos en la técnica o descritos anteriormente. Se identifican secuencias de nucleótidos de regiones de cadena ligera y pesada variables de células B que expresan los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos sensibles al pH, y se producen anticuerpos completamente humanos mediante fusión de las secuencias de nucleótidos de regiones de cadena pesada y ligera variables a secuencias de nucleótidos  $C_H$  y  $C_L$  humanas, respectivamente, en un sistema de expresión adecuado.

### Equivalentes

40 Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando nada más que la experimentación habitual, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención que se describe en el presente documento.

### LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Anticuerpos de cadena ligera modificada mediante ingeniería genética con histidina y animales no humanos modificados genéticamente para la generación de los mismos

50 <130> 1260A-WO

<150> 61/611.950

<151> 16-03-2012

55 <150> 61/736.930

<151> 13-12-2012

<160> 81

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 95

<212> PRT

65 <213> Artificial

<220>  
<223> Sintética

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
85 90 95

5

<210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Sintética

15

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(21)

<400> 2

20 cag cag agc tac agc acc ccc

21

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
1 5

25

<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> Construcción sintética

<400> 3

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro  
1 5

35

<210> 4  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

40

<220>  
<223> sintética

	<220>		
	<221> CDS		
	<222> (1)..(21)		
5	<400> 4		
	cac cat agc cac agc acc cac		21
	His His Ser His Ser Thr His		
	1 5		
	<210> 5		
	<211> 7		
10	<212> PRT		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Construcción Sintética		
15	<400> 5		
	His His Ser His Ser Thr His		
	1 5		
20	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Sintética		
	<220>		
	<221> CDS		
30	<222> (1)..(21)		
	<400> 6		
	cac cag agc tac agc acc ccc		21
	His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro		
	1 5		
35	<210> 7		
	<211> 7		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> Construcción Sintética		
	<400> 7		
45	His Gln Ser Tyr Ser Thr Pro		
	1 5		
	<210> 8		
	<211> 21		
50	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
55	<220>		
	<221> CDS		
	<222> (1)..(21)		

	<400> 8	
	cag cat agc tac agc acc ccc	21
	Gln His Ser Tyr Ser Thr Pro	
	1 5	
5	<210> 9	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Construcción Sintética	
	<400> 9	
	Gln His Ser Tyr Ser Thr Pro	
	1 5	
15	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Sintética	
25	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(21)	
	<400> 10	21
	cag cag agc cac agc acc ccc	
	Gln Gln Ser His Ser Thr Pro	
	1 5	
30	<210> 11	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Construcción Sintética	
	<400> 11	
	Gln Gln Ser His Ser Thr Pro	
	1 5	
40	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Sintética	
50	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(21)	
	<400> 12	21
	cag cag agc tac agc acc cac	
	Gln Gln Ser Tyr Ser Thr His	
	1 5	
55		

5  
 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 13  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr His  
 1 5

10  
 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)  
 <400> 14  
 cac cat agc tac agc acc ccc  
 His His Ser Tyr Ser Thr Pro  
 1 5

15  
 20  
 25  
 21

30  
 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 15  
 His His Ser Tyr Ser Thr Pro  
 1 5

35  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)  
 <400> 16  
 cac cag agc cac agc acc ccc  
 His Gln Ser His Ser Thr Pro  
 1 5

40  
 45  
 50  
 21

55  
 <210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

	<223> Construcción Sintética	
	<400> 17	
	His Gln Ser His Ser Thr Pro	
	1 5	
5		
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Sintética	
	<220>	
15	<221> CDS	
	<222> (1)..(21)	
	<400> 18	
	cac cag agc tac agc acc cac	21
	His Gln Ser Tyr Ser Thr His	
	1 5	
20		
	<210> 19	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
25		
	<220>	
	<223> Construcción Sintética	
	<400> 19	
	His Gln Ser Tyr Ser Thr His	
	1 5	
30		
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
40		
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(21)	
	<400> 20	
	cag cat agc cac agc acc ccc	21
	Gln His Ser His Ser Thr Pro	
	1 5	
45		
	<210> 21	
	<211> 7	
	<212> PRT	
50	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Construcción Sintética	
55		
	<400> 21	
	Gln His Ser His Ser Thr Pro	
	1 5	

	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Sintética	
	<220>	
10	<221> CDS	
	<222> (1)..(21)	
	<400> 22	
	cag cat agc tac agc acc cac	21
	Gln His Ser Tyr Ser Thr His	
	1 5	
15	<210> 23	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Construcción Sintética	
	<400> 23	
	Gln His Ser Tyr Ser Thr His	
25	1 5	
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
35	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(21)	
	<400> 24	
	cag cag agc cac agc acc cac	21
	Gln Gln Ser His Ser Thr His	
40	1 5	
	<210> 25	
	<211> 7	
	<212> PRT	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Construcción Sintética	
50	<400> 25	
	Gln Gln Ser His Ser Thr His	
	1 5	
	<210> 26	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	

<223> Sintética  
 <220>  
 <221> CDS  
 5 <222> (1)..(21)  
 <400> 26  
 cac cat agc cac agc acc ccc  
 His His Ser His Ser Thr Pro 21  
 1 5  
 10 <210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 27  
 His His Ser His Ser Thr Pro  
 1 5  
 20 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Sintética  
 30 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)  
 <400> 28  
 cac cat agc tac agc acc cac  
 His His Ser Tyr Ser Thr His 21  
 1 5  
 35 <210> 29  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Construcción Sintética  
 <400> 29  
 His His Ser Tyr Ser Thr His  
 1 5  
 45 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sintética  
 55 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)  
 <400> 30

cac cag agc cac agc acc cac 21  
 His Gln Ser His Ser Thr His  
 1 5

5 <210> 31  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 31  
 His Gln Ser His Ser Thr His  
 1 5

15 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)

<400> 32 21  
 cag cat agc cac agc acc cac  
 Gln His Ser His Ser Thr His  
 1 5

30 <210> 33  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 33  
 Gln His Ser His Ser Thr His  
 1 5

40 <210> 34  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Sintética

<400> 34 45  
 cttactactg tcaacatagt cacagtaecc atccgatcac cttcg

50 <210> 35  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> Sintética

ES 2 679 369 T3

	<400> 35		
	<b>caacttacta ctgtcaccat agtcacagta cccatccgat caccttcggc</b>		<b>50</b>
5	<210> 36 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Sintética		
	<400> 36		
	<b>cgaaggatgat cggatgggta ctgtgactat gttgacagta gtaag</b>		<b>45</b>
15	<210> 37 <211> 50 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Sintética		
	<400> 37		
25	<b>gccgaaggatg atcggatggg tactgtgact atggtgacag tagtaagttg</b>		<b>50</b>
30	<210> 38 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial		
35	<220> <223> Sintética		
	<400> 38		
35	<b>tgggcacaac agacaatcgg ctg</b>		<b>23</b>
40	<210> 39 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial		
45	<220> <223> Sintética		
	<400> 39		
45	<b>ggtggagagg ctattcggc</b>		<b>19</b>
50	<210> 40 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial		
55	<220> <223> Sintética		
	<400> 40		
55	<b>gaacacggcg gcatcag</b>		<b>17</b>
60	<210> 41 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial		

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 41 <b>ccattatgat gctccatgcc tctctgttc</b>	29
10	<210> 42 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Sintética	
15	<400> 42 <b>aggtgagggt acagataagt gttatgag</b>	28
20	<210> 43 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Sintética	
25	<400> 43 <b>tgacaaatgc cctaattata gtgatca</b>	27
30	<210> 44 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Sintética	
35	<400> 44 <b>atcagcagaa accagggaaa gccct</b>	26
40	<210> 45 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Sintética	
50	<400> 45 <b>gggcaagtca gagcattagc a</b>	21
55	<210> 46 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Sintética	
60	<400> 46 <b>tgcaaactgg atgcagcata g</b>	21
60	<210> 47 <211> 19	

	<212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> Sintética	
	<400> 47 <b>ggccacattc catgggttc</b>	19
10	<210> 48 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Sintética	
	<400> 48 <b>gcaaacaaaa accactggcc</b>	20
20	<210> 49 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Sintética	
30	<400> 49 <b>ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa</b>	37
35	<210> 50 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Sintética	
	<400> 50 <b>gggcactgga tacgatgtat gg</b>	22
45	<210> 51 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintética	
	<400> 51 <b>cacagcttgt gcagcctcc</b>	19
55	<210> 52 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Sintética	
	<400> 52 <b>agaagaagcc tgtactacag catccgtttt acagtca</b>	37

5	<p>&lt;210&gt; 53                      &lt;211&gt; 19                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
10	<p>&lt;400&gt; 53  <b>accatagtca cagtaccca</b></p>	19
15	<p>&lt;210&gt; 54                      &lt;211&gt; 23                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
20	<p>&lt;400&gt; 54  <b>agcagtctgc aacctgaaga ttt</b></p>	23
25	<p>&lt;210&gt; 55                      &lt;211&gt; 18                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
30	<p>&lt;400&gt; 55  <b>cccttggccg aaggtgat</b></p>	18
35	<p>&lt;210&gt; 56                      &lt;211&gt; 19                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p>	
40	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
	<p>&lt;400&gt; 56  <b>atagtcacag tacccatcc</b></p>	19
45	<p>&lt;210&gt; 57                      &lt;211&gt; 23                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p>	
50	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
55	<p>&lt;400&gt; 57  <b>agtctgcaac ctgaagattt tgc</b></p>	23
60	<p>&lt;210&gt; 58                      &lt;211&gt; 18                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p>	
	<p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	

<400> 58  
cccttgccg aaggtgat

18

5 <210> 59  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Sintética

<400> 59

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 60  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Sintética

<400> 60

25 gattttgcag tgtattactg tcagcagtat ggtagctcac cttggacgtt cggc

54

30 <210> 61  
<211> 54  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sintética

35 <400> 61

gattttgcag tgtattactg tcatcaccat ggtcactcac cttggacgtt cggc

54

40 <210> 62  
<211> 54  
<212> ADN

ES 2 679 369 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
5	<400> 62	
	<b>gccgaacgtc caaggtgagt gaccatggtg atgacagtaa tacactgcaa aatc</b>	<b>54</b>
10	<210> 63	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 63	
	<b>gcagtgtatt actgtcatca ctatgggtcac tcaccttggg cgttcgg</b>	<b>47</b>
20	<210> 64	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 64	
	<b>ccgaacgtcc aaggtgagtg accatagtgga tgacagtaat aactgc</b>	<b>47</b>
30	<210> 65	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 65	
40	<b>aaagagccac cctctcctgc aggg</b>	<b>24</b>
45	<210> 66	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
50	<400> 66	
	<b>tccaggcacc ctgtctttg</b>	<b>19</b>
55	<210> 67	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
60	<400> 67	
	<b>aagtagctgc tgctaacact ctgact</b>	<b>26</b>

5	<p>&lt;210&gt; 68                      &lt;211&gt; 15                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
10	<p>&lt;400&gt; 68  <b>ctgtcatcac catgg</b></p>	15
15	<p>&lt;210&gt; 69                      &lt;211&gt; 23                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
20	<p>&lt;400&gt; 69  <b>gcagactgga gcctgaagat ttt</b></p>	23
25	<p>&lt;210&gt; 70                      &lt;211&gt; 20                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
30	<p>&lt;400&gt; 70  <b>ccgaacgtcc aaggtgagtg</b></p>	20
35	<p>&lt;210&gt; 71                      &lt;211&gt; 17                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
40	<p>&lt;400&gt; 71  <b>tactgtcatc actatgg</b></p>	17
45	<p>&lt;210&gt; 72                      &lt;211&gt; 22                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
50	<p>&lt;400&gt; 72  <b>gcagactgga gcctgaagat tt</b></p>	22
55	<p>&lt;210&gt; 73                      &lt;211&gt; 20                      &lt;212&gt; ADN                      &lt;213&gt; Artificial</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;223&gt; Sintética</p>	
60	<p>&lt;400&gt; 73</p>	

	ccgaacgtcc aaggtgagtg	20
5	<210> 74 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintética	
15	<220> <221> CDS <222> (1)..(21)	
	<400> 74 cag cag tat ggt agc tca cct Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro 1 5	21
20	<210> 75 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial	
25	<220> <223> Construcción Sintética	
	<400> 75 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro 1 5	
30	<210> 76 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Sintética	
40	<220> <221> CDS <222> (1)..(21)	
	<400> 76 cat cac cat ggt cac tca cct His His His Gly His Ser Pro 1 5	21
45	<210> 77 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial	
50	<220> <223> Construcción Sintética	
	<400> 77 His His His Gly His Ser Pro 1 5	
55	<210> 78 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	

