

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 993 142**

(51) Int. Cl.:

A01K 67/027 (2014.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2014 E 20191651 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024 EP 3794941**

(54) Título: **Modelos animales y moléculas terapéuticas**

(30) Prioridad:

01.10.2013 FR 1359518
01.10.2013 GB 201317410

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

23.12.2024

(73) Titular/es:

KYMBAB LIMITED (100.00%)
The Bennet Building (B930), Babraham Research Campus
Cambridge CB22 3AT, GB

(72) Inventor/es:

LEE, E-CHIANG;
CLUBE, JASPER y
BRADLEY, ALLAN

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 993 142 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

Modelos animales y moléculas terapéuticas

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a ratones y ratas y células de los mismos que se modifican mediante ingeniería para contener ADN del gen de inmunoglobulina humana y a métodos para la producción de anticuerpos y cadenas de anticuerpos producidos por tales animales.

10 Sumario de la invención

Todas las coordenadas de nucleótidos para el ratón son aquellas correspondientes a NCBI m37 para la cepa C57BL/6J de ratón, por ejemplo, abril de 2007 ENSEMBL versión 55.37h, por ejemplo, NCBI37 julio de 2007 (NCBI build 37) (por ejemplo, UCSC versión mm9 véanse World Wide Web (www) genome.ucsc.edu y World Wide Web (www) genome.ucsc.edu/FAQ/FAQreleases.html) a menos que se especifique lo contrario. Las coordenadas de nucleótidos humanos son aquellas correspondientes a GRCh37 (por ejemplo, UCSC versión hg 19, World Wide Web (www) genome.ucsc.edu/FAQ/FAQreleases.html), feb. de 2009 ENSEMBL versión 55.37, o son aquellas correspondientes a NCBI36, Ensemble versión 54 a menos que se especifique lo contrario. Los nucleótidos de rata son aquellos correspondientes a RGSC 3.4 dic. de 2004 ENSEMBL versión 55.34w, o Baylor College of Medicine HGSC v3.4 nov. de 2004 (por ejemplo, UCSC rn4, véase World Wide Web (www) genome.ucsc.edu y World Wide Web (www) genome.ucsc.edu/FAQ/FAQreleases.html) a menos que se especifique lo contrario. La referencia a trabajo en ratones en el presente documento es solo a modo de ejemplo, y se considera que la referencia a ratones incluye la referencia a todos los mamíferos no humanos a menos que resulte evidente de lo contrario a partir de la divulgación, prefiriéndose los ratones como mamífero no humano.

Todas las definiciones dadas a conocer en los documentos US2012/0204278 y PCT/GB2013/050682 se dan a conocer específica y explícitamente en el presente documento.

30 La referencia a segmentos génicos humanos en el presente documento abarca tanto la secuencia de segmento genético humano de línea germinal como la forma recombinada del segmento genético que puede incluir una o más mutaciones en relación con la secuencia de segmento genético humano de línea germinal, por ejemplo, alelos dados a conocer en la base de datos IMGT y la base de datos 1000, así como en el documento WO2013041844.

35 Todos los segmentos génicos a los que se hace referencia en el presente documento pueden identificarse usando análisis de secuencias estándar mediante la comparación con secuencias de segmento genético de línea germinal humana opcionalmente referencia a las bases de datos de secuencias públicas, tal como la base de datos IMGT o 1000 Genomes.

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

La célula de vertebrado no humano de la invención es una célula de ratón o de rata. El vertebrado no humano de la invención es un ratón o una rata.

45 En un aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o a una célula cuyo genoma comprende segmentos génicos VH, D y JH humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno y/o segmentos génicos VL y JL humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera endógeno, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de expresar cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina que comprenden dominios VH y VL humanos respectivamente, comprendiendo el locus de cadena pesada un segmento genético VH de alelo 01 humano capaz de recombinarse con un segmento genético D y JH humano para producir un dominio VH, comprendiendo el locus de cadena ligera un segmento genético VL de alelo 01 humano capaz de recombinarse con un segmento genético JL humano para producir un dominio VL, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dichas cadenas pesadas y/o ligeras.

55 Tal como se explica adicionalmente en los ejemplos más adelante, los inventores han descubierto sorprendentemente que pueden usarse alelos 01 humanos para producir sitios de unión específicos de antígeno, recombinándose estos de manera apropiada en un vertebrado no humano, presentando mutaciones de unión y somáticas y pudiendo expresarse y aislarse de manera apropiada.

60 En otro aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vertebrado o célula no humano (por ejemplo, una célula de ratón o célula de rata) cuyo genoma comprende (a) JH2*01 humano y/o JH6*01 humano o JH6*02 y/o JH3*02, uno o más segmentos génicos VH humanos y uno o más segmentos génicos D humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno y/o (b) Jk2*01 humano y/o Jk4*01 humano y uno o más segmentos génicos Vk humanos en el sentido de 5' de una región

constante en un locus de cadena ligera endógeno, estando los segmentos génicos en cada locus unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de producir una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, produciéndose la cadena pesada

- 5 mediante la recombinación del segmento JH2*01 y/o JH6*01 o JH6*02 humano y/o JH3*02 con un segmento D y un segmento VH y produciéndose la cadena ligera mediante la recombinación del segmento Jk2*01 y/o Jk4*01 humano con un segmento Vk. En un ejemplo, el genoma comprende JH2*01 humano. En un ejemplo, el genoma comprende JH2*01 y JH6*01 humanos. En un ejemplo, el genoma comprende JH2*01, JH6*01 y JH3*02 humanos. En un ejemplo, el genoma comprende JH6*01 humano. En un ejemplo, el genoma comprende JH6*01 y JH3*02 humanos.
- 10 En un ejemplo, el genoma comprende JH3*02 humano. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH2*01 humano con un segmento D y un segmento VH. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH6*01 humano con un segmento D y un segmento VH. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH6*02 humano con un segmento D y un segmento VH. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH3*02 humano con un segmento D y un segmento VH.
- 15

En otro aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vertebrado no humano cuyo genoma comprende (i) JH1*01, JH2*01, JH3*02, JH4*02, JH5*02 y/o JH6*01 o JH6*02 humanos, uno o más segmentos génicos VH humanos y uno o más segmentos génicos D humanos en el sentido de 5' de una

- 20 región constante en un locus de cadena pesada endógeno y/o (ii) Jk1*01, Jk2*01, Jk3*01, Jk4*01 y/o Jk5*01 humanos y uno o más segmentos génicos Vk humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera endógeno, estando los segmentos génicos en cada locus unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de producir una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, produciéndose la cadena pesada mediante la recombinación del segmento JH1*01, JH2*01, JH3*02, JH4*02, JH5*02 y/o JH6*01 o JH6*02 humano con un segmento D y un segmento VH y produciéndose la cadena ligera mediante la recombinación del Jk1*01, Jk2*01, Jk3*01, Jk4*01 y/o Jk5*01 humano con un segmento Vk. En un ejemplo, el genoma comprende JH1*01, JH2*01, JH3*02, JH4*02, JH5*02 y JH6*01 humanos. En un ejemplo, el genoma comprende JH1*01, JH2*01, JH3*02, JH4*02, JH5*02 y JH6*02 humanos. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH2*01 humano con un segmento D y un segmento VH. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH6*01 humano con un segmento D y un segmento VH. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH6*02 humano con un segmento D y un segmento VH. En un ejemplo, la cadena pesada se produce mediante la recombinación del segmento JH3*02 humano con un segmento D y un segmento VH. Adicional o alternativamente a estos ejemplos de cadena pesada, en un ejemplo la cadena ligera se produce mediante la recombinación del segmento Jk2*01 humano con un segmento Vk.
- 25
- 30
- 35

En una realización, el vertebrado no humano comprende además uno o más de los segmentos génicos VH y/o uno o más de los segmentos génicos D de la tabla 7 y/o uno o más segmentos génicos Vk de la tabla 12. En una realización adicional, el vertebrado no humano comprende además los segmentos génicos VH y segmentos génicos D de la tabla 3 y/o los segmentos génicos Vk de la tabla 10 u 11.

- 40 Los segmentos descritos en el presente documento se han identificado por los inventores como usados amplia y altamente entre diversas poblaciones étnicas humanas y por tanto tolerados ampliamente para la generación de anticuerpos y la eficacia en humanos en general.
- 45

En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vertebrado o célula de vertebrado no humano (por ejemplo, una célula de ratón o rata célula) cuyo genoma comprende uno o más segmentos génicos VH humanos, uno o más segmentos génicos JH humanos y uno o más segmentos génicos D humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno y uno o más segmentos génicos JL humanos y uno o más segmentos génicos VL humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera, estando los segmentos génicos en cada locus unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de producir una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, comprendiendo dicho uno o más segmentos génicos VH humanos del locus de cadena pesada o consistiendo en uno, más o todos los segmentos génicos VH humanos seleccionados del grupo que consiste en VH3-23*04, VH7-4-1*01, VH4-4*02, VH1-3*01, VH3-13*01, VH3-7*01, VH3-20*d01 y VH3-9*01.

- 50
- 55
- 60 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vertebrado o célula de vertebrado no humano (por ejemplo, una célula de ratón o rata célula) cuyo genoma comprende uno o más segmentos génicos VH humanos, uno o más segmentos génicos JH humanos y uno o más segmentos génicos D humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno y uno o más segmentos génicos Jk humanos y uno o más segmentos génicos Vk humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera, estando los segmentos génicos en cada locus unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de producir una
- 65

cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, comprendiendo dicho uno o más segmentos génicos Vk humanos o consistiendo en uno, más o todos los segmentos génicos Vk humanos seleccionados del grupo que consiste en Vk4-1*01, Vk2-28*01, Vk1D-13*d01, Vk1-12*01, Vk1D-12*02, Vk3-20*01, Vk1-17*01, Vk1D-39*01, Vk3-11*01, Vk1D-16*01 y Vk1-9*d01.

En otra realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vertebrado o célula de vertebrado no humano (por ejemplo, una célula de ratón o rata célula) cuyo genoma comprende JH2*01 humano y/o JH6*02 humano, uno o más segmentos génicos VH humanos y uno o más segmentos génicos D humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno y/o Jk2*01 humano y/o Jk4*01 humano y uno o más segmentos génicos Vk humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera endógeno, estando los segmentos génicos en cada locus unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que la célula o el vertebrado es capaz de producir una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo, produciéndose la cadena pesada mediante la recombinación del segmento JH2*01 y/o JH6*02 humano con un segmento D y un segmento VH y/o produciéndose la cadena ligera mediante la recombinación del segmento Jk2*01 y/o Jk4*01 humano con un segmento Vk;

comprendiendo dicho uno o más segmentos génicos VH humanos del locus de cadena pesada o consistiendo en uno, más o todos los segmentos génicos VH humanos seleccionados del grupo que consiste en VH3-23*04, VH7-4-1*01, VH4-4*02, VH1-3*01, VH3-13*01, VH3-7*01 y VH3-20*d01 y/o

comprendiendo dicho uno o más segmentos génicos Vk humanos o consistiendo en uno, más o todos los segmentos génicos VH humanos seleccionados del grupo que consiste en Vk4-1*01, Vk2-28*01, Vk1D-13*d01, Vk1-12*01, Vk1D-12*02, Vk3-20*01, Vk1-17*01, Vk1D-39*01, Vk3-11*01, Vk1D-16*01 y Vk1-9*d01.

Opcionalmente, la referencia a un segmento génico humano en el presente documento es la forma recombinada del segmento génico.

Tal como se explica adicionalmente en los ejemplos más adelante, los inventores han descubierto sorprendentemente que pueden usarse cadenas ligeras producidas según la invención para producir sitios de unión específicos de antígeno, recombinándose estas de manera apropiada en un vertebrado no humano, presentando mutaciones de unión y somáticas y pudiendo expresarse y aislarse de manera apropiada.

En otro aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula cuyo genoma comprende un repertorio de segmentos génicos de Ig producido mediante la inserción dirigida de segmentos génicos de Ig humanos en uno o más loci de Ig endógenos, comprendiendo el genoma segmentos génicos V λ y J λ humanos en el sentido de 5' de una región constante, seleccionándose los segmentos génicos V λ y J λ humanos de uno, más o todos los segmentos de la tabla 18 y habiéndose proporcionado mediante la inserción en un locus de cadena ligera endógeno del vertebrado o la célula, comprendiendo el vertebrado cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables lambda (cadenas ligeras lambda) o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dichas cadenas ligeras de inmunoglobulina, comprendiendo las cadenas ligeras lambda cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden recombinantes de regiones variables lambda de uno, más o todos los segmentos génicos V λ y J λ humanos de la tabla 18.

Inactivación de cadena ligera endógena y alta expresión de regiones variables lambda humanas en vertebrados y células no humanos transgénicos (no forman parte de la invención reivindicada)

Tal como se explica adicionalmente en los ejemplos más adelante, los inventores han observado sorprendentemente niveles de expresión muy altos de cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda humanas (al menos el 70 o el 80% de lambda V humana) a partir de loci de cadena ligera transgénicos producidos mediante la inserción dirigida de segmentos génicos lambda humanos en loci de cadena ligera de vertebrado no humano endógenos. Esto es posible incluso en presencia de segmentos génicos V y J de vertebrado no humano endógenos en el genoma de vertebrado. Además, los niveles de expresión sorprendentemente altos se consiguen cuando la inserción de segmentos génicos lambda humanos es en el locus kappa o lambda endógeno. Tales altos niveles mediante la inserción dirigida no se han publicado hasta la fecha en la técnica.

Los inventores han observado también sorprendentemente que la expresión de cadena kappa endógena puede inactivarse completamente mediante la inserción dirigida de una secuencia génica lambda humana en el locus kappa endógeno, tal como se explica adicionalmente en los ejemplos.

La inserción dirigida de segmentos génicos humanos en loci de Ig endógenos es ventajosa porque posibilita la ubicación operativa de secuencias de Ig humanas insertadas con respecto a regiones constantes de Ig endógenas y regiones de control endógenas, tales como potenciadores y otras regiones de control de locus, por ejemplo. Por tanto, la inserción dirigida permite aprovechar el control endógeno importante en uno o más de recombinación de

segmentos génicos de Ig, exclusión alélica, maduración por afinidad, cambio de clase, niveles de expresión de Ig y desarrollo deseable del compartimento de células B. Como tal, la inserción dirigida es superior a intentos anteriores en la técnica para producir loci y expresión de Ig transgénicos, intentos que se basaban en la introducción en células de vertebrado no humano de vectores tales como YAC que portan segmentos génicos de Ig humanos. Los YAC se integran al azar en el genoma de la célula de vertebrado, de modo que es difícil conseguir el control proporcionado mediante la inserción dirigida y los beneficios concomitantes que se obtienen en términos de aprovechar los mecanismos de control endógeno. Además, la inserción al azar da como resultado a menudo que los segmentos génicos de Ig humanos insertados pasen a estar bajo el control de elementos de control heterólogos y/o modificaciones cromosómicas epigenéticas tales como confirmaciones de metilación y de cromatina, cualquiera de las cuales puede ser perjudicial para una recombinación de segmentos génicos de Ig, exclusión alélica, maduración por afinidad, cambio de clase, niveles de expresión de Ig y desarrollo deseable del compartimento de células B apropiados. La inserción al azar da como resultado normalmente 2 o más copias del transgén introducido que pueden provocar inestabilidad cromosómica y por tanto dar como resultado un rendimiento de reproducción pobre de los animales además de efectos perjudiciales sobre una recombinación de segmentos génicos de Ig, exclusión alélica, maduración por afinidad, cambio de clase, niveles de expresión de Ig y desarrollo deseable del compartimento de células B apropiados. Por tanto, los intentos de la técnica anterior que usan inserción al azar han tendido a conducir a un desarrollo de células B pobre, compartimentos de células B relativamente pequeños y una expresión de Ig inferior y una dificultad concomitante a la hora de aislar un anticuerpo con una característica deseada.

Vertebrados no humanos que expresan Regiones variables kappa y lambda (no forman parte de la invención reivindicada)

(i) Cadenas K y L producidas en relaciones similares a las humanas

Este aspecto de la divulgación es útil para producir cadenas ligeras que no están sesgadas hacia relaciones no similares a las humanas. Por ejemplo, en ratones las cadenas ligeras de tipo kappa predominan por mucho con respecto a las cadenas ligeras de tipo lambda (normalmente del orden del 95% de cadenas ligeras kappa:5% de cadenas ligeras lambda en un ratón de tipo silvestre). Los humanos, por otra parte, presentan normalmente alrededor del 60% de kappa:alrededor del 40% lambda. Por tanto, la expresión de lambda es mucho mayor que la encontrada en un ratón. Sería deseable proporcionar un vertebrado no humano, tal como un ratón o una rata, en el que pueda expresarse una proporción mayor de cadenas ligeras de tipo lambda. Esto es útil cuando el vertebrado expresa cadenas ligeras que portan regiones variables lambda humanas y otras cadenas ligeras que portan regiones variables kappa humanas. Para este fin, los inventores han demostrado por primera vez un vertebrado de este tipo que expresa cadenas ligeras lambda elevadas, y por tanto la divulgación proporciona:-

Un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) cuyo genoma comprende un repertorio de segmentos génicos de Ig producido mediante la inserción dirigida de segmentos génicos de Ig humanos en uno o más loci de Ig endógenos, comprendiendo el genoma segmentos génicos V λ y J λ humanos proporcionados mediante la inserción en un locus de cadena ligera endógena del vertebrado en el sentido de 5' de una región constante, comprendiendo el genoma segmentos génicos V k y J k humanos proporcionados mediante la inserción en un locus de cadena ligera endógena del vertebrado en el sentido de 5' de una región constante, expresando el vertebrado cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables de cadena ligera kappa y cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables de cadena ligera lambda, comprendiendo más del 20% de las cadenas ligeras expresadas por el vertebrado regiones variables lambda (por ejemplo, tal como se determina mediante FACS de células B esplénicas).

Las cadenas ligeras restantes expresan regiones variables kappa.

El documento WO03047336 enseña el deseo de producir relaciones de kappa:lambda similares a la humana, pero no proporciona una divulgación posibilitada o plausible de cómo conseguirlo.

(ii) Cadenas K y L producidas con compartimentos de células B normales

Los inventores han generado exitosamente vertebrados no humanos que contienen una inserción dirigida de segmentos génicos lambda V y J humanos para posibilitar la expresión de cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda humanas mediante compartimentos de células B normales (es decir, comparable a vertebrado de tipo silvestre). Por tanto, los inventores han proporcionados tales vertebrados que pueden producir de manera útil tales cadenas ligeras con buenos repertorios y de manera más fiable que los vertebrados no humanos transgénicos de la técnica anterior que presentaban compartimentos de células B comprendidos de tamaño y madurez reducidos, y que de hecho pueden incluso no producir cadenas ligeras que tienen regiones variables lambda humanas. Por tanto, la divulgación proporciona:-

Un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) cuyo genoma comprende un repertorio de segmentos génicos de Ig producido mediante la inserción dirigida de segmentos génicos de Ig humanos en uno o más loci de Ig endógenos, comprendiendo el genoma segmentos génicos V λ y J λ humanos proporcionados mediante la inserción

- en un locus de cadena ligera endógeno del vertebrado en el sentido de 5' de una región constante, comprendiendo el genoma segmentos génicos V_k y J_k humanos proporcionados mediante la inserción en un locus de cadena ligera endógeno del vertebrado en el sentido de 5' de una región constante, expresando el vertebrado cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables de cadena ligera kappa y cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables de cadena ligera lambda, y produciendo el vertebrado una proporción o porcentaje normal de células B esplénicas maduras (por ejemplo, tal como se determina mediante FACS de células B esplénicas).
- 5 Con respecto a vertebrados no humanos (i) y (ii), se contemplan las siguientes realizaciones (a menos que se especifique, cada realización es aplicable a (i) o (ii)):-
- 10 En una realización, la inserción V_λ y J_λ humana comprende al menos los segmentos génicos V y J humanos funcionales comprendidos por un locus de Ig de cadena lambda humano de desde V_λ3-27 hasta C_λ7.
- 15 En una realización, la inserción V_λ y J_λ humana comprende al menos los segmentos génicos V humanos V_λ3-27, V_λ3-25, V_λ2-23, V_λ3-22, V_λ3-21, V_λ3-19, V_λ2-18, V_λ3-16, V_λ2-14, V_λ3-12, V_λ2-11, V_λ3-10, V_λ3-9, V_λ2-8, V_λ4-3 y V_λ3-1, opcionalmente los alelos de la tabla 18.
- 20 En una realización, la inserción V_λ y J_λ humana comprende uno, más o todos los segmentos génicos J humanos J_λ1, J_λ2, J_λ3, J_λ6 y J_λ7.
- En una realización, la inserción V_λ y J_λ humana comprende una inserción de una agrupación J_λ-C_λ humana, comprendiendo la agrupación los segmentos génicos J y C de desde J_λ1 hasta C_λ7.
- 25 En una realización, la inserción V_λ y J_λ humana comprende una inserción de un potenciador E_λ humano. Por ejemplo, el potenciador E_λ se proporciona en configuración de línea germinal con respecto a un J_λ7 humano que también está comprendido por la inserción. Por ejemplo, el potenciador E_λ se proporciona en configuración de línea germinal con respecto a una agrupación J_λ-C_λ humana que está comprendida también por la inserción, comprendiendo la agrupación J_λ1 a C_λ7 en configuración de línea germinal humana. En una configuración de línea germinal humana, el potenciador E_λ está 3' de la agrupación J_λ-C_λ.
- 30 En una realización o vertebrado (i) o (ii), la inserción V_λ y J_λ humana se proporciona mediante una inserción de una secuencia que corresponde a las coordenadas 22886217 a 23327884 del cromosoma 22 humano.
- 35 En una realización o vertebrado (ii), la inserción V_λ y J_λ humana se proporciona mediante una inserción de una secuencia que corresponde a las coordenadas 23064876 a 23327884 del cromosoma 22 humano.
- En una realización, la inserción de V_k y J_k humanos comprende al menos los segmentos génicos V y J humanos funcionales comprendidos por un locus de Ig de cadena capa humano de desde V_k1-33 hasta J_k5.
- 40 En una realización, la inserción de V_k y J_k humanos comprende al menos segmentos génicos V humanos V_k1-33, V_k2-30, V_k2-29, V_k2-28, V_k1-27, V_k2-24, V_k3-20, V_k1-17, V_k1-16, V_k3-15, V_k1-13, V_k1-12, V_k3-11, V_k1-9, V_k1-8, V_k1-6, V_k1-5, V_k5-2 y V_k4-1, opcionalmente los alelos de la tabla 12.
- 45 En una realización, la inserción de V_k y J_k humanos comprende uno, más o todos los segmentos génicos J humanos J_k1, J_k2, J_k3, J_k4 y J_k5, opcionalmente los alelos de la tabla 12.
- En una realización, más del 30, del 35, del 40, del 45 o del 50% de las cadenas ligeras expresadas por el vertebrado comprenden regiones variables lambda.
- 50 En una realización, desde el 20 hasta el 40, el 45 o el 50% de las cadenas ligeras expresadas por el vertebrado comprenden regiones variables lambda. En una realización, desde el 30 hasta el 40, el 45 o el 50% de las cadenas ligeras expresadas por el vertebrado comprenden regiones variables lambda.
- 55 En una realización, dichas regiones variables de cadena ligera kappa son regiones variables de cadena ligera kappa humanas.
- En una realización, los segmentos génicos V_k y J_k humanos están en un locus de cadena ligera kappa endógeno del vertebrado en el sentido de 5' de una región constante kappa.
- 60 En una realización, los segmentos génicos V_λ y J_λ humanos están en un locus de cadena ligera kappa endógeno del vertebrado.
- 65 En una realización, los segmentos génicos V_λ y J_λ humanos están en un locus de cadena ligera lambda endógeno del vertebrado.

- En una realización, el vertebrado expresa cadenas ligeras que comprenden regiones variables kappa humanas y expresa cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda humanas. En un ejemplo, la expresión de cadena kappa (de vertebrado no humano) endógena es sustancialmente inactiva o es inactiva y/o la expresión de cadena lambda (de vertebrado no humano) endógena es sustancialmente inactiva o es inactiva. Cuando el vertebrado es un ratón, la expresión de cadena lambda de ratón es normalmente muy baja (alrededor del 5% o menos) y en este caso puede no ser necesario modificar mediante ingeniería el genoma del ratón para inactivar adicionalmente la expresión de cadena lambda endógena. Por tanto, cuando el vertebrado es s ratón, la expresión de cadena kappa endógena es sustancialmente inactiva o es inactiva y la expresión de cadena lambda de ratón es del 5% o menos de toda la expresión de cadena ligera.
- En una realización, el vertebrado produce una proporción o porcentaje normal de células B esplénicas maduras. Por ejemplo, esto puede determinarse mediante FACS de células B esplénicas aisladas del vertebrado.
- En una realización, el vertebrado produce una relación normal de T1, T2 y células B esplénicas maduras. Por ejemplo, esto puede determinarse mediante FACS de células B esplénicas aisladas del vertebrado.
- En una realización, al menos el 40, el 50, el 60 o el 70 % de las células B esplénicas totales producidas por el vertebrado son células B maduras. Por ejemplo, esto puede determinarse mediante FACS de células B esplénicas aisladas del vertebrado.
- Afirmaciones adicionales de la divulgación (no forman parte de la invención reivindicada)
- En una realización, la divulgación se refiere a lo siguiente:
- Un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula de vertebrado cuyo genoma comprende segmentos génicos VH, D y JH humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno y/o segmentos génicos VL y JL humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera endógeno, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de expresar cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina que comprenden dominios VH y VL humanos respectivamente, comprendiendo el locus de cadena pesada un segmento genético VH humano capaz de recombinarse con un segmento genético D y JH humano para producir un dominio VH, comprendiendo el locus de cadena ligera un segmento genético VL humano capaz de recombinarse con un segmento genético JL humano para producir un dominio VL, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dichos dominios variables de cadena pesada y ligera.
- Un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula de vertebrado cuyo genoma comprende segmentos génicos VH, D y JH humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de expresar cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden dominios VH humanos, comprendiendo el locus de cadena pesada un segmento genético VH de alelo 01 humano capaz de recombinarse con un segmento genético D y JH humano para producir un dominio VH, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dicho dominio variable de cadena pesada.
- Un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula de vertebrado cuyo genoma comprende segmentos génicos VL y JL en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera endógeno, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de expresar cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden dominios VL humanos, comprendiendo el locus de cadena ligera un segmento genético VL de alelo 01 humano capaz de recombinarse con un segmento genético JL humano para producir un dominio VL, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dicho dominio variable de cadena ligera.
- Opcionalmente el vertebrado o la célula tiene un genoma que comprende el locus de cadena pesada y el locus de cadena ligera definidos anteriormente y por tanto comprende un locus de cadena pesada que comprende un segmento genético VH de alelo 01 humano capaz de recombinarse con un segmento genético D y JH humano para producir un dominio VH y un locus de cadena ligera que comprende un segmento genético VL de alelo 01 humano capaz de recombinarse con un segmento genético JL humano para producir un dominio VL.
- En una realización alternativa, la divulgación se refiere a un vertebrado o célula de vertebrado no humano (por ejemplo, una célula de ratón o rata célula) cuyo genoma comprende uno o más segmentos génicos VH humanos, uno o más segmentos génicos JH humanos y uno o más segmentos génicos D humanos en el sentido de 5' de una región constante en una cadena pesada endógena, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que la célula o el vertebrado es capaz de producir una cadena pesada de anticuerpo, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa una cadena pesada de anticuerpo, comprendiendo dicho uno o más segmentos génicos VH humanos del locus de cadena pesada o consistiendo en uno, más o todos los segmentos génicos VH humanos seleccionados del grupo que consiste en VH3-23*04, VH7-4-1*01, VH4-4*02, VH1-3*01, VH3-13*01, VH3-7*01, VH3-20*d01 y VH3-9*01.

- En una realización alternativa adicional, la divulgación se refiere a un vertebrado o célula de vertebrado no humano (por ejemplo, una célula de ratón o rata célula) cuyo genoma comprende uno o más segmentos génicos Jk humanos y uno o más segmentos génicos Vk humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que la célula o el vertebrado es capaz de producir una cadena ligera de anticuerpo, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa una cadena ligera de anticuerpo, comprendiendo dicho uno o más segmentos génicos Vk humanos o consistiendo en uno, más o todos los segmentos génicos Vk humanos seleccionados del grupo que consiste en Vk4-1*01, Vk2-28*01, Vk1D-13*d01, Vk1-12*01, Vk1D-12*02, Vk3-20*01, Vk1-17*01, Vk1D-39*01, Vk3-11*01, Vk1D-16*01 y Vk1-9*d01.
- En una realización alternativa, la divulgación se refiere a un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula de vertebrado cuyo genoma comprende segmentos génicos VH, D y JH humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno, comprendiendo los segmentos génicos JH JH1*01, JH2*01, JH3*02, JH4*02, JH5*02 y/o JH6*01 o JH6*02 y estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de expresar cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden dominios VH humanos, comprendiendo el locus de cadena pesada un segmento genético VH humano capaz de recombinarse con a human D y uno de dichos segmentos génicos JH para producir un dominio VH, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dicho dominio variable de cadena pesada.
- En una realización preferida, los segmentos génicos JH son JH1*01, JH2*01, JH3*02, JH4*02, JH5*02 y JH6*02. En otra realización, los segmentos génicos JH son JH1*01, JH2*01, JH3*02, JH4*02, JH5*02 y JH6*01.
- En una realización, el vertebrado no humano comprende además uno o más de los segmentos génicos VH y/o uno o más de los segmentos génicos D de la tabla 7. En una realización adicional, el vertebrado no humano comprende además los segmentos génicos VH y segmentos génicos D de la tabla 3.
- Un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula de vertebrado cuyo genoma comprende segmentos génicos VL y JL en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera endógeno, comprendiendo los segmentos génicos JL Jk1*01, Jk2*01, Jk3*01, Jk4*01 y/o Jk5*01 y estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado o la célula es capaz de expresar cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden dominios VL humanos, comprendiendo el locus de cadena ligera un segmento genético VL humano capaz de recombinarse con uno de dichos segmentos génicos JL humanos para producir un dominio VL, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dicho dominio variable de cadena ligera.
- En una realización, el vertebrado no humano comprende además uno o más o todos los segmentos génicos Vk de la tabla 12. En una realización adicional, el vertebrado no humano comprende además los segmentos génicos Vk de la tabla 10 u 11.
- Opcionalmente el vertebrado o la célula tiene un genoma que comprende el locus de cadena pesada y el locus de cadena ligera definidos anteriormente y por tanto comprende un locus de cadena pesada que comprende un segmento genético VH humano capaz de recombinarse con un D humano y uno de dichos segmentos génicos JH para producir un dominio VH y un locus de cadena ligera que comprende un segmento genético VL humano capaz de recombinarse con uno de dichos segmentos génicos JL humanos para producir un dominio VL.
- Se concibe que en todas las realizaciones de la divulgación, el genoma de la célula o el vertebrado según la divulgación pueda no comprender un segundo alelo humano de uno, más o todos los segmentos génicos humanos.
- En una realización, el locus de cadena ligera endógeno es el locus kappa endógeno, y en otra realización es el locus lambda endógeno.
- Combinaciones de alelos
- En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, el alelo del segmento genético es un alelo d01, opcionalmente un alelo d01 dado a conocer en la tabla 7, tabla 12 o tabla 18.
- En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, el vertebrado o la célula tiene un genoma que comprende además un alelo 02, 03, 04, 05, 10, 12, 18 o d03 dado a conocer en la tabla 7, tabla 12 o tabla 18.
- Los alelos preferidos de la divulgación se exponen en las tablas 1 a 18 tal como sigue:

ES 2 993 142 T3

Tabla 1: Alelos de IgH n.^o 1 - alelos S1

	Alelo
J _H 6	02
J _H 5	02
J _H 4	02
J _H 3	02
J _H 2	01
J _H 1	01
D7-27	02
D1-26	01
D6-25	01
D5-24	01
D4-23	01
D3-22	01
D2-21	02
D1-20	01
D6-19	01
D5-18	01
D4-17	01
D3-16	02
D2-15	01
D1-14	01
D6-13	01
D5-12	01
D4-11	01
D3-10	01
D3-9	01
D2-2	02
D1-1	01
V _H 6-1	01
	02 o
V _H 1-2	04
V _H 1-3	01
V _H 4-4	02
V _H 7-4 -1	01
	01 o
V _H 2-5	10

En una tabla 1 alternativa, el alelo JH6 puede ser JH6*01.

