(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 942 413**

(51) Int. CI.:

A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 18210518 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2023 EP 3501272**

(54) Título: **Ratones que expresan un repertorio limitado de cadenas ligeras de inmunoglobulina**

(30) Prioridad:

13.03.2013 US 201313798455

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2023

(73) Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6706, US

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Ratones que expresan un repertorio limitado de cadenas ligeras de inmunoglobulina

Campo

Se emplea un ratón modificado genéticamente que expresa anticuerpos que tienen una cadena ligera variable humana/constante de ratón o rata común asociada con diversas cadenas pesadas variables humanas/constantes de ratón. Se proporciona un método de generación de un anticuerpo biespecífico humano a partir de secuencias génicas de región variable humanas de linfocitos B del ratón.

Antecedentes

Los anticuerpos normalmente comprenden un componente de cadena pesada homodimérico, en el que cada monómero de cadena pesada está asociado con una cadena ligera idéntica. Los anticuerpos que tienen un componente de cadena pesada heterodimérico (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) son deseables como anticuerpos terapéuticos. Pero la generación de anticuerpos biespecíficos que tengan un componente de cadena ligera adecuado que pueda asociarse satisfactoriamente con cada una de las cadenas pesadas de un anticuerpo biespecífico ha resultado ser problemática.

En un enfoque, se podría seleccionar una cadena ligera mediante el estudio de las estadísticas de uso de todos los dominios variables de la cadena ligera, identificando la cadena ligera empleada con más frecuencia en anticuerpos humanos, y emparejando esa cadena ligera *in vitro* con las dos cadenas pesadas de diferente especificidad.

En otro enfoque, se podría seleccionar una cadena ligera observando secuencias de cadenas ligeras en una genoteca de presentación en fagos (por ejemplo, una genoteca de presentación en fagos que comprendiera secuencias de región variable de cadena ligera humana, por ejemplo, una genoteca de scFv humanos) y seleccionando la región variable de la cadena ligera más comúnmente usada de la biblioteca. La cadena ligera se puede probar en las dos cadenas pesadas diferentes de interés.

En otro enfoque, se podría seleccionar una cadena ligera mediante el ensayo de una genoteca de presentación en fagos de secuencias variables de cadena ligera usando las secuencias variables de cadena pesada de ambas cadenas pesadas de interés como sondas. Una cadena ligera que se asocia con ambas secuencias variables de cadena pesada podría seleccionarse como una cadena ligera para las cadenas pesadas.

En otro enfoque, se podría alinear una cadena ligera candidata con las cadenas ligeras afines de las cadenas pesadas, y realizarse modificaciones en la cadena ligera para ajustarla más estrechamente a las características de secuencia comunes a las cadenas ligeras afines de ambas cadenas pesadas. Si es necesario reducir al mínimo las posibilidades de inmunogenicidad, las modificaciones preferentemente dan lugar a secuencias que están presentes en secuencias de cadenas ligeras humanas conocidas, de modo que es improbable que el procesamiento proteolítico genere un epítopo de linfocitos T basado en parámetros y en métodos conocidos en la técnica para evaluar la probabilidad de inmunogenicidad (es decir, *in silico*, así como ensayos en húmedo).

Todos los enfoques anteriores se basan en métodos *in vitro* que incluyen una serie de restricciones a priori, por ejemplo, la identidad de secuencia, la capacidad de asociarse con cadenas pesadas específicas previamente seleccionadas, etc. Existe la necesidad en la técnica de composiciones y métodos que no se basen en la manipulación de las condiciones *in vitro*, sino que empleen enfoques biológicamente más sensibles para producir proteínas de unión al epítopo humanas que incluyan una cadena ligera común.

Sumario

En la presente invención, se emplean ratones modificados genéticamente que expresan dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, ratones que tienen un repertorio variable limitado de cadenas ligeras.

La presente invención proporciona un método para generar una secuencia de región variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana que comprende las etapas de:

(a) inmunizar un ratón modificado genéticamente con un antígeno, en el que el ratón modificado genéticamente genera anticuerpos cuando se inmuniza con el antígeno, y en el que el ratón modificado genéticamente tiene un genoma de línea germinal que comprende:

(i) dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana y cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina

humana unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón o de rata, en el que los dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana son un Vκ1-39 humano y un Vκ3-20 humano, y los cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana son Jκ1 humano, Jκ2 humano, Jκ3 humano, Jκ4 humano y Jκ5 humano; y

(ii) uno o más segmentos de gen V_H de inmunoglobulina humana no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H de inmunoglobulina humana no reordenados, y uno o más segmentos de gen J_H de inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón;

en el que los segmentos de gen de cadena pesada humana no reordenados y los segmentos de gen de cadena ligera kappa humana no reordenados del ratón son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana, respectivamente, de un anticuerpo, y en el que el ratón no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que sea capaz de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera, y

(b) determinar una secuencia de región variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana que codifique un dominio variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina humana, respectivamente, de un anticuerpo que se una específicamente al antígeno y que haya sido generado por el ratón modificado genéticamente.

La presente invención proporciona además un método para generar una secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana que comprende las etapas de:

(a) inmunizar un ratón modificado genéticamente con un antígeno de interés, en el que el ratón modificado genéticamente comprende en su genoma de línea germinal:

(i) exactamente dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana no reordenados y cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón en los locus endógenos de cadena ligera kappa del ratón, en el que los dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana no reordenados son un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano, y los cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana no reordenados son Jκ1 humano, Jκ2 humano, Jκ3 humano, Jκ4 humano y Jκ5 humano; y

(ii) uno o más segmentos de gen V_H de inmunoglobulina humana no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H de inmunoglobulina humana no reordenados, y uno o más segmentos de gen J_H de inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón en los locus endógenos de cadena pesada de ratón;

en el que los segmentos génicos de cadena pesada y cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana no reordenados del ratón modificado genéticamente son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana, respectivamente, de un anticuerpo, y en el que el ratón modificado genéticamente no comprende segmentos de genes Vκ o Jκ endógenos de inmunoglobulina que son capaces de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina; y

(b) determinar una secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana de un anticuerpo que se une específicamente al antígeno y que fue generado por el ratón modificado genéticamente.

La presente invención también proporciona un método para fabricar un anticuerpo que comprende:

(1) expresar en una célula individual:

(a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina, comprendiendo la primera secuencia de ácido nucleico una primera secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana, en la que la primera secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana se obtuvo a partir de un linfocito B de un ratón modificado genéticamente, en el que el ratón modificado genéticamente ha sido inmunizado con un primer antígeno de interés y el ratón modificado genéticamente comprende en su genoma de línea germinal:

(i) dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados y cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera, en el que los dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados son un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano, y en el que los cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados son un segmento de gen

Jκ1 humano, un segmento de gen Jκ2 humano, un segmento de gen Jκ3 humano, un segmento de gen Jκ4 humano y un segmento de gen Jκ5 humano; y

(ii) uno o más segmentos de gen V_H humano no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H humano no reordenados y uno o más segmentos de gen J_H humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de ratón;

en el que los segmentos génicos de cadena pesada humana no reordenados y los segmentos génicos de cadena ligera kappa humana no reordenados del ratón modificado genéticamente son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana de un anticuerpo, respectivamente;
en el que el ratón modificado genéticamente no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que es capaz de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera; y
en el que la primera secuencia de región variable de cadena pesada humana codifica un primer dominio variable de cadena pesada humana que, con un dominio variable de cadena ligera kappa, reconoce el primer antígeno; y

(b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina, comprendiendo la segunda secuencia de ácido nucleico una secuencia de región variable de cadena ligera kappa humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera humana, en la que la secuencia de región variable de cadena ligera kappa humana comprende: un segmento de gen Vκ1-39 humano, un segmento de gen Vκ3-20 humano, o una versión hipermutada somáticamente de los mismos;

(2) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar un anticuerpo totalmente humano; y

(3) aislar el anticuerpo. También se hace referencia un sistema biológico para generar un dominio variable de cadena ligera humana que se asocia y expresa con un repertorio diverso de dominios variables de cadena pesada humanos madurados por afinidad. También se hace referencia a métodos de generación de proteínas de unión que comprenden dominios variables de inmunoglobulina, que comprenden inmunizar ratones que tienen un repertorio limitado de cadenas ligeras de inmunoglobulina con un antígeno de interés, y emplean una secuencia génica de la región variable de inmunoglobulina del ratón en una proteína de unión que se une específicamente al antígeno de interés. Los métodos incluyen métodos de generación de dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana adecuados para su uso en la fabricación de proteínas de unión al antígeno multiespecíficas.

También se hace referencia a ratones modificados genéticamente para seleccionar dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana madurados por afinidad adecuados derivados de un repertorio de segmentos génicos de región variable de cadena pesada humana no reordenados, en los que los dominios variables de cadena pesada humana madurados por afinidad se asocian y expresan con un solo dominio variable de cadena ligera humana derivado de un segmento génico de región variable de cadena ligera humana. También se proporcionan ratones diseñados genéticamente que presentan una opción de dos segmentos génicos de región variable de cadena ligera humana. Los dos segmentos génicos son Vκ1-39 humano y Vκ3-20 humano.

También se hace referencia a ratones modificados genéticamente que expresan un repertorio limitado de dominios variables de cadena ligera humana, o un único dominio variable de cadena ligera humana, de un repertorio limitado de segmentos génicos de región variable de cadena ligera humana. Los ratones están modificados genéticamente para incluir dos segmentos génicos de la región variable de cadena ligera humana desorganizados que se reordena para formar dos genes de región variable de cadena ligera reordenados que expresan una cualquiera o ambas cadenas ligeras. Los dominios variables de la cadena ligera humana reordenados son capaces de emparejarse con una pluralidad de cadenas pesadas humanas maduradas por afinidad seleccionadas por los ratones, en los que las regiones variables de cadena pesada se unen específicamente a diferentes epítopos.

También se hace referencia a ratones modificados genéticamente que expresan un repertorio limitado de dominios variables de cadena ligera humana, o un único dominio variable de cadena ligera humana, de un repertorio limitado de secuencias de región variable de cadena ligera humana. También se hace referencia a ratones modificados genéticamente para incluir una sola secuencia de cadena ligera humana V/J (o dos secuencias V/J) que expresen una región variable de una sola cadena ligera (o que expresen una cualquiera o ambas regiones variables). Una cadena ligera que comprende la secuencia variable es capaz de emparejarse con una pluralidad de cadenas pesadas humanas maduradas por afinidad seleccionadas clónicamente por los ratones, en los que las regiones variables de cadena pesada se unen específicamente a diferentes epítopos.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende un solo segmento génico de la región variable (V_L) de cadena ligera de inmunoglobulina humana que es capaz de reordenarse con un segmento génico J humano (seleccionado entre uno o una pluralidad de segmentos de J_L) y que codifica un dominio V_L humano de una cadena ligera de inmunoglobulina. El ratón modificado genéticamente empleado en la presente invención comprende dos segmentos de gen V_L humano, cada uno de los cuales es capaz de reordenarse con un segmento

génico J humano (seleccionado entre uno o una pluralidad de segmentos de J_L) y de codificar un dominio V_L humano de cadena ligera de inmunoglobulina. En algunos casos, los dos segmentos de gen V_L humano están yuxtapuestos en el genoma del ratón. En algunos casos, los dos segmentos de gen V_L humano están en diferentes locus (por ejemplo, un heterocigoto, que comprende un primer segmento de V_L humano en un primer alelo de cadena ligera, y un segundo segmento de V_L humano en un segundo alelo de cadena ligera, en el que el primer y el segundo segmentos de V_L humanos no son idénticos) en el genoma del ratón. Los dos segmentos de gen V_L humanos son un segmento del gen Vκ1-39 humano y un segmento del gen Vκ3-20 humano. El gen J_L humano es Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4, Jκ5 humanos. El ratón modificado genéticamente empleado en la presente invención no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que son capaces de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente empleado contiene una modificación genética que inactiva y/o elimina parte o la totalidad de un segmento del gen V_L endógeno.

[Eliminado]

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que no comprende un segmento de gen V_L de ratón endógeno que es capaz de reordenarse para formar un gen de cadena ligera de inmunoglobulina, en el que el locus de V_L contiene un solo segmento de gen V_L humano que es capaz de reordenarse para codificar una región de V_L de un gen de cadena ligera. En casos específicos, el segmento del gen V_L humano es un segmento del gen Vκ1-39Jκ5 humano y un segmento del gen Vκ3-20Jκ1 humano. También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende un locus de V_L que no comprende un segmento de gen V_L de ratón endógeno que es capaz de reordenarse para formar un gen de cadena ligera de inmunoglobulina, en el que el locus de V_L comprende no más de dos segmentos de gen V_L humano que son capaces de reordenarse para codificar una región de V_L de un gen de cadena ligera. Los no más de dos segmentos de gen V_L humanos se seleccionan del grupo que consiste en un segmento del gen Vκ1-39 humano, un segmento del gen Vκ3-20 humano y una combinación de los mismos. En algunos ciertos casos, los no más de dos segmentos de gen V_L humanos son un segmento del gen Vκ1-39Jκ5 humano y un segmento del gen Vκ3-20Jκ1 humano.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende una sola región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (V/J) reordenada (V_L) (es decir, una región V_L/J_L) que codifica un dominio V_L humano de una cadena ligera de inmunoglobulina. En otro caso, el ratón comprende no más de dos regiones V_L humanas reordenadas que son capaces de codificar un dominio V_L humano de una cadena ligera de inmunoglobulina.

En un caso, la región V_L es una secuencia de Vκ1-39/J humana reordenada o una secuencia de Vκ3-20/J humana reordenada. En un caso, el segmento de J_L humano de la secuencia de V_L/J_L reordenada se selecciona entre Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4 y Jκ5. En un caso específico, la región de V_L es una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana o una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humana. el ratón proporcionado tiene tanto una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana como una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humana.

En una realización, el segmento del gen V_L humano está unido operativamente a una secuencia líder humana o de ratón. En una realización, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón. En una realización específica, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder de Vκ3-7 de ratón. En una realización específica, la secuencia líder está unida operativamente a un segmento de gen V_L humano reordenado.

En una realización, el segmento de gen V_L está unido operativamente a una secuencia promotora de inmunoglobulina. En una realización, la secuencia promotora es una secuencia promotora humana. En una realización específica, el promotor de inmunoglobulina humana es un promotor de Vκ3-15 humano. En una realización específica, el promotor está unido operativamente a un segmento de gen V_L humano reordenado.

En una realización, el locus de la cadena ligera comprende una secuencia líder flanqueada en 5' (con respecto a la dirección de la transcripción de un segmento de gen V_L) con un promotor de inmunoglobulina humana y flanqueada en 3' con un segmento de gen V_L humano que se reordena con un segmento de J humano y codifica un dominio V_L de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante endógena de cadena ligera de ratón (C_L). En una realización específica, el segmento de gen V_L está en el locus Vκ de ratón, y la C_L de ratón es una Cκ de ratón.

En un caso, el locus de la cadena ligera comprende una secuencia líder flanqueada en 5' (con respecto a la dirección de la transcripción de un segmento de gen V_L) con un promotor de inmunoglobulina humana y flanqueada en 3' con una región de V_L humana reordenada (secuencia de V_L/J_L) y codifica un dominio V_L de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante endógena de cadena ligera de ratón (C_L). En un caso específico, la secuencia de V_L/J_L humana reordenada está en el locus kappa (κ) de ratón, y la CL de ratón es una Cκ de ratón.

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

En una realización, el ratón empleado en la invención comprende un locus de cadena ligera lambda (λ) de

inmunoglobulina no funcional. En una realización específica, el locus de la cadena ligera λ comprende una eliminación de una o más secuencias del locus, en el que una o más eliminaciones hacen que el locus de la cadena ligera λ sea incapaz de reordenarse para formar un gen de la cadena ligera. En otra realización, se eliminan todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_L del locus de la cadena ligera λ.

En una realización, el ratón empleado en la invención genera una cadena ligera que comprende un dominio V_L mutado somáticamente derivado de un segmento del gen V_L humano. En una realización, la cadena ligera comprende un dominio V_L mutado somáticamente derivado de un segmento del gen V_L humano, y una región de $C_κ$ de ratón. En una realización, el ratón no expresa una cadena ligera λ.

En una realización, el ratón modificado genéticamente empleado es capaz de hipermutar somáticamente la secuencia de la región de V_L humana. En una realización específica, el ratón empleado comprende una célula que comprende un gen de cadena ligera de inmunoglobulina reordenado derivado de un segmento del gen V_L humano que es capaz de reordenarse y codificar un dominio V_L, y el gen de cadena ligera de inmunoglobulina reordenado comprende un dominio V_L mutado somáticamente.

En una realización, el ratón empleado en la invención comprende una célula que expresa una cadena ligera que comprende un dominio V_L humano mutado somáticamente unido a una Cκ de ratón, en el que la cadena ligera se asocia con una cadena pesada que comprende un dominio V_H mutado somáticamente derivado de un segmento del gen V_H humano y en el que la cadena pesada comprende una región constante de la cadena pesada del ratón (C_H). En una realización específica, la cadena pesada comprende una C_H1 de ratón, una bisagra de ratón, una C_H2 de ratón y una C_H3 de ratón. En una realización específica, la cadena pesada comprende una C_H1 humana, una bisagra, una C_H2 de ratón y una C_H3 de ratón.

El ratón empleado comprende uno o más segmentos de gen V_H de la inmunoglobulina humana reordenados, uno o más segmentos de gen D_H de la inmunoglobulina humana reordenados y uno o más segmentos de gen J_H de la inmunoglobulina humana reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de inmunoglobulina de ratón. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de segmentos de gen V_H de ratón endógeno con uno o más segmentos de gen V_H humano, en el que los segmentos de gen V_H humano están unidos operativamente a un gen de la región de C_H de ratón, de modo que el ratón reordena los segmentos de gen V_H humanos y expresa una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica inversa que comprende un dominio V_H humano y un C_H de ratón. En una realización, del 90 al 100 % de los segmentos de gen V_H de ratón no reordenados están reemplazados por al menos un segmento de gen V_H humano reordenado. En una realización específica, todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_H de ratón endógenos están reemplazados por al menos un segmento del gen V_H humano no reordenado. En una realización, el reemplazo es con al menos 19, al menos 39 o al menos 80 u 81 segmentos de gen V_H humano no reordenados. En una realización, el reemplazo es con al menos 12 segmentos de gen V_H humano no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos de gen V_H humano no reordenados funcionales o al menos 43 segmentos de gen V_H humano no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende un reemplazo de todos los segmentos de D_H y J_H de ratón por al menos un segmento de D_H humano no reordenado y al menos un segmento de J_H humano no reordenado. En una realización, el al menos un segmento de D_H humano no reordenado se selecciona entre 1-1, D1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, 7-27, y una combinación de los mismos. En una realización, el al menos un segmento de J_H humano no reordenado se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, 6 y una combinación de los mismos. En una realización específica, el uno o más segmentos de gen V_H humano se selecciona entre un segmento de gen V_H humano 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 y una combinación de los mismos.

En una realización, el ratón empleado comprende un linfocito B que expresa una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno de interés, en el que la proteína de unión comprende una cadena ligera derivada de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano o un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano, y en el que la célula comprende un gen de cadena pesada de inmunoglobulina reordenado derivado de un reordenamiento de segmentos de gen V_H humano seleccionados de entre un segmento de gen 1-69, 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 3-33, 3-53, 4-39, 4-59 y 5-51. En una realización, el uno o más segmentos de gen V_H humanos se reordenan con un segmento de gen J_H de cadena pesada humana seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización, El uno o más segmentos de gen V_H y J_H humanos se reordenan con un segmento de gen D_H humano seleccionado entre 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13 y 7-27. En una realización específica, el gen de la cadena ligera tiene 1, 2, 3, 4 o 5, o más hipermutaciones somáticas.

En una realización, el ratón empleado comprende un linfocito B que comprende una secuencia génica de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina reordenada que comprende una región de $V_H/D_H/J_H$ seleccionada entre 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/3, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3-30/5-12/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7-27/5, 3-30/7-27/6, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, 4-39/1-26/3, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4, 4-59/3-22/3, 5-51/3-16/6, 5-51/5-5/3, 5-51/6-13/5, 3-53/1-1/4, 1-69/6-6/5 y 1-69/6-13/4. En una realización específica, los linfocitos B expresan una proteína de unión que comprende una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de la cadena pesada de ratón, y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de cadena ligera de ratón.

En una realización, la región de V_L humana reordenada es una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio V_L derivado de la secuencia de V_L/J_L humana e (ii) una C_L de ratón; estando la cadena ligera asociada con una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) una C_H de ratón e (ii) un dominio V_H humano mutado somáticamente derivado de un segmento de gen V_H humano seleccionado de un segmento de gen V_H humano 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. En una realización, la C_L es una Cκ de ratón. En una realización específica, el segmento del gen V_H humano se selecciona entre un segmento de gen 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 4-59, 5-51 y 1-69. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente comprende una secuencia derivada de un segmento de D_H seleccionado entre 1-1, 1-7, 2-8, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13 y 7-27. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente comprende una secuencia derivada de un segmento de J_H seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En una realización específica, el dominio V_H humano mutado somáticamente está codificado por una secuencia de $V_H/D_H/J_H$ humana reordenada seleccionada entre 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3-30/5-12/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7-27/5, 3-30/7-27/6, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4, 4-59/3-22/3, 5-51/5-5/3, 1-69/6-6/5 y 1-69/6-13/4.

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

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

En una realización, del 90 al 100 % de los segmentos de gen V_H de ratón no reordenados endógenos están reemplazados por al menos un segmento de gen V_H humano reordenado. En una realización específica, todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_H de ratón no reordenados endógenos están reemplazados por al menos un segmento del gen V_H humano no reordenado. En una realización, el reemplazo es con al menos 18, al menos 39, al menos 80 u 81 segmentos de gen V_H humano no reordenados. En una realización, el reemplazo es con al menos 12 segmentos de gen V_H humano no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos de gen V_H humano no reordenados funcionales o al menos 43 segmentos de gen V_H humano no reordenados.

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

También se describe un ratón que expresa un anticuerpo quimérico inverso que comprende una cadena ligera que comprende una Cκ de ratón y un dominio V_L humano mutado somáticamente derivado de una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana reordenada o una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, y una cadena pesada que comprende una C_H de ratón y un dominio V_H humano mutado somáticamente derivado de un segmento de gen V_H humano seleccionado entre un segmento de gen V_H humano 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51 y 6-1, ratón que no expresa un anticuerpo completamente de ratón y que no expresa un anticuerpo completamente humano. En un caso, el ratón comprende un locus de la cadena ligera κ que comprende un reemplazo de los segmentos de gen de la cadena ligera kappa del ratón endógeno con la secuencia

de Vκ1-39Jκ5 humana reordenada o la secuencia de Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, y comprende un reemplazo de todos o esencialmente todos los segmentos de genes V_H de ratón endógenos con un repertorio completo o esencialmente completo de segmentos de genes V_H humanos.

También se describe una población de anticuerpos específicos del antígeno derivados de un ratón como el descrito en el presente documento, en la que los anticuerpos comprenden un gen de cadena ligera derivado de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humana o un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humana, y en la que los anticuerpos comprenden un gen de cadena pesada de inmunoglobulina reordenada derivado de un reordenamiento de un segmento de gen V_H humano seleccionado de un segmento del gen V_H humano 1-2, 1-3, 1-8, 1-18, 1-24, 1-46, 1-58, 1-69, 2-5, 2-26, 2-70, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-16, 3-20, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33, 3-43, 3-48, 3-53, 3-64, 3-72, 3-73, 4-31, 4-34, 4-39, 4-59, 5-51 y 6-1. En un caso, el uno o más segmentos de gen V_H humanos se reordenan con un segmento de gen J_H de cadena pesada humana seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En un caso específico, la cadena ligera tiene 1, 2, 3, 4 o 5, o más hipermutaciones somáticas.

En un caso, la cadena ligera tiene 1, 2, 3 o 4 hipermutaciones somáticas. En un caso, el gen de la cadena ligera tiene 1 o 2 mutaciones. En diversos casos, el gen de la cadena ligera es capaz de incurrir en mutaciones múltiples a lo largo de su secuencia.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y la cadena ligera tiene al menos una o no más de cuatro hipermutaciones somáticas. En un caso, la cadena ligera comprende al menos dos hipermutaciones somáticas. En un caso, la cadena ligera comprende al menos tres hipermutaciones somáticas. En un caso, la cadena ligera comprende al menos cuatro hipermutaciones somáticas. En un caso específico, al menos una de dichas hipermutaciones somáticas está presente en una o más regiones marco conservadas (FW) de la cadena ligera. En un caso específico, al menos una de dichas hipermutaciones somáticas está presente en una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera. En un caso específico, al menos una de dichas hipermutaciones somáticas está presente en una o más FW y/o una o más CDR de la cadena ligera. En diversos casos, las regiones marco conservadas se seleccionan entre la región marco conservada 1 (FW1), la región marco conservada 2 (FW2), la región marco conservada 3 (FW3) y/o una combinación de las mismas. En diversos casos, las CDR se seleccionan de entre CDR1, CDR2, CDR3 y/o una combinación de las mismas.

En un caso, la cadena pesada comprende al menos una mutación en una o más FW o una o más CDR. En un caso, la cadena pesada comprende al menos una mutación en una o más FW y una o más CDR. En un caso, la cadena pesada comprende al menos dos mutaciones en una o más FW y una o más CDR. En un caso, la cadena pesada comprende al menos tres mutaciones en una o más FW y una o más CDR. En un caso, la cadena pesada comprende al menos cuatro mutaciones en una o más FW y una o más CDR. En un caso, la cadena pesada comprende al menos cinco o más de cinco mutaciones en una o más FW y una o más CDR; en un caso específico, la cadena pesada comprende al menos cinco o más de cinco mutaciones en dos FW; en un caso específico, la cadena pesada comprende al menos cinco o más de cinco mutaciones en una FW y una CDR.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 9 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen al menos una mutación presente en FW1; en un caso, al menos el 9 % de las cadenas ligeras comprenden una mutación presente en FW1. En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 25 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen al menos una mutación o más de dos mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 19 % de las cadenas ligeras tienen una mutación presente en CDR1; en un caso, al menos el 5 % de las cadenas ligeras tienen dos mutaciones presentes en CDR1.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 20 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen al menos una mutación o más de tres mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 17 % de las cadenas ligeras tienen una mutación presente en FW2; en un caso, al menos el 1 % de las cadenas ligeras tienen dos mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 1 % de las cadenas ligeras tienen tres mutaciones presentes en FW2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 10 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen al menos una mutación o más de dos mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 10 % de las cadenas ligeras tienen una mutación presente en CDR2; en un caso, al menos el 1 % de las cadenas ligeras tienen dos mutaciones presentes en CDR2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 29 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen al menos una mutación o más de cuatro mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 21 % de las cadenas ligeras tienen una mutación presente en FW3; en un caso, al menos el 5 % de las cadenas ligeras tienen dos mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 2 % de las cadenas ligeras tienen tres mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 2 % de las cadenas ligeras tienen cuatro mutaciones presentes en FW3.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 37 % de

las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen al menos una mutación o más de cuatro mutaciones presentes en CDR3; en un caso, al menos el 27 % de las cadenas ligeras tienen una mutación presente en CDR3; en un caso, al menos el 8 % de las cadenas ligeras tienen dos mutaciones presentes en CDR3; en un caso, al menos el 1 % de las cadenas ligeras tienen tres mutaciones presentes en CDR3; en un caso, al menos el 1 % de las cadenas ligeras tienen cuatro mutaciones presentes en CDR3.

También se describe una población de anticuerpos específicos del antígeno derivados de un ratón como el descrito en el presente documento, en la que los anticuerpos comprenden una cadena ligera derivada de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 9 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen una o más mutaciones presentes en FW1, aproximadamente el 25 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen una o más mutaciones presentes en CDR1, aproximadamente el 20 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen una o más mutaciones presentes en FW2, aproximadamente el 10 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen una o más mutaciones presentes en CDR2, aproximadamente el 29 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen una o más mutaciones presentes en FW3, y aproximadamente el 37 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39/Jκ5 tienen una o más mutaciones presentes en CDR3.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 35 % de las cadenas pesadas tienen al menos una mutación presente en FW1; en un caso, al menos el 25 % de las cadenas pesadas tienen una mutación presente en FW1; en un caso, al menos el 9 % de las cadenas pesadas tienen dos mutaciones presentes en FW1; en un caso, al menos el 1 % de las cadenas pesadas tienen tres mutaciones presentes en FW1; en un caso, al menos el 1 % de las cadenas pesadas tienen más de cinco mutaciones presentes en FW1.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 92 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o no más de cuatro mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 92 % de las cadenas pesadas tienen al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 26 % de las cadenas pesadas tienen una mutación presente en CDR1; en un caso, al menos el 44 % de las cadenas pesadas tienen dos mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 19 % de las cadenas pesadas tienen tres mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 3 % de las cadenas pesadas tienen cuatro mutaciones presentes en CDR1.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 66 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o no más de tres mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 66 % de las cadenas pesadas tienen al menos una, al menos dos o al menos tres mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 35 % de las cadenas pesadas tienen una mutación presente en FW2; en un caso, al menos el 23 % de las cadenas pesadas tienen dos mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 8 % de las cadenas pesadas tienen tres mutaciones presentes en FW2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 70 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o no más de cuatro mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 70 % de las cadenas pesadas tienen al menos dos, al menos tres o al menos cuatro mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 34 % tienen una mutación presente en CDR2; en un caso, al menos el 20 % de las cadenas pesadas tienen dos mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 12 % de las cadenas pesadas tienen tres mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 5 % de las cadenas pesadas tienen cuatro mutaciones presentes en CDR2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 91 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o hasta cinco o más mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 91 % de las cadenas pesadas tienen al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco o más mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 19 % de las cadenas pesadas tienen una mutación presente en FW3; en un caso, al menos el 33 % de las cadenas pesadas tienen dos mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 22 % de las cadenas pesadas tienen tres mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 11 % de las cadenas pesadas tienen cuatro mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 7 % de las cadenas pesadas tienen cinco mutaciones o más presentes en FW3.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y aproximadamente el 63 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o no más de dos mutaciones presentes en CDR3; en un caso, al menos el 63 % de las cadenas pesadas tienen una mutación presente en CDR3; en un caso, al menos el 54 % de las cadenas pesadas tienen una mutación presente en CDR3; en un caso, al menos el 9 % de las cadenas pesadas tienen dos mutaciones presentes en CDR3.

También se describe una población de anticuerpos específicos del antígeno derivados de un ratón como el descrito en el presente documento, en la que los anticuerpos comprenden una cadena ligera derivada de un reordenamiento de Vκ1-39/Jκ5 humano y al menos el 35 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en FW1, aproximadamente el 92 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en CDR1, aproximadamente el 66 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en FW2, aproximadamente el 70 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en CDR2,

aproximadamente el 91 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en FW3, y aproximadamente el 63 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en CDR3.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y el gen de la cadena ligera tiene al menos una o no más de dos hipermutaciones somáticas; en un caso, el gen de la cadena ligera tiene al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más hipermutaciones somáticas. En un caso específico, las mutaciones están presentes en una o más regiones marco conservadas de la cadena ligera. En un caso específico, las mutaciones están presentes en una o más regiones CDR de la cadena ligera. En un caso específico, las mutaciones están presentes en una o más regiones marco conservadas y/o una o más regiones CDR de la cadena ligera. En diversas realizaciones, las regiones marco conservadas se seleccionan entre la región marco conservada 1 (FW1), la región marco conservada 2 (FW2), la región marco conservada 3 (FW3) y/o una combinación de las mismas.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 10 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen al menos una mutación presente en FW1; en un caso, al menos el 10 % de las cadenas ligeras tienen una mutación en FW1.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 53 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen al menos una mutación o más de dos mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 27 % de las cadenas ligeras tienen una o más mutaciones en CDR1; en un caso, aproximadamente el 54 % de las cadenas ligeras tienen una o dos mutaciones presentes en CDR1.
En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 6 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen al menos una mutación o más de dos mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 6 % de las cadenas ligeras tienen al menos una mutación presente en FW2; en un caso, al menos el 3 % de las cadenas ligeras tienen una mutación presente en FW2; en un caso, al menos el 3 % de las cadenas ligeras tienen dos mutaciones presentes en FW2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y al menos aproximadamente el 3 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen al menos una mutación presente en CDR2; en un caso, al menos el 3 % de las cadenas ligeras tienen una mutación en CDR2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 17 % o más de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen al menos una mutación o más de dos mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 20 % de las cadenas ligeras tienen una mutación presente en FW3; en un caso, al menos el 17 % de las cadenas ligeras tienen dos mutaciones presentes en FW3.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y al menos el 43 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen al menos una mutación presente en CDR3; en un caso, al menos el 43 % de las cadenas ligeras tienen una mutación en CDR3.

También se describe una población de anticuerpos específicos del antígeno derivados de un ratón como el descrito en el presente documento, en la que los anticuerpos comprenden una cadena ligera derivada de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 10 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen una o más mutaciones presentes en al menos, aproximadamente el 53 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen una o más mutaciones presentes en CDR1, aproximadamente el 6 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen una o más mutaciones presentes en FW2, aproximadamente el 3 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen una o más mutaciones presentes en CDR2, aproximadamente el 37 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen una o más mutaciones presentes en FW3, y aproximadamente el 43 % de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20/Jκ1 tienen una o más mutaciones presentes en CDR3.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 43 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o no más de dos mutaciones presentes en FW1; en un caso, al menos el 41 % de las cadenas pesadas tienen al menos una mutación presente en FW1; en un caso, aproximadamente el 41 % de las cadenas pesadas tienen una mutación presente en FW1; en un caso, aproximadamente el 2 % de las cadenas pesadas tienen dos mutaciones presentes en FW1.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 92 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o no más de cuatro mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 43 % de las cadenas pesadas tienen al menos una mutación presente en CDR1; en un caso, al menos el 25 % de las cadenas pesadas tienen al menos dos mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 15 % de las cadenas pesadas tienen al menos 3 mutaciones presentes en CDR1; en un caso, al menos el 10 % de las cadenas pesadas tienen 4 mutaciones o más presentes en CDR1.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 46 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o no más de tres mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 34 % de las cadenas pesadas tienen al menos una mutación presente en FW2; en un caso, al menos el 10 % de las cadenas pesadas tienen dos o más mutaciones presentes en FW2; en un caso, al menos el 2 % de las cadenas

pesadas tienen tres mutaciones o más presentes en FW2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 84 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o hasta cinco o más de cinco mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 39 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones o más presentes en CDR2; en un caso, al menos el 18 % de las cadenas pesadas tienen dos o más mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 21 % de las cadenas pesadas tienen tres o más mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 3 % de las cadenas pesadas tienen cuatro o más mutaciones presentes en CDR2; en un caso, al menos el 2 % de las cadenas pesadas tienen cinco mutaciones o más presentes en CDR2.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 92 % de las cadenas pesadas tienen al menos una o hasta cinco o más de cinco mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 21 % de las cadenas ligeras tienen al menos una mutación presente en FW3; en un caso, al menos el 20 % de las cadenas pesadas tienen al menos dos mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 13 % de las cadenas pesadas tienen al menos tres mutaciones presentes en FW3; en un caso, al menos el 20 % de las cadenas pesadas tienen al menos cuatro mutaciones en FW3; en un caso, al menos el 18 % de las cadenas pesadas tienen al menos 5 mutaciones en FW3.

En un caso, la cadena ligera se deriva de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 7 % de las cadenas pesadas tienen al menos una mutación presente en CDR3; en un caso, aproximadamente el 7 % de las cadenas pesadas tienen una mutación en CDR3.

También se describe una población de anticuerpos específicos del antígeno derivados de un ratón como el descrito en el presente documento, en la que los anticuerpos comprenden una cadena ligera derivada de un reordenamiento de Vκ3-20/Jκ1 humano y aproximadamente el 43 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en FW1, aproximadamente el 92 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en CDR1, aproximadamente el 46 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en FW2, aproximadamente el 84 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en CDR2, aproximadamente el 92 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en FW3, y aproximadamente el 7 % de las cadenas pesadas tienen una o más mutaciones presentes en CDR3.

También se hace referencia a un ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada, en el que la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada está presente en la línea germinal del ratón, en el que la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia variable humana. En un caso, la línea germinal del ratón comprende una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada que se deriva del mismo segmento V y el mismo segmento J que todas las secuencias de cadena ligera no sustitutas presentes en cada linfocito B del ratón que comprende una secuencia de cadena ligera reordenada.

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

En un caso, la línea germinal del ratón comprende no más de una, no más de dos, o no más de tres secuencias de cadenas ligeras (V/J) reordenadas.

En un caso, la secuencia V/J reordenada comprende una secuencia de cadena ligera κ. En un caso específico, la secuencia de cadena ligera κ es una secuencia de cadena ligera κ humana. En un caso específico, la secuencia de cadena ligera κ se selecciona de una secuencia de Vκ1-39/J humana, una secuencia de Vκ3-20/J humana y una combinación de las mismas. En un caso específico, la secuencia de cadena ligera κ es una secuencia de Vκ1-39/Jκ5 humana. En un caso específico, la secuencia de cadena ligera κ es una secuencia de Vκ3-20/Jκ1 humana.

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

El ratón empleado comprende uno o más segmentos de genes V_H de inmunoglobulina humana no reordenados, uno o más segmentos de genes D_H de inmunoglobulina humana no reordenado, y uno o más segmentos de genes J_H de inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. En una realización, el ratón comprende una pluralidad de segmentos de gen V_H, D_H y J_H humanos. En una realización específica, los segmentos de gen V_H, D_H y J_H humanos reemplazan segmentos de gen V_H, D_H y J_H de ratón endógenos en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno. En una realización específica, el ratón comprende un reemplazo de todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_H, D_H y J_H de ratón funcionales con todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_H, D_H y J_H humanos funcionales.

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

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

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

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

En un caso, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada de la línea germinal del ratón está en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno de ratón. En un caso específico, la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina reordenada en la línea germinal del ratón reemplaza todas o esencialmente todas las secuencias V y J de la cadena ligera del ratón en el locus de la cadena ligera de la inmunoglobulina endógeno del ratón.

También se hace referencia a un ratón que comprende una población de linfocitos B caracterizada por cada linfocito B que comprende una secuencia de cadena ligera no sustituta, secuencia que comprende un gen de cadena ligera reordenado que se genera a partir de un solo segmento de gen V humano y un solo segmento de gen J humano, en el que la única secuencia variable de cadena ligera de la línea germinal del ratón es una secuencia reordenada generada a partir del segmento V humano único y el segmento J humano único, y en el que cada linfocito B que comprende el gen de cadena ligera reordenado comprende además un gen que codifica un dominio variable de cadena pesada humano afín, y en el que el gen de cadena ligera reordenado comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro hipermutaciones somáticas.

También se hace referencia a un ratón cuya población de linfocitos B maduros se caracteriza porque cada linfocito B maduro comprende una secuencia de cadena ligera no sustituta en su superficie, secuencia que comprende un gen de cadena ligera reordenado que se genera a través del reordenamiento de uno de dos segmentos de gen V_L humano y uno de no más de cinco segmentos de gen J_L humano, en el que la única secuencia variable de cadena ligera (secuencia de V_LJ_L) en la línea germinal del ratón es una secuencia reordenada que se genera a través del reordenamiento de uno de los dos segmentos de gen V_L humano y uno de los no más de cinco segmentos de gen J_L humano, y en el que cada linfocito B que comprende el gen de la cadena ligera reordenada comprende además un gen que codifica un dominio variable de cadena pesada humano afín, y en el que el gen de la cadena ligera reordenada comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o cinco o más hipermutaciones somáticas. En algunos casos, un gen de cadena ligera reordenado comprende una, dos, tres, cuatro o cinco hipermutaciones somáticas. En algunas realizaciones, los ratones como se describen en el presente documento se han inmunizado con un antígeno de interés y, en algunos casos, una población de linfocitos B maduros se enriquece con linfocitos B que se unen al antígeno de interés.

En algunas realizaciones, el ratón empleado es aquel cuya población de linfocitos B maduros se caracteriza porque cada linfocito B maduro comprende una secuencia de cadena ligera no sustituta en su superficie, secuencia que comprende un gen de cadena ligera reordenado que se genera a través del reordenamiento de uno de dos segmentos de gen V_L humano y uno de 5 segmentos de gen J_L humano, en el que los segmentos de genes V_L consisten esencialmente en dos segmentos de genes V_L que no son idénticos, y el locus de V_L comprende 5 segmentos de genes J_L humanos, y en el que cada linfocito B que comprende el gen de la cadena ligera reordenado comprende además un gen que codifica un dominio variable de cadena pesada humano afín, y en el que el gen de cadena ligera reordenado comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o cinco o más hipermutaciones somáticas. En algunas realizaciones, un gen de cadena ligera reordenado comprende una, dos, tres, cuatro o cinco hipermutaciones somáticas. En algunas realizaciones, los ratones como se describen en el presente documento se han inmunizado con un antígeno de interés y, en algunas realizaciones, una población de linfocitos B maduros se enriquece con linfocitos B que se unen al antígeno de interés.

También se hace referencia a una célula pluripotente, pluripotente inducida o totipotente derivada de un ratón como el descrito en el presente documento. En un caso específico, la célula es una célula madre embrionaria (ES) de ratón.

