

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 593**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/US2013/031036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138518**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13761578 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2825652**

54 Título: **Composición y método para la diversificación de secuencias diana**

30 Prioridad:

15.03.2012 US 201261611446 P

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

12.12.2018

73 Titular/es:

OMEROS CORPORATION (50.0%)

201 Elliott Avenue West

Seattle, WA 98119, US y

**UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS
CENTER FOR COMMERCIALIZATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

CUMMINGS, W., JASON;

TJOELKER, LARRY, W.;

WOOD, CHRISTI, L.;

YABUKI, MUNEHISA;

ALLISON, DANIEL, S.;

LEPPARD, JOHN, B. y

MAIZELS, NANCY

74 Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E

INVENCIONES, SLP

ES 2 693 593 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

Composición y método para la diversificación de secuencias diana

5 Referencia a la solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud de patente provisional americana N.º 61/611.446, presentada el 15 de Marzo de 2012, en la actualidad pendiente.

10 Listado de secuencia

El listado de secuencia asociado con esta solicitud se proporciona en formato texto en lugar de una copia en papel, y se incorpora por el presente documento como referencia en la memoria. El nombre del archivo de texto que contiene el Listado de Secuencia es 980087_402WO_SEQUENCE_LISTING.txt. El archivo de texto es de aproximadamente 17 KB, se creó el 13 de Marzo de 2013, y está siendo presentado electrónicamente vía EFS-Web.

Declaración del interés del Gobierno

Esta invención se realizó con el soporte del gobierno bajo las becas R01 GM41712 y U54 AI081680 concedidas por el "U.S. National Institutes of Health". El gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Antecedentes

25 Campo de la invención

Esta descripción se refiere a la manipulación dirigida de los genes a, y su integración en, un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina. Los vectores, composiciones, y métodos descritos en el presente documento son particularmente útiles para la evolución de anticuerpo acelerada *ex vivo*.

30 Descripción de la técnica anterior

Los anticuerpos monoclonales (AcM) están bien establecidos como terapéuticos, diagnósticos y reactivos para la investigación, pero su uso actualmente está limitado por las dificultades y los costes asociados con la identificación de los AcM con la afinidad y la especificidad requerida para una diana deseada. Muchas dianas de interés son proteínas altamente conservadas, y los mecanismos de la regulación inmune limitan la diversidad de anticuerpos que se pueden obtener a partir de una respuesta inmune fisiológica. Además, muchas dianas terapéuticas clave son proteínas de la superficie celular, que representan retos particulares al desarrollo de AcM debido a que sus conformaciones fisiológicamente activas no son fácilmente recapituladas por preparaciones de proteínas purificadas o membrana usadas para la inmunización para obtener los anticuerpos específicos. Estos componentes de superficie celular incluyen algunas dianas de especialmente alto valor para ciertos contextos clínicamente útiles, tales como receptores de citoquina y receptores acoplados a proteína G.

La mayoría de las estrategias actuales para el descubrimiento de AcM emplean planteamientos *in vivo* y/o *in vitro*. Los planteamientos *in vivo* implican la activación y selección de linfocitos B productores de anticuerpo específico por inmunización, seguido de generación de hibridomas (Kohler y col., 1975; Chiarella y col., 2008). Este proceso es costoso y requiere mucho tiempo, puesto que se requieren extenso cribado y, en muchos casos, etapas posteriores incluyendo la maduración de la afinidad para obtener AcM con propiedades deseadas. También está limitado por la inmune tolerancia, que hace difícil o imposible de obtener anticuerpos que específicamente reconozcan algunos antígenos. Además, una vez que se ha identificado un AcM no hay un paso directo a más optimización de su afinidad o funcionalidad. Los planteamientos *in vivo* con frecuencia dependen de cribado de números masivos de anticuerpos de cadena sencilla sintéticos, generalmente presentados en fago (Winter y col., 1994; Bratkovic y col., 2010). Estos anticuerpos se expresan por genes clonados que codifican regiones variables de la cadena pesada (V_H) y variables de la cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina unidas derivadas de un repertorio inmune, con frecuencia de un individuo convaleciente (Grande y col., 2010; Hammond y col. 2010). Además se pueden optimizar por mutagénesis basada en PCR iterativa acompañada de selección *in vitro*, usando planteamientos de alta producción. Sin embargo, el éxito al final depende de la calidad de las genotecas de partida y de sus fuentes, y no todos los anticuerpos de cadena sencilla se pueden convertir fácilmente en anticuerpos naturales para aplicaciones prácticas.

El descubrimiento de AcM también se puede llevar a cabo *ex vivo* en linfocitos B inmortalizados. Los linfocitos B muestran moléculas de inmunoglobulina (Ig) en la superficie celular, facilitando la selección para el reconocimiento de antígeno. En algunas líneas de linfocito B, rutas fisiológicas para la diversificación del gen de inmunoglobulina (Ig) permanecen activas, posibilitando la evolución de anticuerpos de alta afinidad en el cultivo. La línea de linfocito B de pollo, DT40, ha demostrado que es especialmente adaptable para tales propósitos (Cumbers y col., 2002; Seo y col., 2005; Kajita y col., 2010). DT40 deriva de un linfoma bursal, y las células DT40 diversifican constitutivamente sus genes de la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_L) de

inmunoglobulina (Arakawa y col., 2004). La diversificación en curso se da por dos rutas, conversión génica e hipermutación somática (Maizels y col 2005). En resumen, la mayoría de las mutaciones se hacen con molde y surgen como resultado de la conversión génica, con pseudoregiones V no funcionales que sirven como donadores para la transferencia de secuencias al gen V reordenado y transcrito. Una pequeña fracción de mutaciones son sin molde, y surgen como resultado de la hipermutación somática, la ruta mutagénica que genera mutaciones puntuales en genes de Ig de linfocitos B humanos y murinos activados por antígeno. Las células DT40 proliferan rápidamente, con un tiempo de duplicación de 8 a 10 horas (en comparación con 20 a 24 horas para las líneas de linfocito B humano), y son resistentes a manipulaciones experimentales incluyendo clasificación celular activada magnética (MACS), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y clonación celular sencilla. Lo más importante, las células DT40 soportan manipulación genética dirigida homóloga muy eficaz (Buerstedde y col., 1991), por tanto las regiones genómicas en muchos casos se pueden reemplazar o modificar como se desee usando estrategias de recombinación homóloga apropiadamente diseñadas.

A pesar del potencial considerable de las células DT40 para la evolución de anticuerpo, su utilidad hasta ahora se ha limitado en la práctica debido a que, como en otras líneas de linfocito B transformadas, la diversificación del gen de Ig se da a menos del 1 % la tasa fisiológica. El documento WO2011061937 describe métodos para introducir ADN que codifican una secuencia de aminoácidos deseada en el en el locus del gen de la región variable del anticuerpo de la línea de linfocito B de pollo DT40-SW, que introduce mutaciones espontáneas. Buerstedde y col. (*Cell*, vol. 67, no. 1, p179-188, 1991) describe la transfección de células DT40 con construcciones de un gen de la cadena ligera de pollo reordenado. Se han usado varios planteamientos para acelerar la diversificación en las células DT40. Esto se puede conseguir inhabilitando la ruta de recombinación homóloga (Cumbers y col., 2002), pero las células así modificadas por ingeniería han perdido la capacidad de llevar a cabo manipulación genética dirigida, o diversificar sus genes de Ig por conversión génica, y la diversificación produce mutaciones puntuales sin molde, como aquellas generadas durante hipermutación somática conducida de antígeno en seres humanos o ratones. La diversificación también se puede acelerar por tratamiento de las células con el inhibidor de la histona desacetilasa, tricostatina A (Seo y col., 2005). Este planteamiento incrementa la tasa de conversión génica, pero no promueve la mutagénesis puntual, limitando la diversidad potencial. Claramente queda una necesidad de generación más rápida y eficaz de diversidad de secuencia codificante en un gen diana de interés tal como un gen codificador de anticuerpo. Las composiciones actualmente descritas y los métodos abordan esta necesidad y ofrecen otras ventajas relacionadas.

Breve compendio

Según un primer aspecto de la invención descrita en el presente documento se proporciona un vector de polinucleótido recombinante para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo, que comprende (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_H de inmunoglobulina de pollo; (b) un gen diana que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio, en las que dicho gen V_H -D- J_H se reorganiza de modo que los genes V_H , D y J_H están juntos; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_H de inmunoglobulina de pollo, en el que el gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H de DT40. En ciertas realizaciones el gen diana comprende además una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína marcadora, que en ciertas realizaciones adicionales se selecciona de la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína azul fluorescente (BFP). En otras realizaciones la hipermutación somática tiene lugar en cualquiera o ambas de una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina.

En un segundo aspecto se proporciona una composición que comprende una pluralidad de vectores de polinucleótido recombinantes según el primer aspecto de la invención para integrar una pluralidad de genes diana en una pluralidad de loci de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo, comprendiendo cada uno de dichos vectores (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_H de inmunoglobulina de pollo; (b) un gen diana que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo, en las que dicho gen V_H -D- J_H está reorganizado de modo que los genes V_H , D y J_H están juntos; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_H de inmunoglobulina de pollo, en el que el gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H

de DT40, y en el que el gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado se obtiene de una pluralidad de genes V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo. En ciertas realizaciones el gen diana comprende además una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína marcadora, que en ciertas realizaciones adicionales se selecciona de la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína azul fluorescente (BFP). En ciertas realizaciones la hipermutación somática tiene lugar en cualquiera o ambas de una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina.

En otro aspecto se proporciona una composición, que comprende (a) el vector anteriormente descrito; y (b) un segundo vector para integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina, comprendiendo el segundo vector (1) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_L de inmunoglobulina de pollo; (2) un segundo gen diana que comprende un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado que opcionalmente se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo; y (3) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_L de inmunoglobulina de pollo, en el que el segundo gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena ligera de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_L de DT40. En otro aspecto se proporciona una composición, que comprende (1) la composición anteriormente descrita; y (2) uno o una pluralidad de vectores de polinucleótido recombinantes para integrar una pluralidad de genes diana en una pluralidad de loci de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo, comprendiendo cada uno de dichos vectores (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_L de inmunoglobulina de pollo; (b) un segundo gen diana que comprende un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado opcionalmente que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_L de inmunoglobulina de pollo, en el que el segundo gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena ligera de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos de pseudogen V_L de DT40, y en el que opcionalmente el gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado se obtiene de una pluralidad de genes V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo. En ciertas realizaciones el segundo gen diana comprende además una secuencia de polinucleótido que codifica una segunda proteína marcadora, que en ciertas realizaciones más adicionales se selecciona de la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína azul fluorescente (BFP). En ciertas realizaciones la hipermutación somática tiene lugar en cualquiera o ambas de una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_L de inmunoglobulina y una secuencia codificadora de la región marco conservada (*framework*) de V_L de inmunoglobulina.

Ciertos aspectos descritos en el presente documento proporcionan una célula hospedadora, que comprende cualquiera de los vectores o composiciones anteriormente descritos. En ciertas realizaciones la célula hospedadora es una célula bacteriana. En ciertas realizaciones la célula hospedadora se deriva de una célula de pollo, o es una célula de linfoma bursal de pollo, o es una célula DT40, y en ciertas realizaciones adicionales el locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina en la célula hospedadora comprende un operador de lactosa polimerizada y/o el locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina en la célula hospedadora comprende un operador de lactosa polimerizada. Según ciertos otros aspectos se proporciona una genoteca de las células hospedadoras descritas en el presente documento.

Volviendo a otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo, que comprende (a) someter a transfección linfocitos B de pollo con uno de los vectores anteriormente descritos, o someter a transfección linfocitos B de pollo con una de las composiciones anteriormente descritas; y (b) identificar un linfocito B de pollo en el que el gen diana está integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina. En otro aspecto se proporciona un método para integrar un primer gen diana en un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo e integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera de inmunoglobulina, que comprende (a) someter a transfección una o una pluralidad de linfocitos B de pollo con una de las composiciones anteriormente descritas para obtener una o una pluralidad de linfocitos B sometidos a transfección; y (b) identificar un linfocito B de pollo sometido a transfección (a) en el que el gen diana que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado está integrado en el locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina y el segundo gen diana está integrado en el locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina. En otro aspecto se proporciona un método para producir un repertorio de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de un polipéptido diana que es codificado por un gen diana que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado, que

comprende cultivar un linfocito B de pollo que contiene uno de los vectores anteriormente descritos bajo condiciones que permiten la proliferación del linfocito B hasta que se obtiene una pluralidad de linfocitos B, en el que el linfocito B es capaz de cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H , y produciendo de ese modo un repertorio de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo del polipéptido diana. En ciertos aspectos relacionados el linfocito B de pollo comprende además un segundo vector para integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo, comprendiendo el segundo vector (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_L de inmunoglobulina de pollo; (b) un segundo gen diana que comprende un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado opcionalmente que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo que comprende un homólogo de secuencia al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_L de inmunoglobulina de pollo, en el que el segundo gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena ligera de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_L de DT40. En ciertas realizaciones adicionales el locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo comprende un operador de lactosa polimerizada. En ciertas otras realizaciones adicionales se selecciona la célula de pollo de DT40 y DTLacO. Según ciertos otros aspectos, los métodos anteriormente descritos comprenden además cribado de la pluralidad de linfocitos B de pollo para la unión a un antígeno.

Estos y otros aspectos de la descripción proporcionada en el presente documento serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos. Los aspectos y realizaciones de la descripción se pueden modificar, si es necesario, para emplear conceptos de las diversas patentes, solicitudes y publicaciones para proporcionar más ejemplos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra diagramas esquemáticos de dos etapas de modificación por ingeniería de la diversificación clonal acelerada. El diagrama esquemático superior muestra el locus de la cadena pesada de Ig (IgH) reordenado y expresado, que contiene la región variable (VDJ), la región constante (C_μ), y la matriz Ψ_{VH} en dirección 5'. IgH se modificó primero por inserción de PolyLacO en la matriz Ψ_{VH} en células DT40 PolyLacO- λ_R , que llevan PolyLacO dirigido al locus de la cadena ligera o λ de Ig (Ig λ) reordenado y expresado (Cummins y col., 2007; Cummins y col., 2008; Yabuki y col., 2009). Luego, este locus se modificó más por sustitución de la región V_H (VDJ) endógena con regiones V_H de un polluelo nuevo.

La Figura 2 muestra la tasa de diversificación clonal acelerada en células DTLacO. (A) Ensayo de la pérdida de IgM de superficie (sIgM) de tres transfectantes DTLacO Lacl-HP1 clonales representativos. La fracción de células sIgM⁺ en cada cultivo está indicada abajo a la derecha en cada panel. (B) Compendio de los ensayos de la pérdida de sIgM. Cada círculo en blanco representa el porcentaje de células sIgM⁺ en un transfectante clonal, analizado tres semanas después de la transfección. Las células analizadas eran: transfectantes control DT40 PolyLacO- λ_R GFP-Lacl (n=27); transfectantes DT40 PolyLacO- λ_R Lacl-HP1 (n=16), y transfectantes DTLacO Lacl-HP1 (n=20). (C) Pérdida media de sIgM de transfectantes DT40 PolyLacO- λ_R Lacl-HP1 y DTLacO Lacl-HP1 en relación con transfectantes control GFP-Lacl.

La Figura 3 muestra rápida evolución de anticuerpos anti-estreptavidina (SAV) en células DTLacO. (A) El perfil de unión de SAV de sucesivas poblaciones celulares seleccionadas de células DTLacO (izquierda) o DTLacO E47-Lacl (derecha). La selección se llevó a cabo en promedio a intervalos semanales. Los números celulares se trazaron en relación con la señal fluorescente de SAV-PE. Las poblaciones en sucesivas rondas de selección se designan por encima de los picos (S0-S7). "Pre" designa poblaciones antes de cualquier clasificación (relleno gris). (B) Cinéticas de unión saturación de la población S7 de DTLacO E47-Lacl. (C) Secuencias de AcM anti-SAV seleccionado de alta afinidad en comparación con la línea germinal (Reynaud y col., 1987; Reynaud y col., 1989). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se identifican por encierre en recuadros. La inserción/duplicación de 18 restos en CDR1 de V_λ del AcM anti-SAV recapituló una inserción en CDR1 de la cadena ligera informada por otras selecciones de AcM anti-SAV a partir de células DT40 que no se habían sometido a ninguna modificación por ingeniería genética (Seo y col., 2005). Las secuencias de V_H y V_λ de la línea germinal se exponen en las SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente. Las secuencias de V_H y V_λ del AcM anti-SAV se exponen en las SEQ ID NO: 18 y 20, respectivamente.

La Figura 4 muestra AcM de alta afinidad seleccionados de células DTLacO. (A). Por encima, los perfiles de unión de sucesivas poblaciones DTLacO Lacl-HP1 seleccionadas para el reconocimiento de receptores de superficie celular, VEGFR2, TIE2 y TROP2. Rondas de selección designadas por encima de los picos (S0-S8). Por debajo, cinéticas de unión saturación, indicando K_D aparente. (B) Especificidad de poblaciones DTLacO seleccionadas. El análisis FACS de la unión de las poblaciones celulares seleccionadas para reconocimiento de alta afinidad de VEGFR2, TIE2 o TROP2 a VEGFR2 recombinante, TIE2, TROP2, SAV u ovoalbúmina (OVA).

Los picos rellenos representan el control de referencia negativo (anticuerpo secundario solo), y las líneas sólidas intensas representan la tinción para el antígeno indicado. (C) Alineamiento esquemático de las regiones V_H y V_λ de los AcM seleccionados para la unión a VEGFR2, TIE2 y TROP2. Las líneas horizontales claras representan regiones marco conservadas de pollo, las líneas horizontales intensas encerradas en recuadros identifican las CDR, las barras verticales indican diferencias de resto único en relación con la secuencia de DTLacO más común, y el triángulo indica inserción.

La Figura 5 muestra la selección y humanización de los AcM anti-FN14 y anti-FZD10. (A) Esquema del trascurso del tiempo de la selección de los AcM anti-FN14 y anti-FZD10, con etapas de selección indicadas por S, y afinidades aparentes (k_D) de los AcM quiméricos recombinantes mostrados más adelante. (B) Alineamiento esquemático de las regiones V_H y V_λ de los AcM seleccionados para la unión a FN14 y FZD10. Las líneas horizontales claras representan regiones marco conservadas de pollo, las líneas horizontales intensas encerradas en recuadros identifican las CDR, las barras verticales indican las diferencias de resto único en relación con la secuencia DTLacO más común, y el triángulo indica inserción. (C) Humanización de anticuerpo. Las regiones V_H y V_λ de los AcM humanizados hFS24 y hFZ2 esquemáticamente alineados al consenso V_{H-III} o $V_{\lambda-III}$ humano (líneas superiores). Las líneas horizontales claras representan regiones marco conservadas humanas; los asteriscos indican los dos restos eliminados del N-terminal de la cadena ligera; las líneas verticales fuera de los recuadros identifican restos de la zona Vernier conservados en los AcM humanizados; otras indicaciones como en el Panel B. (D) Afinidades aparentes (k_D) de los AcM de FZ2 (anti-FZD10) humanizados y progenitores.

Descripción detallada

La presente descripción se refiere en parte a vectores de polinucleótido recombinantes, y a composiciones relacionadas, células hospedadoras, genotecas y métodos para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo. En particular, los métodos descritos en el presente documento contemplan reemplazar un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo con un gen diana por recombinación homóloga en un linfocito B de pollo. El locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo ha sido sumamente difícil de caracterizar (véase, Reynaud y col., *Cell* 59:171-83, 1989). Por lo tanto, la integración con éxito de genes diana en este locus no se podía haber previsto previamente y hoy en día sorprendentemente se ha conseguido por primera vez según la descripción encontrada en el presente documento. La integración de los genes diana en este locus permite ventajosamente diversificación acelerada de genes diana integrados a través de cualquiera o ambas de hipermutación somática y conversión génica en un linfocito B de pollo.