5

Tabla 2: Alelos de IgH n.^o 2 - alelos S2

	ID
J _H 6	02
J _H 5	02
J _H 4	02
J _H 3	02
J _H 2	01
J _H 1	01
D7-27	02
D1-26	01
D6-25	01
D5-24	01
D4-23	01
D3-22	01
D2-21	02
D1-20	01
D6-19	01
D5-18	01
D4-17	01
D3-16	02

ES 2 993 142 T3

	ID
D2-15	01
D1-14	01
D6-13	01
D5-12	01
D4-11	01
D3-10	01
D3-9	01
D2-2	02
D1-1	01
V _H 6-1	01
	02 o
V _H 1-2	04
V _H 1-3	01
V _H 4-4	02
V _H 7-4-1	01
	01 o
V _H 2-5	10
V _H 3-7	01
V _H 1-8	01
V _H 3-9	01
V _H 3-11	01
V _H 3-13	01

En una tabla 2 alternativa, el alelo JH6 puede ser JH6*01.

Tabla 3: Alelos de IgH n.^o 3 - alelos S3

5

ID	Alelo
J _H 6	02
J _H 5	02
J _H 4	02
J _H 3	02
J _H 2	01
J _H 1	01
D7-27	02
D1-26	01
D6-25	01
D5-24	01
D4-23	01
D3-22	01
D2-21	02
D1-20	01
D6-19	01
D5-18	01
D4-17	01
D3-16	02
D2-15	01
D1-14	01
D6-13	01
D5-12	01
D4-11	01
D3-10	01
D3-9	01
D2-2	02
D1-1	01
V _H 6-1	01
V _H 1-2	02 o 04
V _H 1-3	01
V _H 4-4	02

ES 2 993 142 T3

ID	Alelo
V _H 7-4-1	01
V _H 2-5	01 o 10
V _H 3-7	01
V _H 1-8	01
V _H 3-9	01
V _H 3-11	01
V _H 3-13	01
V _H 3-15	01
V _H 1-18	01
V _H 3-20	01 o d01
V _H 3-21	01 o 03
V _H 3-23	04
V _H 1-24	01 o d01
V _H 2-26	01 o d01

En una tabla 3 alternativa, el alelo JH6 puede ser JH6*01.

Tabla 4: Alelos de IgH n.^o 4 - alelos S4

5

ID	Alelo
J _H 6	02
J _H 5	02
J _H 4	02
J _H 3	02
J _H 2	01
J _H 1	01
D7-27	02
D1-26	01
D6-25	01
D5-24	01
D4-23	01
D3-22	01
D2-21	02
D1-20	01
D6-19	01
D5-18	01
D4-17	01
D3-16	02
D2-15	01
D1-14	01
D6-13	01
D5-12	01
D4-11	01
D3-10	01
D3-9	01
D2-2	02
D1-1	01
V _H 6-1	01
V _H 1-2	02 o 04
V _H 1-3	01
V _H 4-4	02

ES 2 993 142 T3

ID	Alelo
V _H 7-4-1	01
V _H 2-5	01 o 10
V _H 3-7	01
V _H 1-8	01
V _H 3-9	01
V _H 3-11	01
V _H 3-13	01
V _H 3-15	01
V _H 3-18	01
V _H 3-20	01 o d01
V _H 3-21	01 o 03
V _H 3-23	04
V _H 1-24	01 o d01
V _H 2-26	01 o d01
V _H 4-28	05
V _H 3-30	18
V _H 4-31	03
V _H 3-33	01
V _H 4-34	01
V _H 4-39	01

En una tabla 4 alternativa, el alelo JH6 puede ser JH6*01.

Tabla 5: Alelos de IgH n.^o 5 - alelos S5

5

ID	Alelo
J _H 6	02
J _H 5	02
J _H 4	02
J _H 3	02
J _H 2	01
J _H 1	01
D7-27	02
D1-26	01
D6-25	01
D5-24	01
D4-23	01
D3-22	01
D2-21	02
D1-20	01
D6-19	01
D5-18	01
D4-17	01
D3-16	02
D2-15	01
D1-14	01
D6-13	01

ES 2 993 142 T3

ID	Alelo
D5-12	01
D4-11	01
D3-10	01
D3-9	01
D2-2	02
D1-1	01
V _H 6-1	01
V _H 1-2	02 o 04
V _H 1-3	01
V _H 4-4	02
V _H 7-4-1	01
V _H 2-5	01 o 10
V _H 3-7	01
V _H 1-8	01
V _H 3-9	01
V _H 3-11	01
V _H 3-13	01
V _H 3-15	01
V _H 1-18	01
V _H 3-20	01 o d01
V _H 3-21	01 o 03
V _H 3-23	04
V _H 1-24	01 o d01
V _H 2-26	01 o d01
V _H 4-28	05
V _H 3-30	18
V _H 4-31	03
V _H 3-33	01
V _H 4-34	01
V _H 4-39	01
V _H 3-43	01
V _H 1-45	02
V _H 1-46	01
V _H 3-48	01

En una tabla 5 alternativa, el alelo JH6 puede ser JH6*01.

Tabla 6: Alelos de IgH n.^o 6 - alelos S6

5

ID	Alelo
J _H 6	02
J _H 5	02
J _H 4	02

ES 2 993 142 T3

ID	Alelo
J _H 3	02
J _H 2	01
J _H 1	01
D7-27	02
D1-26	01
D6-25	01
D5-24	01
D4-23	01
D3-22	01
D2-21	02
D1-20	01
D6-19	01
D5-18	01
D4-17	01
D3-16	02
D2-15	01
D1-14	01
D6-13	01
D5-12	01
D4-11	01
D3-10	01
D3-9	01
D2-2	02
D1-1	01
V _H 6-1	01
V _H 1-2	02 o 04
V _H 1-3	01
V _H 4-4	02
V _H 7-4-1	01
V _H 2-5	01 o 10
V _H 3-7	01
V _H 1-8	01
V _H 3-9	01
V _H 3-11	01
V _H 3-13	01
V _H 3-15	01
V _H 1-18	01
V _H 3-20	01 o d01
V _H 3-21	01 o 03
V _H 3-23	04
V _H 1-24	01 o d01
V _H 2-26	01 o d01
V _H 4-28	05
V _H 3-30	18
V _H 4-31	03
V _H 3-33	01
V _H 4-34	01

ID	Alelo
V _H 4-39	01
V _H 3-43	01
V _H 1-45	02
V _H 1-46	01
V _H 3-48	01
V _H 3-49	05
V _H 5-51	01
V _H 3-53	01
V _H 1-58	01
V _H 4-59	01 o 05
V _H 4-61	01
V _H 3-64	02
V _H 3-66	03
V _H 1-69	12

En una tabla 6 alternativa, el alelo JH6 puede ser JH6*01.

Tabla 7: Alelos de IgH n.^o 7 - S7 alelos (un repertorio completo de segmentos génicos de IgH funcionales)

5

ID	Alelo
1	JH6
2	JH5
3	JH4
4	JH3
5	JH2
6	JH1
7	D7-27
8	D1-26
9	D6-25
10	D5-24
11	D4-23
12	D3-22
13	D2-21
14	D1-20
15	D6-19
16	D5-18
17	D4-17
18	D3-16
19	D2-15
20	D1-14
21	D6-13
22	D5-12
23	D4-11
24	D3-10
25	D3-9
26	D2-2
27	D1-1
28	V _H 6-1

ES 2 993 142 T3

	ID	Alelo
29	V _H 1-2	02 o 04
30	V _H 1-3	01
31	V _H 4-4	02
32	V _H 7-4-1	01
33	V _H 2-5	01 o 10
34	V _H 3-7	01
35	V _H 1-8	01
36	V _H 3-9	01
37	V _H 3-11	01
38	V _H 3-13	01
39	V _H 3-15	1,1 01
40	V _H 1-18	01
41	V _H 3-20	01 o d01
42	V _H 3-21	01 o 03
43	V _H 3-23	04
44	V _H 1-24	01 o d01
45	V _H 2-26	01 o d01
46	V _H 1-28	05
47	V _H 3-30	18
48	V _H 4-31	03
49	V _H 3-33	01
50	V _H 4-34	01
51	V _H 4-39	01
52	V _H 3-43	01
53	V _H 1-45	02
54	V _H 1-46	01
55	V _H 3-48	01
56	V _H 3-49	05
57	V _H 5-51	01
58	V _H 3-53	01
59	V _H 1-58	01
60	V _H 4-59	01 o 05
61	V _H 4-61	01
62	V _H 3-64	02
63	V _H 3-66	03

ES 2 993 142 T3

	ID	Alelo
64	V _H 1-69	12
65	V _H 2-70	04
66	V _H 3-72	01
67	V _H 3-73	02
68	V _H 3-74	01

En una tabla 7 alternativa, el alelo JH6 puede ser JH6*01.

Tabla 8: Alelos de Igκ n.^o 1 - alelos K1

5

ID	Alelo
Jk5	01
Jk4	01
Jk3	01
Jk2	01 o 04
Jk1	01
V _k 4-1	01
V _k 5-2	01 o d01
V _k 1-5	03
V _k 1-6	01
V _k 1-8	01
V _k 1-9	01 o d01

Tabla 9: Alelos Igκ n.^o 2 - alelos K2

1.2	ID	Alelo
Jk5	01	
Jk4	01	
Jk3	01	
Jk2	01 o 04	
Jk1	01	
V _k 4-1	01	
V _k 5-2	01 o d01	
V _k 1-5	03	
V _k 1-6	01	
V _k 1-8	01	
V _k 1-9	01 o d01	
V _k 3-11	01	
V _k 1-12	01	
V _k 1-13	01	
V _k 3-15	01	
V _k 1-16	02	
V _k 1-17	01	
V _k 3-20	01	
V _k 6-21	01	
V _k 2-24	01	

10 Tabla 10: Alelos Igκ n.^o 3 - alelos K3

1.3	ID	Alelo
Jk5	01	
Jk4	01	
Jk3	01	
Jk2	01 o 04	
Jk1	01	
V _k 4-1	01	
V _k 5-2	01 o d01	

ES 2 993 142 T3

1.3	ID	Alelo
	Vκ1-5	03
	Vκ1-6	01
	Vκ1-8	01
	Vκ1-9	01 o d01
	Vκ3-11	01
	Vκ1-12	01
	Vκ1-13	01
	Vκ3-15	01
	Vκ1-16	02
	Vκ1-17	01
	Vκ3-20	01
	Vκ6-21	01
	Vκ2-24	01
	Vκ1-27	01
	Vκ2-28	01
	Vκ2-29	01
	Vκ2-30	01
	Vκ1-33	01
	Vκ1D-39	01
	Vκ2D-40	01

Tabla 11: Alelos Igκ n.º 4 - alelos K4

1.4	ID	Alelo
	Jκ5	01
	Jκ4	01
	Jκ3	01
	Jκ2	01 o 04
	Jκ1	01
	Vκ4-1	01
	Vκ5-2	01 o d01
	Vκ1-5	03
	Vκ1-6	01
	Vκ1-8	01
	Vκ1-9	01 o d01
	Vκ3-11	01
	Vκ1-12	01
	Vκ1-13	01
	Vκ3-15	01
	Vκ1-16	02
	Vκ1-17	01
	Vκ3-20	01
	Vκ6-21	01
	Vκ2-24	01
	Vκ1-27	01
	Vκ2-28	01
	Vκ2-29	01
	Vκ2-30	01
	Vκ1-33	01
	Vκ1D-39	01
	Vκ2D-40	01
	Vκ3D-7	01
	Vκ1D-8	01 o d01
	Vκ1D-43	01
	Vκ3D-11	01 o d01
	Vκ1D-12	02
	Vκ1D-13	d01
	Vκ3D-15	d01
	Vκ1D-16	01
	Vκ1D-17	01
	Vκ3D-20	01

Tabla 12: Alelos Igκ n.º 5 - alelos K5 (un repertorio completo de segmentos génicos kappa humanos funcionales)

1.5	ID	Alelo
Jκ5		01
Jκ4		01
Jκ3		01
Jκ2		01 o 04
Jκ1		01
Vκ4-1		01
Vκ5-2		01 o d01
Vκ1-5		03
Vκ1-6		01
Vκ1-8		01
Vκ1-9		01 o d01
Vκ3-11		01
Vκ1-12		01
Vκ1-13		01
Vκ3-15		01
Vκ1-16		02
Vκ1-17		01
Vκ3-20		01
Vκ6-21		01
Vκ2-24		01
Vκ1-27		01
Vκ2-28		01
Vκ2-29		01
Vκ2-30		01
Vκ1-33		01
Vκ1D-39		01
Vκ2D-40		01
Vκ3D-7		01
Vκ1D-8		01 o d01
Vκ1D-43		01
Vκ3D-11		01 o d01
Vκ1D-12		02
Vκ1D-13		d01
Vκ3D-15		d01
Vκ1D-16		01
Vκ1D-17		01
Vκ3D-20		01
Vκ2D-26		01 o d01
Vκ2D-28		01 o d01
Vκ2D-29		01
Vκ2D-30		01
Vκ1D-33		01
Vκ1D-39		01

En un aspecto de la tabla 12 no hay ningún segmento genético Vκ1D-39 presente en el genoma.

- 5 Para evitar cualquier duda, cualquier referencia a la tabla 12 en el presente documento, incluyendo en las reivindicaciones, puede leerse con o sin la limitación de que en un aspecto de la tabla 12 no hay ningún segmento genético Vκ1D-39 presente en el genoma.
- 10 En una tabla 12 alternativa, el alelo Vκ2D-26 es Vκ2D-26*d02.

Tabla 13: Alelos Igλ n.º 1 - alelos L1 o P1

ID	Alelo
Cλ7	01
Jλ7	01
Cλ6	04
Jλ6	01
Cλ3	03

ES 2 993 142 T3

Jλ3	02
Cλ2	02
Jλ2	01
Cλ1	02
Jλ1	01
Vλ3-1	01

Tabla 14: Alelos Igλ n.º 2 - alelos L2 o P2

ID	Alelos
Cλ7	01
Jλ7	01
Cλ6	04
Jλ6	01
Cλ3	03
Jλ3	02
Cλ2	02
Jλ2	01
Cλ1	02
Jλ1	01
Vλ3-1	01
Vλ4-3	01
Vλ2-8	01
Vλ3-9	01
Vλ3-10	01
Vλ2-11	01
Vλ3-12	02
Vλ2-14	01
Vλ3-16	01
Vλ2-18	01

5 Tabla 15: Alelos Igλ n.º 3 - alelos L3 o P3

ID	Alelo
Cλ7	01
Jλ7	01
Cλ6	04
Jλ6	01
Cλ3	03
Jλ3	02
Cλ2	02
Jλ2	01
Cλ1	02
Jλ1	01
Vλ3-1	01
Vλ4-3	01
Vλ2-8	01
Vλ3-9	01
Vλ3-10	01
Vλ2-11	01
Vλ3-12	02
Vλ2-14	01
Vλ3-16	01
Vλ2-18	01
Vλ3-19	01
Vλ3-21	01 o d01
Vλ3-22	01
Vλ2-23	02 o d02
Vλ3-25	01 o d03
Vλ3-27	01

ES 2 993 142 T3

Tabla 16: Alelos Igλ n.º 4 - alelos L4 o P4

ID	Alelo
Cλ7	01
Jλ7	01
Cλ6	04
Jλ6	01
Cλ3	03
Jλ3	02
Cλ2	02
Jλ2	01
Cλ1	02
Jλ1	01
Vλ3-1	01
Vλ4-3	01
Vλ2-8	01
Vλ3-9	01
Vλ3-10	01
Vλ2-11	01
Vλ3-12	02
Vλ2-14	01
Vλ3-16	01
Vλ2-18	01
Vλ3-19	01
Vλ3-21	01 o d01
Vλ3-22	01
Vλ2-23	02 o d02
Vλ3-25	01 o d03
Vλ3-27	01
Vλ1-36	01
Vλ5-37	01
Vλ5-39	01
Vλ1-40	01
Vλ7-43	01
Vλ1-44	01
Vλ5-45	03
Vλ7-46	01

5 Tabla 17: Alelos Igλ n.º 5 - alelos L5 o P5

ID	Alelo
Cλ7	01
Jλ7	01
Cλ6	04
Jλ6	01
Cλ3	03
Jλ3	02
Cλ2	02
Jλ2	01
Cλ1	02
Jλ1	01
Vλ3-1	01
Vλ4-3	01
Vλ2-8	01
Vλ3-9	01
Vλ3-10	01
Vλ2-11	01
Vλ3-12	02
Vλ2-14	01
Vλ3-16	01
Vλ2-18	01
Vλ3-19	01

Vλ3-21	01 o d01
Vλ3-22	01
Vλ2-23	02 o d02
Vλ3-25	01 o d03
Vλ3-27	01
Vλ1-36	01
Vλ5-37	01
Vλ5-39	01
Vλ1-40	01
Vλ7-43	01
Vλ1-44	01
Vλ5-45	03
Vλ7-46	01
Vλ1-47	01
Vλ9-49	01
Vλ1-51	01
Vλ5-52	01
Vλ10-54	02

Tabla 18: Igλ Alelos n.º 6 - alelos L6 o P6 (un repertorio completo de alelos lambda humanos funcionales)

1.6	ID	Alelo
Cλ7		01
Jλ7		01
Cλ6		04
Jλ6		01
Cλ3		03
Jλ3		02
Cλ2		02
Jλ2		01
Cλ1		02
Jλ1		01
Vλ3-1		01
Vλ4-3		01
Vλ2-8		01
Vλ3-9		01
Vλ3-10		01
Vλ2-11		01
Vλ3-12		02
Vλ2-14		01
Vλ3-16		01
Vλ2-18		01
Vλ3-19		01
Vλ3-21		d01
Vλ3-22		01
Vλ2-23		02 o d02
Vλ3-25		01 o d03
Vλ3-27		01
Vλ1-36		01
Vλ5-37		01
Vλ5-39		01
Vλ1-40		01
Vλ7-43		01
Vλ1-44		01
Vλ5-45		03
Vλ7-46		01
Vλ1-47		01
Vλ9-49		01
Vλ1-51		01
Vλ5-52		01
Vλ10-54		02
Vλ6-57		01

Vλ4-60	03 o d03
Vλ8-61	01
Vλ4-69	01

Con respecto a la tabla 18, en un aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, no hay ningún segmento génico Cλ6 o Jλ6 presente en el genoma. En otro aspecto, adicional o alternativamente, no hay ningún segmento génico Vλ3-22 y/o Vλ5-39 y/o Vλ10-54.

- 5 Para evitar cualquier duda, cualquier referencia a la tabla 18 en el presente documento, puede leerse con o sin la limitación de que, en un aspecto de la tabla 18, no hay ningún Cλ6 o Jλ6 presente, y sin o sin la limitación de que no hay ningún segmento génico Vλ3-22 y/o Vλ5-39 y/o Vλ10-54.
- 10 Los ejemplos de segmentos génicos en el documento WO2013/041844 se dan a conocer específica y explícitamente en el presente documento como posibles segmentos génicos con respecto a la presente invención.
- 15 Cada aspecto, realización, cláusula o provisión descrito en el presente documento puede combinarse en un vertebrado no humano capaz de expresar uno o más segmentos génicos humanos dados a conocer en el documento WO2013/041844 y/o descritos en el presente documento o un sitio de unión o anticuerpo que es un producto de recombinación de uno o más segmentos génicos humanos dados a conocer en el documento WO2013/041844 y/o descritos en el presente documento, según sea apropiado,
- 20 Los segmentos génicos dados a conocer en las tablas 1-7 del documento WO2013/041844 se dan a conocer específica y explícitamente en el presente documento como posibles secuencias de segmento génico con respecto a la presente invención. Las secuencias se exponen en el listado de secuencias presentado con esa solicitud.
- 25 Ejemplos adicionales de secuencias de segmentos génicos para su uso en el contexto de la invención se exponen en las secuencias incluidas al final de la descripción.
- 30 En una realización preferida, que no forma parte de la invención reivindicada, el genoma del vertebrado o la célula de la divulgación comprende uno o más segmentos génicos de una cualquiera de las tablas 1 a 18. En una realización adicional preferida, que no forma parte de la invención reivindicada, el genoma del vertebrado o la célula del comprende una combinación de cualesquier dos segmentos génicos de una cualquiera de las tablas 1 a 18. En una realización preferida aún adicional , que no forma parte de la invención reivindicada, el genoma del vertebrado o la célula del comprende una combinación de cualesquier tres segmentos génicos de una cualquiera de las tablas 1 a 18.
- 35 En la realización más preferida, que no forma parte de la invención reivindicada, el genoma del vertebrado o la célula de la divulgación comprende una combinación de cualesquier cuatro segmentos génicos de una cualquiera de las tablas 1 a 18. Preferiblemente un segmento de cadena pesada VH y uno JH se selecciona de la tabla 7 y un segmento de cadena ligera VL y uno JL se selecciona de la tabla 12 o tabla 18. Opcionalmente un segmento de cadena pesada D se selecciona de la tabla 7.
- 40 La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere además a un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula cuyo genoma comprende segmentos génicos VL y JL humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera endógeno, expresando el vertebrado o la célula cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables humanas, o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dichas cadenas ligeras, comprendiendo dichas cadenas ligeras de inmunoglobulina cadenas ligeras que comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación de (i) segmentos génicos Vk y Jk humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos génicos Vk y Jk de una cualquiera de las tablas 8 a 12 o (ii) segmentos génicos Vλ y Jλ humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos génicos Vλ y Jλ de una cualquiera de las tablas 12 a 18.
- 45 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, el vertebrado o la célula de la divulgación expresa cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda humanas y derivándose al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95% de las regiones variables de tales cadenas ligeras de la recombinación de segmentos génicos Vλ y Jλ humanos.
- 50 Opcionalmente las cadenas ligeras se expresan como anticuerpos IgG, por ejemplo, IgG1 o IgG2b, opcionalmente IgG2a.
- 55 La región constante puede ser una región constante kappa o lambda; opcionalmente región constante humana, de ratón o de rata. Dicho locus de cadena ligera endógeno puede ser un locus kappa o lambda; comprendiendo opcionalmente el genoma al menos los segmentos génicos V y J de la tabla 8 en un locus de cadena ligera endógeno, por ejemplo, el locus kappa y/o al menos los segmentos génicos V y J de la tabla 13 en un locus de cadena ligera endógeno, por ejemplo, el locus lambda o kappa .

Dichas cadenas ligeras pueden comprender cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables humanas que se derivan de la recombinación de (ii), expresándose cada región variable de este tipo con una región constante codificada por un segmento génico C λ seleccionado del grupo que consiste en los segmentos génicos C λ de la tabla 18.

5 En esta realización de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, el vertebrado o la célula puede expresar cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda humanas y al menos el 60%, el 70% o el 80% de las regiones variables de tales cadenas ligeras pueden derivarse de la recombinación de segmentos génicos V λ y J λ humanos, por ejemplo, los segmentos V y J listados en la tabla 18.

10 Una divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere también a un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula cuyo genoma comprende segmentos génicos VH, D y JH humanos en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena pesada endógeno, expresando el vertebrado o la célula cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden regiones variables humanas o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dichas cadenas pesadas, o pudiendo expresar la célula cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden regiones variables humanas, comprendiendo dichas cadenas pesadas de inmunoglobulina cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación de (iii) segmentos génicos VH, D y JH humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos génicos VH, D y JH de la tabla 7.

20 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, dichas cadenas ligeras se expresan conjuntamente con dichas cadenas pesadas para formar anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos IgG.

25 Un vertebrado no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) o célula, que no forma parte de la invención reivindicada, cuyo genoma comprende un repertorio de segmentos génicos de Ig producido mediante la inserción dirigida de segmentos génicos de Ig humanos en uno o más loci de Ig endógenos, comprendiendo el genoma segmentos génicos V λ y J λ humanos en el sentido de 5' de una región constante, habiéndose proporcionado los segmentos génicos V λ y J λ humanos mediante la inserción en un locus de cadena ligera endógeno del vertebrado o la célula, comprendiendo el vertebrado cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables lambda (cadenas ligeras lambda) o pudiendo desarrollarse la célula en un vertebrado que expresa dichas cadenas ligeras de inmunoglobulina, comprendiendo las cadenas ligeras lambda cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables lambda derivadas de la recombinación de segmentos génicos V λ y J λ humanos; derivándose al menos el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de las regiones variables de las cadenas ligeras lambda expresadas por el vertebrado de la recombinación de segmentos génicos V λ y J λ humanos; opcionalmente en el que el vertebrado o la célula cualquier vertebrado o célula dado a conocer en el presente documento.

35 Un dominio o región variable derivado de, o producido como resultado de, la recombinación de segmentos génicos humanos se denomina también en el presente documento recombinante de dichos segmentos génicos.

40 Los segmentos génicos en los locus pesados y/o ligeros están unidos operativamente a la región constante, de modo que el vertebrado es capaz de producir una cadena pesada o ligera de anticuerpo producida mediante la recombinación de los segmentos génicos.

45 La célula de ratón o de rata o el ratón o la rata tiene un genoma que comprende los segmentos kappa de la tabla 9.

50 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o vertebrado no humano tiene un genoma que comprende los segmentos lambda de la tabla 13 o tabla 14 o tabla 15 o tabla 16 o tabla 17 o tabla 18, o cualquier combinación de los mismos.

55 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o vertebrado no humano tiene un genoma que comprende los segmentos de cadena pesada de la tabla 1 o tabla 2 o tabla 3 o tabla 4 o tabla 5 o tabla 6 o tabla 7 o cualquier combinación de los mismos.

60 La célula o vertebrado no humano de la divulgación puede expresar cadenas ligeras que comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación (es decir recombinantes) de (i) segmentos génicos V k y J k humanos de la tabla 9.

65 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o vertebrado no humano de la divulgación puede expresar cadenas ligeras que comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación (es decir recombinantes) de (ii) segmentos génicos V λ y J λ humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos génicos V λ y J λ de la tabla 13 o tabla 14 o tabla 15 o tabla 16 o tabla 17 o tabla 18, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación puede expresar cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación (es decir recombinantes) de segmentos génicos VH, D y JH humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos

génicos VH, D y JH de la tabla 1 o tabla 2, o tabla 3, o tabla 4 o tabla 5 o tabla 6 o tabla 7, o cualquier combinación de los mismos.

5 En un ejemplo, que no forma parte de la invención reivindicada, el vertebrado o la célula según cualquier provisión anterior comprende uno o más o todos los alelos JH de la tabla 7, por ejemplo, JH2*02 y/o al menos JH6*02 (que es útil para producir dominios HCDR3 V largos para uso terapéutico humano tal como se muestra en los ejemplos).

10 Por tanto, cada alelo combinado con cualquier otro alelo en la tabla 7 se da a conocer explícitamente en el presente documento. La misma estructura de combinaciones se da a conocer en relación con los alelos de la tabla 12 y la tabla 18. Por tanto, cada alelo en la tabla 7 combinado con cualquier otro alelo en la tabla 12 o tabla 18 se da a conocer, y cada alelo en la tabla 12 se da a conocer en combinación con cada otro alelo en la tabla 12, y cada alelo en la tabla 18 se da a conocer en combinación con cada otro alelo en la tabla 18.

15 En un ejemplo, que no forma parte de la invención reivindicada, el vertebrado o la célula según cualquier provisión anterior comprende uno o más o todos los alelos Jk de la tabla 12, por ejemplo, al menos Jk2*01 y/o Jk4*01 (que es útil para producir dominios Vk para uso terapéutico humano tal como se muestra en los ejemplos).

20 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-23*04, JH2*01, VK4-1*01 y/o JK2*01.

25 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-7*01, JH6*02, VK2-28*01 y/o JK4*01.

30 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH7-4-1*01, JH6*02, VK2-28*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-16*02.

35 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH4-4-1*02, JH6*02, VK1D-13*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-10*01.

40 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH1-3*01, JH6*02, VK1-12*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-10*01.

45 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-13*01, JH6*02, VK1D-12*02 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-9*01.

50 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH4-4*02, JH6*02, VK1D-13*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-10*01.

55 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-13*01, JH6*02, VK3-20*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-10*01.

60 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-23*04, JH6*02, VK1-17*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-22*01.

65 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-7*01, JH6*02, VK1D-39*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-9*01.

En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-13*01, JH6*02, VK1D-39*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-10*01.

En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-13*01, JH6*02, VK3-11*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-10*01.

En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH4-4*02, JH6*02, VK1D-16*01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-9*01.

