



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 986 443**

⑮ Int. Cl.:

A01K 67/027 (2014.01)
C12N 15/85 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2018** PCT/EP2018/068309

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019** WO19008123

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2018** E 18743421 (2)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024** EP 3648587

⑮ Título: **Células, vertebrados, poblaciones y métodos**

⑩ Prioridad:

07.07.2017 GB 201710984

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.11.2024

⑬ Titular/es:

KYMBAB LIMITED (100.0%)
The Bennet Building (B930), Babraham Research Campus
Cambridge CB22 3AT, GB

⑭ Inventor/es:

LEE, E-CHIANG;
WANG, WEI;
BLACKWOOD, JOHN KENNETH;
MAGLIOZZI, ROBERTO y
WOOD, ANDREW

⑮ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 986 443 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células, vertebrados, poblaciones y métodos

- 5 **Campo de la invención**
 La invención se refiere a células y vertebrados no humanos para producir cadenas de anticuerpos, en particular para su uso en la producción de anticuerpos multiespecíficos útiles para terapia o diagnóstico.
- 10 **Antecedentes**
 Los anticuerpos son una clase de fármacos en rápido crecimiento. Un anticuerpo típico de 4 cadenas contiene dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, que forman una molécula con características de unión a antígeno bivalentes y monoespecíficas. El anticuerpo biespecífico es una nueva clase de fármaco que puede unirse a dos antígenos diferentes o dos epitopos diferentes del mismo antígeno al mismo tiempo. Existen varias aplicaciones de anticuerpos biespecíficos para el tratamiento de enfermedades. La aplicación más ampliamente usada de este concepto es la inmunoterapia contra el cáncer, donde los anticuerpos biespecíficos captan células T citotóxicas y las dirigen a células tumorales que van a destruirse. También pueden aplicarse para bloquear simultáneamente dos dianas (Klein, C *et al.* *MABs*. 2016. 8: 1010-20.), o actuar como cofactor para una ruta enzimática (Kitazawa, T. *et al.* *Nat Med.* 2012. 18: 1570-4.). Se han aprobado para la terapia dos anticuerpos biespecíficos, catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) y blinatumomab (anti-19 x anti-CD3), y actualmente se encuentran en desarrollo clínico varios anticuerpos biespecíficos adicionales. Hay cinco grupos estructurales diferentes para los anticuerpos biespecíficos: (i) IgG biespecífica (BsIgG) (ii) IgG unida a un resto de unión a antígeno adicional (iii) fragmentos de BsAb (iv) proteínas de fusión biespecíficas y (v) conjugados de BsAb (Spiess, C. *et al.* *Mol. Immunol.* 2015. 67:95-106). Entre ellos, BsIgG es un anticuerpo biespecífico con un peso molecular cercano al de una molécula de IgG. Por lo general, tiene características biológicas y biofísicas similares a las de una IgG típica. La producción de BsIgG mediante la coexpresión de los dos anticuerpos en células es un gran desafío debido al bajo rendimiento de la BsIgG deseada y la dificultad para eliminar moléculas de IgG mal emparejadas estrechamente relacionadas. Dos cadenas pesadas pueden formar homodímeros así como heterodímeros deseados. Además, las cadenas ligeras pueden no emparejarse con cadenas pesadas no afines. En consecuencia, la coexpresión de dos anticuerpos da como resultado nueve especies de IgG no deseadas y solo una BsIgG deseada debido a los problemas de apareamiento de cadenas pesadas y de apareamiento de cadenas ligeras.
- 30 La ingeniería de cadenas pesadas para favorecer la heterodimerización se ha demostrado mediante la tecnología de "botón en ojal" (Ridgway, JB *et al.* *Protein Eng.* 1996. 9: 617-21.; Atwell, S. *et al.* *J. Mol. Biol.* 1997. 270: 26-35) o la tecnología de "emparejamiento de cargas" (Gunasekaran, K. *et al.* *J. Biol. Chem.* 2010. 285: 19637-46.; Strop, P. *et al.* *J. Mol.* 2012. 420: 204-19). Estas tecnologías tienen como objetivo resolver el problema del emparejamiento de cadenas pesadas. El problema del emparejamiento de cadenas ligeras se obvia mediante la expresión de anticuerpos usando cadenas ligeras comunes (Merchant, M. *et al.* *Nat. Biotechnol.* 1998. 16: 677-81). Al aplicar las tecnologías de "botón en ojal" o de "emparejamiento de cargas" y tecnologías de cadenas ligeras comunes, la coexpresión de una cadena ligera y dos cadenas pesadas da como resultado una BsIgG dominante y tres especies menores de emparejamiento incorrecto. La tecnología de botón en ojal se describe en los documentos US 5,731,168 y WO98/50431. Se han aplicado etapas de purificación usando intercambio catiónico (Sampei, Z. *et al.* *PLoS One.* 2013. 8: e57479) o unión a proteína A diferencial (Smith, E.J. *et al.* *Sci. Rep.* 2015. 5: 17943) para aislar esta BsIgG expresada dominante.
- 40 45 Es un desafío identificar una cadena ligera común para BsIgG. El emparejamiento forzado de cadenas pesadas y ligeras no afines suele dar como resultado un bajo rendimiento de expresión o inestabilidad de las moléculas. Se ha usado el barajado de cadenas ligeras entre dos cadenas ligeras emparejadas afines para identificar la cadena ligera común (Sampei, Z. *et al.* *PLoS One.* 2013. 8: e57479). Sin embargo, esto requiere etapas tediosas y mucho esfuerzo, y el resultado también es incierto. En comparación con este método, se promete que la tecnología "transgénica de cadenas ligeras comunes" será más sencilla y directa, y se basará en la selección *in vivo* para generar las moléculas de emparejamiento naturales. En estas aplicaciones, se usan ratones modificados por ingeniería genética para que contengan sólo una secuencia codificante de cadena ligera químérica (regiones variables humanas y constantes de ratón) para identificar anticuerpos que comparten una cadena ligera similar pero no necesariamente idéntica porque la secuencia de cadena ligera reordenada insertada todavía es susceptible a la hipermutación somática (SHM). La elección de la cadena ligera insertada también es limitada, ya que se basa en ratones con transmisión por línea germinal con una inserción de secuencia de cadena ligera. Los documentos WO2004/106375, WO2009/157771, EP2147594 y WO2014/160179 analizan técnicas relevantes para la producción de anticuerpos biespecíficos y ratones con cadenas ligeras comunes.
- 50 55 60 65 El documento EP2147594 da a conocer animales no humanos transgénicos que comprenden un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina, mediante lo cual la cadena ligera de inmunoglobulina es humana, de tipo humano o humanizada. El ácido nucleico está provisto de un medio que lo hace resistente a reordenamientos y/o hipermutaciones somáticas del ADN.
- Declaración de la invención**

La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los inventores se dieron cuenta de que la provisión de una secuencia de región variable codificante de dominio V en 3' del potenciador intrónico en un locus de cadena de anticuerpo minimiza la SHM de la región V, lo que permite que 5 la invención se use para identificar y usar cadenas ligeras comunes verdaderas, dominios VL y dominios VH que pueden emparejarse con estas para producir sitios de unión a antígeno.

A continuación se proporcionan ejemplos adicionales por medio de experimentos y datos elaborados.

10 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1

Un esquema de la estrategia de direccionamiento para generar un alelo de cadena ligera común. El potenciador intrónico κ de ratón y la región constante κ de ratón (4,6 kb) en células ES de ratón se reemplazaron por un fragmento 15 de ADN sintetizado de 6,8 kb, que contiene un casete EF1 α -Puro-2A-EGFP, el promotor natural y el péptido señal de V λ 3-21 humano, potenciador intrónico κ de ratón, así como un alelo de cadena ligera lambda común humana recombinada de un anticuerpo que se une específicamente a la diana X.

Figura 2

20 Un esquema de la estrategia de clasificación para aislar células B del bazo que expresan anticuerpos con una cadena ligera λ humana y se unen específicamente a la diana X humana de un ratón quimera con inserción de cadena ligera común. La estrategia de clasificación implicó la selección de linfocitos, seguida de la selección de células individuales, 25 seguida de la selección de células vivas, seguida de la selección de células B CD19 $^+$ y finalmente la selección de células positivas para lambda humana y positivas para antígeno (diana X). SSC: dispersión lateral. FSC: dispersión hacia adelante. SSC-A: área de dispersión lateral.

Figura 3

30 Gráficos de clasificación que muestran el aislamiento de células B que expresan anticuerpos con una cadena ligera λ humana y se unen específicamente a la diana X humana de un ratón quimera con inserción de cadena ligera común. Los gráficos A-F son gráficos de clasificación y muestran el flujo de clasificación. Las células seleccionadas en la 35 primera clasificación se utilizaron para la clasificación posterior y el proceso de selección continuó. A. Gráfico de clasificación seleccionando linfocitos. SSC-A (área de dispersión lateral) frente a FSC-A (área de dispersión hacia adelante). B. Gráfico de clasificación seleccionando células individuales. FSC-W (ancho de la dispersión hacia adelante) frente a FSC-A (área de dispersión hacia adelante). C. Gráfico de clasificación seleccionando células individuales. 40 SSC-W (ancho de la dispersión lateral) frente a SSC-A (área de dispersión lateral). D. Gráfico de clasificación seleccionando células vivas. SSC-A (área de dispersión lateral) frente a 7-AAD vivo/muerto. E. Gráfico de clasificación seleccionando células B CD19 $^+$. El eje Y indica los marcadores utilizados frente a CD19-PB. F. Gráfico de clasificación de células B que expresan la cadena ligera lambda humana y se unen específicamente a la diana X humana. Antígeno diana X humana marcado con AF647 frente a cadena ligera lambda humana marcada con PE.

Figura 4

45 Las regiones VL de las cadenas ligeras recuperadas mediante NGS llevan todas esencialmente las mismas 6 mutaciones distintas de línea germinal que el alelo de cadena ligera común de inserción.

Figura 5

50 Los ratones quimera generados a partir de blastocistos Rag $^{/-}$ microinyectados con células ES seleccionadas como diana (Rag $^{/-}$ seleccionadas como diana) tenían un número total similar de células de bazo viables en comparación con los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre).

Figura 6

55 Los ratones quimera generados a partir de blastocistos Rag $^{/-}$ microinyectados con células ES seleccionadas como diana (Rag $^{/-}$ seleccionadas como diana) tenían un número similar de células B positivas para CD19 y positivas para B220 en comparación con los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre).

Figura 7

60 El porcentaje de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220 en ratones quimera generados a partir de blastocistos Rag $^{/-}$ microinyectados con células ES seleccionadas como diana (Rag $^{/-}$ seleccionadas como diana) fue similar al de los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre).

Figura 8

65 El porcentaje de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220 en ratones quimera generados a partir de blastocistos Rag $^{/-}$ microinyectados con células ES seleccionadas como diana (Rag $^{/-}$ seleccionadas como diana) fue similar al de los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre).

Figura 9

El porcentaje de población de células B IgG positivas para antígeno en ratones quimera generados a partir de blastocitos Rag^{-/-} microinyectados con células ES seleccionadas como diana (Rag^{-/-} seleccionadas como diana) fue similar al de los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre).

5 **Descripción detallada**

Los aspectos del presente documento pueden expresarse en cuanto al vertebrado no humano que es un ratón, pero debe entenderse que roedores, ratas, conejos o cualquier otro vertebrado no humano pueden ser adecuados para realizar la presente invención.

10 Los inventores se dieron cuenta de que la provisión en un locus de cadena ligera o pesada de un anticuerpo de una secuencia de región variable codificante de dominio V en 3' del potenciador intrónico en un locus de cadena de anticuerpo minimiza la SHM de la región V, lo que permite utilizar la invención para identificar cadenas ligeras o pesadas comunes verdaderas. En algunas realizaciones, el locus es una versión modificada de un locus de anticuerpo endógeno de una célula de vertebrado de tipo silvestre o transgénica o de un vertebrado no humano. En otras 15 realizaciones, el locus no está en un locus de cadena de anticuerpo endógeno, sino que está comprendido por un locus insertado en Rosa 26 u otra ubicación donde el locus es capaz de expresar cadenas de anticuerpos. Por ejemplo, el locus de la divulgación está compuesto por un transgén insertado al azar en el genoma de la célula o del vertebrado. Al minimizar o eliminar la SHM de la región V, es más probable que la célula o tales células comprendidas en el vertebrado expresen una única cadena ligera (es decir, "común"). Cuando se elimina la SHM, la región variable expresa 20 solo un único tipo de dominio VL que puede emparejarse con diferentes dominios VH expresados por el vertebrado, permitiendo de ese modo el cribado e identificación de uno o más dominios VH que pueden emparejarse funcionalmente con VL para formar sitios de unión VH/VL para un antígeno o epítopo. Incluso si puede producirse alguna mutación, la invención restringe la posibilidad de esto de modo que la pureza de los dominios VL producidos por la misma recombinación VJ sea probablemente tal que predomine con diferencia un único VL reordenado (por ejemplo, a un nivel de al menos el 95 % o el 100 % como se describe adicionalmente a continuación). Por lo tanto, de 25 manera útil, la expresión de una cadena ligera común deseada puede predeterminarse (por ejemplo, proporcionando una secuencia de región variable (o cadena ligera) reordenada conocida en el locus o transgén, tal como una secuencia de región variable (o cadena ligera) reordenada conocida que codifica un VL (o cadena ligera) de un anticuerpo conocido que puede unirse específicamente a un antígeno o epítopo predeterminado. Ventajosamente, la 30 capacidad en las realizaciones para usar una secuencia de cadena ligera (por ejemplo, una V_kJ_kC_k humana reordenada de un anticuerpo humano predeterminado de especificidad y/o afinidad de unión conocida por un antígeno o epítopo) es útil ya que los emparejamientos y la selección *in vivo* en el vertebrado de la invención es entonces posible en el contexto de la cadena ligera humana completa que se usará en un producto de anticuerpo final (por ejemplo, un medicamento de anticuerpo biespecífico).

35 Opcionalmente, la cadena ligera común comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la misma. Opcionalmente, el dominio variable de la cadena ligera común comprende o consiste en el dominio variable de la secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 1, opcionalmente con 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o 1 cambio de 40 aminoácido. Cada cambio puede ser una delección, sustitución o adición de un aminoácido. En un ejemplo, la secuencia del dominio variable está determinada por la numeración de Kabat. En un ejemplo, la secuencia del dominio variable está determinada por la numeración IMGT.

45 Se proporciona un ejemplo de un enfoque *in vivo* que utiliza el ratón químico (u otro vertebrado no humano) para identificar cadenas ligeras comunes para anticuerpos multi o biespecíficos, en donde las células B del ratón se derivan de células ES con locus de cadenas ligeras reordenadas y que expresan un repertorio de cadenas ligeras de inmunoglobulinas con un número único o muy limitado de dominios variables de cadenas ligeras. El ratón químico se genera, por ejemplo, a partir de blastocitos de ratón de tipo silvestre, desactivados para RAG o desactivados para IgH, en los que se inyectan células ES de ratón que llevan la secuencia codificante de cadena ligera humana 50 reordenada de inserción y un locus de IgH humano o endógeno no reordenado. La secuencia de ADN de la cadena ligera humana reordenada se inserta de manera que pueda estar libre de hipermutación somática (SHM). Se proporcionan métodos para producir tal ratón químico u otro vertebrado no humano que expresa cadenas ligeras comunes. Se proporcionan métodos para identificar anticuerpos de cadena ligera común específicos de antígeno útiles 55 como anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, para la terapia contra el cáncer en un ser humano), al igual que tales anticuerpos *per se* y las células que los expresan.