<220>  
 <223> Sintética

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)

<400> 78  
 cat cac tat ggt cac tca cct  
 His His Tyr Gly His Ser Pro  
 1 5

10

<210> 79  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 79  
 His His Tyr Gly His Ser Pro  
 1 5

20

<210> 80  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Sintética

30

<400> 80  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
 85 90 95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

35

<210> 81  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 679 369 T3

<220>

<223> Sintética

<400> 81

5 caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un roedor modificado genéticamente que comprende en su línea germinal, en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógena, un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana derivada de una secuencia Yk1-39/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina, y en el que
- 5
- 10 (i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia del gen Yk1-39/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina
- 15 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111 y una combinación de las mismas;
- (b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o
- (c) en las posiciones 106, 108 y 111; o
- 20 (ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el Vk3-20/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina
- 25 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;
- (b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o
- (c) en las posiciones 105, 106 y 109;
- 30 en el que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.
2. El roedor de la reivindicación 1, en el que:
- 35 la secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de roedor, tal como una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina endógena,
3. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- 40 el roedor comprende adicionalmente en su línea germinal una secuencia génica no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos unidos operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, opcionalmente en el que la secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es una secuencia génica de región constante de
- 45 cadena pesada de inmunoglobulina de roedor, tal como una secuencia génica de región constante de inmunoglobulina de roedor endógena, opcionalmente en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de roedor endógeno.
4. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el roedor carece de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina no reordenada funcional.
- 50
5. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la única secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana reordenada deriva de una secuencia del gen Yk1-39/Jk5 o Vk3-20/Jk1 reordenada.
- 55
6. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el roedor comprende una población de anticuerpos específicos de antígeno que, en comparación con una población de anticuerpos específicos de antígeno generados en roedores que no comprenden un codón de histidina sustituido en una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, se enriquece para anticuerpos específicos de antígeno que presentan una disminución en la semivida disociativa ( $t_{1/2}$ ) a un pH ácido en comparación con un pH neutro de al menos aproximadamente 2 veces,
- 60 al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces u opcionalmente aproximadamente 30 veces o más.
- 65
7. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el roedor expresa un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana con una sustitución de al menos un

residuo no de histidina con una histidina en una posición de aminoácido codificada por al menos un codón sustituido en la secuencia génica de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina.

- 5 8. El roedor de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el roedor es una rata.
9. El roedor de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el roedor es un ratón.
- 10 10. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que la secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina se selecciona entre una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de una rata o de un ratón, opcionalmente en un locus de cadena ligera de rata endógeno o un locus de cadena ligera de ratón endógeno, respectivamente; y  
 en el que el roedor comprende opcionalmente además en su línea germinal una secuencia no reordenada de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende segmentos V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> humanos unidos operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionada entre una secuencia génica de región constante de cadena pesada de rata o de ratón; opcionalmente en un locus de cadena pesada de rata endógeno o en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno, respectivamente.
- 15 11. El roedor de la reivindicación 10, en el que el roedor expresa una población de anticuerpos específicos de antígeno en respuesta a un antígeno de interés en el que todos los anticuerpos de la población comprenden:  
 dominios variables de cadena ligera de inmunoglobulina derivados de la misma única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera humana que comprende una sustitución de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina, y  
 25 cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden dominios variables de cadena pesada humana derivados de un repertorio de segmentos V, D y J de cadena pesada humana.
- 30 12. Un método de obtención del roedor decualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende reemplazar todas las secuencias génicas de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina funcionales en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno en el roedor con la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana, en el que la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina, tal como una secuencia génica de región constante de cadena ligera de roedor endógena en el locus de cadena ligera de inmunoglobulina de roedor endógeno.
- 35 13. Un método de generación de un anticuerpo que presenta unión dependiente del pH a un antígeno de interés que comprende:  
 40 inmunizar un roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o un roedor obtenido mediante el método de la reivindicación 12 con un antígeno de interés; y  
 obtener una célula B que expresa un anticuerpo que se une al antígeno de interés con una afinidad deseada a un pH neutro mientras que muestra una unión reducida al antígeno de interés a un pH ácido y, opcionalmente, (a) usar la célula B para fabricar un hibridoma o (b) aislar el ADN que codifica el anticuerpo de la célula B o el hibridoma y poner el ADN en vectores de expresión y transfectar los vectores en una célula hospedadora.
- 45 14. El método de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo presenta una semivida disociativa (t<sub>1/2</sub>) a pH ácido y 37 °C de aproximadamente 2 minutos o menos.
- 50 15. El método de la reivindicación 13 o 14, en el que el método es para fabricar un anticuerpo biespecífico que presenta unión dependiente del pH a uno o más antígenos.
- 55 16. El método de la reivindicación 15, en el que el método comprende:  
 (a) identificar una célula B que codifica un primer dominio variable de cadena pesada que se une a un primer epítipo de interés y expresa un anticuerpo que presenta unión a antígeno dependiente de pH y aislar un primer ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada; e  
 60 (b) identificar una célula B que codifica un segundo dominio variable de cadena pesada que se une a un segundo epítipo de interés y expresa un anticuerpo que presenta unión a antígeno dependiente de pH y aislar un segundo ácido nucleico que codifica la segunda región variable de cadena pesada;
- 65 (c) seleccionar una tercera secuencia de ácido nucleico derivada de la única secuencia reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana; y

(d) expresar las secuencias de ácido nucleico primera, segunda y tercera para formar el anticuerpo biespecífico.

5 17. Una célula de roedor aislada del roedor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o aislada de un roedor obtenido mediante el método de la reivindicación 12, en la que la célula comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y deriva de una secuencia Yk1-39/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, y en la que

10 (i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia del gen Yk1-39/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

15 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111, y una combinación de las mismas

(b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o

(c) en las posiciones 106, 108 y 111; o

20 (ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el Vk3-20/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

25 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;

(b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o

(c) en las posiciones 105, 106 y 109;

30 en la que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.

18. La célula de roedor de la reivindicación 17 en la que la célula es una célula B.

35 19. Un hibridoma fabricado a partir de una célula B aislada del roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o un roedor obtenido mediante el método de la reivindicación 12, en el que el hibridoma comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que está unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y deriva de una secuencia Yk1-39/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, y en el que

40 (i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia Yk1-39/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

45 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111, y una combinación de las mismas

(b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o

(c) en las posiciones 106, 108 y 111; o

50 (ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el Vk3-20/Jk que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

55 (a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;

(b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o

(c) en las posiciones 105, 106 y 109;

60 en el que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.

65 20. Una célula ES de roedor que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende, en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógena, una única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina y derivada de una secuencia Yk139/Jk o Vk3-20/Jk reordenada, y en la que

(i) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende la secuencia del gen Y $\kappa$ 1-39/J $\kappa$  que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

5

(a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 108, 111, y una combinación de las mismas

(b) en las posiciones 105, 106, 108 y 111; o

10

(c) en las posiciones 106, 108 y 111; o

(ii) la única secuencia génica reordenada de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende el V $\kappa$ 3-20/J $\kappa$  que comprende un reemplazo de al menos un codón no de histidina con un codón de histidina diseñado para expresar una histidina

15

(a) en una posición seleccionada entre 105, 106, 107, 109 y una combinación de las mismas;

(b) en las posiciones 105, 106, 107 y 109, o

20

(c) en las posiciones 105, 106 y 109;

en la que las posiciones son de acuerdo con la numeración IMGT.

IGKV1-39*01	-----FR1-IMGT-----   CDR1   -----FR2-IMGT---   C   ----- DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS .....F...T.H.....I.....V...YT..... A.....I.NF.....G.YN..... .....HN.NN.....H.....N..... ..... .....A...T.N..... ..... A.L.....N.D..... A.....N.N...H.....D.F..... A.L..... A..... A.L.....M.....	
IGKV1-39*01	-----FR3-IMGT-----   CDR3-  RFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYQCQSYST-P----- ...A.....T.....NI...FTFGPGTKVDIKR .....I.....H-----LTFGGGTKVEIKR ...Y...T.H...GN.....SMYTFGQGTQLEIKR .....H.....I...ITFGQGTRLEIKR .....H...I...ITFGQGTRLEIKR ...T.H.....H.....ITFGQGTRLEIKR ...T.....H.....ITFGQGTRLEIKR .....P.ITFGQGTRVEIKR ...K.....I.H.ITFGQGTKLEIKR .....H.IP.ITFGQGTRLEIK. ...T.....R.....H..P.ITFGQGTKVEIKR	SEQ ID NO:1

FIG. 1

	105	106		108		111	
	Q	Q	S	Y	S	T	P
TS	CAG	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:3
							SEQ ID NO:2
							SEQ ID NO:5
H105/106/108/111	<b>H</b>	<b>H</b>	S	<b>H</b>	S	T	<b>H</b>
	CAC	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:4
H105	CAC	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:6
H106	CAG	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:8
H108	CAG	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:10
H111	CAG	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:12
H105/106	CAC	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:14
H105/108	CAC	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:16
H105/111	CAC	CAG	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:18
H106/108	CAG	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:20
H106/111	CAG	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:22
H108/111	CAG	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:24
H105/106/108	CAC	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CCC
							SEQ ID NO:26
H105/106/111	CAC	CAT	AGC	TAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:28
H105/108/111	CAC	CAG	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:30
H106/108/111	CAG	CAT	AGC	CAC	AGC	ACC	CAC
							SEQ ID NO:32

