

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 067**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2014.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012** **E 21157152 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024** **EP 3865581**

54 Título: **Ratones con cadena ligera universal humanizada**

30 Prioridad:

05.08.2011 US 201161515374 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MCWHIRTER, JOHN;
MACDONALD, LYNN;
STEVENS, SEAN;
DAVIS, SAMUEL;
BUCKLER, DAVID R;
HOSIAWA, KAROLINA A y
MURPHY, ANDREW J

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 990 067 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

Ratones con cadena ligera universal humanizada

5 **Campo de la invención**

Ratones, células, embriones no humanos, tejidos y ácidos nucleicos aislados genéticamente modificados para producir anticuerpos y secuencias que codifican dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulinas humanas, incluyendo anticuerpos biespecíficos e incluyendo anticuerpos biespecíficos que comprenden cadenas ligeras universales. Composiciones y métodos que implican ratones genéticamente modificados con reemplazos de línea germinal en el locus variable de cadena pesada de ratón endógeno, que comprenden locus de cadena ligera modificados que expresan cadenas ligeras derivadas de no más de uno o dos segmentos génicos V de cadena ligera diferentes, en donde los ratones están además genéticamente modificados en su línea germinal de tal manera que los ratones macho que llevan estas modificaciones son fértiles. Se proporcionan ratones genéticamente modificados que expresan cadenas ligeras universales y dominios variables de cadena pesada humanizada, en donde los ratones comprenden una actividad ADAM6 que es funcional en un ratón macho.

Antecedentes

El desarrollo de anticuerpos para su uso como agentes terapéuticos humanos tiene una historia larga y compleja. Un avance significativo ha sido la capacidad de producir esencialmente secuencias de anticuerpos completamente humanos para usar en el diseño de agentes terapéuticos humanos eficaces con un potencial reducido de inmunogenicidad. Hoy en día existen ratones que se modifican en su línea germinal para generar secuencias de anticuerpos humanos derivados de segmentos genéticos no reordenados (pesados y ligeros) como transgenes o como reemplazos en los locus de inmunoglobulinas de ratón endógenos. El reemplazo de secuencias variables de ratón con secuencias variables humanas en locus endógenos en ratones, como con ratones humanizados con VELOCIMMUNE®, permite que el sistema inmunitario del ratón funcione esencialmente de manera normal. Como resultado, exponer a estos ratones a un antígeno de elección genera una población maravillosamente diversa y rica de linfocitos B clonalmente seleccionados que expresan dominios variables humanos mutados somáticamente de alta afinidad que pueden usarse para producir anticuerpos completamente humanos dirigidos contra el antígeno de elección.

Los dominios variables humanos producidos en ratones humanizados se pueden usar para diseñar anticuerpos biespecíficos completamente humanos, es decir, proteínas de unión que son heterodímeros de cadenas pesadas, donde difieren las identidades y especificidades de unión de los dominios variables de cadena pesada. Pero seleccionar cadenas ligeras que puedan asociarse y expresarse de manera eficaz con los heterodímeros de cadena pesada no tiene una solución fácil. El desarrollo de dominios variables de cadena ligera humana para su uso en agentes terapéuticos humanos es ciertamente posible en ratones humanizados, pero no hay soluciones fáciles para seleccionar qué cadenas ligeras se asociarán y expresarán de manera eficaz con cadenas pesadas que tengan características de unión deseadas, donde las cadenas ligeras no sean perjudiciales para la expresión o comportamiento de unión de ambas cadenas pesadas.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de composiciones y métodos para desarrollar regiones variables de inmunoglobulinas humanas para su uso en agentes terapéuticos humanos, incluyendo regiones variables de inmunoglobulinas humanas generadas a partir de secuencias de ácidos nucleicos en locus de inmunoglobulinas de ratón endógenos.

Sumario

Se describen ratones que expresan dominios variables de inmunoglobulinas humanas que son adecuados para su uso en proteínas de unión biespecíficas, incluyendo anticuerpos biespecíficos, en donde los ratones comprenden una humanización de un locus variable de cadena pesada de ratón endógeno, en donde los ratones macho que comprenden la humanización son fértiles, y en donde los ratones comprenden además una humanización de un locus de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno que da como resultado que el ratón exprese un repertorio de cadenas ligeras de inmunoglobulinas que deriva de no más de uno, o no más de dos, segmentos génicos V λ y/o κ .

Se proporcionan ratones modificados por ingeniería genética que seleccionan dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulinas humanas madurados por afinidad adecuados derivados de un repertorio de segmentos V, D y J de cadena pesada humana no reordenados, en donde los dominios variables de cadena pesada humana madurados por afinidad se asocian y expresan con una cadena ligera universal humanizada. La cadena ligera universal humanizada se expresa a partir de un locus que comprende no más de uno o no más de dos segmentos V de cadena ligera humana y un segmento J humano unidos operativamente a un gen constante de cadena ligera, o no más de una o no más de dos secuencias de ácidos nucleicos humano reordenadas (V λ /J λ , V κ /J κ , V λ /J κ o V κ /J λ) que codifican un dominio variable de cadena ligera unido operativamente a un gen constante de cadena ligera. En diversas realizaciones, el dominio de cadena ligera universal humanizada se empareja con una pluralidad de dominios variables de cadena pesada humana madurados por afinidad, en donde la pluralidad de dominios variables de cadena pesada

se une específicamente a diferentes epítomos o antígenos. En particular, se proporciona un ratón cuyo genoma comprende:

- 5 (a) al menos un segmento génico V_H humano no reordenado, al menos un segmento génico D_H humano no reordenado y al menos un segmento génico J_H humano no reordenado unidos operativamente a un gen de región constante de cadena pesada endógeno en un locus de cadena pesada endógeno;
- (b) un locus que comprende no más de una, o no más de dos, secuencias de ácido nucleico humano reordenadas V/J que codifican un dominio variable de cadena ligera unido operativamente a un gen constante de cadena ligera; y
- 10 (c) una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6a de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un fragmento funcional de la misma y una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6b de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un fragmento funcional de la misma, en donde las proteínas, ortólogos, homólogos o fragmentos de ADAM6 son funcionales en un ratón macho, en donde dicha función está asociada con la fertilidad del ratón macho,
- 15 en donde el ratón ha eliminado o reducido la función endógena de ADAM6.

Además, se proporciona un método de fabricación de un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 20 (a) exponer un primer ratón de la presente invención a un primer antígeno de interés que comprende un primer epítipo;
- (b) exponer un segundo ratón de la presente invención a un segundo antígeno de interés que comprende un segundo epítipo;
- (c) permitir que el primer y el segundo ratón monten respuestas inmunitarias a los antígenos de interés;
- 25 (d) identificar en el primer ratón una primera región variable de cadena pesada humana que se une al primer epítipo del primer antígeno de interés, identificar en el segundo ratón una segunda región variable de cadena pesada humana que se une al segundo epítipo del segundo antígeno de interés, producir un primer gen de cadena pesada completamente humano que codifica una primera cadena pesada que se une al primer epítipo del primer antígeno de interés y que comprende la primera región variable de cadena pesada humana, producir un segundo
- 30 gen de cadena pesada completamente humano que codifica una segunda cadena pesada que se une al segundo epítipo del segundo antígeno de interés y que comprende la segunda región variable de cadena pesada humana;
- (e) expresar la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada en una célula que expresa una única cadena ligera completamente humana derivada de un segmento génico $Vk1-39$ humano o $Vk3-20$ humano para formar un anticuerpo; y
- 35 (f) aislar el anticuerpo biespecífico.

También se proporciona el uso de un ratón de la presente invención para producir una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada humana o de dominio variable de cadena ligera humana de un anticuerpo.

- 40 Se proporciona además el uso de un ratón de la presente invención para producir una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

La presente invención proporciona además una célula de ratón cuyo genoma comprende:

- 45 (a) al menos un segmento génico V_H humano no reordenado, al menos un segmento génico D_H humano no reordenado y al menos un segmento génico J_H humano no reordenado unidos operativamente a un gen de región constante de cadena pesada endógeno en un locus de cadena pesada endógeno;
- (b) un locus que comprende no más de una, o no más de dos, secuencias de ácido nucleico humano reordenadas V/J que codifican un dominio variable de cadena ligera unido operativamente a un gen constante de cadena ligera; y
- 50 (c) una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6a de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un fragmento funcional de la misma y una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6b de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un fragmento funcional de la misma, en donde las proteínas, ortólogos, homólogos o fragmentos de ADAM6 son funcionales en un ratón macho, en donde dicha función está asociada con la fertilidad del ratón macho,
- 55 en donde dicha célula ha eliminado o reducido la función endógena de ADAM6.

- 60 También se describen construcciones de ácidos nucleicos, células, embriones no humanos, ratones, y se proporcionan métodos para producir ratones que comprenden un locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada y un locus variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, en donde el ratón expresa una de no más de dos cadenas ligeras universales y los ratones que son machos muestran fertilidad de tipo silvestre.
- 65 También se describe un ratón modificado que comprende en su línea germinal un locus variable de cadena pesada

de inmunoglobulina humanizada en un locus de cadena pesada de ratón endógeno y un locus variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada, en donde el ratón expresa una cadena ligera universal, y en donde el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma. En varios casos, el locus variable de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada está en un locus de cadena ligera de ratón endógeno.

En una realización, el locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada comprende un reemplazo en el locus variable de cadena pesada de ratón endógeno la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón funcionales con uno o más segmentos génicos V humano, D humano y J humano, en donde el uno o más segmentos V, D y J humanos están unidos operativamente y son capaces de reordenarse para formar un gen V/D/J reordenado que está unido operativamente a una secuencia constante de cadena pesada.

En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera que está modificado por ingeniería para producir una cadena ligera universal, en donde la cadena ligera universal es una cadena ligera que deriva de un locus de cadena ligera que comprende una única secuencia V/J de cadena ligera reordenada. También se divulga un ratón que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un único segmento V de cadena ligera de inmunoglobulina humana que es capaz de reordenarse con un segmento génico J de cadena ligera humana (seleccionado de uno o una pluralidad de segmentos J) y que codifica un dominio variable de cadena ligera humana.

En otro caso, el ratón comprende no más de dos segmentos V de cadena ligera humana en el locus de cadena ligera, cada segmento V de los mismos es capaz de reordenarse con un segmento génico J humano (seleccionado de uno o una pluralidad de segmentos J de la cadena ligera) y codificar un dominio variable de cadena ligera humana reordenada.

En un caso, el segmento V de la cadena ligera humana único está operativamente unido a un segmento J de cadena ligera humana seleccionado de Jk1, Jk2, Jk3, Jk4 y Jk5, en donde el segmento V de cadena ligera humana único es capaz de reordenarse para formar una secuencia que codifica un gen de región variable de cadena ligera con cualquiera de los uno o más segmentos J de cadena ligera humana.

En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera endógeno que comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V y J de ratón con no más de una, o no más de dos, secuencias de ácidos nucleicos reordenadas (V/J). En una realización, las no más de una o no más de dos secuencias de ácidos nucleicos reordenadas (V/J) se seleccionan de Vk1-39Jk5, Vk3-20Jk1 humana y una combinación de las mismas.

En una realización, el ratón carece de un locus de cadena ligera endógeno funcional que sea capaz de expresar un dominio variable de cadena ligera de ratón. En una realización, el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de una cadena ligera universal en un locus κ . En una realización, el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de una cadena ligera universal en un locus λ .

En una realización, la secuencia V/J reordenada humana está operativamente unida a una secuencia líder humana o de ratón. En una realización, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón. En una realización específica, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder Vk3-7 de ratón.

En una realización, la secuencia V/J reordenada está operativamente unida a una secuencia promotora de inmunoglobulina. En una realización, la secuencia promotora es una secuencia promotora humana. En una realización específica, el promotor de inmunoglobulina humana es un promotor Vk3-15 humano.

En una realización, la secuencia (V/J) reordenada está operativamente unida a un gen C κ de ratón.

En una realización, la secuencia (V/J) reordenada está presente en un locus de cadena ligera κ , y el locus de cadena ligera κ comprende un potenciador intrínico κ de ratón, un potenciador 3' κ de ratón o tanto un potenciador intrínico como un potenciador 3'. En una realización específica, el locus κ es un locus κ endógeno.

En una realización, el ratón comprende un locus κ que comprende una secuencia que codifica un dominio variable de una cadena ligera universal, y el ratón comprende un locus de la cadena ligera lambda (λ) de inmunoglobulina no funcional. En una realización específica, el locus de la cadena ligera λ comprende una delección de una o más secuencias del locus, en donde la una o más delecciones hacen que el locus de la cadena ligera λ sea incapaz de reordenarse para formar un gen de cadena ligera. En otra realización, se suprimen la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V del locus de la cadena ligera λ . En otra realización, el ratón comprende una delección de la totalidad o sustancialmente todos, los locus variables de cadena ligera endógenos.

En una realización, el ratón comprende además en su línea germinal una secuencia seleccionada de un potenciador κ intrínico de ratón 5' con respecto a la secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina reordenada o los segmentos genéticos no reordenados, un potenciador 3' κ de ratón y una combinación de los mismos.

En una realización, la secuencia de dominio variable de cadena ligera universal del ratón comprende una o más hipermutaciones somáticas; en una realización, la secuencia de dominio variable comprende una pluralidad de hipermutaciones somáticas.

5 En una realización, el ratón produce una cadena ligera universal que comprende un dominio variable humano mutado somáticamente. En una realización, la cadena ligera comprende un dominio variable humano mutado somáticamente derivado de un segmento V humano, un segmento J humano y un gen C_k de ratón. En una realización, el ratón no expresa una cadena ligera λ.

10 En una realización, la secuencia variable humana es una secuencia V_{k1}-39J_{k5} humana reordenada y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio variable derivado de V_{k1}-39J_{k5} y (ii) un C_L de ratón; en donde la cadena ligera se asocia con una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) un C_H de ratón y (ii) un dominio variable de cadena pesada humana mutado somáticamente. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. En una realización, el C_L es un C_k de ratón.

15 En una realización, la secuencia variable humana es una secuencia V_{k3}-20J_{k1} humana reordenada y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio variable derivado de V_{k3}-20J_{k1}, (ii) un C_L de ratón; en donde la cadena ligera se asocia con una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) un C_H de ratón y (ii) un dominio variable de cadena pesada humana mutado somáticamente.

20 En una realización, el ratón comprende tanto una secuencia V_{k1}-39J_{k5} humana reordenada como una secuencia V_{k3}-20J_{k1} humana reordenada, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) una cadena ligera que comprende un dominio variable derivado de la secuencia V_{k1}-39J_{k5} o la secuencia V_{k3}-20J_{k1} y (ii) un C_L de ratón; en donde la cadena ligera se asocia con una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) un C_H de ratón y (ii) un dominio variable de cadena pesada humana mutado somáticamente. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. En una realización, el C_L es un C_k de ratón.

25 En una realización, el ratón expresa un anticuerpo quimérico inverso que comprende una cadena ligera que comprende una C_k de ratón y un dominio variable humano mutado somáticamente derivado de una secuencia V_{k1}-39J_{k5} humana reordenada o una secuencia V_{k3}-20J_{k1} humana reordenada, y una cadena pesada que comprende un C_H de ratón y un dominio variable de cadena pesada humana mutado somáticamente, en donde el ratón no expresa un anticuerpo completamente de ratón y no expresa un anticuerpo completamente humano. En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera κ que comprende un reemplazo de segmentos génicos de cadena ligera κ de ratón endógenos con la secuencia V_{k1}-39J_{k5} humana reordenada o la secuencia V_{k3}-20J_{k1} humana reordenada, y comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J de cadena pesada de ratón endógenos con un repertorio completo o sustancialmente completo de segmentos génicos V, D y J de cadena pesada humana.

30 En un aspecto, el ratón genéticamente modificado proporcionado expresa una única cadena ligera κ derivada de no más de una, o no más de dos, secuencias de cadena ligera κ reordenadas, en donde el ratón, tras la inmunización con antígeno, muestra un título sérico que es comparable a un ratón de tipo silvestre inmunizado con el mismo antígeno. En una realización específica, el ratón expresa una secuencia de cadena ligera κ única, en donde la secuencia de cadena ligera κ única deriva de no más de una secuencia de cadena ligera κ reordenada. En una realización, el título sérico se caracteriza como inmunoglobulina total. En una realización específica, el título sérico se caracteriza como título específico de IgM. En una realización específica, el título sérico se caracteriza como título específico de IgG. En una realización más específica, la secuencia de cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia V_{k1}-39J_{k5} y V_{k3}-20J_{k1}. En una realización, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia V_{k1}-39J_{k5}. En una realización, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia V_{k3}-20J_{k1}.

35 En un aspecto, el ratón genéticamente modificado proporcionado expresa una pluralidad de cadenas pesadas de inmunoglobulinas asociadas con una única secuencia de cadena ligera. La cadena pesada comprende una secuencia humana. La secuencia humana incluye al menos una secuencia variable y también puede comprender una secuencia humana seleccionada de un CH1, una bisagra, un CH2, un CH3 y una combinación de los mismos. La cadena ligera única comprende una secuencia humana. La secuencia humana incluye al menos una secuencia variable y también puede comprender una secuencia humana seleccionada de una secuencia constante y una combinación de las mismas. En una realización, el ratón comprende un locus de inmunoglobulina endógeno desactivado y expresa la cadena ligera de un transgén o episoma extracromosómico. En una realización, el ratón comprende un reemplazo en un locus de ratón endógeno de algunos o todos los segmentos génicos de cadena pesada de ratón endógenos (es decir, V, D, J), y/o algunas o todas las secuencias constantes de cadena pesada de ratón endógenas (por ejemplo, CH1, bisagra, CH2, CH3, o una combinación de los mismos), y/o algunas o todas las secuencias de cadena ligera de ratón endógenas (por ejemplo, V, J, constante, o una combinación de las mismas), con una o más secuencias de inmunoglobulinas humanas.

40 En una realización, el ratón, después de la reordenación de uno o más segmentos génicos V, D y J, el ratón comprende en su genoma al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen ADAM6 de ratón o un homólogo o un ortólogo o un fragmento funcional del mismo. En una realización, después de la reordenación, el ratón comprende en

su genoma al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican un gen ADAM6 de ratón o un homólogo o un ortólogo o un fragmento funcional del mismo. En una realización, después de la reordenación, el ratón comprende en su genoma al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen ADAM6 de ratón o un homólogo o un ortólogo o un fragmento funcional del mismo. En una realización, el ratón comprende el gen ADAM6 o un homólogo o un ortólogo o un fragmento funcional del mismo en un linfocito B.

[Eliminado].

También se divulgan ratones macho que comprenden una secuencia ADAM6 o un homólogo o un ortólogo o un fragmento funcional de la misma en una ubicación en el genoma de ratón que se aproxima a la ubicación del alelo endógeno ADAM6 de ratón, por ejemplo, 3' de una secuencia del segmento génico V final y 5' de un segmento génico D inicial.

En una realización, los ratones macho comprenden una secuencia ADAM6 o un homólogo o un ortólogo o un fragmento funcional de la misma flanqueada cadena arriba, cadena abajo o cadena arriba y cadena abajo (con respecto a la dirección de transcripción de la secuencia ADAM6) de una secuencia de ácido nucleico que codifica un segmento génico de región variable de inmunoglobulina. En una realización específica, el segmento génico de la región variable de inmunoglobulina es un segmento génico humano. En una realización, el segmento génico de región variable de inmunoglobulina es un segmento génico humano, y la secuencia que codifica la ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma en un ratón está entre segmentos génicos V humanos; en una realización, el ratón comprende dos o más segmentos génicos V humanos, y la secuencia está en una posición entre el segmento génico V final y el penúltimo segmento génico V; en una realización, la secuencia está en una posición que sigue al segmento génico V final y al primer segmento génico D. En las realizaciones descritas en el presente documento, referencia a "ADAM6" significa "ADAM6 y ADAM6b".

En una realización, el locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada carece de un gen ADAM6 de ratón endógeno. En una realización, el locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada comprende un gen ADAM6 que es funcional en un ratón macho. En una realización específica, el gen ADAM6 que es funcional en el ratón macho es un gen ADAM6 de ratón, y el gen ADAM6 de ratón se coloca dentro o inmediatamente adyacente al locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada.

En una realización, el locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada carece de un gen ADAM6 de ratón endógeno, y el ratón comprende una secuencia ADAM6 ectópica que es funcional en un ratón macho. En una realización, el gen ADAM6 ectópico que es funcional en el ratón macho es un gen ADAM6 de ratón. En una realización, el gen ADAM6 de ratón está en el mismo cromosoma que el locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada. En una realización, el gen ADAM6 de ratón está en un cromosoma diferente al locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada. En una realización, el gen ADAM6 del ratón está en un episoma.

En un caso, el ratón comprende un primer alelo de cadena pesada endógeno y un segundo alelo de cadena pesada endógeno, y el primer alelo de cadena pesada endógeno comprende una delección de un locus ADAM6 de ratón, y el primer alelo de cadena pesada endógeno comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos V, D y J de ratón funcionales con uno o más segmentos V, D y J humanos. En una realización, el primer y el segundo alelos de cadena pesada endógenos comprenden cada uno una delección de un locus ADAM6 de ratón endógeno, y el primer y el segundo alelos de cadena pesada endógenos comprenden un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos V, D y J de ratón funcionales con uno o más segmentos V, D y J humanos. En una realización, el primer y/o el segundo alelo comprende una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma. En una realización, la secuencia de ácido nucleico ectópico se ubica 3' (con respecto a la direccionalidad transcripcional del locus variable de la cadena pesada) de un segmento génico V de ratón final y se ubica 5' (con respecto a la direccionalidad transcripcional de la secuencia constante) de un gen constante de cadena pesada de ratón (o quimérico humano/ratón) o fragmento del mismo (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica C_H1 y/o bisagra C_H2 y/o C_H3 humanas y/o de ratón). En una realización, la secuencia de ácido nucleico ectópico se ubica cadena abajo (con respecto a la dirección de transcripción del locus del segmento V) de un segmento V y cadena arriba de un segmento D. En una realización, la secuencia de ácido nucleico ectópico se ubica entre el penúltimo segmento V más 3' y el último segmento V más 3'. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico ectópico se ubica entre el segmento V humano V_H1-2 y el segmento V humano V_H6-1. En una realización, la secuencia de nucleótidos entre los dos segmentos génicos V humanos se coloca en orientación de transcripción opuesta con respecto a los segmentos génicos V humanos. En una realización específica, la secuencia de nucleótidos codifica, de 5' a 3' con respecto a la dirección de transcripción de los genes ADAM6 y la secuencia ADAM6a seguida de una secuencia ADAM6b. En una realización específica, los genes ADAM6 están orientados en orientación transcripcional opuesta en comparación con los segmentos V flanqueantes cadena arriba y cadena abajo.

Se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica ADAM6a de ratón o un fragmento funcional de la misma y/o una secuencia que codifica ADAM6b de ratón o un fragmento funcional de la misma, en donde la ADAM6a y/o ADAM6b o uno o varios fragmentos funcionales de los mismos están operativamente unidos a un promotor. El promotor puede ser un promotor humano. El promotor puede ser el promotor ADAM6 de ratón. El promotor ADAM6 puede comprender

una secuencia localizada entre el primer codón del primer gen ADAM6 más cercano al segmento génico D_H de ratón más 5' y la secuencia de señal de recombinación del segmento génico D_H más 5', en donde se indica 5' con respecto a dirección de transcripción de los genes de inmunoglobulinas de ratón. El promotor puede ser un promotor vírico. El promotor vírico puede ser un promotor de citomegalovirus (CMV). El promotor puede ser un promotor de ubiquitina.

En una realización, el ADAM6a y/o ADAM6b de ratón se seleccionan de ADAM6a de la SEQ ID NO: 1 y/o ADAM6b de secuencia de la SEQ ID NO: 2. En una realización, el promotor ADAM6 de ratón es un promotor de SEQ ID NO: 3. En una realización específica, el promotor ADAM6 de ratón comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 3 directamente cadena arriba (con respecto a la dirección de transcripción de ADAM6a) del primer codón de ADAM6a y se extiende hasta el final de la SEQ ID NO: 3 cadena arriba de la región codificante de ADAM6. En otra realización específica, el promotor ADAM6 es un fragmento que se extiende desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio de ADAM6a a aproximadamente 0,5 kb, 1 kb, 2 kb o 3 kb o más cadena arriba del codón de inicio de ADAM6a.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma que cuando se coloca en un ratón que es infértil o que tiene baja fertilidad debido a la falta de ADAM6, mejora la fertilidad o restaura la fertilidad a una fertilidad de tipo silvestre. En una realización, la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma confiere a un ratón macho la capacidad de producir un espermatozoide que es capaz de atravesar un oviducto de ratón hembra para fertilizar un óvulo de ratón.

Los ratones comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6, o un ortólogo o un homólogo o un fragmento de la misma, que es funcional en un ratón macho. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico está dentro o adyacente a una secuencia de ácido nucleico humano que comprende uno o más segmentos génicos de región variable de inmunoglobulina. En una realización, el uno o más segmentos génicos de región variable de inmunoglobulina está en un locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno modificado. En una realización, la modificación comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón funcionales con una pluralidad de segmentos de segmentos génicos de cadena pesada humana no reordenados que están operativamente unidos a un gen de región constante de ratón endógeno. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico está entre dos segmentos V humanos. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico está entre un segmento V humano y un segmento D humano. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico está entre un segmento D humano y un segmento J humano. En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico está cadena arriba del segmento V humano más 5' (con respecto a la dirección de transcripción del segmento V). En una realización específica, la secuencia de ácido nucleico está entre un segmento J humano y una secuencia génica de región constante de cadena pesada de ratón endógena.

En una realización, los ratones macho son capaces de generar descendencia mediante el apareamiento, con una frecuencia que es casi la misma que la de un ratón de tipo silvestre. En una realización, los ratones macho producen espermatozoides que puede transitar desde el útero de un ratón a través de un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón; en una realización específica, los espermatozoides de los ratones transitan a través del oviducto casi tan eficazmente como los espermatozoides de un ratón de tipo silvestre. En una realización, aproximadamente el 50% o más de los espermatozoides producidos en el ratón muestran la capacidad de entrar y/o transitar un oviducto para fertilizar un óvulo de ratón.

El ratón carece de un locus ADAM6 endógeno funcional, en donde el ratón comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que complementa la pérdida de la función ADAM6 de ratón en un ratón macho. En una realización, la secuencia de nucleótidos ectópica confiere al ratón macho la capacidad de producir descendencia que es comparable a un ratón macho de tipo silvestre correspondiente que contiene un gen ADAM6 endógeno funcional. En una realización, la secuencia confiere al ratón la capacidad de formar un complejo de ADAM2 y/o ADAM3 y/o ADAM6 sobre la superficie del espermatozoide del ratón. En una realización, la secuencia confiere al ratón la capacidad de viajar desde un útero de ratón a través de un oviducto de ratón a un óvulo de ratón para fertilizar el óvulo.

En una realización, el ratón carece de un locus ADAM6 endógeno funcional y comprende una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una ADAM6 o un ortólogo o un homólogo o un fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho y en donde el ratón macho produce al menos aproximadamente un 50%, 60 %, 70 %, 80%, o 90% de la cantidad de camadas que produce un ratón de tipo silvestre de la misma edad y cepa en un período de seis meses.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica produce al menos aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, o aproximadamente 10 veces o más de progenie cuando se reproduce durante un período de seis meses que un ratón de la misma edad y la misma cepa o similar que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia de nucleótidos ectópica que se reproduce sustancialmente durante el mismo período de tiempo y en sustancialmente las mismas condiciones.

En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de

nucleótidos ectópica produce un promedio de al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces o 4 veces mayor número de cachorros por camada en un período de reproducción de 4 o 6 meses que un ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia de nucleótidos ectópica, y que se reproduce durante el mismo período de tiempo.

5 En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica es un ratón macho, y el ratón macho produce espermatozoides que cuando se recuperan de los oviductos aproximadamente 5- 6 horas después de la copulación refleja una migración en el oviducto que es al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, 100 veces, 110 veces, o 120 veces o más que el espermatozoide de un ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que carece de la secuencia de nucleótidos ectópica.

15 En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica cuando copula con un ratón hembra genera esperma que es capaz de atravesar el útero y entrar y atravesar el oviducto dentro de aproximadamente 6 horas con una eficacia que es aproximadamente igual a la del esperma de un ratón de tipo silvestre.

20 En una realización, el ratón que carece del gen ADAM6 endógeno funcional y que comprende la secuencia de nucleótidos ectópica produce aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, o aproximadamente 4 veces o más camadas en un período de tiempo comparable que un ratón que carece del gen ADAM6 funcional y que carece de la secuencia de nucleótidos ectópica.

25 También se describe un ratón que comprende un locus variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno humanizado y una modificación de un locus de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón, en donde el ratón expresa un linfocito B que comprende una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina humana reordenada unida operativamente a una secuencia génica de región constante de cadena pesada humana o de ratón, y el linfocito B comprende en su genoma (p. ej., en un cromosoma de linfocitos B) un gen que codifica una ADAM6 o un ortólogo o un homólogo o un fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho (por ejemplo, un gen ADAM6 de ratón, por ejemplo, ADAM6a de ratón y/o ADAM6b de ratón), en donde los dominios variables de las cadenas ligeras de inmunoglobulina λ o κ de los ratones derivan de no más de uno o no más de dos segmentos génicos V de cadena ligera.

35 En un caso, la secuencia de inmunoglobulina reordenada unida operativamente a la secuencia génica de la región constante de cadena pesada comprende una secuencia V, D y/o J de cadena pesada humana; una secuencia V, D y/o J de cadena pesada de ratón; una secuencia V y/o J de cadena ligera humana o de ratón. En un caso, la secuencia génica de la región constante de cadena pesada comprende una secuencia de cadena pesada humana o de ratón seleccionada del grupo que consiste en un C_H1 , una bisagra, un C_H2 , un C_H3 y una combinación de los mismos.

40 En un aspecto, el ratón proporcionado es adecuado para producir anticuerpos que tienen la misma cadena ligera, en donde la totalidad o sustancialmente todos los anticuerpos producidos en el ratón se expresan con la misma cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende un dominio variable humano, y en donde los anticuerpos comprenden una cadena pesada que comprende un dominio variable humano.

45 En un aspecto, el ratón proporcionado se caracteriza por la incapacidad del ratón para producir un linfocito B que exprese un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina que deriva de una secuencia de cadena ligera reordenada que no es una secuencia Vk1-39Jk5 humana o una secuencia Vk3-20Jk1 humana.

50 En una realización, el ratón muestra una proporción de cadena ligera κ : λ que es aproximadamente la misma que la de un ratón que comprende un complemento de tipo silvestre de segmentos génicos V y J de cadena ligera de inmunoglobulina.

55 En un aspecto, se proporciona un ratón como se describe en el presente documento que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina derivada de una secuencia Vk1-39Jk5 humana o una secuencia Vk3-20Jk1 humana, en donde el ratón comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos de la región variable de cadena pesada de ratón endógenos con uno o más segmentos génicos de la región variable de cadena pesada humana, y el ratón muestra una proporción de (a) linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ , a (b) linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ , de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.

60 En una realización, el ratón expresa una cadena ligera κ única, en donde la cadena ligera κ única deriva de una secuencia Vk1-39Jk5 humana y la proporción de linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ a linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20; en una realización, la proporción es de aproximadamente 1 a al menos aproximadamente 66; en una realización específica, la relación es de aproximadamente 1 a 66.

65 En una realización, el ratón expresa una cadena ligera κ única, en donde la cadena ligera κ única deriva de una

secuencia Vk3-20Jk5 humana y la proporción de linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera λ a linfocitos B CD19+ que expresan una inmunoglobulina que tiene una cadena ligera κ es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20; en una realización, la proporción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 21. En realizaciones específicas, la proporción es 1 a 20 o 1 a 21.

5 En una realización, el porcentaje de linfocitos B Igk+ Ig λ + en el ratón es aproximadamente el mismo que en un ratón de tipo silvestre. En una realización específica, el porcentaje de linfocitos B Igk+ Ig λ + en el ratón es aproximadamente de aproximadamente un 2 a aproximadamente un 6 por ciento. En una realización específica, el porcentaje de linfocitos B Igk+ Ig λ + en un ratón en donde la cadena ligera κ reordenada única deriva de una secuencia Vk1-39Jk5 es de
10 aproximadamente un 2 a aproximadamente un 3; en una realización específica, aproximadamente un 2,6. En una realización específica, el porcentaje de linfocitos B Igk+ Ig λ + en un ratón en donde la cadena ligera κ reordenada única deriva de una secuencia Vk3-20Jk1 es de aproximadamente un 4 a aproximadamente un 8; en una realización específica, aproximadamente un 6.

15 En una realización, el ratón no comprende una modificación que reduzca o elimine la capacidad del ratón de mutar somáticamente cualquier locus funcional de cadena ligera del mouse. En una realización, el único locus funcional de cadena ligera en el ratón expresa una cadena ligera que comprende un dominio variable humano derivado de una secuencia reordenada seleccionada de una secuencia Vk1-39Jk5 humana, una secuencia Vk3-20Jk1 humana y una combinación de las mismas.

20 En un aspecto, se proporciona el ratón modificado genéticamente que expresa una única cadena ligera κ derivada de no más de una, o no más de dos, secuencias de cadena ligera κ reordenadas, en donde el ratón muestra el uso de la cadena ligera κ que es aproximadamente 100 veces o más, al menos aproximadamente 200 veces o más, al menos aproximadamente 300 veces o más, al menos aproximadamente 400 veces o más, al menos aproximadamente 500
25 veces o más, al menos aproximadamente 600 veces o más, al menos aproximadamente 700 veces o más, al menos aproximadamente 800 veces o más, al menos aproximadamente 900 veces o más, al menos aproximadamente 1000 veces o más, mayor que el uso de la misma cadena ligera κ (es decir, derivada del mismo segmento V y el mismo segmento J, o derivado del mismo segmento V/J reordenado) mostrado por un ratón que soporta un locus de cadena ligera κ humana completo o sustancialmente completo. En una realización específica, el ratón que lleva un locus de
30 cadena ligera κ humana completo o sustancialmente completo carece de una secuencia de cadena ligera κ de ratón no reordenada funcional. En una realización específica, el ratón expresa la cadena ligera κ única de no más de una secuencia de cadena ligera κ reordenada. En una realización, el ratón comprende una copia de una secuencia de cadena ligera κ reordenada (por ejemplo, un heterocigoto). En una realización, el ratón comprende dos copias de una secuencia de cadena ligera κ reordenada (por ejemplo, un homocigoto). En una realización más específica, la
35 secuencia de cadena ligera κ reordenada se selecciona de una secuencia Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1. En una realización, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia Vk1-39Jk5. En una realización, la secuencia de cadena ligera κ reordenada es una secuencia Vk3-20Jk1.

