

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 427**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/0278** (2014.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2017** **E 23151094 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025** **EP 4218408**

54 Título: **Roedores que expresan desoxinucleotidiltransferasa terminal exógena**

30 Prioridad:

**03.06.2016 US 201662345524 P**

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

**16.05.2025**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**

**(100.00%)**

**777 Old Saw Mill River Road  
Tarrytown, NY 10591-6706, US**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, LYNN;  
MURPHY, ANDREW, J.;  
GUO, CHUNGUANG;  
LEVENKOVA, NATASHA;  
TU, NAXIN;  
MCWHIRTER, JOHN;  
VORONINA, VERA y  
HARRIS, FAITH**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

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

ES 3 018 427 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

Roedores que expresan desoxinucleotidiltransferasa terminal exógena

## 5 Aplicación relacionada

Esta aplicación reivindica el beneficio de la prioridad a la solicitud de patente provisional de EE. UU. número de serie 62/345.524, presentada el 3 de junio de 2016.

## 10 Antecedentes

Animales no humanos, particularmente ratones y ratas, han demostrado ser una fuente valiosa de anticuerpos terapéuticos y potencialmente podrían servir como fuente de otras moléculas de unión a antígenos. Un alto nivel de diversidad de receptores de antígenos en dichos animales no humanos aumenta la probabilidad de que se genere después de la inmunización una molécula de unión a antígeno que tenga propiedades terapéuticas deseables. Por consiguiente, existe la necesidad de animales no humanos genéticamente modificados que tengan una mayor diversidad de receptores de antígenos para mejorar la producción de moléculas terapéuticas de unión a antígenos.

## Sumario

La invención proporciona un método para producir un anticuerpo específico para un antígeno, en donde el método comprende exponer un roedor genéticamente modificado al antígeno, en donde el roedor genéticamente modificado comprende en su genoma: una secuencia de ácido nucleico que codifica una desoxinucleotidiltransferasa terminal humana (TdT) unida operativamente a un elemento de control transcripcional que conduce la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT humana en pre-linfocitos B; y una región variable de inmunoglobulina humana específica para el antígeno que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar, en donde la región variable de inmunoglobulina humana está operativamente unida a una región constante de inmunoglobulina.

La invención también proporciona un método para producir un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humano específico para un antígeno y/o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humano específico para un antígeno, en donde el método comprende: (a) exponer un roedor genéticamente modificado al antígeno, en donde el roedor genéticamente modificado comprende en su genoma: una secuencia de ácido nucleico que codifica una desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) humana unida operativamente a un elemento de control transcripcional que conduce la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT humana en pre-linfocitos B; y una región variable de inmunoglobulina humana específica para el antígeno que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar, en donde la región variable de inmunoglobulina humana está unida operativamente a una región constante de inmunoglobulina; y (b) obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana específico para el antígeno y/o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humano específico para el antígeno del roedor. En determinados aspectos, en el presente documento se describen roedores genéticamente modificados que comprenden en su genoma un ácido nucleico humano exógeno que codifica la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT). En algunos aspectos, los roedores descritos en el presente documento expresan la TdT humana codificada por el ácido nucleico exógeno durante el desarrollo de los linfocitos B, por ejemplo, en pro-linfocitos B y/o en pre-linfocitos B. En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado comprende múltiples copias de ácidos nucleicos exógenos que codifican TdT (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 copias).

En algunos aspectos, el roedor genéticamente modificado comprende en su genoma una región variable de inmunoglobulina humana específica para el antígeno que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar (por ejemplo, segmentos génicos de cadena pesada, segmentos génicos de la cadena  $\kappa$ , segmentos génicos de la cadena  $\lambda$ ) unidos operativamente a un gen de una región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, un gen de la región constante de cadena pesada, un gen de la región constante de la cadena  $\kappa$ , un gen de la región constante de la cadena  $\lambda$ ). En algunos aspectos, el gen de la región constante es un gen de la región constante humano, un gen de la región constante de ratón o un gen de la región constante de rata. En algunos aspectos, el gen de la región constante es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el gen de la región variable y de la región constante están ubicados en un locus de inmunoglobulina endógena (por ejemplo, un locus de cadena pesada, un locus  $\kappa$ , un locus  $\lambda$ ). En algunos aspectos, el roedor genéticamente modificado expresa anticuerpos que comprenden un dominio variable de inmunoglobulina humano derivado de la región variable de inmunoglobulina y un dominio constante de inmunoglobulina codificado por el gen de la región constante de inmunoglobulina. En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para usar dicho roedor genéticamente modificado para generar un anticuerpo, un linfocito B, un hibridoma o un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina humano.

En determinados aspectos, el roedor genéticamente modificado comprende en su genoma una región variable del receptor de linfocito T (TCR) que comprende segmentos génicos de la región variable del TCR humanos sin reordenar (por ejemplo, segmentos génicos de TCR $\alpha$ , segmentos génicos de TCR  $\beta$ , segmentos génicos de TCR $\gamma$ , segmentos

génicos de TCR $\delta$ ) unidos operativamente a un gen de la región constante de TCR (por ejemplo, gen de la región constante de TCR $\alpha$ , gen de la región constante de TCR  $\beta$ , gen de la región constante TCR $\gamma$ , gen de la región constante TCR $\delta$ ). En algunos aspectos, el gen de la región constante es un gen de la región constante humano, un gen de la región constante de ratón o un gen de la región constante de rata. En algunos aspectos, el gen de la región constante es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el gen de la región variable y la región constante están ubicados en un locus de TCR endógeno (por ejemplo, locus de TCR $\alpha$ , locus de TCR  $\beta$ , locus de TCR $\gamma$ , locus de TCR $\delta$ ). En algunos aspectos, el roedor genéticamente modificado expresa TCR que comprende un dominio variable de TCR humano derivado de la región variable de TCR y un dominio constante de TCR codificado por el gen de la región constante de TCR. En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para usar dicho roedor genéticamente modificado para generar un TCR, un linfocito T, un hibridoma de linfocito T o un ácido nucleico que codifica un dominio variable de TCR humano.

En algunos aspectos, el roedor genéticamente modificado comprende en su genoma una región variable de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar (por ejemplo, segmentos génicos de cadena pesada, segmentos génicos de la cadena  $\kappa$ , segmentos génicos de la cadena  $\lambda$ ) unidos operativamente a un gen de la región constante de TCR (por ejemplo, gen de la región constante de TCR $\alpha$ , gen de la región constante de TCR  $\beta$ , gen de la región constante TCR $\gamma$ , gen de la región constante TCR $\delta$ ). En algunos aspectos, el gen de la región constante es un gen de la región constante humano, un gen de la región constante de ratón o un gen de la región constante de rata. En algunos aspectos, el gen de la región constante es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el gen de la región variable y la región constante están ubicados en un locus de TCR endógeno (por ejemplo, locus de TCR $\alpha$ , locus de TCR  $\beta$ , locus de TCR $\gamma$ , locus de TCR $\delta$ ). En algunos aspectos, el roedor genéticamente modificado expresa el receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio variable de inmunoglobulina humano derivado de la región variable de inmunoglobulina y un dominio constante de TCR codificado por el gen de la región constante de TCR. En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para usar dicho roedor genéticamente modificado para generar un CAR, un linfocito T, un hibridoma de linfocito T o un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina humano.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para obtener un roedor descrito en el presente documento que comprenden modificar por ingeniería genética el animal no humano para que comprenda en su línea germinal las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan células ES no humanas que comprenden las modificaciones genéticas descritas en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa un diagrama de un vector de direccionamiento ("targeting vector") ilustrativo (no a escala) mientras que parte del gen *Rag2* de ratón se sustituye con una secuencia de ADN que codifica la TdT humana de isoforma corta (hTdT). En aspectos ilustrativos, el vector se integra aleatoriamente en el genoma. A menos que el etiquetado en el diagrama sugiera lo contrario (por ejemplo, en cuanto a los casetes de selección, los sitios loxP, etc.), las formas rellenas y las líneas sencillas representan secuencias de ratón, y las formas vacías y las líneas dobles representan secuencias humanas. E1, E2, etc. representan exones de genes particulares ilustrados, GFP es proteína fluorescente verde, CM es un gen resistente al cloranfenicol, neo es un gen resistente a la neomicina. Las uniones 1-4 corresponden a las uniones indicadas en la Tabla 1.

La **Figura 2** representa un diagrama de un vector de direccionamiento ilustrativo (no a escala) donde una parte del gen *Rag2* de ratón se sustituye con una secuencia de ADN que codifica la TdT humana de isoforma corta (hTdT). En el aspecto representado, el vector se usa para insertar hTdT, conducido por el promotor de RAG2 de ratón, en el locus kappa de Ig. A menos que el etiquetado en el diagrama sugiera lo contrario (por ejemplo, en cuanto a los casetes de selección, los sitios loxP, etc.), las formas rellenas y las líneas sencillas representan secuencias de ratón, y las formas vacías y las líneas dobles representan secuencias humanas. E1, E2, etc. representan exones de genes particulares ilustrados, GFP es proteína fluorescente verde, CM es un gen resistente al cloranfenicol, hyg es el gen de resistencia a higromicina. Las uniones 1-7 corresponden a las uniones de la Tabla 2.

La **Figura 3** representa un diagrama de un vector de direccionamiento ilustrativo (no a escala) usado para insertar una secuencia de ADN que codifica TdT humana (hTdT), conducido por el promotor de V<sub>H</sub>1-72 y el potenciador E<sub>μ</sub>, en el locus  $\kappa$  de inmunoglobulina. A menos que el etiquetado en el diagrama sugiera lo contrario (por ejemplo, en cuanto a los casetes de selección, los sitios loxP, etc.), las formas rellenas y las líneas sencillas representan secuencias de ratón, y las formas vacías y las líneas dobles representan secuencias humanas. E1, E2, etc. representan exones de genes particulares ilustrados, GFP es proteína fluorescente verde, CM es un gen resistente al cloranfenicol, hyg es el gen de resistencia a higromicina. Las uniones 1-4 corresponden a las uniones de la Tabla 3.

La **Figura 4** representa la expresión de ARNm de hTdT en linfocitos de ratones VELOCIMMUNE® con TdT en comparación con ratones VELOCIMMUNE® de control. Los ratones VELOCIMMUNE® en el presente documento son ratones que comprenden un repertorio diverso de segmentos génicos variables (V(D)J) de cadena pesada y cadena ligera kappa humanos sin reordenar. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto.

La **Figura 5** representa un gráfico que muestra la diversidad de secuencia de hlgk (número de secuencias únicas de CDR3 de cadena ligera por 10.000 lecturas de secuenciación de hlgx) en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO

indica un ratón homocigoto.

La **Figura 6** representa un gráfico que muestra la distribución de adiciones sin molde de hlgk en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto. "NT" significa nucleótidos.

La **Figura 7** tiene dos paneles. El panel (A) representa un gráfico que muestra la distribución de las longitudes de CDR3 de hlgx en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. "AA" significa aminoácido. El panel (B) representa un gráfico que muestra las frecuencias de longitud de delección de exonucleasas en la región 5' de los segmentos JK en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto.

La **Figura 8** tiene dos paneles. El panel (A) representa un gráfico que muestra el uso de Vk en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. El panel (B) representa un gráfico que muestra el uso de Jk en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto.

La **Figura 9** representa un gráfico que muestra la diversidad de secuencias de mlgλ número de secuencias únicas de CDR3 de cadena ligera por 10.000 lecturas de secuenciación de Igλ en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto.

La **Figura 10** representa un gráfico que muestra la distribución de adiciones sin molde de mlgλ en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto. "NT" significa nucleótidos.

La **Figura 11** representa un gráfico que muestra la distribución de longitudes de CDR3 de mlgλ en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto. "AA" significa aminoácido.

La **Figura 12** representa un gráfico que muestra el uso de Vλ en ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT en comparación con ratones de control VELOCIMMUNE®. Het indica un ratón heterocigoto, HO indica un ratón homocigoto.

La **Figura 13** representa un gráfico que muestra la diversidad de secuencias de hlgk (número de secuencias únicas de CDR3 de cadena ligera por 10.000 lecturas de secuenciación de Igk) en ratones de doble cadena ligera (DLC; ratones que comprenden dos segmentos génicos de Vk humanos sin reordenar y cinco segmentos génicos de Jk humanos no sin reordenar, así como un repertorio diverso de segmentos génicos V, D y J de cadena pesada) que expresan hTdT (panel derecho; genes de hTdT presentes como se indica) en comparación con ratones VELOCIMMUNE® que expresan hTdT (panel izquierdo; genes de hTdT presentes como se indica) y ratones DLC y VELOCIMMUNE® de control que no expresan hTdT. Het indica un ratón heterocigoto para hTdT, HO indica un ratón homocigoto para hTdT.

La **Figura 14** representa un gráfico que muestra la distribución de adiciones sin molde de hlgx en ratones que expresan hTdT en comparación con ratones de control DLC que no expresan hTdT (DLC). Het indica un ratón heterocigoto para hTdT, HO indica un ratón homocigoto para hTdT. "NT" significa nucleótidos.

La **Figura 15** representa un gráfico que muestra la distribución de las longitudes de CDR3 de hlgx en ratones DLC que expresan hTdT en comparación con ratones de control DLC que no expresan hTdT. Het indica un ratón heterocigoto para hTdT, HO indica un ratón homocigoto para hTdT.

La **Figura 16** representa gráficos que muestran el uso de Vk y el uso de Jk en ratones DLC que expresan hTdT en comparación con ratones de control DLC que no expresan hTdT. Het indica un ratón heterocigoto para hTdT, HO indica un ratón homocigoto para hTdT. Solo se usan dos ratones DLC Rag TdT tg (HO) diferentes, los cuales se representan por separado.

## Descripción detallada

### General

En el presente documento se describen métodos y composiciones relacionados con roedores (por ejemplo, un ratón o una rata) que comprenden en su genoma un ácido nucleico exógeno que codifica la TdT humana. En determinados aspectos, el genoma del roedor comprende modificaciones adicionales de modo que expresa moléculas de unión a antígeno que tienen dominios variables humanos (por ejemplo, anticuerpos, TCR y/o CAR).

La TdT es una ADN polimerasa que cataliza la adición independiente de molde de nucleótidos (adiciones N) durante la formación de uniones en la recombinación V(D)J, lo que conduce a un aumento de la diversidad de antígeno-receptor en los linfocitos B y T. En algunos aspectos, los animales no humanos proporcionados en el presente documento expresan mayores niveles de TdT durante el desarrollo de los linfocitos B y/o el desarrollo de los linfocitos T en comparación con los animales no humanos correspondientes (es decir, animales no humanos de la misma especie y cepa) que no incluyen en su genoma un ácido nucleico exógeno que codifique TdT. En algunos aspectos, los animales no humanos proporcionados en el presente documento pueden expresar TdT durante las fases de desarrollo de los linfocitos B y/o el desarrollo de los linfocitos T durante las cuales los animales no humanos correspondientes que no incluyen en su genoma un ácido nucleico exógeno que codifica TdT no expresan TdT (por ejemplo, durante la fase de pre-linfocito B). En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento pueden tener una mayor diversidad de antígeno-receptor (por ejemplo, diversidad

de anticuerpos, diversidad de TCR y/o diversidad de CAR) en comparación con los animales no humanos correspondientes que no incluyen en su genoma un ácido nucleico exógeno que codifica TdT.

## Definiciones

5 En el presente documento, los artículos "*un*" y "*uno(a)*" se usan para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

10 El término "*aminoácidos*" pretende abarcar todas las moléculas, ya sean naturales o sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácida y que pueden incluirse en un polímero de aminoácidos de origen natural. Aminoácidos ilustrativos incluyen aminoácidos de origen natural; análogos, derivados y congéneres de los mismos; análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes; y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores.

15 Como se usa en el presente documento, el término "*anticuerpo*" puede referirse tanto a un anticuerpo intacto como a un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos intactos son glucoproteínas que incluyen al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada incluye una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera incluye una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos solo de cadena pesada, anticuerpos con segmentos génicos variables de cadena ligera en la cadena pesada, etc.

30 Los términos "*fragmento de unión a antígeno*" y "*porción de unión a antígeno*" de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, un receptor de linfocitos T (TCR), un receptor de antígeno quimérico (CAR), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de la molécula de unión a antígeno que conservan la capacidad de unirse a un antígeno. Un fragmento de unión a antígeno puede incluir cualquier anticuerpo, fragmento de TCR o CAR que conserva al menos una porción de la región variable de una molécula de unión a antígeno intacta y es capaz de unirse a un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "fragmento de unión a antígeno" incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fv unido a disulfuro, Fd, anticuerpos monocatenarios, TCR soluble, TCR monocatenario, CAR soluble, CAR monocatenario, CDRH3 aislada (anticuerpo o TCR) y otros fragmentos de unión a antígeno que conservan al menos una porción de la región variable de una molécula de unión a antígeno intacta. Estos fragmentos de unión a antígeno se pueden obtener usando técnicas recombinantes y/o enzimáticas convencionales y se pueden cribar en cuanto a la unión a antígeno de la misma manera que los anticuerpos intactos.

40 El término "*correspondiente*" en referencia a un animal no humano, se usa para describir las características de un animal no humano de control de la misma especie y que comprende las mismas modificaciones genéticas que un sujeto no humano, excepto que el sujeto animal no humano expresa TdT exógena mientras que el animal no humano correspondiente no lo hace.

45 Como se usa en el presente documento, un "*receptor de antígeno quimérico*" o "*CAR*" se refiere a una proteína de unión a antígeno que incluye un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina) y un dominio constante del receptor de linfocitos T (TCR) o una porción del mismo. Como se usa en el presente documento, un "dominio constante" de un polipéptido de TCR incluye un dominio constante de TCR próximo a la membrana y también puede incluir un dominio transmembrana de TCR y/o una cola citoplásmica de TCR. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, el CAR puede ser un dímero que incluye un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina unido a un dominio constante de TCRβ y un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable κ o λ) unido a un dominio constante de TCRα. En algunos aspectos, el CAR puede ser un dímero que incluye un primer polipéptido que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina unido a un dominio constante de TCRα y un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable κ o λ) unido a un dominio constante de TCRβ.

60 La expresión "*derivado de*" cuando se usa en relación con un gen de región variable reordenado o un dominio variable "derivado de" una región variable sin reordenar y/o segmentos génicos de región variable sin reordenar se refiere a la capacidad de rastrear la secuencia del gen de región variable o dominio variable reordenado de vuelta hasta un conjunto de segmentos génicos de región variable sin reordenar que se reordenaron para formar el gen de la región variable reordenado que expresa el dominio variable (teniendo en cuenta, cuando sea aplicable, diferencias de corte y empalme y mutaciones somáticas). Por ejemplo, un gen de la región variable reordenado que ha experimentado una mutación somática no cambia el hecho de que deriva de los segmentos génicos de región variable sin reordenar.

Como se usa en el presente documento, el término "*locus*" se refiere a una región en un cromosoma que contiene un conjunto de elementos genéticos relacionados (por ejemplo, genes, segmentos génicos, elementos reguladores). Por ejemplo, un locus de inmunoglobulina sin reordenar puede incluir segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina, uno o más genes de la región constante de inmunoglobulina y elementos reguladores asociados (por ejemplo, promotores, potenciadores, elementos de cambio, *etc.*) que dirigen la recombinación V(D)J y la expresión de inmunoglobulina, mientras que un locus de TCR sin reordenar puede incluir segmentos génicos de la región variable de TCR, un gen de la región constante de TCR y elementos reguladores asociados (por ejemplo, promotores, potenciadores, *etc.*) que dirigen la recombinación V(D)J y la expresión de TCR. De modo similar, un locus CAR sin reordenar puede incluir segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina, un gen de la región constante de TCR y elementos reguladores asociados (por ejemplo, promotores, potenciadores, *etc.*) que dirigen la recombinación V(D)J y la expresión de CAR. Un locus puede ser endógeno o no endógeno. La expresión "*locus endógeno*" se refiere a una ubicación en un cromosoma en la que se encuentra naturalmente un elemento genético particular.

Los segmentos génicos de la región variable sin reordenar están "*operativamente unidos*" a un gen de la región constante contiguo si los segmentos génicos de la región variable sin reordenar son capaces de reordenarse para formar un gen de la región variable reordenado que se expresa junto con el gen de la región constante como una cadena polipeptídica de una proteína de unión a antígeno.

Las expresiones "*polinucleótido*" y "*ácido nucleico*" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir del análisis de enlace, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. En caso de estar presentes, pueden impartirse modificaciones a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como mediante conjugación con un componente de marcado. En todas las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, los nucleótidos U son intercambiables con los nucleótidos T.

Como se usa en el presente documento, "*unión específica*" y "especificidad de antígeno" se refieren a la capacidad de una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, un TCR, un CAR) para unirse a una diana predeterminada, como un antígeno predeterminado. Normalmente, una molécula de unión a antígeno se une específicamente a su diana predeterminada con una afinidad correspondiente a una  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, y se une a la diana predeterminada con una afinidad correspondiente a  $K_D$ , es decir, al menos 10 veces menos, al menos 100 veces menos o al menos 1000 veces menos que su  $K_D$  para una diana no específica y no relacionada (por ejemplo, BSA, caseína). En algunas realizaciones, una molécula de unión a antígeno se une específicamente a su diana predeterminada con una afinidad correspondiente a una  $K_D$  de unos  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M o menos o  $10^{-10}$  M o menos.

Como se usa en el presente documento, un "*receptor de linfocitos T*" o "*TCR*" se refiere a una proteína de unión a antígeno que incluye tanto un dominio de unión a antígeno TCR (por ejemplo, un dominio variable de TCR) como al menos una porción de un dominio constante de TCR. Como se usa en el presente documento, un "dominio constante" de un polipéptido de TCR incluye un dominio constante de TCR próximo a la membrana y también puede incluir un dominio transmembrana de TCR y/o una cola citoplásmica de TCR. Como se describe en el presente documento, el TCR puede ser un TCR soluble y no incluye un dominio transmembrana de TCR o una cola citoplásmica de TCR. Por ejemplo, en algunos aspectos, el TCR puede ser un dímero que incluye un primer polipéptido que comprende un dominio variable de TCR $\beta$  unido a un dominio constante de TCR $\beta$  (o un fragmento del mismo) y un segundo polipéptido que comprende un TCR $\alpha$  unido a un dominio constante de TCR $\alpha$  (o un fragmento del mismo).

La expresión "*sin reordenar*" incluye el estado de una inmunoglobulina, el locus de la región variable de TCR o CAR o los segmentos génicos de la región variable en donde los segmentos génicos V y los segmentos génicos J (para las regiones variables de TCR $\beta$  o pesadas, los segmentos génicos D también) se mantienen por separado, pero se pueden unir para formar un gen V(D)J reordenado (un "gen de la región variable") que comprende un solo V, (D), J del repertorio V(D)J.

### ***Animales no humanos genéticamente modificados y células ES***

En determinados aspectos, en el presente documento se describen animales no humanos y células ES que pueden comprender en su genoma un ácido nucleico exógeno que codifica TdT (por ejemplo, TdT humana, de ratón o rata). En determinados aspectos, el genoma de los roedores y las células ES pueden comprender modificaciones adicionales que incluyen, por ejemplo, modificaciones que dan como resultado la expresión de moléculas de unión a antígeno que tienen dominios variables humanos (por ejemplo, anticuerpos, TCR y/o CAR).

Los roedores genéticamente modificados y las células ES descritos en el presente documento pueden generarse usando cualquier método apropiado conocido en la técnica. Por ejemplo, las células ES de roedores que contienen modificaciones genéticas dirigidas se pueden generar usando tecnología VELOCIGENE®, que se describe en las patentes de EE. UU. N.º 6.586.251, 6.596.541, 7.105.348 y Valenzuela et al. (2003) "High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis" Nat. Biotech. 21(6): 652-659 y la publicación de patente de EE. UU. N.º US 2014/0310828. Las modificaciones dirigidas también se pueden realizar usando un sistema CRISPR/Cas, como describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 9.228.208 y las publicaciones de EE. UU. N.º US 2015-0159174 A1, US 2016-0060657 A1, US 2015-0376650 A1, US 2015-0376651 A1, US 2016-0046960 A1, US 2015-0376628 A1 y US 2016-0115486 A1. Las modificaciones dirigidas también se pueden realizar usando una meganucleasa, como describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 8.703.485, 8.530.214 y 8.624.000. Las modificaciones genéticas no dirigidas se pueden realizar usando métodos convencionales en la técnica, que incluyen, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE. UU. N.º 6.150.584, 6.114.598, 5.633.425, 7.501.552, 6.235.883, 6.998.514 y 5.776.773.

Las células ES descritas en el presente documento se pueden usar para generar un roedor usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células ES de ratón descritas en el presente documento se pueden usar para generar ratones genéticamente modificados usando el método VELOCIMOUSE®, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 7.294.754 y en Sheridan et al., *Nature Biotech* 25:91-99 (2007). Las células ES de rata se pueden usar para generar ratas modificadas usando el método descrito, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. N.º US 2014/0310828. Los ratones o ratas resultantes pueden ser homocigóticos. Pueden combinarse múltiples modificaciones distintas en un único organismo genéticamente modificado, ya sea mediante la cría de animales modificados por separado o mediante la introducción de modificaciones adicionales en una célula ES ya modificada (por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento).

Para roedores en los que no se dispone fácilmente de células ES modificables genéticamente adecuadas, se pueden emplear otros métodos para obtener un roedor que comprenda las modificaciones genéticas descritas en el presente documento. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, modificar un genoma de una célula no ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, tal como un oocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el oocito modificado) en un roedor en las condiciones adecuadas para formar un embrión.

En determinados aspectos, el roedor es un ratón, una rata o un hámster. En algunos aspectos, el roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En algunos aspectos, el roedor es de una familia seleccionada entre Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del nuevo mundo, campañoles), Muridae (por ejemplo, ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), Nesomyidae (por ejemplo, ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas de cola blanca, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú, y zokores). En algunos aspectos, el roedor se selecciona entre un ratón o rata auténtico (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso y una rata con cresta. En algunos aspectos, el ratón es un miembro de la familia Muridae. En algunos aspectos, el roedor se selecciona entre un ratón y una rata. En algunos aspectos, el roedor es un ratón.

En algunos aspectos, el roedor es un ratón de una cepa C57BL. En algunos aspectos, la cepa C57BL se selecciona de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En algunos aspectos, el roedor es un ratón de una cepa 129. En algunos aspectos, la cepa 129 seleccionada entre el grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2. En algunos aspectos, el ratón genéticamente modificado es una mezcla de una cepa 129 y una cepa C57BL. En algunos aspectos, el ratón es una mezcla de cepas 129 y/o una mezcla de cepas C57BL/6. En algunos aspectos, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En algunos aspectos, el ratón es una cepa BALB (por ejemplo, BALB/c). En algunos aspectos, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa (por ejemplo, una cepa C57BL y/o una cepa 129). En algunos aspectos, los roedores descritos en el presente documento puede ser un ratón derivado de cualquier combinación de las cepas anteriormente mencionadas.

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

#### **Roedores que expresan TdT exógena**

En determinados aspectos, en el presente documento se describen roedores genéticamente modificados y células ES que comprenden en su línea germinal y/o genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica una desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) exógena. La desoxinucleotidiltransferasa (TdT) es una ADN polimerasa que cataliza la adición de nucleótidos independientemente de molde (adiciones de NP) durante la formación de uniones en la recombinación V(D)J, lo que conduce a un aumento de la diversidad de antígeno-receptor en los linfocitos B y T. Las adiciones independientes de molde, las adiciones sin molde y las adiciones que no son de la línea germinal se

refieren a adiciones de nucleótidos catalizadas por TdT, y estos términos se usan en el presente documento indistintamente.

La secuencia de la TdT exógena en el genoma del roedor es humana. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico es la secuencia genómica de TdT (es decir, incluye exones e intrones). En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico codifica ARNm/ADNc de TdT (es decir, los exones de una o más isoformas de TdT).

La TdT humana (hTdT) está codificada por el gen *DNTT*, que se ubica en el cromosoma humano 10. Se pueden encontrar secuencias de un ADN genómico de hTdT ilustrativas en la posición 96304328 a 96338564 del número de acceso NCBI NC\_000010.11. La secuencia ilustrativa de ARNm de isoformas de hTdT es proporcionada por los números de acceso NM\_001017520.1 y NM\_004088.3 del NCBI. Las secuencias de proteínas codificadas por estas isoformas son proporcionadas por los números de acceso NP\_001017520.1 y NP\_004079.3 del NCBI, respectivamente. Entre las isoformas de TdT se encuentra una isoforma corta (hTdT<sub>S</sub>) y dos isoformas largas (hTdT<sub>L1</sub> y hTdT<sub>L2</sub>). Las secuencias de las tres isoformas se proporcionan, por ejemplo, en Thai y Kearney, *Adv. Immunol.* 86:113-36 (2005). En determinados aspectos, la secuencia de ácido nucleico exógena codifica hTdT<sub>S</sub>. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico exógena codifica hTdT<sub>L1</sub>. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico exógena codifica hTdT<sub>L2</sub>. En determinados aspectos, el roedor comprende secuencias de ácido nucleico exógenas que codifican múltiples isoformas (por ejemplo, tanto hTdT<sub>S</sub> como hTdT<sub>L2</sub>). En determinados aspectos, el roedor comprende secuencias de ácido nucleico exógenas que codifican las tres isoformas humanas (por ejemplo, tanto hTdT<sub>S</sub> como hTdT<sub>L2</sub>).

La TdT de ratón (mTdT) está codificada por el gen *Dntt*, que se encuentra en el cromosoma 19 del ratón. Se puede encontrar una secuencia de ADN genómico de mTdT ilustrativa en la posición 41029275 a 41059525 del número de acceso NCBI NC\_000085.6. Las secuencias ilustrativas de ARNm de isoformas de mTdT son proporcionadas por los números de acceso NM\_001043228.1 y NM\_009345.2 del NCBI. Las secuencias de proteínas codificadas por estas isoformas son proporcionadas por los números de acceso NP\_001036693.1 y NP\_033371.2 del NCBI, respectivamente.