En un ejemplo preferido, los genes (V_H-D-J_H) de la región variable de la cadena pesada (V_H), la región de diversidad (D) y la región de unión (J) de inmunoglobulina de pollo independientemente reordenados (por ejemplo, una genoteca de V_H de regiones V_H-D-J_H ya reordenadas derivadas de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo) se usan para reemplazar un gen V_H-D-J_H de pollo endógeno en un linfoma de linfocito B, tal como DT40. Tal sustitución promueve la generación acelerada de la diversidad de secuencia de V_H por los linfocitos B en combinación con hipermutación somática y mecanismos de conversión génica. Los métodos descritos en el presente documento son útiles para generar una genoteca diversa de inmunoglobulinas (Ig) que se pueden someter a cribado para identificar y recuperar anticuerpos capaces de unirse específicamente a antígenos diana deseados.

Vectores

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona un vector de polinucleótido recombinante para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo. El vector de polinucleótido recombinante comprende: (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo; (b) un gen diana; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo. En un aspecto preferido, el gen diana es un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado, el cual tras la integración en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H de DT40. En ciertos aspectos la hipermutación somática se puede dar en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad (CDR) de V_H de inmunoglobulina, y en ciertos aspectos la hipermutación somática se puede dar en una secuencia codificadora de la región marco conservada (FW) de V_H de inmunoglobulina y en ciertos aspectos la hipermutación somática se puede dar en tanto una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad (CDR) de V_H de inmunoglobulina como en una secuencia codificadora de la región marco conservada (FW) de V_H de inmunoglobulina.

Un "vector de polinucleótido recombinante" se refiere a una molécula de polinucleótido de no origen natural útil para transferir información codificante a una célula hospedadora. Tales vectores se generan usando técnicas de recombinación de ADN.

Un "locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina" se refiere al locus en el que un gen que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina reside en el genoma de pollo. Contiene un gen J_H único y un gen V_H funcional

único de 15 kb en dirección 5', con genes de aproximadamente 15 D intermedios. Véase, Reynaud y col., *Cell* 59:171-83, 1989. Este locus también contiene un grupo de pseudogenes (Ψ VH) que abarcan 60 a 80 kb, comenzando 7 kb en dirección 5' a partir del gen V_H, así como un grupo de genes C que codifican regiones constantes de la inmunoglobulina en dirección 3' del gen J_H.

5 El locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo se ha conocido durante largo tiempo como que es excepcionalmente difícil de caracterizar o secuenciar (Reynaud y col., *Cell* 59: 171-83, 1989). Tales dificultades pueden ser debidas a la riqueza de GC (es decir, una alta frecuencia y preponderancia de dinucleótidos G-C emparejados) y/o a la presencia de muchas secuencias de nucleótidos repetidas en este locus.

10 Un "gen diana" se refiere a un gen que codifica una proteína de interés. En un aspecto preferido, un gen diana es un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado.

15 Un "gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado" se refiere a un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado en una célula somática del linaje de linfocito B de manera que los genes V_H, D y J_H están juntos en lugar de separados por otras secuencias, como en otras células. "Gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina" se usa en el presente documento intercambiamente con "gen VDJ de Ig" o "gen VDJ de inmunoglobulina". En ciertos aspectos, el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado se aísla de una célula de la bolsa de Fabricio de pollo.

20 "Integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo" se refiere a integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo por recombinación homóloga. Más específicamente, tal integración se efectúa por recombinación homóloga entre un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo endógeno de un linfocito B (por ejemplo, una célula DT40) y un vector de polinucleótido recombinante que comprende tanto una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo y una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo. El vector además comprende el gen diana entre la región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo y la región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo.

30 Una "región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo" se refiere a una región en un genoma de pollo que está en dirección 5' a partir del codón de inicio (por ejemplo, localizado 5' al codón de inicio cuando se usa la hebra codificante o sentido para la orientación) de un gen V_H de inmunoglobulina de pollo en ciertos aspectos. Tal región también es referida como una "región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo de origen natural". Esta región debe ser suficientemente larga en un vector de polinucleótido recombinante para permitir recombinación homogénea con un gen V_H-D-J_H endógeno de un linfocito B de pollo. En ciertos aspectos, esta región es al menos 100 a 2.000 o al menos 500 a 2.000 (incluyendo todos los números enteros en el intervalo, por ejemplo, al menos 100, al menos 500, al menos 1.000, o al menos 1.500) nucleótidos de largo. En ciertos aspectos, el terminal 3' de la región es de 1 a 1.000 (incluyendo todos los números enteros en este intervalo) nucleótidos a partir del codón de inicio de un gen V_H de inmunoglobulina de pollo.

40 En ciertos aspectos, una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo no incluye ninguna secuencia en la matriz Ψ V_H. En ciertos otros aspectos, una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo puede incluir una secuencia de la matriz Ψ V_H.

45 En ciertos otros aspectos, "una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo" también puede incluir una secuencia que es suficientemente homóloga a una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo de origen natural para permitir recombinación homóloga con un gen V_H-D-J_H endógeno de un linfocito B de pollo. Tales regiones pueden compartir al menos 80,0 a 99,9 o al menos 90,0 a 99,9 (incluyendo todos los valores en el intervalo, por ejemplo, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95 o al menos 99) por ciento de identidad con una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo de origen natural.

50 El término "unido de forma operativa" significa que los componentes a los que se aplica el término están en una relación que los permite llevar a cabo sus funciones inherentes bajo condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control de transcripción "unida de forma operativa" a una secuencia codificante de proteína está ligada a la misma de modo que la expresión de la secuencia codificante de proteína se consigue bajo condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias control.

60 El término "secuencia control" como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido que pueden afectar a la expresión, procesamiento o localización intracelular de secuencias codificantes a las que están ligadas o unidas de forma operativa. La naturaleza de tales secuencias control puede depender del organismo hospedador. En aspectos particulares, las secuencias control de la transcripción para procariontes pueden incluir un promotor, sitio de unión ribosomal, y secuencia de finalización de la transcripción. En otros aspectos particulares, las secuencias control de la transcripción para eucariotes puede incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para los factores de la transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción, secuencias de finalización de la transcripción y secuencias de poliadenilación. En ciertos aspectos, las

“secuencias control” pueden incluir secuencias líder y/o secuencias pareja de fusión.

El término “polinucleótido” como se refiere en el presente documento significa polímeros de ácidos nucleicos de cadena sencilla o doble cadena. En ciertos aspectos, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los dos tipos de nucleótidos. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de base tales como bromouridina, modificaciones de ribosa tales como arabinosido y 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones del enlace de internucleótidos tales como fosforotioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilatioato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término “polinucleótido” específicamente incluye formas de cadena sencilla o doble de ADN.

El término “nucleótidos de origen natural” incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados” incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “enlaces de oligonucleótido” incluye enlaces de oligonucleótido tales como fosforotioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilatioato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche y col., 1986, *Nucl. Acids Res.*, 14:9.081; Stec y col., 1984, *J. Am. Chem. Soc.*, 106:6.077; Stein y col., 1988, *Nucl. Acids Res.*, 16:3.209; Zon y col., 1991, *Anti-Cancer Drug Design*, 6:539; Zon y col., 1991, “OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH”, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed.), Oxford University Press, Oxford Inglaterra; Stec y col., patente americana N.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman, 1990, *Chemical Reviews*, 90:543. Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta detectable para posibilitar la detección del oligonucleótido o su hibridación.

El término “vector” se usa para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, o virus) usado para transferir información codificante a una célula hospedadora. El término “vector de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula hospedadora y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas insertadas. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como transcripción, traducción y corte y empalme de ARN, si los intrones están presentes.

Como se entenderá por aquellos expertos en la técnica, los polinucleótidos pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmido y segmentos de gen modificado por ingeniería más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Tales segmentos se pueden aislar naturalmente, o modificar sintéticamente por los expertos en la técnica.

Como se reconocerá por los expertos en la técnica, los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla (codificante o antisentido) o de doble cadena, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o de ARN. Las moléculas de ARN pueden incluir moléculas de ARNhn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una manera uno a uno, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no necesitan, estar presentes en un polinucleótido según la presente descripción, y un polinucleótido puede, pero no necesita, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte. Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia natural o pueden comprender una secuencia que codifica una variante o derivado de tal secuencia.

Cuando se comparan secuencias de polinucleótido, se dice que dos secuencias son “idénticas” si la secuencia de nucleótidos en cada una de las dos secuencias es la misma cuando las secuencias se alinean para la máxima correspondencia. La identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos como se describe en el presente documento (por ejemplo, con respecto a una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo y una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo) se puede determinar según prácticas y criterios aceptados por la técnica, por ejemplo, los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 descritos en Altschul y col., *Nucl. Acids Res.* 25:3.389-3.402 (1977) y Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. El programa informático para la realización de los análisis BLAST está públicamente disponible en el “National Center for Biotechnology Information”. En un ejemplo ilustrativo, las puntuaciones acumulativas se pueden calcular usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos de emparejamiento; siempre >0) y N (puntuación de castigo para restos de mal emparejamiento; siempre <0). Las extensiones de las correspondencias de palabra en cada región se paran cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo cae fuera de la cantidad X de su valor alcanzado máximo; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de resto de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier de las dos secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo de BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, y expectación (E) de 10, y los alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10.915 (1989)), (B) de 50, expectación (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras.

Una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo” se refiere a una región que está en dirección 3' a partir del sitio de corte y empalme (por ejemplo, localizada 3' al sitio de corte y empalme cuando se usa la hebra codificante o sentido para la orientación) de un gen J_H de inmunoglobulina de pollo en ciertos aspectos. Tal región también es referida como una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo de origen natural”. Esta región debe ser suficientemente larga en

- un vector de polinucleótido recombinante para permitir recombinación homóloga con un gen V_H-D-J_H endógeno de un linfocito B de pollo. En ciertos aspectos, esta región es al menos 100 a 2.000 o al menos 500 a 2.000 (incluyendo todos los números enteros en el intervalo, por ejemplo, al menos 100, al menos 500, al menos 1.000, o al menos 1.500) nucleótidos de largo. En ciertos aspectos, al menos uno del terminal 5' de la región y el terminal 3' de la región es 1 a 1.000 (incluyendo todos los números enteros en este intervalo) nucleótidos a partir del sitio de corte y empalme de un gen J_H de inmunoglobulina de pollo. En ciertos aspectos, una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo no incluye ninguna secuencia en el grupo de genes C que codifican regiones constantes de una cadena pesada de inmunoglobulina.
- En ciertos otros aspectos, "una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo" también puede incluir una secuencia que es suficientemente homóloga a una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo de origen natural para permitir recombinación homóloga con un gen V_H-D-J_H endógeno de un linfocito B de pollo. Tales regiones pueden compartir al menos 80,0 a 99,9 o al menos 90,0 a 99,9 (incluyendo todos los valores en el intervalo, por ejemplo, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, o al menos 99) por ciento de identidad con una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo de origen natural.

La línea de linfocito B de pollo DT40 se deriva de un linfoma bursal inducido por virus de la leucosis aviar. Se detiene en una fase de diferenciación del linfocito B de la bolsa y se sabe que muta constitutivamente sus genes de inmunoglobulina cadena pesada y ligera en cultivo. Como otros linfocitos B, esta mutagénesis constitutiva dirige las mutaciones a la región variable (V) de los genes de la inmunoglobulina (Ig), y por tanto, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las moléculas anticuerpo expresadas. La mutagénesis constitutiva en las células DT40 tiene lugar por conversión génica usando como secuencias donadoras una matriz de genes V no funcionales (pseudogenes V; ψV) situada en dirección 5' de cada región V funcional. Previamente se mostró que la delección de la región ψV en el locus de la cadena ligera causa un cambio en el mecanismo de diversificación de conversión génica a hipermutación somática, el mecanismo comúnmente observado en los linfocitos B humanos. También se ha demostrado que DT40 soporta eficiente recombinación homóloga, que posibilita la creación de células modificadas en las que los genes específicos se modifican, se someten a delección o insertan o en las que los genes específicos de interés reemplazan un gen endógeno, en particular un gen de Ig reordenado.

La "hipermutación somática" se refiere a la mutación de un ácido nucleico en una célula somática a una tasa por encima de lo anterior (por ejemplo, de manera estadísticamente significativa). Preferiblemente, la hipermutación se refiere a una tasa de mutación de entre 10^{-5} y 10^{-3} pb⁻¹ generación⁻¹ al nivel fisiológico. Esta es mucho mayor que las tasas de mutación anteriores, que son del orden de 10^{-9} y 10^{-10} pb⁻¹ generación⁻¹. La hipermutación somática se puede detectar por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de los genes variables de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, secuencias codificadoras de la región determinante de complementariedad de los genes variables de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina) de células somáticas (por ejemplo, linfocitos B) se pueden comparar con la secuencia génica variable de la línea germinal más homóloga. En ciertos aspectos, las secuencias de las células somáticas difieren en al menos 1 a 10 (incluyendo todos los números enteros en el intervalo, por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 5, o al menos 10) por ciento de sus secuencias de la línea germinal correspondiente.

"Conversión génica" se refiere a la transferencia de la información de secuencia de manera unidireccional de un alelo homólogo al otro. Por ejemplo, la conversión génica incluye el proceso por el cual regiones pseudo V no funcionales (por ejemplo, pseudogenes V_H o V_L) sirven como donadores para transferir de una parte de la secuencia de nucleótidos al gen V reordenado y transcrito (por ejemplo, genes V_H o V_L reordenados y transcritos). La conversión génica se puede detectar por cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo la comparación de las secuencias de los genes V reordenados con aquellas de las regiones pseudo V.

La hipermutación somática y la conversión génica generan diversidad natural en los genes VDJ y VJ de inmunoglobulina de linfocitos B. La hipermutación somática tiene lugar en los centros germinales después de la estimulación de antígeno. La conversión génica tiene lugar en órganos linfoides primarios, como la bolsa de Fabricio en pollo y otras especies aviares, independiente de la estimulación de antígeno. En pollo, los tramos a partir de los pseudogenes V en dirección 5' se transfieren en el gen V_H-D-J_H o V_L-J_L reordenado.

En ciertos aspectos, el gen diana puede ser un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón o conejo) reordenado o un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina humanizada. Al integrar la composición descrita en el presente documento en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo, el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón o conejo) reordenado o el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina humanizada se puede diversificar por hipermutación somática, conversión génica o ambas en un linfocito B de pollo, tal como una célula DT40.

En ciertos aspectos, el gen diana no incluye genes V_H-D-J_H reordenados descritos en la publicación de la solicitud PCT N.º 2009/029315.

65

En ciertos aspectos, el gen diana es un gen que codifica una proteína marcadora, tal como la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína azul fluorescente (BFP). Genes como ejemplos adicionales incluyen aquellos que codifican resistencia a anticuerpos tales como neomicina, blasticidina, histidinol, higromicina, zeocina, zeomicina y puromicina. Genes diana como ejemplos adicionales incluyen genes V_H-D-J_H reordenados fusionados con una

5

secuencia codificante para un epítipo marcador tal como una etiqueta FLAG, Myc o HA.

Los vectores de polinucleótido recombinantes que contienen genes que codifican de proteínas marcadoras se pueden usar para facilitar la integración de otros genes diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo. Por ejemplo, un vector de polinucleótido recombinante que comprende una región de la

10

15

20

secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo, un gen de GFP, y una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo se pueden usar para integrar primero el gen de GFP en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de un linfocito B de pollo. Los linfocitos B de pollo con el gen de GFP integrado se pueden detectar fácilmente basándose en la fluorescencia generada por la GFP celularmente expresada. A continuación, tales linfocitos B se pueden someter a

25

transfección con un segundo vector de polinucleótido recombinante que comprende también una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo y una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo pero un segundo gen diana (por ejemplo, un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado). Por recombinación homóloga, el gen de GFP se puede reemplazar por el segundo gen diana en alguna de los linfocitos B sometidos a transfección, dichas células se

30

pueden detectar fácilmente mediante la pérdida de fluorescencia producida por GFP.

En ciertos aspectos, el gen diana es un gen que codifica una enzima de interés. El vector de polinucleótido recombinante que comprende tal gen diana es útil en la diversificación de la enzima de manera que se pueden obtener variantes de la enzima que tienen propiedades modificadas (por ejemplo, actividad catalítica, especificidad de sustrato y/o estabilidad de calor). Genes diana como ejemplos incluyen aquellos que codifican receptores, ligandos, proteasas, lipasas, glucosidasas, fosfatasas, quinasas y nucleasas.

En ciertos aspectos, los vectores de polinucleótido recombinantes de la presente descripción comprenden dos o más genes diana. Por ejemplo, un vector de polinucleótido recombinante que comprende un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado además puede comprender otro gen que codifica una proteína marcadora.

35

40

Composiciones

Vectores de polinucleótido recombinantes de la presente descripción pueden en ciertos aspectos contener una o más secuencias reguladoras, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de finalización, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y/u otras secuencias según sea apropiado. Los

45

50

55

vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo, fago, o fagomido, como sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual": 2^o edición, Sambrook y col., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación del ácido nucleico, tal como preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células, etc. están descritos en detalle en "Current Protocols in Molecular Biology", Segunda Edición, Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons, 1992, o sus actualizaciones posteriores.

La presente descripción también proporciona, según ciertos aspectos, composiciones que comprenden los vectores de polinucleótido recombinantes descritos en el presente documento.

En ciertos aspectos, se proporciona una composición que comprende vectores de polinucleótido recombinantes múltiples como se describe en el presente documento. Por ejemplo, como se describe en el presente documento tal composición puede comprender una pluralidad de vectores de polinucleótido recombinantes para integrar una pluralidad de genes diana en una pluralidad de loci de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo. Cada uno de los vectores comprende: (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo; (b) un gen diana; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo. Los genes diana en diferentes vectores de la composición pueden tener diferentes secuencias de nucleótidos y pueden codificar una o una pluralidad de proteínas diana y/o una o más variantes de las mismas.

Una "variante" de una "proteína diana" es una proteína que tiene al menos 60 a 99,5 (incluyendo todos los valores en el intervalo anterior, por ejemplo, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95 o al menos 99) por ciento de homología de secuencia con la proteína diana.

60

Como se usa en el presente documento, el porcentaje de homología de las dos secuencias de aminoácidos también se determina usando los programas BLAST de Altschul y col. (*J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) con sus parámetros por defecto.

65

En un aspecto preferido, el gen diana es un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado, que tras ser integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse

a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de V_H de inmunoglobulina, que puede incluir hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y/o en una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H de DT40. En un aspecto preferido adicional, el gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado se obtiene de una pluralidad de genes V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo. La edad del pollo a partir del cual se obtiene las células de la bolsa de Fabricio puede ser día 15 embrionario a día 180 después de incubar (incluyendo todos los números enteros en el intervalo). Los genes V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de células de la bolsa de Fabricio de pollo pueden haberse diversificado ya por hipermutación somática y conversión génica *in vivo*. Se pueden diversificar más cuando se integran de nuevo en los loci de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo por los vectores proporcionados en el presente documento.

Según ciertos aspectos descritos en el presente documento hay contemplado una composición que comprende vectores de polinucleótido recombinantes múltiples para integrar los genes V_H - J_H de inmunoglobulina reordenados múltiples en los loci de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo. Tal composición es útil para preparar una genoteca de regiones variables de la cadena pesada de inmunoglobulina, como se describe más adelante.

En ciertos aspectos se proporciona una composición que comprende un primer vector de polinucleótido recombinante para integrar un primer gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo como se describe en el presente documento, y un segundo vector de polinucleótido recombinante para integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo. El segundo vector de polinucleótido recombinante comprende: (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo; (b) un segundo gen diana; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo.

De una manera similar a lo anteriormente descrito para el primer gen diana, el segundo gen diana puede ser un gen que codifica alguna proteína de interés, tal como inmunoglobulinas, proteínas marcadoras y enzimas.

En ciertos aspectos, los primeros y segundos genes diana codifican subunidades de una proteína o dos proteínas que se unen una con otra para formar un complejo proteico. La composición en tales aspectos es útil en la diversificación de ambas subunidades o proteínas para modificar las características (por ejemplo, afinidad de unión o especificidad) de los complejos resultantes. Por ejemplo, el primer gen diana puede codificar una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina de mamífero (incluyendo ser humano, ratón o conejo) o humanizada), y el segundo gen diana puede codificar una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de mamífero (incluyendo ser humano, ratón o conejo) o humanizada). La composición en este ejemplo es útil en la integración de ambos genes diana en el genoma de un linfocito B de pollo (por ejemplo, células DT40) y diversificación de las regiones variables tanto cadena pesada como ligera de inmunoglobulina para desarrollar regiones variables de la inmunoglobulina con afinidad y/o especificidad alterada a un antígeno.