En un caso, se divulga un tejido derivado de un ratón como el descrito en el presente documento. En un caso, el tejido se deriva de bazo, ganglio linfático o médula ósea de un ratón como el descrito en el presente documento.

También se hace referencia a un núcleo derivado de un ratón como el descrito en el presente documento. En un caso, el núcleo es de una célula diploide que no es un linfocito B.

También se hace referencia a una célula de ratón que está aislada de un ratón como el descrito en el presente documento. En un caso, la célula es una célula ES. En un caso, la célula es un linfocito. En un caso, el linfocito es un linfocito B. En un caso, el linfocito B expresa una cadena pesada quimérica que comprende un dominio variable derivado de un segmento de gen humano; y una cadena ligera derivada de una secuencia de Vκ1-39/J humana reordenada, una secuencia de Vκ3-20/J humana reordenada o una combinación de las mismas; en el que el dominio

variable de cadena pesada se fusiona con una región constante del ratón, y el dominio variable de cadena ligera se fusiona con una región constante de ratón o humana.

También se hace referencia a un hibridoma, en el que el hibridoma se fabrica con un linfocito B de un ratón como el descrito en el presente documento. En un caso específico, el linfocito B es de un ratón como el descrito en el presente documento que se ha inmunizado con un inmunógeno que comprende un epítopo de interés, y el linfocito B expresa una proteína de unión que se une al epítopo de interés, la proteína de unión tiene un dominio V_H humano mutado somáticamente y una C_H de ratón, y tiene un dominio V_L humano derivado de un Vκ1-39Jκ5 humano reordenado o un Vκ3-20Jκ1 humano reordenado y una C_L de ratón.

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

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

También se hace referencia a un vector de dirección según lo descrito anteriormente, pero en lugar del brazo de homología del ratón 5', el promotor humano o del ratón está flanqueado en 5' con un sitio de reconocimiento de recombinasa específico del sitio (SRRS), y en lugar del brazo de homología de ratón 3', la región de V_L humana está flanqueada en 3' con un SRRS.

También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso generado por un ratón como el descrito en el presente documento, en el que el anticuerpo quimérico inverso comprende una cadena ligera que comprende una V_L humana y una CL de ratón, y una cadena pesada que comprende una V_H humana y un C_H de ratón.

La presente invención proporciona un método para fabricar un anticuerpo que comprende:

(1) expresar en una célula individual:

(a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina, comprendiendo la primera secuencia de ácido nucleico una primera secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana, en la que la primera secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana se obtuvo a partir de un linfocito B de un ratón modificado genéticamente, en el que el ratón modificado genéticamente ha sido inmunizado con un primer antígeno de interés y el ratón modificado genéticamente comprende en su genoma de línea germinal:

(i) dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados y cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera, en el que los dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados son un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano, y en el que los cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados son un segmento de gen Jκ1 humano, un segmento de gen Jκ2 humano, un segmento de gen Jκ3 humano, un segmento de gen Jκ4 humano y un segmento de gen Jκ5 humano; y

(ii) uno o más segmentos de gen V_H humano no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H humano no reordenados y uno o más segmentos de gen J_H humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de ratón;

en el que los segmentos génicos de cadena pesada humana no reordenados y los segmentos génicos de cadena ligera kappa humana no reordenados del ratón modificado genéticamente son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana de un anticuerpo, respectivamente;
en el que el ratón modificado genéticamente no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que es capaz de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera; y
en el que la primera secuencia de región variable de cadena pesada humana codifica un primer dominio variable de cadena pesada humana que, con un dominio variable de cadena ligera kappa, reconoce el primer antígeno; y

(b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina,

comprendiendo la segunda secuencia de ácido nucleico una secuencia de región variable de cadena ligera kappa humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera humana, en la que la secuencia de región variable de cadena ligera kappa humana comprende: un segmento de gen Vκ1-39 humano, un segmento de gen Vκ3-20 humano, o una versión hipermutada somáticamente de los mismos;

(2) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar un anticuerpo totalmente humano; y

(3) aislar el anticuerpo

En un aspecto, se proporciona un método de generación de un anticuerpo, que comprende expresar, en una sola célula, (a) una primera secuencia del gen V_H de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia del gen C_H humano; (b) una secuencia del gen V_L de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia del gen C_L humano; y (c) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar un anticuerpo completamente humano y aislar el anticuerpo. En una realización, la célula comprende una segunda secuencia del gen V_H de un segundo ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia del gen C_H humano, la primera secuencia de gen V_H codifica un dominio V_H que reconoce un primer epítopo, y la segunda secuencia del gen V_H codifica un dominio V_H que reconoce un segundo epítopo, en el que el primer epítopo y el segundo epítopo no son idénticos.

En un aspecto, se proporciona un método de generación de un anticuerpo, que comprende exponer a un ratón como el descrito en el presente documento a un inmunógeno que comprende un epítopo de interés, Mantener el ratón en condiciones suficientes para que el ratón genere una molécula de inmunoglobulina que se una específicamente el epítopo de interés y aislar la molécula de inmunoglobulina que se une específicamente al epítopo de interés; en el que la proteína de unión al epítopo comprende una cadena pesada que comprende una V_H humana mutada somáticamente y una C_H de ratón, asociada con una cadena ligera que comprende una C_L de ratón y una V_L humana derivada de un Vκ1-39Jκ5 humano reordenado o un Vκ3-20Jκ1 humano reordenado.

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

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

En una realización, el segundo dominio V_H se une al segundo epítopo con una constante de disociación que es inferior a 10^{-6} M, inferior a 10^{-1} M, inferior a 10^{-8} M, inferior a 10^{-9} M, inferior a 10^{-10} M, Inferior a 10^{-11} M o inferior a 10^{-12} M.

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

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

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

También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso, que comprende una V_H humana y un dominio constante de cadena pesada de ratón, una V_L humana y un dominio constante de cadena ligera de ratón, en el que el anticuerpo se genera mediante un proceso que comprende inmunizar un ratón como el descrito en el presente documento con un inmunógeno comprende un epítopo, y el anticuerpo se une específicamente al epítopo del inmunógeno con el que se inmunizó el ratón. En un caso, el dominio V_L está mutado somáticamente. En un caso, el dominio V_H está mutado somáticamente. En un caso, tanto el dominio V_L como el dominio V_H están mutados somáticamente. En un caso, la V_L está vinculada a un dominio Cκ de ratón.

También se hace referencia a un ratón, que comprende segmentos de gen V_H humano que reemplazan todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_H del ratón en el locus de la cadena pesada de ratón endógeno; no más de una o dos secuencias V_L/J_L de cadena ligera humanas reordenadas seleccionadas entre una Vκ1-39/J reordenada y una Vκ3-20/J reordenada o una combinación de las mismas, que reemplaza todos los segmentos génicos de cadena ligera de ratón; en el que los segmentos génicos variables de cadena pesada humanos están unidos a un gen constante de ratón, y las secuencias de cadena ligera humanas reordenadas están vinculadas a un gen constante humano o de ratón.

También se hace referencia a un ratón que comprende segmentos de gen V_H de inmunoglobulina humano que reemplazan todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_H de inmunoglobulina de ratón en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno; no más de dos segmentos gen V_L de inmunoglobulina humanos no reordenados y dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) segmentos de gen J_L de inmunoglobulina humanos no reordenados o cinco segmentos de gen J_L de inmunoglobulina humanos, que reemplazan todos los segmentos génicos de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón; en el que los segmentos de gen V_H de inmunoglobulina humanos están unidos a un gen constante de inmunoglobulina de ratón, y los segmentos de gen V_L y J_L de inmunoglobulina humanos no reordenados están unidos a un gen constante de inmunoglobulina humano o no humano. En algunos casos, un gen constante no humano es un gen constante de inmunoglobulina de ratón. En algunas realizaciones, un gen constante de inmunoglobulina no humano es un gen constante de inmunoglobulina de rata.

También se hace referencia a una célula ES de ratón que comprende un reemplazo de todos o esencialmente todos los segmentos génicos variables de cadena pesada de ratón por segmentos génicos variables de cadena pesada humanos, y no más de una o dos secuencias de V_L/J_L de cadena ligera humanas reordenadas, en la que los segmentos génicos variables de cadena pesada humanos están unidos a un gen constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, y las secuencias V_L/J_L de cadena ligera humanas reordenadas están vinculadas a un gen constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón o humano. En un caso específico, el gen constante de cadena ligera es un gen constante de ratón.

También se hace referencia a una célula ES de ratón, que comprende un reemplazo de todos o esencialmente todos los segmentos génicos V_H de inmunoglobulina de ratón por segmentos génicos V_H de inmunoglobulina humanos, y dos segmentos génicos V_L de inmunoglobulina humanos no reordenados y 5 segmentos de gen J_H de inmunoglobulina humanos no reordenados, en la que los segmentos de gen V_H de inmunoglobulina humanos están unidos a un gen constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, y los segmentos de gen V_L y J_L de inmunoglobulina humanos no reordenados están unidos a un gen constante de cadena ligera de inmunoglobulina humano o no humano. En algunos ciertos casos, el gen constante de cadena ligera de inmunoglobulina no humano es un gen constante de inmunoglobulina de ratón. En algunos ciertos casos, el ratón comprende cinco segmentos de gen J_L de inmunoglobulina no reordenados.

También se hace referencia a un ratón que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que al menos uno de, y en algunas realizaciones todos, los segmentos de gen V_L de ratón están reemplazados por un segmento de gen V_L humano o no más de dos segmentos de gen V_L humanos. En algunos casos, los segmentos de gen V_L humanos de un ratón son capaces de reordenarse en uno de dos o más segmentos de gen J_L humanos para codificar un dominio V_L de inmunoglobulina de un anticuerpo. En algún caso, el/los segmento/s de gen V_L humano/s de un locus de cadena ligera de un ratón como el descrito en el presente documento está/n unido/s operativamente a dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) segmentos de gen J_L humanos.

También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene una secuencia de nucleótidos antes del reordenamiento que codifique un segmento de gen V_L endógeno. También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene una secuencia de nucleótidos antes del reordenamiento que codifique un segmento de gen J_L endógeno. También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene un nucleótido antes del reordenamiento que codifique los segmentos de gen V_L y J_L endógenos.

También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene una secuencia de nucleótidos después del reordenamiento que codifique un segmento de gen V_L endógeno. También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene una secuencia de nucleótidos después del reordenamiento que codifique un segmento de gen J_L endógeno. También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene un nucleótido después del reordenamiento que codifique los segmentos de gen V_L y J_L endógenos.

También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene más de dos segmentos de gen V_L humanos y dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) segmentos de gen J_L humanos antes del reordenamiento. También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que no contiene más de dos segmentos de gen V_L humanos y cinco segmentos de gen J_L humanos antes del reordenamiento.

También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que contiene dos segmentos de gen V_L humanos y cinco segmentos de gen J_L humanos después del reordenamiento. También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que contiene dos segmentos de gen V_L humanos y cinco segmentos de gen J_L humanos después del reordenamiento.

También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que contiene un segmento de gen V_L humano y cinco o menos (por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1) segmentos de gen J_L humanos después del reordenamiento. También se hace referencia a un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que contiene un segmento de gen V_L humano y uno, dos, tres, cuatro o cinco segmentos de gen J_L humanos después del reordenamiento.

En diversas realizaciones, los segmentos de gen V_L y J_L son segmentos de gen V_κ y J_κ humanos. los segmentos de V_κ humanos se seleccionan de un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano. Los segmentos de gen J_κ humanos son Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4 y Jκ5 humanos.

También se hace referencia a un ratón que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es diferente de la estructura de referencia de la FIG. 19 en que contiene una estructura que es esencialmente la misma que la estructura de la FIG. 1, la FIG. 2, la FIG. 3 o la FIG. 9 antes del reordenamiento. En algunas realizaciones, se proporciona un ratón, que comprende un locus de cadena ligera cuya estructura es idéntica a la estructura de la FIG. 1, la FIG. 2, la FIG. 3 o la FIG. 9 antes del reordenamiento.

También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno generada por un ratón como el descrito en el presente documento. En un caso específico, la proteína de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de ratón, y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana derivada de un segmento de gen Vκ1-39 o un segmento de gen Vκ3-20, en la que la región constante de cadena ligera es una región constante de ratón.

También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno completamente humana generada a partir de una secuencia génica de región variable de inmunoglobulina de un ratón como el descrito en el presente documento, en la que la proteína de unión al antígeno comprende una cadena pesada completamente humana que comprende una región variable humana derivada de una secuencia de un ratón como el descrito en el presente documento, y una cadena ligera completamente humana que comprende un Vκ1-39 o un VK3-20. En un caso, la región variable de cadena ligera comprende de una a cinco mutaciones somáticas. En un caso, la región variable de cadena ligera es una región variable de cadena ligera afín que está emparejada en un linfocito B del ratón con la región variable de cadena pesada.

En un caso, la proteína de unión al antígeno completamente humana comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, en la que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada comprenden regiones variables no idénticas derivadas independientemente de un ratón como el descrito en el presente documento, y en la que cada una de la primera y la segunda cadena pesada se expresan desde una célula hospedadora asociada con una cadena ligera humana derivada de un segmento de gen Vκ1-39 o un segmento de gen Vκ3-20. En un caso, la primera cadena pesada comprende una primera región variable de cadena pesada que se une específicamente a un primer epítopo de un primer antígeno, y la segunda cadena pesada comprende una segunda región variable de cadena pesada que se une específicamente a un segundo epítopo de un segundo antígeno. En un caso específico, el primer antígeno y el segundo antígeno son diferentes. En un caso específico, el primer antígeno y el segundo antígeno son iguales, y el primer epítopo y el segundo epítopo no son idénticos; en una realización específica, la unión del primer epítopo por una primera molécula de la proteína de unión no bloquea la unión del segundo epítopo por una segunda molécula de la proteína de unión.

También se hace referencia a una proteína de unión completamente humana derivada de una secuencia de inmunoglobulina humana de un ratón como el descrito en el presente documento que comprende una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina, en la que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una primera región variable que no es idéntica a una región variable de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, y en la que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un determinante de unión a la proteína A de tipo silvestre, y la segunda cadena pesada carece de un determinante de unión a la proteína A de tipo silvestre. En un caso, la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a la proteína A en condiciones de aislamiento, y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina no se une a la proteína A o se une a la proteína A de manera al menos 10 veces, cien veces o mil veces más débil de lo que la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a la proteína A en condiciones de aislamiento. En un caso específico, la primera y la segunda cadena pesada son isotipos lgG1, en el que la segunda cadena pesada comprende una modificación seleccionada entre 95R (EU 435R), 96F (EU 436F), y una combinación de las mismas, y en el que la primera cadena pesada carece de dicha modificación.

En un aspecto, se proporciona un método de generación de una proteína de unión al antígeno biespecífica, que comprende exponer un primer ratón como el descrito en el presente documento a un primer antígeno de interés que comprende un primer epítopo, exponer un segundo ratón como el descrito en el presente documento a un segundo antígeno de interés que comprende un segundo epítopo, dejar que el primer y el segundo ratón generen cada uno una respuesta inmunitaria hacia los antígenos de interés, identificar en el primer ratón una primera región variable de cadena pesada humana que se una al primer epítopo del primer antígeno de interés, identificar en el segundo ratón una segunda región variable de cadena pesada humana que se una al segundo epítopo del segundo antígeno de interés, formar un primer gen de cadena pesada completamente humano que codifique una primera cadena pesada que se una al primer epítopo del primer antígeno de interés, formar una segundo gen de cadena pesada completamente humano que codifique una segunda cadena pesada que se una al segundo epítopo del segundo antígeno de interés, expresar la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada en una célula que exprese una única cadena ligera completamente humana derivada de un segmento de gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano para formar una proteína de unión al antígeno biespecífica, y aislar la proteína de unión al antígeno biespecífica.

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

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

En una realización, la cadena ligera humana, cuando se empareja con la primera cadena pesada, se une específicamente al primer epítopo del primer antígeno, y cuando se empareja con la segunda cadena pesada, se une específicamente al segundo epítopo del segundo antígeno.

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

En una realización, el dominio variable de cadena ligera de la cadena ligera comprende de 2 a 5 mutaciones somáticas. En una realización, el dominio variable de cadena ligera es una cadena ligera afín mutada somáticamente expresada en un linfocito B del primer o segundo ratón inmunizado con el primer o el segundo dominio variable de cadena pesada. En una realización, la cadena ligera de la célula comprende una secuencia de la línea germinal.

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

En un aspecto, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un primer y a un segundo antígeno, en el que el método comprende (a) identificar una primera secuencia de ácido nucleico que codifique un primer dominio variable (V_H) de cadena pesada humana que sea específico del primer antígeno; (b) identificar una segunda secuencia de ácido nucleico que codifique un segundo dominio variable de cadena pesada (V_H) humana que sea específico del segundo antígeno; (c) proporcionar una tercera secuencia de ácido nucleico que codifique una región variable (V_L) de cadena ligera humana que, cuando se empareje con la región V_H de (a) se una específicamente al primer antígeno, y cuando se empareje con la región V_H de (b) se una específicamente al segundo antígeno; (d) cultivar una célula hospedadora que comprenda la primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico para permitir la expresión de la primera y segunda regiones V_H humanas y la región V_L humana para formar el anticuerpo biespecífico; y (d) recuperar dicho anticuerpo biespecífico. En diversos aspectos, el primer y el segundo antígeno son diferentes entre sí. En diversos aspectos, la primera y la segunda

secuencia de ácido nucleico se aíslan de un ratón inmunizado que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada, en el que la secuencia de inmunoglobulina reordenada está en la línea germinal del ratón.

En una realización, la región V_L humana se deriva de una secuencia de cadena ligera humana reordenada que comprende un segmento del gen Vκ1-39 humano o un segmento del gen Vκ3-20 humano. En una realización específica, la secuencia de la cadena ligera humana reordenada es una secuencia de la línea germinal (es decir, no comprende una hipermutación somática dentro de la secuencia del segmento del gen V).

En una realización, la tercera secuencia de ácido nucleico se aísla de un ratón que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada de la línea germinal del ratón. En una realización, la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina reordenada comprende un segmento de gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano. En una realización específica, la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada comprende un segmento del gen Vκ1-39 humano. En una realización, la región V_L de inmunoglobulina humana se expresa desde un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno modificado.

En una realización, el primer y el segundo antígeno están presentes en una molécula. En una realización, el primer y el segundo antígeno están presentes en diferentes moléculas. En diversas realizaciones, la primera o segunda secuencia de ácido nucleico comprende una modificación que reduce la afinidad de la cadena pesada codificada hacia la proteína A.

En una realización, la primera o la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de región variable de cadena pesada humana reordenada que comprende un segmento génico de cadena pesada humano seleccionado de V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-72, V_H3-73, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H5-51 y V_H6-1. En una realización específica, el segmento génico de cadena pesada es V_H2-5, V_H3-23 o V_H3-30.

En un aspecto, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un primer y a un segundo antígeno, en el que el método comprende (a) identificar una primera secuencia de ácido nucleico que codifique un primer dominio variable (V_H) de cadena pesada humana que sea específico del primer antígeno; (b) identificar una segunda secuencia de ácido nucleico que codifique un segundo dominio variable de cadena pesada (V_H) humana que sea específico del segundo antígeno; (c) proporcionar una tercera secuencia de ácido nucleico que codifique una región variable de cadena ligera (V_L) humana derivada de un segmento génico Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano que, cuando se empareje con la región V_H de (a) se una específicamente al primer antígeno, y cuando se empareje con la región V_H de (b) se una específicamente al segundo antígeno; (d) cultivar una célula hospedadora que comprenda la primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico para permitir la expresión de la primera y segunda regiones V_H humanas y la región V_L humana para formar el anticuerpo biespecífico; y (d) recuperar dicho anticuerpo biespecífico. En diversos aspectos, el primer y el segundo antígeno son diferentes entre sí. En diversos aspectos, la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico se aíslan de un ratón inmunizado que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana de una secuencia de inmunoglobulina reordenada que se deriva de un segmento de gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano, en los que el segmento de gen Vκ1-39 o Vκ3-30 humano reordenado está en la línea germinal del ratón.

En una realización, la tercera secuencia de ácido nucleico es una secuencia de la línea germinal (es decir, no comprende una hipermutación somática dentro de la secuencia del segmento de gen V). En una realización, la tercera secuencia de ácido nucleico se aísla del ratón que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana derivada de un segmento del gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada de la línea germinal del ratón. En una realización específica, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende de dos a cinco hipermutaciones somáticas en una región determinante de la complementariedad (CDR) y/o una región marco conservada (FWR). En una realización, la región V_L de inmunoglobulina humana se expresa desde un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno modificado.

En una realización, el primer y el segundo antígeno están presentes en una molécula. En una realización, el primer y el segundo antígeno están presentes en diferentes moléculas. En una realización, la primera o segunda secuencia de ácido nucleico comprende una modificación que reduce la afinidad de la cadena pesada codificada hacia la proteína A.

En una realización, la primera o la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de región variable de cadena pesada humana reordenada que comprende un segmento génico de cadena pesada humano seleccionado de V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-72, V_H3-73, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H5-51 y V_H6-1. En una realización específica, el segmento génico de cadena pesada es V_H2-5, V_H3-23 o V_H3-30.

En un aspecto, se proporciona un método de generación de un anticuerpo biespecífico, que comprende exponer un

ratón como el descrito en el presente documento a un antígeno de interés, dejar que el ratón genere una respuesta inmunitaria hacia el antígeno de interés, identificar una primera región variable de cadena pesada humana que se una a un primer epítopo del antígeno de interés, identificar una segunda región variable de cadena pesada humana que se una a un segundo epítopo del antígeno de interés, formar un primer gen de cadena pesada completamente humano que codifique la primera cadena pesada que se una al primer epítopo del antígeno de interés, formar una segundo gen de cadena pesada completamente humano que codifique una segunda cadena pesada que se una al epítopo del segundo antígeno de interés, expresar la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada en una célula que exprese una única cadena ligera completamente humana derivada de un segmento de gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano para formar un anticuerpo biespecífico, y aislar la proteína de unión al antígeno biespecífica.

En una realización, el primer epítopo y el segundo epítopo no son idénticos. En una realización, la unión de la primera región variable de cadena pesada al primer epítopo no bloquea la unión de la segunda región variable de cadena pesada al segundo epítopo. En una realización, la primera y segunda cadena pesada son capaces de unirse al primer y al segundo epítopo simultáneamente.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se une al primer y al segundo epítopo simultáneamente. En una realización, el anticuerpo biespecífico se une al primer epítopo y al segundo epítopo independientemente.

En una realización, la respuesta de unión del anticuerpo biespecífico al antígeno es aproximadamente 2 veces más alta que la respuesta de unión de la primera región variable de cadena pesada al antígeno. En una realización, la respuesta de unión del anticuerpo biespecífico al antígeno es aproximadamente 2 veces más alta que la respuesta de unión de la segunda región variable de cadena pesada al antígeno. En una realización, la respuesta de unión del anticuerpo biespecífico al antígeno es aproximadamente la misma que, o aproximadamente igual a, la respuesta de unión de la primera región variable de cadena pesada y/o la segunda región variable de cadena pesada al antígeno.

En una realización, el antígeno se selecciona de un antígeno soluble, un antígeno de superficie celular (por ejemplo, un antígeno tumoral) y un receptor de superficie celular. En una realización específica, el receptor de superficie celular es un receptor de inmunoglobulina. En una realización específica, el receptor de inmunoglobulina es un receptor Fc.

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

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

En diversas realizaciones, los métodos de generación de anticuerpos biespecíficos se mejoran empleando una cadena ligera común para emparejarse con cada región variable de cadena pesada de los anticuerpos biespecíficos. En diversas realizaciones, el empleo de una cadena ligera común como la descrita en el presente documento reduce el número de especies inapropiadas de inmunoglobulinas que carecen de biespecificidad en comparación con el empleo de cadenas ligeras afines originales. En diversas realizaciones, las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos biespecíficos se identifican a partir de anticuerpos monoespecíficos que comprenden una cadena ligera común. En diversas realizaciones, las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos biespecíficos comprenden segmentos de genes variables de cadena pesada humanos que se reordenan *in vivo* dentro de linfocitos B de ratón que se han diseñado previamente para expresar un repertorio limitado de cadenas ligeras humanas, o una sola cadena ligera humana, afín a cadenas pesadas humanas y, en respuesta a la exposición con un antígeno de interés, genera un repertorio de anticuerpos quiméricos que contiene una pluralidad de regiones variables de cadena pesada humanas que son afines a una o una de las dos posibles regiones variables de cadena ligera humanas, de modo que los anticuerpos quiméricos son específicos del antígeno de interés.

En diversos aspectos, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo biespecífico, anticuerpo biespecífico que comprende 1) un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el primer y el segundo polipéptido incluye cada uno un dominio de multimerización (por ejemplo, un dominio Fc de inmunoglobulina) que permite que el primer y el segundo polipéptido formen un dímero, y los dominios de multimerización potencian una interacción estable entre el primer y el segundo polipéptido, y en el que uno de los dominios de multimerización porta una modificación de aminoácidos que reduce su afinidad hacia la proteína A y el otro dominio de multimerización carece de la modificación; 2) un dominio de unión en cada uno del primer y el segundo polipéptido, comprendiendo cada dominio de unión una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, en el que la cadena ligera variable del primer polipéptido y la cadena ligera variable del segundo polipéptido tienen una secuencia de aminoácidos común, cuya secuencia común tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con una cadena ligera original de cada uno de los polipéptidos de al menos el 80 %, de al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente, al menos en el 95 % y lo más preferentemente, al menos el 100 % de identidad de secuencia. En diversas realizaciones, la cadena ligera variable se deriva de un segmento de gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano. En diversas realizaciones, la cadena ligera variable es una secuencia de cadena ligera humana reordenada. En diversas realizaciones, la cadena ligera variable se aísla de un ratón como el descrito en el presente documento.

En diversas realizaciones, el método comprende las etapas de (i) cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el primer polipéptido, el segundo polipéptido y la cadena ligera común, en el que se expresa el ácido nucleico; e (ii) recuperar el anticuerpo biespecífico del cultivo de la célula hospedadora; en una realización, el ácido nucleico que codifica el primer polipéptido o el ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido, porta una modificación de aminoácido que reduce su afinidad hacia la proteína A. En una realización, el ácido nucleico que codifica el primer polipéptido, el segundo polipéptido, y la cadena ligera común está presente en un solo vector o en vectores separados. En una realización, la célula hospedadora se usa para producir un anticuerpo biespecífico de acuerdo con el párrafo anterior.

En un aspecto, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo biespecífico, que comprende (a) seleccionar un primer ácido nucleico que codifica una primera región variable de cadena pesada humana aislada de un ratón como el descrito en el presente documento; (b) seleccionar un segundo ácido nucleico que codifica una segunda región variable de cadena pesada humana aislada del mismo ratón o de un ratón separado como se describe en el presente documento; (c) proporcionar un tercer ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera humana aislada de un ratón como el descrito en el presente documento o derivada de una región variable de cadena ligera humana reordenada como se describe en el presente documento; (c) introducir, en una célula hospedadora, el primer, segundo y tercer ácido nucleico, y cultivar la célula hospedadora de modo que se produzca la expresión del primer, segundo y tercer ácido nucleico; y (d) recuperar el anticuerpo biespecífico formado a partir del cultivo celular.

En una realización, la primera y la segunda región variable de cadena pesada humana están mutadas somáticamente. En una realización específica, la primera y segunda región variable de cadena pesada humana se derivan independientemente de un segmento de gen V_H humano reordenado seleccionado entre un segmento de gen V_H humano 1-2, 1-3, 1-8, 1-18, 1-24, 1-46, 1-58, 1-69, 2-5, 2-26, 2-70, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-16, 3-20, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33, 3-43, 3-48, 3-53, 3-64, 3-72, 3-73, 4-31, 4-34, 4-39, 4-59, 5-51 y 6-1. En una realización, la primera y la segunda región variable de cadena pesada humana se derivan independientemente de un segmento de gen V_H humano reordenado seleccionado de 2-5, 3-30 y 3-23. En una realización, la primera región variable de cadena pesada humana se deriva de un segmento de gen V_H2-5 humano y la segunda región variable de cadena pesada humana se deriva de un segmento de gen V_H3-30 humano. En una realización, la primera región variable de cadena pesada humana se deriva de un segmento de gen V_H3-30 humano y la segunda región variable de cadena pesada humana se deriva de un segmento de gen V_H3-23 humano. En una realización, la primera región variable de cadena pesada humana se deriva de un segmento de gen V_H3-23 humano y la segunda región variable de cadena pesada humana se deriva de un segmento de gen V_H3-30 humano.

En una realización, el primer o el segundo ácido nucleico se modifica antes de la etapa (c), en la que el primer o segundo ácido nucleico se modifica de manera que tenga una afinidad reducida hacia la proteína A.

En una realización, el tercer ácido nucleico se aísla de un ratón como el descrito en el presente documento. En una realización, el tercer ácido nucleico comprende de 2 a 5 mutaciones somáticas. En una realización, el tercer ácido nucleico codifica una región variable de cadena ligera humana derivada de un segmento de gen Vκ1-39 humano. En una realización, el tercer ácido nucleico codifica una región variable de cadena ligera humana derivada de un segmento de gen Vκ3-20 humano.

En una realización, el tercer ácido nucleico se deriva de una región variable de cadena ligera humana reordenada. En una realización, la región variable de cadena ligera humana reordenada comprende una secuencia derivada de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano. En una realización, la región variable de cadena ligera humana reordenada comprende una secuencia de Vκ1-39 humana de la línea germinal (es decir, no comprende una hipermutación somática dentro de la secuencia del segmento del gen V). En una realización, la región variable de cadena ligera humana reordenada comprende una secuencia de Vκ3-20 humana de la línea germinal.

En diversas realizaciones, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo biespecífico que incorpora una primera cadena pesada humana que comprende un dominio variable derivado de un ratón modificado que carece de una secuencia de cadena ligera humana reordenada en su línea germinal, en el que la primera cadena pesada humana está emparejada con una cadena ligera humana afín que comprende una región variable de cadena ligera humana reordenada derivada de un segmento de gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano. En diversas realizaciones, una segunda cadena pesada humana con una especificidad diferente de la primera cadena pesada humana se identifica a partir de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento. Los ácidos nucleicos que codifican las dos cadenas pesadas y la cadena ligera común se introducen en una célula hospedadora como se describe en los párrafos precedentes, de modo que se produce la expresión de las tres cadenas y el anticuerpo biespecífico se recupera del cultivo celular.

En una realización, el ratón se inmuniza con el mismo antígeno usado para generar el primer dominio variable de cadena pesada humano. En una realización, el ratón se inmuniza con un antígeno diferente usado para generar el primer dominio variable de cadena pesada humano.

En un aspecto, se proporciona un método de selección de cadenas pesadas humanas que pueden emparejarse con

una sola cadena ligera humana para producir un anticuerpo biespecífico, Incluyendo los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo biespecífico y una célula hospedadora que comprende los ácidos nucleicos.

En un aspecto, se proporciona un método para aumentar la cantidad de un anticuerpo biespecífico deseado en un cultivo celular frente a productos no deseados, tales como anticuerpos monoespecíficos, en el que una de las cadenas pesadas del anticuerpo biespecífico se modifica para reducir su afinidad hacia la proteína A.

También se hace referencia a una célula hospedadora aislada, de modo que la célula hospedadora comprende (a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una primera región variable de cadena pesada humana que se une a un primer antígeno, en la que la primera secuencia de ácido nucleico se aísla de un ratón inmunizado con el primer antígeno que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana a partir de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada de la línea germinal del ratón; (b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda región variable de cadena pesada humana que se une a un segundo antígeno, en la que la segunda secuencia de ácido nucleico se aísla de un ratón inmunizado con el segundo antígeno que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada de la línea germinal del ratón; (c) una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera humana que, cuando se empareja con la región variable de cadena pesada de (a) se une específicamente al primer antígeno, y cuando se empareja con la región variable de cadena pesada de (b) se una específicamente al segundo antígeno.

En diversos aspectos, el primer y el segundo antígeno son diferentes entre sí. En diversos aspectos, la expresión de la primera, la segunda y la tercera secuencia de ácido nucleico conduce a la formación de un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al primer y al segundo antígeno.

En una realización, la región V_L humana se deriva de una secuencia de cadena ligera humana reordenada que comprende un segmento del gen Vκ1-39 humano o un segmento del gen Vκ3-20 humano. En una realización específica, la secuencia de cadena ligera humana reordenada es una secuencia de la línea germinal (es decir, no comprende una hipermutación somática dentro del dominio variable). En una realización, la tercera secuencia de ácido nucleico se aísla de un ratón que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana a partir de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada, en el que la secuencia de cadena ligera humana reordenada está presente en la línea germinal del ratón. En una realización, la secuencia de la cadena ligera de inmunoglobulina reordenada comprende un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano. En una realización específica, el segmento de gen Vκ1-39 humano o el segmento de gen Vκ3-20 humano comprende al menos una hipermutación somática en una región determinante de la complementaria (CDR) o región marco conservada (FWR). En una realización específica, la primera, segunda y tercera secuencias de ácido nucleico se aíslan de un ratón que expresa una región V_L de inmunoglobulina humana derivada de un segmento de gen Vκ1-39 humano o Vκ3-20 humano de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada, en el que la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada está presente en la línea germinal del ratón.

En diversas realizaciones, el ratón no contiene un segmento génico de la región variable de cadena ligera endógeno que sea capaz de reordenarse para formar una cadena ligera de inmunoglobulina.

En una realización, la región V_L de inmunoglobulina humana se expresa desde un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno modificado. En una realización, el primer y el segundo antígeno están presentes en una molécula. En una realización, el primer y el segundo antígeno están presentes en diferentes moléculas. En una realización, la primera o segunda secuencia de ácido nucleico comprende una modificación que reduce la afinidad de la cadena pesada codificada hacia la proteína A.

En una realización, la primera o la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de región variable de cadena pesada humana reordenada que comprende un segmento génico de cadena pesada humano seleccionado de V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-72, V_H3-73, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H5-51 y V_H6-1. En una realización específica, el segmento génico de cadena pesada es V_H2-5, V_H3-23 o V_H3-30.

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

En un aspecto, un ratón, un embrión o una célula modificados genéticamente descritos en el presente documento comprenden un locus de cadena ligera κ que conserva elementos reguladores o de control endógenos, por ejemplo, un potenciador intrónico κ de ratón, un potenciador 3' κ de ratón, o tanto un potenciador intrónico como un potenciador 3', en el que los elementos reguladores o de control facilitan la mutación somática y la maduración por afinidad de una secuencia expresada del locus de cadena ligera κ.

También se hace referencia a un ratón que comprende una población de linfocitos B caracterizada por tener cadenas

ligeras de inmunoglobulina derivadas de no más de uno, o no más de dos, segmentos de genes V y J de cadena ligera de inmunoglobulina reordenados o no reordenados, de modo que el ratón presenta una proporción de la cadena ligera κ:λ que es aproximadamente igual a la de un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de los segmentos de genes V y J de cadena ligera de inmunoglobulina.

En un caso, las cadenas ligeras de inmunoglobulina se derivan de no más de uno, o no más de dos, segmentos de genes V y J de cadena ligera de inmunoglobulina reordenados. En un caso específico, las cadenas ligeras se derivan de no más de un segmento de gen V y J de cadena ligera de inmunoglobulina reordenado. En un caso, las cadenas ligeras de inmunoglobulina se generan a partir de uno de los dos segmentos de gen V_L de inmunoglobulina no reordenados y uno de 1, 2, 3, 4 o 5 segmentos de gen J_L de inmunoglobulina. En un caso, las cadenas ligeras de inmunoglobulina se generan a partir de uno de los dos segmentos de gen V_L de inmunoglobulina no reordenados y un segmento de gen J_L de inmunoglobulina.

También se hace referencia a un ratón como el descrito en el presente documento que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina derivada de no más de una, o no más de dos, secuencias de Vκ/Jκ humanas, de modo que el ratón comprende un reemplazo de todos o esencialmente todos los segmentos de genes de región variable de cadena pesada de ratón endógenos con uno o más segmentos de genes de región variable de cadena pesada humanos, y el ratón muestra una proporción de los (a) linfocitos B $CD19^+$ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ, con respecto a (b) los linfocitos B $CD19^+$ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.

En un caso, el ratón expresa una sola cadena ligera κ derivada de una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana, y la proporción de linfocitos B $CD19^+$ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ con respecto a los linfocitos B $CD19^+$ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20; en un caso, la proporción es de aproximadamente 1 a al menos aproximadamente 66; en una realización específica, la proporción es de aproximadamente 1 a 66.

También se hace referencia a un ratón que expresa una sola cadena ligera κ derivada de una secuencia de Vκ3-20Jκ5 humana, y la proporción de linfocitos B $CD19^+$ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ con respecto a los linfocitos B $CD19^+$ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20; en un caso, la proporción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 21. En realizaciones específicas, la proporción es de 1 a 20 o de 1 a 21.

También se hace referencia a un ratón que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina cuya secuencia es idéntica a la obtenida mediante el reordenamiento de uno de los dos segmentos del gen Vκ humano con 1, 2, 3, 4 o 5 segmentos del gen Jκ humano.

En algunas realizaciones, el ratón proporcionado expresa una cadena ligera de inmunoglobulina generada a partir de un reordenamiento de dos segmentos de gen Vκ humano y 5 segmentos de gen Jκ humano, de modo que el ratón comprende un reemplazo de todos o esencialmente todos los segmentos de gen V_H de inmunoglobulina endógenos con uno o más segmentos de gen V_H, uno o más segmentos de gen D_H y uno o más segmentos de gen J_H de inmunoglobulina humanos, y el ratón muestra una proporción de (a) los linfocitos B de la médula ósea que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ, con respecto a (b) los linfocitos B de médula ósea que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15. En algunas realizaciones, el reordenamiento incluye un segmento de gen Vκ1-39 humano. En algunas realizaciones, el reordenamiento incluye un segmento de gen Vκ3-20 humano. En algunas realizaciones, el reemplazo de los segmentos de gen V_H de inmunoglobulina endógenos es en un locus de V_H de inmunoglobulina endógeno. En algunas realizaciones, los dos segmentos de gen Vκ humano están en un locus Vκ de inmunoglobulina endógeno y, en algunas realizaciones, los dos segmentos de gen Vκ humanos reemplazan todos o esencialmente todos los segmentos del gen Vκ de inmunoglobulina del ratón. En algunas realizaciones, los dos segmentos de gen Vκ humanos están en un locus Vκ de inmunoglobulina endógeno y, en algunas realizaciones, los dos segmentos de gen Vκ humano reemplazan todos o esencialmente todos los segmentos de los genes Vκ y Jκ de inmunoglobulina de ratón. Los dos segmentos de gen Vκ humanos están unidos operativamente a 5 segmentos de gen Jκ humano.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención expresa una cadena ligera generada a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano, y 5 segmentos del gen Jκ humano, y la proporción de los linfocitos B inmaduros d la médula ósea que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ con respecto a los linfocitos B inmaduros que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ es de aproximadamente 1 a aproximadamente 13.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención expresa una cadena ligera generada a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano y 5 segmentos del gen Jκ humano, y la proporción de linfocitos B maduros de médula ósea que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ con respecto a los linfocitos B inmaduros que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ es de aproximadamente 1 a aproximadamente 7.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención expresa una cadena ligera generada a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano y 5 segmentos de gen Jκ humano, y tiene una población de linfocitos pro-B de médula ósea dentro del intervalo de aproximadamente 2,5 x 10^4 a aproximadamente 1,5 x 10^5 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 2,5 x 10^4, 3,0 x 10^4, 3,5 x 10^4, 4,0 x 10^4, 4,5 x 10^4, 5,0 x 10^4, 5,5 x 10^4, 6,0 x 10^4, 6,5 x 10^4, 7,0 x 10^4, 7,5 x 10^4, 8,0 x 10^4, 8,5 x 10^4, 9,0 x 10^4, 9,5 x 10^4, 1,0 x 10^5, o 1,5 x 10^5 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos pro-B de la médula ósea de aproximadamente 2,88 x 10^4 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos pro-B de la médula ósea de aproximadamente 6,42 x 10^4 células; en algunas realizaciones, un ratón de la presente invención comprende una población de linfocitos pro-B de la médula ósea de aproximadamente 9,16 x 10^4 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos pro-B de la médula ósea de aproximadamente 1,19 x 10^5 células. Los linfocitos pro-B ilustrativos de médula ósea de ratones modificados genéticamente como se describe en el presente documento se caracterizan por la expresión de CD19, CD43, c-kit y/o una combinación de las mismas (por ejemplo, $CD19^+$, $CD43^+$, $c\text{-}kit^+$).

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención expresa una cadena ligera generada a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano y 5 segmentos de gen $J_κ$ humano, y tiene una población de linfocitos pre-B de médula ósea dentro del intervalo de aproximadamente 1 x 10° a aproximadamente 2x10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 1,0 x 10^6, 1,1 x 10^6, 1,2 x 10^6, 1,3 x 10^6, 1,4 x 10^6, 1,5 x 10^6, 1,6 x 10^6, 1,7 x 10^6, 1,8 x 10^6, 1,9 x 10^6, o 2,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos pre-B de la médula ósea de aproximadamente 1,25 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos pre-B de la médula ósea de aproximadamente 1,46 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos pre-B de la médula ósea de aproximadamente 1,64 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos pre-B de la médula ósea de aproximadamente 2,03 x 10^6 células. Los linfocitos pre-B ilustrativos de médula ósea de ratones modificados genéticamente como se describe en el presente documento se caracterizan por la expresión de CD19, CD43, c-kit y/o una combinación de las mismas (por ejemplo, $CD19^+$, $CD43^-$, $c\text{-}kit^-$).