La TdT de rata (rTdT) está codificada por el gen *Dntt*, que se encuentra en el cromosoma 1 de rata. Se puede encontrar una secuencia de ADN genómico ilustrativa de rTdT en la posición 260289626 a 260321174 del número de acceso NCBI NC\_005100.4. Una secuencia ilustrativa de ARNm de rTdT ilustrativa es proporcionada por el número de registro NCBI NM\_001012461.1. La secuencia de proteína codificada por este ARNm es proporcionada por el número de acceso NP\_001012479.1 del NCBI.

En algunos aspectos, el genoma del animal no humano genéticamente modificado contiene múltiples copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT exógena. En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado contiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT exógena. En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado contiene al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT exógena.

En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT humana se une operativamente a uno o más elementos de control transcripcional (por ejemplo, un promotor y/o un potenciador). En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un promotor constitutivo (es decir, ubicuo). Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, pero sin limitación, un SV40, un promotor de CMV, un promotor adenoviral, un promotor de EF1, un promotor de  $\beta$ -actina, un promotor de EGR1, un promotor de eIF4A1, un promotor de FerH, un promotor de FerL, un promotor de GAPDH, un promotor de GRP78, un promotor de GRP94, un promotor de HSP70, un promotor de  $\beta$ -Kin, un promotor de PGK-1, un promotor de ROSA y un promotor de Ubiquitina B. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico no se une operativamente a un promotor constitutivo.

En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional induce la expresión de la TdT codificada durante el desarrollo de los linfocitos B. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional induce la expresión de TdT en pro-linfocitos B y/o pre-linfocitos B. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor y/o potenciador) de un gen expresado durante el desarrollo de los linfocitos B, en pro-linfocitos B y/o en pre-linfocitos B. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional de RAG1, un elemento de control transcripcional de RAG2, un elemento de control transcripcional de cadena pesada de inmunoglobulina, un elemento de control transcripcional de la cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina y/o un elemento de control transcripcional de la cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional de ratón, un elemento de control transcripcional de rata o un elemento de control transcripcional humano. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional endógeno (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la TdT exógena se inserta en el genoma del animal no humano en una posición de modo que la expresión de la TdT exógena está controlada al menos parcialmente por un elemento de control transcripcional endógeno). En algunos aspectos, los elementos de control transcripcional pueden incluir aquellos que regulan la transcripción de: RAG1, RAG2,  $\lambda$ 5, VpreB, CD34, CD45, AA4.1, CD45R, IL-7R, MHC de clase II, CD10, CD19, CD38, CD20, CD40,



diferentes promotores y potenciadores de segmentos génicos V de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, una lista de diferentes segmentos génicos V enumerados en el sitio web del "International Immunogenetics Information System"® - IMGT, [imgt.org](http://imgt.org), por ejemplo, promotor de V<sub>H</sub>1-72 de ratón y otros, etc.). Los elementos de control transcripcional pueden incluir los de origen humano, ratón, rata, u otras especies.

En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional induce la expresión de la TdT codificada durante el desarrollo de los linfocitos T. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional induce la expresión de TdT en timocitos doble negativos (DN) para CD4/CD8 y/o timocitos doble positivos (DP) para CD4/CD8. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional (por ejemplo, un promotor y/o potenciador) de un gen expresado durante el desarrollo de linfocitos T, en timocitos DN y/o en timocitos DP. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional de RAG1, un elemento de control transcripcional de RAG2, un elemento de control transcripcional de TCR $\alpha$ , un elemento de control transcripcional de TCR $\beta$ , un elemento de control transcripcional de TCR $\gamma$  y/o un elemento de control transcripcional de TCR $\delta$ . En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional de ratón, un elemento de control transcripcional de rata o un elemento de control transcripcional humano. En algunos aspectos, el elemento de control transcripcional es un elemento de control transcripcional endógeno (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la TdT exógena se inserta en el genoma del animal no humano en una posición de modo que la expresión de la TdT exógena está controlada al menos parcialmente por un elemento de control transcripcional endógeno). En algunos aspectos, los elementos de control transcripcional pueden incluir aquellos que regulan la transcripción de: RAG1, RAG2, Lck, ZAP-70, CD34, CD2, HSA, CD44, CD25, PT $\alpha$ , CD4, CD8, CD69, diferentes promotores y potenciadores de segmentos génicos V de TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  y TCR $\gamma$  V (véase, por ejemplo, una lista de diferentes segmentos génicos V enumerados en el sitio web del "International Immunogenetics Information System"® - IMGT, [imgt.org](http://imgt.org), etc.) Los elementos de control transcripcional pueden incluir los de origen humano, ratón, rata, u otras especies.

En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica la TdT está ubicado en el genoma del roedor en o próximo a (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 kb) un locus genómico de un gen que se expresa durante el desarrollo de los linfocitos B, en pro-linfocitos B y/o en pre-linfocitos B. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica TdT está ubicada en o próxima a un locus de la cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina, un locus de la cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina, un locus de la cadena pesada de inmunoglobulina, un locus de RAG1 o un locus de RAG2.

En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica la TdT está ubicado en el genoma del roedor en o próximo a (por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 kb) un locus genómico de un gen que se expresa durante desarrollo de los linfocitos T, en timocitos DN y/o en timocitos DP. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica TdT está ubicada en o próxima a un locus de la cadena TCR $\alpha$ , un locus de la cadena TCR $\beta$ , un locus de la cadena TCR $\gamma$ , un locus de la cadena TCR $\delta$ , un locus de RAG1 o un locus de RAG2.

En algunos aspectos, el roedor descrito en el presente documento expresa niveles elevados de expresión de TdT durante una o más fases del desarrollo de los linfocitos T y/o los linfocitos B (por ejemplo, en pro-linfocitos B, en pre-linfocitos B, en timocitos DN y/o en timocitos DP) en comparación con un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifique una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, los roedores genéticamente modificados que se describen en el presente documento expresan al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 100 %, el 150 %, el 200 %, el 250 %, el 300 %, el 350 %, el 400 %, el 450 % o el 500 % más de TdT en una o más fases de desarrollo de los linfocitos T y/o linfocitos B que un roedor correspondiente.

En todos los siguientes aspectos, el animal no humano es un roedor. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos







cadena TCR $\alpha$  V-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de la cadena TCR $\alpha$  V-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias de CDR3 de TCR $\alpha$  únicas que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %.

[illegible]







cadena TCRδ D-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de la cadena TCRδ D-J que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena TCRδ D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de la cadena TCRδ D-J en el animal comprenden adiciones sin molde.

En algunos aspectos, los loci endógenos de TdT en el organismo no humano están intactos. En algunos aspectos, los loci TdT endógenos están inactivados. Por ejemplo, en algunos aspectos, los loci endógenos de TdT se eliminan en su totalidad o en parte de modo que el organismo no humano no expresa TdT endógena.

## Roedores que expresan anticuerpos humanos de dominio variable y TdT exógena

En determinados aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES de animales no humanos que comprenden TdT exógena como se describe en el presente documento también comprenden en su línea germinal y/o genoma un locus de inmunoglobulina (exógeno o endógeno) que contiene una región variable de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar y una región constante de inmunoglobulina que comprende un gen de la región constante de inmunoglobulina y en el que los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar están unidos operativamente al gen de la región constante de inmunoglobulina. En algunos aspectos, los animales no humanos y las células ES no humanas comprenden en su línea germinal y/o genoma múltiples loci de inmunoglobulina de este tipo. Por ejemplo, en algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES de animal no humano comprenden en su línea germinal y/o genoma al menos un locus de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de cadena pesada humanos sin reordenar y al menos un locus de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de cadena ligera humanos sin reordenar (por ejemplo, segmentos génicos de la cadena  $\kappa$  y/o segmentos génicos de la cadena  $\lambda$ ). En algunos aspectos, las células ES de animal no humano y de animales no humanos genéticamente modificados comprenden en su línea germinal y/o genoma al menos un locus de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de cadena pesada humana sin reordenar, al menos un locus de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de la cadena  $\kappa$  humanos sin reordenar y al menos un locus de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de la cadena  $\lambda$  humanos sin reordenar. En algunos aspectos, un animal no humano genéticamente modificado, por ejemplo, ratones o ratas genéticamente modificados, comprenden en su línea germinal y/o genoma loci de inmunoglobulina genéticamente modificados (loci de inmunoglobulina reordenados o sin reordenar genéticamente modificados) de tal modo que los ratones producen anticuerpos humanos, humanizados, parcialmente humanos, quiméricos inversos (regiones variables humanas y constantes no humanas).



Los loci de inmunoglobulina que comprenden segmentos génicos de la región variable humanos se conocen en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 5,633,425, 5,770,429, 5,814,318, 6,075,181, 6,114,598, 6,150,584, 6,998,514, 7,795,494, 7,910,798, 8,232,449, 8,502,018, 8,697,940, 8,703,485, 8,754,287, 8,791,323, 8,907,157, 9,035,128, 9,145,588, y 9,206,263, así como las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2008/0098490, 2010/0146647, 2011/0195454, 2012/0167237, 2013/0145484, 2013/0167256, 2013/0219535, 2013/0326647, 2013/0096287, 2014/013275, 2014/093908, y 2015/0113668, y en las publicaciones PCT N.º WO2007117410, WO2008151081, WO2009157771, WO2010039900, WO2011004192, WO2011123708 y WO2014093908.

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar son segmentos génicos de cadena pesada y el gen de la región constante de inmunoglobulina es un gen de la región constante de cadena pesada. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina sin reordenar son segmentos génicos de cadena ligera, por ejemplo, la cadena  $\kappa$  y el gen de la región constante de inmunoglobulina es un gen de la región constante de cadena pesada.

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar son segmentos génicos de cadena pesada y el gen de la región constante de inmunoglobulina es un gen de la región constante de cadena  $\kappa$ . En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar son segmentos génicos de la cadena  $\lambda$  y el gen de la región constante de inmunoglobulina es un gen de la región constante de la cadena  $\kappa$ . En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar son segmentos génicos de la cadena  $\lambda$  y el gen de la región constante de inmunoglobulina es un gen de la región constante de la cadena  $\lambda$ .

En determinados aspectos, la región variable de inmunoglobulina contiene segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de Ig humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de Ig humanos sin reordenar comprenden una pluralidad de segmentos  $V_H$  humanos sin reordenar, uno o más segmentos  $D_H$  humanos y uno o más segmentos  $J_H$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de Ig humanos sin reordenar comprenden al menos 3 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 18 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 20 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 30 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 40 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 50 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 60 segmentos génicos  $V_H$ , al menos 70 segmentos génicos  $V_H$  o al menos 80 segmentos génicos  $V_H$ . En algunos aspectos, los segmentos génicos de Ig humanos sin reordenar incluyen todos los segmentos génicos  $D_H$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de Ig humanos sin reordenar incluyen todos los segmentos génicos  $J_H$  humanos. Regiones variables ilustrativas que comprenden segmentos génicos de cadena pesada de Ig se proporcionan, por ejemplo, en Macdonald et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:5147-52 e información complementaria. En algunos aspectos, los animales no humanos descritos en el presente documento tienen un locus de cadena pesada de inmunoglobulina restringido caracterizado por un único segmento génico  $V_H$  humano polimórfico, una pluralidad de segmentos génicos  $D_H$  y una pluralidad de segmentos génicos  $J_H$  (por ejemplo, como se describe en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2013/0096287). En algunos aspectos el segmento génico  $V_H$  es VH1-2 o VH1-69.

En diferentes aspectos, las modificaciones del locus de inmunoglobulina descritas en el presente documento no afectan a la fertilidad del animal no humano. En algunos aspectos, el locus de la cadena pesada comprende un gen *Adam6a* endógeno, gen *Adam6b*, o ambos, y la modificación genética no afecta a la expresión y/o función del gen *Adam6a* endógeno, gen *Adam6b*, o ambos. En algunos aspectos, el genoma del animal no humano genéticamente modificado comprende un gen *Adam6a* ubicado ectópicamente, gen *Adam6b*, o ambos. Animales no humanos ilustrativos que expresan *Adam6a* y/o *Adam6b* exógenos se describen en las patentes de EE. UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940.

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos B para generar genes de la región variable de cadena pesada humanos reordenados en los linfocitos B del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de cadena

pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente por al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el correspondiente animal no humano en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el correspondiente animal no humano en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el correspondiente animal no humano en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias únicas de CDR3 de cadena pesada de inmunoglobulina que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %.

En determinados aspectos, la región variable de inmunoglobulina contiene segmentos génicos de la región variable  $\kappa$  de Ig humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden una pluralidad de segmentos  $V_{\kappa}$  humanos y uno o más segmentos  $J_{\kappa}$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden todos los segmentos  $J_{\kappa}$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina comprenden cuatro segmentos  $V_{\kappa}$  funcionales y todos los segmentos  $J_{\kappa}$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina comprenden 16 segmentos  $V_{\kappa}$  funcionales y todos los segmentos  $J_{\kappa}$  humanos (por ejemplo, todos los segmentos  $V_{\kappa}$  y los segmentos  $J_{\kappa}$  humanos funcionales). En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden la totalidad de los segmentos  $V_{\kappa}$  humanos y todos los segmentos  $J_{\kappa}$  humanos. Regiones variables ilustrativas que comprenden segmentos génicos de  $\kappa$  de Ig se proporcionan, por ejemplo, en Macdonald et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:5147-52 e información complementaria. En algunos aspectos, los animales no humanos proporcionados en el presente documento tienen un locus de cadena ligera de inmunoglobulina restringido caracterizado por no más de dos segmentos génicos  $V_L$  humanos y una pluralidad de segmentos génicos  $J_L$  (por ejemplo, ratones de doble cadena ligera o DLC, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 2013/0198880). En algunas realizaciones, los segmentos génicos  $V_L$  son segmentos génicos  $V_{\kappa}$ . En algunas realizaciones, los segmentos génicos  $V_L$  son segmentos génicos  $V_{\lambda}$ . En algunos aspectos, los segmentos génicos  $V_{\kappa}$  son IGKV3-20 e IGKV1-39.

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable  $\kappa$  de inmunoglobulina humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos B para generar genes de la región variable  $\kappa$  humanos reordenan en los linfocitos B del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunas realizaciones, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente

que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias únicas de CDR3 de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene al menos 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 o 1700 secuencias únicas de CDR3 de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina por 10.000 secuencias de CDR3 de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina.

En determinados aspectos, la región variable de inmunoglobulina contiene segmentos génicos de la región variable  $\lambda$  de Ig humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden una pluralidad de segmentos  $V_\lambda$  humanos y uno o más segmentos  $J_\lambda$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden todos los segmentos  $V_\lambda$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden todos los segmentos  $J_\lambda$  humanos. Regiones variables ilustrativas que comprenden segmentos génicos de  $\lambda$  de Ig se proporcionan en, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. N.º 2012/0073004 y 2002/0088016).

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable  $\lambda$  de inmunoglobulina humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos B para generar genes de la región variable  $\lambda$  humanos reordenados en los linfocitos B del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano

descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunas realizaciones, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal puede comprender adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias únicas de CDR3 de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene al menos 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 secuencias CDR3 únicas de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina por 10.000 secuencias de CDR3 de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina.

En algunos aspectos, la región variable de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar también incluye secuencias intergénicas de la región variable de inmunoglobulina humanas. En algunos aspectos, la región variable de inmunoglobulina incluye secuencias intergénicas de la región variable de Ig no humanas (por ejemplo, roedor, rata, ratón). En algunos aspectos, la secuencia intergénica es de origen de especies endógenas.

En algunos aspectos, el organismo no humano comprende en su línea germinal y/o genoma un locus de inmunoglobulina que comprende una región variable de cadena pesada reordenada (una región variable de cadena pesada universal). En algunos aspectos, el gen de la región variable de cadena pesada de Ig reordenado es un gen de la región variable de cadena pesada de Ig reordenado humano. Regiones variables de cadena pesada de Ig reordenadas ilustrativas se proporcionan en la publicación de patente de EE. UU. No. 2014/0245468. En algunos aspectos, el organismo no humano que comprende una región variable de cadena pesada universal se usa para producir anticuerpos biespecíficos.

En algunos aspectos, el organismo no humano comprende en su línea germinal y/o genoma un locus de inmunoglobulina que comprende una región variable de cadena ligera reordenada (una región variable de cadena ligera universal). En algunos aspectos, el gen de la región variable de cadena ligera de Ig reordenada es un gen de la región variable de cadena ligera de Ig reordenada humano. Regiones variables de cadena ligera de Ig reordenadas ilustrativas se proporcionan en, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2011/0195454, 2012/0021409, 2012/0192300, 2013/0045492, 2013/0185821, 2013/0302836, 2015/0313193, 2015/0059009 y 2013/0198879. En algunos aspectos, el organismo no humano (organismo de "cadena ligera universal") que comprende una región variable de cadena ligera universal se usa para producir anticuerpos biespecíficos.

En algunos aspectos, el organismo no humano comprende en su línea germinal y/o genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera que comprende un repertorio limitado de segmentos génicos variables de cadena ligera (por ejemplo, una región variable de cadena ligera doble que comprende dos segmentos génicos variables de cadena ligera). En algunos aspectos, los segmentos génicos variables de cadena ligera en el repertorio limitado de segmentos génicos de cadena ligera son segmentos génicos de cadena ligera humanos. Regiones variables de cadena ligera dobles ilustrativas se proporcionan en la publicación de patente de EE. UU. No. 2013/0198880. En algunos aspectos, el organismo no humano que comprende una región variable de cadena ligera doble se usa para

producir anticuerpos biespecíficos.

En otros aspectos más, el organismo no humano puede comprender en su línea germinal y/o genoma un locus de inmunoglobulina de cadena ligera y/o de cadena pesada que incluye inserciones y/o sustituciones de codones de histidina diseñados para introducir propiedades de unión dependientes del pH a los anticuerpos generados en dicho organismo no humano. En algunos de dichos aspectos, los codones de histidina se insertan y/o sustituyen en las secuencias de ácido nucleico que codifican CDR3. Varios de dichos loci de ligera y pesada de inmunoglobulina se proporcionan en las patentes de EE. UU. N.º 9.301.510, 9.334.334, las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2013/0247236, 20140013456.

En algunos aspectos, la región constante de inmunoglobulina comprende un gen de la región constante de cadena pesada. En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena pesada es un gen de la región constante de cadena pesada humano. En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena pesada es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena pesada es un gen de la región constante de ratón o un gen de la región constante de rata. En algunos aspectos, el gen de la región constante es una mezcla de secuencia humana y no humana. Por ejemplo, en algunos aspectos, el gen de la región constante codifica una región CH1 humana y una región CH2 y/o CH3 no humana (por ejemplo, origen de especies endógenas, ratón, rata). En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena pesada es un gen de la región constante de C $\mu$ , C $\delta$ , C $\gamma$  (C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4), C $\alpha$  o C $\epsilon$ . En algunos aspectos, el gen de la región constante es un gen de la región constante endógeno. En algunos aspectos, el gen de la región constante codifica una región CH1 mutada de modo que el animal no humano exprese solo anticuerpos de cadena pesada (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 8.754.287, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2015/0289489). En algunos aspectos, por ejemplo, donde el objetivo es generar cadenas pesadas para producir anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, en organismos de cadena ligera universal o doble), los dominios Fc de las cadenas pesadas comprenden modificaciones para facilitar la formación de heterodímero de cadena pesada y/o para inhibir la formación de homodímero de cadena pesada. Dichas modificaciones se proporcionan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 5.731.168, 5.807.706, 5.821.333, 7.642.228 y 8.679.785 y en las publicaciones de patente de EE. UU. No. 2013/0195849.

En algunos aspectos, la región constante de inmunoglobulina comprende un gen de la región constante de cadena ligera. En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena ligera es un gen de la región constante  $\kappa$ . En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena ligera es un gen de la región constante  $\lambda$ . En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena ligera es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena ligera es un gen de región constante de ratón o un gen de la región constante de rata. En algunos aspectos, el gen de la región constante de cadena ligera es una mezcla de secuencia humana y no humana.

En algunos aspectos, la región variable de inmunoglobulina que comprende segmentos génicos de la región variable humanos y el gen de la región constante de inmunoglobulina al que se unen operativamente los segmentos génicos de la región variable están ubicados en un locus de inmunoglobulina endógeno. En algunos aspectos, el locus de inmunoglobulina endógeno es un locus de cadena pesada endógeno. En algunos aspectos, el locus de inmunoglobulina endógeno es un locus  $\kappa$  endógeno. En algunos aspectos, el locus de inmunoglobulina endógeno es un locus  $\lambda$  endógeno. En algunos aspectos, el gen de la región constante al que se unen operativamente los segmentos génicos de la región variable humanos es un gen de la región constante endógeno.

En algunos aspectos, uno o más de los loci endógenos de inmunoglobulina o una porción de uno o más locus endógenos (por ejemplo, una región variable y/o una región constante) en el genoma del animal no humano proporcionado en el presente documento están inactivados. Los loci del gen de la región variable de inmunoglobulina endógenos y porciones de los mismos se pueden inactivar usando cualquier método conocido en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la delección del locus o una porción del mismo del genoma del organismo, la sustitución de un locus o una porción del mismo con una secuencia de ácido nucleico diferente, la inversión de una porción del locus y/o el desplazamiento de una porción del locus a otra posición en el genoma del organismo no humano. En algunos aspectos, la inactivación del locus es solo una inactivación parcial. En algunos aspectos, la región variable del locus está inactiva, pero la región constante permanece funcional (por ejemplo, porque está unida operativamente a segmentos génicos de la región variable no endógenos).

En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado incluye un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno inactivado. En algunos aspectos, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno o una porción del mismo se inactiva por delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión de al menos parte de la región variable endógena del locus de cadena pesada endógeno. En algunos aspectos, la al menos parte de la región variable del locus de cadena pesada endógeno que se somete a delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión comprende los segmentos J de la región variable. En algunos aspectos, el locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno o una porción del mismo se inactiva por delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión de al menos parte de la región constante endógena del locus de cadena pesada endógeno. En algunos aspectos, la al menos parte de la región constante del locus de cadena pesada endógeno que se somete a delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión puede comprender el gen de C $\mu$  de la región constante endógena.

En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado incluye un locus de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno inactivado. En algunos aspectos, el locus de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno o una porción del mismo se inactiva por delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión de al menos parte de la región variable endógena del locus de la cadena  $\kappa$  endógeno. En algunos aspectos, la al menos parte de la región variable del locus de la cadena  $\kappa$  endógeno que se somete a delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión comprende los segmentos J de la región variable. En algunos aspectos, el locus de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina endógeno o porción del mismo se inactiva por delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión de al menos parte de la región constante endógena del locus de la cadena  $\kappa$  endógeno. En algunos aspectos, la al menos parte de la región constante del locus de la cadena  $\kappa$  endógeno que se somete a delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión comprende el gen de C $\kappa$  de la región constante endógena.

En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado incluye un locus de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno inactivado. En algunos aspectos, el locus de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno o una porción del mismo se inactiva por delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión de al menos parte de una región variable endógena del locus de la cadena  $\lambda$  endógeno. En algunos aspectos, la al menos parte de al menos un grupo de genes V-J-C en el locus de la cadena  $\lambda$  endógeno se somete a delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión. En algunos aspectos, el locus de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina endógeno o porción del mismo se inactiva por delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión de al menos parte de una región constante endógena del locus de la cadena  $\lambda$  endógeno. En algunos aspectos, la al menos parte de la región constante del locus de la cadena  $\lambda$  endógeno que se somete a delección, sustitución, desplazamiento y/o inversión comprende un gen de C $\lambda$  de la región constante endógena.

En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado proporcionado en el presente documento expresa anticuerpos que tienen dominios variables humanos (por ejemplo, un dominio variable humano derivado de los segmentos génicos de la región variable humanos sin reordenar descritos en el presente documento). En algunos aspectos, el dominio variable humano es un dominio variable de cadena pesada humano. En algunos aspectos, los anticuerpos son sólo anticuerpos de cadena pesada. En algunos aspectos, el dominio variable humano es un dominio variable de cadena ligera humano. En algunos aspectos, los anticuerpos producidos por los animales no humanos tienen dominios variables de cadena pesada humanos y dominios variables de cadena ligera humanos. En algunos aspectos, los anticuerpos tienen dominios constantes de cadena pesada humanos. En algunos aspectos, los anticuerpos tienen dominios constantes de cadena ligera humanos. En algunos aspectos, el dominio constante de cadena pesada y/o ligera es de origen no humano. Por ejemplo, en algunos aspectos, el dominio de región constante de cadena pesada es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el dominio constante de cadena pesada es de origen de ratón o rata. En algunos aspectos, el dominio de la región constante de cadena ligera es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el dominio constante de cadena ligera es de origen de rata o ratón.

#### **Roedores que expresan receptores de linfocitos T de dominio variable humanos y TdT exógena**

En determinados aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES de animales no humanos que comprenden TdT exógena como se describe en el presente documento también comprenden en su línea germinal y/o genoma un locus de TCR (exógeno o endógeno) que contiene una región variable de TCR que comprende segmentos génicos de la región variable de TCR humanos sin reordenar y una región constante de TCR que comprende un gen de la región constante de TCR y en el que los segmentos génicos de la región variable de TCR humanos sin reordenar están unidos operativamente al gen de la región constante de TCR. En algunos aspectos, diferentes animales no humanos genéticamente modificados, por ejemplo, ratones genéticamente modificados, comprenden en su línea germinal y/o genoma loci de receptores de linfocitos T genéticamente modificados (loci de TCR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y/o  $\delta$  genéticamente modificados) de modo que los ratones expresan receptores de linfocitos T humanos, humanizados, parcialmente humanos, quiméricos inversos (regiones variables humanas y constantes no humanas). En un aspecto, el animal no humano ilustrativo se proporciona en la patente de EE. UU. N.º 9.113.616 y la publicación internacional N.º WO 2016/164492.

En algunos aspectos, el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de TCR no humano. En algunos aspectos, el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de roedores, tal como un gen de la región constante de rata o un gen de la región constante de ratón. En algunos aspectos, el gen de la región constante es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante humano.

En algunos aspectos, los animales no humanos y las células ES no humanas comprenden en su línea germinal y/o genoma múltiples loci de TCR de este tipo. Por ejemplo, en algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES de animales no humanos pueden comprender en su línea germinal y/o genoma al menos un locus de TCR que comprende segmentos génicos de la región variable de TCR $\alpha$  sin reordenar y al menos un locus de TCR que comprende segmentos génicos de la región variable de TCR $\beta$  sin reordenar. En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES de animales no humanos pueden comprender en su línea germinal y/o genoma al menos un locus de TCR que comprende segmentos génicos de la región variable de TCR $\gamma$  humanos sin reordenar y al menos un locus de TCR que comprende segmentos génicos de la región variable de TCR $\delta$  humanos sin reordenar.

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de TCR humano sin reordenar son segmentos génicos de TCR $\alpha$  y el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de TCR $\alpha$ . En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de TCR humanos sin reordenar son segmentos génicos de la cadena de TCR $\beta$  y el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de TCR $\beta$ . En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de TCR humanos sin reordenar son segmentos génicos de la cadena de TCR $\gamma$  y el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de TCR $\gamma$ . En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de TCR humano sin reordenar son segmentos génicos de la cadena de TCR $\delta$  y el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de TCR $\delta$ . Regiones variables ilustrativas que comprenden segmentos génicos de TCR humanos se proporcionan, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 9.113.616 y Li et al., *Nature Medicine* 16:1029-1035(2010).

En algunos aspectos, la región variable de TCR contiene segmentos génicos de la región variable de TCR $\beta$  humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de TCR $\beta$  humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos T para generar genes de la región variable de TCR $\beta$  humanos reordenados en los linfocitos T del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de TCR $\beta$  V-D que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de TCR $\beta$  V-D y/o D-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias de CDR3 de TCR $\beta$  únicas que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %.

En algunos aspectos, la región variable de TCR contiene segmentos génicos de la región variable del TCR $\alpha$  humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de TCR $\alpha$  humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos T para generar genes de la región variable de TCR $\alpha$  humanos reordenados en los linfocitos T del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCR $\alpha$  V-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCR $\alpha$  V-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos







y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCRδ V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCRδ V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCRδ V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCRδ V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCRδ V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCRδ V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de TCRδ V-D y/o D-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias de CDR3 de TCRδ únicas que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %.

En algunos aspectos, la región variable de TCR contiene segmentos génicos de la región variable de TCRy humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de TCRy humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos T para generar genes de la región variable de TCRy humanos reordenados en los linfocitos T del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones TCRy V-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCRy V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de TCRy V-D que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCRy V-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de TCRy V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCRy V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCRy V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCRy V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de TCRy V-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de TCRy V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de TCRy V-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias de CDR3 de TCRy únicas que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %.

En algunos aspectos, la región variable de TCR que comprende segmentos génicos de la región variable de TCR humanos sin reordenar también incluye secuencias intergénicas de la región variable de TCR humanas. En algunos aspectos, la región variable de TCR incluye secuencias intergénicas de la región variable de TCR no humanas (por ejemplo, roedor, rata, ratón). En algunos aspectos, las secuencias intergénicas es de origen de especie endógena.

5 En algunos aspectos, la región variable de TCR que comprende segmentos génicos de la región variable humanos y el gen de la región constante de TCR al que se unen operativamente los segmentos génicos de la región variable están ubicados en un locus de TCR endógeno. En algunos aspectos, el locus de TCR endógeno es un locus de TCR $\alpha$  endógeno. En algunos aspectos, el locus de TCR endógeno es un locus de TCR $\beta$  endógeno. En algunos aspectos, el locus de TCR endógeno es un locus de TCR $\gamma$  endógeno. En algunos aspectos, el locus de TCR endógeno es un locus de TCR $\delta$  endógeno. En algunos aspectos, el gen de la región constante al que se unen operativamente los segmentos génicos de la región variable humanos es un gen de la región constante endógeno, por ejemplo, la región constante endógena correspondiente.