- En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende los segmentos génicos VH3-20*d01, JH6*02, VK1-9*d01 y/o JK4*01. Opcionalmente el genoma comprende además D3-10*01.
- 5 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende el segmento génico humano VH3-23*04. Adicional o alternativamente, dominios variables de cadena pesada del anticuerpo de la invención se codifican por (i) segmentos VH3-23*04, D y JH humanos.
- 10 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende el segmento génico humano VH3-9*01. Adicional o alternativamente, dominios variables de cadena pesada del anticuerpo de la divulgación se codifican por (i) segmentos VH3-9*01, D y JH humanos.
- 15 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende el segmento génico humano Vk1-12*02 o Vk1D-12*02. Adicional o alternativamente, dominios variables de cadena ligera del anticuerpo de la divulgación se codifican por (i) segmentos Vk1-12*02 o Vk1D-12*02 y Jk humanos.
- 20 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende el segmento génico humano VK2-28*01. Adicional o alternativamente, dominios variables de cadena ligera del anticuerpo de la divulgación se codifican por (i) segmentos VK2-28*01 y Jk humanos.
- 25 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende el segmento génico humano VK4-1*01. Adicional o alternativamente, dominios variables de cadena ligera del anticuerpo de la divulgación se codifican por (i) segmentos VK4-1*01 y Jk humanos. En una realización adicional, la célula o el vertebrado de la divulgación tiene un genoma que comprende la combinación de segmentos génicos descritos anteriormente con JH6*01 en lugar de JH6*02.
- 30 En todas las realizaciones descritas en el presente documento, la región de cadena pesada V y J puede recombinarse opcionalmente entre sí y con una región D definida en el presente documento para formar un dominio variable de cadena pesada. Además, las regiones de cadena ligera V y J pueden recombinarse opcionalmente para formar un dominio variable de cadena ligera.
- 35 La divulgación se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende dominios variables humanos producidos o derivados de la recombinación de cualquiera de las combinaciones anteriores de segmentos génicos.
- 40 Anticuerpos o fragmentos según la divulgación se muestra en los ejemplos que son útiles para producir una recombinación de segmentos génicos productiva *in vivo*, que presentan una mutación de unión y mutación somática, y producen dominios que pueden unirse específicamente a antígeno con buena cinética de unión.
- 45 La divulgación incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se obtienen o pueden obtenerse mediante la recombinación, *in vivo* en un ratón, mamífero o vertebrado de la invención tras la inmunización, de uno o más segmentos génicos D, uno o más segmentos génicos VH y uno o más de los segmentos génicos JH humanos JH2*01 y JH6*02.
- 50 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación puede expresar cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación de uno o más segmentos génicos D, uno o más segmentos génicos JH y uno o más de los siguientes segmentos génicos VH VH3-20*d01, VH1-24*d01 y VH2-26*d01.
- 55 Por tanto, la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se obtienen o pueden obtenerse mediante la recombinación, *in vivo* en un ratón, mamífero o vertebrado de la invención tras la inmunización, de uno o más segmentos génicos D, uno o más segmentos génicos JH y uno o más de los segmentos génicos VH humanos VH3-20*d01, VH1-24*d01 y VH2-26*d01.
- 60 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la divulgación puede expresar adicional o alternativamente cadenas ligeras que comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación de uno o más segmentos génicos Jk y uno o más de los segmentos génicos Vk humanos Vk5-2*d01, Vk1-9*d01, Vk1D-8*d01, Vk3D-11*d01, Vk1D-13*d01, Vk3D-15*d01, Vk2D-26*d01 y Vk2D-28*d01 o la recombinación de uno o más segmentos génicos Jλ y uno o más de los segmentos génicos VL humanos VL2-22*d01, VL2-23*d02, VL3-25*d03 y VL4-60*d03.
- 65

- Por tanto, la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se obtienen o pueden obtenerse mediante la recombinación, *in vivo* en un ratón, mamífero o vertebrado de la invención tras la inmunización, de uno o más segmentos génicos Jκ y uno o más de los segmentos génicos Vκ humanos Vκ5-2*d01, Vκ1-9*d01, Vκ1D-8*d01, Vκ3D-11*d01, Vκ2D-26*d01 y Vκ2D-28*d01 o de uno o más segmentos génicos Jλ y uno o más de los segmentos génicos Vλ humanos Vλ2-22*d01, Vλ2-23*d02, Vλ3-25*d03 y Vλ4-60*d03.
- En todos los aspectos de la invención, la célula puede ser una célula de hibridoma, una célula B, opcionalmente una célula B inmortalizada, o una célula madre embrionaria.
- En una realización, el vertebrado o la célula comprende una región constante que es una región constante kappa o lambda; opcionalmente una región constante de ratón o de rata. En una realización, la región constante puede ser una región constante humana.
- En una realización, el vertebrado o la célula dado a conocer en el presente documento comprende un locus de cadena ligera endógeno que es un locus kappa o lambda; comprendiendo opcionalmente el genoma al menos los segmentos génicos V y J de la tabla 8, 9 o 10 en un locus de cadena ligera endógena, por ejemplo, el locus kappa y/o al menos los segmentos génicos V y J de la tabla 13 o 14 en un locus de cadena ligera endógena, por ejemplo, ya sea el locus lambda o kappa.
- En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, el vertebrado o la célula dado a conocer en el presente documento comprende cadenas ligeras de inmunoglobulina que comprenden regiones variables humanas que se derivan de la recombinación de segmentos génicos Vλ y Jλ humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos génicos Vλ y Jλ de la tabla 18, expresándose cada región variable de este tipo con una región constante codificada por un segmento genético Cλ seleccionado del grupo que consiste en los segmentos génicos Cλ de la tabla 18.
- En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, las cadenas ligeras comprenden regiones variables humanas derivadas de la recombinación de segmentos génicos Vλ y Jλ humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos génicos Vλ y Jλ de la tabla 18.
- En todas las realizaciones de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, los dominios VH y VL pueden formar opcionalmente un sitio de unión a antígeno.
- La célula de cualquier aspecto de la invención puede ser una célula de hibridoma o una célula B, opcionalmente una célula B inmortalizada. La célula puede ser también una célula ES. La célula ES puede formar parte de una población de al menos 90, 150 o más de 200 células. En un ejemplo, la población de células está contenida en una o más placas de múltiples pocillos (por ejemplo, placas de 96 pocillos) y puede, por ejemplo, ser una población clasificada en la que células individuales están comprendidas por respectivos pocillos diferentes de una placa. El vertebrado de cualquier aspecto puede estar comprendido dentro de un recipiente que comprende aire filtrado, opcionalmente que comprende un filtro de aire.
- En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, el entorno interno de recipiente es estéril, por ejemplo, según sea posible usando un recipiente para animales estándar, por ejemplo, un loft para ratones Techniplast™ (<http://www.tecniplast.it/us/product/mouse-loft.html>). En un ejemplo, el recipiente tiene un cuerpo de plástico, por ejemplo, un cuerpo translúcido o transparente.
- El recipiente, que no forma parte de la invención reivindicada, que comprende los vertebrados puede tener un volumen de no más de cuatro, 3, 2 o 1 metros³. El recipiente puede comprender una pluralidad de vertebrados, por ejemplo, un macho y una hembra (por ejemplo, una pareja fértil).
- En una realización los vertebrados de la invención son de al menos 3,5 semanas de edad, por ejemplo, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas de edad.
- El uso de los segmentos génicos tal como se reivindica, específicamente tal como se indica en la tabla 9, proporciona las ventajas vistas en los ejemplos.
- La invención se refiere además a un método de producción de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el método inmunizar un vertebrado de la invención con un antígeno y recuperar el anticuerpo o fragmento modificando opcionalmente el anticuerpo o fragmento aislado de modo que comprenda regiones constantes humanas.
- La invención incluye también un método de producción de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el método aislar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a partir de una célula de la invención; y opcionalmente modificar el anticuerpo o fragmento aislado de modo que comprenda regiones constantes humanas.

Puede usarse tecnología de ADN recombinante para producir una secuencia de nucleótidos modificada que codifica el anticuerpo o fragmento modificado.

- 5 El método puede comprender
 - (a) aislar del vertebrado una célula B que codifica un anticuerpo que se une al antígeno,
 - (b) identificar o copiar una secuencia de nucleótidos de la célula B que codifica un dominio VH del anticuerpo y/o identificar o copiar una secuencia de nucleótidos de la célula B que codifica un dominio VL del anticuerpo; y
 - (c) usar la(s) secuencia(s) para producir un anticuerpo aislado que comprende el dominio VH y/o VL; comprendiendo opcionalmente el anticuerpo aislado regiones constantes humanas.
- 10 La invención incluye un método para producir un anticuerpo completamente humanizado que comprende inmunizar un vertebrado tal como se da a conocer en el presente documento y entonces reemplazar la región constante de vertebrado no humano de un anticuerpo específicamente reactivo con el antígeno por una región constante humana, de manera adecuada modificando mediante ingeniería el ácido nucleico que codifica el anticuerpo.
- 15 La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere también a un anticuerpo humanizado producido según cualquier método dado a conocer en el presente documento y al uso de un anticuerpo humanizado así producido en medicina.
- 20 En una realización adicional, la invención incluye aislar un anticuerpo IgG1, IgG2b y/o IgM que se une específicamente al antígeno diana.
- 25 Un anticuerpo aislado de la divulgación puede producirse mediante la expresión a partir de una célula huésped seleccionada de una célula CHO, HEK293, Cos o de levadura (por ejemplo, *Pichia*). En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo producido mediante la expresión a partir de una célula CHO.
- 30 En una realización adicional, que no forma parte de la invención reivindicada, el anticuerpo o fragmento aislado puede formularse con un diluyente, portador, excipiente o un fármaco para producir una composición farmacéutica para uso médico humano. Opcionalmente, el anticuerpo formulado puede envasarse en un recipiente estéril, por ejemplo, un vial, tubo, bolsa IV o jeringa, produciendo opcionalmente además un kit que comprende combinar el envase con una etiqueta o instrucciones que indican el uso de la composición de anticuerpo para uso médico humano; comprendiendo opcionalmente la etiqueta o las instrucciones un número de lote de medicamento y/o un número de autorización de comercialización, opcionalmente además un número de autorización de comercialización de la EMA o FDA. En un ejemplo, que no forma parte de la invención reivindicada, el anticuerpo aislado (por ejemplo, producido por una célula CHO) (i) se formula con un diluyente, portador, excipiente o un fármaco para producir una composición farmacéutica para uso médico humano, (ii) el anticuerpo formulado se envasa en un recipiente estéril combinado con una etiqueta o instrucciones que indican el uso de la composición de anticuerpo para uso médico humano; comprendiendo la etiqueta o las instrucciones un número de lote de medicamento y/o un número de autorización de comercialización (por ejemplo, un número de autorización de comercialización de la EMA o FDA). En una realización de un ejemplo de este tipo, el anticuerpo se une específicamente a PCSK9 humano y el uso es para tratar o prevenir la hiperlipidemia o para reducir el colesterol en un humano. En una realización de un ejemplo de este tipo, el anticuerpo se une específicamente a IL6Ra humano y el uso es para tratar o prevenir un estado inflamatorio o artritis reumatoide en un humano. En una realización de un ejemplo de este tipo, el anticuerpo se une específicamente a IL4Ra humano y el uso es para tratar o prevenir una enfermedad atópica, dermatitis atópica o asma en un humano.
- 35 La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere al anticuerpo o fragmento producido mediante el método de la invención para uso médico humano y al uso del anticuerpo o fragmento aislado producido mediante el método de la invención en la fabricación de un medicamento para uso médico humano.
- 40 El medicamento puede ser una composición o un kit dado a conocer en el presente documento.
- 45 La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden dominios variables humanos producidos mediante o derivados de la recombinación de cualquier combinación de segmentos génicos dados a conocer en el presente documento, obteniéndose o pudiendo obtenerse opcionalmente el anticuerpo y los fragmentos mediante la recombinación, *in vivo* en un ratón, mamífero u otro vertebrado de la invención tras la inmunización.
- 50 En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, las cadenas pesadas de inmunoglobulina expresadas por la célula o el vertebrado son de manera esencialmente exclusiva dichas cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas; y dichas cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas se expresan como parte de anticuerpos IgG de suero, opcionalmente anticuerpos IgG1, IgG2a o IgG2b o IgM.
- 55
- 60
- 65

En una realización, que no forma parte de la invención reivindicada, la célula o el vertebrado de la invención expresa un anticuerpo IgG, opcionalmente un anticuerpo IgG1, IgG2a o IgG2b, o un anticuerpo IgM que comprende cadenas pesadas tal como se definen en el presente documento, uniéndose el anticuerpo específicamente a un antígeno diana.

5 La divulgación se refiere además a:

10 El anticuerpo, opcionalmente, producido mediante un método de la divulgación que comprende

(a) un dominio variable de cadena pesada humano derivado de la recombinación de segmentos génicos VH, D y JH humanos seleccionados del grupo que consiste en segmentos génicos VH, D y JH de una cualquiera de las tablas 1-7; y

15 (b) un dominio variable de cadena ligera humano derivado de la recombinación de segmentos génicos V y J humanos ambos seleccionados de los segmentos génicos V y J de una cualquiera de las tablas 8-18.

Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que no forma parte de la invención reivindicada, obtenido o que puede obtenerse opcionalmente mediante el método de la invención, comprendiendo una región 20 variable del anticuerpo o fragmento una o más mutaciones somáticas de patrón de desaminasa inducida por activación (AID) de ratón o rata y/o mutaciones de unión de patrón de desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) de ratón o rata.

25 El dominio o región ligera variable según la invención puede comprender hasta 10, incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 mutaciones de unión.

En una realización adicional, el dominio o región ligera variable según la invención puede comprender adicional o alternativamente hasta 9, incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, u 8, incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, mutaciones somáticas.

30 En una realización adicional, la divulgación incluye un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que no forma parte de la invención reivindicada, obtenido o que puede obtenerse opcionalmente mediante el método de la invención, que se une a un receptor gamma, y opcionalmente además una cadena ligera constante humana. En una realización, el FC comprende dominios constantes gamma humanos, por ejemplo, dominios constantes IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanos.

35 Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que no forma parte de la invención reivindicada, obtenido o que puede obtenerse opcionalmente mediante el método de la invención, comprendiendo el anticuerpo la glicosilación de células CHO, HEK293, Cos o de levadura (por ejemplo, *Pichia*).

40 Un anticuerpo o fragmento de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, puede unirse específicamente a una enzima humana.

Un anticuerpo o fragmento de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, puede unirse 45 específicamente a las dianas humanas: proproteína convertasa PC9, proproteína convertasa subtilisina kexina-9 (PCSK9), CD126, IL-4, receptor de IL-4, IL-6, receptor de IL-6, IL-13, receptor de IL-18, Erbb3, célula ASIC1, ANG2, GDF-8, ligando-2 de angiopoyetina, ligando 4 de proteína similar a delta, GI de inmunoglobulina, ligando PDGF, receptor de PDGF o receptor de NGF, toxina A o toxina B de *Clostridium difficile*, relaxina, CD48, Cd20, receptor de glucagón, receptor 2 activado por proteasa, ligando IA similar a TNF (T LIA), angiopoyetina relacionada-2 (AR-2), proteína 4 similar a angiopoyetina, RANKL, proteína 3 similar a angiopoyetina (ANGPTL3), ligando 4 similar a delta (DLL4), endotelina-1 grande (ET-1), activina A, receptor tirosina cinasas, por ejemplo, AR-1 humana y tirosina cinasa con dominios de homología Ig y EGF (TIE) o receptor de TIE-2. En un ejemplo, la diana es PCSK9. En un ejemplo, la diana es el receptor de IL-6 (por ejemplo, IL6Ra). En un ejemplo, la diana es el receptor de IL-4 (por ejemplo, IL4Ra).

55 Los aspectos preferidos de la divulgación incluyen:

El uso del anticuerpo o fragmento del mismo en la fabricación de un medicamento, que no forma parte de la invención reivindicada, para su uso para atenuar o inhibir una enfermedad o trastorno mediado por IL-4Ra en un humano. Los trastornos mediados por o relacionados con IL-4Ra que se tratan mediante el ligando, anticuerpo o fragmento de la invención incluyen, por ejemplo, artritis (incluyendo artritis séptica), dermatitis herpetiforme, urticaria idiopática crónica, escleroderma, cicatrización hipertrófica, enfermedad de Whipple, hiperplasia prostática benigna, trastornos pulmonares, tales como asma suave, moderada o grave, trastornos inflamatorios tales como enfermedad inflamatoria intestinal, reacciones alérgicas, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de células falciformes, síndrome de Churg-Strauss, enfermedad de Grave, preeclampsia, síndrome de Sjogren, síndrome linfoproliferativo autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, esófago de Barrett, uveítis autoinmune, tuberculosis y nefrosis.

- 5 Estados particulares para los que puede usarse un anticuerpo o fragmento de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, en el tratamiento o el diagnóstico incluyen: asma, COPD (por ejemplo, bronquitis crónica, enfermedad de las vías respiratorias pequeñas o enfisema), enfermedad inflamatoria intestinal, un estado fibrótico (por ejemplo, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática inducida por parásitos o fibrosis quística), alergia (por ejemplo, dermatitis atópica, alergia a ácaros, alergia a mascotas o alergia alimentaria), terapia de trasplante para prevenir el rechazo de un trasplante, supresión de una hipersensibilidad de tipo retardado o una reacción de hipersensibilidad por contacto, como adyuvante a inmunoterapia de alergia o como adyuvante de vacuna.

10 Está abarcado además por la divulgación el uso del anticuerpo o fragmento del mismo en la fabricación de un medicamento, que no forma parte de la invención reivindicada, para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, siendo dicha enfermedad o estado una enfermedad o estado inflamatorio; una enfermedad o estado atópico; una enfermedad o estado respiratorio; una enfermedad o estado asociado con una IgE elevada; o una enfermedad o estado asociados con actividad IL-4 y/o IL-13 elevada.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Está abarcado además por la divulgación el uso del anticuerpo o fragmento del mismo en la fabricación de un medicamento, que no forma parte de la invención reivindicada, para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, seleccionándose dicha enfermedad o estado del grupo que consiste en una enfermedad o estado inflamatorio de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, neumonía, neumonitis por hipersensibilidad, infiltrado pulmonar con eosinofilia, enfermedad pulmonar ambiental, neumonía, bronquiectasia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar primaria, tromboembolismo pulmonar, trastornos de la pleura, trastornos del mediastino, trastornos del diafragma, hipoventilación, hiperventilación, apnea del sueño, síndrome de dificultad respiratoria aguda, mesotelioma, sarcoma, rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped, cáncer de pulmón, rinitis alérgica, alergia, asbestosis, aspergiloma, aspergilosis, bronquiectasia, bronquitis crónica, enfisema, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad neumocócica invasiva, gripe, micobacterias no tuberculosas, efusión pleural, neumoconiosis, neumocitosis, neumonía, actinomicosis pulmonar, proteinosis alveolar pulmonar, ántrax pulmonar, edema pulmonar, embolia pulmonar, inflamación pulmonar, histiocitosis X pulmonar, hipertensión pulmonar, nocardiosis pulmonar, tuberculosis pulmonar, enfermedad venooclusiva pulmonar, enfermedad pulmonar reumatoide, sarcoidosis y granulomatosis de Wegener.

Está abarcado además por la divulgación un anticuerpo o fragmento del mismo, que no forma parte de la invención reivindicada, tal como se da a conocer en el presente documento, para la prevención o el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno dado a conocer en el presente documento,

Está abarcado además por la divulgación el uso del anticuerpo, o fragmento del mismo, que no forma parte de la invención reivindicada, en un método de medical tratamiento de una enfermedad o trastorno dado a conocer en el presente documento,

Está abarcado además por la divulgación el uso del ligando, anticuerpo o fragmento de un en la fabricación de un medicamento, que no forma parte de la invención reivindicada, para su uso para atenuar o inhibir una enfermedad o trastorno mediado por PCSK9 en un humano.

Los ejemplos no limitativos de tales enfermedades o estados pueden incluir, por ejemplo, un trastorno lipídico, hiperlipoproteinemia, hiperlipidemia; dislipidemia; hipercolesterolemia, un ataque al corazón, un accidente cerebrovascular, enfermedad cardiaca coronaria, aterosclerosis, enfermedad vascular periférica, claudicación, diabetes tipo II, hipertensión arterial y una enfermedad o estado cardiovascular.

Está abarcado además por la divulgación, pero no forma parte de la invención reivindicada, el uso del ligando, anticuerpo o fragmento de un en la fabricación de un medicamento para su uso para atenuar o inhibir una enfermedad o trastorno mediado por IL-6Ra en un humano.

Dicha enfermedad o estado puede ser una enfermedad o estado inflamatorio. Dicha enfermedad o estado puede seleccionarse del grupo que consiste en una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, bronquiolitis, gingivitis, rechazo de trasplante, rechazo de trasplante alogénico, enfermedad de injerto frente a huésped (GvHD), asma, síndrome de dificultad respiratoria en adultos (ARDS), choque séptico, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, inflamación de las vías respiratorias, enfermedad de Castleman, periodontitis, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico y enfermedad cardíaca coronaria.

Las siguientes definiciones son aplicables a cualquier configuración, aspecto, cláusula, provisión, ejemplo o realización de la invención.

“Derivado de” se usa en el sentido ordinario del término. Los sinónimos a modo de ejemplo incluyen “producido como”, “que resulta de”, “recibido de”, “obtenido de”, “un producto de”, “consecuencia de” y “modificado a partir de”. Por ejemplo, una región variable humana de una cadena pesada puede derivarse de la recombinación de segmentos génicos VH, D y JH humanos y esto refleja la recombinación *in vivo* de estos segmentos génicos en, por

ejemplo, un locus de cadena pesada transgénico según la invención con cualquier mutación acompañante (por ejemplo, mutación de unión).

5 Las muestras de las que pueden obtenerse células B incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, bazo, tejido esplénico, médula ósea, linfa, nódulo linfático, timo y apéndice. Los anticuerpos y las cadenas de inmunoglobulina pueden obtenerse de cada una de las muestras mencionadas anteriormente y también de la siguiente lista no limitativa de células B, fluido de ascitis, hibridomas y cultivos celulares.

10 "Pluralidad" se usa en el sentido ordinario del término y significa "al menos uno" o "más de uno".

10 El término "configuración de línea germinal" se refiere a una configuración genómica de línea germinal. Por ejemplo, segmentos génicos de inmunoglobulina humanos de un locus de inmunoglobulina transgénico están en una configuración de línea germinal cuando el orden relativo de los segmentos génicos es el mismo que el orden de segmentos génicos correspondiente en un genoma de línea germinal humano. Por ejemplo, cuando el locus 15 transgénico es un locus de cadena pesada de la invención que comprende segmentos génicos de inmunoglobulina humanos hipotéticos A, B y C, estos se proporcionarían en este orden (de 5' a 3' en el locus) cuando los segmentos génicos correspondientes de un genoma de línea germinal humano comprenden la disposición 5'-A-B-C-3'. En un ejemplo, cuando se proporcionan elementos de un locus de inmunoglobulina humano (por ejemplo, segmentos génicos, potenciadores u otros elementos reguladores) en un locus de inmunoglobulina transgénico según la invención, los elementos de locus Ig humano están en configuración de línea germinal cuando el orden relativo de los segmentos génicos es el mismo que el orden de segmentos génicos correspondientes en un genoma 20 de línea germinal humano y se incluyen secuencias humanas entre los elementos, correspondiendo estas a tales secuencias entre elementos correspondientes en el genoma de línea germinal humano. Por tanto, en un ejemplo hipotético el locus transgénico comprende elementos humanos en la disposición 5'-A-S1-B-S2-C-S3-3', siendo A, B 25 y C segmentos génicos de inmunoglobulina humanos y siendo S1-S3 secuencias de segmento intergénico humanas, estando presente la disposición 5'-A-S1-B-S2-C-S3-3' correspondiente en un genoma de línea germinal humano. Por ejemplo, esto puede conseguirse proporcionando en un locus de inmunoglobulina transgénico de la invención un inserto de ADN correspondiente a la secuencia de ADN de A a C en un genoma de línea germinal humano (o comprendiendo el inserto la secuencia de ADN de A a C). Las disposiciones en genomas de línea 30 germinal humanos y loci de inmunoglobulina se conocen en la técnica (por ejemplo, véase el IMGT en la World Wide Web (véase anteriormente), Kabat y otros recursos de anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento).

35 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región FC de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpo con especificidad polipeptídica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, dAb, Fab, F(ab')2 y Fv). El término "anticuerpo" incluye también anticuerpos H2 que comprenden un dímero de una cadena pesada (5'VH-(opcional bisagra)-CH2-CH3-3') y carecen de una cadena ligera (similar a anticuerpos H2 que se producen de manera natural; véase, por ejemplo, Nature. 3 de junio 40 de 1993;363(6428):446-8; Naturally occurring antibodies devoid of light chains; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R). Por tanto, en una realización de la presente invención, el ARN producido a partir del locus de cadena pesada transgénico codifica cadenas pesadas que carecen de un segmento genético CH1 y no comprenden ninguna cadena ligera de anticuerpo funcional. En un ejemplo, el ARN producido a partir del locus de cadena pesada transgénico codifica dominios variables individuales 45 VH (dAc; anticuerpos de dominio). Estos pueden comprender opcionalmente una región constante.

El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con "anticuerpo" en el presente documento.

50 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno de producción (por ejemplo, de manera natural o recombinante). Preferiblemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción, por ejemplo, de modo que el anticuerpo se ha aislado con respecto a un estándar que puede aprobarse o aprobado por la FDA. Componentes contaminantes de su entorno de producción, tal como el que resulta de células transfundidas recombinantes, son materiales que interferirían normalmente con usos de investigación, de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, 55 y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará: (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo tal como se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y, en algunas realizaciones, hasta más del 99% en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o 60 reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, dado que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

65 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente el antígeno que se une a y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos

dAb, Fab, Fab', F(ab')2 y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido, antígeno o epítopo particular es uno que se une a ese polipéptido, antígeno o epítopo particular sin unirse sustancialmente a otros polipéptidos, antígenos o epítopos. Por ejemplo, la unión al antígeno o epítopo es específica cuando el anticuerpo se une con una K_D de 100 μM o menos, 10 μM o menos, 1 μM 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 tal como conocerá el experto en la técnica, por ejemplo, unión en ELISA y/o determinación de la afinidad usando resonancia plasmónica de superficie (por ejemplo, medición de afinidad en fase de disolución BiacoreTM o KinExATM que puede detectar hasta afinidades de fM (Sapidyne Instruments, Idaho)).

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado o que puede aprobarse por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE. UU. o un estatal o listado en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, incluyendo 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 o cadena de anticuerpo descrito en el presente documento, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y es no tóxico cuando se administra en dosis suficientes para suministrar una cantidad terapéutica del agente.

20 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1, parte 1, ilustra los BAC primero y segundo usados para la inserción en loci de cadena ligera endógenos de ratón. Se muestra el ADN humano en cada BAC. La parte 2 de la figura 1 muestra el punto de inserción de ADN de locus Ig lambda humano en el locus de cadena kappa endógeno de ratón. La parte 3 de figura 1 muestra el punto de inserción de ADN de locus Ig lambda humano en el locus de cadena lambda endógeno de ratón.

La Fig. 2 muestra los resultados de análisis FACS para determinar la expresión de C λ de ratón y humano (y por tanto correspondientemente la expresión de región variable de ratón y humana) en células B esplénicas B220⁺ de ratones homocigóticos P1 (P1/P1) en comparación con ratones de tipo silvestre (WT).

La Fig. 3A muestra los resultados de análisis FACS para determinar la expresión de C κ y C λ de ratón en células B esplénicas B220⁺ a partir de ratones homocigóticos P2 (P2/P2) en comparación con ratones de tipo silvestre (WT). No se observó ninguna expresión de C κ de ratón detectable.

La Fig. 3B muestra los resultados de análisis FACS para determinar la expresión de C λ humano (y por tanto correspondientemente la expresión de región variable humana) en células B esplénicas B220⁺ a partir de ratones homocigóticos P2 (P2/P2) en comparación con ratones de tipo silvestre (WT).

La Fig. 4 muestra la utilización de V λ humano en ratones homocigóticos P2 (P2/P2) y la utilización de V λ típica en humanos (recuadro)

La Fig. 5 muestra la utilización de J λ humano en ratones homocigóticos P2 (P2/P2) y la utilización de J λ típica en humanos (recuadro)

La Fig. 6 muestra que la utilización de V λ es muy alta en ratones homocigóticos P2 (P2/P2).

La Fig. 7 muestra la distribución de utilización de segmento génico V κ de ratón y V λ humano a partir de los locus kappa quiméricos en ratones homocigóticos P2 (P2/P2).

La Fig. 8 ilustra la disposición de RSS en los loci lambda y kappa.

La Fig. 9A muestra los resultados de análisis FACS para determinar la expresión de C λ de ratón y humano (y por tanto correspondientemente la expresión de región variable de ratón y humana) en células B esplénicas B220⁺ a partir de ratones homocigóticos L2 en los que se ha inactivado la expresión de cadena kappa endógena (L2/L2; KA/KA) en comparación con ratones que no tienen ningún ADN lambda humano insertado y en los que se ha inactivado la expresión de cadena kappa endógena (KA/KA). Se ha observado una utilización de V λ humano muy alta en los ratones L2/L2; KA/KA, casi hasta la exclusión de uso de V λ de ratón.

Fig. 9B: Análisis de compartimentos de células B esplénicas. Esta figura muestra los resultados de análisis FACS en células B esplénicas a partir de ratones L2/L2; KA/KA transgénicos (homocigotos L2; homocigóticos para la inserción de segmentos génicos lambda humanos en loci lambda endógenos; habiéndose inactivado la expresión de cadena kappa endógena) en comparación con células B esplénicas de ratones que expresan solo anticuerpos de ratón (ratones KA/KA). Los resultados muestran que los compartimentos de células B esplénicas en los ratones de la divulgación son normal (es decir, equivalentes a los compartimentos de ratones que expresan solo cadenas de anticuerpos de ratón).

Fig. 10: Desarrollo de células B y marcadores en la médula ósea y compartimentos esplénicos.

Fig. 11A: Análisis de compartimentos de células B esplénicas. Esta figura muestra los resultados de análisis FACS en células B esplénicas de ratones S1F/HA, KA/+ transgénicos de la invención que expresan regiones variables de cadena pesada que son todas humanas (en las que la expresión de cadena pesada endógena se ha inactivado mediante inversión), en comparación con células B esplénicas de ratones que expresan solo anticuerpos de ratón. Los resultados muestran que los compartimentos de células B esplénicas en los ratones de la divulgación son normales (es decir, equivalentes a los compartimentos de ratones que expresan solo cadenas de anticuerpos de ratón).