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención expresa una cadena ligera generada a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano y 5 segmentos de gen Jκ humano, y tiene una población de linfocitos B inmaduros de médula ósea dentro del intervalo de aproximadamente 5 x 10^5 a aproximadamente 7 x 10^5 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 5,0 x 10^5, 5,1 x 10^5, 5,2 x 10^5, 5,3 x 10^5, 5,4 x 10^5, 5,5 x 10^5, 5,6 x 10^5, 5,7 x 10^5, 5,8 x 10^5, 5,9 x 10^5, 6,0 x 10^5, 6,1 x 10^5, 6,2 x 10^5, 6,3 x 10^5, 6,4 x 10^5, 6,5 x 10^5, 6,6 x 10^5, 6,7 x 10^5, 6,8 x 10^5, 6,9 x 10^5, o 7,0 x 10^5 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B inmaduros de la médula ósea de aproximadamente 5,80 x 10^5 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B inmaduros de la médula ósea de aproximadamente 5,92 x 10^5 células; en algunas realizaciones, el ratón de la presente invención comprende una población de linfocitos B inmaduros de la médula ósea de aproximadamente 6,67 x 10^5 células. Los linfocitos B inmaduros ilustrativos de médula ósea de ratones modificados genéticamente como se describe en el presente documento se caracterizan por la expresión de IgM, B220 y/o una combinación de las mismas (por ejemplo, IgM^+, $B220^{int}$).

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención expresa una cadena ligera generada a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano y uno de 5 segmentos de gen Jκ humano, y tiene una población de linfocitos B maduros de médula ósea dentro del intervalo de aproximadamente 3 x 10^4 a aproximadamente 1,5 x 10^5 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 3,0 x 10^4, 3,5 x 10^4, 4,0 x 10^4, 4,5 x 10^4, 5,0 x 10^4, 5,5 x 10^4, 6,0 x 10^4, 6,5 x 10^4, 7,0 x 10^4, 7,5 x 10^4, 8,0 x 10^4, 8,5 x 10^4, 9,0 x 10^4, 9,5 x 10^4, 1,0 x 10^5, o 1,5 x 10^5 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B maduros de la médula ósea de aproximadamente 3,11 x 10^4 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B maduros de la médula ósea de aproximadamente 1,09 x 10^5 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B maduros de la médula ósea de aproximadamente 1,16 x 10^5 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B maduros de la médula ósea de aproximadamente 1,44 x 10^5 células. Los linfocitos B maduros ilustrativos de la médula ósea de los ratones modificados genéticamente según lo descrito en el presente documento se caracterizan por la expresión de IgM, B220 y/o una combinación de las mismas (por ejemplo, IgM^+, $B220^{hi}$).

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención expresa una cadena ligera generada a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 humano o un segmento de gen Vκ3-20 humano y 5 segmentos de gen Jκ humano, y tiene una población de linfocitos B totales de médula ósea dentro del intervalo de aproximadamente 1 x 10^6 a aproximadamente 3 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 1,0 x 10^6, 1,1 x 10^6, 1,2 x 10^6, 1,3 x 10^6, 1,4 x 10^6, 1,5 x 10^6, 1,6 x 10^6, 1,7 x 10^6, 1,8 x 10^6, 1,9 x 10^1, 2,0 x 10^6, 2,1 x 10^1, 2,2 x 10^6, 2,3 x 10^6, 2,4 x 10^6, 2,5 x 10^6, 2,6 x 10^6, 2,7 x 10^6, 2,8 x 10^6, 2,9 x 10^6 o 2,0 x 10° células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos totales de la médula

ósea de aproximadamente 1,59 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B totales de la médula ósea de aproximadamente 1,75 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B totales de la médula ósea de aproximadamente 2,13 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos totales de la médula ósea de aproximadamente 2,55 x 10^6 células. Los linfocitos B totales ilustrativos de médula ósea de ratones modificados genéticamente como se describe en el presente documento se caracterizan por la expresión de CD19, CD20 y/o una combinación de las mismas (por ejemplo, $CD19^+$).

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que expresa una sola cadena ligera κ reordenada, de modo que el ratón comprende un locus funcional de cadena ligera λ, y el ratón expresa una población de linfocitos B que comprende linfocitos $Ig\kappa^+$ que expresan una cadena κ ligera derivada de la misma cadena κ ligera reordenada única. En un caso, el porcentaje de linfocitos B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ del ratón es aproximadamente el mismo que en un ratón de tipo silvestre. En un caso específico, el porcentaje de linfocitos B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ en el ratón es del aproximadamente 2 al aproximadamente 6 por ciento. En un caso específico, el porcentaje de células B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ en un ratón en el que la única cadena ligera κ reordenada se deriva de una secuencia de Vκ1-39Jκ5 es del aproximadamente 2 al aproximadamente 3; en una realización específica, el porcentaje es del aproximadamente 2,6. En un caso específico, el porcentaje de células B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ en un ratón en el que la única cadena ligera κ reordenada se deriva de una secuencia de Vκ3-20Jκ1 es del aproximadamente 4 al aproximadamente 8; en un caso específico, el porcentaje es del aproximadamente 6.

En algunas realizaciones, el ratón modificado genéticamente empleado expresa una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia Vκ/Jκ de inmunoglobulina humana reordenada, ratón que comprende un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina funcional, y ratón que comprende una población de linfocitos B esplénicos que comprende una proporción de linfocitos B $Ig\lambda^+$ con respecto a los linfocitos B $Ig\lambda^+$ que es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8; en algunas realizaciones, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5. La secuencia de Vκ/Jκ de inmunoglobulina humana reordenada se genera a través de un reordenamiento de uno de los dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana y uno de 5 segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, la secuencia de Vκ/Jκ de inmunoglobulina humana reordenada se genera a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ1-39 de inmunoglobulina humana y un segmento de gen Jκ de inmunoglobulina humana seleccionado de Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4, Jκ5 y/o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la secuencia de Vκ/Jκ de inmunoglobulina humana reordenada se genera a través de un reordenamiento de un segmento de gen Vκ3-20 de inmunoglobulina humana y un segmento de gen Jκ de inmunoglobulina humana seleccionado de Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4, Jκ5 y/o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$ en el intervalo de aproximadamente 2 x 10^6 a aproximadamente 7 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 2,0 x 10^6, 2,5 x 10^6, 3,0 x 10^6, 3,5 x 10^6, 4,0 x 10^6, 4,5 x 10^6, 5,0 x 10^6, 5,5 x 10^6, 6,0 x 10^6, 6,5 x 10^6, o 7,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$ de aproximadamente 2,74 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$ de aproximadamente 4,30 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$ de aproximadamente 5,53 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$ de aproximadamente 6,18 x 10^6 células.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{hi}, IgM^{lo} en el intervalo de aproximadamente 1 x 10^6 a aproximadamente 4 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 1,0 x 10^6, 1,5 x 10^6, 2,0 x 10^6, 2,5 x 10^6, 3,0 x 10^6, 3,5 x 10^6, 4,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{hi}, IgM^{lo} de aproximadamente 1,30 x 10^6; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{hi}, IgM^{lo} de aproximadamente 2,13 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{hi}, IgM^{lo} de aproximadamente 3,15 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{hi}, IgM^{lo} de aproximadamente 3,93 x 10^6 células.

En alguna realización, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{lo}, IgM^{hi} en el intervalo de aproximadamente 9 x 10^5 a aproximadamente 2 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 9,0 x 10^5, 9,25 x 10^5, 9,5 x 10^5, 9,75 x 10^5, 1,0 x 10^6, 1,25 x 10^6, 1,50 x 10^6, 1,75 x 10^6, 2,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{lo}, IgM^{hi} de aproximadamente 9,52 x 10^5; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{lo}, IgM^{hi} de aproximadamente 1,23 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $CD19^+$, IgD^{lo}, IgM^{hi} de aproximadamente 1,40 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B esplénicos $D19^+$,

IgD^{lo} IgM^{hi} de aproximadamente 1,42 x 10^6 células.

En algunas realizaciones, el ratón modificado genéticamente empleado comprende un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina que comprende dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humanos no reordenados y 5 segmentos de gen Jκ humanos no reordenados, y en las que el ratón comprende una población de linfocitos B esplénicos periféricos que comprende poblaciones de linfocitos B de transición (por ejemplo, T1, T2 y T3) que son aproximadamente iguales a las de un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de segmentos de gen V y J de cadena ligera κ de inmunoglobulina. Las poblaciones de linfocitos B de transición ilustrativas (por ejemplo, T1, T2 y T3) del bazo de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento se caracterizan por la expresión de IgM, CD23, CD93, B220 y/o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T1 del bazo (por ejemplo, $CD93^+$, $B220^+$, IgM^{hi}, $CD23^-$) en el intervalo de aproximadamente 2 x 10^6 a aproximadamente 7 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 2,0 x 10^6, 2,5 x 10^6, 3,0 x 10^6, 3,5 x 10^6, 4,0 x 10^6, 4,5 x 10^6, 5,0 x 10^6, 5,5 x 10^6, 6,0 x 10^6, 6,5 x 10^6, o 7,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T1 del bazo de aproximadamente 2,16 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T1 del bazo de aproximadamente 3,63 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T1 del bazo de aproximadamente 3,91 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T1 del bazo de aproximadamente 6,83 x 10^6 células.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T2 del bazo (por ejemplo, $CD93^+$, $B220^+$, IgM^{hi}, $CD23^+$) en el intervalo de aproximadamente 1 x 10^6 a aproximadamente 7 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 1,0 x 10^6, 1,5 x 10^6, 2,0 x 10^6, 2,5 x 10^6, 3,0 x 10^6, 3,5 x 10^6, 4,0 x 10^6, 4,5 x 10^6, 5,0 x 10^6, 5,5 x 10^6, 6,0 x 10^6, 6,5 x 10^6, o 7,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T2 del bazo de aproximadamente 1,30 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T2 del bazo de aproximadamente 2,46 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T2 del bazo de aproximadamente 3,24 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T2 del bazo de aproximadamente 6,52 x 10^6 células.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T3 del bazo (por ejemplo, $CD93^+$, $B220^+$, IgM^{lo} $CD23^+$) en el intervalo de aproximadamente 1 x 10^6 a aproximadamente 4 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 1,0 x 10^6, 1,5 x 10^6, 2,0 x 10^6, 2,5 x 10^6, 3,0 x 10^6, 3,5 x 10^6, o 4,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón de la presente invención comprende una población de linfocitos B T3 del bazo de aproximadamente 1,08 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T3 del bazo de aproximadamente 1,35 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T3 del bazo de aproximadamente 3,37 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B T1 del bazo de aproximadamente 3,63 x 10^6 células.

En algunas realizaciones, el ratón modificado genéticamente empleado en la presente invención comprende un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina que comprende dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humanos no reordenados y 5 segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humanos no reordenados, y en las que el ratón comprende una población de linfocitos B esplénicos periféricos que comprende poblaciones de linfocitos B de zona marginal y precursores de zona marginal que son aproximadamente iguales a las de un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de segmentos de gen Vκ y Jκ de inmunoglobulina. Las poblaciones de linfocitos B de zona marginal ilustrativos del bazo de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento se caracterizan por la expresión de IgM, CD21/35, CD23, CD93, B220 y/o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B de la zona marginal del bazo (por ejemplo, $CD93^-$, $B220^+$, IgM^{hi}, $CD21/35^{hi}$, $CD23^-$) en el intervalo de aproximadamente 1 x 10^6 a aproximadamente 3 x 10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente 1,0 x 10^6, 1,5 x 10^6, 2,0 x 10^6, 2,5 x 10^6, o 3,0 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B de la zona marginal del bazo de aproximadamente 1,47 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B de la zona marginal del bazo de aproximadamente 1,49 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B de la zona marginal del bazo de aproximadamente 2,26 x 10^6 células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B de la zona marginal del bazo de aproximadamente 2,33 x 10^6 células.

En algunas realizaciones, un ratón modificado genéticamente empleado en la presente invención es aquel en el que el ratón que comprende un locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina que comprende dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humanos no reordenados y 5 segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humanos no reordenados, y

en ratón que comprende una población de linfocitos B esplénicos periféricos que comprende una o varias poblaciones de linfocitos B foliculares (por ejemplo, FO-I y FO-II) que son aproximadamente iguales a las de un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de segmentos de gen Vκ y Jκ de inmunoglobulina. Las poblaciones de linfocitos B foliculares ilustrativas (por ejemplo, FO-I y FO-II) del bazo de un ratón modificado genéticamente como se describe en el presente documento se caracterizan por la expresión de IgM, IgD, CD21/35, CD93, B220 y/o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 1 del bazo (por ejemplo, $CD93^-$, $B220^+$, $CD21/35^{int}$, IgM^{lo}, IgD^{hi}) en el intervalo de aproximadamente 3×10^6 a aproximadamente $1{,}5 \times 10^7$ células, ambos inclusive, por ejemplo, aproximadamente $3{,}0 \times 10^6$, $3{,}5 \times 10^6$, $4{,}0 \times 10^6$, $4{,}5 \times 10^6$, $5{,}0 \times 10^6$, $5{,}5 \times 10^6$, $6{,}0 \times 10^6$, $6{,}5 \times 10^6$, $7{,}0 \times 10^6$, $7{,}5 \times 10^6$, $8{,}0 \times 10^6$, $8{,}5 \times 10^6$, $9{,}0 \times 10^6$, $9{,}5 \times 10^6$, $1{,}0 \times 10^7$, o $1{,}5 \times 10^7$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 1 del bazo de aproximadamente $3{,}57 \times 10^6$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 1 del bazo de aproximadamente $6{,}31 \times 10^6$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 1 del bazo de aproximadamente $9{,}42 \times 10^6$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 1 del bazo de aproximadamente $1{,}14 \times 10^7$ células.

En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 2 del bazo (por ejemplo, $CD93^-$, $B220^+$, $CD21/35^{int}$, IgM^{int}, IgD^{hi}) en el intervalo de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 2×10^6 células, ambos inclusive, por ejemplo, $1{,}0 \times 10^6$, $1{,}25 \times 10^6$, $1{,}5 \times 10^6$, $1{,}75 \times 10^6$, o $2{,}0 \times 10^6$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 2 del bazo de aproximadamente $1{,}14 \times 10^6$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 2 del bazo de aproximadamente $1{,}45 \times 10^6$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 2 del bazo de aproximadamente $1{,}80 \times 10^6$ células; en algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención comprende una población de linfocitos B foliculares de tipo 2 del bazo de aproximadamente $2{,}06 \times 10^6$ células.

En un aspecto, el ratón modificado genéticamente empleado en la presente invención expresa una única cadena ligera κ reordenada derivada de un segmento de gen Vκ y Jκ humano, en el que el ratón expresa una población de linfocitos B que comprende una única cadena ligera κ derivada de la única secuencia de cadena ligera κ reordenada, en el que el ratón modificado genéticamente no se ha vuelto resistente a las hipermutaciones somáticas. En una realización, al menos el 90 % de las cadenas ligeras κ expresadas en un linfocito B del ratón presentan de al menos una a aproximadamente cinco hipermutaciones somáticas.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que se modifica para expresar una única cadena ligera κ derivada de no más de una, o no más de dos, secuencias de cadena ligera κ reordenadas, ratón que presenta un uso de cadena ligera κ que es aproximadamente el doble o más, al menos aproximadamente el triple o más, o al menos aproximadamente cuatro veces superior o más que el uso de cadena ligera κ presentada por un ratón de tipo silvestre, o superior al uso de cadena ligera κ presentada por un ratón de la misma cepa que comprende un repertorio de tipo silvestre de segmentos génicos de cadena ligera κ. En un caso específico, el ratón expresa la única cadena ligera κ de no más de una secuencia de cadena ligera κ reordenada. En un caso más específico, la secuencia de cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia de Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1. En un caso, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia de Vκ1-39Jκ5. En un caso, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia de Vκ3-20Jκ1.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que expresa una única cadena ligera κ derivada de no más de una, o no más de dos, secuencias de cadena ligera κ reordenadas, ratón que presenta un uso de cadena ligera κ que es aproximadamente 100 veces o más, al menos aproximadamente 200 veces o más, al menos aproximadamente 300 veces o más, al menos aproximadamente 400 veces o más, al menos aproximadamente 500 veces o más, al menos aproximadamente 600 veces o más, al menos aproximadamente 700 veces o más, al menos aproximadamente 800 veces o más, al menos aproximadamente 900 veces o más, al menos aproximadamente 1.000 veces o más superior al mismo uso de cadena ligera κ presentado por un ratón que porta un locus de cadena ligera κ humano completo o esencialmente completo. En un caso específico, el ratón que porta un locus de cadena ligera κ humano completo o esencialmente completo carece de una secuencia de cadena ligera κ de ratón no reordenada funcional. En un caso específico, el ratón expresa la única cadena ligera κ de no más de una secuencia de cadena ligera κ reordenada. En un caso, el ratón comprende una copia de una secuencia de cadena ligera κ reordenada (por ejemplo, un heterocigoto). En un caso, el ratón comprende dos copias de una secuencia de cadena ligera κ reordenada (por ejemplo, un homocigoto). En una realización más específica, la secuencia de cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia de Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1. En una realización, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia de Vκ1-39Jκ5. En una realización, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia de Vκ3-20Jκ1.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que expresa una única cadena ligera derivada de

no más de una, o no más de dos, secuencias de cadena ligera reordenadas, en el que la cadena ligera del ratón modificado genéticamente presenta un nivel de expresión que es de al menos 10 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 100 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 200 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 300 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 400 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 500 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 600 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 700 veces a aproximadamente 1.000 veces, de 800 veces a aproximadamente 1.000 veces o de 900 veces a aproximadamente 1.000 veces superior a la expresión de la misma cadena ligera reordenada que presenta un ratón portador de un locus de cadena ligera completo o esencialmente completo. En un caso, la cadena ligera comprende una secuencia humana. En un caso específico, la secuencia humana es una secuencia κ. En un caso, la secuencia humana es una secuencia λ. En un caso, la cadena ligera es una cadena ligera completamente humana.

En una realización, el nivel de expresión se caracteriza por cuantificar el ARNm de una secuencia de cadena ligera transcrita, y compararlo con la secuencia de cadena ligera transcrita de un ratón que tiene un locus de cadena ligera completo o esencialmente completo.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que expresa una única cadena ligera κ derivada de no más de una, o no más de dos, secuencias de cadena ligera κ reordenadas, ratón que, tras la inmunización con antígeno, presenta un título en suero que es comparable a un ratón de tipo silvestre inmunizado con el mismo antígeno. En un caso específico, el ratón expresa una única cadena ligera κ de no más de una secuencia de cadena ligera κ reordenada. En un caso, el título en suero se caracteriza como inmunoglobulina total. En un caso específico, el título en suero se caracteriza como un título específico de IgM. En un caso específico, el título en suero se caracteriza como un título específico de IgG. En una realización más específica, la secuencia de cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia de Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1. En un caso, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia de Vκ1-39Jκ5. En un caso, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia de Vκ3-20Jκ1.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que expresa una población de anticuerpos específicos del antígeno, en la que todas las cadenas ligeras de inmunoglobulina de la población de anticuerpos específicos del antígeno comprenden una región variable de cadena ligera humana (V_L) derivada del mismo único segmento de gen V_L humano y las cadenas pesadas de inmunoglobulina comprenden una región variable de cadena pesada humana (V_H) derivada de uno de una pluralidad de segmentos de gen V_H humanos.

En diversas realizaciones, los segmentos de gen V_H humano se seleccionan de V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-72, V_H3-73, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H5-51 y V_H6-1.

En diversas realizaciones, el mismo segmento de gen V_L humano único se selecciona de un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano. En diversas realizaciones, todas las cadenas ligeras de inmunoglobulina comprenden un segmento de gen J de cadena ligera (J_L) humano seleccionado de un segmento de gen Jκ y Jλ. En una realización específica, el segmento de gen J_L humano se selecciona entre un segmento de gen Jκ1 humano y un segmento de gen Jκ5. En diversas realizaciones, el ratón carece de una secuencia seleccionada entre un segmento de V_L de inmunoglobulina de ratón, un segmento de gen J_L de inmunoglobulina de ratón y una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, la región V_L humana está unida operativamente a una región constante (C_L) de cadena ligera de inmunoglobulina humana, de ratón o de rata. En una realización específica, la región V_L humana está unida operativamente a una región Cκ de ratón. En una realización específica, la región V_L humana está unida operativamente a una región Cκ de rata.

En diversas realizaciones, la región V_L humana se expresa desde un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno. En diversas realizaciones, la región V_H humana está unida operativamente a una región constante (C_H) de cadena pesada de inmunoglobulina humana, de ratón o de rata. En diversas realizaciones, la región (C_H) comprende una secuencia humana seleccionada entre una C_H1, una bisagra, una C_H2, una C_H3, una C_H4 y/o una combinación de las mismas. En diversas realizaciones, la región V_H humana se expresa desde un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que expresa una pluralidad de cadenas pesadas de inmunoglobulina asociadas con una sola cadena ligera. En un caso, la cadena pesada comprende una secuencia humana. En diversos casos, la secuencia humana se selecciona de una secuencia variable, una C_H1, una bisagra, una C_H2, una C_H3 y una combinación de las mismas. En un caso, la cadena ligera única comprende una secuencia humana. En diversos casos, la secuencia humana se selecciona de una secuencia variable, una secuencia constante y una combinación de las mismas. En un caso, el ratón comprende un locus de inmunoglobulina endógeno deshabilitado y expresa la cadena pesada y/o la cadena ligera de un transgén o un episoma extracromosómico. En un caso, el ratón comprende un reemplazo en un locus de ratón endógeno de algunos o todos los segmentos génicos de cadena pesada de ratón endógenos (es decir, V, D, J) y/o algunas o todas las secuencias constantes de cadena pesada de ratón endógenas (por ejemplo, C_H1, bisagra, C_H2, C_H3 o una combinación de las mismas, y/o algunas o todas las secuencias endógenas de cadena ligera del ratón (por ejemplo, V, J, constante o una combinación de las mismas), con una o más secuencias de inmunoglobulina humanas.

En un aspecto, se emplea un ratón adecuado para generar anticuerpos que tienen la misma cadena ligera, en el que todos o esencialmente todos los anticuerpos producidos en el ratón se expresan con la misma cadena ligera. En una realización, la cadena ligera se expresa a partir de un locus de cadena ligera endógeno.

En un aspecto, se proporciona un método de generación de una cadena ligera para un anticuerpo humano, que comprende obtener de un ratón como el descrito en el presente documento una secuencia de cadena ligera y una secuencia de cadena pesada, y emplear la secuencia de cadena ligera y la secuencia de cadena pesada para generar un anticuerpo humano. En una realización, el anticuerpo humano es un anticuerpo biespecífico.

En un aspecto, se proporciona un método de identificación de un dominio variable de cadena pesada humano que es capaz de unirse a un antígeno de interés con una cadena ligera diseñada como se describe en el presente documento, en el que el método comprende proporcionar un dominio variable de cadena pesada derivado de un primer anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno, reparar el dominio variable de cadena pesada con una secuencia de cadena ligera de la línea germinal y transfectar una célula para que cada uno se exprese para formar un segundo anticuerpo, exponiendo el segundo anticuerpo al antígeno y midiendo la unión del segundo anticuerpo al antígeno.

En una realización, la cadena ligera del primer anticuerpo comprende una secuencia de Vκ1-39 humana. En una realización, la cadena ligera del primer anticuerpo comprende una secuencia de Vκ3-20 humana. En una realización, la secuencia de cadena ligera de la línea germinal comprende una secuencia de Vκ1-39 o Vκ3-20 humana. En diversas realizaciones, la unión del segundo anticuerpo al antígeno se determina mediante la comparación de la unión del primer anticuerpo al antígeno.

cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento pueden utilizarse juntos entre sí, salvo que se indique otra cosa o sea evidente a partir del contexto. Otras realizaciones serán evidentes para un experto en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción.

Breve descripción de las figuras

La **FIG. 1** ilustra una estrategia de dirección para reemplazar los segmentos génicos endógenos de la región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón por una región del gen Vκ1-39Jκ5 humano.

La **FIG. 2** ilustra una estrategia de dirección para reemplazar los segmentos génicos endógenos de la región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón por una región del gen Vκ3-20Jκ1 humano.

La **FIG. 3** ilustra una estrategia de dirección para reemplazar los segmentos génicos endógenos de la región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón por una región del gen VpreB/Jλ5 humano.

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

La **FIG. 5A** muestra la expresión relativa de ARNm (eje y) de una cadena ligera derivada de Vκ1-39 en un ensayo de PCR cuantitativo usando sondas específicas de la unión de una región de cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 humana diseñada por ingeniería genética (sonda de unión de Vκ1-39Jκ5) y el segmento de gen Vκ1-39 humano (sonda de Vκ1-39) en un ratón homocigoto para un reemplazo de los segmentos de los genes Vκ y Jκ endógenos con segmentos de los genes Vκ y Jκ humanos (Hκ), un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón heterocigoto para una región de cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 reordenada humana diseñada por ingeniería genética (Vκ1-39Jκ5 HET). Las señales se normalizan con respecto a la expresión de Cκ del ratón. N.D.: No detectado.

La **FIG. 5B** muestra la expresión relativa de ARNm (eje y) de una cadena ligera derivada de Vκ1-39 en un ensayo de PCR cuantitativo usando sondas específicas de la unión de una región de cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 humana diseñada por ingeniería genética (sonda de unión de Vκ1-39Jκ5) y el segmento de gen Vκ1-39 humano (sonda de Vκ1-39) en un ratón homocigoto para un reemplazo de los segmentos de los genes Vκ y Jκ endógenos con segmentos de los genes Vκ y Jκ humanos (Hκ), un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para una región de cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 reordenada humana diseñada por ingeniería genética (Vκ1-39Jκ5 HO). Las señales se normalizan con respecto a la expresión de Cκ del ratón.

La **FIG. 5C** muestra la expresión relativa de ARNm (eje y) de una cadena ligera derivada de Vκ3-20 en un ensayo de PCR cuantitativo usando sondas específicas de la unión de una región de cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 humana diseñada por ingeniería genética (sonda de unión de Vκ3-20Jκ1) y el segmento de gen Vκ3-20 humano (sonda de Vκ3-20) en un ratón homocigoto para un reemplazo de los segmentos de los genes Vκ y Jκ endógenos con segmentos de los genes Vκ y Jκ humanos (Hκ), un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón heterocigoto (HET) y homocigoto (HO) para una región de cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 reordenada humana diseñada por ingeniería genética. Las señales se normalizan con respecto a la expresión de CK del ratón.

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

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

La **FIG. 7A** muestra un esquema de anticuerpos monoespecíficos (Parental 1 y Parental 2) y un anticuerpo biespecífico (Biespecífico) construido a partir de regiones variables de cadena pesada de cada anticuerpo monoespecífico parental. Una región variable de cadena ligera común (oscurecida) se indica en el anticuerpo biespecífico.

La **FIG. 7B** muestra un esquema para las características de unión de dos anticuerpos monoclonales parentales (Parental 1 y Parental 2) para un antígeno de interés, así como la característica de unión de un anticuerpo biespecífico construido a partir del emparejamiento de las regiones variables de cadena pesada de cada anticuerpo parental monoespecífico con una cadena ligera común. Se indica la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse a dos epítopos distintos del antígeno de interés por separado (inferior izquierda) o simultáneamente (inferior derecha).

La **FIG. 8** muestra un gráfico de barras de la unión de anticuerpos biespecíficos 300 nM (barras oscuras) y monoespecíficos (barras rayadas y grises) a una superficie del Antígeno E monomérico capturado en unidades BIACORE™ (RU). Se indican el anticuerpo monoclonal parental 1 (Ac P1), el anticuerpo monoclonal parental 2 (Ac P2) y los anticuerpos biespecíficos (Ac Bs).

La **FIG. 9** muestra dos locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógenos modificados por ingeniería genética (por ejemplo, cadena ligera κ). El locus de la parte superior (DLC-5J) contiene un fragmento de ADN humano diseñado por ingeniería genética (línea rayada) que contiene dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano. El locus de la parte inferior (DLC-1J) contiene un fragmento de ADN humano diseñado por ingeniería genética (línea rayada) que contiene dos segmentos de gen Vκ humano y un segmento de gen Jκ humano. Cada locus es capaz de reordenarse para formar una región Vκ humana unida operativamente a una región constante de cadena ligera endógena (por ejemplo, una Cκ). Se muestran los promotores de inmunoglobulina (flecha sobre el locus), los exones líderes (flechas rellenas) y los dos segmentos de gen Vκ humano (flechas sin rellenar), todos flanqueados cadena arriba (5') por un casete de neomicina que contiene sitios de recombinación de Frt. Las secuencias de señal de recombinación diseñadas con cada uno de los segmentos de genes humanos (Vκ y Jκ) se indican mediante óvalos sin rellenar yuxtapuestos con cada segmento génico.

La FIG. 10A, en el panel superior, muestra diagramas de contorno representativos de médula ósea teñida para linfocitos B y T ($CD19^+$ and $CD3^+$, respectivamente) de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J). El panel inferior muestra diagramas de contorno representativos de la médula ósea seleccionados en $CD19^+$ y teñidos para cκit+ y $CD43^+$ de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J). Los linfocitos B Pro y Pre se indican en los diagramas de contorno del panel inferior.

La **FIG. 10B** muestra el número de linfocitos B Pro ($CD19^+CD43^+ckit^+$) y Pre ($CD19^+CD43^-ckit^-$) en médula ósea extraída de fémures de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J).

La **FIG. 11A** muestra diagramas de contorno representativos de la médula ósea seleccionados en singletes teñidos para la inmunoglobulina M (IgM) y B220 de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J). Se observan linfocitos B inmaduros, maduros y pro/pre en cada uno de los diagramas de contorno.

La **FIG. 11B** muestra el número total de linfocitos B ($CD19^+$), B inmaduros ($B220^{int}IgM^+$) y B maduros ($B220^{hi}IgM^+$) en médula ósea aislada de fémures de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J).

La **FIG. 12A** muestra diagramas de contorno representativos de la médula ósea seleccionados en singletes teñidos para la inmunoglobulina M (IgM) y B220 de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J). Se observan linfocitos B inmaduros, maduros y pro/pre en cada uno de los diagramas de contorno.

La **FIG. 12B** muestra diagramas de contorno representativos de la médula ósea seleccionados en linfocitos B inmaduros ($B220^{int}IgM^+$) y maduros ($B220^{hi}IgM^+$) teñidos para la expresión de Igλ e Igκ aislada de los fémures de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J).

FIG. 13A, en el panel superior, muestra diagramas de contorno representativos de esplenocitos seleccionados en singletes y teñidos para linfocitos B y T ($CD19^+$ and $CD3^+$, respectivamente) de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J). El panel inferior muestra diagramas de contorno representativos de esplenocitos seleccionados en $CD19^+$ y teñidos para inmunoglobulina D (IgD) e inmunoglobulina M (IgM) de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humanos y cinco segmentos de gen Jκ humanos (DLC-5J). En cada uno de los diagramas de contorno, se indican los linfocitos B maduros (54 para WT, 56,9 para DLC-5J) y de transición (23,6 para WT, 25,6 para DLC-5J).

La **FIG. 13B** muestra el número total de linfocitos B $CD19^+$, linfocitos B de transición ($CD19^+IgM^{hi}IgD^{lo}$) y linfocitos B maduros ($CD19^+IgM^{lo}IgD^{hi}$) en bazos extraídos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y dos segmentos de gen Jκ humano (DLC-5J).

La **FIG. 14A** muestra diagramas de contorno representativos y esplenocitos $Ig\lambda^+$ e $Ig\kappa^+$ seleccionados en $CD19^+$ de un ratón de tipo silvestre (WT) y un ratón homocigoto para dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano (DLC-5J).

La **FIG. 14B** muestra el número total de linfocitos B ($CD19^+$), Linfocitos B $Ig\kappa^+$ ($CD19^+Ig\kappa^+$) y linfocitos B Igλ+ ($CD19^+Ig\lambda$+) en bazos extraídos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para dos segmentos de

gen Vκ humano y dos segmentos de gen Jκ humano (DLC-5J).

La **FIG. 15A** muestra el desarrollo de linfocitos B periféricos en ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano. El primer diagrama de contorno (extremo izquierdo) muestra los esplenocitos $CD93^+$ y $B220^+$ seleccionados en $CD19^+$, lo que indica linfocitos B inmaduros (39,6) y maduros (57,8). El segundo diagrama de contorno (mitad superior) muestra la expresión IgM^+ y $CD23^+$ en linfocitos B inmaduros que indican las poblaciones de linfocitos B T1 (33,7; $IgD^-IgM^+CD21^{lo}CD23^-$), T2 (21,2; $IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}CD23^+$) y T3 (29.1). El tercer diagrama de contorno (parte inferior central) muestra la expresión $CD21^+$ ($CD35^+$) y IgM^+ de linfocitos B maduros que indican una pequeña población (14,8) que da lugar a linfocitos B de la zona marginal y una segunda población (70,5) que da lugar a linfocitos B foliculares (FO). El cuarto diagrama de contorno (parte superior derecha) muestra la expresión $B220^+$ y $CD23^+$ de los linfocitos B maduros que indican poblaciones de linfocitos B de la zona marginal (90,5; MZ) y precursores de la zona marginal (7,3; $IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}CD23^+$). El quinto diagrama de contorno (parte inferior derecha) muestra la expresión IgD^+ e IgM^+ en linfocitos B maduros que indican las poblaciones de linfocitos B FO-I (79,0; $IgD^{hi}IgM^{lo}CD21^{mid}CD23^+$) y FO-II (15,1; $IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}CD23^+$). Se muestra el porcentaje de células de cada región seleccionada.

La **FIG. 15B** muestra el desarrollo de linfocitos B periféricos en ratones de tipo silvestre. El primer diagrama de contorno (extremo izquierdo) muestra los esplenocitos $CD93^+$ y $B220^+$ seleccionados en $CD19^+$, lo que indica linfocitos B inmaduros (31,1) y maduros (64,4). El segundo diagrama de contorno (mitad superior) muestra la expresión IgM^+ y $CD23^+$ en linfocitos B inmaduros que indican las poblaciones de linfocitos B T1 (28,5; $IgD^-IgM^+CD21^{lo}CD23^-$), T2 (28,7; $IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}CD23^+$) y T3 (30,7). El tercer diagrama de contorno (parte inferior central) muestra la expresión $CD21^+$ ($CD35^+$) y IgM^+ de linfocitos B maduros que indican una pequeña población (7,69) que da lugar a linfocitos B de la zona marginal y una segunda población (78,5) que da lugar a linfocitos B foliculares (FO). El cuarto diagrama de contorno (parte superior derecha) muestra la expresión $B220^+$ y $CD23^+$ de los linfocitos B maduros que indican poblaciones de linfocitos B de la zona marginal (79,9; MZ) y precursores de la zona marginal (19,4; $IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}CD23^+$). El quinto diagrama de contorno (parte inferior derecha) muestra la expresión de IgD^+ e IgM^+ en linfocitos B maduros que indican las poblaciones de linfocitos B FO-I (83,6; $IgD^{hi}IgM^{lo}CD21^{mid}CD23^+$) y FO-II (13,1; $IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}CD23^+$). Se muestra el porcentaje de células de cada región seleccionada.

La **FIG. 16** muestra el número total de poblaciones de linfocitos B transicionales, de zona marginal y foliculares en bazos extraídos de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano (DLC-5J).

La **FIG. 17** muestra la expresión relativa de ARNm en la médula ósea (eje y) de cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20 y derivadas de Vκ1-39 en un ensayo de PCR cuantitativa que usa sondas específicas para segmentos génicos Vκ3-20 o Vκ1-39 en ratones homocigotos para un reemplazo de los segmentos de genes Vκ y Jκ endógenos con segmentos de genes Vκ y Jκ humanos (Hκ), ratones de tipo silvestre (WT), ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano (DLC-5J) y ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y un segmento de gen Jκ humano (DLC-1J). Las señales se normalizan con respecto a la expresión de Cκ del ratón. ND: No detectado.

La **FIG. 18** muestra la expresión relativa de ARNm en bazos enteros (eje y) de cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20 y derivadas de Vκ1-39 en un ensayo de PCR cuantitativa que usa sondas específicas para segmentos génicos Vκ3-20 o Vκ1-39 en ratones homocigotos para un reemplazo de los segmentos de genes Vκ y Jκ endógenos con segmentos de genes Vκ y Jκ humanos (Hκ), ratones de tipo silvestre (WT), ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano (DLC-5J) y ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y un segmento de gen Jκ humano (DLC-1J). Las señales se normalizan con respecto a la expresión de Cκ del ratón. ND: No detectado.

La **FIG. 19** muestra una ilustración general de la recombinación de un segmento de gen V y J de un alelo de cadena ligera κ de inmunoglobulina en un ratón y la estructura del locus de cadena ligera antes de la reordenación (arriba) y después de la reordenación (abajo). Dicha reordenación, como se muestra, es solo una de las varias reordenaciones posibles.

Descripción detallada

La presente invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales descritos en particular, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, dado que el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos y frases utilizadas en el presente documento incluyen que los términos y las frases que son habituales en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa un término o frase. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales particulares.

El término "anticuerpo", como se usan en el presente documento, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada

cadena ligera comprender una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y de cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada se pueden abreviar como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera se pueden abreviar como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. La expresión anticuerpo “de alta afinidad” se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D con respecto a su epítopo diana de aproximadamente 10^{-9} M o inferior (por ejemplo, de aproximadamente 1 x 10^{-9} M, 1 x 10^{-10} M, 1 x 10^{-11} M o aproximadamente 1 x 10^{-12} M). En una realización, la K_D se mide mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™; en otra realización, la K_D se mide mediante ELISA.

La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de dos anticuerpos monoclonales diferentes (FIG. 7A) y, en general, comprenden dos cadenas pesadas no idénticas derivadas de los dos anticuerpos monoclonales diferentes, con cada cadena pesada uniéndose específicamente a un epítopo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (por ejemplo, diferentes epítopos en dos inmunógenos diferentes; véase la FIG. 7B, parte inferior izquierda) o en la misma molécula (por ejemplo, diferentes epítopos del mismo inmunógeno; véase la FIG. 7B, parte inferior derecha). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítopo y un segundo epítopo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítopo, en general, será de al menos uno a dos o tres o cuatro o más órdenes de magnitud inferior a la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítopo, y viceversa. Los epítopos unidos específicamente por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diana diferente (por ejemplo, en la misma proteína o en otra diferente; véase la FIG. 7B. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos incluyen aquellos con una primera cadena pesada específica de un antígeno tumoral y una segunda cadena pesada específica de un marcador citotóxico, por ejemplo, un receptor Fc (por ejemplo, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, etc.) o un marcador de linfocitos T (por ejemplo, CD3, CD28, etc.). Además, la segunda región variable de cadena pesada puede sustituirse con una región variable de cadena pesada que tiene una especificidad deseada diferente. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con una primera cadena pesada específica de un antígeno tumoral y una segunda cadena pesada específica de una toxina puede emparejarse para administrar una toxina (por ejemplo, saporina, alcaloide de la vinca, etc.) a un linfocito tumoral. Otros ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos con una primera cadena pesada específica de un receptor activador (por ejemplo, receptor de los linfocitos B, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, FcαRI, receptor de linfocitos T, etc.) y una segunda cadena pesada específica de un inhibidor receptor (por ejemplo, FcγRIIB, CD5, CD22, CD72, CD300a, etc.). Dichos anticuerpos biespecíficos pueden construirse para condiciones terapéuticas asociadas con la activación celular (por ejemplo, alergia y asma). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopos del mismo o diferente inmunógeno (FIG. 7B). Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo o diferente inmunógeno pueden fusionarse con secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones constantes de cadena pesada iguales o diferentes, y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que exprese una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de cadena pesada, seguidas de un dominio C_H1 (N-terminal a C-terminal), una bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que bien no confiere especificidad de unión al epítopo, pero puede asociarse con cada cadena pesada, o puede asociarse con cada cadena pesada y puede unir uno o más de los epítopos unidos por las regiones de unión al epítopo de cadena pesada, o que puede asociarse con cada pesada y permitir la unión, o una o ambas cadenas pesadas a uno o ambos epítopos.

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

La expresión "región determinante de la complementariedad" o el término "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de los genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, de un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones marco conservadas en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T). Una CDR puede ser codificada, por ejemplo, por una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por un linfocito B o un linfocito T no tratado previamente o maduro. Una

CDR puede ser mutada somáticamente (por ejemplo, variar de una secuencia codificada en la línea germinal de un animal), humanizada y/o modificada con sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada), pero que son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de linfocitos B, por ejemplo, como resultado del corte y empalme o de la conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación de V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

El término "conservativa", cuando se usa para describir una sustitución conservativa de aminoácido, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena secundaria con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de una región variable para unirse específicamente a un epítopo diana con una afinidad deseada. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias con propiedades químicas similares incluyen cadenas secundarias alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; cadenas secundarias hidroxil alifáticas tales como serina y treonina; cadenas secundarias que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas secundarias aromáticas tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; cadenas secundarias básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas secundarias ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y cadenas secundarias que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/arginina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución de cualquier resto nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 divulgada en Gonnet *et al*. (1992) “Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database”, *Science* 256:1443-45. En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en la que la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

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

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

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

La expresión "línea germinal" incluye una referencia a una secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de una célula no mutada somáticamente, por ejemplo, un linfocito B o un linfocito pre-B, o una célula hematopoyética no mutados somáticamente.