15 En algunos aspectos, uno o más de los loci de TCR endógenos o una porción de uno o más loci endógenos (por ejemplo, una región variable y/o una región constante) en el genoma del animal no humano descrito en el presente documento están inactivados. Los loci del gen de la región variable de TCR endógenos y porciones de los mismos se pueden inactivar usando cualquier método conocido en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la delección del locus o una porción del mismo del genoma del organismo, la sustitución de un locus o una porción del mismo con una secuencia de ácido nucleico diferente, la inversión de una porción del locus y/o el desplazamiento de una porción del locus a otra posición en el genoma del organismo no humano. En algunos aspectos, la inactivación del locus es solo una inactivación parcial. En algunos aspectos, la región variable del locus está inactiva, pero la región constante permanece funcional (por ejemplo, porque está unida operativamente a segmentos génicos de la región variable no endógenos). Ejemplos de loci de TCR inactivados se describen, por ejemplo, en Mombaerts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3084-3087 (1991) y Mombaerts et al., *Nature* 390:225-231 (1992).

En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento expresa TCR que tiene dominios variables humanos (por ejemplo, un dominio variable humano derivado de los segmentos génicos de la región variable humanos sin reordenar descritos en el presente documento). En algunos aspectos, el dominio variable humano es un dominio variable de TCR $\alpha$  humano. En algunos aspectos, el dominio variable humano puede ser un dominio variable de TCR $\beta$  humano. En algunos aspectos, el dominio variable humano es un dominio variable de TCR $\gamma$  humano. En algunos aspectos, el dominio variable humano es un dominio variable de TCR $\delta$  humano. En algunos aspectos, el TCR producido por los animales no humanos tiene tanto dominios variables de TCR $\alpha$  humanos como dominios variables de TCR $\beta$  humanos. En algunos aspectos, el TCR producido por los animales no humanos puede tener tanto dominios variables de TCR $\gamma$  humano como dominios variables de TCR $\delta$  humano. En algunos aspectos, el TCR producido por los animales no humanos tiene dominios variables de TCR $\alpha$  humanos y dominios variables de TCR $\beta$  humanos, y dominios variables de TCR $\gamma$  humanos y dominios variables de TCR $\delta$  humanos. En algunos aspectos, los TCR tienen dominios constantes humanos. En algunos aspectos, los dominios constantes son de origen no humano. Por ejemplo, en algunos aspectos, los dominios constantes son de origen de especie endógena.

40 En algunos aspectos, los dominios constantes son de origen de ratón o rata.

#### Roedores que expresan receptores de antígeno quimérico (CAR) y TdT exógena

En determinados aspectos, en el presente documento se describen animales no humanos genéticamente modificados y células ES de animales no humanos que comprenden TdT exógena como se describe en el presente documento que también comprenden loci de receptor de antígeno quimérico (CAR). Dichos loci de CAR generalmente comprenden una región variable y una región constante. La región variable incluye segmentos génicos de la región variable de Ig humanos sin reordenar, mientras que el locus de la región constante incluye un gen de la región constante de TCR, en donde los segmentos génicos de la región variable de Ig están ligados operativamente al gen de la región constante. En algunos aspectos, el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de TCR no humano. En algunos aspectos, el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante de roedores, tal como un gen de la región constante de rata o un gen de la región constante de ratón. En algunos aspectos, el gen de la región constante es de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el gen de la región constante de TCR es un gen de la región constante humano.

55 En algunos aspectos, los loci de CAR descritos en el presente documento están ubicados en loci de TCR endógenos. Por ejemplo, en algunos aspectos, un locus de CAR que comprende un gen de la región constante de TCR $\alpha$  se ubica en un locus de la región constante de TCR $\alpha$  endógeno. En algunos aspectos, dicho locus se crea sustituyendo parte o la totalidad de la región variable sin reordenar de TCR $\alpha$  con una región variable de Ig sin reordenar. En algunos aspectos, un locus de CAR que comprende un gen de la región constante de TCR $\beta$  está ubicado en un locus de la región constante de TCR $\beta$  endógeno. En algunos aspectos, dicho locus se crea sustituyendo parte o la totalidad de la región variable sin reordenar de TCR $\beta$  con una región variable de Ig sin reordenar.

65 En determinados aspectos, el locus de la región variable de CAR contendrá segmentos génicos de la región variable de Ig humanos sin reordenar. En la técnica se han descrito loci de la región variable ilustrativos que comprenden segmentos génicos de la región variable humanos. Por ejemplo, dichos loci se describen en las patentes de EE. UU.

N.º 5.633.425, 5.770.429, 5.814.318, 6.075.181, 6.114.598, 6.150.584, 6.998.514, 7.795.494, 7.910.798, 8.232.449, 8.502.018, 8.697.940, 8.703.485, 8.754.287, 8.791.323, 8.907.157, 9.035.128, 9.145.588, y 9.206.263, así como las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2008/0098490, 2010/0146647, 2011/0195454, 2012/0167237, 2013/0145484, 2013/0167256, 2013/0219535, 2013/0326647, 2014/013275, 2014/093908, 2015/0113668 y 2016/0081314, y en las publicaciones PCT N.º WO2007117410, WO2008151081, WO2009157771, WO2010039900, WO2011004192, WO2011123708, WO2014093908 y WO2016/044745.

En determinados aspectos, el locus de la región variable de CAR contiene segmentos génicos de la región variable de la cadena pesada de Ig humana sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de Ig humanos sin reordenar comprenden una pluralidad de segmentos V<sub>H</sub> humanos sin reordenar, uno o más segmentos D<sub>H</sub> humanos y uno o más segmentos J<sub>H</sub> humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de Ig humanos sin reordenar comprenden al menos 3 segmentos génicos V<sub>H</sub>, al menos 18 segmentos génicos V<sub>H</sub>, al menos 20 segmentos génicos V<sub>H</sub>, al menos 30 segmentos génicos V<sub>H</sub>, al menos 40 segmentos génicos V<sub>H</sub>, al menos 50 segmentos génicos V<sub>H</sub>, al menos 60 segmentos génicos V<sub>H</sub>, al menos 70 segmentos génicos V<sub>H</sub> o al menos 80 segmentos génicos V<sub>H</sub>. En algunos aspectos, los segmentos génicos de Ig humanos sin reordenar incluyen todos los segmentos génicos D<sub>H</sub> humanos. En algunos aspectos, la región variable de CAR comprende además segmentos génicos de la región variable de TCRβ (por ejemplo, segmentos génicos V, D y/o J). En un aspecto, la región variable de CAR comprende además segmentos génicos Vβ de TCR distales, por ejemplo, el segmento génico Vβ31 de TCR. En otro aspecto, los segmentos génicos Vβ de TCR distales, por ejemplo, el segmento génico Vβ31 de TCR, funcionalmente se han inactivado o sometido a delección. En algunos aspectos, los segmentos génicos de Ig humanos sin reordenar incluyen todos los segmentos génicos J<sub>H</sub> humanos. Regiones variables ilustrativas que comprenden segmentos génicos de cadena pesada de Ig se proporcionan, por ejemplo, en Macdonald et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:5147-52 e información complementaria.

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos T para generar genes de la región variable de cadena pesada humanos reordenados en los linfocitos T del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente por al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el correspondiente animal no humano en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el correspondiente animal no humano en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el correspondiente animal no humano en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no

humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena pesada de inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de cadena pesada de

inmunoglobulina V-D y/o D-J en el animal puede comprender adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias únicas de CDR3 de cadena pesada de inmunoglobulina que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %.

En algunos aspectos, el locus del gen variable de CAR que comprende segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de Ig humanos sin reordenar también puede incluir secuencias intergénicas de la región variable de cadena pesada de Ig humanas. En algunos aspectos, el locus del gen variable de CAR incluye secuencias intergénicas de la región variable de cadena pesada de Ig no humanas (por ejemplo, roedor, rata, ratón). En algunos aspectos, el locus del gen variable de CAR incluye secuencias intergénicas de la región variable de TCR $\beta$  humanas o no humanas (por ejemplo, roedor, rata, ratón). Por ejemplo, en algunos aspectos, la región variable sin reordenar del locus de CAR comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) genes de tripsinógeno (TRY) (por ejemplo, genes de TRY y/o pseudogenes normalmente presentes en el locus de la región variable de TCR $\beta$ ). En algunos aspectos, los genes de TRY no son humanos, por ejemplo, genes de TRY de ratón. En algunos aspectos, los genes de TRY de ratón se seleccionan del grupo que consiste en *Try1*, *Try2*, *Try3*, *Try4*, *Try5*, *Try6*, *Try7*, *Try8*, *Try9*, *Try10*, *Try11*, *Try12*, *Try13*, *Try14*, *Try15*, *Try16*, *Try17*, *Try18*, *Try19* y *Try20*. En algunos aspectos, uno o más genes de TRY están ubicados aguas arriba de los segmentos V<sub>H</sub> de la región variable sin reordenar. En algunos aspectos, uno o más genes de TRY están ubicados aguas abajo de los segmentos V<sub>H</sub> y aguas arriba de los segmentos D<sub>H</sub> de la región variable sin reordenar. En algunos aspectos, los *Try* 1-7 están ubicados aguas arriba de los segmentos V<sub>H</sub> de la región variable sin reordenar y *Try* 8-20 están ubicados aguas abajo de los segmentos V<sub>H</sub> y aguas arriba de los segmentos D<sub>H</sub> de la región variable sin reordenar. La información adicional sobre los genes de TRY ubicados en el locus de TCR $\beta$  humano y/o de ratón. se proporciona en Glusman et al., *Immunity* 15:337-349 (2001) y Skok et al., *Nature Immunology* 8:378-387 (2007). En algunos aspectos, el locus del gen de CAR comprende elementos reguladores no humanos (por ejemplo, promotores y/o potenciadores no humanos). En algunos aspectos, los elementos reguladores no humanos son elementos reguladores de roedores (por ejemplo, promotores o potenciadores de rata o ratón). En algunos aspectos, el locus de CAR comprende un potenciador de IgM (E $\mu$ ). En algunos aspectos, el potenciador de IgM es un E $\mu$  no humano (por ejemplo, un E $\mu$  de roedor, tal como un E $\mu$  de ratón o rata).

En determinados aspectos, el locus de la región variable de CAR contiene segmentos génicos de la región variable  $\kappa$  de Ig humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden una pluralidad de segmentos Y $\kappa$  humanos y uno o más segmentos J $\kappa$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina comprenden cuatro segmentos V $\kappa$  funcionales y todos los segmentos J $\kappa$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina comprenden 16 segmentos funcionales V $\kappa$  y todos los segmentos J $\kappa$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden todos los segmentos V $\kappa$  humanos y todos los segmentos J $\kappa$  humanos (por ejemplo, todos los segmentos V $\kappa$  y los J $\kappa$  segmentos humanos funcionales). Regiones variables ilustrativas que comprenden segmentos génicos de  $\kappa$  de Ig se proporcionan, por ejemplo, en Macdonald et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:5147-52 e información complementaria. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden todos los segmentos J $\kappa$  humanos. En algunos aspectos, la región variable de CAR comprende además segmentos génicos de la región variable de TCR $\alpha$  (por ejemplo, segmentos génicos V y/o J).

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable  $\kappa$  de inmunoglobulina humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos T para generar genes de la región variable  $\kappa$  humanos reordenados en los linfocitos T del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que

codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina V-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias únicas de CDR3 de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene al menos 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 o 1700 secuencias únicas de CDR3 de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina por 10.000 secuencias de CDR3 de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina.

En determinados aspectos, el locus de la región variable de CAR contiene segmentos génicos de la región variable  $\lambda$  de Ig humanos sin reordenar. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden una pluralidad de segmentos  $V_\lambda$  humanos y uno o más segmentos  $J_\lambda$  humanos. En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden todos los segmentos  $V_\lambda$  humanos (por ejemplo, todos los segmentos  $V_\lambda$  humanos funcionales). En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar comprenden todos los segmentos  $J_\lambda$  humanos. En algunos aspectos, la región variable de CAR comprende además segmentos génicos de la región variable de TCR $\alpha$  (por ejemplo, segmentos génicos V y/o J). Regiones variables ilustrativas que comprenden segmentos génicos de  $\lambda$  de Ig se proporcionan en, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2012/0073004 y 2002/0088016).

En algunos aspectos, los segmentos génicos de la región variable  $\lambda$  de inmunoglobulina humanos se reordenan durante el desarrollo de los linfocitos T para generar genes de la región variable  $\lambda$  humanos reordenados en los linfocitos T del organismo no humano. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un porcentaje menor de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que no contienen adiciones sin molde en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es menor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma. En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 1 adición de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en

el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma.

En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 2 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma.

En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 3 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene un mayor porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N que un animal no humano correspondiente que no tiene un ácido nucleico que codifica una TdT exógena en su genoma.

En algunos aspectos, el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J que contienen al menos 4 adiciones de N en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento es mayor que el porcentaje de uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 30 % o el 40 %. En algunos aspectos, al menos el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 % o el 40 % de las uniones de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina V-J en el animal comprenden adiciones sin molde. En algunos aspectos, el animal no humano tiene una mayor frecuencia de secuencias únicas de CDR3 de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina que un animal no humano correspondiente en al menos el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %. En algunos aspectos, el animal no humano descrito en el presente documento tiene al menos 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 secuencias CDR3 únicas de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina por 10.000 secuencias de CDR3 de la cadena  $\lambda$  de inmunoglobulina.

En algunos aspectos, el locus del gen variable de CAR que contiene segmentos génicos de la región variable de cadena ligera de Ig humanos sin reordenar también incluye secuencias intergénicas de la región variable de cadena ligera de Ig humana (por ejemplo, secuencias intergénicas de la región variable  $\kappa$  y/o secuencias intergénicas de la región variable  $\lambda$ ). En algunos aspectos, el locus del gen variable de CAR incluye secuencias intergénicas de la región variable de cadena ligera de Ig no humanas (por ejemplo, roedor, rata, ratón) (por ejemplo, secuencias intergénicas de la región variable  $\kappa$  y/o secuencias intergénicas de la región variable  $\lambda$ ). En algunos aspectos, el locus del gen variable de CAR incluye secuencias intergénicas de la región variable de TCR $\alpha$  humanas o no humanas (por ejemplo, roedor, rata, ratón). En algunos aspectos, el locus del gen de CAR comprende elementos reguladores no humanos (por ejemplo, promotores y/o potenciadores no humanos). En algunos aspectos, los elementos reguladores no humanos son elementos reguladores de roedores (por ejemplo, promotores o potenciadores de rata o ratón).

En algunos aspectos, el locus de la región variable de CAR es un locus de la región variable reordenado que comprende un gen de la región variable de cadena pesada de Ig (una región variable de cadena pesada universal). En algunos aspectos, el gen de la región variable de cadena pesada de Ig reordenado es un gen de la región variable de cadena pesada de Ig reordenado humano. El uso de las regiones variables de cadena pesada universales facilita la generación de anticuerpos biespecíficos en los que al menos un dominio de unión a antígeno tiene especificidad por un complejo péptido/MHC. Regiones variables de cadena pesada de Ig reordenadas ilustrativas se proporcionan en la publicación de patente de EE. UU. No. 2014/0245468.

En algunos aspectos, el locus de la región variable de CAR es un locus de la región variable reordenado que comprende un gen de la región variable de cadena ligera de Ig (una región variable de cadena ligera universal). En algunos aspectos, el gen de la región variable de cadena ligera de Ig reordenada es un gen de la región variable de cadena ligera de Ig reordenada humano. El uso de las regiones variables de cadena ligera universales facilita la generación de anticuerpos biespecíficos en los que al menos un dominio de unión a antígeno tiene especificidad de unión por un complejo péptido/MHC. Regiones variables de cadena pesada de Ig reordenadas ilustrativas se proporcionan en la publicación de patente de EE. UU. No. 2013/0185821.

#### Otras modificaciones genéticas

En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES descritas en el presente documento que expresan TdT exógena, TCR o CAR humanizados también expresan y/o comprenden en su genoma loci que codifican polipéptidos de cadena  $\alpha$  de MHC clase I humanizados (por ejemplo, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-g, HLA-K y/o HLA-L). En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase I humanizado es completamente humano. En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase I humanizado comprende un dominio extracelular humano (por ejemplo, uno de los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  humanos) y

un dominio citoplasmático de origen de especie endógena. Polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase I humanizados, loci que codifican polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase I humanizados y animales no humanos que expresan polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase I humanizados se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2013/0111617, 2013/0185819 y 2014/0245467.

En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES descritas en el presente documento que expresan TdT exógena, TCR o CAR humanizados también expresan y/o comprenden en su genoma un locus que codifica el polipéptido de  $\beta$ -2-microglobulina humanizado. Polipéptidos de  $\beta$ -2-microglobulina humanizados, loci que codifican polipéptidos de  $\beta$ -2-microglobulina humanizados y animales no humanos que expresan polipéptidos de  $\beta$ -2-microglobulina humanizados se describen en las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2013/0111617 y 2013/0185819).

En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES descritas en el presente documento que expresan TdT exógena, TCR o CAR humanizados también pueden expresar y/o comprender en su genoma loci que codifican polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase II humanizados (por ejemplo, HLA-DMA, HLA-DOA, HLA-DPA, HLA-DQA y/o HLA-DRA humanizados). En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase II humanizado es completamente humano. En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase II humanizado comprende un dominio extracelular humano y un dominio citoplásmico de origen de especie endógena. Polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase II humanizados, loci que codifican polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase II humanizados y animales no humanos que expresan polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de MHC de clase II humanizados se describen en las patentes de EE. UU. N.º 8.847.005 y 9.043.996 y la publicación de patente de EE. UU. No. 2014/0245467.

En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES descritas en el presente documento que expresan TdT exógena, TCR o CAR humanizados también expresan y/o comprenden en su genoma loci que codifican polipéptidos de la cadena  $\beta$  de MHC de clase II humanizados (por ejemplo, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB, HLA-DQB y/o HLA-DRB humanizados). En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\beta$  de MHC de clase II humanizado es completamente humano. En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\beta$  de MHC de clase II humanizado comprende un dominio extracelular humano y un dominio citoplásmico de origen de especie endógena. Polipéptidos de la cadena  $\beta$  de MHC de clase II humanizados, loci que codifican polipéptidos de la cadena  $\beta$  de MHC de clase II humanizados y animales no humanos que expresan polipéptidos de la cadena  $\beta$  de MHC de clase II humanizados se describen en las patentes de EE. UU. N.º 8.847.005 y 9.043.996 y la publicación de patente de EE. UU. No. 2014/0245467.

Los animales no humanos genéticamente modificados que comprenden TdT exógena, los loci de TCR humanizados y los loci de MHC I y/o MHC II (MHC II $\alpha$ /II $\beta$ ) humanizados pueden generarse mediante cría usando métodos convencionales; como alternativa, pueden generarse mediante recombinación homóloga en células ES que ya comprenden uno o más loci genéticamente modificados (por ejemplo, loci de TCR humanizados) y generar un animal no humano a partir de dichas células ES.

Los animales no humanos genéticamente modificados que comprenden TdT exógena, los loci de CAR humanizados y los loci de MHC I y/o MHC II (MHC II $\alpha$ /II $\beta$ ) humanizados pueden generarse mediante cría usando métodos convencionales; como alternativa, pueden generarse mediante recombinación homóloga en células ES que ya comprenden uno o más loci genéticamente modificados (por ejemplo, loci de CAR humanizados) y generar un animal no humano a partir de dichas células ES.

En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES descritas en el presente documento que expresan TdT exógena, TCR o CAR humanizados también expresan y/o comprenden en su genoma un locus que codifica un polipéptido de la cadena  $\alpha$  de CD8 humanizado. En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\alpha$  de CD8 humanizado es completamente humano. En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\alpha$  de CD8 humanizado puede comprender un dominio de inmunoglobulina extracelular humano y un dominio citoplásmico de origen de especie endógena. Polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de CD8 humanizados, loci que codifican polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de CD8 humanizados y animales no humanos que expresan polipéptidos de la cadena  $\alpha$  de CD8 humanizados se describen en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2014/0245466.

En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES descritas en el presente documento que expresan TdT exógena, TCR o CAR humanizados también pueden expresar y/o comprender en su genoma un locus que codifica un polipéptido de la cadena  $\beta$  de CD8 humanizado. En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\beta$  de CD8 humanizado es completamente humano. En algunos aspectos, el polipéptido de la cadena  $\beta$  de CD8 humanizado comprende un dominio de inmunoglobulina extracelular humano y un dominio citoplásmico de origen de especies endógenas. Polipéptidos de la cadena  $\beta$  de CD8 humanizados, loci que codifican polipéptidos de la cadena  $\beta$  de CD8 humanizados y animales no humanos que expresan polipéptidos de la cadena  $\beta$  de CD8 humanizados se describen en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2014/0245466.

En algunos aspectos, los animales no humanos genéticamente modificados y las células ES descritas en el presente documento que expresan TdT exógena, TCR o CAR humanizados también expresan y/o comprenden en su genoma



un locus que codifica un polipéptido de CD4 humanizado. En algunos aspectos, el polipéptido de CD4 humanizado es completamente humano. En algunos aspectos, el polipéptido de CD4 humanizado comprende al menos un dominio de inmunoglobulina extracelular humano y un dominio citoplásmico de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el polipéptido de CD4 humanizado comprende al menos un dominio de inmunoglobulina D1 humano, un dominio de inmunoglobulina D2 humano, y un dominio de inmunoglobulina D3 humano, y un dominio citoplásmico de origen de especie endógena. En algunos aspectos, el polipéptido de CD4 humanizado comprende un dominio de inmunoglobulina D1 humano, un dominio de inmunoglobulina D2 humano, un dominio de inmunoglobulina D3 humano, un dominio de inmunoglobulina D4 de origen de especie endógena y un dominio citoplásmico de origen de especie endógena. Polipéptidos de CD4 humanizados, loci que codifican polipéptidos de CD4 humanizados y animales no humanos que expresan polipéptidos de CD4 humanizados se describen en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2014/0245466.

Los animales no humanos genéticamente modificados que comprenden TdT exógena, los loci de TCR humanizados y los loci de CD4 y/o CD8 humanizados (CD8α/CD8β) pueden generarse mediante cría usando métodos convencionales; como alternativa, pueden generarse mediante recombinación homóloga en células ES que ya comprenden uno o más loci genéticamente modificados (por ejemplo, loci de TCR humanizados) y generar un animal no humano a partir de dichas células ES.

Los animales no humanos genéticamente modificados que comprenden TdT exógena, los loci de CAR humanizados y los loci de CD4 y/o CD8 humanizados (CD8α/CD8β) pueden generarse mediante cría usando métodos convencionales; como alternativa, pueden generarse mediante recombinación homóloga en células ES que ya comprenden uno o más loci genéticamente modificados (por ejemplo, loci de CAR humanizados) y generar un animal no humano a partir de dichas células ES.

#### **Métodos de uso de los roedores genéticamente modificados**

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para usar los roedores genéticamente modificados descritos en el presente documento para generar proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos, CAR, TCR), células que expresan dichas proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, hibridomas de linfocito B, hibridomas de linfocito T) y ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas de unión a antígeno o porciones de las mismas (por ejemplo, dominios variables). En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para producir proteínas de unión a antígeno más diversas (por ejemplo, anticuerpos, CAR, TCR). En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para producir regiones variables reordenadas de proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos, CAR, TCR) que tienen un mayor número de adiciones de nucleótidos.

En determinados aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT exógena y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen dominios variables humanos a un antígeno de modo que el animal no humano genéticamente modificado produce un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable humano específico para el antígeno.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT exógena y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen dominios variables humanos para un antígeno; y obtener un linfocito B que expresa un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio variable humano específico para el antígeno del animal no humano.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT exógena y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen dominios variables humanos para un antígeno; obtener un linfocito B que exprese un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenda un dominio variable humano específico para el antígeno del roedor; y producir un hibridoma a partir del linfocito B.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT exógena y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen dominios variables humanos para un antígeno; y obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina humano específico para el antígeno del animal no humano.

En un determinado aspecto, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT exógena y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen dominios variables humanos para un antígeno; obtener un linfocito B que exprese un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenda un dominio variable humano específico para el antígeno del animal no humano; opcionalmente producir un hibridoma a partir del linfocito B; y obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina humano específico para el antígeno del linfocito B o el hibridoma.



En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT exógena y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen dominios variables humanos a un antígeno; obtener un linfocito B que exprese un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprenda un dominio variable humano específico para el antígeno del animal no humano; opcionalmente producir un hibridoma a partir del linfocito B; obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina humano específico para el antígeno del linfocito B o el hibridoma; unir operativamente el ácido nucleico que codifica el dominio variable de inmunoglobulina con un ácido nucleico que codifica un dominio constante de inmunoglobulina humano en una célula hospedadora; y cultivar la célula hospedadora en condiciones de modo que la célula hospedadora exprese un anticuerpo humano que comprende el dominio variable de inmunoglobulina y el dominio constante de inmunoglobulina.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que se ha modificado para expresar TdT y TCR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; y obtener un linfocito T que exprese un TCR específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que se ha modificado para expresar TdT y TCR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; obtener un linfocito T que exprese un TCR específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado; y producir un hibridoma de linfocitos T a partir del linfocito T.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT y TCR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; obtener un linfocito T que exprese un TCR específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado; y aislar un ácido nucleico que codifica un dominio variable de TCR humano del TCR del linfocito T.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT y TCR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; obtener un linfocito T que exprese un TCR específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado; aislar un ácido nucleico que codifica un dominio variable de TCR del TCR del linfocito T; y unir operativamente el ácido nucleico que codifica el dominio variable de TCR a un dominio constante de TCR en una célula de modo que la célula exprese un TCR que comprende el dominio variable de TCR y el dominio constante de TCR.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT y CAR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; y obtener un linfocito T que exprese un CAR específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento que se ha modificado para expresar TdT y CAR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; obtener un linfocito T que exprese un CAR específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado; y producir un hibridoma de linfocitos T a partir del linfocito T.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT y CAR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; obtener un linfocito T que exprese un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado; y aislar un ácido nucleico que codifica un dominio variable de TCR humano del CAR del linfocito T.

En algunos aspectos, el método comprende exponer un animal no humano descrito en el presente documento que ha sido modificado para expresar TdT y CAR exógenos que tienen dominios variables humanos para un antígeno que comprende un péptido o un ácido nucleico que codifica un antígeno que comprende un péptido de modo que el péptido se presenta en un MHC en el animal no humano; obtener un linfocito T que exprese un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para el péptido presentado en el MHC del animal no humano genéticamente modificado; aislar un

ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina humano del CAR del linfocito T; y unir operativamente el ácido nucleico que codifica el dominio variable de inmunoglobulina humano con un dominio constante de inmunoglobulina humano en una célula de modo que la célula exprese un anticuerpo que comprende el dominio variable de inmunoglobulina humano y el dominio constante de inmunoglobulina humano.

5 En determinados aspectos, los métodos descritos en el presente documento incluyen un paso en el que un animal no humano descrito en el presente documento se expone a un antígeno (inmunizado) para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria de linfocito B y/o una respuesta inmunitaria de linfocito T). En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado se inmuniza con un antígeno proteico completo o  
10 un fragmento del mismo. Los roedores se pueden inmunizar por cualquier método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" 1988 Cold Spring Harbor Laboratory; Malik y Lillehoj (1994) "Antibody Techniques", Academic Press, CA).

15 En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado se expone al antígeno administrando al animal no humano un virus (por ejemplo, un retrovirus, un adenovirus, un virus vaccinia o un lentivirus) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno. Los métodos para la vacunación viral se proporcionan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 6.001.349, 8.663.622, 8.691.502 y 8.377.688, así como en Precopio et al., JEM204:1405-1416 (2007). En algunos aspectos, al animal no humano se le administra el virus directamente. En algunos aspectos, una célula (por ejemplo, una célula presentadora de antígeno, como una célula dendrítica) se infecta  
20 con el virus *in vitro* o *ex-vivo* que, a continuación, se administra al animal no humano. En algunos aspectos, el virus codifica un complejo péptido/MHC (por ejemplo, un complejo péptido/MHC monocatenario). Ejemplos de vacunas basadas en péptido/MHC monocatenario se proporcionan en Truscott et al., *J. Immunol.* 178:6280-6289 (2007), EP1773383, Kim et al., *Vaccine* 30: 2178-2186 (2012), Kim et al., *J. Immunol.* 184:4423-4430 (2010).

25 En algunos aspectos, el animal no humano genéticamente modificado se expone al antígeno administrando al animal un ácido nucleico que codifica el antígeno. En algunos aspectos, al animal no humano se le administra un ácido nucleico que codifica un complejo de péptido/MHC monocatenario. Ejemplos de vacunas basadas en péptido/MHC monocatenario se proporcionan en Truscott et al., *J. Immunol.* 178:6280-6289 (2007), EP1773383, Kim et al., *Vaccine* 30: 2178-2186 (2012), Kim et al., *J. Immunol.* 184:4423-4430 (2010). En determinados aspectos, el ácido nucleico es un vector de ADN. La administración de ácidos nucleicos puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluida la transferencia de genes mediada por virus y la transferencia de genes mediada por liposomas. Un polinucleótido de interés se asocia con un liposoma para formar un vehículo de administración de genes como se describe en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 6.770.291, 7.001.614, 6.749.863, 5.512.295 y 7.112.338, cada una de las cuales se incorporan al presente documento por referencia. En algunos aspectos, el ácido nucleico es un  
35 vector de ARNm. Métodos ilustrativos para generar y administrar vectores de ARNm se describen en, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 8.278.036 y las publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2013/151736 y 2012/135805).