Un flujo de trabajo de ejemplo particular puede ser:-

1. obtener un primer anticuerpo que comprende primeros dominios VH y VL humanos, en donde el anticuerpo se une específicamente a un primer antígeno predeterminado; y obtener secuencias de nucleótidos que codifican dicho VL o la cadena ligera del anticuerpo;
2. obtener una célula ES de ratón transgénico que comprende un locus de IgH (en forma heterocigota u homocigota), en donde el locus de IgH comprende una región variable humanizada para expresar una pluralidad de dominios VH humanos diferentes;
3. insertar una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo o el VL del mismo en el genoma de la célula ES, en donde la inserción es entre el E_k y C_k de un alelo del locus kappa del genoma de la célula ES;

4. opcionalmente, modificar el otro alelo del locus kappa para que no sea capaz de expresar cadenas ligeras kappa, o modificar el alelo mediante lo cual se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del primer o segundo anticuerpo o el VL del mismo entre el E_κ y C_κ de dicho otro alelo del locus kappa;
5. desarrollar la célula ES en un ratón (por ejemplo, implantando la célula ES en un blastocisto receptor o embrión premórula (por ejemplo, un blastocisto o embrión premórula desactivado para RAG y/o IgH) e implantar el blastocisto o embrión premórula en un ratón hembra pseudopreñado, mediante lo cual nacen una o más crías de la hembra), en donde el ratón o la(s) cría(s) así desarrollado(s) comprende(n) al menos un locus kappa que es capaz de expresar la cadena ligera o VL, en donde la cadena ligera o VL se empareja con cadenas pesadas o VH expresadas por el ratón para formar sitios de unión a antígeno VH/VL;
10. opcionalmente, obtener ratones de progenie, en donde cada uno de la progenie comprende al menos un locus kappa que es capaz de expresar la cadena ligera o VL, en donde la cadena ligera o VL se empareja con cadenas pesadas o VH expresadas por el ratón de progenie para formar sitios de unión a antígeno VH/VL;
15. inmunizar el ratón de la etapa 5 o dicho ratón de progenie con un segundo antígeno, en donde los antígenos primero y segundo son diferentes;
20. obtener de un ratón inmunizado de la etapa 7 (por ejemplo, usando PCR de ADN de una célula B y/o tecnología de hibridoma de una célula B de un ratón inmunizado de la etapa 7) una secuencia de nucleótidos que codifica un VH (segundo VH) que se empareja con el VL (o un VH de una cadena pesada que se empareja con el VL de la cadena ligera), en donde el segundo VH y el VL forman un sitio de unión a antígeno que se une específicamente al segundo antígeno;
25. opcionalmente, insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el primer VH, una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo VH y una secuencia de nucleótidos que codifica el VL en uno o más vectores de expresión o en el genoma de una o más células huésped, estando cada secuencia de nucleótidos de V en conexión operable en 5' de una primera región CH, segunda CH o CL de anticuerpo, respectivamente, para la expresión de primeras cadenas pesadas de anticuerpo, segundas cadenas pesadas de anticuerpo o cadenas ligeras de anticuerpo, respectivamente; opcionalmente en donde las regiones CH primera y segunda codifican los dominio CH primero y segundo que son dominios CH humanos mutados que se emparejan entre sí (por ejemplo, usando mutación de pares de carga o mutación de botón en ojal) y/o en donde las cadenas primera y segunda tienen pl diferentes (por ejemplo, separados por 0,5-1 unidad de pl);
30. opcionalmente, obtener células huésped de la etapa 9 y expresar las cadenas pesada y ligera en las células huésped, mediante lo cual se producen anticuerpos biespecíficos, comprendiendo cada uno de ellos un primer par de cadena pesada/cadena ligera que comprende un sitio de unión VH/VL que es capaz de unirse específicamente al primer antígeno, y un segundo par de cadena pesada/cadena ligera que comprende un sitio de unión VH/VL que es capaz de unirse específicamente al segundo antígeno; y
35. opcionalmente, aislar dichos anticuerpos biespecíficos.
40. Como alternativa, se utilizan epítotos primero y segundo de un antígeno en lugar de antígenos primero y segundo. En una realización, el método comprende las etapas 1 a 8; 1 a 9; 1 a 10 o 1 a 11. En un ejemplo, se proporciona un método para obtener un anticuerpo biespecífico, comenzando el método en la etapa 7. En un ejemplo, se proporciona un método para obtener un anticuerpo biespecífico, comenzando el método en la etapa 8. En un ejemplo, se proporciona un método para obtener un anticuerpo biespecífico, comenzando el método en la etapa 9. En un ejemplo, se proporciona un método para obtener un anticuerpo biespecífico, comenzando el método en la etapa 10. En un ejemplo, se proporciona un método para obtener un anticuerpo biespecífico, comenzando el método en la etapa 11.
45. En un ejemplo, el repertorio de cadenas ligeras de cada ratón usado en la etapa 7 es al menos el 95, 96, 97, 98 o 99 % puro (o 100 % puro) para el VL. Esto puede determinarse, por ejemplo, obteniendo una muestra de células B (por ejemplo, muestra de células B de bazo y/o médula ósea) del ratón, obteniendo secuencias de nucleótidos que codifican VL del mismo (por ejemplo, ARNm o ADNc) y llevando a cabo secuenciación de última generación (NGS) para determinar el porcentaje del VL (y cualquier otra especie de VL) en las secuencias de nucleótidos muestreadas. El experto en la técnica estará familiarizado con las técnicas de NGS rutinarias. Así, por ejemplo, en el presente documento "95 % puro" con respecto al VL significa que el repertorio (por ejemplo, un repertorio muestreado del ratón) comprende secuencias (por ejemplo, ARNm, ADNc o ADN) que codifican dicho VL predeterminado en una proporción del repertorio o muestra del 95 % o más, por ejemplo, tal como se determina mediante NGS. En una realización, todos (o sustancialmente todos) los dominios VL expresados por el ratón son idénticos a los VL del anticuerpo de la etapa 1. Esto puede lograrse ventajosamente debido al posicionamiento según la invención de la secuencia que codifica VL en 3' del potenciador intrónico, tal como entre este potenciador y la región constante.
50. En una alternativa, la secuencia de la región variable que codifica VL (por ejemplo, en las etapas 3 y 4 anteriores) es un inserto en el(los) alelo(s) del locus lambda de la célula o el ratón entre lambda 2-4 de ratón y C_λ o entre el potenciador de lambda 4-10 de ratón y C_λ. Además, en una realización, la secuencia de región variable que codifica VL es un inserto en el(los) alelo(s) del locus kappa de la célula o el ratón entre E_κ y C_κ.
55. Como alternativa, sólo uno de los alelos del locus lambda comprende dicho inserto; y sólo uno de los alelos del locus

kappa comprende dicho inserto.

Los insertos de región variable que codifica VL en los alelos lambda y kappa, o en los 2 lambda o en los 2 kappa pueden ser iguales o diferentes (es decir, codificar los mismos o diferentes VL, tales como VL de 2 anticuerpos diferentes de especificidad predeterminada para antígenos iguales o diferentes).

En una realización, las células ES de ratón primera y segunda (u otro vertebrado no humano, tal como rata) se modifican para comprender los locus primero y segundo de la divulgación, por ejemplo, modificándose cada célula según las etapas 1 a 4, pero en donde los insertos de secuencia de nucleótidos que codifican VL en las células son diferentes (es decir, codifican diferentes dominios VL, tales como dominios VL de diferentes anticuerpos de diferente especificidad de antígeno o epítopo). Las células ES primera y segunda (o la progenie de las mismas) se implantan en el mismo blastocisto o embrión premórula y se desarrolla un ratón (o progenie del mismo), en donde el ratón o su progenie expresan dichos dominios VL diferentes para emparejarse con dominios VH (por ejemplo, VH humano) expresados por el ratón o su progenie.

Ventajosamente, un ratón de primera generación (es decir, que ha crecido directamente a partir del blastocisto o premórula con células ES implantadas en el presente documento) es útil ya que puede inmunizarse sin necesidad de reproducirse adicionalmente a ratones de generaciones posteriores. Esto ahorra tiempo y complejidad en la reproducción. Puede ser deseable, por ejemplo, que el blastocisto o la premórula que recibe el implante de células ES comprenda una desactivación de sus locus de IgH o sea una desactivación de RAG, ya que esto obliga a que todas las células B productoras producidas en el ratón de primera generación (o ratones de generaciones posteriores) se deriven de células ES, garantizando de ese modo que todas las células B productoras comprendan uno o más locus de la invención.

Opcionalmente, por lo tanto, en general, ventajosamente puede no ser necesario obtener la transmisión por línea germinal de los locus de la invención en linajes o progenie de vertebrados no humanos; en su lugar, es posible trabajar con vertebrados quimera que han crecido a partir del blastocisto o embrión premórula, lo que proporciona ventajas de tiempo significativas sobre las técnicas de la técnica anterior donde se describe la transmisión por línea germinal de modificaciones de alelos de cadena ligera. Así, en una realización, un ratón o vertebrado de la invención es una quimera que comprende una primera pluralidad de células de la invención y una segunda pluralidad de células que no son según la invención (por ejemplo, células de tipo silvestre o transgénicas que no comprenden un locus de la invención). Opcionalmente, la quimera puede comprender una tercera pluralidad de células según la invención que comprenden locus según la invención pero que son capaces de expresar dominios V que son diferentes de los dominios V expresados por los locus de la invención de la primera pluralidad de células. Por lo tanto, es posible desarrollar un vertebrado químérico que pueda expresar dominios VL primero y segundo que son diferentes pero que están predeterminados tal como se expresan a partir de los locus de la invención. Puede ser ventajoso desactivar la expresión de uno o más locus de cadena ligera y/o pesada de la segunda pluralidad de células de modo que las cadenas pesadas y ligeras en el vertebrado solo sean aportadas por la primera y opcionalmente la tercera pluralidad de células. Además o alternativamente, la segunda pluralidad de células puede tener una desactivación de RAG (por ejemplo, RAG-1 y/o RAG-2) para eliminar la aportación a la cadena de anticuerpos de tales células en el vertebrado.

Un dominio V o sitio de unión que "se une específicamente" o es "específico para" un antígeno o epítopo particular es aquel que se une a ese antígeno o epítopo particular sin unirse sustancialmente a otros antígenos o epítopos. Por ejemplo, la unión al antígeno o epítopo es específica cuando el anticuerpo se une con una K_D de 1 mM o menos, por ejemplo, 100 μ M o menos, 10 μ M o menos, 1 μ M o menos, 100 nM o menos, por ejemplo, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 500 pM o menos, 100 pM o menos o 10 pM o menos. La afinidad de unión (K_D) puede determinarse usando procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, unión en ELISA y/o determinación de afinidad usando resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, medición de afinidad en fase de disolución BiacoreTM, ProteonTM o KinExATM que puede detectar hasta afinidades de fM (Sapidyne Instruments, Idaho)). En una realización, la resonancia de plasmón superficial (SPR) se lleva a cabo a 25 °C. En otra realización, la SPR se lleva a cabo a 37 °C. En una realización, la SPR se lleva a cabo a pH 7 o a pH 7,6 (por ejemplo, usando solución salina tamponada con HEPES a pH 7,6 (también denominada HBS-EP)). En una realización, la SPR se lleva a cabo a un nivel de sal fisiológico, por ejemplo, NaCl 150 mM. En una realización, la SPR se lleva a cabo a un nivel de detergente no superior al 0,05 % en volumen, por ejemplo, en presencia de P20 (polisorbato 20; por ejemplo, Tween-20TM) al 0,05 % y EDTA a 3 mM. En un ejemplo, la SPR se lleva a cabo a 25 °C o 37 °C en un tampón a pH 7,6, NaCl 150 mM, detergente al 0,05 % (por ejemplo, P20) y EDTA 3 mM. El tampón puede contener HEPES 10 mM. En un ejemplo, la SPR se lleva a cabo a 25 °C o 37 °C en HBS-EP. HBS-EP está disponible de Teknova Inc. (California; número de catálogo H8022).

En un ejemplo, la afinidad se determina usando SPR

1. acoplando IgG anti-ratón (u otro vertebrado no humano relevante, para que coincida con la región C de un anticuerpo, por ejemplo) (por ejemplo, Biacore BR-1008-38) a un chip biosensor (por ejemplo, chip GLM) tal como mediante acoplamiento de aminas primarias;
2. exponiendo la IgG anti-ratón (anticuerpo de vertebrado no humano) a un anticuerpo IgG de prueba o una cadena pesada para capturar el anticuerpo de prueba sobre el chip;
3. haciendo pasar el antígeno de prueba sobre la superficie de captura del chip a 1024 nM, 256 nM, 64

nM, 16 nM, 4 nM con 0 nM (es decir, tampón solo); y

4. determinando la afinidad de unión del anticuerpo/cadena de prueba al antígeno de prueba usando resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, en una condición SPR comentada anteriormente (por ejemplo, a 25 °C en tampón fisiológico). La SPR puede realizarse utilizando cualquier aparato de SPR

5 estándar, tal como Biacore™ o utilizando el ProteOn XPR36TM (Bio-Rad®).

La regeneración de la superficie de captura puede llevarse a cabo con glicina 10 mM a pH 1.7. Esto elimina el anticuerpo capturado y permite que la superficie se utilice para otra interacción. Los datos de unión pueden ajustarse al modelo 1:1 inherente usando técnicas estándar, por ejemplo, usando un modelo inherente al software de análisis

10 ProteOn XPR36TM.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad polipeptídica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas de cadena sencilla, así como

15 fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')2) que tiene sitio(s) de unión a antígeno VH/VL emparejados.

Un "dominio" es una estructura proteica plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de propiedades funcionales diferenciadas de las proteínas y, en muchos casos, pueden añadirse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la

20 proteína y/o del dominio.

Opcionalmente, cualquier anticuerpo multiespecífico del presente documento es un anticuerpo biespecífico. Esto incluye formatos como DVD-Ig, mAb², FIT-Ig, mAb-dAb, dock and lock, intercambio de brazos Fab, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, Kλ-cuerpo, Fab ortogonal, scDiacuerpo-Fc, diacuerpo-Fc, scFv-Fc en tandem, Fab-scFv-Fc, Fab-scFv, intracuerpo, BiTE, diacuerpo, DART, TandAb, scDiacuerpo, scDiacuerpo-CH3, Diacuerpo-CH3, triple cuerpo, minianticuerpo, minicuerpo, minicuerpo TriBi, scFv-CH3 KIH, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')2-scFv, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, HCab tetravalente, ImmTAC, botones en ojales, botones en ojales con cadena ligera común, botones en ojales con cadena ligera común y pares de carga, pares de carga, pares de carga con cadena ligera común, DT-IgG, DutaMab, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig y zybody. Para una revisión de formatos biespecíficos, véase Spiess, C., *et al.*, Mol. Inmunol. (2015). Opcionalmente, el ligando multiespecífico es un DVD-Ig, mAb², FIT-Ig, mAb-dAb, dock and lock, SEEDbody, scDiacuerpo-Fc, diacuerpo-Fc, scFv-Fc en tandem, Fab-scFv-Fc, Fab-scFv, intracuerpo, BiTE, diacuerpo, DART, TandAb, scDiacuerpo, scDiacuerpo-CH3, Diacuerpo-CH3, minicuerpo, ligando de botones en ojales, ligando de botones en ojales con cadena ligera común, ligando de botones en ojales con cadena ligera común y pares

35 de carga, pares de carga, ligando que tiene pares de carga con cadena ligera común; comprendiendo en cada caso al menos un sitio de unión a antígeno VH/VL.