FIG. 2

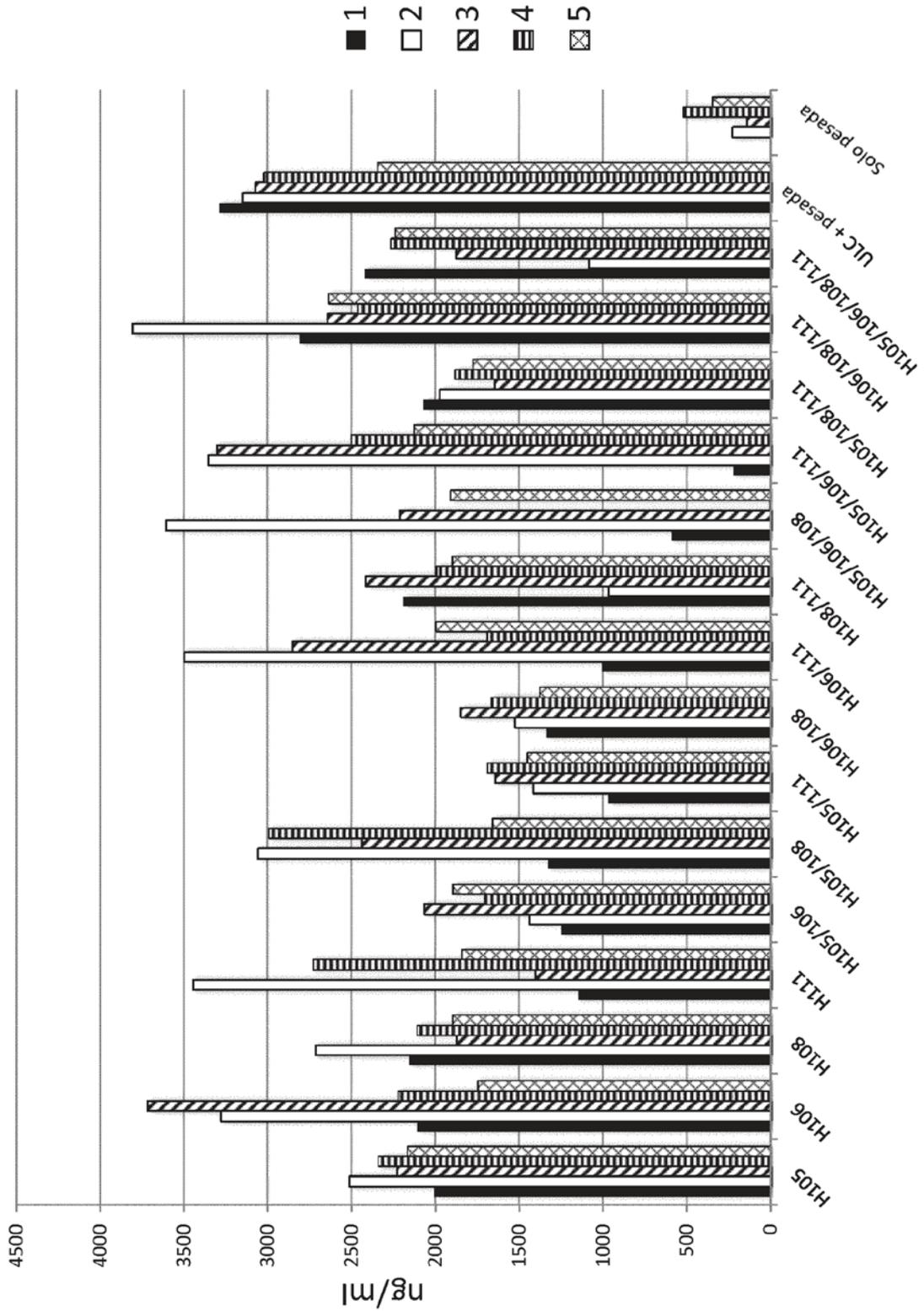


FIG. 3

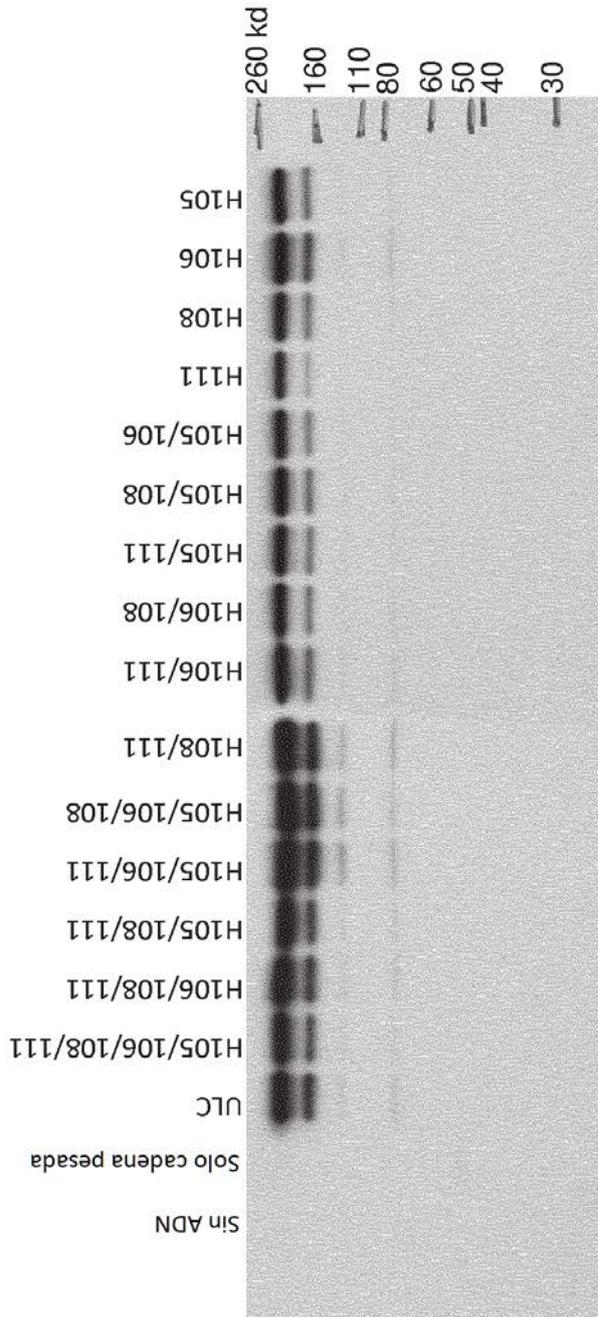


FIG. 4

Cadena pesada	Cinética a pH 7,4										Cinética a pH 5,75						Relación de pH bajo/pH neutro		
	Mutante de cadena ligera	mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (min)	mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (min)	ka	kd	KD			
1	H105	488	47,2	3,52E+05	9,30E-03	2,64E-08	1,2	378	37,8	4,24E+05	1,38E-02	3,24E-08	0,8	1,2	1,5	1,2			
	H106	620	73,7	3,22E+05	3,67E-03	1,14E-08	3,1	505	65,4	3,66E+05	4,86E-03	1,33E-08	2,4	1,1	1,3	1,2			
	H108	648	99,0	3,17E+05	2,07E-03	6,54E-09	5,6	496	80,7	3,59E+05	3,02E-03	8,41E-09	3,8	1,1	1,5	1,3			
	H111	669	81,0	3,01E+05	3,81E-03	1,27E-08	3,0	536	62,8	3,32E+05	5,41E-03	1,63E-08	2,1	1,1	1,4	1,3			
	H105/106	492	55,6	3,74E+05	6,44E-03	1,72E-08	1,8	404	45,7	4,30E+05	1,01E-02	2,34E-08	1,1	1,2	1,6	1,4			
	H105/108	538	75,2	3,28E+05	4,17E-03	1,27E-08	2,8	416	56,3	3,87E+05	7,43E-03	1,92E-08	1,6	1,2	1,8	1,5			
	H105/111	501	44,6	3,44E+05	9,77E-03	2,84E-08	1,2	402	31,9	4,06E+05	1,70E-02	4,19E-08	0,7	1,2	1,7	1,5			
	H106/108	494	64,9	3,36E+05	4,14E-03	1,23E-08	2,8	407	43,0	4,07E+05	1,17E-02	2,86E-08	1,0	1,2	2,8	2,3			
	H106/111	536	78,2	3,09E+05	3,10E-03	1,00E-08	3,7	423	61,4	3,62E+05	4,68E-03	1,29E-08	2,5	1,2	1,5	1,3			
	H108/111	584	78,5	3,11E+05	3,80E-03	1,22E-08	3,0	473	59,0	3,50E+05	6,13E-03	1,75E-08	1,9	1,1	1,6	1,4			
	H105/106/108	442	51,2	3,72E+05	6,38E-03	1,71E-08	1,8	370	28,4	4,26E+05	2,13E-02	5,00E-08	0,5	1,1	3,3	2,9			
	H105/106/111	473	62,8	3,40E+05	4,55E-03	1,34E-08	2,5	378	47,6	4,07E+05	7,42E-03	1,82E-08	1,6	1,2	1,6	1,4			
	H105/108/111	433	49,5	3,57E+05	7,42E-03	2,08E-08	1,6	354	31,3	4,09E+05	1,73E-02	4,23E-08	0,7	1,1	2,3	2,0			
	H106/108/111	491	66,6	3,44E+05	3,82E-03	1,11E-08	3,0	415	43,3	3,91E+05	1,06E-02	2,72E-08	1,1	1,1	2,8	2,5			
	H105/106/108/111	454	57,9	3,51E+05	5,77E-03	1,64E-08	2,0	368	36,8	4,06E+05	1,35E-02	3,32E-08	0,9	1,2	2,3	2,0			
ULC + pesada	586	76,0	3,16E+05	3,85E-03	1,22E-08	3,0	483	66,5	3,45E+05	4,58E-03	1,33E-08	2,5	1,1	1,2	1,1				
Solo pesada	141	-1,3	SU	SU	SU	SU	107	-6,7	SU	SU	SU	SU	SU	Control negativo					
Sin ADN	60	-1,5	SU	SU	SU	SU	26	-7,2	SU	SU	SU	SU	SU	Control negativo					

FIG. 5A

Cadena pesada	Cinética a pH 7,4										Cinética a pH 5,75					Relación de pH bajo/pH neutro		
	Mutante de cadena ligera	mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	Kd (M)	t <sub>1/2</sub> (min)	mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	Kd (M)	t <sub>1/2</sub> (min)	ka (1/Ms)	Kd (M)	t <sub>1/2</sub> (min)	ka	Kd	kd	
	H105	720	33,7	1,02E+05	9,10E-04	8,89E-09	12,7	0,3	SU	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo				
	H106	735	32,9	9,11E+04	4,47E-04	4,91E-09	25,8	4,3	2,27E+04	6,41E-03	2,82E-07	1,8	0,2	14,3	57,4			
	H108	728	32,2	8,48E+04	2,67E-04	3,14E-09	43,3	3,6	1,16E+03	3,41E-03	2,93E-06	3,4	0,0	12,8	933,1			
	H111	802	42,4	1,17E+05	1,15E-04	9,88E-10	100,3	14,1	3,01E+04	7,08E-04	2,35E-08	16,3	0,3	6,1	23,8			
	H105/106	570	24,9	8,51E+04	2,92E-04	3,43E-09	39,5	2,4	1,14E+04	6,47E-03	5,69E-07	1,8	0,1	22,1	165,9			
	H105/108	723	28,4	8,73E+04	1,30E-03	1,49E-08	8,9	-2,6	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo					
	H105/111	627	28,5	8,82E+04	3,60E-04	4,08E-09	32,1	2,3	1,02E+04	1,30E-02	1,27E-06	0,9	0,1	36,2	311,3			
	H106/108	550	21,1	6,75E+04	9,12E-04	1,35E-08	12,7	-1,9	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo					
	H106/111	808	32,7	9,01E+04	6,78E-04	7,52E-09	17,0	0,9	SU	SU	SU	SU	No binding at Low pH					
	H108/111	801	40,5	1,17E+05	9,80E-05	8,40E-10	117,8	10,6	1,87E+04	5,84E-04	3,12E-08	19,8	0,2	6,0	37,1			
	H105/106/108	409	13,0	8,21E+04	4,29E-04	5,22E-09	26,9	-4,4	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo					
	H105/106/111	767	9,3	4,84E+04	1,25E-03	2,58E-08	9,3	-6,1	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo					
	H105/108/111	578	24,5	8,99E+04	2,87E-04	3,19E-09	40,2	-0,7	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo					
	H106/108/111	765	15,1	5,04E+04	1,65E-03	3,27E-08	7,0	-5,9	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo					
	H105/106/108/111	723	0,3	SU	SU	SU	SU	-7,0	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH sometido a ensayo					
	ULC + pesada	781	39,8	1,13E+05	1,78E-04	1,57E-09	64,9	11,7	2,04E+04	1,22E-03	6,00E-08	9,4	0,2	6,9	38,2			
	Solo pesada	143	-1,8	SU	SU	SU	SU	-6,1	SU	SU	SU	SU	Control negativo					
	Sin ADN	63	-2,1	SU	SU	SU	SU	-6,4	SU	SU	SU	SU	Control negativo					

FIG. 5B

Cadena pesada	Mutante de cadena ligera	Cinética a pH 7,4						Cinética a pH 5,75						Relación de pH bajo/pH neutro		
		mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t <sup>1/2</sup> (min)	mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t <sup>1/2</sup> (min)	ka	kd	KD
3	H105	574	12,4	5,64E+04	1,21E-03	2,15E-08	9,5	496	0,1	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo		
	H106	662	16,1	7,37E+04	5,36E-04	7,27E-09	21,5	584	3,0	3,00E+04	4,79E-03	1,58E-07	2,4	0,4	8,9	21,7
	H108	518	12,3	4,82E+04	2,15E-04	4,46E-09	53,7	440	2,2	3,70E+04	1,25E-03	3,40E-08	9,3	0,8	5,8	7,6
	H111	480	9,1	1,82E+04	4,16E-04	2,28E-08	27,7	406	0,4	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo		
	H105/106	487	7,4	1,82E+04	7,45E-03	4,10E-07	1,6	423	-4,1	SU	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo		
	H105/108	548	11,8	3,25E+04	5,25E-04	1,62E-08	22,0	468	0,0	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo		
	H105/111	504	7,9	1,06E+04	1,66E-03	1,57E-07	7,0	430	-1,6	SU	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo		
	H106/108	487	10,7	6,64E+04	2,91E-04	4,38E-09	39,7	424	-4,2	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo		
	H106/111	563	10,5	2,75E+04	3,71E-04	1,35E-08	31,2	482	-1,9	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo		
	H108/111	528	10,1	1,10E+04	8,01E-05	7,27E-09	144,2	449	-0,5	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo		
	H105/106/108	470	6,4	2,64E+04	5,40E-03	2,04E-07	2,1	412	-5,3	SU	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo		
	H105/106/111	539	0,8	SU	SU	SU	SU	462	-5,6	SU	SU	SU	SU	No binding at either pH tested		
	H105/108/111	419	6,5	1,76E+04	4,01E-04	2,27E-08	28,8	354	-3,8	SU	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo		
	H106/108/111	509	3,3	5,47E+04	9,07E-04	1,66E-08	12,7	443	-5,9	SU	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo		
	H105/106/108/111	450	-1,1	SU	SU	SU	SU	382	-6,4	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH sometido a ensayo		
	ULC + pesada	688	16,9	3,54E+04	3,57E-04	1,01E-08	32,3	598	5,0	1,16E+04	1,76E-03	1,52E-07	6,6	0,3	4,9	15,0
Solo pesada	152	-1,6	SU	SU	SU	SU	127	-5,4	SU	SU	SU	SU	Control negativo			
Sin ADN	54	-1,7	SU	SU	SU	SU	30	-5,6	SU	SU	SU	SU	Control negativo			