En algunos aspectos, el antígeno es un antígeno asociado al cáncer. Ejemplos de antígenos asociados al cáncer incluyen, pero sin limitación, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinina-4, alfa-fetoproteína (AFP), ALK, ANKRD30A, ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), proteína de fusión BCR-ABL b3a2, beta-catenina, BING-4, BIRC7, CA-125, CA9, CALCA, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), CALR, CASP-5, CASP-8, CCR5, CD19, CD20, CD22, CD27, CD274, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD45, CD52, CD56, CD79, Cdc27, CDK12, CDK4, CDKN2A, CEA, CLEC12A, CLPP, COA-1, CPSF, CSNK1A1, CTAG1, CTAG2, ciclina D1, Ciclina-A1, proteína de fusión dek-can, DKK1, EFTUD2, EGFR, EGFR variante III, Factor 2 de elongación, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA2, EphA3, antígeno tumoral  
45 epitelial ("ETA"), ERBB3, ERBB4, proteína de fusión ETV6-AML1, EZH2, FCRL3, FGF5, FLT3-ITD, FN1, FOLR1, G250/MN/CAIX, GAGE-1,2,8, GAGE-3,4,5,6,7, GAS7, glipicano-3, GnTV, gp100/Pmel17, GPNMB, GM3, GPR112, IL3RA, HAUS3, Hepsina, HER-2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A11, HLA-A2, HLA-DOB, hsp70-2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, Carboxil esterasa intestinal, Kras, Calicreína 4, KIF20A, KIT, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1 también conocido como CCDC110, KRAS, LAGE-1, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, Lengsina, LGR5, LMP2, M-CSF, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-C1, MAGE-C2, enzima málica, mammaglobina-A, MART2, MATN, MC1R, MCSP, mdm-2, ME1, Melan-A / MART-1, Meloe, midquina, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC5AC, MUC16, mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina, Miosina clase I, N-rav, NA88-A, neo-PAP, NFYC, NY-BR-1, NY-ESO-1/LAGE-2, OA1, OGT, OS-9, OX40, polipéptido P, p53, PAP, PAX3, PAX5, PBF, PLAC1, PMEL, proteína de fusión pml-RARalfa, mucina epitelial  
50 polimórfica ("PEM"), PPP1R3B, PRAMA, PRDX5, PRLR, PSA, PSMA, PT-PRK, RAB38/NY-MEL-1, RAGE-1, RBAF600, RET, RGS5, RhoC, RNF43, ROR1, RU2AS, SAGE, SART1, SART3, secernina 1, SIRT2, SLAMF7, SLC39A6, SNRPD1, SOX10, Sp17, SPA17, SSX-2, SSX-4, STEAP1, STEAP2, survivina, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomerasa, TERT, TGF-betaRII, nuevo antígeno de Thompson, TMPRSS2, TNFRSF17, TPBG, TRAG-3, Triosafosfato isomerasa, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2, tirosinasa, tirosinasa ("TYR"),  
60 UPK3A, VEGF, VTCN1, WT1, XAGE-1b/GAGED2a. En algunos aspectos, el antígeno es un neo-antígeno.

En algunos aspectos, el antígeno es un antígeno expresado por un patógeno infeccioso. En algunos aspectos, el patógeno es un virus, una bacteria, un hongo, un helminto o un protozoo. Ejemplos no limitativos de los virus incluyen VIH, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes (por ejemplo, VHS-1, VHS-2, CMV, VHA-6, VVZ, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincicial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus vaccinia,

VLHT, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC, virus del ébola, y antígeno del virus de la encefalitis arboviral. En algunos aspectos, el parásito es la malaria. En algunos aspectos, el patógeno es *Aspergillus*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leishmania*, *Meningococci*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma* y *Vibrio cholerae*. Las especies ilustrativas incluyen *Neisseria gonorrhea*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, Grupo B *Streptococcus* sp., *Micropasma hominis*, *Hemophilus ducreyi*, *Granuloma inguinale*, *Lymphopathia venereum*, *Treponema pallidum*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus intestinalis*, *Leptospira pomona*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella abortus ovis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinobacillus seminis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia ramosa*, *Trypanosoma equiperdum*, *Babesia caballi*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*; o, un hongo, tal como, por ejemplo, *Paracoccidioides brasiliensis*; u otro patógeno, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*.

En algunos aspectos de los métodos descritos en el presente documento, el método incluye el paso de obtención de un linfocito T y/o un linfocito B del animal no humano genéticamente modificado. En determinados aspectos, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para obtener dichas células. Por ejemplo, dichos linfocitos T y/o linfocitos B pueden obtenerse del bazo, los ganglios linfáticos y/o la sangre periférica del animal. Dichos linfocitos T y/o linfocitos B pueden cribar en cuanto a la especificidad de unión usando métodos disponibles en la técnica.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento incluyen el paso de producción de un hibridoma de linfocito B a partir de un linfocito B. Los métodos útiles para producir un hibridoma de linfocito B son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" 1988 Cold Spring Harbor Laboratory; Malik y Lillehoj (1994) "Antibody Techniques", Academic Press, CA.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento incluyen el paso de producción de un hibridoma de linfocito T a partir de un linfocito T. Los métodos útiles para producir un hibridoma de linfocito T son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hedrick et al., *Cell* 30: 141-152 (1982) y Kruisbeek, *Curr. Protoc. Immunol.* Capítulo 3 (2001) y White et al., *Methods in Molecular Biology* 134:185-193 (2000).

En algunos aspectos, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen el paso de aislamiento de un ácido nucleico que codifica una región variable de Ig o TCR. En algunos aspectos de los métodos descritos en el presente documento, se puede usar cualquier método para aislar el ácido nucleico que codifica la región variable de Ig o TCR.

En algunos aspectos, el paso de aislamiento del ácido nucleico comprende producir un hibridoma de linfocito B o linfocito T a partir de un linfocito B o un linfocito T respectivamente y aislar el ácido nucleico del hibridoma. En algunos aspectos, el ácido nucleico se aísla usando un proceso de amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, en algunos aspectos, el proceso de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), replicación de secuencia auto sostenida (3SR), amplificación basada en Q $\beta$  replicasa, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), la reacción en cadena de reparación (RCR), amplificación de ADN boomerang (BDA) o amplificación por círculo rodante (RCA).

En algunos aspectos, el ácido nucleico se aísla secuenciando el gen de región variable de Ig o TCR reordenado en un linfocito B, linfocito T, hibridoma de linfocito B o hibridoma de linfocito T y sintetizando una secuencia de ácido nucleico que comprende el gen de la región variable de Ig o TCR reordenado. Procesos de secuenciación de ácidos nucleicos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, secuenciación de la terminación de cadena, secuenciación por ligamiento, secuenciación por síntesis, pirosecuenciación, secuenciación de semiconductores iónicos, secuenciación en tiempo real de una sola molécula, secuenciación 454 y/o secuenciación Dilute-'N'-Go.

Cuando se obtienen fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de Ig de cadena pesada y/o ligera, estos fragmentos de ADN se pueden manipular más mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN codificante de la región variable se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "se une/unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se juntan de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el mismo marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región variable de cadena pesada se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN codificante de la región variable a otra molécula de ADN que codifica el dominio constante de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humanas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991)

"Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242, o Lefranc, "The Immunoglobulin Handbook", Londres: Academic Press 2001) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional. El dominio constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, un dominio constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN codificante de  $V_H$  se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada.

Por tanto, en algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento incluyen el paso de unir operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de Ig de cadena pesada con una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de Ig de cadena pesada en una célula hospedadora de modo que la célula hospedadora exprese un polipéptido de cadena pesada de Ig que comprende el dominio variable de cadena pesada de Ig y el dominio constante de cadena pesada de Ig. En algunos aspectos, el método incluye el paso de unir operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de Ig de cadena ligera con una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de Ig de cadena ligera en una célula hospedadora de tal modo que la célula hospedadora exprese un polipéptido de cadena ligera de Ig que comprende el dominio variable de cadena ligera de Ig y el dominio constante de cadena pesada de Ig. En algunos aspectos, el método incluye el paso de unir operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de Ig de cadena pesada con una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de Ig de cadena pesada en una célula hospedadora y unir operativamente una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de Ig de cadena ligera con una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de Ig de cadena ligera en la célula hospedadora de modo que la célula hospedadora exprese un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende el dominio variable de Ig de cadena pesada y el dominio constante de Ig de cadena pesada y una cadena ligera que comprende el dominio variable de Ig de cadena ligera y el dominio constante de Ig de cadena ligera. Las regiones variables de Ig se pueden unir con regiones constantes de Ig usando técnicas convencionales de biología molecular bien conocidas en la técnica. En algunos aspectos, se puede usar cualquier célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido de inmunoglobulina. En algunos aspectos, la célula es una célula CHO, una célula HEK-293, una célula BHK, una célula NS0, una célula SP2/0 o una célula Vero o una célula retinal que expresa una secuencia de ácido nucleico viral (por ejemplo, célula PERC.6™).

En algunos aspectos, el ácido nucleico que codifica el dominio constante de cadena pesada codifica un dominio constante que comprende un dominio Fc modificado (por ejemplo, una mutación que altera la interacción entre el receptor Fc y Fc). Por ejemplo, en algunos aspectos, el dominio constante comprende la modificación de su dominio Fc en la posición 235, 236, 237, 239, 265, 267, 268, 269, 270, 298, 326, 327, 330, 332, 350, 351, 366, 392, 394, 405 y/o 407 (usando el sistema de numeración de la UE). En algunos aspectos, la modificación se selecciona del grupo que consiste en L235A, G236E, G237F, S239E, S239D, D265E, D265S, S267E, S267D, S267G, H268E, H268D, E269L, D270N, D270E, S298A, K326A, K326D, A327H, A327V, A327L, A330I, A330S, I332E, T350V, L351Y, T366L, K392M, K392L, T394W, F405A y/o Y407V (usando el sistema de numeración de la UE). En algunos aspectos, el dominio constante comprende múltiples modificaciones a su dominio Fc. En algunos aspectos, las múltiples modificaciones se seleccionan del grupo que consiste en D270N/K326D, S239E/S298A/K326A/A327H, L235A/S239E/D265E/A327H, G236E/G237F/S239E, G237F/S239E/D265E, G327F/S239E/H268D, G236E/D270N/A327V/I332E, G237F/S239E/A327H, G237F/A327L/A330I, S239D/D265S/S298A/I332E, S239E/D265S/H268D/I332E, S239E/D265S/I332E, S239E/S267E/H268D, S239E/A327L/A330I, D265E/S267D/A330S, S267G/H268E/D270E, H268D/E269L/S298A/K326A/A327H, H268D//K326A/A327H. Las modificaciones de Fc y las combinaciones de modificaciones de Fc adicionales se proporcionan en las patentes de EE. UU. N.º 5.624.821, 5.648.260, 6.528.624, 6.737.056, 7.122.637, 7.183.387, 7.297.775, 7.317.091, 7.332.581, 7.632.497, 7.662.925, 7.695.936, 8.093.359, 8.216.805, 8.218.805, 8.388.955 y 8.937.158, las publicaciones de patente de EE. UU. 2005/0054832, 2006/0222653, 2006/0275282, 2006/0275283, 2007/0190063, 2008/0154025, 2009/0042291 2013/0108623 y 2013/0089541.

## 50 **Proteínas de unión a Antígeno**

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos, TCR, CAR y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) obtenibles y/u obtenidos de acuerdo con un método descrito en el presente documento (por ejemplo, usando un animal no humano descrito en el presente documento).

En determinados aspectos, las moléculas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento pueden unirse específicamente a un antígeno diana con una constante de disociación no superior a  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  o  $10^{-9}$  M. En algunos aspectos, la afinidad de unión de la proteína de unión a antígeno a un antígeno (expresada por  $K_D$ ) es de al menos 10 veces menos, al menos 100 veces menos o al menos 1.000 veces menos que la afinidad de la proteína de unión a antígeno para un antígeno no relacionado. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno se une a un complejo péptido/MHC con una constante de disociación no superior a  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  o  $10^{-9}$  M. En algunos aspectos, la afinidad de unión de la proteína de unión a antígeno a un complejo péptido/MHC (expresada por  $K_D$ ) es de al menos 10 veces menos, al menos 100 veces menos o al menos 1.000 veces menos que la afinidad de la proteína de unión a antígeno para el péptido por la misma proteína MHC que presenta un péptido no relacionado. Los ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de las proteínas de unión a antígeno son conocidos en la técnica,

incluyendo, por ejemplo, ensayos ELISA, transferencias Western y ensayos RIA. La cinética de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) de la proteína de unión a antígeno también se puede evaluar mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como por el análisis de Biacore.

5 En algunos aspectos, el antígeno comprende un epítipo y/o es un antígeno asociado al cáncer. Ejemplos de antígenos asociados al cáncer incluyen, pero sin limitación, adipofilina, AIM-2, ALDH1A1, alfa-actinina-4, alfa-fetoproteína (AFP), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), proteína de fusión BCR-ABL b3a2, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), CASP-5, CASP-8, CD274, CD45, Cdc27, CDK12, CDK4, CDKN2A, CEA, CLPP, COA-1, CPSF, CSNK1A1, CTAG1, CTAG2, ciclina D1, Ciclina-A1, proteína de fusión dek-can, DKK1, EFTUD2, Factor 2 de elongación, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antígeno tumoral epitelial ("ETA"), proteína de fusión ETV6-AML1, EZH2, FGF5, FLT3-ITD, FN1, G250/MN/CAIX, GAGE-1,2,8, GAGE-3,4,5,6,7, GAS7, glipicano-3, GntV, gp100/Pmel17, GP-NMB, HAUS3, Hepsina, HER-2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A11, HLA-A2, HLA-DOB, hsp70-2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, Carboxil esterasa intestinal, K-ras, Caliceína 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1 también conocido como CCDC110, LAGE-1, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, Lengsina, M-CSF, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-C1, MAGE-C2, enzima mállica, mammaglobina-A, MART2, MATN, MC1R, MCSP, mdm-2, ME1, Melan-A / MART-1, Meloe, midquina, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUCSAC, mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina, Miosina clase I, N-raw, NA88-A, neo-PAP, NFYC, NY-BR-1, NY-ESO-1/LAGE-2, OA1, OGT, OS-9, polipéptido P, p53, PAP, PAX5, PBF, proteína de fusión pml-RARalfa, mucina epitelial polimórfica ("PEM"), PPP1R3B, PRAMA, PRDX5, PSA, PSMA, PTPRK, RAB38/NY-MEL-1, RAGE-1, RBAF600, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, SAGE, secernina 1, SIRT2, SNRPD1, SOX10, Sp17, SPA17, SSX-2, SSX-4, STEAP1, survivina, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomerasa, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-3, Triosafofato isomerasa, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2, tirosinasa, tirosinasa ("TYR"), VEGF, WT1, XAGE-1b/GAGED2a. En algunos aspectos, el antígeno es un neo-antígeno.

25 En algunos aspectos, el antígeno comprende un epítipo y/o es un antígeno expresado por un patógeno infeccioso. En algunos aspectos, el patógeno es un virus, una bacteria, un hongo, un helminto o un protozoo. Algunos ejemplos no limitativos de virus incluyen VPH, VHB, virus de la hepatitis C (VHC), retrovirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), virus del herpes tal como el virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), VHS-1 y VHS-2, y virus de la influenza. En algunos aspectos, el parásito es la malaria. En algunos aspectos, el patógeno es *Aspergillus*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma* y *Vibrio cholerae*. Las especies ilustrativas incluyen *Neisseria gonorrhea*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, Grupo B *Streptococcus* sp., *Microplasma hominis*, *Hemophilus ducreyi*, *Granuloma inguinale*, *Lymphopathia venereum*, *Treponema pallidum*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus intestinalis*, *Leptospira pomona*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella abortus ovis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinobacillus seminis*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia ramosa*, *Trypanosoma equiperdum*, *Babesia caballi*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*; o, un hongo, tal como, por ejemplo, *Paracoccidioides brasiliensis*; u otro patógeno, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*.

En algunos aspectos, el antígeno comprende un epítipo y/o es una proteína que es la diana de un linfocito T autorreactivo en una enfermedad inflamatoria, rechazo del trasplante de piel o de órganos, enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) o enfermedades autoinmunitarias. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, nefritis glomerular, artritis, enfermedad similar a la miocardiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, eritematoso sistémico, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis alérgica de contacto, polimiosis, paquiderma, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgaris, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad de Behcet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, la dermatomiositis, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, anaemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de la esterilidad, hepatitis activa crónica, pénfigo, púrpura trombopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitario, hepatitis crónica activa, la enfermedad de Addison, síndrome antifosfolípido, alergia atópica, gastritis atrófica autoinmunitaria, aclorhidria autoinmunitaria, enfermedad celíaca, síndrome de Cushing, la dermatomiositis, lupus discoide, eritematosis, síndrome de Goodpasture, tiroiditis de Hashimoto, atrofia idiopática de las glándulas suprarrenales, trombocitopenia idiopática, diabetes dependiente de insulina, síndrome de Lambert-Eaton, hepatitis lupoide, algunos casos de linfopenia, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, penfigoide, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, uveítis facogénica, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarios, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Raynaud, policodritis recidivante, síndrome de Schmidt, escleroderma limitada (o síndrome de la cresta), oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tirotoxicosis, resistencia a la insulina de tipo B, colitis ulcerosa y granulomatosis de Wegener. Proteínas ilustrativas identificadas por los linfocitos T autorreactivos incluyen, por ejemplo, p205, insulina, hormona estimulante de la tiroides, tirosinasa, TRP1 y mielina.

En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo. En algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden dominios variables de cadena pesada humanos. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden dominios constantes de cadena pesada humanos. En algunos aspectos, los

anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden un dominio constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Las secuencias de los dominios constantes de cadena pesada son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242, o Lefranc, "The Immunoglobulin Handbook", Londres: Academic Press 2001). En algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en el presente documento carecen de un dominio constante de cadena pesada o una porción del mismo.

En algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden un dominio Fc modificado (por ejemplo, una mutación que altera la interacción entre el Fc y un receptor de Fc). Por ejemplo, en algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en el presente documento comprenden la modificación de su dominio Fc en la posición 235, 236, 237, 239, 265, 267, 268, 269, 270, 298, 326, 327, 330, 332, 350, 351, 366, 392, 394, 405 y/o 407 (usando el sistema de numeración de la UE). En algunos aspectos, la modificación se selecciona del grupo que consiste en L235A, G236E, G237F, S239E, S239D, D265E, D265S, S267E, S267D, S267G, H268E, H268D, E269L, D270N, D270E, S298A, K326A, K326D, A327H, A327V, A327L, A330I, A330S, I332E, T350V, L351Y, T366L, K392M, K392L, T394W, F405A y/o Y407V (usando el sistema de numeración de la UE). En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden múltiples modificaciones en su dominio Fc. En algunos aspectos, las múltiples modificaciones se seleccionan del grupo que consiste en D270N/K326D, S239E/S298A/K326A/A327H, L235A/S239E/D265E/A327H, G236E/G237F/S239E, G237F/S239E/D265E, G327F/S239E/H268D, G236E/D270N/A327V/I332E, G237F/S239E/A327H, G237F/A327L/A330I, S239D/D265S/S298A/I332E, S239E/D265S/H268D/I332E, S239E/D265S/I332E, S239E/S267E/H268D, S239E/A327L/A330I, D265E/S267D/A330S, S267G/H268E/D270E, H268D/E269L/S298A/K326A/A327H, H268D/K326A/A327H. Las modificaciones de Fc y las combinaciones de modificaciones de Fc adicionales se proporcionan en las patentes de EE. UU. N.º 5.624.821, 5.648.260, 6.528.624, 6.737.056, 7.122.637, 7.183.387, 7.297.775, 7.317.091, 7.332.581, 7.632.497, 7.662.925, 7.695.936, 8.093.359, 8.216.805, 8.218.805, 8.388.955 y 8.937.158, y publicaciones de patente de EE. UU. N.º 2005/0054832, 2006/0222653, 2006/0275282, 2006/0275283, 2007/0190063, 2008/0154025, 2009/0042291 2013/0108623 y 2013/0089541.

En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunos aspectos, los dos dominios de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico tienen dominios variables de cadena pesada distintos pero tienen dominios variables de cadena ligera idénticos. En algunos aspectos, los dominios Fc de las cadenas pesadas comprenden modificaciones para facilitar la formación de heterodímero de cadena pesada y/o para inhibir la formación de homodímero de cadena pesada. Dichas modificaciones se proporcionan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N.º 5.731.168, 5.807.706, 5.821.333, 7.642.228 y 8.679.785 y en las publicaciones de patente de EE. UU. No. 2013/0195849.

En algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en el presente documento tienen dominios variables de cadena ligera humanos. En algunas realizaciones, los dominios variables de cadena ligera son dominios variables de la cadena ligera  $\lambda$ . En algunas realizaciones, los dominios variables de cadena ligera son dominios variables de la cadena ligera  $\kappa$ . En algunas realizaciones, los anticuerpos tienen dominios constantes de cadena ligera humanos. En algunas realizaciones, los dominios constantes de cadena ligera son dominios constantes de la cadena ligera  $\lambda$ . En algunas realizaciones, los dominios constantes de cadena ligera son dominios constantes de la cadena ligera  $\kappa$ . Las secuencias de los dominios de la región constante de cadena ligera humanas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242, o Lefranc, "The Immunoglobulin Handbook", Londres: Academic Press 2001).

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento son anticuerpos intactos. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento son fragmentos de anticuerpo que conservan la unión a antígeno. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fv unido a disulfuro, Fd, anticuerpos monocatenarios, CDRH3 aislada u otro fragmento de anticuerpo que conserva al menos una porción del dominio variable de un anticuerpo intacto.

En determinados aspectos, la proteína de unión a antígeno es un CAR. En algunos aspectos, el CAR está unido a la membrana. En algunos aspectos, el CAR es un CAR soluble (por ejemplo, que carece de un dominio transmembrana o citoplasmático). En algunos aspectos, dichos CAR comprenden un primer polipéptido CAR que comprende un dominio variable de cadena pesada de Ig y un dominio constante de TCR $\beta$  y un segundo polipéptido CAR que comprende un dominio variable de cadena ligera de Ig (por ejemplo, un dominio variable de  $\kappa$  de Ig o un dominio variable  $\lambda$  de Ig) y un dominio constante de TCR $\alpha$ . En algunos aspectos, el dominio variable de cadena pesada de Ig y/o el dominio variable de cadena ligera de Ig son dominios variables de Ig humanos. En algunos aspectos, el dominio constante de TCR $\beta$  y/o el dominio constante de TCR $\alpha$  son dominios constantes no humanos (por ejemplo, dominios constantes de rata o ratón). En algunos aspectos, el dominio constante de TCR $\beta$  y/o el dominio constante de TCR $\alpha$  son dominios constantes humanos.

En determinados aspectos, la proteína de unión a antígeno es un TCR. En algunas realizaciones, el TCR está unido a la membrana. En algunos aspectos, el TCR es un TCR soluble (por ejemplo, que carece de un dominio transmembrana o citoplasmático). En algunos aspectos, dichos TCR comprenden un primer polipéptido de TCR que

comprende un dominio variable de TCR $\beta$  y un dominio constante de TCR $\beta$  y un segundo polipéptido de TCR que comprende un dominio variable de TCR $\alpha$  y un dominio constante de TCR $\alpha$ . En algunos aspectos, el dominio variable de TCR $\alpha$  y/o el dominio variable de TCR $\beta$  son dominios variables de TCR humanos. En algunos aspectos, el dominio constante de TCR $\beta$  y/o el dominio constante de TCR $\alpha$  son dominios constantes no humanos (por ejemplo, dominios constantes de rata o ratón). En algunos aspectos, el dominio constante de TCR $\beta$  y/o el dominio constante de TCR $\alpha$  son dominios constantes humanos.

### **Composiciones farmacéuticas**

En determinados aspectos, en el presente documento se proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene al menos un agente descrito en el presente documento (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno descrita en el presente documento, tal como un anticuerpo, un CAR o un TCR descritos en el presente documento, obtenidos del animal no humano descrito en el presente documento) formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, drenches (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellos dirigidos a la absorción bucal, sublingual y sistémica, inyección en embolada, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; o (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural en forma de, por ejemplo, una solución o suspensión estéril o una formulación de liberación sostenida.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más agentes descritos en el presente documento en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

En determinados aspectos, las composiciones comprenden un anticuerpo, un TCR y/o un CAR descritos en el presente documento en una concentración que da como resultado una p/v apropiada para una dosis deseada. El anticuerpo, TCR y/o CAR pueden estar presentes en la composición en una concentración de al menos 1 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 35 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 45 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 55 mg/ml, al menos 60 mg/ml, al menos 65 mg/ml, al menos 70 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 80 mg/ml, al menos 85 mg/ml, al menos 90 mg/ml, al menos 95 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 105 mg/ml, al menos 110 mg/ml, al menos 115 mg/ml, al menos 120 mg/ml, al menos 125 mg/ml, al menos 130 mg/ml, al menos 135 mg/ml, al menos 140 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml, al menos 250 mg/ml o al menos 300 mg/ml.

En algunos aspectos, la composición comprende uno o más compuestos activos según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, normalmente los que tienen actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichos compuestos activos adicionales están convenientemente presentes junto con cantidades que son eficaces para el fin previsto.

En algunos aspectos, las composiciones se preparan mezclando un anticuerpo, un TCR y/o un CAR descritos en el presente documento con vehículos fisiológicamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizadores, que incluyen, pero sin limitación, agentes tampón, sacáridos, sales, tensioactivos, solubilizantes, polioles, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, sales, disolventes lipófilos, aminoácidos, quelantes, conservantes, o similares ("The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, 12ª edición, L. Brunton, et al. "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición, Osol, A. Ed. (1999)), en forma de composiciones liofilizadas o soluciones acuosas a una concentración final deseada. Los vehículos, excipientes y/o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como histidina, fosfato, citrato, glicina, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo trehalosa, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como



EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN, polisorbato 80, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

- 5 En algunos aspectos, el agente tampón es histidina, citrato, fosfato, glicina o acetato. El excipiente sacárido puede ser trehalosa, sacarosa, manitol, maltosa o rafinosa. El tensioactivo puede ser polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 80 o Pluronic F68. La sal puede ser NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub>.

10 En algunos aspectos, la composición comprende un agente tampón o de ajuste del pH para proporcionar un mejor control del pH. Dicha composición puede tener un pH de entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 9,0, entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0, o entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5. En un aspecto adicional, dicha composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,5 o aproximadamente 9,0. En un aspecto específico, una composición tiene un pH de aproximadamente 6,0. Un experto en la técnica entiende que el pH de una composición generalmente no debe ser igual al punto isoelectrico del anticuerpo, TCR o CAR particular que se va a usar en la composición. Normalmente, el agente tampón es una sal preparada a partir de un ácido o una base orgánicos. Agentes de tampón representativos incluyen, pero sin limitación, sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampones de fosfato. Además, los componentes de aminoácidos también pueden funcionar en una capacidad tampón. Los componentes de aminoácidos representativos que se pueden usar en la composición como agentes tampón incluyen, pero sin limitación, glicina e histidina. En determinados aspectos, el agente tampón se elige entre histidina, citrato, fosfato, glicina y acetato. En un aspecto específico, el agente tampón es histidina. En otro aspecto específico, el agente tampón es citrato. En otro aspecto específico más, el agente tampón es glicina. La pureza del agente tampón debe ser al menos del 98 %, o al menos del 99 %, o al menos del 99,5 %. Como se usa en el presente documento, el término "pureza" en el contexto de la histidina y la glicina se refiere a la pureza química de la histidina o la glicina como se entiende en la técnica, por ejemplo, como se describe en "The Merck Index", 13ª ed., O'Neil et al. ed. (Merck & Co., 2001).

35 En determinados aspectos, la composición comprende histidina como agente tampón. En determinados aspectos, la histidina está presente en la composición en una concentración de al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 20 mM, al menos aproximadamente 30 mM, al menos aproximadamente 40 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 75 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 150 mM o al menos aproximadamente 200 mM. En otro aspecto, una composición comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 200 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 40 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 30 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 75 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 50 mM, entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 40 mM o entre aproximadamente 20 mM y aproximadamente 30 mM de histidina. En un aspecto adicional, la composición comprende aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM o aproximadamente 200 mM de histidina. En un aspecto específico, una composición puede comprender aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, o sin histidina.

60 En algunos aspectos, la composición comprende un carbohidrato como excipiente. Los excipientes de carbohidratos pueden actuar, por ejemplo, como agentes potenciadores de la viscosidad, estabilizantes, agentes de volumen, agentes solubilizantes y/o similares. Los excipientes de carbohidratos generalmente están presentes entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 99 % en peso o volumen, por ejemplo, entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 15 %, entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 15 %, entre aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 15 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, entre el 0,1 % y el 20 %, entre el 5 % y el 15 %, entre el 8 % y el 10 %, entre el 10 % y el 15 %, entre el 15 % y el 20 %, entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 5 %, entre aproximadamente



el 5 % y aproximadamente el 10 %, o entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 20 %. En otros aspectos más específicos, el excipiente de carbohidrato está presente al 1 %, o al 1,5 %, o al 2 %, o al 2,5 %, o al 3 %, o al 4 %, o al 5 %, o al 10 %, o al 15 %, o al 20 %.

5 En algunos aspectos, la composición comprende un carbohidrato como excipiente. Los excipientes de carbohidratos adecuados para su uso en las composiciones incluyen, pero sin limitación, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditos, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y similares. En determinados aspectos, los excipientes de carbohidratos para su uso en las composiciones proporcionadas en el presente documento se eligen entre sacarosa, trehalosa, lactosa, manitol y rafinosa. En un aspecto específico, el excipiente de carbohidrato es trehalosa. En otro aspecto específico, el excipiente de carbohidrato es manitol. En otro aspecto específico más, el excipiente de carbohidrato es sacarosa. En aún otro aspecto específico, el excipiente de carbohidrato es rafinosa. La pureza del excipiente de carbohidrato debe ser al menos del 98 %, o al menos del 99 %, o al menos del 99,5 %.

15 En algunos aspectos, la composición comprende trehalosa. En determinados aspectos, una composición comprende al menos aproximadamente el 1 %, al menos aproximadamente el 2 %, al menos aproximadamente el 4 %, al menos aproximadamente el 8 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, o al menos aproximadamente el 40 % de trehalosa. En otro aspecto, una composición comprende entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 30 %, o entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 20 % de trehalosa. En un aspecto adicional, una composición comprende aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 40 % de trehalosa. En un aspecto específico, una composición comprende aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 6 % o aproximadamente el 15 % de trehalosa.

30 En determinados aspectos, la composición comprende un excipiente. En un aspecto específico, una composición comprende al menos un excipiente elegido entre: azúcar, sal, tensioactivo, aminoácido, poliol, agentes quelantes, emulsionante y conservante. En determinados aspectos, una composición comprende una sal, por ejemplo, una sal seleccionada entre: NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>. En una realización específica, la composición comprende NaCl.