Opcionalmente, la región variable reordenada (por ejemplo, una región variable reordenada que codifica un dominio VL, Vλ o Vκ, por ejemplo, un dominio humano) en el locus de cadena ligera comprende cadena arriba uno de los

40 siguientes pares de promotor y péptido señal (es decir, promotor, región SP y V en orden 5' a 3'):-

- 1) Promotor Vλ de ratón + SP de Vλ de ratón
- 2) Promotor Vλ de ratón + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
- 3) Promotor Vλ de ratón + SP de Vλ humano
- 4) Promotor Vλ de ratón + SP de Vλ de primate no humano
- 5) Promotor VK de ratón + SP de Vλ de ratón
- 6) Promotor VK de ratón + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
- 7) Promotor VK de ratón + SP de Vλ humano
- 8) Promotor VK de ratón + SP de Vλ de primate no humano
- 9) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de Vλ de ratón
- 10) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
- 11) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de Vλ humano
- 12) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de Vλ de primate no humano
- 13) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP de Vλ de ratón
- 14) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
- 15) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP de Vλ humano
- 16) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP Vλ de primate no humano
- 17) Promotor Vλ humano + SP de Vλ de ratón
- 18) Promotor Vλ humano + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
- 19) Promotor Vλ humano + SP de Vλ humano
- 20) Promotor Vλ humano + SP de Vλ de primate no humano
- 21) Promotor VK humano + SP de Vλ de ratón
- 22) Promotor VK humano + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
- 23) Promotor VK humano + SP de Vλ humano
- 24) Promotor VK humano + SP de Vλ de primate no humano

- 25) Promotor Vλ de primate no humano + SP de Vλ de ratón
 26) Promotor Vλ de primate no humano + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
 27) Promotor Vλ de primate no humano + SP de Vλ humano
 28) Promotor Vλ de primate no humano + SP de Vλ de primate no humano
 5 29) Promotor VK de primate no humano + SP de Vλ de ratón
 30) Promotor VK de primate no humano + SP de Vλ de roedor distinto de ratón
 31) Promotor VK de primate no humano + SP de Vλ humano
 32) Promotor VK de primate no humano + SP de Vλ de primate no humano
 33) Promotor Vλ de ratón + SP de VK de ratón
 10 34) Promotor Vλ de ratón + SP de VK de roedor distinto de ratón
 35) Promotor Vλ de ratón + SP de VK humano
 36) Promotor Vλ de ratón + SP de VK de primate no humano
 37) Promotor VK de ratón + SP de VK de ratón
 38) Promotor VK de ratón + SP de VK de roedor distinto de ratón
 15 39) Promotor VK de ratón + SP de VK humano
 40) Promotor VK de ratón + SP de VK de primate no humano
 41) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de VK de ratón
 42) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de VK de roedor distinto de ratón
 43) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de VK humano
 20 44) Promotor Vλ de roedor distinto de ratón + SP de VK de primate no humano
 45) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP de VK de ratón
 46) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP de VK de roedor distinto de ratón
 47) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP de VK humano
 48) Promotor VK de roedor distinto de ratón + SP de VK de primate no humano
 25 49) Promotor Vλ humano + SP de VK de ratón
 50) Promotor Vλ humano + SP de VK de roedor distinto de ratón
 51) Promotor Vλ humano + SP de VK humano
 52) Promotor Vλ humano + SP de VK de primate no humano
 53) Promotor VK humano + SP de VK de ratón
 30 54) Promotor VK humano + SP de VK de roedor distinto de ratón
 55) Promotor VK humano + SP de VK humano
 56) Promotor VK humano + SP de VK de primate no humano
 57) Promotor Vλ de primate no humano + SP de VK de ratón
 58) Promotor Vλ de primate no humano + SP de VK de roedor distinto de ratón
 35 59) Promotor Vλ de primate no humano + SP de VK humano
 60) Promotor Vλ de primate no humano + SP de VK de primate no humano
 61) Promotor VK de primate no humano + SP de VK de ratón
 62) Promotor VK de primate no humano + SP de VK de roedor distinto de ratón
 63) Promotor VK de primate no humano + SP de VK humano
 40 64) Promotor VK de primate no humano + SP de VK de primate no humano

Roedores de ejemplo son ratas, castores, topos, hámsteres, jerbos, puercoespinas, chinchillas, lemmings o campañoles. Primates no humanos de ejemplo son chimpancés, monos, gorilas, orangutanes, simios, monos (por ejemplo, macacos rhesus o monos cynomolgus), lémures o babuinos. Las fuentes de secuencias para el promotor y/o SP incluyen, por ejemplo, www.ensembl.org y secuencias obtenidas usando una muestra (por ejemplo, muestra de sangre y PCR de la secuencia) de tal roedor o primate o humano, como resultará fácilmente evidente para el experto.

50 En un ejemplo, el locus de cadena ligera de la célula, vertebrado, mamífero o ratón de la invención carece de un marcador de selección. En los ejemplos siguientes, se retuvo un marcador de selección y el locus funcionó de manera deseable. Como alternativa, puede incluirse un marcador de selección escindible al construir el locus, seguido de la escisión del marcador antes de desarrollar el vertebrado o el ratón. En un ejemplo, el marcador está flanqueado por repeticiones terminales piggyBac y se expresa transitoriamente PBase en la célula ES en la que se ha construido el locus, eliminando de ese modo el marcador. En un ejemplo, el marcador comprende puro-delta-tk flanqueado por repeticiones terminales piggyBac.

55 La divulgación proporciona además una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica o una composición para uso médico) que comprende un anticuerpo, anticuerpo biespecífico, cadena de anticuerpo (por ejemplo, cadena ligera), VL o secuencia de nucleótidos del mismo obtenida u obtenible mediante un método de la invención tal como se divulga en el presente documento; opcionalmente en donde la composición comprende un diluyente, excipiente o portador, opcionalmente en donde la composición está contenida en un recipiente IV (por ejemplo, una bolsa IV) o un recipiente conectado a una jeringa IV. Cuando la composición es una composición farmacéutica o una composición para uso médico, el diluyente, excipiente o portador es farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado o que lo puede aprobar una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de los EE. UU. o

5 incluido en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, incluidos seres humanos. Un "portador, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador, excipiente o adyuvante que puede administrarse a un sujeto, junto con un agente, por ejemplo, cualquier anticuerpo, VL o cadena de anticuerpo descrito en el presente documento, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica del agente.

10 Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de esta divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. La abreviatura "e.g." se deriva del latín *exempli gratia* y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo. Por tanto, la abreviatura "e.g." es sinónima del término "por ejemplo".

15 20 Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología celular y biología molecular en "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 19^a edición, publicado por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); Benjamin Lewin, *Genes X*, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321); Kendrew *et al.* (eds.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) y *Current Protocols in Protein Sciences* 2009, Wiley Intersciences, Coligan *et al.*, editores.

25 30 A menos que se indique lo contrario, la presente invención se realizó usando procedimientos estándar, como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. (2012); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing, Inc., Nueva York, EE. UU. (1995); o *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques* vol. 152, SL Berger y AR Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, EE. UU. (1987); *Current Protocols in Protein Science (CPPS)* (John E. Coligan, *et al.* ed., John Wiley and Sons, Inc.), *Current Protocols in Protein Science (CPCB)* (Juan S. Bonifacino *et al.* ed., John Wiley and Sons, Inc.) y *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* de R. Ian Freshney, Editor: Wiley-Liss; 5^a edición (2005), *Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology)*, vol. 57, editores Jennie P. Mather y David Barnes, Academic Press, 1^a edición, 1998).

35 40 Otros términos se definen en el presente documento dentro de la descripción de los diversos aspectos de la invención. Todas las patentes y otras publicaciones; incluidas referencias bibliográficas, patentes concedidas, solicitudes de patente publicadas y solicitudes de patente en tramitación junto con la presente (incluidas las contrapartes estadounidenses de cualquiera de estas); citadas a lo largo de esta solicitud se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder a tal divulgación en virtud de una invención anterior o por cualquier otro motivo. Todas las declaraciones sobre la fecha o representación sobre el contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

45 55 La descripción de las realizaciones de la divulgación no pretende ser exhaustiva ni limitar la divulgación a la forma precisa divulgada. Si bien en el presente documento se describen realizaciones específicas y ejemplos de la divulgación con fines ilustrativos, son posibles diversas modificaciones equivalentes dentro del alcance de la divulgación, como reconocerán los expertos en la técnica relevante. Por ejemplo, aunque las etapas o funciones del método se presentan en un orden determinado, realizaciones alternativas pueden realizar funciones en un orden diferente, o las funciones pueden realizarse sustancialmente al mismo tiempo. Las enseñanzas de la divulgación proporcionada en el presente documento pueden aplicarse a otros procedimientos o métodos según corresponda. Las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para proporcionar realizaciones adicionales. Pueden modificarse aspectos de la divulgación, si es necesario, para emplear las composiciones, funciones y conceptos de las referencias y aplicaciones anteriores para proporcionar aún más realizaciones de la divulgación. Además, debido a consideraciones de equivalencia funcional biológica, pueden realizarse algunos cambios en la estructura de la proteína sin afectar la acción biológica o química en tipo o cantidad. Estos y otros cambios pueden realizarse en la divulgación a la luz de la descripción detallada. Se pretende que todas estas modificaciones se incluyan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

60 65 Pueden combinarse elementos específicos de cualquiera de las realizaciones anteriores o sustituirse por elementos en otras realizaciones. Además, si bien las ventajas asociadas con ciertas realizaciones de la divulgación se han descrito en el contexto de estas realizaciones, otras realizaciones también pueden presentar tales ventajas, y no todas las realizaciones necesariamente presentar tales ventajas para que se encuentren dentro del alcance de la divulgación.

70 Se entenderá que configuraciones, aspectos, ejemplos y realizaciones particulares descritos en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente estudios de rutina, numerosos equivalentes a los

procedimientos específicos descritos en el presente documento. Se considera que tales equivalentes están dentro del alcance de esta invención y están cubiertos por las reivindicaciones. Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consecuente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza con el significado de "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente del error del dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Tal como se utilizan en esta memoria descriptiva y la(s) reivindicación/reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas del método adicionales no mencionados.

Cualquier parte de esta divulgación puede leerse en combinación con cualquier otra parte de la divulgación, a menos que se desprenda lo contrario del contexto.

Todas las composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin apartarse del concepto, alcance de la invención. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se considera que están dentro del alcance y concepto de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de vectores de direccionamiento para el direccionamiento a células ES de ratón

1.1 Síntesis de ADN del vector pUC57_N128L_KI

N128L es una cadena ligera λ humana reordenada a partir de IGLV3-21*01 e IGU3*02 humanos (la secuencia del dominio VL se proporciona a continuación). Genscript sintetizó un fragmento de ADN que contenía el promotor IGLV3-21*01 humano de tipo silvestre (pV λ) y el péptido señal (SP), el potenciador κ intrónico de ratón (m1E κ) y la región variable y región constante de cadena ligera N128L. Se usaron un fragmento de 1 kb entre la región V κ y J κ en el locus kappa, y un fragmento de 1 kb entre la región constante κ de ratón (C κ) y el potenciador κ en 3' de ratón (m3'E κ) como brazos de homología para el direccionamiento al casete de inserción de N128L. Después de un direccionamiento exitoso, el ADN del alelo kappa que incluye C κ de ratón se reemplazó por la inserción de N128L (figura 1).

1.2 Vector de direccionamiento pUC57_N128L_EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA

Se digirió el vector EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA con NotI y Ascl. Se purificó un fragmento de 3,6 kb utilizando el kit de purificación por PCR QIAquick™ (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se digirió el vector pUC57_N128L_KI con NotI y Ascl. Se purificó un fragmento de 7,9 kb con el kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Los fragmentos de EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA y pUC57_N128L_KI digeridos con NotI-Ascl se ligaron usando ligasa T4 (New England Biolabs) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se transformó la cepa de *E. coli* DH10B (ElectroMax™ DH10B (Invitrogen)) con la disolución de ligación. Se aislaron los respectivos ADN plasmídicos de los clones resistentes a ampicilina obtenidos utilizando el kit QIAprep™ Spin Miniprep (QIAGEN). Se confirmó que los respectivos transformantes resistentes a ampicilina resultantes tenían la inserción mediante secuenciación de Sanger.

1.3 Preparación de ADN plasmídico para el direccionamiento a células ES de ratón

Para el vector de direccionamiento pUC57_N128L_EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA, se aisló ADN plasmídico de los clones verificados por secuenciación utilizando QIAprep Maxi plus Kit™ (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se confirmó que los respectivos ADN plasmídicos tenían la inserción mediante secuenciación de Sanger.

Ejemplo 2. Generación de líneas celulares ES de ratón con inserción de N1281

2.1 Preparación de células ES de ratón

- 5 Se expandieron células de dos líneas independientes de células madre embrionarias (ES) de ratón en placas alimentadoras STO para la electroporación. Las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo hasta que alcanzaron una confluencia del 80 % al 85 % bajo el microscopio. El constructo de inserción se introdujo usando electroporación.
- 10 Las células ES se cultivaron en medio M15 suplementado con puromicina (1 µg/ml). Siete días después de la electroporación, las colonias resistentes a puromicina eran lo suficientemente grandes como para recogerse.

2.2 Microinyección de clones de células ES de ratón seleccionadas como diana

- 15 Se inyectaron células ES seleccionadas como diana en blastocistos de la cepa C57BL6. Después de la inyección, los blastocistos se transfirieron al útero de hembras híbridas F1 de la cepa C57BL6 apareadas con machos vasectomizados 3 días antes de la inyección. Se permitió que los embriones químéricos se desarrollaran a término en las receptoras pseudopreñadas, que se desarrollaron en crías que comprendían la inserción de cadena ligera.

Ejemplo 3: Ratones con cadenas ligeras comunes

- 20 Ocho ratones quimera con un alelo de inserción de cadena ligera común y una región VH humana funcional no reordenada en un locus de IgH se inmunizaron con diana X humana.
- 25 La inserción codifica para la siguiente VL N128L (en dirección N- a C-terminal):-
- SYVLTQPPSVSVA~~PGETARITCGGDNIGRKSVY~~WYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE
AGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLTVL
- 30 Después de la inmunización, se realizó la clasificación en células B de bazo utilizando un anticuerpo monoclonal contra la cadena ligera λ humana marcada con PE y diana X humana marcada con AF647 (figuras 2 y 3). Las células B que eran positivas tanto para PE como para AF647 se clasificaron como células individuales en pocillos individuales en una placa de 96 pocillos. Se construyeron bibliotecas de NGS de células individuales utilizando un protocolo estándar y se sometieron a secuenciación NGS.
- 35 Después de restar las secuencias de un control de PCR incluido en el presente experimento, se encontraron 346 clones, todos los cuales comprendían la combinación de cadena ligera λ esperada derivada de IGLV3-21*01 e IGLJ3*02. La agrupación de las secuencias de cadena ligera con la del alelo de cadena ligera de inserción demostró que 339 de 346 clones no estaban mutados, y los otros 7 clones tenían una o más mutaciones (figura 4).

40 Tabla 1: Frecuencias de cadena L común

Número de clones (de 346 en total)	Porcentaje de identidad con la cadena ligera λ humana predeterminada reordenada a partir de IGLV3-21*01 e IGLJ3*02 humanos
339	100,00 %
1	97,23 %
1	98,15 %
1	99,08 %
4	99,69 %

- 45 En comparación con las secuencias que son una coincidencia perfecta (es decir, el 100 %) para la secuencia de cadena ligera insertada, las que no coinciden completamente tienen puntuaciones de confianza más bajas (puntuación de confianza del 81,6 % (para el promedio de las secuencias a las que se les asignó una coincidencia del 100 %) frente a una puntuación de confianza del 31,7 % (para el promedio de las otras 7 secuencias), el 100 % representa la confianza más alta, el 0 % representa la confianza más baja). Por lo tanto, se encontró que, de todos los VL que se basaron en la combinación de IGLV3-21*01 e IGLJ3*02 humanos, el 98 % comprendía la secuencia V de cadena ligera común de entrada idéntica.

- 50 Después del análisis bioinformático, se encontró deseablemente que el repertorio de secuencias de dominio V de cadena pesada humana de los clones era diverso. No se identificó ningún uso humano dominante de V_H , D_H o J_H mediante el análisis bioinformático. Esto coincide con el análisis de NGS masivo de regiones variables de cadenas pesadas en células B de bazo de ratones quimera sin tratamiento previo (datos no mostrados).
- 55 El uso de segmentos génicos de VH humanos comprendía lo siguiente:

IGHV1-3*01, IGHV1-8*01, IGHV1-18*01, IGHV1-46*03, IGHV3-7*01, IGHV3-9*01, IGHV3-11*01, IGHV3-15*01, IGHV3-20*d01, IGHV3-21*03, IGHV3-23*04, IGHV3-30*18, IGHV3-33*01, IGHV3-48*02, IGHV3-53*01, IGHV4-4*02, IGHV4-31*03, IGHV4-34*01, IGHV4-39*01, IGHV4-59*01, IGHV4-61*01, IGHV5-51*01, IGHV6-1*01 e IGHV7-4-1*01.

- 5 Ejemplo 4: Construcción de un vector de direccionamiento de cadena ligera común para el direccionamiento a células ES de ratón

Se produjeron ratones con cadenas ligeras comunes adicionales tal como sigue.