La expresión "cadena pesada", o "cadena pesada de inmunoglobulina", incluye una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres regiones CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique otra cosa. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de las mismas. Una cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable (de N-terminal a C-terminal), un dominio C_H1, una bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un epítopo (por ejemplo, reconocer el epítopo con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de expresarse y secretares desde una célula, y que comprende al menos una CDR.

El término "identidad", cuando se usa junto con secuencia incluye identidad, como se determina mediante numerosos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, se determinan las identidades usando un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de hueco de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1, y que utiliza una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de las secuencias

dependerá de las secuencias concretas, pero en el caso de un dominio constante de cadena ligera, la longitud debe contener una secuencia de longitud suficiente para plegarse en un dominio constante de cadena ligera que sea capaz de autoasociarse para formar un dominio canónico de cadena ligera, por ejemplo, capaz de formar dos láminas beta que comprendan cadenas beta y capaz de interactuar con al menos un dominio C_H1 de un ser humano o un ratón. En el caso de un dominio C_H1, la longitud de la secuencia debe contener una secuencia de longitud suficiente para plegarse en un dominio C_H1 que sea capaz de formar dos láminas beta que comprendan cadenas beta y que pueda interactuar con al menos un dominio constante de cadena ligera de un ratón o un ser humano.

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

La expresión "cadena ligera" incluye una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye cadenas ligeras κ y λ humanas y una VpreB, así como cadenas ligeras sustitutas. Los dominios variables de cadena ligera (V_L) normalmente incluyen tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco (FR), a menos que se especifique otra cosa. En general, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, un dominio V_L que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y un dominio constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras incluyen aquellas, por ejemplo, que no se unen selectivamente a un primer o a un segundo epítopo unidos selectivamente por la proteína de unión al epítopo en la que aparecen. Las cadenas ligeras también incluyen aquellas que se unen y reconocen, o ayudan a la cadena pesada con la unión y el reconocimiento, de uno o más epítopos unidos de forma selectiva por la proteína de unión al epítopo en la que aparecen. Las cadenas ligeras comunes son aquellas derivadas de una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana reordenada o una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humana reordenada, e incluyen versiones mutadas somáticamente (por ejemplo, maduradas por afinidad).

La expresión "intervalo micromolar" pretende significar 1-999 micromolar; la expresión "intervalo nanomolar" pretende significar 1-999 nanomolar; la expresión "intervalo picomolar" significa 1-999 picomolar.

La expresión "mutado somáticamente" incluye una referencia a una secuencia de ácido nucleico de un linfocito B que ha sufrido un cambio de clase, en el que la secuencia de ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada o que incluye una secuencia de CDR o FR de cadena pesada) en el linfocito B con cambio de clase no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico del linfocito B antes del cambio de clase, tal como, por ejemplo, una diferencia en una CDR o secuencia de ácido nucleico estructural entre un linfocito B que no se ha sometido a cambio de clase y un linfocito B que ha sufrido cambio de clase. “Mutadas somáticamente” incluye la referencia a secuencias de ácido nucleico de linfocitos B madurados por afinidad que no son idénticos a las secuencias de región variable de inmunoglobulina correspondientes de linfocitos B que no están madurados por afinidad (es decir, secuencias del genoma de células de la línea germinal). La expresión "mutada somáticamente" también incluye una referencia a una secuencia de ácido nucleico de la región variable de inmunoglobulina de un linfocito B después de la exposición del linfocito B a un epítopo de interés, de manera que la secuencia de ácido nucleico difiere de la secuencia de ácido nucleico correspondiente antes de la exposición de los linfocitos B al epítopo de interés. La expresión "mutada somáticamente" se refiere a secuencias de anticuerpos que se han generado en un animal, por ejemplo, un ratón que tiene secuencias de ácido nucleico de región variable de inmunoglobulina humana, en respuesta a la exposición a un inmunógeno, y que resultan de los procesos de selección inherentemente operativos en dicho animal.

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

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

Cadena ligera universal

Los esfuerzos previos por fabricar proteínas de unión al epítopo multiespecíficas útiles, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, se han visto obstaculizados por una variedad de problemas que frecuentemente comparten un paradigma común: la selección o manipulación *in vitro* de secuencias para diseñar racionalmente, o para diseñar mediante prueba y error, un formato adecuado para el emparejamiento de una inmunoglobulina humana biespecífica heterodimérica. Desafortunadamente, la mayoría, si no todos, los enfoques de ingeniería *in vitro* brindan soluciones en gran medida *ad hoc* que son adecuadas, si acaso, para moléculas individuales. Por otro lado, no se han realizado métodos *in vivo* para emplear organismos complejos para seleccionar los emparejamientos apropiados que son capaces de conducir a agentes terapéuticos humanos.

Los ratones que contienen locus de inmunoglobulina humana, regiones variables y constantes insertadas aleatoriamente en el genoma del ratón, se conocen en la técnica. Las cepas iniciales de dichos ratones contenían un número limitado de segmentos génicos de inmunoglobulina humana. Específicamente, un puñado de cepas que

contenían segmentos de genes de cadena ligera de inmunoglobulina humana contenían uno, tres o cuatro segmentos de gen V_L de inmunoglobulina humana y cinco segmentos de gen J_L de inmunoglobulina humana (Taylor *et al.* 1992, *Nucleic Acids Research* 20(23): 6287-6295; Fishwild *et al*. 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851; Lonberg *et al.* 1994, *Nature* 368: 856-859; Green *et al.* 1994, *Nature Genetics* 7:13-21; Green y Jakobovits 1998, *J. Exp*. *Med*. 188(3): 483-495; Green 1999, *J. Immunol. Methods* 231: 11-23). Estos ratones que contenían solo unos cuantos segmentos de gen V_L de inmunoglobulina humanos como parte de transgenes completamente humanos insertados al azar en el genoma del ratón demostraron números de linfocitos B comprometidos, desarrollo de linfocitos B alterado y otras deficiencias inmunitarias. La expresión de los genes V_L de la inmunoglobulina humana, detectada por la expresión superficial de la Cκ humana en los linfocitos B, fue menor que la cadena ligera κ endógena en comparación con el tipo silvestre. Sorprendentemente, la presente invención proporciona ratones cuyo número y desarrollo de linfocitos B es casi de tipo silvestre con respecto a cuándo los ratones se modifican por ingeniería genética en los locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógenos para contener uno o dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana (por ejemplo, los Ejemplos 2 y 14, Tablas 3, 25 y 26, y FIG. 4, 10A-18). Además, en algunas realizaciones, los ratones proporcionados por la presente invención, son capaces de generar varios anticuerpos quiméricos inversos de alta afinidad que contienen dominios V_H y V_L humanos en respuesta al antígeno, en los que cada uno de los dominios V_L contienen uno de dos segmentos de gen V_L humanos posibles y uno de cinco segmentos de gen J_L humanos posibles (por ejemplo, véanse los Ejemplos 5-10, 12 y 14). Por lo tanto, a diferencia de las cepas preliminares de ratones diseñados por ingeniería genética con minilocus de cadena ligera de inmunoglobulina humana (es decir, un número limitado de segmentos de genes de inmunoglobulina humana), en la actualidad, se proporcionan ratones diseñados que contienen un número limitado de segmentos de gen V_L de inmunoglobulina humana (dos) y 5 segmentos de gen J_L de inmunoglobulina humana, presentan sorprendentemente números de linfocitos B normales, expresión de cadena ligera de inmunoglobulina normal y desarrollo de linfocitos B normal. Además, dichos ratones proporcionados tampoco muestran una capacidad reducida o deteriorada para generar respuestas inmunitarias potentes hacia múltiples antígenos como resultado de un repertorio de cadenas ligeras de inmunoglobulina limitado. Por consiguiente, se proporcionan ratones que comprenden un locus de V_L humanizado que comprende dos segmentos de gen V_L de inmunoglobulina humana no reordenados y 5 segmentos de gen J_L de inmunoglobulina humana, y que muestran poblaciones de linfocitos B de tipo silvestre en número, y muestran desarrollo de linfocitos B de tipo silvestre.

En general, las secuencias de ratones nativos con frecuencia no son una buena fuente de secuencias terapéuticas humanas. Al menos por ese motivo, la generación de regiones variables de inmunoglobulina de cadena pesada de ratón que se emparejan con una cadena ligera humana común tienen una utilidad práctica limitada. Se realizarían más esfuerzos de ingeniería *in vitro* en un proceso de prueba y error para tratar de humanizar las secuencias variables de cadena pesada del ratón mientras se espera mantener la especificidad y afinidad del epítopo mientras se mantiene la capacidad de acoplarse con la cadena ligera humana común, con un resultado incierto. Al final de dicho proceso, el producto final puede mantener algo de la especificidad y la afinidad, y asociarse con la cadena ligera común, pero, en última instancia, la inmunogenicidad en un ser humano probablemente siga siendo un gran riesgo.

Por lo tanto, un ratón adecuado para la fabricación de agentes terapéuticos para seres humanos incluiría un repertorio adecuadamente grande de segmentos génicos de región variable de cadena pesada humanos en lugar de segmentos génicos de región variable de cadena pesada endógenos de ratón. Los segmentos génicos de región variable de cadena pesada humanos deberían poder reordenarse y recombinarse con un dominio constante de cadena pesada de ratón endógeno para formar una cadena pesada quimérica inversa (es decir, una cadena pesada que comprendiera un dominio variable humano y una región constante de ratón). La cadena pesada debe ser capaz de cambiar de clase e hipermutación somática de modo que el repertorio de dominios variables de cadena pesada esté disponible para que el ratón seleccione uno que pueda asociarse con el repertorio limitado de regiones variables de cadena ligera humanas.

Un ratón que selecciona una cadena ligera común para una pluralidad de cadenas pesadas tiene una utilidad práctica. En diversas realizaciones, los anticuerpos que se expresan en un ratón que solo puede expresar una cadena ligera común tendrán cadenas pesadas que podrán asociarse y expresarse con una cadena ligera idéntica o esencialmente idéntica. Esto es particularmente útil en la fabricación de anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, dicho ratón puede inmunizarse con un primer inmunógeno para generar un linfocito B que exprese un anticuerpo que se una específicamente a un primer epítopo. El ratón (o un ratón genéticamente igual) se puede inmunizar con un segundo inmunógeno para generar un linfocito B que exprese un anticuerpo que se una específicamente al segundo epítopo. Las regiones de cadena pesada variables pueden clonarse a partir de linfocitos B y expresarse con la misma región constante de cadena pesada y la misma región variable de cadena ligera (por ejemplo, una cadena ligera común) en una célula para producir un anticuerpo biespecífico, de modo que el componente de cadena pesada variable del anticuerpo biespecífico ha sido seleccionado por un ratón para asociarlo y expresarlo con el componente de cadena ligera variable (o cadena ligera común).

Los inventores han diseñado por ingeniería genética un ratón para generar cadenas ligeras de inmunoglobulina que se emparejarán adecuadamente con una familia bastante diversa de cadenas pesadas, incluyendo las cadenas pesadas cuyas regiones variables se separan de las secuencias de la línea germinal, por ejemplo, las regiones variables maduradas por afinidad o mutadas somáticamente. En diversas realizaciones, el ratón está diseñado para emparejar dominios variables de cadena ligera humanos con dominios variables de cadena pesada humanos que comprenden mutaciones somáticas, permitiendo así una vía a proteínas de unión de alta afinidad adecuadas para su

uso como agentes terapéuticos para seres humanos.

El ratón creado mediante ingeniería genética, a través del largo y complejo proceso de selección de anticuerpos dentro de un organismo, toma decisiones biológicamente apropiadas al emparejar una colección diversa de dominios variables de cadena pesada humanos con un número limitado de opciones de cadenas ligeras humanas. Para conseguir esto, el ratón se diseña por ingeniería genética para presentar un número limitado de opciones de dominio variable de cadena ligera humano junto con una amplia diversidad de opciones de dominio variable de cadena pesada humano. Tras el desafío con un inmunógeno, el ratón aumenta al máximo el número de soluciones en su repertorio para desarrollar un anticuerpo contra el inmunógeno, limitado en gran parte o únicamente por el número o las opciones de cadena ligera de su repertorio. En diversas realizaciones, esto incluye permitir que el ratón logre mutaciones somáticas adecuadas y compatibles del dominio variable de cadena ligera que, sin embargo, serán compatibles con una variedad relativamente grande de dominios variables de cadena pesada humanos, incluyendo, en particular, dominios variables de cadena pesada humanos mutados somáticamente.

Para lograr un repertorio limitado de opciones de cadena ligera, el ratón se diseña para volver no funcional o esencialmente no funcional su capacidad de hacer, o reordenar, un dominio variable de cadena ligera nativo de ratón. Esto puede lograrse, por ejemplo, eliminando los segmentos génicos de región variable de cadena ligera del ratón. El locus del ratón endógeno puede modificarse luego por un segmento génico de la región variable de cadena ligera humano exógena adecuado, unido operativamente al dominio constante de cadena ligera del ratón endógeno, de manera que los segmentos génicos de la región variable humanos exógenos se puedan combinar con el gen endógeno de la región constante de cadena ligera del ratón y formar un gen de cadena ligera quimérica inversa reordenada (variable humana, constante del ratón). En diversas realizaciones, la región variable de cadena ligera es capaz de ser mutada somáticamente. En diversas realizaciones, para maximizar la capacidad de la región variable de cadena ligera para adquirir mutaciones somáticas, se conserva/n el/los potenciador/es apropiado/s en el ratón. Por ejemplo, al modificar un locus de cadena ligera κ de ratón para reemplazar los segmentos génicos de cadena ligera κ de ratón endógenos por segmentos génicos de cadena ligera κ humanos, el potenciador intrónico κ de ratón y el potenciador 3' κ de ratón se mantienen funcionalmente o no se interrumpen.

Por tanto, la presente invención emplea un ratón modificado genéticamente que tiene un genoma de línea germinal que comprende:

(i) dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana y cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón o de rata, en el que los dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana son un Vκ1-39 humano y un Vκ3-20 humano, y los cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana son Jκ1 humano, Jκ2 humano, Jκ3 humano, Jκ4 humano y Jκ5 humano; y
(ii) uno o más segmentos de gen V_H de la inmunoglobulina humana no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H de la inmunoglobulina humana no reordenados y uno o más segmentos de gen J_H de la inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón;

en el que los segmentos génicos de cadena pesada humana no reordenados y los segmentos génicos de cadena ligera kappa humana no reordenados del ratón son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana, respectivamente, de un anticuerpo, y en el que el ratón no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que sea capaz de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera ratón se proporciona en su genoma de línea germinal.

También se hace referencia a un ratón de ingeniería genética que expresa un repertorio limitado de cadenas ligeras quiméricas inversas (variables humanas, constantes de ratón) asociadas con una diversidad de cadenas pesadas quiméricas inversas (variables humanas, constantes de ratón). En diversas realizaciones, los segmentos de gen de cadena ligera κ endógenos del ratón se eliminan y se reemplazan por dos regiones de cadena ligera humanas reordenadas, unidas operativamente al gen Cκ endógeno de ratón. En realizaciones para maximizar la hipermutación somática de la región de cadena ligera humana reordenada, se mantienen el potenciador intrónico κ de ratón y el potenciador 3' κ de ratón. En diversas realizaciones, el ratón también comprende un locus de cadena ligera λ no funcional, o una eliminación del mismo o una eliminación que hace que el locus sea incapaz de formar una cadena ligera λ.

También se hace referencia a un ratón diseñado genéticamente que, en diversos casos, comprende un locus de región variable de cadena ligera que carece de segmentos de gen V_L y J_L de cadena ligera de ratón endógenos y que comprende una región variable de cadena ligera humana reordenada, en un caso, una secuencia de V_L/J_L humana reordenada, unida operativamente a una región constante de ratón, de modo que el locus es capaz de experimentar hipermutación somática, y de modo que el locus expresa una cadena ligera que comprende la secuencia de V_L/J_L humana unida a una región constante de ratón. Por lo tanto, en diversos casos, el locus comprende un potenciador 3' κ de ratón, que se correlaciona con un nivel normal o de tipo silvestre de hipermutación somática.

El ratón diseñado genéticamente en diversas realizaciones, cuando se inmuniza con un antígeno de interés, genera

linfocitos B que presentan una diversidad de reordenaciones de regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina humanas que se expresan y funcionan con dos cadenas ligeras reordenadas, Incluyendo las realizaciones en las que dos cadenas ligeras comprenden regiones variables de cadena ligera humanas que comprenden, por ejemplo, de 1 a 5 mutaciones somáticas. En diversas realizaciones, las cadenas ligeras humanas expresadas de este modo son capaces de asociarse y expresarse con cualquier región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana expresada en el ratón.

Además de los ratones diseñados genéticamente que comprenden un repertorio limitado de cadenas ligeras de inmunoglobulina (dos segmentos de gen V_L humanos y cinco segmentos de gen J_L humanos) como se describe en el presente documento, también se describen en el presente documento otros animales no humanos modificados genéticamente que comprenden un solo segmento de gen V_L humano o no más de dos segmentos de gen V_L humanos. En algunos casos, dichos animales no humanos comprenden una sola región V_L humana reordenada compuesta de una secuencia de V_LJ_L humana reordenada. En algunos casos, dichos animales no humanos comprenden no más de dos segmentos de gen V_L humanos y dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 segmentos de gen J_L humanos. En diversos casos, los segmentos de genes humanos están unidos operativamente a una región constante de cadena ligera no humana, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de ratón o de rata.

El animal no humano proporcionado es un ratón. Para los animales no humanos roedores cuyas células ES genéticamente modificables adecuadas no estén fácilmente disponibles, se emplean otros métodos para obtener un animal no humano que comprenda las modificaciones genéticas según lo descrito en el presente documento. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, modificar el genoma de una célula no ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un animal no humano en las condiciones adecuadas para formar un embrión.

[Eliminado]

En algunas realizaciones, el ratón empleado es de una cepa C57BL seleccionada entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, y C57BL/Ola. En algunas determinadas realizaciones, un ratón de la presente invención es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/Svlm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing *et al*., 1999, “Mammalian Genome” 10:836; Auerbach *et al*., 2000, *Biotechniques* 29(5):1024-1028, 1030, 1032). En algunas determinadas realizaciones, un ratón modificado genéticamente empleado en la presente invención es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En algunas determinadas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En algunas determinadas realizaciones, una cepa 129 de la mezcla según lo descrito en el presente documento es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En alguna realización, un ratón empleado en la presente invención es de una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En algunas realizaciones, un ratón empleado en la presente invención es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

[Eliminado]

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

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

Se han publicado varias técnicas de generación de fragmentos de anticuerpos biespecíficos a partir de cultivos de células recombinantes. Sin embargo, la síntesis y expresión de proteínas de unión biespecíficas ha sido problemática, en parte debido a problemas asociados con la identificación de una cadena ligera adecuada que pueda asociarse y expresarse con dos cadenas pesadas diferentes, y en parte debido a problemas de aislamiento. En diversas realizaciones, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento proporcionan la ventaja de los anticuerpos biespecíficos de longitud completa que no requieren modificaciones especiales para mantener la estructura de inmunoglobulina tradicional al aumentarse la estabilidad/interacción de los componentes (FIG. 7A). En diversas realizaciones, dichas modificaciones han resultado ser complicadas y han servido como un obstáculo para el desarrollo de la tecnología de anticuerpos biespecíficos y su uso potencial en el tratamiento de enfermedades humanas. Por lo tanto, en diversas realizaciones, al proporcionar una estructura de inmunoglobulina natural (es decir, de longitud completa) que tiene la propiedad añadida de múltiples especificidades, los anticuerpos biespecíficos de longitud completa mantienen sus funciones efectoras críticas de las que carecen los fragmentos biespecíficos anteriores, y además, proporcionan agentes terapéuticos que demuestran el importante parámetro farmacocinético de una semivida más larga.

Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento permiten que un ratón modificado genéticamente seleccione, mediante procesos naturales, una cadena ligera adecuada que pueda asociarse y expresarse con más de una cadena pesada, incluyendo las cadenas pesadas que están mutadas somáticamente (por ejemplo, maduradas por afinidad). Las secuencias de V_L y V_H humanas de los linfocitos B adecuados de ratones inmunizados según lo descrito en el presente documento que expresan anticuerpos madurados por afinidad que tienen cadenas pesadas quiméricas inversas (es decir, variables humanas y constantes de ratón) se pueden identificar y clonar en fase en un vector de expresión con una secuencia génica de región constante humana adecuada (por ejemplo, una IgG1 humana). Se pueden preparar dos de dichas construcciones, de modo que cada construcción codifica un dominio variable de cadena pesada humano que se une a un epítopo diferente. Uno de los V_L humanos (por ejemplo, Vκ1-39Jκ5 humano o Vκ3-20Jκ1 humano), en la secuencia de la línea germinal o de un linfocito B en el que la secuencia ha sido mutada somáticamente, puede fusionarse en fase con un gen de región constante humano adecuado (por ejemplo, un gen constante κ humano). Estas tres construcciones completamente humanas, pesadas y ligeras, pueden colocarse en una célula adecuada para la expresión. La célula expresará dos especies principales: una cadena pesada homodimérica con la cadena ligera idéntica y una cadena pesada heterodimérica con la cadena ligera idéntica. Para permitir una separación fácil de estas especies principales, una de las cadenas pesadas se modifica para omitir un determinante de unión a la proteína A, que da lugar a una afinidad diferencial de una proteína de unión homodimérica de una proteína de unión heterodimérica. Las composiciones y los métodos que abordan este problema se describen en USSN 12/832.838, presentada el 25 de junio de 2010, titulado "Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format", publicado como el documento US 2010/0331527A1.

También se hace referencia a una proteína de unión al epítopo, en la que las secuencias de V_L y V_H humanas se derivan de ratones descritos en el presente documento que se han inmunizado con un antígeno que comprende un epítopo de interés.

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

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

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

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

En un caso, la segunda región C_H3 es de una IgG4 humana modificada, y además comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I según EU).

Un método de producción de una proteína de unión al epítopo que se une a más de un epítopo es inmunizar un primer ratón de acuerdo con la invención con un antígeno que comprende un primer epítopo de interés, en el que el ratón comprende un locus de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno que no contiene un V_L de ratón endógeno que es capaz de reordenar y formar una cadena ligera, en el que el locus de la región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón endógeno es una sola región V_L humana reordenada unida operativamente al gen de la región constante de cadena ligera endógeno del ratón, y la región V_L humana reordenada se selecciona entre un Vκ1-39Jκ5 humano y un Vκ3-20Jκ1 humano, y los segmentos de gen V_H de ratón endógenos han sido reemplazados en su totalidad o en parte por segmentos de gen V_H humano, de modo que las cadenas pesadas de inmunoglobulina producidas por el ratón son única o esencialmente cadenas pesadas que comprenden dominios variables humanos y dominios constantes de ratón. Cuando se inmuniza, dicho ratón creará un anticuerpo quimérico inverso, que comprenderá solo uno de los dos dominios variables de cadena ligera humanos (por ejemplo, uno de Vκ1-39Jκ5 humano o Vκ3-20Jκ1 humano). Una vez que se identifica un linfocito B que codifica una V_H que se une al epítopo de interés, la secuencia de nucleótidos de la V_H (y, opcionalmente, la V_L) se puede recuperar (por ejemplo, mediante PCR) y se puede clonar en una construcción de expresión en fase con un dominio constante de inmunoglobulina humana adecuado. Este proceso se puede repetir para identificar un segundo dominio V_H que se una a un segundo epítopo, y se puede recuperar una segunda secuencia del gen V_H y clonarla en un vector de expresión en fase a un segundo dominio constante de inmunoglobulina adecuado. El primer y el segundo dominio constante de

inmunoglobulina pueden tener el mismo isotipo o uno diferente, y uno de los dominios constantes de inmunoglobulina (pero no el otro) puede modificarse como se describe en el presente documento o en el documento US 2010/0331527A1, y la proteína de unión al epítopo puede expresarse en una célula adecuada y aislarse en función de su afinidad diferencial por la proteína A en comparación con una proteína de unión al epítopo homodimérica, por ejemplo, como se describe en el documento US 2010/0331527 A1.

En una realización, se proporciona un método de generación de una proteína de unión al epítopo biespecífica, que comprende identificar una primera secuencia de nucleótidos V_H humana (V_H1) madurada por afinidad (por ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) de un ratón como se describe en el presente documento, identificar una segunda secuencia de nucleótidos V_H humana madurada por afinidad (por ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) (V_H2) de un ratón como se describe en el presente documento, clonar V_H1 en fase con una cadena pesada humana que carece de una modificación del determinante de la proteína A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar la cadena pesada 1 (HC1), clonar V_H2 en fase con una cadena pesada humana que comprende un determinante de la proteína A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar la cadena pesada 2 (HC2), introducir un vector de expresión que comprende HC1 y el mismo o un vector de expresión diferente que comprende HC2 en una célula, de manera que la célula también expresa una cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende un Vκ1-39 humano /Jκ5 humano o un Vκ3-20 humano/Jκ1 humano fusionado a un dominio constante de cadena ligera humano, lo que permite a la célula expresar una proteína de unión al epítopo biespecífica que comprende un dominio V_H codificado por V_H1 y un dominio V_H codificado por V_H2, y aislar la proteína de unión al epítopo biespecífica en función de su capacidad diferencial para unirse a la proteína A en comparación con la proteína de unión al epítopo homodimérica monoespecífica. En una realización específica, HC1 es una IgG1, y HC2 es una IgG1 que comprende la modificación H95R (IMGT; H435R según EU) y además comprende la modificación Y96F (IMGT; Y436F según EU). En una realización, el dominio VH codificado por V_H1, el dominio V_H codificado por V_H2, o ambos, están mutados somáticamente.

Genes V_H humanos que se expresan con una V_L común

Se expresó una variedad de regiones variables humanas de anticuerpos madurados por afinidad generados contra cuatro antígenos diferentes con su cadena ligera afín, o al menos una de entre una cadena ligera humana seleccionada de Vκ1-39/Jκ5 humana, Vκ3-20/Jκ1 humana o VpreB/Jλ5 humana (véase el Ejemplo 1). Para los anticuerpos contra cada uno de los antígenos, las cadenas pesadas de alta afinidad mutadas somáticamente de diferentes familias de genes se emparejaron con éxito con las regiones Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenadas, y se secretaron de las células que expresaban las cadenas pesada y ligera. Para Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1, los dominios V_H derivados de las siguientes familias de genes V_H humanos expresaron favorablemente: 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51 y 6-1. Por lo tanto, un ratón que está diseñado para expresar un repertorio limitado de dominios V_L humanos de uno o ambos Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 generará una población diversa de dominios V_H humanos mutados somáticamente de un locus de V_H modificado para reemplazar segmentos de gen V_H de ratón por segmentos de gen V_H humanos.

Los ratones diseñados genéticamente para expresar cadenas pesadas de inmunoglobulina quiméricas inversas (variables humanas, constantes de ratón) asociadas con una única cadena ligera reordenada (por ejemplo, una Vκ1-39/J o una Vκ3-20/J), cuando se inmunizaron con un antígeno de interés, generaron linfocitos B que comprendían una diversidad de reordenaciones de V_H humanas y expresaron una diversidad de anticuerpos específicos del antígeno de alta afinidad con diversas propiedades con respecto a su capacidad para bloquear la unión del antígeno a su ligando, y con respecto a su capacidad para unirse a variantes del antígeno (véanse los Ejemplos 5 a 10).

Por lo tanto, los ratones y los métodos descritos en el presente documento son útiles para generar y seleccionar dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana, Incluyendo los dominios variables de cadena pesada humanos mutados somáticamente, que resultan de una diversidad de reordenaciones, que presentan una amplia variedad de afinidades (incluyendo la presentación de una K_D de aproximadamente nanomolar o inferior), una amplia variedad de especificidades (incluyendo la unión a diferentes epítopos del mismo antígeno), y que se asocian y expresan con la misma o esencialmente la misma región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana.

Anticuerpos biespecíficos completamente humanos que tienen una cadena ligera común

Como primera etapa en diversas realizaciones, la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico que codifican cada uno de los dominios variables de cadena pesada humanos (y cualquier secuencia de ácido nucleico adicional que forma el anticuerpo biespecífico) se seleccionan de los anticuerpos monoclonales parentales que tienen características deseadas, tales como, por ejemplo, capaces de unirse a diferentes epítopos (véanse las FIG. 7A y 7B), con diferentes afinidades, etc. Normalmente, las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios variables de cadena pesada humanos se aíslan de ratones inmunizados, como se describe en el presente documento, para permitir que la fusión con regiones constantes de cadena pesada humanas sea adecuada para la administración a seres humanos. Se pueden realizar modificaciones adicionales en la/s secuencia/s mediante la introducción de mutaciones que añadan funcionalidad adicional al anticuerpo biespecífico, que incluyen, por ejemplo, aumentar la semivida en suero (por ejemplo, véase el documento US 7.217.797) y/o aumentar la citotoxicidad mediada por células dependientes de los anticuerpos (por ejemplo, véase el documento US 6.737.056). La introducción de mutaciones en

las regiones constantes de anticuerpos es conocida en la técnica. Además, parte del anticuerpo biespecífico puede prepararse de forma recombinante en cultivo celular y otra/s parte/s de la molécula puede/n prepararse mediante las técnicas mencionadas anteriormente.

Se han descrito varias técnicas para la producción de anticuerpos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, se producen anticuerpos quiméricos en ratones como se describe en el presente documento. Los anticuerpos pueden aislarse directamente de los linfocitos B de un ratón inmunizado (por ejemplo, véase el documento US 2007/0280945A1) y/o los linfocitos B del ratón inmunizado se pueden usar para preparar hibridomas (Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256:495-497). El ADN que codifica los anticuerpos (cadenas pesadas y/o ligeras humanas) de ratones como los descritos en el presente documento se aísla y se secuencia fácilmente usando técnicas convencionales. Los hibridomas y/o linfocitos B derivados de ratones como los descritos en el presente documento sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células hospedadoras que, de lo contrario, no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas.

En diversas realizaciones, tras el aislamiento del ADN, y la selección de la primera y de la segunda secuencia de ácido nucleico que codifican el primer y segundo dominio variable de cadena pesada humanos que tienen las especificidades/afinidades deseadas, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de cadena ligera humano (una secuencia reordenada de la línea germinal o una secuencia de cadena ligera aislada de un ratón como se describe en el presente documento), las tres secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas se expresan para formar el anticuerpo biespecífico usando técnicas recombinantes que están ampliamente disponibles en la técnica. A menudo, el sistema de expresión de elección incluirá un vector de expresión de células de mamífero y un hospedador, de modo que el anticuerpo biespecífico esté adecuadamente glicosilado (por ejemplo, en el caso de los anticuerpos biespecíficos que comprenden dominios de anticuerpo que están glicosilados). Sin embargo, las moléculas también pueden producirse en los sistemas de expresión procariotas. Normalmente, la célula hospedadora se transformará con el ADN que codifica el primer dominio variable de cadena pesada humano, el segundo dominio variable de cadena pesada humano, el dominio de cadena ligera humano en un solo vector o vectores independientes. Sin embargo, es posible expresar el primer dominio variable de cadena pesada humano, el segundo dominio variable de cadena pesada humano y el dominio de cadena ligera humano (los componentes del anticuerpo biespecífico) en sistemas de expresión independientes y acoplar los polipéptidos expresados *in vitro*. En diversas realizaciones, el dominio de cadena ligera humano comprende una secuencia de la línea germinal. En diversas realizaciones, el dominio de cadena ligera humano comprende no más de una, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro o no más de cinco hipermutaciones somáticas con la secuencia variable de cadena ligera del dominio de cadena ligera.

En diversas realizaciones, el/los ácido/s nucleico/s (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifican las dos cadenas pesadas y la cadena ligera humana única se insertan en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) y/o para la expresión. Muchos vectores están disponibles, y en general, incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. Cada componente puede seleccionarse individualmente o basarse en una elección de célula hospedadora u otro criterio determinado experimentalmente. Se conocen varios ejemplos de cada componente en la técnica.

En general, los vectores de expresión y clonación contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente a las secuencias de ácido nucleico que codifican cada uno o todos los componentes del anticuerpo biespecífico. Se conoce bien un gran número de promotores, reconocidos por una diversidad de células huésped potenciales. Estos promotores se unen operativamente al ADN codificante del anticuerpo biespecífico eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector.

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levaduras, hongos, insectos, planta, animal, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica los componentes del anticuerpo biespecífico. Los vectores de expresión adecuados para diversas realizaciones incluyen aquellos que proporcionan la expresión transitoria en células de mamíferos de ADN que codifica el anticuerpo biespecífico. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficazmente en una célula hospedadora, de manera que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza altos niveles de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Los sistemas de expresión transitorios, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula hospedadora, permiten la identificación positiva conveniente de los polipéptidos codificados por los ADN clonados, así como la selección rápida de anticuerpos biespecíficos que tienen especificidades/afinidades de unión deseadas o las características de migración del gel deseadas relativas a los anticuerpos parentales que tienen homodímeros del primer o segundo dominio variable de cadena pesada humanos.

En diversas realizaciones, una vez que el ADN que codifica los componentes del anticuerpo biespecífico se ensambla en el/los vector/es deseado/s como se ha descrito anteriormente, se introducen en una célula hospedadora adecuada para la expresión y recuperación. Las células hospedadoras transfectantes se pueden lograr usando técnicas convencionales conocidas en la técnica apropiadas para la célula hospedadora seleccionada (por ejemplo, electroporación, microinyección nuclear, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina, etc.).

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

Las células huésped de mamífero usadas para producir un anticuerpo biespecífico pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como de Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Los medios pueden completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros suplementos a concentraciones apropiadas como las conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tal como la temperatura, pH y similares, son, en diversas realizaciones, son las usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

El anticuerpo biespecífico se recupera en diversas realizaciones del medio de cultivo en forma de un polipéptido secretado, aunque también puede recuperarse del lisado de la célula hospedadora cuando se produce directamente sin una señal secretora. Si el anticuerpo biespecífico está unido a la membrana, se puede liberar de la membrana usando una solución detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100). Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento implican el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina y un segundo dominio C_H3 de inmunoglobulina, en el que el primer y el segundo dominio C_H3 de inmunoglobulina difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en el que al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido (véase el documento US 2010/0331527A1). En una realización, el primer dominio C_H3 de inmunoglobulina está unido a proteína A y el segundo dominio C_H3 de inmunoglobulina contiene una mutación que reduce o anula la unión a proteína A tal como una modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F según EU). Otras modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I según EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I según EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I según EU) en el caso de anticuerpos IgG4. Dentro del alcance de la presente invención se contemplan variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente.

Debido a la naturaleza doble de los anticuerpos biespecíficos (es decir, pueden ser específicos de diferentes epítopos de un polipéptido o pueden contener dominios de unión al antígeno específicos de más de un polipéptido diana, véase la FIG. 7B; véase también, por ejemplo, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al*., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244), ofrecen muchas ventajas útiles para la aplicación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden usarse para la citotoxicidad redirigida (por ejemplo, para destruir células tumorales), como adyuvante de vacuna, para administrar agentes trombolíticos a coágulos, para convertir profármacos activados por enzimas en un sitio diana (por ejemplo, un tumor), para el tratamiento de enfermedades infecciosas, dirigiendo los complejos inmunes a los receptores de la superficie celular, o para administrar inmunotoxinas a células tumorales.

Los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento también se pueden usar en varios métodos de

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

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la materia cómo hacer y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se ha intentado garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la materia cómo hacer y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se ha intentado garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, la temperatura se indica en grados centígrados, la presión está en o cerca de la atmosférica, las partes están en partes en peso, y el peso molecular es el peso molecular medio.

Ejemplo 1. Identificación de regiones V_H humanas que se asocian con regiones V_L humanas seleccionadas

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

Se conocen métodos para generar anticuerpos humanos en ratones modificados genéticamente (véase, por ejemplo, el documento US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®). La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón modificado genéticamente que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena ligera y pesada humanas unidas operativamente a los locus de región constante endógenos del ratón, de modo que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos producidos a partir de un ratón VELOCIMMUNE® es completamente humano. Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se describe a continuación, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para las características deseables, entre las que se incluyen la afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón se remplazan por una región constante humana deseada para generar un anticuerpo completamente humano que contiene un isotipo que no es de IgM, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo silvestre o modificadas. Aunque la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de diana residen en la región variable.

Se inmunizó un ratón VELOCIMMUNE® con un factor de crecimiento que potencia la angiogénesis (antígeno C) y se aislaron anticuerpos humanos específicos del antígeno y se secuenciaron para el uso del gen V usando técnicas convencionales reconocidas en la materia. Se clonaron los anticuerpos seleccionados en las regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas, y se seleccionaron 69 cadenas pesadas para emparejarse con una de las tres cadenas ligeras humanas: (1) la cadena ligera κ afín se unió a una región constante κ humana; (2) un Vκ1-39Jκ5 humano reordenado de la línea germinal se unió a una región constante κ humana; o (3) un Vκ3-20Jκ1 humano reordenado de la línea germinal se unió a una región constante κ humana. Se transfectó cada par de cadena pesada y cadena ligera simultáneamente en células CHO-K1 usando técnicas convencionales. La presencia de anticuerpo en el sobrenadante se detectó mediante IgG anti-humana en un ensayo de ELISA. Se determinó el título de anticuerpos (ng/ml) para cada par de cadena pesada/cadena ligera, y se compararon los títulos con las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada se emparejó con la cadena ligera afín) y se calculó el porcentaje del título nativo (Tabla 1). V_H: Gen de región variable de cadena pesada. ND: no se detectó expresión en las condiciones experimentales.

TABLA 1

V_H	Título de anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje de título nativo	
	LC afín	Vκ 1-39Jκ5	Vκ 3-20Jκ1	Vκ 1-39Jκ5	Vκ 3-20Jκ1
3-15	63	23	11	36,2	17,5
1-2	103	53	ND	51,1	-
3-23	83	60	23	72,0	27,5
3-33	15	77	ND	499,4	-
4-31	22	69	17	309,4	76,7

(continuación)

V_H	Título de anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje de título nativo	
	LC afín	Vκ 1-39Jκ5	Vκ 3-20Jκ1	Vκ 1-39Jκ5	Vκ 3-20Jκ1
3-7	53	35	28	65,2	53,1
-	22	32	19	148,8	89,3
1-24	3	13	ND	455,2	-
3-33	1	47	ND	5266,7	-
3-33	58	37	ND	63,1	-
-	110	67	18	60,6	16,5
3-23	127	123	21	96,5	16,3
3-33	28	16	2	57,7	7,1
3-23	32	50	38	157,1	119,4
-	18	45	18	254,3	101,7
3-9	1	30	23	2508,3	1900,0
3-11	12	26	6	225,9	48,3
1-8	16	ND	13	-	81,8
3-33	54	81	10	150,7	19,1
-	34	9	ND	25,9	-
3-20	7	14	54	203,0	809,0
3-33	19	38	ND	200,5	-
3-11	48	ND	203	-	423,6
-	11	23	8	212,7	74,5
3-33	168	138	182	82,0	108,2
3-20	117	67	100	57,5	86,1
3-23	86	61	132	70,7	154,1
3-33	20	12	33	60,9	165,3
4-31	69	92	52	133,8	75,0
3-23	87	78	62	89,5	71,2
1-2	31	82	51	263,0	164,6
3-23	53	93	151	175,4	285,4
-	11	8	17	75,7	151,4
3-33	114	36	27	31,6	23,4
3-15	73	39	44	53,7	59,6
3-33	1	34	16	5600,0	2683,3
3-9	58	112	57	192,9	97,6
3-33	67	20	105	30,1	157,0
3-33	34	21	24	62,7	70,4
3-20	10	49	91	478,4	888,2
3-33	66	32	25	48,6	38,2
3-23	17	59	56	342,7	329,8
-	58	108	19	184,4	32,9
-	68	54	20	79,4	29,9
3-33	42	35	32	83,3	75,4
-	29	19	13	67,1	43,9
3-9	24	34	29	137,3	118,4
3-30/33	17	33	7	195,2	43,1
3-7	25	70	74	284,6	301,6
3-33	87	127	ND	145,1	-
6-1	28	56	ND	201,8	-

(continuación)

V_H	Título de anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje de título nativo	
	LC afín	Vκ 1-39Jκ5	Vκ 3-20Jκ1	Vκ 1-39Jκ5	Vκ 3-20Jκ1
3-33	56	39	20	69,9	36,1
3-33	10	53	1	520,6	6,9
3-33	20	67	10	337,2	52,3
3-33	11	36	18	316,8	158,4
3-23	12	42	32	356,8	272,9
3-33	66	95	15	143,6	22,5
3-15	55	68	ND	123,1	-
-	32	68	3	210,9	10,6
1-8	28	48	ND	170,9	-
3-33	124	192	21	154,3	17,0
3-33	0	113	ND	56550,0	-
3-33	10	157	1	1505,8	12,5
3-33	6	86	15	1385,5	243,5
3-23	70	115	22	163,5	31,0
3-7	71	117	21	164,6	29,6
3-33	82	100	47	122,7	57,1
3-7	124	161	41	130,0	33,5

En un experimento similar, los ratones VELOCIMMUNE® se inmunizaron con varios antígenos diferentes y se probaron las cadenas pesadas seleccionadas de anticuerpos humanos específicos del antígeno para determinar su capacidad para aparearse con diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humanas reordenadas (como se ha descrito anteriormente). Los antígenos usados en este experimento incluyeron una enzima implicada en la homeostasis del colesterol (antígeno A), una hormona sérica implicada en la regulación de la homeostasis de la glucosa (antígeno B), un factor de crecimiento que potencia la angiogénesis (antígeno C) y un receptor de la superficie celular (antígeno D). Se aislaron anticuerpos específicos del antígeno de ratones de cada grupo de inmunización, y se clonaron y secuenciaron las regiones variables de cadena pesada y ligera. A partir de la secuencia de las cadenas pesada y ligera, se determinó el uso del gen V, y las cadenas pesadas seleccionadas se emparejaron con su cadena ligera afín o una región Vκ1-39Jκ5 humana de la línea germinal reordenada. Se transfectó cada par de cadenas pesada/ligera simultáneamente en células CHO-K1, y se detectó la presencia de anticuerpo en el sobrenadante mediante IgG anti-humana en un ensayo de ELISA. Se determinó el título de anticuerpo (µg/ml) para cada par de cadena pesada/cadena ligera, y se compararon los títulos con las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humanas con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada se emparejó con la cadena ligera afín) y se calculó el porcentaje del título nativo (Tabla 2). V_H: Gen de región variable de cadena pesada. Vκ: Gen de región variable de cadena ligera κ. ND: no se detectó expresión en las condiciones experimentales.