S1F/HA, +/KA = (i) S1F - el primer alelo de cadena pesada endógeno tiene una inserción de ADN de locus de cadena pesada humano, la región VDJ de ratón endógena se ha inactivado mediante inversión y movimiento en el sentido de 5' en el cromosoma; (ii) HA - el segundo alelo de cadena pesada endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena); (iii) + - el primer alelo kappa endógeno es un alelo kappa de tipo natural; y (iv) KA - el segundo alelo kappa endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena). Esta disposición codifica exclusivamente cadenas pesadas a partir del primer alelo de cadena pesada endógeno.

La Fig. 11B: Análisis de compartimentos de células B esplénicas. Esta figura muestra los resultados de análisis FACS en células B esplénicas de ratones S1F/HA, K2/KKA transgénicos de la divulgación que expresan regiones variables de cadena pesada que son todas humanas (en las que la expresión de cadena pesada endógena se ha inactivado mediante inversión) y regiones variables de cadena kappa humanas, en comparación con células B esplénicas de ratones +/HA, K2/KKA. Los resultados muestran que los compartimentos de células B esplénicas en los ratones de la divulgación son normales.

S1F/HA, K2/KKA = (i) K2 - el primer alelo kappa endógeno tiene dos inserciones de ADN de locus de cadena kappa entre el Jk endógeno más 3' y el Ck de ratón, proporcionando una inserción de 14 Vk y Jk1-Jk5 humanos; y (ii) KA - el segundo alelo kappa endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena). Esta disposición codifica exclusivamente cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas y sustancialmente cadenas ligeras kappa del primer alelo kappa endógeno.

+/HA, K2/KKA - esta disposición codifica cadenas pesadas de ratón y cadenas kappa humanas.

Fig. 12A: Análisis de compartimentos de progenitoras B de médula ósea. Esta figura muestra los resultados de análisis FACS en células B de médula ósea (BM) de ratones S1F/HA, KA/+ transgénicos de la invención que expresan regiones variables de cadena pesada que son todas humanas (en las que la expresión de cadena pesada endógena se ha inactivado mediante inversión), en comparación con células B BM de ratones que expresan solo anticuerpos de ratón. Los resultados muestran que los compartimentos de células B BM en los ratones de la divulgación son normales (es decir, equivalentes a los compartimentos de ratones que expresan solo cadenas de anticuerpos de ratón).

Fig. 12B: Análisis de compartimentos de progenitoras B de médula ósea. Esta figura muestra los resultados de análisis FACS en células B de médula ósea (BM) de ratones S1F/HA, K2/KKA transgénicos de la invención que expresan regiones variables de cadena pesada que son todas humanas (en las que la expresión de cadena pesada endógena se ha inactivado mediante inversión) y regiones variables de cadena kappa humanas, en comparación con células B BM de ratones +/HA, K2/KKA. Los resultados muestran que los compartimentos de células B BM en los ratones de la divulgación son normales.

Fig. 13: Muestra la cuantificación de Ig para la Ig subtipo y total en diversos ratones:

S1F/HA, KA/+ = (i) S1F - el primer alelo de cadena pesada endógeno tiene una inserción de ADN de locus de cadena pesada humano, la región VDJ de ratón endógena se ha inactivado mediante inversión y movimiento en el sentido de 5' en el cromosoma; (ii) HA - el segundo alelo de cadena pesada endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena); (iii) KA - el primer alelo kappa endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena); y (iv) + - el segundo alelo kappa endógeno es un alelo kappa de tipo natural. Esta disposición codifica exclusivamente cadenas pesadas a partir del primer alelo de cadena pesada endógeno.

S1F/HA, K2/KKA = (i) K2 - el primer alelo kappa endógeno tiene dos inserciones de ADN de locus de cadena kappa entre el Jk endógeno más 3' y el Ck de ratón, proporcionando una inserción de 14 Vk y Jk1-Jk5 humanos; y (ii) KA - el segundo alelo kappa endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena). Esta disposición codifica exclusivamente cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas y sustancialmente cadenas ligeras kappa del primer alelo kappa endógeno.

+/HA, K2/+ - esta disposición codifica cadenas pesadas de ratón y cadenas kappa tanto de ratón como humanas.

+/HA, +/KA - esta disposición codifica cadenas pesadas y kappa de ratón.

En esta figura, "Suma de Ig" es la suma de los isotipos IgG y IgM.

5

Fig. 14: muestra la cuantificación de Ig para la Ig subtipo y total en diversos ratones:

S1F/HA, K2/KA (n=15) y 12 ratones que expresan solo cadenas de anticuerpos de ratón (+/HA, +/KA (n=6) y ratones de tipo silvestre (WT; n=6)).

10

Descripción detallada de la invención

Se entenderá que las realizaciones particulares descritas 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 serán capaces de determinar usando no más de un estudio rutinario, 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.

20 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 consistente 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 usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que hace referencia a alternativas solo o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere a solo alternativas e "y/o". Por toda esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

25 Tal como se usa 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" y "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas de método adicionales, no citados

30 El término "o combinaciones de los mismos" tal como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos listados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tal como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etcétera. El experto en la técnica entenderá que normalmente no hay ningún límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto.

40 Como fuente de secuencias de segmento génico de anticuerpo, el experto en la técnica será consciente también de las siguientes bases de datos y recursos disponibles (incluyendo actualizaciones de los mismos):

45 *La base de datos Kabat* (G. Johnson y T. T. Wu, 2002; World Wide Web (www.kabatdatabase.com)). Creada por E. A. Kabat y T. T. Wu en 1966, la base de datos Kabat publica secuencias alineadas de anticuerpos, receptores de células T, moléculas de complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) clase I y II, y otras proteínas de interés inmunológico. Se proporciona una interfaz de búsqueda mediante la herramienta Seqhunll, y están disponibles una grama de utilidades para el alineamiento de secuencias, clasificación por subgrupos de secuencias y la generación de gráficos de variabilidad. Véase también Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K., y Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., publicación NIH n.º 91-3242, Bethesda, MD, en particular con referencia a segmentos génicos humanos para su uso en la presente invención.

55 *KabatMan* (A. C. R. Martin, 2002; World Wide Web (www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html)). Esta es una interfaz web para hacer consultas simples a la base de datos de secuencias Kabat.

60 *IMGT* (the International ImMunoGeneTics Information System®; M.-P. Lefranc, 2002; World Wide Web ([www.imgt.cines.fr](http://imgt.cines.fr))). IMGT es un sistema de información integrado que se especializa en anticuerpos, receptores de células T y moléculas MHC de todas las especies de vertebrados. Proporciona un portal común para datos estandarizados que incluyen secuencias de nucleótidos y de proteínas, cebadores oligonucleotídicos, mapas génicos, polimorfismos genéticos, especificidades y estructuras bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D). IMGT incluye tres bases de datos de secuencias (*IMGT/LIGM-DB*, *IMGT/MHC-DB*, *IMGT/PRIMERDB*), una base de datos de genomas (*IMGT/GENE-DB*), una base de datos de estructuras 3D (*IMGT/3Dstructure-DB*) y una grama de recursos web ("IMGT Marie-Paule page") y herramientas interactivas.

- 5 *V-BASE* (I. M. Tomlinson, 2002; World Wide Web (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)). VBASE es un directorio extenso de todas las secuencias de región variable de línea germinal de anticuerpo humanas compiladas de más de mil secuencias publicadas. Incluye una versión del software de alineamiento DNAPLOT (desarrollado por Hans-Helmar Althaus y Werner Müller) que permite la asignación de genes de V de anticuerpo reorganizados a sus segmentos génicos de línea germinal más cercanos.
- 10 *Anticuerpos-Estructura y secuencia* (A. C. R. Martin, 2002; World Wide Web (www.bioinf.org.uk/abs)). Esta página resume información útil sobre la estructura y la secuencia de anticuerpos. Proporciona una interfaz de consulta para los datos de secuencia de anticuerpo Kabat, información general sobre anticuerpos, estructuras cristalinas y enlaces a otra información relacionada con anticuerpos. También distribuye un sumario automatizado de todas las estructuras de anticuerpo depositadas en la Protein Databank (PDB). De particular interés es una descripción exhaustiva y comparación de los diversos esquemas de numeración para regiones variables de anticuerpo.
- 15 *AAAAA* (A Ho's Amazing Atlas of Antibody Anatomy; A. Honegger, 2001; World Wide Web ([www.unizh.ch/~antibody](http://unizh.ch/~antibody))). Este recurso incluye herramientas para análisis estructural, modelado y modificación mediante ingeniería. Adopta un esquema de unificación para el alineamiento estructural extenso de secuencia de anticuerpo y de receptor de células T, e incluye macros de Excel para el análisis y la representación gráfica de anticuerpos.
- 20 *WAM* (Web Antibody Modeling; N. Whitelegg y A. R. Rees, 2001; World Wide Web (www.antibody.bath.ac.uk)). Albergada por el Centre for Protein Analysis and Design en la Universidad de Bath, Reino Unido. Basado en el paquete AbM (comercializado anteriormente por Oxford Molecular) para construir modelos 3D de secuencias Fv de anticuerpo usando una combinación de métodos teóricos establecidos, este sitio incluye también la última información estructural de anticuerpos.
- 25 *Página de estructura/función de inmunoglobulinas de Mike* (M. R. Clark, 2001; World Wide Web ([www.path.cam.ac.uW-mrc7/mikeimages.html](http://path.cam.ac.uW-mrc7/mikeimages.html))). Estas páginas proporcionan materiales educativos sobre la estructura y la función de inmunoglobulinas, y se ilustran mediante imágenes a color, modelos y animaciones. Está disponible información adicional sobre humanización de anticuerpo y el Mike Clark's Therapeutic Antinbody Human Homology Project, que pretende correlacionar la eficacia clínica y las respuestas anti-inmunoglobulina con secuencias de región variable de anticuerpos terapéuticos.
- 30 *La página de recursos de anticuerpos* (The Antibody Resource Page, 2000; World Wide Web (www.antibodyresource.com)). Este sitio se describe a sí mismo como la "guía completa para la búsqueda y los proveedores de anticuerpos". Se proporcionan enlaces a herramientas de secuenciación de aminoácidos, herramientas de secuenciación de anticuerpos de nucleótidos y bases de datos de hibridomas/cultivos celulares.
- 35 *Humanización por diseño* (J. Saldanha, 2000; World Wide Web ([www.people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s](http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s))). Este recurso proporciona un resumen sobre tecnología de humanización de anticuerpo. La característica más útil es una base de datos en la que pueden hacerse búsquedas (por secuencia y texto) de más de 40 anticuerpos humanizados publicados que incluye información sobre cuestiones de diseño, elección de entramado, retromutaciones de entramado y la afinidad de unión de los constructos humanizados.
- 40 Véase también *Antibody Engineering Methods and Protocols*, Ed. Benny K C Lo, *Methods in Molecular Biology™*, Human Press. También en World Wide Web ([www.blogsua.com/pdf/antibody-engineering-methods-and-protocolsantibody-engineering-methods-and-protocols.pdf](http://blogsua.com/pdf/antibody-engineering-methods-and-protocolsantibody-engineering-methods-and-protocols.pdf)
- 45 Cualquier parte de esta divulgación puede leerse en combinación con cualquier otra parte de la divulgación, a menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto.
- 50 Todas las composiciones y/o los métodos dados a conocer y reivindicados en el presente documento pueden elaborarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los métodos de esta invención se han descritos en términos de realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin apartarse del concepto y del alcance de la invención. Se considera que todos de tales sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica están dentro del alcance y del concepto de la invención tal como se definen mediante las reivindicaciones adjuntas.
- 55 Los siguientes ejemplos se proponen para dotar a los expertos habituales en la técnica de una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.
- 60 Ejemplos (ejemplos de referencia)
- 65 Ejemplo 1:

Expresión de regiones variables lambda humanas alta en ratones transgénicos que comprenden segmentos génicos lambda humanos insertados en locus kappa endógeno

- 5 Se realizó una inserción de segmentos génicos lambda humanos a partir de un 1^{er} IGL BAC en el locus IGK de células AB2.1 ES de ratón (Baylor College of Medicine) para crear un alelo de cadena ligera quimérico denominado alelo P1 (Fig. 1). La secuencia humana insertada corresponde a la secuencia del cromosoma 22 humano desde la posición 23217291 hasta la posición 23327884 y comprende los segmentos génicos lambda funcionales V λ 3-1, J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3, J λ 6-C λ 6 y J λ 7-C λ 7 (los alelos de la tabla 13). La inserción se hizo entre las posiciones 70674755 y 706747756 en el cromosoma 6 de ratón, que está en el sentido de 5' de la región Ck de ratón y 3'E κ (es decir, dentro de 100 kb del potenciador de cadena ligera endógeno) tal como se muestran en la Figura 1. Los segmentos génicos V κ y J κ de ratón se conservaron en el locus quimérico, inmediatamente en el sentido de 5' del ADN lambda humano insertado. Los loci lambda de ratón se dejaron intactos. Se generaron ratones homocigóticos para el locus P1 quimérico a partir de las células ES usando procedimientos estándar.
- 10 15 Se produjeron un segundo tipo de ratones (ratones P2) en los que se insertaron más segmentos génicos V λ funcionales humanos en el sentido de 5' (5') de V λ 3-1 humano mediante la inserción secuencial del ADN humano de BAC1 y entonces ADN de BAC2 para crear el alelo P2 (los alelos de la tabla 14). La secuencia humana insertada de BAC2 corresponde a la secuencia del cromosoma 22 humano desde la posición 23064876 hasta la posición 23217287 y comprende los segmentos génicos lambda funcionales V λ 2-18, V λ 3-16, V λ 2-14, V λ 3-12, V λ 2-11, V λ 3-10, V λ 3-9, V λ 2-8 y V λ 4-3. Se generaron ratones homocigóticos para el locus P2 quimérico a partir de las células ES usando procedimientos estándar.
- 20 25 Se realizó un análisis FACS de células B esplénicas de los homocigotos P1 y P2 para evaluar la expresión de lambda frente a kappa y la expresión de lambda humana frente a lambda de ratón en los ratones transgénicos.
- 30 Se llevó a cabo 5'-RACE estándar para analizar los transcritos de ARN de los loci de cadena ligera en homocigotos P2.

Expresión de cadena ligera y análisis FACS

- 35 Para obtener una suspensión celular individual de bazo, el bazo se hizo pasar suavemente a través de un colador celular de 30 μ m. Se resuspendieron células individuales en solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor al 3%.
- 40 45 Se usaron los siguientes anticuerpos para la tinción:
- Anticuerpo de ficoeritrina (PE) lambda anti-ratón (mC λ) de rata (Southern Biotech), isotiocianato de fluoresceína (FITC) kappa anti-ratón (mC κ) de rata (BD Pharmingen, clon 187.1), ficoeritrina (PE) lambda anti-humano (hC λ) (eBioscience, clon 1-155-2), aloficiocianina (APC) anti-B220/CD45R (eBioscience, clon RA3-6B2). NB: se espera que las cadenas ligeras que portan C λ humano tengan regiones variables derivadas de la reorganización de V λ humano y J λ humano insertados. Se espera que las cadenas ligeras que portan C λ de ratón tengan regiones variables derivadas de la reorganización de ratón V λ y J λ de los loci lambda endógenos.
- 50 55 Se añadieron 5×10^6 células a tubos individuales, se centrifugaron para eliminar el exceso de fluido y se resuspendieron en 100 μ l nuevos de PBS + FCS al 3%. A cada tubo individual se le añadieron los siguientes anticuerpos:
- Para la tinción de m λ frente a m κ se añadió 1 μ l de cada anticuerpo además de 1 μ l de anticuerpo B220/CD45R. Para la detección de B células que expresan cadena ligera lambda humana, el anticuerpo m λ se sustituyó por anticuerpo h λ . Las células se incubaron en la oscuridad a 6°C durante 15 minutos seguido de varios lavados con PBS nuevo+FCS al 3% para eliminar el anticuerpo no unidos. Las células se analizaron usando un analizador de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de Miltenyi Biotech.
- 60 65 Se controlaron los esplenocitos vivos usando una dispersión lateral (SSC) y una dispersión frontal (FSC). Dentro de la población controlada por SSC y FSC, se detectó una subpoblación de B220/CD45R (células B de ratón) usando el fluorocromo APC. La población de B220/CD45R positiva individual se subdividió adicionalmente en una célula que porta fluorocromo PE o bien m λ o bien h λ junto con fluorocromo FITC. El porcentaje de cada población se calculó usando un sistema de control.
- Sorprendentemente, el análisis FACS de células B esplénicas de los homocigotos P1 no mostró ninguna expresión de C κ de ratón detectable (Fig. 2), lo que indica que la inserción del ADN de locus lambda humana de BAC1 interrumpe la expresión de la cadena IGK endógena.
- La fuerte expresión de C λ endógeno y la débil expresión de C λ humano en las células B esplénicas agrupadas mediante análisis FACS (C λ ratón:C λ humano = 65:32) en estos ratones sugiere que la secuencia IGL humana insertada, aunque interrumpe la actividad IGK, no puede competir totalmente con los genes IGL endógenos.

El análisis FACS de nuevo no mostró sorprendentemente ninguna expresión de Cκ de ratón detectable en los homocigotos P2 (Figs. 3A y B). Sin embargo, el Cλ humano predomina enormemente en células B expresadas agrupadas como Cλ de ratón o humano tras el análisis FACS (Cλ de ratón:Cλ humano = 15:80 correspondiente a una relación de 15 regiones variables lambda de ratón:80 regiones variables lambda humanas, es decir, un 84% de regiones variables lambda humanas con referencia a las células B agrupadas - lo que corresponde al 80% de las células B totales) de los homocigotos P2. Aunque sin querer restringirse a ninguna teoría, sugerimos que la secuencia de locus lambda humana insertada del 2º BAC proporciona algunas ventajas para competir con una reorganización o expresión de segmentos génicos lambda endógenos.

Analizamos la utilización de Vλ y Jλ humanos en los homocigotos P2. Véase la Figura 4 que muestra la utilización de Vλ humano en homocigotos P2. La utilización observada era similar a la observada en humanos (según J Mol Biol. 25 de abril de 1997;268(1):69-77; "The creation of diversity in the human immunoglobulin V(lambda) repertoire"; Ignatovich O *et al.*). Además, la utilización de Jλ humano era similar a la observada en humanos (Figura 5). El análisis de utilización de Vλ frente a Vκ de transcriptos Cλ humanos secuenciando clones de PCR 5'-RACE sin sesgo (amplificación rápida de los extremos de ADNc) mostró que entre 278 secuencias de clon, solo una usaba Vκ para la reorganización para dar Jλ (Jλ humano) y todas las demás (277 clones) usaban Vλ humano (Figs. 6 y 7; se detectó Vλ2-5 al nivel de transcríto de ARN, pero este es un pseudogén que habitualmente no se recoge mediante la utilización a nivel de proteína). Aunque no se pretende restringirse a ninguna teoría, sugerimos que los segmentos génicos Vκ de ratón conservados esencialmente no pueden reorganizarse eficientemente con los segmentos génicos Jλ humanos insertados porque tiene el mismo tipo de RSS (secuencias señal de recombinación; véase la explicación más adelante) y son incompatibles para la reorganización (Fig. 8). Este resultado indica también que la inactivación de la actividad IGK endógena y la expresión predominante de la secuencia lambda humana insertada puede conseguirse sin modificación adicional del locus IGK, por ejemplo, una delección o inversión de segmentos génicos de loci kappa endógenos no es necesaria, lo que simplifica enormemente la generación de ratones transgénicos útiles que expresan cadenas ligera que portan regiones variables lambda humanas (es decir, regiones variables producidas mediante la recombinación de segmentos génicos Vλ y Jλ humanos).

La disposición de secuencias señal de recombinación (RSS) que median en la recombinación de V(D)J *in vivo* se discute, por ejemplo, en Cell. Abril de 2002; 109 Supl:págs. 45-55; "The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination"; Bassing CH, Swat W, Alt FW. Se han identificado dos tipos de elemento de RSS: una RSS de una vuelta (12-RSS) y una RSS de dos vueltas (23-RSS). En la recombinación VJ natural en el locus de cadena ligera lambda, la recombinación se efectúa entre una RSS de dos vueltas que se encuentra 3' de un lambda V y una RSS de una vuelta que se encuentra 5' de un lambda J, estando las RSS en orientación opuesta. En una recombinación de VJ natural en el locus de cadena ligera kappa, la recombinación si efectúa entre una RSS de una vuelta que se encuentra 3' de un kappa V y una RSS de dos vueltas que se encuentra 5' de un kappa J, estando las RSS en orientación opuesta. Por tanto, generalmente una RSS de dos vueltas es compatible con una RSS de una vuelta en la orientación opuesta.

Por tanto, los inventores han demostrado cómo (i) inactivar la expresión de cadena kappa endógena mediante la inserción de segmentos génicos lambda humanos en el locus kappa; y (ii) como conseguir una expresión de región variable lambda humana muy alta (proporcionando así repertorios de cadena ligera útiles para la selección frente a un antígeno diana) - incluso en presencia de segmentos génicos V lambda y kappa endógenos. Por tanto, los inventores han mostrado como eliminar significativamente (lambda) o eliminar totalmente (kappa) la competición de segmentos génicos V y por tanto la expresión de cadena ligera endógena mediante la inserción de al menos los segmentos génicos lambda humanos funcionales comprendidos por BAC 1 y 2. En este ejemplo se consiguió sorprendentemente un nivel muy alto de expresión de región variable lambda humana (el 84% de las cadenas lambda totales y las cadenas ligeras totales tal como se explicó anteriormente).

50 Ejemplo 2:

Expresión de regiones variables lambda humanas alta en ratones transgénicos que comprenden segmentos génicos lambda humanos insertados en locus lambda endógeno

Se realizó una inserción de segmentos génicos lambda humanos del 1^{er} y 2^º IGL BAC la locus lambda de células AB2.1 ES de ratón (Baylor College of Medicine) para crear un alelo de cadena ligera lambda denominado alelo L2 (Fig. 1). La secuencia humana insertada corresponde a la secuencia del cromosoma 22 humano desde la posición 23064876 hasta la posición 23327884 y comprende los segmentos génicos lambda funcionales Vλ2-18, Vλ3-16, V2-14, Vλ3-12, Vλ2-11, Vλ3-10, Vλ3-9, Vλ2-8, Vλ4-3, Vλ3-1, Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6 y Jλ7-Cλ7. La inserción se hizo entre las posiciones 19047551 y 19047556 en el cromosoma 16 de ratón, que está en el sentido de 5' de la región Cλ de ratón y entre Eλ4-10 y Eλ3-1 (es decir, dentro de 100 kb de los potenciadores de cadena ligera endógenos) tal como se muestra en la Figura 1. Los segmentos génicos Vλ y Jλ de ratón se conservaron en el locus, inmediatamente en el sentido de 5' del ADN lambda humano insertado. Los loci kappa de ratón se inactivaron para impedir la expresión de cadena kappa. Se generaron ratones homocigóticos para el locus L2 a partir de las células ES usando procedimientos estándar.

Usando un método similar al del ejemplo 1, se realizó un análisis FACS de células B esplénicas a partir de los homocigotos L2 para evaluar la expresión lambda frente a kappa y la expresión de lambda humano frente a lambda de ratón en los ratones transgénicos.

5 Expresión de cadena ligera y análisis FACS

El análisis FACS de células B esplénicas en homocigotos L2 bajo el fondo inactivado de IGK (en los que se han conservado segmentos génicos Vk y Jk) mostró sorprendentemente que la expresión de Cλ humano predomina enormemente en células B agrupadas como Cλ de ratón o humano tras el análisis FACS (Cλ de ratón:Cλ humano = 5:93 correspondiente a una relación de 5 regiones variables lambda de ratón:93 regiones variables lambda humanas, es decir, un 95% de regiones variables lambda humanas con referencia a las células B agrupadas - que corresponde al 93% de células B totales) (Fig. 9A), lo que demuestra que los segmentos génicos Igλ humanos insertados dentro del locus Igλ endógeno puede superar la reorganización o expresión de segmentos génicos Igλ endógenos.

10 Por tanto, los inventores han demostrado cómo conseguir una expresión de región variable lambda humana muy alta (proporcionando así repertorios de cadena ligera útiles para la selección frente al antígeno diana) - incluso en presencia de segmentos génicos V lambda y kappa endógenos. Por tanto, los inventores han mostrado cómo eliminar significativamente la competición de segmentos génicos V lambda endógenos y por tanto la expresión de cadena ligera lambda endógena mediante la inserción de al menos los segmentos génicos lambda humanos funcionales comprendidos por BAC 1 y 2. En este ejemplo se consiguió sorprendentemente un nivel muy alto de expresión de región variable lambda humana (el 95% de las cadenas lambda totales y las cadenas ligeras totales tal como se explicó anteriormente).

15 Estos datos indican que los ratones que portan alelos o bien P (ejemplo 1) o bien L (ejemplo 2) producidos mediante la inserción dirigida de los segmentos génicos funcionales proporcionados por BAC1 y BAC2 pueden funcionar en la reorganización y la expresión en células B maduras. Estos dos tipos de alelos son muy útiles para proporcionar ratones transgénicos que producen cadenas lambda Ig humanas para el descubrimiento de anticuerpos terapéuticos y como herramientas de búsqueda.

20 Ratones transgénicos de la divulgación que expresan regiones variables lambda humanas desarrollan compartimentos esplénicos normales

25 En el bazo, las células B se caracterizan como inmaduras (T1 y T2) y maduras (M) basándose en los niveles de marcadores de la superficie celular, IgM y IgD. Las células T1 tienen un alto IgM y bajo IgD. Las células T2 tienen niveles medios de ambos. Las células M tienen una IgM baja pero una IgD mala (figura 10). Véase también J Exp Med. 5 de julio 1999;190(1):75-89; "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals"; Loder F et al.

30 Usando métodos similares a los descritos en el ejemplo 3 más adelante, se puntuaron las células B esplénicas de los animales para la expresión de IgD y IgM usando FACS. Comparamos los ratones de control KA/KA (en los que expresión de cadena kappa endógena se ha inactivado, pero no la expresión de cadena lambda endógena) con ratones L2/L2;KA/KA (homocigotos L2). Los homocigotos L2 mostraron sorprendentemente comportamientos de células B esplénicas comparables con los ratones control (Fig. 9B).

35 Ejemplo 3:

Evaluación del desarrollo de células B e Ig en ratones transgénico de la divulgación

40 Observamos una expresión de subtipo de Ig y un desarrollo de células B normales en ratones transgénicos de la divulgación que expresan anticuerpos con regiones variables de cadena pesada humanas sustancialmente en ausencia de expresión de cadena pesada y capa endógena.

45 Usando células ES y los métodos de manipulación genómica RMCE descritos anteriormente, se construyeron ratones con combinaciones de los siguientes alelos de locus Ig:-

50 S1F/HA, +/KA = (i) S1F - el primer alelo de cadena pesada endógena tiene una inserción de ADN de locus de cadena pesada humano, la región VDJ de ratón endógena se ha inactivado mediante inversión y movimiento en el sentido de 5' en el cromosoma (véase la descripción anterior, en la que este alelo se denomina S1^{inv1}); (ii) HA - el segundo alelo de cadena pesada endógena se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena); (iii) + - el primer alelo kappa endógeno es un alelo kappa de tipo natural y (iv) KA - el segundo alelo kappa endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena). Esta disposición codifica exclusivamente cadenas pesadas a partir del primer alelo de cadena pesada endógeno.

55 S1F/HA, K2/KA = (i) K2 - el primer alelo kappa endógeno tiene dos inserciones de ADN de locus de cadena kappa entre el Jk endógeno más 3' y el Ck de ratón, proporcionando una inserción de 14 Vk y Jk1-Jk5 humanos; y (ii) KA -

el segundo alelo kappa endógeno se ha inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena). Esta disposición codifica exclusivamente cadenas pesadas que comprenden regiones variables humanas y sustancialmente cadenas ligeras kappa del primer alelo kappa endógeno.

- 5 +/HA, K2/KA - esta disposición codifica ratón cadenas pesadas y cadenas kappa humanas.
 +/HA, +/KA - esta disposición codifica cadenas pesadas y kappa de ratón - los ratones solo producen cadenas pesadas y ligeras de ratón.
- 10 En médula ósea, las poblaciones progenitoras B se caracterizan basándose en sus marcadores superficiales, B220 y CD43. Las células PreProB portan configuración IGH e IGK/L de línea germinal y tienen bajo B220 y alto CD43 en su superficie celular. Las células ProB comienzan a iniciar la recombinación de VDJ en el locus IGH y portan medios de tanto B220 como CD43. Las células PreB portan un locus de VDJ IGH y comienzan a iniciar la reorganización de VJ de cadena ligera, y tienen alto B220, pero bajo CD43. En bazo, las células B se caracterizan como inmaduras (T1 y T2) y maduras (M) basándose en los niveles de marcadores de la superficie celular, IgM y IgD. Las células T1 tienen un alto IgM y bajo IgD. Las células T2 tienen niveles medios de ambos de ellos. Las células M tienen bajo IgM, pero alto IgD (figura 10). Véase también J Exp Med. 1 de mayo de 1991; 173(5): 1213-25; "Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow"; Hardy RR *et al.* y J Exp Med. 5 de julio de 1999; 190(1): 75-89; "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals"; Loder F *et al.*

Los ratones transgénicos de la divulgación desarrollan compartimientos esplénicos y BM normales

25 (a) Análisis del comportamiento esplénico

Para cada ratón, para obtener una suspensión celular individual de bazo, el bazo se hizo pasar suavemente a través de un colador celular de 30 µm. Se resuspendieron células individuales en solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor al 3%. Se añadieron 5×10^6 células a tubos individuales, se centrifugaron para eliminar el exceso de fluido y se resuspendieron en 100 µl nuevos de PBS + FCS al 3%. A cada tubo individual se le añadieron los siguientes anticuerpos: aloficocianina (APC) anti-B220/CD45R (eBioscience, clon RA3-6B2), anticuerpo frente a receptor de IgD conjugado con ficoeritrina (PE) (eBioscience, clon 11-26) y anticuerpo frente a receptor de IgM conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (eBioscience, clon 11/41).