10 Generación de un vector de direccionamiento de cadena ligera común

Se sintetizó un fragmento de ADN que contenía el promotor V_λ humano de tipo silvestre (pV_λ) y el péptido señal (SP), un potenciador κ intrónico de ratón (miE_κ) y una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable y una región constante de cadena ligera humana. El dominio variable de cadena ligera tiene especificidad por una diana (diana Z) distinta de la diana Y utilizada a continuación. Un fragmento de 1 kb entre V_λ y J_κ (1-5) y un fragmento de 1 kb entre la región constante κ de ratón (C_κ) y el potenciador κ en 3' de ratón ($m3'E_\kappa$) se usaron como brazos de homología para el direccionamiento al casete de inserción de cadena ligera común. Después de un direccionamiento exitoso, se reemplazarán J_κ humano (1-5) y C_κ de ratón por un casete de inserción de cadena ligera común en uno o ambos alelos.

15 Generación de células ES de ratón seleccionadas como diana con cadenas ligeras comunes

20 Se expandieron células de dos líneas de células madre embrionarias (ES) de ratón en placas alimentadoras STO para electroporación. Las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo hasta que alcanzaron una confluencia del 80 % al 85 % bajo el microscopio.

25 Dos horas antes de la electroporación, las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo. Antes de la electroporación, las células ES se lavaron dos veces con PBS y se disociaron de las placas añadiendo tripsina. Después de la incubación a 37 °C durante 20 minutos, la tripsina se inactivó añadiendo el mismo volumen de medio M15. Las células ES se disociaron en una suspensión de células individuales mediante pipeteo repetido. Las células ES se sedimentaron mediante centrifugación a 1100 rpm durante 4 minutos y se resuspendieron en tampón de electroporación (Lonza) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto.

30 30 La electroporación se realizó utilizando la máquina Amaxa™ de Lonza utilizando un protocolo de células ES de ratón preestablecido. Después de la electroporación, las células ES de cada electroporación se resuspendieron en medio M15 nuevo y se sembraron sobre una placa alimentadora de 10 cm.

35 35 Las células ES se alimentaron con medio M15 durante 3 días después de la electroporación. Las células ES de cada electroporación se pasaron 1:3 a tres placas alimentadoras de 10 cm. Dos días después del pase, las células ES se cultivaron en medio M15 suplementado con puromicina (1 µg/ml). Siete días después de la electroporación, las colonias resistentes a puromicina eran lo suficientemente grandes como para recogerse.

40 40 Las colonias resistentes a puromicina en placas alimentadoras STO de 10 cm se alimentaron con medio M15 nuevo 2 horas antes de la recogida. Se añadieron 50 µl de tripsina a cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Colonias en placas alimentadoras STO de 10 cm dos veces con tampón PBS. Se añadieron 10 ml de tampón PBS a cada placa de 10 cm.

45 45 Se recogieron colonias individuales de las placas alimentadoras utilizando una pipeta Gilson y se transfirieron al pocillo con tripsina de una placa de 96 pocillos (1 colonia/pocillo). Después de completar una placa (96 colonias recogidas), la placa de tripsina se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de eso, se añadieron a cada pocillo 150 µl de medio M15 nuevo. Las colonias se disociaron mediante pipeteo repetido. La suspensión de células individuales se transfirió a una placa alimentadora de 96 pocillos y se cultivó en una incubadora TC a 37 °C. Las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo hasta que alcanzaron una confluencia del 80 % al 85 % bajo el microscopio.

50 Pase de células ES de ratón con cadenas ligeras comunes

55 Dos horas antes del pase, las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo. Antes del pase, las células ES se lavaron dos veces con tampón PBS y se disociaron de las placas añadiendo tripsina. Después de la incubación a 37 °C durante 20 minutos, la tripsina se inactivó añadiendo el mismo volumen de medio M15. Las células ES se disociaron en una suspensión de células individuales mediante pipeteo repetido.

60 60 Las suspensiones de células ES individuales se dividieron 1:4 en cuatro placas alimentadoras STO de 96 pocillos. Las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo hasta que alcanzaron una confluencia del 80 % al 85 % bajo el microscopio.

65 Congelación de células ES en placa de 96 pocillos

65 Dos horas antes de la congelación, las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo. Antes de la congelación, las células ES se lavaron dos veces con tampón PBS y se disociaron de las placas añadiendo tripsina. Después de la

incubación a 37 °C durante 20 minutos, la tripsina se inactivó añadiendo el mismo volumen de medio de congelación 2X (60 % de DMEM, 20 % de FBS, 20 % de DMSO, recién preparado). Las células ES se disociaron en una suspensión de células individuales mediante pipeteo repetido. Se sellaron placas de 96 pocillos y se colocaron en una caja de poliestireno dentro de un congelador a -80 °C para facilitar un proceso de congelación muy lento.

- 5 **Extracción de ADN genómico**
Las células ES se lavaron dos veces con tampón PBS y se añadieron 50 µl de tampón de lisis de células ES (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, SDS al 0,5 %, NaCl 10 mM) con proteinasa K (1 mg/ml) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos. Las placas se sellaron, se envolvieron con pañuelos de papel húmedos y se colocaron en una fiambra. 10 La fiambra se incubó a 55 °C durante la noche.
- 15 El segundo día, se añadieron 100 µl de mezcla de etanol/NaCl enfriada con hielo (1,5 ml de NaCl 5 M añadidos a 98,5 ml de etanol al 100 %) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos. Las placas estuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Después de la incubación, las placas se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos. Las placas se invirtieron para decantar el líquido y se secaron sobre toallas de papel para eliminar el líquido en exceso. Las placas se lavaron dos veces añadiendo 150 µl de etanol al 70% frío y se secaron completamente sobre toallas de papel. Después de secar los sedimentos de ADN, se añadieron 30 µl de tampón TE (pH 8,0) y se resuspendió el ADN mediante incubación a 55 °C durante 30 minutos.
- 20 **Descongelación y expansión de clones de células ES de ratón con cadenas ligeras comunes**
Las placas de 96 pocillos congeladas se sacaron del congelador a -80 °C y se descongelaron en una incubadora a 37 °C hasta que todos los pocillos de las placas se volvieron transparentes. Se añadieron 2 ml de medio M15 nuevo a cada pocillo de placas alimentadoras STO de 24 pocillos. Todo el contenido de los pocillos deseados de las placas de 96 pocillos se transfirió a un pocillo de las placas de 24 pocillos. Después de que todos los clones seleccionados como diana se transfirieran a una placa de 24 pocillos, la placa se cultivó en una incubadora TC a 37 °C. Las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo hasta que alcanzaron una confluencia del 80 % al 85 % bajo el microscopio. Una vez que alcanzaron la confluencia, se pasaron 1:1 a placas alimentadoras STO de 6 pocillos y se congelaron para la microinyección.
- 30 **Microinyección de clones de células ES de ratón con cadenas ligeras comunes**
Las células ES de ratón se descongelaron y expandieron antes de la inyección. Dos horas antes de la inyección, las células ES se alimentaron con medio M15 nuevo. Antes de la inyección, las células ES se lavaron dos veces con tampón PBS y se disociaron de las placas añadiendo tripsina. Después de la incubación a 37 °C durante 20 minutos, la tripsina se inactivó añadiendo el mismo volumen de medio M15 nuevo. Las células ES se disociaron en una suspensión de células individuales mediante pipeteo repetido y se pusieron en hielo para la inyección.
- 35 Se inyectaron células ES seleccionadas como diana en blastocistos E3.5 Rag^{-/-}. Después de la inyección, los blastocistos se transfirieron al útero de hembras híbridas F1 CBA;C57BL6/J apareadas con machos vasectomizados 3 días antes de la inyección. Se permitió que los embriones químéricos se desarrollaran hasta término en las receptoras pseudopreñadas. Los ratones resultantes comprendían células derivadas de las células ES modificadas genéticamente, donde los genomas celulares comprendían la inserción de cadena ligera lambda humana en un locus kappa de ratón (el otro locus kappa se inactivó mediante delección en la región J) y una región variable de cadena pesada humana no reordenada compuesta por un locus de IgH homocigoto.
- 40 **Ejemplo 5: Producción de anticuerpo frente a la diana Y**
Inmunización
Se inmunizaron ratones quimera con cadenas ligeras comunes con la diana Y como se describe a continuación. Como primera inmunización, se administraron por vía subcutánea 40 µg/cabeza de diana Y, emulsionado con CpG (Sigma) y alumbre (antígeno 1:1). Cuatro semanas más tarde, se administraron 5 µg/cabeza de diana Y, emulsionado con CpG (Sigma) y alumbre (antígeno 1:1) mediante inyección intraperitoneal (primer refuerzo). Una semana después, se sacrificaron cuatro ratones y se extrajeron los bazos. Cuatro semanas después del primer refuerzo, se administraron 2 µg/cabeza de diana Y, emulsionado con CpG (Sigma) y alumbre (antígeno 1:1) mediante inyección intraperitoneal (segundo refuerzo) a los otros cuatro ratones. Una semana después, estos ratones fueron sacrificados y se extrajeron los bazos.
- 45 **Clasificación de células B específicas de antígeno**
Los tejidos de bazo recogidos y procesados se resuspendieron en 20 ml de FBS al 3 %/PBS. Las células se sedimentaron a 300 g durante 10 segundos a 40 °C y se resuspendieron en 300 µl de FBS al 3 %/tampón PBS.
- 50 **60** Se añadieron 20 µl de bloqueante de Fc durante 10 segundos y se almacenó a 4 °C antes de su uso.
- 55 La disolución madre de diana Y humano marcado con Alexa-647 (0,8 mg/ml) se diluyó hasta 20 µg/ml y se usó en una dilución de 1:40 (concentración final 0,5 µg/ml) para la tinción.
- 60 Se mezcló un cóctel de tinción de 100 µl que contenía CD19-PB, IgM-APC-Cy7, IgD-APC-Cy7, CD38-FITC, CD95-PE, Hu-diana Y-Alexa 647 y se añadió a 300 µl de suspensión de células de bazo. Después de la incubación a 4 °C

durante 20 minutos, se añadieron a las muestras 5 ml de FBS al 3 %/tampón PBS. Las células se sedimentaron a 300 g durante 10 minutos y se resuspendieron en 400 μ l de FBS al 3 %/tampón PBS y se filtraron a través de un filtro celular de 30 μ m. Cinco minutos antes de la clasificación, se añadieron 8 μ l de 7AAD (dilución 1:100). La estrategia de selección para la clasificación se muestra a continuación.

- 5 Cribado de células B (BCT) y recuperación de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo acopladas para la expresión.
La tecnología BCT se describe generalmente en el documento WO2015/040401.
- 10 Para la RT, se añadió una mezcla de 0,1 μ l de un cebador específico de la región constante de IgG (10 μ M), 0,1 μ l de un cebador específico de la región constante de IgK (10 μ M), 0,05 μ l de un cebador específico de la región constante de IgL (10 μ M), 1 μ l de mezcla de dNTP (10 mM), 2 μ l de tampón de primera cadena 5X, 1 μ l de DTT 0,1 M, 0,4 μ l de inhibidor de ARNasa RNaseOUTTM (Invitrogen), 0,25 μ l de SuperScriptTM III RT (200 unidades/ μ l, Invitrogen) y 1,1 μ l de agua libre de ARNasa a cada pocillo para obtener un volumen final de 10 μ l. Se realizaron reacciones de RT para generar ADNc de primera cadena.
- 15 Para la PCR de 1^a ronda, se mezcló una mezcla de 12,5 μ l de mezcla maestra 2X Q5, 0,15 μ l de una mezcla de cebadores específicos de VH (10 μ M), 0,1 μ M de una mezcla de cebadores específicos de VL (10 μ M), 0,15 μ l de una mezcla de cebadores específicos de VK (10 μ M), 0,1 μ l de un cebador específico de la región constante de IgG (10 μ M), 0,1 μ l de un cebador específico de la región constante de IgK (10 μ M), 0,1 μ l de un cebador específico de la región constante de IgL (10 μ M) y 1,8 μ l de agua libre de ARN con 10 μ l de producto RT en cada pocillo para obtener un volumen final de 25 μ l. Se realizaron reacciones de PCR para amplificar las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera.
- 20 Para la PCR de 2^a redonda, se mezcló una mezcla de 12,5 μ l de mezcla maestra 2X Q5, 0,2 μ l de un cebador de PCR anidado de VH (10 μ M), 0,2 μ l de un cebador de PCR anidado de VK (10 μ M), 0,2 μ l de un cebador de PCR anidado de VL (10 μ M), 0,2 μ l de un cebador de PCR anidado de región constante de IgG (10 μ M), 0,2 μ l de un cebador de PCR anidado de región constante de IgK (10 μ M), 0,2 μ l de un cebador de PCR anidado de región constante de IgL (10 μ M) y 10,3 μ l de agua libre de ARNasa con 1 μ l de producto de PCR de 1^a ronda en cada pocillo para obtener un volumen final de 25 μ l. Se realizaron reacciones de PCR para amplificar las regiones variables cadena pesada y cadena ligera.
- 25 Para la PCR puente, se mezcló una mezcla de 15 μ l de mezcla maestra 2X Q5, 0,1 μ l de vector pesado (100 ng/ μ l), 0,05 μ l de vector Kappa (100 ng/ μ l) y 1 μ l de mezcla de HLP479/480 (10 μ M cada uno) y 12,85 μ l de agua libre de ARNasa con 1 μ l de producto de PCR de 2^a ronda en cada pocillo para obtener un volumen final de 25 μ l. Se realizaron reacciones de PCR para amplificar las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera.
- 30 Transfección de células Expi293F
Véanse los ejemplos 6 y 7 para más detalles sobre la expresión y purificación de anticuerpos.
- 35 40 Un día antes de la transfección, se contaron las células Expi293F cultivadas (Invitrogen) para calcular la siembra celular. Se sedimentaron células Expi293F a 300 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio de expresión Expi293 nuevo precalentado para dar una dilución final de 2,5x10⁶ células/ml. Se incubaron 200 ml de suspensión celular en una incubadora con agitación Kuhner (37 °C, 140 rpm, 8 % de CO₂) hasta la mañana siguiente.
- 45 45 El día de la transfección, las células Expi293F cultivadas se contaron y se diluyeron hasta 4X10⁶ células/ml usando medio de expresión Expi293 nuevo. Se tomaron alícuotas de 500 μ l de suspensión celular en cada pocillo de placas de pocillos profundos de 96 pocillos usando el instrumento Multidrop Combi. Después de la dispensación, las placas se cubrieron con una cubierta de tipo sándwich Duetz y se incubaron en una incubadora con agitación Kuhner (37 °C, 300 rpm, alcance orbital de 50 mm, humedad del 80 %) durante 2-2,5 horas.
- 50 50 Para cada transfección, se prepararon dos mezclas.
Mezcla 1: 25 μ l de producto puente de células B + 55 μ l de RSM + 100 ng de PBase por pocillo
Mezcla 2: 1 μ l de ExpiFectamineTM 293 (Invitrogen) + 79 μ l de RSM
Se añadió la mezcla 2 a la mezcla 1 y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se añadió la mezcla incubada a los 500 μ l de disolución de cultivo celular y se incubó en una incubadora con agitación Kuhner (37 °C, 300 rpm, alcance orbital de 50 mm) durante una semana.
- 55 60 **Ejemplo 6: Expresión de anticuerpos**
Los sistemas de expresión transitoria de mamíferos permiten una producción rápida y flexible de proteínas. Son ideales para la expresión de proteínas humanas o de otros mamíferos porque estos sistemas generan proteínas recombinantes con más plegamiento nativo y modificaciones postraduccionales.
- 65 65 1. El día antes de la transfección, las células Expi293 se contaron mediante un contador de células automatizado (contador de células Eve), se sembraron en medios de expresión precalentados a una densidad de ~1,7 x 10⁶ células/ml y se incubaron durante la noche en una incubadora con agitador orbital (37 °C, 8 % de CO₂, 140 rpm).
2. El día de la transfección, se contaron las células y se ajustó el número de células a 2,5x10⁶

células/ml. Se dispensaron 2000 μ l de suspensión celular en placas de 24 pocillos profundos y se colocaron en una incubadora con agitación Kuhner (37 °C, 8 % de CO₂, 225 rpm).

Preparación de disoluciones de ADN.