40 En un aspecto, el ratón modificado genéticamente proporcionado expresa una única cadena ligera derivada de no más de una, o no más de dos, secuencias de cadena ligera κ reordenadas, en donde la cadena ligera en el ratón genéticamente modificado muestra un nivel de expresión que es al menos 10 veces a aproximadamente 1.000 veces, 100 veces a aproximadamente 1.000 veces, 200 veces a aproximadamente 1.000 veces, 300 veces a aproximadamente 1.000 veces, 400 veces a aproximadamente 1.000 veces, 500 veces a aproximadamente 1.000
45 veces, 600 veces a aproximadamente 1.000 veces, 700 veces a aproximadamente 1.000 veces, 800 veces a aproximadamente 1.000 veces, o 900 veces a aproximadamente 1.000 veces mayor que la expresión de la misma cadena ligera reordenada mostrada por un ratón que lleva un locus variable de cadena ligera κ humana completo o sustancialmente completo. En una realización, la cadena ligera comprende una secuencia humana. En una realización, la cadena ligera única deriva de una secuencia de cadena ligera κ reordenada seleccionada de una Vk1-39Jk5 humana, una Vk3-20Jk1 humana, y una combinación de las mismas.

50 En una realización, el nivel de expresión de la cadena ligera, con el fin de comparar la expresión de la cadena ligera con la expresión en un ratón que comprende un locus variable de cadena ligera sustancialmente completamente humanizado, se caracteriza cuantificando ARNm de la secuencia de la cadena ligera transcrita (de la una o dos secuencias reordenadas), y comparándolas con la secuencia de cadena ligera transcrita de un ratón que lleva un locus
55 de cadena ligera completo o sustancialmente completo.

También se describe un método para producir un anticuerpo, que comprende expresar en una célula (a) una primera secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada humana de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia del gen C_H humano; (b) una secuencia de ácido nucleico de
60 dominio variable de cadena ligera humana de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia del gen C_L humano; y, (c) mantener la célula en condiciones suficientes para expresar un anticuerpo completamente humano y aislar el anticuerpo. En una realización, la célula comprende una segunda secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada humana de un segundo ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia de gen C_H humano, la primera secuencia de ácido
65 nucleico de cadena pesada codifica un primer dominio variable de cadena pesada que reconoce un primer epítipo, y la segunda secuencia de ácido nucleico de cadena pesada codifica un segundo dominio variable de cadena pesada

que reconoce un segundo epítipo, en donde el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos.

También se describe un método para producir una proteína de unión a epítipo, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento con un antígeno que comprende un epítipo de interés, mantener el ratón en condiciones suficientes para que el ratón genere una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente al epítipo de interés y aislar la molécula de inmunoglobulina que se une específicamente al epítipo de interés; en donde la proteína de unión a epítipo comprende una cadena pesada que comprende un dominio variable humano mutado somáticamente y un C_H de ratón, asociados con una cadena ligera que comprende un C_L de ratón y un dominio variable humano derivado de un Vk1-39Jk5 humano reordenado o un Vk3-20Jk1 humano reordenado.

También se describe un método para producir una proteína de unión a antígeno biespecífica, que comprende exponer un primer ratón como se describe en el presente documento a un primer antígeno de interés que comprende un primer epítipo, exponer un segundo ratón como se describe en el presente documento a un segundo antígeno de interés que comprende un segundo epítipo, permitir que el primer y el segundo ratón monten respuestas inmunitarias a los antígenos de interés, identificar en el primer ratón una primera región variable de cadena pesada humana que se une al primer epítipo del primer antígeno de interés, identificar en el segundo ratón una segunda región variable de cadena pesada humana que se une al segundo epítipo del segundo antígeno de interés, producir un primer gen de cadena pesada completamente humano que codifica una primera cadena pesada que se une al primer epítipo del primer antígeno de interés, producir un segundo gen de cadena pesada completamente humano que codifica una segunda cadena pesada que se une al segundo epítipo del segundo antígeno de interés, expresar la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada en una célula que expresa una única cadena ligera completamente humana derivada de un segmento génico Vk1-39 humano o Vk3-20 humano para formar una proteína de unión a antígeno biespecífica, y aislar la proteína de unión a antígeno biespecífica.

En un caso, el primer antígeno y el segundo antígeno no son idénticos.

En un caso, el primer antígeno y el segundo antígeno son idénticos, y el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos. En un caso, la unión de la primera región variable de cadena pesada al primer epítipo no bloquea la unión de la segunda región variable de cadena pesada al segundo epítipo.

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

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

En un aspecto, se proporciona una célula que expresa una proteína de unión a epítipo, en donde la célula comprende: (a) una secuencia de nucleótidos humana que codifica un dominio variable de cadena ligera humana que deriva de una Vk1-39Jk5 humana reordenada o una Vk3-20Jk1 humana reordenada, en donde la secuencia de ácido nucleico humana se fusiona (directamente o a través de un enlazador) a una secuencia de ácido nucleico de dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana (por ejemplo, una secuencia de ADN de dominio constante κ humano); y, (b) una primera secuencia de ácido nucleico de dominio variable de cadena pesada humana que codifica un dominio variable de cadena pesada humana derivada de una primera secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena pesada humana, en donde la primera secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena pesada humana se fusiona (directamente o a través de un enlazador) a una secuencia de ácido nucleico de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana (por ejemplo, una secuencia de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgE humana); en donde la proteína de unión a epítipo reconoce un primer epítipo. En una realización, la proteína de unión a epítipo se une al primer epítipo con una constante de disociación inferior a 10^{-6} M, inferior a 10^{-8} M, inferior a 10^{-9} M, inferior a 10^{-10} M, inferior a 10^{-11} M, o inferior a 10^{-12} M. En una realización, la célula comprende una segunda secuencia de nucleótidos humana que codifica un segundo dominio variable de cadena pesada humana, en donde la segunda secuencia humana se fusiona (directamente o a través de un enlazador) a una secuencia de ácido nucleico de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana, y en donde el segundo dominio variable de cadena pesada humana no reconoce específicamente el primer epítipo (por ejemplo, presenta una constante de disociación de, por ejemplo, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, o superior), y en donde la proteína de unión a epítipo se une tanto al primer epítipo como al segundo epítipo, y en donde la primera y la segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina se asocian cada una con una cadena ligera de acuerdo con (a). En una realización, el segundo dominio V_H se une al segundo epítipo con una constante de disociación que es inferior a 10^{-6} M, inferior a 10^{-7} M, inferior a 10^{-8} M, inferior a 10^{-9} M, inferior a 10^{-10} M, inferior a 10^{-11} M o inferior a 10^{-12} M.

En una realización, la proteína de unión a epítipo comprende una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una

segunda cadena pesada de inmunoglobulina, cada una asociada con una cadena ligera universal (por ejemplo, una cadena ligera derivada de una secuencia variable de cadena ligera humana reordenada seleccionada de una Vk1-39Jk5 humana o una Vk3-20Jk1 humana), en donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a un primer epítipo con una constante de disociación en el intervalo nanomolar (por ejemplo, 1 nM a 100 nM) a picomolar (por ejemplo, 1 pM a 100 pM), la segunda cadena pesada de inmunoglobulina se une a un segundo epítipo con una constante de disociación en el intervalo nanomolar a picomolar (por ejemplo, 1 pM a 100 nM), el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos, la primera cadena pesada de inmunoglobulina no se une al segundo epítipo o se une al segundo epítipo con una constante de disociación más débil que el intervalo micromolar (por ejemplo, el intervalo milimolar), la segunda cadena pesada de inmunoglobulina no se une al primer epítipo o se une al primer epítipo con una constante de disociación más débil que el intervalo micromolar (por ejemplo, el intervalo milimolar) y uno o más de los dominios variables (es decir, uno o más del dominio variable de cadena ligera, el dominio variable de cadena pesada de la primera cadena pesada de inmunoglobulina, y el dominio variable de cadena pesada) de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina está mutado somáticamente. En una realización, la unión de la proteína de unión a epítipo al primer epítipo no bloquea la unión de la proteína de unión a epítipo al segundo epítipo.

En una realización, la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un determinante de unión a proteína A de tipo silvestre, y la segunda cadena pesada carece de un determinante de unión a proteína A de tipo silvestre. En una realización, la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a la proteína A en condiciones de aislamiento, y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina no se une a la proteína A o se une a la proteína A al menos 10 veces, unas cien veces o unas mil veces más débil que la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a la proteína A en condiciones de aislamiento. En una realización específica, la primera y la segunda cadenas pesadas son isotipos de IgG1, en donde la segunda cadena pesada comprende una modificación seleccionada entre 95R (EU 435R), 96F (EU 436F), y una combinación de las mismas, y en donde la primera cadena pesada carece de dicha modificación.

En un aspecto, un ratón, embrión no humano o célula como se describe en el presente documento comprende un locus de cadena ligera κ que conserva elementos reguladores o de control endógenos, por ejemplo, un potenciador intrónico κ de ratón, un potenciador 3' κ de ratón, o tanto un potenciador intrónico como un potenciador 3', en donde los elementos reguladores o de control facilitan la mutación somática y la maduración por afinidad de una secuencia expresada del locus de la cadena ligera κ .

En un aspecto, se proporciona una célula de ratón que se aísla de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es una célula ES. En una realización, la célula es un linfocito. En una realización, el linfocito es un linfocito B. En una realización, el linfocito B expresa una cadena pesada quimérica que comprende un dominio variable derivado de un segmento génico V humano; y una cadena ligera derivada de (a) una secuencia Vk1-39/J humana reordenada, (b) una secuencia Vk3-20/J humana reordenada, o (c) una combinación de las mismas; en donde el dominio variable de cadena pesada está fusionado a una región constante de ratón y el dominio variable de cadena ligera está fusionado a una región constante de ratón o humana. En una realización, la célula es un linfocito B y el linfocito B comprende una secuencia que codifica un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana reordenada y una secuencia que codifica un dominio variable de cadena ligera universal, en donde el linfocito B comprende en un cromosoma una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ADAM6 o un ortólogo o un homólogo o un fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho; en una realización, el linfocito B de ratón comprende dos alelos de la secuencia de ácido nucleico.

En un aspecto, la célula de ratón proporcionada, comprende un primer cromosoma que comprende un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada que comprende segmentos V, D y J humanos no reordenados; un segundo cromosoma que comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina humanizada que codifica o es capaz de reordenarse para codificar una cadena ligera, en donde el locus de cadena ligera comprende no más de una o no más de dos secuencias V/J de cadena ligera reordenadas operativamente unidas a un gen constante de cadena ligera; y un tercer cromosoma que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho. En una realización, el primer y tercer cromosomas son iguales. En una realización, el segundo y tercer cromosomas son iguales. En una realización, el primer, el segundo y el tercer cromosomas son cada uno diferentes. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma está presente en dos copias. En una realización, la célula es una célula somática. En una realización específica, la célula somática es un linfocito B. En una realización, la célula es una célula germinal.

En un aspecto, se proporciona un hibridoma, en donde el hibridoma se produce con linfocito B de un ratón como se describe en el presente documento. En una realización específica, el linfocito B es de un ratón como se describe en el presente documento que se ha inmunizado con un antígeno que comprende un epítipo de interés, y el linfocito B expresa una proteína de unión que se une al epítipo de interés, la proteína de unión tiene un dominio variable de cadena pesada humana mutado somáticamente y una región constante de cadena pesada de ratón, y tiene un dominio variable de cadena ligera humana derivado de un Vk1-39Jk5 humano reordenado o un Vk3-20Jk1 humano reordenado y un C_L de ratón.

También se describe una célula que comprende un gen de cadena pesada completamente humano que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer dominio variable de cadena pesada de un ratón como se

describe en el presente documento, y un gen de cadena ligera completamente humano que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera universal como se describe en el presente documento. En un caso, la célula comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo dominio variable de cadena pesada de un ratón como se describe en el presente documento, en donde el primer y el segundo dominio variable de cadena pesada son diferentes. En una realización, la célula se selecciona entre CHO, COS, 293, HeLa, y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6™).

También se describe un embrión de ratón, en donde el embrión comprende una célula ES donante que deriva de un ratón como se describe en el presente documento.

También se describe el uso de un embrión de ratón que comprende una modificación genética como se describe en el presente documento, en donde el uso comprende producir un ratón genéticamente modificado como se describe en el presente documento.

También se describe un dominio variable de cadena pesada humana y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera humana de un anticuerpo producido en un ratón como se describe en el presente documento.

También se describe una secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena pesada humana y una secuencia de nucleótidos de dominio variable de cadena ligera humana de un anticuerpo producido en un ratón como se describe en el presente documento.

También se describe un anticuerpo o proteína de unión a antígeno o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, Fab, F(ab)₂, scFv) producido en un ratón como se describe en el presente documento.

En un aspecto, el ratón proporcionado se produce usando un vector de direccionamiento, una construcción de nucleótidos o una célula como se describe en el presente documento.

En un aspecto, el ratón proporcionó una progenie del apareamiento de un primer ratón como se describe en el presente documento con un segundo ratón que es un ratón de tipo silvestre o genéticamente modificado.

También se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para producir un anticuerpo completamente humano, o una proteína de unión a antígeno completamente humana que comprende un dominio variable de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo.

También se describe el uso de un ratón o tejido o célula como se describe en el presente documento para producir un anticuerpo biespecífico completamente humano.

También se describe el uso de una secuencia de ácido nucleico producida por un ratón como se describe en el presente documento, en donde el uso comprende expresar la secuencia de ácido nucleico en la producción de un agente terapéutico humano.

También se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para producir una línea celular inmortalizada.

También se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para producir un hibridoma o cuadroma.

También se describe el uso de un ratón como se describe en el presente documento para producir una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de inmunoglobulina o un fragmento de la misma. En una realización, la secuencia de ácido nucleico se usa para producir un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un caso, el ratón se usa para producir una proteína de unión a antígeno seleccionada de un anticuerpo, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), un scFv, un bis-scFv, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un V-NAR, un VHH, un VL, un F(ab), un F(ab)₂, una DVD (es decir, proteína de unión a antígeno de dominio variable dual), una SVD (es decir, proteína de unión a antígeno de dominio variable único) o un acoplador de linfocitos T biespecífico (BiTE).

También se describe el uso del ratón como se describe en el presente documento para la producción de un medicamento (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno), o para la fabricación de una secuencia que codifica una secuencia variable de un medicamento (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno), se proporciona para el tratamiento de una enfermedad o trastorno humano.

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

Breve descripción de las figuras

La **FIG. 1A** muestra una ilustración general, no a escala, para el reemplazo genómico directo de aproximadamente tres megabases (Mb) del locus del gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (símbolos cerrados) con aproximadamente una megabase (Mb) del locus del gen variable de cadena pesada de

inmunoglobulina humana (símbolos abiertos). La **FIG. 1B** muestra una ilustración general, no a escala, para el reemplazo genómico directo de aproximadamente tres megabases (Mb) del locus del gen variable de la cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón (símbolos cerrados) con aproximadamente 0,5 megabases (Mb) de la primera, o proximal, de dos repeticiones casi idénticas del locus del gen variable de la cadena ligera κ de inmunoglobulina humana (símbolos abiertos).

La **FIG. 2A** muestra una ilustración detallada, no a escala, para tres etapas iniciales (A-C) para el reemplazo genómico directo del locus del gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que da como resultado la delección de todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H de ratón y el reemplazo con tres V_H humanos, todos los segmentos génicos D_H y J_H humanos. Se muestra un vector de direccionamiento para la primera inserción de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana ($3hV_H$ BACvec) con un brazo de homología de ratón 5' de 67 kb, un casete de selección (rectángulo abierto), un sitio de recombinación específico del sitio (triángulo abierto), un fragmento genómico humano de 145 kb y un brazo de homología de ratón 3' de 8 kb. Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulinas humanas (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados), casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específicos del sitio (triángulos abiertos) insertados a partir de vectores de direccionamiento posteriores.

La **FIG. 2B** muestra una ilustración detallada, no a escala, para seis etapas adicionales (D-I) para el reemplazo genómico directo del locus del gen variable de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que da como resultado la inserción de 77 segmentos génicos V_H humanos adicionales y la eliminación del casete de selección final. Se muestra un vector de direccionamiento para la inserción de segmentos génicos V_H humanos adicionales ($18hV_H$ BACvec) para la inserción inicial de segmentos génicos de cadena pesada humana (alelo híbrido $3hV_H$ -CRE) con un brazo de homología de ratón 5' de 20 kb, un casete de selección (rectángulo abierto), un fragmento genómico humano de 196 kb y un brazo de homología humano de 62 kb que se solapa con el extremo 5' de la inserción inicial de los segmentos génicos de cadena pesada humana que se muestra con un sitio de recombinación específico del sitio (triángulo abierto) ubicado en 5' de los segmentos génicos humanos. Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulinas humanas (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados) y casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) insertados por vectores de direccionamiento posteriores.

La **FIG. 2C** muestra una ilustración detallada, no a escala, para tres etapas iniciales (A-C) para el reemplazo genómico directo del locus del gen variable de la cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que da como resultado la delección de todos los segmentos génicos V_k y J_k de ratón (Alelo Híbrido Igk-CRE). Se muestran casetes de selección (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específicos del sitio (triángulos abiertos) insertados a partir de vectores de direccionamiento.

La **FIG. 2D** muestra una ilustración detallada, no a escala, para 5 etapas adicionales (D-H) para el reemplazo genómico directo del locus del gen variable de la cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que da como resultado la inserción de todos los segmentos génicos V_k y J_k humanos en la repetición proximal y la delección del casete de selección final (Alelo Híbrido $40hV_{kd}Hyg$). Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulinas humanas (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados) y casetes de selección adicionales (rectángulos abiertos) insertados por vectores de direccionamiento posteriores.

La **FIG. 3A** muestra una ilustración general de las ubicaciones de los conjuntos de cebadores/sondas de PCR cuantitativa (qPCR) para la exploración de células ES para la inserción de secuencias de genes de cadena pesada humana y la pérdida de secuencias de genes de cadena pesada de ratón. La estrategia de exploración en células ES y ratones para la primera inserción de genes de cadena pesada humana se muestra con conjuntos de cebador/sonda de qPCR para la región suprimida (sondas de "pérdida" C y D), la región insertada (sondas G y H de "hlgH") y regiones flanqueantes (sondas de "retención" A, B, B, E y F) en un cromosoma de ratón no modificado (arriba) y un cromosoma correctamente dirigido (abajo).

La **FIG. 3B** muestra un cálculo representativo del número de copias de la sonda observadas en células ES precursoras y modificadas para la primera inserción de segmentos génicos de cadena pesada de inmunoglobulina humana. El número de copias de la sonda observadas para las sondas A a F se calculó como $2/2\Delta\Delta Ct$. $\Delta\Delta Ct$ se calcula como $\text{prom} [\Delta Ct (\text{muestra}) - \text{med}\Delta Ct (\text{control})]$ donde ΔCt es la diferencia en Ct entre las sondas de prueba y de referencia (entre 4 y 6 sondas de referencia según el ensayo). El término $\text{med}\Delta Ct (\text{control})$ es la mediana de ΔCt de múltiples (> 60) muestras de ADN no dirigidas de células ES precursoras. Se ensayó cada clon de células ES modificadas por sextuplicado. Para calcular el número de copias de las sondas G y H de IgH en las células ES precursoras, se supuso que estas sondas tenían un número de copias de 1 en las células ES modificadas y se utilizó un Ct (umbral de ciclo, por sus siglas en inglés, *cycle threshold*) máximo de 35 aunque no se observó amplificación.

La **FIG. 3C** muestra un cálculo representativo de los números de copias para cuatro ratones de cada genotipo que se calcularon de manera similar usando solo sondas D y H. Ratones de tipo silvestre: ratones TS; Ratones heterocigotos para la primera inserción de segmentos génicos de inmunoglobulina humana: Ratones HET; Ratones homocigoto para la primera inserción de segmentos génicos de inmunoglobulina humana: Ratones Homo.

La **FIG. 4A** muestra una ilustración de las tres etapas empleadas para la construcción de $3hV_H$ BACvec por recombinación homóloga bacteriana (BHR, por sus siglas en inglés). Se muestran segmentos génicos de inmunoglobulinas humanas (símbolos abiertos) y de ratón (símbolos cerrados), casetes de selección (rectángulos abiertos) y sitios de recombinación específicos del sitio (triángulos abiertos) insertados a partir de vectores de

direccionamiento.

La **FIG. 4B** muestra electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés) de tres clones BAC (B1, B2 y B3) después de la digestión con NotI. Los marcadores M1, M2 y M3 son marcadores de PFG de intervalo bajo, intervalo medio y escalera lambda, respectivamente (New England BioLabs, Ipswich, MA).

La **FIG. 5A** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de modificaciones secuenciales del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón con cantidades crecientes de segmentos de genes de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Se realizaron ratones homocigotos a partir de cada una de las tres etapas diferentes de la humanización de la cadena pesada. Los símbolos abiertos reflejan la secuencia humana; los símbolos cerrados reflejan la secuencia de ratón.

La **FIG. 5B** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de modificaciones secuenciales del locus de la cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón con cantidades crecientes de segmentos de genes de la cadena ligera κ de inmunoglobulina humana. Se realizaron ratones homocigotos a partir de cada una de las tres etapas diferentes de la humanización de la cadena ligera κ . Los símbolos abiertos reflejan la secuencia humana; los símbolos cerrados reflejan la secuencia de ratón.

La **FIG. 6** muestra gráficos de puntos FACS de poblaciones de linfocitos B en ratones humanizados de tipo silvestre y VELOCIMMUNE®. Se tiñeron células de bazo (fila superior, tercera fila a partir de la fila superior e inferior) o ganglio linfático inguinal (segunda fila de la parte superior) de ratones de tipo silvestre (ts) o VELOCIMMUNE® 1 (V1), VELOCIMMUNE® 2 (V2) o VELOCIMMUNE® 3 (V3) se tiñeron para determinar linfocitos B que expresaban IgM de superficie (fila superior y segunda fila desde la parte superior), inmunoglobulina de superficie que contiene cadenas ligeras κ o λ (tercera fila desde la parte superior) o IgM de superficie de haplotipos específicos (fila inferior) y poblaciones separadas por FACS.

La **FIG. 7A** muestra secuencias representativas de CDR3 de cadena pesada de anticuerpos VELOCIMMUNE® seleccionados al azar alrededor de la unión $V_H-D_H-J_H$ (CDR3), demostrando diversidad de unión y adiciones de nucleótidos. Las secuencias de CDR3 de cadena pesada se agrupan de acuerdo con el uso del segmento génico D_H , cuya línea germinal se proporciona sobre cada grupo en negrita. Los segmentos génicos V_H para cada secuencia CDR3 de cadena pesada se observan entre paréntesis en el extremo 5' de cada secuencia (por ejemplo, 3-72 es V_H 3-72 humano). Los segmentos génicos J_H para cada CDR3 de cadena pesada se observan entre paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (por ejemplo, 3 es J_H 3 humano). Las SEQ ID NO para cada secuencia mostrada son los siguientes, de arriba a abajo: SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39.

La **FIG. 7B** muestra secuencias representativas de CDR3 de cadena ligera de anticuerpos VELOCIMMUNE® seleccionados al azar alrededor de la unión V_K-J_K (CDR3), demostrando diversidad de unión y adiciones de nucleótidos. Los segmentos génicos V_K para cada secuencia de CDR3 de cadena ligera se indican entre paréntesis en el extremo 5' de cada secuencia (por ejemplo, 1-6 es V_K 1-6 humano). Los segmentos génicos J_K para cada CDR3 de cadena ligera se observan entre paréntesis en el extremo 3' de cada secuencia (por ejemplo, 1 es J_K 1 humano). Las SEQ ID NO para cada secuencia mostrada son los siguientes, de arriba a abajo: SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 53; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58.

La **FIG. 8** muestra las frecuencias de hipermutación somática de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos VELOCIMMUNE® puntuadas (después de la alineación con las secuencias de la línea germinal apareadas) como porcentaje de secuencias cambiadas en cada posición de nucleótido (NT; columna izquierda) o aminoácido (AA; columna derecha) entre conjuntos de 38 (IgM no inmunizada), 28 (IgG no inmunizada), 32 (IgG no inmunizada de IgG), 36 (IgG inmunizada) o 36 (IgG inmunizada de IgG) secuencias. Las barras sombreadas indican la ubicación de las CDR.

La **FIG. 9A** muestra los niveles de inmunoglobulina sérica para los isotipos IgM e IgG en ratones de tipo silvestre (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

La **FIG. 9B** muestra los niveles de inmunoglobulina sérica para el isotipo IgA en ratones de tipo silvestre (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

La **FIG. 9C** muestra los niveles de inmunoglobulina sérica para el isotipo IgE en ratones de tipo silvestre (barras abiertas) o VELOCIMMUNE® (barras cerradas).

La **FIG. 10A** muestra títulos de IgG específicos de antígeno contra el receptor de interleucina-6 de suero siete ratones VELOCIMMUNE® (VI) y cinco ratones de tipo silvestre (TS) después de dos (sangrado 1) o tres (sangrado 2) rondas de inmunización con ectodominio del receptor de interleucina-6.

La **FIG. 10B** muestra títulos de isotipo IgG específicos para el receptor anti-interleucina-6 de siete ratones VELOCIMMUNE® (VI) y cinco ratones de tipo silvestre (TS).

La **FIG. 11A** muestra la distribución de afinidad de anticuerpos monoclonales anti receptor de interleucina-6 generados en ratones VELOCIMMUNE®.

La **FIG. 11B** muestra el bloqueo específico de antígeno de anticuerpos monoclonales anti receptor de interleucina-6 generados en ratones VELOCIMMUNE® (VI) y de tipo silvestre (TS).

La **FIG. 12** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de genes ADAM6a y ADAM6b de ratón en el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. Se muestra un vector de direccionamiento (Vector de Direccionamiento mADAM6) utilizado para la inserción de ADAM6a y ADAM6b de ratón en un locus de cadena pesada endógeno humanizado con un casete de selección (HYG: higromicina) flanqueado por sitios de

recombinación específicos del sitio (Frt) que incluyen sitios de restricción modificados por ingeniería en los extremos 5' y 3'.

La **FIG. 13** muestra una ilustración esquemática, no a escala, de un pseudogén ADAM6 humano (hADAM6 Ψ) ubicado entre los segmentos genéticos variables de cadena pesada humana 1-2 (V_H1-2) y 6-1 (V_H6-1). Se muestra un vector de direccionamiento para la recombinación homóloga bacteriana (Vector de Direccionamiento hADAM6 Ψ) para suprimir un pseudogén ADAM6 humano e insertar sitios de restricción únicos en un locus de cadena pesada humana con un casete de selección (NEO: neomicina) flanqueado por sitios de recombinación específicos del sitio (loxP) incluyendo sitios de restricción modificados por ingeniería en los extremos 5' y 3'. Se muestra una ilustración, no a escala, del locus de cadena pesada humanizado dirigido resultante que contiene un fragmento genómico que codifica para los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón, que incluye un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación específicos del sitio.

La **FIG. 14A** muestra gráficos de contorno FACS de linfocitos seleccionados en singletes para la expresión superficial de IgM y B220 en la médula ósea para ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para cadena ligera κ humana pesada y humana locus de genes variables que tienen un fragmento genómico de ratón insertado que comprende genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6). El porcentaje de linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{high}IgM⁺) se observa en cada gráfico de contorno.

La **FIG. 14B** muestra el número total de linfocitos B inmaduros (B220^{int}IgM⁺) y maduros (B220^{high}IgM⁺) en la médula ósea aislados de fémures de ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica para genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6).

La **FIG. 15A** muestra gráficas de contorno FACS de linfocitos B CD19⁺ seleccionados para la expresión superficial de c-kit y CD43 en la médula ósea para ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena ligera κ (H/ κ) humana y pesada humana y ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica para genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6). El porcentaje de linfocitos pro-B (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) y pre-B (CD19⁺CD43⁺ckit⁻) se observa en los cuadrantes superior derecho e inferior izquierdo, respectivamente, de cada gráfico de contorno.

La **FIG. 15B** muestra el número total de linfocitos pro-B (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) y linfocitos pre-B (CD19⁺CD43⁺ckit⁻) en la médula ósea aislados de fémures de ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que comprende genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6).

La **FIG. 16A** muestra gráficos de contorno FACS de linfocitos seleccionados en singletes para la expresión superficial de CD19 y CD43 en la médula ósea para ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para cadena ligera κ humana pesada y humana locus de genes variables que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica para genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6). El porcentaje de linfocitos B inmaduros (CD19⁺CD43⁻), pre-B (CD19⁺CD43^{int}) y pro-B (CD19⁺CD43⁺) se observa en cada gráfico de contorno.

La **FIG. 16B** muestra histogramas de linfocitos B inmaduros (CD19⁺CD43⁻) y pre-B (CD19⁺CD43^{int}) en la médula ósea de ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico ectópico de ratón que codifica para genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6).

La **FIG. 17A** muestra gráficos de contorno FACS de linfocitos seleccionados en singletes para la expresión superficial de CD19 y CD3 en esplenocitos para ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para cadena ligera κ humana pesada y humana locus de genes variables que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica para genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6). El porcentaje de linfocitos B (CD19⁺CD3⁻) y T (CD19⁻CD3⁺) se observa en cada gráfico de contorno.

La **FIG. 17B** muestra gráficos de contorno de FAC para linfocitos B CD19⁺ seleccionados para la expresión superficial de la cadena ligera Ig λ e Ig κ en el bazo de ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que comprende genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6). El porcentaje de linfocitos B Ig λ ⁺ (cuadrante superior izquierdo) e Ig κ ⁺ (cuadrante inferior derecho) se observa en cada gráfico de contorno.

La **FIG. 17C** muestra el número total de linfocitos B CD19⁺ en el bazo de ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que comprende genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6).

La **FIG. 18A** muestra gráficas de contorno FACS de linfocitos B CD19⁺ seleccionados para la expresión superficial de IgM en el bazo de ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que comprende genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6). El porcentaje de linfocitos B (CD19⁺IgD^{high}IgM^{int}) se observa en cada gráfico de contorno. La flecha en el gráfico de contorno derecho ilustra el proceso de maduración de los linfocitos B en relación con la expresión de superficie de IgM e IgD.

La **FIG. 18B** muestra el número total de linfocitos B en el bazo de ratones homocigóticos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y ratones homocigotos para locus de genes variables

de cadena pesada humana y ligera κ humana que tienen un fragmento genómico de ratón ectópico que codifica para genes ADAM6 de ratón (H/ κ -A6) durante la maduración de CD19+IgM^{high}IgD^{int} a CD19+IgM^{int}IgD^{high}.

La FIG. 19 ilustra una estrategia de direccionamiento para reemplazar segmentos génicos de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón endógenos con una región génica Vk1-39Jk5 humana.

La FIG. 20 ilustra una estrategia de direccionamiento para reemplazar segmentos génicos de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón endógenos con una región génica Vk3-20Jk1 humana.

La FIG. 21 ilustra una estrategia de direccionamiento para reemplazar segmentos génicos de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina por ratón endógenos con una región génica VpreB/J λ 5 humana.

La FIG. 22 muestra el porcentaje de linfocitos B CD19+ (eje y) de sangre periférica de ratones de tipo silvestre (TS), ratones homocigotos para una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 reordenada humana modificada por ingeniería (Vk1-39Jk5 HO) y ratones homocigotos para una región de cadena ligera Vk3-20Jk1 reordenada humana modificada por ingeniería (Vk3-20Jk1 HO).

La FIG. 23A muestra la expresión relativa de ARNm (eje y) de una cadena ligera derivada de Vk1-39 en un ensayo de PCR cuantitativa utilizando sondas específicas para la unión de una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 reordenada humana modificada por ingeniería (Sonda de Unión Vk1-39Jk5) y el segmento génico Vk1-39 humano (sonda Vk1-39) en un ratón homocigoto para un reemplazo de los segmentos génicos Vk y Jk endógenos con segmentos génicos Vk y Jk (Hk) humanos, un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón heterocigoto para una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 reordenada humana modificada por ingeniería (Vk1-39Jk5 HET). Las señales se normalizan a la expresión de Ck de ratón. N.D.: no detectado.

La FIG. 23B muestra la expresión relativa de ARNm (eje y) de una cadena ligera derivada de Vk1-39 en un ensayo de PCR cuantitativa utilizando sondas específicas para la unión de una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 reordenada humana modificada por ingeniería (Sonda de Unión Vk1-39Jk5) y el segmento génico Vk1-39 humano (sonda Vk1-39) en un ratón homocigoto para un reemplazo de los segmentos génicos Vk y Jk endógenos con segmentos génicos Vk y Jk (Hk) humanos, un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón homocigoto para una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 reordenada humana modificada por ingeniería (Vk1-39Jk5 HO). Las señales se normalizan a la expresión de Ck de ratón.

La FIG. 23A muestra la expresión relativa de ARNm (eje y) de una cadena ligera derivada de Vk3-20 en un ensayo de PCR cuantitativa utilizando sondas específicas para la unión de una región de cadena ligera Vk3-20Jk1 reordenada humana modificada por ingeniería (Sonda de Unión Vk3-20Jk1) y el segmento génico Vk3-20 humano (sonda Vk3-20) en un ratón homocigoto para un reemplazo de los segmentos génicos Vk y Jk endógenos con segmentos génicos Vk y Jk (Hk) humanos, un ratón de tipo silvestre (TS) y un ratón heterocigoto (HET) y homocigoto (HO) para una región de cadena ligera Vk3-20Jk1 humana reordenada modificada por ingeniería. Las señales se normalizan a la expresión de Ck de ratón.

La FIG. 24A muestra el título de IgM (izquierda) e IgG (derecha) en tipo silvestre (TS; N = 2) y ratones homocigotos para una región de cadena ligera Vk1-39Jk5 reordenada humana modificada por ingeniería (Vk1-39Jk5 HO; N = 2) inmunizados con β -galactosidasa.

La FIG. 24B muestra el título de inmunoglobulinas totales (IgM, IgG, IgA) en tipo silvestre (TS; N = 5) y ratones homocigotos para una región de cadena ligera Vk3-20Jk1 reordenada humana modificada por ingeniería (Vk3-20Jk1 HO; N = 5) inmunizados con β -galactosidasa.

Descripción detallada

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. La expresión "alta afinidad" se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D con respecto a su epítipo diana de aproximadamente 10⁻⁹ M o inferior (por ejemplo, aproximadamente 1 x 10⁻⁹ M, 1 x 10⁻¹⁰ M, 1 x 10⁻¹¹ M, o aproximadamente 1 x 10⁻¹² M). En una realización, K_D se mide mediante resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORE™; en otra realización, La K_D se mide mediante ELISA.