TABLA 2

Antígeno	Anticuerpo	V_H	Vκ	Título (µg/ml)			Porcentaje de título nativo
				V_H sola	V_H + Vκ	V_H + Vκ 1-39Jκ5	
A	320	1-18	2-30	0,3	3,1	2,0	66
	321	2-5	2-28	0,4	0,4	1,9	448
	334	2-5	2-28	0,4	2,7	2,0	73
	313	3-13	3-15	0,5	0,7	4,5	670
	316	3-23	4-1	0,3	0,2	4,1	2174
	315	3-30	4-1	0,3	0,2	3,2	1327
	318	4-59	1-17	0,3	4,6	4,0	86
B	257	3-13	1-5	0,4	3,1	3,2	104
	283	3-13	1-5	0,4	5,4	3,7	69
	637	3-13	1-5	0,4	4,3	3,0	70
	638	3-13	1-5	0,4	4,1	3,3	82
	624	3-23	1-17	0,3	5,0	3,9	79
	284	3-30	1-17	0,3	4,6	3,4	75

(continuación)

Antígeno	Anticuerpo	V_H	Vκ	Título (µg/ml)			Porcentaje de título nativo
				V_H sola	V_H + Vκ	V_H + Vκ 1-39Jκ5	
	653	3-33	1-17	0,3	4,3	0,3	7
	268	4-34	1-27	0,3	5,5	3,8	69
	633	4-34	1-27	0,6	6,9	3,0	44
C	730	3-7	1-5	0,3	1,1	2,8	249
	728	3-7	1-5	0,3	2,0	3,2	157
	691	3-9	3-20	0,3	2,8	3,1	109
	749	3-33	3-15	0,3	3,8	2,3	62
	750	3-33	1-16	0,3	3,0	2,8	92
	724	3-33	1-17	0,3	2,3	3,4	151
	706	3-33	1-16	0,3	3,6	3,0	84
	744	1-18	1-12	0,4	5,1	3,0	59
	696	3-11	1-16	0,4	3,0	2,9	97
	685	3-13	3-20	0,3	0,5	3,4	734
	732	3-15	1-17	0,3	4,5	3,2	72
	694	3-15	1-5	0,4	5,2	2,9	55
	743	3-23	1-12	0,3	3,2	0,3	10
D	742	3-23	2-28	0,4	4,2	3,1	74
	693	3-23	1-12	0,5	4,2	4,0	94
	136	3-23	2-28	0,4	5,0	2,7	55
	155	3-30	1-16	0,4	1,0	2,2	221
	163	3-30	1-16	0,3	0,6	3,0	506
	171	3-30	1-16	0,3	1,0	2,8	295
	145	3-43	1-5	0,4	4,4	2,9	65
	49	3-48	3-11	0,3	1,7	2,6	155
	51	3-48	1-39	0,1	1,9	0,1	4
	159	3-7	6-21	0,4	3,9	3,6	92
	169	3-7	6-21	0,3	1,3	3,1	235
	134	3-9	1-5	0,4	5,0	2,9	58
	141	4-31	1-33	2,4	4,2	2,6	63
	142	4-31	1-33	0,4	4,2	2,8	67

Los resultados obtenidos de estos experimentos demuestran que algunas cadenas pesadas de alta afinidad mutadas somáticamente de diferentes familias de genes pueden emparejarse con las regiones Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humanas reordenadas y ser secretadas de la célula como una molécula de anticuerpo normal. Como se muestra en la Tabla 1, el título de anticuerpos se aumentó para aproximadamente el 61 % (42 de 69) de las cadenas pesadas cuando se emparejaron con la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 humana reordenada y el 29 % (20 de 69) de las cadenas pesadas cuando se emparejaron con la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 humana reordenada en comparación con la cadena ligera afín del anticuerpo parental. Para aproximadamente el 20 % (14 de 69) de las cadenas pesadas, ambas cadenas ligeras de la línea germinal humanas reordenadas confirieron un aumento en la expresión en comparación con la cadena ligera afín del anticuerpo parental. Como se muestra en la Tabla 2, la región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada confirió un aumento en la expresión de varias cadenas pesadas específicas para un intervalo de diferentes clases de antígenos en comparación con la cadena ligera afín para los anticuerpos parentales. El título de anticuerpos se aumentó en más del doble para aproximadamente el 35 % (15/43) de las cadenas pesadas en comparación con la cadena ligera afín de los anticuerpos parentales. Para dos cadenas pesadas (315 y 316), el aumento fue superior a diez veces en comparación con el anticuerpo parental. Dentro de todas las cadenas pesadas que mostraron un aumento de la expresión en relación con la cadena ligera afín del anticuerpo parental, las cadenas pesadas de la familia tres (V_H3) están representadas en exceso en comparación con otras familias de genes de la región variable de cadena pesada. Esto demuestra una relación favorable de las cadenas pesadas V_H3 humanas para emparejarse con las cadenas ligeras de Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humanas reordenadas.

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

Se crearon varios vectores de dirección de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.586.251 y Valenzuela *et al*., (2003) "High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis", *Nature Biotech*. 21(6): 652-659) para modificar los clones 302 g12 y 254m04 (Invitrogen) del cromosoma artificial bacteriano (BAC) genómico de ratón. Usando estos dos clones de BAC, se diseñaron construcciones genómicas que contenían una sola región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada, y se insertaron en un locus de cadena ligera κ endógeno que se había modificado previamente para eliminar la región variable κ endógena y los segmentos génicos de unión.

Construcción de vectores de dirección de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. Se crearon tres regiones diferentes de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada usando técnicas convencionales de Biología molecular reconocidas en la materia. Los segmentos génicos variables humanos usados para construir estas tres regiones incluían la secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana reordenada, una secuencia de Vκ3-20Jκ1 humana reordenada y una secuencia de VpreBJλ5 humana reordenada.

Se creó un segmento de ADN que contenía el exón 1 (codificante del péptido líder) y el intrón 1 del gen Vκ3-7 de ratón mediante la síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies). Se incluyó parte de la región no traducida 5' hasta un sitio de enzima de restricción BlpI natural. Se amplificaron los exones de los genes Vκ1-39 y Vκ3-20 humanos mediante PCR a partir de genotecas de BAC genómicas humanas. Los cebadores directos tenían una extensión 5' que contenía el sitio del aceptor de corte y empalme del intrón 1 del gen Vκ3-7 de ratón. El cebador inverso usado para la PCR de la secuencia de Vκ1-39 humana incluía una extensión codificante de Jκ5 humano, mientras que el cebador inverso usado para la PCR de la secuencia de Vκ3-20 humana incluía una extensión codificante de Jκ1 humano. La secuencia de VpreBJλ5 humana se creó mediante síntesis *de novo* de ADN (Integrated DNA Technologies). Se amplificó una parte del intrón Jκ-Cκ humano que incluye el sitio donante de cortes y empalmes mediante PCR a partir del plásmido pBS-296-HA18-PIScel. El cebador de PCR directo incluía una extensión codificante de parte de una secuencia humana de Jκ5, Jκ1 o Jλ5. El cebador inverso incluía un sitio PI-SceI, que se diseñó previamente en el intrón.

El exón 1/intrón 1 de Vκ3-7 de ratón, los exones de cadena ligera variable humana y los fragmentos del intrón Jκ-Cκ humano se cosieron entre sí mediante PCR de extensión de solapamiento, se digirieron con BlpI y PI-SceI y se ligaron en el plásmido pBS-296-HA18-PIScel, que contenía el promotor del segmento de gen variable Vκ3-15 humano. Se reemplazó un casete de higromicina floxeado en el plásmido pBS-296-HA18-PIScel con un casete de higromicina flanqueado por sitios FRT flanqueado por sitios NotI y AscI. Se ligó el fragmento NotI/PI-SceI de este plásmido en BAC 254m04 de ratón modificado, que contenía parte del intrón Jκ-Cκ de ratón, el exón Cκ de ratón y aproximadamente 75 κb de secuencia genómica cadena abajo del locus κ de ratón, que proporcionó un brazo de homología 3' para la recombinación homóloga en células ES de ratón. A continuación, se ligó el fragmento de NotI/AscI de este BAC en BAC 302 g12 de ratón modificado, que contenía un casete de neomicina flanqueado por sitios FRT y aproximadamente 23 κb de secuencia genómica cadena arriba del locus κ endógeno para la recombinación homóloga en células ES de ratón.

Vector de dirección Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada (FIG. 1). Se introdujeron sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de una inserción de cadena ligera diseñada para la clonación en un vector de dirección: un sitio AscI en el extremo 5' y un sitio PI-SceI en el extremo 3'. Dentro del sitio AscI 5' y del sitio PI-SceI 3', la construcción de dirección de 5' a 3' incluía un brazo de homología 5' que contenía la secuencia 5' al locus endógeno de cadena ligera κ de ratón obtenido del clon 302 g12 de BAC de ratón, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por sitios FRT, una secuencia genómica que incluía el promotor de Vκ3-15 humano, una secuencia líder del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia intrónica del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, un marco abierto de lectura de la región de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contenía una parte del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia 3' del segmento de gen Jκ5 de ratón endógeno obtenido del clon 254m04 de BAC de ratón (Figura 1, medio). Los genes y/o las secuencias cadena arriba del locus endógeno de cadena ligera κ de ratón endógeno y cadena abajo del segmento de gen Jκ más 3' (por ejemplo, el potenciador 3' endógeno) no fueron modificados por la construcción de dirección (véase la Figura 1). La secuencia del locus de Vκ1-39Jκ5 humano diseñado se muestra en la SEQ ID NO: 1.

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

Los clones de células ES positivas se confirmaron mediante la detección TAQMAN™ y cariotipado usando sondas específicas para la región de cadena ligera Vκ1-39Jκ5 diseñada en el locus endógeno. En resumen, la sonda neoP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; SEQ ID NO: 8) que se une dentro del gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (CCATTATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC; SEQ ID NO: 9) que se une dentro de la secuencia del intrón 3' a la secuencia líder de Vκ3-7 de ratón, y la sonda 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT; SEQ ID NO: 10) que se une dentro del marco abierto de lectura de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada. Luego se usaron clones de células ES positivas para implantarlos en ratones hembra y generar una camada de crías que expresara la región de cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal.

Como alternativa, las células ES portadoras de la región de cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada se transfectan con una construcción que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina flanqueado por sitios FRT introducido mediante la construcción de dirección. Opcionalmente, el casete de neomicina se extrae mediante reproducción en ratones que expresan la FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina queda retenido en los ratones.

Vector de dirección Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada (FIG. 2). De forma similar, se creó un locus de cadena ligera diseñado que expresaba una región de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada usando una construcción de dirección que incluía, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contenía la secuencia 5' al locus de cadena ligera κ endógeno de ratón obtenido del clon 302 g12 de BAC de ratón, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por sitios FRT, una secuencia genómica que incluía el promotor de Vκ3-15 humano, Una secuencia líder del segmento de gen variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia intrónica del segmento de gen variable Vκ3-7 de ratón, un marco abierto de lectura de la región de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contenía una parte del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia 3' del segmento de gen Jκ5 de ratón endógeno obtenido del clon 254m04 de BAC de ratón (Figura 2, medio). La secuencia del locus de Vκ3-20Jκ1 humano diseñado se muestra en la SEQ ID NO: 11.

La inserción dirigida de la región de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada en el ADN de BAC se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores ubicados en secuencias dentro de la región de cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia intrónica 3' a la secuencia líder de Vκ3-7 de ratón se confirmó con los cebadores ULC-m1F (SEQ ID NO: 2) y ULC-m1R (SEQ ID NO: 3). El marco abierto de lectura de la región Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; SEQ ID NO: 12) y 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; SEQ ID NO: 13). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEQ ID NO: 6) y neoR (SEQ ID NO: 7). Luego se usó ADN de BAC dirigido para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas con el fin de generar ratones quiméricos que expresaran la cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 humana de la línea germinal reordenada.

Los clones de células ES positivas se confirmaron mediante la detección TAQMAN™ y cariotipado usando sondas específicas para la región de cadena ligera Vκ3-20Jκ1 diseñada en el locus endógeno de cadena ligera κ. En resumen, la sonda neoP (SEQ ID NO: 8) que se une dentro del gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (SEQ ID NO: 9) que se une dentro de la secuencia líder de Vκ3-7 de ratón y la sonda 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG; SEQ ID NO: 14) que se une dentro del marco abierto de lectura de Vκ3-20Jκ1. Luego se usaron clones de células ES positivas para implantarlos en ratones hembra. Una camada de cachorros que expresaban la región de cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana.

Como alternativa, las células ES portadoras de la región de cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana se pueden transfectar con una construcción que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina flanqueado por sitios FRT introducido mediante la construcción de dirección. Opcionalmente, el casete de neomicina se puede extraer mediante reproducción en ratones que expresan la FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina queda retenido en los ratones.

Vector de dirección de VpreBJλδ de la línea germinal humana reordenada (FIG. 3). De forma similar, se creó un locus de cadena ligera diseñado genéticamente que expresaba una región de VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada usando una construcción de dirección que incluía, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contenía la secuencia 5' al locus de cadena ligera κ endógeno de ratón obtenido del clon 302 g12 de BAC de ratón, un gen de resistencia a la neomicina flanqueado por sitios FRT, una secuencia genómica que incluía el promotor de Vκ3-15 humano, Una secuencia líder del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia intrónica del segmento génico variable Vκ3-7 de ratón, un marco abierto de lectura de la región de VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contenía una parte del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia 3' del segmento de gen Jκ5 de ratón endógeno obtenido del clon 254m04 de BAC de ratón (Figura 3, medio). La secuencia del locus de VpreBJλ5 humano diseñado genéticamente se muestra en SEQ ID NO: 15.

La inserción dirigida de la región de VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada en el ADN de BAC se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores ubicados en secuencias dentro de la región de cadena ligera de VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia intrónica 3' a la

secuencia líder de Vκ3-7 de ratón se confirmó con los cebadores ULC-m1 F (SEQ ID NO: 2) y ULC-m1 R (SEQ ID NO: 3). El marco abierto de lectura de la región VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1616-h1F (TGTCCTCGGC CCTTGGA; SEQ ID NO: 16) y 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCCT; SEQ ID NO: 17). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEQ ID NO: 6) y neoR (SEQ ID NO: 7). Luego se usó ADN de BAC dirigido para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas con el fin de generar ratones quiméricos que expresaran la cadena ligera de VpreBJλ5 humana de la línea germinal reordenada.

Los clones de células ES positivas se confirman mediante la detección TAQMAN™ y cariotipado usando sondas específicas para la región de cadena ligera VpreBJλ5 diseñada en el locus endógeno de cadena ligera κ. En resumen, la sonda neoP (SEQ ID NO: 8) que se une dentro del gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1P (SEQ ID NO: 9), que se une dentro de la secuencia líder de lgVκ3-7 de ratón, y la sonda 1616h1 P (ACAATCCGCC TCACCTGCAC CCT; SEQ ID NO: 18) que se une dentro del marco abierto de lectura de VpreBJλ5 humano. Luego se usaron clones de células ES positivas para implantarlos en ratones hembra y generar una camada de crías que expresara la región de cadena ligera de la línea germinal.

Como alternativa, las células ES portadoras de la región de cadena ligera de VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada se transfectan con una construcción que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina flanqueado por sitios FRT introducido mediante la construcción de dirección. Opcionalmente, el casete de neomicina se extrae mediante reproducción con ratones que expresan la FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina queda retenido en los ratones.

Ejemplo 3. Generación de ratones que expresan una sola cadena ligera humana reordenada

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.*, (2007) “F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses”, *Nature Biotech*. 25(1): 91-99. VELOCIMICE® que porta independientemente una región de cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 humana de la línea germinal diseñada genéticamente, una región de cadena ligera Vκ3-20Jκ1 o una región de cadena ligera VpreBJλ5 se identifican mediante el genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al*., *supra*) que detecta la presencia de la única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

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

Citometría de flujo. La expresión de la región de cadena ligera humana reordenada en el repertorio normal de anticuerpos de ratones de cadena ligera común se validó mediante el análisis de la expresión de κ y λ de inmunoglobulina en esplenocitos y sangre periférica de ratones de cadena ligera común. Se prepararon suspensiones celulares de bazos extraídos y de sangre periférica ratones de tipo silvestre (n = 5), heterocigotos de cadena ligera común de Vκ1-39Jκ5 (n = 3), homocigotos de cadena ligera común de Vκ1-39Jκ5 (n = 3), heterocigotos de cadena ligera común de Vκ3-20Jκ1 (n = 2) y homocigotos de cadena ligera común de Vκ3-20Jκ1 (n = 2) usando métodos convencionales, y se tiñeron con $CD19^+$, $Ig\lambda^+$ e $Ig\kappa^+$ usando anticuerpos marcados con fluorescencia (BD Pharmigen).

En resumen, se incubaron 1 x 10^6 células con CD16/CD32 anti-ratón (clon 2.4G2, BD Pharmigen) en hielo durante 10 minutos, seguido del marcaje con el siguiente cóctel de anticuerpos durante 30 minutos en hielo: CD19 anti-ratón conjugado con APC (clon 1D3, BD Pharmigen), CD3 anti-ratón conjugado con PerCP-Cy5.5 (clon 17A2, BioLegend), Igκ anti-ratón conjugado con FITC (clon 187.1, BD Pharmigen), Igλ anti-ratón conjugado con PE (clon RML-42, BioLegend). Después de la tinción, se lavaron las células y se fijaron en formaldehído al 2 %. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo LSRII y se analizaron con FlowJo. Selección: linfocitos B totales ($CD19^+CD3^-$), linfocitos B $Ig\kappa^+$ ($Ig_\kappa{}^+Ig\lambda^-CD19^+CD3^-$), linfocitos B $Ig\lambda^+$ ($Ig\kappa^-Ig\lambda^+CD19^+CD3^-$). Los datos obtenidos de muestras de sangre y esplenocitos demostraron resultados similares. La Tabla 3 muestra el porcentaje de linfocitos B positivos en $CD19^+$ de la sangre periférica de un ratón representativo de cada grupo que son Igλ+, $Ig\kappa^+$, o $Ig\lambda^+Ig\kappa^+$. En la Figura 4, se muestra el porcentaje de linfocitos B $CD19^+$ en sangre periférica de ratones de tipo silvestre (WT) y ratones homocigotos para la cadena ligera común de Vκ1-39Jκ5 o Vκ3-20Jκ1.

TABLA 3

Ratón	Linfocitos B $CD19^+$		
	$Ig\lambda^+$	$Ig\kappa^+$	$Ig\lambda^+Ig\kappa^+$
Tipo silvestre	4,8	93	0,53
Vκ 1-39Jκ5	1,4	93	2,6
Vκ 3-20Jκ1	4,2	88	6

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

En resumen, se purificaron linfocitos B CD19$^+$ de los bazos de ratones de tipo silvestre, ratones homocigotos para un reemplazo de cadena pesada del ratón y locus de región variable de cadena ligera κ por los correspondientes locus de región variable de cadena pesada y ligera κ humana (Hκ), así como ratones homocigotos y heterocigotos para cada región de cadena ligera humana reordenada (Vκ1-39Jκ5 o Vκ3-20Jκ1) usando microperlas de CD19 de ratón (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN total se purificó a partir de linfocitos B CD19$^+$ usando el κit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y el ARN genómico se eliminó usando un tratamiento en columna con ADNasa sin ARNasa (Qiagen). Se transcribieron 200 ng de ARNm de forma inversa en ADNc usando el κit de síntesis de ADNc First Stand (Invitrogen) y el ADNc resultante se amplificó con la mezcla maestra de PCR universal de Taqman (Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron usando el sistema de detección de secuencias ABI 7900 (Applied Biosystems) usando cebadores y sondas Taqman MGB que abarcaban (1) la unión de Vκ-Jκ para ambas cadenas ligeras comunes; (2) el gen Vκ solo (es decir, Vκ1-39 y Vκ3-20); y (3) la región Cκ de ratón. La Tabla 4 muestra las secuencias de los cebadores y las sondas empleados para este ensayo. La expresión relativa se normalizó con respecto a la expresión de la región Cκ de ratón. Los resultados se muestran en la FIG. 5A, 5B y 5C.

TABLA 4

Región	Descripción del cebador/de la sonda (5'-3')	SEQ ID NO:
Unión de Vκ1-39Jκ5	(Codificante) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	19
	(No codificante) GTTTAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	20
	(Sonda) CCTCCGATCA CCTTC	21
Vκ1-39	(Codificante) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	22
	(No codificante) ATGGGACCCC ACTTTGCA	23
	(Sonda) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	24
Unión de Vκ3-20Jκ1	(Codificante) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	25
	(No codificante) TGATTTCCAC CTTGGTCCCT T	26
	(Sonda) TAGCTCACCT TGGACGTT	27
Vκ3-20	(Codificante) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	28
	(No codificante) GACCCACTGC CACTGAACCT	29
	(Sonda) CCACTGGCAT CCC	30
Cκ del ratón	(Codificante) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	31
	(No codificante) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	32
	(Sonda) ACCAAGGACG AGTATGAA	33

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

En resumen, la β-galactosidasa (Sigma) se emulsionó en adyuvante titermax (Sigma), según las instrucciones del fabricante. Se inmunizaron ratones de tipo silvestre, homocigotos de tipo silvestre (n = 7), homocigotos de cadena ligera común de Vκ1-39Jκ5 (n = 2) y homocigotos de cadena ligera común de Vκ1-20Jκ1 (n = 5) mediante inyección subcutánea con 100 µg de β-galactosidasa/Titermax. Los ratones recibieron un refuerzo mediante inyección subcutánea dos veces, en un intervalo de 3 semanas, con 50 µg de β-galactosidasa/Titermax. Tras el segundo refuerzo, se extrajo sangre de los ratones anestesiados usando un sangrado retroorbitario en tubos separadores de suero (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para medir los anticuerpos IgM o IgG anti-galactosidasa, se recubrieron las placas de ELISA (Nunc) con 1 µg/ml de β-galactosidasa durante la noche a 4 ºC. El exceso de antígeno se lavó antes del bloqueo con PBS con BSA al 1 % durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones en serie de suero a las placas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente antes del lavado. Las placas se incubaron luego con anti-IgM conjugado con HRP (Southern Biotech) o anti-IgG (Southern Biotech) durante una hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado, las placas se revelaron con sustrato TMB (BD Biosciences). Las reacciones se detuvieron con ácido sulfúrico 1 N y se leyó la DO_{450} usando un lector de placas Victor X5 (Perκin Elmer). Se analizaron los datos con GraphPad Prism, y la señal se calculó como la dilución del suero que es dos veces superior al fondo. Los resultados se muestran en la FIG. 6A y 6B.

Como se muestra en este ejemplo, la proporción de células κ/λ B en los compartimentos esplénico y periférico de ratones de cadena ligera común de Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1 demostró un patrón de tipo casi silvestre (Tabla 3 y Figura 4). Sin embargo, los ratones de cadena ligera común DE VpreBJλ5 demostraron menos linfocitos B periféricos, de los cuales aproximadamente el 1-2 % expresan la región de cadena ligera humana diseñada genéticamente (datos no mostrados). Los niveles de expresión de las regiones de cadena ligera humana de Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1

reordenadas desde el locus endógeno de cadena ligera κ se elevaron en comparación con un locus endógeno de cadena ligera κ que contenía un reemplazo completo de los segmentos de los genes Vκ y Jκ de ratón por los segmentos de los genes Vκ y Jκ humanos (FIG. 5A, 5B y 5C). Los niveles de expresión de la región de cadena ligera humana reordenada de VpreBJλ5 demostraron una alta expresión similar del locus endógeno de cadena ligera κ en ratones heterocigotos y homocigotos (datos no mostrados). Esto demuestra que, en competencia directa con λ, κ, o ambos locus de cadena ligera endógenos de ratón, una única secuencia de V_L/J_L humana reordenada puede rendir mejor que la expresión a nivel de tipo silvestre del locus de cadena ligera κ endógeno, y dar lugar a una frecuencia de linfocitos B esplénicos y sanguíneos normal. Además, los ratones toleraron bien la presencia de un locus de cadena ligera κ diseñado genéticamente con una secuencia de Vκ1-39Jκ5 humana o Vκ3-20Jκ1 humana, y parecieron funcionar de forma natural al representar una parte sustancial del repertorio de cadenas ligeras del componente humoral de la respuesta inmunitaria (FIG. 6A y 6B).

Ejemplo 4. Reproducción de ratones que expresan una sola cadena ligera de la línea germinal humana reordenada

Este ejemplo describe otras varias cepas de ratones modificados genéticamente que pueden reproducirse con cualquiera de los ratones de cadena ligera común descritos en el presente documento para crear múltiples cepas de ratones modificados genéticamente que albergan múltiples locus de inmunoglobulina modificados genéticamente.

Desactivación de Igλ endógeno (KO). Para optimizar el uso del locus de cadena ligera diseñada genéticamente, los ratones portadores de una de las regiones de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se reproducen con otro ratón que contiene una eliminación en el locus de cadena ligera λ endógeno. De esta manera, la progenie obtenida expresará, como su única cadena ligera, la región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada como se describe en el Ejemplo 2. La reproducción se realiza mediante técnicas convencionales reconocidas en la materia y, como alternativa, por un criador comercial (por ejemplo, The Jackson Laboratory). Se analizan las cepas de ratón portadoras de un locus de cadena ligera diseñado genéticamente y una eliminación del locus de cadena ligera λ endógeno para detectar la presencia de la única región de cadena ligera y la ausencia de cadenas ligeras λ de ratón endógenas.

Locus de cadena pesada endógeno humanizado. Se cruzan ratones portadores de un locus de cadena ligera de la línea germinal humana diseñado genéticamente con ratones que contienen un reemplazo del locus de gen variable de cadena pesada de ratón endógeno por el locus del gen variable de cadena pesada humano (véase el documento US 6.596.541; el ratón VELOCIMMUNE®, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). El ratón VELOCIMMUNE® comprende un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada humanas unidas operativamente a los locus de región constante endógenos del ratón, de modo que el ratón produce anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada humana y una región constante de cadena pesada de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos se aísla y se une operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada humanas. El ADN se expresa luego en una célula capaz de expresar la cadena pesada completamente humana del anticuerpo.

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

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

Tras el cruce de los ratones que contienen la región de cadena ligera humana diseñada genéticamente con varias cepas deseadas que contienen modificaciones y eliminaciones de otros locus de Ig endógenos (como se describe en el Ejemplo 4), los ratones seleccionados pueden inmunizarse con un antígeno de interés.

En general, se expone un ratón VELOCIMMUNE® que contiene una de las regiones de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada a un antígeno, y se obtienen células linfáticas (tales como linfocitos B) del suero de los animales. Las células linfáticas se fusionan con una estirpe celular de mieloma para preparar estirpes celulares de hibridoma inmortales, y dichas estirpes celulares de hibridoma se analizan y se seleccionan para identificar estirpes celulares de hibridoma que produzcan anticuerpos que contengan regiones variables de cadena pesada humanas y cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenada que sean específicas del antígeno usado para la inmunización. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y la cadena ligera se aíslan y se unen a regiones constantes isotípicas deseables de cadena pesada y la cadena ligera. Debido a la presencia de las secuencias de ratón endógenas y a cualquier elemento adicional que actúe en *cis* presente en el locus endógeno, la cadena ligera única de cada anticuerpo puede estar mutada somáticamente. Esto añade una diversidad adicional al repertorio específico del antígeno que comprende una sola secuencia de cadena ligera y diversas secuencias de

cadenas pesadas. Las secuencias de anticuerpos clonadas resultantes se expresan posteriormente en una célula, tal como una célula CHO. Como alternativa, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos del antígeno o los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas se identifica directamente a partir de linfocitos específicos del antígeno.

Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para las características deseables, entre las que se incluyen la afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan por una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano que contiene una cadena pesada humana mutada somáticamente y una única cadena ligera derivada de una región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada de la invención. Las regiones constantes humanas adecuadas incluyen, por ejemplo, IgG1 o IgG4 de tipo silvestre o modificada.

Se inmunizaron cohortes separadas de ratones VELOCIMMUNE® que contenían un reemplazo del locus de cadena pesada de ratón endógeno por segmentos de genes V_H, D_H y J_H humanos y un reemplazo del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno por la región de cadena ligera humana de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal diseñada genéticamente o la región de cadena ligera humana de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal diseñada genéticamente (descritas anteriormente) con una proteína receptora de la superficie celular humana (Antígeno E). El antígeno E se administra directamente en la pata trasera de los ratones con seis inyecciones consecutivas cada 3-4 días. Se mezclan de dos a tres microgramos de antígeno E con 10 µg de oligonucleótido CpG (n.º de cat. tlrl-modn-oligonucleótido ODN1826; InVivogen, San Diego, CA) y 25 µg de Adju-Phos (adyuvante de gel de fosfato de aluminio, n.º de cat. H-71639-250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) antes de la inyección. Se administra un total de seis inyecciones antes del reclutamiento final del antígeno, que se administra de 3 a 5 días antes del sacrificio. Se recogen las hemorragias después de la 4ª y 6ª inyección, y se controla la respuesta inmunitaria del anticuerpo mediante un inmunoensayo convencional específico del antígeno.

Cuando se consigue una respuesta inmunitaria deseada, se recogen los esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para conservar su viabilidad y formar estirpes celulares de hibridoma. Las estirpes celulares de hibridoma se detectan y seleccionan para identificar estirpes celulares productoras de anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno E. Usando esta técnica, se obtienen varios anticuerpos de cadena ligera común específicos del y anti-antígeno E (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de cadena pesada humanos, el mismo dominio variable de cadena ligera humano y dominios constantes de ratón).

Como alternativa, los anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E se aíslan directamente de los linfocitos B positivos en el antígeno sin fusión con las células de mieloma, como se describe en el documento U.S. 2007/0280945A1. Usando este método, se obtuvieron varios anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseían dominios variables de cadena pesada humanos, ya sea una cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 humana diseñada por ingeniería genética o una región de cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 humana diseñada por ingeniería genética y dominios constantes humanos).

Las propiedades biológicas de los anticuerpos de cadena ligera común contra el antígeno E ilustrativos generados de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen en detalle en los siguientes apartados.

Ejemplo 6. Uso del segmento de gen de cadena pesada en anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno

Para analizar la estructura de los anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E humanos producidos, se clonaron y secuenciaron los ácidos nucleicos codificantes de las regiones variables de anticuerpos de cadena pesada. A partir de las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos predichas de los anticuerpos, se identificó el uso del gen para la región variable de cadena pesada (HCVR) de anticuerpos de cadena ligera común seleccionados obtenidos de ratones VELOCIMMUNE® inmunizados que contenían la cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 humana diseñada genéticamente o la región de cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 humana diseñada por ingeniería genética. Los resultados se muestran en las Tablas 5 y 6, que demuestran que los ratones de acuerdo con la invención generan anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno a partir de una variedad de segmentos de genes de cadena pesada humana, debido a una variedad de reordenaciones, cuando se emplea un ratón que expresa una cadena ligera de solo una cadena ligera derivada de Vκ1-39 humano o una cadena ligera derivada de Vκ3-20 humano. Los segmentos de gen V_H humano de las familias 2, 3, 4 y 5 se reordenaron con una variedad de segmentos de D_H humanos y segmentos de J_H humanos para producir anticuerpos específicos del antígeno.

TABLA 5

Vκ 1-39Jκ5

Anticuerpos de cadena ligera común

Anticuerpo	HCVR			Anticuerpo	HCVR		
	V_H	D_H	J_H		V_H	D_H	J_H
2952	2-5	6-6	1	6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1	6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1	2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5	2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4	3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4	3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4	5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4	6002	3-30	6-13	4
6011	3-23	7-27	4	6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4	6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4	6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4	6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4	6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4	6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4	6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4	6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4	6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4	2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4	2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5	2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5	3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5	3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2	3020	3-30	7-27	4
3013	3-30	5-12	4	3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4	3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1	3030	3-30	7-27	4
3043	3-30	6-6	3	3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4	5997	3-30	7-27	4
2949	3-30	6-6	5	6033	3-30	7-27	4
2950	3-30	6-6	5	3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5	6028	3-30	7-27	6
2978	3-30	6-6	5	3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5	3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5	6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5	6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5	6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5	6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5	6037	4-59	3-16	3
6004	3-30	6-6	5	2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5	3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5	3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5	6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5	6006	1-69	6-6	5
6023	3-30	6-6	5	6008	1-69	6-13	4

TABLA 6

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

Ejemplo 7. Determinación de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno mediante el ensayo LUMINEX™

Se probaron noventa y ocho anticuerpos de cadena ligera común humana generados contra el antígeno E para determinar su capacidad para bloquear la unión del ligando natural del antígeno E (ligando Y) al antígeno E en un ensayo basado en perlas.

El dominio extracelular (ECD) del antígeno E se conjugó con dos marcadores de epítopo myc y un marcador de histidina x6 (antígeno E-mmH) y se acopló con amina a microesferas carboxiladas a una concentración de 20 µg/ml en tampón MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y luego se desactivó la perla con Tris 1 M, pH 8,0, y luego se lavó en PBS con Tween-20 al 0,05 % (v/v). A continuación, se bloquearon las perlas con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 2 % (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa de filtro de 96 pocillos, se diluyeron sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno E 1:15 en tampón. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante simulado con los mismos componentes de medios que para el sobrenadante de anticuerpos. Se añadieron perlas marcadas con antígeno E a los sobrenadantes y se incubaron durante la noche a 4 ºC. La proteína de ligando Y biotinilada se añadió a una concentración final de 0,06 nM y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La detección del ligando Y biotinilado unido a perlas marcadas con antígeno E-myc-myc-6His se determinó con perlas marcadas con R-ficoeritrina conjugadas con estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD), a lo que le siguió la medición en un analizador basado en citometría de flujo LUMINEX™. Se restó la intensidad de fluorescencia media de fondo (IFM) de una muestra sin ligando Y de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo se calculó dividiendo la IFM sustraída del fondo de cada muestra entre el valor de control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante a 100.

En un experimento similar, los mismos 98 anticuerpos de cadena ligera común humana generados contra el antígeno E se probaron para determinar su capacidad para bloquear la unión del antígeno E a las perlas marcadas con el ligando Y.

En resumen, se acopló con amina el ligando Y a microesferas carboxiladas a una concentración de 20 µg/ml diluida en tampón MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y luego se desactivaron las perlas con Tris 1 M a pH 8 y después se lavaron en PBS con Tween-20 al 0,05 % (v/v). A continuación, se bloquearon las perlas con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 2 % (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa de filtro de 96 pocillos, se diluyeron sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno E 1:15 en tampón. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante simulado con los mismos componentes de medios que para el sobrenadante de anticuerpos. Se añadió un antígeno E-mmH biotinilado a una concentración final de 0,42 nM y se incubó durante la noche a 4 ºC. A continuación, se añadieron las perlas marcadas con el ligando Y a la mezcla de anticuerpo/antígeno E y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. La detección del antígeno E-mmH biotinilado unido a las perlas de ligando Y se determinó con R-ficoeritrina conjugada con estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD), a lo que le siguió la medición en un analizador basado en citometría de flujo LUMINEX™. Se restó la intensidad de fluorescencia media de fondo (IFM) de una muestra sin antígeno E de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo se calculó dividiendo la IFM sustraída del fondo de cada muestra entre el valor de control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante a 100.

Las Tablas 7 y 8 muestran el porcentaje de bloqueo del total de los 98 anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E probados en ambos ensayos LUMINEX™. ND: no determinado en las condiciones experimentales actuales.

TABLA 7

Vκ 1-39Jκ5 Anticuerpos de cadena ligera común		
Anticuerpo	% de bloqueo de las perlas marcadas con antígeno E	% de bloqueo de antígeno E en solución
2948	81,1	47,8
2948G	38,6	ND
2949	97,6	78,8
2949G	97,1	73,7
2950	96,2	81,9
2950G	89,8	31,4
2952	96,1	74,3
2952G	93,5	39,9
2954	93,7	70,1
2954G	91,7	30,1
2955	75,8	30,0
2955G	71,8	ND
2964	92,1	31,4
2964G	94,6	43,0
2978	98,0	95,1
2978G	13,9	94,1
2982	92,8	78,5
2982G	41,9	52,4
2985	39,5	31,2
2985G	2,0	5,0
2987	81,7	67,8
2987G	26,6	29,3
2996	87,3	55,3
2996G	95,9	38,4
2997	93,4	70,6
2997G	9,7	7,5
3004	79,0	48,4
3004G	60,3	40,7
3005	97,4	93,5
3005G	77,5	75,6
3010	98,0	82,6
3010G	97,9	81,0
3011	87,4	42,8
3011G	83,5	41,7
3012	91,0	60,8
3012G	52,4	16,8
3013	80,3	65,8
3013G	17,5	15,4
3014	63,4	20,7
3014G	74,4	28,5
3015	89,1	55,7
3015G	58,8	17,3
3016	97,1	81,6
3016G	93,1	66,4
3017	94,8	70,2
3017G	87,9	40,8

(continuación)

Vκ 1-39Jκ5 Anticuerpos de cadena ligera común		
Anticuerpo	% de bloqueo de las perlas marcadas con antígeno E	% de bloqueo de antígeno E en solución
3018	85,4	54,0
3018G	26,1	12,7
3019	99,3	92,4
3019G	99,3	88,1
3020	96,7	90,3
3020G	85,2	41,5
3021	74,5	26,1
3021G	81,1	27,4
3022	65,2	17,6
3022G	67,2	9,1
3023	71,4	28,5
3023G	73,8	29,7
3024	73,9	32,6
3024G	89,0	10,0
3025	70,7	15,6
3025G	76,7	24,3
3027	96,2	61,6
3027G	98,6	75,3
3028	92,4	29,0
3028G	87,3	28,8
3030	6,0	10,6
3030G	41,3	14,2
3032	76,5	31,4
3032G	17,7	11,0
3033	98,2	86,1
3033G	93,6	64,0
3036	74,7	32,7
3036G	90,1	51,2
3041	95,3	75,9
3041G	92,4	51,6
3042	88,1	73,3
3042G	60,9	25,2
3043	90,8	65,8
3043G	92,8	60,3

TABLA 8

Vκ3-20Jκ1 Anticuerpos de cadena ligera común		
Anticuerpo	% de bloqueo de las perlas marcadas con antígeno E	% de bloqueo de antígeno E en solución
2968	97,1	73,3
2968G	67,1	14,6
2969	51,7	20,3
2969G	37,2	16,5
2970	92,2	34,2
2970G	92,7	27,2
2971	23,4	11,6
2971G	18,8	18,9

(continuación)

Vκ3-20Jκ1 Anticuerpos de cadena ligera común		
Anticuerpo	% de bloqueo de las perlas marcadas con antígeno E	% de bloqueo de antígeno E en solución
2972	67,1	38,8
2972G	64,5	39,2
2973	77,7	27,0
2973G	51,1	20,7
2974	57,8	12,4
2974G	69,9	17,6
2975	49,4	18,2
2975G	32,0	19,5
2976	1,0	1,0
2976G	50,4	20,4

En el primer experimento LUMINEX™ descrito anteriormente, se probaron 80 anticuerpos de cadena ligera común que contenían la cadena ligera diseñada genéticamente con Vκ1-39Jκ5 para determinar su capacidad para bloquear la unión del ligando Y a las perlas marcadas con el antígeno E. De estos 80 anticuerpos de cadena ligera común, 68 demostraron un bloqueo >50 %, mientras que 12 demostraron un bloqueo <50 % (6 con un bloqueo del 25-50 % y 6 con un bloqueo <25 %). Para los 18 anticuerpos de cadena ligera común que contenían la cadena ligera diseñada genéticamente con Vκ3-20Jκ1, 12 demostraron un bloqueo >50 %, mientras que 6 demostraron <50 % de bloqueo (3 con un bloqueo del 25-50 % y 3 con un bloqueo <25 %) de la unión del ligando Y a las perlas marcadas con el antígeno E.