35 Para la tinción de IgM frente a IgD, se usaron 5×10^6 células para cada tinción. A cada vial que contenía esplenocitos se le añadió un cóctel de anticuerpos que consistía en: anti-IgD (PE), anti-IgM (FITC) y anti-B220/CD45R (APC). Las células se incubaron a 6°C durante 15 minutos, se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpos sin unir y se analizaron usando un analizador de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de Miltenyi Biotech. Las células B se controlaron como B220^{ALTO} IgM^{ALTO} IgD^{BAJO} (es decir, B220+ IgM⁺ IgD⁻) para la población T1, B220^{ALTO} IgM^{ALTO} IgD^{ALTO} (B220+ IgM⁺ IgD⁺) para la población T2 y B220^{ALTO} IgM^{BAJO} IgD^{ALTO} (B220+ IgM⁻ IgD⁺) para la población M. Se calculó el porcentaje de células usando un sistema de control. Usamos controles para identificar y definir subconjuntos de poblaciones celulares en gráficos con escala logarítmica. Antes de aplicar los controles, se usa un anticuerpo de tinción individual para cada fluorocromo para discriminar entre una población positiva (fluorocromo de alta intensidad) y negativa (ningún fluorocromo de intensidad detectable). Los controles se aplican basándose en las intensidades de fluorocromo de la misma manera a todas las muestras. Las tinciones individuales eran:

IgD-PE

50 IgM-FITC

B220-APC

55 Se controlaron los esplenocitos vivos usando una dispersión lateral (SSC) y una dispersión frontal (FSC). Dentro de la población controlada por SSC y FSC, se detectó una subpoblación de células positivas B220/CD45R (células B de ratón) usando el fluorocromo APC. La población B220/CD45R positiva individual se subdividió adicionalmente en una célula que porta o bien isotiocianato de fluoresceína (FITC) de IgM o bien fluorocromo de IgD junto con fluorocromo de FITC. El porcentaje de cada población se calculó usando un sistema de control. Los compartimentos de células B esplénicas en los ratones de la divulgación son normales (es decir, equivalentes a los compartimentos de ratones que expresan solo cadenas de anticuerpos de ratón).

60 (b) Análisis de progenitoras B de médula ósea

65 Para obtener una suspensión celular individual a partir de médula ósea para cada ratón, se lavaron el fémur y la tibia con solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor al 3%. Las células se hicieron pasar adicionalmente a través de un colador celular de 30 µm para eliminar

- trozos de hueco o agrupaciones celulares. Se resuspendieron las células en PBS fría suplementada con suero al 3%. Se añadieron 2×10^6 células a tubos individuales, se centrifugaron para eliminar el exceso de tampón y se resuspendieron en 100 μl nuevos de PBS + FCS al 3%. A cada tubo individual se le añadieron los siguientes anticuerpos: isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-leucosialina (CD43) (eBioscience, clon eBioR2/60) y aloficocianina (APC) anti-B220/CD45R (eBioscience, clon RA3-6B2). Las células se incubaron en la oscuridad a 6°C durante 15 minutos seguido de varios lavados con PBS nuevo+FCS al 3% para eliminar el anticuerpo sin unir. Las células se analizaron usando un analizador de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de Miltenyi Biotech. Se controlaron las células de médula ósea vivas usando una dispersión lateral (SSC) y una dispersión frontal (FSC). Usamos controles para identificar y definir subconjuntos de poblaciones celulares en gráficos con escala logarítmica. Antes de aplicar los controles, se usa un anticuerpo de tinción individual para cada fluorocromo para discriminar entre una población positiva (fluorocromo de alta intensidad) y negativa (ningún fluorocromo de intensidad detectable). Los controles se aplican basándose en las intensidades de fluorocromo de la misma manera a todas las muestras.
- Las tinciones individuales eran:
- B220-APC
CD43-FITC
- Dentro de la población viva se identificó una población doble de células positivas B220/CD45R y CD43 como células pre-B, pro-B y pre-pro B. Los compartimentos de células B esplénicas en los ratones de la divulgación son normales (es decir, equivalentes a los compartimentos de ratones que expresan solo cadenas de anticuerpos de ratón).
- Los ratones transgénicos de la divulgación desarrollan una expresión de Ig normal
- Cuantificación de IgM y IgG de suero
- Se recubrieron placas NUNC de 96 pocillos inicialmente con un anticuerpo de captura (anticuerpo Fab anti-ratón de cabra a 1 $\mu\text{g/ml}$) durante la noche a 4°C. Las placas de IgG usaron anti-Fab, (M4155 Sigma) y las placas de IgM usaron anti-Fab (OBT1527 AbD Serotec). Tras tres lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween20 al 0,1% v/v, las placas se bloquearon con 200 μl de PBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 1% p/v durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron tres veces tal como anteriormente y entonces se añadieron 50 μl de patrones (anticuerpos de isotipo de ratón de control, IgG1 (M9269 Sigma), IgG2a (M9144 Sigma), IgG2b (M8894 sigma), IgM (M3795 Sigma) o muestras de suero diluidas en PBS con BSA 0,1% a cada pocillo, y se incubaron durante 1 hora a TA. Tras lavar tres veces tal como anteriormente, se añadieron 100 μl de anticuerpo de detección (anticuerpo específico de isotipo anti-ratón de cabra-conjugado con peroxidasa del rábano, 1/10000 en PBS con Tween al 0,1%) (IgG1 anti-ratón (STAR132P AbD Serotec), IgG2a anti-ratón (STAR133P AdD Serotec), IgG2b anti-ratón (STAR134P AbD Serotec) e IgM anti-ratón (ab97230 Abcam) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron tres veces tal como anteriormente y se revelaron usando sustrato de tetrametilbencidina (TMB, Sigma) durante 4-5 minutos en la oscuridad a TA. El revelado se detuvo añadiendo 50 μl /pocillo de ácido sulfúrico 1 M. Las placas se leyeron con un lector de placas Bitek Synergy HT a 450 nm.
- Conclusión:
- L inversión de $V_{\text{H}}\text{-}D\text{-}J_{\text{H}}$ endógenos tras la inserción de IGH BAC humano da como resultado la inactivación de la reorganización de V_{H} endógeno a $D\text{-}J_{\text{H}}$ humano insertado. Los inventores observaron, sin embargo, que sorprendentemente la inactivación de la expresión de cadena pesada endógena no cambia la relación de células B en el compartimento esplénico (Fig. 11) o el compartimento de progenitoras B de médula ósea (Fig. 12) y los niveles de inmunoglobulina en suero son normales y se expresan los subtipos de Ig correctos (Fig. 13). Esto se mostró en ratones que expresan regiones variables de cadena pesada humanas con cadenas ligeras de ratón (Figs. 11A y 12A) así como en ratones que expresan tanto regiones variables de cadena pesada humanas como regiones variables de cadena ligera humanas (Figs. 11B y 12B). Estos datos demuestran que los segmentos génicos IGH humanos insertados (una inserción de al menos los segmentos génicos V_{H} humanos $V_{\text{H}}2\text{-}5$, 7-4-1, 4-4, 1-3, 1-2, 6-1, y todos los segmentos génicos D y J_{H} humanos D1-1, 2-2, 3-3, 4-4, 5-5, 6-6, 1-7, 2-8, 3-9, 5-12, 6-13, 2-15, 3-16, 4-17, 6-19, 1-20, 2-21, 3-22, 6-25, 1-26 y 7-27; y J1, J2, J3, J4, J5 y J6) son totalmente funcionales en el aspecto de reorganización, señalización de BCR y maduración de células B. La funcionalidad se conserva también cuando se insertan segmentos génicos VJ de cadena ligera humanos para proporcionar cadenas ligeras transgénicas, según la inserción usada para crear el alelo K2. Esta inserción es una inserción que comprende los segmentos génicos humanos $V_{\text{K}}2\text{-}24$, $V_{\text{K}}3\text{-}20$, $V_{\text{K}}1\text{-}17$, $V_{\text{K}}1\text{-}16$, $V_{\text{K}}3\text{-}15$, $V_{\text{K}}1\text{-}13$, $V_{\text{K}}1\text{-}12$, $V_{\text{K}}3\text{-}11$, $V_{\text{K}}1\text{-}9$, $V_{\text{K}}1\text{-}8$, $V_{\text{K}}1\text{-}6$, $V_{\text{K}}1\text{-}5$, $V_{\text{K}}5\text{-}2$, $V_{\text{K}}4\text{-}1$, $J_{\text{K}}1$, $J_{\text{K}}2$, $J_{\text{K}}3$, $J_{\text{K}}4$ y $J_{\text{K}}5$. Más del 90% de los anticuerpos expresados por los ratones S1F/HA; K2/KA comprendían regiones variables de cadena pesada humanas y regiones variables de cadena ligera kappa humanas. Estos ratones son, por tanto, muy útiles para la selección de anticuerpos que tienen regiones variables humanas que se unen específicamente a antígeno humano tras la inmunización de los ratones con tal antígeno. Tras el aislamiento de un anticuerpo de este tipo, el experto en la técnica puede reemplazar las regiones constantes de

ratón por regiones constantes humanas usando técnicas convencionales para llegar a anticuerpos totalmente humanos que son útiles como candidatos de fármaco para su administración a humanos (opcionalmente tras una mutación o adaptación para producir un derivado adicional, por ejemplo, con potenciamiento o inactivación de FC o tras conjugación con una carga tóxica o un indicador o una etiqueta u otro radical activa).

5

Se llevó a cabo un experimento adicional para evaluar los niveles de IgG y IgM y las proporciones relativas en ratones transgénicos de la divulgación que expresan anticuerpos que tienen regiones variables pesadas y ligeras (kappa) humanas (ratones S1F/HA, K2/KA; n=15). Estos se compararon frente a 12 ratones que expresan solo cadenas de anticuerpos de ratón (+/HA, +/KA (n=6) y ratones de tipo silvestre (WT; n=6)). Los resultados se tabulan a continuación (tabla 19) y se muestran en la Figura 14.

Puede verse que los ratones de la divulgación, en los que esencialmente todas las regiones variables de cadena pesada son regiones variables de cadena pesada humanas, expresaban proporciones normales de los subtipos IgM e IgG, y también la IgG total en relación con la IgM era normal.

10

15
Tabla 19:

	IgG1 (μ g/ml)	IgG2a (μ g/ml)	IgG2b (μ g/ml)	IgM (μ g/ml)	IgG + IgM total (μ g/ml)
KMCB22.1a S1F/HA, K2/KA	30,5	38,3	49,9	1,7 224,4	1,8 343,1
KMCB 19.1d S1F/HA, K2/KA	103,6	181,2	85,6	1,9 351,7	1,10 722,1
KMCB 19.1h S1F/HA, K2/KA	191,4	456,6	383,3	1,11 643,2	1,12 1674,6
KMCB 20.1a S1F/HA, K2/KA	53,6	384,4	249,7	1,13 427,1	1,14 1114,7
KMCB 20.1c S1F/HA, K2/KA	87,3	167,0	125,7	1,15 422,1	1,16 802,1
KMCB 20.1f S1F/HA, K2/KA	55,4	177,2	95,6	1,17 295,7	1,18 623,9
KMCB22.1f S1F/HA, K2/KA	61,1	56,3	111,4	1,19 245,8	1,20 474,5
KMCB23.1c S1F/HA, K2/KA	71,4	70,7	80,5	1,21 585,4	1,22 808,0
KMCB23.1d S1F/HA, K2/KA	65,4	148,7	187,4	1,23 255,4	1,24 657,0
KMCB24.1f S1F/HA, K2/KA	60,0	56,6	150,5	1,25 294,8	1,26 561,9
KMCB13.1a S1F/HA, K2/KA	101,2	200,5	269,8	1,27 144,1	1,28 715,7
KMCB13.1d S1F/HA, K2/KA	124,5	117,5	246,6	1,29 183,2	1,30 671,9
KMCB17.1f S1F/HA, K2/KA	58,3	174,2	1,31 116,2	1,32 218,1	1,33 566,8
KMCB14.1a S1F/HA, K2/KA	51,9	46,5	27,9	1,34 222,2	1,35 348,6
KMCB14.1b S1F/HA, K2/KA	11,5	54,2	48,5	1,36 194,4	1,37 308,6
KMCB19.1e +/HA, +/KA	233,0	6,7	465,6	1,38 420,9	1,39 1126,3
KMCB19.1f +/HA, +/KA	154,3	4,6	610,2	1,40 435,7	1,41 1204,8
KMCB19.1l +/HA, +/KA	113,5	1,1	246,8	1,42 374,6	1,43 736,0
KMCB20.1e +/HA, +/KA	561,0	4,3	614,3	1,44 482,1	1,45 1661,7
KMCB13.1e +/HA, +/KA	439,3	17,1	584,1	1,46 196,9	1,47 1237,3
KMCB14.1c +/HA, +/KA	93,4	1,3	112,0	1,48 106,8	1,49 313,6
KMWT 1.3c WT	212,9	155,2	104,6	1,50 233,7	1,51 706,4
KMWT 1.3d WT	297,1	203,2	144,6	1,52 248,6	1,53 893,5
KMWT 1.3e WT	143,1	174,2	619,1	1,54 251,8	1,55 1188,2

	IgG1 (μ g/ml)	IgG2a (μ g/ml)	IgG2b (μ g/ml)	IgM (μ g/ml)	IgG + IgM total (μ g/ml)
KMW1 1.3f WT	218,8	86,8	256,1	1,56 294,8	1,57 856,4
KMW1 1.3b WT	150,2	114,2	114,7	1,58 225,6	1,59 604,7
KMW1 3.1e WT	125,9	335,5	174,6	1,60 248,9	1,61 884,9

Ejemplo 4:

Evaluación de la relación de kappa:lambda y compartimentos de células B esplénicas en ratones transgénicos de la divulgación

Se obtuvieron ratones que comprenden los siguientes genomas.

WT/WT = tipo silvestre;

KA/KA = cada alelo kappa endógeno se ha inactivado; y los loci lambda endógenos se dejan intactos;

K3F/K3F = cada alelo kappa endógeno tiene tres inserciones de ADN de locus de cadena kappa entre los Jk más endógenos 3' y el Ck de ratón, proporcionando la inserción de los segmentos génicos V humanos Vk2-40, Vk1-39, Vk1-33, Vk2-30, Vk2-29, Vk2-28, Vk1-27, Vk2-24, Vk3-20, Vk1-17, Vk1-16, Vk3-15, Vk1-13, Vk1-12, Vk3-11, Vk1-9, Vk1-8, Vk1-6, Vk1-5, Vk5-2 y Vk4-1 y los segmentos génicos J humanos Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5 (los segmentos génicos V humanos estando 5' de los segmentos génicos J humanos); cada VJ kappa endógeno se ha inactivado mediante inversión y movimiento en el sentido de 5' en el cromosoma; y los loci lambda endógenos se dejan intactos;

L2/L2 = tal como se describe en Ejemplo 2 (homocigotos L2 en los que se ha insertado un ADN de región variable lambda humano en los loci lambda endógenos; los loci kappa endógeno se dejan intactos);

L2/L2;KA/KA = como L2/L2, pero los alelos kappa endógenos se han inactivado (mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena=KA);

L3/L3;KA/KA = como L2/L2;KA/KA, pero complementado con una tercera inserción de ADN de región variable lambda humana 5' de la segunda inserción de ADN lambda en los loci lambda endógenos de modo que los siguientes segmentos génicos lambda humanos se insertan entre el Jλ más endógeno 3' y el Cλ de ratón: los segmentos génicos V humanos Vλ3-27, Vλ3-25, Vλ2-23, Vλ3-22, Vλ3-21, Vλ3-19, Vλ2-18, Vλ3-16, Vλ2-14, Vλ3-12, Vλ2-11, Vλ3-10, Vλ3-9, Vλ28, Vλ4-3 y Vλ3-1, los segmentos génicos J y C humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6 y Jλ7-Cλ7 (también se incluyeron los segmentos no funcionales Jλ4-Cλ4, Jλ5-Cλ5), proporcionando así una inserción correspondiente a las coordenadas 22886217 a 23327884 del cromosoma 22 humano insertadas inmediatamente tras la posición 19047551 en el cromosoma 16 de ratón;

S3F/HA;KA/KA;L3/L3 = el primer alelo de cadena pesada endógeno tiene tres inserciones de ADN de región variable de cadena pesada humano entre el JH más endógeno 3' y el Eμ, proporcionando la inserción de los segmentos génicos humanos V_H2-26, V_H1-24, V_H3-23, V_H3-21, V_H3-20, V_H1-18, V_H3-15, V_H3-13, V_H3-11, V_H3-9, V_H1-8, V_H3-7, V_H2-5, V_H7-4-1, V_H4-4, V_H1-3, V_H1-2, V_H6-1, D1-1, D2-2, D3-9, D3-10, D4-11, D5-12, D6-13, D1-14, D2-15, D3-16,

D4-17, D5-18, D6-19, D1-20, D2-21, D3-22, D4-23, D5-24, D6-25, D1-26, D7-27, JH1, JH2, JH3, JH4, JH5 y JH6 (en el : segmentos génicos V humanos, segmentos génicos D humanos y segmentos génicos J humanos); la secuencia VDJ de cadena pesada endógena se ha inactivado mediante inversión y movimiento en el sentido de 5' en el cromosoma; y los loci lambda endógenos se dejan intactos; el segundo alelo de cadena pesada endógeno se ha inactivado mediante la inserción de una secuencia de interrupción endógena = HA); los alelos kappa endógenos se han inactivado (=KA/KA); y los alelos lambda endógenos se han modificado mediante la inserción de ADN de región variable lambda humano (=L3/L3);

P2/WT = alelo P2 (ADN de región variable lambda humano tal como se describe en el ejemplo 1) en un locus kappa endógeno; el otro locus kappa endógeno se deja intacto; ambos loci lambda endógenos se dejan intactos;

P2/P2 = véase el ejemplo 14; ambos loci lambda endógenos se dejan intactos;

P2/K2 = alelo P2 en un locus kappa endógeno; teniendo el otro locus kappa endógeno dos inserciones de ADN entre el Jk más endógeno 3' y el Ck de ratón, proporcionando la inserción de los segmentos génicos V humanos Vk2-24, Vk3-20, Vk1-17, Vk1-16, Vk3-15, Vk1-13, Vk1-12, Vk3-11, Vk1-9, Vk1-8, Vk1-6, Vk5-2 y Vk4-1 y los segmentos génicos J humanos Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5 (los segmentos génicos V humanos estando 5' de los segmentos génicos J humanos); ambos loci lambda endógenos se dejan intactos;

P3/K3F = como un locus kappa endógeno que tiene una inserción entre los siguientes segmentos génicos lambda humanos se insertan entre el Jk más endógeno 3' y el Ck de ratón, proporcionando la inserción de los segmentos

génicos V humanos Vλ3-27, Vλ3-25, Vλ2-23, Vλ322, Vλ3-21, Vλ3-19, Vλ2-18, Vλ3-16, Vλ2-14, Vλ3-12, Vλ2-11, Vλ3-10, Vλ3-9, Vλ2-8, Vλ4-3 y Vλ3-1, los segmentos génicos J y C humanos Jλ1-Cλ1, Jλ2-Cλ2, Jλ3-Cλ3, Jλ6-Cλ6 y Jλ7-Cλ7 (también se incluyeron los segmentos no funcionales Jλ4-Cλ4, Jλ5-Cλ5), proporcionando así una inserción correspondiente a las coordenadas 22886217 a 23327884 del cromosoma 22 humano insertado inmediatamente tras la posición 70674755 en cromosoma 6 de ratón; teniendo el otro locus kappa endógeno el alelo K3F descrito anteriormente (segmentos génicos kappa V y J humanos insertados); ambos loci lambda endógenos se dejan intactos;

5 P2/P2; L2/WT = Como P2/P2 pero en el que un locus lambda endógeno tiene el alelo L2 (segmentos génicos V y J humanos insertados) y el otro locus lambda endógeno es de tipo silvestre; y

10 P2/P2; L2/L2 = homocigótico para alelos P2 y L2 en loci kappa y lambda endógenos respectivamente.

15 Se llevó a cabo un análisis FACS de células B esplénicas (tal como se describió anteriormente) y se determinaron proporciones de expresión de cadena ligera. También determinamos las proporciones de T1, T2 y células B esplénicas maduras (M) y las comparamos con ratones de tipo silvestre, con el fin de evaluar si obtuvimos comportamientos de células B esplénicas normal en los ratones transgénicos o no. Los resultados se muestran en las tablas 20 y 21. También evaluamos la proporción de células positivas B220 como indicación de la proporción de células B en las muestras de células esplénicas.

20

Tabla 20: Comparaciones con ratones con insertos de región variable lambda humana en Locus lambda

Genotipo	B220	Porcentaje de IGL				Comparamiento de células B esplénicas			
		ml.GK	1.63	ml.GA	1.64	ml.GA	T1	1.68	1.65
WT/WT (n=2)	20%	90%	3.80	1.65	1.69	0%	1.70	3.3%	1.67
KAKA (n=2)	13.60%	0.22%	68.50%	1.69	0%				
K3F/K3F (n=2)	20%	83%	7%	1.73		1.74	16%	1.75	15.50%
L2L2 (n=2)	17.30%	91.60%	1.60%	1.77	6.50%	1.78	21.50%	1.79	10%
L2L2KA/KA (n=1)	9.10%	0%	5%	1.81	93%	1.82	28%	1.83	7%
L3L3KA/KA (n=2)	16.30%	0.10%	4.50%	1.85	93.20%	1.86	37.40%	1.87	13.10%
S3F/KAKAK; L3L3 (n=1)	19%	0.20%	3.80%	1.89	98%	1.90	15.50%	1.91	19%

Tabla 21: Ratones con inserciones de región variable lambda humana en locus kappa endógeno

Genotipo	8220	Porcentaje de IGL			Compartimento de células B espécificas			
		1.93 ml/GK	1.94 ml/GK	1.95 ml/GK	T1	T2	M	
P2WT (n=2)	N.D.	90%	4.20%	6.55%	1.97	17.30%	1.98	8.90%
P2P2 (n=2)	14.80%	0.20%	15%	1.100	76%	1.101	27.50%	1.102 12%
P2K2 (n=2)	18.20%	78.80%	7.90%	1.104	15.60%	1.105	19.50%	1.106 12%
P3K3F (n=2)	18.40%	64.80%	11.80%	1.108	19.40%	1.109	11.80%	1.110 18.40%
P2P2; L2WT (n=2)	20.40%	0.05%	8.50%	1.112	94%	1.113	13.10%	1.114 16.10%
P2P2; L2L2 (n=2)	12.70%	0.07%	5.10%	1.116	95.40%	1.117	13.40%	1.118 13.80%

Conclusiones

- Como se demuestra mediante L2/L2;KA/KA y L3/L3;KA/KA, las inserciones de ADN de región variable lambda humano en el locus lambda endógeno (con una inactivación kappa endógena) presentaban una expresión predominante de cadenas ligeras que portan regiones variables lambda humanas (indicado mediante la expresión de cadenas C λ -positivas a alrededor del 93%). Esto se produce sorprendentemente aunque está todavía presente ADN de región variable lambda de ratón endógeno, indicando que el ADN de región variable lambda humano insertado puede superar la reorganización de Ig λ endógeno.
- Además, los ratones que tienen los segmentos génicos V y J humanos presentes en la inserción L3 homocigótica producen células B (células positivas B220) a una proporción que es similar al tipo silvestre y adicionalmente producen una proporción o un porcentaje normal de células B esplénicas maduras (es decir, similar al tipo silvestre). Esto se confirma no solo mediante los ratones L3/L3;KA/KA, sino que se observó también para S3F/H;KA/KA;L3/L3, que comprende también un locus IgH (humano-ratón) quimérico.
- Además, observamos que los ratones que tienen los segmentos génicos V y J humanos presentes en la inserción K3F homocigótica producen células B (células positivas B220) en una proporción que es similar al tipo silvestre y adicionalmente producen una proporción o un porcentaje normal de células B esplénicas maduras (es decir, similar al tipo silvestre).
- Los ratones que tienen los segmentos génicos V y J humanos presentes en la inserción P2 homocigótica en el locus kappa endógeno mostraron una alta expresión de cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda humanas (tal como se indica mediante una proporción observada del 76%). Podríamos sesgar a un porcentaje global incluso mayor combinando la inserción de segmentos génicos V y J lambda humanos en ambos loci kappa y lambda endógenos (véase P2/P2; L2/WT a alrededor del 94% y P2/P2; L2/L2 a alrededor del 95%). Además, los ratones que comprenden la disposición de segmentos génicos V y J humanos de P2/P2; L2/L2 producen una proporción o un porcentaje normal de células B esplénicas maduras (es decir, similar al tipo silvestre).
- Cuando se insertaron segmentos génicos V y J lambda humanos en un locus kappa endógeno y el otro locus kappa endógeno comprendía una inserción de segmentos génicos V y J kappa humanos, obtuvimos ratones que podrían expresar cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda y también cadenas ligeras que comprenden regiones variables kappa. Sorprendentemente se observó que podíamos aumentar la proporción de cadenas ligeras que comprenden regiones variables lambda por encima de lo visto en un ratón de tipo silvestre en el que solo el 5% o menos de cadenas ligeras comprenden normalmente regiones variables lambda. Observamos una proporción de alrededor del 22% para el genotipo P2/K2 y alrededor del 31% para el genotipo P3/K3F. La proporción observada con el último genotipo se aproxima a la vista en un humano en el que normalmente alrededor del 60% de las cadenas ligeras comprenden regiones variables kappa y alrededor del 40% de las cadenas ligeras comprenden regiones variables lambda. También en los casos P2/K2 y P3/K3F, los ratones produjeron una proporción de células B normal en comparación con ratones de tipo silvestre. Además, los ratones que comprenden la disposición de segmentos génicos V y J humanos de P3/K3F produce una proporción o un porcentaje normal de células B esplénicas maduras (es decir, similar al tipo silvestre).

Ejemplo 5:

- Se generaron ratones que comprendían los alelos IgH específicos listados en la tabla 3; y los alelos IgL específicos listados en las tablas 10 u 11. Los ratones se inmunizaron con antígenos diana y se aislaron anticuerpos específicos de antígeno. Los anticuerpos se evaluaron para la especificidad de unión, maduración (es decir, el grado de mutación de unión y somática frente a secuencias de segmento genético de línea germinal) y cinética de unión. También se obtuvieron células B correspondientes y en algunos casos se produjeron hibridomas que expresan los anticuerpos seleccionados.

Los anticuerpos seleccionados se resumen en la tabla 22. La cinética de unión de algunos de estos se determinó tal como sigue.

55 Determinación de la cinética de unión

- Se creó una superficie de captura de IgG anti-ratón en un chip GLM Biosensor™ mediante acoplamiento de amina primaria usando IgG anti-ratón de GE Healthcare (BR-1008-38). Los anticuerpos de prueba tal como se exponen en la tabla 22 se capturaron en esta superficie y el respectivo antígeno se hizo pasar sobre el Ab capturado a las concentraciones indicadas. Se usó una inyección de tampón (es decir 0 nM de antígeno) para una referencia doble de las curvas de unión, y los datos se ajustaron al modelo 1:1 inherente al software de análisis ProteOn XPR36™. La regeneración de la superficie de captura se llevó a cabo usando glicina 10 mM, pH 1,7. El ensayo se ejecutó a 25°C y usando HBS-EP como tampón de ejecución.

- 65 Diana 1: una proteína humana de múltiples subunidades

Diana 2: una citotoxina bacteriana

Diana 3: una proteína humana de múltiples subunidades diferente

5 Diana 4: una proteína expresada como proteína transmembrana en células humanas

Diana 1 Acm1.1

Concentración individual de DIANA 1 (256 nM), captura anti-ratón

10 ka kd KD

3,85E+05 3,22E-05 83 pM

15 (Afinidad aparente desde la diana de múltiples subunidades)

Diana 2 Acm2.1

DIANA 2 a 256, 64, 16, 4 y 1 nM; resultados de 3 experimentos:-

20 Experimento 1:

ka kd KD

25 1,40E+04 1,83E-05 1,300 nM

Experimento 2:

ka kd KD

30 2,76E+04 3,23E-05 1,170

Experimento 3:

35 No pudo resolverse la constante de disociación - lo que indica una unión extremadamente estrecha más allá de límites detectables.

Diana 3 Acm3.1

40 DIANA 3 a 256, 64, 16, 4 y 1 nM

ka kd KD

45 4,00E+05 2,34E-04 0,59 nM

(Afinidad aparente desde la diana de múltiples unidades)

Diana 3 Acm3.2

50 DIANA 3 a 256, 64, 16, 4 y 1 nM

ka kd KD

55 3,86E+05 2,57E-04 0,67

(Afinidad aparente desde la diana de múltiples unidades)

Diana 3 Acm3.3

60 DIANA 3 a 256, 64, 16, 4 y 1 nM

ka kd KD

65 Incapaz de resolver la constante de disociación, unión extremadamente estrecha

(Afinidad aparente desde la diana de múltiples unidades)

En conclusión, la presente invención proporciona anticuerpos madurados por afinidad *in vivo* con dominios variables humanos que pueden expresarse en sistemas *in vivo*, y que se unen específicamente a antígenos diana con afinidades, constantes de asociación y de disociación muy buenas. Por tanto, la invención proporciona anticuerpos que son útiles para la medicina humana, así como vertebrados no humanos, células (por ejemplo, células B e hibridomas) para producir tales anticuerpos.

5

Ejemplo 6:

- 10 Las líneas S (pesada), K (kappa en locus kappa), L (lambda en locus lambda) y P (lambda en locus kappa) usadas para generar los datos en los ejemplos usaron los alelos de las tablas 1 a 18 y demostraron que tales colecciones de alelos pueden producir los resultados sorprendentes mostrados (por ejemplo, buenos compartimentos de células B, expresión de región V lambda humana alta, relación de lambda:kappa deseable en un ratón y repertorio normal de isótipos IgH). Los anticuerpos aislados se basaban todos en los alelos listados en la tabla 1 a 18 anteriores. Todos
- 15 tenían dominios V con mutación de patrón AID y TdT de ratón.

ES 2 993 142 T3

Tabla 22

ES 2 993 142 T3

DANA
2.

ES 2 993 142 T3

Secuencias	DIAMÁ				Mutaciones AA ₁	Mutaciones AA ₂	Mutaciones kAA ₂
	Bcell	Tech	V	D			
IGHV4 3- Acn 3.3 -4*02 10*01 *02	IGHD IGHV3 3-	IGHJ6 IGHV4 3-	1,158 IGK V1	1,158 IGK D-	1,158 IGK 13* J4*	1,158 IGK 1,160 3	1,161 3
			1,156 2	1,157 7	d01	1,160 3	1,161 3
	DIAMÁ						
t:							
id	v	d	j		1,162 linea no germinal AA	1,163 Mutaciones AA ₂	1,164 linea no germinal AA ₁
IGHD IGHV3 3-	IGHV4 3-	IGHJ6 IGHV4 3-	1,171 IGK 1,170 IGK J4*				
Acn 1.3 -13*01 10*01 *02		1,166 5	1,169 0	V3-	1,172 0	1,173 0	

ES 2 993 142 T3

20*
01

DIANA 3.