La frase "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas no idénticas, y cada cadena pesada se une específicamente a un epítipo diferente en dos moléculas diferentes (por ejemplo, diferentes epítopos en dos inmunógenos diferentes) o en la misma molécula (por ejemplo, diferentes epítopos en el mismo inmunógeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo generalmente será de al menos uno a dos o tres o cuatro o más órdenes de magnitud más baja que la afinidad de la primera cadena pesada para el segundo epítipo, y viceversa. Los epítopos específicamente unidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diana diferente (por ejemplo, en la misma proteína o en otra diferente). Se pueden preparar anticuerpos

biespecíficos, por ejemplo, mediante la combinación de cadenas pesadas que reconocen diferentes epítomos del mismo inmunógeno. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítomos del mismo inmunógeno pueden fusionarse con secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes de cadena pesada iguales o diferentes, y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de cadena pesada, seguidas de un dominio C_H1 (N-terminal a C-terminal), una bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a epítopo pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítomos unidos por las regiones de unión al epítopo de la cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas cadenas pesadas a uno o ambos epítomos.

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariotas y eucariotas (de una única célula o de múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células de animales no humanos, células humanas o fusiones de células tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona entre las siguientes células: CHO (p.ej., CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula retiniana, Vero, CV1, de riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula anteriormente mencionada. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6™).

La frase "región determinante de complementariedad", o el término "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de unos genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones marco en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T). Una CDR puede estar codificada por, por ejemplo, una secuencia de línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por un linfocito B no tratado o uno maduro o por un linfocito T. Una CDR puede estar mutada somáticamente (por ejemplo, variar de una secuencia codificada en la línea germinal de un animal), humanizada y/o modificada con sustituciones adiciones o deleciones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada) pero son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de linfocitos B, por ejemplo, como resultado de cortar y empalmar o conectar las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

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

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

- La frase "proteína de unión a epítipo" incluye una proteína que tiene al menos una CDR y que es capaz de reconocer selectivamente un epítipo, por ejemplo, es capaz de unir un epítipo con una K_D que es aproximadamente uno micromolar o inferior (por ejemplo, una K_D que es alrededor de 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, o aproximadamente 1×10^{-12} M). Las proteínas de unión a epítopos terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) con frecuencia requieren una K_D que se encuentre en el intervalo nanomolar o picomolar.
- La frase "fragmento funcional" incluye fragmentos de proteínas de unión a epítipo que pueden expresarse, secretarse y unirse específicamente a un epítipo con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar. El reconocimiento específico incluye tener una K_D que esté al menos en el intervalo micromolar, el intervalo nanomolar o el intervalo picomolar.
- La expresión "línea germinal" incluye referencia a una secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina en una célula no mutada somáticamente, por ejemplo, un linfocito B o pre-B o una célula hematopoyética no mutados somáticamente.
- La frase "cadena pesada", o "cadena pesada de inmunoglobulina" incluye una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique otra cosa. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR y combinaciones de los mismos. Una cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable (de N-terminal a C-terminal), un dominio C_H1 , una bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3 . Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un epítipo (por ejemplo, reconocer el epítipo con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de expresarse y secretarse a partir de una célula, y que comprende al menos una CDR.
- El término "identidad" cuando se usa en relación con la secuencia, incluye la identidad determinada por una serie de algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, las identidades se determinan usando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) empleando una penalización de hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1 y usando una matriz de similitud de Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de las secuencias dependerá de las secuencias concretas, pero en el caso de un dominio constante de cadena ligera, la longitud debe contener una secuencia de longitud suficiente para plegarse en un dominio constante de cadena ligera que sea capaz de asociarse consigo mismo para formar un dominio constante de cadena ligera canónico, por ejemplo, capaz de formar dos láminas beta que comprenden hebras beta y capaces de interactuar con al menos un dominio C_H1 de un ser humano o un ratón. En el caso del dominio C_H1 , la longitud de la secuencia debe contener una secuencia de longitud suficiente para plegarse en un dominio C_H1 que sea capaz de formar dos láminas beta que comprendan cadenas beta y que pueda interactuar con al menos un dominio constante de cadena ligera de un ratón o un ser humano.
- La frase "molécula de inmunoglobulina" incluye dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas pueden ser idénticas o diferentes, y las cadenas ligeras pueden ser idénticas o diferentes.
- La frase "cadena ligera" incluye una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique otra cosa, incluye cadenas ligeras κ y λ humanas y una VpreB, así como cadenas ligeras sustitutas. Los dominios variables de cadena ligera (V_L) incluyen generalmente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones marco conservadas (FR, a menos que se especifique otra cosa. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, un dominio V_L que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y un dominio de región constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras incluyen aquellas, por ejemplo, que no se unen selectivamente a un primer o segundo epítipo unido selectivamente por la proteína de unión a epítipo en la que aparecen. Las cadenas ligeras también incluyen aquellas que se unen y reconocen, o ayudan a la cadena pesada a unirse y el reconocer, uno o más epítopos unidos de forma selectiva por la proteína de unión a epítipo en la que aparecen.
- Las cadenas ligeras universales, o cadenas ligeras comunes, se refiere a cadenas ligeras producidas en ratones como se describe en el presente documento, en donde los ratones están altamente restringidos en la selección de segmentos de genes disponibles para producir un dominio variable de cadena ligera. Como resultado, tales ratones producen una cadena ligera derivada de, en una realización, no más de uno o dos segmentos V de cadena ligera no reordenados y no más de uno o dos segmentos J de cadena ligera no reordenados (por ejemplo, un V y un J, dos V y un J, un V y dos J, dos V y dos J). En una realización, no más de una o dos secuencias V/J de cadena ligera reordenadas, por ejemplo, una secuencia Vk1-39Jk5 humana reordenada o una secuencia Vk3-20Jk1 humana reordenada. En diversas realizaciones, las cadenas ligeras universales incluyen versiones mutadas somáticamente (por ejemplo, maduras por afinidad).
- La frase "mutada somáticamente" incluye una referencia a una secuencia de ácido nucleico de un linfocito B que ha sufrido un cambio de clase, en donde la secuencia de ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina (por

ejemplo, un dominio variable de cadena pesada o que incluye una secuencia de CDR o FR de cadena pesada) en el linfocito B con cambio de clase no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico en el linfocito B antes del cambio de clase, tales como, por ejemplo, una diferencia en una secuencia de ácido nucleico de CDR o marco entre un linfocito B que no haya sufrido un cambio de clase y un linfocito B que haya sufrido un cambio de clase. "Mutada somáticamente" incluye una referencia a secuencias de ácidos nucleicos de linfocitos B madurados por afinidad que no son idénticas a las correspondientes secuencias de la región variable de inmunoglobulina en linfocitos B que no están madurados por afinidad (es decir, secuencias en el genoma de células de la línea germinal). La frase "mutada somáticamente" también incluye una referencia a una secuencia de ácido nucleico de la región variable de inmunoglobulina de un linfocito B después de la exposición del linfocito B a un epítipo de interés, en donde la secuencia de ácido nucleico difiere de la secuencia de ácido nucleico correspondiente antes de la exposición del linfocito B al epítipo de interés. La frase "mutada somáticamente" se refiere a secuencias de anticuerpos que se han generado en un animal, por ejemplo, un ratón que tiene secuencias de ácidos nucleicos de región variable de inmunoglobulina humana, en respuesta a una exposición a inmunógeno, y que resultan de los procesos de selección inherentemente operativos en tal un animal.

El término "no reordenada", con respecto a secuencias de ácidos nucleicos, incluye secuencias de ácidos nucleicos que existen en la línea germinal de una célula animal.

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

Ratones con Locus de Inmunoglobulina Humanizada

El ratón como modelo genético ha sido potenciado en gran medida por las tecnologías transgénicas y de supresión génica, que han permitido el estudio de los efectos de la sobreexpresión o delección dirigida de genes específicos. A pesar de todas sus ventajas, el ratón todavía presenta obstáculos genéticos que lo convierten en un modelo imperfecto para enfermedades humanas y una plataforma imperfecta para probar agentes terapéuticos humanos o hacerlos. En primer lugar, aunque aproximadamente el 99% de los genes humanos tienen un homólogo de ratón (Waterston, R.H., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.), con frecuencia, los posibles agentes terapéuticos no logran una reacción cruzada o logran una reacción cruzada inadecuada, con los ortólogos de ratón de las dianas humanas previstas. Para evitar este problema, los genes diana seleccionados se pueden "humanizar", es decir, el gen del ratón se puede eliminar y reemplazar por la secuencia del gen ortólogo humano correspondiente (p. ej., documento US 6.586.251, documento US 6.596.541 y documento US 7.105.348). Inicialmente, los esfuerzos para humanizar genes de ratones mediante una estrategia de "humanización por supresión génica más transgénica" implicaron cruzar un ratón que porta una delección (es decir, nuligénico) del gen endógeno con un ratón que porta un transgén humano integrado al azar (véase, por ejemplo, Bril, W.S., et al. (2006). Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution. *Thromb Haemost* 95, 341-347; Homanics, G.E., et al. (2006). Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease. *BMC Med Genet* 7, 33; Jamsai, D., et al. (2006). A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/beta-thalassemia. *Genomics* 88(3):309-15; Pan, Q., et al. (2006). Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3 gamma- and CD3 gammadelta-deficient mice. *Mol Immunol* 43, 1741-1750). Pero esos esfuerzos se vieron obstaculizados por las limitaciones de tamaño; las tecnologías de supresión génica convencionales no fueron suficientes para reemplazar directamente genes de ratones grandes con sus homólogos genómicos humanos grandes. Raramente se intenta un enfoque simple de reemplazo homólogo directo, en el que un gen endógeno de ratón se reemplaza directamente por el gen homólogo humano en la misma ubicación genética precisa del gen de ratón (es decir, en el locus endógeno de ratón), debido a dificultades técnicas. Hasta ahora, los esfuerzos de reemplazo directo incluyeron procedimientos elaborados y complicados, lo que limitó la longitud del material genético que se podía manejar y la precisión con la que se podía manipular.

Los transgenes de inmunoglobulinas humanas introducidos exógenamente se reordenan en linfocitos B precursores en ratones (Alt, F.W., Blackwell, T.K., y Yancopoulos, G.D. (1985). Immunoglobulin genes in transgenic mice. *Trends Genet* 1, 231-236). Este hallazgo se explotó mediante ratones modificados por ingeniería utilizando el enfoque supresión génica más transgénica para expresar anticuerpos humanos (Green, L.L. et al. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 7, 13-21; Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23, 1117-1125; Lonberg, N., et al. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856-859; Jakobovits, A., et al. (2007). From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 25, 1134-1143). Los locus de cadena pesada y cadena ligera kappa de inmunoglobulina de ratón endógenos se inactivaron en estos ratones mediante la delección dirigida de porciones pequeñas pero críticas de cada locus endógeno, seguida de la introducción de locus de genes de inmunoglobulinas humanas como grandes transgenes aleatoriamente integrados, como se describe anteriormente o como minicromosomas (Tomizuka, K., et al. (2000). Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 722-727). Tales ratones representaron un avance importante en la ingeniería genética; los anticuerpos

monoclonales completamente humanos aislados de ellos produjeron un posible agente terapéutico prometedor para tratar una variedad de enfermedades humanas (Gibson, T.B., *et al.* (2006). Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6, 29-31; Jakobovits *et al.*, 2007; Kim, Y.H., *et al.* (2007). Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two Phase II studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 109(11):4655-62; Lonberg, 2005; Maker, A.V., *et al.* (2005). Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 12, 1005-1016; McClung, M.R., *et al.* (2006). Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354, 821-831). Pero, como se analiza anteriormente, estos ratones muestran un desarrollo comprometido de linfocitos B y deficiencias inmunitarias en comparación con los ratones de tipo silvestre. Tales problemas potencialmente limitan la capacidad de los ratones para soportar una respuesta humoral intensa y, en consecuencia, para generar anticuerpos completamente humanos contra algunos antígenos. Las deficiencias pueden deberse a: (1) funcionalidad ineficaz debido a la introducción aleatoria de los transgenes de inmunoglobulinas humanas y la expresión incorrecta resultante debido a la falta de elementos de control cadena arriba y cadena abajo (Garrett, F.E., *et al.* (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and *in vivo* occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25, 1511-1525; Manis, J.P., *et al.* (2003). Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region. *Mol Immunol* 39, 753-760; Pawlitzky, I., *et al.* (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse IgH locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J Immunol* 176, 6839-6851); 2) interacciones entre especies ineficaces entre dominios constantes humanos y componentes de ratón del complejo de señalización del receptor de linfocitos B en la superficie celular, lo que puede perjudicar los procesos de señalización necesarios para la maduración, proliferación y supervivencia normales de linfocitos B (Hombach, J., *et al.* (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343, 760-762); y (3) interacciones entre especies ineficaces entre inmunoglobulinas humanas solubles y receptores Fc de ratón que podrían reducir la selección por afinidad (Rao, S.P., *et al.* (2002). Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells. *J Immunol* 169, 1859-1868) and inmunoglobulin serum concentrations (Brambell, F.W., *et al.* (1964). A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature* 203, 1352-1354; Junghans, R.P., and Anderson, C.L. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5512-5516; Rao *et al.*, 2002; Hjelm, F., *et al.* (2006). Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand J Immunol* 64, 177-184; Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2007). Fc- receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96, 179-204). Estas deficiencias pueden corregirse mediante la humanización *in situ* de solo las regiones variables de los locus de inmunoglobulinas de ratón dentro de sus ubicaciones naturales en los locus endógenos de cadena pesada y ligera. Esto daría como resultado, de forma eficaz, ratones que producen anticuerpos quiméricos inversos (es decir, V humana: C de ratón) que serían capaces de interacciones y selección normales con el entorno de ratón basándose en la conservación de las regiones constantes de ratón. Adicionalmente, dichos anticuerpos quiméricos inversos se vuelven a elaborar fácilmente en anticuerpos completamente humanos para fines terapéuticos.

Se describe un método para un reemplazo genético *in situ* grande de los genes variables de inmunoglobulinas de línea germinal de ratón con genes variables de inmunoglobulinas de línea germinal humana mientras se mantiene la capacidad de los ratones para generar descendencia. De manera específica, se describe el reemplazo preciso de seis megabases de los locus de genes variables tanto de cadena pesada como de cadena ligera κ de inmunoglobulinas de ratón con sus homólogos humanos mientras se deja intactas las regiones constantes del ratón. Como resultado, se han creado ratones que tienen un reemplazo preciso de todo su repertorio variable de inmunoglobulinas de línea germinal con secuencias variables equivalentes de inmunoglobulinas de línea germinal humana, mientras se mantienen regiones constantes de ratón. Las regiones variables humanas están unidas a regiones constantes de ratón para formar locus de inmunoglobulinas quiméricos humano-de ratón que se reordenan y expresan a niveles fisiológicamente apropiados. Los anticuerpos expresados son "quimeras inversas", es decir, comprenden secuencias de región variable humana y secuencias de región constante de ratón. Estos ratones que tienen regiones variables de inmunoglobulinas humanizadas que expresan anticuerpos que tienen regiones variables humanas y regiones constantes de ratón se denominan ratones humanizados VELOCIMMUNE®.

Los ratones humanizados VELOCIMMUNE® muestran un sistema inmunitario humoral completamente funcional que es esencialmente indistinguible del de los ratones de tipo silvestre. Muestran poblaciones de células normales en todas las etapas del desarrollo de linfocitos B. Muestran una morfología normal de los órganos linfoides. Las secuencias de anticuerpos de ratones humanizados VELOCIMMUNE® muestran reordenamiento normal de segmentos variables e hipermutación somática normal. Las poblaciones de anticuerpos en estos ratones reflejan distribuciones de isotipos que resultan del cambio de clase normal (por ejemplo, cambio *cis* de isotipo normal). La inmunización de ratones humanizados VELOCIMMUNE® da como resultado respuestas humorales potentes que generan una gran diversidad de anticuerpos que tienen dominios variables de inmunoglobulinas humanas adecuados como candidatos terapéuticos. Esta plataforma proporciona una fuente abundante de secuencias de región variable de inmunoglobulinas humanas maduras por afinidad para producir anticuerpos y otras proteínas de unión a antígeno farmacéuticamente aceptables.

Es el reemplazo preciso de las secuencias variables de inmunoglobulinas de ratón con secuencias variables de inmunoglobulinas humanas que permite producir ratones humanizados VELOCIMMUNE®. Sin embargo, incluso un

reemplazo preciso de las secuencias de inmunoglobulinas endógenas de ratón en locus de cadena pesada y ligera con secuencias de inmunoglobulinas humanas equivalentes, por recombinación secuencial de tramos muy grandes de secuencias de inmunoglobulinas humanas, puede presentar ciertos desafíos debido a la evolución divergente de los locus de inmunoglobulinas entre ratón y hombre. Por ejemplo, las secuencias intergénicas intercaladas dentro de los locus de inmunoglobulinas no son idénticas entre ratones y seres humanos y, en algunas circunstancias, pueden no ser funcionalmente equivalentes. Las diferencias entre los ratones y los seres humanos en sus locus de inmunoglobulinas aún pueden dar como resultado anomalías en ratones humanizados, particularmente cuando se humanizan o manipulan determinadas porciones de locus de cadena pesada de inmunoglobulinas de ratón endógenos. Algunas modificaciones en los locus de cadena pesada de inmunoglobulinas de ratón son perjudiciales. Las modificaciones perjudiciales pueden incluir, por ejemplo, la pérdida de la capacidad de los ratones modificados para aparearse y producir descendencia.

Se realizó un reemplazo preciso, a gran escala, *in situ* de seis megabases de las regiones variables de los locus de cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas de ratón (V_H - D_H - J_H y V_K - J_K) con las secuencias genómicas humanas de 1,4 megabases correspondientes, mientras se dejaban las secuencias de ratón flanqueantes intactas y funcionales dentro de los locus híbridos, incluidos todos los genes de cadena constante de ratón y las regiones de control transcripcional de locus (Figura 1). De manera específica, las secuencias de genes humanos V_H , D_H , J_H , V_K y J_K se introdujeron mediante la inserción gradual de 13 vectores de direccionamiento BAC quiméricos que llevan fragmentos solapantes de los locus variables de la línea germinal humana en células ES de ratón usando tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos 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 Biotechnol* 21.652-659).

La humanización de los genes de inmunoglobulinas de ratón representa la mayor modificación genética del genoma de ratón hasta la fecha. Si bien los esfuerzos previos con transgenes de inmunoglobulinas humanas integrados aleatoriamente han tenido cierto éxito (analizado anteriormente), el reemplazo directo de los genes de inmunoglobulinas de ratón con sus homólogos humanos aumenta drásticamente la eficacia con la que se pueden generar anticuerpos completamente humanos de manera eficaz en ratones normales. Adicionalmente, tales ratones muestran una diversidad drásticamente incrementada de anticuerpos completamente humanos que se pueden obtener después de la inmunización con prácticamente cualquier antígeno, en comparación con los ratones que llevan locus endógenos discapacitados y transgenes de anticuerpos completamente humanos. Múltiples versiones de locus humanizados reemplazados muestran niveles completamente normales de linfocitos B maduros e inmaduros, en comparación con los ratones con transgenes humanos integrados aleatoriamente, que muestran poblaciones de linfocitos B significativamente reducidas en diversas etapas de diferenciación. Si bien los esfuerzos para aumentar el número de segmentos de genes humanos en ratones transgénicos humanos han reducido tales defectos, los repertorios de inmunoglobulinas expandidas no han corregido por completo las reducciones en las poblaciones de linfocitos B en comparación con los ratones de tipo silvestre.

A pesar de la función inmunitaria humoral casi de tipo silvestre observada en ratones con locus de inmunoglobulinas reemplazados, existen otros desafíos encontrados al emplear un reemplazo directo de la inmunoglobulina que no se encuentra en algunos enfoques que emplean transgenes integrados aleatoriamente. Las diferencias en la composición genética de los locus de inmunoglobulinas entre ratones y seres humanos han conducido al descubrimiento de secuencias beneficiosas para la reproducción de ratones con segmentos de genes de inmunoglobulinas reemplazados. De manera específica, los genes ADAM de ratón ubicados dentro del locus de inmunoglobulinas endógeno están presentes de manera óptima en ratones con locus de inmunoglobulinas reemplazados, debido a su papel en la fertilidad.

Ubicación Genómica y Función de ADAM6 de Ratón

Los ratones macho que carecen de la capacidad de expresar cualquier proteína ADAM6 funcional muestran un defecto grave en la capacidad de los ratones para aparearse y generar descendencia. Los ratones carecen de la capacidad de expresar una proteína ADAM6 funcional en virtud de un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos de región variable de inmunoglobulinas de ratón con segmentos génicos de región variable humana. La pérdida de la función ADAM6 se debe a que el locus ADAM6 está ubicado dentro de una región del locus génico de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón endógeno, próximo al extremo 3' del locus del segmento génico V_H que está cadena arriba de los segmentos génicos D_H . Con el fin de criar ratones que sean homocigotos para un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos de genes variables de cadena pesada de ratones endógenos con segmentos de genes variables de cadena pesada humana, generalmente es un enfoque engorroso configurar machos y hembras que sean homocigotos para el reemplazo y aguardar un apareamiento productivo. Las camadas exitosas son relativamente raras, y el tamaño promedio de la camada es muy bajo. En cambio, se han empleado machos heterocigotos para el reemplazo para aparearse con hembras homocigotas para el reemplazo para generar progenie que sea heterocigota para el reemplazo, y a continuación se cría un ratón homocigoto a partir de la misma. Los presentes inventores han determinado que la causa probable de la pérdida de fertilidad en los ratones macho es la ausencia en los ratones macho homocigotos de una proteína ADAM6 funcional.

La proteína ADAM6 es un miembro de la familia de proteínas ADAM, donde ADAM es el acrónimo de A Disintegrin

And Metaloprotease (A Desintegrina y Metaloproteasa). La familia de proteínas ADAM es grande y diversa, con diversas funciones. Algunos miembros de la familia ADAM están implicados en la espermatogénesis y la fertilización. Por ejemplo, ADAM2 codifica una subunidad de la proteína fertilina, que está implicada en las interacciones espermatozoide-óvulo. ADAM3, o cirtestina, parece necesaria para la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida. La ausencia de ADAM2 o ADAM3 da como resultado infertilidad. Se ha postulado que ADAM2, ADAM3 y ADAM6 forman un complejo sobre la superficie de los espermatozoides de ratón.

El gen ADAM6 humano, que normalmente se encuentra entre los segmentos V_{H1-2} y V_{H6-1} del gen V_H humano, parece ser un pseudogén (Figura 12). En ratones, hay dos genes ADAM6, ADAM6a y ADAM6b que se encuentran en una región intergénica entre los segmentos génicos V_H y D_H de ratón, y en el ratón, los genes a y b están orientados en una orientación transcripcional opuesta a la orientación de transcripción de los segmentos génicos de inmunoglobulinas circundantes (Figura 11). En ratones, aparentemente se necesita un locus ADAM6 funcional para la fertilización normal. Un locus o secuencia ADAM6 funcional, entonces, se refiere a un locus o secuencia ADAM6 que puede complementar, o rescatar, la fertilización reducida drásticamente mostrada en ratones macho con locus ADAM6 endógenos ausentes o dañados.

La posición de la secuencia intergénica en ratones que codifica ADAM6a y ADAM6b hace que la secuencia intergénica sea susceptible de modificación al modificar una cadena pesada de ratón endógena. Cuando los segmentos génicos V_H se suprimen o reemplazan, o cuando los segmentos génicos D_H se suprimen o reemplazan, existe una alta probabilidad de que un ratón resultante exhiba un déficit grave en la fertilidad. Para compensar el déficit, el ratón se modifica para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que complementará la pérdida en la actividad de ADAM6 debido a una modificación del locus de ADAM6 de ratón endógeno. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos complementaria es una que codifica una ADAM6a de ratón, una ADAM6b de ratón, o un homólogo o un ortólogo o un fragmento funcional de la misma que rescata el déficit de fertilidad.

La secuencia de nucleótidos que rescata la fertilidad se puede colocar en cualquier posición ectópica adecuada. Se puede colocar en cualquier posición ectópica adecuada en el genoma. En una realización, la secuencia de nucleótidos se puede introducir en un transgén que se integra aleatoriamente en el genoma de ratón. En una realización, la secuencia puede mantenerse de manera episómica, es decir, en un ácido nucleico separado en lugar de en un cromosoma de ratón. Las posiciones adecuadas incluyen posiciones que son transcripcionalmente permisivas o activas, por ejemplo, un locus ROSA26.

El término "ectópico" pretende incluir un desplazamiento, o una localización en una posición que normalmente no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, la localización de una secuencia de ácido nucleico en una posición que no es la misma posición en la que se encuentra la secuencia de ácido nucleico en un ratón de tipo silvestre). El término en diversas realizaciones se usa en el sentido de que su objetivo está fuera de su posición normal o apropiada. Por ejemplo, la frase "una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica..." se refiere a una secuencia de nucleótidos que aparece en una posición en la que normalmente no se encuentra en el ratón. Por ejemplo, en el caso de una secuencia de nucleótidos ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón (o un ortólogo o un homólogo o un fragmento de la misma que proporciona el mismo o similar beneficio de fertilidad en ratones macho), la secuencia puede colocarse en una posición diferente en el genoma del ratón de la que normalmente se encuentra en un ratón de tipo silvestre. Un homólogo o un ortólogo funcional de ADAM6 de ratón es una secuencia que confiere un rescate de la pérdida de fertilidad (por ejemplo, la pérdida de la capacidad de un ratón macho de generar descendencia por apareamiento) que se observa en un ratón ADAM6^{-/-}. Los homólogos u ortólogos funcionales incluyen proteínas que tienen al menos aproximadamente 89% de identidad o más, por ejemplo, hasta un 99% de identidad, con la secuencia de aminoácidos de ADAM6a y/o con la secuencia de aminoácidos de ADAM6b, y que pueden complementar o rescatar la capacidad de aparearse con éxito, de un ratón que tiene un genotipo que incluye una delección o supresión génica de ADAM6a y/o ADAM6b.

La posición ectópica puede estar en cualquier lugar (por ejemplo, como con la inserción aleatoria de un transgén que contiene una secuencia ADAM6 de ratón), o puede estar, por ejemplo, en una posición que se aproxima (pero no es exactamente la misma) a su ubicación en un ratón de tipo silvestre (por ejemplo, en un locus de inmunoglobulina de ratón endógeno modificado, pero cadena arriba o cadena abajo de su posición natural, por ejemplo, dentro de un locus de inmunoglobulina modificado pero entre diferentes segmentos génicos, o en una posición diferente en una secuencia intergénica V-D de ratón). Un ejemplo de una localización ectópica es la localización dentro de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada. Por ejemplo, un ratón que comprende un reemplazo de uno o más segmentos génicos V_H endógenos con segmentos génicos V_H humanos, en donde el reemplazo elimina una secuencia ADAM6 endógena, puede modificarse por ingeniería para tener una secuencia ADAM6 de ratón ubicada dentro de la secuencia que contiene los segmentos génicos V_H humanos. La modificación resultante generaría una secuencia ADAM6 de ratón (ectópica) dentro de una secuencia génica humana, y la localización (ectópica) de la secuencia ADAM6 de ratón dentro de la secuencia génica humana puede aproximarse a la posición del pseudogén ADAM6 humano (es decir, entre dos segmentos V) o puede aproximarse a la posición de la secuencia ADAM6 de ratón (es decir, dentro de la región intergénica V-D).

En diversos aspectos, se pueden producir ratones que comprenden delecciones o reemplazos del locus de la región variable de cadena pesada endógeno o porciones del mismo que contienen una secuencia de nucleótidos ectópica

que codifica una proteína que confiere beneficios de fertilidad similares a ADAM6 de ratón (por ejemplo, un ortólogo o un homólogo o un fragmento de la misma que es funcional en un ratón macho). La secuencia de nucleótidos ectópica puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que es un homólogo o un ortólogo de ADAM6 (o fragmento de la misma) de una cepa de ratón diferente o una especie diferente, por ejemplo, una especie de roedor diferente, y que confiere un beneficio en la fertilidad, por ejemplo, mayor número de camadas durante un período de tiempo específico, y/o mayor número de crías por camada, y/o la capacidad de un espermatozoide de un ratón macho para atravesar un oviducto de ratón para fertilizar un óvulo de ratón.

En una realización, la ADAM6 es un homólogo o un ortólogo que es al menos del 89% al 99% idéntico a una proteína ADAM6 de ratón (por ejemplo, al menos del 89% al 99% idéntico al ADAM6a de ratón o ADAM6b de ratón). En una realización, la secuencia de nucleótidos ectópica codifica una o más proteínas seleccionadas independientemente de una proteína al menos 89% idéntica a ADAM6a de ratón, una proteína al menos 89% idéntica a ADAM6b de ratón y una combinación de las mismas. En una realización, el homólogo u ortólogo es una proteína de rata, hámster, ratón o cerdo de guinea que es o está modificada para ser aproximadamente un 89% o más idéntica a ADAM6a de ratón y/o ADAM6b de ratón. En una realización, el homólogo u ortólogo es un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a ADAM6a de ratón y/o ADAM6b de ratón.

ADAM6 Ectópica en Ratones con Cadena Pesada Humanizada

Los ratones que producen anticuerpos humanos han estado disponibles desde hace algún tiempo. Aunque representan un avance importante en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos humanos, estos ratones muestran una serie de anomalías significativas que limitan su utilidad. Por ejemplo, muestran un desarrollo comprometido de linfocitos B. El desarrollo comprometido puede deberse a una variedad de diferencias entre los ratones transgénicos y los ratones de tipo silvestre.

Los anticuerpos humanos podrían no interactuar de manera óptima con los receptores de linfocitos pre B o linfocitos B de ratón en la superficie de las células de ratón que indican la maduración, la proliferación o la supervivencia durante la selección clonal. Los anticuerpos completamente humanos podrían no interactuar óptimamente con un sistema receptor de Fc de ratón; los ratones expresan receptores de Fc que no muestran una correspondencia uno a uno con los receptores de Fc humanos. Por último, varios ratones que producen anticuerpos completamente humanos no incluyen todas las secuencias genuinas de ratón, por ejemplo, elementos potenciadores y otros elementos de control de locus cadena abajo, que pueden ser necesarios para el desarrollo de linfocitos B de tipo silvestre.

Los ratones que producen anticuerpos completamente humanos generalmente comprenden locus de inmunoglobulinas endógenos que están desactivados de alguna manera, y los transgenes humanos que comprenden segmentos de genes de inmunoglobulinas variables y constantes se introducen en una ubicación aleatoria en el genoma de ratón. Mientras el locus endógeno esté lo suficientemente desactivado como para no reordenar los segmentos génicos para formar un gen de inmunoglobulina funcional, el objetivo de producir anticuerpos completamente humanos en dicho ratón se puede lograr, aunque con el desarrollo comprometido de linfocitos B.

Aunque esté obligado a producir anticuerpos completamente humanos a partir del locus transgénico humano, la generación de anticuerpos humanos en un ratón aparentemente es un proceso desfavorable. En algunos ratones, el proceso es tan desfavorable que da como resultado la formación de cadenas pesadas quiméricas, variables humanas/constantes de ratón (pero no cadenas ligeras) a través del mecanismo de cambio trans. Mediante este mecanismo, las transcripciones que codifican anticuerpos completamente humanos experimentan el cambio de isotipo en *trans* a partir del isotipo humano a un isotipo de ratón. El proceso es en *trans*, porque el transgén completamente humano está ubicado aparte del locus endógeno que conserva una copia no dañada de un gen de región constante de cadena pesada de ratón. Aunque en tales ratones el cambio trans es fácilmente evidente, el fenómeno aún es insuficiente para rescatar el desarrollo de linfocitos B, que sigue estando francamente afectado. En cualquier caso, los anticuerpos con cambio en trans producidos en dichos ratones conservan cadenas ligeras completamente humanas, ya que el fenómeno del cambio en trans aparentemente no se produce con respecto a las cadenas ligeras; el cambio en trans probablemente se basa en secuencias de cambio en locus endógenos utilizados (aunque de manera diferente) en el isotipo normal con cambio en *cis*. Por lo tanto, incluso cuando los ratones modificados por ingeniería para producir anticuerpos completamente humanos seleccionan un mecanismo de cambio en trans para producir anticuerpos con regiones constantes de ratón, la estrategia sigue siendo insuficiente para rescatar el desarrollo normal de los linfocitos B.

Una preocupación principal en la producción de agentes terapéuticos humanos basados en anticuerpos es hacer una diversidad suficientemente grande de secuencias de región variable de inmunoglobulinas humanas para identificar dominios variables útiles que reconozcan específicamente epítopos concretos y se unan a ellos con una afinidad deseable, generalmente, pero no siempre, con alta afinidad. Antes del desarrollo de los ratones humanizados VELOCIMMUNE®, no había indicios de que los ratones que expresaban regiones variables humanas con regiones constantes de ratón presentaran diferencias significativas con respecto a los ratones que producían anticuerpos humanos a partir de un transgén. Esa suposición, sin embargo, era incorrecta.

Los ratones humanizados VELOCIMMUNE®, que contienen un reemplazo preciso de regiones variables de

inmunoglobulinas de ratón con regiones variables de inmunoglobulinas humanas en los locus de ratón endógenos, presentan una similitud extraordinaria con los ratones de tipo silvestre respecto al desarrollo de linfocitos B. En un desarrollo sorprendente y asombroso, los ratones humanizados VELOCIMMUNE® mostraron una respuesta de tipo silvestre esencialmente normal a la inmunización que difería solo en un aspecto significativo respecto a los ratones de tipo silvestre, las regiones variables generadas en respuesta a la inmunización son completamente humanas.

Los ratones humanizados VELOCIMMUNE® contienen un reemplazo preciso a gran escala de las regiones variables de la línea germinal de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) y cadena ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, cadena ligera κ , Igk) de ratón con las regiones variables de inmunoglobulina humana correspondientes, en los locus endógenos. En total, se reemplazan aproximadamente seis megabases de locus de ratón con aproximadamente 1,4 megabases de secuencia genómica humana. Este reemplazo preciso da como resultado un ratón con locus de inmunoglobulina híbridos que producen cadenas pesadas y ligeras que tienen regiones variables humanas y una región constante de ratón. El reemplazo preciso de los segmentos V_H - D_H - J_H y V_k - J_k de ratón dejan secuencias de ratón flanqueantes intactas y funcionales en los locus de inmunoglobulina híbridos. El sistema inmunitario humoral del ratón funciona como el de un ratón de tipo silvestre. El desarrollo de linfocitos B no está impedido en cualquier respecto significativo y se genera una rica diversidad de regiones variables humanas en el ratón tras la exposición al antígeno.

Los ratones humanizados VELOCIMMUNE® son posibles debido a que los segmentos génicos de inmunoglobulina para las cadenas pesadas y ligeras κ se reordenan de manera similar en seres humanos y ratones, lo que no equivale a decir que sus locus sean iguales o incluso que claramente no lo son. Sin embargo, los locus son lo suficientemente similares como para que la humanización del locus del gen variable de cadena pesada se pueda lograr reemplazando aproximadamente 3 millones de pares de bases de secuencia contigua de ratón que contiene todos los segmentos génicos V_H , D_H , y J_H con aproximadamente 1 millón de bases de secuencia genómica humana contigua cubriendo básicamente la secuencia equivalente de un locus de inmunoglobulina humana.