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

Los datos de las Tablas 7 y 8 establecen que las reordenaciones descritas en las Tablas 5 y 6 generaron anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno E que bloqueaban la unión del Ligando Y a su antígeno E receptor afín con diversos grados de eficacia, lo que coincide con los anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E de las Tablas 5 y 6 que comprenden anticuerpos con especificidad del epítopo solapante y no solapante con respecto al antígeno E.

Ejemplo 8. Determinación de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno mediante ELISA

Se probaron anticuerpos de cadena ligera común humanos generados contra el antígeno E para determinar su capacidad para bloquear la unión del antígeno E a una superficie recubierta con ligando Y en un ensayo de ELISA.

El ligando Y se recubrió sobre placas de 96 pocillos a una concentración de 2 µg/ml diluido en PBS y se incubó durante la noche, seguido de lavado cuatro veces en PBS con Tween-20 al 0,05 %. La placa luego se bloqueó con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 0,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) durante una hora a temperatura ambiente. En una placa separada, se diluyeron sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E 1:10 en tampón. Se usó un sobrenadante simulado con los mismos componentes de los anticuerpos como control negativo. El antígeno E-mmH (descrito anteriormente) se añadió a una concentración final de 0,150 nM y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la mezcla de anticuerpo/antígeno E-mmH a la placa que contenía el ligando Y y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La detección del antígeno E-mmH unido al ligando Y se determinó con peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con el anticuerpo anti-Penta-His (Qiagen, Valencia, CA) y se desarrolló mediante una respuesta colorimétrica convencional con sustrato tetrametilbencidina (TMB) (BD Biosciences, San Jose, CA) neutralizado por ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó a DO_{450} durante 0,1 s. Se restó la absorbancia de fondo de una muestra sin antígeno E de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo se calculó dividiendo la IFM sustraída del fondo de cada muestra entre el valor de control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante a 100.

Las Tablas 9 y 10 muestran el porcentaje de bloqueo del total de los 98 anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E probados en ambos ELISA. ND: no determinado en las condiciones experimentales actuales.

TABLA 9

Vκ1-39Jκ5

Anticuerpos de cadena ligera común

Anticuerpo	% de bloqueo de antígeno E en solución	Anticuerpo	% de bloqueo de antígeno E en solución
2948	21,8	3015	23,7
2948G	22,9	3015G	10,2
2949	79,5	3016	78,1
2949G	71,5	3016G	37,4
2950	80,4	3017	61,6
2950G	30,9	3017G	25,2
2952	66,9	3018	40,6
2952G	47,3	3018G	14,5
2954	55,9	3019	94,6
2954G	44,7	3019G	92,3
2955	12,1	3020	80,8
2955G	25,6	3020G	ND
2964	34,8	3021	7,6
2964G	47,7	3021G	20,7
2978	90,0	3022	2,4
2978G	90,2	3022G	15,0
2982	59,0	3023	9,1
2982G	20,4	3023G	19,2
2985	10,5	3024	7,5
2985G	ND	3024G	15,2
2987	31,4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13,9
2996	29,3	3027	61,4
2996G	ND	3027G	82,7
2997	48,7	3028	40,3
2997G	ND	3028G	12,3
3004	16,7	3030	ND
3004G	3,5	3030G	9,5
3005	87,2	3032	ND
3005G	54,3	3032G	13,1
3010	74,5	3033	77,1
3010G	84,6	3033G	32,9
3011	19,4	3036	17,6
3011G	ND	3036G	24,6
3012	45,0	3041	59,3
3012G	12,6	3041G	30,7
3013	39,0	3042	39,9
3013G	9,6	3042G	16,1
3014	5,2	3043	57,4
3014G	17,1	3043G	46,1

TABLA 10

Vκ3-20Jκ1

Anticuerpos de cadena ligera común

Anticuerpo	% de bloqueo de antígeno E en solución	Anticuerpo	% de bloqueo de antígeno E en solución
2968	68,9	2972G	35,7

Vκ3-20Jκ1

Anticuerpos de cadena ligera común

Anticuerpo	% de bloqueo de antígeno E en solución	Anticuerpo	% de bloqueo de antígeno E en solución
2968G	15,2	2973	20,7
2969	10,1	2973G	23,1
2969G	23,6	2974	ND
2970	34,3	2974G	22,0
2970G	41,3	2975	8,7
2971	6,3	2975G	19,2
2971G	27,1	2976	4,6
2972	9,6	2976G	26,7

Como se describe en este ejemplo, de los 80 anticuerpos de cadena ligera común que contenían la cadena ligera diseñada genéticamente con Vκ1-39Jκ5, se probó su capacidad para bloquear la unión del antígeno E a una superficie recubierta con ligando Y, 22 demostraron un bloqueo >50 %, mientras que 58 demostraron un bloqueo <50 % (20 con un bloqueo del 25-50 % y 38 con un bloqueo <25 %). Para los 18 anticuerpos de cadena ligera común que contenían la cadena ligera diseñada genéticamente con Vκ3-20Jκ1, uno demostró > 50% de bloqueo, mientras que 17 demostraron <50 % de bloqueo (5 con un bloqueo del 25-50 % y 12 con un bloqueo <25 %) de la unión del Antígeno E a la superficie marcada con el ligando Y.

Estos resultados también coinciden con la combinación de anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno E que comprende anticuerpos con especificidad del epítopo solapante y no solapante con respecto al antígeno E.

Ejemplo 9. Determinación de la afinidad de BIACORE™ por los anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno

Las constantes de disociación de equilibrio (K_D) para los sobrenadantes de anticuerpos seleccionados se determinaron mediante SPR (Resonancia de plasmones superficiales) usando un instrumento BIACORE™ T100 (GE Healthcare). Todos los datos se obtuvieron usando HBS-EP (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4), tanto en los tampones de procesamiento como de muestra, a 25 ºC. Se capturaron anticuerpos de muestras de sobrenadante en bruto en una superficie de chip del sensor CM5 previamente derivatizada con una alta densidad de anticuerpos anti-Fc humano usando química de acoplamiento de amina convencional. Durante la etapa de captura, se inyectaron los sobrenadantes a través de la superficie anti-Fc humano a un caudal de 3 µl/min, durante un total de 3 minutos. A la etapa de captura, le siguió una inyección de un tampón de procesamiento o analito a una concentración de 100 nM durante 2 minutos a un caudal de 35 µl/min. La disociación del antígeno del anticuerpo capturado se controló durante 6 minutos. El anticuerpo capturado se eliminó mediante una inyección breve de glicina 10 mM, pH 1,5. Se hizo doble referencia a todos los sensogramas restando los sensogramas de inyecciones de tampón de los sensogramas de analito, eliminando así los artefactos causados por la disociación del anticuerpo de la superficie de captura. Los datos de unión para cada anticuerpo se ajustaron a un modelo de unión 1:1 con transporte de masa usando el software de evaluación BIAcore T100 v2.1. Los resultados se muestran en las tablas 11 y 12.

TABLA 11

Vκ1-39Jκ5

Anticuerpos de cadena ligera común

Anticuerpo	Antígeno E 100 nM		Anticuerpo	Antígeno E 100 nM	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)		K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)
2948	8,83	28	3015	29,1	11
2948G	95,0	1	3015G	65,9	0
2949	3,57	18	3016	4,99	17
2949G	6,37	9	3016G	18,9	4
2950	4,91	17	3017	9,83	8
2950G	13,6	5	3017G	55,4	2
2952	6,25	7	3018	11,3	36
2952G	7,16	4	3018G	32,5	3
2954	2,37	24	3019	1,54	59
2954G	5,30	9	3019G	2,29	42

(continuación)

Vκ1-39Jκ5
Anticuerpos de cadena ligera común

Anticuerpo	Antígeno E 100 nM		Anticuerpo	Antígeno E 100 nM	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)		K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)
2955	14,4	6	3020	5,41	39
2955G	12,0	4	3020G	41,9	6
2964	14,8	6	3021	50,1	6
2964G	13,0	9	3021G	26,8	4
2978	1,91	49	3022	25,7	17
2978G	1,80	58	3022G	20,8	12
2982	6,41	19	3023	263	9
2982G	16,3	9	3023G	103	5
2985	64,4	9	3024	58,8	7
2985G	2,44	8	3024G	7,09	10
2987	21,0	11	3025	35,2	6
2987G	37,6	4	3025G	42,5	8
2996	10,8	9	3027	7,15	6
2996G	24,0	2	3027G	4,24	18
2997	7,75	19	3028	6,89	37
2997G	151	1	3028G	7,23	22
3004	46,5	14	3030	46,2	7
3004G	1,93	91	3030G	128	3
3005	2,35	108	3032	53,2	9
3005G	6,96	27	3032G	13,0	1
3010	4,13	26	3033	4,61	17
3010G	2,10	49	3033G	12,0	5
3011	59,1	5	3036	284	12
3011G	41,7	5	3036G	18,2	10
3012	9,71	20	3041	6,90	12
3012G	89,9	2	3041G	22,9	2
3013	20,2	20	3042	9,46	34
3013G	13,2	4	3042G	85,5	3
3014	213	4	3043	9,26	29
3014G	36,8	3	3043G	13,1	22

TABLA 12

Vκ3-20Jκ1
Anticuerpos de cadena ligera común

Anticuerpo	Antígeno E 100 nM		Anticuerpo	Antígeno E 100 nM	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)		K_D (nM)	T1/2 (min)
2968	5,50	8	2973	5,35	39
2968G	305	0	2973G	11,0	44
2969	34,9	2	2974	256	0
2969G	181	1	2974G	138	0
2970G	12,3	3	2975	38,0	2
2971G	32,8	22	2975G	134	1
2972	6,02	13	2976	6,73	10
2972G	74,6	26	2976G	656	8

Las afinidades de unión de los anticuerpos de cadena ligera común que comprenden las reordenaciones mostradas en las Tablas 5 y 6 varían, y casi todos presentan una K_D en el intervalo nanomolar. Los datos de afinidad coinciden

con los anticuerpos de cadena ligera común que resultan de la asociación combinatoria de dominios variables reordenados descritos en las Tablas 5 y 6 que son de alta afinidad, seleccionados clónicamente y mutados somáticamente. Junto con los datos mostrados anteriormente, los anticuerpos de cadena ligera común descritos en las Tablas 5 y 6 comprenden una colección de diversos anticuerpos de alta afinidad que muestran especificidad por uno o más epítopos en el antígeno E.

Ejemplo 10. Determinación de las especificidades de unión de los anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno mediante el ensayo LUMINEX™

Se probaron los anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E seleccionados para determinar su capacidad para unirse al ECD del antígeno E y las variantes de ECD del antígeno E, Incluyendo los ortólogo de mono cynomolgous (Antígeno E de *Mf*), que difiere de la proteína humana en aproximadamente el 10 % de sus restos de aminoácidos; un mutante por eliminación del Antígeno E que carece de los últimos 10 aminoácidos del extremo C-terminal del ECD (Antígeno E-ΔCT); y dos mutantes que contienen una sustitución de alanina en lugares sospechosos de interacción con el ligando Y (Antígeno E-Ala1 y Antígeno E-Ala2). Las proteínas del antígeno E se produjeron en células CHO y cada una contenía un marcador myc-myc-His C-terminal.

Para los estudios de unión, se capturaron la proteína ECD del antígeno E o la proteína variante (descrita anteriormente) de 1 ml de medio de cultivo mediante incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con 1 x 10^6 perlas microesféricas (LUMINEX™) recubiertas covalentemente con un anticuerpo monoclonal anti-myc (Acm 9E10, estirpe celular de hibridoma CRL-1729™; ATCC, Manassas, VA). A continuación, se lavaron las perlas con PBS antes de su uso. Se diluyeron sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E 1:4 en tampón, y se añadieron a placas de filtro de 96 pocillos. Se usó un sobrenadante simulado sin anticuerpo como control negativo. Las perlas que contenían las proteínas de antígeno E capturadas se añadieron luego a las muestras de anticuerpos (3000 perlas por pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 ºC. Al día siguiente, se lavaron las perlas de muestra y se detectó el anticuerpo de cadena ligera común unido con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina-R. La intensidad de fluorescencia de las perlas (se midieron aproximadamente 100 perlas para cada muestra de anticuerpo que se unía a cada proteína de Antígeno E) con un analizador basado en citometría de flujo LUMINEX™ y se registró la intensidad de fluorescencia media (IFM) para al menos 100 perlas contadas por interacción de perla/anticuerpo. Los resultados se muestran en las tablas 13 y 14.

TABLA 13

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Anticuerpo	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Antígeno E de *Mf*
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744

(continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Anticuerpo	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Antígeno E de *Mf*
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186

(continuación)

Anticuerpos de cadena ligera común Vκ1-39Jκ5					
Anticuerpo	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Antígeno E de *Mf*
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

TABLA 14

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

Los sobrenadantes del anticuerpo de cadena ligera común anti-antígeno E mostraron una alta unión específica a las perlas unidas al ECD del antígeno E. Para estas perlas, el sobrenadante simulado de control negativo dio como resultado una señal despreciable (<10 IFM) cuando se combinó con la muestra de perlas de ECD del antígeno E, mientras que los sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E mostraron una potente señal de unión (IFM media de 2.627) para 98 sobrenadantes de anticuerpo; IMF> 500 para 91/98 muestras de anticuerpos).

Como medida de la capacidad de los anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E seleccionados para identificar diferentes epítopos en el ECD del antígeno E, se determinó la unión relativa de los anticuerpos a las variantes. Las cuatro variantes de antígeno E se capturaron en las perlas LUMINEX™ anti-myc como se ha descrito anteriormente para los estudios de unión del ECD del antígeno E nativo, y se determinaron las proporciones de unión relativas $IFM_{variante}/IFM_{ECD\ de\ antígeno\ E}$). Para los 98 sobrenadantes de anticuerpos de cadena ligera común probados que se muestran en las Tablas 12 y 13, las proporciones medias ($IFM_{variante}/IFM_{ECD\ de\ antígeno\ E}$) difirieron para cada

variante, lo que probablemente refleja diferentes cantidades de captura de proteínas en las perlas (proporciones medias de 0,61, 2,9, 2,0 y 1,0 para antígeno E-ΔCT, Antígeno E-Ala1, Antígeno E-Ala2 y Antígeno E de *Mf*, respectivamente). Para cada variante de proteína, la unión de un subconjunto de los 98 anticuerpos de cadena ligera común probados mostró una unión muy reducida, lo que indica sensibilidad a la mutación que caracterizó una variante dada. Por ejemplo, 19 de las muestras de anticuerpos de cadena ligera común se unieron al antígeno E de *Mf* con $IFM_{variante}/IFM_{ECD\ de\ antígeno\ E}$ de < 8 %. Dado que muchos en este grupo incluyen anticuerpos de afinidad alta o moderadamente alta (5 con K_D <5 nM, 15 con K_D <50 nM), es probable que la señal más baja para este grupo se deba a las diferencias en la sensibilidad a la secuencia (epítopo) entre el ECD del antígeno E nativo y una variante dada en lugar de afinidades más bajas.

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

Ejemplo 11. Intercambio de cadenas ligeras en anticuerpos de cadena ligera común

Se probaron cadenas pesadas de los anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno seleccionado para determinar su unión al antígeno E después de reparar las cadenas pesadas con una cadena ligera de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal o una cadena ligera de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal diseñadas por ingeniería genética (como se describe en el Ejemplo 1).

En resumen, se transfectaron 247 cadenas pesadas de anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno E (Vκ1-39Jκ5 y Vκ3-20Jκ1) con una cadena ligera de Vκ1-39 de la línea germinal o una cadena ligera de Vκ3-20 de la línea germinal diseñadas por ingeniería genética y se volvieron a rastrear para determinar su unión al antígeno E mediante el ensayo LUMINEX™ (como se describe en el Ejemplo 7 y el Ejemplo 10). La unión al antígeno E fue confirmada por BIACORE™ (como se describe en el Ejemplo 9). Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Como se muestra en este ejemplo, veintiocho anticuerpos de cadena ligera común específicos del antígeno E fueron capaces de unirse al antígeno E cuando se repararon con una forma de la línea germinal de la cadena ligera.

TABLA 15

Cadena ligera original	Cadena ligera reparada	N.º probado	N.º de aglutinantes confirmados
1-39	1-39	198	23
3-20	3-20	49	5

Ejemplo 12. Uso de genes de cadena pesada y frecuencia de hipermutación somática en anticuerpos de cadena ligera común

Se compilaron secuencias de cadena pesada y ligera (> 6000) de anticuerpos generados en los ratones VELCOIMMUNE® (por ejemplo, documentos US 6.596.541 y US 7.105.348) con secuencias de cadenas pesadas y ligeras (>600) de anticuerpos de cadena ligera común obtenidos mediante un esquema de inmunización de múltiples antígenos, empleando ratones de cadena ligera diseñados genéticamente (descritos anteriormente) para comparar el uso del segmento génico de cadena pesada y las frecuencias de hipermutación somática de las cadenas de anticuerpos.

Uso del gen de cadena pesada. Se analizaron secuencias de cadena pesada y ligera obtenidas de ratones VELOCIMMUNE® que contenían un reemplazo del locus de cadena pesada de ratón endógeno por segmentos de genes V_H, D_H y J_H humanos y un reemplazo del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno por la región de cadena ligera humana de Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal diseñada genéticamente o la región de cadena ligera humana de Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal diseñada genéticamente (descritas en el Ejemplo 2) inmunizados con un receptor de la superficie celular humana (Antígeno E), un heterodímero de dos glicoproteínas de superficie celular humana (antígeno F), un receptor de citocinas humanas (antígeno G) y un antígeno de diferenciación tumoral humano (antígeno H) para determinar el uso del segmento de gen de cadena pesada y se registraron los segmentos V_H y de gen J_H. Los resultados se muestran en las Tablas 16-18. Los porcentajes de las Tablas 16-18 representan valores redondeados y, en algunos casos, pueden no ser iguales al 100 % cuando se suman.

La Tabla 16 muestra el porcentaje de uso de la familia de cadenas pesadas para los anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE® (VI), los anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE® que tienen una cadena ligera de Vκ1-39 afín (VI-Vκ1-39), los anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ1-39 (Vκ1-39), anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE® que tienen una cadena ligera de Vκ3-20 afín (VI-Vκ3-20) y anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ3-20 (Vκ3-20). La Tabla 17 muestra el porcentaje de uso de los genes V_H y J_H para anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE® (VI), los anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE® que tienen una cadena ligera de Vκ1-39 afín (VI-Vκ1-39), los anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ1-39 (Vκ1-39), anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE® que tienen una cadena ligera de Vκ3-20 afín (VI-Vκ3-20) y anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ3-20 (Vκ3-20). La Tabla 18 muestra el

porcentaje de uso del gen V_H para anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñada genéticamente con Vκ1-39 (ratones Vκ1-39) de cada grupo de inmunización (Antígenos E, F, G y H) y el porcentaje de uso del gen V_H para anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ3-20 (ratones Vκ3-20) de grupos de inmunización seleccionados (antígenos E y G).

Como se muestra en este ejemplo, el uso del gen de cadena pesada para los antígenos probados en ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ1-39Jκ5 se caracterizó por una preponderancia de los subgrupos de la familia III de V_H (V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-20, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33 y V_H3-48). El uso notable de otros subgrupos de la familia de V_H 1-18, V_H1-69, V_H2-5, V_H4-59 y V_H6-1. Para los antígenos probados en ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ3-20Jκ1, el uso del gen de cadena pesada se caracterizó por una preponderancia de los subgrupos de la familia III de V_H, familia IV de V_H y familia V de V_H (V_H3-11, V_H3-30, V_H3-33, V_H4-39, V_H4-59 y V_H5-51). El uso notable de otros subgrupos de la familia de V_H 1-18, V_H1-69, V_H2-70 y V_H6-1.

Frecuencia de hipermutación somática. Se alinearon las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos generados en los ratones VELCOIMMUNE® y los ratones de cadena ligera diseñados genéticamente (descritos anteriormente) con las secuencias de la línea germinal de acuerdo con el uso del gen de cadena pesada y ligera demostrado para cada cadena pesada y/o ligera. Se calcularon los cambios de aminoácidos para cada región marco conservada (FW) y región determinante de la complementariedad (CDR) tanto para la cadena pesada como ligera de cada secuencia. Los resultados se muestran en las Tablas 19-22. Los porcentajes de las Tablas 21-24 representan valores redondeados y, en algunos casos, pueden no ser iguales al 100 % cuando se suman.

La Tabla 19 muestra el número de cambios de aminoácidos (aa) observados en cada región FW y CDR de cadenas pesadas de anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE®, cadenas pesadas de anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente Vκ1-39 (ratones Vκ1-39) y cadenas pesadas de anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ3-20 (ratones Vκ3-20). La Tabla 20 muestra el número de cambios de aminoácidos (aa) observados en cada región FW y CDR de cadenas ligeras de anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE®, la cadena ligera de anticuerpos de ratones diseñados genéticamente con Vκ1-39 (ratones Vκ1-39) y la cadena ligera de anticuerpos de ratones diseñados genéticamente con Vκ3-20 (ratones Vκ3-20). La Tabla 21 muestra el número de cambios de aminoácidos (aa) observados en cada región FW y CDR de cadenas pesadas de anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ1-39 (ratones Vκ1-39) para grupos de inmunización seleccionados (Antígenos E, F y H). La Tabla 22 muestra el número de cambios de aminoácidos (aa) observados en cada región FW y CDR de cadenas pesadas de anticuerpos de ratones de cadena ligera diseñados genéticamente con Vκ3-20 (ratones Vκ3-20) para grupos de inmunización seleccionados (Antígenos E y G).

TABLA 16

Familia de V_H	VI	VI - Vκ1-39	Vκ1-39	VI - Vκ3-20	Vκ3-20
1	9,0	14,8	3,3	7,1	4,9
2	2,2	1,8	4,6	0	1,6
3	77,8	69,8	77,3	61,4	29,5
4	8,4	8,3	11,2	27,1	39,3
5	0,9	0	0,7	4,3	23,0
6	1,7	5,3	3,0	0	1,6

TABLA 17

Gen de V_H	VI	VI - Vκ1-39	Vκ1-39	VI - Vκ3-20	Vκ3-20
1-2	3,9	8,3	0	2,9	0
1-3	0	0	0	0	0
1-8	1,3	0,6	0	1,4	0
1-18	3,0	0,6	1,3	2,1	1,6
1-24	0,4	3,6	0	0,7	0
1-46	0,1	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0
1-69	0,3	1,8	2,0	0	3,3
2-5	1,9	0	4,6	0	0
2-26	0,2	1,8	0,0	0	0
2-70	0,1	0	0	0	1,6
3-7	3,0	14,8	0	1,4	0
3-9	8,5	3,6	29,6	16,4	0
3-11	5,4	10,7	0	7,1	1,6

(continuación)

Gen de V_H	Vl	Vl - Vκ1-39	Vκ1-39	Vl - Vκ3-20	Vκ3-20
3-13	3,2	1,8	0,7	2,1	0
3-15	4,0	4,7	0,3	0,7	0
3-20	1,0	0,6	0,3	5,0	0
3-21	0,8	0,6	0	2,1	0
3-23	20,4	8,9	3,3	8,6	0
3-30	17,6	4,1	35,2	12,9	1,6
3-33	12,6	14,8	0	5,0	26,2
3-43	0,2	0,6	0	0	0
3-48	0,8	1,2	7,2	0	0
3-53	0,3	3,6	0,3	0	0
3-64	0	0	0,3	0	0
3-72	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0
4-31	2,7	0	0,7	8,6	0
4-34	1,8	0,6	0,3	14,3	0
4-39	1,6	0,6	3,0	2,1	14,8
4-59	2,3	7,1	7,2	2,1	24,6
5-51	0,9	0	0,7	4,3	23,0
6-1	1,7	5,3	3,0	0	1,6
Gen de J_H	Vl	Vl - Vκ1-39	Vκ1-39	Vl - Vκ3-20	Vκ3-20
1	1,5	1,2	7,1	0	0
2	4,5	2,4	0,7	5,0	26,9
3	10,5	16,6	13,1	13,6	26,9
4	44,0	34,3	32,3	50,7	9,6
5	9,6	10,1	16,8	7,9	1,9
6	29,7	35,5	30,0	22,9	34,6

TABLA 18

Gen de V_H	Ratones Vκ1-39				Ratones Vκ3-20	
	Antígeno E	Antígeno F	Antígeno G	Antígeno H	Antígeno E	Antígeno G
1-2	0	0	0	0	0	0
1-3	0	0	0	0	0	0
1-8	0	0	0	0	0	0
1-18	0	0	0	8,3	0	3,1
1-24	0	0	0	0	0	0
1-46	0	0	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0	0
1-69	2,9	0	25,0	0	0	6,3
2-5	8,2	0	0	0	0	0
2-26	0	0	0	0	0	0
2-70	0	0	0	0	0	3,1
3-7	0	0	0	0	0	0
3-9	1,2	98,8	0	14,6	0	0
3-11	0	0	0	0	0	3,1
3-13	0,6	0	25,0	0	0	0
3-15	0	1,2	0	0	0	0
3-20	0	0	25,0	0	0	0
3-21	0	0	0	0	0	0

(continuación)

Gen de V_H	Ratones Vκ1-39				Ratones Vκ3-20	
	Antígeno E	Antígeno F	Antígeno G	Antígeno H	Antígeno E	Antígeno G
3-23	4,1	0	25,0	4,2	0	0
3-30	62,9	0	0	0	3,4	0
3-33	0	0	0	0	13,8	37,5
3-43	0	0	0	0	0	0
3-48	0,6	0	0	43,8	0	0
3-53	1,6	0	0	0	0	0
3-64	1,6	0	0	0	0	0
3-72	0	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0	0
4-31	0	0	0	4,2	0	0
4-34	0	0	0	2,1	0	0
4-39	5,3	0	0	0	31,0	0
4-59	11,8	0	0	4,2	3,4	43,8
5-51	1,2	0	0	0	48,3	0
6-1	0	0	0	18,8	0	3,1

TABLA 19

N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE®					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	63	32	36	26	12	82
1	23	32	41	31	22	17
2	9	25	17	23	27	1
3	4	10	5	16	13	0
4	0	1	1	3	12	0
>5	1	0	0	1	14	0

N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos de ratones Vκ1-39					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	8	34	30	9	37
1	25	26	35	34	19	54
2	9	44	23	20	33	9
3	1	19	8	12	22	0
4	0	3	0	5	11	0
>5	1	0	0	0	7	0

N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos de ratones Vκ3-20					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	57	8	54	16	8	93
1	41	43	34	39	21	7
2	2	25	10	18	20	0
3	0	15	2	21	13	0
4	0	10	0	3	20	0
>5	0	0	0	2	18	0

TABLA 20

N.º de cambios de aa	Cadenas ligeras de anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE®					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	24	49	60	33	23
1	24	20	34	31	27	38

(continuación)

N.º de cambios de aa	Cadenas ligeras de anticuerpos de ratones VELCOIMMUNE®					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
2	9	27	16	9	18	28
3	1	20	1	0	14	7
4	0	7	0	0	4	3
>5	1	1	0	0	3	0
N.º de cambios de aa	Cadenas ligeras de anticuerpos de ratones Vκ1-39					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	91	75	80	90	71	63
1	9	19	17	10	21	27
2	0	5	1	1	5	8
3	0	0	1	0	2	1
4	0	0	0	0	2	1
>5	0	0	0	0	0	0
N.º de cambios de aa	Cadenas ligeras de anticuerpos de ratones Vκ3-20					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	90	47	93	97	63	57
1	10	27	3	3	20	43
2	0	27	3	0	17	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
>5	0	0	0	0	0	0

TABLA 21

N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos anti-antígeno E de ratones Vκ1-39					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	75	8	49	41	14	36
1	21	25	33	35	25	52
2	4	43	14	18	28	12
3	0	20	4	5	16	0
4	0	5	0	1	12	0
>5	1	0	0	0	5	0
N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos anti-antígeno F de ratones Vκ1-39					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	52	0	6	6	2	15
1	35	24	32	35	15	78
2	11	59	46	22	49	7
3	0	17	16	24	29	0
4	0	0	0	12	4	0
>5	1	0	0	0	1	0
N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos anti-antígeno H de ratones Vκ1-39					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	54	21	29	33	4	77
1	17	35	50	27	6	23
2	23	21	15	21	25	0
3	6	21	4	15	27	0
4	0	2	2	2	15	0
>5	0	0	0	2	23	0

TABLA 22

N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos anti-antígeno E de ratones Vκ3-20					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	79	17	62	24	17	90
1	21	28	34	55	31	10
2	0	28	3	21	24	0
3	0	14	0	0	10	0
4	0	14	0	0	3	0
>5	0	0	0	0	14	0
N.º de cambios de aa	Cadenas pesadas de anticuerpos anti-antígeno G de ratones Vκ3-20					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	38	0	47	9	0	97
1	59	56	34	25	13	3
2	3	22	16	16	16	0
3	0	16	3	41	16	0
4	0	6	0	6	34	0
>5	0	0	0	3	22	0

Ejemplo 13. Afinidad de unión de anticuerpos biespecíficos con cadenas ligeras universales

Se construyeron anticuerpos biespecíficos completamente humanos a partir de regiones variables de cadena pesada humanas clonadas de anticuerpos de cadena ligera común anti-antígeno E monoespecíficos seleccionados (descritos en el Ejemplo 5) usando técnicas de ADN recombinante convencionales conocidas en la materia. La Tabla 23 muestra el emparejamiento de cadenas pesadas humanas (HC-1 y HC-2) de anticuerpos monoespecíficos parentales seleccionados; cada par empleado con una cadena ligera de Vκ1-39/Jκ1 humana reordenada de la línea germinal para la construcción de cada anticuerpo biespecífico.

La unión de los anticuerpos anti-antígeno E monoespecíficos biespecíficos o parentales con el dominio extracelular (ECD) del antígeno E se determinó usando un ensayo de biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real en un instrumento BIACORE™ 2000 (GE Healthcare). Se usó una superficie de sensor CM5 BIACORE™ derivada con anticuerpo monoclonal anti-c-myc específico (Clon n.º 9E10) usando química de EDC-NHS para capturar el ECD marcado con myc-myc-hexahistidina C-terminal de antígeno E (antígeno E-mmh). Se capturaron aproximadamente 190 RU de antígeno E-mmh en la superficie del sensor BIACORE™, seguido de la inyección de concentraciones de 300 nM y 50 nM de diferentes anticuerpos anti-antígeno E biespecíficos o monoespecíficos parentales a un caudal de 50 µl/min. El experimento se realizó a 25 ºC en un tampón de procesamiento de HBST (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v). Se registró la cantidad de anticuerpo que se unía a la superficie de antígeno E-mmh a una concentración de 300 nM tres segundos antes del final de la inyección del anticuerpo y se representó.

La Tabla 24 y la FIG. 8 exponen las respuestas de unión (unidades BIACORE™; RU) observadas para cada anticuerpo biespecífico (Ac Bs) y anticuerpo parental monoespecífico (Ac P-1, Ac P-2). Dado que cada anticuerpo se inyectó en condiciones de saturación sobre una superficie de antígeno E-mmh idéntica, la respuesta de unión refleja la estequiometría de unión para cada unión de anticuerpo a la superficie de captura de antígeno.

Como se muestra en este ejemplo, la respuesta de unión observada para cada anticuerpo biespecífico fue aproximadamente 2 veces superior a la respuesta de unión para cada anticuerpo monoespecífico parental (Tabla 24 y FIG. 8), demostrando la construcción funcional de anticuerpos biespecíficos usando cadenas pesadas de anticuerpos monoclonales específicos del antígeno y una cadena ligera común en la que cada brazo Fab de la molécula de anticuerpo biespecífico se une simultáneamente a distintos epítopos en el dominio extracelular de un receptor de superficie celular (Antígeno E; véase la FIG. 7B, parte inferior izquierda).

TABLA 23

Anticuerpo biespecífico	HC-1 parental	HC-2 parental
3108	2952	2978
3109	2978	3022
3111	2952	3005
3112	3022	3005

TABLA 24

Anticuerpo biespecífico	Respuesta de unión (RU)		
	Ac P-1	Ac P-2	BsAb
3108	236	229	485
3109	236	197	408
3111	202	229	435
3112	202	197	345

Ejemplo 14. Generación y análisis de ratones que expresan dos cadenas ligeras humanas

Usando los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 2, se construyeron dos locus de cadena ligera modificados por ingeniería genética adicionales que contenían dos segmentos de genes Vκ humanos (por ejemplo, un segmento de gen Vκ1-39 humano y de gen Vκ3-20 humano) (FIG. 9). Un locus de cadena ligera diseñado genéticamente contenía dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano en una configuración no reordenada (DLC-5J). El segundo locus de cadena ligera diseñado genéticamente contenía dos segmentos de gen Vκ humano y un segmento de gen Jκ humano en una configuración no reordenada (DLC-1J). Para cada uno de los dos locus de cadena ligera diseñados genéticamente adicionales, los segmentos de genes humanos estaban flanqueados en 3' con secuencias de señal de recombinación para permitir la reordenación *in vivo* de los segmentos de genes humanos de los linfocitos B.

Los clones de ADN de BAC modificados que contenían cada uno de los locus de cadena ligera diseñados genéticamente unidos operativamente a las secuencias de ratón (es decir, las secuencias cadena arriba y cadena abajo del locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina endógeno) se confirmaron mediante PCR usando cebadores ubicados en las secuencias dentro de cada locus de cadena ligera diseñado genéticamente que contenía los dos segmentos de gen Vκ humano seguidos de la electroporación en células ES para crear ratones que expresaran cualquiera de los dos segmentos de gen Vκ humano (como se ha descrito anteriormente). Los clones de células ES positivas que contienen cualquiera de los locus de cadena ligera de ingeniería descritos anteriormente se confirmaron mediante el cribado y cariotipo TAQMAN ™ usando sondas específicas para los locus de cadena de luz de ingeniería (como se describió anteriormente). Los clones de células ES confirmadas se usaron para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresan un dominio variable de cadena ligera humana fusionado con un dominio Cκ de ratón, denominado en el presente documento ratones de cadena ligera dual (DLC).

Como alternativa, las células ES que llevan el locus de cadena ligera diseñada pueden transfectarse con una construcción que exprese FLP para eliminar el casete de neomicina flanqueado por sitios FRT introducido por la construcción de dirección. Opcionalmente, el casete de neomicina se extrae mediante reproducción en ratones que expresan la FLP recombinasa (por ejemplo, documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina queda retenido en los ratones.

Citometría de flujo. Las poblaciones de linfocitos B y el desarrollo de linfocitos B en ratones DLC se validaron mediante análisis de citometría de flujo de preparaciones de esplenocitos y médula ósea. Se realizaron suspensiones celulares de ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano (n = 4), ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano y un segmento de gen Jκ humano (n = 4) y ratones de tipo silvestre (n = 4) usando métodos convencionales (descritos anteriormente) y se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia (como se describe en el Ejemplo 3).

En resumen, se incubaron 1 x 10^6 células con CD16/CD32 anti-ratón (clon 2.4G2, BD Pharmigen) en hielo durante 10 minutos, seguido del marcaje con el siguiente cóctel de anticuerpos durante 30 minutos en hielo: CD19 anti-ratón conjugado con APC-H7 (clon 1D3, BD Pharmigen), CD3 anti-ratón conjugado con Pacific Blue (clon 17A2, BioLegend), Igκ anti-ratón conjugado con FITC (clon 187.1, BD Pharmigen) o CD43 anti-ratón (clon 1B11, BioLegend), Igλ anti-ratón conjugado con PE (clon RML-42, BioLegend) o c-kit anti-ratón (clon 2B8, BioLegend), IgD anti-ratón conjugado con PerCP-Cy5.5 (BioLegend), IgM anti-ratón conjugado con PE-Cy7 (clon II/41, eBioscience), B220 anti-ratón conjugado con APC (clon RA3-6B2, eBioscience). Después de la tinción, se lavaron las células y se fijaron en formaldehído al 2 %. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo LSRII y se analizaron con FlowJo (Tree Star, Inc.). Selección: linfocitos B totales ($CD19^+CD3^-$), linfocitos B $Igκ^+$ ($Igκ^+Igλ/CD19^+CD3^-$), linfocitos B $Igλ^+$ ($Igκ^-$ $Igλ^+CD19^+CD3^-$). Los resultados para el compartimiento de médula ósea se muestran en la FIG. 10A-FIG. 12B. Los resultados para el compartimento esplénico se muestran en la FIG. 13A-FIG. 16.

Como se muestra en este ejemplo, los ratones DLC-5J demuestran poblaciones de linfocitos B normales dentro de los compartimentos esplénico y de la médula ósea (FIG. 10A-16). Los ratones DLC-5J demostraron poblaciones de linfocitos inmaduros, maduros y B pre/pro dentro del compartimiento de la médula ósea que son esencialmente iguales a las observadas en las camadas de tipo silvestre. De hecho, el locus DLC-5J era capaz de competir con el locus de cadena ligera λ endógeno para producir una proporción de κ:λ que era esencialmente la misma que la observada en los ratones de tipo silvestre (FIG. 14B). Además, los ratones DLC-5J demuestran un desarrollo normal de linfocitos B periféricos a medida que se produce la progresión de linfocitos B a través de varias etapas en el compartimento

esplénico (por ejemplo, inmaduros, maduros, T1, T2, T3, precursores de zona marginal, zona marginal, foliculares-I, foliculares-II, etc.) de una manera esencialmente igual a la observada en los ratones de tipo silvestre (FIG. 15A-16). Por el contrario, los ratones DLC-1J demostraron un número total más bajo de linfocitos B y un mayor uso de la cadena ligera λ en comparación con la cadena ligera κ diseñada (datos no mostrados).

Expresión doble de cadena ligera. La expresión de ambos segmentos de gen Vκ humano se analizó en ratones homocigotos usando un ensayo de PCR cuantitativo de acuerdo con el Ejemplo 3. En resumen, se purificaron linfocitos B $CD19^+$ de médula ósea y bazos enteros de ratones de tipo silvestre, ratones homocigotos para un reemplazo de cadena pesada del ratón y locus de región variable de cadena ligera κ por los correspondientes locus de región variable de cadena pesada y ligera κ humana (Hκ), así como ratones homocigotos para un locus de cadena ligera κ diseñado genéticamente que contiene dos segmentos de gen Vκ humano y cinco segmentos de gen Jκ humano (DLC-5J) o un segmento de gen Jκ humano (DLC-1J). La expresión relativa se normalizó con respecto a la expresión de la región Cκ de ratón (n = 3 a 5 ratones por grupo). Los resultados se muestran en la FIG. 17 y la FIG. 18.

La expresión de cadenas ligeras que contienen un segmento de gen Vκ3-20 humano o Vκ1-39 humano reordenado se detectó tanto en la médula ósea como en el bazo de ratones DLC-5J y DLC-1J (FIG. 17 y FIG. 18). En el compartimiento de la médula ósea, la expresión de ambas cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20 humano y derivadas de Vκ1-39 humano en ambas cepas de ratones DLC fue significativamente mayor en comparación con los ratones que comprendían un reemplazo del segmento de gen Vκ y Jκ de ratón por segmentos de genes Vκ y Jκ humanos correspondientes (Hκ; FIG. 17). La expresión de cadena ligera derivada de Vκ3-20 humano se observó de aproximadamente seis veces (DLC-5J) a quince veces (DLC-1J) más alta que en los ratones Hκ. Los ratones DLC-1J demostraron una expresión aproximadamente dos veces mayor de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20 humano frente a los ratones DLC-5J en el compartimento de la médula ósea. La expresión de cadena ligera derivada de Vκ1-39 humano se observó de aproximadamente seis veces (DLC-5J) a trece veces (DLC-1J) más alta que en ratones Hκ. Los ratones DLC-1J demostraron una expresión aproximadamente dos veces mayor de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39 humano frente a los ratones DLC-5J en el compartimento de la médula ósea.

En el compartimento esplénico, la expresión de cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20 humano y derivadas de Vκ1-39 humano en ambas cepas de ratones DLC fue significativamente superior en comparación con los ratones Hκ (FIG. 18). La expresión de cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20 humano se observó aproximadamente cuatro veces (DLC-5J) y ocho veces (DLC-1J) más alta que en ratones Hκ. Los ratones DLC-1J demostraron una expresión aproximadamente dos veces mayor de las cadenas ligeras derivadas de Vκ3-20 humano frente a los ratones DLC-5J en el compartimento esplénico. La expresión de cadena ligera derivada de Vκ1-39 humano se observó de aproximadamente cuatro veces (DLC-5J) a cinco veces (DLC-1J) más alta que en ratones Hκ. Los ratones DLC-1J demostraron una expresión similar de las cadenas ligeras derivadas de Vκ1-39 humano en comparación con los ratones DLC-5J en el compartimento esplénico.

Uso de V_L/J_L humano en ratones DLC-5J. Se analizaron ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados y cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados (DLC-5J) para determinar el uso del segmento de gen Vκ/Jκ humano en linfocitos B esplénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR).

En resumen, se extrajeron los bazos de ratones homocigotos DLC-5J (n = 3) y de tipo silvestre (n = 2) y se tamizaron en 10 ml de RPMI 1640 (Sigma) que contenía un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor usando portaobjetos de vidrio esmerilado para crear suspensiones unicelulares. Los esplenocitos se sedimentaron con una centrífuga (1200 rpm durante cinco minutos) y los glóbulos rojos se lisaron en 5 ml de tampón de lisado ACK (GIBCO) durante tres minutos. Los esplenocitos se diluyeron con PBS (Irvine Scientific), se filtraron con un filtro de células de 0,7 µm y se centrifugaron nuevamente para sedimentar las células, a lo que le siguió la resuspensión en 1 ml de PBS.