ID	v	d	j	Linea no germinal AA ₁	Linea no germinal AA ₂	Mutaciones		Linea no germinal k AA ₁	Mutaciones kAA ₂
						5,179	5,176		
52	IGHV3	3-	IGHJ6					1,182	IGK
	IGHV3	3-	IGHJ6					V1-	1,183 IGK
	AcM3.4	-23*04	22*01	*02	1,180 9	1,181 8	01	17*	J4*
	AcM3.5	-23*04	22*01	*02	1,183 10	1,187 5	01	1	1,184 1
	AcM3.6	-7*01	3-9*01	*02	1,192 6	1,193 2	01	1,188 IGK	1,185 1
	IGHV3	IGHD	IGHJ6					V1-	1,189 IGK
	AcM3.7	-23*04	22*01	*02	1,183 10	1,187 5	01	17*	J4*
	AcM3.8	-7*01	3-9*01	*02	1,192 6	1,193 2	01	1,194 IGK	1,195 IGK
								V1	J4*
								D-	1,196 2
									1,197 3

ES 2 993 142 T3

ES 2 993 142 T3

id	γ	δ	ε	γγ	linea no germinal AA ¹	linea no germinal AA ²	Mutaciones		linea no germinal AA ¹	linea no germinal AA ²	Mutaciones AA ²
							AA ¹	AA ²			
IGHV4	IGH40	IGH46							1,224	IGK	
Alm 4.1	-4'02	3'-01	*02	1,222	7				01	D ₁	1,225
									16*	J4*	
									01	1	1,226
									1	1	1,227
IGHV3									1,230	IGK	
	IGH40								V1-	1,231	IGK
	-3'-00	3-	IGH46						8*4	J4*	
Alm 4.2	1	10'01	*02	1,228	8				01	1	1,232
									1	1	1,233

Todos los
segmentos
génicos son
numerados

¹Linea no germinal AA: número de segmentos de linea no germinal intercalados en unicos VH-D o D-H o en unicos V-L-J.

²Mutaciones AA: número de mutaciones AA en la región V y J (región CDRH3 O CDRL3 excluida)

Secuencias para ejemplos de segmentos génicos según la invención se exponen a continuación.

IGLC7*01

```
ggtcagcccaaggctccccctcggtcactctgtcccaccctctgaggagctcaa
gccaacaaggccacactggtgtctcgtaagtgacttctacccggagccgtgacagtg
gcctggaaggcagatggcagccccgtcaagggtggagtgagaccaccaaaccctccaaa
caaagcaacaacaagtatcgccggcagcagctacctgagcctgacgcccggcagcagtggaa
tcccacagaagctacagctgccgggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtg
gcccctgcagaatgtct
```

IGLJ7*01

```
tgcgtgtcgaggaggcaccagctgaccgtcctcg
```

IGLC6*01

```
ggtcagcccaaggctccccatcggtcactctgtcccgcctctgaggagctcaa
gccaacaaggccacactggtgtgcctgatcagtgacttctacccggagctgtgaaagtg
gcctggaaggcagatggcagccccgtcaacacgggagtggagaccacacccctccaaa
cagagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgacgcctgagcagtggaa
tcccacagaagctacagctgccaggcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtg
gcccctgcagaatgtca
```

IGLC6*04

```
gtcagcccaaggctccccatcggtcactctgtcccgcctctgaggagctcaag
ccaacaaggccacactggtgtgcctgatcagtgacttctacccggagctgtgaaagtgg
cctggaaggcagatggcagccccgtcaacacgggagtggagaccacacccctccaaac
agagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgacgcctgagcagtgg
aagtcccacagaagctacagttgccaggcacgcatgaagggagcaccgtggagaagaca
gtggccctgcagaatgtct
```

IGLJ6*01

```
taatgtgtcgccagtggcaccaagggtgaccgtcctcg
```

IGLC3*03

```
ggtcagcccaaggctccccctcggtcactctgtcccaccctctgaggagctcaa
gccaacaaggccacactggtgtctcataagtgacttctacccggagccgtgacagtg
gcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcggtggagaccacacccctccaaa
caaagcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgacgcctgagcagtggaa
tcccacaaaagctacagctgccaggcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtg
gcccctacagaatgtca
```

IGLJ3*02

```
ttgggtgtcgccggaggcaccaaggctgaccgtcctcg
```

IGLC2*02

ggtcagcccaaggctccccctcggtcactctgttccgcccctctgaggagctcaa
 gccaacaaggccacactggtgtctcataagtgacttctaccggagccgtacagtg
 gccttggaaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaa
 caaagcaacaacaagaatgcggccagcagctatctgagcctgacgcctgagcagtggaaag
 tcccacagaagctacagctgccaggcacgcataagggagcaccgtggagaagacagtg
 gcccctacagaatgttca

IGLJ2*01

tgtggtaatcgccggagggaccaagctgaccgtccat

IGLC1*02

ggtcagcccaaggccaaccccactgtcactctgttccgcccctctgaggagctccaa
 gccaacaaggccacactagtgtgtcatcagtgacttctaccggagctgtacagtg
 gccttggaaaggcagatggcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccacaccctccaaa
 cagagcaacaacaagaatgcggccagcagctacctgagcctgacgcggcagcagtggaaag
 tcccacagaagctacagctgccaggcacgcataagggagcaccgtggagaagacagtg
 gcccctacagaatgttca

IGLJ1*01

ttatgtcttcggaaactgggaccaaggtcaccgtccat

IGLV3-1*01

gatccgtggcccttatgagctgactcagccaccctcagtgtccgtgtcccccaggacagacagccagc
 atcacctgctggagataaaattggggataaatatgcttgctggatcagcagaagcca
 ggccagtccctgtgtcatctataagatgcaagtagcagccctcaggatccctgag
 cgattctctggctccaactctggaaacacagccactctgaccatcagcgggaccaggct
 atggatgaggctgactattactgtcaggcgtggacagcagcactgca

IGLV4-3*01

ctgcctgtctgactcagccccgtctgcatctgccttgcggagcctcgatcaagctcacc
 tgcaccctaagcagtgagcacagcacctacaccatcgaatggatcaacagagaccagg
 aggtccccccagtatataatgaaggtaagagtgtatggcagccacagcaagggggacgg
 atccccgatcgcttcatggctccagttctgggctgaccgtacccatctccaaac
 ctccagtctgacgatgaggctgagttactgtggagagagccacacgattgtggccaa
 gtcggttggc

IGLV2-8*01

cagtctgcctgactcagcccccgtccgtccgggtctctggacagtcaagtcaccatctctgcactgga
 accagcagtgacgtgggtataactatgtctctggatccaacagcaccaggcaaa
 gcccccaactcatgattatgaggtcagtaagcggccctcagggtccctgatcgcttc
 tctggctccaagtctggcaacacggccctccgtaccgtctctgggtccaggctgaggat
 gaggctgattattactgcagctcatatgcaggcagcaacaatttc

IGLV3-9*01

tcctatgagctgactcagccacttcgtcagtgtcaggccctgggacagacggccaggattacc
 tgtggggaaacaacatttgaagtaaaaatgtcacttgttaccagcagaagccaggccag
 gccccctgtgtggcatctataggatagcaaccggcccttggatccctgagcgattc
 tctggctccaactcgggaaacacggccaccctgaccatcagcagagccaaagccgggat
 gaggctgactattactgtcagggtgtggacagcgcactgca

IGLV3-10*01

tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgtcccccaggacaaacggccaggatcacc
 tgctctggagatgcattgaaaaaaaatgtcttttgttaccagcagaagtgcaggccag
 gccccctgtgtggcatctatgaggacagcaaacgaccctccggatccctgagagattc
 tctggctccagctcagggacaatggccacccgtactatcagtggggcccagggtggagat
 gaagctgactactactgttactcaacagacagcagtgtaatcatag

IGLV2-11*01

cagtctccctgactcagccctcgctcagtgtccgggtctcctggacagtcaagtaccatctcc
 tgcactgaaaccaggcagtgtatgtgggtataactatgtctcctggatccaacagcac
 ccaggcaaagccccaaactcatgatattatgtcagtaaggccctcagggtccct
 gatcgcttctggctccaagtctggcaacacggccctgaccatctctggctccag
 gctgaggataggctgattattactgtcgtcatatgcaggcagctacactttc

IGLV3-12*02

tcctatgagctgactcagccacactcagtgtcagtggccacagcacagatggccaggatcacc
 tgtggggaaacaacatttgaagtaaaggctgtcacttgttaccagcaaaagccaggccag
 gaccctgtgtggcatctatagcgatagcaaccggccctcagggtccctgagcgattc
 tctggctccaacccaggaaacaccggccaccctaaccatcagcaggatcgaggctgggat
 gaggctgactattactgtcagggtgtggacagtagtagtgtatcc

IGLV2-14*01

cagtctccctgactcagccctcgctccgtgtctgggtctcctggacagtcaagtaccatctcc
 tgcactgaaaccaggcagtgtatgtgggtataactatgtctcctggatccaacagcac
 ccaggcaaagccccaaactcatgatattatgtggcagtaatggccctcagggtttct
 aatcgcttctggctccaagtctggcaacacggccctgaccatctctggctccag
 gctgaggacgaggctgattattactgcagctatataaggcagcagcacttc

IGLV3-16*01

tcctatgagctgacacagccaccctcggtgtcagtgtcccttaggacagatggccaggatcacc
 tgctctggagaaggcattgaaaaaaaatgtcttttgttaccagcagaagccaggccag
 ttccctgtgtggatataaaggacagcgagaggccctcagggtccctgagcgattc
 tctggctccagctcagggacaatagtacattgaccatcagtggagttccaggcagaagac
 gaggctgactattactgtctatcagcagacagcagtggtacttatcc

IGLV2-18*01

cagtctgccctgactcagccctccgtgtccgggttcctggacagtca
tcactggaaaccaggcagtgcgttgttagttataaccgtgttcctggtacc
ccaggcacagccccaaactcatgatattgaggctcagaatcgccctcagg
gtcgcttcgggtccaagtctggcaacacggccctgaccatctctggctcc
gctgaggacgaggctgattattactgcagttatataaaggcaggcacttc

IGLV3-19*01

tcttctgagctgactcaggaccctgctgtgtggcctggacagacagtca
tgccaaggagacagcctcagaagctattatgcaagctggtaccaggcaga
gcccctgtacttgtcatctatggtaaaaacaaccggccctcaggatccc
tctggctccagctcaggaaacacagcttcctgaccatcactgggctcagg
gaggctgactattactgttaactccggacagcagtcgtgtaaccatct

IGLV3-21*01

tcctatgtgctgactcagccaccctcagtgtcagtggccccaggaaa
tgtggggaaacaacattggaaagtaaaagtgtgcactggtaccaggc
gcccctgtgtggcatctattatgatagcgaccggccctcaggatcc
tctggctccaactctggAACACGGCCACCCtgc
gaggccgactattactgtcagggtgtggacagtc
gaggatgtatcc

IGLV3-21*d01

tcctatgtgctgactcagccaccctcagtgtcagtggccccaggaaa
tgtggggaaacaacattggaaagtaaaagtgtgcactggtaccaggc
gcccctgtgtggcatctattatgatagcgaccggccctcaggatcc
tctggctccaactctggAACACGGCCACCCtgc
gaggccgactattactgtcagggtgtggatagtc
gaggatgtatcc

IGLV3-22*d01

tcctatgagctgacacagctaccctcggtgtcagtgtccccagg
tgctctggagatgtactggggaaaaattatgctgactggtaccagg
gtctgatatacgagttggatatacgaagatagtgc
gattctctgggtccacccctcaggAACACGGCCACCCtgc
aagacgaggctgactattactgtttgtggaaatgaggacaatcc

IGLV3-22*01

tcctatgagctgacacagctaccctcggtgtcagtgtccccagg
tgctctggagatgtactggggaaaaattatgctgactggtaccagg
gcccctgagttggatatacgaagatagtgc
tctgggtccacccctcaggAACACGGCCACCCtgc
gaggctgactattactgtttgtggaaatgaggacaatcc

IGLV2-23*d02

cagtctgccctgactcagccctccgtgtgggttcctgg
acagtgc
atcaccatctcc

tgcactggasccaggcagtgsigtgggtataactatgtctccgttaccacac
 ccaggcaaagccccaaactcatgatttatgtatgtcagtaaggcgccctcaggggttct
 aatcgctctctggctccaaggctggcaaacacggccctgacaatctctggctccag
 gctgaggacgaggctgattattactgtgtcatatgcaggtagtagcacttc

IGLV2-23*02

cagtctgccctgactcagccigccctgggtctggacagtcgtatccatctcc
 tgcaactggaaeccaggcagtgttgtggaggtataaccttgtctctggtacccaacaggcac
 ccaggcaaagccccaaactcatgatttatgaggctcagtaaggccctcaggggttct
 aatcgctctctggctccaaggctggcaaacacggccctgacaatctctggctccag
 gctgaggacgaggctgattattactgtgtcatatgcaggtagtagcacttc

IGLV3-25*d03

tccatgagctgacacagccacccctggtgtcagtgcc
 ccaggacagacggccaggatcacctgtctgcagatgcattggccaaagcaatatgtttat
 tggtaccagcagaagccaggccaggccccctgtgtgttatataaaagacagttagagg
 ccctcagggatccctgagcgattctctggctccagctcaggacaacagtcacgltgacc
 atcagtggaggtccaggcagaagacgaggctgactattactgtcaatcagcagacagcagt
 ggtacttatcc

IGLV3-25*01

tccatgagctgatgcagccacccctgggtgtcagtgcc
 ccaggacagacggccaggatcacctgtctggagatgcattggccaaagcaatatgtttat
 tggtaccagcagaagccaggccaggccccctgtgtgttatataaaagacagttagagg
 ccctcagggatccctgagcgattctctggctccagctcaggacaacagtcacgltgacc
 atcagtggaggtccaggcagaagatgaggctgactattactgtcaatcagcagacagcagt
 ggtacttatcc

IGLV3-27*01

tccatgagctgacacagccatccctcaigtgtcagtgctccggacagacagccaggatcacc
 tgctcaggagatgtactgtcaaaaaaaaaatgtctgggtttccagcagaaggccaggccag
 gccccctgtgtgttatataaaagacagttagcgccctcaggatccctgagcgatic
 tcggctccagctcaggaccacagtcacccgtaccatcagggggcccagggtttaggat
 gaggtgactattactgttactctgtgtgtgacaacaatct

IGLV1-36*01 | Homo sapiens

cagtctgtgtgactcagccacccctgggtgtcaaggccccaggcagagggttaccatct
 cctgtctggaaaggcagctccaaacatcgaaataatgtgtaaactggtaccagcagctcc
 aggaasggctccaaactctcatctattatgtatgtatctgtgtccctcaggggtctctgac
 cgattctctggctccaaggctggcacctcagccctggccatcagtggttccagtcg
 aggatgaggctgattattactgtgtcagcatggatgacaggccctgaatggtcc

IGLV5-37*01 | Homo sapiens

cagccgttgtactcggccacccttccctccggcatctccgtggagaatccggccaggactca
ccgtcacccctggcccgatgtacatcaatgtttggtagctacaacatatactggtaccaggcagaa
gccagggagcccccccggtatctccgtactactactcagactcagataagggccagggc
tcgtggagtccccagccgttctctggatccaaaggatgtctcagccaaatacagggttttac
tcatctccgggtcccgatgtggggatggggcgtactattactgtatgtttggccaaaggcaa
tgctct

IGLV5-39*01 | Homo sapiens

cagccctgtgcgtgactcagccaaccctcccttcagcacltcggaggcatcagccagattca
octgcacctgtcgtagtggcatcaatgtttggtacccatcaggatatacttgttaccaggcagaa
gccaggaggatctccccggtatctccgtgaggtacaaaatcagactcagataagcagcaggcc
tctggagtccccagccgttctctggatccaaagatgcgttcaaccatgcaggcctttac
tcatctctgggtccagtcgtgaagatgaggctgactattactgtgccatttggtaacagcag
cacitct

IGLV1-40*01 | *Homo sapiens*

cagtctgtgcgtacgcagccgcocgtcagtgctggggcccccaggcagggcagegggtcaccaatct
ccgtcactgggaggcagctccaacatcgccccagggttatgtatgtacactgttaccaggcagct
tcaggaaacagcccccaaaactccatctatggtaacagcaatcgccctcagggtccct
gaccgtttctctgggtccaagtcggcaactcagccctggccatcaactgggtccagg
ctggggatggggctgtattatctgtccaggctatgtacacgcagccgtacgttgttc

>|IGLV7-43'01|*Homo sapiens*

cagactgtggtgactcaggagocctcactgtactgtccccaggagggacagtcaacttca
cctgtcttcaggcactggagcagtccaccgtgttactatccaaaciggttccagcaga
acctggacaaggcaccaggcactgtttatagtacaaggcaacaaacactccggaccc
gccccgttctcaggctccctcttggggcaaaactgtgcctgacactgtcagggtgcagc
ctgaggacqaggctgtactattactucctqctactatgttgttgcacq

>|GLV1-44*01|Homo sapiens

cagtcgtgtactcgccaccctcagcgtggaccccgcccggcagagggtcaccatct
cttgtctggasgcagctccaacatcgaaagttaactgttaactgttacccagcgtcccc
aggAACGGGCTCCAAACTCCATCTATACTAATCAGCGGCCCTCAAGGGTCCCTGAC
cgattctctggctccaagtcgtggcacccctcagccctccctggccatcagtgggcctccagtcg
aggatgaggctgattttactgtgtcagcatggatgacagcctgaatggtc

|IGLV5-45*03| *Homo sapiens*

ggccaccctccaaactcctatcctacaggaataacaaccggccctcaggatctcagag
 agattctctgcatccaggcaggaaacacagcctccctgaccattactggactccgcct
 gaggacgaggcgtgactattactgctcagcattggacagcgcctcagtgc
 >|IGLV6-57*01
 aattttatgctgactcagccccactctgtgtcgagtcctccgggaagacggtaaccatctcc
 tgccacccgcagcagtgccagcattgccagcaactatgtgcagtggtaccagcagcgc
 ggcagttcccccaccactgtatgaggataaccaaagacccctctgggtccctgat
 cggttctctggctccatcgacagctcccaactctgcctccctcaccatctggactg
 aagactgaggacgaggcgtactactgtcagtcttatgatagcagcaatca
 >|IGLV4-60*d03
 cagccgtgtgactcaatcatccctgcctgtgtccctggatccctggtca
 agctcacctgcactctgagcagtgccacagtagtacatcatcgcatggcatcagc
 agccagggaaaggcccctcggtactgtatgagaagctgaaggtagtggaaagctacaacaagg
 ggagcggagttcctgatcgctctcaggctccagctgtggctgaccgtacccatcca
 tctccaacctccagtcgaggatgaggctgattattactgtgagacctggacagtaaca
 ctca
 >other|IGLV4-60*03
 cagccgtgtgactcaatcatccctgcctgtgtccctggatccctggtca
 agctcacctgcactctgagcagtgccacagtagtacatcatcgcatggcatcagc
 agccagggaaaggcccctcggtactgtatgagaagctgaaggtagtggaaagctacaacaagg
 ggagcggagttcctgatcgctctcaggctccagctgtggctgaccgtacccatcca
 tctccaacctccagtcgaggatgaggctgattattactgtgagacctggacagtaaca
 ct
 >|IGLV8-61*01
 cagactgtggtgacccaggagccatcggtctcagtgccctggagggacagtcacactca
 tgtggcttgagctctggctcagtcgtacttagttactaccccgactggtagcc
 ccaggccaggctccacgcacgctcatctacagcacaaacactcgcttctgggtcc
 gatcgctctctggctccatccctggaaacaaagctccctcaccatcacggggcc
 gcagatgatgataatctgattattactgtgtatatggtagtggcatttc
 >|IGLV4-69*01
 cagctgtgtgactcaatccctgcctgcctccctggagccctggtaagctc
 acctgcactctgagcagtgccacagcagctacgcacatcgcatggcatcagc
 gagaaggccctcggtactgtatgaaagcttacagtgatggcagccacagca
 gggatccctgatcgcttcaggctccagctgtggctgagcgtacccatctcc
 agccctccagtcgaggatgaggctgactattactgtcagacccctggcactgg
 >|IGHV3-20*d01
 gaggtgcagtggtggagtctggggagggtgtgtacggccctgggggtcc
 tggagactctcc

tgtcagccctggattcacittgatgattatggcatgagctgggtccccaagctcca
 ggaaaggggctggagtgggtctggattaaatggatggtagcacaggatcgca
 gactctgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaactcccttatctg
 caaatgaacagtctgagagccgaggacacggcctgttattactgtgcgagaga
 >IGHV1-24*d01
 caggtccagctggatcagtctgggctgaggtgaagaaggctgggcctcagtaaggctcc
 tgcaagggttcggatacaccctcactgaattatccatgcactgggtgcacaggctct
 ggaaaaggcgtgagtgatggaggtttgatcctgaagatggtaaaacatctacgca
 cagaagtccaggcagagtaccatgaccgaggacacatctacagacacacgcctacatg
 gacctgagcagcctgagatctgaggacacggccgttattactgtgcacacaga
 >IGHV2-26*d01
 caggtcacctgaaggagtctggctgtctggtaaaacccacagagaccctcacgctgacc
 tgcaccgtctctgggtctcactcagcaatgtctggatccatcag
 cccccagggaaaggccctggagtggctgcacacattttgcataatgcgaaaaatcctac
 agcacatctgaagagcaggctaccatctcaaggacacccatccaaaagccagggtggc
 cttaccatgaccaatatggaccctgtggacacagccacatattactgtgcacggatac
 >IGKV5-2*d01
 gaaacgacactcacgcagtctccagcattcatgtcagcgactccaggagacaaagtcaac
 atctcctgcaaagccagccaagacattgtatgtatgtatgcactggatccaacagaaacca
 ggagaagctgctatttcattattcaagaagctactactctcggttgcataatctcacct
 cgattcagtggcagcgggtatggacacagatttaccctcacaattaataacatagaatct
 gaggatgctgcatattacttctgtctacaacatgataatccctct
 >IGKV1-9*d01
 gacatccagttgacccagtctccatcctccgtctgcattgttaggagacaga
 gtcaccatcacttgtggccagtcaggcattagcaggatattgcctggatcagcaa
 aaaccaggaaagcccctaagctctatgtatgcatttgcacccatggcaaaagtggggtc
 ccatcaagggtcagcggcagtggtatggacacagaattcacttcacatcagcagccctg
 cagccctgaagatggcaacttattactgtcaacagcttaatagttaccctcc
 >IGKV1D-8*d01
 gccatctggatgacccagtctccatcctactctgcattacaggagacaga
 gtcaccatcagttgtcggtatgagtccaggcattagcaggatattgcctggatcagcaa
 aaaccaggaaagcccctaagctctatgtatgcatttgcacccatggcaaaagtggggtc
 ccatcaagggtcagtggtatggacacagaattcacttcacatcagcagccctg
 cagtcgtaaagatggcaacttattactgtcaacagttatagttccctcc
 >IGKV3D-11*d01
 gaaatgtgtgacacagtctccagccaccctgtttgtccagggaaagagccacc
 ctctccatgcagggccagtcaggatgttagcagctacttagcctggtaccagcagaaacct

ggccaggctcccaggctccatctatgtatgcattccaacagggccactggcatccccagcc
aggitcagtggcagtggccggacagacttcacttcaccatcagcagccatagagact
qaaattttccatgttttattactqtcagcgcgcgtatcaacttccatcc

>||GKV1D-13*d01

>||GKV3D-15*d01

gaaatagtgtacgcagtcicccagccaccctgttgttccaggggaaagagccaccctctctgcaggccaggta
gagtgttagcagcaacttagtgcgttaccaggcagaaaacctggccaggctcc
caggctccatctatggtgcattccatcaggccactggcatccccagccaggttcagtgg
cagtgggtctggcacagagttcactctcaccatcagcatctgcagtctgaagatttgc
agtttattactgtcagcagttataataactggccctcc

>||GKV2D-26*d01

gagattgtatgacccagactccactctcttgcatacccccggagagcaggcc
atgtccctgcaggcttagtcagagccctctgcatagtgtatggatacaccttttgtatgg
tttctgcagaaaagccaggccagtctccacgcctctgtatgtatggatcaaccggttc
tctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtcagggacagattcacactgaaaatc
agccgggtggaggctgaggattttggatattactgcatgcaagatgcacaagatct
CC

Vk2D-26*^d02 secuencia de región V:

gagattgtgtatgaccccagactccacttccttgtaatcacccctggagagcaggccctcatgttttgtgcaggtclegtcagag
ccctccctgcatagtgtatggatacacccatatttgttatggtttgtgcagagcagccaggccagtcacccacgcctctgtatctatgaagtt
ccaaaccgggttctctggagtgtccagatagggtcagtggcagccccatgggacagatttcacactgaaaatcagccgggtg
qaaacccatggatattttcaatgtttatctgtatgtatccatccaaatgtcacaatgtatcc

→ ||GKV2D-28*d01

REIVINDICACIONES

- 1.- Una célula de vertebrado no humano cuyo genoma comprende los segmentos génicos Jk y Vk Jk5*01, Jk4*01, Jk3*01, Jk2*01 o Jk2*04, Jk1*01, Vk4-1*01, Vk5-2*01 o Vk5-2*d01, Vk1-5*03, Vk1-6*01, Vk1-8*01, Vk1-9*01 o Vk1-9*d01, Vk3-11*01, Vk1-12*01, Vk1-13*01, Vk3-15*01, Vk1-16*02, Vk1-17*01, Vk3-20*01, Vk6-21*01 y Vk2-24*01 en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que i) la célula es capaz de producir cadenas ligeras de anticuerpo que comprenden dominios VL humanos, comprendiendo el locus de cadena ligera un segmento genético VL humano de Jk5*01, Jk4*01, Jk3*01, Jk2*01 o Jk2*04, Jk1*01, Vk4-1*01, Vk5-2*01 o Vk5-2*d01, Vk1-5*03, Vk1-6*01, Vk1-8*01, Vk1-9*01 o Vk1-9*d01, Vk3-11*01, Vk1-12*01, Vk1-13*01, Vk3-15*01, Vk1-16*02, Vk1-17*01, Vk3-20*01, Vk6-21*01 y Vk2-24*01 capaz de recombinarse con uno de dichos segmentos génicos JL humanos de Jk5*01, Jk4*01, Jk3*01, Jk2*01 o Jk2*04, Jk1*01, Vk4-1*01, Vk5-2*01 o Vk5-2*d01, Vk1-5*03, Vk1-6*01, Vk1-8*01, Vk1-9*01 o Vk1-9*d01, Vk3-11*01, Vk1-12*01, Vk1-13*01, Vk3-15*01, Vk1-16*02, Vk1-17*01, Vk320*01, Vk6-21*01 y Vk2-24*01 para producir un dominio VL, o ii) la célula puede desarrollarse en un vertebrado que expresa un anticuerpo que comprende dicho dominio VL, y siendo la célula de vertebrado no humano una célula de ratón o de rata.
- 2.- Un vertebrado no humano cuyo genoma comprende los segmentos génicos Jk y Vk Jk5*01, Jk4*01, Jk3*01, Jk2*01 o Jk2*04, Jk1*01, Vk4-1*01, Vk5-2*01 o Vk5-2*d01, Vk1-5*03, Vk1-6*01, Vk1-8*01, Vk1-9*01 o Vk1-9*d01, Vk3-11*01, Vk1-12*01, Vk1-13*01, Vk3-15*01, Vk1-16*02, Vk1-17*01, Vk3-20*01, Vk6-21*01 y Vk2-24*01 en el sentido de 5' de una región constante en un locus de cadena ligera, estando los segmentos génicos unidos operativamente a la región constante de los mismos de modo que el vertebrado es capaz de producir cadenas ligeras de anticuerpo que comprenden dominios VL humanos y siendo el vertebrado no humano un ratón o una rata.
- 3.- Un método de producción de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el método (i) aislar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a partir de una célula según la reivindicación 1 que es capaz de producir una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo o (ii) inmunizar un vertebrado según la reivindicación 2 con un antígeno y recuperar el anticuerpo o fragmento, y opcionalmente modificar el anticuerpo o fragmento aislado de modo que comprenda regiones constantes humanas.