FIG. 5C

Cadena pesada	Mutante de cadena ligera	Cinética a pH 7,4						Cinética a pH 5,75						Relación de pH bajo/pH neutro		
		mAb captu- rado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t <sub>1/2</sub> (min)	mAb captu- rado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t <sub>1/2</sub> (min)	ka	kd	KD
4	H105	598	4,9	2,80E+04	1,38E-03	4,91E-08	8,4	512	-0,2	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H106	569	7,1	1,49E+04	9,67E-04	6,49E-08	11,9	494	1,2	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H108	587	6,3	2,25E+04	2,02E-03	8,96E-08	5,7	500	-0,9	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H111	606	5,6	3,46E+04	2,19E-03	6,33E-08	5,3	521	-0,9	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H105/106	517	3,1	2,00E+04	2,05E-03	1,03E-07	5,6	460	-1,1	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H105/108	581	2,5	1,61E+05	2,30E-03	1,43E-08	5,0	506	-2,7	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H105/111	575	3,8	1,01E+04	1,70E-03	1,68E-07	6,8	504	-2,0	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H106/108	498	2,5	4,01E+04	6,07E-04	1,51E-08	19,0	447	-3,9	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H106/111	587	3,0	7,85E+04	9,20E-04	1,17E-08	12,6	509	-2,6	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H108/111	599	4,0	9,68E+04	2,02E-03	2,09E-08	5,7	528	-2,6	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H105/106/108	64	-1,7	SU	SU	SU	SU	46	-5,4	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/106/111	561	1,1	SU	SU	SU	SU	493	-2,8	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/108/111	521	2,7	7,66E+04	1,29E-03	1,68E-08	9,0	461	-3,2	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H106/108/111	577	1,3	SU	SU	SU	SU	514	-4,2	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/106/108/111	554	0,6	SU	SU	SU	SU	495	-4,8	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	ULC + pesada	585	7,4	5,69E+04	2,01E-03	3,53E-08	5,7	527	1,9	SU	SU	SU	Sin unión a pH bajo			
Solo pesada	187	-2,4	SU	SU	SU	SU	161	-5,4	SU	SU	SU					
Sin ADN	49	-2,6	SU	SU	SU	SU	25	-5,6	SU	SU	SU			Control negativo		

FIG. 5D

Cadena pesada	Cinética a pH 7,4							Cinética a pH 5,75							Relación de pH bajo/pH neutro		
	Mutante de cadena ligera	mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t <sub>1/2</sub> (min)	mAb capturado (UR)	Unión a antígeno 50 nM (UR)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t <sub>1/2</sub> (min)	ka	kd	KD	
5	H105	522	3,2	5,05E+04	9,48E-03	1,88E-07	1,2	463	-4,3	SU	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H106	496	0,3	SU	SU	SU	SU	437	-5,2	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H108	475	-0,1	SU	SU	SU	SU	415	-5,7	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H111	523	1,6	SU	SU	SU	SU	463	-4,7	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/106	534	-0,6	SU	SU	SU	SU	472	-5,5	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/108	499	2,0	5,80E+04	1,16E-02	1,99E-07	1,0	433	-5,5	SU	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H105/111	489	0,1	SU	SU	SU	SU	426	-4,7	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H106/108	441	-0,5	SU	SU	SU	SU	386	-4,2	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H106/111	529	-0,8	SU	SU	SU	SU	461	-6,3	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H108/111	495	4,1	1,73E+05	1,06E-02	6,11E-08	1,1	435	-4,0	SU	SU	SU	SU	Mala unión a pH neutro, sin unión a pH bajo			
	H105/106/108	505	-1,1	SU	SU	SU	SU	444	-5,5	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/106/111	499	-1,7	SU	SU	SU	SU	438	-5,8	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/108/111	436	0,8	SU	SU	SU	SU	388	-3,7	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H106/108/111	539	-1,4	SU	SU	SU	SU	477	-4,0	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	H105/106/108/111	556	-1,6	SU	SU	SU	SU	490	-4,4	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	ULC + pesada	516	0,6	SU	SU	SU	SU	451	-5,0	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
	Solo pesada	144	-1,3	SU	SU	SU	SU	122	-5,7	SU	SU	SU	SU	Sin unión a ningún pH ensayado			
Sin ADN	47	-1,4	SU	SU	SU	SU	25	-5,8	SU	SU	SU	SU	Control negativo				

FIG. 5E

$V_H$	$V_K$	$K_D$ a pH7,4 (nM)	$K_D$ a pH5,75 (nM)	$T_{1/2}$ a pH7,4 (min)	$T_{1/2}$ a pH5,75 (min)
2	ULC Parental	1,6	60	65	9,4
2	ULC (His105,106)	3,4	570	39	1,8
2	ULC (His105,111)	4,1	1270	32	0,9
2	ULC (His105,108,111)	3,2	SU	40	SU
2	ULC (His105,106,108)	5,2	SU	27	SU
3	ULC Parental	10,1	152	32	6,6
3	ULC (His106,108)	4,4	SU	40	SU
3	ULC (His108,111)	7,3	SU	144	SU
6	ULC Parental	3,0	2,4	10	6
6	ULC (His105,111)	3,5	SU	9	SU
6	ULC (His106, 108,111)	2,0	SU	16	SU

FIG. 6

Cebadores de mutagénesis dirigida al sitio para sustituciones con histidina en CDR3 de cadena ligera universal de hVK1-39JK5

Nombre del cebador	Secuencia	% de GC	N	% de desemparejamiento	Tm
ESTIRPE GERMINAL hVH1-39/JK5	CAACTTACTACTGTGTCAACA GAGTTACAGTATCCCTCCGATCACCTTCGGC				
1633-H106/108/111 F	CTTACTACTGTCAACA TAGTCACAGTACCCATCCGATCACCTTCG	47,0	45	6,7	79,0
1633-H105/106/108/111 F	CAACTTACTACTGTGTCA CCA TAGTCACAGTACCCATCCGATCACCTTCGGC	50,0	50	8,0	80,5
1633-H106/108/111 R	CGAAGGTGATCGGA TGGGTACTGTGACTATGTTGACAGTAGTAAG	47,0	45	6,7	79,0
1633-H105/106/108/111 R	GCCGAAGGTGATCGGA TGGGTACTGTGACTATGTTGACAGTAGTAAGTTG	50,0	50	8,0	80,5

Cebador	SEQ ID NO
ESTIRPE GERMINAL hVK1-39/JK5	81
1633-H106/108/111 F	34
1633-H105/106/108/111 F	35
1633-H106/108/111 R	36
1633-H105/106/108/111 R	37