En una realización preferida, el primer gen diana es un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado y el segundo gen diana es un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado. Tras ser integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, el primer gen diana es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de V_H de inmunoglobulina, que puede incluir hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y/o en una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H de DT40; y el segundo gen diana es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de V_L de inmunoglobulina, que puede incluir hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_L de inmunoglobulina y/o en una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_L de DT40.

Un "locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo" se refiere al locus en el que un gen que codifica la cadena ligera de inmunoglobulina reside en el genoma de pollo. Contiene un gen J_L único y un gen V_L funcional en dirección 5'. Véase, Reynaud y col., *Cell* 40:283-91, 1985, publicación de solicitud de patente americana N.º US 2007/0186292, y publicación de solicitud PCT N.º WO 2009/029315. Este locus también contiene un grupo de pseudogenes (ΨV_L) en dirección 5' a partir del gen V_L así como un gen C que codifica una región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina del gen J_L .

Un "gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo" se refiere a un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado en una célula somática del linaje de linfocito B de manera que los genes V_L y J_L estén juntos en lugar de separados por

otras secuencias como en otras células (por ejemplo, células de la línea germinal). El “gen V_L - J_L de inmunoglobulina” se usa en el presente documento intercambiabilmente con el “gen V_L de Ig” o “gen V_J de inmunoglobulina”. En ciertas realizaciones, el gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado se aísla de una célula de la bolsa de Fabricio de pollo.

5 “Integrar un gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo” se refiere a integrar un gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo por recombinación homóloga. Más específicamente, tal integración se efectúa por recombinación homóloga entre un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo endógeno de un linfocito B (por ejemplo, una célula DT40) y un vector de polinucleótido recombinante que
10 comprende tanto una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo como una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de inmunoglobulina de pollo. El vector además comprende el gen diana entre la región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo y una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de inmunoglobulina de pollo.

15 Una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo” se refiere a una región en un genoma de pollo que está en dirección 5’ a partir del codón de inicio (por ejemplo, localizada 5’ al codón de inicio cuando se usa la hebra codificante o sentido para la orientación) de un gen V_L de inmunoglobulina de pollo en ciertos aspectos. Tal región también es referida como una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en
20 dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo de origen natural”. Esta región debe ser suficientemente larga en un vector de polinucleótido recombinante para permitir recombinación homóloga con un gen V_L - J_L endógeno de un linfocito B de pollo. En ciertos aspectos, esta región es al menos 100 a 2.000 o al menos 500 a 2.000 (incluyendo todos los números enteros en el intervalo, por ejemplo, al menos 100, al menos 500, al menos 1.000, o al menos 1.500) nucleótidos de largo. En ciertos aspectos, el terminal 3’ de la región es 1 a 1.000 (incluyendo todos los
25 números enteros en este intervalo) nucleótidos a partir del codón de inicio de un gen V_L de inmunoglobulina de pollo. En ciertos aspectos, una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo no incluye ninguna secuencia en la matriz ψV_L . En ciertos otros aspectos, sin embargo, una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo puede incluir una secuencia de la matriz ψV_L . Por ejemplo, ciertos vectores dirigidos a V_L pueden comprender una región de la secuencia de ácidos
30 nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo que contiene uno, dos o más pseudogenes V_L en el grupo de homología en dirección 5’. Como un ejemplo, un vector dirigido a V_L contenía dos pseudogenes V_L en la región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo como resultado de la distancia de secuencia (aproximadamente 2,4 kb) entre la región codificadora de V_L y el pseudogen V_L en dirección 5’ más cercano, que era una distancia relativamente corta en comparación con el espacio entre los
35 elementos homólogos en el locus IgH.

En ciertos otros aspectos, una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo” también puede incluir una secuencia que es suficientemente homóloga a una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo de origen natural para permitir
40 recombinación homóloga con un gen V_L - J_L endógeno de un linfocito B de pollo. Tales regiones pueden compartir al menos 80,0 a 99,9 o al menos 90,0 a 99,9 (incluyendo todos los valores en el intervalo, por ejemplo, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, o al menos 99) por ciento de identidad con una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5’ del gen V_L de inmunoglobulina de pollo de origen natural.

45 Una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de inmunoglobulina de pollo” se refiere a una región que está en dirección 3’ a partir del sitio de corte y empalme (por ejemplo, localizada 3’ al sitio de corte y empalme cuando se usa la hebra codificante o sentido para orientación) de un gen J_L de inmunoglobulina de pollo. Tal región también es referida como una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de
50 inmunoglobulina de pollo de origen natural”. Esta región debe ser suficientemente larga en un vector de polinucleótido recombinante para permitir la recombinación homóloga con un gen V_L - J_L endógeno de un linfocito B de pollo. En ciertos aspectos, esta región es al menos 100 a 2.000 o al menos 500 a 2.000 (incluyendo todos los números enteros en el intervalo, por ejemplo, al menos 100, al menos 500, al menos 1.000, o al menos 1.500) nucleótidos de largo. En ciertos aspectos, el terminal 3’ de la región es de 1 a 1.000 (incluyendo todos los números enteros en este intervalo) nucleótidos a partir del sitio de corte y empalme de un gen J_L de inmunoglobulina de pollo.
55 En ciertos aspectos, una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de inmunoglobulina de pollo no incluye ninguna secuencia en el gen C que codifica regiones constantes de una cadena ligera de la inmunoglobulina.

60 En ciertos otros aspectos, una “región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de inmunoglobulina de pollo” también pueden incluir una secuencia que es suficientemente homóloga a una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de inmunoglobulina de pollo de origen natural para permitir recombinación homóloga con un gen V_L - J_L endógeno de un linfocito B de pollo. Tales regiones pueden compartir al menos 80,0 a 99,9 o 90,0 a 99,9 (incluyendo todos los valores en el intervalo, por ejemplo, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, o al menos 99) por ciento de identidad con una región de la secuencia de
65 ácidos nucleicos en dirección 3’ del gen J_L de inmunoglobulina de pollo de origen natural.

Según ciertos otros aspectos, la presente descripción proporciona una composición que comprende (1) una pluralidad de primeros vectores de polinucleótido recombinantes para integrar una pluralidad de primeros genes diana en una pluralidad de loci de cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo, y (2) una pluralidad de segundos vectores de polinucleótido recombinantes para integrar una pluralidad de segundos genes diana en una pluralidad de loci de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo. Cada uno de los primeros vectores de polinucleótido recombinantes comprende: (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo; (b) un primer gen diana; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo. Cada uno de los segundos vectores de polinucleótido recombinantes comprende: (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo; (b) un primer gen diana; y (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo. Los primeros genes diana en diferentes primeros vectores de polinucleótido recombinantes pueden tener secuencias de nucleótidos y pueden codificar una primera proteína diana o sus variantes. Igualmente, los segundos genes diana en diferentes segundos vectores de polinucleótido recombinantes pueden tener diferentes secuencias de nucleótidos y pueden codificar una segunda proteína diana o sus variantes.

En ciertos aspectos, los primeros y segundos genes diana codifican subunidades de una proteína o dos proteínas que se unen una a otra para formar un complejo proteico o las variantes de tales subunidades o proteínas. Por ejemplo, el primer gen diana puede codificar una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina de mamífero (incluyendo ser humano, ratón, o conejo) o humanizada), y el segundo gen diana puede codificar una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina de mamífero (incluyendo ser humano, ratón, o conejo) o humanizada).

En un aspecto preferido, el primer gen diana es un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado y el segundo gen diana es un gen V_L-J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado. Tras ser integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, el primer gen diana es capaz de someterse a cualquier o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_H de inmunoglobulina, que puede incluir hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y/o en una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos de pseudogen V_H de DT40; y el segundo gen diana es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_L de inmunoglobulina, que puede incluir hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_L de inmunoglobulina y/o en una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos de pseudogen V_L de DT40. En un aspecto preferido adicional, el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado y/o el gen V_L-J_L reordenado se obtienen a partir de una pluralidad de genes V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenados y/o genes V_L-J_L reordenados aislados de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo. Las composiciones que comprenden múltiples primeros vectores de polinucleótido recombinantes y múltiples segundos vectores de polinucleótido recombinantes son útiles para generar una genoteca diversa de inmunoglobulinas que se pueden someter a cribado para identificar y recuperar anticuerpos capaces de unirse específicamente a antígenos diana deseados como se describe más adelante.

Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unión específica a una diana, tal como carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítipo, localizado en la región variable (también referida en el presente documento como dominio variable) de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como un anticuerpo de la región variable sencilla (AcD), u otros fragmentos de anticuerpo conocidos tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y similares, variantes sintéticas de cadena sencilla (ScFv) de los mismos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración obtenida por ingeniería o modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio o fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento a epítipo) de la especificidad requerida. "Diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; Holliger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6.444-6.448, 1993) son también una forma particular de anticuerpo contemplado en el presente documento. Los minicuerpos que comprenden una scFv unida a un dominio CH3 también están incluidos en el presente documento (Hu y col., *Cancer Res.*, 56, 3.055-3.061, 1996; véase también, por ejemplo, Ward y col., *Nature* 341, 544-546 (1989); Bird y col., *Science* 242, 423-426, 1988; Huston y col., *PNAS USA*, 85, 5.879-5.883, 1988; documento PCT/US92/09965; documento WO94/13804; Holliger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6.444-6.448, 1993; Reiter y col., *Nature Biotech* 14, 1.239-1.245, 1996; Hu y col., *Cancer Res.* 56, 3.055-3.061, 1996). También se contemplan nanocuerpos y maxicuerpos (véase, por ejemplo, los documentos U.S. 6,765,087; U.S. 6,838,254; WO 06/079372; WO

2010/037402).

El término "fragmento de unión a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos una CDR de una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina que se une al antígeno de interés. A este respecto, un fragmento de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en el presente documento puede comprender una, dos, tres, cuatro, cinco o todas las seis CDR de una secuencia V_H y/o V_L presentada en el presente documento.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una parte de una molécula capaz de unirse por un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y además capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítipos.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante de polipéptido, que es capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocito T. Un epítipo es una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo. En ciertos aspectos, determinantes de epítipo incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y pueden en ciertos aspectos tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. En ciertos aspectos, se dice que un anticuerpo se une específicamente un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Se puede decir que un anticuerpo según ciertos aspectos se une un antígeno específicamente cuando la constante de disociación de equilibrio para la unión anticuerpo-antígeno es menos que o igual a 10^{-6} M, o menos que o igual a 10^{-7} , o menos que o igual a 10^{-8} M. En algunos aspectos, la constante de disociación de equilibrio puede ser menos que o igual a 10^{-9} M o menos que o igual a 10^{-10} M.

La enzima proteolítica papaína preferencialmente parte moléculas de IgG para producir diversos fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) cada uno comprende un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión a antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de partir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento F(ab')₂ que comprende ambos sitios de unión a antígeno. Un fragmento Fv para usarse según ciertos aspectos de la presente descripción se puede producir mediante escisión proteolítica preferencial de una IgM, y en rara ocasiones de una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Sin embargo los fragmentos Fv más comúnmente se derivan usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero $V_H::V_L$ no covalente que incluye un sitio de unión a antígeno que retiene muchas de las capacidades de reconocimiento y unión a antígeno de la molécula de anticuerpo natural (Inbar y col. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:2.659-2.662; Hochman y col. (1976) *Biochem* 15:2.706-2.710; y Ehrlich y col. (1980) *Biochem* 19:4.091-4.096).

En ciertos aspectos, se contemplan anticuerpos Fv de cadena sencilla o scFv. Por ejemplo, se pueden preparar cuerpos Kappa (Ill y col., *Prot. Eng.* 10:949-57 (1997); minicuerpos (Martin y col., *EMBO J* 13:5.305-9 (1994); diacuerpos (Holliger y col., *PNAS* 90:6.444-8 (1993)); o Janusinas (Traunecker y col., *EMBO J.* 10:3.655-59 (1991) y Traunecker y col. *Int. J. Cancer Suppl.* 7:51-52 (1992)), usando las técnicas de biología molecular estándar seguido de las enseñanzas de la presente solicitud con respecto a la selección de anticuerpos que tienen la especificidad deseada. En aún otros aspectos, los anticuerpos biespecíficos o quiméricos se pueden hacer que abarquen los ligandos de la presente descripción. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender CDR y regiones marco conservadas de diferentes anticuerpos, mientras que los anticuerpos biespecíficos se pueden generar de manera que se unan específicamente a un antígeno deseado a través de un dominio de unión y a una segunda molécula a través de un segundo dominio de unión. Estos anticuerpos se pueden producir a través de técnicas biológicas moleculares recombinantes o se pueden conjugar físicamente juntos.

Un polipéptido Fv (sFv) de cadena sencilla es un heterodímero $V_H::V_L$ covalentemente unido que se expresa a partir de una fusión génica que incluyen genes codificadores de V_H y V_L unidos a un conector codificador peptídico. Huston y col. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85(16):5.879-5.883. Se ha descrito un número de métodos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas naturalmente agregadas pero químicamente separadas de una región V del anticuerpo en una molécula sFv que se plegará en una estructura tridimensional básicamente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, la patente americana N.º 5.091.513 y 5.132.405, de Huston y col.; y la patente americana N.º 4.946.778, de Ladner y col.

Un fragmento Acd de un anticuerpo consiste en un dominio V_H (Ward, E. S. y col., *Nature* 341, 544-546 (1989)).

En ciertos aspectos, un anticuerpo como se describe en el presente documento está en forma de un diacuerpo. Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando los dos dominios unidos (por ejemplo, por un conector peptídico) pero incapaces de asociarse uno con otro para formar un sitio de unión a antígeno; los sitios de unión a antígeno están formados por la asociación del primer dominio de un polipéptido en el multímero con el segundo dominio de otro polipéptido en el multímero (documento WO94/13804).

Cuando los anticuerpos biespecíficos son para usarse, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, los cuales se pueden fabricar en una diversidad de maneras (Holliger, P. y Winter G. *Current Opinion Biotechnol.* 4, 446-449 (1993)), por ejemplo, químicamente preparados o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos anteriormente mencionados. Los diacuerpos y scFv se pueden

5 construir sin una región Fc, usando solamente regiones variables, reduciendo potencialmente la probabilidad o gravedad de una respuesta inmune provocada, tal como una reacción antiidiotípica, en un sujeto que recibe una administración de tales anticuerpos.

Los diacuerpos biespecíficos, en lugar de los anticuerpos totales biespecíficos, también pueden ser particularmente

10 útiles debido a que se pueden construir y expresar fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas se pueden seleccionar fácilmente usando presentación en fago (documento WO94/13804) a partir de genotecas. Si un grupo del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida a antígeno X, entonces se puede producir una genoteca donde el otro grupo se varía y un anticuerpo de especificidad apropiada seleccionada. Los anticuerpos

15 completos biespecíficos se pueden producir mediante modificación por ingeniería de protuberancias en agujeros (Ridgeway y col, *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996).

En ciertos aspectos, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden proporcionar en la forma de un UniBody®. Un UniBody® es un anticuerpo de IgG4 con la región bisagra eliminada (véase, GenMab Utrecht, Los Países Bajos; véase también, por ejemplo, el documento US20090226421). Esta tecnología de anticuerpo patentada crea un formato de anticuerpo estable y más pequeño con una ventana terapéutica más larga esperada que los formatos de anticuerpo pequeños actuales. Los anticuerpos de IgG4 se consideran inertes y por tanto no interactúan con el sistema inmune. Los anticuerpos de IgG4 completamente humanos se pueden modificar eliminando la región bisagra del anticuerpo para obtener fragmentos de molécula medios que tienen distintas propiedades de estabilidad

20 en relación con la IgG4 intacta correspondiente (GenMab, Utrecht). Reducir a la mitad la molécula de IgG4 deja solamente un área sobre el UniBody® que se puede unir a antígenos cognados (por ejemplo, dianas de enfermedad) y el UniBody® por lo tanto se une univalentemente a solamente un sitio sobre las células diana. Para ciertos antígenos de superficie de célula cancerosa, esta unión univalente no puede estimular el crecimiento de las células cancerosas ya que se puede ver que usan anticuerpos bivalentes que tienen la misma especificidad a antígeno, y, por lo tanto, la tecnología de UniBody® puede proporcionar opciones de tratamiento para algunos tipos de cáncer que pueden ser refractarios a tratamiento con anticuerpos convencionales. El UniBody® es aproximadamente la mitad de tamaño de un anticuerpo de IgG4 regular. Este pequeño tamaño puede ser un gran beneficio cuando se trata algunas formas de cáncer, permitiendo mejor distribución de la molécula sobre mayores tumores sólidos y eficacia potencialmente creciente.

En ciertos aspectos, los anticuerpos de la presente descripción pueden tomar la forma de un nanocuerpo. Los nanocuerpos se codifican mediante genes únicos y se producen eficazmente en casi todos los hospedadores procariontes y eucariotes, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, la patente americana N.º 6.765.087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Hansenula* o *Pichia* (véase, por ejemplo, la patente americana N.º 6.838.254)). El proceso de producción se puede poner a escala y se han producido cantidades en multikilogramos de nanocuerpos. Los nanocuerpos se pueden formular como una solución lista para usar que tiene una larga semivida. El método de Nanoclone (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar Nanocuerpos frente a una diana deseada, basado en la selección de alto rendimiento automatizada de linfocitos B.

40

En ciertos aspectos, los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno como se describen en el presente documento incluyen un conjunto de CDR de una cadena pesada y una cadena ligera, respectivamente interpuesto entre el conjunto de región marco conservada (FR) de una cadena pesada y una cadena ligera que proporciona soporte a las CDR y define la relación espacial de las CDR en relación unas con otras. Como se usa en el presente documento, el término "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de la cadena pesada o ligera. Avanzando desde el terminal N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se indican como "CDR1," "CDR2," y "CDR3" respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, comprendiendo el conjunto de CDR de cada una de la región V de una cadena pesada y una ligera. Un polipéptido que comprende una CDR única (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) se refiere en el presente documento como una "unidad de reconocimiento molecular". El análisis cristalográfico de un número de complejos antígeno-anticuerpo ha demostrado que los restos de aminoácidos de las CDR forman contacto extenso con antígeno unido, en el que el contacto de antígeno más extenso es con la CDR3 de la cadena pesada. Por tanto, las unidades de reconocimiento molecular son principalmente responsables de la especificidad de un sitio de unión a antígeno.

50

Como se usa en el presente documento, el término "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de un conjunto de CDR de la región V de una cadena pesada o ligera. Algunos restos de FR pueden contactar con el antígeno unido; sin embargo, las FR principalmente son responsables del plegamiento de la región V en el sitio de unión a antígeno, particularmente los restos de FR directamente adyacentes a las CDR. En las FR, ciertos restos de aminoácidos y ciertas características estructurales están muy altamente conservadas. A este respecto, todas las secuencias de la región V contienen un bucle de disulfuro interno de restos de alrededor 90 aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de

60

65

unión, las CDR se muestran como motivos bucle salientes que forman una superficie de unión a antígeno. Generalmente se reconoce que son regiones estructurales conservadas de las FR que influyen en la forma plegada de los bucles de CDR en ciertas estructuras “canónicas” sin reparar en la secuencia de aminoácidos de CDR precisa. Además, se sabe que ciertos restos de FR participan en contactos interdominio no covalentes que establecen la interacción de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Las estructuras y localizaciones de las regiones variables de inmunoglobulina se pueden determinar como referencia a Kabat, E.A. y col., “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 4^o Edición, “US Department of Health and Human Services”, 1987, y sus actualizaciones, ahora disponibles en internet (immuno.bme.nwu.edu).

Un “anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de anticuerpo homogénea en la que el anticuerpo monoclonal está comprendido de aminoácidos (de origen natural y de no origen natural) que están implicados en la unión selectiva de un epítipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos a un epítipo único. El término “anticuerpo monoclonal” abarca no solamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv) cadena sencilla (scFv), variantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítipo) de la especificidad requerida y la capacidad de unirse a un epítipo. No se pretende que se limite con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en la que se produce (por ejemplo, por hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas así como los fragmentos, etc. anteriormente descritos.