35 En algunos aspectos, la composición comprende un aminoácido, por ejemplo, lisina, arginina, glicina, histidina o una sal de aminoácido. La composición puede comprender al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 25 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 150 mM, al menos aproximadamente 200 mM, al menos aproximadamente 250 mM, al menos aproximadamente 300 mM, al menos aproximadamente 350 mM, o al menos aproximadamente 400 mM de un aminoácido. En otro aspecto, la composición puede comprender entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM, entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 150 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 350 mM, entre aproximadamente 25 mM y aproximadamente 400 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 350 mM, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 400 mM, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 300 mM, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 400 mM, entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 250 mM, entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 300 mM o entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 400 mM de un aminoácido. En un aspecto adicional, una composición comprende aproximadamente 1 mM, 1,6 mM, 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 250 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 350 mM, o aproximadamente 400 mM de un aminoácido.

55 En algunos aspectos, la composición comprende un tensioactivo. El término "tensioactivo" como se usa en el presente documento se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas; concretamente, se componen de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, normalmente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivos se pueden clasificar, dependiendo de la carga de la porción tensioactiva, en tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensioactivos se usan a menudo como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diferentes composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); polioxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; octilglucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil taurato sódico o metil oleil taurato disódico; y la serie MONAQUA® (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilglicoles, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, PLURONICS® PF68, etc.), se pueden añadir

opcionalmente a las composiciones para reducir la agregación. En determinados aspectos, una composición comprende Polisorbato 20, Polisorbato 40, Polisorbato 60 o Polisorbato 80. Los tensioactivos son particularmente útiles si se usa una bomba o un recipiente de plástico para administrar la composición. La presencia de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable mitiga la propensión de la proteína a agregarse. Las composiciones pueden comprender un polisorbato que está en una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 1 %, o aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 0,1 %, o aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 0,1 %. En otros aspectos específicos, las composiciones comprenden un polisorbato que está en una concentración de 0,001 %, o 0,002 %, o 0,003 %, o 0,004 %, o 0,005 %, o 0,006 %, o 0,007 %, o 0,008 %, o 0,009 % o 0,01 %, o 0,015 %, o 0,02 %.

En algunos aspectos, la composición comprende otros excipientes y/o aditivos que incluyen, pero sin limitación, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvantes o similares. Se pueden usar excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables en las composiciones proporcionadas en el presente documento. Los excipientes/aditivos de uso común, tal como quelantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, pero sin limitación, EDTA, DTPA o EGTA) se pueden añadir opcionalmente a las composiciones para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se usa una bomba o un recipiente de plástico para administrar la composición.

En algunos aspectos, la composición comprende un conservante. Conservantes, tales como el fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, pero sin limitación, hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos, se pueden añadir opcionalmente a las composiciones en cualquier concentración adecuada, tal como entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 5 %, o cualquier intervalo o valor en el mismo. La concentración de conservante usada en las composiciones es una concentración suficiente para producir un efecto antimicrobiano. Dichas concentraciones dependen del conservante seleccionado y son fácilmente determinables por el experto.

En algunos aspectos, la composición es isotónica con sangre humana, en donde las composiciones tienen prácticamente la misma presión osmótica que la sangre humana. Dichas composiciones isotónicas, en general, tienen una presión osmótica de aproximadamente 250 mOSm a aproximadamente 350 mOSm. La isotonicidad se puede medir, por ejemplo, usando un osmómetro de presión de vapor o de congelación de hielo. La tonicidad de una composición se ajusta mediante el uso de modificadores de la tonicidad. Los "modificadores de la tonicidad" son aquellas sustancias inertes farmacéuticamente aceptables que se pueden añadir a la composición para proporcionar una isotonicidad de la composición. Los modificadores de tonicidad adecuados para las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, sacáridos, sales y aminoácidos.

En determinados aspectos, la composición es una composición sin pirógenos que está prácticamente libre de endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan únicamente cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirogénicas también incluyen fiebre, sustancias termoestables de la membrana externa de bacterias y otros microorganismos. Estas dos sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y shock si se administran a seres humanos. Debido a los efectos dañinos potenciales, incluso bajas cantidades de endotoxinas deben retirarse de las soluciones del fármaco administradas por vía intravenosa. La "Food & Drug Administration" ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un periodo de una hora para las aplicaciones intravenosas de fármacos (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando se administran proteínas terapéuticas en cantidades de varios cientos o miles de miligramos por kilogramo de peso corporal, como puede ser el caso con las proteínas de interés (por ejemplo, anticuerpos), deben retirarse incluso cantidades mínimas de endotoxina dañina y peligrosa. En algunos aspectos, los niveles de endotoxina y pirógenos en la composición son de menos de 10 UE/ml, o menos de 5 UE/mg, o menos de 1 UE/mg, o menos de 0,1 UE/mg o menos de 0,01 UE/mg o menos de 0,001 UE/mg.

Cuando se usa para administración *in vivo*, la composición descrita en el presente documento debe ser estéril. La composición se puede esterilizar mediante diferentes métodos de esterilización, incluyendo filtración estéril, radiación, etc. En determinados aspectos, la composición se esteriliza por filtración con un filtro preesterilizado de 0,22 micras. Las composiciones estériles para inyección se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional como se describe en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005). Las composiciones que comprenden las proteínas de interés (por ejemplo, anticuerpos o TCR o CAR) como las descritas en el presente documento, ordinariamente se almacenarán en forma liofilizada o en solución. Se contempla que las composiciones estériles que comprenden las proteínas de interés (por ejemplo, anticuerpo, TCR o CAR) se coloquen en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un adaptador que permite recuperar la composición, tal como un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. En determinados aspectos, se proporciona una composición como una jeringa precargada.

En determinados aspectos, la composición es una formulación líquida. El término "liofilizado" o "secado por congelación" incluye un estado de una sustancia que se ha sometido a un procedimiento de secado tal como la liofilización, donde se ha eliminado al menos el 50 % de la humedad.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los agentes proporcionados en el presente documento, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

### **Métodos terapéuticos**

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o trastorno que comprenden administrar a un sujeto una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, un TCR y/o un CAR descritos en el presente documento, tal como un anticuerpo, TCR o CAR completamente humanos). En algunos aspectos, el anticuerpo, un TCR y/o un CAR es un anticuerpo, un TCR y/o un CAR obtenidos u obtenibles usando los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, usando un animal no humano descrito en el presente documento).

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar el cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento, tal como un anticuerpo, TCR o CAR completamente humanos descritos en el presente documento, obtenidos del animal no humano como se describe en el presente documento). En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cualquier tumor canceroso o precanceroso. Los cánceres que pueden tratarse mediante métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, origen gastrointestinal, encías, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, los testículos, lengua o útero. Ejemplos no limitativos de diferentes tipos histológicos de cáncer incluyen: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma, indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma microcítico; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma pilomatricial; carcinoma de células transicionales; carcinoma papilar de células transicionales; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoideo quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis familiar del colon; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometriode; carcinoma de anejos cutáneos; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma papilar seroso; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en forma de anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecomoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de lipocitos, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de diseminación superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; liomiosarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma, maligno; tumor de Brenner, maligno; tumores filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor óseo de células gigantes; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno;ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; linfoma de Hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno, pequeño linfocítico; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no hodgkinianos especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y tricoleucemia.

En determinados aspectos, el anticuerpo, TCR o CAR en la composición farmacéutica administrada al sujeto tiene especificidad de unión por un epítipo de un antígeno asociado al cáncer (por ejemplo, un epítipo expresado por el cáncer que se está tratando). Ejemplos de antígenos asociados al cáncer incluyen, pero sin limitación, adipofilina, AIM-

2, ALDH1A1, alfa-actinina-4, alfa-fetoproteína (AFP), ARTC1, B-RAF, BAGE-1, BCLX (L), proteína de fusión BCR-ABL b3a2, beta-catenina, BING-4, CA-125, CALCA, antígeno carcinoembrionario ("CEA"), CASP-5, CASP-8, CD274, CD45, Cdc27, CDK12, CDK4, CDKN2A, CEA, CLPP, COA-1, CPSF, CSNK1A1, CTAG1, CTAG2, ciclina D1, Ciclina-A1, proteína de fusión dek-can, DKK1, EFTUD2, Factor 2 de elongación, ENAH (hMena), Ep-CAM, EpCAM, EphA3, antígeno tumoral epitelial ("ETA"), proteína de fusión ETV6-AML1, EZH2, FGF5, FLT3-ITD, FN1, G250/MN/CAIX, GAGE-1,2,8, GAGE-3,4,5,6,7, GAS7, glipicano-3, GntV, gp100/Pmel17, GPNMB, HAUS3, Hepsina, HER-2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A11, HLA-A2, HLA-DOB, hsp70-2, IDO1, IGF2B3, IL13Ralpha2, Carboxil esterasa intestinal, K-ras, Calicreína 4, KIF20A, KK-LC-1, KKLC1, KM-HN-1, KMHN1 también conocido como CCDC110, LAGE-1, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS, Lengsina, M-CSF, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-C1, MAGE-C2, enzima málica, mammaglobina-A, MART2, MATN, MC1R, MCSP, mdm-2, ME1, Melan-A / MART-1, Meloe, midquina, MMP-2, MMP-7, MUC1, MUC5AC, mucina, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina, Miosina clase I, N-raw, NA88-A, neo-PAP, NFYC, NY-BR-1, NY-ESO-1/LAGE-2, OA1, OGT, OS-9, polipéptido P, p53, PAP, PAX5, PBF, proteína de fusión pml-RARalfa, mucina epitelial polimórfica ("PEM"), PPP1R3B, PRAMA, PRDX5, PSA, PSMA, PTPRK, RAB38/NY-MEL-1, RAGE-1, RBAF600, RGS5, RhoC, RNF43, RU2AS, SAGE, secernina 1, SIRT2, SNRPD1, SOX10, Sp17, SPA17, SSX-2, SSX-4, STEAP1, survivina, proteína de fusión SYT-SSX1 o -SSX2, TAG-1, TAG-2, Telomerasa, TGF-betaRII, TPBG, TRAG-3, Triosafosfato isomerasa, TRP-1/gp75, TRP-2, TRP2-INT2, tirosinasa, tirosinasa ("TYR"), VEGF, WT1, XAGE-1b/GAGED2a. En algunos aspectos, el antígeno es un neo-antígeno.

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que padece de una infección, incluyendo infecciones víricas, una infección fúngica, una infección bacteriana, una infección por helmintos, o una infección por protozoos, que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, TCR o CAR descrito en el presente documento obtenidos de los animales no humanos descritos en el presente documento). Ejemplos no limitativos de enfermedades infecciosas virales incluyen VHP, VHB, virus de la hepatitis C (VHC), retrovirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), virus del herpes tal como el virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), VHS-1 y VHS-2, y virus de la influenza. Un ejemplo no limitativo de infección parasitaria es la malaria. Ejemplos no limitativos de bacterias, hongos y otras enfermedades patógenas incluyen *Aspergillus*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma* y *Vibrio cholerae*. Las especies ilustrativas incluyen *Neisseria gonorrhea*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, Grupo B *Streptococcus* sp., *Microplasma hominis*, *Hemophilus ducreyi*, *Granuloma inguinale*, *Lymphopathia venereum*, *Treponema pallidum*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus intestinalis*, *Leptospira pomona*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella abortus ovis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinobacillus seminis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia ramosa*, *Trypanosoma equiperdum*, *Babesia caballi*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*; o, un hongo, tal como, por ejemplo, *Paracoccidioides brasiliensis*; u otro patógeno, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*.

En determinados aspectos, el anticuerpo, TCR o CAR en la composición farmacéutica administrada al sujeto tiene especificidad de unión por un epítipo de un antígeno expresado por un patógeno infeccioso (por ejemplo, un epítipo expresado por el patógeno infeccioso que se está tratando).

En algunos aspectos, en el presente documento se proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria, rechazo del trasplante de piel o de órganos, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), o enfermedades autoinmunitarias, que comprende administrar a un sujeto una composición farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, TCR o CAR descrito en el presente documento obtenidos de los animales no humanos descritos en el presente documento). Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, nefritis glomerular, artritis, enfermedad similar a la miocardiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, eritematoso sistémico, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis alérgica de contacto, polimiosis, paquiderma, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgaris, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad de Behcet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, la dermatomiositis, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, anaemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de la esterilidad, hepatitis activa crónica, pénfigo, púrpura trombopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis crónica activa, la enfermedad de Addison, síndrome antifosfolípido, alergia atópica, gastritis atrófica autoinmunitaria, aclorhidria autoinmunitaria, enfermedad celíaca, síndrome de Cushing, la dermatomiositis, lupus discoide, eritematosis, síndrome de Goodpasture, tiroiditis de Hashimoto, atrofia idiopática de las glándulas suprarrenales, trombocitopenia idiopática, diabetes dependiente de insulina, síndrome de Lambert-Eaton, hepatitis lúpide, algunos casos de linfopenia, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, penfigoide, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, uveítis facogénica, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunitarios, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Raynaud, policondritis recidivante, síndrome de Schmidt, esclerodermia limitada (o síndrome de la cresta), oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tirotoxicosis, resistencia a la insulina de tipo B, colitis ulcerosa y granulomatosis de Wegener.

En determinados aspectos, el anticuerpo, TCR o CAR en la composición farmacéutica administrada al sujeto tiene especificidad de unión para la diana de un linfocito T autorreactivo en la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, un epítipo identificado por linfocitos B autorreactivos en una enfermedad autoinmunitaria). Proteínas ilustrativas identificadas por los linfocitos T autorreactivos incluyen, por ejemplo, p205, insulina, hormona estimuladora del tiroides, tirosinasa, TRP1 y mielina.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo la vía oral, nasal, tal como, por ejemplo, por un atomizador, la vía rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, tal como mediante polvos, pomadas o gotas, incluyendo la vía bucal y sublingual. En determinados aspectos, las composiciones farmacéuticas se administran generalmente (por ejemplo, mediante administración por vía oral o parenteral).

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden modificarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin que sea tóxico para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del agente particular empleado, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción o metabolismo del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y los antecedentes médicos previos del paciente que se está tratando y de factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

En algunos aspectos, el CAR y/o el TCR descritos en el presente documento se usan para la terapia basada en linfocitos B. Por ejemplo, en determinados aspectos, los linfocitos T que expresan un CAR y/o un TCR descritos en el presente documento se administran a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria basada en linfocitos T en el sujeto. Los métodos útiles en la terapia basada en linfocitos B se describen, por ejemplo, en Schumacher, *Nat. Rev. Immunol.* 2:512-519 (2002) y Bitton et al., *Frontiers in Bioscience* 4:d386-393 (1999).

En algunos aspectos, en el presente documento se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria basada en linfocitos B) en un sujeto. En algunos aspectos, el método incluye administrar al sujeto una célula (por ejemplo, un linfocito T humano, tal como un linfocito T CD4 o un linfocito T CD8) que expresa un CAR o TCR descrito en el presente documento.

En algunos aspectos, el sujeto es un sujeto que lo necesita. En algunos aspectos, el sujeto es un sujeto con cáncer o un sujeto infectado con un patógeno. En dichos aspectos, el péptido en el complejo péptido/MHC reconocido por CAR o TCR es un péptido de un antígeno canceroso o un péptido de un antígeno expresado por un patógeno infeccioso.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporciona un método para inhibir una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunos aspectos, el método incluye administrar al sujeto un linfocito T regulador (por ejemplo, un linfocito T regulador CD4<sup>+</sup>, CD-25<sup>+</sup> y foxp3<sup>+</sup> o un linfocito T Treg17) que expresan un CAR o TCR descrito.

En algunos aspectos, el sujeto es un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto con una enfermedad autoinmunitaria. En dichos aspectos, el linfocito T es un linfocito T regulador (es decir, un linfocito T supresor) y el péptido en el complejo péptido/MHC reconocido por el TCR o CAR es un autoantígeno frente al cual el sujeto experimenta una respuesta autoinmunitaria.

## **Moléculas de ácido nucleico**

En el presente documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, TCR o CAR descritos en el presente documento y/o porciones de anticuerpos, TCR y CAR descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica un dominio variable de un anticuerpo, TCR o CAR descrito en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico pueden amplificarse, por ejemplo, en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o prácticamente pura.

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de anticuerpo, TCR y/o CAR descritos en el presente documento o una porción de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes, por ejemplo, en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o prácticamente pura. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden obtener usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden clonarse usando técnicas de PCR convencionales o sintetizarse químicamente. Para los ácidos nucleicos que codifican los CAR, TCR o anticuerpos expresados por hibridomas, los ADNc que codifican cada cadena del anticuerpo, TCR o CAR producido por el hibridoma se puede obtener mediante amplificación por PCR o técnicas de clonación de ADNc convencionales.

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "vector", se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden unirse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de este modo pueden replicarse junto con el genoma del hospedador. Asimismo, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes. Dichos vectores se refieren en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión").

En determinados aspectos, en el presente documento se proporcionan células que contienen un ácido nucleico descrito en el presente documento (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, TCR o CAR descrito en el presente documento o una porción del mismo). La célula puede ser, por ejemplo, procariota, eucariota, mamífera, aviar, murina y/o humana. En determinados aspectos, el ácido nucleico descrito en el presente documento se une operativamente a un elemento de control de la transcripción, tal como un promotor. En algunos aspectos, la célula transcribe el ácido nucleico descrito en el presente documento y de este modo expresa un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo o polipéptido descrito en el presente documento. La molécula de ácido nucleico puede estar integrada en el genoma de la célula o puede ser extracromosómica.

Las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden clonarse usando técnicas de PCR convencionales o sintetizarse químicamente.

Para los anticuerpos y los ácidos nucleicos de CAR descritos en el presente documento, una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican segmentos  $V_H$  y  $V_L$ , estos fragmentos de ADN se pueden manipular más mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN codificante de  $V_L$  o  $V_H$  se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "se une/unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se juntan de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el mismo marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región variable de cadena pesada se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN de la región variable de cadena pesada a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humanas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242, o Lefranc, "The Immunoglobulin Handbook", Londres: Academic Press 2001) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN codificante de  $V_H$  se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región variable de cadena ligera se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica la región variable de cadena ligera a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242, o Lefranc, "The Immunoglobulin Handbook", Londres: Academic Press 2001) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

### Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían bien conocidos por los expertos en la materia (técnicas de clonación molecular, etc.). A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

#### Ejemplo 1: Generación de ratones que expresan TdT humana

Los ratones que comprenden un gen de TdT humana, ya sea como transgén aleatorio o dirigido al locus kappa de inmunoglobulina, se obtienen usando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, patente de EE.UU N.º 6.586.251 y Valenzuela, D.M., et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat. Biotech.* 21(6): 652-659), en donde las secuencias humanas derivadas de bibliotecas BAC que usan recombinación homóloga bacteriana se usan para producir vectores de direccionamiento grandes (LTVEC) que comprenden fragmentos genómicos del locus de TdT humana y, en el caso de TdT dirigida al locus IgK, flanqueado por brazos de direccionamiento para dirigir los LTVEC al locus IgK en células ES de ratón. Los LTVEC se linealizan y someten a electroporación en una línea de células ES de ratón de acuerdo con Valenzuela et al. Las células ES se criban por TAQMAN® para determinar el número de copias del gen (para transgenes integrados aleatoriamente) o el direccionamiento correcto al locus IgK.

Como alternativa, una isoforma corta del ADNc de TdT humana (TdTS) se sintetiza de nuevo (Blue Heron Bio) y se incorpora en un vector de direccionamiento para la introducción en células ES como se ha descrito anteriormente.

Los clones de células ES dirigidos se introducen en embriones de ratón en fase de 8 células (o antes) mediante método VELOCIMOUSE® (Poueymirou, WT et al. (2007). F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat. Biotech.* 25: 91-99). Los VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de célula ES donante) que llevan el locus de TdT humana se identifican mediante cribado por TAQMAN® en un ensayo de ganancia de alelos humanos (Valenzuela et al.). Los cachorros F0 se genotipan y se crían para homocigosidad. Se producen ratones homocigóticos para el locus de TdT humana y se fenotipan. Como se describe con más detalle en el siguiente Ejemplo 1, los ratones que comprenden TdTS humana y loci variables de cadena ligera y pesada humanos sin reordenar se generan introduciendo un transgén aleatorio de TdTS humana o dirigiendo TdTS humana al locus IgK en ratones VELOCIMUNE® que comprenden un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional. Sin embargo, al menos para el transgén de TdTS humana introducido al azar, dichos animales también pueden generarse generando primero células ES que comprenden una TdTS humana como se describe a continuación, generando ratones a partir de las mismas, y criando ratones que comprendan el locus de TdTS humana integrado al azar con ratones VELOCIMUNE® que comprenden un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional.

#### Ejemplo 1.1. Generación de transgén que expresa isoforma corta de TdT humana (TdTS) bajo el control de elementos reguladores de Rag de ratón (*Rag-TdT tg*)

En resumen, se construyó un gran vector de direccionamiento (LTVEC), mostrado en detalle en la FIG. 1, a partir de clones BAC humanos y de ratón en los que el gen *Rag2* de ratón (desde el codón de inicio ATG en el exón 3 hasta el codón de parada TGA en el exón 3) se sustituyó con el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal humana (TdT o DNTT) que codifica solo la isoforma corta, TdTS (desde el codón de inicio ATG en el exón 1 hasta aproximadamente 0,5 kb 3' de la señal de poliA en el exón 13). Los sitios de corte y empalme del ARN de los exones 7 y 12 de TdT se mutaron para evitar la expresión de las isoformas largas (TdT<sub>L1</sub> y L2). En el mismo LTVEC, el gen *Rag1* de ratón desde el codón de inicio ATG en el exón 2 hasta el codón de terminación TAA en el exón 2 se sustituyó con la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y la señal de poliA de 3'UTR de *LacZ*. El LTVEC contiene 130 kb de secuencias reguladoras aguas arriba 5' del gen *Rag2* de ratón y 8,8 kb de secuencias reguladoras aguas arriba 3' del gen *Rag1* de ratón, así como la región intergénica *Rag2-Rag1* de 5,6 kb.

El LTVEC se construyó a partir del clon de BAC de ratón RP23-374f10 (Invitrogen/Life Technologies) que contiene los genes *Rag2* y *Rag1*, y el clon de BAC humano RP11-1070o2 (Invitrogen/Life Technologies) que contiene el gen de TdT usando técnicas de biología molecular y de recombinación convencionales tales como PCR, restricción digestión/ligamiento, ensamblaje isotérmico de Gibson, CRISPR/Cas9, recombinación homóloga bacteriana, etc. El LTVEC definitivo contiene, desde 5' a 3': (1) un casete Loxp-pgk-puro-neo-loxp para la selección en células ES o bacterias, (2) 134.069 pb de la secuencia genómica de ratón que comienza 129.440 pb aguas arriba del exón 1 de *Rag2* y termina 25 pb desde el comienzo del exón 3 de *Rag2* (coordenadas del genoma del ratón 2:101.495.278-101.629.347 basadas en el ensamblaje GRCm38), (3) 34.573 pb de la secuencia genómica de TdT humana que comienza en el codón de inicio ATG en el exón 1 y termina en 514 pb 3' de la señal de poliA (coordenadas del genoma humano 10:96.304.498-96.339.063 basadas en el ensamblaje GRCh38); dentro del gen de TdT humana, el sitio donante de corte y empalme del exón 7 se somete a delección y se sustituye por un sitio NotI para evitar la expresión de la isoforma TdT<sub>L2</sub>, y el sitio aceptor de corte y empalme del exón 12 se somete a delección para evitar la expresión de la isoforma TdT<sub>L1</sub> (descripción detallada a continuación), (4) sitio AsiSI; (5) 10.742 pb de la secuencia genómica de ratón (coordenadas del genoma GRCm38 2:101.630.931-101.641.672) que contienen la 3'UTR del exón 3 de *Rag2* (1.599 pb), la región intergénica *Rag2/Rag1* de 5.753 pb y la 3'UTR del exón 2 de *Rag1* (3390 pb), (6) sitio FseI, (7) 1.068 pb en la hebra negativa que contiene la señal de poliA de 249 pb de *LacZ* y la CDS de 793 pb de EGFP, (8) 13.459 pb de la secuencia genómica de ratón (GRCm38 coordenadas 2:101.644.793-101.658.251) con *Rag1* en la hebra negativa, comenzando en el codón de inicio ATG en el exón 2 de *Rag1* y terminando 8.750 pb 3' del sitio de inicio de la transcripción de *Rag1*, y (9) casete Em7-CM para selección en bacterias (véase FIG. 1).

De manera detallada, se construyeron los pasos de clonación para crear dos modificaciones del gen de TdT para evitar el corte y empalme alternativo usando los exones 7 y 12 de TdT (que se usan para obtener las isoformas largas TdT<sub>L2</sub> y TdT<sub>L1</sub>, respectivamente) mientras se permite el corte y empalme del transcrito que codifica la isoforma corta



TdTS a partir del clon BAC RP11-1070o2 usando BHR y ligamiento:

- (1) se sometieron a delección 13 pb, incluido el sitio donante de corte y empalme del exón 7 (GTCGGGTCGTGGT (SEQ ID NO: 1), el donante de corte y empalme subrayado) y se sustituyeron por un sitio NotI (GCGGCCGC (SEQ ID NO: 2)). Esto creó un sitio SacII superpuesto (CCGCGG (SEQ ID NO: 3)), y  
(2) se eliminó el sitio aceptor de corte y empalme de 2 pb del exón 12.

El LTVEC final se representa en la **FIG. 1**, con las posiciones aproximadas de diferentes uniones de secuencia indicadas en la figura. Las uniones también se resumen en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1: Uniones de secuencia de Rag-TdT Tg LTVEC**

Unión	SEQ ID NO	Secuencia
1 (Rag2 de ratón/TdT humana)	4	TATTGCGTTTTTTTAATCCTTTCAGATAAAAGACCTA TTCACAATCAAAA/ ATGGATCCACCACGAGCGTCCC ACTTGAGCCCTCGGAAGAAGAGACCCC
2 (TdT humana/AsiS 1/Rag2 de ratón)	5	GCCCTGGCTGAGGGAAATTTTGGAAGTCCCAGGC TCCAGACCCATTCTTT/ GCGATCGC/ TTTAGCAAA AGCCCCCTCAGACTCAGGTATATTGCTCTCT GAATCTACTTT
3 (Rag 1 de ratón/Fse 1/EGFP)	6	CCAAAGGAAAACACATTGGCAAATACCAACTTCTATG TGGAGATCCTAT/ GGCCGGCC/ GGGGATCCAGACATGA TAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC
4 (EGFP/Rag 1 de ratón)	7	TCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTC CTCGCCCTTGCTCAC/ CATGTTGGCTAAGC TACCTGGGAACAATGGGGGGGGGGGGGGGGGA GTCAAG

El LTVEC final se linealizó y sometió a electroporación en células ES VELOCIMMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 8.642.835). Después de la selección con Neo, las células ES se cribaron por TAQMAN® para determinar el número de copias del transgén. Se obtuvieron células ES que comprendían una sola copia, dos copias o copias múltiples del transgén Rag-TdT humano.

El sitio de integración del transgén Rag-TdT se determina mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el sitio de integración se determina mediante la secuenciación de extremos pareados de baja cobertura del genoma completo del ratón (Biblioteca de secuenciación - Nextera DNA Library Preparation, Illumina; Secuencia - Miseq, Illumina). Por ejemplo, en un caso, se determinó que el transgén Rag-TdT se integró como dos copias en tándem de cabeza a cola entre las coordenadas 41130492 y 41130502 en el cromosoma 1 (coordenadas en el ensamblaje GRCh38/mm10), sin alterar ninguna región codificante.

**Ejemplo 1.2. Generación de inserción en locus kappa de inmunoglobulina dirigida de isoforma corta de TdT humana (TdTS) bajo el control de elementos reguladores de Rag de ratón (Rag-TdT IgK)**

Con el fin de generar un ratón que comprenda TdT humana bajo el control de los elementos reguladores de *Rag* en el locus kappa de inmunoglobulina de ratón, se añadieron brazos de homología de IgK de ratón para la recombinación en células ES a los extremos 5' y 3' de la construcción que se genera como se describe en el Ejemplo 1.1 y la **FIG. 1**. En general, los brazos de IgK de ratón se añaden: (1) modificando el BAC de IgK de ratón mediante recombinación homóloga bacteriana para insertar un casete de selección (por ejemplo, Hyg, Neo, etc.) flanqueado por los sitios de enzima de restricción I-CeuI y PI-SceI, y (2) insertando la construcción TdT en el BAC de IgK de ratón mediante ligamiento con I-CeuI y PI-SceI. El LTVEC final está representado en la **FIG. 2**.

Este LTVEC final contiene, desde 5' a 3': (1) un casete Spec para la selección en bacterias, (2) un brazo de homología

de ratón 5' de 28.591 pb (coordenadas del genoma GRCm38 6:70.725.823-70.754.415) que contiene el gen de IgKc, el potenciador 3' de IgK y la secuencia recombinante (RS) de IgK 3'; el brazo del ratón termina aproximadamente 2,6 kb 3' de la RS, (3) sitio PI-SceI, (4) un casete loxp-UbCp-em7-hyg-loxp para la selección en células ES o bacterias, (5) la construcción descrita anteriormente en el Ejemplo 1.1 y la FIG. 1 que contiene los genes de promotor de Rag2-TdTS humana y Rag1-EGFP, (6) sitio I-CeuI, (7) un brazo de homología de IgK de ratón 3' de 44.900 pb (coordenadas del genoma GRCm38 6:70.754.508-70.799.678), y (8) casete CM para la selección en bacterias.

El LTVEC final se representa en la FIG. 2, con las posiciones aproximadas de diferentes uniones de secuencia indicadas en la figura. Las uniones también se resumen en la siguiente Tabla 2.