5 Se prepararon disoluciones mixtas que contenían ADN plasmídico para la transfección de células Expi293. Por 2 ml de cultivo celular, se usó 1 μ g de cada uno del plásmido de expresión de cadena pesada y del plásmido de expresión de cadena ligera. Para cada transfección se usaron 2 μ g de mezcla de plásmidos de ADN diluidos en agua ultrapura.

Transfección

Se prepararon dos mezclas:

10 Mezcla 1: 2 μ g de ADN plasmídico diluidos en 40 μ l de medio Opti-MEM® I.

Mezcla 2: 80 μ l de reactivo de transfección ExpiFectamine™ 293 + 40 μ l de medio OptiMEM I.

La mezcla 2 se combinó con la mezcla 1 y se incubó durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Una vez completada la incubación, se dispensaron 165 μ l de complejo de ADN-reactivo ExpiFectamine™ 293 en cada pocillo de la placa de 24 pocillos profundos. Las células se incubaron en la incubadora con agitación Kuhner (37 °C, 8 % de CO₂, 225 rpm) durante 6 días. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron 6 días después de la transfección.

15 Ejemplo 7: Purificación de anticuerpos a partir de ratón con cadenas ligeras comunes
Se empleó una purificación en placa de 96 pocillos para purificar anticuerpos de sobrenadantes de cultivos de células Expi293F. Este método permite una purificación rápida de anticuerpos por afinidad a pequeña escala de múltiples muestras en experimentos de cribado de anticuerpos. Para lograr un alto porcentaje de recuperación, se utilizó MabSelect Sure LX™, que es una afinidad a proteína A con actividad de unión muy dinámica (60 mg de IgG humana/ml de medio), un tiempo de residencia prolongado, tolerante a álcalis y baja fuga de ligando.

Procedimiento

20 1. Se equilibró la resina MabSelect Sure LX (GE Healthcare) en 1X PBS (Gibco) para eliminar el tampón de almacenamiento, hasta una concentración final de suspensión al 10 %.

25 2. Se añaden 600 μ l de suspensión al 10 % a cada pocillo de la placa de 96 pocillos AcroPrep™ Advance (Pall).

30 3. La resina se centrifugó a 70 x rcf durante 1 min a 4 °C.

4. La resina se lavó con 300 μ l de 1X PBS, se centrifugó 70x FCR durante 1 min. Esta etapa se repitió dos veces.

35 5. Se cargaron 2 ml de sobrenadantes de cultivo celular (pH 7-8) sobre la resina MabSelect Sure LX en la placa de purificación de 96 pocillos y se centrifugó a 70-100 x rcf durante 1 minuto.

6. La placa se lavó usando 600 μ l de 1 x PBS y se centrifugó a 70-100 x rcf durante 1 minuto. Esta etapa se realiza cuatro veces en total.

35 7. Se añadieron 70 μ l de tampón de elución (IgG Elute Pierce) a cada pocillo y se incubaron durante 1 min.

40 8. La placa se centrifugó a 70-100 x rcf durante 1 minuto para recoger el eluato. Esta etapa se realiza dos veces en total.

Ejemplo 8: Análisis de SPR del anticuerpo para el antígeno Y

OBJETIVO del experimento

45 Se realizó un análisis de SPR para determinar la afinidad de unión y la cinética de interacción del aclaro 1 (es decir, un anticuerpo de tipo lambda del presente ratón con cadenas ligeras comunes) con la diana Y. La afinidad y la cinética del anticuerpo purificado se compararon con el punto de referencia y un control de isotipo (ISTC).

Métodos

50 Se utilizó resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar la afinidad de unión (K_D) al antígeno Y, las constantes cinéticas constante de asociación (k_{on}) y constante de disociación (k_{off}). El análisis se realizó utilizando un sistema Biacore 8K (GE Healthcare).

55 Se inmovilizó un anticuerpo anti-Fc de IgG humana en un chip CM4 (número de catálogo de GE Healthcare BR100534) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó un kit de acoplamiento de aminas (BioRad) para activar la superficie del chip. Posteriormente, se bloqueó la superficie con etanolamina 1 M. La ejecución de inmovilización se realizó a 25 °C usando HBS-EP como tampón de ejecución de inmovilización. Los anticuerpos monoespecíficos purificados (denominados ligando) del ejemplo 7 se capturaron sobre la superficie de CM4 anti-Fc de IgG humana a aproximadamente 2 μ g /ml. Los ligandos se inyectaron durante 60 segundos a 10 μ l/min en todos los canales activos de los 8 canales de flujo. La ejecución se realizó a 25 °C usando HBS-P 1X + CaCl₂ 2,5 mM a pH neutro como tampón de ejecución.

60 El antígeno Y humano se reconstituyó a 1 mg /ml en el tampón de ejecución y se usó como analito. El antígeno Y se inyectó en modo cinético de ciclo múltiple (MCK) a 3 concentraciones (1,5 μ M, 500 nM y 166,7 nM) con una fase de asociación de 120 segundos y una fase de disociación de 200 segundos, a un caudal de 30 μ l/s en los canales activo y de referencia. Se usaron tres inyecciones de glicina 10 mM pH 1,5 durante 60 segundos a 10 μ l/min para la fase de regeneración.

Un anticuerpo de control de isotipo IgG4PE KYAB2229 (ISTC; este no se une específicamente al antígeno Y) se capturó a 1 ug/ml durante 60 segundos a 10 μ l/min en el canal de referencia. También se capturó un anticuerpo de control de isotipo IgG4PE en el canal activo como control negativo. Se usaron dos anticuerpos contra el antígeno Y como puntos de referencia (punto de referencia 1 y punto de referencia 2). Los datos se restaron de la referencia y el tampón y se ajustaron al modelo de Langmuir 1:1. En el modelo se evaluaron los primeros 30 segundos de disociación.

Tabla 2. Afinidad de unión y constantes cinéticas constante de asociación (k_{on}) y constante de disociación (k_{off}) de anticuerpos anti-antígeno Y

Anticuerpo capturado	K_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
Punto de referencia 1	2,94X10 ⁴	4,27X10 ⁻²	1,45X10 ⁻⁶
Punto de referencia 2	4,13X10 ⁴	2,72X10 ⁻²	6,60X10 ⁻⁷
Acierto de anticuerpo 1	1,19X10 ⁵	1,25X10 ⁻¹	1,05X10 ⁻⁶
IgG4PE ISTC			NB

Los datos de asociación y disociación de la interacción se ajustaron usando un modelo de reacción biomolecular (modelo de Langmuir 1:1). Los valores para la constante de velocidad de asociación (k_{on}), la constante de velocidad de disociación (k_{off}) y la constante de disociación (K_D) se calcularon a partir de los datos de unión mediante el software BIAevaluación.

Punto de referencia 1: anticuerpo anti-antígeno Y

Punto de referencia 2: anticuerpo anti-antígeno Y

NB: no se observa unión

IgG4PE ISTC: IgG4 de control de isotipo humana

El anticuerpo del acierto 1 estaba en formato IgG4PE.

Conclusión

El acierto 1 mostró unión al antígeno Y en el intervalo de afinidad proporcionado en la tabla 2 y velocidades de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) rápidas para el antígeno Y. No se observó unión al antígeno Y con ISTC. El anticuerpo del acierto 1 muestra velocidades cinéticas y afinidad de unión similares al antígeno Y en comparación con los anticuerpos de referencia. Esto muestra que los presentes ratones con cadenas ligeras comunes pueden generar anticuerpos con dominios variables humanos que se unen específicamente al antígeno diana con una cinética de unión deseable.

Ejemplo 9: Análisis de poblaciones de células B de ratones con cadenas ligeras comunes

Se analizaron los compartimentos de células B de ratones de la invención. Los resultados se muestran en las figuras 5 a 9 como sigue. Los ratones "Rag^{-/-} seleccionados como diana" eran ratones producidos como se describe en el Ejemplo 4, derivados de células ES modificadas genéticamente. Por lo tanto, los genomas de los ratones comprendían la inserción de cadena ligera lambda humana reordenada y una región variable de cadena pesada humana no reordenada comprendida por un locus de IgH.

Figura 5

Los ratones quimera generados a partir de blastocitos Rag^{-/-} microinyectados con células ES seleccionadas como diana (Rag^{-/-} seleccionadas como diana) tenían un número total similar de células de bazo viables en comparación con los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre). Número total de células de bazo viables después de la inmunización (sensibilización con antígeno seguido de dos refuerzos con antígeno) con antígeno no divulgado (diana Y). Como control, ratones no inmunizados deficientes en Rag^{-/-} mostraron un número total bajo de células de bazo viables. Rag^{-/-} seleccionadas como diana, ratón quimera derivado de células ES seleccionadas como diana y blastocitos deficientes en Rag^{-/-}, Tipo Silvestre, ratón de tipo silvestre; Rag^{-/-} sin tratamiento previo, ratones deficientes en Rag^{-/-} no inmunizados.

Figura 6

Los ratones quimera generados a partir de blastocitos Rag^{-/-} microinyectados con células ES seleccionadas como diana (Rag^{-/-} seleccionadas como diana) tenían un número similar de células B positivas para CD19 y positivas para B220 en comparación con los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre). Número total de células B de bazo viables después de la inmunización (sensibilización con antígeno seguido de dos refuerzos con antígeno) con antígeno no divulgado (diana Y). Como control, ratones no inmunizados deficientes en Rag^{-/-} (Rag^{-/-} sin tratamiento previo) mostraron un número total mínimo de células B (CD19⁺ / B220⁺). Rag^{-/-} seleccionadas como diana, ratón quimera derivado de células ES seleccionadas como diana y blastocitos deficientes en Rag^{-/-}, Tipo Silvestre, ratón de tipo silvestre; Rag^{-/-} sin tratamiento previo, ratones deficientes en Rag^{-/-} no inmunizados.

Figura 7

El porcentaje de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220 en ratones quimera generados a partir de blastocistos $Rag^{-/-}$ microinyectados con células ES seleccionadas como diana ($Rag^{-/-}$ seleccionadas como diana) fue similar al de los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre). Porcentaje de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220 después de la inmunización (sensibilización con antígeno seguido de dos refuerzos con antígeno) con antígeno no divulgado (diana Y). Como control, ratones no inmunizados deficientes en $Rag^{-/-}$ ($Rag^{-/-}$ sin tratamiento previo) mostraron un porcentaje mínimo de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220. $Rag^{-/-}$ seleccionadas como diana, ratón quimera derivado de células ES seleccionadas como diana y blastocistos deficientes en $Rag^{-/-}$, Tipo Silvestre, ratón de tipo silvestre; $Rag^{-/-}$ sin tratamiento previo, ratones deficientes en $Rag^{-/-}$ no inmunizados.

Figura 8

El porcentaje de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220 en ratones quimera generados a partir de blastocistos $Rag^{-/-}$ microinyectados con células ES seleccionadas como diana ($Rag^{-/-}$ seleccionadas como diana) fue similar al de los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre). Porcentaje de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220 después de la inmunización (sensibilización con antígeno seguido de dos refuerzos con antígeno) con antígeno no divulgado (diana Y). Como control, ratones no inmunizados deficientes en $Rag^{-/-}$ ($Rag^{-/-}$ sin tratamiento previo) mostraron un porcentaje mínimo de población de células B de bazo positivas para CD19 y positivas para B220. $Rag^{-/-}$ seleccionadas como diana, ratón quimera derivado de células ES modificadas genéticamente seleccionadas como diana y blastocistos deficientes en $Rag^{-/-}$, Tipo Silvestre, ratón de tipo silvestre; $Rag^{-/-}$ sin tratamiento previo, ratones deficientes en $Rag^{-/-}$ no inmunizados.

Figura 9

El porcentaje de población de células B IgG positivas para antígeno en ratones quimera generados a partir de blastocistos $Rag^{-/-}$ microinyectados con células ES seleccionadas como diana ($Rag^{-/-}$ seleccionadas como diana) fue similar al de los ratones de tipo silvestre (Tipo Silvestre). Porcentaje de población de células B de bazo positivas para antígeno, positivas para CD19 o positivas para B220, negativas para IgM y negativas para IgD después de la inmunización (sensibilización con antígeno seguido de uno o dos refuerzos con antígeno) con antígeno no divulgado (diana Y). $Rag^{-/-}$ seleccionadas como diana, ratón quimera derivado de células ES modificadas genéticamente seleccionadas como diana y ratones deficientes en $Rag^{-/-}$; Tipo Silvestre, ratón de tipo silvestre.

Conclusión

Ratones quimera “ $Rag^{-/-}$ seleccionados como diana” derivados de células ES modificadas genéticamente microinyectadas en blastocistos deficientes en $Rag^{-/-}$ produjeron células B de bazo negativas para IgM, negativas para IgD y positivas para antígeno después de una sensibilización con antígeno y uno o dos refuerzos con antígeno de una manera similar a los ratones de tipo silvestre. En comparación, ratones no químéricos deficientes en $Rag^{-/-}$ no produjeron células B de bazo. Estas observaciones respaldan la observación de los inventores de que los ratones generados a partir de células ES modificadas genéticamente microinyectadas en $Rag^{-/-}$ tienen una respuesta inmunitaria funcional que generó células B IgG positivas para antígeno en respuesta a un régimen de inmunización.

De manera útil, puede emparejarse una copia respectiva de la cadena ligera común con una copia de una cadena pesada de un anticuerpo (aislado de un ratón con cadenas ligeras comunes inmunizado de la invención) que se une a la diana Y y una copia de una cadena pesada de una anticuerpo que se une a la diana Z para producir un anticuerpo biespecífico de 4 cadenas que se une específicamente a Y y Z. Esto puede expresarse a partir de una célula (por ejemplo, una célula eucariótica, de mamífero, humana, CHO, Cos o HEK293) que comprende (i) una secuencia de nucleótidos expresable que codifica la cadena ligera; (ii) una secuencia de nucleótidos expresable que codifica una cadena pesada que se une específicamente a la diana Y; y (iii) una secuencia de nucleótidos expresable que codifica una cadena pesada que se une específicamente a la diana Z. Alternativamente, la célula comprende (i) y (ii) y una segunda célula comprende (iii), en donde los productos de expresión de cadena pesada y ligera de las células pueden mezclarse para producir el anticuerpo biespecífico. Alternativamente, la célula comprende (i) y (iii) y una segunda célula comprende (ii), en donde los productos de expresión de cadena pesada y ligera de las células pueden mezclarse para producir el anticuerpo biespecífico. Alternativamente, la célula comprende (ii) y (iii) y una segunda célula comprende (i), en donde los productos de expresión de cadena pesada y ligera de las células pueden mezclarse para producir el anticuerpo biespecífico. Alternativamente, (i), (ii) y (iii) están compuestos por células respectivas separadas y los productos de expresión de cadenas de anticuerpos de las células se mezclan para producir un anticuerpo biespecífico. En un ejemplo, las regiones constantes de cadena pesada comprenden motivos o mutaciones (por ejemplo, pares de carga o motivos de botones en ojales, véanse las referencias anteriores) que promueven el emparejamiento de la cadena pesada anti-diana Y con la cadena pesada anti-diana Z.

60 Metodología**Introducción:**

Después de la inmunización con el antígeno Y, se procesaron células B de bazo que expresaban anticuerpos con cambio de clase específicos para dicho antígeno y se clasificaron las células individuales. Se analizaron ratones quimera $Rag^{-/-}$ seleccionados como diana en busca de evidencia de un sistema inmunitario funcional y se compararon con ratones de control de tipo silvestre. También se realizó una comparación adicional con ratones $Rag^{-/-}$ no químéricos, que demuestran una respuesta inmunitaria basal mínima.