Anticuerpos “humanizados” se refieren a una molécula quimérica, generalmente preparada usando técnicas recombinantes, que tienen un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender o bien regiones variables completas fusionadas sobre dominios constantes o solamente las CDR injertadas sobre las regiones marco conservadas apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a epítipo pueden ser de tipo silvestre o pueden estar modificados por una o más sustituciones de aminoácidos. La estructura quimérica elimina la región constante del origen no humano como un inmunogen en individuos humanos, pero la posibilidad de una respuesta inmune a la región variable extraña permanece (LoBuglio, A. F. y col., (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4.220-4.224; Queen y col., *PNAS* (1988) 86:10.029-10.033; Riechmann y col., *Nature* (1988) 332:323-327).

Otro planteamiento se centra no solamente en proporcionar regiones constantes derivadas de humanos, sino también en modificar las regiones variables así como para reformarlas tan cercanamente como sea posible a la forma humana. Como también se indicó anteriormente, se sabe que las regiones variables de tanto las cadenas pesadas como ligeras contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los epítopos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco conservadas (FR) que están relativamente conservadas en una especie dada y que proporcionan supuestamente un armazón para las CDR. Cuando los anticuerpos no humanos se preparan con respecto a un epítipo particular, las regiones variables se pueden “reformular” o “humanizar” injertando CDR derivadas de anticuerpo no humano sobre las FR presentes en el anticuerpo humano a modificar. La solicitud de este planteamiento a diversos anticuerpos se ha publicado por Sato, K., y col., (1993) *Cancer Res.* 53:851-856; Riechmann, L., y col., (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M., y col., (1988) *Science* 239:1.534-1.536; Kettleborough, C.A., y col., (1991) *Protein Engineering* 4:773-3.783; Maeda, H., y col. (1991) *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S.D., y col., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4.181-4.185; Tempest, P.R., y col., (1991) *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M.S., y col., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2.869-2.873; Carter, P., y col., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4.285-4.289; y Co, M.S. y col., (1992) *J. Immunol.* 148:1.149-1.154. En algunos aspectos, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado contiene todas las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otros aspectos, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se califican de una o más CDR “derivadas de” una o más CDR del anticuerpo original.

En ciertos aspectos, los anticuerpos de la presente descripción pueden ser anticuerpos quiméricos. A este respecto, un anticuerpo quimérico está comprendido de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de especificidad de unión deseada unido de forma operativa o si no fusionado a una parte Fc heteróloga de un anticuerpo diferente. En ciertos aspectos, el dominio Fc heterólogo es de origen humano. En otros aspectos, el dominio Fc heterólogo puede ser de una clase de Ig diferente del anticuerpo parental, incluyendo IgA (incluyendo subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (incluyendo subclases IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), e IgM. En aspectos adicionales, el dominio Fc heterólogo puede estar comprendido de dominios CH2 y CH3 de una o más de las diferentes clases de Ig. Como se indicó anteriormente con respecto a los anticuerpos humanizados, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo quimérico puede comprender solamente una o más de las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento), o pueden comprender un dominio variable entero (V_L, V_H o ambas).

En ciertos aspectos, un anticuerpo que tiene una especificidad de unión a antígeno deseada comprende una o más de las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento. A este respecto, se ha mostrado en algunos casos que la transferencia de solamente la VHCDR3 de un anticuerpo se puede hacer mientras aún se retiene la unión específica deseada (Barbas y col., *PNAS* (1995) 92:2.529-2.533). Véase también, McLane y col., *PNAS* (1995) 92:5.214-5.218, Barbas y col., *J. Am. Chem. Soc.* (1994) 116:2.161-2.162.

Marks y col (*Bio/Technology*, 1992, 10:779-783) describen métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que los cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable se usan junto con cebadores consenso a la tercera región marco conservada de los genes V_H , para proporcionar un repertorio de dominios variables V_H que carecen de una CDR3. Marks y col. además describen cómo se pueden combinar este repertorio con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de los anticuerpos actualmente descritos se pueden barajar con repertorios de dominios V_H y V_L que carecen de una CDR3, y los dominios V_H y V_L completos barajados combinados con un dominio V_L y V_H cognado para proporcionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno deseado. A continuación el repertorio se puede mostrar en un sistema hospedador adecuado tal como el sistema de presentación en fago del documento WO92/01047 de manera que los anticuerpos adecuados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden seleccionar. Un repertorio puede consistir en al menos de aproximadamente 10^4 miembros individuales y más por varias órdenes de magnitud, por ejemplo, a aproximadamente de 10^6 a 10^8 o 10^{10} o más miembros. Barajar análogos o técnicas combinatorias también están descritas por Stemmer (*Nature*, 1994, 370:389-391), quien describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa pero observa que el planteamiento se puede usar para la generación de anticuerpos.

Una alternativa adicional es generar nuevas regiones V_H y V_L nuevas que llevan una o más secuencias derivadas de CDR de los ejemplos descritos en el presente documento usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes V_H y/o V_L seleccionados para generar mutaciones en el dominio variable entero. Tal técnica está descrita por Gram y col. (1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3.576-3.580), quien usó PCR propensa a error. Otro método que se puede usar es mutagénesis directa a regiones CDR de los genes V_H o V_L . Tales técnicas están descritas por Barbas y col. (1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3.809-3.813) y Schier y col. (1996 *J. Mol. Biol.* 263:551-567).

En ciertos aspectos, una V_H y/o V_L específica de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar para cribado de una genoteca del dominio variable de complementariedad para identificar anticuerpos con propiedades deseadas, tales como afinidad incrementada para un antígeno deseado. Tales métodos están descritos, por ejemplo, en Portolano y col., *J. Immunol.* (1993) 150:880-887; Clarkson y col., *Nature* (1991) 352:624-628.

También se pueden usar otros métodos para mezclar y emparejar CDR para identificar anticuerpos que tienen actividad de unión deseada. Por ejemplo: Klimka y col., *British Journal of Cancer* (2000) 83:252-260, describen un proceso de cribado que usa una genoteca de V_L de ratón y una de V_H humana con CDR3 y FR4 conservadas de la V_H de ratón. Después de obtener los anticuerpos, la V_H se sometió a cribado frente a una genoteca de V_L humana para obtener anticuerpos que se unen a antígeno. Beiboer y col., *J. Mol. Biol.* (2000) 296:833-849 describen un proceso de cribado que usa una genoteca entera de cadena pesada de ratón y una de cadena ligera humana. Después de obtener los anticuerpos, se combinó una V_L con una genoteca de V_H humana con la CDR3 del ratón conservada. Se obtuvieron anticuerpos capaces de unirse a antígeno. Rader y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1998) 95:8.910-8.915 describen un proceso similar al anterior de Beiboer y col.

Estas técnicas ya descritas son, por sí mismas, conocidas como tales en la técnica. Sin embargo, basándose en la presente descripción, el experto en la técnica será capaz de usar tales técnicas para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos según varios aspectos descritos en el presente documento, usando la metodología de rutina en la técnica.

Un epítipo que "se une específicamente" o "se une preferencialmente" (usado intercambiamente en el presente documento) a un anticuerpo o un polipéptido es un término bien conocido en la técnica, y los métodos para determinar tal unión específica o preferencial también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula presenta "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferencialmente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que se une a otras sustancias. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que específica o preferencialmente se une a una primera diana puede o no puede unirse específica o preferencialmente a una segunda diana. De por sí, "unión específica" o "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferencial.

La unión inmunológica se refiere generalmente a las interacciones no covalentes del tipo que se dan entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica, por ejemplo, a modo de ilustración y no limitación, como resultado de atracciones o repulsión electrostáticas, iónicas, hidrófilas y/o hidrófobas, fuerzas estéricas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, y otras interacciones. La fuerza, o

afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de constante de disociación (k_d) de la interacción, en la que una k_d menor representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de los polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Un dicho método implica medir las tasas de la formación de complejo sitio de unión a antígeno/antígeno y la disociación, en el que esas tasas dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, la afinidad de la interacción, y de los parámetros geométricos que influyen igualmente en la tasa en ambas direcciones. Por tanto, tanto la “constante de asociación” (K_{on}) y la “constante de disociación” (K_{off}) se pueden determinar mediante el cálculo de las concentraciones y las tasas actuales de asociación y disociación. La relación de K_{off}/K_{on} posibilita la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y, por tanto, es igual a la constante de disociación K_d . Véase, en general, Davies y col. (1990) *Annual Rev. Biochem.* 59:439-473.

El término “inmunológicamente activo”, con referencia a un epítipo que es o “se mantiene inmunológicamente activo”, se refiere a la capacidad de un anticuerpo de unirse al epítipo bajo diferentes condiciones, por ejemplo, después de que el epítipo se haya sometido a condiciones de reducción y desnaturalización.

Células hospedadoras y genotecas

En otros aspectos, la presente descripción proporciona células hospedadoras que comprenden los vectores de polinucleótido recombinantes o composiciones que comprenden tales vectores descritos en el presente documento.

En ciertos aspectos relacionados, las células hospedadoras son capaces de propagar los vectores de polinucleótido recombinantes descritos en el presente documento. Células hospedadoras como ejemplos para tales propósitos incluyen células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*).

En ciertos aspectos, las células hospedadoras son células de pollo que permiten la integración de un gen diana en un locus de la cadena pesada o ligera del gen de inmunoglobulina de pollo. En una realización preferida, las células hospedadoras son linfocitos B de pollo o células derivadas de linfocitos B de pollo, tales como células del linfoma bursal de pollo. En una realización más preferida, las células hospedadoras son células DT40.

En ciertos aspectos, las células hospedadoras son linfocitos B de pollo (por ejemplo, células DT40) que comprenden además un “elemento regulador en cis” (por ejemplo, una secuencia del operador de lactosa polimerizada) en sus loci de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina y/o sus loci de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina para permitir el uso de los sistemas descritos en los documentos WO 2009/029315 y US 2010093033 que facilitan además la diversificación de secuencias diana. En resumen, en los mismos se describe un linfocito B modificado que permite inducción reversible de la diversificación de un gen diana. Las células se modifican para incluir un “elemento regulador en cis” unido de forma operativa a un gen diana de interés (por ejemplo, un gen V_H -D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado). La célula se modifica además para incluir un “factor de diversificación” que se fusiona a un “factor de anclaje”. La función del factor de anclaje es unirse al elemento regulador en cis, trayendo de ese modo el factor de diversificación a la región que controla la expresión y/o mutagénesis del gen diana. El papel del factor de diversificación es acelerar o regular la diversificación (mutación) de la secuencia diana. Puesto que el gen diana está insertado en el locus de Ig, las mutaciones se dirigen a su región codificante y se controlan mediante el uso de la proteína de fusión de factor de diversificación-factor de anclaje. Generalmente, el elemento regulador en cis puede ser cualquier secuencia de ADN que permite la unión de un factor de anclaje al mismo de una manera específica a una secuencia y está colocado en una región que controla la expresión o diversificación de un gen (por ejemplo, el gen de interés, tal como un gen diana). Los elementos reguladores en cis pueden incluir un operador de lactosa polimerizada (PolyLacO), tal como los que comprenden aproximadamente 100 repeticiones del sitio de unión a LacO de 20 pares de bases. El elemento regulador en cis está colocado en la región ψV de la cadena ligera de Ig λ y los loci de IgH. El factor de anclaje incluye el represor de Lac (LacI) que se une con alta afinidad al LacO. Esta inserción del elemento regulador en cis no afecta al proceso normal de la mutagénesis con molde (conversión génica) en la línea celular de DT40 modificada.

El aspecto inducible del sistema de los documentos WO2009029315 y US2010093033 se da a través de la expresión de las proteínas de fusión factor de anclaje (LacI)-factor de diversificación y el uso de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG), una pequeña molécula que causa liberación de LacI de LacO. El cultivo de las células DT40 modificadas con apenas 10 μM de IPTG causa liberación de LacI de PolyLacO y no afecta a la proliferación celular. Se contemplan muchos factores diferentes de diversificación e incluyen factores que afectan a la estructura de la cromatina, activadores transcripcionales y otros reguladores de gen, desaminasas, proteínas implicadas en la reparación y replicación de ADN, resolvasas y helicasas, reguladores del ciclo celular, proteínas del complejo de poro nuclear, y proteínas implicadas en ubiquitinilación. Una construcción de factor de anclaje-factor de diversificación como ejemplo incluye LacI-HP1. En esta construcción, la proteína de heterocromatina, HP1, promueve una estructura de cromatina cerrada de genes cercanos. Por tanto, cuando LacI se une al PolyLacO en las células DT40 modificadas, la proteína HP1 anclada causa una transición de las secuencias ψV donadoras de un estado de cromatina abierta a no permisiva. Esto es funcionalmente equivalente a la delección de la región ψV e igualmente da como resultado el cambio de una mutagénesis con molde del locus $V\lambda$ de Ig en dirección 3' a una hipermutación somática de esta región dirigida. Las construcciones adicionales factor de anclaje-factor de diversificación útiles en combinación con PolyLacO también están descritas en los documentos WO2009029315 y

US2010093033.

En ciertos aspectos, las células hospedadoras son células de pollo (por ejemplo, células DT40) en las que los genes que codifican regiones constantes de la cadena pesada de Ig de pollo y/o genes que codifican regiones constantes de la cadena ligera de Ig de pollo se han reemplazado con genes que codifican regiones constantes de la cadena pesada y/o ligera de Ig humana. Tales sustituciones también se pueden hacer por recombinación homóloga en regiones en dirección 5' y en dirección 3' a partir de los genes de pollo a reemplazar. Tales células hospedadoras son capaces de generar anticuerpos quiméricos y, por tanto, facilitar la humanización de anticuerpos deseables producidos en aquellas células.

En un aspecto relacionado, la presente descripción proporciona genotecas de células hospedadoras que comprenden los vectores de polinucleótido recombinantes descritos en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona una genoteca de células hospedadoras para propagar los vectores de polinucleótido recombinantes descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede producir una genoteca de célula bacteriana transformando células bacterianas con una composición que comprende vectores de polinucleótido recombinantes múltiples para integrar genes V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de células de la bolsa de Fabricio de pollo. Igualmente, otra genoteca de célula bacteriana se puede producir transformando células bacterianas con una composición que comprende vectores de polinucleótido recombinantes múltiples para integrar genes V_L - J_H de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de células de la bolsa de Fabricio de pollo.

En otro aspecto, se proporciona una genoteca de células de pollo con genes diana integrados en sus loci de la cadena pesada y/o ligera del gen de inmunoglobulina. Una genoteca como ejemplo puede comprender células DT40 sometidas a transfección con vectores de polinucleótido recombinantes que contienen diferentes genes de la región variable de la cadena pesada aislados de células de la bolsa de Fabricio de uno o más pollos. Tal genoteca se puede producir según el método para integrar genes diana en los loci de la cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina de pollo como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, se proporciona una genoteca de células de pollo con genes diana integrados en sus loci de la cadena pesada y/o ligera del gen de inmunoglobulina. Una genoteca como ejemplo puede comprender progenie de células DT40 sometidas a transfección con vectores de polinucleótido recombinantes que contienen diferentes genes de la región variable de la cadena pesada de Ig aislados de células de la bolsa de Fabricio de uno o más pollos. Se pueden producir según el método de producción de repertorios de variantes de secuencia de polipéptidos de la cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina de pollo como se describe en el presente documento.

Las genotecas proporcionadas en el presente documento pueden comprender al menos 10 a 10^{14} (incluyendo todos los números enteros en el intervalo anterior, por ejemplo, al menos 10, al menos 100, al menos 1.000, al menos 10.000, al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , etc.) células que contienen variantes de secuencia de los genes diana, por ejemplo, en ciertos aspectos al menos 10^3 a 10^7 células que contienen variantes de secuencia de los genes diana. Por ejemplo, una genoteca puede tener al menos 10 a 10^{14} células DT40 que contienen diferentes genes de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.

Métodos de integración o diversificación de genes diana

Según ciertos aspectos de la presente descripción, se proporciona un método para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo. Tal método comprende: (a) someter a transfección linfocitos B de pollo con un vector de polinucleótido recombinante para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo o una composición que comprende una pluralidad de tales vectores de polinucleótido recombinantes como se proporcionan en el presente documento; y (b) identificar un linfocito B en el que el gen diana está integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina.

La etapa (a) se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica para someter a transfección una célula de pollo con un vector de polinucleótido recombinante, incluyendo el método usado en el Ejemplo de más adelante. Algunos linfocitos B de pollo que permiten la recombinación homóloga se pueden someter a transfección. Se proporciona descripción adicional de tales células anteriormente relacionado con las células hospedadoras.

La etapa (b) se puede realizar usando cualquier método apropiado conocido en la técnica. Por ejemplo, los linfocitos B en los que el gen diana está integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina se pueden identificar por análisis de transferencia Southern usando el gen diana como sonda o mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el fragmento de ácidos nucleicos entre la región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo y la región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo, seguido de detección del fragmento de ácidos nucleicos amplificado. En ciertas realizaciones, los linfocitos B en los que se ha de integrar un gen diana puede tener ya un gen marcador (por ejemplo, el gen de GFP) integrado en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo. La integración del gen diana en tales linfocitos B se puede identificar por la sustitución del gen marcador con el gen diana y, por lo tanto, la pérdida del marcador (por ejemplo, fluorescencia producida por GFP).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para integrar un primer gen diana en un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo e integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera de inmunoglobulina de pollo. Tal método comprende (a) someter a transfección linfocitos B de pollo con (1) un primer vector de polinucleótido recombinante para integrar un primer gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo o una primera composición que comprende una pluralidad de tales primeros vectores de polinucleótido recombinantes proporcionados en el presente documento, y (2) un segundo vector de polinucleótido recombinante para integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo o una segunda composición que comprende una pluralidad de tales segundos vectores de polinucleótido recombinantes proporcionados en el presente documento; e (b) identificar un linfocito B de pollo en el que el primer gen diana está integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina y el segundo gen diana está integrado en el locus de la cadena ligera de inmunoglobulina.

La etapa (a) se puede realizar mezclando primero uno o más de los primeros vectores de polinucleótido recombinantes para integrar un primer gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo con uno o más de los segundos vectores recombinantes para integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo para formar una mezcla y, a continuación, someter a transfección los linfocitos B con dicha mezcla. Alternativamente, los linfocitos B de pollo se pueden someter a transfección de manera separada con uno o más de los primeros vectores de polinucleótido recombinantes y con uno o más de los segundos vectores de polinucleótido recombinantes.

La etapa (b) se puede realizar usando cualquier método apropiado conocido en la técnica. En ciertos aspectos preferidos, los linfocitos B en los que se han de integrar los primeros y segundos genes ya pueden tener un primer gen marcador (por ejemplo, el gen de GFP) integrado en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo y un segundo gen marcador (por ejemplo, el gen de BFP) integrado en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo. La integración de tanto los primeros como los segundos genes diana en tales linfocitos B se pueden identificar por la sustitución de los primeros y segundos genes marcadores con los primeros y segundos genes diana, por tanto, la pérdida de tanto los primeros como los segundos marcadores (por ejemplo, fluorescencia producida por GFP y por BFP).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un repertorio (es decir, una genoteca) de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena pesada de inmunoglobulina de un polipéptido diana codificado por un gen diana que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina reordenado. Tal método comprende: cultivar un linfocito B que contiene un vector que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina reordenado bajo condiciones que permiten la proliferación del linfocito B hasta que se obtiene una pluralidad de linfocitos B. El linfocito B es capaz de cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_H de inmunoglobulina, que puede incluir hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y/o en una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H . La proliferación del linfocito B produce un repertorio de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena pesada de inmunoglobulina del polipéptido diana codificado por el gen diana que comprende el gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina reordenado.

En ciertos aspectos, el gen diana comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón o conejo) o humanizada. En ciertos aspectos preferidos, el gen diana comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina reordenado de pollo.

En ciertos aspectos, el linfocito B a proliferar se puede someter a transfección con, y por tanto comprender un segundo vector para integrar un gen V_L - J_L de inmunoglobulina reordenado en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo como se describe en el presente documento. El gen V_L - J_L de inmunoglobulina reordenado puede ser un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón, o conejo) o humanizada reordenado. En aspectos preferidos, el gen V_L - J_L de inmunoglobulina reordenado es un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado.