**Tabla 2: Uniones de secuencia de Rag-TdT IgK LTVEC**

Unión	SEQ ID NO	Secuencia
1. (IgK de ratón/PI-Sce1/casete loxp-Ub-Hyg )	8	CATCCTTACATCTTTGTCATCCCCTGTATCAACA TGGAAAGGCATTAATG/ATCTATGTCGGGTGCGG AGAAAGAGGTAATGAAATGGCA/ACCGGTATAA CTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATG CATGGCC
2. (casete loxp-Ub-Hyg/Rag2 de ratón)	9	TTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTC GACCTCGAGGGGGGGGCCC/ACCTCCAGC TGCCTTACAGAAAAGCAAATGCTTGCTTGCA ACAATCACCT
3. (Rag2 de ratón/TdTS humana)	10	TATTGCGTTTTTTTAATCCTTTCAGATAAAA GACCTATTACAATCAAAA/ATGGATCCACC ACGAGCGTCCCCTTGAGCCCTCGGAAGAA GAGACCCC
4. (TdTS humana/AsiS 1/Rag2 de ratón)	11	GCCCTGGCTGAGGGAAATTTTGGAACTCCCAG GCTCCAGACCCATTCTTT/GCGATCGC/TTTAG CAAAAGCCCCCTCAGACTCAGGTATATTGCTCT CTGAATCTACTTT
5. (Rag1 de ratón/Fse1/EGFP)	12	CCCAAAGGAAAACACATTGGCAAATACCAA CTTCTATGTGGAGATCCTAT/GGCCGGCC/GG GGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAG TTTGGACAAACCACAAC
6. (EGFP/Rag 1 de ratón)	13	TCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACA GCTCCTCGCCCTTGCTCAC/CATGTTGGCTAA GCTACCTGGGAACAATGGGGGGGGGGGGGGGG AGTCAAG

(continuación)

Unión	SEQ ID NO	Secuencia
7. (Rag1 de ratón/I-Ceu/IgK de ratón)	14	ACCTCTGCTGTGTCTGCAAGTTTGGCTTGTTCTGCTTCTGATTTTGGG/TCTAGACCCCCGGGCTCGATAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGACTCGAG/CATAACCACTTTCCTGCTATGGATCTGTAAATATCCGCCAAAGGCCAAG

El LTVEC resultante se linealizó y se sometió a electroporación en células ES VELOCIMMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 8.642.835). Después de la selección en cuanto a la resistencia a Hyg, las células ES se cribaron por modificación TAQMAN® del ensayo de alelos (Valenzuela et al, *supra*) para identificar correctamente clones dirigidos.

*Ejemplo 1.3. Generación de inserción en locus Kappa de inmunoglobulina transgénica aleatoria y dirigida de isoforma corta de TdT humana (TdTS), ambas bajo el control del potenciador intrónico de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (Eμ) y el promotor de IgVH1-72 de ratón (mIgH-Eμ-VH1-72-TdT tg y mIgH-Eμ-IH1-72-TdT IgK, respectivamente)*

El mismo gen de TdT humana que se usó para hacer el Rag-TdT en los Ejemplos 1.1 y 1.2 (es decir, desde el codón de inicio ATG hasta aproximadamente 514 pb 3' de la señal de poliA), se colocó bajo el control del potenciador Eμ de ratón de 689 pb y el promotor de IgVH1-72 de ratón de 303 pb. Esta construcción se integró aleatoriamente en el genoma del ratón o se dirigió al locus de inmunoglobulina K (IgK). Para la integración dirigida, el gen se insertó entre los mismos brazos de homología de IgK de ratón 5' y 3' que se usaron para producir LTVEC en el Ejemplo 1.2.

Específicamente, el LTVEC final contiene, desde 5' a 3' (**FIG. 3**): (1) un casete Spec para la selección en bacterias, (2) un brazo de homología de ratón 5' de 28.591 pb (coordenadas del genoma GRCm38 6:70.725.823-70.754.415) que contiene el gen de IgK constante (IgKC), el potenciador 3' de IgK y la secuencia recombinante (RS) de IgK 3'; el brazo del ratón termina aproximadamente 2,6 kb 3' de la RS, (3) sitio I-CeuI, (4) casete loxp-UbCp-em7-hyg-loxp en orientación inversa para la selección en células ES o bacterias, (5) el mismo gen de TdT humana de 34.573 pb usado en los Ejemplos anteriores en orientación inversa, (6) el promotor IgHV1-72 de ratón de 303 pb en orientación inversa (coordenadas del genoma GRCm38 12:115.758.417-115.758.719), (7) El potenciador Eμ de 689 pb de ratón (fragmento EcoRI-XbaI, coordenadas del genoma GRCm38 12:113.427.284-113.427.972) en orientación inversa, (8) sitio PI-SceI, (9) un brazo de homología de IgK de ratón 3' de 44.900 pb (coordenadas del genoma GRCm38 6:70.754.508-70.799.678), y (10) casete CM para la selección en bacterias.

Las posiciones aproximadas de las uniones de secuencia específicas en el vector final se representan en la **FIG. 3**, y sus secuencias se indican en la siguiente Tabla 3.

**Tabla 3: Uniones de secuencia de mIgH-Eμ-VH1-72-TdT IgK LTVEC**

Unión	SEQ ID NO	Secuencia
1. (ratón/I-Ceu 1/casete loxp-Ub-Hyg)	15	CATCCTTACATCTTTGTCATCCCCTGTAT CAACATGGAAAGGCATTAATG/TCGCTA CCTTAGGACCGTTATAGTTA/GGCCCCCCCTCGA GGTCGACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAG
2. (casete loxp-Ub-Hyg/TdT humana)	16	GGCCATGCATATAACTTCGTATAGCAT ACATTATACGAAGTTATACCGGT/AAA GAATGGGTCTGGAGCCTGGGAGTTCCA AAATTTCCCTCAGCCAGGGC

(continuación)

Unión	SEQ ID NO	Secuencia
3. (TdT humana/IgHV1-72 de ratón)	17	CGGGGTCTCTTCTTCCGAGGGCTCAAGT GGGACGCTCGTGGTGGATCCAT/GGTGAG GTCCTGTGTGCTCAGTAACTGTAAAGAGA ACAGTGATCTCATGT
4. (Eμ de ratón/PI-SceI/IgK de ratón)	18	TAGTTTCCCCAACTTAAGTTTATCGACTTCTA AAATGTATTTAGAATTC/TGCCATTTTCATTACC TCTTTCTCCGCACCCGACATAGATAAAGCTT/CA TAACCACTTTCTGCTATGGATCTGTAAATAT CCGCCAAAGGCCAAG

El LTVEC resultante se linealizó y se sometió a electroporación en células ES VELOCIMMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 8.642.835). Después de la selección en cuanto a la resistencia a Hyg, Los clones de células ES se cribaron por TAQMAN® en cuanto al direccionamiento correcto al locus IgK de ratón (para mlgH-Eμ-VH1-72-TdT IgK) o en cuanto al número de copias del transgén (para mlgH-Eμ-VH1-72-TdT tg).

*Ejemplo 1.4. Generación de inserción en locus Kappa de inmunoglobulina dirigida, así como TdTS humana transgénica a partir de ADNc de TdTS*

Como alternativa, se sintetiza de nuevo un ADNc de TdTS (Blue Heron Bio) como un fragmento de ADN de 3.682 pb y se incorpora en un vector de direccionamiento para introducirlo en las células ES. El vector de direccionamiento contiene, desde 5' a 3', un sitio PI-SceI, el potenciador intrónico de IgH de ratón de 689 pb (fragmento EcoRI-XbaI), el promotor de VH1-72 de ratón de 303 pb, la CDS de 1.530 pb de TdTS humana (Secuencia de referencia de NCBI NM\_004088) con el intrón 2 de 735 pb conservado entre los exones 2 y 3 para la mejora de la expresión mediada por intrones, la 3' UTR/señal de poliA de TdT humana de 340 pb, sitios de enzima de restricción NotI y SalI para ligamiento en un casete loxp-neo-loxp, y un sitio I-CeuI. El vector se insertó entre los mismos brazos de homología de IgK de ratón 5' y 3' que se usaron para producir LTVEC en el Ejemplo 1.2 y se dirigió al locus IgK o se integró al azar en el genoma del ratón.

El LTVEC resultante se linealiza y se somete a electroporación en células ES VELOCIMMUNE® que comprenden un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 8.642.835). Después de la selección en cuanto a la resistencia a Hyg, los clones de células ES son cribados por TAQMAN® en cuanto al direccionamiento correcto al locus IgK de ratón (para la versión dirigida a IgK) o para el número de copias del transgén (para la versión transgénica).

*Ejemplo 1.5. Ratones que expresan TdTS humana*

Como se ha descrito anteriormente, una vez que se producen las células ES dirigidas correctamente, se introducen en embriones de ratón en etapa de 8 células (o antes) por el método VELOCIMOUSE®, seleccionados en un ensayo de ganancia de alelo, y posteriormente criados para homocigosidad. Los animales heterocigotos u homocigotos expresan TdTS humana, así como anticuerpos que comprenden dominios de cadena ligera y pesada variables humanos y regiones constantes de ratón (ya que estos ratones comprenden segmentos génicos variables pesados y ligeros de inmunoglobulina humanos en los loci endógenos IgK e IgH, respectivamente: ratones VELOCIMUNE®).

Se generaron y ensayaron varias versiones de ratones con TdTS humana, e incluían TdTS transgénica aleatoria y dirigida a IgK, ambas bajo el control del promotor de Rag y elementos reguladores Eμ-VH1-72. También se incluyeron versiones con una, dos o varias copias del transgén de TdTS; así como versiones generadas a partir de secuencias genómicas de TdT y del ADN de TdT. Los ejemplos restantes demuestran los datos obtenidos con ratones que comprenden un transgén Rag-TdTS genómica (inserción en tándem de dos copias en el cromosoma 1, como se describe en el Ejemplo 1.1 anterior) y Eμ-VH1-72-TdTS genómica dirigido al locus IgK (Ejemplo 1.3).

En primer lugar, los ratones se ensayan para determinar la expresión de TdT. Se usó PT-PCR para amplificar los transcritos de TdT de la médula ósea de ratones control VELOCIMMUNE®, VELOCIMMUNE® + transgén Rag-TdTS genómica, o VELOCIMMUNE® + Eμ-VH1-72-TdTS genómica dirigido al locus IgK. El ARN total se usó para la transcripción inversa por transcriptasa inversa SUPESCRIPT® III (Life Technologies) usando el cebador Oligo-dT. La

PCR se realizó con supermezcla verdeSYBR® Universal SsoAdvanced™, con cebadores para Beta Actina (control), cebadores diseñados para amplificar los exones 1-2, cebadores diseñados para amplificar los exones 4-6, cebadores diseñados para amplificar los exones 7-9 y cebadores diseñados para amplificar los exones 9-11. Como se muestra en la FIG. 4, se detectó la presencia de exones de TdTS humana en ambas versiones de los ratones, mientras que estaba ausente en ratones de control VELOCIMMUNE®.

## Ejemplo 2. Diversidad de unión de inmunoglobulina kappa humana en ratones que comprenden TdTS humana

Para evaluar la diversidad de secuencias del repertorio de las inmunoglobulinas en diferentes modelos de ratón con TdTS humana VELOCIMMUNE® descritos anteriormente en el Ejemplo 1, las secuencias de IgK se amplificaron mediante 5' RACE de bazos de diferentes ratones con cebador constante mlgK y se secuenciaron usando Illumina MiSeq.

Específicamente, los linfocitos B esplénicos se enriquecieron positivamente a partir de esplenocitos totales mediante clasificación celular magnética usando perlas magnéticas anti CD19 y columnas MACS® (Miltenyi Biotech). El ARN total se aisló de linfocitos B esplénicos purificados usando un kit de aislamiento de ARN RNeasy Plus (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una transcripción inversa para generar ADNc que contenía la secuencia de la región Igk constante, usando un kit de amplificación de ADNc SMARTer™ RACE (Clontech) y un cebador específico de Igk (Tabla 4). Durante este proceso, una secuencia de ADN, que es un complemento inverso al 3' del cebador PE2-PIIA, se unió al extremo 3' de los ADNc recién sintetizados. A continuación, los ADNc específicos de Igk purificados se amplificaron mediante la primera ronda de PCR usando el cebador PE2-PIIA y un cebador específico de Igk constante enumerado en la Tabla 4. Los productos de PCR entre 450 y 700 pb se aislaron usando Pippin Prep (SAGE Science). Estos productos se amplificaron además mediante una segunda ronda de PCR usando los cebadores enumerados en la Tabla 4 ("XXXXXX" representa una secuencia índice de 6 pb para permitir la multiplexación de muestras para la secuenciación). Los productos de PCR entre 400 pb-700 pb se aislaron, se purificaron y se cuantificaron mediante qPCR usando un kit de cuantificación de bibliotecas KAPA (KAPA Biosystems) antes de cargarlos en un secuenciador Miseq (Illumina) para la secuenciación usando los kits de reactivo Miseq v3 (600 ciclos).

**Tabla 4: Cebadores usados en la preparación de bibliotecas para la secuenciación del repertorio de Igk**

Cebadores de RT	IgK (SEQ ID NO: 19)	5' - AAGAAGCACACGACTGAGGCAC - 3'
cebadores de PCR de la 1ª ronda	IgK constante (SEQ ID NO: 20)	5' - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GGAAGATGGATACAGTTGGTGC - 3'
	PE2-PIIA (SEQ ID NO: 21)	5' - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3'
cebadores de PCR de la 2ª ronda	Directos (SEQ ID NO: 22)	5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXX XX ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT - 3'
	Inversos (SEQ ID NO: 23)	5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXX GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT - 3'

Para el análisis bioinformático, las secuencias de Illumina sin procesar se desmultiplexaron y se filtraron en función de la calidad, la longitud y el emparejamiento perfecto con el cebador de la región constante kappa. Las lecturas de los extremos emparejados superpuestas se combinaron y analizaron mediante un proceso interno personalizado. El proceso usó la instalación local de IgBLAST (NCBI, v2.2.25+) para alinear las secuencias de cadenas ligera reordenadas con la base de datos de genes V y J de la línea germinal humana. Los reordenamientos se consideraron productivos si no se detectaban codones de parada y la unión VJ estaba dentro del marco con el segmento J. De lo contrario, los reordenamientos se consideraron improductivos y se excluyeron del análisis.

Las secuencias de CDR3 se extrajeron usando los límites del Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT). La región de unión entre los segmentos V y J anotados se clasificó como nucleótidos P y N. La región con adiciones de N/P se extrajo de cada secuencia y se calculó su longitud. La diversidad del repertorio de anticuerpo se calculó analizando clonotipos únicos. La diversidad de secuencias se definió como un número de secuencias de CDR3

únicas en 10.000 lecturas elegidas al azar.

La **FIG. 5** muestra que se detectó un aumento de hasta 2 veces en el número de secuencias de aminoácidos de CDR3 únicas en modelos de ratón con TdTS humana en comparación con ratones VELOCIMMUNE® que no comprendían TdTS humana. También se observó una mayor diversidad de CDR3 a nivel de nucleótidos (datos no mostrados). La **FIG. 5** solo muestra los datos obtenidos con ratones que comprenden dos copias del transgén de Rag-TdTS genómica (Rag TdT Tg) y Eμ-VH1-72-TdTS genómica dirigido al locus IgK (mIgH-Eμ-VH1-72 TdT IgK) (tanto versiones homocigotas como heterocigotas), aunque que se obtuvieron datos similares de otras versiones de los ratones (no mostrados).

### **Ejemplo 3. Aumento de las adiciones no germinales en ratones que comprenden TdTS humana**

El porcentaje de adiciones de nucleótidos que no son de la línea germinal en CDR3 (que consta de partes de los segmentos génicos Vk y Jk) también se determinó a partir de la secuenciación de próxima generación descrita en el anterior ejemplo 2.

Como se representa en la **FIG. 6**, se demostró que aproximadamente el 45 % de la cadena ligera kappa humanizada en los linfocitos B tenían adiciones no germinales en ambas versiones de ratones con TdTS humanizada en comparación con aproximadamente el 10 % en ratones VELOCIMMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional. El análisis de secuencias de las cadenas ligeras de inmunoglobulina del bazo mostró de 0 a 8 adiciones sin molde en cadenas ligeras de ratones con TdTS humana (8 en la figura incluye secuencias con 8 o más adiciones sin molde).

### **Ejemplo 4. Longitudes de CDR3 de cadena ligera humana en inmunoglobulinas obtenidas de ratones con TdTS humana**

Las secuencias de CDR3 se extrajeron usando los límites del Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT). Los nucleótidos que no son de molde se determinaron basándose en secuencias V y J de cadena ligera conocidas.

Como se representa en la **FIG. 7A**, el aumento de las adiciones sin molde observadas en las dos versiones de los ratones con TdTS humana descritos en los Ejemplos 2 y 3 anteriores condujo a un aumento en la longitud de CDR3 de la cadena ligera kappa en comparación con los ratones control (ratones VELOCIMMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional). Como se representa en la **FIG. 7B**, el análisis de secuencia no reveló una actividad extensa de exonucleasa que afectara a las tasas de recorte de J 5' en ratones con Rag-TdTS (en el presente documento solo se muestran los datos para ratones heterocigotos) en comparación con el control (ratones VELOCIMMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional).

### **Ejemplo 5. Uso del segmento génico Vk y Jk de cadena ligera humano en ratones con TdTS humana**

Como se muestra en las **FIG. 8A y 8B**, la introducción de TdTS humana en las dos versiones de ratones descritas en los Ejemplos 2 y 3 anteriores no alteró significativamente el uso de los segmentos génicos Vk o de los segmentos génicos Jk en comparación con ratones VELOCIMMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional.

### **Ejemplo 6. Diversidad de unión en el locus de inmunoglobulina lambda de cadena ligera y otros loci de reordenamiento en ratones que comprenden TdTS humana**

Además del locus kappa de inmunoglobulina humana, puede investigarse la diversidad de receptor- antígeno en otros loci de linfocitos B (cadena ligera λ, cadena pesada) y T (α/β).

Por ejemplo, cuando la diversidad de unión ligera lambda que contiene C λ1 en ratones VELOCIMMUNE® que comprendía un gen *Adam6* de ratón ectópico funcional se comparó con los mismos ratones VELOCIMMUNE® que también comprendían transgenes de TdT humana descritos en el Ejemplo 1 anterior usando el mismo método de secuenciación que se describe en el Ejemplo 2 y los cebadores enumerados en la **Tabla 5**, se observó una mayor diversidad de secuencias (aproximadamente 2 veces) en el locus lambda de ratón de ratones transgénicos (**FIG. 9**). Además, observamos un aumento en la tasa de adiciones sin molde de inmunoglobulina lambda de ratón (**FIG. 10**). Las longitudes de CDR3 de las cadenas lambda en los ratones transgénicos con TdT se representan en la **FIG. 11**. Por último, no se observó ninguna diferencia en el uso de V lambda de ratón entre los diferentes animales ensayados (**FIG. 12**).

**Tabla 5: Cebadores usados en la preparación de bibliotecas para la secuenciación del repertorio de IgL-C1**

<b>Cebadores de RT</b>	<b>IgL (SEQ ID NO: 24)</b>	<b>5' - CACCAGTGTGGCCTTGTTAGTCTC- 3'</b>
<b>cebadores de PCR de la 1ª ronda</b>	<b>IgL constante (SEQ ID NO: 25)</b>	<b>5' - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAA GGTGGAAACAGGGTGACTGATG - 3'</b>
	<b>PE2-PIIA (SEQ ID NO: 21)</b>	<b>5' - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3'</b>
<b>cebadores de PCR de la 2ª ronda</b>	<b>Directos (SEQ ID NO: 22)</b>	<b>5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXX XXACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT - 3'</b>
	<b>Inversos (SEQ ID NO: 23)</b>	<b>5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXX GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT- 3'</b>

Adicionalmente, para los ratones VELOCIMUNE® que comprenden segmentos génicos variables de cadena ligera y pesada humanos sin reordenar, incluidos aquellos que comprenden el gen *Adam6* de ratón ectópico funcional como se describe anteriormente (por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 8.878.001; 9.078.418; 9.125.386), o ratones que comprenden solo segmentos génicos variables de cadena pesada humanos sin reordenar o segmentos génicos variables de cadena ligera humanos sin reordenar, se pueden generar otros animales que contengan una TdTS humana. Algunos de dichos animales incluyen aquellos que comprenden una región variable lambda humana en el locus lambda o kappa endógeno de ratón (Patentes de EE. UU. N.º 9.035.128; 9.066.502; 9.163.092; 9.120.662; 9.029.628; 9.006.511; 9.012.717), una región variable kappa humana en el locus endógeno de cadena pesada (por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2012/0096572), un loci de TCR alfa y beta humanizado (por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 9.113.616) y varias permutaciones de los mismos, ratones con cadena ligera doble y permutaciones de los mismos (publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2013/0198880), ratones con cadena ligera universal y permutaciones de los mismos (por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2011/0195454; 2013/018582), ratones con cadena pesada universal y permutaciones de los mismos (por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 9.204.624), ratones que comprenden sustituciones de histidina en su genoma de línea germinal (por ejemplo, patentes de EE. UU. N.º 9.334.334 y 9.301.510, publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2013/0247236, 2014/0013456), ratones con receptor de antígeno quimérico (por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2016/0081314), ratones que carecen de un dominio CH1 (por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 8.754.287 y publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2015/0289489). Cualquiera de dichos animales donde se desee aumentar la diversidad de unión en la cadena ligera y/o pesada (por ejemplo, cadena ligera y/o pesada humana) puede generarse mediante la introducción en células ES que comprenden dichas modificaciones, ya sea un transgén o una inserción dirigida de TdTS humana descrita en el presente documento. En el caso de ratones generados a partir de células ES que comprenden un transgén de TdTS integrado aleatoriamente (y en los casos donde no se haya modificado el locus IgK, por ejemplo, ratones con loci de TCR humanizados), también se pueden generar criando ratones que comprenden varias modificaciones mencionadas anteriormente. La incorporación exitosa del alelo de TdTS en dichos animales se determina como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y el efecto de la expresión de TdTS humana en la generación de la diversidad de unión en varios loci se determina como se ha descrito anteriormente en el presente documento. También se estudia el efecto sobre los loci de reordenamiento no modificados, por ejemplo, loci endógenos de linfocitos B e inmunoglobulina de ratón.

Uno de dicho ejemplo, donde se estudió el efecto de la introducción de TdTS en la diversidad de unión de ratones de doble cadena ligera, se presenta en los siguientes Ejemplos 7-10.

#### **Ejemplo 7. Diversidad de unión de inmunoglobulina kappa humana en ratones de doble cadena ligera (DLC) que comprenden TdTS humana**

Se generaron ratones que comprendían un locus de cadena ligera dual y TdTS humana mediante la cría de ratones VELOCIMUNE® que comprendían un gen *Adam6* de ratón funcional (véanse las patentes de EE. UU. N.º 8.642.835 y 8.697.940) y TdTS humana exógena con ratones que comprendían el locus de cadena ligera dual (véase la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2013/0198880).

Para evaluar la diversidad de secuencias del repertorio de inmunoglobulinas en modelos de ratón con TdTS humana DLC que tienen un loci Igk limitado que contiene solo dos segmentos génicos V<sub>k</sub> sin reordenar: IGVK3-20 e IGVK1-



39, y cinco segmentos génicos IGJK sin reordenar (véase la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º US2013/0198880), las secuencias de Igk se amplificaron mediante 5' RACE de bazos de varios ratones con cebador constante mlgK y se secuenciaron usando Illumina MiSeq. En la mayoría de los experimentos, se usaron varios ratones heterocigotos para Rag TdT Tg y homocigotos para el locus DLC (Rag TdT tg (HET) DLC) y dos ratones homocigotos para Rag TdT Tg y homocigotos para el locus DLC (Rag TdT tg (HO) DLC); los datos para Rag TdT tg (HET) DLC se representan como la media de todos los ratones ensayados, mientras que los dos ratones Rag TdT tg (HO) DLC se muestran individualmente.

Específicamente, los linfocitos B esplénicos se enriquecieron positivamente a partir de esplenocitos totales mediante clasificación celular magnética usando perlas magnéticas anti CD19 y columnas MACS® (Miltenyi Biotech). El ARN total se aisló de linfocitos B esplénicos purificados usando un kit de aislamiento de ARN RNeasy Plus (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una transcripción inversa para generar ADNc que contenía la secuencia de la región Igk constante, usando un kit de amplificación de ADNc SMARTer™ RACE (Clontech) y un cebador específico de Igk (**Tabla 4**). Durante este proceso, una secuencia de ADN, que es un complemento inverso al 3' del cebador PE2-PIIA, se unió al extremo 3' de los ADNc recién sintetizados. A continuación, los ADNc específicos de Igk purificados se amplificaron mediante la primera ronda de PCR usando el cebador PE2-PIIA y un cebador específico de Igk constante enumerado en la **Tabla 4**. Los productos de PCR entre 450 y 700 pb se aislaron usando Pippin Prep (SAGE Science). Estos productos se amplificaron además mediante una segunda ronda de PCR usando los cebadores enumerados en la **Tabla 4** ("XXXXXX" representa una secuencia índice de 6 pb para permitir la multiplexación de muestras para la secuenciación). Los productos de PCR entre 400 pb-700 pb se aislaron, se purificaron y se cuantificaron mediante qPCR usando un kit de cuantificación de bibliotecas KAPA (KAPA Biosystems) antes de cargarlos en un secuenciador Miseq (Illumina) para la secuenciación usando los kits de reactivo Miseq v3 (600 ciclos).

Para el análisis bioinformático, las secuencias de Illumina sin procesar se desmultiplexaron y se filtraron en función de la calidad, la longitud y el emparejamiento perfecto con el cebador de la región constante kappa. Las lecturas de los extremos emparejados superpuestas se combinaron y analizaron mediante un proceso interno personalizado. El proceso usó la instalación local de IgBLAST (NCBI, v2.2.25+) para alinear las secuencias de cadenas ligera reordenadas con la base de datos de genes V y J de la línea germinal humana. Los reordenamientos se consideraron productivos si no se detectaban codones de parada y la unión VJ estaba dentro del marco con el segmento J. De lo contrario, los reordenamientos se consideraron improductivos y se excluyeron del análisis.

Las secuencias de CDR3 se extrajeron usando los límites del Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT). La región de unión entre los segmentos V y J anotados se clasificó como nucleótidos P y N (adiciones sin molde). La región con adiciones de N/P se extrajo de cada secuencia y se calculó su longitud. La diversidad del repertorio de anticuerpo se calculó analizando clonotipos únicos. La diversidad de secuencias se definió como un número de secuencias de CDR3 únicas en 10.000 lecturas elegidas al azar.

La **FIG. 13** muestra que se detectó un aumento de más del doble en el número de secuencias de aminoácidos de CDR3 únicas en modelos de ratón con TdTS humana DLC en comparación con ratones DLC que no comprendían TdTS humana introducida.

#### **Ejemplo 8. Aumento de las adiciones no germinales en ratones DLC que comprenden TdTS humana**

El porcentaje de adiciones de nucleótidos que no son de la línea germinal en CDR3 (que consiste en partes de segmentos génicos de tanto Vk como Jk) en secuencias de inmunoglobulina de ratones DLC con TdT también se determinó a partir de la secuenciación de próxima generación descrita en el anterior ejemplo 7.

Como se representa en la **FIG. 14**, se demostró que aproximadamente la mitad de las cadenas ligeras kappa humanizadas en los linfocitos B tenían adiciones no germinales en ratones con TdT humanizada DLC (tanto HET como HO para TdT) en comparación con aproximadamente el 10 % en ratones de control DLC (ratones DLC sin TdT humana introducida).

#### **Ejemplo 9. Longitudes de CDR3 de cadena ligera humana en inmunoglobulinas obtenidas de ratones DLC que comprenden TdTS humana**

Las secuencias de CDR3 se extrajeron usando los límites del Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT). Los nucleótidos que no son de molde se determinaron a partir de secuencias V y J de cadena ligera conocidas.

Como se representa en la **FIG. 15**, el aumento de las adiciones sin molde observadas en los ratones con TdT humanizada DLC (tanto HET como HO) descritos condujo a un aumento en la longitud de CDR3 de la cadena ligera kappa en comparación con el control (ratones DLC sin TdT humana introducida).

#### **Ejemplo 10. Uso del segmento génico Vk y Jk de cadena ligera humano en ratones DLC que comprenden TdTS humana**

Como se representa en la **FIG. 16**, la introducción de TdTS humana en ratones DLC no alteró significativamente el uso de los segmentos génicos V $\kappa$  o de los segmentos génicos J $\kappa$  en comparación con los ratones de control DLC (ratones DLC sin TdT humana introducida).

# REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un anticuerpo específico para un antígeno, en donde el método comprende exponer un roedor genéticamente modificado al antígeno, en donde el roedor genéticamente modificado comprende en su genoma:

una secuencia de ácido nucleico que codifica una desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) humana unida operativamente a un elemento de control transcripcional que conduce la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT humana en pre-linfocitos B; y  
una región variable de inmunoglobulina humana que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar, en donde la región variable de inmunoglobulina humana está operativamente unida a una región constante de inmunoglobulina.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende, además:

(a) obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina humano del anticuerpo del roedor,  
(b) unir operativamente la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de inmunoglobulina humano del anticuerpo a una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio constante de inmunoglobulina humano en una célula hospedadora; y  
(c) cultivar la célula hospedadora en condiciones de modo que la célula hospedadora exprese un anticuerpo humano que comprenda el dominio variable de inmunoglobulina y el dominio constante de inmunoglobulina.

3. El método de la reivindicación 2, en donde:

(a) el dominio variable de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina y el dominio constante de inmunoglobulina es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina; y/o  
(b) el dominio variable de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina y el dominio constante de inmunoglobulina es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina.