En algunas realizaciones, el reemplazo adicional de determinadas secuencias de genes de la región constante de ratón con secuencias de genes humanos (por ejemplo, el reemplazo de la secuencia C_H1 de ratón con la secuencia C_H1 humana y el reemplazo de la secuencia C_L de ratón con la secuencia C_L humana) da como resultado ratones con locus de inmunoglobulinas híbridos que producen anticuerpos que tienen regiones variables humanas y regiones constantes parcialmente humanas, adecuadas para, por ejemplo, producir fragmentos de anticuerpos completamente humanos, por ejemplo, Fab completamente humanos. Los ratones con locus de inmunoglobulina híbridos muestran una reordenación de segmentos génicos variables normal, hipermutación somática normal y cambio de clase normal. Estos ratones muestran un sistema inmunitario humoral que es indistinguible del de ratones de tipo silvestre y presentan poblaciones de células normales en todas las etapas de desarrollo de linfocitos B y estructuras de órganos linfoides normales, incluso en los casos donde los ratones carecen de un repertorio completo de segmentos génicos de región variable humana. La inmunización de estos ratones da como resultado respuestas humorales fuertes que presentan una gran diversidad de uso de segmentos génicos variables.

El reemplazo preciso de los segmentos génicos de la región variable de línea germinal de ratón permite producir ratones que tienen locus de inmunoglobulina parcialmente humanos. Debido a que los locus de inmunoglobulina parcialmente humanos se reordenan, hipermutan y cambian de clase de manera normal, los locus de inmunoglobulina parcialmente humanos generan anticuerpos en un ratón que comprende regiones variables humanas. Pueden identificarse y clonarse secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables, después se fusionan (por ejemplo, en un sistema *in vitro*) con cualquier secuencia de elección, por ejemplo, cualquier isotipo de inmunoglobulina adecuado para un uso particular, dando como resultado un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno procedente completamente de secuencias humanas.

Se utilizó humanización a gran escala mediante métodos de ingeniería por recombinación para modificar las células madre embrionarias de ratón (ES) para reemplazar con precisión hasta 3 megabases del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que incluía esencialmente todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H de ratón con segmentos génicos humanos equivalentes con una secuencia genómica humana de hasta 1 megabase que contiene algunos o esencialmente todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H humanos. Se usó hasta un segmento de 0,5 megabases del genoma humano que comprende una de las dos repeticiones que codifica esencialmente todos los segmentos génicos V_k y J_k humanos para reemplazar un segmento de 3 megabase del locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que contiene esencialmente todos los segmentos génicos V_k y J_k de ratón.

Los ratones con tales locus de inmunoglobulinas reemplazados pueden comprender una interrupción o delección del locus de ADAM6 de ratón endógeno, que normalmente se encuentra entre el segmento génico V_H más 3' y el segmento génico D_H más 5' en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón. La interrupción en esta región puede conducir a la reducción o eliminación de la funcionalidad del locus de ADAM6 de ratón endógeno. Si los segmentos génicos V_H más 3' del repertorio de cadenas pesadas humanas se usan en un reemplazo, una región intergénica que contiene un pseudogén que parece ser un pseudogén ADAM6 humano está presente entre estos segmentos génicos V_H , es decir, entre V_H1 -2 y V_H1 -6 humanos. Sin embargo, los ratones macho que comprenden esta secuencia intergénica humana muestran poca o ninguna fertilidad.

Se describen ratones que comprenden los locus reemplazados como se describe anteriormente, y que también

comprenden una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una ADAM6 de ratón, donde los ratones muestran fertilidad esencialmente normal. En una realización, la secuencia de ácido nucleico ectópico es la SEQ ID NO: 3, localizada entre V_H1-2 y V_H1-6 humanos en el locus de cadena pesada de ratón endógeno modificado. La dirección de transcripción de los genes ADAM6 de la SEQ ID NO: 3 es opuesta con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos V_H humanos circundantes. Aunque los ejemplos en el presente documento muestran el rescate de la fertilidad colocando la secuencia ectópica entre los segmentos génicos V_H humanos indicados, los expertos reconocerán que se espera que la ubicación de la secuencia ectópica en cualquier locus transcripcionalmente permisivo adecuado en el genoma del ratón (o incluso extracromosómicamente) rescate de manera similar la fertilidad en un ratón macho.

El fenómeno de complementar un ratón que carece de un locus ADAM6 funcional con una secuencia ectópica que comprende un gen ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional del mismo es un método general que es aplicable al rescate de cualquier ratón con locus ADAM6 endógenos no funcionales o mínimamente funcionales. Por lo tanto, un gran número de ratones que comprenden una modificación disruptiva de ADAM6 del locus de cadena pesada de inmunoglobulina puede rescatarse con las composiciones y métodos de la invención. En consecuencia, la invención comprende ratones con una amplia variedad de modificaciones de locus de cadenas pesadas de inmunoglobulinas que comprometen la función endógena de ADAM6 presente ectópicamente. Algunos ejemplos (no limitantes) se proporcionan en la presente descripción. Además de los ratones humanizados VELOCIMMUNE® descritos, se pueden usar las composiciones y métodos relacionados con ADAM6 en muchas aplicaciones, por ejemplo, cuando se modifica un locus de cadena pesada de una gran variedad de formas.

En un aspecto, se proporciona un ratón que comprende una secuencia ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional (o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma), un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_H humanos, un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y segmentos génicos J_H de ratón con segmentos génicos D_H humanos y J_H humanos; en donde el ratón carece de un C_H1 y/o región bisagra. En una realización, el ratón produce una proteína de unión a un dominio variable único que es un dímero de cadenas de inmunoglobulinas seleccionadas entre: (a) V_H humana- C_H1 de ratón - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón; (b) V_H humana - bisagra de ratón - C_H2 de ratón- C_H3 de ratón; y, (c) V_H humana- C_H2 de ratón- C_H3 de ratón.

En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que rescata la fertilidad se coloca dentro de una secuencia de región variable de cadena pesada de inmunoglobulinas humanas (por ejemplo, entre segmentos génicos V_H1-2 y V_H1-6 humanos) en un ratón que tiene un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (mV_H, mD_H y mJ_H) con uno o más segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulinas humanas (hV_H, hD_H, y hJ_H) y el ratón comprende además un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón (mV_K, mJ_K) con uno o más segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulinas humanas (hV_K y hJ_K). En una realización, la secuencia de nucleótidos se coloca entre un segmento génico V_H1-2 humano y un segmento génico V_H1-6 humano en un ratón humanizado VELOCIMMUNE® (documento US 6.596.541 y documento US 7.105.348). En una realización, el ratón humanizado VELOCIMMUNE® modificado de este modo comprende un reemplazo con la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena pesada de inmunoglobulinas humanas (todos los hV_H, hD_H y hJ_H) y la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos variables de cadena ligera κ de inmunoglobulinas humanas (hV_K y hJ_K).

En un aspecto, se puede colocar un locus ADAM6 de ratón funcional (o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional del mismo) en medio de segmentos génicos V_H humanos que reemplazan segmentos génicos V_H de ratones endógenos. En una realización, se eliminan la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón y se reemplazan con uno o más segmentos génicos V_H humanos, y el locus ADAM6 de ratón se coloca inmediatamente adyacente al extremo 3' de los segmentos génicos V_H humanos, o entre dos segmentos génicos V_H humanos. En una realización específica, el locus ADAM6 de ratón se coloca entre dos segmentos génicos V_H cerca del término 3' de los segmentos génicos V_H humanos insertados. En una realización específica, el reemplazo incluye segmentos génicos V_H1-2 y V_H6-1 de V_H humano, y el locus ADAM6 de ratón se coloca cadena abajo del segmento génico V_H1-2 y cadena arriba del segmento génico V_H6-1. En una realización específica, La disposición de los segmentos génicos V_H humanos es entonces la siguiente (de cadena arriba a cadena abajo con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos V_H humanos): V_H1-2 humano - locus ADAM6 de ratón - V_H6-1 humano. En una realización específica, el pseudogén ADAM6 entre V_H1-2 humano y V_H6-1 humano se reemplaza con el locus ADAM6 de ratón. En una realización, la orientación de uno o más de ADAM6a de ratón y ADAM6b de ratón del locus ADAM6 de ratón es opuesta con respecto a la dirección de transcripción en comparación con la orientación de los segmentos génicos V_H humanos. Alternativamente, el locus ADAM6 de ratón se puede colocar en la región intergénica entre el segmento génico V_H humano más 3' y el segmento génico D_H más 5'. Este puede ser el caso, si el segmento D_H más 5' es de ratón o humano.

De forma similar, un ratón modificado con uno o más segmentos génicos V_L humanos (p. ej., segmentos V_K o V_λ) que reemplaza la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón endógenos se puede modificar para mantener el locus ADAM6 de ratón endógeno, como se describe anteriormente, por ejemplo, empleando un vector de direccionamiento que tiene un brazo de homología cadena abajo que incluye un locus ADAM6 de ratón o un

fragmento funcional del mismo, o para reemplazar un locus ADAM6 de ratón dañado con una secuencia ectópica posicionada entre dos segmentos génicos V_L humanos o entre los segmentos génicos V_L humanos y un segmento génico D_H (ya sea humano o de ratón, por ejemplo, $V\lambda + m/hD_H$), o un segmento génico J (ya sea humano o de ratón, por ejemplo, $V\kappa + J_H$). En una realización, el reemplazo incluye dos o más segmentos génicos V_L humanos, y el locus ADAM6 de ratón o un fragmento funcional del mismo se coloca entre los dos segmentos génicos V_L más 3'. En una realización específica, la disposición de los segmentos génicos V_L humanos es entonces la siguiente (de cadena arriba a cadena abajo con respecto a la dirección de transcripción de los segmentos génicos humanos): $V_L3'-1$ humano - locus ADAM6 de ratón- V_L3' humano. En una realización, la orientación de uno o más de ADAM6a de ratón y ADAM6b de ratón del locus ADAM6 de ratón es opuesta con respecto a la dirección de transcripción en comparación con la orientación de los segmentos génicos V_L humanos. Alternativamente, el locus ADAM6 de ratón se puede colocar en la región intergénica entre el segmento génico V_L humano más 3' y el segmento génico D_H más 5'. Este puede ser el caso, si el segmento D_H más 5' es de ratón o humano.

En un aspecto, se describe un ratón con un reemplazo de uno o más segmentos génicos V_H de ratón endógenos, y que comprende al menos un segmento génico D_H de ratón endógeno. En dicho un ratón, la modificación de los segmentos génicos V_H de ratón endógenos puede comprender una modificación de uno o más de los segmentos génicos V_H más 3', pero no del segmento génico D_H más 5', donde se tiene cuidado para que la modificación del uno o más segmentos génicos V_H más 3' no interrumpa o haga que el locus ADAM6 de ratón endógeno no sea funcional. Por ejemplo, en un caso, el ratón comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón endógenos con uno o más segmentos génicos V_H humanos, y el ratón comprende uno o más segmentos génicos D_H endógenos y un locus ADAM6 de ratón endógeno funcional.

[Eliminado]

El empleo de ratones que contienen una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un homólogo funcional de la misma es útil cuando las modificaciones interrumpen la función de ADAM6 de ratón endógeno. La probabilidad de interrumpir la función de ADAM6 endógena de ratón es alta cuando se realizan modificaciones en los locus de inmunoglobulinas de ratón, en particular cuando se modifican las regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulinas de ratón y las secuencias circundantes. Por lo tanto, tales ratones proporcionan un beneficio particular cuando se producen ratones con locus de cadenas pesadas de inmunoglobulinas que se suprimen en su totalidad o en parte, se humanizan en su totalidad o en parte, o se reemplazan (por ejemplo, con secuencias $V\kappa$ o $V\lambda$) en su totalidad o en parte. Los expertos en la técnica conocen los métodos para producir las modificaciones genéticas descritas para los ratones descritos a continuación.

Los ratones que contienen una secuencia ectópica que codifica una proteína ADAM6 de ratón, o una proteína sustancialmente idéntica o similar que confiere los beneficios de fertilidad de una proteína ADAM6 de ratón, son particularmente útiles junto con modificaciones de un locus del gen de región variable de cadena pesada de inmunoglobulinas de ratón que interrumpe o suprime la secuencia ADAM6 de ratón endógena. Aunque se describe principalmente en relación con ratones que expresan anticuerpos con regiones variables humanas y regiones constantes de ratón, tales ratones son útiles en conexión con cualquier modificación genética que interrumpa el gen ADAM6 de ratón endógeno. Los expertos reconocerán que esto abarca una amplia variedad de ratones genéticamente modificados que contienen modificaciones del locus del gen de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulinas de ratón. Estos incluyen, por ejemplo, ratones con una delección o un reemplazo de la totalidad o una parte de los segmentos del gen de cadena pesada de inmunoglobulinas de ratón, independientemente de otras modificaciones.

Se describen ratones modificados genéticamente que comprenden un gen ADAM6 de ratón, de roedor u otro ectópico (o un ortólogo o un homólogo o un fragmento) funcional en un ratón, y uno o más segmentos de genes de región variable y/o constante de inmunoglobulinas humanas.

Se describe un ratón que comprende una secuencia ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional, un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_H humanos; un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H de ratón con uno o más segmentos génicos D_H humanos; y un reemplazo de todos o sustancialmente todos los segmentos génicos J_H de ratón con uno o más segmentos génicos J_H humanos.

En un caso, el ratón comprende además un reemplazo de una secuencia de nucleótidos de C_H1 de ratón con una secuencia de nucleótidos de C_H1 humano. En una realización, el ratón comprende además un reemplazo de una secuencia de nucleótidos de bisagra de ratón con una secuencia de nucleótidos de bisagra humana. En un caso, el ratón comprende además un reemplazo de un locus variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L y J_L) con un locus variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana. En un caso, el ratón comprende además un reemplazo de una secuencia de nucleótidos de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón con una secuencia de nucleótidos de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana. En un caso específico, la V_L , J_L y C_L son secuencias de cadena ligera κ de inmunoglobulina. En un caso específico, el ratón comprende una secuencia de región constante de inmunoglobulina C_H2 de ratón y C_H3 de ratón fusionadas con una bisagra humana y una secuencia C_H1 humana, de modo que los locus de inmunoglobulinas de ratón se reordenan para formar un gen que

codifica una proteína de unión que comprende (a) una cadena pesada que tiene una región variable humana, una región C_H1 humana, una región bisagra humana y una región C_H2 de ratón y una región C_H3 de ratón; y (b) un gen que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende un dominio variable humano y una región constante humana.

5 Se describe un ratón que comprende una secuencia ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional, un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_L humanos, y opcionalmente un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y/o segmentos génicos J_H con uno o más segmentos génicos D_H humanos y/o segmentos génicos J_H humanos, u
10 opcionalmente un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y segmentos génicos J_H con uno o más segmentos génicos J_L humanos.

Se describe un ratón que comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H, D_H y J_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_L, uno o más D_H y uno o más J (por ejemplo, J_K o J_λ), en
15 donde los segmentos génicos están operativamente unidos a una región bisagra de ratón endógena, en donde el ratón forma un gen de cadena de inmunoglobulina reordenado que contiene, de 5' a 3' en la dirección de la transcripción, V_L humanos- D_H humano o de ratón -J humano o de ratón - bisagra de ratón -C_H2 de ratón - C_H3 de ratón. En un caso, la región J es una región J_K humana. En un caso, la región J es una región J_H humana. En un caso, la región J es una
20 región J_λ humana. En un caso, la región V_L humana se selecciona de una región V_λ humana y una región V_K humana.

En casos específicos, el ratón expresa un anticuerpo de dominio variable único que tiene una región constante de ratón o humana y una región variable derivada de una V_K humana, una D_H humana y una J_K humana; una V_K humana, una D_H humana y una J_H humana; una V_λ humana, una D_H humana y una J_λ humana; una V_λ humana, una D_H humana y una J_H humana; una V_K humana, una D_H humana y una J_λ humana; una V_λ humana, una D_H humana y una J_K
25 humana. En un caso específico, las secuencias de reconocimiento de recombinación se modifican para permitir que se produzcan reordenamientos productivos entre segmentos génicos V, D y J enumerados o entre segmentos génicos V y J enumerados.

En un aspecto, el ratón proporcionado comprende una secuencia ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional (o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma), un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_L humanos, un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y segmentos génicos J_H de ratón con segmentos génicos J_L humanos; en donde el ratón carece de un C_H1 y/o región bisagra.

35 En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifique un dominio C_H1. En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifique una región bisagra. En una realización, el ratón carece de una secuencia que codifique un dominio C_H1 y una región bisagra.

En una realización específica, el ratón expresa una proteína de unión que comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana (λ o κ) fusionado a un dominio C_H2 de ratón que está unido a un dominio C_H3 de ratón.
40

En un aspecto, el ratón proporcionado comprende una secuencia ADAM6 ectópica que codifica una proteína ADAM6 funcional (o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma), un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V_H de ratón con uno o más segmentos génicos V_L humanos, un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos D_H y J_H de ratón con segmentos génicos J_L humanos.
45

En una realización, el ratón comprende una delección de una secuencia génica de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que codifica una región C_H1, una región bisagra, una región C_H1 y una bisagra, o una región C_H1 y una región bisagra y una región C_H2.
50

En una realización, el ratón produce una proteína de unión a un dominio variable único que comprende un homodímero seleccionado entre los siguientes: (a) V_L humana- C_H1 de ratón - C_H2 de ratón - C_H3 de ratón; (b) V_L humana -bisagra de ratón - C_H2 de ratón- C_H3 de ratón; (c) V_L humana- C_H2 de ratón- C_H3 de ratón.
55

En un aspecto, se proporciona un ratón con un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno desactivado, que comprende un locus ADAM6 de ratón endógeno desactivado o suprimido, en donde el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que expresa un anticuerpo humano o de ratón o humano/de ratón u otro anticuerpo quimérico. En una realización, la secuencia de ácido nucleico está presente en un transgén integrado que se integra aleatoriamente en el genoma del ratón. En una realización, la secuencia de ácido nucleico está en un episoma (por ejemplo, un cromosoma) que no se encuentra en un ratón de tipo silvestre.
60

Cadena Ligera Común o Universal

65 Los esfuerzos previos para producir proteínas de unión a epítopos multiespecíficas útiles, por ejemplo, anticuerpos

biespecíficos, se han visto obstaculizados por una variedad de problemas que frecuentemente comparten un paradigma común: la selección o manipulación *in vitro* de secuencias para modificar por ingeniería racionalmente, o para modificar por ingeniería mediante ensayo y error, un formato adecuado para emparejar una inmunoglobulina humana biespecífica heterodimérica. Desafortunadamente, la mayoría, si no todos, los enfoques de ingeniería *in vitro* proporcionan soluciones en gran medida *ad hoc* que son adecuadas, si es que lo son, para moléculas individuales. Por otro lado, no se han realizado métodos *in vivo* para emplear organismos complejos para seleccionar emparejamientos apropiados que sean capaces de conducir a agentes terapéuticos humanos.

Generalmente, las secuencias de ratón naturales con frecuencia no son una buena fuente de secuencias de agentes terapéuticos humanos. Al menos por esa razón, la generación de regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulinas de ratón que se emparejan con una cadena ligera humana común es de utilidad práctica limitada. Se realizarían más esfuerzos de ingeniería *in vitro* en un proceso de prueba y error para tratar de humanizar las secuencias variables de cadena pesada de ratón mientras se espera conservar la especificidad y afinidad del epítipo, manteniendo la capacidad de acoplarse con la cadena ligera humana común, con resultados inciertos. Al final de dicho proceso, el producto final puede mantener algo de la especificidad y afinidad, y asociarse con la cadena ligera común, pero en última instancia, la inmunogenicidad en un ser humano probablemente seguiría siendo un riesgo profundo.

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

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

Los presentes inventores han modificado por ingeniería un ratón para generar cadenas ligeras de inmunoglobulina que se emparejarán adecuadamente con una familia bastante diversa de cadenas pesadas, incluidas las cadenas pesadas cuyas regiones variables se separan de las secuencias de la línea germinal, por ejemplo, las regiones variables maduras por afinidad o mutadas somáticamente. En diversas realizaciones, el ratón está ideado para emparejar dominios variables de cadena ligera humana con dominios variables de cadena pesada humana que comprenden mutaciones somáticas, permitiendo así una ruta a proteínas de unión de alta afinidad adecuadas para su uso como agentes terapéuticos humanos.

El ratón modificado por ingeniería genética, a través del largo y complejo proceso de selección de anticuerpos dentro de un organismo, toma decisiones biológicamente apropiadas al emparejar una colección diversa de dominios variables de cadena pesada humana con un número limitado de opciones de cadena ligera humana. Con el fin de lograr esto, el ratón se modifica por ingeniería para presentar un número limitado de opciones de dominio variable de cadena ligera humana junto con una amplia variedad de opciones de dominio variable de cadena pesada humana. Ante la exposición con un antígeno, el ratón maximiza el número de soluciones en su repertorio para desarrollar un anticuerpo para el antígeno, limitado en gran parte o únicamente por el número o las opciones de cadena ligera en su repertorio. En diversas realizaciones, esto incluye permitir que el ratón logre mutaciones somáticas adecuadas y compatibles del dominio variable de cadena ligera que, sin embargo, serán compatibles con una variedad relativamente grande de dominios variables de cadena pesada humana, incluidos en particular dominios variables de cadena pesada humana mutados somáticamente.

Para lograr un repertorio limitado de opciones de cadenas ligeras, se modifica por ingeniería el ratón para hacer no funcional o sustancialmente no funcional su capacidad de producir o reordenar, un dominio variable de cadena ligera de ratón natural. Esto puede lograrse, por ejemplo, suprimiendo los segmentos génicos de la región variable de cadena ligera del ratón. El locus del ratón endógeno puede modificarse después mediante segmentos génicos de la región variable de cadena ligera humana exógenos adecuados, operativamente unidos al dominio constante de cadena ligera de ratón endógeno, de manera tal que los segmentos génicos de la región variable humana exógenos se puedan combinar con el gen de la región constante de la cadena ligera de ratón exógeno y formar un gen de cadena ligera

quimérico inverso reordenado (variable humana, constante de ratón). En diversas realizaciones, la región variable de la cadena ligera es capaz de ser mutada somáticamente. En diversas realizaciones, para maximizar la capacidad de la región variable de la cadena ligera para adquirir mutaciones somáticas, se conservan en el ratón los potenciadores apropiados. Por ejemplo, al modificar un locus de cadena ligera κ de ratón para reemplazar segmentos génicos de cadena ligera κ de ratón endógenos con segmentos génicos de cadena ligera κ humana, el potenciador intrínico κ de ratón y el potenciador 3' κ de ratón se mantienen, o no se interrumpen funcionalmente.

El ratón modificado por ingeniería genética puede expresar un repertorio limitado de cadenas ligeras quiméricas inversas (variable humana, constante de ratón) asociadas con una diversidad de cadenas pesadas quiméricas inversas (variable humana, constante de ratón). En diversas realizaciones, los segmentos génicos de cadena ligera κ de ratón endógenos se suprimen y se reemplazan con una sola (o dos) región o regiones de cadena ligera humana reordenada, unida operativamente al gen C_κ de ratón endógeno. En realizaciones para maximizar la hipermutación somática de la región de la cadena ligera humana reordenada, se mantienen el potenciador intrínico κ de ratón y el potenciador 3' κ de ratón. En diversas realizaciones, el ratón también comprende un locus de cadena ligera λ no funcional, o una delección del mismo o una delección que hace que el locus sea incapaz de producir una cadena ligera λ .

El ratón modificado por ingeniería genética proporcionado puede comprender, en diversas realizaciones, un locus de región variable de cadena ligera que carece de segmentos génicos V_L y J_L de cadena ligera de ratón endógenos y que comprende una región variable de cadena ligera humana reordenada, en una realización, una secuencia V_L/J_L humana reordenada, unida operativamente a una región constante de ratón, en donde el locus es capaz de experimentar hipermutación somática, y en donde el locus expresa una cadena ligera que comprende la secuencia V_L/J_L humana unida a una región constante de ratón. Por lo tanto, en diversas realizaciones, el locus comprende un potenciador 3' κ de ratón, que se correlaciona con un nivel normal o de tipo silvestre de hipermutación somática.

El ratón modificado por ingeniería genética en diversas realizaciones cuando se inmuniza con un antígeno de interés genera linfocitos B que muestran una diversidad de reordenamientos de regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se expresan y funcionan con una o dos cadenas ligeras reordenadas, incluidas las realizaciones donde la una o las dos cadenas ligeras comprenden regiones variables de cadena ligera humana que comprenden, por ejemplo, 1 a 5 mutaciones somáticas. En diversas realizaciones, las cadenas ligeras humanas así expresadas son capaces de asociarse y expresarse con cualquier región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana expresada en el ratón.

Proteínas de Unión a Epítopos que se Unen a Más de Un Epítopo

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

La síntesis y expresión de proteínas de unión biespecíficas ha sido problemática, en parte debido a problemas asociados con la identificación de una cadena ligera adecuada que puede asociarse y expresarse con dos cadenas pesadas diferentes, y en parte debido a problemas de aislamiento. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento permiten que un ratón genéticamente modificado seleccione, mediante procesos naturales, una cadena ligera adecuada que pueda asociarse y expresarse con más de una cadena pesada, incluyendo cadenas pesadas que están mutadas somáticamente (por ejemplo, maduras por afinidad). Las secuencias de V_L y V_H humanas de linfocitos B adecuados de ratones inmunizados como se describe en el presente documento que expresan anticuerpos madurados por afinidad que tienen cadenas pesadas quiméricas inversas (es decir, variable humana y constante de ratón) se pueden identificar y clonar en marco en un vector de expresión con una secuencia génica de la región constante humana adecuada (por ejemplo, una IgG1 humana). Se pueden preparar dos construcciones de este tipo, en donde cada construcción codifica un dominio variable de cadena pesada humana que se une a un epítopo diferente. Una de las V_L humanas (por ejemplo, $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ humana o $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ humana), en secuencia de línea germinal o de un linfocito B en donde la secuencia ha mutado somáticamente, puede fusionarse en marco a un gen de región constante humano adecuado (por ejemplo, un gen constante κ humano). Estas tres construcciones pesadas y ligeras completamente humanas pueden colocarse en una célula adecuada para la expresión. La célula expresará dos especies principales: una cadena pesada homodimérica con la cadena ligera idéntica, y una cadena pesada heterodimérica con la cadena ligera idéntica. Para permitir una separación fácil de estas especies principales, una de las cadenas pesadas se modifica para omitir un determinante de unión a la proteína A, lo que da como resultado una afinidad diferencial de una proteína de unión homodimérica a partir de una proteína de unión heterodimérica. Las composiciones y los métodos que abordan este problema se describen en el documento USSN 12/832.838, presentado el 25 de junio de 2010, titulado "Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format," publicado como US 2010/0331527A1.

Se describe una proteína de unión a epítopo, en donde las secuencias de V_L y V_H humanas derivan de ratones descritos en el presente documento que se han inmunizado con un antígeno que comprende un epítopo de interés.

- Se describe una proteína de unión a epítipo que comprende un primer y un segundo polipéptido, comprendiendo el primer polipéptido, desde el extremo N al extremo C, una primera región de unión a epítipo que se une selectivamente a un primer epítipo, seguida de una región constante que comprende una primera región C_H3 de una IgG humana seleccionada entre IgG1, IgG2, IgG4 y una combinación de las mismas; y, un segundo polipéptido que comprende, desde el extremo N al extremo C, una segunda región de unión a epítipo que se une selectivamente a un segundo epítipo, seguida de una región constante que comprende una segunda región C_H3 de una IgG humana seleccionada entre IgG1, IgG2, IgG4 y una combinación de las mismas, en donde la segunda región C_H3 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio C_H3 a la proteína A.
- 10 En un caso, la segunda región C_H3 comprende una modificación H95R (por numeración de exón IMGT; H435R por numeración EU). En otra realización, la segunda región C_H3 comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU).
- 15 En un caso, la segunda región C_H3 procede de una IgG1 humana modificada y comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I según EU).
- 20 En un caso, la segunda región C_H3 procede de una IgG2 humana modificada y comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I según EU).
- 25 En un caso, la segunda región C_H3 procede de una IgG4 humana modificada y comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I según EU).
- 30 Un método para producir una proteína de unión a epítipo que se une a más de un epítipo es inmunizar a un primer ratón de acuerdo con la invención con un antígeno que comprende un primer epítipo de interés, en donde el ratón comprende un locus de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógeno que no contiene una V_k de ratón endógena que es capaz de reordenar y formar una cadena ligera, en donde el locus de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón endógeno es una única región V_L humana reordenada operativamente unida al gen de la región constante de cadena ligera de ratón endógeno, y la región V_L humana reordenada se selecciona de una V_k1-39Jk5 humana y una V_k3-20Jk1 humana, y los segmentos génicos V_H de ratón endógenos se han reemplazado total o parcialmente con segmentos génicos V_H humanos, de modo que las cadenas pesadas de inmunoglobulina producidas por el ratón son única o sustancialmente cadenas pesadas que comprenden dominios variables humanos y dominios constantes de ratón. Cuando se inmuniza, dicho ratón producirá un anticuerpo quimérico inverso, que comprenderá solo uno de los dos dominios variables de cadena ligera humana (por ejemplo, uno de V_k1-39Jk5 humana o V_k3-20Jk1 humana). Una vez que se identifica un linfocito B que codifica una V_H que se une al epítipo de interés, la secuencia de nucleótidos de la V_H (y, opcionalmente, la V_L) puede recuperarse (por ejemplo, por PCR) y clonarse en una construcción de expresión en marco con un dominio constante de inmunoglobulina humana adecuado. Este proceso puede repetirse para identificar un segundo dominio V_H que se une a un segundo epítipo, y puede recuperarse y clonarse una segunda secuencia génica V_H en un vector de expresión en marco con un segundo dominio constante de inmunoglobulina adecuado. El primer y el segundo dominio constante de inmunoglobulina pueden ser el mismo isotipo o uno diferente, y uno de los dominios constantes de inmunoglobulina (pero no el otro) puede modificarse como se describe en el presente documento o en el documento US 2010/0331527A1, y la proteína de unión a epítipo puede expresarse en una célula adecuada y aislarse en función de su afinidad diferencial por la proteína A en comparación con una proteína de unión a epítipo homodimérica, por ejemplo, como se describe en el documento US 2010/0331527A1.
- 45 Se describe un método para producir una proteína de unión a antígeno biespecífica, que comprende identificar una primera secuencia de nucleótidos de V_H humana (V_H1) madurada por afinidad (por ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) de un ratón como se describe en el presente documento, identificar una segunda secuencia de nucleótidos de V_H humana (V_H2) madurada por afinidad (por ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) de un ratón como se describe en el presente documento, clonar V_H1 en el marco con una cadena pesada humana que carece de una modificación determinante de la proteína A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar la cadena pesada 1 (HC1), clonar V_H2 en el marco con una cadena pesada humana que comprende un determinante de la proteína A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar la cadena pesada 2 (HC2), introducir un vector de expresión que comprende HC1 y el mismo o diferente vector de expresión que comprende HC2 en una célula, en donde la célula también expresa una cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende una V_k1-39 humana/Jk5 humana o una V_k3-20 humana/Jk1 humana fusionada a un dominio constante de la cadena ligera humana, permitir que la célula exprese una proteína de unión a epítipo biespecífica que comprende un dominio V_H codificado por V_H1 y un dominio de V_H codificado por V_H2, y aislar la proteína de unión a epítipo biespecífica en función de su capacidad diferencial para unirse a la proteína A en comparación con una proteína de unión a epítipo homodimérica monoespecífica. En una realización específica, HC1 es una IgG1, y HC2 es una IgG1 que comprende la modificación H95R (IMGT; H435R por EU) y comprende además la modificación Y96F (IMGT; Y436F por EU). En una realización, el dominio V_H codificado por V_H1, el dominio V_H codificado por V_H2, o ambos, están mutados somáticamente.

Genes de V_H Humana que se Expresan con una V_L Humana Común

Una variedad de regiones variables humanas de anticuerpos maduros por afinidad generados contra cuatro antígenos diferentes se expresó con su cadena ligera afin, o al menos una de una cadena ligera humana seleccionada de Vk1-39Jk5 humana, Vk3-20Jk1 humana, o VpreBJ λ ,5 humana (véase el Ejemplo 10). Para los anticuerpos contra cada uno de los antígenos, las cadenas pesadas de alta afinidad mutadas somáticamente de diferentes familias génicas se emparejaron con éxito con regiones Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenadas y se secretaron de las células que expresan las cadenas pesadas y ligeras. Para Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1, los dominios V_H derivados de las siguientes familias génicas V_H humanas se expresaron favorablemente: 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, y 6-1. Por lo tanto, un ratón modificado por ingeniería para expresar un repertorio limitado de dominios V_L humanos de uno o ambos de Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 generará una población diversa de dominios V_H humanos mutados somáticamente a partir de un locus V_H modificado para reemplazar segmentos génicos V_H de ratón con segmentos génicos V_H humanos.

Los ratones modificados por ingeniería genética para expresar cadenas pesadas de inmunoglobulina quimérica inversa (variable humana, constante de ratón) asociadas con una sola cadena ligera reordenada (por ejemplo, una Vk1-39/J o una Vk3-20/J), cuando se inmunizaron con un antígeno de interés, generaron linfocitos B que comprendían una diversidad de reordenamientos de V_H humanas y expresaron una diversidad de anticuerpos específicos de antígeno de alta afinidad con diversas propiedades con respecto a su capacidad para bloquear la unión del antígeno a su ligando, y con respecto a su capacidad para unirse a variantes del antígeno (véanse los Ejemplos 14 a 15).

Por lo tanto, los ratones y los métodos descritos en el presente documento son útiles para producir y seleccionar dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana, incluidos dominios variables de cadena pesada humana mutados somáticamente, que son el resultado de una diversidad de reordenamientos, que muestran una amplia variedad de afinidades (que incluyen una K_D de aproximadamente uno nanomolar o menos), una amplia variedad de especificidades (que incluyen la unión a diferentes epitopos del mismo antígeno), y que se asocian y expresan con la misma o sustancialmente la misma región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana.

Un primer ratón que comprende un locus de región variable de cadena pesada humanizada puede aparearse con un segundo ratón que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un locus de cadena ligera común o universal como se describe en el presente documento. El primer o el segundo ratón puede comprender una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma. La progenie se cría para obtener ratones homocigotos para un locus de cadena pesada humanizada, y homocigotos para el locus de cadena ligera universal. El primer ratón o el segundo ratón pueden comprender una modificación de un locus de cadena ligera de ratón endógeno para hacer que el locus de cadena ligera de ratón endógeno no sea funcional (por ejemplo, una deleición o una supresión génica de, por ejemplo, un locus endógeno λ y/o κ). El primer ratón puede comprender un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J de ratón endógenos funcionales con uno o más segmentos de génicos V, D y J humanos no reordenados (por ejemplo, la totalidad o sustancialmente todos los segmentos génicos V, D y J humanos funcionales); y el ratón comprende un reemplazo de la totalidad o sustancialmente todos los segmentos de génicos V y J de cadena ligera funcionales con no más de una o no más de dos secuencias V/J de cadena ligera reordenadas. El primer ratón comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una ADAM6 de ratón o un ortólogo o un homólogo o un fragmento funcional de la misma. En un caso, la secuencia de ácido nucleico ectópico está en un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada.