Se aisló el ARN de esplenocitos sedimentados usando el mini κit AllPrep DNA RNA (Qiagen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se realizó la RT-PCR en el ARN de los esplenocitos usando un sistema RACE 5' (amplificación rápida de extremos de ADNc) con cebadores específicos para el gen Cκ de ratón de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Los cebadores específicos para el gen Cκ de ratón fueron 3' mIgκC RACE1 (AAGAAGCACA CGACTGAGGC AC; SEQ ID NO: 34) y mIgκC3'-1 (OTOAOTGGAT GGTGGGAAGA TGGA; SEQ ID NO: 35). Los productos de PCR se purificaron en gel y se clonaron en el vector pCR®2.1-TOPO® (TOPO® TA Cloning® κit, Invitrogen) y se secuenciaron con cebadores M13 Directo (GTAAAACGAC GGCCAG; SEQ ID NO: 36) y M13 Inverso (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO: 37) ubicados dentro del vector en ubicaciones que flanqueaban el sitio de clonación. Se secuenciaron diez clones de cada muestra de bazo. Se compararon las secuencias con los conjuntos de inmunoglobulinas de ratón y ser humano del directorio de referencia IMGT V-QUEST determinan el uso de Vκ/Jκ. La Tabla 25 muestra las combinaciones de Vκ/Jκ para los clones seleccionados observados en los clones de RT-PCR de cada muestra de esplenocitos. La Tabla 26 muestra la secuencia de aminoácidos de las uniones de Vκ humano/Jκ humano y Jκ humano/Cκ de ratón de clones de RT-PCR seleccionados de ratones homocigotos DLC-5J. Las letras minúsculas indican mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la región variable o adiciones sin molde que resultan de las adiciones de N y/o P durante la recombinación.

Como se muestra en este ejemplo, los ratones homocigotos para dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados

y cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados (DLC-5J) operativamente unidos al gen Cκ de ratón pueden recombinar productivamente ambos segmentos de gen Vκ humano a múltiples segmentos de gen Jκ humano para producir un repertorio limitado de cadenas ligeras de inmunoglobulina. Entre las reordenaciones en ratones homocigotos DLC-5J mostrados en la Tabla 25, se observaron reordenaciones de Vκ/Jκ humanos únicas para Vκ1-39/Jκ2 (1), Vκ1-39/Jκ3 (1), Vκ3-20/Jκ1 (7), Vκ3-20/Jκ2 (4) y Vκ3-20/Jκ3 (1). Además, dichas reordenaciones únicas demostraron una diversidad de unión a través de la presencia de aminoácidos únicos dentro de la región CDR3 de cadena ligera (Tabla 26) que resulta de la mutación y/o la recombinación de los segmentos de los genes Vκ y Jκ humanos durante el desarrollo. Todos las reordenaciones mostraron una lectura funcional en la Cκ de ratón (Tabla 26).

En conjunto, estos datos demuestran que los ratones diseñados genéticamente para presentar una opción de no más de dos segmentos de gen V_L humano, ambos capaces de reordenarse (por ejemplo, con uno o más y, en algunas realizaciones, hasta cinco segmentos de gen J_L humano) y que codifican el dominio V_L humano de una cadena ligera de inmunoglobulina tienen números de linfocitos B y un desarrollo que es casi de tipo silvestre en todos los aspectos. Dichos ratones producen una colección de anticuerpos que tienen cadenas ligeras de inmunoglobulina que tienen uno de los dos posibles segmentos de gen V_L humano presente en la colección. Esta colección de anticuerpos es producida por el ratón en respuesta a la exposición al antígeno, y se asocia con una diversidad de cadenas pesadas quiméricas inversas (variable humana/constante de ratón).

TABLA 25

N.º ID del ratón	Genotipo	Clon	Combinación de Vκ/Jκ
1089451	DLC-5J	1-2	1-39/3
		1-4	3-20/2
		1-7	3-20/1
		1-8	3-20/2
1089452	DLC-5J	2-2	3-20/1
		2-3	3-20/1
		2-6	3-20/2
		2-8	3-20/2
		2-9	3-20/1
		2-10	1-39/2
1092594	DLC-5J	3-1	3-20/1
		3-2	3-20/1
		3-4	3-20/1
		3-6	3-20/3
		3-9	3-20/2
1092587	WT	1-1	19-93/1
		1-2	6-25/1
		1-3	4-91/5
		1-5	3-10/4
		1-6	4-86/4
		1-8	19-93/1
		1-10	19-93/2
1092591	WT	2-1	19-93/1
		2-3	6-20/5
		2-4	6-25/5
		2-5	1-117/1
		2-6	8-30/1
		2-7	8-19/2
		2-8	8-30/1
		2-10	1-117/1

TABLA 26

Clon	Vκ/Jκ	Secuencia de unión de hVκ/hJκ/mCκ (CDR3 subrayada, mIgκC en cursiva)	SEQ ID NO:
2-10	1-39/2	QPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK*RADAAPTVSI*	38
1-2	1-39/3	QPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK*RADAAPTVSI*	39
1-7	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPrTFGQGTKVEIK*RADAAPTVSI*	40
2-2	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSrTFGQGTKVEIK*RADAAPTVSI*	41
2-3	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK*RADAAPTVSI*	42
2-9	3-20/1	dPEDFAVYYCQQYGSSPrTFGQGTKVEIK*RADAAPTVSI*	44
3-1	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPrTFGQGTKVEIK*RADAAPTVSI*	45
3-2	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK*RADAAPTVSI*	46
3-4	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPPTFGQGTKVEIK*RADAAPTVSI*	47
3-9	3-20/2	EPEDFAVYYCQQYGSSPYTFGQGTKLEIK*RADAAPTVSI*	48
3-6	3-20/3	EPEDFAVYYCQQYGSSiFTFGPGTKVDIK*RADAAPTVSI*	49

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una secuencia de región variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana que comprende las etapas de:

(a) inmunizar un ratón modificado genéticamente con un antígeno, en el que el ratón modificado genéticamente genera anticuerpos cuando se inmuniza con el antígeno, y en el que el ratón modificado genéticamente tiene un genoma de línea germinal que comprende:

(i) dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana y cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón o rata, en el que los dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana son un Vκ1-39 humano y un Vκ3-20 humano, y los cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana son Jκ1 humano, Jκ2 humano, Jκ3 humano, Jκ4 humano y Jκ5 humano; y
(ii) uno o más segmentos de gen V_H de inmunoglobulina humana no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H de inmunoglobulina humana no reordenados, y uno o más segmentos de gen J_H de inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón;

en el que los segmentos de gen de cadena pesada humana no reordenados y los segmentos de gen de cadena ligera kappa humana no reordenados del ratón son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana, respectivamente, de un anticuerpo, y en el que el ratón no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que sea capaz de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera, y
(b) determinar una secuencia de región variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana que codifique un dominio variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina humana, respectivamente, de un anticuerpo que se una específicamente al antígeno y que haya sido generado por el ratón modificado genéticamente.

2. Un método para generar una secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana que comprende las etapas de:

(a) inmunizar un ratón modificado genéticamente con un antígeno de interés, en el que el ratón modificado genéticamente comprende en su genoma de línea germinal:

(i) exactamente dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana no reordenados y cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón en los locus endógenos de cadena ligera kappa del ratón, en el que los dos segmentos de gen Vκ de inmunoglobulina humana no reordenados son un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano, y los cinco segmentos de gen Jκ de inmunoglobulina humana no reordenados son Jκ1 humano, Jκ2 humano, Jκ3 humano, Jκ4 humano y Jκ5 humano; y
(ii) uno o más segmentos de gen V_H de inmunoglobulina humana no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H de inmunoglobulina humana no reordenados, y uno o más segmentos de gen J_H de inmunoglobulina humana no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón en los locus endógenos de cadena pesada de ratón;

en el que los segmentos génicos de cadena pesada y cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana no reordenados del ratón modificado genéticamente son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana, respectivamente, de un anticuerpo, y en el que el ratón modificado genéticamente no comprende segmentos de genes Vκ o Jκ endógenos de inmunoglobulina que son capaces de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina; y
(b) determinar una secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o ligera kappa de inmunoglobulina humana de un anticuerpo que se une específicamente al antígeno y que fue generado por el ratón modificado genéticamente.

3. El método de la reivindicación 2, en el que determinar la secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana comprende determinar una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana.

4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el genoma de la línea germinal del ratón modificado genéticamente comprende por orden: el segmento de gen Vκ1-39 humano, el segmento de gen Vκ3-20 humano, el segmento de gen Jκ1 humano, el segmento de gen Jκ2 humano, el segmento de gen Jκ3 humano, el segmento de gen Jκ4 humano y el segmento de gen Jκ5 humano.

5. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el ratón modificado genéticamente comprende un locus de cadena ligera λ de inmunoglobulina no funcional.

6. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el ratón modificado genéticamente no comprende un segmento de gen V_H de inmunoglobulina de ratón endógeno que sea capaz de reordenarse para formar una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina.

7. Un método para fabricar un anticuerpo que comprende:

(1) expresar en una célula individual:

(a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina, comprendiendo la primera secuencia de ácido nucleico una primera secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana, en la que la primera secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana se obtuvo a partir de un linfocito B de un ratón modificado genéticamente, en el que el ratón modificado genéticamente ha sido inmunizado con un primer antígeno de interés y el ratón modificado genéticamente comprende en su genoma de línea germinal:

(i) dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados y cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera, en el que los dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados son un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano, y en el que los cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados son un segmento de gen Jκ1 humano, un segmento de gen Jκ2 humano, un segmento de gen Jκ3 humano, un segmento de gen Jκ4 humano y un segmento de gen Jκ5 humano; y
(ii) uno o más segmentos de gen V_H humano no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H humano no reordenados y uno o más segmentos de gen J_H humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de ratón;

en el que los segmentos génicos de cadena pesada humana no reordenados y los segmentos génicos de cadena ligera kappa humana no reordenados del ratón modificado genéticamente son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana de un anticuerpo, respectivamente;
en el que el ratón modificado genéticamente no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que es capaz de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera; y
en el que la primera secuencia de región variable de cadena pesada humana codifica un primer dominio variable de cadena pesada humana que, con un dominio variable de cadena ligera kappa, reconoce el primer antígeno; y

(b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina, comprendiendo la segunda secuencia de ácido nucleico una secuencia de región variable de cadena ligera kappa humana unida operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera humana, en la que la secuencia de región variable de cadena ligera kappa humana comprende: un segmento de gen Vκ1-39 humano, un segmento de gen Vκ3-20 humano, o una versión hipermutada somáticamente de los mismos;

(2) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar un anticuerpo totalmente humano; y

(3) aislar el anticuerpo

8. El método de la reivindicación 7, en el que los dos segmentos de gen Vκ humanos no reordenados y los cinco segmentos de gen Jk humanos no reordenados del genoma de la línea germinal del ratón modificado genéticamente están unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera κ de ratón.

9. El método de la reivindicación 7, en el que los dos segmentos de gen Vκ humanos no reordenados y los cinco segmentos de gen Jk humanos no reordenados del genoma de línea germinal del ratón modificado genéticamente están presentes en un locus endógeno de cadena ligera de inmunoglobulina.

10. El método de la reivindicación 7, en el que el genoma de la línea germinal del ratón modificado genéticamente comprende por orden: el segmento de gen Vκ1-39 humano, el segmento de gen Vκ3-20 humano, el segmento de gen Jκ1 humano, el segmento de gen Jκ2 humano, el segmento de gen Jκ3 humano, el segmento de gen Jκ4 humano y el segmento de gen Jκ5 humano.

11. El método de la reivindicación 7, en el que el uno o más segmentos de gen V_H humanos no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H humanos no reordenados y uno o más segmentos de gen J_H humanos no reordenados del genoma de la línea germinal del ratón modificado genéticamente están presentes en el locus endógeno de cadena pesada de inmunoglobulina.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que la célula comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de inmunoglobulina humana, comprendiendo la tercera secuencia de ácido nucleico una segunda región variable de inmunoglobulina humana unida operativamente a una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana, en la que la secuencia de región variable de cadena pesada de la segunda inmunoglobulina humana se obtuvo a partir de un linfocito B de un segundo ratón modificado genéticamente, en el que el segundo ratón modificado genéticamente ha sido inmunizado con un segundo antígeno de interés y el segundo ratón modificado genéticamente comprende en su genoma de línea germinal:

(i) dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados y cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena ligera, en el que los dos segmentos de gen Vκ humano no reordenados son un segmento de gen Vκ1-39 humano y un segmento de gen Vκ3-20 humano, y en el que los cinco segmentos de gen Jκ humano no reordenados son un segmento de gen Jκ1 humano, un segmento de gen Jκ2 humano, un segmento de gen Jκ3 humano, un segmento de gen Jκ4 humano y un segmento de gen Jκ5 humano; y
(ii) uno o más segmentos de gen V_H humano no reordenados, uno o más segmentos de gen D_H humano no reordenados y uno o más segmentos de gen J_H humano no reordenados unidos operativamente a una secuencia de región constante de cadena pesada de ratón;

en el que los segmentos génicos de cadena pesada humana no reordenados y los segmentos génicos de cadena ligera kappa humana no reordenados del ratón modificado genéticamente son capaces de reordenarse y codificar dominios variables de cadena pesada humana y dominios variables de cadena ligera kappa humana de un anticuerpo, respectivamente;
en el que el ratón modificado genéticamente no comprende un segmento de gen Vκ endógeno que es capaz de reordenarse para formar una secuencia de región variable de cadena ligera; y
en el que la segunda secuencia de región variable de cadena pesada humana codifica un segundo dominio variable de cadena pesada humana que, con un dominio variable de cadena ligera kappa, reconoce el segundo antígeno; y

en el que:

- el primer y segundo antígeno son diferentes;
- la cadena ligera de inmunoglobulina codificada por dicha segunda secuencia de ácido nucleico, cuando se empareja con la primera cadena pesada de inmunoglobulina humana, se une específicamente al primer antígeno, y cuando se empareja con la segunda cadena pesada de inmunoglobulina se une específicamente al segundo antígeno; y
- el anticuerpo fabricado mediante el método es un anticuerpo biespecífico.

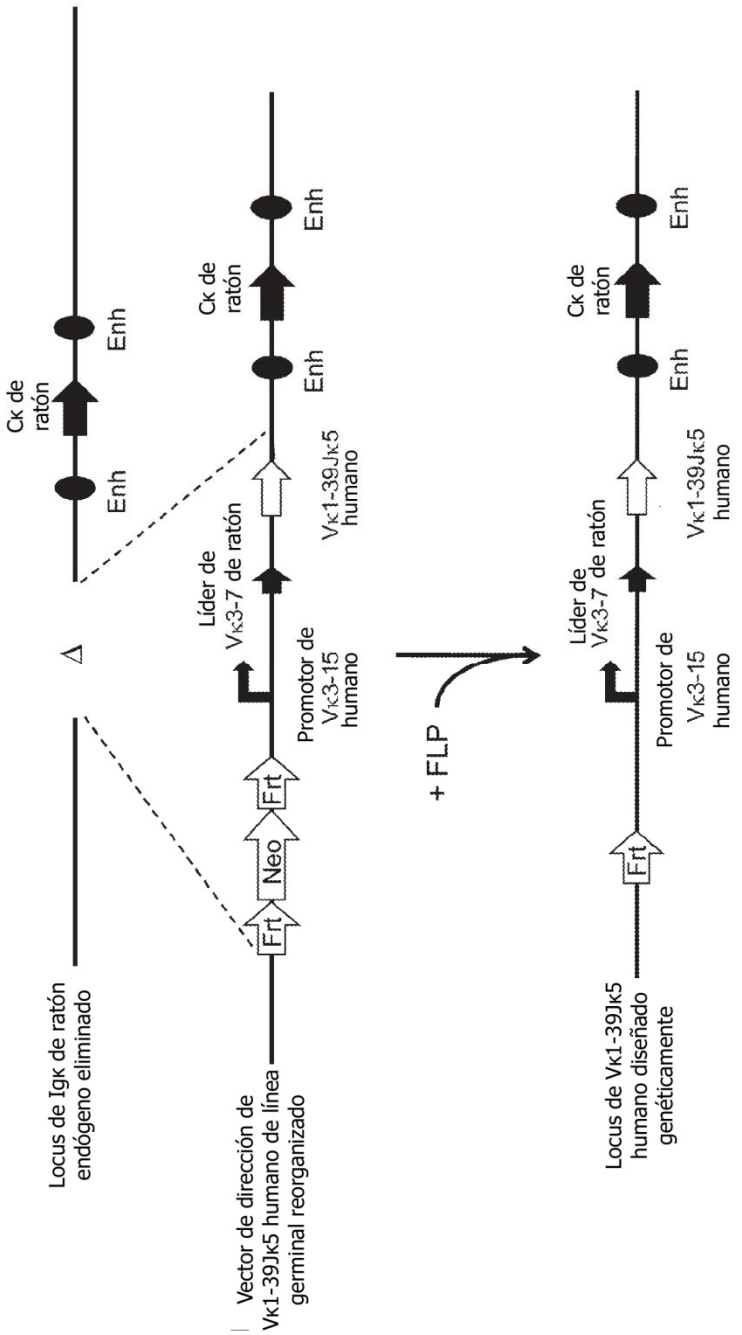

Locus de Igκ de ratón endógeno eliminado
Cκ de ratón
Enh
Enh
Δ
Vector de dirección de Vκ1-39Jκ5 humano de línea germinal reorganizado
Frt
Neo
Frt
Líder de Vκ3-7 de ratón
Promotor de Vκ3-15 humano
Cκ de ratón
Enh
Enh
Vκ1-39Jκ5 humano
+ FLP
Locus de Vκ1-39Jκ5 humano diseñado genéticamente
Frt
Líder de Vκ3-7 de ratón
Promotor de Vκ3-15 humano
Cκ de ratón
Enh
Enh
Vκ1-39Jκ5 humano

FIG. 1

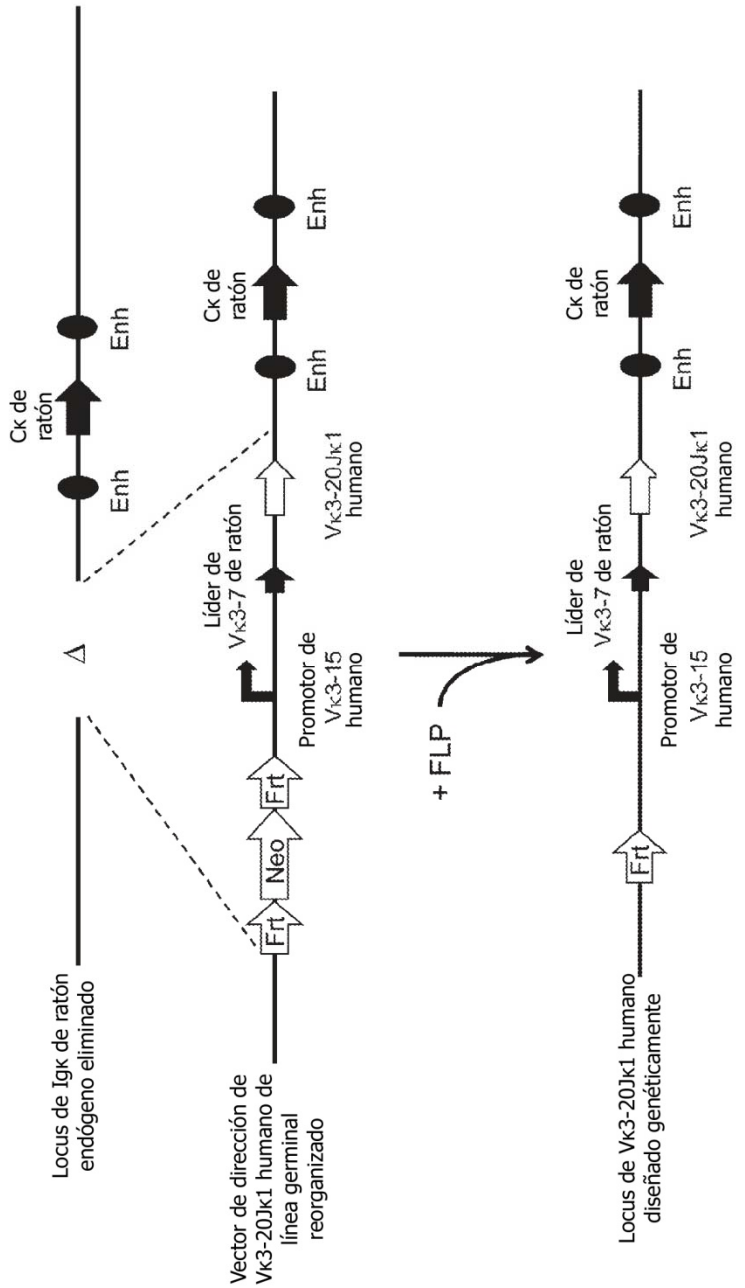

Cκ de ratón
Enh
Enh
Δ
Locus de Igκ de ratón endógeno eliminado
Cκ de ratón
Enh
Enh
Líder de Vκ3-7 de ratón
Vκ3-20Jκ1 humano
Promotor de Vκ3-15 humano
Frt
Neo
Frt
Vector de dirección de Vκ3-20Jκ1 humano de línea germinal reorganizado
+ FLP
Cκ de ratón
Enh
Enh
Líder de Vκ3-7 de ratón
Vκ3-20Jκ1 humano
Promotor de Vκ3-15 humano
Frt
Locus de Vκ3-20Jκ1 humano diseñado genéticamente

FIG. 2

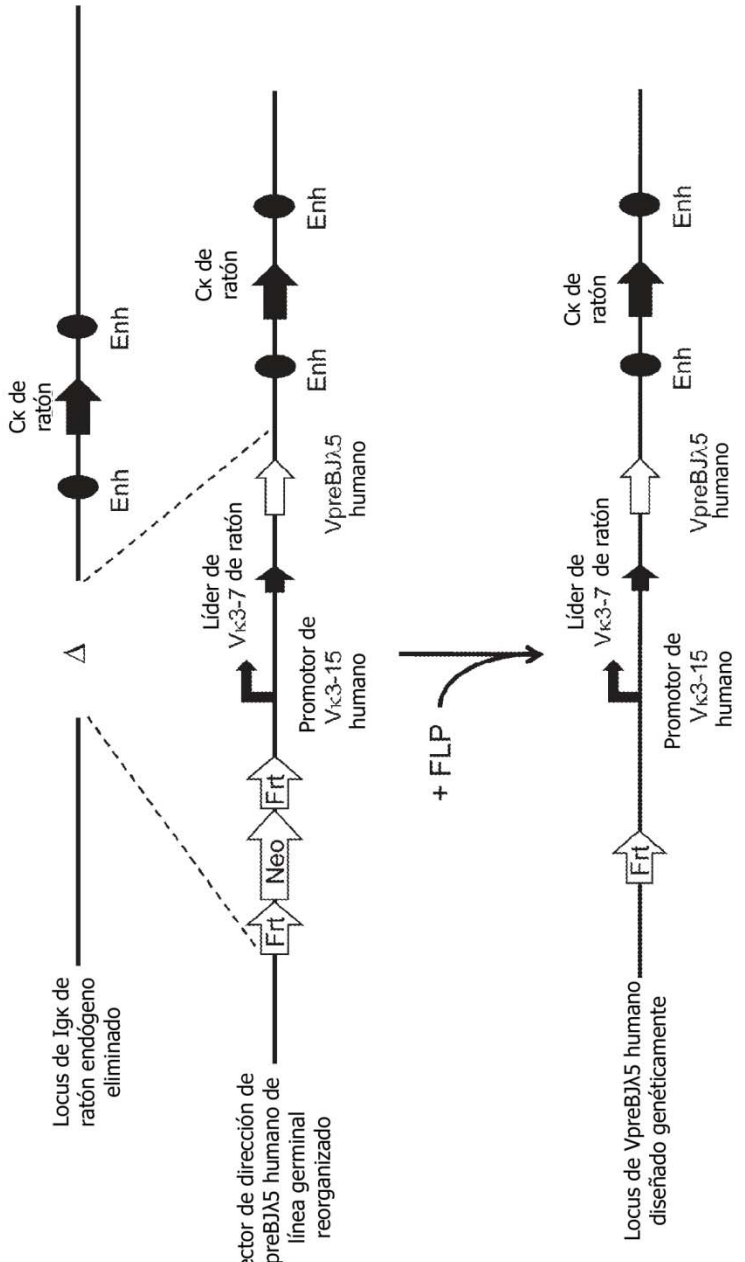

Cκ de ratón
Enh
Enh
Δ
Locus de Igκ de ratón endógeno eliminado
Vector de dirección de VpreBJλ5 humano de línea germinal reorganizado
Frt
Neo
Frt
Líder de Vκ3-7 de ratón
Promotor de Vκ3-15 humano
VpreBJλ5 humano
Enh
Cκ de ratón
Enh
+ FLP
Locus de VpreBJλ5 humano diseñado genéticamente
Frt
Líder de Vκ3-7 de ratón
Promotor de Vκ3-15 humano
VpreBJλ5 humano
Enh
Cκ de ratón
Enh

FIG. 3

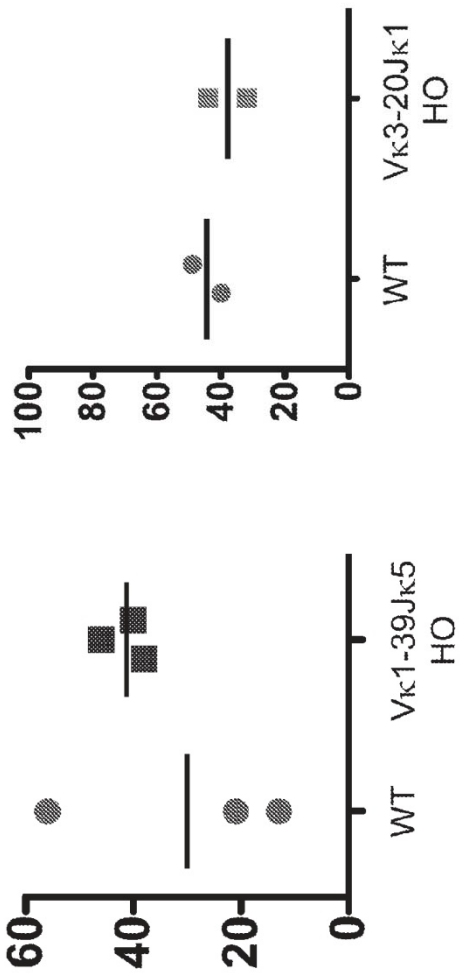


FIG. 4

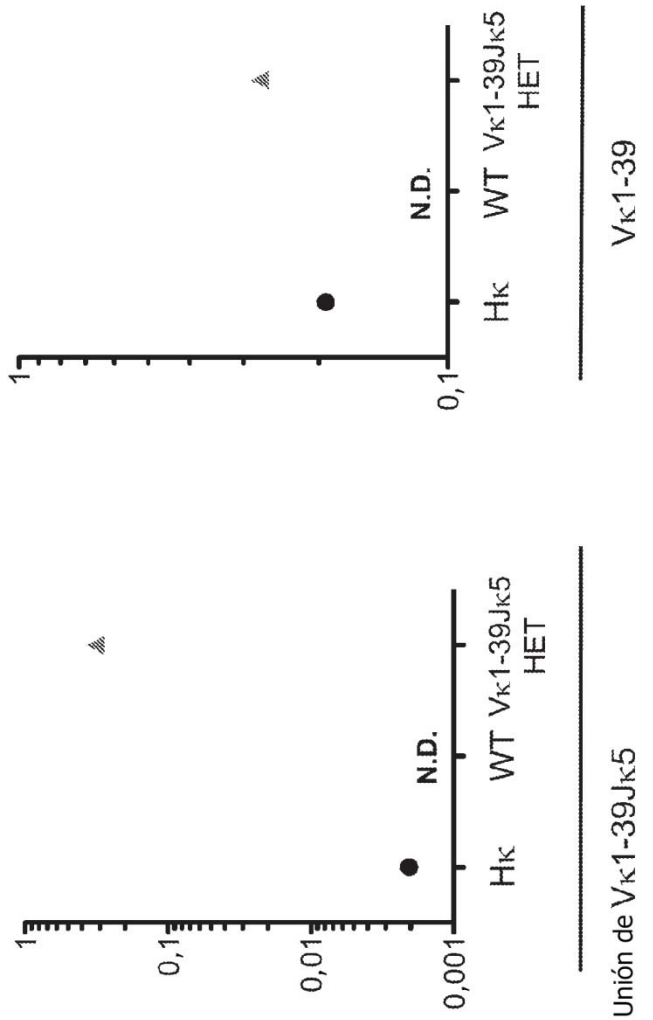

1
0,1
0,01
0,001
N.D.
Hκ
WT
Vκ1-39Jκ5 HET
Unión de Vκ1-39Jκ5
1
0,1
N.D.
Hκ
WT
Vκ1-39Jκ5 HET
Vκ1-39

FIG. 5A

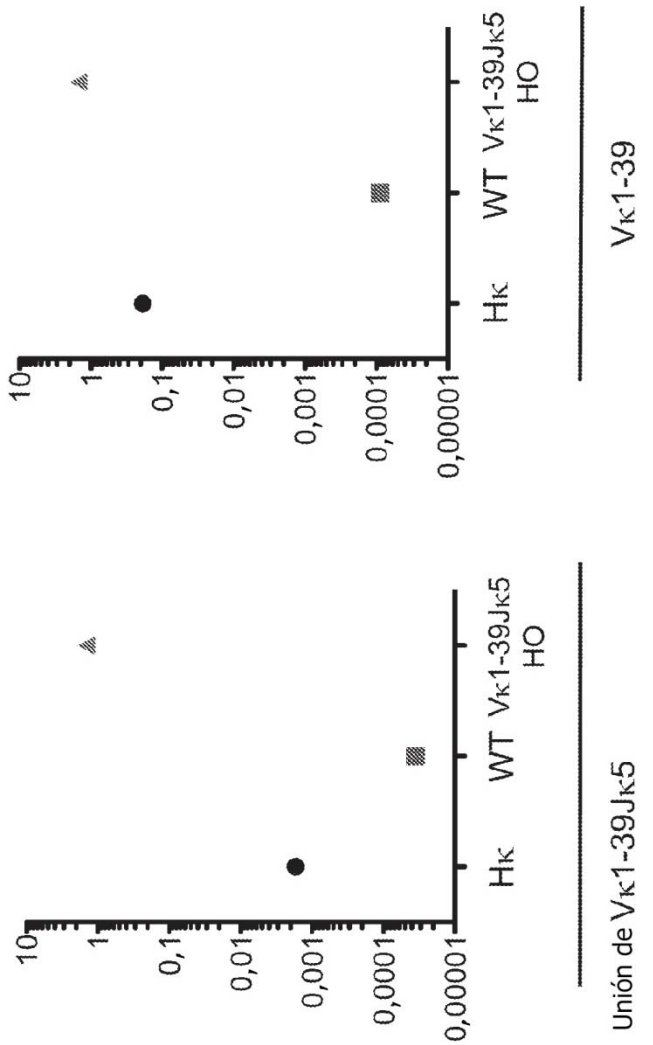

10
1
0,1
0,01
0,001
0,0001
0,00001
Hκ
WT
Vκ1-39Jκ5 HO
Unión de Vκ1-39Jκ5
Vκ1-39

FIG. 5B

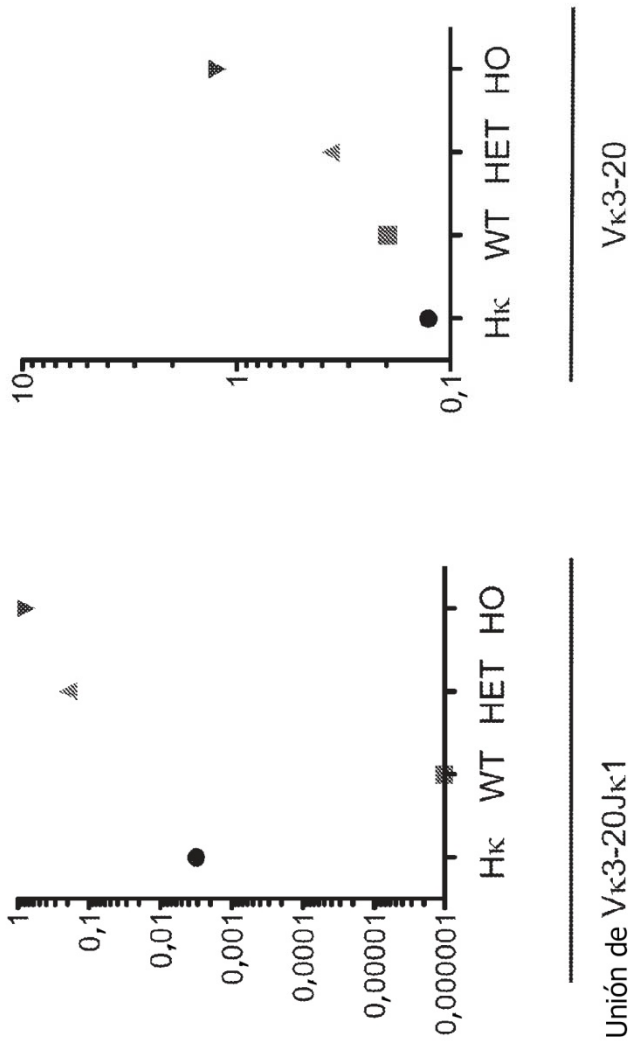

1
0,1
0,01
0,001
0,0001
0,00001
0,000001
Hκ WT HET HO
Unión de Vκ3-20Jκ1
10
1
0,1
Hκ WT HET HO
Vκ3-20

FIG. 5C

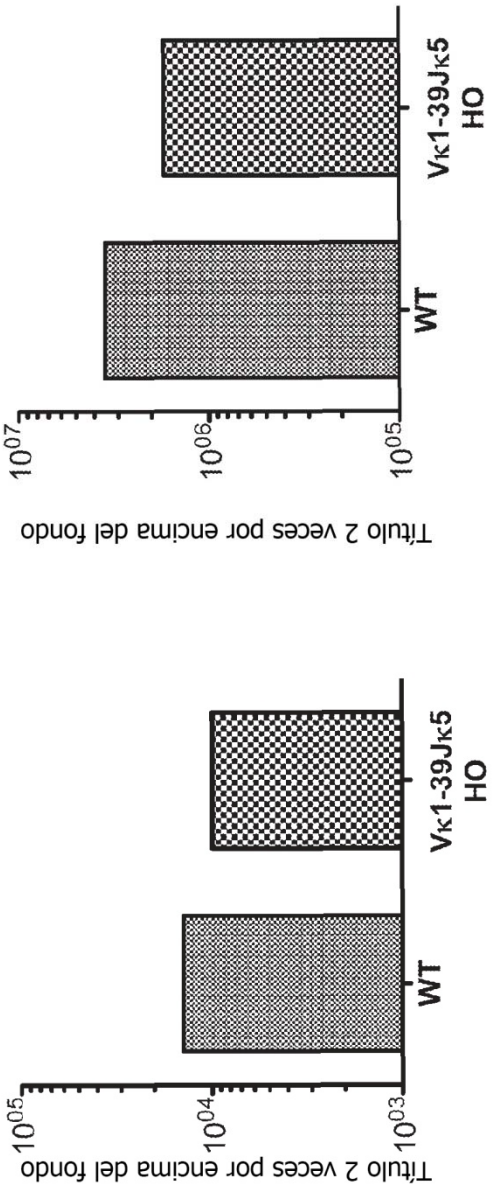

Título 2 veces por encima del fondo
10^{07}
10^{06}
10^{05}
WT
Vκ1-39Jκ5 HO
Título 2 veces por encima del fondo
10^{05}
10^{04}
10^{03}
WT
Vκ1-39Jκ5 HO

FIG. 6A

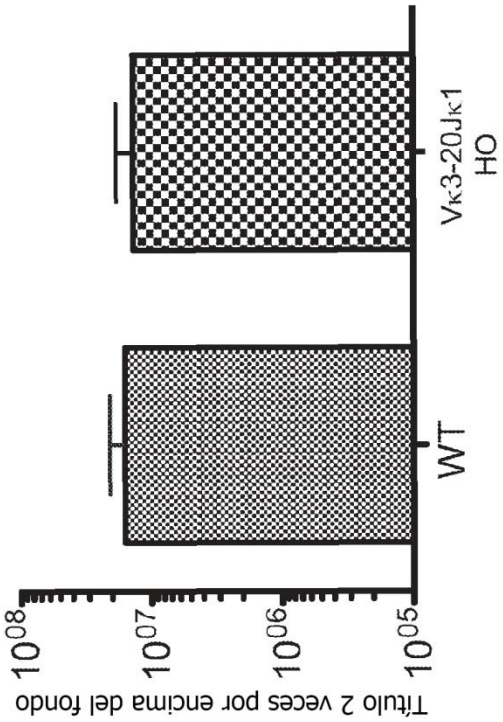

Título 2 veces por encima del fondo
10^8
10^7
10^6
10^5
WT
Vκ3-20Jκ1 HO

FIG. 6B

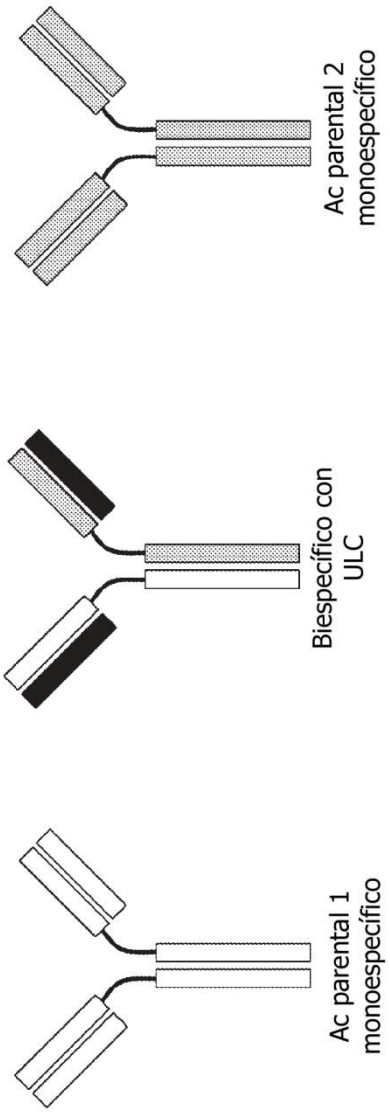

Ac parental 2 monoespecífico
Biespecífico con ULC
Ac parental 1 monoespecífico

FIG. 7A

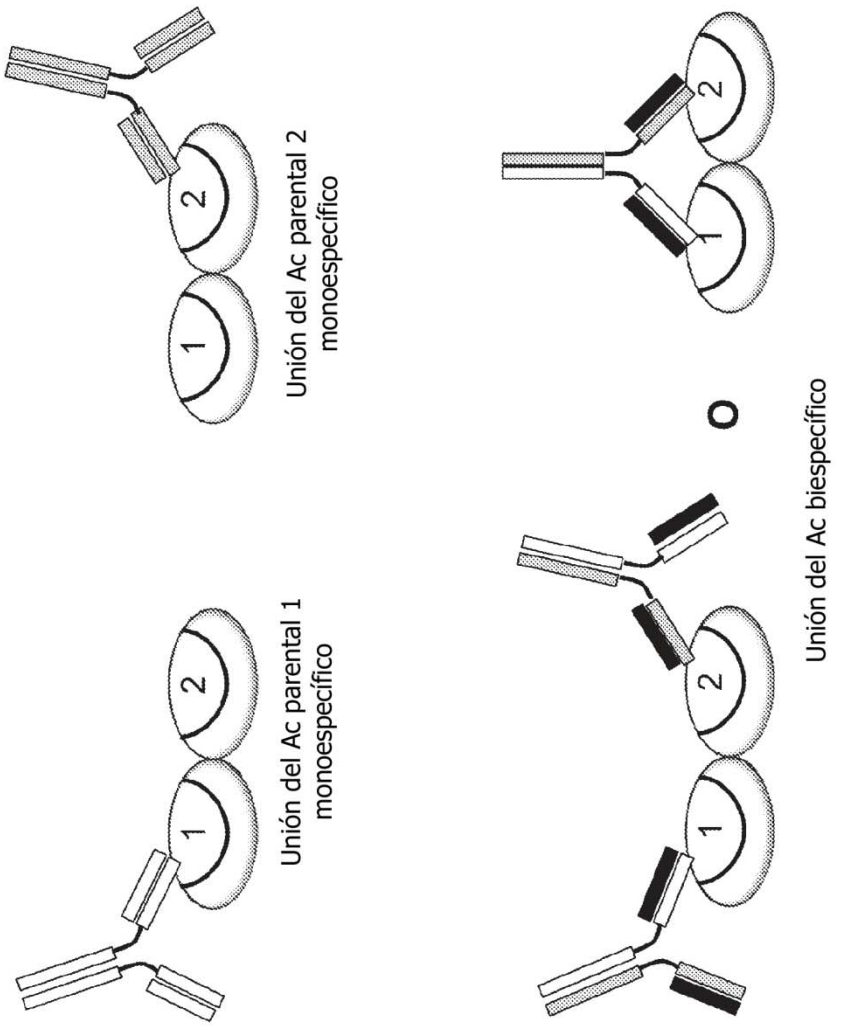

Unión del Ac parental 1
monoespecífico
Unión del Ac parental 2
monoespecífico
O
Unión del Ac biespecífico