4. Un método para producir un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humano específico para un antígeno y/o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humano específico para un antígeno, en donde el método comprende:

(a) exponer un roedor genéticamente modificado al antígeno, en donde el roedor genéticamente modificado comprende su genoma:

una secuencia de ácido nucleico que codifica una desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) humana unida operativamente a un elemento de control transcripcional que conduce la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT humana en pre-linfocitos B; y  
una región variable de inmunoglobulina humana que comprende segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar, en donde la región variable de inmunoglobulina humana está operativamente unida a una región constante de inmunoglobulina; y

(b) obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humano específico para el antígeno y/o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humano específico para el antígeno del roedor.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el elemento de control transcripcional:

(i) conduce a la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT humana en pro-linfocitos B y pre-linfocitos B; y/o  
(ii) se selecciona del grupo que consiste en un elemento de control transcripcional RAG1, un elemento de control transcripcional RAG2, un elemento de control transcripcional de cadena pesada de inmunoglobulina, un elemento de control transcripcional de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina y/o un elemento de control transcripcional de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la TdT humana no se expresa constitutivamente.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la TdT humana está ubicada en un locus de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina, un locus de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina, un locus de cadena pesada de inmunoglobulina, un locus RAG1, o un locus RAG2.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la región variable de inmunoglobulina humana es una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que comprende segmentos génicos V, D y J de cadena pesada de inmunoglobulina humanos sin reordenar y el gen de la región constante de inmunoglobulina es

una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina.

9. El método de la reivindicación 8, en donde:

- (i) el gen de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es de origen de especie endógena; y/o
- (ii) la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana y el gen de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina están ubicados en un locus endógeno de cadena pesada de inmunoglobulina.

10. El método de la reivindicación 8 o 9, que comprende además en su genoma una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende segmentos génicos de la región variable de cadena ligera humanos sin reordenar unidos operativamente a una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina, en donde opcionalmente la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina unida operativamente a la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina se ubica en un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno.

11. El método de la reivindicación 10, en donde

- (i) la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende segmentos génicos de la región variable de la cadena  $\kappa$  humanos;
- (ii) la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es una región constante  $\kappa$  de inmunoglobulina;
- (iii) la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es una región constante  $\kappa$  de inmunoglobulina de origen de especie endógena; y/o
- (iv) la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina están ubicadas en un locus endógeno de cadena ligera  $\kappa$  de inmunoglobulina.

12. El método de la reivindicación 10, en donde:

- (i) la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana comprende segmentos génicos de la región variable de la cadena  $\lambda$  humanos;
- (ii) la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es una región constante  $\lambda$  de inmunoglobulina;
- (iii) la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina es una región constante  $\lambda$  de inmunoglobulina de origen de especie endógena; y/o
- (iv) la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana y la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina están ubicadas en un locus endógeno de cadena ligera  $\lambda$  de inmunoglobulina.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde los segmentos génicos de la región variable de inmunoglobulina humanos sin reordenar se sometieron a reordenamiento durante el desarrollo de los linfocitos B para generar regiones variables de inmunoglobulina humana reordenadas en los linfocitos B del animal no humano, en donde opcionalmente:

- (i) al menos el 10 % de los genes de la región variable reordenados comprenden adiciones sin molde; y/o
- (ii) al menos el 10 % de las uniones de la cadena ligera de inmunoglobulina V-J en el animal comprenden adiciones sin molde.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el roedor es una rata o ratón, en donde opcionalmente el roedor es un ratón.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la TdT humana es la isoforma corta de TdT (TdTS).

Figura 1

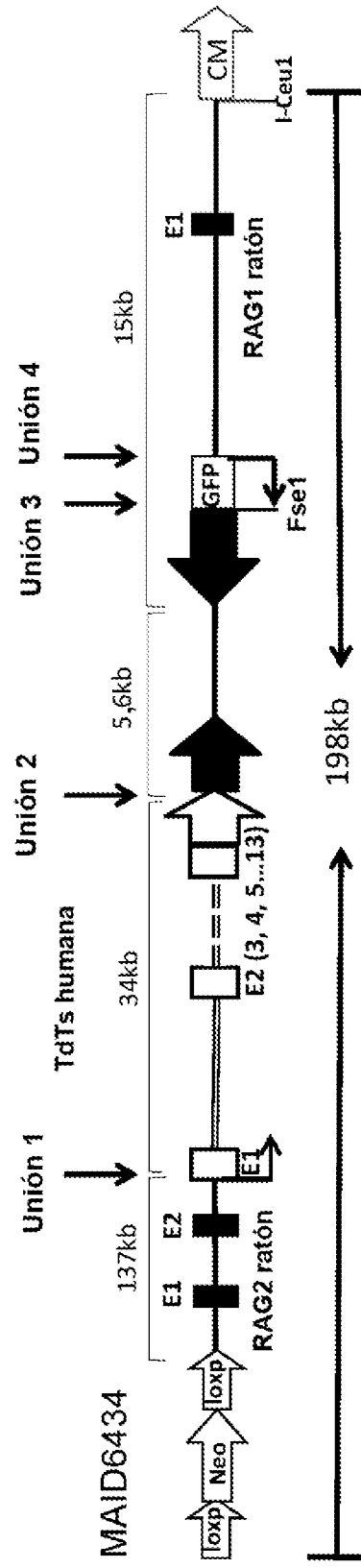
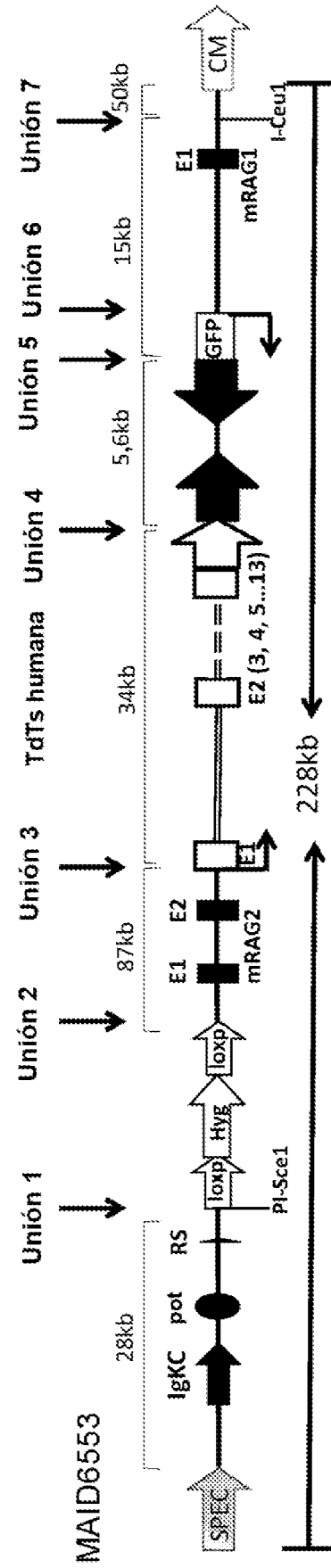


Figura 2



**Figura 3**

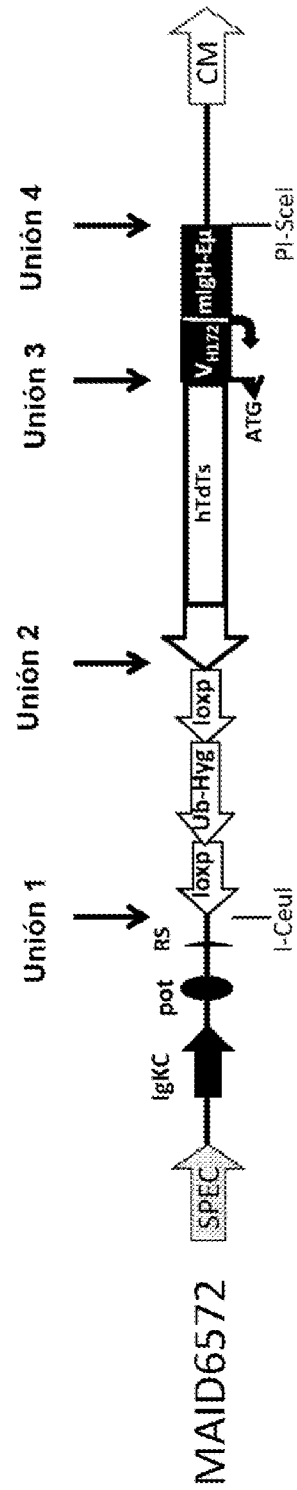




Figura 4

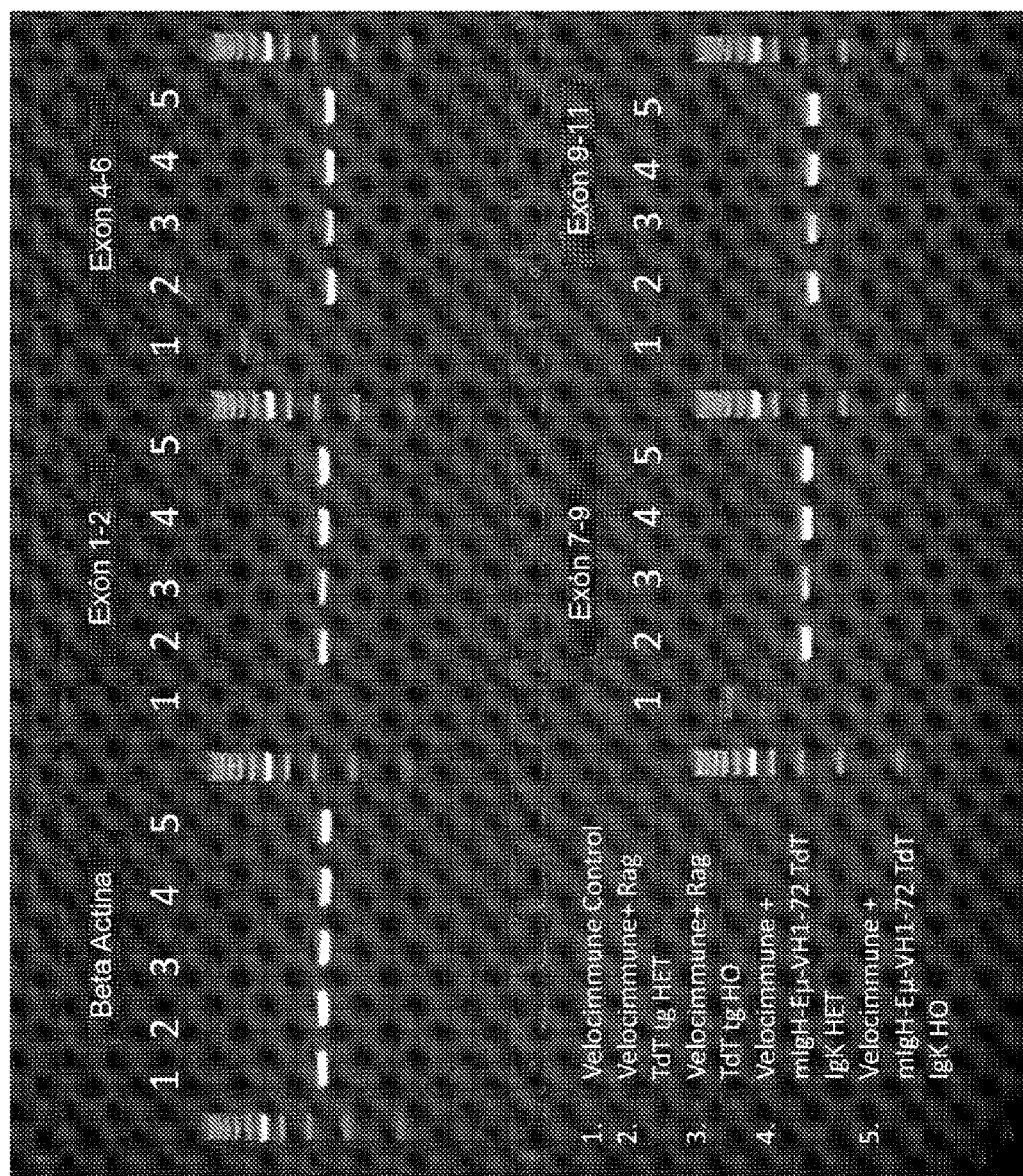


Figura 5  
Diversidad de secuencia de hlgK en ratones VELOCIMMUNE® con TdT

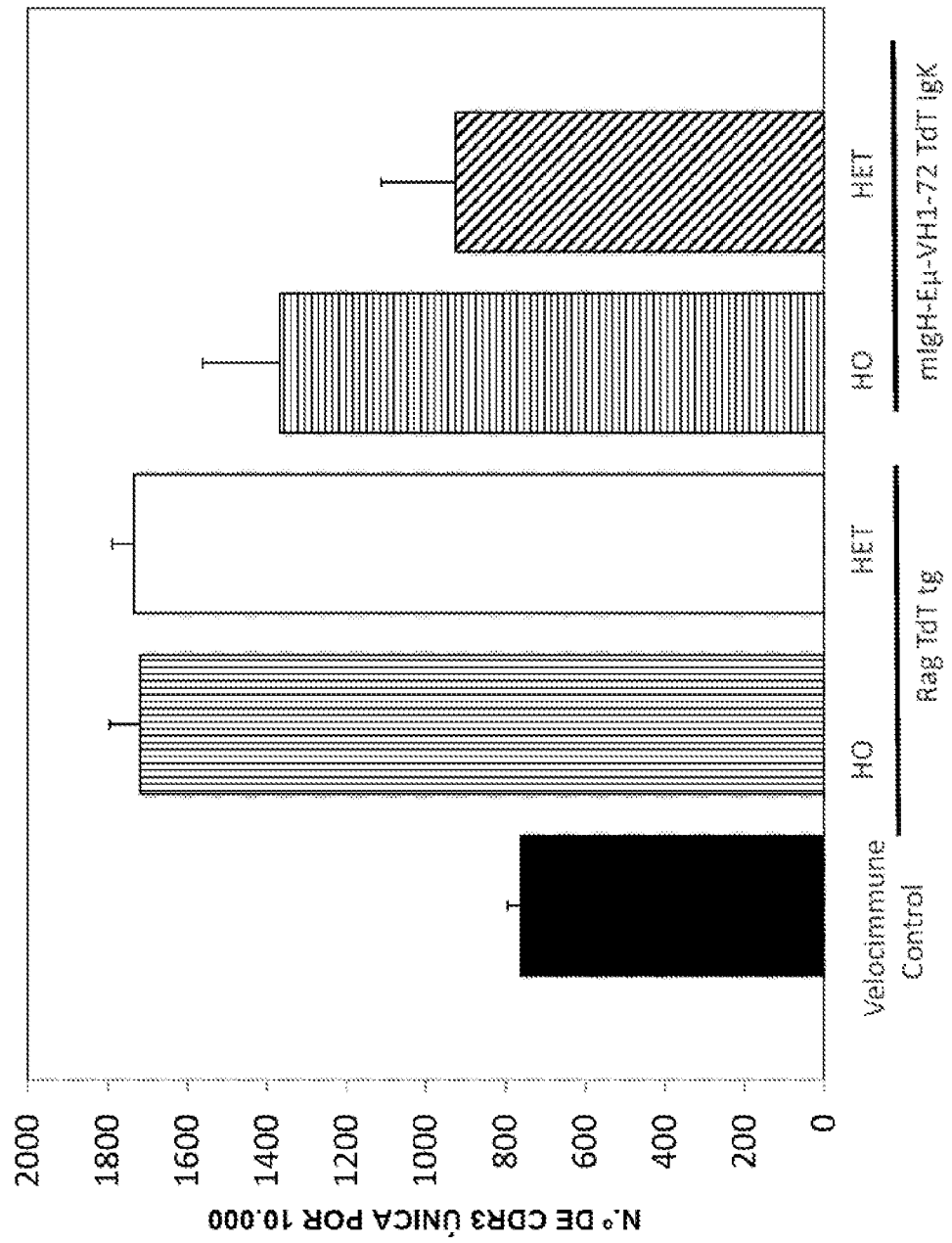


Figura 6

Tasa de adiciones sin molde de hlgK en ratones VELOCIMMUNE® con TdT

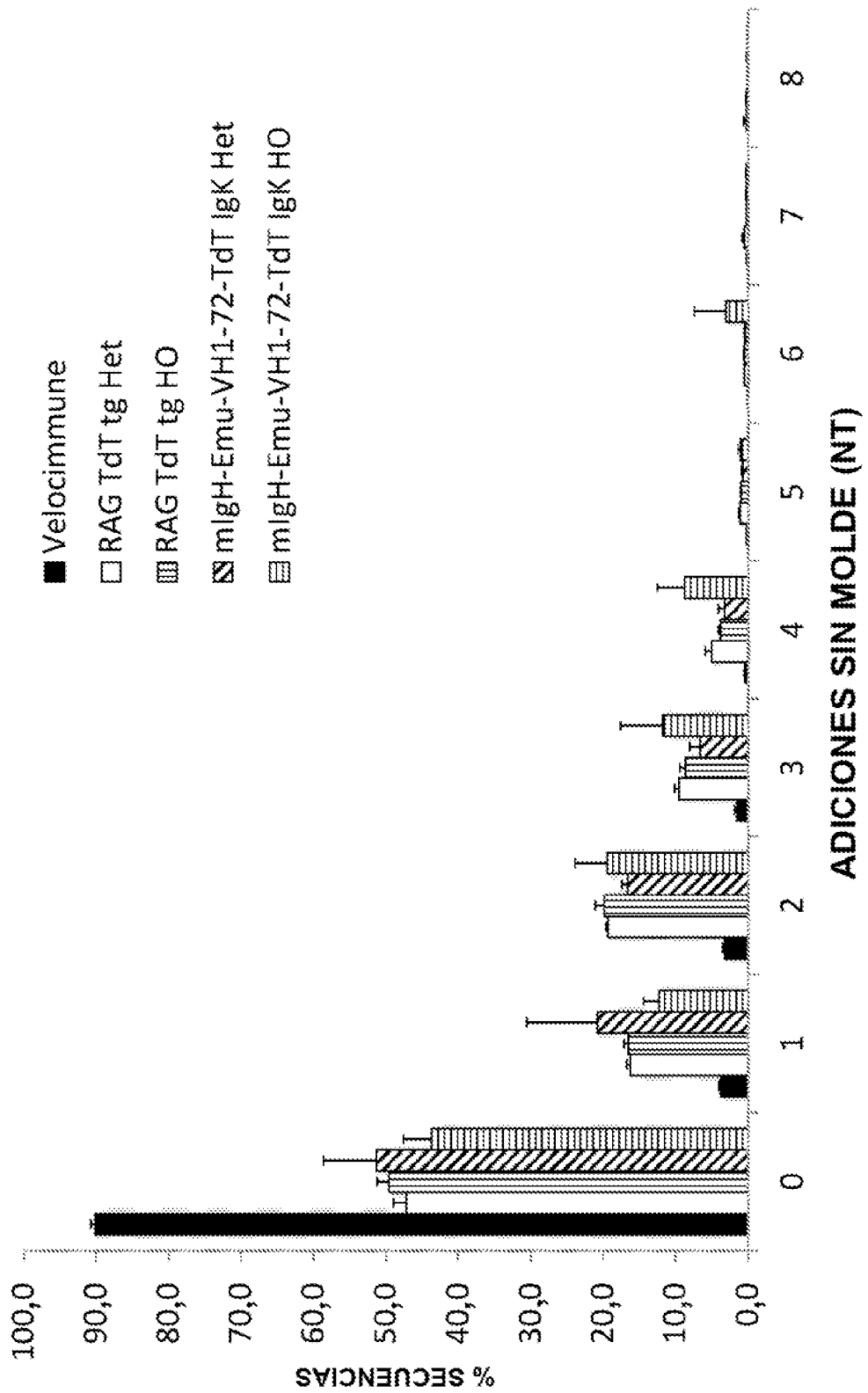


Figura 7

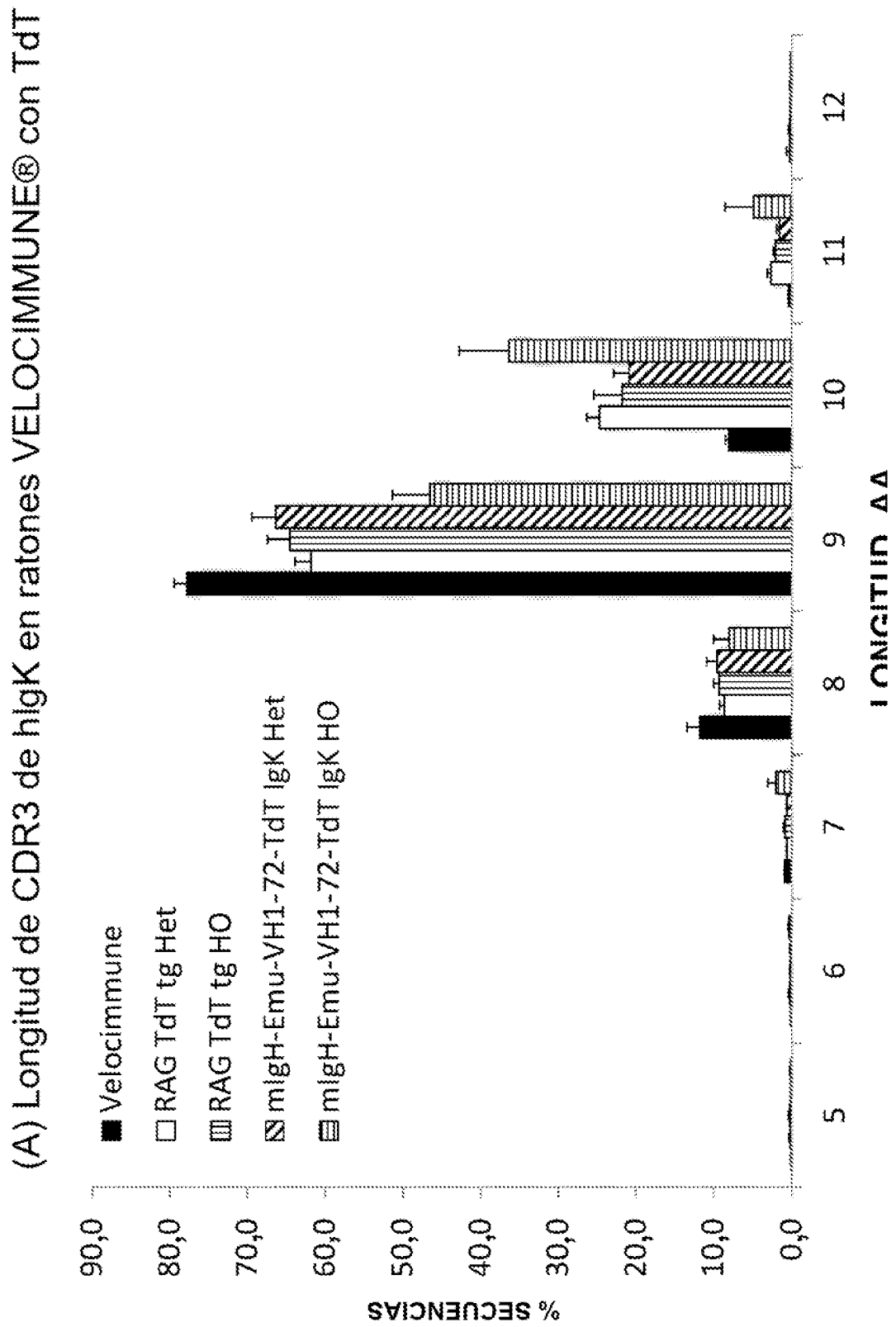


Figura 7 (continuación)

(B) Actividad exonucleasa en ratones VELOCIMMUNE® con TdT

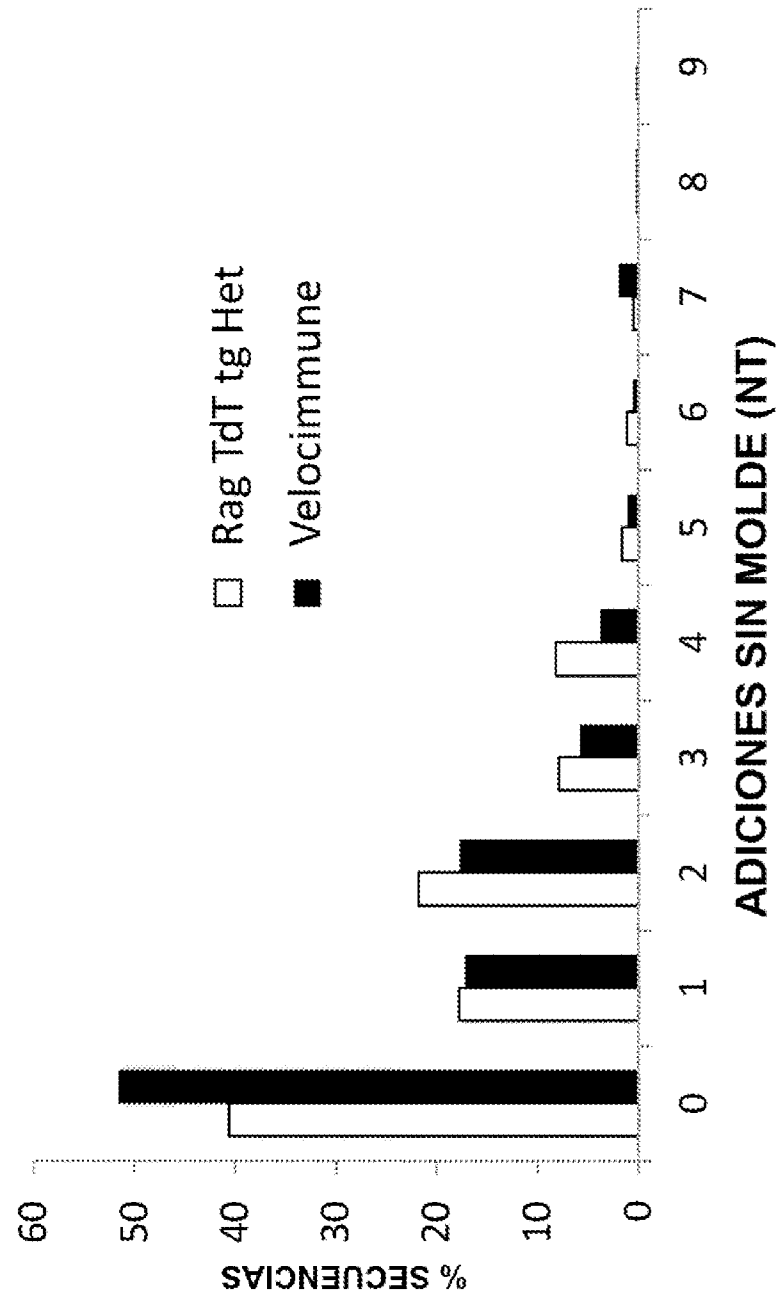


Figura 8

(A) Uso de  $V_k$  en ratones VELOCIMMUNE® con TdT

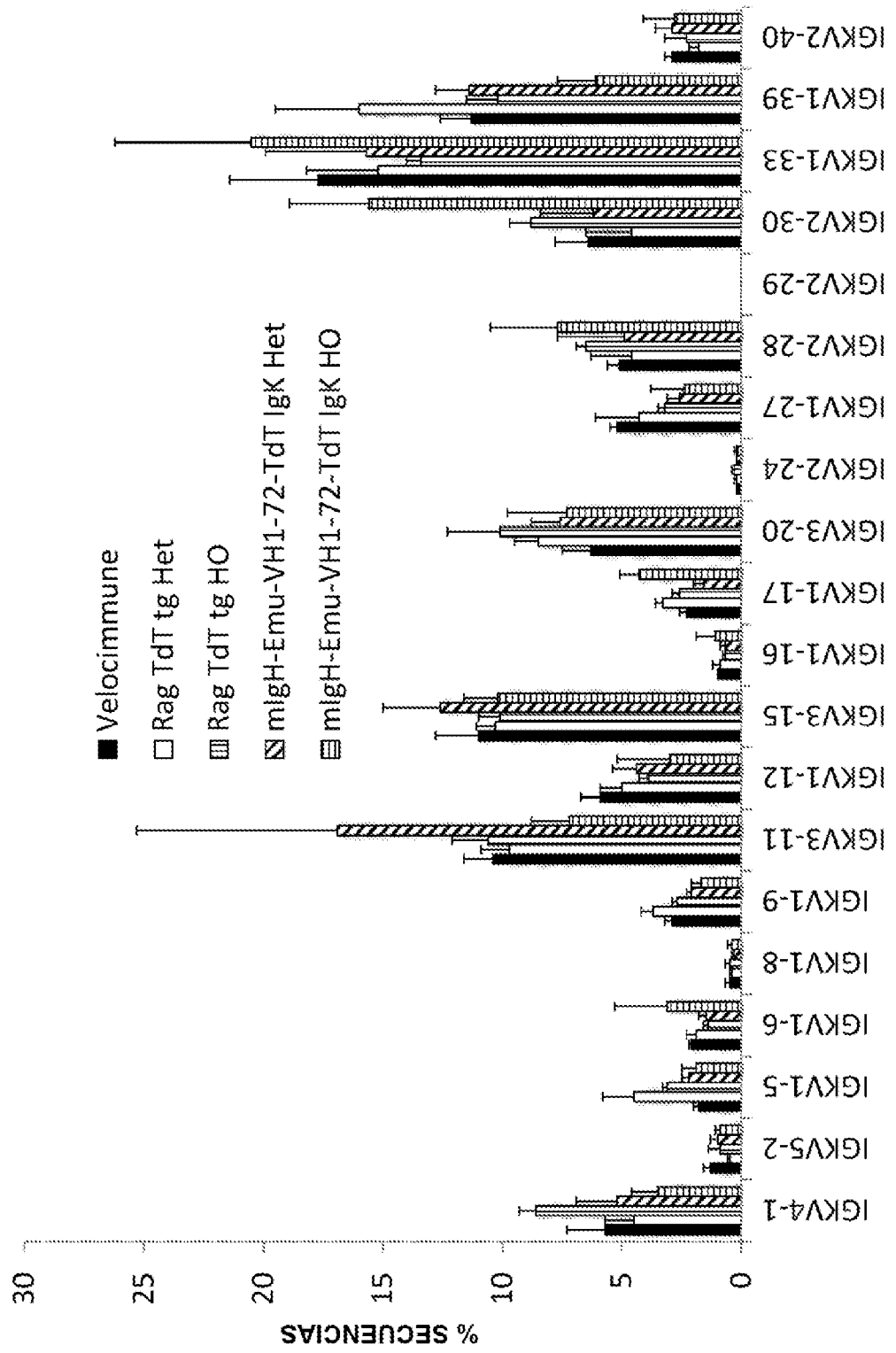
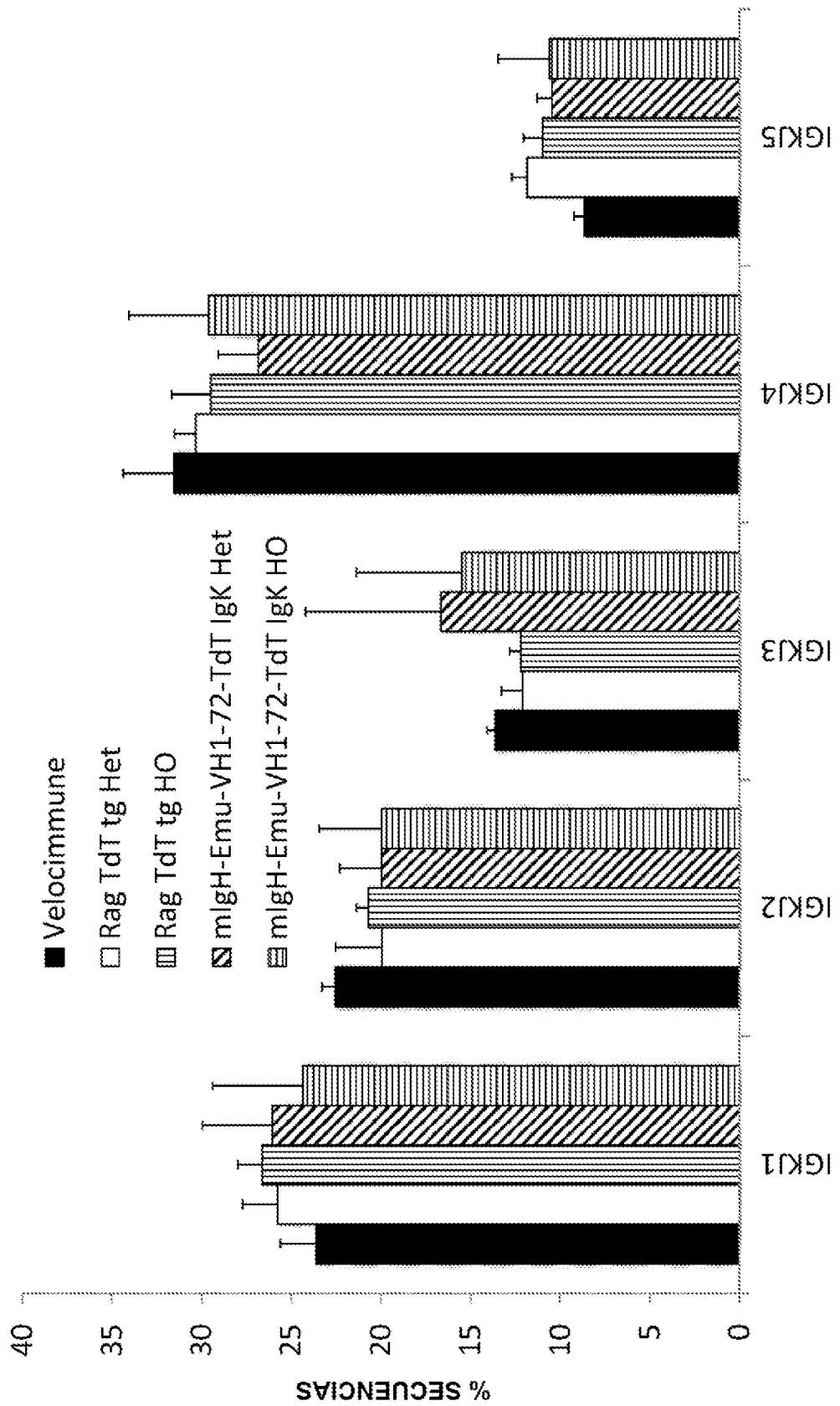