En ciertos aspectos, el linfocito B a proliferar puede comprender un operador de lactosa polimerizada en su locus de la cadena pesada o ligera del gen de inmunoglobulina. Como se describió anteriormente, el operador de lactosa polimerizada facilita diversificación de los gen(es) diana.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para cribado de linfocitos B para la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno dado. Como se describió anteriormente, los linfocitos B de pollo (por ejemplo, células DT40) se pueden someter a transfección con un primer vector de polinucleótido recombinante que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina reordenado y un segundo vector de polinucleótido recombinante que comprende un gen V_L - J_L de inmunoglobulina reordenado para obtener un linfocito B de pollo que tiene el gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina reordenado integrado en su locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina y el gen V_L - J_L de inmunoglobulina reordenado integrado en su locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina. Tales linfocitos B de pollo además se pueden cultivar para obtener una pluralidad de linfocitos B

que producen un repertorio de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena pesada de inmunoglobulina así como un repertorio de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena ligera de inmunoglobulina. La pluralidad de linfocitos B se puede someter a cribado para su producción de anticuerpos que se unen a un antígeno específico.

5 Se pueden usar cualquier método apropiado para cribado linfocitos B para su producción de anticuerpos específicos a antígeno conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede detectar la unión de moléculas de inmunoglobulina a antígenos específicos como interacción con derivados fluorescentes de los antígenos analizados por inmunocitofluorimetría de flujo; y se pueden recuperar linfocitos B que se unen a un antígeno específico tras la clasificación mediante la misma técnica de citometría de flujo o similar (por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia, FACS). Los linfocitos B que se unen a antígenos específicos también se pueden seleccionar sobre soportes sólidos que llevan esos antígenos, por ejemplo, perlas magnéticas revestidas por antígeno. Por el contrario, la unión a soportes sólidos también puede permitir la separación de linfocitos B con especificidades de unión no deseadas en una técnica apropiadamente configurada, tal como agotamiento de las células mediante “selección (*panning*)” sobre placas revestidas con antígeno. Métodos como ejemplos para cribado de linfocitos B para producir anticuerpos específicos a antígenos particulares incluyen clasificación celular activada por magnetismo (MACS) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) como se describe en el Ejemplo. Se pueden realizar múltiples rondas de selección para identificar los linfocitos B con suficiente afinidad de unión al antígeno específico.

20 En ciertos aspectos, el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina reordenado y el gen V_L-J_L de inmunoglobulina reordenado integrados en los loci de la cadena pesada y ligera del gen de inmunoglobulina de pollo, respectivamente, son un gen de la cadena pesada V_H-D-J_H de inmunoglobulina reordenado humano y un gen de la cadena ligera V_L-J_L de inmunoglobulina reordenado humano. El método para cribado de linfocitos B para producir anticuerpos específicos para un antígeno particular anteriormente descrito es, por tanto, capaz de identificar directamente los linfocitos B que producen anticuerpos humanos que se unen al antígeno. Tales linfocitos B pueden haber tenido ya genes de la región constante de la cadena pesada y ligera de pollo reemplazados por genes de la región constante de la cadena pesada y ligera humanos, antes de la integración de los genes V_H-D-J_H y V_L-J_L de inmunoglobulina reordenados humanos en los loci de la cadena pesada y ligera del gen de inmunoglobulina de pollo.

30 En ciertos aspectos, el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina reordenado y el gen V_L-J_L de inmunoglobulina reordenado integrados en los loci de la cadena pesada y ligera del gen de inmunoglobulina de pollo, respectivamente, son un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina reordenado humanizado (por ejemplo, aquellos que contienen regiones marco conservadas de la cadena pesada humanas) y un gen V_L-J_L de inmunoglobulina reordenado humanizado (por ejemplo, aquellos que contienen regiones marco conservadas de la cadena ligera humanas). El método para cribado de linfocitos B para producir anticuerpos específicos para un antígeno particular anteriormente descrito es por tanto capaz de identificar directamente los linfocitos B que producen anticuerpos humanizados que se unen al antígeno.

40 En ciertos aspectos, el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina reordenado y el gen V_L-J_L de inmunoglobulina reordenado integrados en los loci de la cadena pesada y ligera del gen de inmunoglobulina de pollo, respectivamente, son un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina reordenado de pollo y un gen V_L-J_L de inmunoglobulina reordenado de pollo. En aspectos preferidos, el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina reordenado y el gen V_L-J_L de inmunoglobulina reordenado se obtienen de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo. El método de cribado de linfocitos B para producir anticuerpos específicos para un antígeno particular descrito en el presente documento es, por tanto, capaz de identificar linfocitos B que producen anticuerpos de pollo que se unen al antígeno. Los anticuerpos de pollo obtenidos además pueden ser humanizados usando métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica.

50 Los anticuerpos obtenidos por los métodos anteriormente descritos pueden tener aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Además, los métodos son adaptables a planteamientos de alto rendimiento, y pueden ser especialmente adecuados para desarrollos de anticuerpos monoclonales para medicina personalizada.

Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo de tejido y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar según las especificaciones del fabricante o como se efectúan comúnmente en la técnica o como se describen en el presente documento. Estas y las técnicas y procedimientos relacionados generalmente se pueden realizar según los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas en técnicas de microbiología, biología molecular, bioquímica, genética molecular, biología celular, virología e inmunología que se citan y discuten por toda la presente memoria. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; “Current Protocols in Molecular Biology” (John Wiley and Sons, actualización Julio 2008); “Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology”, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; “Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II” (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); “Current Protocols in Immunology” (Editado por: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); “Real-Time PCR: Current Technology and Applications”, Editado por Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; “Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes”, (Academic Press, Nueva York, 1992); Guthrie y Fink, “Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology” (Academic Press, Nueva York, 1991);

5 “Oligonucleotide Synthesis” (N. Gait, Ed., 1984); “Nucleic Acid Hybridization” (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985);
 “Transcription and Translation” (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); “Animal Cell Culture” (R. Freshney, Ed., 1986);
 “Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning” (1984); “Next-Generation Genome Sequencing” (Janitz, 2008 Wiley-
 VCH); “PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)” (Park, Ed., 3ª Edición, 2010 Humana Press); “Immobilized
 10 Cells And Enzymes” (IRL Press, 1986); el tratado, “Methods In Enzymology” (Academic Press, Inc., N.Y.); “Gene
 Transfer Vectors For Mammalian Cells” (J.H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory);
 Harlow y Lane, “Antibodies”, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998);
 “Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology” (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres,
 1987); “Handbook Of Experimental Immunology”, Volúmenes I-IV (D.M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Riott,
 15 “Essential Immunology”, 6º Edición, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); “Embryonic Stem Cells:
 Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)” (Kurstad Turksen, Ed., 2002); “Embryonic Stem Cell
 Protocols: Volume I: Isolation and Characterization (Methods in Molecular Biology)” (Kurstad Turksen, Ed., 2006);
 “Embryonic Stem Cell Protocols: Volume II: Differentiation Models (Methods in Molecular Biology)” (Kurstad Turksen,
 Ed., 2006); “Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology)” (Kursad Turksen Ed., 2006);
 20 “Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)” (Darwin J. Prockop, Donald G.
 Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008); “Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine)”
 (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001); “Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular
 Biology)” (Kevin D. Bunting Ed., 2008) “Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)”
 (Leslie P. Weiner Ed., 2008).

20 A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los
 procedimientos y técnicas de laboratorio de, biología molecular, química analítica, química orgánica sintética, y
 química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento son bien conocidos y normalmente usados en
 la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para la tecnología recombinante, biología molecular, microbiología,
 25 síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación, y administración, y tratamiento de
 pacientes.

30 Por toda esta memoria, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprender”, o variaciones tales
 como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado o número
 entero o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o
 grupo de elementos o números enteros. Por “consistir en” se quiere decir incluir, y generalmente limitado a, lo que
 sea que siga la frase “consistir en”. Por “consistir básicamente en” se quiere decir incluir cualquier elemento
 35 enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o
 acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por tanto, la frase “consistir básicamente en”
 indica que los elementos enumerados se requieren o son obligatorios, pero que no otros elementos se requieren y
 pueden o no pueden estar presentes dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos
 enumerados.

40 En esta memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular “un”, “una” y “el” y “la” incluyen referencias
 del plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Como se usa en el presente documento, en
 aspectos particulares, los términos “aproximado” o “aproximadamente” cuando preceden un valor numérico indica el
 valor más o menos un intervalo de 5 %, 6 %, 7 %, 8 % o 9 %. En otros aspectos, los términos “aproximado” o
 “aproximadamente” cuando preceden un valor numérico indican el valor más o menos un intervalo de 10 %, 11 %,
 45 12 %, 13 % o 14 %. En otros aspectos más, los términos “aproximado” o “aproximadamente” cuando preceden un
 valor numérico indica el valor más o menos un intervalo de 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 %.

La referencia por toda esta memoria a “una realización” o “un aspecto” significa que un rasgo particular, estructura o
 característica descrita en relación con la realización está incluida en al menos un aspecto de la presente descripción.
 Por tanto, las apariciones de las frases “en un aspecto” en diversos sitios por toda esta memoria no son
 50 necesariamente todos referentes al mismo aspecto. Además, los rasgos, estructuras o características particulares se
 pueden combinar de cualquier manera adecuada en uno o más aspectos.

El siguiente ejemplo es a modo ilustrativo y no es limitante.

55 Ejemplo

En este ejemplo se usan los siguientes materiales y métodos:

60 Cultivo celular y manipulación genética dirigida. Las líneas celulares derivadas de DT40 (Cummings y col., 2007;
 Cummings y col., 2008; Yabuki y col., 2009; y como se describen en el presente documento) se mantuvieron y se
 sometieron a transfección como se describió previamente (Yabuki y col., 2005). Las células FreeStyle 293-F
 (Invitrogen, Carlsbad, CA) se mantuvieron y se sometieron a transfección como se especifica por el fabricante.

Se dirigió PolyLacO a la matriz ψ_{VH} en el alelo de la cadena pesada reordenado y expresado de células DT40
 PolyLacO- λ R, previamente modificadas por ingeniería para llevar el PolyLacO en el alelo de la cadena ligera
 65 reordenado o expresado (Cummings y col., 2007; Cummings y col., 2008; Yabuki y col., 2009). El elemento
 regulador de PolyLacO (Robinett y col., 1996) comprendía aproximadamente 100 repeticiones de un operador de

lactosa de 20 mer (LacO). La construcción de transferencia (*targeting construct*), pPolyLacO- ψ V_H, llevaba el gen de resistencia a blastidina para posibilitar la selección de transfectantes estables seguido de aproximadamente 10 días de crecimiento en 20 μ g/ml de concentración de blastidina (Invitrogen). Para generar esta construcción, se obtuvieron grupos de homología de 2,8 y 4,2 kb de los fragmentos de matriz ψ VH amplificados a partir de ADN genómico de DT40 usando los cebadores 5'-GGGGTCTCTATGGGGTCTAAGCGTGGCC-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-GGCCGATTCTTTTCTCATGAGATCCCTCCAGAAG-3' (SEQ ID NO:2) o 5'-TTCCCCACAACCAGGCCATGCGCCTCCTTG-3' (SEQ ID NO:3) y 5'-CCTGCAGACACCCAGAGGAGGGCTCAGC-3' (SEQ ID NO:4). El PolyLacO, el gen de resistencia a blastidina, y dos grupos de homología se subclonaron en pBluescript II KS(+) (Stratagen). La construcción se verificó mediante análisis de restricción y secuenciación parcial, y se propagó en cepas de *E. coli* deficientes en recombinación Stb12 (Invitrogen) para mantener la estabilidad de repetición. La manipulación dirigida se llevó a cabo básicamente como se describió anteriormente (Yabuki y col., 2009). Las células DT40 PolyLacO- λ R se sometieron a transfección, y después de 10 días de cultivo en presencia de antibiótico, los transfectantes estables se sometieron a cribado por PCR genómica y transferencia Southern para identificar integrantes homólogos.

El repertorio de la región V_H (VDJ) de células DTLacO se aumentó en dos etapas, ambas de las cuales dependían del vector de transferencia, pVDJ3. Para generar pVDJ3, se amplificaron grupos de homología de 2,2 y 1,8 kb a partir del ADN genómico de DT40 usando los cebadores 5'-TGAATGCTTTGTTAGCCCTAATTAGGGATTGAATTGAGAG-3' (SEQ ID NO:5) y 5'-CCGTGAGACCCCCCGTTGACC-3' (SEQ ID NO:6) o 5'-GCCCCGACCGAAGTCATCGTCTCCTCCGGTG-3' (SEQ ID NO:7) y 5'-TTTGCCTTCAAATCACCTA-3' (SEQ ID NO:8), respectivamente, y se centraron en la región VDJ líder y se clonaron en pBluescript II KS(+). El derivado de la construcción de transferencia pVDJ3-GFP se generó reemplazando la región VDJ líder con un casete de expresión de GFP (McConnell Smith y col., 2009). El conjunto de construcción de transferencia pVDJ3-Bin1 se generó insertando una genoteca de la región V_H en el sitio XcmI-PshAI de pVDJ3. Esas secuencias se han amplificado a partir de la bolsa de un polluelo Leghorn Blanco de 2 meses de vida usando los cebadores de PCR 5'-GGGTCTGCGGGCTCTATGGGG-3' (SEQ ID NO:9) y 5'-ATCGCCGCGGAATTTTGGGG-3' (SEQ ID NO:10). En la primera etapa, la región VDJ endógena se reemplazó por el casete de expresión de GFP usando pVDJ3-GFP. En la segunda etapa, el conjunto de construcción de transferencia pVDJ3-Bin1 se usó para reemplazar la GFP previamente dirigida, produciendo células slgM⁺. Las transfecciones para manipulación dirigida de la cadena pesada se llevaron a cabo usando un Nucleofector (programa B-023; Lonza).

Las células slgM⁺ se recogieron por MACS y a continuación FACS. En resumen, después de dos días después de la transfección, las células se lavaron en PBS que contenía BSA al 1 % (Sigma, St. Louis, MO), y células slgM⁺ enriquecidas por la unión a Dynabeads (Dyna) de proteína G acopladas a anti-IgM de pollo (Southern Biotech) según las orientaciones de los fabricantes. Después de tres días en cultivo, las células slgM⁺/GFP⁻ se clasificaron usando una FACSAria (BD Biosciences), generando la población de DTLacO-2.

Construcciones de transfección a VJ. Para dirigir nuevas secuencias VJ, se construyó pVJ1. Un fragmento de 3,2 kb de la región en dirección 5' VJ se amplificó con los cebadores de PCR 21-22 (5'-GGGACACCTGAAGGCATGAGTGG-3', SEQ ID NO:21) y (5'-GGCGGAATCCAGCAGCTGTGT-3', SEQ ID NO:22); un fragmento de 1,2 kb de la región en dirección 3' VJ se amplificó con cebadores de PCR 23-24 (5'-GTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGTTC-3', SEQ ID NO:23) y (5'-GGGCTCTTCTACCTCAAGGCATGT-3', SEQ ID NO:24); y ambos fragmentos se clonaron en pCR2.1 (Invitrogen). La región VJ líder, a continuación, se insertó en el sitio BmgBI-AvrII del plásmido. La construcción se verificó mediante análisis de restricción y secuenciación. Las nuevas secuencias VJ también estaban ligadas en el sitio BmgBI-AvrII.

Para dirigir BFP a la región VJ de DT40, se produjo pVJ1-BFP. Las secuencias señal de poly A de SV40 y BFP se amplificaron a partir de pTagBFP-N (Evrogen); unas 155 pb de la región en dirección 5' VJ se fusionaron al amplión; y, a continuación, se insertaron en el sitio BmgBI-AvrII del vector VJ.

Para añadir la etiqueta FLAG al VJ, se produjo pVJ1-FLAG λ . Se insertó una etiqueta FLAG corta (DYKDE, SEQ ID NO:25) justo en dirección 5' de la región VJ madura por mutagénesis dirigida a sitio.

Construcciones de transferencia a región C. Primero se generó una construcción de expresión de la cadena pesada quimérica humana-de pollo: chVDJ-huCy1-FLAG-TEV-chTMD, y se confirmó que este polipéptido de fusión se emparejaba con la cadena ligera λ de pollo y se expresaba sobre la superficie de las células DT40.

Para generar la construcción de sustitución de la región C, un fragmento de 4 kb de la región en dirección 5' C μ 1 se amplificó a partir del ADN genómico de DT40 con XP0090 (5'-AGCCTCATTATCCCCCTGAT-3', SEQ ID NO:26; diseñado basándose en GenBank N.º AB029075.1) y XP0094 (5'-TCTCTTTCCCTTCGCTTTGA-3', SEQ ID NO:27) y un fragmento de 6 kb de la región C μ 1-C μ 2 se amplificó con XP0095 (5'-ACAGTTCGGTTTCCGGTATG-3', SEQ ID NO:28) y XP0099 (5'-CACTCCATCCTCTTGCTGGT-3', SEQ ID NO:29). La en dirección 5' se clonó en el sitio EcoRV del pBluescript II KS(+) (Stratagene); las secuencias señal de poly A de BGH y huCy1-FLAG-TEV-chTMD se fusionaron a justo en dirección 3' de la secuencia en dirección 5' insertada por mutagénesis dirigida a sitio QuikChange™ (Stratagene); y, a continuación, la dirección 3' se clonó en el sitio HindIII-XhoI del plásmido. También

se insertó el marcador de Zeocina flanqueado por sitios loxP modificados en el sitio HindIII para proporcionar un mecanismo de selección de fármaco para transfectantes estables, si se necesita posteriormente. La construcción se verificó por análisis de restricción y secuenciación parcial, y se propagó en cepas de *E. coli* deficientes en recombinación StbI2 o StbI3 (Invitrogen) para mantener las secuencias de repetición de la región S.

5 Para prevenir posible apoptosis inducida por receptor del linfocito B (BCR) debido a la unión de IgM anclado en membrana a antígenos diana con alta afinidad, se preparó una versión mutante de la construcción que reemplaza la región C. Dos aminoácidos Ser-Thr en el dominio de la transmembrana (TMD), los cuales son cruciales para la transducción de la señal (Shaw, A.C., Mitchell, R.N., Weaver, Y.K., Campos-Torres, J., Abbas, A.K. y Leder, P. *Cell* 10 63, 381-392 (1990)), se sustituyeron por Val-Val mediante mutagénesis dirigida a sitio.

Las construcciones de transferencia tanto silvestres como mutantes se diseñaron también para tener sitios de escisión de proteasa en caso de llegar a ser deseable para los anticuerpos quiméricos para liberarse de las células. Una era la etiqueta FLAG de longitud completa (DYKDDDDK, SEQ ID NO:30; que se podía escindir por enteroquinas) y la otra era el sitio de reconocimiento de TEV (ENLYFQG, SEQ ID NO:31; que se podía escindir por TEV proteasa).

20 Para reemplazar la región C de la cadena pesada, células DT40 silvestres se sometieron a transfección con cualquiera de las dos construcciones que reemplazan la región C usando un Nucleofactor (Lonza); y después de 3 días después de la transfección, las células que expresan anticuerpo quimérico humano-de pollo se enriquecieron por MACS con Dynabeads Proteína G (Invitrogen). La expresión de la proteína de fusión se detectó por FACS con anti-IgG humana (Southern Biotech) y las secuencias de las fusiones chVDJ-huCy1-FLAG-TEV-chTMD expresadas se confirmaron por RT-PCR.

25 La secuencia de nucleótidos que codifica chVDJ-huCy1-FLAG-TEV-chTMD se expone en la SEQ ID NO:32, en la cual las secuencias de nucleótidos componentes que codifican los fragmentos chVDJ, huCy1, FLAG, TEV, y chTMD se exponen en las SEQ ID NOS:33 a 37, respectivamente.

30 Quantificación de tasas de diversificación. Las tasas de diversificación se cuantificaron usando el ensayo de pérdida de sIgM, que mide la fracción de células que han perdido la expresión de IgM sobre la superficie celular debido a los sucesos de diversificación (Sale y col., 2001; Yabuki y col., 2005; Ordinario y col., 2009). En resumen, los paneles de aproximadamente 20 transfectantes independientes se aumentaron durante 3 semanas, a continuación las células (aproximadamente 1×10^6) de cada miembro del panel se tiñeron con anti-IgM de pollo conjugada con R-PE (1:200; Southern Biotech), y se analizaron sobre un FACScan con el programa informático CellQuest (BD Biosciences). El porcentaje de células sIgM⁻ se calculó como la relación del número de células con descenso 8 veces o mayor en la intensidad de PE y PE de la población de sIgM⁺ (Hatanaka y col., 2005; Sale y col., 2001).