En un caso, los ratones que comprenden la secuencia ectópica y que son homocigotos para el locus de cadena ligera universal y para el locus de cadena pesada humanizado se inmunizan con un antígeno de interés para generar anticuerpos que comprenden una pluralidad de dominios variables humanos mutados somáticamente que se asocian y expresan con una cadena ligera universal. En un caso, las secuencias de ácido nucleico de dominio variable de la cadena pesada humana identificadas en el ratón se emplean en un sistema de expresión para producir un anticuerpo completamente humano que comprende el dominio variable de cadena pesada humana y una cadena ligera que comprende una secuencia de cadena ligera universal de ratón.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la materia cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención. Se ha intentado garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplos

Ejemplo I

Humanización de Genes de Inmunoglobulina de Ratón

Se usaron cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés) humanos y de ratón para modificar por

ingeniería 13 vectores de direccionamiento BAC diferentes (BACvec) para la humanización de los locus de cadena pesada y de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón. Las tablas 1 y 2 exponen descripciones detalladas de las etapas realizadas para la construcción de todos los BACvec empleados para la humanización los locus de cadena pesada y de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón, respectivamente.

Identificación de BAC humanos y de ratón.

Los BAC de ratón que abarcan los extremos 5' y 3' de los locus de cadena pesada y de cadena ligera κ de inmunoglobulina, se identificaron mediante hibridación de filtros manchados con biblioteca de BAC o mediante PCR que explora los grupos de ADN de la biblioteca de BAC de ratón. Los filtros se hibridaron en condiciones convencionales usando sondas que correspondían a las regiones de interés. Los grupos de la biblioteca se exploraron por PCR usando pares de cebadores únicos que flanquean la región diana de interés. Se realizó una PCR adicional usando los mismos cebadores para desconvolucionar un pocillo dado y aislar el BAC de interés correspondiente. Tanto los filtros BAC como los grupos de la biblioteca se generaron a partir de células ES de ratón 129 SvJ (Incyte Genomics/Invitrogen). Los BAC humanos que cubren todos los locus de cadena pesada y de cadena ligera κ de inmunoglobulina se identificaron por hibridación de filtros manchados con la biblioteca de BAC (bibliotecas Caltech B, C o D y biblioteca RPCI-11, Research Genetics/Invitrogen) a través de la exploración de los grupos de la biblioteca de BAC humana (biblioteca Caltech, Invitrogen) mediante un método basado en PCR o utilizando una base de datos de secuencia final BAC (biblioteca Caltech D, TIGR).

Construcción de BACvec (Tablas 1 y 2).

La recombinación homóloga bacteriana (BHR, por sus siglas en inglés) se realizó como se describe (Valenzuela *et al.*, 2003; Zhang, Y., *et al.* (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. Nat Genet 20, 123-128). En la mayoría de los casos, se generaron fragmentos lineales uniendo cajas de homología derivadas de PCR a casetes clonados, seguido de aislamiento en gel de productos de unión y electroporación en bacterias competentes para BHR que albergan el BAC diana. Después de la selección sobre las placas de Petri antibióticas apropiadas, se identificaron los BAC correctamente recombinados por PCR a través de ambas nuevas uniones, seguido de un análisis de restricción sobre geles de campo pulsado (Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75) y verificación de manchas por PCR usando cebadores distribuidos a través de las secuencias humanas.

Se construyó un 3hV_H BACvec usando tres etapas de BHR secuenciales para la etapa inicial de humanización del locus de cadena pesada de inmunoglobulina (FIG. 4A y Tabla 1). En la primera etapa (Etapa 1), se introdujo un casete en un BAC precursor humano cadena arriba del segmento génico V_H1-3 humano que contiene una región de homología con el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (HB1), un gen que confiere resistencia a la kanamicina en bacterias y resistencia a G418 en células animales (kanR) y un sitio de recombinación específico del sitio (p. ej., loxP). En la segunda etapa (Etapa 2), se introdujo un segundo casete justo cadena abajo del último segmento J_H que contiene una segunda región de homología con el locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (HB2) y un gen que confiere resistencia a espectomicina en bacterias (specR). Esta segunda etapa incluyó la delección de secuencias de locus de cadena pesada de inmunoglobulina humana cadena abajo de J_H6 y el gen de resistencia a cloranfenicol del vector BAC (cmR). En la tercera etapa (Etapa 3), el BAC humano doblemente modificado (B1) se linealizó usando sitios I-CeuI que se habían agregado durante las dos primeras etapas y e integrado en un BAC (B2) de ratón mediante BHR a través de las dos regiones de homología (HB1 y HB2). Las selecciones de fármacos para la primera (cm/kan), segunda (spec/kan) y tercera (cm/kan) etapa se diseñaron para ser específicos para los productos deseados. Los clones BAC modificados se analizaron mediante electroforesis en gel pulsado (PFGE) después de la digestión con enzimas de restricción para determinar la construcción apropiada (FIG. 4B).

De forma similar, se modificaron por ingeniería 12 BACvec adicionales para la humanización de los locus de cadena pesada y de cadena ligera κ . En algunos casos, se realizó unión de BAC en lugar de BHR para unir conjuntamente dos BAC grandes mediante la introducción de sitios de restricción raros en ambos BACvec precursores por BHR junto con la colocación cuidadosa de marcadores seleccionables. Esto permitió la supervivencia del producto de unión deseado tras la selección con combinaciones específicas de marcadores de fármacos. Los BAC recombinantes obtenidos por unión después de la digestión con enzimas de restricción raras se identificaron y exploraron de manera similar a los obtenidos por BHR (como se describe anteriormente).

Tabla 1

BACvec	Etapas	Descripción	Procedimiento
3hV _H	1	Insertar la caja de homología de ratón cadena arriba en BAC CTD-2572o2 proximal humano	BHR
	2	Insertar la caja de homología del ratón cadena abajo en BAC CTD-2572o2 proximal humano	BHR
	3	Insertar 3hV _H /27hD _H /9hJ _H en BAC CT7-302a07 proximal de ratón para crear 3hV _H BACvec	BHR
DC	1	Insertar el casete en el extremo distal del locus de IgH de ratón usando BAC CT7-253i20 de ratón	BHR
18hV _H	1	Insertar un marcador specR en el extremo cadena abajo de la inserción de 3hV _H usando BAC CTD-2572o2 humano	BHR
	2	Insertar los sitios I-Ceul y Not que flanquean puroR en el extremo cadena arriba de la inserción de 3hV _H	BHR
	3	Insertar el sitio Not en el extremo cadena abajo de Rel2-408p02 BAC (≈10 kb cadena abajo de V _H 2-5)	BHR
	4	Insertar el sitio I-Ceu1 en el extremo cadena arriba de Rel2-408p02 BAC (≈23 kb cadena arriba de V _H 1-18)	BHR
	5	Unir el fragmento de 184 kb de la etapa 4 al vector de 153 kb de la etapa 2	Unión
	6	Recortar la homología humana de CTD-2572o2 BAC suprimiendo ≈85 kb y dejando la homología de 65 kb a 3hV _H	BHR
	7	Insertar el casete y el sitio Not en el extremo distal del locus de IgH de ratón en CT7-253i20 BAC	BHR
	8	Subclonar el brazo de homología distal de ratón para inserción cadena arriba de BAC humanos	Unión
	9	Insertar el brazo de ratón de 20 kb cadena arriba de Rel2-408p02	BHR
	10	Cambiar el casete de selección de hygR a neoR para crear 18hV _H BACvec	BHR
39hV _H	1	Insertar los sitios I-Ceul y PI-SceI que flanquean hygR en el extremo distal del BAC CTD-2534n10 humano	BHR
	2	Insertar CmR en el extremo proximal de CTD-2534n10 BAC para permitir la selección para la unión a RP11-72n10 BAC	BHR
	3	Insertar el sitio PI-SceI en RP11-72n10 BAC para unir a CTD-2534n10 BAC	BHR
	4	Insertar los sitios I-Ceul y Ascl que flanquean puroR en el extremo distal de RP11-72n10 BAC	BHR
	5	Unir el fragmento de 161 kb de la construcción de la etapa 4 a la construcción de la etapa 2 reemplazando hygR	Unión
	6	Insertar el sitio neoR y Ascl en el extremo proximal del brazo de homología de ratón distal usando CT7-253i20 BAC	BHR
	7	Insertar el sitio specR y I-Ceul en el extremo distal del brazo de homología de ratón distal	BHR
	8	Unir el brazo de homología de ratón distal sobre el inserto humano de la etapa 5	Unión
	9	Cambiar el casete de selección de neo a hyg usando UbCp y pA como cajas de homología para crear 39hV _H BACvec	BHR
53hV _H	1	Insertar specR en el extremo proximal de CTD-3074b5 BAC humano	BHR
	2	Inserte Ascl en el extremo proximal de CTD-3074b5 BAC humano	BHR
	3	Insertar el sitio hygR y Ascl en el extremo proximal del brazo de homología de ratón distal usando CT7-253i20 BAC	BHR
	4	Unir el brazo de homología de ratón distal en la construcción de la etapa 2	Unión
	5	Cambiar el casete de selección de hyg a neo usando UbCp y pA como cajas de homología para crear 53hV _H BACvec	BHR

(continuación)

BACvec	Etap	Descripción	Procedimiento
70hV _H	1	Insertar los sitios PI-SceI e I-CeuI que flanquean spec en el extremo distal del CTD-2195p5 BAC humano	BHR
	2	Insertar el sitio I-CeuI en el extremo proximal de RP11-926p12 BAC para la unión a CTD-2195p5 BAC	BHR
	3	Insertar los sitios PI-SceI y AscI en el extremo distal de RP11-926p12 BAC para la unión del brazo de ratón	BHR
	4	Unir el brazo de homología de ratón distal en la construcción de la etapa 3	Unión
	5	Unir el brazo de homología de ratón distal y el fragmento de hlgH de RP11-926p12 BAC en CTD-2195p5 BAC para crear 70 hV _H BACvec	Unión
80hV _H	1	Insertar los sitios I-CeuI y AscI que flanquean hygR en el extremo distal de CTD-2313e3 BAC	BHR
	2	Unir el brazo de homología de ratón distal en CTD-2313e3 BAC humano a partir de la etapa 1 para crear 80hV _H BACvec	Unión

Tabla 2

BACvec	Etap	Descripción	Procedimiento
Igk-PC	1	Insertar el sitio loxP dentro del intrón J-C de ratón utilizando CT7-254m04 BAC	BHR
Igk-DC	1	Insertar el sitio loxP en el extremo distal del locus de IgK de ratón usando CT7-302 g12 BAC	BHR
6hVk	1	Insertar el sitio PI-SceI ≈400 pb cadena abajo de hJk5 en CTD-2366j12 BAC	BHR
	2	Insertar los sitios I-CeuI y AscI que flanquean hygR en el extremo distal de CTD-2366j12 BAC	BHR
	3	Insertar los sitios I-CeuI y PI-SceI que flanquean puroR ≈xx pb cadena abajo de mJkx usando CT7-254m04 BAC	BHR
	4	Insertar hlgVk/Jk cadena arriba Enhk/Ck de ratón utilizando la construcción de la etapa 3	Unión
	5	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 4 con spectR	BHR
	6	Insertar el casete de selección Neo en el extremo distal del locus de Igk de ratón usando CT7-302 g12 BAC	BHR
	7	Unir el brazo de homología de ratón distal cadena arriba del inserto humano en la construcción de la etapa 6 para crear 6hVk BACvec	Unión
16hVk	1	Insertar NeoR en el extremo distal de RP11-1061b13 BAC	BHR
	2	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 1 con spectR	BHR
	3	Insertar el casete de selección Hyg en el extremo distal del locus de Igk de ratón usando CT7-302 g12 BAC	BHR
	4	Unir el brazo de homología de ratón distal cadena arriba del inserto humano en la construcción de la etapa 2 para crear 16hVk BACvec	Unión
30hVk	1	Insertar HygR en el extremo distal de RP11-99 g6 BAC	BHR
	2	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 1 con spectR	BHR
	3	Insertar el casete de selección Neo en el extremo distal del locus de Igk de ratón usando CT7-302 g12 BAC	BHR
	4	Unir el brazo de homología de ratón distal cadena arriba del inserto humano en la construcción de la etapa 2 para crear 30hVk BACvec	Unión
40hVk	1	Insertar NeoR en el extremo distal del locus de hlgH en CTD-2559d6 BAC	BHR
	2	Reemplazar cmR en la construcción de la etapa 1 con spectR	BHR
	3	Unir el brazo de homología de ratón distal cadena arriba del locus de hlgH en la construcción de la etapa 2 para crear 40hVk BACvec	Unión

5 Modificación de células madre embrionarias (ES por sus siglas en inglés) y generación de ratones.

El direccionamiento de células ES (F1H4) se realizó utilizando el método de ingeniería genética VELOCIGENE® como se describe (Valenzuela *et al.*, 2003). La obtención de ratones a partir de células ES modificadas por blastocisto (Valenzuela *et al.*, 2003) o por inyección de 8cell (Poueymirou *et al.*, 2007) fue como se describe. Las células ES y los ratones dirigidos se confirmaron mediante la exploración de ADN de células ES o ratones con conjuntos únicos de

10

sondas y cebadores en un ensayo basado en PCR (por ejemplo, FIG. 3A, 3B y 3C). Todos los estudios en ratones se supervisaron y aprobaron por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Regeneron (IACUC por sus siglas en inglés).

5 **Análisis de Cariotipo e Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).**

El análisis de cariotipo se realizó mediante Repositorios de Células de Coriell (Instituto Coriell de Investigación Médica, Camden, NJ). La FISH se realizó en células ES dirigidas como se describe (Valenzuela *et al.*, 2003). Las sondas correspondientes al ADN de BAC de ratón o al ADN de BAC humano se marcaron mediante traslación de muesca (Invitrogen) con el espectro naranja o el espectro verde de nucleótidos dUTP marcados con fluorescencia (Vysis).

Locus de Genes Variables de Cadena Pesada de Inmunoglobulina.

La humanización de la región variable del locus de cadena pesada se logró en nueve etapas secuenciales mediante el reemplazo directo de aproximadamente tres millones de pares de bases (Mb) de secuencia genómica de ratón contigua que contiene todos los segmentos génicos V_H , D_H y J_H con aproximadamente una Mb de secuencia genómica humana contigua que contiene los segmentos génicos equivalentes humanos (FIG. 1A y Tabla 1) usando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.586.251 y Valenzuela *et al.*, 2003).

El intrón entre segmentos génicos J_H y genes de región constante (el intrón J-C) contiene un potenciador transcripcional (Neuberger, M.S. (1983) Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. EMBO J 2, 1373-1378) seguido de una región de repeticiones simples necesarias para la recombinación durante el cambio de isotipo (Kataoka, T. *et al.* (1980) Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. Proc Natl Acad Sci U S A 77, 919-923). La unión entre la región humana V_H - D_H - J_H y la región C_H de ratón (la unión proximal) se eligió para mantener el potenciador intrónico de cadena pesada de ratón y cambiar el dominio para preservar tanto la expresión eficaz como el cambio de clase del locus de la cadena pesada humanizada dentro del ratón. La posición exacta de nucleótidos de esta y las uniones posteriores en todos los reemplazos fue posible mediante el uso del método de ingeniería genética VELOCIGENE® (*supra*), que empleó recombinación homóloga bacteriana activada por oligonucleótidos sintetizados. Por lo tanto, la unión proximal se colocó a unos 200 pb cadena abajo del último segmento génico J_H y la unión distal se colocó a varios cientos cadena arriba del segmento génico V_H más 5' del locus humano y aproximadamente 9 kb cadena abajo del segmento génico V_H -1-86 de ratón, también conocido como J558.55. El segmento génico V_H -1-86 (J558.55) de ratón es el segmento de gen variable de cadena pesada más distal, se informa que es un pseudogén en ratones C57BL/6, pero potencialmente activo, aunque con una secuencia RSS deficiente, en el alelo 129 dirigido. Según se informa, el extremo distal del locus de cadena pesada de ratón puede contener elementos de control que regulan la expresión y/o el reordenamiento del locus (Pawlitzy *et al.*, 2006).

Se logró una primera inserción de la secuencia de ADN de inmunoglobulina humana en el ratón usando 144 kb del extremo proximal del locus de cadena pesada humana que contiene 3 segmentos génicos V_H , los 27 D_H y 9 J_H humanos insertados en el extremo proximal del locus de IgH de ratón, con una delección concomitante de 16,6 kb de secuencia genómica de ratón, usando aproximadamente 75 kb de brazos de homología de ratón (Etapa A, FIG. 2A; Tablas 1 y 3, 3h V_H). Esta inserción grande de 144 kb y la delección de 16,6 kb que se acompaña se realizó en una única etapa (Etapa A) que se produjo con una frecuencia de un 0,2 % (Tabla 3). Las células ES dirigidas correctamente se puntuaron mediante un ensayo de pérdida de alelo natural (LONA) (Valenzuela *et al.*, 2003) utilizando sondas dentro y flanqueando la secuencia de ratón suprimida y dentro de la secuencia humana insertada, y se verificó la integridad del inserto grande humano utilizando múltiples sondas que abarcan toda la inserción (FIG. 3A, 3B y 3C). Debido a que se anticiparon muchas rondas de direccionamiento secuencial de células ES, los clones de células ES dirigidos a esto, y todas las etapas posteriores, se sometieron a análisis de cariotipo (*supra*) y solo se utilizaron para etapas posteriores aquellos clones que mostraban cariotipos normales en al menos 17 de 20 extensiones.

Las células ES dirigidas de la Etapa A se volvieron a dirigir con un BACvec que produjo una delección de 19 kb en el extremo distal del locus de cadena pesada (Etapa B, FIG. 2A). El BACvec de la Etapa B contenía un gen de resistencia a higromicina (hig) a diferencia del gen de resistencia a neomicina (neo) contenido en el BACvec de la etapa A. Los genes de resistencia de los dos BACvec se diseñaron de tal manera que, después de un redireccionamiento exitoso al mismo cromosoma, aproximadamente tres Mb del locus del gen variable de cadena pesada de ratón que contiene todos los segmentos génicos V_H de ratón diferentes a V_H -1-86 y todos los segmentos génicos D_H diferentes a DQ52, así como los dos genes de resistencia, estaban flanqueados por sitios loxP; DQ52 y todos los segmentos del gen de la cadena J_H de ratón se suprimieron en la Etapa A. Los clones de células ES doblemente dirigidos sobre el mismo cromosoma se identificaron conduciendo el casete proximal 3h V_H a la homocigosidad en G418 alta (Mortensen, R.M. *et al.* (1992) Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. Mol Cell Biol 12:2391-2395) y siguiendo el destino del casete hyg distal. Los segmentos de ratón de hasta cuatro Mb de tamaño, que se han modificado de manera que estén flanqueados por sitios loxP, se han suprimido con éxito en las células ES mediante la expresión transitoria de recombinasa CRE con altas eficacias (hasta ≈11 %) incluso en ausencia de selección de fármacos (Zheng, B., *et al.* (2000). Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. Mol Cell Biol 20:648-655). De una manera similar, los presentes inventores lograron una delección de tres

Mb en el 8% de los clones de células ES después de la expresión transitoria de Cre (Etapa C, FIG. 2A; Tabla 3). La delección se puntuó mediante el ensayo LONA utilizando sondas en cada extremo de la secuencia de ratón suprimida, así como la pérdida de neo e hyg y la aparición de un producto de PCR a través del punto de delección que contiene el único sitio loxP restante. Adicionalmente, la delección se confirmó por hibridación *in situ* fluorescente (datos no mostrados).

El resto de la región variable de cadena pesada humana se añadió al alelo 3hV_H en una serie de 5 etapas utilizando el método de ingeniería genética VELOCIGENE® (Etapas EH, FIG. 2B), y cada paso implica la inserción precisa de hasta 210 kb de secuencias de genes humanos. Para cada etapa, el extremo proximal de cada nuevo BACvec se diseñó para solapar las secuencias humanas más distales de la etapa anterior y el extremo distal de cada nuevo BACvec contenía la misma región de homología de ratón distal que se usó en la Etapa A. Los BACvec de las etapas D, F y H contenían casetes de selección neo, mientras que los de las etapas E y G contenían casetes de selección hyg, por lo que las selecciones se alternaron entre G418 e higromicina. El direccionamiento en la etapa D se ensayó mediante la pérdida del producto de PCR único a través del sitio loxP distal del Alelo Híbrido 3hV_H. El direccionamiento de las etapas E a I se analizó por pérdida del casete de selección previo. En la etapa final (Etapa I, FIG. 2B), el casete de selección neo, flanqueado por sitios Frt (McLeod, M. *et al.* (1986) Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle. *Mol Cell Biol* 6, 3357-3367), se eliminó mediante la expresión transitoria de FLPe (Buchholz, F. *et al.* (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 16, 657-662). Las secuencias humanas de los BACvec para las etapas D, E y G derivaron de dos BAC precursores humanos cada una, mientras que aquellas de las etapas F y H derivaron de BAC únicos. La retención de secuencias humanas se confirmó en cada etapa utilizando múltiples sondas que abarcan las secuencias humanas insertadas (como se describe anteriormente, por ejemplo, la FIG. 3A, 3B y 3C). Solo se llevaron a cabo en cada etapa aquellos clones con cariotipo normal y potencial de línea germinal. Las células ES de la etapa final todavía pudieron contribuir a la línea germinal después de nueve manipulaciones secuenciales (Tabla 3). Los ratones homocigotos para cada uno de los alelos de cadena pesada fueron viables, parecían sanos y demostraron un sistema inmunitario humoral esencialmente de tipo silvestre (véase el Ejemplo 3).

Tabla 3

Alelo Híbrido	Secuencia humana	Construcción de direccionamiento	Eficacia de direccionamiento	% de uso	V _H Total	V _H Funcional
3hV _H	144 kb	240 kb	0,2 %	5	3	3
3hV _H /DC	144 kb	110 kb	0,1 %	5	3	3
3hV _H -CRE	144 kb	-	8 %	5	3	3
18hV _H	340 kb	272 kb	0,1 %	25	18	12
39hV _H	550 kb	282 kb	0,2 %	60	39	25
53hV _H	655 kb	186 kb	0,4 %	65	53	29
70hV _H	850 kb	238 kb	0,5 %	90	70	39
80hV _H	940 kb	124 kb	0,2 %	100	80	43
80hV _H dNeo	940 kb	-	2,6 %	100	80	43

Locus de Genes Variables de Cadena Ligera K de Inmunoglobulina.

La región variable de la cadena ligera κ se humanizó en ocho etapas secuenciales mediante el reemplazo directo de aproximadamente tres Mb de secuencia de ratón que contenía todos los segmentos génicos V κ y J κ con aproximadamente 0,5 Mb de secuencia humana que contenía los segmentos génicos V κ y J κ proximales humanos de manera similar a la de la cadena pesada (FIG. 1B; Tablas 2 y 4).

La región variable del locus de la cadena ligera κ humana contiene dos repeticiones casi idénticas de 400 kb separadas por un espaciador de 800 kb (Weichhold, G.M. *et al.* (1993) e human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity, *Genomics* 16:503-511). Debido a que las repeticiones son muy similares, casi toda la diversidad de locus puede reproducirse en ratones usando la repetición proximal. Adicionalmente, se ha informado de un alelo humano natural del locus de la cadena ligera κ que le falta la repetición distal (Schaible, G. *et al.* (1993) The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals, *Hum Genet* 91:261-267). Aproximadamente tres Mb de secuencia de gen variable de cadena ligera κ de ratón se reemplazaron con aproximadamente 0,5 Mb de secuencia de gen variable de cadena ligera κ humana para reemplazar eficazmente todos los segmentos génicos V κ y J κ de ratón con la V κ humana proximal y todos los segmentos génicos J κ humanos (FIG. 2C y 2D; Tablas 2 y 4). A diferencia del método descrito en el Ejemplo 1 para el locus de la cadena pesada, la región del gen V κ de ratón completa, que contiene todos los segmentos génicos V κ y J κ , se suprimió en un proceso de tres etapas antes de que se agregara cualquier secuencia humana. En primer lugar, se introdujo un casete neo en el extremo proximal de la región variable (Etapa A, FIG. 2C). A continuación, se

insertó un casete hyg en el extremo distal del locus κ (Etapa B, FIG. 2C). Los sitios LoxP se ubicaron nuevamente dentro de cada casete de selección de modo que el tratamiento con Cre indujo la delección de las 3 Mb restantes de la región V κ de ratón junto con ambos genes de resistencia (Etapa C, FIG. 2C).

- 5 Se insertó un fragmento genómico humano de aproximadamente 480 kb de tamaño que contenía la región variable de la cadena ligera κ de inmunoglobulina completa en cuatro etapas secuenciales (FIG. 2D; Tablas 2 y 4), con hasta 150 kb de secuencia de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana insertada en una única etapa, utilizando métodos similares a los empleados para la cadena pesada (véase el Ejemplo 1). El gen de resistencia a higromicina final se eliminó mediante expresión transitoria de FLPe. Al igual que con la cadena pesada, los clones de células ES dirigidos se evaluaron para determinar la integridad de todo el inserto humano, el cariotipo normal y el potencial de la línea germinal después de cada etapa. Se generaron ratones homocigotos para cada uno de los alelos de la cadena ligera κ y se encontró que eran sanos y de apariencia normal.

Tabla 4

Alelo Híbrido	Secuencia humana	Construcción de direccionamiento	Eficacia de direccionamiento	% de uso	V κ Total	V κ Funcional
Ig κ -PC	0	132 kb	1,1 %	-	-	-
Ig κ -PC/DC	0	90 kb	0,4 %	-	-	-
Ig κ -CRE	0	-	1 %	-	-	-
6hV κ	110 kb	122 kb	0,3 %	14	6	4
16hV κ	240 kb	203 kb	0,4 %	47	16	11
30hV κ	390 kb	193 kb	0,1 %	70	30	18
40hV κ	480 kb	185 kb	0,2 %	100	40	25
40hV κ dHyg	480 kb	-	0,7 %	100	40	25

Ejemplo II

Generación de Ratones Completamente Humanizados mediante la Combinación de Múltiples Alelos de Inmunoglobulina Humanizada

En varios puntos, las células ES que llevan una porción de los repertorios variables de cadena pesada o de cadena ligera κ de inmunoglobulina humana como se describe en el Ejemplo 1 se microinyectaron y los ratones resultantes se aparearon para crear múltiples versiones de ratones humanizados VELOCIMMUNE® con fracciones progresivamente más grandes de los repertorios de inmunoglobulinas de línea germinal humana (Tabla 5; FIG. 5A y 5B). Los ratones humanizados VELOCIMMUNE® 1 (V1) poseen 18 segmentos génicos V H humanos y todos los segmentos génicos D H y J H humanos combinados con 16 segmentos génicos V κ humanos y todos los segmentos génicos J κ humanos. Los ratones humanizados VELOCIMMUNE® 2 (V2) y los ratones humanizados VELOCIMMUNE® (V3) han aumentado los repertorios variables que llevan un total de 39 V H y 30 V κ , y 80 V H y 40 V κ , respectivamente. Debido a que las regiones genómicas que codifican los segmentos génicos V H , D H y J H de ratón, y los segmentos génicos V κ y J κ , se han reemplazado completamente, los anticuerpos producidos por cualquier versión de ratones humanizados VELOCIMMUNE® contienen regiones variables humanas unidas a regiones constantes de ratón. Los locus de cadena ligera λ de ratón permanecen intactos en todas las versiones de ratones humanizados VELOCIMMUNE® y sirven como un comparador para la eficacia de la expresión de los diversos locus de cadena ligera κ VELOCIMMUNE® humanizados.

Se generaron ratones doblemente homocigotos tanto para la humanización de la cadena pesada como de la cadena ligera κ de inmunoglobulina a partir de un subconjunto de los alelos descritos en el Ejemplo 1. Todos los genotipos observados durante el curso de la reproducción para generar los ratones doblemente homocigotos se produjeron en aproximadamente proporciones Mendelianas. La progenie masculina homocigota para cada uno de los alelos de cadena pesada humana mostró una fertilidad reducida. La fertilidad reducida fue el resultado de la pérdida de la actividad ADAM6 de ratón. El locus del gen variable de cadena pesada del ratón contiene dos genes ADAM6 funcionales embebidos (ADAM6a y ADAM6b). Durante la humanización del locus de gen variable de cadena pesada de ratón, la secuencia genómica humana insertada contenía un pseudogén ADAM6. La ADAM6 de ratón puede ser necesaria para la fertilidad y, por lo tanto, la falta de genes de ADAM6 de ratón en locus de genes variables de cadena pesada humanizados podría conducir a una fertilidad reducida en estos ratones a pesar de la presencia del pseudogén humano. Los Ejemplos 7-9 describen el reemplazo preciso de los genes ADAM6 de ratón suprimidos en un locus de genes variables de cadena pesada humanizado, y la restauración de un nivel de fertilidad de tipo silvestre en ratones con un locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada.

Tabla 5

Versión de Ratón VELOCIMMUNE®	Cadena pesada			Cadena Ligera κ		
	V _H Humana	Alelo	gen 5' V _H	V _κ Humana	Alelo	gen 5' V _κ
V1	18	18hV _H	V _H 1-18	16	16hV _κ	V _κ 1-16
V2	39	39hV _H	V _H 4-39	30	30hV _κ	V _κ 2-29
V3	80	80hV _H	V _H 3-74	40	40hV _κ	V _κ 2-40

Ejemplo III

5 Poblaciones de Linfocitos en Ratones con Genes de Inmunoglobulinas Humanizadas

Las poblaciones de linfocitos B maduros en las tres versiones diferentes de ratones VELOCIMMUNE® se evaluaron por citometría de flujo.

- 10 En resumen, se realizaron suspensiones celulares de médula ósea, bazo y timo utilizando métodos convencionales. Las células se resuspendieron a 5×10^5 células/ml en tampón de tinción BD Pharmingen FACS, se bloquearon con anti-CD16/32 de ratón (BD Pharmingen), se tiñeron con el cóctel apropiado de anticuerpos y se fijaron con BD CYTOFIX™, todo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sedimentos celulares finales se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de tinción y se analizaron usando el software BD FACSCALIBUR™ y BD CELLQUEST PRO™. Todos los anticuerpos (BD Pharmingen) se prepararon en una dilución en masa/cóctel y se añadieron a una concentración final de 0,5 mg/ 10^5 células. Los cócteles de anticuerpos para la tinción de médula ósea (A-D) fueron los siguientes: A: anti-IgM^b de ratón-FITC, anti-IgM^a de ratón-PE, anti-CD45R(B220) de ratón-APC; B: anti-CD43(S7) de ratón-PE, anti-CD45R(B220) de ratón-APC; C: anti-CD24(HSA) de ratón-PE; anti-CD45R(B220) de ratón-APC; D: anti-BP-1 de ratón-PE, anti-CD45R(B220) de ratón-APC. Los cócteles de anticuerpos para la tinción del bazo y los ganglios linfáticos inguinales (E-H) fueron los siguientes: E: anti-IgM^b de ratón-FITC, anti-IgM^a de ratón-PE, anti-CD45R(B220) de ratón-APC; F: anti-Ig de ratón, cadena ligera λ1, λ2, λ3- FITC, anti cadena ligera Igκ de ratón-PE, anti-CD45R(B220) de ratón-APC; G: anti-Ly6G/C de ratón-FITC, anti-CD49b(DX5) de ratón-PE, anti-CD11b de ratón-APC; H: anti-CD4(L3T4) de ratón-FITC, anti-CD45R(B220) de ratón-PE, anti-CD8a de ratón-APC. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

- 25 Los linfocitos aislados del bazo o ganglio linfático de ratones humanizados VELOCIMMUNE® homocigotos se tiñeron para la expresión en la superficie de los marcadores B220 e IgM y se analizaron usando citometría de flujo (FIG. 6). Los tamaños de las poblaciones de linfocitos B maduros B220⁺ IgM⁺ en todas las versiones de ratones humanizados VELOCIMMUNE® probados fueron prácticamente idénticos a los de los ratones de tipo silvestre, independientemente del número de segmentos génicos V_H que contenían. Además, los ratones que contenían locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada híbrido homocigoto, incluso aquellos con solo 3 segmentos génicos V_H, pero locus de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón normal o los ratones que contenían locus de cadena ligera κ humanizada híbrido homocigoto con locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón normal, también tenían números normales de linfocitos B220⁺ IgM⁺ en sus compartimentos periféricos (no mostrado). Estos resultados indican que los locus quiméricos con segmentos de genes variables humanos y regiones constantes de ratón pueden poblar completamente el compartimento de linfocitos B maduros. Adicionalmente, el número de segmentos de genes variables en los locus de cadena pesada o de cadena ligera κ, y por lo tanto la diversidad teórica del repertorio de anticuerpos, no se correlaciona con la capacidad de generar poblaciones de linfocitos B maduros de tipo silvestre. Por el contrario, los ratones con transgenes de inmunoglobulinas humanas totalmente integrados al azar y locus de inmunoglobulinas de ratón inactivados tienen un número reducido de linfocitos B en estos compartimentos, y la gravedad del déficit depende del número de segmentos de genes variables incluidos en el transgén (Green, L.L., y Jakobovits, A. (1998) Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes, J Exp Med 188:483-495). Esto demuestra que la estrategia de "humanización genética *in situ*" da como resultado un resultado funcional fundamentalmente diferente que los transgenes integrados aleatoriamente logrados en el enfoque de "supresión génica más transgénica".

Exclusión Alélica y Elección de Locus.

- 50 Se examinó la capacidad de mantener la exclusión alélica en ratones heterocigotos para diferentes versiones del locus de cadena pesada de inmunoglobulina humanizada.