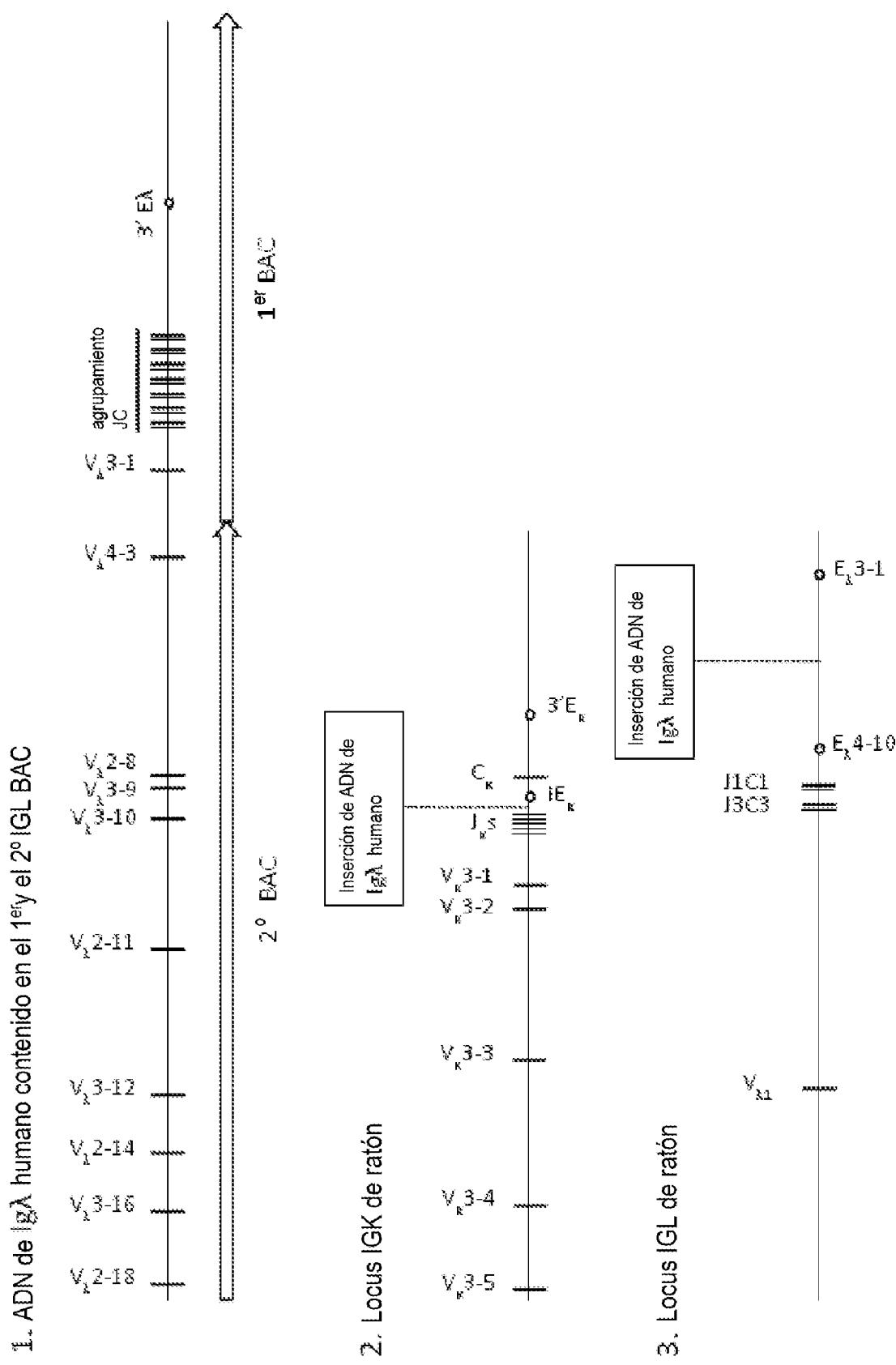


Fig. 1

ES 2 993 142 T3

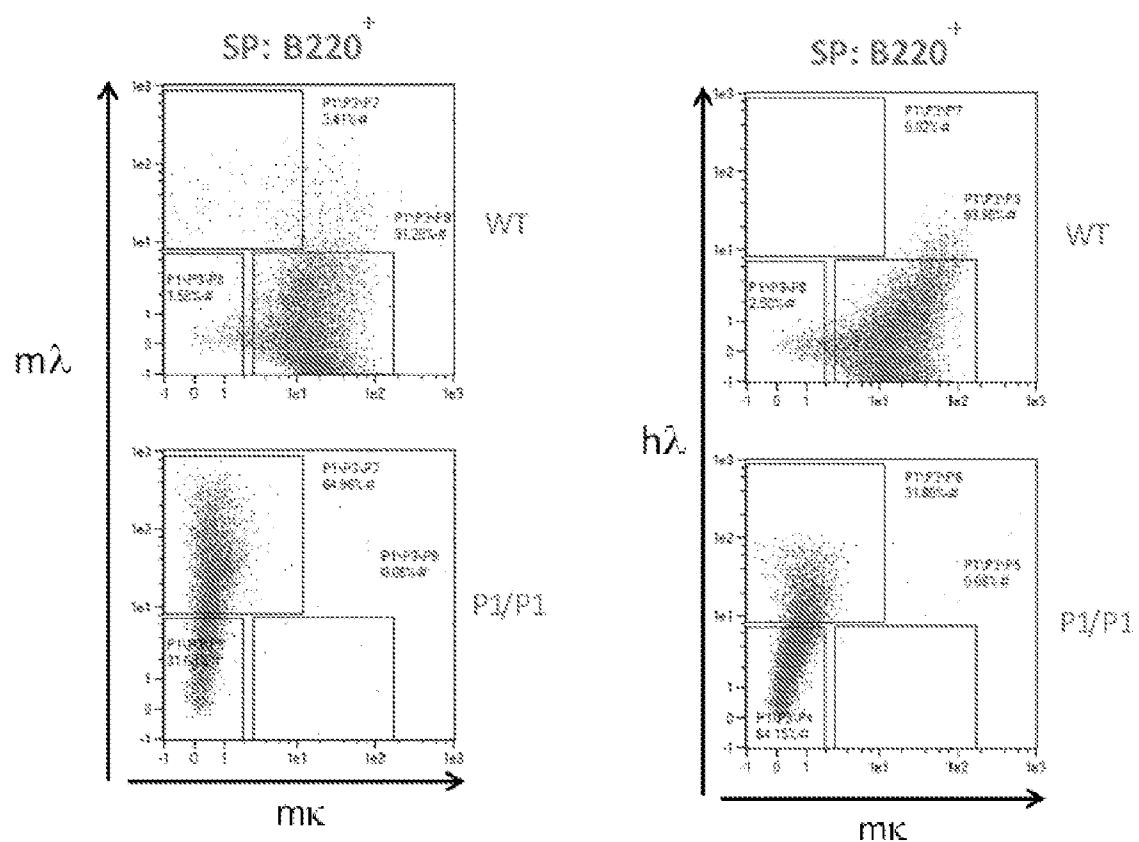
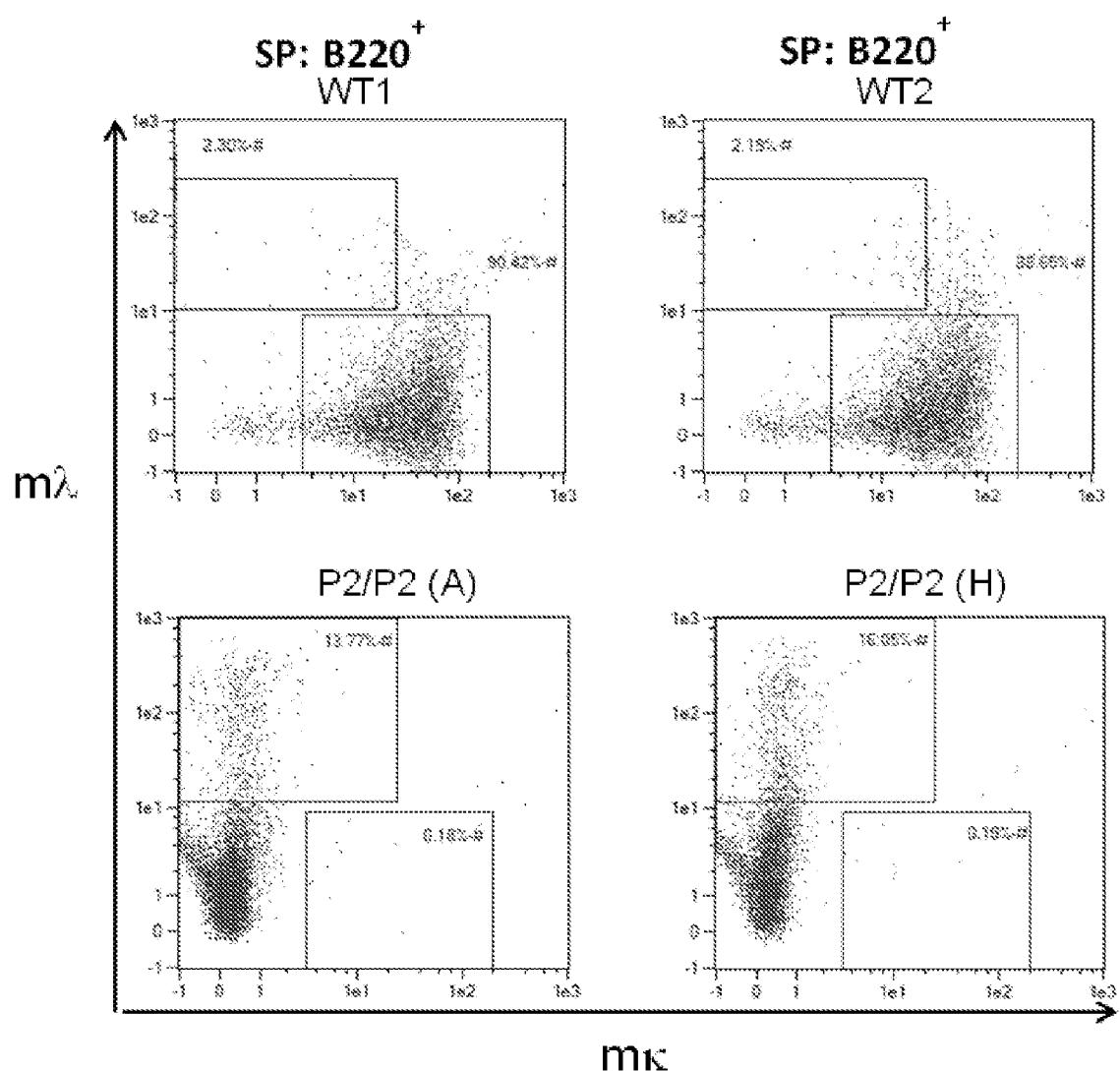
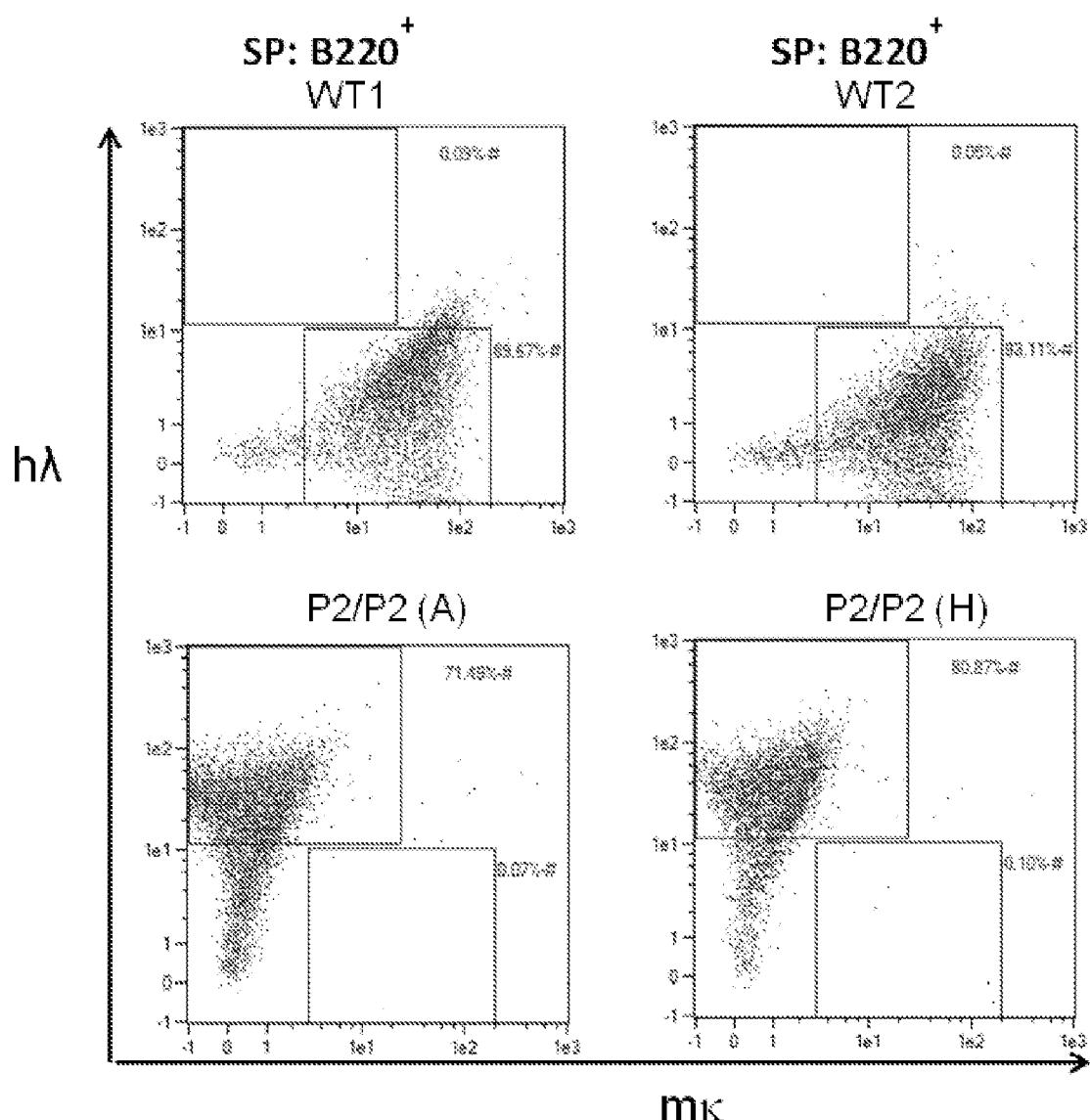


Fig. 2

**Fig. 3A**

**Fig. 3B**

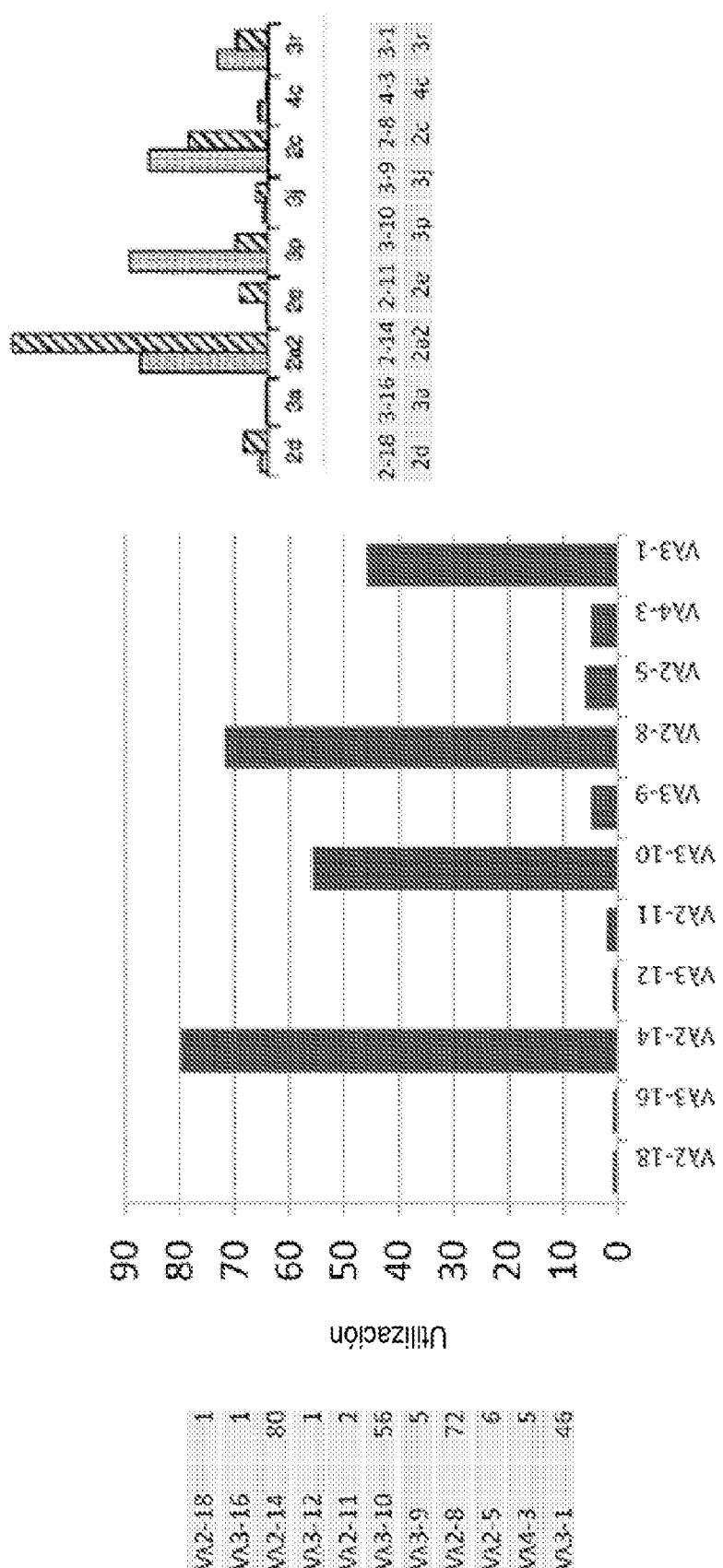
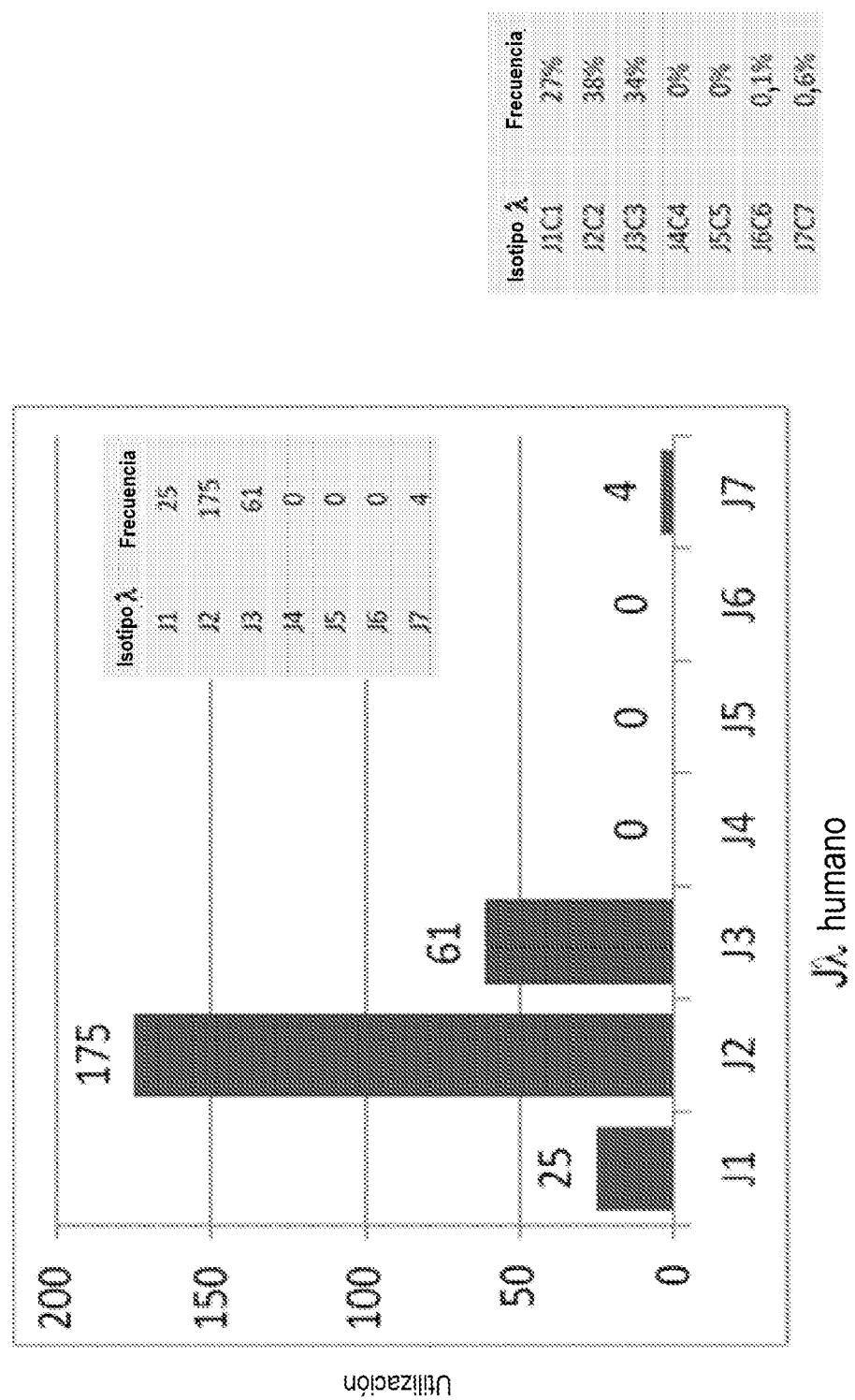