40 Análisis de la secuencia de la región V. La PCR de la región V y el análisis de secuencia se realizaron básicamente como se describe (Yabuki y col., 2005; Cummings y col., 2007), usando cebadores 5'-CAGGAGCTCGCGGGGCCGTCCTACTGATTGCCG-3' (SEQ ID NO:11) y 5'-GCGCAAGCTTCCCCAGCCTGCCGCCAAGTCCAAG-3' (SEQ ID NO:12) para la amplificación de las regiones V_L reordenadas y los cebadores 5'-GGGTCTCGGGCTCTATGGGG-3' (SEQ ID NO:13) y 5'-ATCGCCGCGGCAATTTGGGG-3' (SEQ ID NO:14) para amplificación de las regiones V_H reordenadas. Cuando es necesario, se llevó a cabo PCR semianidada usando un cebador de segunda ronda 5'-TCACTGATTGCCGTTTTCTCCCTCTCTCC-3' (SEQ ID NO:15) para las regiones V_L o 5'-GGTCAACGGGGGGTCTCACGG-3' (SEQ ID NO:16) para las regiones V_H. Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick™ (Qiagen, Valencia, CA) y se secuenciaron directamente.

50 Antígenos y selección para la unión a antígeno. Las selecciones iniciales se realizaron uniendo poblaciones de DTLacO diversificadas a perlas magnéticas formando complejos con antígenos, y posteriormente selecciones por FACS usando antígenos solubles marcados por fluorescencia, seguido de procedimientos previamente descritos (Cumbers y col., 2002; Seo y col., 2005) con modificaciones menores. Dynabeads M-280 (Dyna) de SA_v y SA_v-PE (Southern Biotech) se usaron para seleccionar células que reconocían SA_v. La selección de células que reconocían proteínas de superficie celular humanas usaron proteínas quiméricas humanas recombinantes, expresadas como fusiones con Fc de IgG1 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN), incluyendo el dominio extracelular de VEGFR2 (restos 20-764; n.º de Cat 357-KD), TIE2 (restos 23-745; n.º de Cat. 313-TI), TROP2 (restos 88-274; n.º de Cat. 650-T2), FN14 (restos 28-79; N.º de Cat. 1199-TW) or FZD10 (restos 21-161; N.º de Cat. 3459-FZ). Las proteínas quiméricas se unieron a Dynabeads de proteína G (Dyna) usando las condiciones recomendadas por los fabricantes para el método MACS, y se detectaron con anti-Fc de IgG humana marcado con PE-Cy5 (Southern Biotech; 1:200) para el método FACS. Las proteínas quiméricas se unieron a Dynabeads de proteína G (Dyna) usando las condiciones recomendadas por los fabricantes para el método MACS, y se detectaron con anti-Fc de IgG humana marcado con PE-Cy5 (Southern Biotech; 1:200) para el método FACS. Los antígenos para la selección se usaron a concentraciones de 10 µg/ml; las selecciones se llevaron a cabo sobre $>10^8$ células a una relación perla:célula que oscilaba de 3:1 a 1:1. En algunos casos, el preaclaramiento de células DTLacO no específicas se llevó a cabo usando perlas que carecían de antígeno.

Ensayos de unión y afinidad. Se determinaron las cinéticas de unión saturación tiñendo células con diversas concentraciones de antígenos solubles marcados fluorescentes, y las afinidades aparentes (K_D) se calcularon mediante regresión no línea usando el programa informático GraphPad™ Prism. Para ensayar la unión de los AcM a los antígenos de superficie celular, se generaron AcM humanos-de pollo quiméricos recombinantes clonando segmentos V_H y V_L amplificados por PCR en el marco en derivados de pcDNA3.1 (Invitrogen), pcDNA3.HG1 y pcDNA3.HLam, que llevan las regiones constantes $\gamma 1$ y λ humanas, respectivamente. Los plásmidos de expresión se sometieron a transfección conjunta de manera transitoria en células FreeStyle™ 293-F (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Después de 2 a 4 días de cultivo, los anticuerpos secretados se purificaron de sobrenadantes mediante cromatografía de la proteína A (MabSelect SuRe; GE Healthcare) y, si era necesario, se concentraron por ultrafiltración Ultracel (Millipore). Las células diana se generaron mediante transfección transitoria de células 293-F con construcciones de expresión de antígeno (GeneCopoeia).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

La plataforma de descubrimiento de AcM de DTLacO. La plataforma de DTLacO para la selección y optimización rápida de AcM se obtuvo por ingeniería en dos etapas (Figura 1). Primero, un elemento regulador fuerte, multímeros del ADN del operador de lactosa del operón de lactosa de *E. coli* ("PolyLacO"), se insertó en dirección 5' del gen de IgH reordenado y expresado en la línea celular DT40 PolyLacO- λ_R , previamente modificada por ingeniería para llevar PolyLacO en Ig λ solamente. Luego, la región V_H endógena (VDJ) se sustituyó con una genoteca de V_H generada a partir de linfocitos B de la bolsa de pollo, aumentando el repertorio de V_H inicial. Ambas etapas de modificación por ingeniería tomaron ventaja de la alta eficacia de la manipulación genética dirigida en linfocitos B DT40 de pollo.

Previamente se demostró que PolyLacO puede posibilitar la regulación inducible de la tasa y el resultado de la diversificación del gen de Ig λ (hipermutación somática o conversión génica) tras la expresión de factores reguladores distintos fusionados a proteína represora de lactosa (LacI) (Cummings y col., 2007; Cummings y col., 2008; Yabuki y col., 2009). Este uso de la red reguladora de LacO/LacI tomó ventaja de la alta afinidad ($K_D=10^{-14}$ M) de LacI para LacO, así como la sensibilidad de la interacción LacI/LacO en la molécula pequeña, IPTG.

Aceleración sinérgica de la diversificación para PolyLacO dirigido a tanto Ig λ como IgH. Se previno que la diversificación era elevada en células "DTLacO", modificadas por ingeniería para llevar PolyLacO dirigido a tanto los genes de Ig λ como los de IgH, en relación con las células DT40 PolyLacO- λ_R , que llevaban PolyLacO solamente en Ig λ . Las tasas de diversificación de las líneas modificadas por ingeniería candidatas se determinaron mediante el ensayo de la fracción de células sIgM⁺ 3 semanas después de la transfección con el factor regulador LacI-HP1. Los candidatos representativos presentaron tasas de diversificación de 6,9 %, 12,6 % y 25,7 % (por ejemplo, Fig. 2A), elevado de 2,5 a 9,2 veces en relación con el 2,8 % característico de la línea parental DT40 PolyLacO- λ_R LacI-HP1. La diversificación acelerada se reconfirmó para una línea mediante ensayo de fluctuación de transfectantes individuales (Fig. 2B). Los porcentajes de células sIgM⁺ oscilaron de 2,5 % a 52,5 %, con una media de 13,0 % (Fig. 2B), 4,6 veces mayor que en los transfectantes DT40 PolyLacO- λ_R LacI-HP1 (2,8 %) y 21,7 veces mayor que en las células control DT40 PolyLacO- λ_R GFP-LacI (0,6 %, comparable con la línea parental DT40 (Cummings y col., 2007). Algunos de los clones individuales presentaron pérdida de sIgM considerablemente diferente de la media, como se predice debido a que este ensayo de fluctuación media variantes sIgM⁺ acumuladas. Por tanto, dirigir elementos PolyLacO a la diversificación acelerada de tanto los genes de la cadena pesada como ligera casi 22 veces en relación con la línea celular parental DT40 (Fig. 2C). La diversificación también se aceleró tras la transfección de otros factores, incluyendo LacI-VP16 y E47-LacI (no mostrado).

Evolución ex vivo de anticuerpos anti-estreptavidina. Para ensayar la utilidad de las células DTLacO para la evolución de AcM ex vivo, se seleccionaron AcM frente al antígeno modelo, estreptavidina (SAv) (Cumbers y col., 2002; Seo y col., 2005) de la población DTLacO-1 (Figura 1, Etapa 1). Las células se sometieron a transfección establemente con una construcción de expresión E47-LacI, que codificaba una fusión de LacI y la isoforma E47 del factor regulador, E2A. E47 era un regulador transcripcional conocido en algunos contextos, pero en los genes de Ig de las células DT40 promovieron la diversificación pero no la transcripción (Yabuki y col., 2009). Una población diversificada de 3×10^8 células DTLacO E47-LacI se enriquecieron dos veces para la unión a perlas magnéticas conjugadas a SAv y, a continuación, se seleccionaron mediante rondas sucesivas de FACS para la unión a SAv-PE. La población celular presentó afinidad incrementada después de cada ronda de selección. Un cambio de 30 veces era evidente después de la quinta ronda de selección y un cambio de 100 veces por la séptima ronda (S5 y S7, respectivamente; Figura 3A). La afinidad de unión de la población S7 para SAv-PE-Cy7 se midió mediante cinéticas de unión saturación. En este método basado en FACS, las células se tiñeron con concentraciones crecientes de antígeno hasta que se estableció el equilibrio de antígeno unido y no unido; los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) resultantes se analizaron con el programa informático Prism (GraphPad); y se determinó la afinidad en equilibrio (K_D) (Figura 3B). La afinidad aparente se encontró que era 0,7 nM, después de 7 rondas de selección, que se comparó favorablemente con 15-19 rondas de selección que se requirieron para la selección de anticuerpos de afinidad comparable ex vivo usando líneas de linfocito B humanas cultivadas (Cumbers y col., 2002). Las secuencias de las regiones V_H y V_L se determinaron mediante la amplificación por PCR de células únicas, y comparadas con la línea germinal (Reynaud y col., 1987; Reynaud y col., 1989). Sorprendentemente, una inserción/duplicación de 18 restos se identificó en CDR1 de V_L (Figura 3C). Una inserción en la CDR1 de la cadena ligera de los AcM anti-SAv también ha sido publicada por otros usando células DT40 que no se han sometido a modificación por ingeniería (Seo y col., 2005).

Selección de los AcM de alta afinidad que reconocen receptores de superficie celular conservados. Las células DTLacO-1 que expresan establemente Lacl-HP1 se seleccionaron para identificar AcM frente a tres antígenos de superficie celular de interés terapéutico: el receptor tirosina quinasas, VEGFR2 y TIE2, que juega papeles esenciales en la angiogénesis fisiológica y patológica, más notablemente en cáncer (Huang y col., 2010; Ferrara y col., 2010); y la glucoproteína, TROP2, que se sobreexpresa en numerosos cánceres epiteliales (Cubas y col., 2010). Los dominios extracelulares de estos receptores estaban altamente conservados, con los ortólogos humanos y murinos que presentaban 80 %, 90 % y 83 % de identidad, respectivamente. Cada dominio extracelular se expresó como proteína recombinante fusionada al dominio Fc de IgG1 humana. Las células DTLacO específicas para cada antígeno se enriquecieron a partir de 1×10^9 células mediante la selección inicial sobre el antígeno unido a perlas magnéticas, y a continuación uniéndose al antígeno soluble y clasificándose por FACS. Se caracterizaron ocho poblaciones seleccionadas con éxito y se mostró que presentaban afinidad incrementada en cada etapa de selección (Figura 4A, superior). En la octava etapa de selección, el análisis de las cinéticas de unión saturación de los antígenos solubles VEGFR2, TIE2, y TROP2 a sus poblaciones DTLacO cognadas estableció valores de afinidad aparentes (k_D) de 6,0, 1,4 y 2,0 nM, respectivamente (Figura 4A, inferior). La especificidad de las poblaciones seleccionadas individuales se ensayaron analizando la unión a un panel de antígenos (VEGFR2, TIE2, TROP2, SAV y ovoalbúmina). Las células DTLacO seleccionadas reconocieron solamente la diana cognada, y no eran de reacción cruzada (Figura 4B).

AcM de alta afinidad caracterizados por mutaciones dirigidas a CDR. Se generaron AcM humanos-de pollo quiméricos y recombinantes mediante la clonación de las regiones V_H y V_λ de las células DTLacO que reconocían VEGFR2, TIE2 o TROP2 en una construcción para la expresión fusionada a regiones constantes de la cadena pesada $\gamma 1$ y ligera λ humana. Los AcM quiméricos conservaron reconocimiento a antígeno de alta afinidad (datos no mostrados), mostrando que el receptor del linfocito B confería unión de alta afinidad mediante las células seleccionadas. El análisis de secuencia de las regiones V_H y V_λ clonadas mostró que las mutaciones que conferían alta afinidad y la especificidad se mapearon principalmente a CDR (Figura 4C). Tanto las mutaciones con molde como sin molde eran evidentes en las CDR.

La diversidad de V_H aumentada aceleró más la selección de AcM. Las células DTLacO que expresaban los factores de fusión a Lacl reguladores, de o bien la población inicial (DTLacO-1) o la población modificada por ingeniería por sustitución de V_H como se describe en el presente documento (DTLacO-2) (Figura 1), eran las fuentes de los AcM que reconocían otros dos antígenos de interés terapéutico, el miembro de la familia del receptor de TNF pequeño, FN14 (Winkles y col., 2008), y el receptor acoplado a proteína G, FZD10 (Katoh y col., 2007). Ambas proteínas tenían dominios extracelulares altamente conservados (92 % y 94 % de identidad, respectivamente, entre humano y ratón). Como se describe en los documentos U.S.A.N. 13/416.752 y PCT/US2012/28584, se seleccionó un AcM anti-FN14 de la población DTLacO-1 y se maduró por la diversificación conducida por Lacl-HP1 (Figura 5A). La afinidad subnanomolar ($k_D=0,44$ nM) se consiguió después de 17 rondas de selección durante 12 semanas, y la afinidad se mejoró modestamente en el transcurso de las 7 selecciones adicionales durante las próximas 4 semanas ($k_D=0,26$ nM).

Se seleccionó un AcM anti-FZD10 (FZ2) (U.S.A.N. 61/523.102) de la población DTLacO-2 descrita en el presente documento, con diversificación acelerada por el factor anclado HIRA-Lacl (Cummings y col., 2008). La población alcanzó afinidad subnanomolar después de solamente cuatro rondas de selección, durante 8 semanas (Figura 5A). Este AcM reconoció su diana con afinidad aparente $k_D=0,16$ nM. El análisis de secuencia de las regiones V_H y V_λ clonadas mostró que las mutaciones que conferían alta afinidad y especificidad se mapearon principalmente a CDR (Figura 5B).

Humanización superficial de anticuerpos de pollo. Los anticuerpos seleccionados en ratones u otras especies son generalmente humanizados para las aplicaciones terapéuticas (Almagro y col., 2008). El AcM anti-FZD10 se eligió para humanización, ya que su alta afinidad y distintas CDR de la cadena pesada ofrecían un ensayo fuerte de su etapa clave en el desarrollo de AcM. Las regiones V_H y V_λ de pollo estaban relacionadas muy de cerca con subgrupo III de V_H y subgrupo III de V_λ humanos, respectivamente. Estos eran regiones marco conservadas bien establecidas para la humanización, y se han usado previamente para humanizar AcM obtenidos por inmunización de pollos (Tsurushita y col., 2004; Nishibori y col., 2006). La estructura de una CDR se determina no solamente por la secuencia primaria de la propia CDR sino también por un número pequeño de restos de “zona Vernier” cercanos que contribuyen a dar forma a la estructura de CDR (Foote y col., 1992). Los armazones para injertar CDR se generaron modificando regiones marco conservadas humanas en las pocas posiciones necesarias para conseguir la identidad con los restos de la zona Vernier de la correspondiente región V_H o V_λ de pollo. Los armazones marco conservados generados de ese modo eran 94 a 96 % idénticos a las secuencias marco conservadas humanas, haciendo a la inmunogenicidad muy poco probable. Los dos primeros restos N terminales de las cadenas ligeras también se eliminaron, ya que estos residuos estaban situados próximos a CDR1 en los anticuerpos de mamífero y podían interferir en principio con la interacción de los anticuerpos con antígenos. Las CDR del AcM de pollo, a continuación, se injertaron a los armazones modificados, para crear las regiones V_H y V_λ humanizadas (Figura 5 C). Las comparaciones de las afinidades de unión aparentes de las versiones de pollo y humanizadas del AcM anti-FZD10 mostraron que la humanización se alcanzaba sin pérdida de afinidad (Figura 5D). Esta humanización superficial contrastaba con los anticuerpos murinos, los cuales requieren considerable optimización empírica.

Los resultados anteriormente descritos mostraron que la plataforma DTLacO-2 permitía rápido descubrimiento *ex vivo* de AcM que reconocen dianas altamente conservadas. Se demostró el poder de la plataforma DTLacO generando AcM específicos y de alta afinidad para cinco antígenos de superficie celular de interés terapéutico, el receptor tirosina quinasas VEGFR2 y TIE2, la glucoproteína TROP2, y el receptor acoplado a proteína G FZD10, todos los cuales como se describen en el presente documento se obtuvieron usando DTLacO-2, y también el miembro FN14 de la familia del receptor de TNF pequeño obtenido usando DTLacO-1. Los dominios extracelulares altamente conservados de estos receptores de superficie celular eran probablemente para hacerlos dianas difíciles para el descubrimiento de AcM *in vivo*, lo cual está limitado por inmune tolerancia. El tiempo desde la selección inicial a la identificación de un AcM de alta afinidad (<10 nM) era en el orden de 4 a 8 semanas, y la afinidad subnanomolar se alcanzó en 8 a 12 semanas. Este marco de tiempo para la producción de anticuerpos de alta afinidad de especificidad deseada se comparó muy favorablemente con otras plataformas *ex vivo* o *in vivo* para el descubrimiento de AcM.

La plataforma de descubrimiento de AcM *ex vivo* de DTLacO proporcionó varias ventajas adicionales en relación con otros planteamientos de descubrimiento de AcM. Las células producían anticuerpos intactos, los cuales se podían ensayar inmediatamente para propiedades deseadas, mientras que muchos planteamientos *in vitro* como el sistema de presentación en fago producen anticuerpos de cadena sencilla, que son frecuentemente difíciles de convertir en AcM de longitud completa activos debido a la agregación o inestabilidad. Las células DTLacO diversificaron regiones V de Ig usando rutas fisiológicas (hipermutación somática y conversión génica), que dirigen mutaciones principalmente a CDR, los subdominios de las regiones V que directamente contactan con antígenos. Además, las células proliferaron rápidamente y eran inmortales, de manera que en cada etapa de selección la población celular proporcionó no solamente una fuente renovable de anticuerpos (o secuencias V_H y V_L para la expresión de anticuerpos recombinantes), sino también un punto de partida para la optimización adicional.

La plataforma DTLacO se distinguía de otras plataformas de descubrimiento de AcM que usan células DT40 (Cumbers y col.; Seo y col., 2005) por la capacidad de acceder de ambos de los mecanismos de diversificación fisiológicos descritos, hipermutación somática y conversión génica. Las células DTLacO también conservaban la capacidad de llevar a cabo manipulación genética dirigida homóloga, que permitía la modificación por ingeniería genética adicional. La característica anterior de las células DTLacO se explotó más sustituyendo la región V_H endógena con una genoteca V_H reordenada, para crear la población de DTLacO-2 que lleva un repertorio de V_H aumentado. La tercera CDR de la cadena pesada, CDR-H3, incluía la unión VDJ y era un determinante principal para el reconocimiento de antígeno (Xu y col., 2000). La diversidad de CDR-H3 puede haber contribuido a la selección rápida de un AcM anti-FZD10 de alta afinidad a partir de la población DTLacO-2. También es posible intercambiar regiones V humanas por regiones V de pollo (datos no mostrados), que permitían la optimización de la afinidad o funcionalidad de AcM descubiertos por otros métodos, así como descubrimiento directo de AcM terapéuticos humanos.

Los AcM de pollo optimizados en las células DTLacO probaron que eran fácilmente humanizados por el injerto de CDR en regiones marco conservadas del subgrupo III de V_H y subgrupo III de V_L humanas consenso en las que los retos de la zona Vernier se han modificado para conservar la estructura CDR. La humanización de Ig se llevó a cabo sin pérdida de afinidad, y alcanzó >94 % de identidad a Ig humanas en las regiones marco conservadas. Este resultado era comparable a o mejor que muchos AcM murinos humanizados actualmente en la clínica, e hicieron a la inmunogenicidad muy poco probable. Las lecturas con las que los AcM se humanizaron contrastaron con los anticuerpos descubiertos en células de ratón o murinas, las cuales deben someterse a optimización empírica. Las regiones marco conservadas del subgrupo III de V_H y el subgrupo III de V_L se conservan entre un número de vertebrados, surgiendo la posibilidad de que los marco conservados de AcM se pudieran modificar para el tratamiento de enfermedades crónicas en otras especies.