- La humanización de los locus de inmunoglobulinas se realizó en una línea F1 ES (F1H4 (Valenzuela *et al.*, 2003)), derivada de embriones heterocigotos 129S6/SvEvTac y C57BL/6NTac. Las secuencias de genes variables de la línea germinal de la cadena pesada humana están dirigidas al alelo 129S6, que porta el haplotipo IgM^a, mientras que el alelo C57BL/6N de ratón no modificado lleva el haplotipo IgM^b. Estas formas alélicas de IgM se pueden distinguir por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para los polimorfismos encontrados en los alelos IgM^a o IgM^b. Como se muestra en la FIG. 6 (fila inferior), los linfocitos B identificados en ratones heterocigotos para cada versión del locus de cadena pesada humanizada solo expresan un único alelo, ya sea IgM^a (el alelo humanizado) o IgM^b (el

alelo de tipo silvestre). Esto demuestra que los mecanismos implicados en la exclusión alélica están intactos en ratones humanizados VELOCIMMUNE®. Además, el número relativo de linfocitos B positivos para el alelo humanizado (IgM^a) es aproximadamente proporcional al número de segmentos génicos V_H presentes. El locus de inmunoglobulina humanizada se expresa en aproximadamente el 30 % de los linfocitos B en ratones humanizados VELOCIMMUNE® 1 heterocigotos, que tienen 18 segmentos génicos V_H humanos, y en el 50 % de los linfocitos B en ratones humanizados VELOCIMMUNE® 2 y 3 heterocigotos (no se muestra), con 39 y 80 segmentos génicos V_H humanos, respectivamente. De forma notable, la proporción de células que expresan el alelo de ratón humanizado frente al de tipo silvestre (0,5 para ratones humanizados VELOCIMMUNE® 1 y 0,9 para los ratones humanizados VELOCIMMUNE® 2) es mayor que la proporción del número de segmentos de genes variables contenidos en los locus humanizados frente a los silvestre (0,2 para ratones humanizados VELOCIMMUNE® 1 y 0,4 para ratones humanizados VELOCIMMUNE® 2). Esto puede indicar que la probabilidad de elección de alelo es intermedia entre una elección aleatoria de uno u otro cromosoma y una elección aleatoria de cualquier RSS (secuencia de señal de recombinación, por sus siglas en inglés) de segmento V particular. Adicionalmente, puede haber una fracción de linfocitos B, pero no en todos, en donde un alelo se vuelve accesible para la recombinación, completa el proceso y cierra la recombinación antes de que el otro alelo se vuelva accesible. Además, la distribución uniforme de las células que tienen IgM de superficie (sIgM) derivadas del locus de cadena pesada humanizada híbrido o del locus de cadena pesada de ratón de tipo silvestre es evidencia de que el locus híbrido está operando a un nivel normal. Por el contrario, los transgenes de inmunoglobulinas humanas integrados al azar compiten débilmente con los locus de inmunoglobulinas de ratón de tipo silvestre (Bruggemann, M., *et al.* (1989) A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. PNAS 86, 6709-6713; Green *et al.* (1994); Tuailon, N. *et al.* (1993) Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in mu and gamma transcripts, Proc Natl Acad Sci USA 90:3720-3724). Esto demuestra además que las inmunoglobulinas producidas por los ratones humanizados VELOCIMMUNE® son funcionalmente diferentes de las producidas por transgenes integrados aleatoriamente en ratones producidos mediante enfoques de "supresión génica más transgénica".

Los polimorfismos de las regiones C_k no están disponibles en 129S6 o C57BL/6N para examinar la exclusión alélica de locus de cadena ligera κ humanizada frente a no humanizada. Sin embargo, todos los ratones humanizados VELOCIMMUNE® poseen locus de cadena ligera λ de ratón de tipo silvestre, por lo tanto, es posible observar si el reordenamiento y la expresión de los locus de cadena ligera κ humanizada pueden prevenir la expresión de cadena ligera λ de ratón. La proporción del número de células que expresan la cadena ligera κ humanizada con respecto al número de células que expresan la cadena ligera λ de ratón no cambió relativamente en los ratones humanizados VELOCIMMUNE® en comparación con los ratones de tipo silvestre, independientemente del número de segmentos génicos V_k humanos insertados en el locus de la cadena ligera κ (FIG. 6, tercera fila desde arriba). Además, no hubo aumento en el número de células dobles positivas (κ más λ), lo que indica que la recombinación productiva en los locus de la cadena ligera κ híbrida da como resultado la supresión apropiada de la recombinación de los locus de la cadena ligera λ de ratón. Por el contrario, ratones que contienen transgenes de cadena ligera κ integrados aleatoriamente con locus de cadena ligera κ de ratón inactivados, pero con locus de cadena ligera λ de ratón de tipo silvestre exhiben proporciones λ/κ aumentadas drásticamente (Jakobovits, 1998), lo que implica que los transgenes de cadena ligera κ introducidos no funcionan bien en tales ratones. Esto demuestra aún más los diferentes resultados funcionales observados en inmunoglobulinas producidas por ratones humanizados VELOCIMMUNE® en comparación con las producidas por ratones "nuligénicos más transgénicos".

Desarrollo de Linfocitos B.

Debido a que las poblaciones de linfocitos B maduros en ratones humanizados VELOCIMMUNE® se parecen a las de los ratones de tipo silvestre (descritos anteriormente), es posible que los defectos en la diferenciación temprana de linfocitos B se compensen con la expansión de las poblaciones de linfocitos B maduros. Las diversas etapas de la diferenciación de linfocitos B se examinaron mediante análisis de poblaciones de linfocitos B utilizando citometría de flujo. La Tabla 6 expone la proporción de la fracción de células en cada linaje de linfocitos B definidos por FAC, usando marcadores específicos de la superficie celular, en ratones humanizados VELOCIMMUNE® en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre.

El desarrollo temprano de linfocitos B se produce en la médula ósea, y las diferentes etapas de la diferenciación de linfocitos B se caracterizan por cambios en los tipos y cantidades de expresión de marcadores de superficie celular. Estas diferencias en la expresión de la superficie se correlacionan con los cambios moleculares que se producen en los locus de inmunoglobulinas dentro de la célula. La transición de linfocitos pro-B a pre-B requiere el reordenamiento y la expresión exitosa de la proteína de cadena pesada funcional, mientras que la transición de la etapa pre B a la etapa B madura se rige por el reordenamiento y la expresión correctos de una cadena ligera κ o λ . Por lo tanto, la transición ineficaz entre las etapas de diferenciación de linfocitos B puede detectarse mediante cambios en las poblaciones relativas de linfocitos B en una etapa dada.

Tabla 6

Versión de Ratones VELOCIMMUNE®	Médula ósea				Bazo	
	pro-B CD43 ^{hi} B220 ^{lo}	pre-B CD24 ^{hi} B220 ^{lo}	B220 ^{lo} IgM ⁺ Inmaduro	B220 ^{hi} IgM ⁺ Maduro	B220 ^{hi} IgM ⁺ IgD ⁺ emergente	B220 ^{hi} IgM ⁺ Maduro
V1	1,1	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0
V2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
V3	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1

No se observaron defectos importantes en la diferenciación de linfocitos B en ninguno de los ratones humanizados VELOCIMMUNE®. La introducción de segmentos de genes de cadena pesada humana no parece afectar la transición pro-B a pre-B, y la introducción de segmentos de genes de cadena ligera κ humana no afecta la transición de pre-B a B en ratones humanizados VELOCIMMUNE®. Esto demuestra que las moléculas de inmunoglobulinas "quiméricas inversas" que poseen regiones variables humanas y constantes de ratón funcionan normalmente en el contexto de la señalización de linfocitos B y de las moléculas de correceptoras que conducen a la diferenciación de linfocitos B apropiada en un entorno de ratón. Por el contrario, el equilibrio entre las diferentes poblaciones durante la diferenciación de linfocitos B se altera en diferentes grados en ratones que contienen transgenes de inmunoglobulinas integrados aleatoriamente y locus de cadena pesada o cadena ligera κ endógenos inactivados (Green y Jakobovits (1998)).

Ejemplo IV

Repertorio de Genes Variables en Ratones con Inmunoglobulinas Humanizadas

El uso de segmentos de genes variables humanos en el repertorio de anticuerpos humanizados de ratones humanizados VELOCIMMUNE® se analizó por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de regiones variables humanas de múltiples fuentes, incluyendo esplenocitos y células de hibridoma. Se determinaron la secuencia de la región variable, el uso del segmento génico, la hipermutación somática y la diversidad de unión de los segmentos génicos de la región variable reordenados.

En resumen, el ARN total se extrajo de 1×10^7 - 2×10^7 esplenocitos o aproximadamente 10^4 - 10^5 células de hibridoma usando TRIZOL™ (Invitrogen) o el kit Qiagen RNEASY™ Mini (Qiagen) y se cebó con cebadores específicos de región constante de ratón usando el sistema de RT-PCR en una etapa SUPERScript™ III (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo con 2-5 μ l de ARN de cada muestra usando los cebadores específicos constantes 3' mencionados anteriormente emparejados con cebadores líderes agrupados para cada familia de regiones variables humanas tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera κ , por separado. Los volúmenes de reactivos y cebadores, y las condiciones de RT-PCR/PCR se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los cebadores se basaron en múltiples fuentes (Wang, X. and Stollar, B.D. (2000) Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR, J Immunol Methods 244:217-225; Ig-primer sets, Novagen). Cuando sea adecuado, las reacciones de PCR secundarias anidadas se llevaron a cabo con cebadores de regiones marco conservadas específicos de familia agrupados y el mismo cebador específico constante de inmunoglobulina de ratón 3' usado en la reacción primaria. Las alícuotas (5 μ l) de cada reacción se analizaron por electroforesis en agarosa y los productos de reacción se purificaron a partir de agarosa usando un kit de extracción en gel MONTAGE™ (Millipore). Los productos purificados se clonaron utilizando el sistema de clonación TOPO™ TA (Invitrogen) y se transformaron en células DH10 β de *E. coli* por electroporación. Se seleccionaron clones individuales de cada reacción de transformación y se cultivaron en cultivos de caldo LB de 2 ml con selección de antibióticos durante la noche a 37 °C. El ADN plasmídico se purificó de cultivos bacterianos mediante un enfoque basado en un kit (Qiagen).

Uso de Genes Variables de Inmunoglobulinas.

El ADN plasmídico de los clones tanto de cadena pesada como de cadena ligera κ se secuenciaron con cebadores inversos T7 o M13 en el analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos de secuencia sin procesar se importaron a SEQUENCHER™ (v4.5, Gene Codes). Cada secuencia se ensambló en contigs y se alineó con secuencias de inmunoglobulinas humanas usando la función de búsqueda IMGT V-Quest (Brochet, X. *et al.* (2008) IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. Nucleic Acids Res 36:W503-508) para identificar el uso segmentos humanos V_H, D_H, J_H y V_K, J_K. Las secuencias se compararon con las secuencias de la línea germinal para el análisis de hipermutación somática y unión de recombinación.

Se generaron ratones a partir de células ES que contenían la modificación inicial de la cadena pesada (alelo híbrido 3hV_H-CRE, parte inferior de la figura 2A) mediante complementación con RAG (Chen, J. *et al.* (1993) RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development, Proc Natl Acad Sci USA 90:4528-4532) y el ADNc se preparó a partir de ARN de esplenocitos. El ADNc se amplificó usando conjuntos de cebadores (descritos anteriormente) específicos para el ARNm predicho de la cadena pesada quimérica que surgiría por

recombinación V(D)J dentro de los segmentos de genes humanos insertados y el posterior corte y empalme a dominios constantes de IgM o IgG de ratón. Las secuencias derivadas de estos clones de ADNc (no mostrado) demostraron que se había producido una recombinación V(D)J adecuada dentro de las secuencias de genes variables humanos, que los segmentos génicos V(D)J humanos reordenados se cortaron y empalmaron adecuadamente en marco a dominios constantes de ratón y que se había producido recombinación de cambio de clase. Se realizó un análisis de secuencia adicional de productos de ARNm de locus de inmunoglobulinas híbridos posteriores.

En un experimento similar, los linfocitos B de ratones no inmunizados de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® humanizados se separaron por citometría de flujo basándose en la expresión superficial de B220 e IgM o IgG. Las células B220⁺ IgM⁺ o IgG⁺ (sIgG⁺) de superficie se agruparon y se obtuvieron las secuencias V_H y V_K después de la amplificación por RT-PCR y clonación (descrita anteriormente). Se registró el uso representativo de genes en un conjunto de ADNc amplificados por RT-PCR de ratones humanizados VELOCIMMUNE® 1 (Tabla 7) y ratones humanizados VELOCIMMUNE® 3 (Tabla 8) sin inmunizar (* RSS defectuosa; † ausente o pseudogén).

Tabla 7

V _H	Observada	D _H	Observada	V _K	Observada
1-18	3	1-1	1	1-16	2
1-17P	0	2-2	2	3-15	1
3-16*	0	3-3	4	1-12	5
3-15	13	4-4	0	3-11	1
3-13	9	5-5	0	1-9	5
3-11	6	5-18	4	1-8	2
3-9	8	6-6	5	3-7*	0
1-8	6	1-7	7	1-6	5
3-7	2	2-8	0	1-5	8
2-5	2	3-9	4	5-2	6
1-3	0	3-10	2	4-1	8
1-2	11	4-11	1		
6-1	5	5-12	1		
		6-13	3		
		1-14	0		
		2-15	0		
		3-16	1		
		4-17	0		
		6-19	2		
		1-20	2		
		2-21	1		
		3-22	0		
		4-23	2		
		5-24	1		
		6-25	1		
		1-26	6		
		7-27	10		

J _H	Observada
1	2
2	1
3	8
4	33
5	5
6	16

J _K	Observada
1	12
2	10
3	5
4	10
5	0

Tabla 8

V _H	Observada	D _H	Observada	V _K	Observada
7-81†	0	1-1	7	2-40	1
3-74†	0	2-2	8	1-39	34
3-73	1	3-3	9	1-37	2
3-72	2	4-4	4	1-33	35
2-70	2	5-5	6	2-30	8

(continuación)

V _H	Observada	D _H	Observada	V _k	Observada
1-69	3	5-18	6	2-29	2
3-66	1	6-6	29	2-28	7
3-64	1	1-7	30	1-27	5
4-61	1	2-8	4	2-24	7
4-59	10	3-9	8	6-21*	3
1-58	0	3-10	10	3-20	10
3-53	0	4-11	4	1-17	13
5-51	5	5-12	5	1-16	10
3-49	2	6-13	17	3-15	13
3-48	7	1-14	2	1-12	13
1-46	1	2-15	3	3-11	13
1-45	0	3-16	4	1-9	11
3-43	10	4-17	3	1-8	1
4-39	4	6-19	8	3-7*	0
3-38*	0	1-20	3	1-6	6
3-35*	0	2-21	1	1-5	7
4-34	8	3-22	5	5-2	0
3-33	14	4-23	2	4-1	21
4-31	4	5-24	2	Jk	Observada
3-30	13	6-25	2	1	50
4-28	0	1-26	17	2	37
2-26	0	7-27	7	3	28
1-24	3	JH	Observada	4	64
3-23	18	1	2	5	22
3-21	0	2	8		
3-20	0	3	26		
1-18	4	4	95		
1-17P	1	5	11		
3-16*	0				

3-15	13
3-13	6
3-11	5
3-9	31
1-8	7
3-7	11
2-5	1
1-3	0
1-2	6
6-1	9

6	58
---	----

- 5 funcionales. De los segmentos de genes variables funcionales descritos pero no detectados en los ratones
VELOCIMMUNE® humanizados de este experimento, se ha informado que varios poseen secuencias de señal de
recombinación defectuosas (RSS) y, por lo tanto, no se espera que se expresen (Feeney, AJ. (2000) Factors that
influence formation of B cell repertoire. Immunol Res 21:195-202). El análisis de varios conjuntos diferentes de
secuencias de inmunoglobulinas de varios ratones VELOCIMMUNE® humanizados, aislados de repertorios tanto
10 tratados como inmunizados, ha mostrado el uso de estos segmentos génicos, aunque a frecuencias más bajas (datos
no mostrados). Los datos agregados de uso de genes han demostrado que todos los segmentos génicos V_H, D_H, J_H,
V_k y J_k humanos funcionales contenidos en ratones VELOCIMMUNE® humanizados se han observado en varios

repositorios no tratados e inmunizados (datos no mostrados). Aunque el segmento génico V_H7-81 humano se ha identificado en el análisis de las secuencias del locus de cadena pesada humana (Matsuda, F. *et al.* (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, J Exp Med 188:2151-2162), no está presente en los ratones VELOCIMMUNE® humanizados como se confirma mediante la resecuenciación de todo el genoma de ratón VELOCIMMUNE® 3 humanizado.

Se sabe que las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos muestran una variabilidad excepcional, especialmente en segmentos de polipéptidos cortos dentro del dominio variable reordenado. Estas regiones, conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR) crean el sitio de unión para el antígeno en la estructura de la molécula de anticuerpo. Las secuencias polipeptídicas intermedias se denominan regiones marco conservadas (FR). Existen tres CDR (CDR1, CDR2, CDR3) y 4 FR (FR1, FR2, FR3, FR4) tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras. Una CDR, CDR3, es única porque esta CDR se crea mediante la recombinación de los segmentos génicos tanto V_H, D_H y J_H como V_k y J_k y genera una cantidad significativa de diversidad de repertorio antes de encontrar el antígeno. Esta unión es imprecisa debido tanto a las delecciones de nucleótidos a través de la actividad de exonucleasas como a las adiciones no codificadas por plantilla a través de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y, por lo tanto, permite que surjan secuencias nuevas del proceso de recombinación. Aunque las FR pueden mostrar una mutación somática sustancial debido a la alta mutabilidad de la región variable en su conjunto, la variabilidad, sin embargo, no se distribuye uniformemente a través de la región variable. Las CDR son regiones concentradas y localizadas de alta variabilidad en la superficie de la molécula de anticuerpo que permiten la unión al antígeno. Las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos seleccionados de ratones VELOCIMMUNE® humanizados alrededor de la unión CDR3 que demuestran diversidad de unión se muestran en la FIG. 7A y 7B, respectivamente.

Como se muestra en la FIG. 7A, se observan adiciones de nucleótidos no codificados por plantilla (adiciones N) en la unión V_H-D_H y D_H-J_H en anticuerpos de ratones VELOCIMMUNE® humanizados, lo que indica la función adecuada de TdT con los segmentos humanos. Los criterios de valoración de los segmentos V_H, D_H y J_H en relación con sus homólogos de la línea germinal indican que también se ha producido actividad exonucleasa. A diferencia del locus de cadena pesada, los reordenamientos de la cadena ligera κ humana muestran poca o ninguna adición de TdT en CDR3, que se forma por la recombinación de los segmentos V_k y J_k (FIG. 7B). Esto se espera debido a la falta de expresión de TdT en ratones durante los reordenamientos de la cadena ligera en la transición de linfocitos preB a B. La diversidad observada en la CDR3 de las regiones V_k humanas reordenadas se introduce predominantemente a través de la actividad exonucleasa durante el evento de recombinación.

Hipermutación somática.

Se añade diversidad adicional a las regiones variables de los genes de inmunoglobulina reordenados durante la reacción del centro germinal mediante un proceso denominado hipermutación somática. Los linfocitos B que expresan regiones variables mutadas somáticamente compiten con otros linfocitos B por el acceso al antígeno presentado por las células dendríticas foliculares. Esos linfocitos B con mayor afinidad por el antígeno se expandirán aún más y experimentarán un cambio de clase antes de salir a la periferia. Por lo tanto, los linfocitos B que expresan isotipos cambiados generalmente han encontrado antígeno y han experimentado reacciones en el centro germinal y tendrán un mayor número de mutaciones en relación con los linfocitos B no tratados. Adicionalmente, se esperaría que las secuencias de región variable de linfocitos B sIgM⁺ predominantemente sin tratar tuvieran relativamente menos mutaciones que las secuencias variables de linfocitos B sIgG⁺ que han experimentado selección por antígeno.

Las secuencias de clones V_H o V_k aleatorios de linfocitos B sIgM⁺ o sIgG⁺ de ratones VELOCIMMUNE® humanizados no inmunizados o de linfocitos B sIgG⁺ de ratones inmunizados se compararon con sus segmentos de genes variables de la línea germinal y se anotaron los cambios relativos a la secuencia de la línea germinal. Las secuencias de nucleótidos resultantes se tradujeron *in silico* y también se anotaron mutaciones que conducen a cambios de aminoácidos. Los datos se recopilaban de todas las regiones variables y se calculó el cambio porcentual en una posición dada (FIG. 8).

Tal como se muestra en la FIG. 8, las regiones variables de cadena pesada humana derivadas de linfocitos B sIgG⁺ de ratones VELOCIMMUNE® humanizados no inmunizados muestran muchos más nucleótidos en relación con los linfocitos B sIgM⁺ de los mismos grupos de esplenocitos, y las regiones variables de cadena pesada derivadas de ratones inmunizados muestran aún más cambios. El número de cambios aumenta en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en relación con las regiones marco conservadas, lo que indica la selección por antígeno. Las secuencias de aminoácidos correspondientes de las regiones variables de cadena pesada humana también muestran un número significativamente mayor de mutaciones en IgG frente a IgM e incluso más en IgG inmunizada. Estas mutaciones nuevamente parecen ser más frecuentes en las CDR en comparación con las secuencias marco conservadas, lo que sugiere que los anticuerpos se seleccionaron con antígeno *in vivo*. Se observa un aumento similar en el número de mutaciones de nucleótidos y aminoácidos en las secuencias V_k derivadas de linfocitos B IgG⁺ de ratones inmunizados.

El uso de genes y la hipermutación somática observada en ratones VELOCIMMUNE® humanizados demuestran que esencialmente todos los segmentos génicos presentes son capaces de reordenarse para formar anticuerpos

químicos inversos completamente funcionales en estos ratones. Adicionalmente, los anticuerpos derivados de ratones VELOCIMMUNE® humanizados participan plenamente en el sistema inmunitario del ratón para someterse a selección y maduración por afinidad para crear anticuerpos humanos completamente maduros que pueden neutralizar eficazmente su antígeno diana. Los ratones VELOCIMMUNE® humanizados pueden generar respuestas inmunitarias fuertes a múltiples clases de antígenos que dan como resultado el uso de una amplia gama de anticuerpos humanos que son tanto de alta afinidad como adecuados para uso terapéutico (datos no mostrados).

Ejemplo V

Análisis de la Estructura Linfoide y de los Isotipos Séricos

Las estructuras macroscópicas del bazo, los ganglios linfáticos inguinales, las placas de Peyer y el timo de muestras de tejido de ratones de tipo silvestre o VELOCIMMUNE® humanizados teñidos con H&E (hematoxilina y eosina) se examinaron mediante microscopía óptica. Los niveles de isotipos de inmunoglobulinas en suero recogidos de ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® humanizados se analizaron usando la tecnología LUMINEX™.

Estructura de los Órganos Linfoides.

La estructura y la función de los tejidos linfoides dependen en parte del desarrollo adecuado de las células hematopoyéticas. Un defecto en el desarrollo o la función de los linfocitos B puede mostrarse como una alteración en la estructura de los tejidos linfoides. Tras el análisis de las secciones de tejido teñidas, no se identificaron diferencias significativas en la apariencia de los órganos linfoides secundarios entre ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® humanizados (datos no mostrados).

Niveles de Inmunoglobulinas Séricas.

El nivel de expresión de cada isotipo es similar en ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® humanizados (FIG. 9A, 9B y 9C). Esto demuestra que la humanización de los segmentos de genes variables no tuvo ningún efecto adverso aparente sobre el cambio de clase o la expresión y secreción de inmunoglobulinas y, por lo tanto, aparentemente mantiene todas las secuencias endógenas de ratón necesarias para estas funciones.

Ejemplo VI

Inmunización y Producción de Anticuerpos en Ratones con Inmunoglobulinas Humanizadas

Se inmunizaron diferentes versiones de ratones VELOCIMMUNE® humanizados con antígeno para examinar la respuesta humoral a la exposición con antígeno extraño.

Inmunización y Desarrollo de Hibridoma.

Los ratones VELOCIMMUNE® humanizados y de tipo silvestre pueden inmunizarse con un antígeno en forma de proteína, ADN, una combinación de ADN y proteína, o células que expresan el antígeno. Los animales generalmente se refuerzan cada tres semanas por un total de dos o tres veces. Después de cada refuerzo con antígeno, se recogen muestras de suero de cada animal y se analizan para determinar las respuestas de anticuerpos específicos de antígeno mediante determinación del título sérico. Antes de la fusión, los ratones recibieron un refuerzo final previo a la fusión de 5 µg de proteína o ADN, según se desee, mediante inyecciones intraperitoneales y/o intravenosas. Los esplenocitos se recogen y fusionan a células de mieloma Ag8.653 en una cámara de electrofusión de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante (Cyto Pulse Sciences Inc., Glen Burnie, MD). Diez días después del cultivo, los hibridomas se seleccionan para determinar la especificidad del antígeno usando un ensayo ELISA (Harlow, E. y Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Press, Nueva York). Alternativamente, los linfocitos B específicos de antígeno se aíslan directamente de ratones VELOCIMMUNE® humanizados inmunizados y se exploran utilizando técnicas convencionales, incluidas las descritas en el presente documento, para obtener anticuerpos humanos específicos para un antígeno de interés.

Determinación de Títulos Séricos.

Para controlar la respuesta del antígeno anti suero en animales, se recogen muestras de suero aproximadamente 10 días después de cada refuerzo y se determinan los títulos usando ELISA específico de antígeno. En resumen, las placas Nunc MAXISORP™ de 96 pocillos se recubren con antígeno 2 µg/ml durante la noche a 4 °C y se bloquean con albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, MO). Se permite que las muestras de suero en diluciones en serie de 3 veces se unan a las placas durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan después con PBS que contiene Tween-20 al 0,05% y la IgG unida se detecta usando anti-Fc de ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) para el título de IgG total, o anticuerpos policlonales específicos de isotipo o de cadena ligera marcados con biotina (SouthernBiotech Inc.) para títulos específicos de isotipo, respectivamente. Para los anticuerpos marcados con biotina, después del lavado de la placa, se añade estreptavidina conjugada con HRP (Pierce, Rockford, IL). Todas las placas se desarrollan utilizando sustratos colorimétricos como

BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Después de detener la reacción con ácido fosfórico 1 M, se registran las absorciones ópticas a 450 nm y los datos se analizan utilizando el software PRISM™ de Graph Pad. Las diluciones requeridas para obtener dos veces la señal de fondo se definen como título.

- 5 En un experimento, los ratones VELOCIMMUNE® humanizados se inmunizaron con el receptor de interleucina-6 humano (hIL-6R). Un conjunto representativo de títulos séricos para ratones VELOCIMMUNE® y de tipo silvestre inmunizados con hIL-6R se muestra en las FIG. 10A y 10B.

10 Los ratones VELOCIMMUNE® humanizados y de tipo silvestre montaron respuestas fuertes hacia la IL-6R con intervalos de títulos similares (FIG. 10A). Varios ratones de las cohortes de VELOCIMMUNE® humanizados y de tipo silvestre alcanzaron una respuesta máxima después de un único refuerzo con antígeno. Estos resultados indican que la fuerza de respuesta inmunitaria y la cinética de este antígeno fueron similares en los ratones VELOCIMMUNE® humanizados y de tipo silvestre. Estas respuestas de anticuerpos específicos de antígeno se analizaron adicionalmente para examinar los isotipos particulares de los anticuerpos específicos de antígeno encontrados en los sueros. Ambos grupos VELOCIMMUNE® humanizados y de tipo silvestre provocaron predominantemente una respuesta a IgG1 (FIG. 10B), lo que sugiere que el cambio de clase durante la respuesta humoral es similar en ratones de cada tipo.

20 **Determinación de la Afinidad de Unión del Anticuerpo al Antígeno en Solución.**

Un ensayo de competencia en solución basado en ELISA está diseñado generalmente para determinar la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo.

25 En resumen, los anticuerpos en medio acondicionado se mezclan previamente con diluciones en serie de proteína antigénica que varían de 0 a 10 mg/ml. Las soluciones de la mezcla de anticuerpo y antígeno se incuban después durante dos a cuatro horas a temperatura ambiente para alcanzar los equilibrios de unión. Las cantidades de anticuerpo libre en las mezclas se miden después usando un ELISA sándwich cuantitativo. Las placas MAXISORB™ de noventa y seis pocillos (VWR, West Chester, PA) se recubren con 1 µg/ml de proteína antigénica en solución de PBS durante la noche a 4 °C seguido de un bloqueo inespecífico con BSA. Las soluciones de la mezcla de anticuerpo antígeno se transfieren a estas placas seguido de una incubación de una hora. Las placas se lavan después con tampón de lavado y los anticuerpos unidos a la placa se detectaron con un reactivo de anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson Immuno Research Lab) y se desarrollaron usando sustratos colorimétricos tal como BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Después de detener la reacción con ácido fosfórico 1 M, se registran las absorciones ópticas a 450 nm y los datos se analizan utilizando el software PRISM™ de Graph Pad. La dependencia de las señales de las concentraciones de antígeno en solución se analiza con un análisis de ajuste de 4 parámetros y se informa como CI_{50} , la concentración de antígeno requerida para lograr una reducción del 50% de la señal de las muestras de anticuerpos sin la presencia de antígeno en solución.

40 En un experimento, los ratones VELOCIMMUNE® humanizados se inmunizaron con hIL-6R (como se describe anteriormente). Las FIG. 11A y 11B muestran un conjunto representativo de mediciones de afinidad para anticuerpos anti-hIL6R de ratones VELOCIMMUNE® humanizados y de tipo silvestre.

45 Después de que los ratones inmunizados reciban un tercer refuerzo de antígeno, los títulos séricos se determinan mediante ELISA. Los esplenocitos se aíslan de cohortes de ratones de tipo silvestre y VELOCIMMUNE® humanizados seleccionados y se fusionan con células de mieloma Ag8.653 para formar hibridomas y se cultivan bajo selección (como se describe anteriormente). De un total de 671 hibridomas anti-IL-6R producidos, se descubrió que 236 expresaban anticuerpos específicos de antígeno. El medio recolectado de los pocillos positivos para antígeno se usó para determinar la afinidad del anticuerpo de unión al antígeno usando un ELISA de competencia en solución. Los anticuerpos derivados de ratones VELOCIMMUNE® humanizados muestran una amplia gama de afinidad en la unión al antígeno en solución (FIG. 11A). Asimismo, se encontró que 49 de los 236 hibridomas anti-IL-6R bloqueaban la unión de IL-6 al receptor en un bioensayo *in vitro* (datos no mostrados). Adicionalmente, estos 49 anticuerpos de bloqueo anti-IL-6R mostraron una gama de afinidades en solución altas similares a las de los anticuerpos de bloqueo derivados de la inmunización paralela de ratones de tipo silvestre (FIG. 11B).

55 **Ejemplo VII**

Construcción de un Vector de Direccionamiento de ADAM6 de Ratón

60 Se construyó un vector de direccionamiento para la inserción de genes ADAM6a y ADAM6b de ratón en un locus de cadena pesada humanizado usando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (*supra*) para modificar un Cromosoma Bacteriano Artificial (BAC) 929d24 obtenido del Dr. Fred Alt (Universidad de Harvard). Se modificó por ingeniería el ADN de BAC 929d24 para contener fragmentos genómicos que contienen los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón y un casete de higromicina para la delección dirigida de un pseudogén ADAM6 humano (hADAM6Ψ) ubicado entre los segmentos genómicos V_H1-2 y V_H6-1 humanos de un locus de cadena pesada humanizado (FIG. 12).

65 En primer lugar, un fragmento genómico que contiene el gen ADAM6b de ratón, 800 pb de secuencia cadena arriba

(5') y 4800 pb de secuencia cadena abajo (3') se subclonó a partir del clon 929d24 BAC. Un segundo fragmento genómico que contiene el gen ADAM6a de ratón, 300 pb de secuencia cadena arriba (5') y 3400 pb de secuencia cadena abajo (3'), se subclonó por separado a partir del clon 929d24 BAC. Los dos fragmentos genómicos que contienen los genes ADAM6b y ADAM6a de ratón se unieron a un casete de higromicina flanqueado por sitios de recombinación Frt para crear el vector de direccionamiento (Vector de Direccionamiento de ADAM6 de ratón, FIG. 20; SEQ ID NO: 3). Se modificaron por ingeniería diferentes sitios de enzimas de restricción en el extremo 5' del vector de direccionamiento siguiendo el gen ADAM6b de ratón y en el extremo 3' siguiendo el gen ADAM6a de ratón (parte inferior de la FIG. 12) para la unión al locus de cadena pesada humanizado.

Se realizó una modificación por separado en un clon BAC que contenía un reemplazo del locus de cadena pesada de ratón con el locus de cadena pesada humana, incluido el pseudogén ADAM6 humano ubicado entre los segmentos génicos V_H1-2 y V_H6-1 humanos del locus humanizado para la unión posterior del vector de direccionamiento de ADAM6 de ratón (FIG. 13).

En resumen, se modificó por ingeniería un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación loxP para contener brazos de homología que contengan secuencia genómica humana en las posiciones 3' del segmento génico V_H1-2 humano (5' con respecto a hADAM6Ψ) y 5' del segmento génico V_H6-1 humano (3' con respecto a hADAM6Ψ; véase en el medio de la FIG. 13). La ubicación del sitio de inserción de esta construcción de direccionamiento fue de aproximadamente 1,3 kb 5' y 350 pb 3' del pseudogén ADAM6 humano. La construcción de direccionamiento también incluyó los mismos sitios de restricción que el vector de direccionamiento ADAM6 de ratón para permitir la unión de BAC posterior entre el clon BAC modificado que contiene la delección del pseudogén ADAM6 humano y el vector de direccionamiento de ADAM6 de ratón.

Después de la digestión del ADN de BAC derivado de ambas construcciones, los fragmentos genómicos se unieron para construir un clon BAC modificado por ingeniería que contiene un locus de cadena pesada humanizado que contiene una secuencia genómica colocada ectópicamente que comprende secuencias de nucleótidos ADAM6a y ADAM6b de ratón. La construcción de direccionamiento final para la delección de un gen ADAM6 humano dentro de un locus de cadena pesada humanizado y la inserción de secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón en células ES contenidas, de 5' a 3', un fragmento genómico 5' que contenía 13 kb de secuencia genómica humana 3' del segmento génico V_H1-2 humano, 800 pb de secuencia genómica de ratón cadena abajo del gen ADAM6b de ratón, el gen ADAM6b de ratón, 4800 pb de secuencia genómica cadena arriba del gen ADAM6b de ratón, un sitio 5' Frt, un casete de higromicina, un sitio 3' Frt, 300 pb de secuencia genómica de ratón cadena abajo del gen ADAM6a de ratón, el gen ADAM6a de ratón, 3400 pb de secuencia genómica de ratón cadena arriba del gen ADAM6a del ratón, y un fragmento genómico 3' que contiene 30 kb de secuencia genómica humana 5' del segmento del gen V_H6-1 humano (parte inferior de la FIG. 13).