FIG. 7

### Construcción de LTVEC de HULC de VK1-39

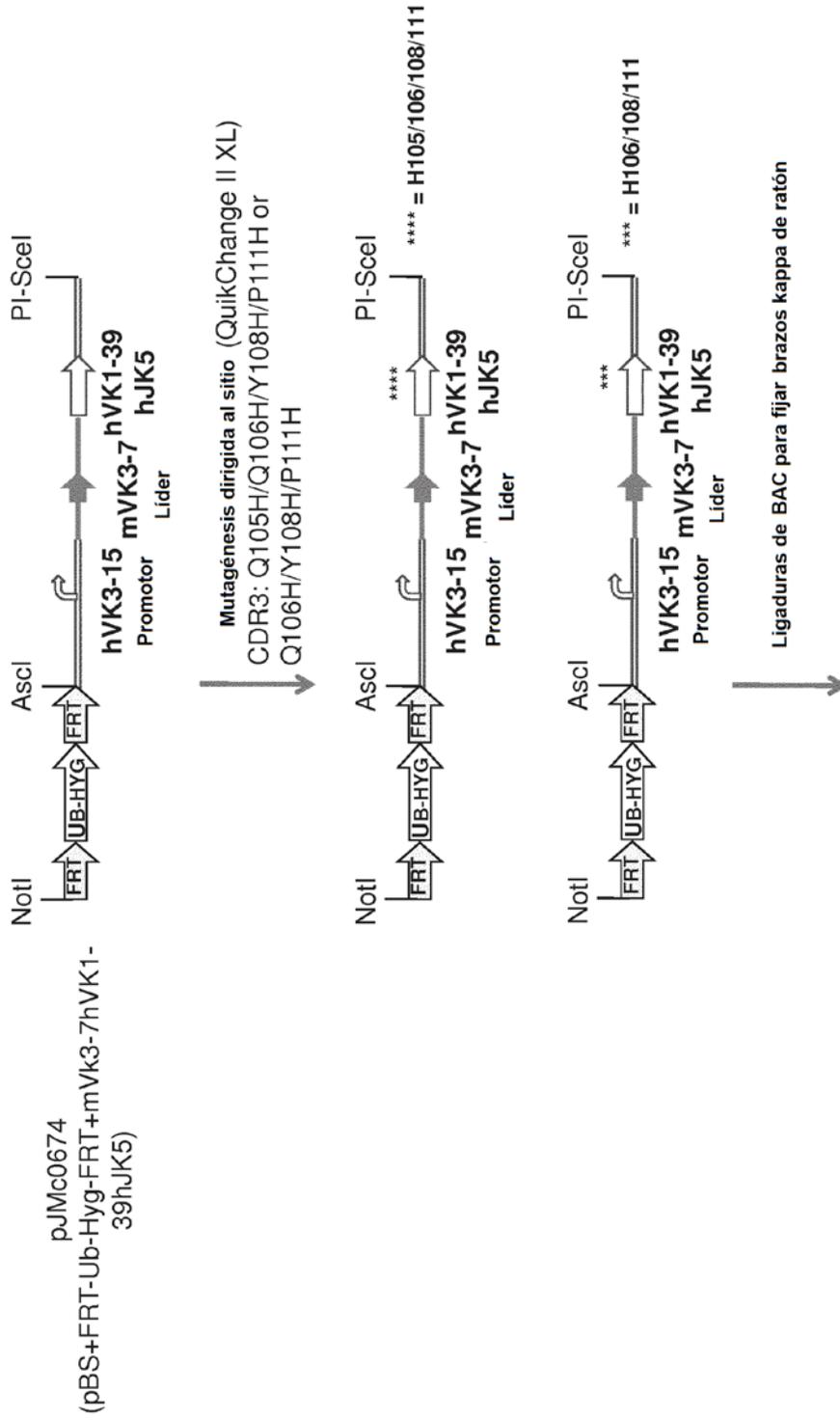


FIG. 8A

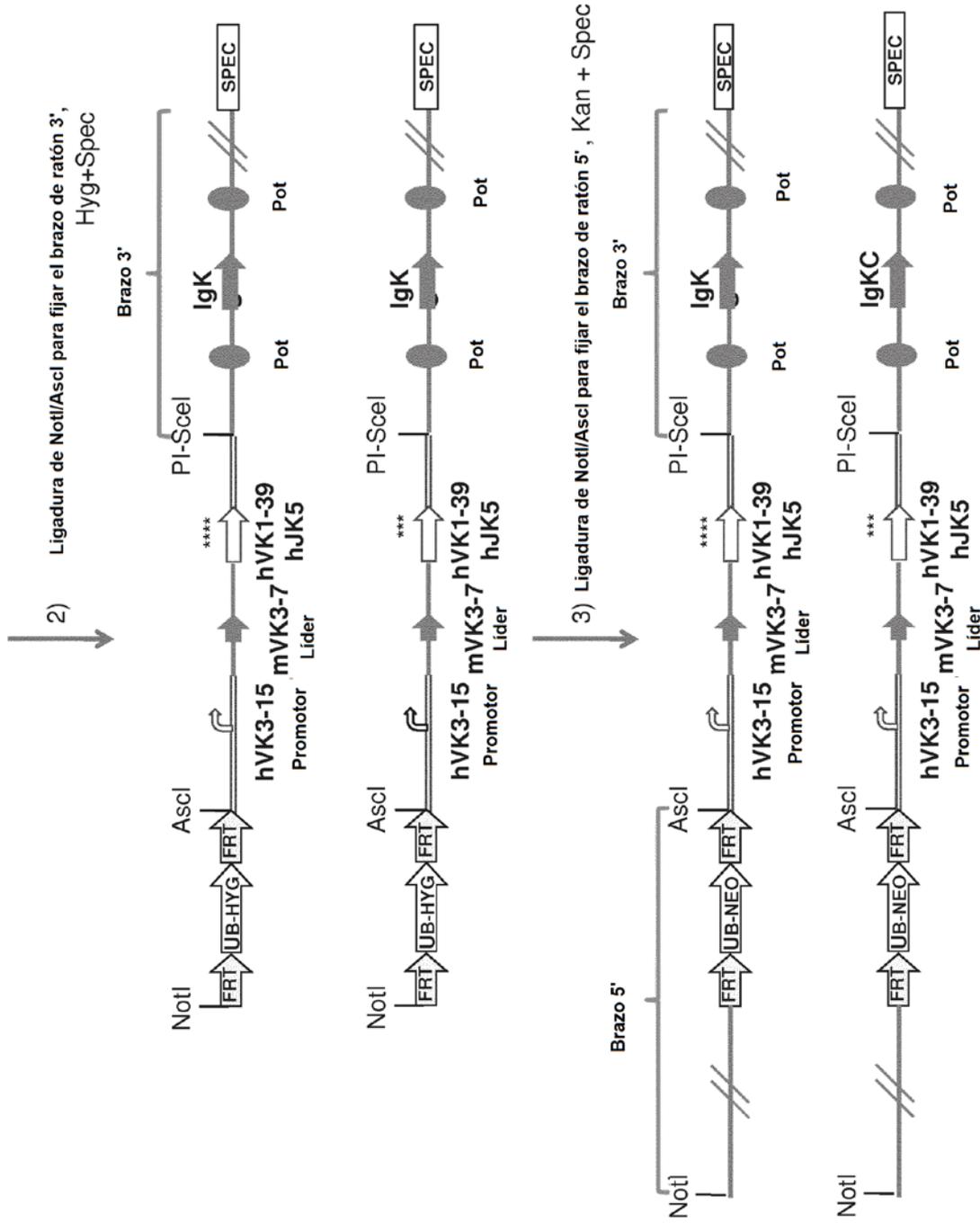


FIG. 8B

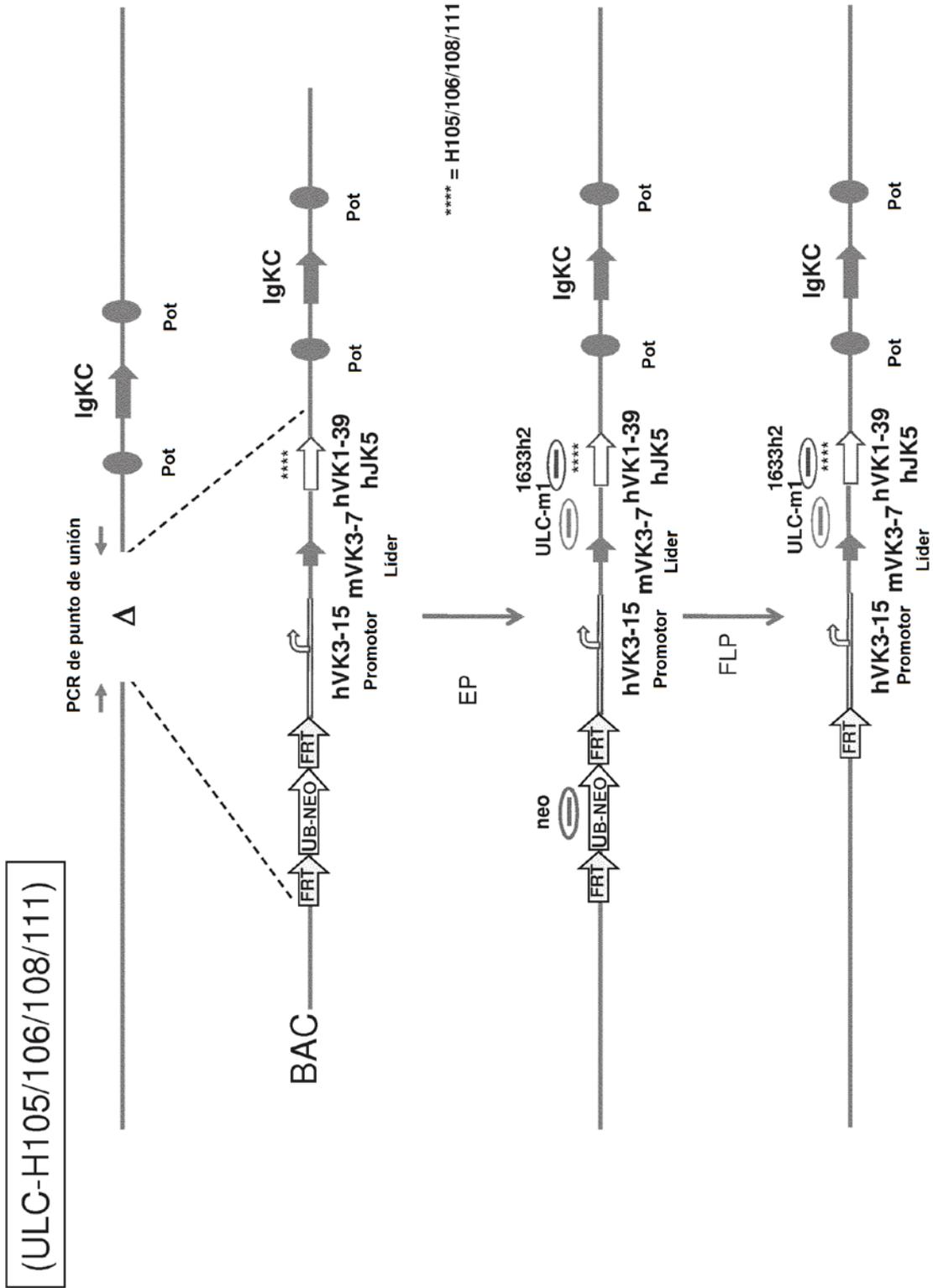


FIG. 8C

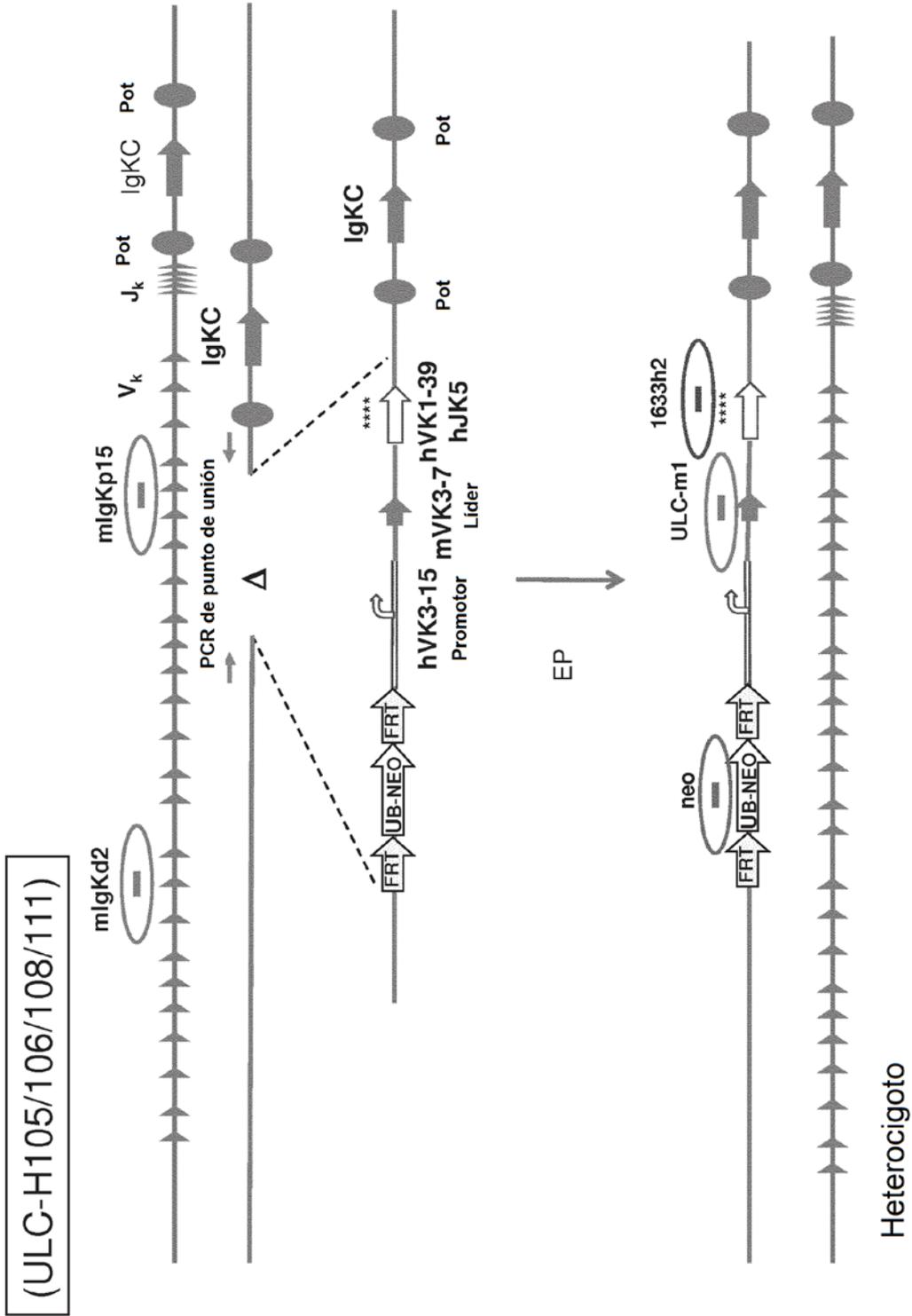


FIG. 8D

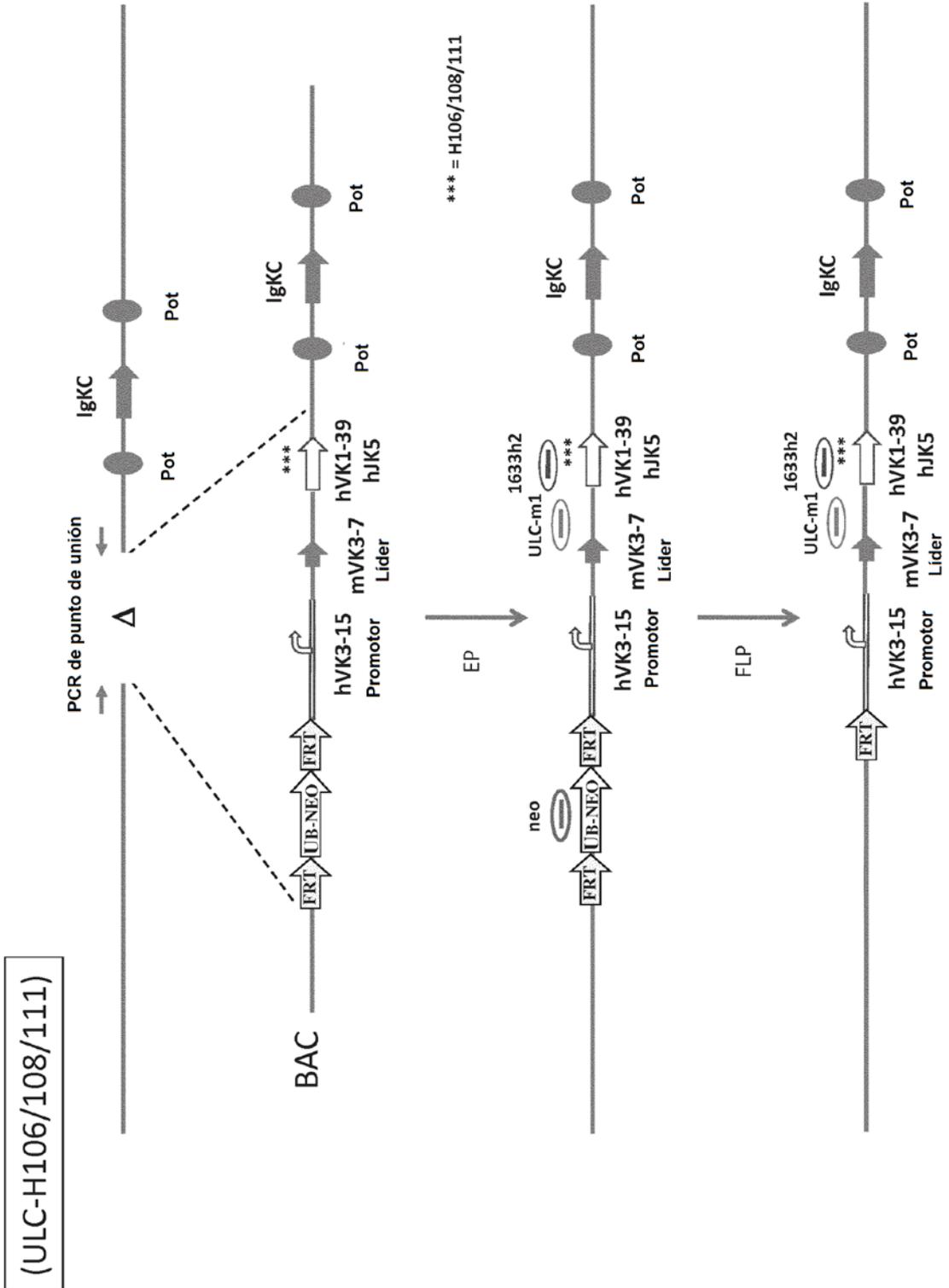


FIG. 8E

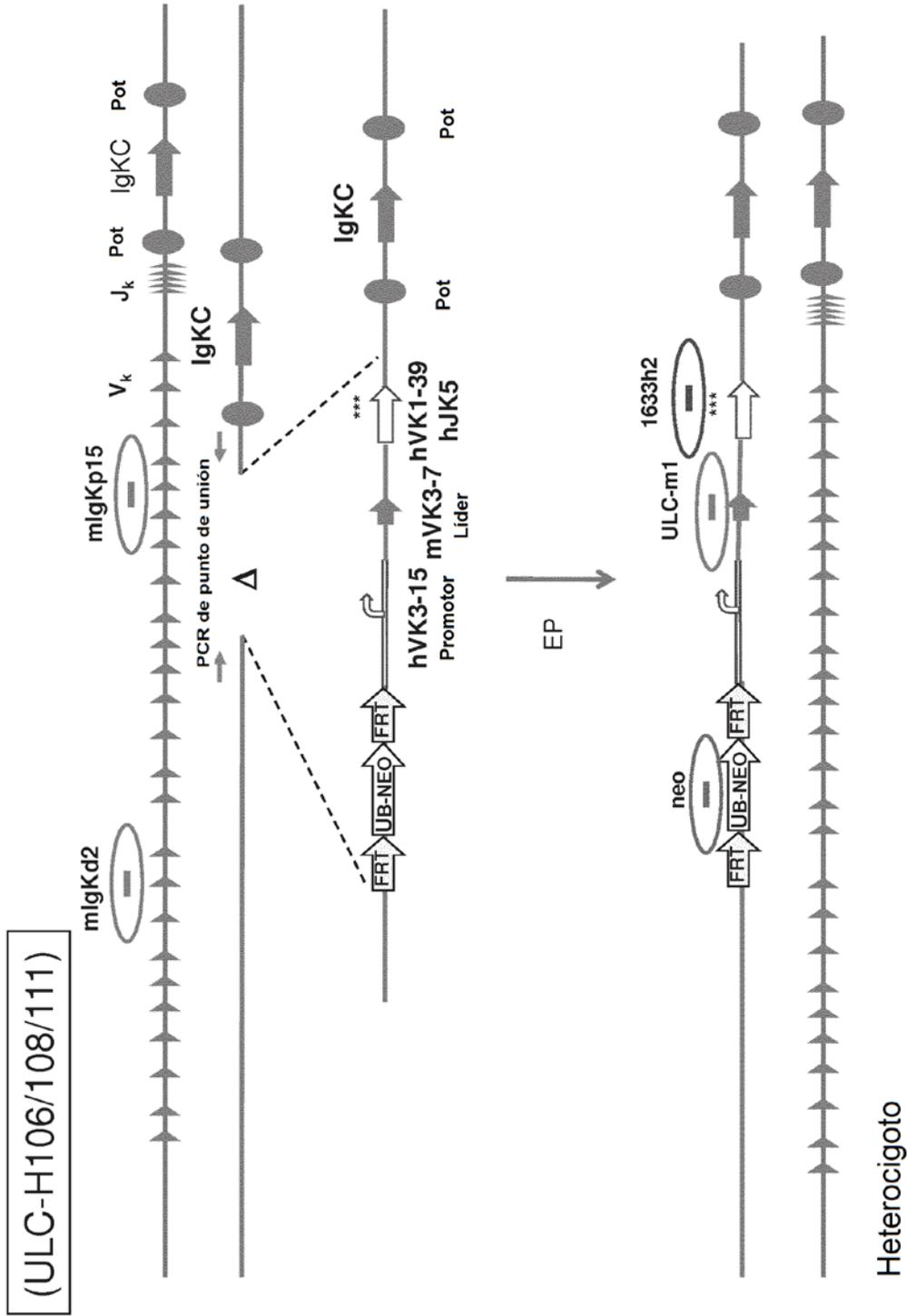