Referencias

1. Kohler G., Milstein C. (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature* 256:495-497.
2. Chiarella P., Fazio VM (2008) "Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production". *Biotechnol Lett* 30:1.303-1.310.
3. Winter G., Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR (1994) "Making antibodies by phage display technology". *Annu Rev. Immunol.* 12:433-455.
4. Bratkovic T (2010) "Progress in phage display: evolution of the technique and its application". *Cell Mol. Life Sci.* 67:749-767.
5. Grandea AG, 3^o, Olsen OA, Cox TC, Renshaw M., Hammond PW, y col. (2010) "Human antibodies reveal a protective epitope that is highly conserved among human and nonhuman influenza A viruses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:12.658-12.663.
6. Hammond PW (2010) "Accessing the human repertoire for broadly neutralizing HIV antibodies". *MAbs* 2:157-164.
7. Cumbers SJ, Williams GT, Davies SL, Grenfell RL, Takeda S., y col. (2002) "Generation and iterative affinity maturation of antibodies *in vitro* using hypermutating β -cell lines". *Nat Biotechnol* 20:1.129-1.134.
8. Seo H., Masuoka M., Murofushi H., Takeda S., Shibata T., y col. (2005) "Rapid generation of specific

antibodies by enhanced homologous recombination". *Nat. Biotechnol.* 23:731-735.

9. Maizels N. (2005) "Immunoglobulin gene diversification". *Annu Rev. Genet.* 39:23-46.

10. Buerstedde JM, Takeda S. (1991) "Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken

5 B cell lines". *Cell* 67:179-188.

11. Cummings WJ, Yabuki M., Ordinario EC, Bednarski DW, Quay S., y col. (2007) "Chromatin structure regulates gene conversión". *PLoS Bio.* 15:e246.

12. Cummings WJ, Bednarski DW, Maizels N. (2008) "Genetic variation stimulated by epigenetic modification". *PLoS ONE* 3:e4075.

10 13. Yabuki M., Ordinario EC, Cummings WJ, Fujii MM, Maizels N. (2009) "E2A acts in cis in G1 phase of cell cycle to promote Ig gene diversification". *J. Immunol.* 182:408-415.

14. Reynaud CA, Anquez V., Grimal H., Weill JC (1987) "A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire". *Cell* 48:379-388.

15 15. Reynaud CA, Dahan A., Anquez V., Weill JC (1989) "Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region". *Cell* 59:171-183.

16. Huang Z., Cheng L., Guryanova OA, Wu Q., Bao S. (2010) "Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signalling and therapeutic targeting". *Protein Cell* 1:638-655.

17. Ferrara N. (2010) "Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis". *Cytokine Growth Factor Rev.* 21:21-26.

20 18. Cubas R., Zhang S., Li M., Chen C., Yao Q. (2010) "Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway". *Mol. Cancer* 9:253.

19. Winkles JA (2008) "The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting". *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:411-425.

25 20. Katoh M. (2007) "Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis". *Stem. Cell Rev.* 3:30-38.

21. Almagro JC, Fransson J. (2008) "Humanization of antibodies". *Front Biosci.* 13:1.619-1.633.

22. Tsurushita N., Park M., Pakabunto K., Ong K., Avdalovic A., y col. (2004) "Humanization of a chicken anti-IL-12 monoclonal antibody". *J. Immunol Methods* 295:9-19.

30 23. Nishibori N., Horiuchi H., Furusawa S., Matsuda H. (2006) "Humanization of chicken monoclonal antibody using phage-display system". *Mol. Immunol* 43:634-642.

24. Foote J., Winter G. (1992) "Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops". *J. Mol. Biol.* 224:487-499.

35 25. Xu JL, Davis MM (2000) "Diversity in the CDR3 region of VH is sufficient for most antibody specificities". *Immunity* 13:37-45.

26. Yabuki M., Fujii MM, Maizels N. (2005) "The MRE11-RAD50-NBS1 complex accelerates somatic hypermutation and gene conversion of immunoglobulin variable regions". *Nat. Immunol.* 6:730-736.

40 27. Robinett CC, Straight A., Li G., Wilhelm C., Sudlow G., y col. (1996) "In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition". *J. Cell Biol.* 135:1.685-1.700.

28. Sale JE, Calandrini DM, Takata M., Takeda S., Neuberger MS (2001) "Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation". *Nature* 412:921-926.

45 Los diversos aspectos descritos anteriormente se pueden modificar, si es necesario para emplear conceptos de las diversas patentes, solicitudes y publicaciones. Estos y otros cambios se pueden hacer a los ejemplos teniendo en cuenta la descripción anteriormente detallada.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Omeros Corporation
University of Washington through its Center for Commercialization Cummings, W. Jason Tjoelker, Larry W. Wood, Christi L. Yabuki, Munehisa Allison, Daniel S. Leppard, John B. Maizels, Nancy

<120> COMPOSICIÓN Y MÉTODO PARA DIVERSIFICACIÓN DE SECUENCIAS DIANA

<130> 980087.402WO

60 <140> PCT
<141> 13-03-2013

<150> US 61/611.446

65 <151> 15-03-2012

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 1
gggggtctcta tgggggtctaa gcggtggcc 28

15 <210> 2
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 2
25 ggccgattct ttctcatga gatccctcca gaag 34

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

35 <400> 3
ttcccacaa ccaggccatg cgctccttg 30

<210> 4
<211> 28
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

45 <400> 4
cctgcagaca cccagaggag ggctcagc 28

<210> 5
<211> 40
50 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Oligonucleótido

<400> 5
tgaatgcttt gtagcccta attaggatt gaattgagag 40

60 <210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 6
 ccgtgagacc cccggtgac c 21

5 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 7
 gcccgaccga agtcatcgtc tctccggtg 30

15 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 8
 ttgcctca aatcaccta 20

25 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 9
 gggctcgcgg gctctatggg g 21
 <210> 10

40 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

45 <400> 10
 atcgccgcgg caatttggg g 21

50 <210> 11
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

55 <400> 11
 caggagctcg cggggccgtc actgattgcc g 31

60 <210> 12
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 12
 gcgcaagctt ccccagcctg ccgccaagtc caag 34

5 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 13
 gggctcgcgg gctctatggg g 21

15 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 14
 atcgccgcgg caatttggg g 21

25 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido

35 <400> 15
 tcaactgattg ccgtttctc ccctctctcc 30

40 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 16
 ggtcaacggg gggctcaccg g 21

50 <210> 17
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*

55 <400> 17

ES 2 693 593 T3

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

5 <210> 18
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 18

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

10 <210> 19
 <211> 94
 <212> PRT
 15 <213> *Gallus gallus*
 <400> 19

ES 2 693 593 T3

Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Gly Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
20 25 30

Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile Tyr Asp Asn Thr Asn
35 40 45

Arg Pro Ser Asn Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Asp Asp Asn Ala Val
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Ala Ser Thr Asp Ser Ser Ser Thr Ala Ala Arg
85 90

<210> 20
<211> 112
5 <212> PRT
<213> *Gallus gallus*

<400> 20

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Trp Tyr
35 40 45

Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Asn Asn
50 55 60

Asn Asn Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser
65 70 75 80

Gly Ser Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Asp Asp Glu
85 90 95

Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala Ala Phe Gly
100 105 110

10
15 <210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

20 <400> 21
gggacacctg aaggcatgag tgg 23

<210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 22
 10 ggcggaatcc cagcagctgt gt 22
 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 20 <400> 23
 gtgagtcgct gacctgtct cggtc 25
 <210> 24
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 30 <400> 24
 gggctctttc tacctcaagg catgt 25
 <210> 25
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido
 <400> 25
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 50 <400> 26
 agcctcatta tcccctgat 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido

Asp Tyr Lys Asp Glu
1 5

ES 2 693 593 T3

<400> 27
 tctctttccc ttgccttga 20

5 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 28
 acagttccgt ttccggtatg 20

15 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 29
 cactccatcc tcttgctggt 20

25 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido

35 <400> 30

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido

45 <400> 31

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

50 <210> 32
 <211> 1548
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Construcción que codifica cadena pesada de Ig humana-de pollo quimérica

<400> 32

 gccgtgacgt tggacgagtc cggggggcggc ctccagacgc cggggggagc gctcagcctc 60
 gtctgcaagg cctccggggtt caccttcagc agtaacgccca tgggttgggt ggcacaggcg 120

ES 2 693 593 T3

cccggcaagg ggctggagtg ggtcgctggt attgatgatg atggtagtgg cacaagatac 180
 ggcgccggcg tgaagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacactgagg 240
 ctgcagctga acaacctcag ggctgaggac accggcatct actactgcac gaaatgtgct 300
 tacagtagtg gttgtgatta tgaagctggt tatatcgacg catggggcca cgggaccgaa 360
 gtcacgtctc cctccgctc gaccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420
 aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct 540
 gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600
 ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
 aagaaagttg agcccaaata ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct 720
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 780
 atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840
 gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1020
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080
 ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1140
 tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200
 accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagca gctcaccgtg 1260
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320
 cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaagatta caaggatgac 1380
 gacgataagg agaacctgta ttttcagggt gatctcctcc attggcctct ggaggccgaa 1440
 gaggacgacg acatccaacg cctttggggc accacctcca ccttcatcgt cctcttcatc 1500
 ctgacgtct tctacagcg caccgtcacc ctcatcaagg tgaatga 1548

<210> 33
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción que codifica región J de IgH de pollo reorganizada (chVDJ)

<400> 33
 atcgacgat ggggccacgg gaccgaagtc atcgtctcct ccg 43

<210> 34
 <211> 989
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción que codifica región C gamma 1 de Ig humana

ES 2 693 593 T3

<400> 34

cctcgaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg	60
gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt	120
ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtctcag	180
gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct	240
acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca	300
aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc ctggggggac	360
cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg	420
aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt	480
acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca	540
gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg	600
agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca	660
aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc cgggatgagc	720
tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg	780
ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc	840
tggactccga cggtccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc	900
agcaggggaa cgtcttctca tgctcogtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac	960
agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa	989

5 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción que codifica la etiqueta de epítipo peptídico

<400> 35
 gattacaagg atgacgacga taag 24

15 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción que codifica el sitio de escisión de la proteasa

25 <400> 36
 gagaacctgt attttcagg t 21

30 <210> 37
 <211> 138
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción que codifica el dominio de transmembrana de IgH de pollo artificial

ES 2 693 593 T3

	<400> 37		
		gatctcctcc attggcctct ggaggccgaa gaggacgacg acatccaacg cctttggggc	60
		accacctoca ccttcatcgt cctcttcctc ctcagcctct tctacagcgc caccgtcacc	120
		ctcatcaagg tgaaatga	138
5	<210> 38 <211> 376 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Construcción que codifica la región J de IgH de pollo reorganizada (chVDJ)		
	<400> 38		
		gccgtgacgt tggacgagtc cgggggccc ctcacagcgc ccgggggagc gctcagcctc	60
		gtctgcaagg cctccgggtt caccttcagc agtaacgcca tgggttgggt gcgacaggcg	120
		cccggcaagg ggctggagtg ggtcgcctgg attgatgatg atggtagtgg cacaagatac	180
		gcgcccggcgg tgaagggccg tgccaccatc tcgagggaca acgggcagag cacactgagg	240
		ctgcagctga acaacctcag ggctgaggac accggcatct actactgcaac gaaatgtgct	300
		tacagtagtg gttgtgatta tgaagctggt tatatcgacg catggggcca cgggaccgaa	360
15		gtcatcgtct cctccg	376
	<210> 39 <211> 989 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Construcción que codifica la región C gamma 1 de Ig humana		
25	<400> 39		

ES 2 693 593 T3

```

cctcgaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg      60
gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt      120
ggaactcagg cgccctgacc agcggogtgc acacettccc ggctgtceta cagtcctcag      180
gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct      240
acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca      300

aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac      360
cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg      420
aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt      480
acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca      540
gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcttgcacca ggactggctg aatggcaagg      600
agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca      660
aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc      720
tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg      780
ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc      840
tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc      900
agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac      960
agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa      989

```

- 5 <210> 40
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Construcción que codifica la etiqueta de epítipo peptídico
- 15 <400> 40
gattacaagg atgacgacga taag 24
- 20 <210> 41
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Construcción que codifica el sitio de escisión de la proteasa
- 30 <400> 41
gagaacctgt attttcagg t 21
- <210> 42
<211> 138
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Construcción que codifica el dominio transmembrana de IgH de pollo artificial
- <400> 42

ES 2 693 593 T3

gatctcctcc attggcctct ggaggccgaa gaggacgacg acatccaacg cctttgggcc	60
accacctcca ccttcatcgt cctcttcatc ctcagcctct totacagcgc caccgtcacc	120
ctcatcaagg tgaatga	138

REIVINDICACIONES

1. Un vector de polinucleótido recombinante para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo, que comprende:

- (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_H de inmunoglobulina de pollo;
- (b) un gen diana que comprende un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo, en las que dicho gen V_H-D-J_H se reorganiza de modo que los genes V_H, D y J_H están juntos; y
- (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_H de inmunoglobulina de pollo,

en el que el gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H de DT40.

2. El vector de la reivindicación 1, en el que el gen diana comprende además una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína marcadora, tal como una proteína marcadora seleccionada de la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína azul fluorescente (BFP).

3. El vector de la reivindicación 1 en el que la hipermutación somática tiene lugar en cualquiera o ambas de una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina.

4. Una composición que comprende una pluralidad de vectores de polinucleótido recombinantes de la reivindicación 1 para integrar una pluralidad de genes diana en una pluralidad de loci de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina de pollo, comprendiendo cada uno de dichos vectores:

- (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_H de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_H de inmunoglobulina de pollo;
- (b) un gen diana que comprende un gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo, en las que dicho gen V_H-D-J_H se reorganiza de modo que los genes V_H, D y J_H están juntos; y
- (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_H de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_H de inmunoglobulina de pollo,

en los que el gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre la secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H de DT40, y

en los que el gen V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado se obtiene a partir de una pluralidad de genes V_H-D-J_H de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo.

5. La composición de la reivindicación 4, en la que el gen diana además comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína marcadora, tal como una proteína marcadora seleccionada de la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína azul fluorescente (BFP).

6. La composición de la reivindicación 4 en la que la hipermutación somática tiene lugar en cualquiera o ambas de una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina y una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_H de inmunoglobulina.

7. Una composición, que comprende:

- (a) el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y
- (b) un segundo vector para integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina, comprendiendo el segundo vector

(1) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que

codifica un gen V_L de inmunoglobulina de pollo;

(2) un segundo gen diana que comprende un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo; y

5 (3) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_L de inmunoglobulina de pollo,

10 en el que el segundo gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena ligera de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_L de DT40.

15 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7; en la que la composición comprende además:

uno o una pluralidad de vectores de polinucleótido recombinantes para integrar una pluralidad de genes diana en una pluralidad de loci de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo, comprendiendo cada uno de dichos vectores:

20 (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_L de inmunoglobulina de pollo;

(b) un segundo gen diana que comprende un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo; y

25 (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_L de inmunoglobulina de pollo,

30 en los que el segundo gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena ligera de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_L de DT40, y

35 en los que el gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado se obtiene de una pluralidad de genes V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenados aislados de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo.

40 9. La composición de la reivindicación 7 u 8, en la que el segundo gen diana comprende además una secuencia de polinucleótido que codifica una segunda proteína marcadora, tal como una proteína marcadora seleccionada de la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína azul fluorescente (BFP).

10. La composición de o bien la reivindicación 7 o la reivindicación 8 en la que la hipermutación somática tiene lugar en cualquiera o ambas de una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_L de inmunoglobulina y una secuencia codificadora de la región marco conservada de V_L de inmunoglobulina.

45 11. Una célula hospedadora, que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.

12. La célula hospedadora de la reivindicación 11 en la que la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, derivada de una célula de pollo, una célula de linfoma bursal de pollo y una célula DT40.

50 13. La célula hospedadora de la reivindicación 11 o 12, en la que el locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina en la célula hospedadora comprende un operador de lactosa polimerizada.

55 14. La célula hospedadora de las reivindicaciones 11 a 13, en la que el locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina en la célula hospedadora comprende un operador de lactosa polimerizada.

15. Una genoteca de las células hospedadoras según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.

60 16. Un método *ex vivo* para la producción de un repertorio de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo de un polipéptido diana que se codifica por un gen diana que comprende un gen V_H - D - J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado, que comprende:

65 cultivar un linfocito B de pollo que contiene el vector de polinucleótido recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 bajo condiciones que permiten la proliferación del linfocito B hasta que se obtiene una pluralidad de linfocitos B, en el que el linfocito B es capaz de cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_H de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_H de inmunoglobulina de pollo

reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_H , y produciendo de ese modo un repertorio de variantes de secuencia de polipéptido de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo del polipéptido diana.

5 17. El método de la reivindicación 16 en el que el linfocito B comprende además un segundo vector para integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo, comprendiendo el segundo vector

- 10 (a) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 5' del gen V_L de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 5' del codón de inicio del ADN genómico endógeno que codifica un gen V_L de inmunoglobulina de pollo;
- (b) un segundo gen diana que comprende un gen V_L - J_L de inmunoglobulina de pollo reordenado que se ha aislado de una población de células de la bolsa de Fabricio de pollo; y
- 15 (c) una región de la secuencia de ácidos nucleicos en dirección 3' del gen J_L de inmunoglobulina de pollo que comprende una secuencia homóloga al lado 3' del sitio de corte y empalme del ADN genómico endógeno que codifica un gen J_L de inmunoglobulina de pollo,

en el que el segundo gen diana, tras ser integrado en el locus de la cadena ligera de inmunoglobulina de pollo de una célula DT40, es capaz de someterse a cualquiera o ambas de (i) hipermutación somática en una secuencia codificadora de la región determinante de complementariedad de V_L de inmunoglobulina, y (ii) conversión génica entre una secuencia de ácidos nucleicos codificadora de V_L de inmunoglobulina de pollo reordenada y una secuencia de ácidos nucleicos del pseudogen V_L de DT40.

20

18. El método de la reivindicación 17, en el que el locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina de pollo comprende un operador de lactosa polimerizada.

25

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en el que la célula de pollo se selecciona de DT40 y DTLacO.

20. El método de la reivindicación 17 o 18, que comprende además el cribado de la pluralidad de linfocitos B de pollo para unirse a un antígeno.

30

21. Un método *ex vivo* para integrar un gen diana en un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de pollo, que comprende:

- 35 (a) someter a transfección linfocitos B de pollo con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o someter a transfección linfocitos B de pollo con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6; y
- (b) identificar un linfocito B en el que el gen diana está integrado en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina.

40 22. El método de la reivindicación 21 que comprende además integrar un segundo gen diana en un locus de la cadena ligera de inmunoglobulina, que comprende:

- 45 (a) someter a transfección uno o una pluralidad de linfocitos B de pollo con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para obtener una o una pluralidad de linfocitos B sometidos a transfección; y
- (b) identificar un linfocito B de pollo sometido a transfección a partir de (a) en el que el gen diana que comprende un gen V_H -D- J_H de inmunoglobulina de pollo reordenado está integrado en el locus de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina y el segundo gen diana está integrado en el locus de la cadena ligera del gen de inmunoglobulina.