El clon BAC modificado por ingeniería (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón que contenían un locus de cadena pesada humanizado para crear células ES modificadas que comprenden una secuencia genómica de ratón colocada ectópicamente que comprende secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón dentro de un locus de cadena pesada humanizado. Las células ES positivas que contienen el fragmento genómico ectópico de ratón dentro del locus de la cadena pesada humanizada se identificaron mediante un ensayo de PCR cuantitativa utilizando sondas TAQMAN™ (Lie, Y.S. y Petropoulos, C.J. (1998) *Advances in quantitative PCR technology: 5'nuclease assays*. *Curr Opin Biotechnol* 9(1):43-48). Las regiones cadena arriba y cadena abajo fuera de la porción modificada del locus de la cadena pesada humanizada se confirmaron mediante PCR usando cebadores y sondas ubicadas dentro de la región modificada para confirmar la presencia de la secuencia genómica ectópica de ratón dentro del locus de la cadena pesada humanizada, así como el casete de higromicina. La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia genómica de cadena pesada humana cadena arriba del punto de inserción y un sitio de restricción I-Ceu I (contenido entre paréntesis a continuación) enlazado contiguamente a la secuencia genómica de ratón presente en el punto de inserción: (CCAGCTTCAT TAGTAATCGT TCATCTGTGG TAAAAGGCA GGATTTGAAG CGATGGAAGA TGGGAGTACG GGCGTTGGA AGACAAAGTG CCACACAGCG CAGCCTTCGT CTAGACCCCC GGGCTAACTA TAACGGTCCT AAGGTAGCGA G) GGGATGACAG ATTCTCTGTT CAGTGCCTC AGGGTCTGCC TCCACGAGAA TCACCATGCC CTTTCTCAAG ACTGTGTTCT GTGCAGTGCC CTGTCACTGG (SEQ ID NO: 4). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción cadena abajo en el extremo 3' de la región diana incluía lo siguiente, que indica la secuencia genómica de ratón y un sitio de restricción PI-Sce I (contenido dentro de los paréntesis a continuación) enlazado contiguamente con la secuencia genómica de cadena pesada humana cadena abajo del punto de inserción: (AGGGGTCTGAG GGGGAATTTT ACAAAGAACA AAGAAGCGGG CATCTGCTGA CATGAGGGCC GAAGTCAGGC TCCAGGCAGC GGGAGCTCCA CCGCGGTGGC GCCATTTTCAT TACCTCTTTC TCCGCACCCG ACATAGATAAAGCTT) ATCCCCCACC AAGCAAATCC CCCTACCTGG GGCCGAGCTT CCCGTATGTG GGAAATGAA TCCCTGAGGT CGATTGCTGC ATGCAATGAA ATTCAACTAG (SEQ ID NO: 5).

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método de ingeniería VELOCIMOUSE® (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos número 7.6598.442, 7.576.259, 7.294.754). Los ratones que llevan un locus de cadena pesada humanizado que contiene una secuencia genómica ectópica de ratón que comprende secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón se identificaron mediante genotipificación usando una modificación del ensayo de alelos

(Valenzuela *et al.*, 2003) que detectó la presencia de los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón dentro de locus de cadena pesada humanizado.

Los ratones que llevan un locus de cadena pesada humanizado que contiene genes ADAM6a y ADAM6b de ratón se reproducen con una cepa de ratón supresora de FLPe (véase, por ejemplo, Rodríguez, C.I. *et al.* (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nature Genetics* 25:139-140) para eliminar cualquier casete de higromicina flanqueado por FRT introducido por el vector de direccionamiento que no se elimina, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de higromicina se conserva en los ratones.

Las crías se genotipan y se selecciona una cría heterocigota para un locus de cadena pesada humanizado que contiene un fragmento genómico ectópico de ratón que comprende secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón para caracterizar la expresión génica de ADAM6 de ratón y la fertilidad.

Ejemplo VIII

Caracterización de Ratones de Rescate de ADAM6

Citometría de Flujo.

Tres ratones de 25 semanas de edad homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y ligera κ humana (H/ κ) y tres ratones de 18-20 semanas de edad homocigotos para la cadena pesada humana y ligera κ humana que tiene el fragmento genómico ectópico de ratón que codifica los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón dentro de ambos alelos del locus de cadena pesada humana (H/ κ -A6) se sacrificaron para la identificación y análisis de poblaciones de células linfocitarias por FAC sobre el sistema BD LSR II (BD Bioscience). Los linfocitos se seleccionaron por linajes celulares específicos y se analizaron para la progresión a través de varias etapas de desarrollo de linfocitos B. Los tejidos recogidos de los animales incluyeron sangre, bazo y médula ósea. Se recogió sangre en tubos de BD microtainer con EDTA (BD Biosciences). Se extrajo médula ósea de fémures mediante un lavado abundante con medio RPMI completo suplementado con suero de ternera fetal, piruvato de sodio, HEPES, 2-mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales y gentamicina. Los glóbulos rojos de las preparaciones de sangre, bazo y médula ósea se lisaron con un tampón de lisis basado en cloruro de amonio (por ejemplo, tampón de lisis ACK), seguido de lavado con medio RPMI completo.

Para la tinción de las poblaciones celulares, se incubaron 1×10^6 células de diversas fuentes de tejido con anti-CD16/CD32 de ratón (2.4G2, BD Biosciences) en hielo durante 10 minutos, seguido de marcado con uno o una combinación de los siguientes cócteles de anticuerpos durante 30 min en hielo.

Médula ósea: anti-FITC-CD43 (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience), A700-CD19 (1D3, BD Biosciences) de ratón.

Sangre periférica y bazo: anti-FITC- κ (187.1, BD Biosciences), PE- λ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-CD3 (145-2C11, BD), A700-CD19 (1D3, BD), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience) de ratón. Después de la incubación con los anticuerpos marcados, las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 2%. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo LSR II y se analizó con FlowJo. Los resultados de un ratón H/ κ y H/ κ -A6 representativos se muestran en las Fig. 14-18.

Los resultados demuestran que los linfocitos B de los ratones H/ κ -A6 progresan a través de las etapas de desarrollo de los linfocitos B de manera similar a los ratones H/ κ en la médula ósea y los compartimentos periféricos, y muestran patrones normales de maduración una vez que entran en la periferia. Los ratones H/ κ -A6 demostraron un aumento de la población de células CD43^{int}CD19⁺ en comparación con los ratones H/ κ (FIG. 16B). Esto puede indicar una expresión acelerada de IgM a partir del locus de cadena pesada humanizado que contiene un fragmento genómico de ratón ectópico que comprende las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón en ratones H/ κ -A6. En la periferia, las poblaciones de linfocitos B y T de ratones H/ κ -A6 parecen normales y similares a las de ratones H/ κ .

Morfología Testicular y Caracterización de Espermatozoides.

Para determinar si la infertilidad en ratones que tienen locus variables de cadena pesada de inmunoglobulinas humanizadas se debe a defectos en testículos y/o en la producción de espermatozoides, se examinó la morfología de los testículos y el contenido de espermatozoides del epidídimo.

En resumen, se diseccionaron y pesaron los testículos de dos grupos de cinco ratones por grupo (Grupo 1: ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada y ligera κ humana, mADAM6^{-/-}; Grupo 2: ratones heterocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada y ligera κ humana, mADAM6^{-/-}) con el epidídimo intacto. Las muestras se fijaron después, se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con tinte hematoxilina y eosina (HE). Se examinaron secciones de los testículos (2 testículos por ratón, para un total de 20) en busca de defectos en la morfología y evidencia de

producción de espermatozoides, mientras que las secciones del epidídimo se examinaron para detectar la presencia de espermatozoides.

En este experimento, no se observaron diferencias en el peso o la morfología de los testículos entre los ratones mADAM6^{-/-} y los ratones mADAM6^{+/+}. Se observaron espermatozoides en todos los genotipos, tanto en los testículos como en el epidídimo. Estos resultados establecen que la ausencia de genes ADAM6a y ADAM6b de ratón no conduce a cambios detectables en la morfología de los testículos, y que se produce espermatozoides en ratones en presencia y ausencia de estos dos genes. Por lo tanto, no es probable que los defectos en la fertilidad de los ratones ADAM6^{-/-} machos se deban a la baja producción de espermatozoides.

Motilidad y Migración de Espermática.

Los ratones que carecen de otros miembros de la familia de genes ADAM son infértiles debido a defectos en la motilidad o migración de los espermatozoides. La migración de espermatozoides se define como la capacidad de los espermatozoides de pasar del útero al oviducto, y normalmente es necesaria para la fertilización en ratones. Para determinar si la delección de ADAM6a y ADAM6b de ratón afecta este proceso, se evaluó la migración espermática en ratones mADAM6^{-/-}. También se evaluó la motilidad espermática.

En resumen, se obtuvieron espermatozoides de testículos de (1) ratones heterocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y homocigotos para locus de genes variables de cadena ligera κ humana (ADAM6^{+/+}); (2) ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y homocigotos para locus de genes variables de cadena ligera κ humana (ADAM6^{-/-}); (3) ratones homocigotos para locus de genes variables de cadena pesada humana y homocigotos para cadena ligera κ de tipo silvestre (ADAM6^{-/-} mk); y, (4) ratones C57 BL/6 de tipo silvestre (TS). No se observaron anomalías significativas en el recuento de espermatozoides ni en la motilidad general de los espermatozoides mediante inspección. Para todos los ratones, se observó dispersión del cúmulo, lo que indica que cada muestra de espermatozoides pudo penetrar las células del cúmulo y unirse a la zona pelúcida *in vitro*. Estos resultados establecen que los ratones ADAM6^{-/-} tienen espermatozoides capaces de penetrar el cúmulo y unirse a la zona pelúcida.

La fertilización de los óvulos de ratón *in vitro* (FIV) se realizó utilizando espermatozoides de ratones como se describe anteriormente. Un número ligeramente menor de embriones escindidos estaban presentes para ADAM6^{-/-} el día siguiente a la FIV, así como un número reducido de espermatozoides unidos a los óvulos. Estos resultados establecen que los espermatozoides de los ratones ADAM6^{-/-}, una vez expuestos a un óvulo, son capaces de penetrar el cúmulo y unirse a la zona pelúcida.

En otro experimento, la capacidad de los espermatozoides de los ratones ADAM6^{-/-} para migrar desde el útero y a través del oviducto se determinó en un ensayo de migración de espermatozoides.

En resumen, se estableció un primer grupo de cinco ratones hembra superovuladas con cinco machos ADAM6^{-/-}. Se estableció un segundo grupo de cinco ratones hembra superovuladas con cinco machos ADAM6^{+/+}. Los pares de apareamiento se observaron para la copulación, y cinco a seis horas después de la copulación, se retiraron el útero y el oviducto adherido de todas las hembras y se lavaron abundantemente para su análisis. Las soluciones de lavado se verificaron en busca de óvulos para verificar la ovulación y obtener un recuento de espermatozoides. La migración de espermatozoides se evaluó de dos maneras diferentes. En primer lugar, ambos oviductos se retiraron del útero, se lavaron abundantemente con solución salina y se contó cualquier espermatozoide identificado. La presencia de óvulos también se observó como evidencia de la ovulación. En segundo lugar, los oviductos se dejaron unidos al útero y se fijaron ambos tejidos, se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron (como se describe anteriormente). Se examinaron las secciones para detectar la presencia de espermatozoides, tanto en el útero como en ambos oviductos.

Para las cinco hembras apareadas con los cinco machos ADAM6^{-/-}, se encontró muy pocos espermatozoides en la solución de lavado del oviducto. Las soluciones de lavado de los oviductos de las cinco hembras apareadas con los cinco machos ADAM6^{+/+} mostraron un nivel de espermatozoides de 25 a 30 veces mayor (promedio, n = 10 oviductos) que el presente en las soluciones de lavado de los oviductos de las cinco hembras apareadas con los cinco machos ADAM6^{-/-}.

Se prepararon secciones histológicas de útero y oviducto. Se examinaron las secciones para detectar la presencia de espermatozoides en el útero y el oviducto (el colliculus tubarius). La inspección de las secciones histológicas del oviducto y el útero reveló que en ratones hembra apareadas con ratones ADAM6^{-/-}, se encontraron espermatozoides en el útero pero no en el oviducto. Adicionalmente, secciones de hembras apareadas con ratones ADAM6^{-/-} revelaron que no se encontraron espermatozoides en la unión uterotubal (UTJ por sus siglas en inglés). En secciones de hembras apareadas con ratones ADAM6^{+/+}, se identificaron espermatozoides en la UTJ y en el oviducto.

Estos resultados establecen que los ratones que carecen de los genes ADAM6a y ADAM6b producen espermatozoides que muestran un defecto de migración *in vivo*. En todos los casos, se observaron espermatozoides dentro del útero, lo que indica que la cópula y la liberación de espermatozoides aparentemente se producen normalmente, pero se observaron pocos o ningún espermatozoide dentro de los oviductos después de la cópula,

medido por el recuento de espermatozoides o la observación histológica. Estos resultados establecen que los ratones que carecen de los genes ADAM6a y ADAM6b producen espermatozoides que exhiben una incapacidad para migrar del útero al oviducto. Aparentemente, este defecto conduce a la infertilidad porque los espermatozoides no pueden cruzar la unión uterotubal hacia el oviducto, donde se fertilizan los óvulos. Tomados en conjunto, todos estos resultados convergen para respaldar la hipótesis de que los genes ADAM6 de ratón ayudan a dirigir los espermatozoides con motilidad normal para migrar fuera del útero, a través de la unión uterotubal y el oviducto, y así acercarse a un óvulo para lograr el evento de fertilización. El mecanismo por el cual ADAM6 logra esto puede ser directamente por acción de las proteínas ADAM6, o mediante la expresión coordinada con otras proteínas, por ejemplo, otras proteínas ADAM, en el espermatozoide, como se describe a continuación.

Expresión de la Familia de Genes ADAM.

Se sabe que un complejo de proteínas ADAM está presente como un complejo en la superficie de los espermatozoides en maduración. Los ratones que carecen de otros miembros de la familia de genes ADAM pierden este complejo a medida que los espermatozoides maduran y muestran una reducción de múltiples proteínas ADAM en los espermatozoides maduros. Para determinar si la falta de genes ADAM6a y ADAM6b afecta a otras proteínas ADAM de manera similar, se analizaron transferencias Western de extractos de proteínas de testículos (espermatozoides inmaduros) y epidídimo (espermatozoides maduros) para determinar los niveles de expresión de otros miembros de la familia de genes ADAM.

En este experimento, se analizaron extractos de proteínas de cuatro ratones ADAM6^{-/-} y cuatro ADAM6^{+/-}. Los resultados mostraron que la expresión de ADAM2 y ADAM3 no se vio afectada en los extractos de testículos. Sin embargo, ADAM2 y ADAM3 se redujeron drásticamente en extractos de epidídimo. Esto demuestra que la ausencia de ADAM6a y ADAM6b en los espermatozoides de los ratones ADAM6^{-/-} puede tener un efecto directo en la expresión y quizás en la función de otras proteínas ADAM a medida que los espermatozoides maduran (por ejemplo, ADAM2 y ADAM3). Esto sugiere que ADAM6a y ADAM6b son parte de un complejo de proteínas ADAM en la superficie de los espermatozoides, lo que podría ser crítico para la migración adecuada de los espermatozoides.

Ejemplo IX

Uso de Genes Variables de Cadena Pesada Humana en Ratones de Rescate de ADAM6

El uso de genes variables de la cadena pesada humana seleccionada se determinó para ratones homocigotos para los locus de genes variables de cadena pesada y ligera κ humana que carecen de los genes ADAM6a y ADAM6b de ratón (mADAM6^{-/-}) o que contienen un fragmento genómico ectópico que codifica los genes ADAM6a y ADAM6b del ratón (ADAM6^{+/-}; véase el Ejemplo 1) mediante un ensayo de PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN[™] (como se describe anteriormente).

En resumen, Los linfocitos B CD19⁺ se purificaron del bazo de ratones mADAM6^{-/-} y ADAM6^{+/-} usando microperlas CD19 de ratón (Miltenyi Biotec) y el ARN total se purificó usando el Mini kit RNEASY[™] (Qiagen). El ARN genómico se eliminó usando un tratamiento en columna con DNase sin RNase (Qiagen). Aproximadamente 200 ng de ARNm se transcribieron inversamente en ADNc usando el kit de Síntesis de ADNc First Stand (Invitrogen) y después se amplificaron con la Mezcla Maestra Universal de PCR TAQMAN[™] (Applied Biosystems) usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI 7900 (Applied Biosystems). La expresión relativa de cada gen se normalizó a la constante κ de ratón (mCk). La Tabla 9 expone las combinaciones de sondas en sentido/antisentido/TAQMAN[™] MGB utilizadas en este experimento.

Tabla 9

V _H Humana	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
V _H 6-1	En sentido: CAGGT ACAGCTGCAGCAGTCA	6
	Anti sentido: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA	7
	Sonda: TCCAGGACTGGTGAAGC	8
V _H 1-2	En sentido: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT	9
	Anti sentido: GAGAACACAGAAGTGGATGAGATC	10
	Sonda: TGAGTCCAGTCCAGGGA	11
V _H 3-23	En sentido: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG	12
	Anti sentido: AACCTGGTCAGAACTGCCA	13
	Sonda: AGAGAAACAGTGGATACGT	14
V _H 1-69	En sentido: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG	15
	Anti sentido: GCTCGTGGATTTGTCCGC	16
	Sonda: CAGAGTCACGATTACC	17

(continuación)

V _H Humana	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
mCk	En sentido: TGAGCAGCACCTCACGTT	18
	Anti sentido: GTGGCCTCACAGGTATAGCTGTT	19
	Sonda: ACCAAGGACGAGTATGAA	20

En este experimento, se observó la expresión de los cuatro genes V_H humanos en las muestras analizadas. Adicionalmente, los niveles de expresión fueron comparables entre los ratones mADAM6^{-/-} y ADAM6^{+/+}. Estos resultados demuestran que los genes V_H humanos que eran distales al sitio de modificación (V_H3-23 y V_H1-69) y proximales al sitio de modificación (V_H1-2 y V_H6-1) fueron capaces de recombinarse para formar una cadena pesada humana expresada funcionalmente. Estos resultados demuestran que el fragmento genómico ectópico que comprende las secuencias ADAM6a y ADAM6b de ratón insertadas en una secuencia genómica de cadena pesada humana no afectó la recombinación V(D)J de segmentos génicos de cadena pesada humana dentro del locus, y estos ratones son capaces de recombinar segmentos génicos de cadena pesada humana de manera normal para producir proteínas funcionales de cadena pesada de inmunoglobulina.

Ejemplo X

Identificación de Regiones Variables de Cadena Pesada Humana que se Asocian con Regiones Variables de Cadena Ligera Humana Seleccionadas

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

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

Se inmunizó un ratón VELOCIMMUNE® humanizado con un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis (Antígeno C) y se aislaron y secuenciaron anticuerpos humanos específicos de antígeno para el uso del gen V usando técnicas convencionales reconocidas en la técnica. Los anticuerpos seleccionados se clonaron en regiones constantes de cadena pesada y ligera humana y se seleccionaron 69 cadenas pesadas para emparejar con una de tres cadenas ligeras humanas: (1) la cadena ligera κ afín unida a una región constante κ humana, (2) una Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada unida a una región constante κ humana, o (3) una Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada unida a una región constante κ humana. Cada par de cadena pesada y cadena ligera se cotransfectó en células CHO-K1 usando técnicas convencionales. La presencia de anticuerpos en el sobrenadante se detectó mediante anti-IgG humana en un ensayo ELISA. El título de anticuerpos (ng/ml) se determinó para cada par de cadena pesada/cadena ligera y los títulos con las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal reordenadas se compararon con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo precursora (es decir, cadena pesada emparejada con cadena ligera afín) y se calculó porcentaje del título natural (Tabla 10). V_H: Gen variable de cadena pesada. ND: expresión no detectada en las condiciones experimentales actuales.

Tabla 10

V _H	Título de Anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje de Título Natural	
	CL afín	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-15	63	23	11	36,2	17,5
1-2	103	53	ND	51,1	-
3-23	83	60	23	72,0	27,5
3-33	15	77	ND	499,4	-

(continuación)

V _H	Título de Anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje de Título Natural	
	CL afín	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ 1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
4-31	22	69	17	309,4	76,7
3-7	53	35	28	65,2	53,1
-	22	32	19	148,8	89,3
1-24	3	13	ND	455,2	-
3-33	1	47	ND	5266,7	-
3-33	58	37	ND	63,1	-
-	110	67	18	60,6	16,5
3-23	127	123	21	96,5	16,3
3-33	28	16	2	57,7	7,1
3-23	32	50	38	157,1	119,4
-	18	45	18	254,3	101,7
3-9	1	30	23	2508,3	1900,0
3-11	12	26	6	225,9	48,3
1-8	16	ND	13	-	81,8
3-33	54	81	10	150,7	19,1
-	34	9	ND	25,9	-
3-20	7	14	54	203,0	809,0
3-33	19	38	ND	200,5	-
3-11	48	ND	203	-	423,6
-	11	23	8	212,7	74,5
3-33	168	138	182	82,0	108,2
3-20	117	67	100	57,5	86,1
3-23	86	61	132	70,7	154,1
3-33	20	12	33	60,9	165,3
4-31	69	92	52	133,8	75,0
3-23	87	78	62	89,5	71,2
1-2	31	82	51	263,0	164,6
3-23	53	93	151	175,4	285,4
-	11	8	17	75,7	151,4
3-33	114	36	27	31,6	23,4
3-15	73	39	44	53,7	59,6
3-33	1	34	16	5600,0	2683,3
3-9	58	112	57	192,9	97,6
3-33	67	20	105	30,1	157,0
3-33	34	21	24	62,7	70,4
3-20	10	49	91	478,4	888,2
3-33	66	32	25	48,6	38,2
3-23	17	59	56	342,7	329,8
-	58	108	19	184,4	32,9
-	68	54	20	79,4	29,9
3-33	42	35	32	83,3	75,4
-	29	19	13	67,1	43,9
3-9	24	34	29	137,3	118,4
3-30/33	17	33	7	195,2	43,1
3-7	25	70	74	284,6	301,6
3-33	87	127	ND	145,1	-
6-1	28	56	ND	201,8	-

(continuación)

V _H	Título de Anticuerpos (ng/ml)			Porcentaje de Título Natural	
	CL afin	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-33	56	39	20	69,9	36,1
3-33	10	53	1	520,6	6,9
3-33	20	67	10	337,2	52,3
3-33	11	36	18	316,8	158,4
3-23	12	42	32	356,8	272,9
3-33	66	95	15	143,6	22,5
3-15	55	68	ND	123,1	-
-	32	68	3	210,9	10,6
1-8	28	48	ND	170,9	-
3-33	124	192	21	154,3	17,0
3-33	0	113	ND	56550,0	-
3-33	10	157	1	1505,8	12,5
3-33	6	86	15	1385,5	243,5
3-23	70	115	22	163,5	31,0
3-7	71	117	21	164,6	29,6
3-33	82	100	47	122,7	57,1
3-7	124	161	41	130,0	33,5

En un experimento similar, Los ratones VELOCIMMUNE® humanizados se inmunizaron con varios antígenos diferentes y se evaluó la capacidad de las cadenas pesadas seleccionadas de anticuerpos humanos específicos de antígeno para emparejarse con diferentes cadenas ligeras de línea germinal humana reordenadas (como se describe anteriormente). Los antígenos utilizados en este experimento incluyeron una enzima implicada en la homeostasis del colesterol (Antígeno A), una hormona sérica implicada en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Antígeno B), un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis (Antígeno C) y un receptor de la superficie celular (Antígeno D). Se aislaron anticuerpos específicos de antígeno de ratones de cada grupo de inmunización y se clonaron y secuenciaron las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera. A partir de la secuencia de las cadenas pesadas y ligeras, se determinó el uso del gen V y las cadenas pesadas seleccionadas se emparejaron con su cadena ligera afin o una región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada. Cada par de cadena pesada/ligera se cotransfectó en células CHO-K1 y la presencia de anticuerpo en el sobrenadante se detectó mediante anti-IgG humana en un ensayo ELISA. El título de anticuerpos (μg/ml) se determinó para cada emparejamiento de cadena pesada/cadena ligera y los títulos con las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humanas reordenadas se compararon con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo precursora (es decir, cadena pesada emparejada con cadena ligera afin) y se calculó porcentaje del título natural (Tabla 11). V_H: Gen variable de cadena pesada. Vκ: gen variable de la cadena ligera κ. ND: expresión no detectada en las condiciones experimentales actuales.

Tabla 11

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

(continuación)

Antígeno	Anticuerpo	V _H	V _K	Título (µg/ml)			Porcentaje de Título Natural
				V _H sola	V _H + V _K	V _H + V _K 1-39Jk5	
	624	3-23	1-17	0,3	5,0	3,9	79
	284	3-30	1-17	0,3	4,6	3,4	75
	653	3-33	1-17	0,3	4,3	0,3	7
	268	4-34	1-27	0,3	5,5	3,8	69
	633	4-34	1-27	0,6	6,9	3,0	44
C	730	3-7	1-5	0,3	1,1	2,8	249
	728	3-7	1-5	0,3	2,0	3,2	157
	691	3-9	3-20	0,3	2,8	3,1	109
	749	3-33	3-15	0,3	3,8	2,3	62
	750	3-33	1-16	0,3	3,0	2,8	92
	724	3-33	1-17	0,3	2,3	3,4	151
	706	3-33	1-16	0,3	3,6	3,0	84
	744	1-18	1-12	0,4	5,1	3,0	59
	696	3-11	1-16	0,4	3,0	2,9	97
	685	3-13	3-20	0,3	0,5	3,4	734
	732	3-15	1-17	0,3	4,5	3,2	72
	694	3-15	1-5	0,4	5,2	2,9	55
	743	3-23	1-12	0,3	3,2	0,3	10
	742	3-23	2-28	0,4	4,2	3,1	74
	693	3-23	1-12	0,5	4,2	4,0	94
D	136	3-23	2-28	0,4	5,0	2,7	55
	155	3-30	1-16	0,4	1,0	2,2	221
	163	3-30	1-16	0,3	0,6	3,0	506
	171	3-30	1-16	0,3	1,0	2,8	295
	145	3-43	1-5	0,4	4,4	2,9	65
	49	3-48	3-11	0,3	1,7	2,6	155
	51	3-48	1-39	0,1	1,9	0,1	4
	159	3-7	6-21	0,4	3,9	3,6	92
	169	3-7	6-21	0,3	1,3	3,1	235
	134	3-9	1-5	0,4	5,0	2,9	58
	141	4-31	1-33	2,4	4,2	2,6	63
	142	4-31	1-33	0,4	4,2	2,8	67

Los resultados obtenidos de estos experimentos demuestran que las cadenas pesadas de alta afinidad con mutaciones somáticas de diferentes familias de genes pueden emparejarse con las regiones V_K1-39Jk5 y V_K3-20Jk1 reordenadas de la línea germinal humana y secretarse de la célula como una molécula de anticuerpo normal. Tal como se muestra en la Tabla 10, el título de anticuerpos se incrementó en aproximadamente el 61 % (42 de 69) de las cadenas pesadas cuando se emparejó con la cadena ligera V_K1-39Jk5 humana reordenada y aproximadamente el 29 % (20 de 69) de las cadenas pesadas cuando se emparejó con la cadena ligera V_K3-20Jk1 humana reordenada en comparación con la cadena ligera afin del anticuerpo precursor. Para aproximadamente el 20 % (14 de 69) de las cadenas pesadas, ambas cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas confieren un aumento en la expresión en comparación con la cadena ligera afin del anticuerpo precursor. Tal como se muestra en la Tabla 11, la región V_K1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada confirió un aumento en la expresión de varias cadenas pesadas específicas para una gama de diferentes clases de antígenos en comparación con la cadena ligera afin para los anticuerpos precursores. El título de anticuerpos aumentó más de dos veces en aproximadamente el 35 % (15/43) de las cadenas pesadas en comparación con la cadena ligera afin de los anticuerpos precursores. Para dos cadenas pesadas (315 y 316), el aumento fue mayor de diez veces en comparación con el anticuerpo precursor. Dentro de todas las cadenas pesadas que mostraron un aumento de la expresión en relación con la cadena ligera afin del anticuerpo precursor, las cadenas pesadas de la familia tres (V_H3) están sobre representadas en comparación con otras familias de genes de la región variable de cadena pesada. Esto demuestra una relación favorable de las cadenas pesadas V_H3 humanas para emparejarse con las cadenas ligeras V_K1-39Jk5 y V_K3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenadas.

Ejemplo XI**Generación de un Locus de Cadena Ligera de la Línea Germinal Humana Reordenada**

Se produjeron varios vectores de direccionamiento de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659) para modificar los clones 302 g12 y 254m04 del Cromosoma Artificial Bacteriano genómico de ratón (BAC) (Invitrogen). Usando estos dos clones BAC, las construcciones genómicas se modificaron por ingeniería para contener una única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada y se insertaron en un locus de cadena ligera κ endógeno que se modificó previamente para suprimir los segmentos génicos variables de κ endógena y de unión.

Construcción de Vectores de Direccionamiento de Cadena Ligera de la Línea Germinal Humana Reordenada.

Se realizaron tres regiones diferentes de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada utilizando técnicas convencionales de biología molecular reconocidas en la técnica. Los segmentos de genes variables humanos utilizados para construir estas tres regiones incluyeron la secuencia Vk1-39Jk5 humana reordenada, una secuencia Vk3-20Jk1 humana reordenada y una secuencia VpreBJL5 reordenada.

Se realizó un segmento de ADN que contiene el exón 1 (que codifica el péptido líder) y el intrón 1 del gen Vk3-7 de ratón mediante síntesis de ADN *de novo* (Integrated DNA Technologies). Se incluyó parte de la región 5' no traducida hasta un sitio de enzima de restricción BlnI de origen natural. Los exones de los genes Vk1-39 y Vk3-20 humanos se amplificaron por PCR a partir de bibliotecas BAC genómicas humanas. Los cebadores directos tenían una extensión 5' que contenía el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 1 del gen Vk3-7 de ratón. El cebador inverso usado para la PCR de la secuencia Vk1-39 humana incluyó una extensión que codifica Jk5 humana, mientras que el cebador inverso usado para la PCR de la secuencia Vk3-20 humana incluyó una extensión que codifica Jk1 humana. La secuencia humana VpreBJL5 se realizó mediante síntesis de ADN *de novo* (Tecnologías de ADN integradas). Una porción del intrón humano Jk-Ck que incluye el sitio donante de corte empalme se amplificó por PCR a partir del plásmido pBS-296-HA18-PISceI. El cebador de PCR directo incluía una parte que codifica la extensión de una secuencia Jk5, Jk1 o Jλ5 humana. El cebador inverso incluía un sitio PISceI, que fue previamente modificar por ingeniería en el intrón.

El exón1/intrón 1 de Vk3-7 de ratón, los exones de cadena ligera variable humana y los fragmentos de intrón Jk-Ck humanos se acoplaron juntos mediante PCR de extensión solapada, se digirieron con BlnI y PISceI, y se unieron en el plásmido pBS-296-HA18-PISceI, que contenía el promotor del segmento de gen variable Vk3-15 humano. Un casete de higromicina con lox dentro del plásmido pBS-296-HA18-PISceI se reemplazó con un casete de higromicina FRT flanqueado por los sitios NotI y Ascl. El fragmento NotI/PISceI de este plásmido se unió a BAC 254m04 de ratón modificado, que contenía parte del intrón Jk-Ck de ratón, el exón Ck de ratón y aproximadamente 75 kb de secuencia genómica cadena abajo del locus κ de ratón que proporcionó un brazo de homología 3' para recombinación homóloga en células ES de ratón. El fragmento NotI/Ascl de este BAC se unió después a BAC 302 g12 de ratón modificado, que contenía un casete de neomicina FRT flanqueado y aproximadamente 23 kb de secuencia genómica cadena arriba del locus κ endógeno para la recombinación homóloga en células ES de ratón.

Vector de Direccionamiento de Vk1-39Jk5 de la Línea Germinal Humana Reordenada (FIG. 19).

Se introdujeron sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de un inserto de cadena ligera modificado por ingeniería para clonar en un vector de direccionamiento: un sitio Ascl en el extremo 5' y un sitio PISceI en el extremo 3'. Dentro del sitio 5'Ascl y el sitio 3' PISceI, la construcción de direccionamiento de 5' a 3' incluía un brazo de homología 5' que contiene la secuencia 5' al locus de cadena ligera κ de ratón endógeno obtenido del clon 302 g12 BAC de ratón, un gen de resistencia a la neomicina FRT flanqueado, una secuencia genómica incluyendo el promotor Vk3-15 humano, una secuencia líder del segmento de gen variable Vk3-7 de ratón, una secuencia intrónica del segmento de gen variable Vk3-7 de ratón, un marco de lectura abierto de una región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón Jk-Ck humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia 3' del segmento del gen Jk5 de ratón endógeno obtenido del clon BAC 254m04 de ratón (Figura 19, centro). Los genes y/o secuencias cadena arriba del locus de la cadena ligera κ de ratón endógeno y cadena abajo del segmento del gen Jk más 3' (p. ej., el potenciador 3' endógeno) no se modificaron mediante la construcción de direccionamiento (véase Figura 19). La secuencia del locus Vk1-39Jk5 humano modificado por ingeniería se muestra en la SEQ ID NO: 59.

La inserción dirigida de la región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada en el ADN de BAC se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores ubicados en secuencias dentro de la región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia intrónica 3' a la secuencia líder Vk3-7 de ratón se confirmó con los cebadores ULC-m1F (AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG; SEQ ID NO:60) y ULC-m1R (TGACAAATGC CTAATTATAGTGATCA; SEQ ID NO:61). El marco de lectura abierto de la

región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1633-h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A; SEQ ID NO:62) y 1633-h2R (TGCAAACCTGG ATGCAGCATA G; SEQ ID NO:63). El casete de neomicina se confirmó con cebadores neoF (gggtgagagg ctattcggc; SEQ ID NO:64) y neoR (gaacacggcg gcatcag; SEQ ID NO:65). Después se usó ADN de BAC dirigido para someter a electroporación células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresan una región Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones positivos de células ES se confirmaron mediante exploración y cariotipificación Taqman™ usando sondas específicas para la región Vk1-39Jk5 de la cadena ligera modificada por ingeniería insertada en el locus endógeno. En resumen, la sonda neoP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; SEQ ID NO:66) que se une dentro del gen marcador de neomicina, sonda ULC-m1P (CCATTATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC; SEQ ID NO:67) que se une dentro de la secuencia intrónica 3' a la secuencia líder Vk3-7 de ratón, y la sonda 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT; SEQ ID NO:68) que se une dentro del marco de lectura abierto de Vk1-39Jk5 de la línea germinal humana reordenada. Después se usaron clones de células ES positivas para implantar en ratones hembra para dar lugar a una camada de cachorros que expresaban la región Vk1-39Jk5 de cadena ligera de la línea germinal.

Alternativamente, las células ES que llevan la región Vk1-39Jk5 de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se transfectan con una construcción que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina FRT flanqueado introducido por la construcción de direccionamiento. Opcionalmente, el casete de neomicina se elimina cruzando con ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se conserva en los ratones.

Vector de Direccionamiento de Vk3-20Jk1 de la Línea Germinal Humana Reordenada (FIG. 20).

De manera similar, se realizó un locus de cadena ligera modificado por ingeniería que expresa una región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada utilizando una construcción de direccionamiento incluyendo, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contiene la secuencia 5' al locus de cadena ligera κ de ratón endógeno obtenido del clon BAC 302 g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina FRT flanqueado, una secuencia genómica incluyendo el promotor Vk3-15 humano, una secuencia líder del segmento de gen variable Vk3-7 de ratón, una secuencia intrónica del segmento de gen variable Vk3-7 de ratón, un marco de lectura abierto de una región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón Jk-C κ humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia 3' del segmento del gen Jk5 de ratón endógeno obtenido del clon 254m04 BAC de ratón (Figura 20, centro). La secuencia del locus Vk3-20Jk1 humano modificado por ingeniería se muestra en la SEQ ID NO: 69.