Materiales :

Tabla 3: Tabla de reactivos:

Reactivos	Proveedor	N.º de cat.	N.º de lote
RPMI	Gibco	11835-063	1881906
Suero bovino fetal inactivado por calor	Gibco	10270-106	08G2073K
Tampón de lisis de ARN	Epicentre	QER090150	20151690
Bloqueante de fcX/Fc TruStain	Biolegend	101320	B221805
7-AAD	eBioscience	00-6993-50	4298663
CD19-BUV395	BD Horizon	563557	7125716
CD45R/B220-BUV395	BD Horizon	563793	7177756
IgM-BV786	BD Horizon	564028	7048650
IgD-BV605	BD Horizon	563003	7226860
Ly-6G-APCCy7	BD Pharmingen	557661	7040615
CD8a-APC-H7	BD Pharmingen	560182	7110593
F4/80-APCCy7	Biolegend	123118	B217243
CD4-APC-H7	BD Pharmingen	560181	7012678
CD11c-APC-Cy7	BD Pharmingen	561241	7096608
Tampón de lisis ACK	Life Technologies	A10492-01	N/A
Antígeno no divulgado Y-647 (1 µg /ml)	Interno		

5

Método:

Procesamiento de muestras:

Se extrajeron y homogeneizaron bazos de ratones inmunizados utilizando filtros celulares de 40 µm mediante procedimientos asépticos. Las células se sedimentaron mediante centrifugación (350 rcf durante 10 minutos a 4 °C) y el sobrenadante se aspiró cuidadosamente. Los glóbulos rojos se eliminaron mediante lisis utilizando 1 ml de tampón de lisis ACK y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. La reacción de lisis se terminó añadiendo un exceso de FBS al 3 %/tampón RPMI. Posteriormente, las células se filtraron utilizando filtros celulares de 40 µm, se sedimentaron como anteriormente y se resuspendieron en 340 µl de tampón. Se bloquearon todos los receptores de Fc expresados en las células procesadas, eliminando la tinción no específica de células B mientras se mantenía la tinción específica mediada por anticuerpos, utilizando un bloqueante de Fc. En esta fase se realizó un recuento celular total.

Tinción:

Las suspensiones de células individuales preparadas a partir de bazos se tiñeron de la siguiente manera. Se definieron poblaciones de bazo de células B maduras con cambio de clase utilizando anticuerpo anti-CD45R conjugado con BUV395 (selección), anti-CD19 conjugado con BUV395 (selección), anti-IgM conjugado con BV786 (de agotamiento) y anti-IgD conjugado con BV605 (de agotamiento). Las células distintas de las células B, como neutrófilos y monocitos, células T positivas para CD8, macrófagos, células T positivas para CD4 y células dendríticas, se excluyeron utilizando anticuerpo anti-Ly-6G/C conjugado con APCCy7, anti-CD8a conjugado con APC-H7, anti-F4/80 conjugado con APCCy7, anti-CD4 conjugado con APC-H7 y anti-CD11c conjugado con APC-Cy7, respectivamente. Las poblaciones positivas para antígeno se identificaron utilizando el mismo antígeno utilizado para la inmunización marcado con Alexa-647. Las células no viables se excluyeron utilizando 7-AAD. Se creó un conjunto de células de control sin marcar con antígeno para permitir que se derivara una FMO (fluorescencia menos uno). También se tomaron controles de tinción positivos adicionales y controles de 7AAD (vivo/muerto). Todas las reacciones de tinción se incubaron a 4 °C durante 20 minutos usando 1 x 10⁶ células en 100 µl de PBS con FBS al 3 %. Las muestras se lavaron dos veces en 400 µl de PBS con FBS al 3 % y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSaria Fusion (BD Biosciences). Todos los datos adquiridos se analizaron utilizando el software Flow-Jo™. Las células de interés eran células individuales

clasificadas directamente en placas de 96 pocillos que contenían tampón de lisis de ARN. Luego, las muestras se procesaron utilizando la tecnología de células B (BCT).

REIVINDICACIONES

1. Una célula que comprende un locus de cadena ligera kappa de anticuerpo (primer locus), en donde el locus comprende (en dirección de 5' a 3')
 5 (a) un potenciador intrónico EiK de cadena ligera;
 (b) una región variable de anticuerpo reordenada que codifica un dominio V de anticuerpo reordenado; y
 (c) una región constante de cadena ligera de anticuerpo que codifica un dominio C de cadena ligera;
 en donde el locus es operable para expresar una cadena de anticuerpo que comprende (en dirección N a C-terminal) dicho dominio V reordenado y dicho dominio C,
 10 en donde el genoma celular comprende un segundo locus de anticuerpo, en donde el segundo locus es un locus de cadena pesada de anticuerpo no reordenado que comprende (en dirección 5' a 3')
 (a) segmentos génicos de VH;
 (b) uno o más segmentos génicos de DH;
 (c) uno o más segmentos génicos de JH; y
 15 (d) una región constante de cadena pesada que codifica uno o más dominios CH;
 en donde el locus de cadena pesada es operable para expresar una pluralidad de cadenas pesadas; y
 en donde dicho locus de cadena pesada comprende
 20 (i) todos los segmentos génicos de VH humanos del grupo que consiste en IGHV1-3, IGHV1-8, IGHV1-18, IGHV1-46, IGHV3-7, IGHV3-9, IGHV3-11, IGHV3-15, IGHV3-20, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-33, IGHV3-48, IGHV3-53, IGHV4-4, IGHV4-31, IGHV4-34, IGHV4-39, IGHV4-59, IGHV4-61, IGHV5-51, IGHV6-1 e IGHV7-4-1; o
 (ii) al menos 5 segmentos génicos de VH humanos del grupo que consiste en IGHV1-3*01, IGHV1-8*01, IGHV1-18*01, IGHV1-46*03, IGHV3-7*01, IGHV3-9*01, IGHV3-11*01, IGHV3-15*01, IGHV3-20*d01, IGHV3-21*03, IGHV3-23*04, IGHV3-30*18, IGHV3-33*01, IGHV3-48*02, IGHV3-53*01, IGHV4-4*02, IGHV4-31*03, IGHV4-34*01, IGHV4-39*01, IGHV4-59*01, IGHV4-61*01, IGHV5-51*01, IGHV6-1*01 e IGHV7-4-1*01.
 25
2. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde
 (a) el dominio V reordenado es un VK y el dominio C es un CK;
 (b) el dominio V reordenado es un VK y el dominio C es un Cλ;
 30 (c) el dominio V reordenado es un vλ y el dominio C es un Cλ; o
 (d) el dominio V reordenado es un vλ y el dominio C es un CK.
3. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde el locus comprende (en dirección 5' a 3')
 35 (a) un promotor operable para promover la transcripción de la región variable;
 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de dominio variable;
 (c) dicho potenciador intrónico;
 (d) dicha región variable de anticuerpo reordenada; y (e) dicha región constante de cadena ligera de anticuerpo, en donde el locus es operable para expresar transcritos de ARN que codifican (en dirección N a C-terminal) dicha secuencia de péptido señal fusionada a la secuencia de aminoácidos de dicho dominio variable.
 40
4. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la célula es una célula ES, iPS, hibridoma o célula B.
5. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde el dominio V reordenado es un dominio V kappa o lambda.
- 45 6. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la región variable codifica un dominio V que tiene una especificidad de unión por un primer antígeno predeterminado o un primer epítopo, en donde el locus es operable para expresar una cadena de anticuerpo que comprende un dominio V que retiene dicha especificidad.
- 50 7. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la célula comprende un segundo locus de anticuerpo que es operable para expresar una segunda cadena de anticuerpo, en donde la segunda cadena comprende un segundo dominio V reordenado que forma un sitio de unión con el primer dominio V reordenado, en donde el sitio de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno o epítopo predeterminado.
- 55 8. La célula de la reivindicación 7 cuando depende de la reivindicación 6, en donde los antígenos predeterminados son diferentes y dicho otro y segundo dominios V son diferentes; o en donde los epítopos son diferentes y dicho otro y segundo dominios V son diferentes.
9. La célula de la reivindicación 8, en donde
 60 (a) el primer dominio es un dominio VL y el segundo y dichos otros dominios V son dominios VH; o
 (b) en donde el primer dominio es un dominio VH y el segundo y dichos otros dominios V son dominios VL.
10. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la región variable está dentro de 0,5 kb en 3' del potenciador.
- 65 11. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde el locus comprende un segundo potenciador que está en 3' de la región constante.

12. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la célula es una célula de mamífero no humano, rata o roedor.
- 5 13. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde dicha región constante está en un locus de anticuerpo endógeno de la célula.
- 10 14. La célula de la reivindicación 13 cuando depende de la reivindicación 1, en donde dicho locus endógeno es un locus de cadena kappa endógeno.
- 15 15. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el locus está comprendido por un transgén que está comprendido por el genoma de la célula en una posición fuera de un locus de anticuerpo endógeno.
- 20 16. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la célula es homocigota para dicho locus.
- 25 17. La célula de cualquier reivindicación anterior cuando depende de la reivindicación 1, en donde el locus de cadena pesada es operable para expresar una pluralidad de cadenas pesadas, que comprenden una pluralidad de especificidades o afinidades antigenicas, siendo capaz cada una de dichas cadenas pesadas de emparejarse con una cadena de anticuerpo codificada por el primer locus para producir cadenas emparejadas que comprenden un sitio de unión a antígeno.
- 30 18. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde cada región variable o segmento génico es humano.
- 25 19. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la célula es una célula de ratón y cada región constante es una región constante de ratón, rata o ser humano.
- 35 20. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde cada uno de dichos potenciadores es un potenciador endógeno de la célula.
- 30 21. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la célula es una célula de ratón y cada uno de dichos potenciadores es un potenciador de ratón.
- 40 22. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde
 (a) la célula es una célula de ratón, la región variable es una región variable humana, el potenciador intrónico es un potenciador intrónico de ratón en un locus de anticuerpo endógeno de la célula y dicha región constante es una región constante de ratón, rata o ser humano; o
 (b) la célula es una célula de rata, la región variable es una región variable humana, el potenciador intrónico es un potenciador intrónico de rata en un locus de anticuerpo endógeno de la célula y dicha región constante es una región constante de ratón, rata o ser humano.
- 45 23. La célula de cualquier reivindicación anterior, en donde la región variable reordenada es una reordenación de
 (a) IGLV3-21 e IGLJ3 humanos y opcionalmente conectados operativamente al promotor IGLV3-21 de línea germinal humana y/o a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal;
 (b) IGK1-39 e IGKJ1 o 5 humanos y opcionalmente conectados operativamente al promotor IGKV1-39 de línea germinal humana y/o a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal;
 (c) IGK3-20 e IGKJ1 o 5 humanos y opcionalmente conectados operativamente al promotor de IGKV3-20 de línea germinal humana y/o a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal;
 (d) VpreB y J5 humanos y opcionalmente conectados operativamente al promotor VpreB de línea germinal humana y/o a la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal.
- 50 24. Un vertebrado no humano transgénico que comprende una pluralidad de células según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 55 25. El vertebrado de la reivindicación 24, en donde la línea germinal de dicho vertebrado comprende un primer locus (y opcionalmente el segundo locus) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.
- 60 26. El vertebrado de la reivindicación 24, en donde el vertebrado es una quimera de dichas células y una pluralidad de otras células que no comprenden el primer locus, en donde la línea germinal del vertebrado no comprende dicho primer locus.
- 65 27. El vertebrado de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, que comprende una primera pluralidad de células y una segunda pluralidad de células, en donde las células de la primera pluralidad comprenden el mismo primer locus de anticuerpo idéntico, y las células de la segunda pluralidad comprenden el mismo locus de anticuerpo idéntico adicional, en donde cada locus de anticuerpo es según el primer locus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en donde el vertebrado es capaz de expresar una primera pluralidad de cadenas de anticuerpos de dicho primer locus idéntico y una segunda pluralidad de cadenas de anticuerpos de dicho locus adicional, y en donde el locus de

anticuerpo de las primeras células es diferente del locus de anticuerpo de las segundas células.

28. El vertebrado de la reivindicación 27, en donde el vertebrado comprende una tercera pluralidad de células, en donde las células de la tercera pluralidad comprenden el mismo locus de anticuerpo adicional, en donde el locus adicional es según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y es diferente de dichos locus de anticuerpos de las células primera y segunda, en donde el vertebrado es capaz de expresar una tercera pluralidad de cadenas de anticuerpos a partir del locus adicional.

29. El vertebrado de la reivindicación 27 o 28, en donde el vertebrado es una quimera de dichas células y una pluralidad de otras células que no comprenden un primer locus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 o dichos locus adicionales o extra.

30. El vertebrado de una cualquiera de las reivindicaciones 24-29, en donde el repertorio de cadenas ligeras de anticuerpos es al menos el 99 % puro para una única especie de dominio VL reordenado.

31. Una población de células de bazo, médula ósea, células B, hibridomas, células CHO, células HEK, células MEF, células COS, células HeLa o células sanguíneas, en donde cada célula es según una cualquiera de las reivindicaciones 1-23; y opcionalmente, en donde las células expresan al menos 10 especies de anticuerpos diferentes en donde (a) al menos el 95 % de los anticuerpos comparten el mismo dominio VL de cadena ligera y la población comprende al menos 10 especies de dominio VH diferentes; o

(b) los anticuerpos comprenden dominios VL derivados de la recombinación de un primer segmento génico de VL y un primer segmento génico de JL, en donde al menos el 95 % de todos dichos dominios VL derivados de dicha recombinación comprenden la misma secuencia de aminoácidos de VL y la población comprende al menos 10 especies de dominio VH diferentes.

32. Un método para identificar u obtener un anticuerpo, un dominio variable de anticuerpo, una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o un dominio variable de anticuerpo, o un vector de expresión o célula huésped que es capaz de expresar el anticuerpo o dominio, en donde el anticuerpo o dominio es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana, comprendiendo el método

(a) poner en contacto la población celular de la reivindicación 31 con dicho antígeno;
 (b) unir anticuerpos expresados o comprendidos por dicha población a dicho antígeno; y
 (c) aislar o identificar uno o más anticuerpos que se unen al antígeno, o aislar o identificar un dominio VH y/o VL de dicho uno o más anticuerpos; o identificar una secuencia de nucleótidos que codifica dicho VH o VL; y
 (d) opcionalmente

(i) correlacionar dicho anticuerpo o dominio identificado con una secuencia de nucleótidos que lo codifica, identificando de ese modo dicha secuencia;
 (ii) amplificar dicha secuencia e insertar la secuencia en un vector de expresión o en el genoma de una célula huésped para la expresión del anticuerpo o dominio codificado; y
 (iii) opcionalmente expresar y aislar dicho anticuerpo o dominio,

en donde las etapas (i) y (ii) pueden llevarse a cabo en cualquier orden.

33. El método de la reivindicación 32, que comprende usar el método para amplificar las secuencias de nucleótidos de VH y VL que codifican los dominios VH y VL del anticuerpo identificado y que comprende además insertar las secuencias de nucleótidos de VH y VL en el vector o célula para la coexpresión del VH y VL para producir sitios de unión VH/VL emparejados que son capaces de unirse al antígeno, y expresar (y opcionalmente aislar) los sitios de unión.

34. El método de la reivindicación 33, en donde el método comprende expresar el VH y VL en presencia de una especie adicional de dominio VH, en donde el VL y el VH adicional forman sitios VH/VL emparejados adicionales que son capaces de unirse a un antígeno adicional, en donde el antígeno adicional y el antígeno mencionado en la reivindicación 33 son diferentes, comprendiendo el método coexpresar (y opcionalmente aislar) los sitios de unión en donde los sitios de unión están comprendidos por anticuerpos biespecíficos codificados por el vector o la célula, en donde los anticuerpos biespecíficos comprenden un sitio de unión respectivo para cada uno de dichos antígenos.

35. El método de la reivindicación 34, en donde los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos de 4 cadenas que comprenden un primer par de cadena pesada-cadena ligera y un segundo par de cadena pesada-cadena ligera, en donde

(a) la cadena ligera en los pares primero y segundo comprende dicho dominio VL,
 (b) la cadena pesada del primer par comprende el dominio VH mencionado en la reivindicación 34, en donde el dominio VH forma un sitio de unión VH/VL con dicho dominio VL y en donde el sitio de unión es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno mencionado en la reivindicación 33;
 (c) la cadena pesada del segundo par comprende dicho dominio VH adicional que forma un sitio de unión VH/VL con dicho dominio VL y en donde el sitio de unión es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno adicional mencionado en la reivindicación 34.

36. El método de la reivindicación 35, en donde cada anticuerpo de 4 cadenas comprende regiones constantes de

cadena pesada mutadas para promover el emparejamiento de las cadenas pesadas de los pares pesado-ligero primero y segundo; opcionalmente en donde las mutaciones son mutaciones de botón en ojal o mutaciones de pares de carga.