FIG. 7B

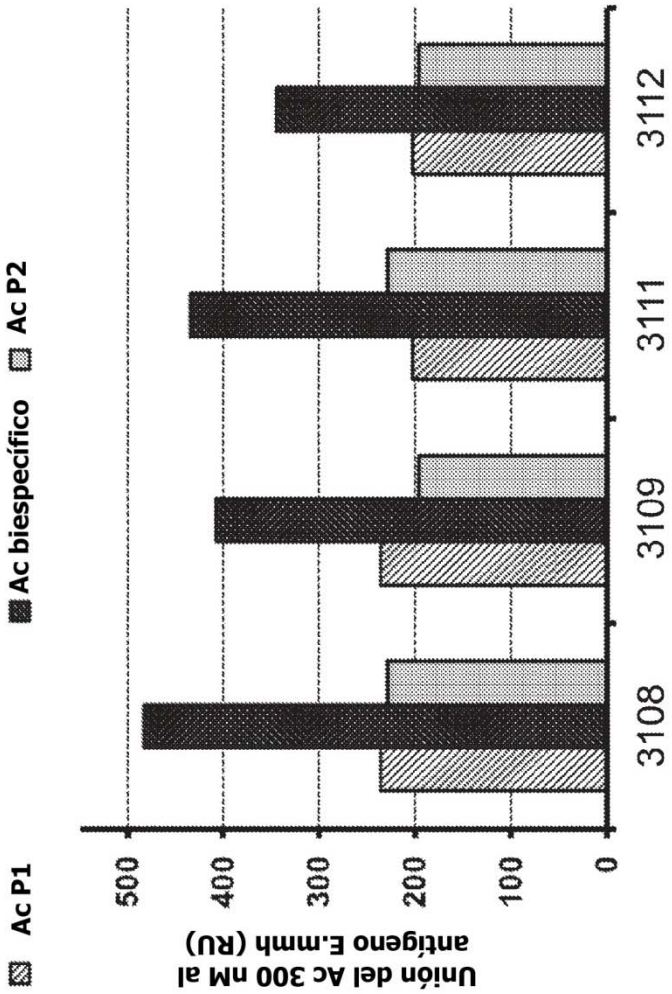

Unión del Ac 300 nM al antígeno E.mmh (RU)
500
400
300
200
100
0
3108
3109
3111
3112
Ac P1
Ac biespecífico
Ac P2

FIG. 8

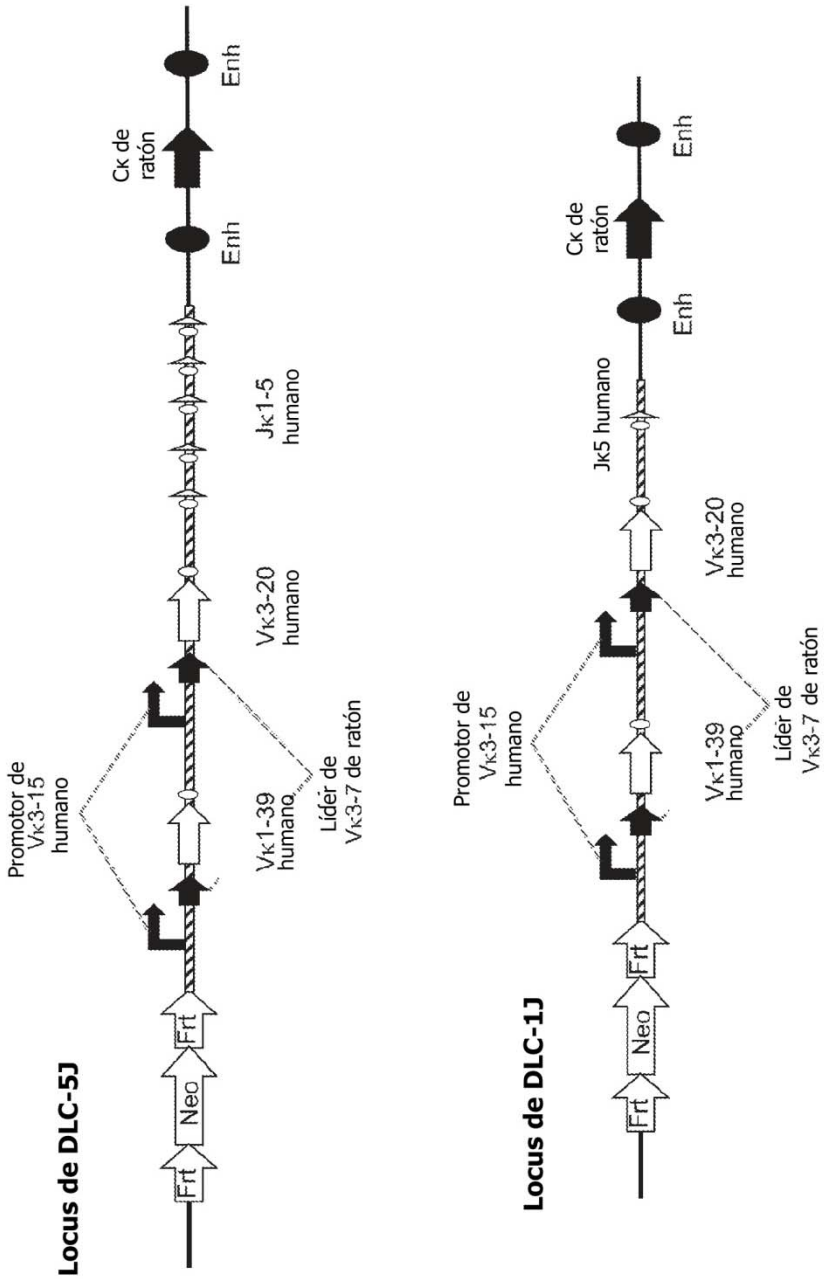

Locus de DLC-5J
Frt
Neo
Frt
Promotor de Vκ3-15 humano
Vκ1-39 humano
Líder de Vκ3-7 de ratón
Vκ3-20 humano
Jκ1-5 humano
Enh
Cκ de ratón
Enh
Locus de DLC-1J
Frt
Neo
Frt
Promotor de Vκ3-15 humano
Vκ1-39 humano
Líder de Vκ3-7 de ratón
Vκ3-20 humano
Jκ5 humano
Enh
Cκ de ratón
Enh

FIG. 9

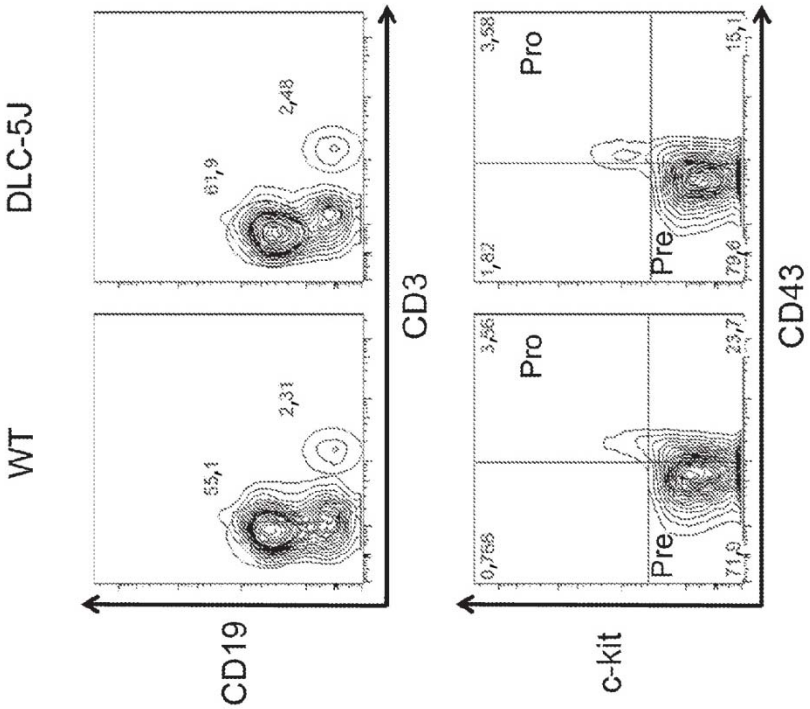

WT
DLC-5J
CD19
CD3
55,1
2,31
61,9
2,48
c-kit
CD43
Pro
Pre
0,788
71,0
3,56
23,7
1,82
79,6
3,58
15,1

FIG. 10A

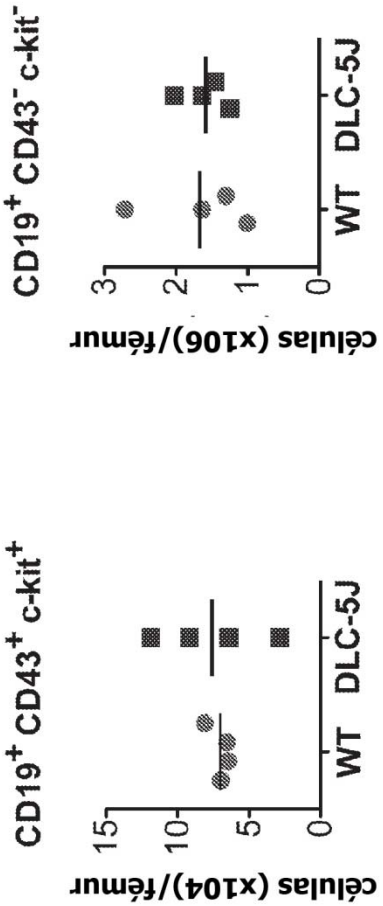

CD19+ CD43+ c-kit+
células (x104)/fémur
15
10
5
0
WT
DLC-5J
CD19+ CD43- c-kit-
células (x106)/fémur
3
2
1
0
WT
DLC-5J

FIG. 10B

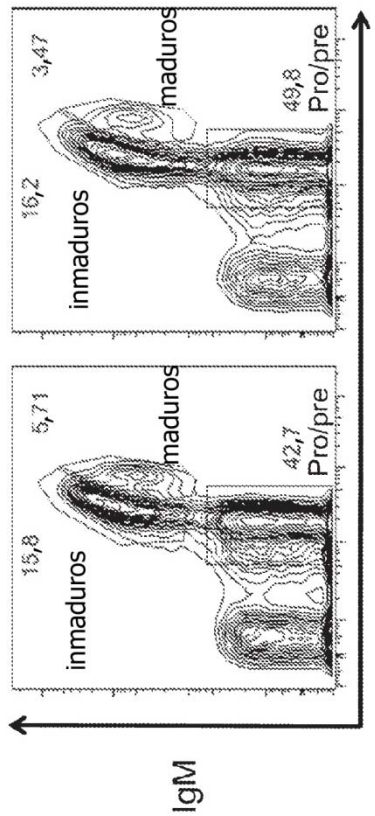

DLC-5J
WT
15,8
inmaduros
5,71
maduros
42,7
Pro/pre
16,2
inmaduros
3,47
maduros
49,8
Pro/pre
IgM
B220

FIG. 11A

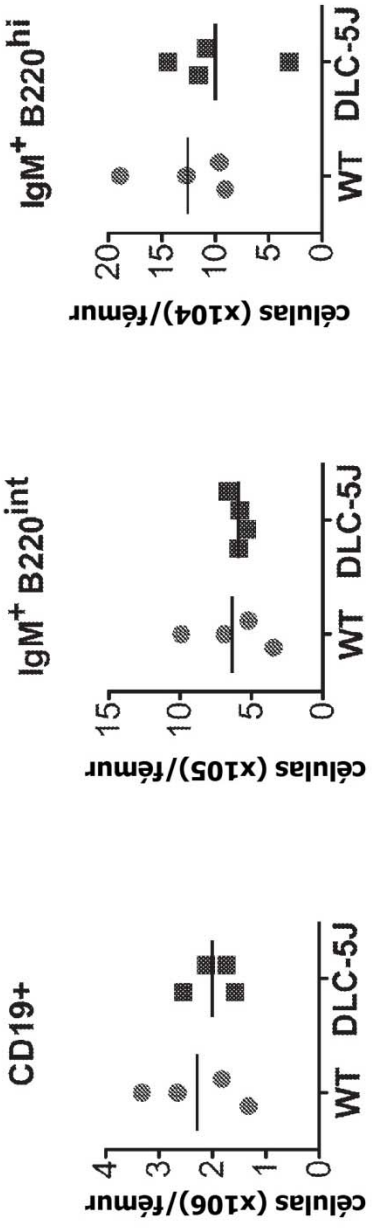

CD19+
células (x106)/fémur
0
1
2
3
4
WT
DLC-5J
IgM+ B220int
células (x105)/fémur
0
5
10
15
WT
DLC-5J
IgM+ B220hi
células (x104)/fémur
0
5
10
15
20
WT
DLC-5J

FIG. 11B

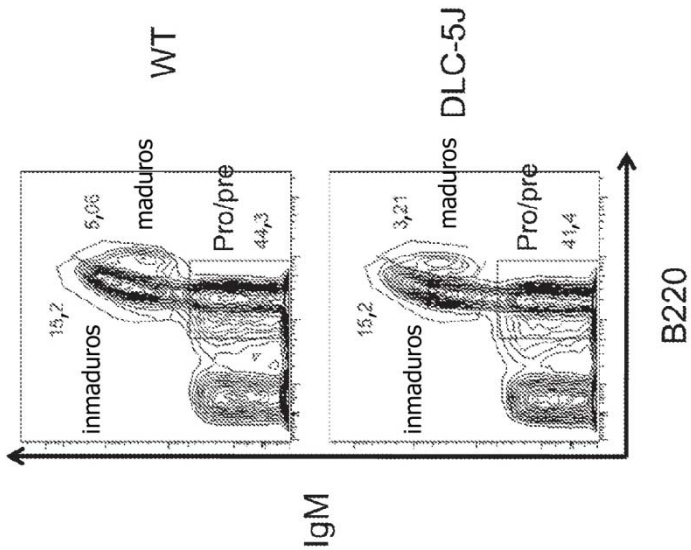

WT
DLC-5J
inmaduros
maduros
Pro/pre
15,2
5,06
44,3
15,2
3,21
41,4
IgM
B220

FIG. 12A

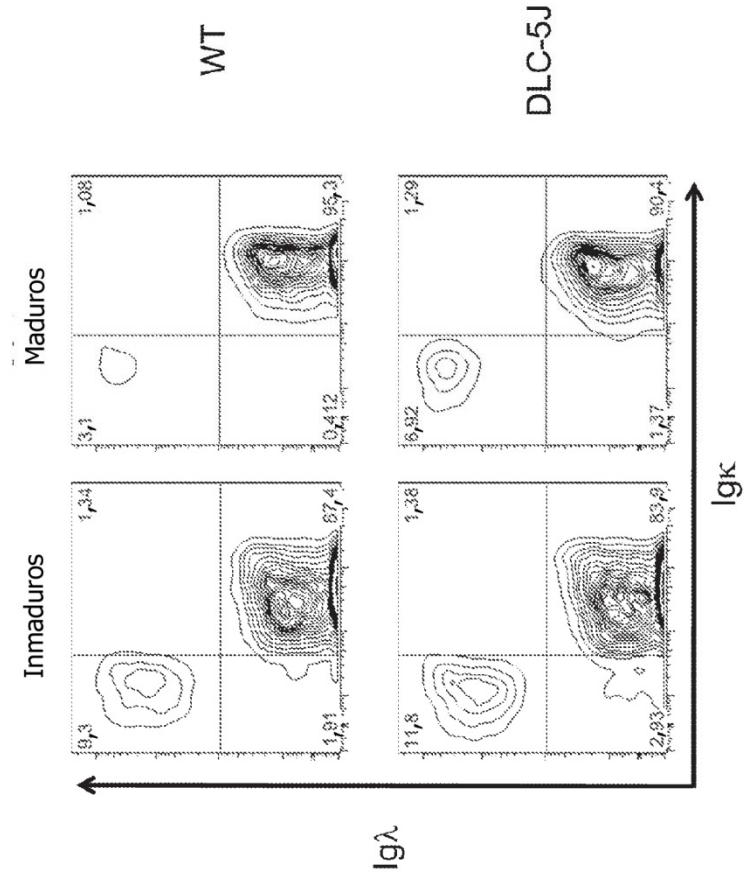

WT
DLC-5J
Inmaduros
Maduros
1,34
67,4
8,3
1,91
1,08
85,3
3,1
0,412
1,38
83,8
11,8
2,93
1,29
90,4
6,92
1,37
Igλ
Igκ

FIG. 12B

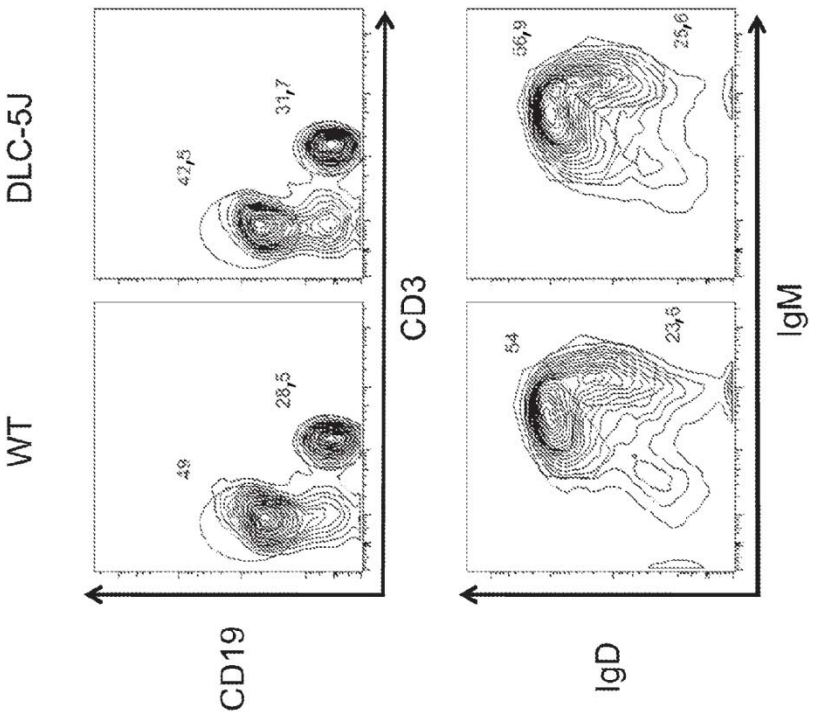


FIG. 13A

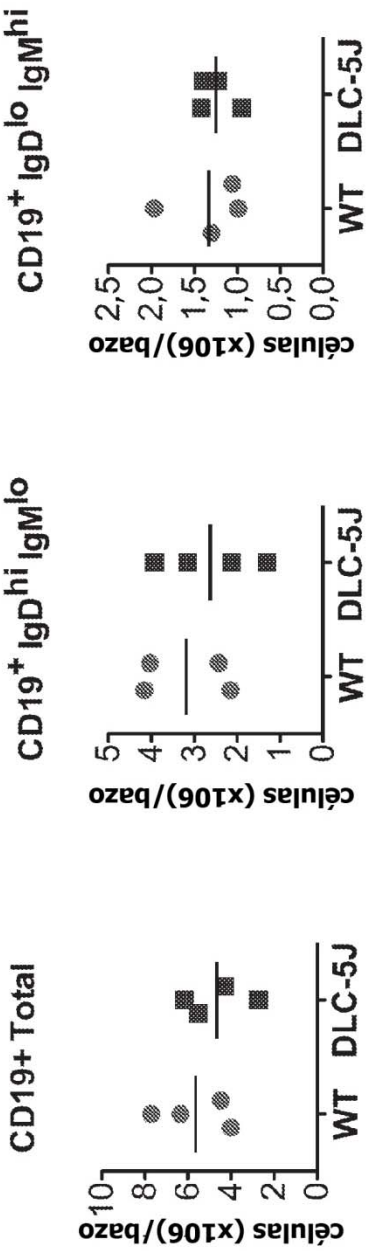

CD19+ Total
células (x106)/bazo
10
8
6
4
2
0
WT
DLC-5J
CD19+ IgDhi IgMlo
células (x106)/bazo
5
4
3
2
1
0
WT
DLC-5J
CD19+ IgDlo IgMhi
células (x106)/bazo
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
WT
DLC-5J

FIG. 13B

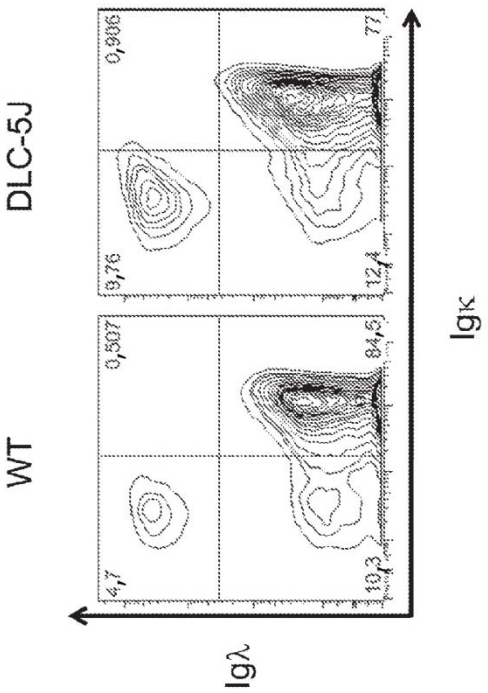


FIG. 14A

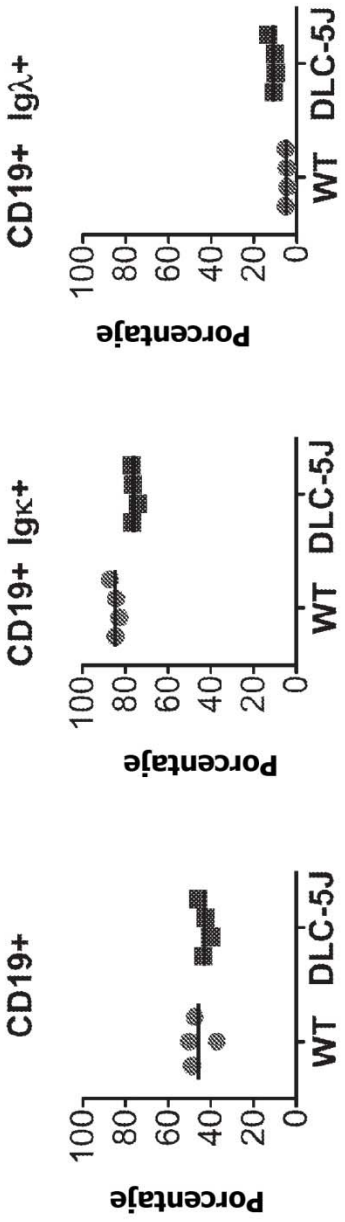


FIG. 14B

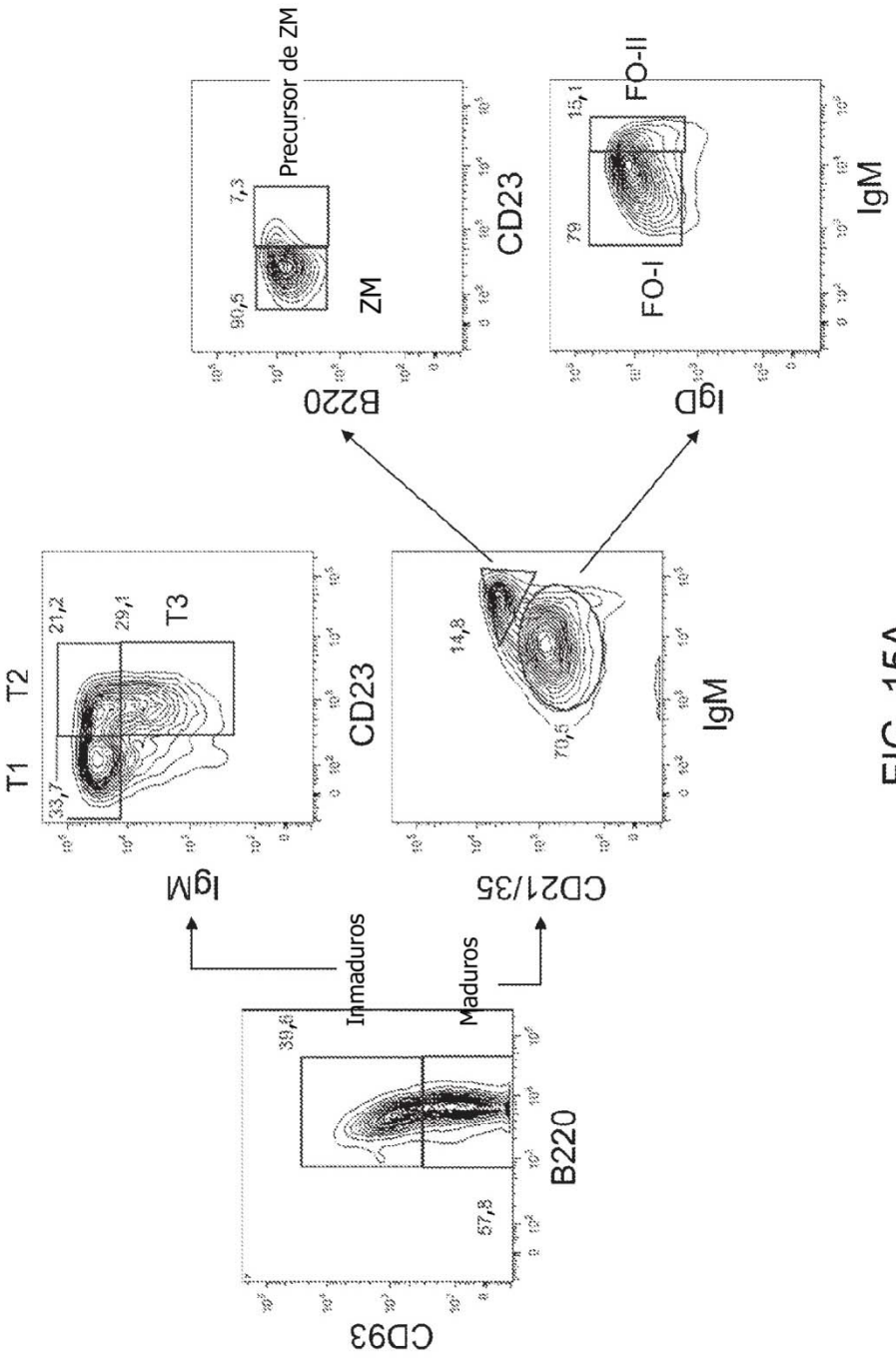

CD93
B220
Inmaduros
Maduros
IgM
CD21/35
T1
T2
T3
CD23
IgM
B220
Precursor de ZM
ZM
CD23
IgD
FO-I
FO-II
IgM

FIG. 15A

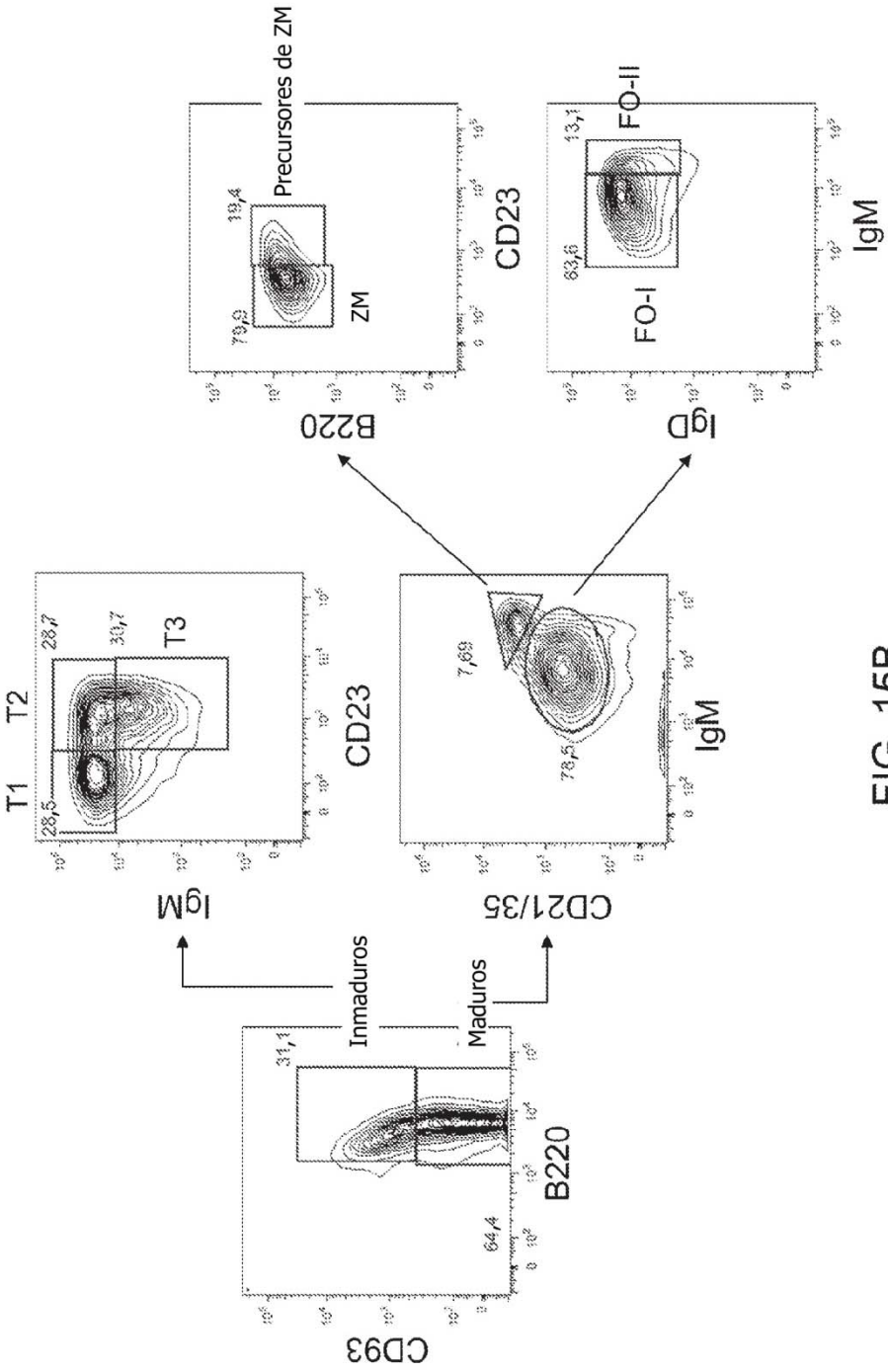

CD93
B220
31,1
64,4
Inmaduros
Maduros
IgM
CD21/35
T1
T2
T3
28,5
28,7
30,7
CD23
IgM
7,69
78,5
B220
CD23
Precursores de ZM
ZM
79,9
19,4
IgD
IgM
FO-I
FO-II
83,6
13,1

FIG. 15B

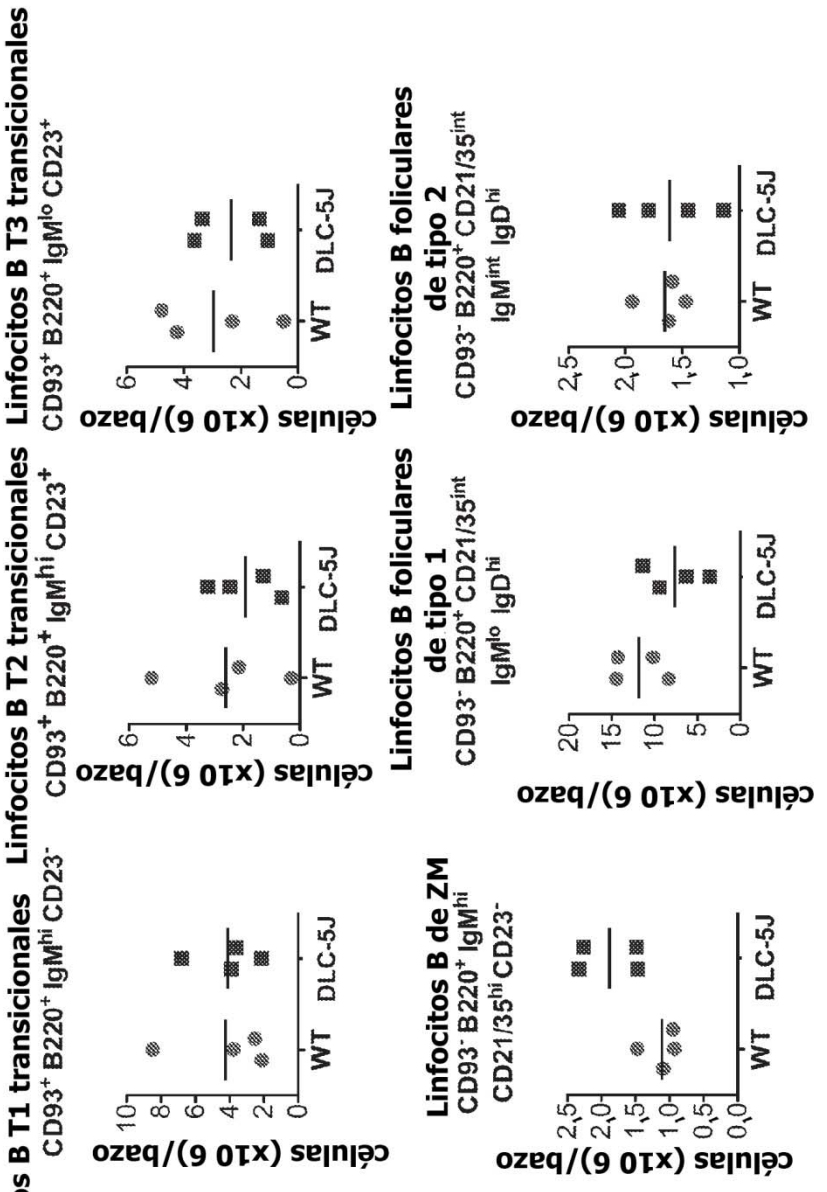

Linfocitos B T1 transicionales
CD93+ B220+ IgMhi CD23-
Linfocitos B T2 transicionales
CD93+ B220+ IgMhi CD23+
Linfocitos B T3 transicionales
CD93+ B220+ IgMlo CD23+
Linfocitos B de ZM
CD93- B220+ IgMhi
CD21/35hi CD23-
Linfocitos B foliculares de tipo 1
CD93- B220+ CD21/35int
IgMlo IgDhi
Linfocitos B foliculares de tipo 2
CD93- B220+ CD21/35int
IgMint IgDhi
células (x10 6)/bazo
WT
DLC-5J

FIG. 16

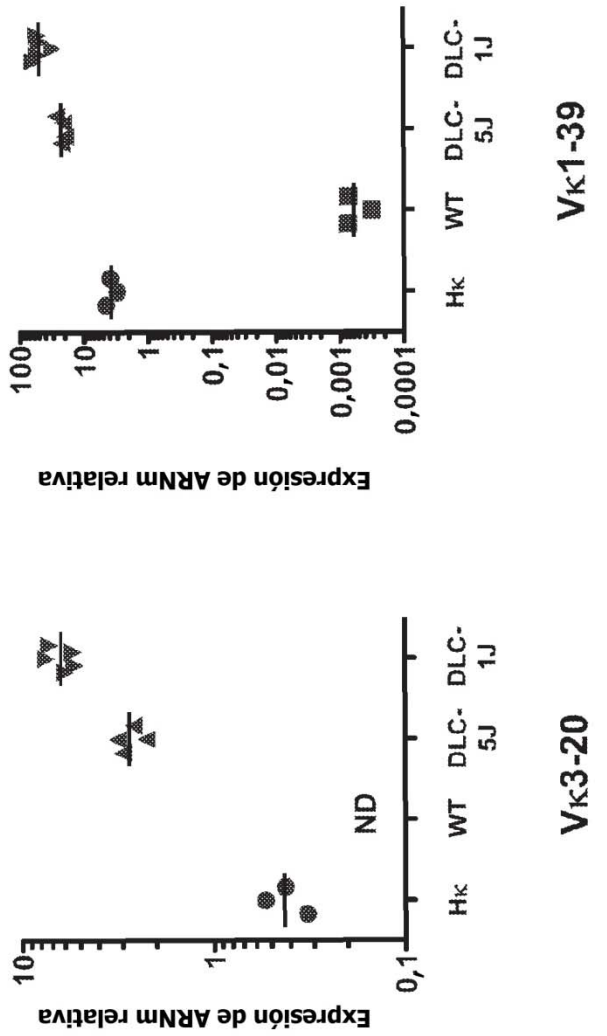

Expresión de ARNm relativa
100
10
1
0,1
0,01
0,001
0,0001
Hκ
WT
DLC-5J
DLC-1J
Vκ1-39
Expresión de ARNm relativa
10
1
0,1
ND
Hκ
WT
DLC-5J
DLC-1J
Vκ3-20

FIG. 17

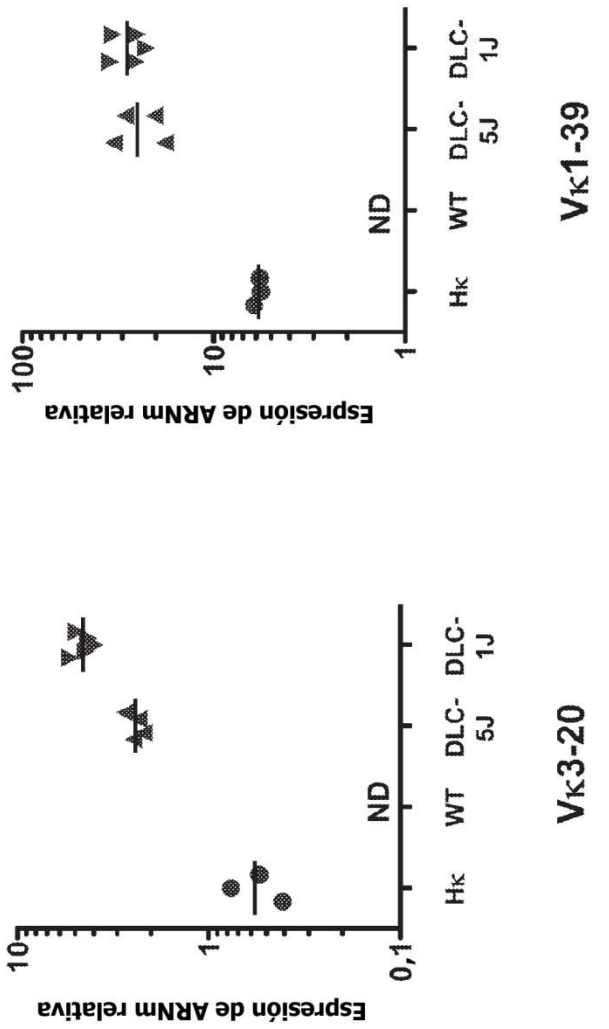

Expresión de ARNm relativa
100
10
1
0,1
Hκ
WT
ND
DLC-5J
DLC-1J
Vκ1-39
Vκ3-20

FIG. 18

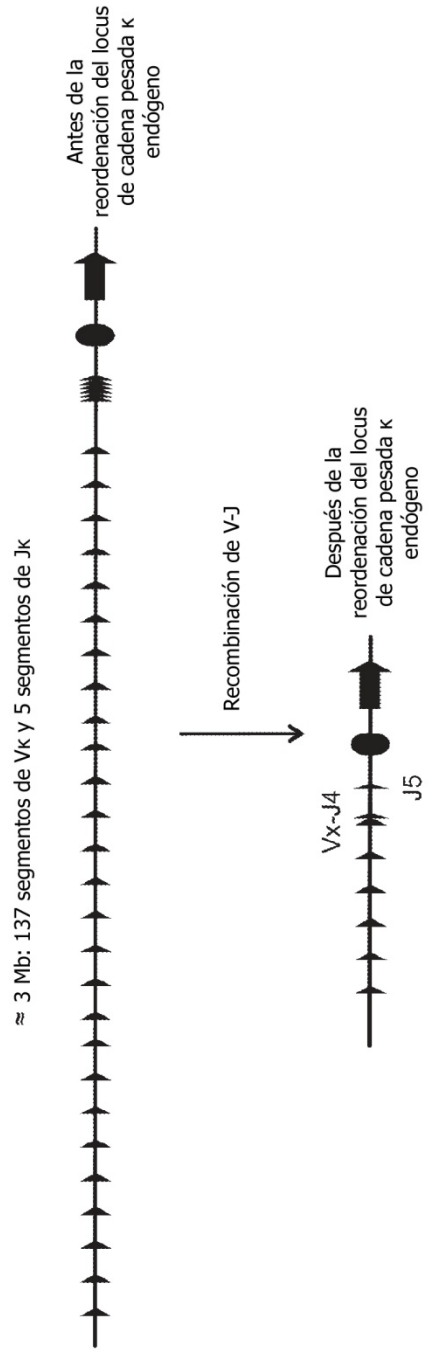

Antes de la reordenación del locus de cadena pesada κ endógeno
≈ 3 Mb: 137 segmentos de Vκ y 5 segmentos de Jκ
Recombinación de V-J
Después de la reordenación del locus de cadena pesada κ endógeno
Vx-J4
J5

FIG. 19