FIG. 8F

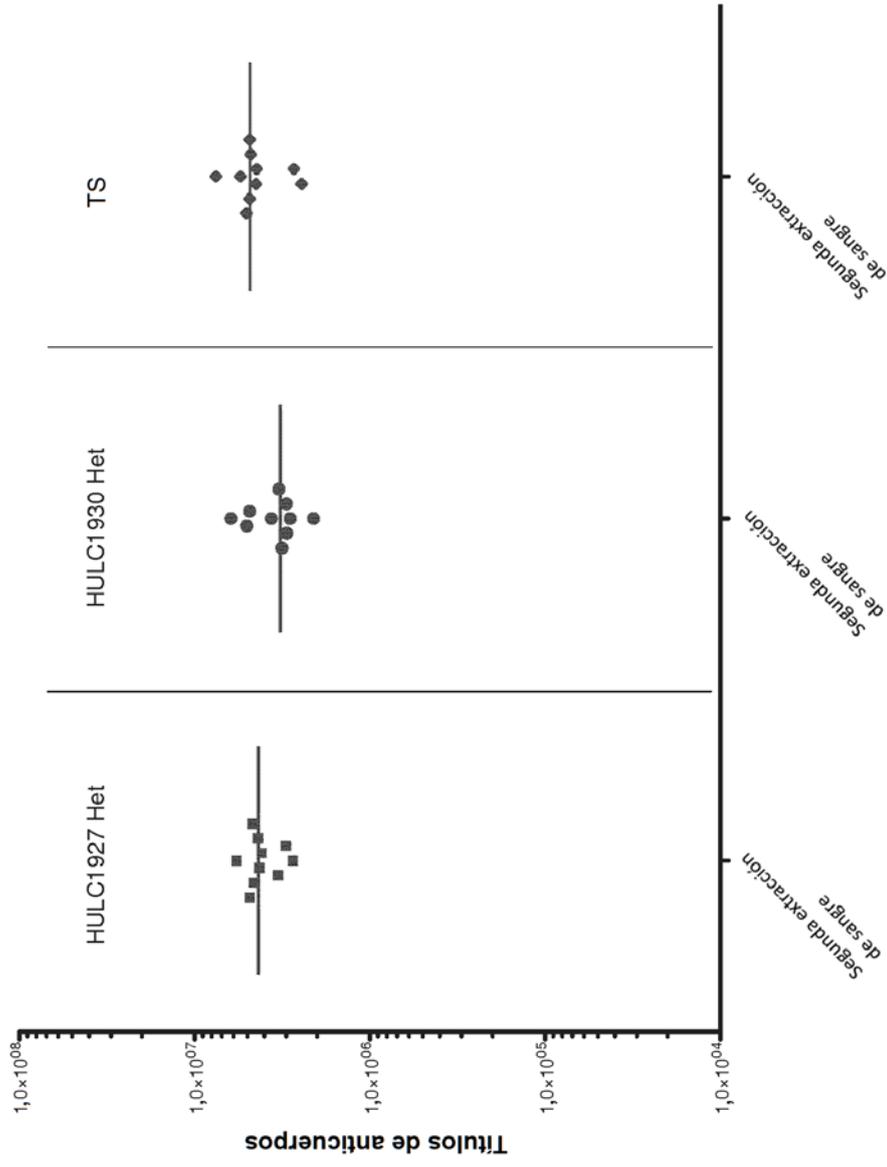


FIG. 9

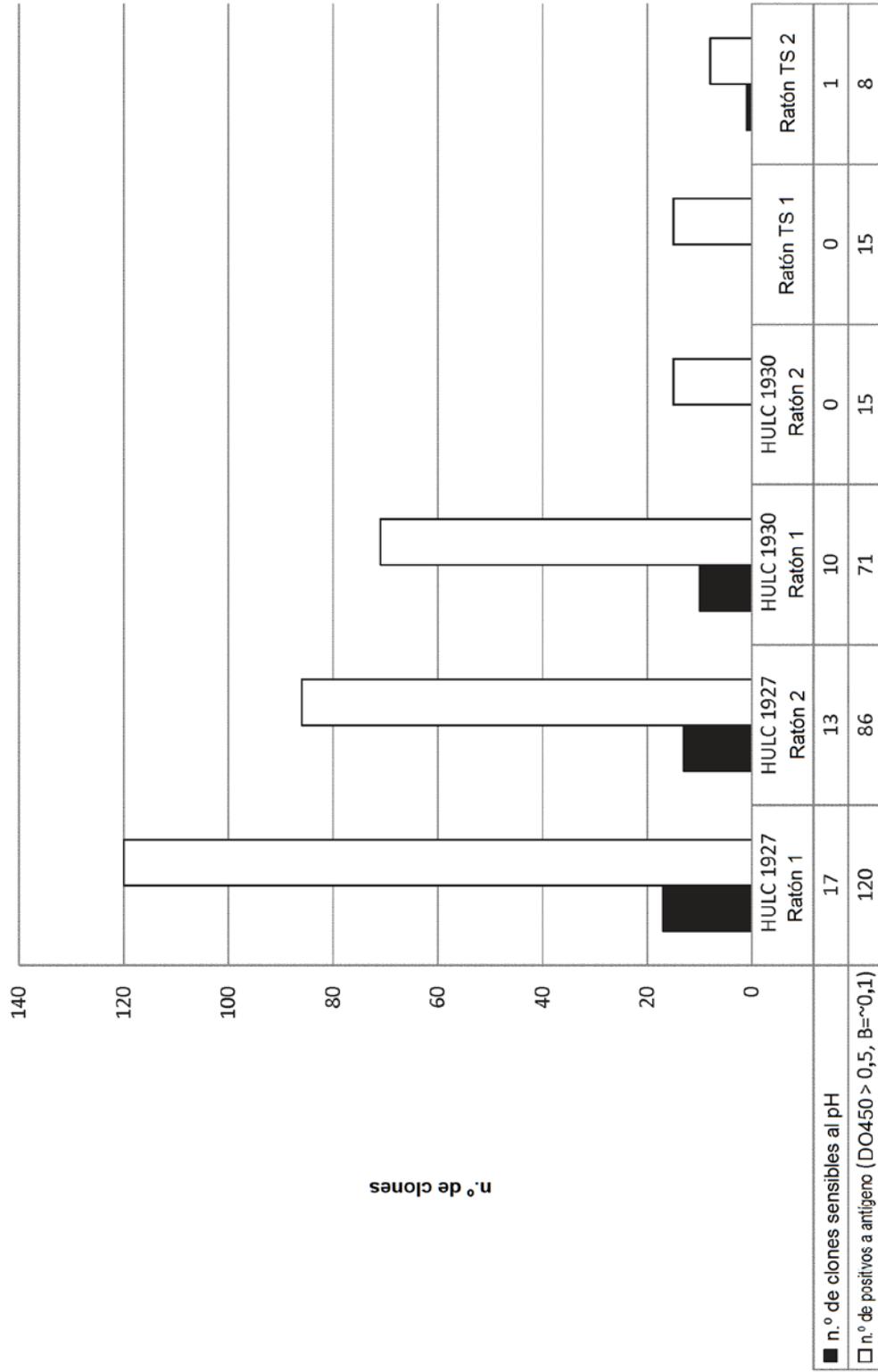


FIG. 10

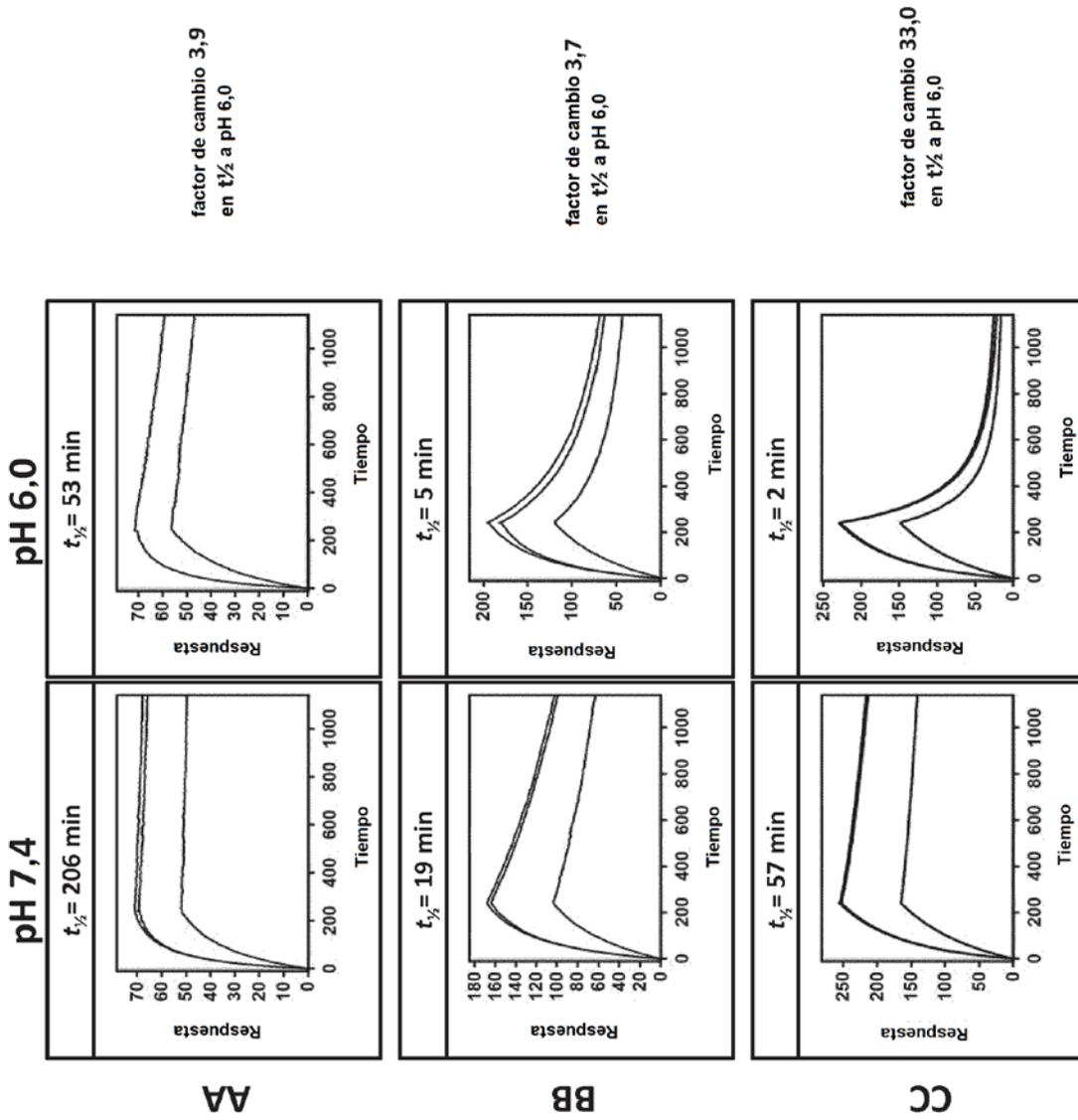


FIG. 11A

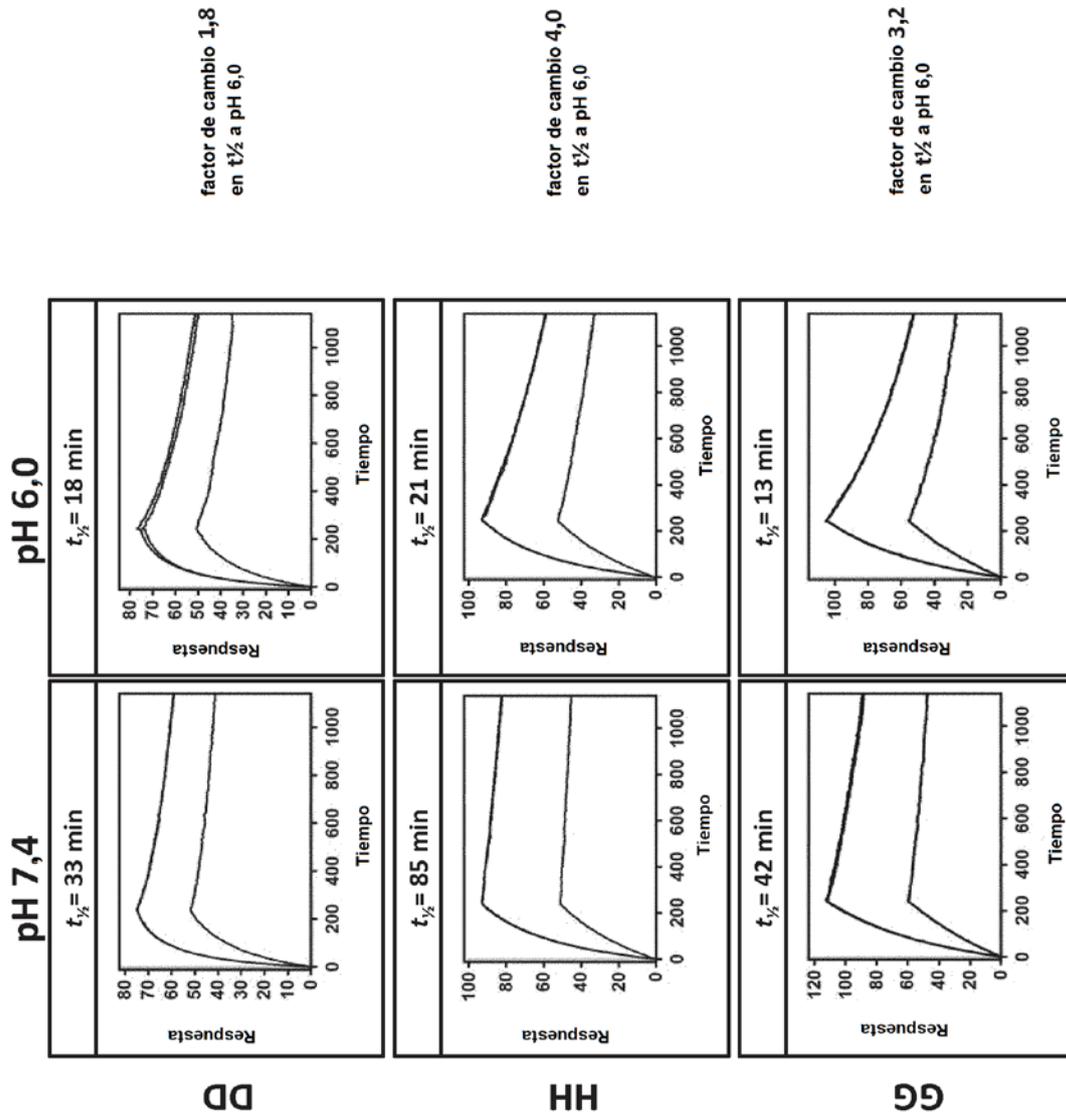


FIG. 11B

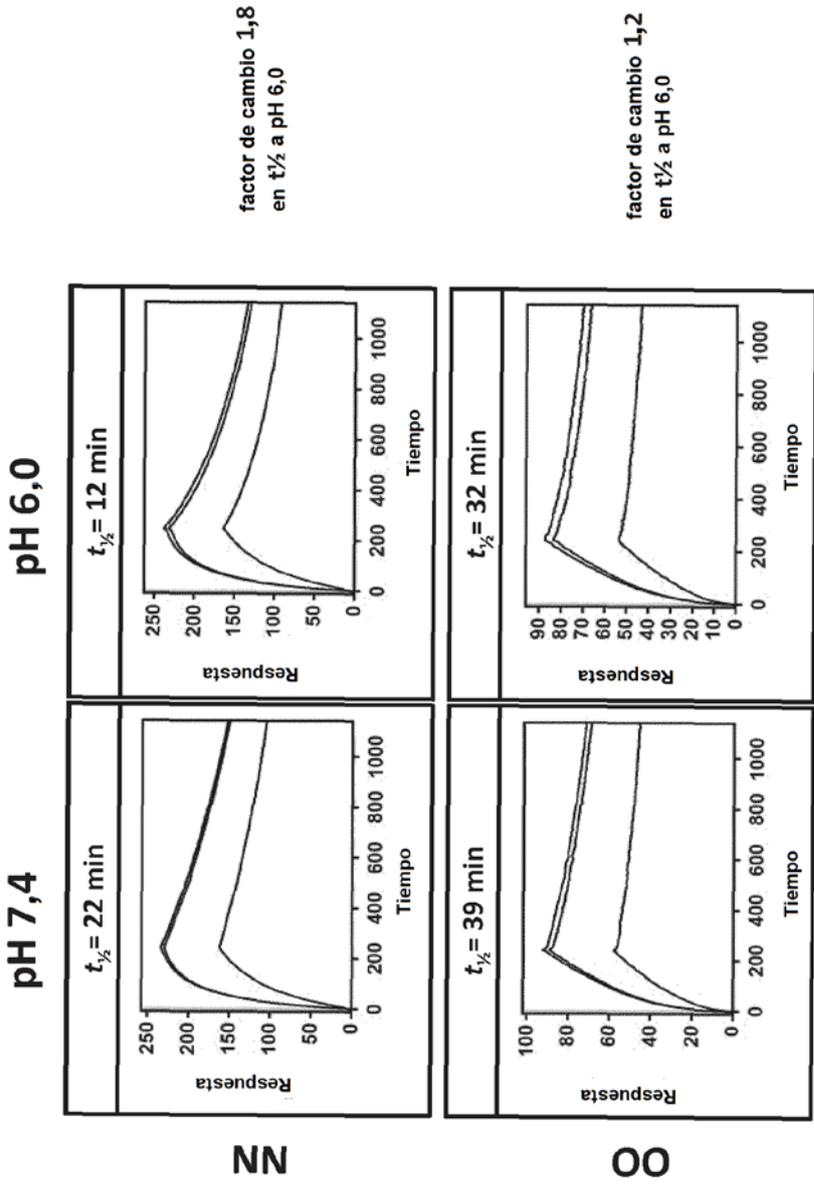


FIG. 11C

105 106 107 108 109 110 111

Q Q Y G S S P SEQ.ID NO:75  
CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCT SEQ.ID NO:74

TS

H105/106/107/109

H H H G H S P SEQ.ID NO:77  
CAT CAC CAT GGT CAC TCA CCT SEQ.ID NO:76

H105/106/109

H H Y G H S P SEQ.ID NO:79  
CAT CAC TAT GGT CAC TCA CCT SEQ.ID NO:78

FIG. 12

Cebadores de mutagénesis dirigida al sitio para sustituciones con histidina en CDR3 de plásmido de ULC VK3-20JK1