- 5 37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 36, en donde el método comprende obtener secuencias de nucleótidos que codifican VL y/o VH a partir de las células de la reivindicación 31 o 35, y en la etapa (d) (i) usar las secuencias de nucleótidos para correlacionar uno o más de las mismas con uno o más dominios VH y/o VL de dichos anticuerpos que se unen al antígeno.
- 10 38. Un método para obtener una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o un dominio variable de anticuerpo, en donde el anticuerpo o dominio es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana, comprendiendo el método
 (a) obtener secuencias de nucleótidos que codifican VL y/o VH a partir de las células de la reivindicación 31 o 35; (b) amplificar dicha secuencia; y
 15 (c) opcionalmente, insertar la secuencia en un vector de expresión o en el genoma de una célula huésped para la expresión del anticuerpo o dominio codificado.
- 20 39. Un método para obtener una línea celular productora de anticuerpos para la producción de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno, comprendiendo el método obtener secuencias de nucleótidos que codifican VL y/o VH a partir de las células de la reivindicación 31 o 35; e insertar las secuencias en el genoma de una célula huésped, en donde
 (a) cada secuencia de VH se inserta operativamente en 5' de una región constante de cadena pesada de anticuerpo para la expresión de cadenas pesadas por la célula que comprende dominios VH y C;
 25 (b) cada secuencia de VL se inserta operativamente en 5' de una región constante de cadena ligera de anticuerpo para la expresión de cadenas ligeras por la célula que comprende dominios VL y C;
 (c) en donde las cadenas pesadas expresadas son capaces de emparejarse con las cadenas ligeras para producir pares de cadenas pesadas-ligeras, comprendiendo cada par un sitio de unión VH/VL que es capaz de unirse a un antígeno; y
 30 (d) en donde las secuencias de nucleótidos que codifican VH y VL son las secuencias de secuencias de nucleótidos que codifican VH y VL de una o más células de la reivindicación 31.
- 35 40. El método de la reivindicación 39, que comprende insertar secuencias de nucleótidos que codifican VH primera y segunda en el genoma celular, en donde
 (a) el primer VH (cuando se expresa como parte de primeras cadenas pesadas) es capaz de emparejarse con el VL (cuando se expresa como parte de cadenas ligeras) para formar un primer sitio de unión VH/VL que es capaz de unirse específicamente a un primer antígeno;
 (b) el segundo VH (cuando se expresa como parte de segundas cadenas pesadas) es capaz de emparejarse con el VL (cuando se expresa como parte de cadenas ligeras) para formar un segundo sitio de unión VH/VL que es capaz de unirse específicamente a un segundo antígeno;
 40 (c) los antígenos primero y segundo son diferentes;
 en donde las cadenas pesadas primera y segunda y las cadenas ligeras son capaces de emparejarse para producir anticuerpos biespecíficos de 4 cadenas que comprenden un primer par de cadena pesada-cadena ligera y un segundo par de cadena pesada-cadena ligera, en donde
 (d) la cadena pesada del primer par de cadena pesada-cadena ligera comprende el primer VH; y
 45 (e) la cadena pesada del segundo par de cadena pesada-cadena ligera comprende el segundo dominio VH.
- 50 41. Un método para obtener un anticuerpo biespecífico, comprendiendo el método:
 1. obtener un primer anticuerpo que comprende primeros dominios VH y VL humanos, en donde el anticuerpo se une específicamente a un primer antígeno predeterminado; y obtener secuencias de nucleótidos que codifican dicho VL o la cadena ligera del anticuerpo;
 2. obtener una célula ES de ratón transgénico que comprende un locus de IgH (en forma heterocigota u homocigota), en donde el locus de IgH comprende una región variable humanizada para expresar una pluralidad de dominios VH humanos diferentes;
 3. insertar una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo o el VL del mismo en el genoma de la célula ES, en donde la inserción es entre EiK y CK de un alelo del locus kappa del genoma de la célula ES para producir una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23;
 55 4. opcionalmente, modificar el otro alelo del locus kappa para que no sea capaz de expresar cadenas ligeras kappa, o modificar el alelo mediante lo cual se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del primer o segundo anticuerpo o el VL del mismo entre EiK y CK de dicho otro alelo del locus kappa;
 5. desarrollar la célula ES en un ratón, en donde el ratón o la(s) cría(s) así desarrollado(s) comprende(n) al menos un locus kappa que es capaz de expresar la cadena ligera o VL, en donde la cadena ligera o VL se empareja con cadenas pesadas o VH expresadas por el ratón para formar sitios de unión a antígeno VH/VL;
 60 6. opcionalmente, obtener ratones de progenie, en donde cada uno de la progenie comprende al menos un locus kappa que es capaz de expresar la cadena ligera o VL, en donde la cadena ligera o VL se
- 65

- 5 empareja con cadenas pesadas o VH expresadas por el ratón de progenie para formar sitios de unión a antígeno VH/VL;
- 10 7. inmunizar el ratón de la etapa 5 o dicho ratón de progenie con un segundo antígeno, en donde los antígenos primero y segundo son diferentes;
- 15 8. obtener de un ratón inmunizado de la etapa 7 una secuencia de nucleótidos que codifica un VH (segundo VH) que se empareja con el VL (o un VH de una cadena pesada que se empareja con el VL de la cadena ligera), en donde el segundo VH y VL forman un sitio de unión a antígeno que se une específicamente al segundo antígeno;
- 20 9. insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el primer VH, una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo VH y una secuencia de nucleótidos que codifica el VL en uno o más vectores de expresión o en el genoma de una o más células huésped, estando cada secuencia de nucleótidos de V en conexión operable en 5' de una primera región CH, segunda CH o CL de anticuerpo, respectivamente, para la expresión de primeras cadenas pesadas de anticuerpo, segundas cadenas pesadas de anticuerpo o cadenas ligeras de anticuerpo, respectivamente; opcionalmente en donde la regiones CH primera y segunda codifican los dominios CH primero y segundo que son dominios CH humanos mutados que se emparejan entre sí y/o en donde las cadenas primera y segunda tienen pl diferentes;
- 25 10. obtener células huésped de la etapa 9 y expresar las cadenas pesada y ligera en las células huésped, mediante lo cual se producen anticuerpos biespecíficos, comprendiendo cada uno de ellos un primer par de cadena pesada/cadena ligera que comprende un sitio de unión VH/VL que es capaz de unirse específicamente al primer antígeno, y un segundo par de cadena pesada/cadena ligera que comprende un sitio de unión VH/VL que es capaz de unirse específicamente al segundo antígeno; y
- 30 11. aislar dichos anticuerpos biespecíficos.
- 35 42. Un método para producir una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 o un vertebrado de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, comprendiendo el método
- 40 (a) obtener un ácido nucleico que comprende una región variable de anticuerpo reordenada que codifica un dominio V de anticuerpo reordenado; y
- 45 (b) insertar la región variable o una copia de la misma en el genoma de una célula, mediante lo cual la región variable está comprendida por un locus de anticuerpo en dicho genoma,
- 50 en donde el locus comprende (en dirección 5' a 3') (c) un potenciador intrónico EiK de cadena ligera de anticuerpo;
- 55 (d) dicha región variable de anticuerpo reordenada; y
- 60 (e) una región constante de anticuerpo que codifica un dominio C de cadena ligera de anticuerpo;
- 65 (f) opcionalmente, en donde la célula es una célula ES o una célula iPS de vertebrado no humano, comprendiendo el método además generar el vertebrado no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30 a partir de la célula.
43. El método de la reivindicación 42, en donde el dominio variable es un VL y el dominio C es CL.
44. El método de la reivindicación 42 o 43, en donde dicha inserción se lleva a cabo usando recombinación homóloga o recombinación específica de sitio con ADN cromosómico de la célula.
45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, que comprende obtener un transgén que comprende (en dirección 5' a 3')
- 50 (a) dicho potenciador intrónico EiK;
- 55 (b) dicha región variable de anticuerpo reordenada; y
- 60 (c) dicha región constante de cadena ligera de anticuerpo; e
- 65 insertar dicho transgén en el genoma de la célula, mediante lo cual dicho locus de anticuerpo está comprendido por la célula.
46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, que comprende insertar dicha región variable entre
- 50 (a) el potenciador intrónico y el CL de un locus de cadena ligera del genoma celular; o
- 55 (b) el potenciador intrónico (E μ) y el C μ de un locus de cadena pesada del genoma celular.
47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 46, en donde la región variable codifica un dominio V de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno predeterminado.
48. El método de la reivindicación 47, en donde la etapa de obtener el ácido nucleico que comprende la región variable de anticuerpo reordenada como se menciona en la reivindicación 42 comprende
- 50 (a) obtener una célula adicional que exprese dicho anticuerpo mencionado en la reivindicación 47;
- 55 (b) obtener o copiar
- i. una secuencia de ADN de la célula adicional que comprende una secuencia de región variable reordenada que codifica el dominio V; o
- 60 ii. una secuencia de ADN de la célula adicional que comprende una secuencia de región variable reordenada que

codifica el dominio V y crear una copia de ADN de dicha secuencia de ARN; obteniendo de ese modo dicho ácido nucleico.

5 49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 48, que comprende cultivar la célula resultante para producir una pluralidad de células, en donde cada célula es según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

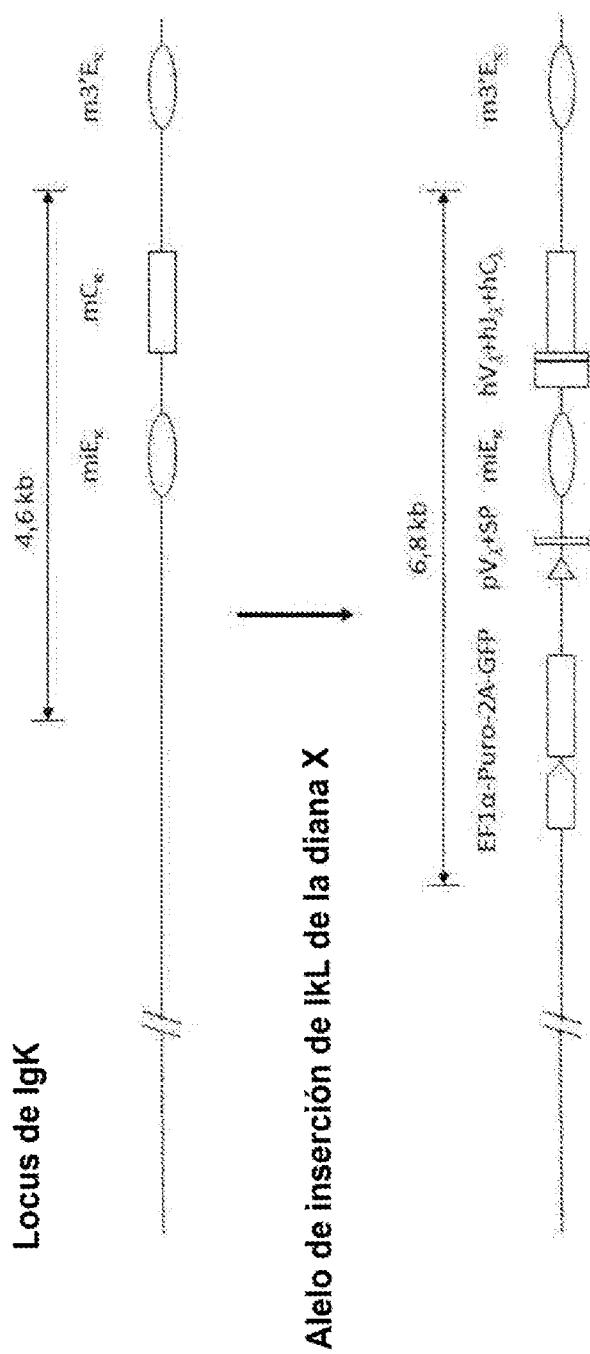
10 50. Un blastocisto o embrión premórula de vertebrado no humano implantado con una célula ES o iPS según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 u obtenido según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 42 a 49.

15 51. Un ácido nucleico que comprende un transgén para su uso en el método de la reivindicación 45, comprendiendo el transgén (en dirección 5' a 3')

- (a) dicho potenciador intrónico EiK;
- (b) dicha región variable de anticuerpo reordenada; y
- (c) dicha región constante de cadena ligera de anticuerpo.