Fig. 4

**Fig. 5**

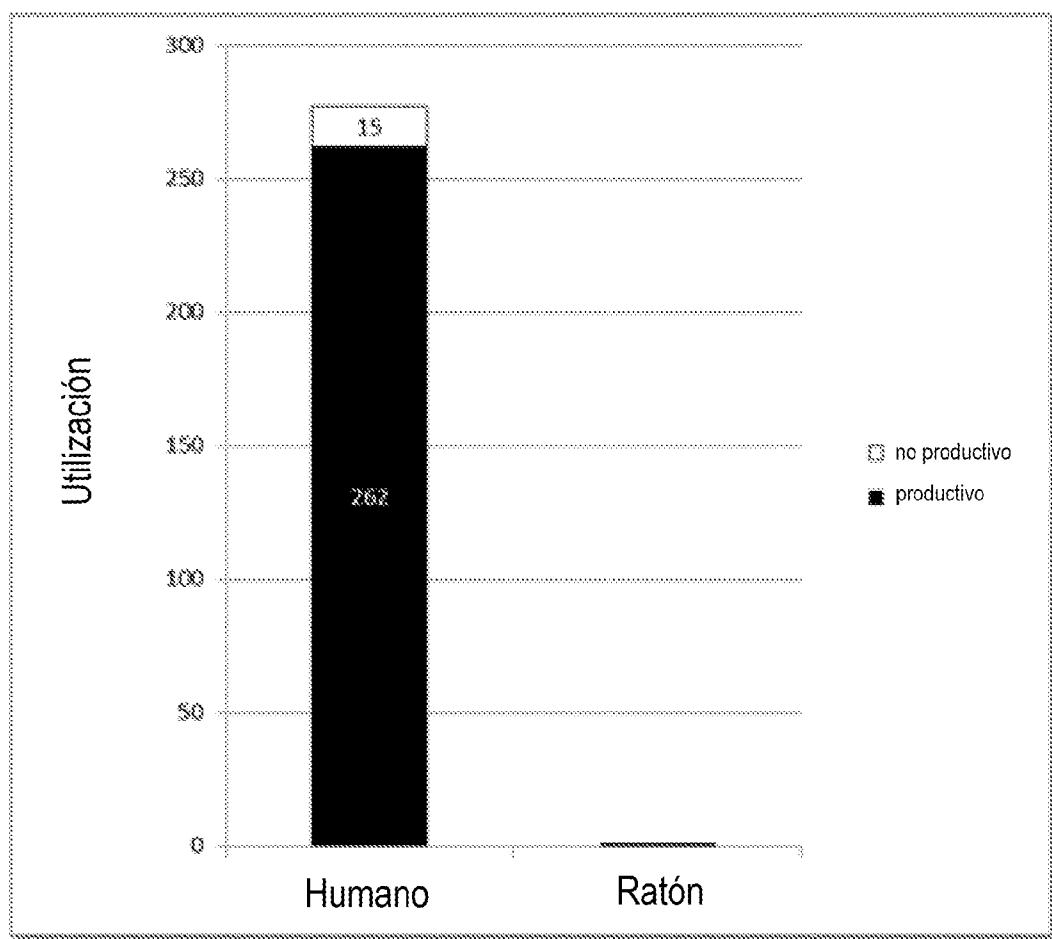


Fig. 6

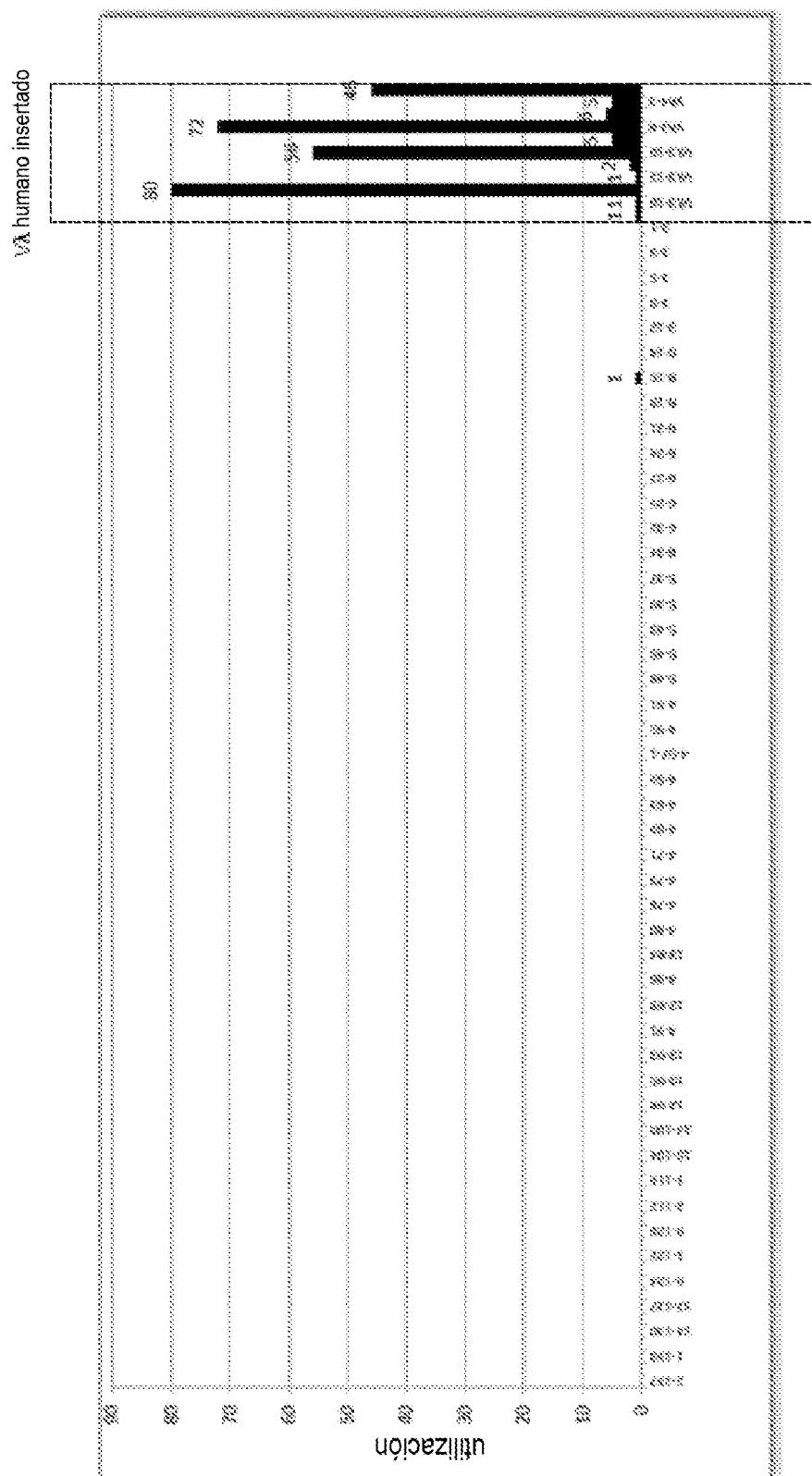


Fig. 7



23-RSS o RSS de dos giros

12-RSS o RSS de un giro

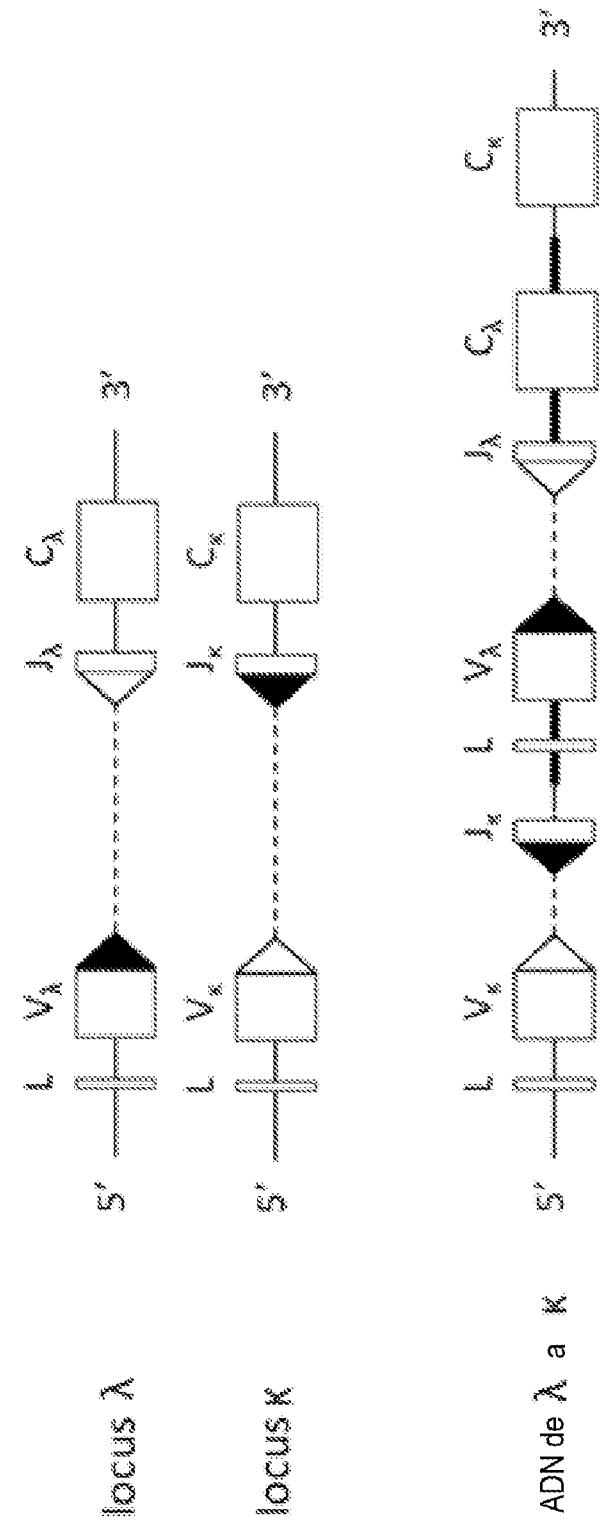


Fig. 8

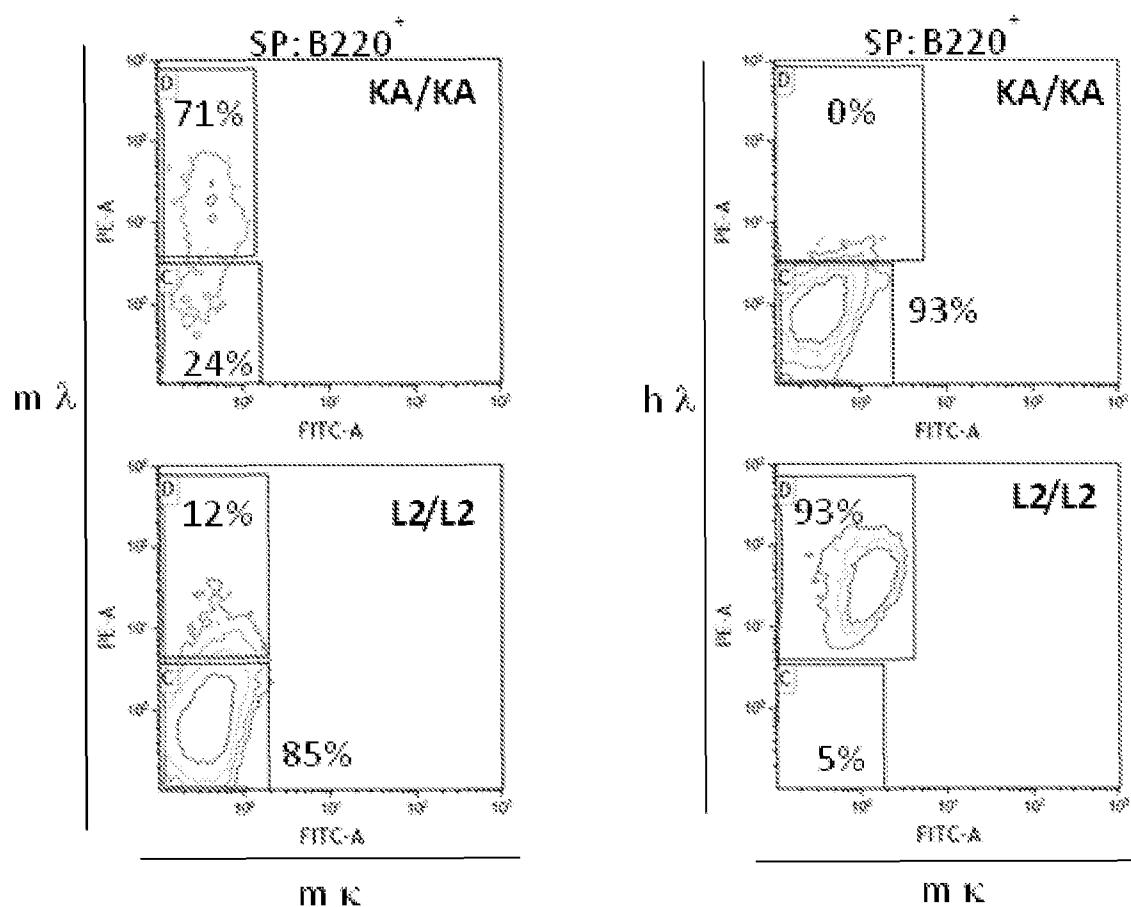


Fig. 9A

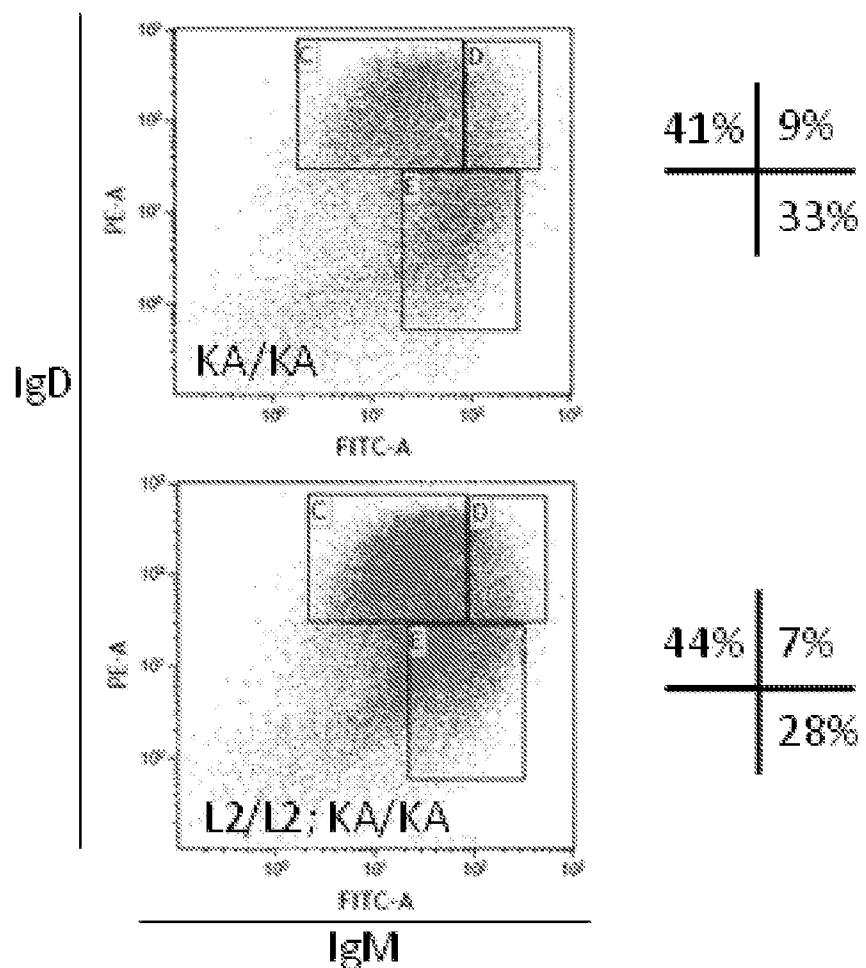


Fig. 9B

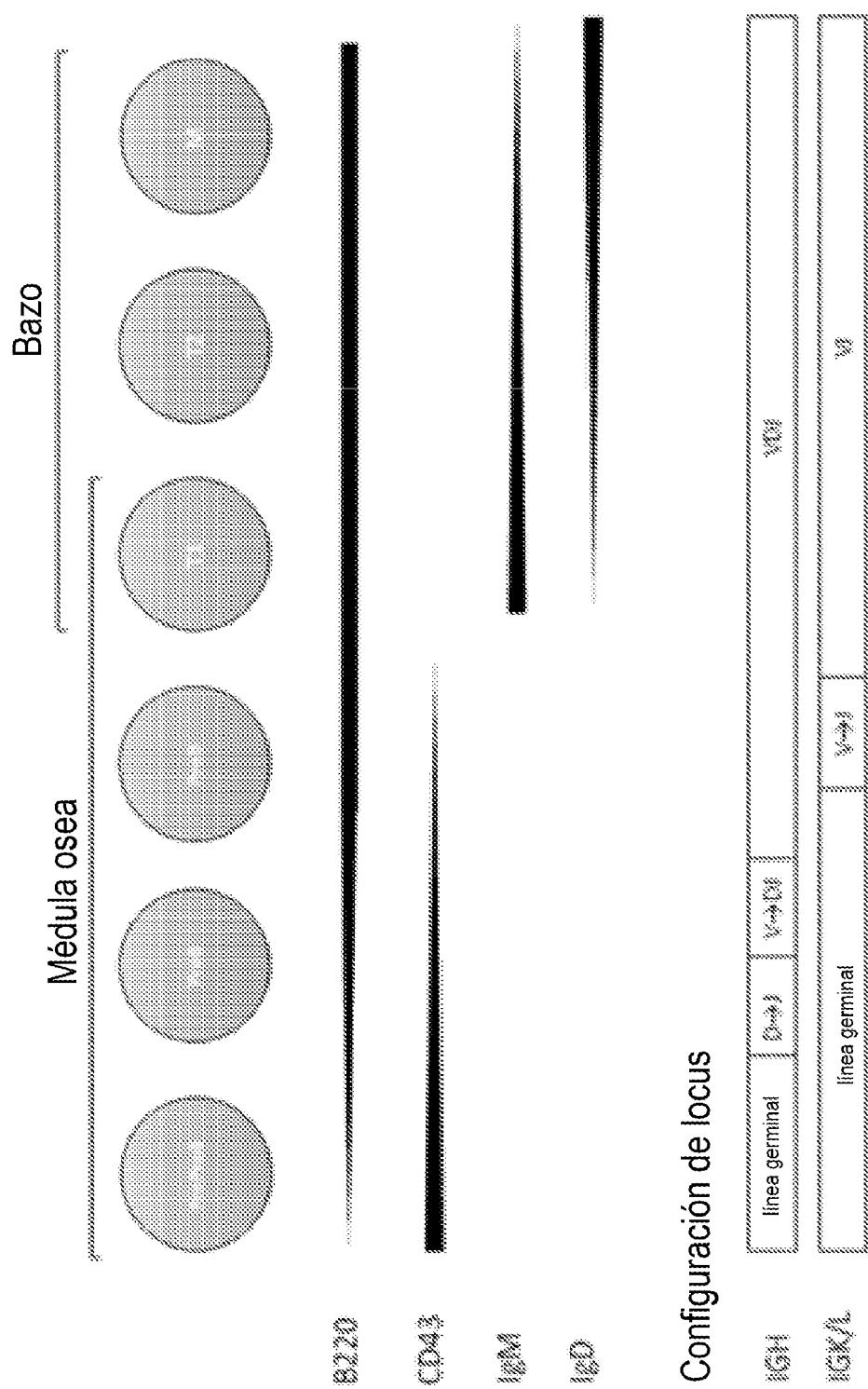


Fig. 10

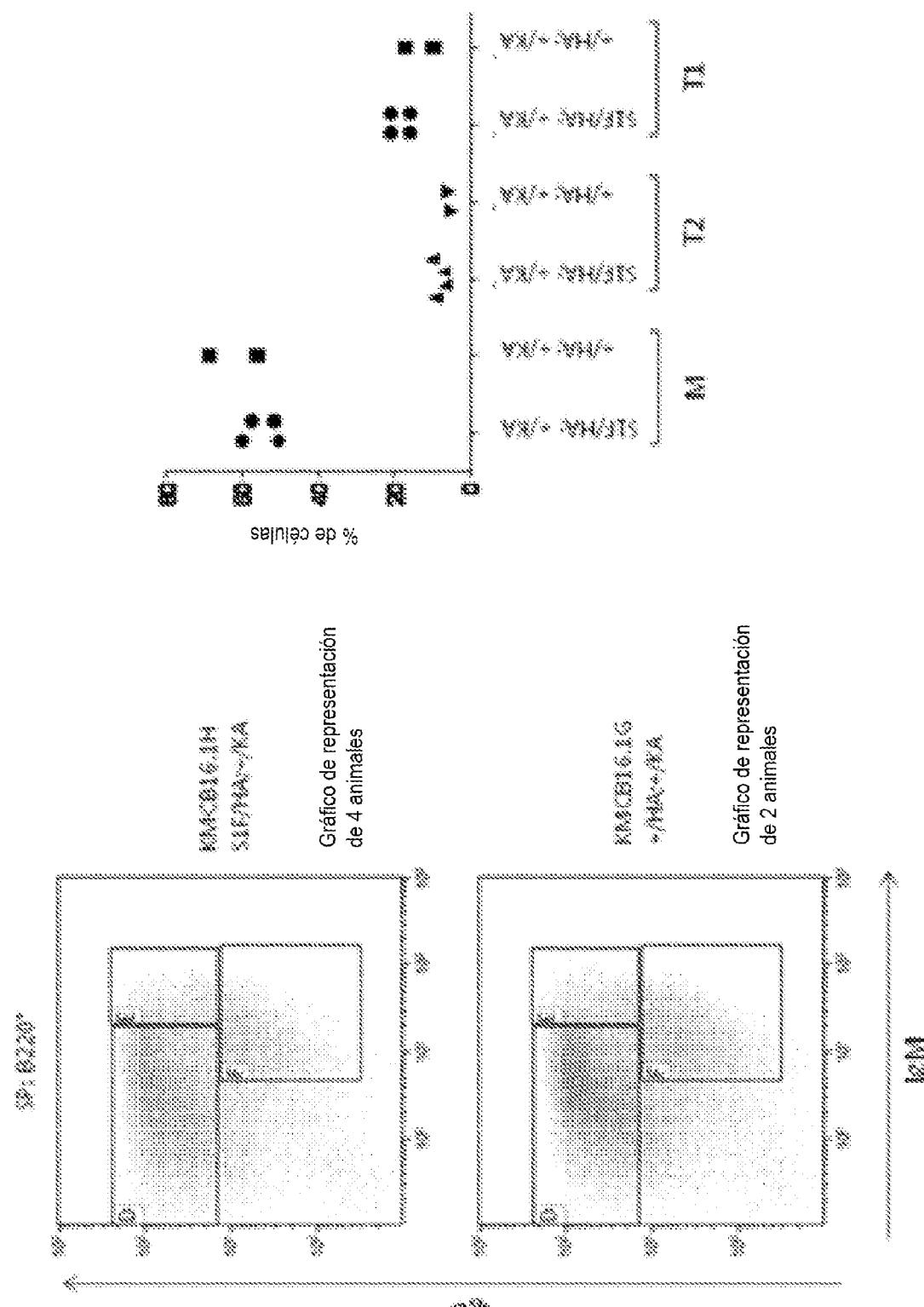


Fig. 11A

ES 2 993 142 T3

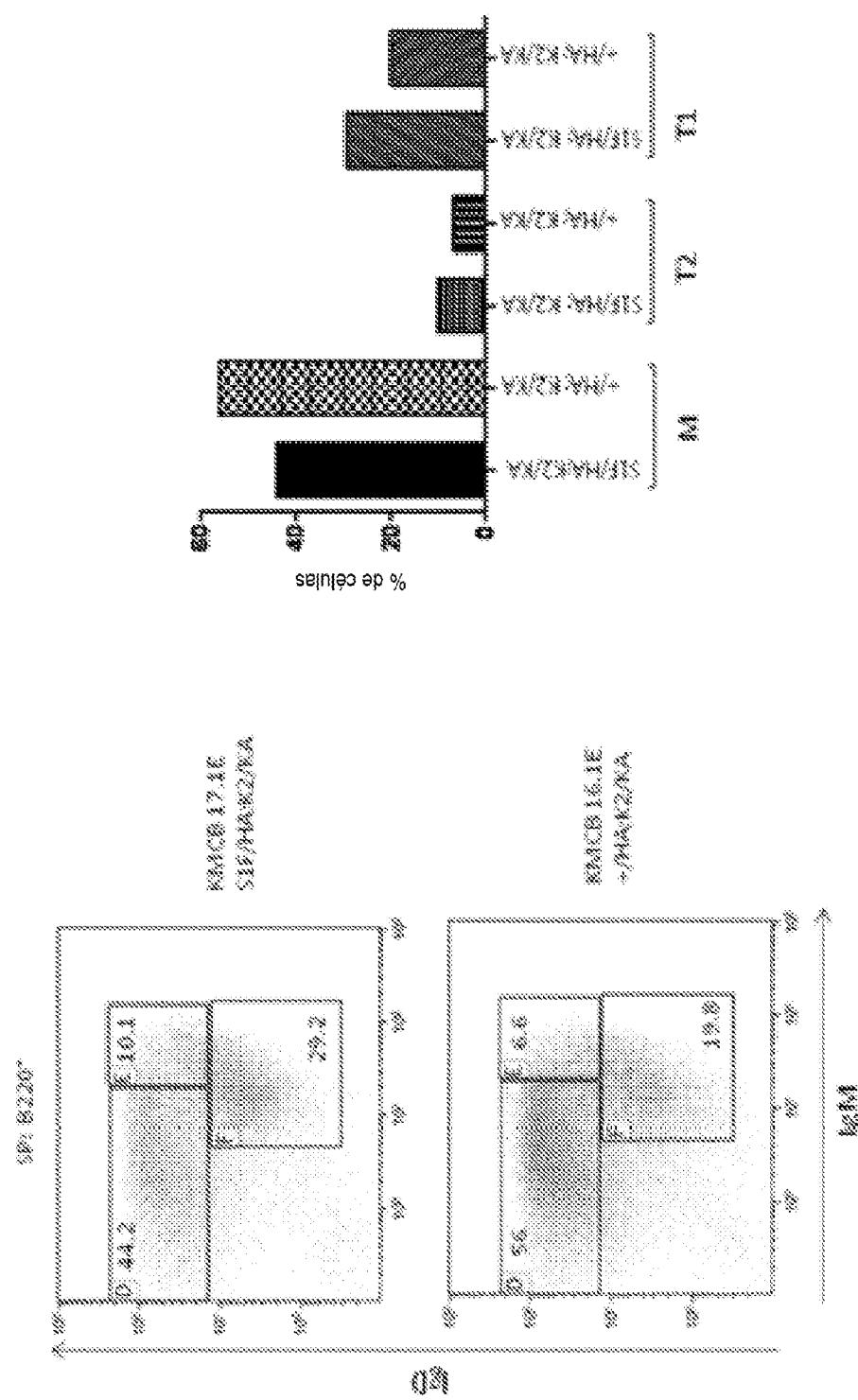


Fig. 11B

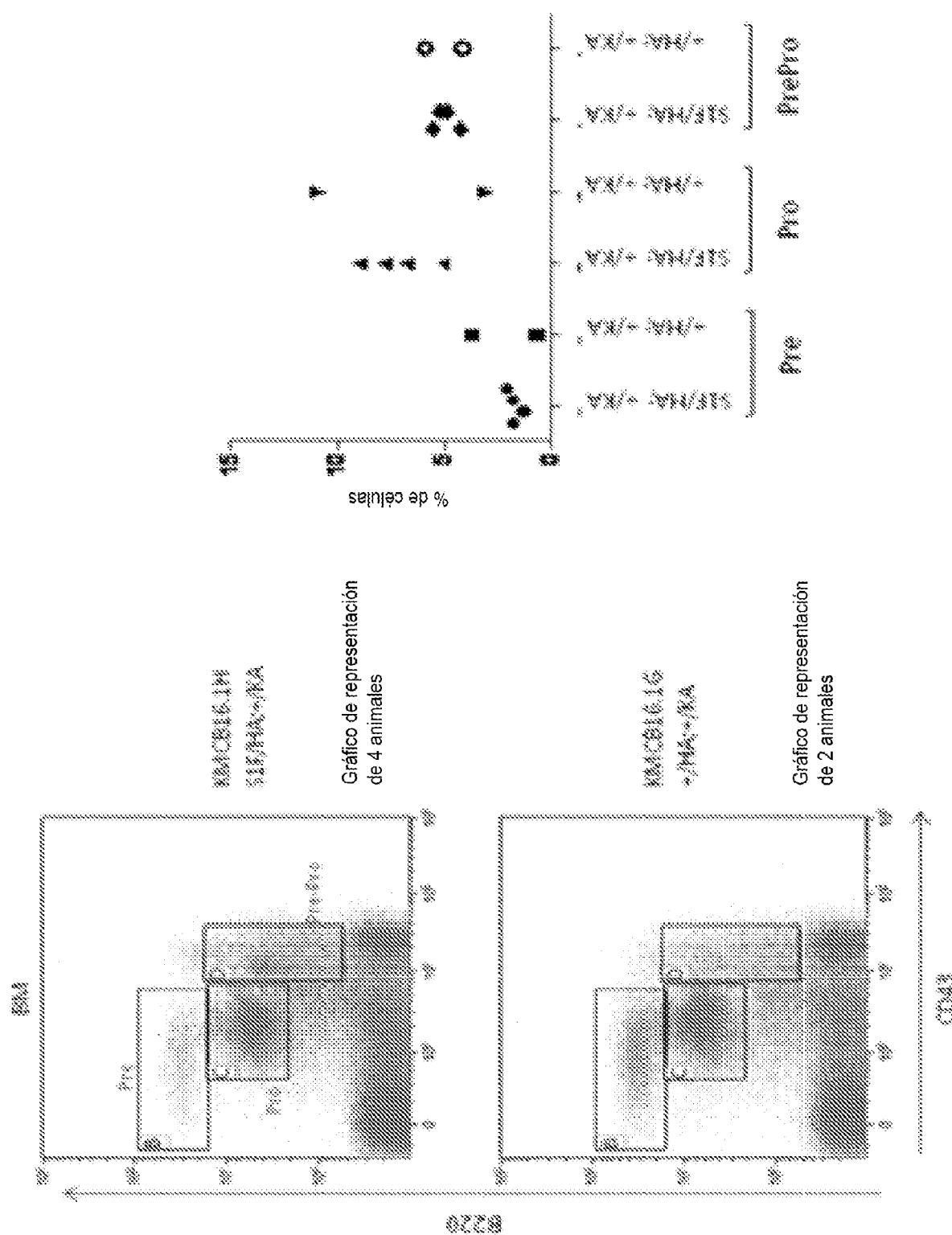


Fig. 12A

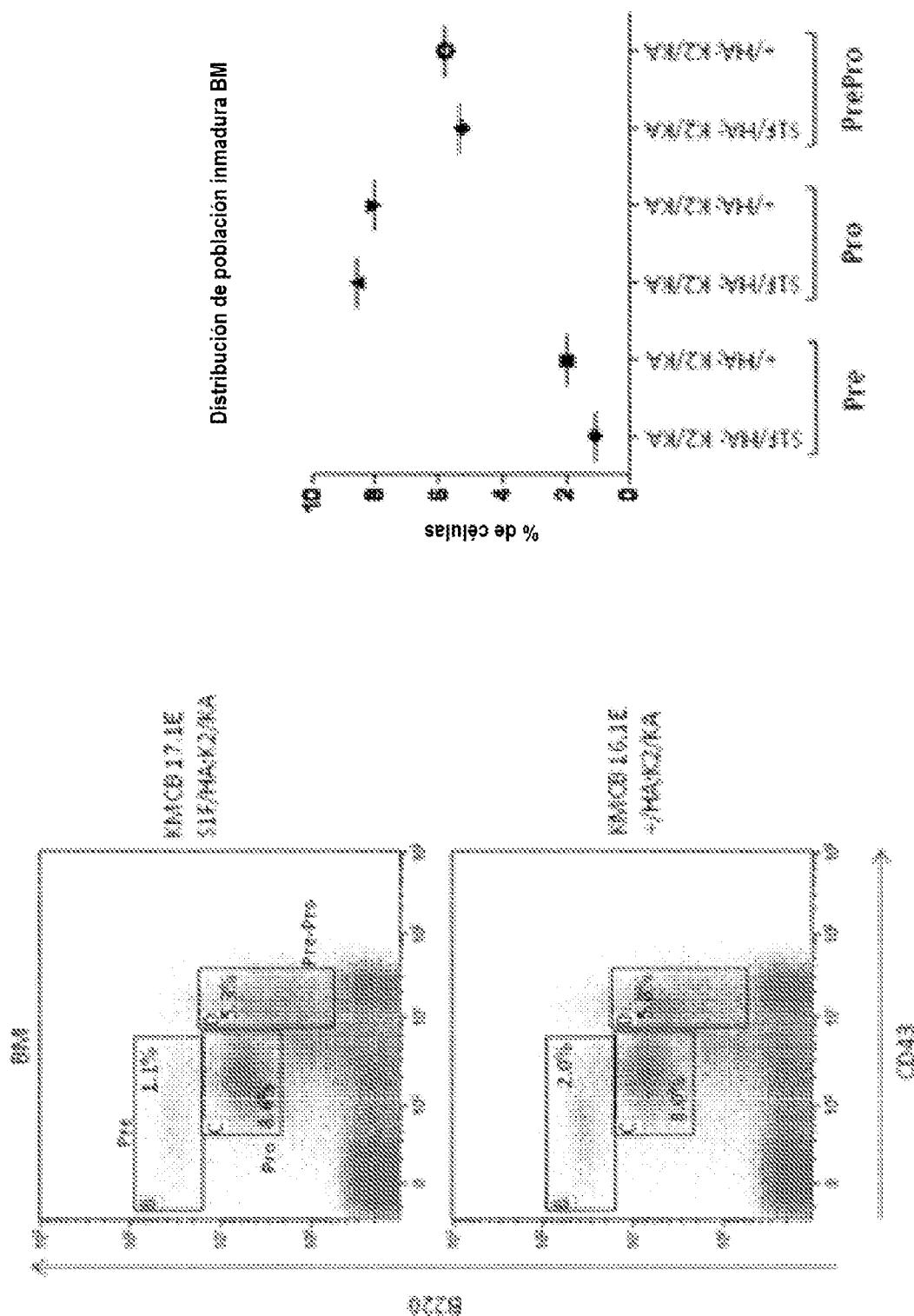


Fig. 12B

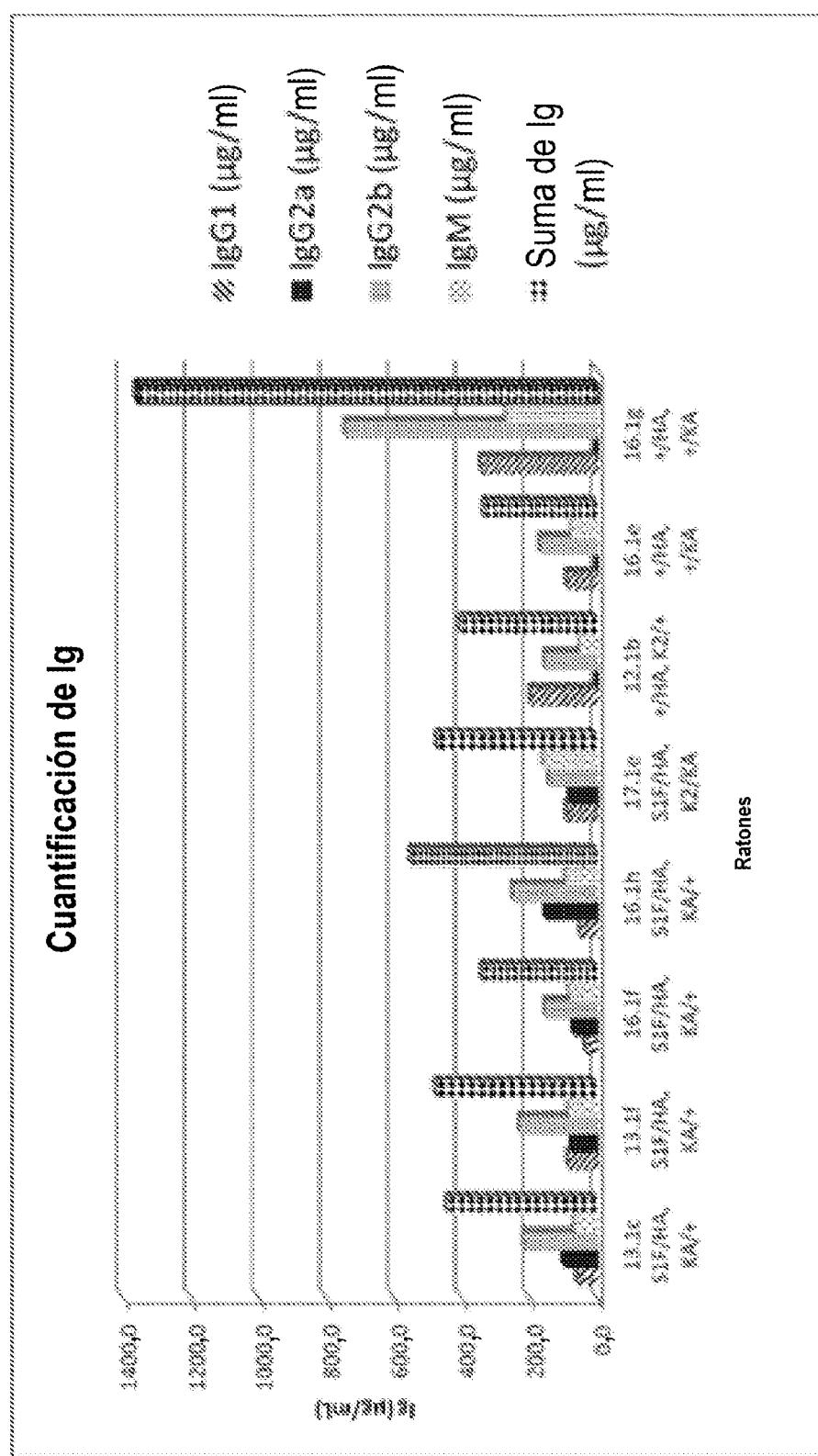


Fig. 13

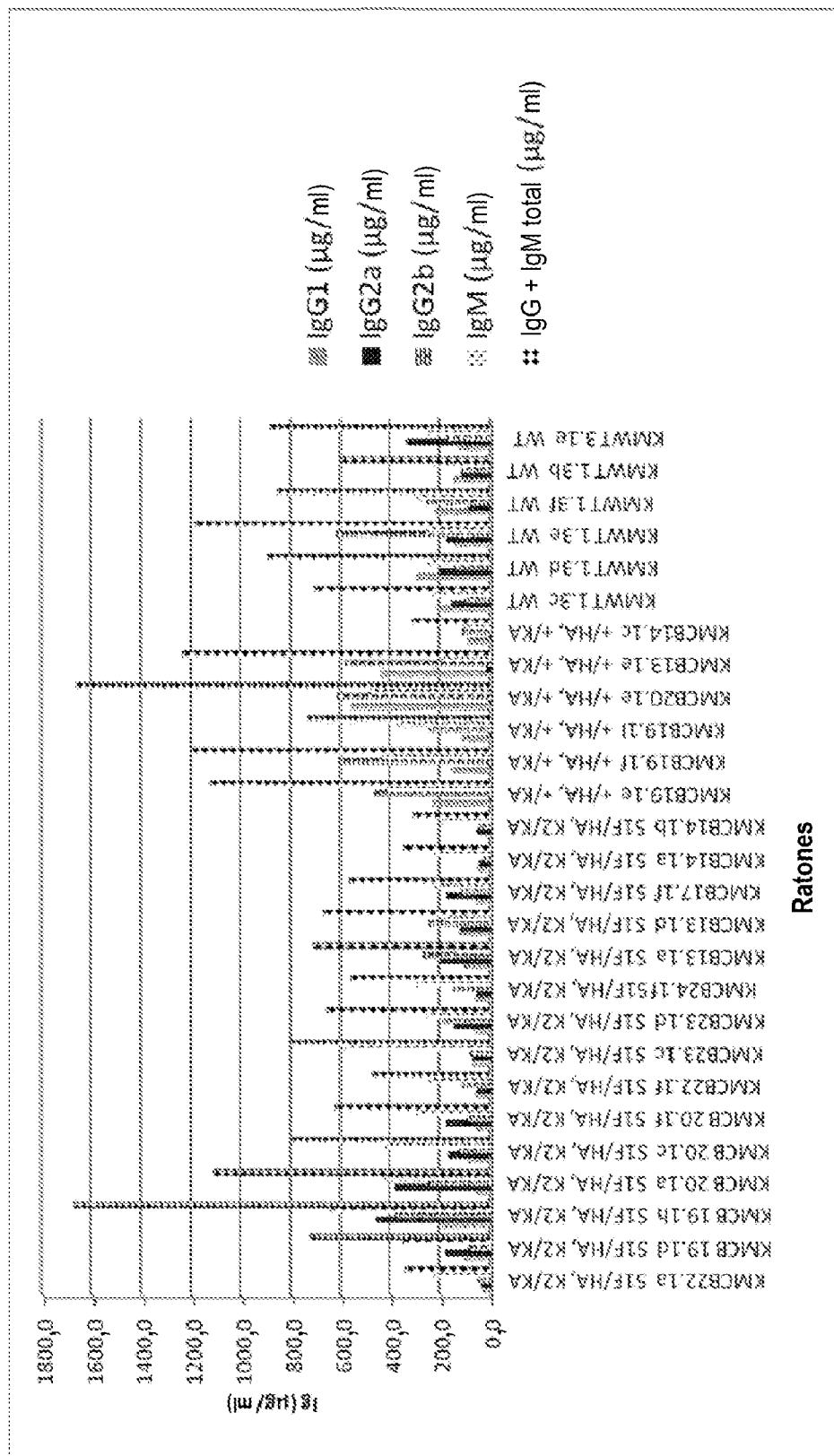


Fig. 14