Nombre del cebador	Secuencia	% de GC	N	deseemparejamiento	Tm
ESTIRPE GERMINAL hVK3-20	GATTTTCAGTGTATTTACTGTCA GCA GTATGTTAGCTCACCTTGGACGTTTCGGC				
hVK3-20 (H105/106/107/109) F	GATTTTCAGTGTATTTACTGTCA TCA CCA TGGT CA CTCACCTTGGACGTTTCGGC	48	54	5	79,5
hVK3-20 (H105/106/107/109) R	GCCGAACGTC CAAGGTGAG TGGACCAT GGTG A TGACAGTAATACACTGCCAAATC	48	54	5	79,5
hVK3-20 (H105/106/109) F	GCAGTGTATTTACTGTCA TCA CTATGGT CA CTCACCTTGGACGTTTCGG	49	47	4	78,7
hVK3-20 (H105/106/109) R	CCGAACGTC CAAGGTGAG TGGACCAT GGTG A TGACAGTAATACACTGC	49	47	4	79,7

Cebador	SEQ ID NO
ESTIRPE GERMINAL hVK3-20/JK1	60
hVK3-20 H105/106/107/109 F	61
hVK3-20 H105/106/107/109 R	62
hVK3-20 H105/106/109 F	63
hVK3-20 H105/106/109 R	64

FIG. 13

# Construcción de LTVEC de HULC de VK3-20

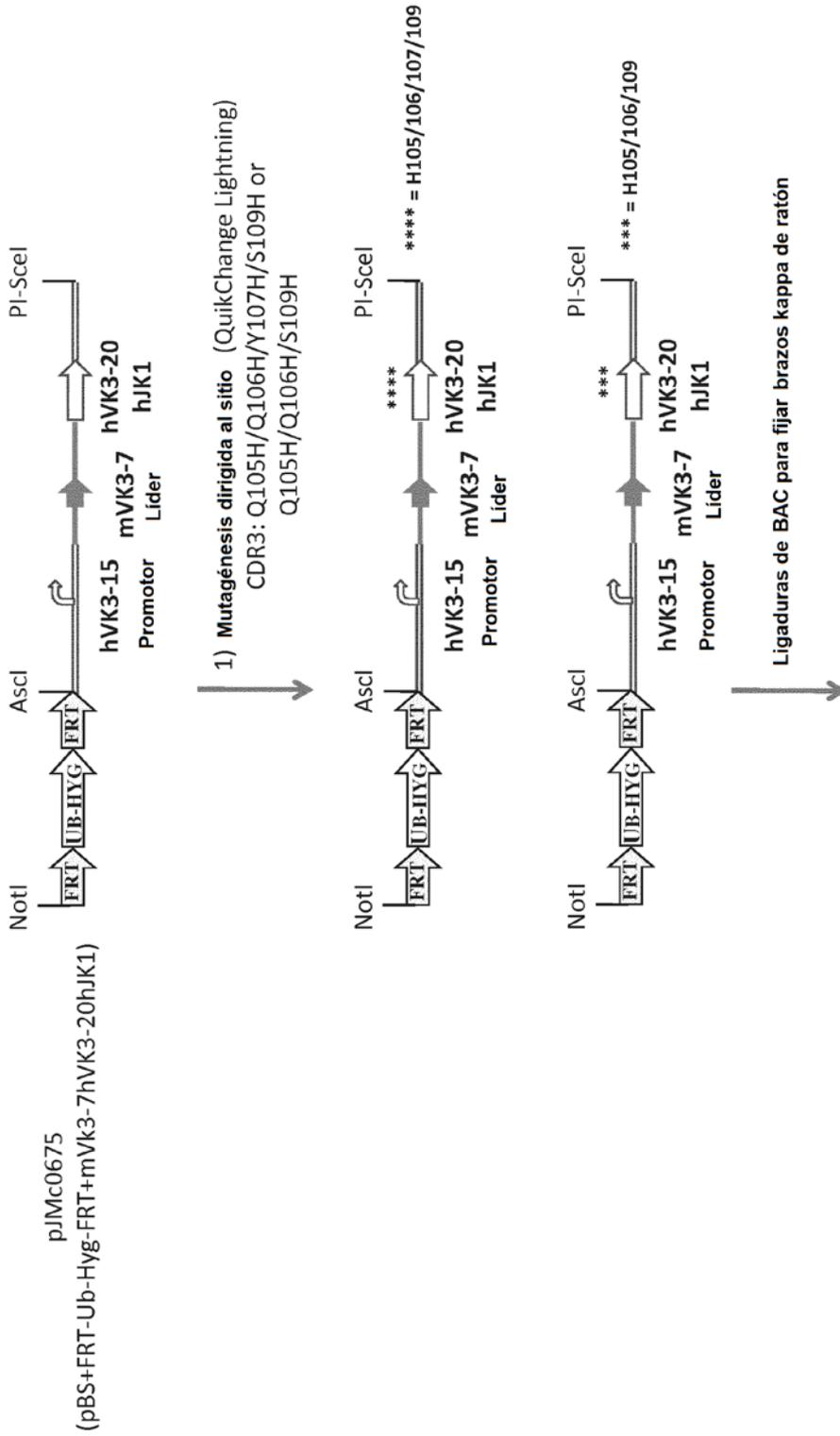


FIG. 14A

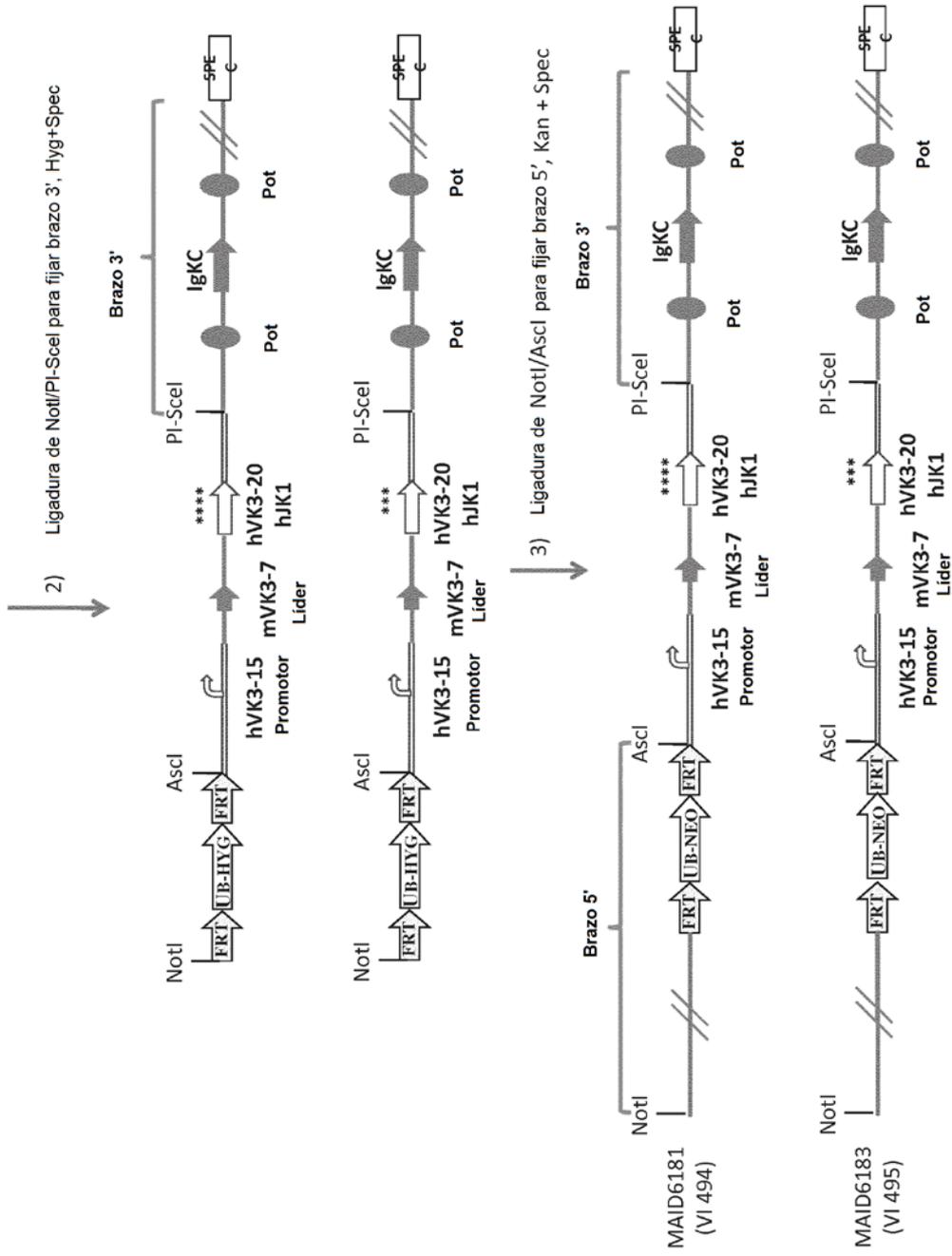


FIG. 14B

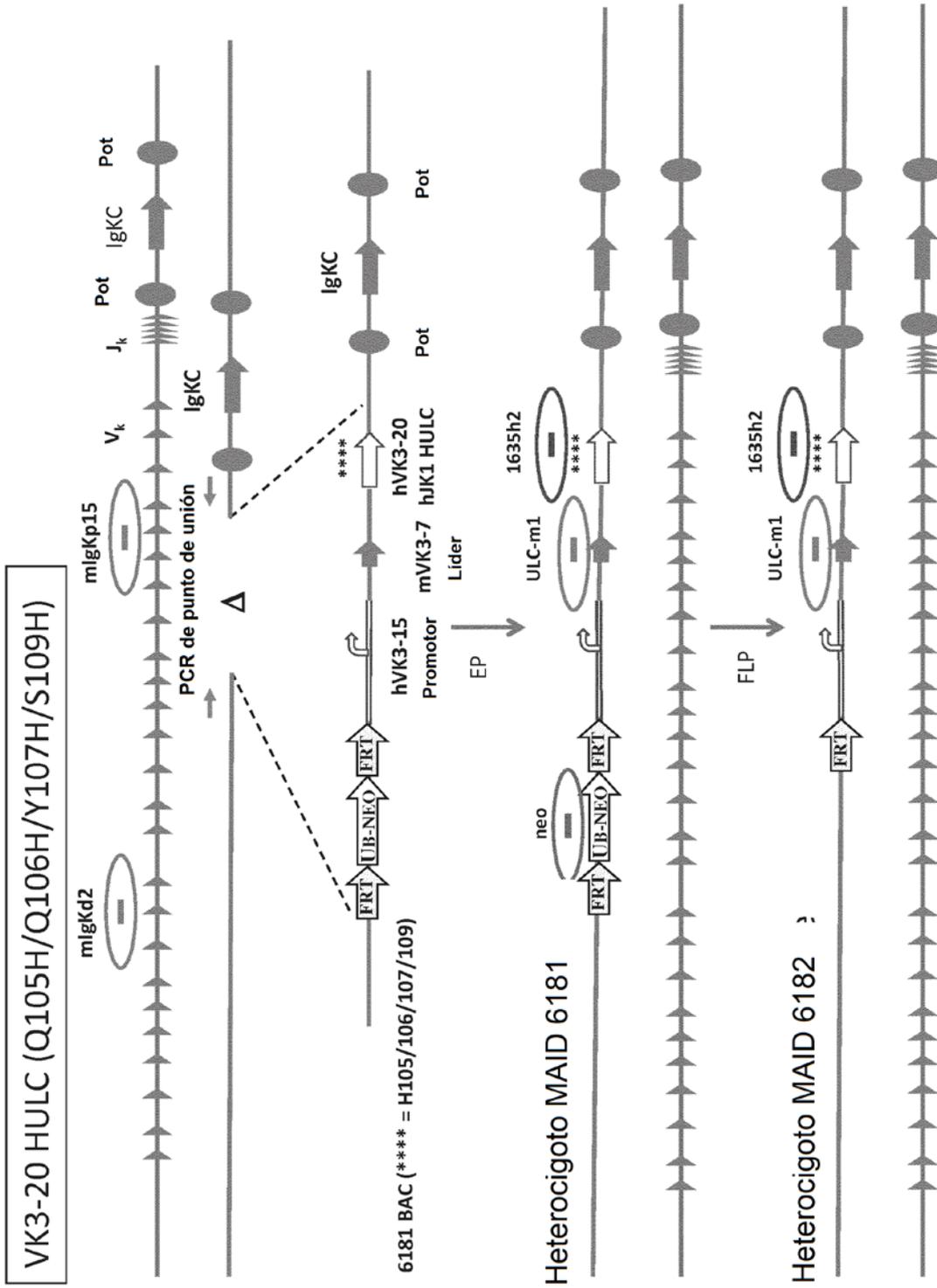


FIG. 14C