Figura 1

Células ES de ratón



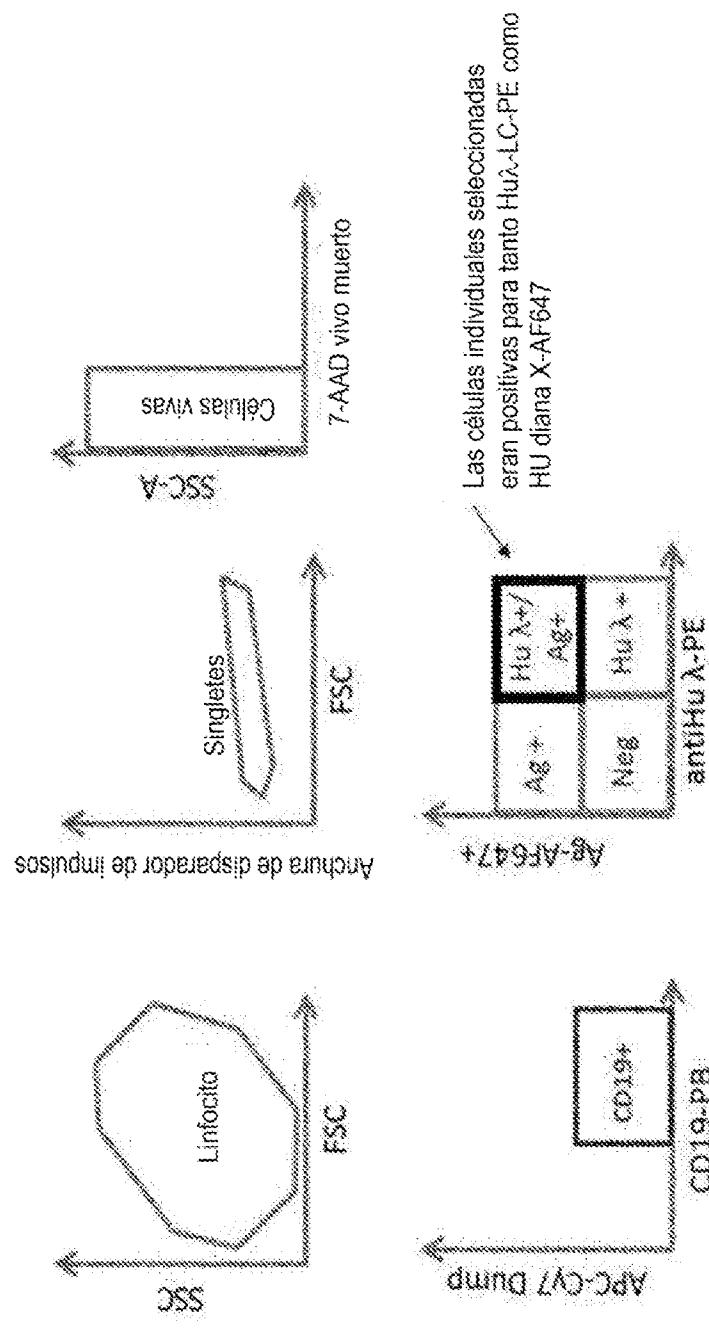


Figura 2

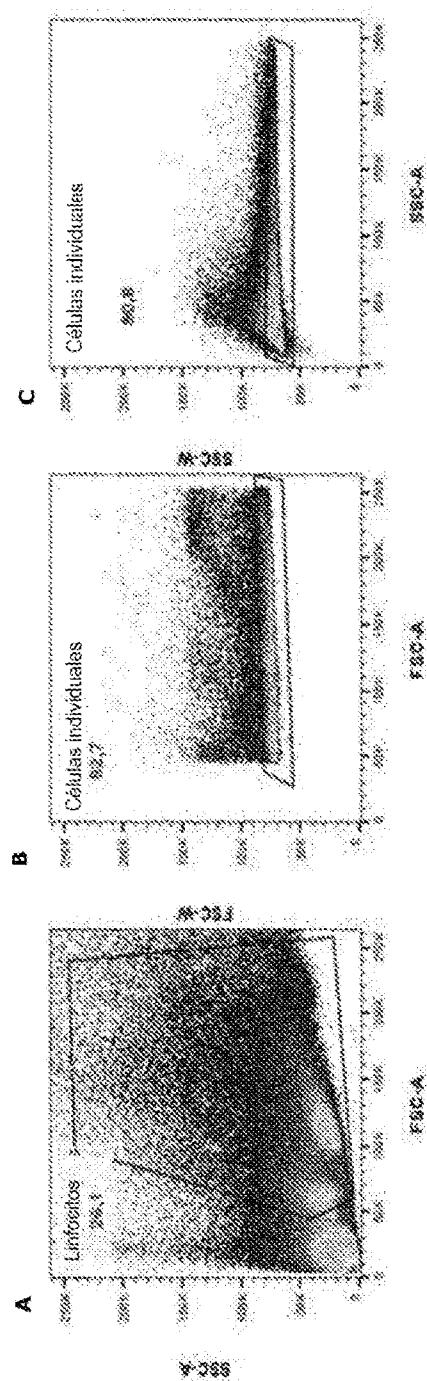


Figura 3

Figura 3, continuación

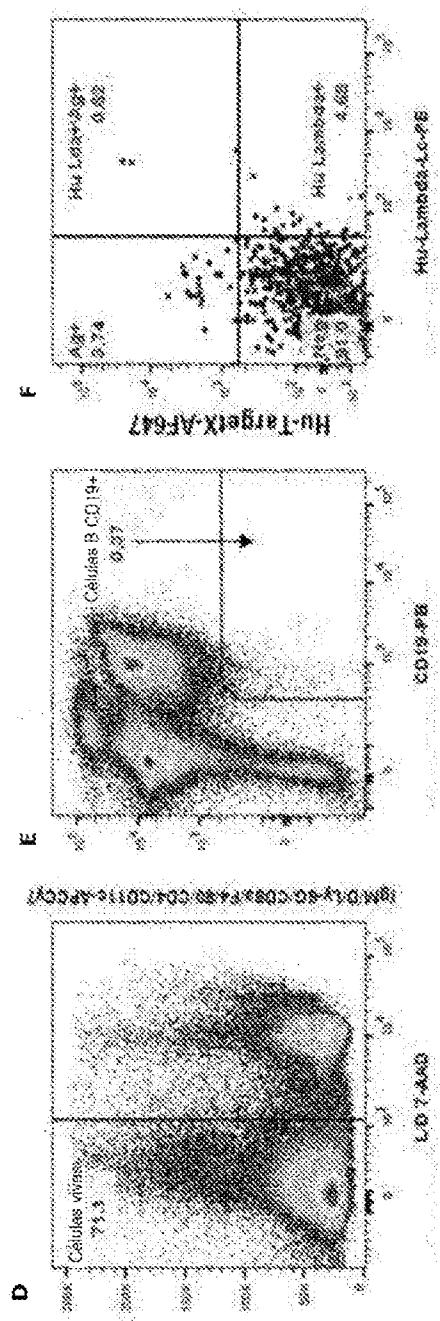


Figura 4

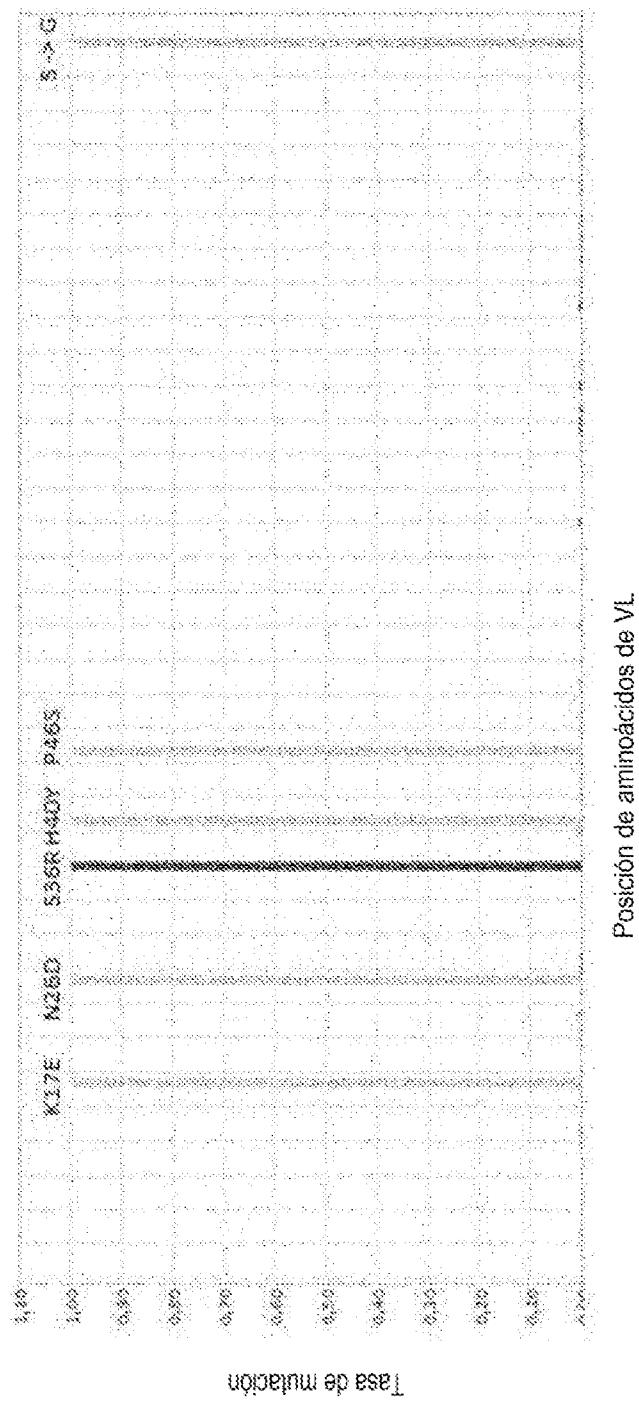


Figura 5

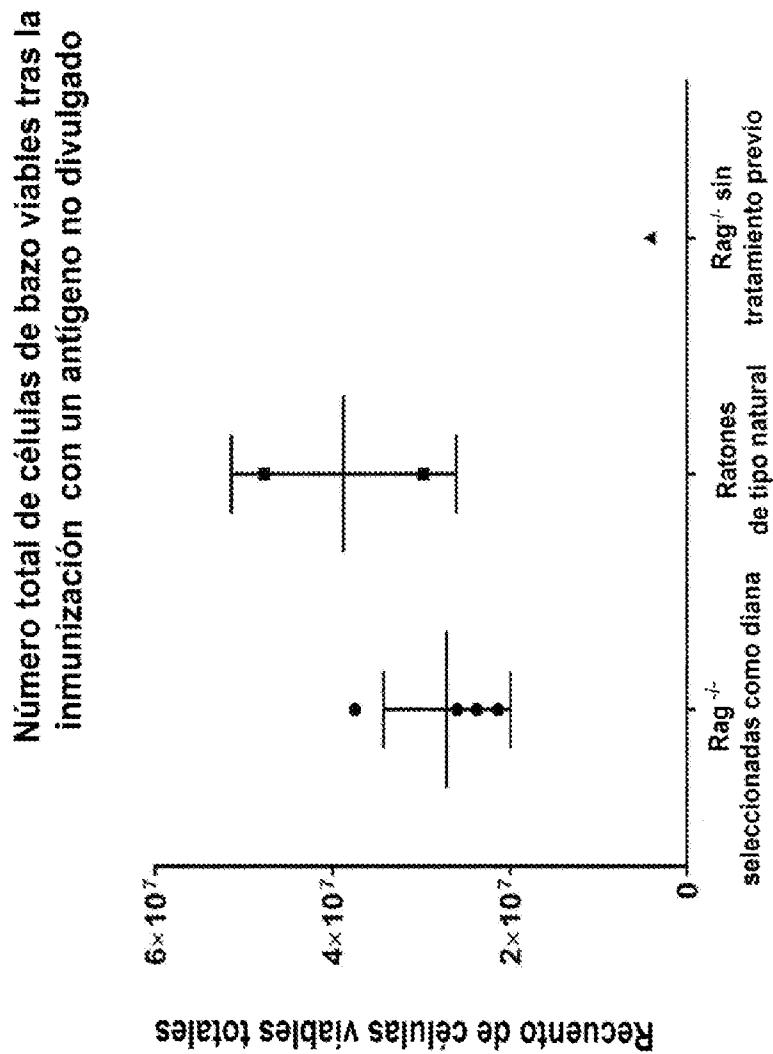


Figura 6

Número total de células B de bazo tras la
inmunización con un antígeno no divulgado

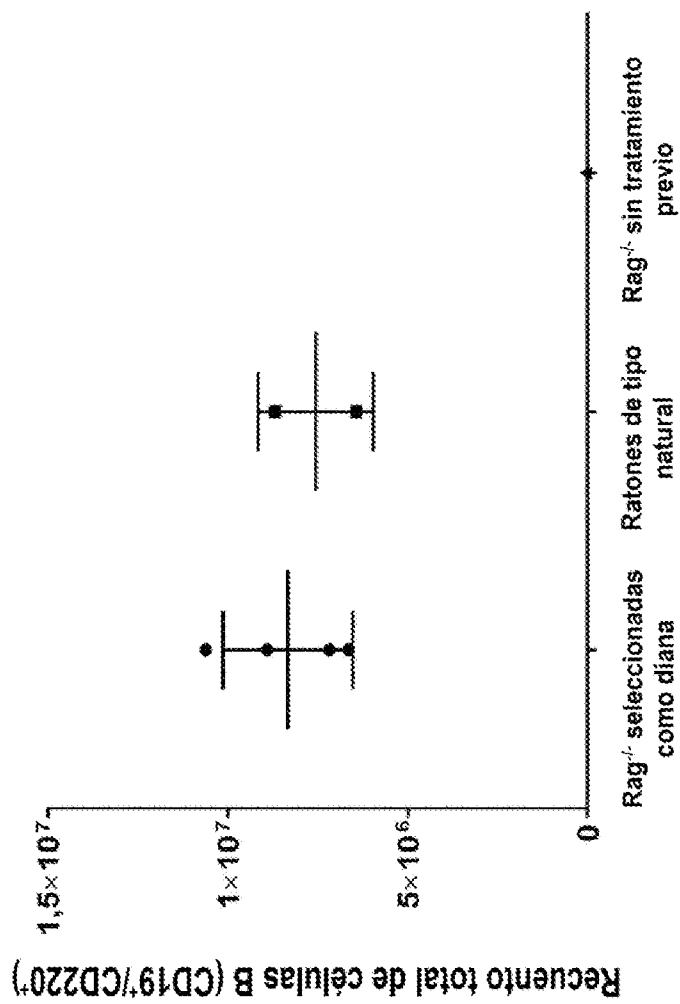


Figura 7

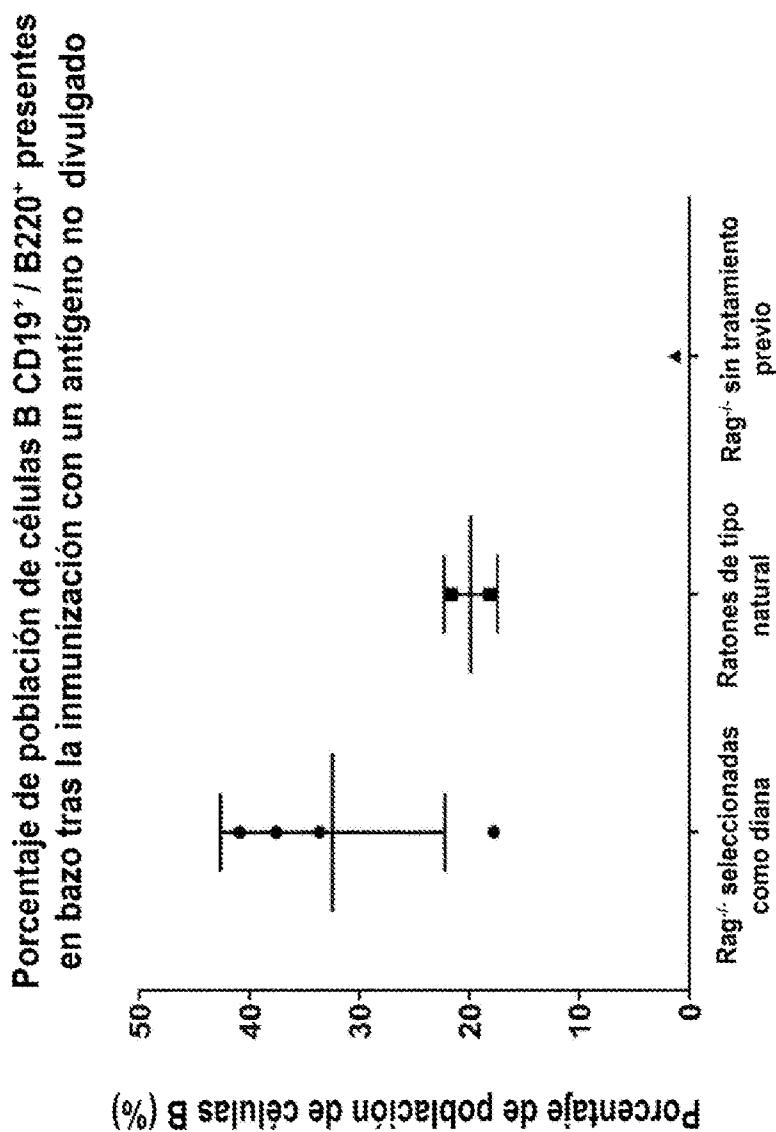


Figura 8

Porcentaje de células B de bazo CD19⁺/ B220⁺ tras la
inmunización con un antígeno no divulgado
Comparación de dos refuerzos con antígeno frente a un refuerzo
con antígeno

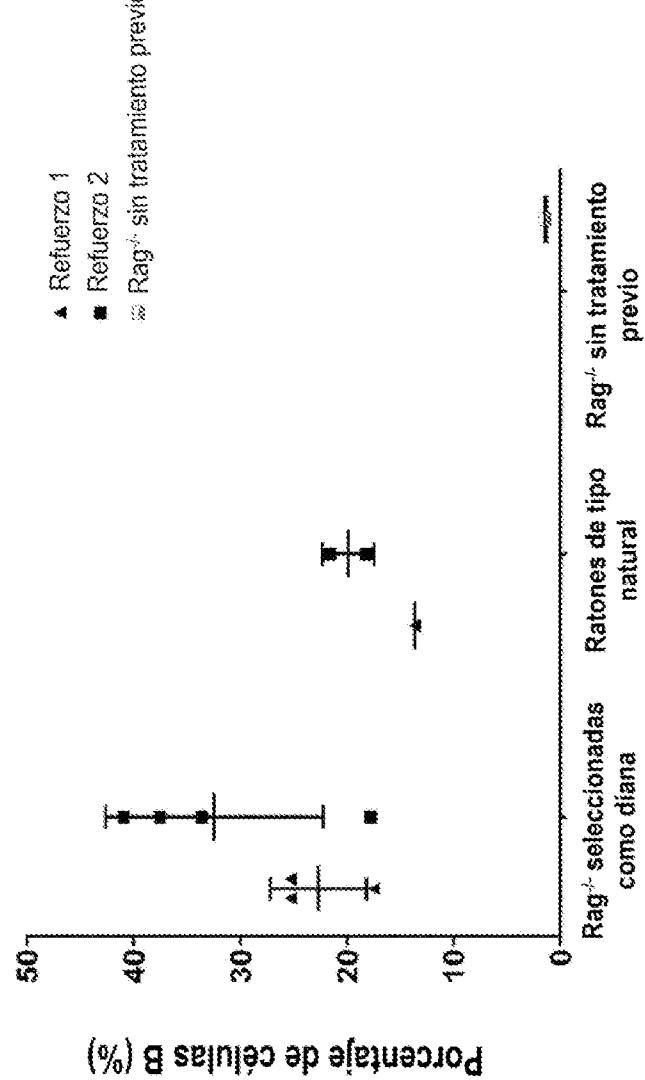


Figura 9

Porcentaje de población de células B IgG positivas para antígeno no divulgado