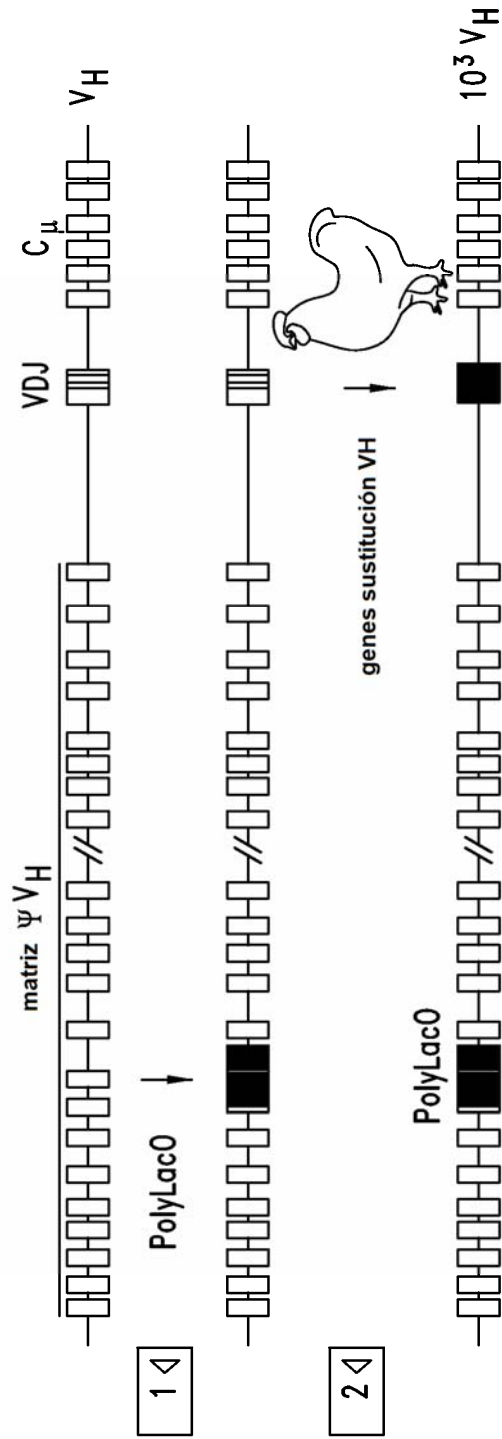


FIG. 1

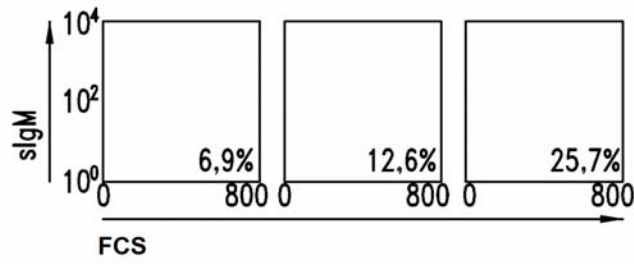


FIG. 2A

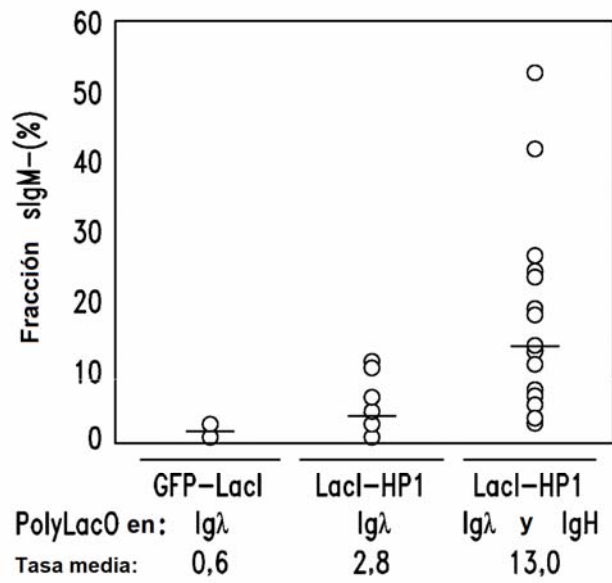


FIG. 2B

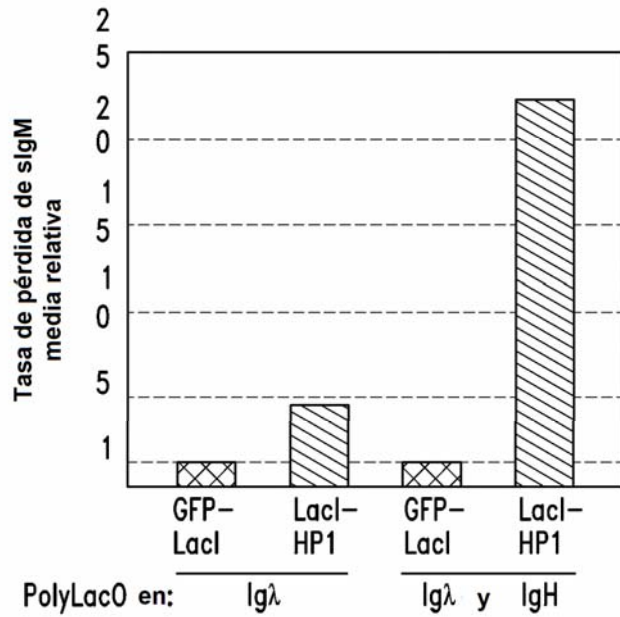


FIG. 2C

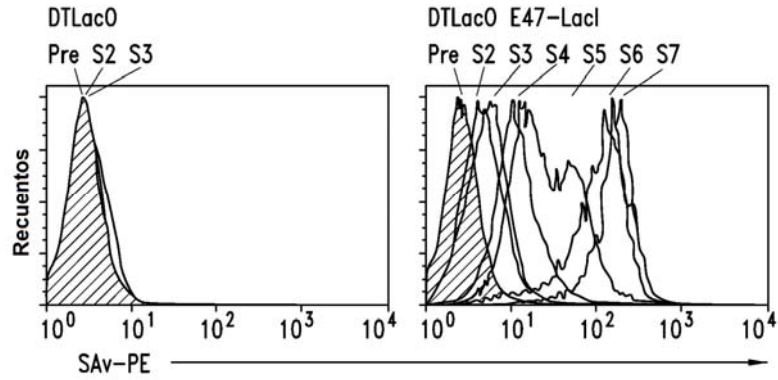


FIG. 3A

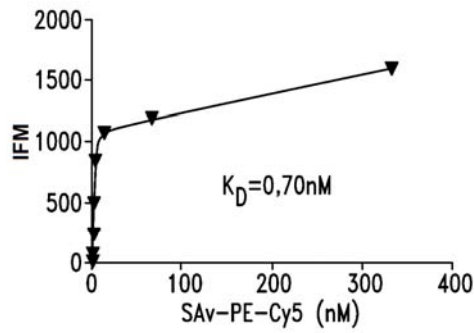


FIG. 3B

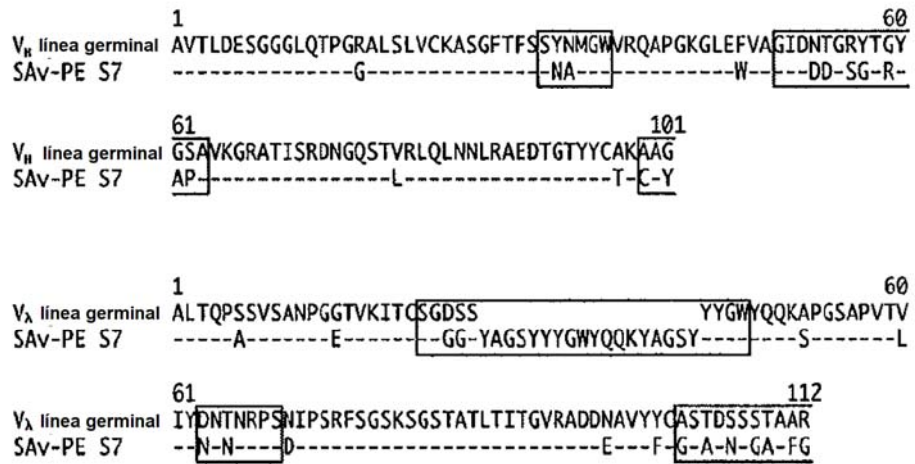


FIG. 3C

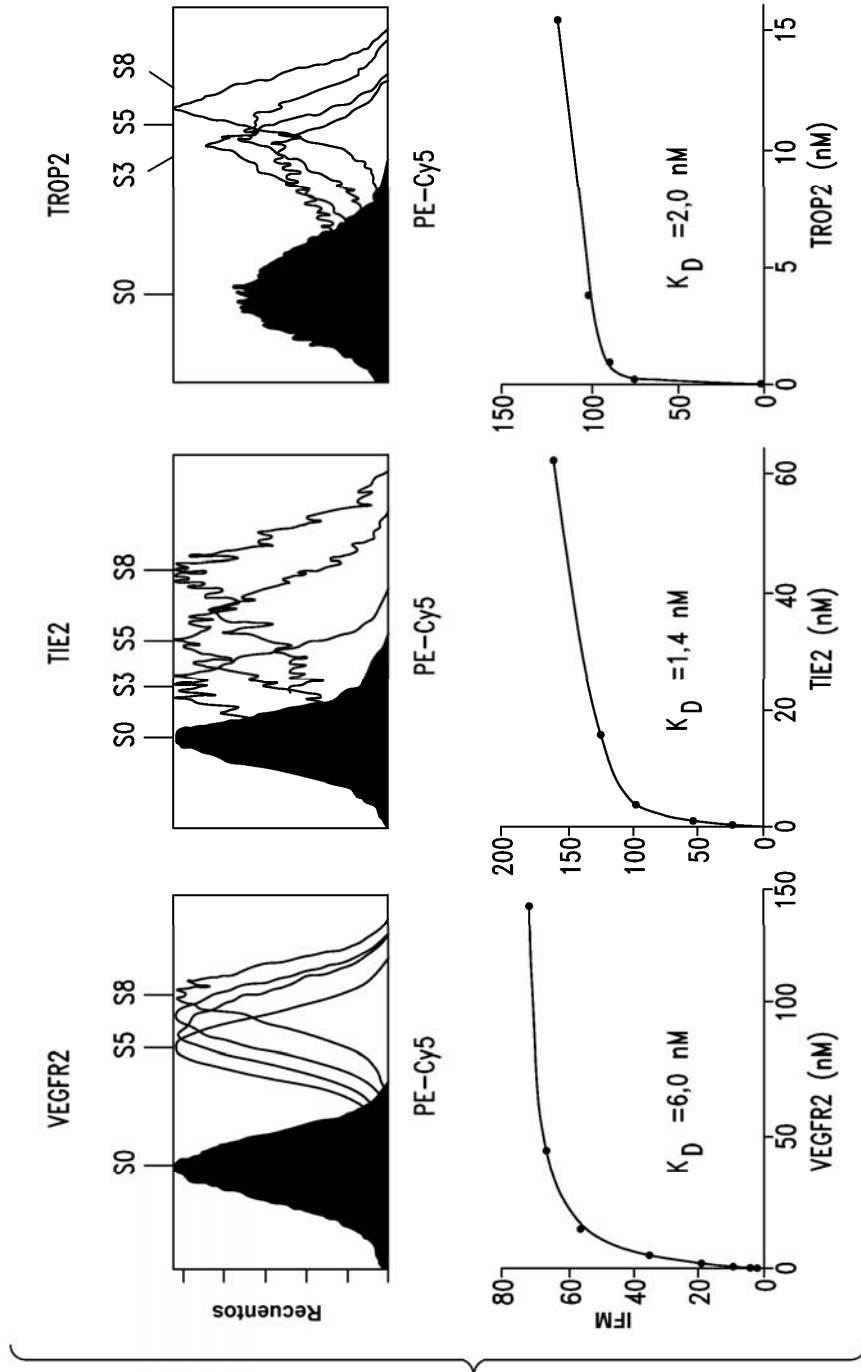


FIG. 4A

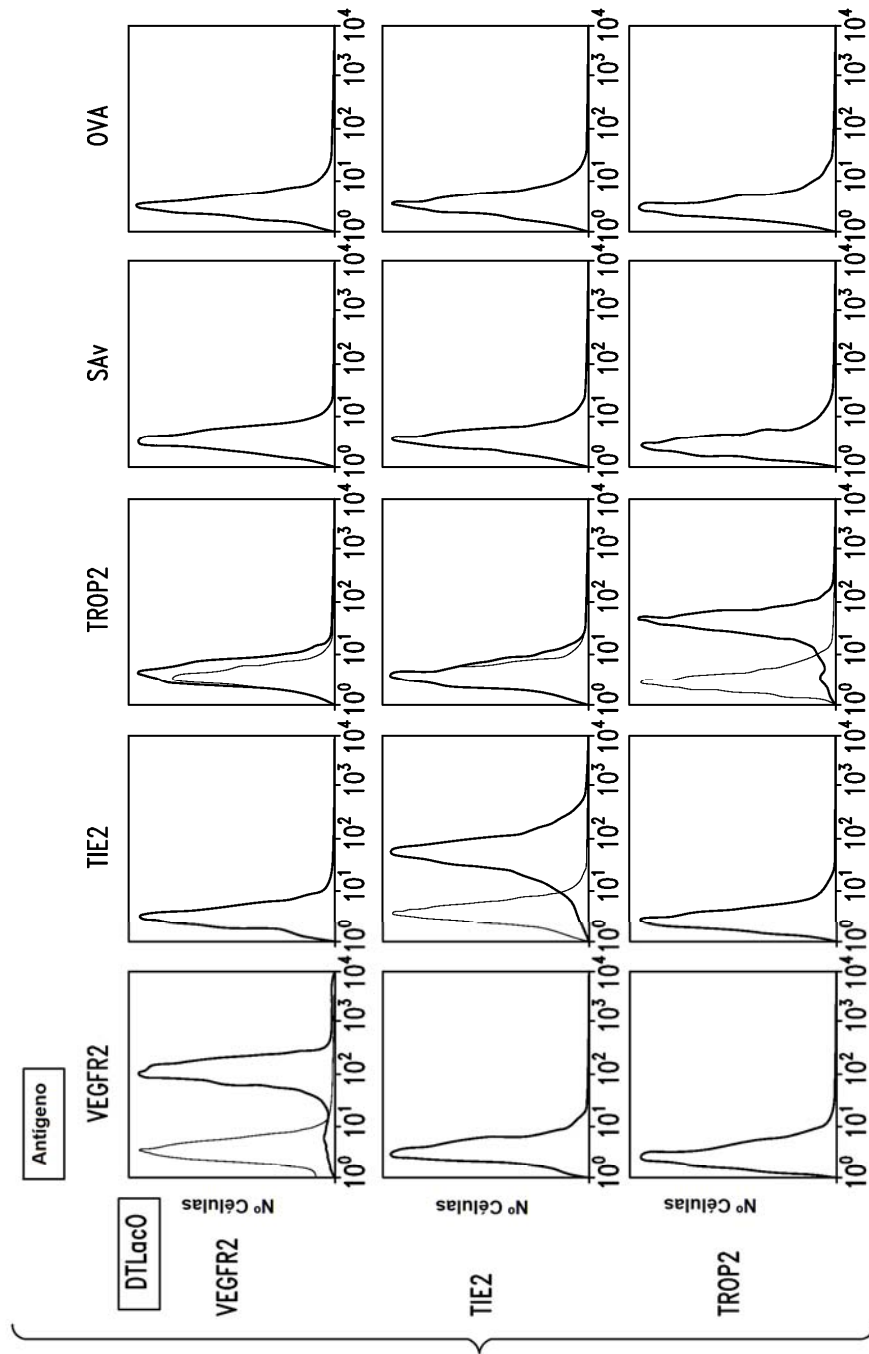


FIG. 4B

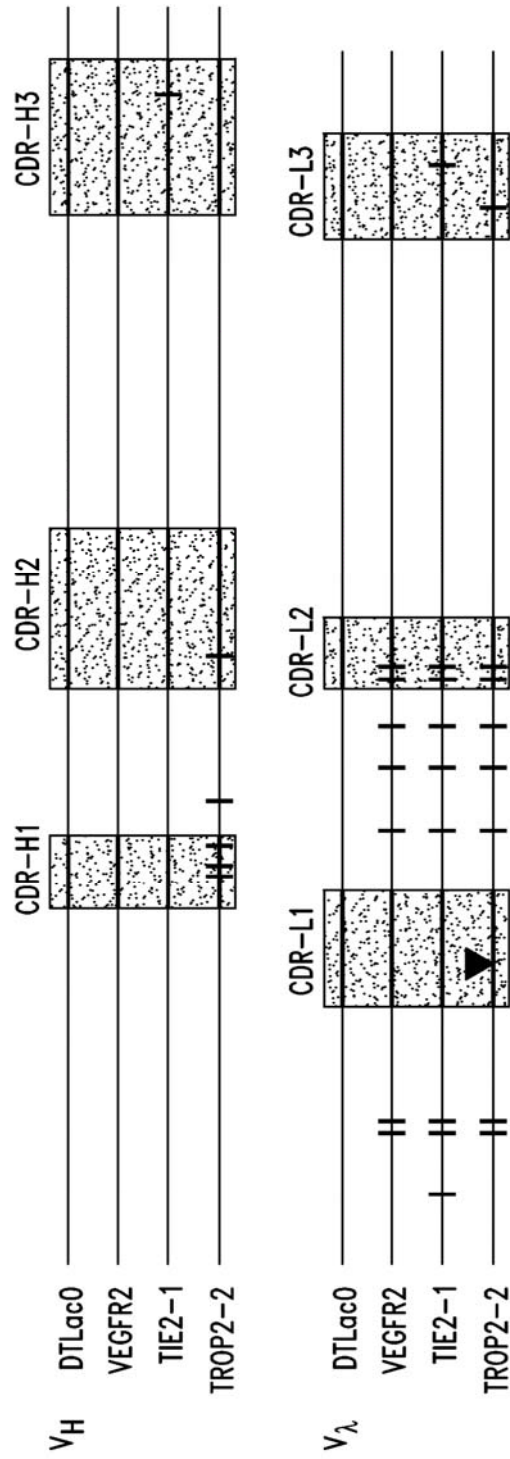


FIG. 4C

	Semanas 1-4	Semanas 5-8	Semanas 9-12	Semanas 13-16
DTLac0-1	FN14 S1 → S4	S7 → S10	S13 → S17	S24
	K_D			
DTLac0-2	FZD10 S1 → S2	S3 → S4		
	K_D			
			25 nM 0,44 nM	0,26 nM
		>40 nM 0,16 nM		

FIG. 5A

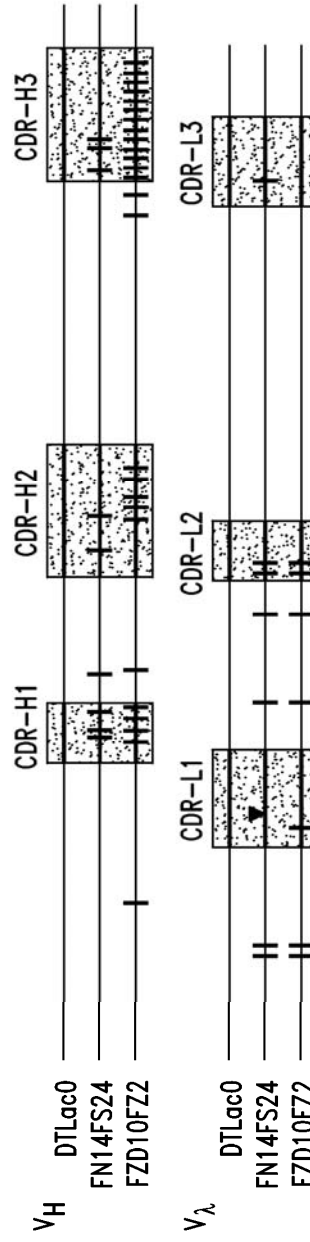


FIG. 5B

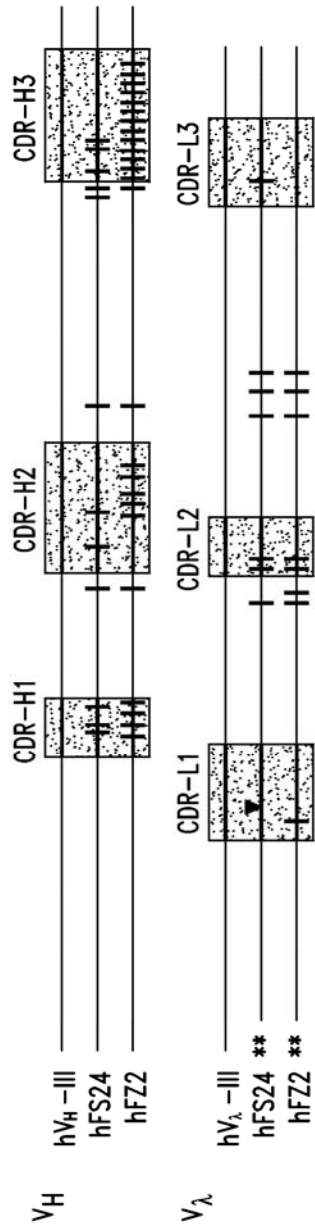


FIG. 5C

AcM	FZ2 (anti-FZD10)
pollo (K_D)	0,16 nM
humanizado (K_D)	0,22 nM

FIG. 5D