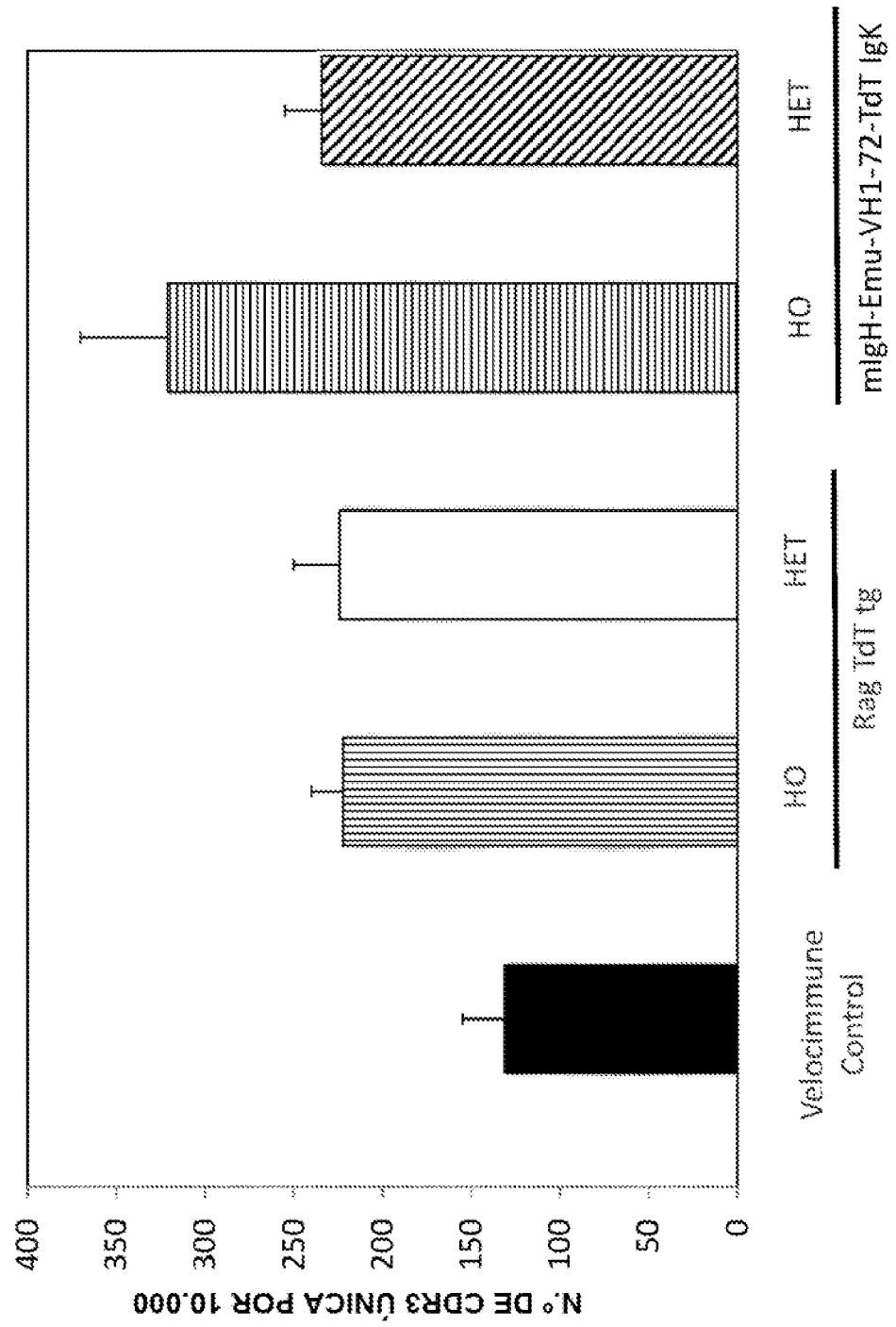
Figura 8 (continuación)

(B) Uso de J<sub>k</sub> en ratones VELOCIMMUNE® con TdT





**Figura 9**  
**Diversidad de secuencia de mlgλ en ratones VELOCIMMUNE® con TdT**



**Figura 10**  
**Tasa de adiciones sin molde de mlgA en ratones VELOCIMMUNE® con TdT**

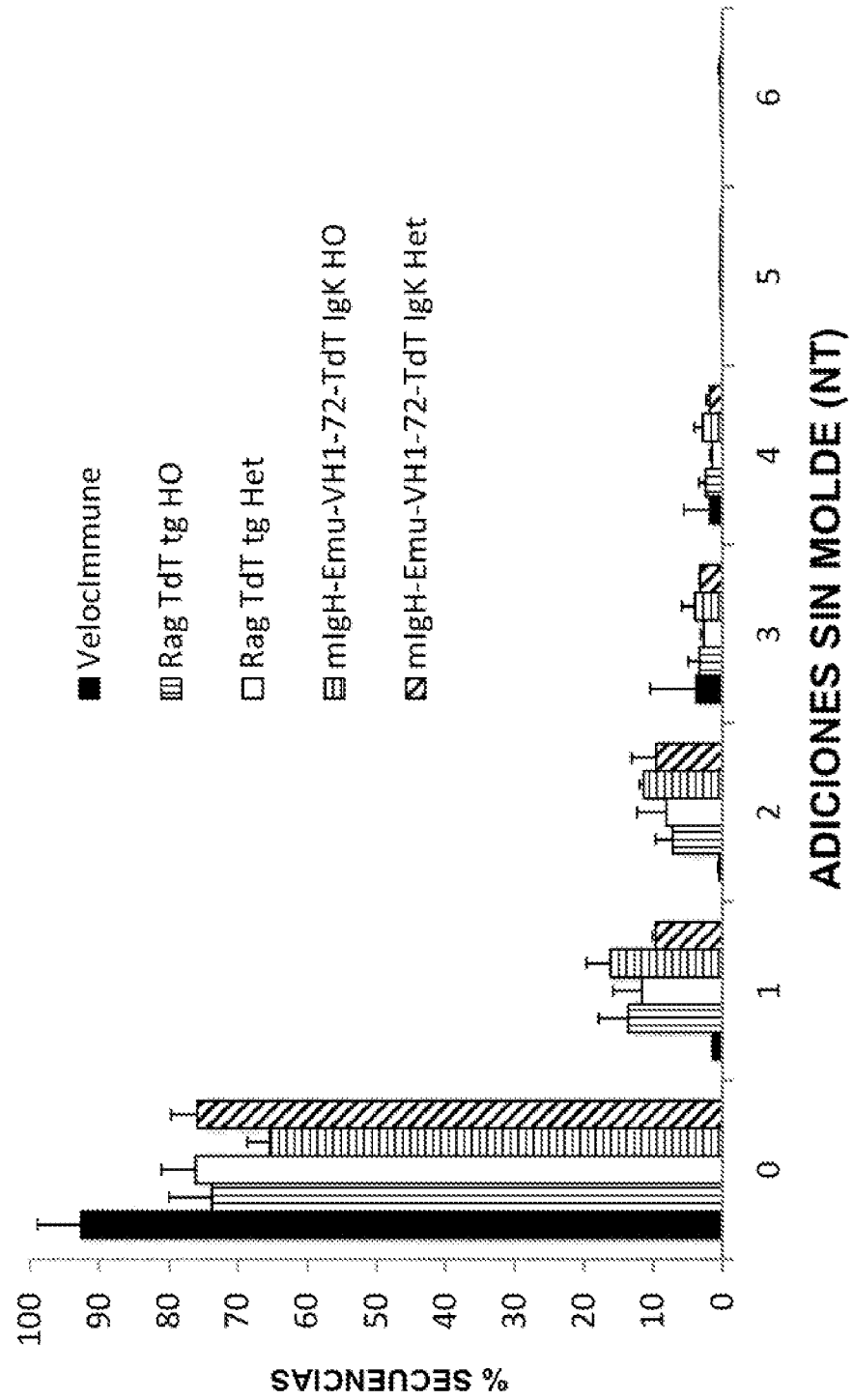


Figura 11

Longitud de CDR3 de mlgλ en ratones VELOCIMMUNE® con TdT

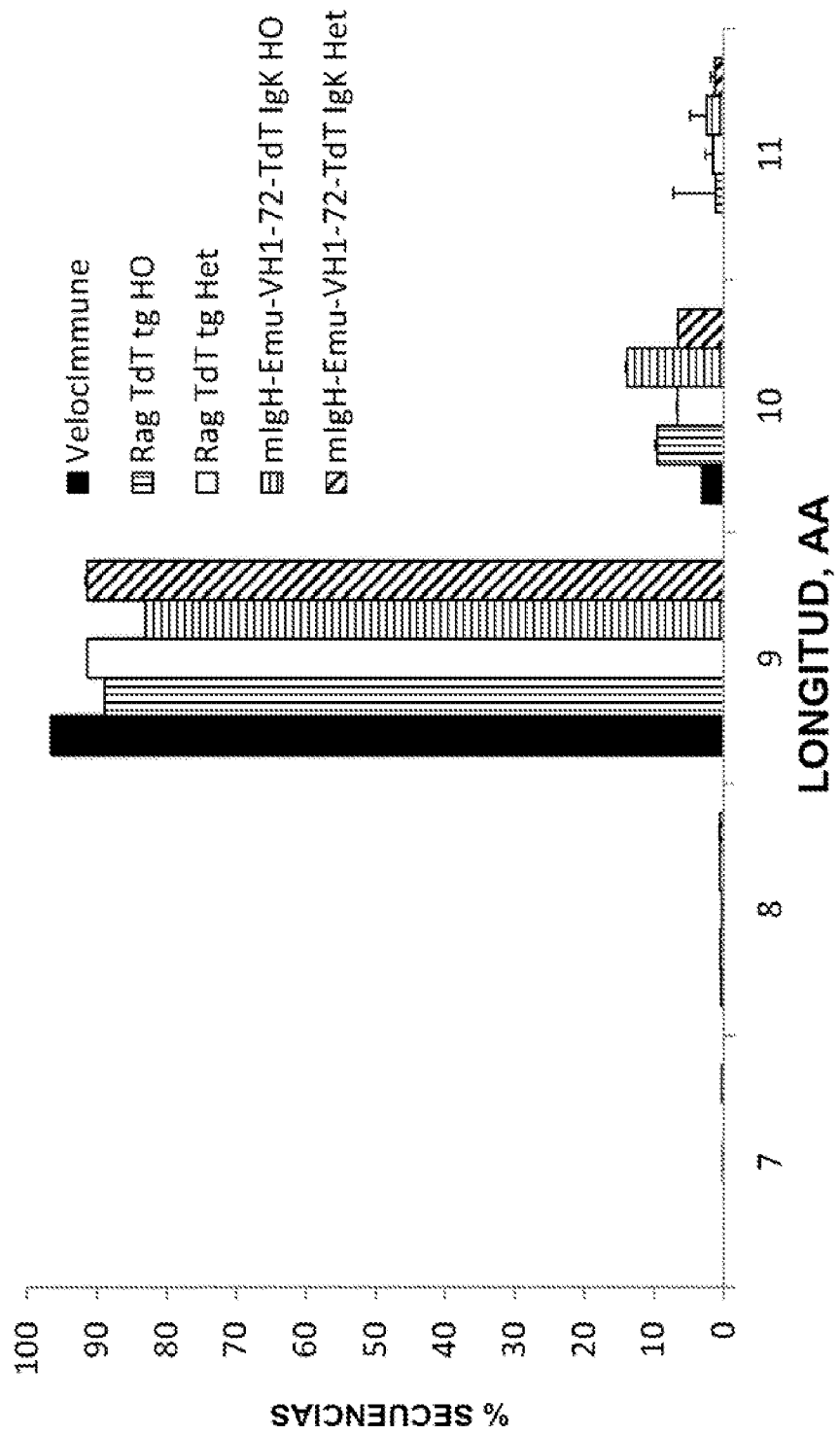


Figura 12

Uso de  $V_{\lambda}$  en ratones VELOCIMUNE® con TdT

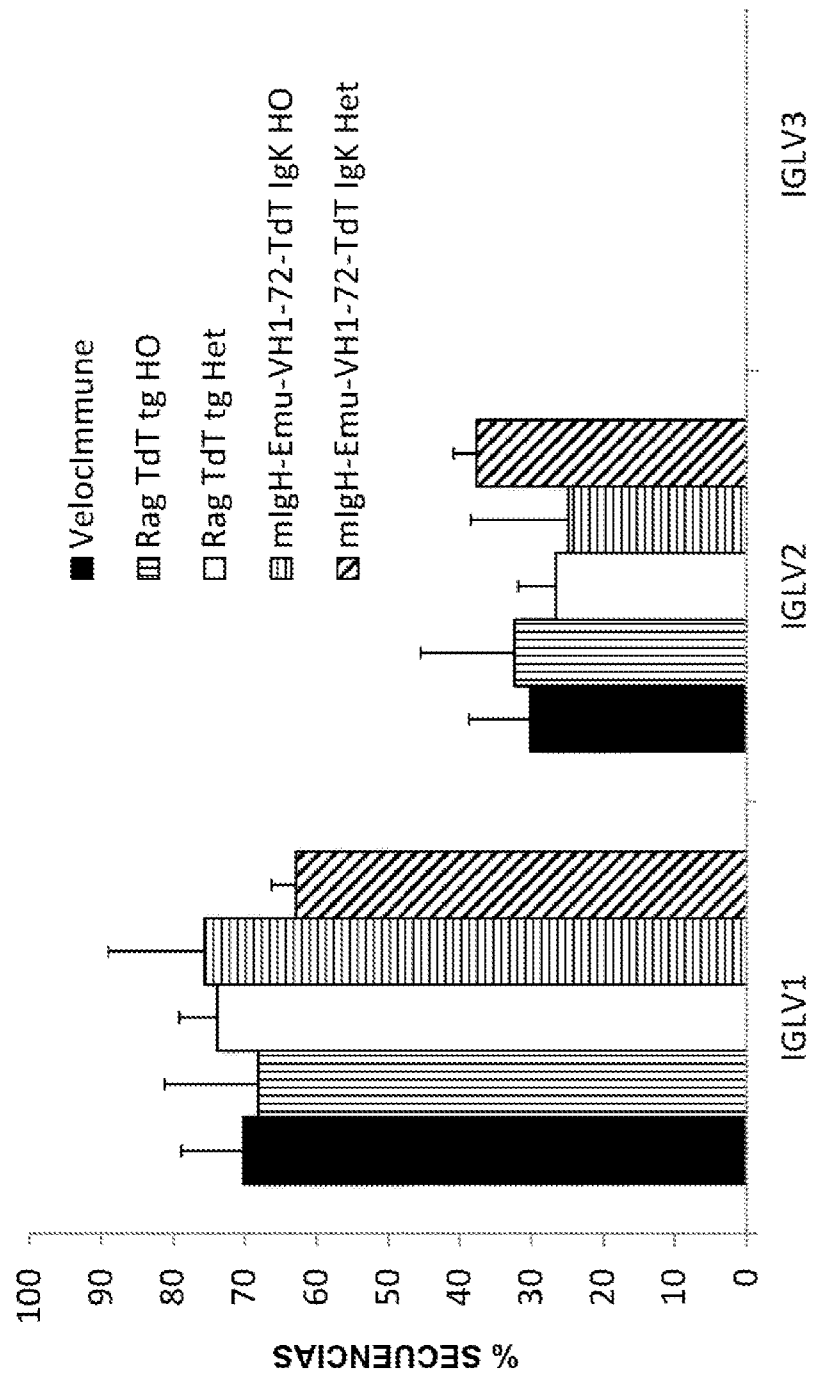


Figura 13

Diversidad de secuencia de hlgK en ratones de Cadena Ligera Dual con TdT

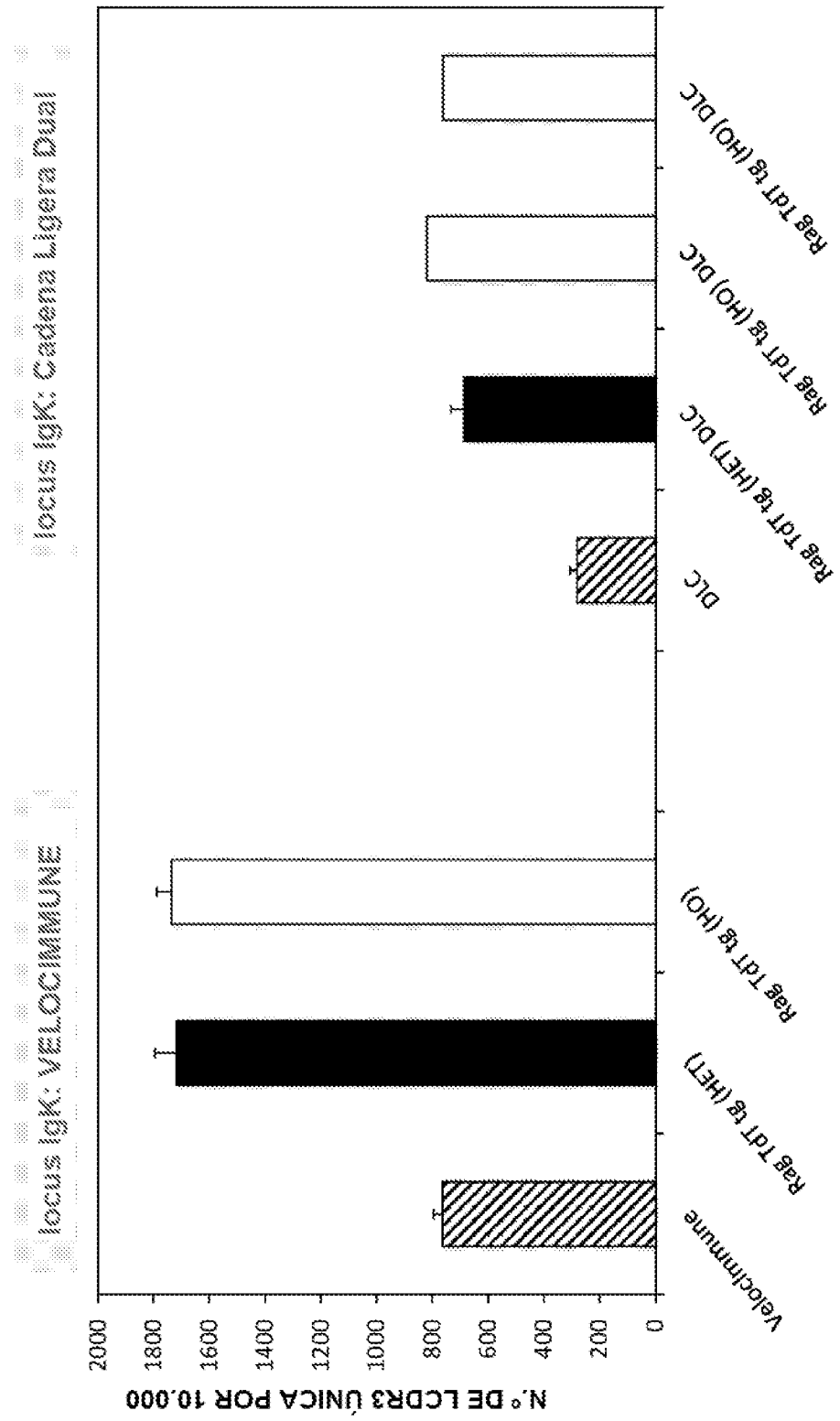


Figura 14

Tasa de adiciones sin molde de mlgK en ratones de Cadena Ligera Dual con TdT

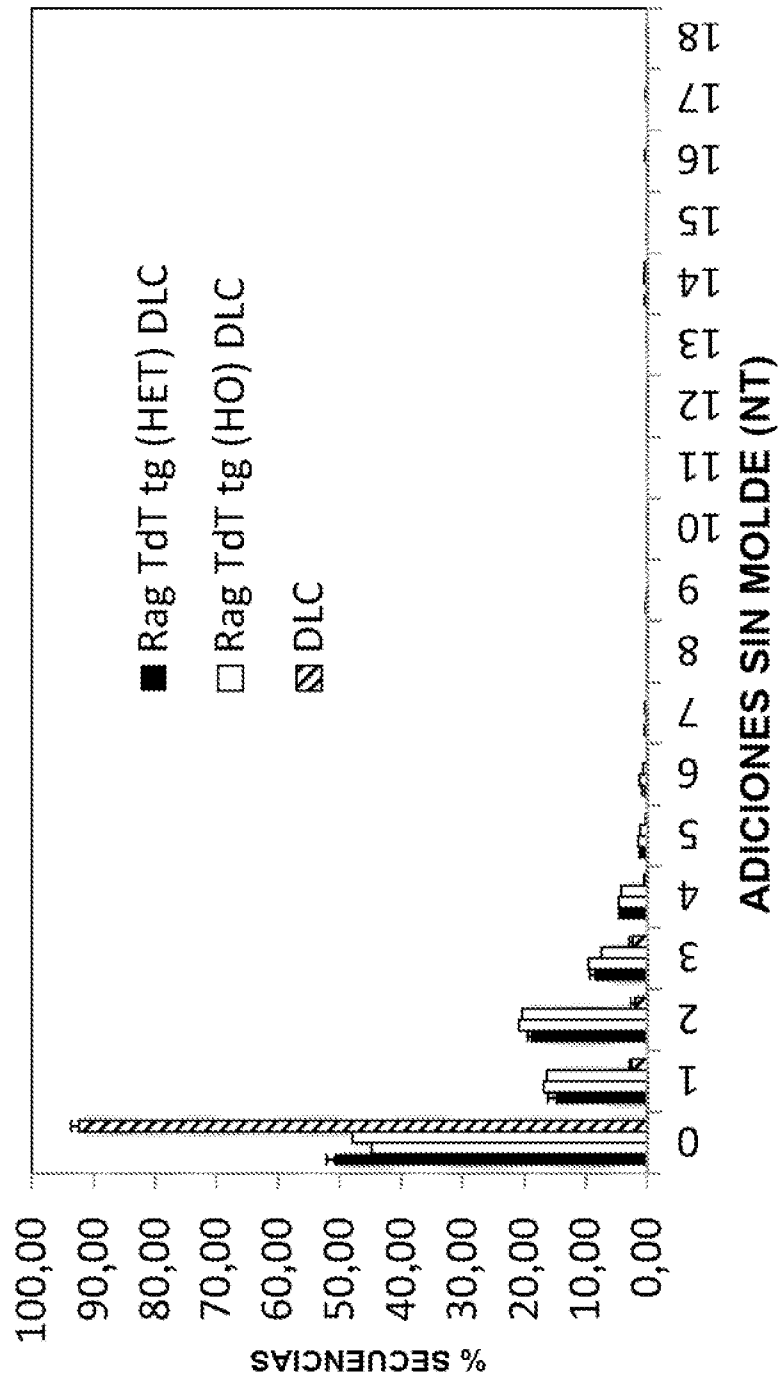
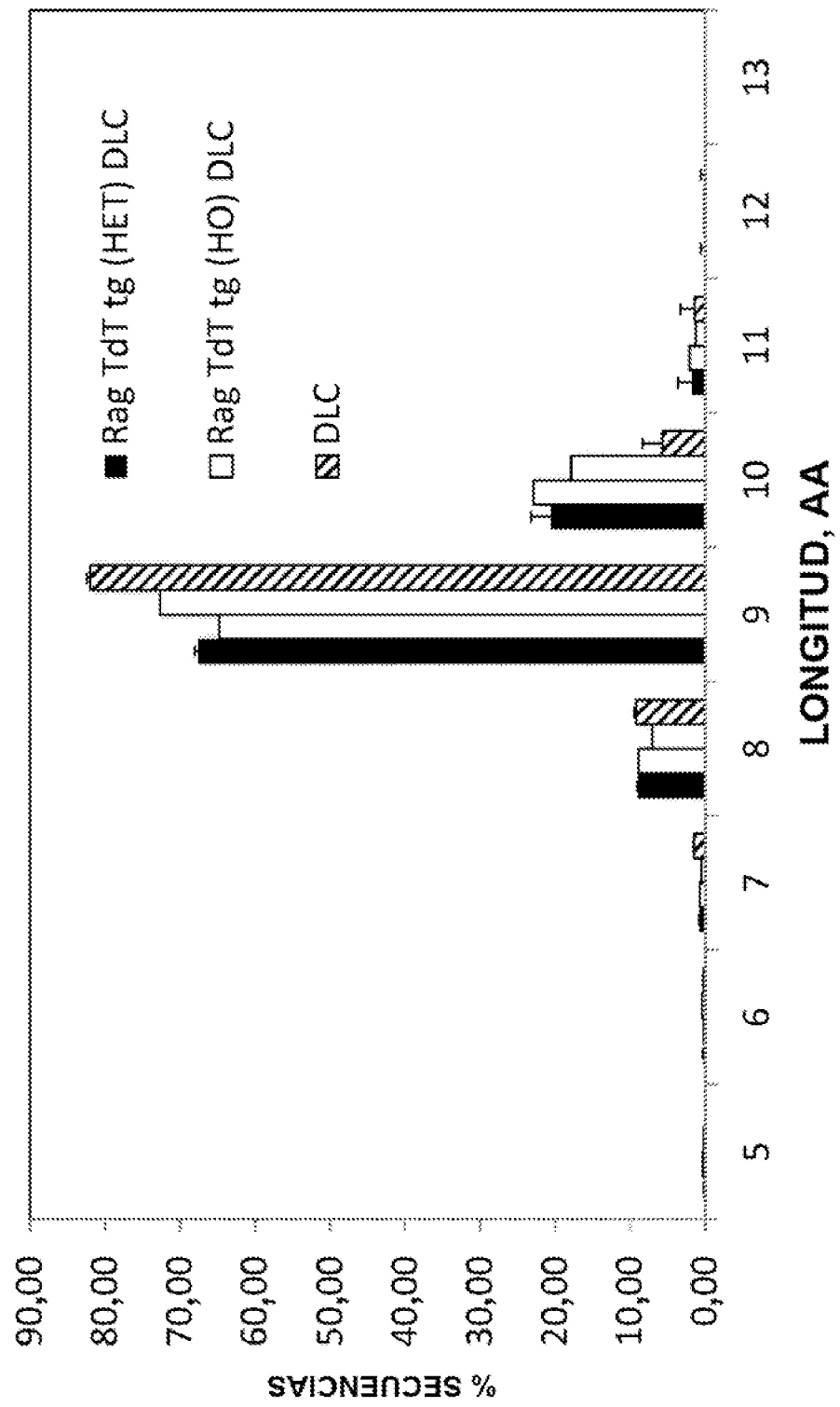


Figura 15 Longitud de CDR3 de mlgK en ratones de Cadena Ligera Dual con



**Figura 16**  
**Uso de VK y JK en ratones de Cadena Ligera Dual con TdT**