La inserción dirigida de la región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada en el ADN de BAC se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores ubicados en secuencias dentro de la región Vk3-20Jk1 de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia intrónica 3' a la secuencia líder Vk3-7 de ratón se confirmó con los cebadores ULC-m1F (SEQ ID NO: 60) y ULC-m1R (SEQ ID NO: 61). El marco de lectura abierto de la región Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; SEQ ID NO: 70) y 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; SEQ ID NO: 71). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEQ ID NO: 64) y neoR (SEQ ID NO: 65). Después se usó ADN de BAC dirigido para someter a electroporación células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresan la cadena ligera Vk3-20Jk1 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones positivos de células ES se confirmaron mediante exploración y cariotipificación Taqman™ usando sondas específicas para la región Vk3-20Jk1 de la cadena ligera modificada por ingeniería insertada en el locus de cadena ligera κ endógeno. En resumen, sonda neoP (SEQ ID NO:66) que se une dentro del gen marcador de neomicina, sonda ULC-m1P (SEQ ID NO: 67) que se une dentro de la secuencia líder Vk3-7 de ratón y sonda 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG; SEQ ID NO: 72) que se une dentro del marco de lectura abierto de Vk3-20Jk1 humana. Los clones positivos de células ES se usaron para implantar ratones hembra. Una camada de cachorros que expresan la región Vk3-20Jk1 de la cadena ligera de la línea germinal humana.

Alternativamente, las células ES que llevan la región Vk3-20Jk1 de cadena ligera de la línea germinal humana se pueden transfectar con una construcción que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina FRT flanqueado introducido por la construcción de direccionamiento. Opcionalmente, el casete de neomicina puede eliminarse cruzando con ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se conserva en los ratones.

Vector de Direccionamiento de VpreBJ λ 5 de la Línea Germinal Humana Reordenada (FIG. 21).

De forma similar, se realizó un locus de cadena ligera modificado por ingeniería que expresa una región VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada utilizando una construcción de direccionamiento incluyendo, de 5' a 3', un brazo de homología 5' que contiene la secuencia 5' al locus de cadena ligera κ de ratón endógeno obtenido del clon BAC 302 g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina FRT flanqueado, una secuencia genómica incluyendo el

promotor Vk3-15 humano, una secuencia líder del segmento de gen variable Vk3-7 de ratón, una secuencia intrónica del segmento de gen variable Vk3-7 de ratón, un marco de lectura abierto de una región VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón J κ -C κ humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia 3' del segmento del gen J κ 5 de ratón endógeno obtenido del clon 254m04 BAC de ratón (Figura 21, centro). La secuencia del locus VpreBJ λ 5 humano modificado por ingeniería se muestra en la SEQ ID NO: 73.

La inserción dirigida de la región VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada en el ADN de BAC se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores ubicados en secuencias dentro de la región VpreBJ λ 5 de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia intrónica 3' a la secuencia líder Vk3-7 de ratón se confirmó con los cebadores ULC-m1F (SEQ ID NO: 60) y ULC-m1R (SEQ ID NO: 61). El marco de lectura abierto de la región VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1616-h1 F (TGTCCTCGGC CTTTGA; SEQ ID NO: 74) y 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCT; SEQ ID NO: 75). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEQ ID NO: 64) y neoR (SEQ ID NO: 65). Después se usó ADN de BAC dirigido para someter a electroporación células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresan la cadena ligera VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones positivos de células ES se confirmaron mediante exploración y cariotipificación Taqman™ usando sondas específicas para la región VpreBJ λ 5 de la cadena ligera modificada por ingeniería insertada en el locus de cadena ligera κ endógeno. En resumen, sonda neoP (SEQ ID NO:66) que se une dentro del gen marcador de neomicina, sonda ULC-m1P (SEQ ID NO: 67) que se une dentro de la secuencia líder IgVk3-7 de ratón, y sonda 1616h1P (ACAATCCGCC TCACCTGCAC CCT; SEQ ID NO: 76) que se une dentro del marco de lectura abierto de VpreBJ λ 5 humana. Después se usaron clones de células ES positivas para implantar en ratones hembra para dar lugar a una camada de cachorros que expresaban la región de cadena ligera de la línea germinal.

Alternativamente, las células ES que llevan la región VpreBJ λ 5 de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se transfectan con una construcción que expresa FLP para eliminar el casete de neomicina FRT flanqueado introducido por la construcción de direccionamiento. Opcionalmente, el casete de neomicina se elimina cruzando con ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se conserva en los ratones.

Ejemplo XII

Generación de Ratones que expresan una única cadena ligera humana reordenada

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou y col. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor genotargeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25 (1):91-99. Se identifican ratones VELOCIMICE® que llevan independientemente una región Vk1-39J κ 5 de cadena ligera, una región Vk3-20J κ 1 de cadena ligera o una región VpreBJ λ 5 de cadena ligera de la línea germinal humana modificadas por ingeniería mediante genotipificación utilizando una modificación del ensayo de alelo (Valenzuela *et al.*, *supra*) que detecta la presencia de la única región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

Las crías se genotipan y se selecciona una cría heterocigota u homocigótica para la región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada única para caracterizar la expresión de la región de cadena ligera de línea germinal humana reordenada.

Citometría de Flujo.

La expresión de la región de la cadena ligera humana reordenada en el repertorio de anticuerpos normales de ratones con cadena ligera común se validó mediante análisis de la expresión de inmunoglobulina κ y λ en esplenocitos y sangre periférica de ratones con cadena ligera común. Se realizaron suspensiones de células de bazo cosechados y sangre periférica de ratones tipo silvestre ($n = 5$), heterocigotos de cadena ligera Vk1-39J κ 5 común ($n = 3$), homocigotos de cadena ligera Vk1-39J κ 5 común ($n = 3$), heterocigotos de cadena ligera Vk3-20J κ 1 común ($n = 2$) y homocigotos de cadena ligera Vk3-20J κ 1 común ($n = 2$) usando métodos convencionales y se tiñeron con CD19 $^{+}$, Ig λ^{+} e Ig κ usando anticuerpos marcados con fluorescencia (BD Pharmigen).

En resumen, se incubaron 1×10^6 células con anti-CD16/CD32 de ratón (clon 2.4G2, BD Pharmigen) en hielo durante 10 minutos, seguido de marcado con el siguiente cóctel de anticuerpos durante 30 minutos en hielo: anti-CD19 de ratón conjugado con APC (clon 1D3, BD Pharmigen), anti-CD3 de ratón conjugado con PerCP-Cy5.5 (clon 17A2, BioLegend), anti-Ig κ de ratón conjugado con FITC (clon 187.1, BD Pharmigen), anti-Ig λ de ratón conjugado con PE (clon RML-42, BioLegend). Después de la tinción, las células se lavaron y se fijaron en formaldehído al 2%. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo LSRII y se analizó con FlowJo™. Selección: linfocitos B totales (CD19 $^{+}$ CD3 $^{-}$), linfocitos B Ig κ^{+} (Ig κ^{+} Ig λ^{-} CD19 $^{+}$ CD3 $^{-}$), linfocitos B Ig λ^{+} (Ig κ^{-} Ig λ^{+} CD19 $^{+}$ CD3 $^{-}$). Los datos recopilados de

muestras de sangre y esplenocitos demostraron resultados similares. La Tabla 12 expone el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ positivos de sangre periférica de un ratón representativo de cada grupo que son Igλ⁺, Igκ⁺, o Igλ⁺Igκ⁺. El porcentaje de linfocitos B CD19⁺ en sangre periférica de ratones de tipo silvestre (TS) y homocigotos para la cadena ligera común Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1 se muestra en la FIG. 22.

5

Tabla 12

Genotipo de Ratón	linfocitos B CD19 ⁺		
	Igλ ⁺	Igκ ⁺	Igλ ⁺ Igκ ⁺
tipo silvestre	4,8	93	0,53
Vk 1-39Jk5	1,4	93	2,6
Vk 3-20Jk1	4,2	88	6

Expresión de la Cadena Ligera Común.

- 10 La expresión de cada cadena ligera común (Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1) se analizó en ratones heterocigotos y homocigotos utilizando un ensayo de PCR cuantitativa (por ejemplo, Taqman™).

En resumen, los linfocitos B CD19⁺ se purificaron de los bazo de los ratones de tipo silvestre, homocigotos para un reemplazo de los locus de región variable de cadena pesada y cadena ligera κ de ratón con locus de región variable de cadena pesada y cadena ligera κ humanos correspondientes (Hκ), así como de ratones homocigotos y heterocigotos para cada región de cadena ligera humana reordenada (Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1) usando microperlas CD19 de ratón (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN total se purificó a partir de linfocitos B CD19⁺ usando el mini kit RNeasy™ (Qiagen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y el ARN genómico se eliminó usando un tratamiento en columna con DNasa sin RNasa (Qiagen). Se transcribieron inversamente 200 ng de ARNm en ADNc usando el kit de síntesis de ADNc First Stand (Invitrogen) y el ADNc resultante se amplificó con la Mezcla Maestra Universal de PCR Taqman™ (Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI 7900 (Applied Biosystems) usando cebadores y sondas Taqman™ MGB que abarcan (1) la unión Vk-Jκ para ambas cadenas ligeras comunes, (2) el gen Vk solo (es decir, Vk1-39 y Vk3-20) y (3) la región Cκ de ratón. La Tabla 13 expone las secuencias de los cebadores y las sondas empleadas para este ensayo. La expresión relativa se normalizó a la expresión de la región Cκ de ratón. Los resultados se muestran en las FIG. 23A, 23B y 23C.

Tabla 13

Región	Descripción del Cebador/Sonda (5'-3')	SEQ ID NO:
Unión Vk1-39Jk5	(en sentido) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	77
	(antisentido) GTTTAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	78
	(sonda) CCTCCGATCA CCTTC	79
Vk1-39	(en sentido) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	80
	(antisentido) ATGGGACCCC ACTTTGCA	81
	(sonda) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	82
Unión Vk3-20Jk1	(en sentido) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	83
	(antisentido) TGATTTCCAC CTTGGTCCCT T	84
	(sonda) TAGCTCACCT TGGACGTT	85
Vk3-20	(en sentido) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	86
	(antisentido) GACCCACTGC CACTGAACCT	87
	(sonda) CCACTGGCAT CCC	88
Cκ de ratón	(en sentido) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	89
	(antisentido) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	90
	(sonda) ACCAAGGACG AGTATGAA	91

30 Anticuerpos de Cadena Ligera Común Específicos de Antígeno.

Los ratones con cadena ligera común que portaban una cadena ligera común Vk1-39Jk5 o Vk3-20Jk1 en el locus de cadena ligera κ de ratón endógeno se inmunizaron con β-galactosidasa y se midió el título de anticuerpos.

- 35 En resumen, la β-galactosidasa (Sigma) se emulsionó en adyuvante TITERMAX™ (Sigma), según las instrucciones del fabricante. Los ratones de tipo silvestre (n = 7), los homocigotos de cadena ligera común Vk1-39Jk5 (n = 2) y los homocigotos de cadena ligera común Vk3-20Jk1 (n = 5) se inmunizaron mediante inyección subcutánea con 100 µg de β-galactosidasa/TITERMAX™. Los ratones se sometieron a refuerzo mediante inyección subcutánea dos veces, con 3 semanas de diferencia, con 50 µg de β-galactosidasa/TITERMAX™. Después del segundo refuerzo, se recogió

sangre de ratones anestesiados usando una hemorragia retroorbital en tubos separadores de suero (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Para medir los anticuerpos IgM o IgG anti-p-galactosidasa, las placas ELISA (Nunc) se revistieron con 1 µg/ml de β-galactosidasa durante la noche a 4 °C. El exceso de antígeno se lavó antes de bloquear con PBS con BSA al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones en serie de suero a las placas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente antes del lavado. Las placas se incubaron después con anti-IgM (Southern Biotech) o anti-IgG (Southern Biotech) conjugada con HRP durante una hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado, las placas se desarrollaron con sustrato TMB (BD Biosciences). Las reacciones se detuvieron con ácido sulfúrico 1 N y se leyó la DO₄₅₀ usando un lector de placas Victor X5 (Perkin Elmer). Los datos se analizaron con GRAPHPAD™ Prism y la señal se calculó como la dilución del suero que está dos veces por encima del fondo. Los resultados se muestran en las FIG. 24A y 24B.

Como se muestra en este Ejemplo, la proporción de linfocitos B κ/λ tanto en los compartimientos esplénicos como periféricos de los ratones con cadena ligera común Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 demostró un patrón de tipo casi silvestre (Tabla 12 y FIG. 22). Sin embargo, los ratones con cadena ligera común VpreBJλ5 demostraron menos linfocitos B periféricos, de los cuales aproximadamente el 1-2 % expresan la región de la cadena ligera humana modificada por ingeniería (datos no mostrados). Los niveles de expresión de las regiones Vk1-39Jk5 y Vk3-20Jk1 de la cadena ligera humana reordenada a partir del locus de la cadena ligera κ endógeno se elevaron en comparación con un locus de la cadena ligera κ endógeno que contiene un reemplazo completo de segmentos de genes Vk y Jk de ratón con segmentos génicos Vk y Jk humanos (FIG. 23A, 23B y 23C). Los niveles de expresión de la región VpreBJλ5 de cadena ligera humana reordenada demostraron una alta expresión similar a la del locus de la cadena ligera κ endógeno tanto en ratones heterocigotos como homocigotos (datos no mostrados). Esto demuestra que en competencia directa con los locus endógenos de cadena ligera λ, κ, o ambos, una única secuencia V_L/J_L humana reordenada puede producir mejor que la expresión a nivel de tipo silvestre a partir del locus de cadena ligera κ endógeno y dar lugar la frecuencia normal de linfocitos B esplénicas y en sangre. Adicionalmente, la presencia de un locus de cadena ligera κ modificada por ingeniería que tiene una secuencia Vk1-39Jk5 humana o Vk3-20Jk1 humana fue bien tolerada por los ratones y parece funcionar de forma de tipo silvestre al representar una porción sustancial del repertorio de cadena ligera en el componente humoral de la respuesta inmunitaria (FIG. 24A y 24B).

Ejemplo XIII

Reproducción de Ratones que Expresan una Única Cadena Ligera de la Línea Germinal Humana Reordenada

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

Supresión génica (KO) de Igλ endógena.

Para optimizar el uso del locus de cadena ligera modificado por ingeniería, los ratones que llevan una de las regiones de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se cruzan con otro ratón que contiene una delección en el locus de la cadena ligera λ endógeno. De esta manera, la progenie obtenida expresará, como su única cadena ligera, la región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada como se describe en el Ejemplo 11. El cruce se realiza mediante técnicas convencionales reconocidas en la técnica y, como alternativa, por un criador comercial (por ejemplo, The Jackson Laboratory). Las cepas de ratón que llevan un locus de cadena ligera modificado por ingeniería y una delección del locus de la cadena ligera λ endógeno se exploran para detectar la presencia de la región de cadena ligera única y la ausencia de cadenas ligeras λ de ratón endógenas.

Locus de Cadena Pesada Endógena Humanizada.

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

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

de C_H y C_L humanas en un sistema de expresión adecuado.

Ejemplo XIV

5 Generación de Anticuerpos a partir de Ratones que Expresan Cadenas Pesadas Humanas y una Región de Cadena Ligera de Línea Germinal Humana Reordenada

Después de cruzar ratones que contienen la región de cadena ligera humana modificada por ingeniería con diversas cepas deseables que contienen modificaciones y delecciones de otros locus de Ig endógenos (como se describe en el Ejemplo 12), los ratones seleccionados pueden inmunizarse con un antígeno de interés.

Generalmente, un ratón VELOCIMMUNE® humanizado que contiene una de las regiones de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se expone con un antígeno, y se recuperan las células linfáticas (tal como los linfocitos B) del suero de los animales. Las células linfáticas se fusionan con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos que contienen regiones variables de cadena pesada humana y cadenas ligeras de línea germinal humana reordenadas que son específicas del antígeno utilizado para la inmunización. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas y la cadena ligera se aíslan y se unen a regiones constantes isotípicas deseables de la cadena pesada y la cadena ligera. Debido a la presencia de secuencias endógenas de ratón y cualquier elemento adicional de acción en *cis* presente en el locus endógeno, la única cadena ligera de cada anticuerpo puede estar somáticamente mutada. Esto añade diversidad adicional al repertorio específico de antígeno que comprende una única cadena ligera y diversas secuencias de cadena pesada. Las secuencias de anticuerpos clonadas resultantes se expresan posteriormente en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se identifican directamente a partir de linfocitos específicos de antígeno.

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

Se inmunizaron cohortes separadas de ratones VELOCIMMUNE® humanizados que contienen un reemplazo del locus de cadena pesada de ratón endógeno con segmentos génicos humanos V_H, D_H, y J_H humanos y un reemplazo del locus de cadena ligera κ de ratón endógeno con la región Vk1-39Jk5 de cadena ligera de la línea germinal humana modificada por ingeniería o con la región Vk3-20Jk1 de cadena ligera de la línea germinal humana modificada por ingeniería (descrita anteriormente) con una proteína de receptor de superficie celular humano (Antígeno E). El antígeno E se administra directamente en la almohadilla de la pata trasera de los ratones con seis inyecciones consecutivas cada 3-4 días. Se mezclan de dos a tres microgramos de Antígeno E con 10 µg de oligonucleótido CpG (Número de Cat. oligonucleótido tlr1-modn-ODN1826; InVivogen, San Diego, CA) y 25 µg de Adju-Phos (adyuvante de gel de fosfato de aluminio, número de Cat. H-71639 -250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Dinamarca) antes de la inyección. Se administran un total de seis inyecciones antes del recuerdo con antígeno final, que se administra 3-5 días antes del sacrificio. Las hemorragias después de la cuarta y sexta inyección se recogen y la respuesta inmunitaria del anticuerpo se controla mediante un inmunoensayo convencional específico de antígeno.

Cuando se consiguió una respuesta inmunitaria deseada, se recogieron los esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para conservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar líneas celulares que producen anticuerpos de cadena ligera común específicos de Antígeno E. Usando esta técnica, se obtienen varios anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E específicos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de cadena pesada humana, el mismo dominio variable de cadena ligera humana y dominios constantes de ratón).

Alternativamente, los anticuerpos anti antígeno E de cadena ligera común se aíslan directamente de los linfocitos B positivos para antígeno sin fusión a las células de mieloma, como se describe en el documento U.S. 2007/0280945A1. Usando este método, Se obtuvieron varios anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E completamente humanos (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de cadena pesada humana, ya sea una región Vk1-39Jk5 de cadena ligera humana modificada por ingeniería o una región Vk3-20Jk1 de cadena ligera humana modificada por ingeniería, y dominios constantes humanos).

Las propiedades biológicas de los ejemplos de anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E generados de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen en detalle a continuación.

65 Ejemplo XV

Uso de Segmentos Génicos de Cadena Pesada en Anticuerpos de Cadena Ligera Común Específicos de Antígeno

- 5 Para analizar la estructura de los anticuerpos de cadena ligera humana anti Antígeno E producidos, se clonaron y secuenciaron ácidos nucleicos que codifican regiones variables de anticuerpos de cadena pesada. A partir de las secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos predichas de los anticuerpos, se identificó el uso de genes para la región variable de la cadena pesada (HCVR por sus siglas en inglés) de anticuerpos de cadena ligera común seleccionados obtenidos de ratones VELOCIMMUNE® humanizados inmunizados que contienen la región
- 10 Vκ1-39Jκ5 de cadena ligera humana modificada por ingeniería o la región Vκ3-20Jκ1 de cadena ligera humana modificada por ingeniería. Los resultados se muestran en las Tablas 14 y 15, que demuestran que los ratones de acuerdo con la invención generan anticuerpos de cadena ligera común específicos de antígeno a partir de una variedad de segmentos génicos de cadena pesada humana, debido a una variedad de reordenamientos, cuando emplean un
- 15 ratón que expresa una cadena ligera únicamente de una cadena ligera derivada de Vκ1-39 humana o de Vκ3-20. Los segmentos del gen V_H humano de las familias 2, 3, 4 y 5 se reordenaron con una variedad de segmentos D_H humanos y segmentos J_H humanos para producir anticuerpos específicos de antígeno.

Tabla 14
Vκ1-39Jκ5
Anticuerpo con Cadena Ligera Común

Anticuerpo	HCVR			Anticuerpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
2952	2-5	6-6	1	6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1	6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1	2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5	2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4	3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4	3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4	5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4	6002	3-30	6-13	4
6011	3-23	7-27	4	6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4	6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4	6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4	6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4	6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4	6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4	6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4	6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4	6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4	2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4	2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5	2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5	3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5	3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2	3020	3-30	7-27	4
3013	3-30	5-12	4	3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4	3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1	3030	3-30	7-27	4
3043	3-30	6-6	3	3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4	5997	3-30	7-27	4
2949	3-30	6-6	5	6033	3-30	7-27	4
2950	3-30	6-6	5	3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5	6028	3-30	7-27	6

(continuación)

Vk1-39Jk5 Anticuerpo con Cadena Ligera Común							
Anticuerpo	HCVR			Anticuerpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
2978	3-30	6-6	5	3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5	3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5	6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5	6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5	6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5	6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5	6037	4-59	3-16	3
6004	3-30	6-6	5	2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5	3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5	3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5	6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5	6006	1-69	6-6	5
6023	3-30	6-6	5	6008	1-69	6-13	4

Tabla 15

Vk3-20Jk1 Anticuerpo con Cadena Ligera Común							
Anticuerpo	HCVR			Anticuerpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
5989	3-30	3-3	3	5992	4-39	1-26	3
5994	3-33	1-7	4	2975	5-51	6-13	5
5985	3-33	2-15	4	2972	5-51	3-16	6
5987	3-33	2-15	4	5986	5-51	3-16	6
5995	3-33	2-15	4	5993	5-51	3-16	6
2968	4-39	1-26	3	5996	5-51	3-16	6
5988	4-39	1-26	3	5984	3-53	1-1	4
5990	4-39	1-26	3				

Ejemplo XVI

5

Determinación de la Capacidad de Bloqueo de Anticuerpos de Cadena Ligera Común Específicos de Antígeno Mediante Ensayo LUMINEX™

10

Noventa y ocho anticuerpos de cadena ligera común humana producidos contra el Antígeno E se analizaron para determinar su capacidad para bloquear la unión del ligando natural del Antígeno E (Ligando Y) al Antígeno E en un ensayo basado en perlas.

15

El dominio extracelular (ECD por sus siglas en inglés) del antígeno E se conjugó con dos etiquetas de epítipo myc y una etiqueta de histidina 6X (antígeno E-mmH) y se acopló con amina a microesferas carboxiladas a una concentración de 20 µg/ml en tampón MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente seguido de la desactivación de las perlas con Tris 1 M pH 8,0 seguido de lavado en PBS con Tween-20 al 0,05 % (v/v). Después se bloquearon las perlas con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 2 % (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa de filtro de 96 pocillos, los sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común específicos de Antígeno E, se diluyeron 1:15 en tampón. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante simulado con los mismos componentes de medios que para el sobrenadante de anticuerpo. Se añadieron perlas marcadas con Antígeno E a los sobrenadantes y se incubaron durante la noche a 4 °C. La proteína de ligando Y biotinilado se añadió a una concentración final de 0,06 nM y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Se determinó la detección de ligando Y biotinilado unido a perlas marcadas con antígeno E-myc-myc-6HIS con R-ficoeritrina conjugada con Estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD) seguido de medición en un analizador basado en citometría de flujo LUMINEX™. Se restó la Intensidad de Fluorescencia Media de Fondo (MFI por sus siglas en inglés) de una muestra sin Ligando Y de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo se calculó dividiendo la MFI restada del fondo de cada muestra por entre el valor de control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el

20

25

valor resultante de 100.

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

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

Las tablas 16 y 17 muestran el porcentaje de bloqueo para los 98 anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E probados en ambos ensayos LUMINEX™. ND: no determinado en las condiciones experimentales actuales.

Tabla 16

**Vk 1-39Jk5
Anticuerpo con Cadena Ligera Común**

Anticuerpo	% de Bloqueo de Perlas Marcadas con Antígeno E	% de bloqueo del Antígeno E en Solución
2948	81,1	47,8
2948G	38,6	ND
2949	97,6	78,8
2949G	97,1	73,7
2950	96,2	81,9
2950G	89,8	31,4
2952	96,1	74,3
2952G	93,5	39,9
2954	93,7	70,1
2954G	91,7	30,1
2955	75,8	30,0
2955G	71,8	ND
2964	92,1	31,4
2964G	94,6	43,0
2978	98,0	95,1
2978G	13,9	94,1
2982	92,8	78,5
2982G	41,9	52,4
2985	39,5	31,2
2985G	2,0	5,0
2987	81,7	67,8
2987G	26,6	29,3
2996	87,3	55,3
2996G	95,9	38,4
2997	93,4	70,6
2997G	9,7	7,5

(continuación)

Vk 1-39Jk5		
Anticuerpo con Cadena Ligera Común		
Anticuerpo	% de Bloqueo de Perlas Marcadas con Antígeno E	% de bloqueo del Antígeno E en Solución
3004	79,0	48,4
3004G	60,3	40,7
3005	97,4	93,5
3005G	77,5	75,6
3010	98,0	82,6
3010G	97,9	81,0
3011	87,4	42,8
3011G	83,5	41,7
3012	91,0	60,8
3012G	52,4	16,8
3013	80,3	65,8
3013G	17,5	15,4
3014	63,4	20,7
3014G	74,4	28,5
3015	89,1	55,7
3015G	58,8	17,3
3016	97,1	81,6
3016G	93,1	66,4
3017	94,8	70,2
3017G	87,9	40,8
3018	85,4	54,0
3018G	26,1	12,7
3019	99,3	92,4
3019G	99,3	88,1
3020	96,7	90,3
3020G	85,2	41,5
3021	74,5	26,1
3021G	81,1	27,4
3022	65,2	17,6
3022G	67,2	9,1
3023	71,4	28,5
3023G	73,8	29,7
3024	73,9	32,6
3024G	89,0	10,0
3025	70,7	15,6
3025G	76,7	24,3
3027	96,2	61,6
3027G	98,6	75,3
3028	92,4	29,0
3028G	87,3	28,8
3030	6,0	10,6
3030G	41,3	14,2
3032	76,5	31,4
3032G	17,7	11,0
3033	98,2	86,1
3033G	93,6	64,0

(continuación)

Vk 1-39Jk5 Anticuerpo con Cadena Ligera Común		
Anticuerpo	% de Bloqueo de Perlas Marcadas con Antígeno E	% de bloqueo del Antígeno E en Solución
3036	74,7	32,7
3036G	90,1	51,2
3041	95,3	75,9
3041G	92,4	51,6
3042	88,1	73,3
3042G	60,9	25,2
3043	90,8	65,8
3043G	92,8	60,3

Tabla 17

Vk 3-20Jk1 Anticuerpo con Cadena Ligera Común		
Anticuerpo	% de Bloqueo de Perlas Marcadas con Antígeno E	% de bloqueo del Antígeno E en Solución
2968	97,1	73,3
2968G	67,1	14,6
2969	51,7	20,3
2969G	37,2	16,5
2970	92,2	34,2
2970G	92,7	27,2
2971	23,4	11,6
2971G	18,8	18,9
2972	67,1	38,8
2972G	64,5	39,2
2973	77,7	27,0
2973G	51,1	20,7
2974	57,8	12,4
2974G	69,9	17,6
2975	49,4	18,2
2975G	32,0	19,5
2976	1,0	1,0
2976G	50,4	20,4

En el primer experimento LUMINEX™ descrito anteriormente, se probaron 80 anticuerpos de cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada por ingeniería para determinar su capacidad para bloquear la unión del Ligando Y a las perlas marcadas con Antígeno E. De estos 80 anticuerpos de cadena ligera común, 68 demostraron > 50 % de bloqueo, mientras que 12 demostraron <50 % de bloqueo (6 de 25-50 % de bloqueo y 6 de <25 % de bloqueo). Para los 18 anticuerpos de cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada por ingeniería, 12 demostraron > 50 % de bloqueo, mientras que 6 demostraron <50 % de bloqueo (3 de 25-50 % de bloqueo y 3 de <25 % de bloqueo) de la unión del Ligando Y a perlas marcadas con Antígeno E.

En el segundo experimento LUMINEX™ descrito anteriormente, se probaron los mismos 80 anticuerpos de cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada por ingeniería para determinar su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a las perlas marcadas con Ligando Y. De estos 80 anticuerpos de cadena ligera común, 36 demostraron > 50 % de bloqueo, mientras que 44 demostraron <50 % de bloqueo (27 de 25-50 % de bloqueo y 17 de <25 % de bloqueo). Para los 18 anticuerpos de cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada por ingeniería, 1 demostraron > 50 % de bloqueo, mientras que 17 demostraron <50 % de bloqueo (5 de 25-50 % de bloqueo y 12 de <25 % de bloqueo) de la unión del Antígeno E a las perlas marcadas con Ligando Y.

Los datos de las Tablas 16 y 17 establecen que los reordenamientos descritos en las Tablas 14 y 15 generaron anticuerpos de cadena ligera común específicos de Antígeno E que bloquearon la unión del Ligando Y a su receptor afín Antígeno E con diversos grados de eficacia, lo cual es consistente con los anticuerpos de cadena ligera común

anti Antígeno E de las Tablas 14 y 15 que comprenden anticuerpos con especificidad de epítipo solapante y no solapante con respecto al Antígeno E.

Ejemplo XVII

Determinación de la Capacidad de Bloqueo de Anticuerpos de Cadena Ligera Común Específicos de Antígeno Mediante ELISA

Los anticuerpos de cadena ligera humana común producidos contra el Antígeno E se analizaron para determinar su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a una superficie recubierta con Ligando Y en un ensayo ELISA.

El ligando Y se recubrió sobre placas de 96 pocillos a una concentración de 2 µg/ml diluido en PBS y se incubó durante la noche seguido de lavado cuatro veces en PBS con Tween-20 al 0,05 %. Después se bloqueó la placa con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía BSA al 0,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) durante una hora a temperatura ambiente. En una placa separada, los sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E se diluyeron 1:10 en tampón. Se usó un sobrenadante simulado con los mismos componentes de los anticuerpos como control negativo. El antígeno E-mmH (descrito anteriormente) se añadió a una concentración final de 0,150 nM y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla de anticuerpo/Antígeno E-mmH se añadió después a la placa que contenía el Ligando Y y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La detección del antígeno E-mmH unido al Ligando Y se determinó con Peroxidasa de Rábano Picante (HRP) conjugada con el anticuerpo anti-Penta-His (Qiagen, Valencia, CA) y se desarrolló por respuesta colorimétrica convencional usando sustrato de tetrametilbencidina (TMB) (BD Biosciences, San José, CA) neutralizado por ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó a DO450 durante 0,1 segundos. Se restó absorbancia de fondo de una muestra sin Antígeno E de todas las muestras. El porcentaje de bloqueo se calculó dividiendo la MFI restada del fondo de cada muestra por entre el valor de control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante de 100.

Las tablas 18 y 19 muestran el porcentaje de bloqueo para los 98 anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E probados en el ensayo ELISA. ND: no determinado en las condiciones experimentales actuales.

Tabla 18

Vk 1-39Jk5			
Anticuerpo con Cadena Ligera Común			
Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en Solución	Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en Solución
2948	21,8	3015	23,7
2948G	22,9	3015G	10,2
2949	79,5	3016	78,1
2949G	71,5	3016G	37,4
2950	80,4	3017	61,6
2950G	30,9	3017G	25,2
2952	66,9	3018	40,6
2952G	47,3	3018G	14,5
2954	55,9	3019	94,6
2954G	44,7	3019G	92,3
2955	12,1	3020	80,8
2955G	25,6	3020G	ND
2964	34,8	3021	7,6
2964G	47,7	3021G	20,7
2978	90,0	3022	2,4
2978G	90,2	3022G	15,0
2982	59,0	3023	9,1
2982G	20,4	3023G	19,2
2985	10,5	3024	7,5
2985G	ND	3024G	15,2
2987	31,4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13,9
2996	29,3	3027	61,4

(continuación)

Vk 1-39Jk5			
Anticuerpo con Cadena Ligera Común			
Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en Solución	Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en Solución
2996G	ND	3027G	82,7
2997	48,7	3028	40,3
2997G	ND	3028G	12,3
3004	16,7	3030	ND
3004G	3,5	3030G	9,5
3005	87,2	3032	ND
3005G	54,3	3032G	13,1
3010	74,5	3033	77,1
3010G	84,6	3033G	32,9
3011	19,4	3036	17,6
3011G	ND	3036G	24,6
3012	45,0	3041	59,3
3012G	12,6	3041G	30,7
3013	39,0	3042	39,9
3013G	9,6	3042G	16,1
3014	5,2	3043	57,4
3014G	17,1	3043G	46,1

Tabla 19

Vk 3-20Jk1			
Anticuerpo con Cadena Ligera Común			
Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en Solución	Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en Solución
2968	68,9	2972G	35,7
2968G	15,2	2973	20,7
2969	10,1	2973G	23,1
2969G	23,6	2974	ND
2970	34,3	2974G	22,0
2970G	41,3	2975	8,7
2971	6,3	2975G	19,2
2971G	27,1	2976	4,6
2972	9,6	2976G	26,7

5 Como se describe en este Ejemplo, de los 80 anticuerpos de cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vk1-39Jk5 modificada por ingeniería probados para determinar su capacidad para bloquear la unión del antígeno E a una superficie recubierta de Ligando Y, 22 demostraron > 50 % de bloqueo, mientras que 58 demostraron <50 % de bloqueo (20 de 25-50 % de bloqueo y 38 de <25 % de bloqueo). Para los 18 anticuerpos de cadena ligera común que contienen la cadena ligera Vk3-20Jk1 modificada por ingeniería, uno demostró > 50 % de bloqueo, mientras que 17 demostraron <50 % de bloqueo (5 de 25-50 % de bloqueo y 12 de <25 % de bloqueo) de la unión del Antígeno E a superficie recubierta con Ligando Y.

Estos resultados también son consistentes con el conjunto de anticuerpos de cadena ligera común específicos de Antígeno E que comprende anticuerpos con especificidad de epítipo solapante y no solapante con respecto al Antígeno E.

15 Ejemplo XVIII

20 Determinación de la Afinidad con BIACORE™ para Anticuerpos con Cadena Ligera Común Específicos de Antígeno

Las constantes de disociación en equilibrio (K_D) para sobrenadantes de anticuerpos seleccionados se determinaron

mediante SPR (Resonancia de Plasmón Superficial) usando un instrumento BIACORE™ T100 (GE Healthcare). Todos los datos se obtuvieron utilizando HBS-EP (10 mM HEPES, NaCl 150 mM, EDTA 0,3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) como tampones tanto de muestra como de ejecución, a 25 °C. Los anticuerpos se capturaron a partir de muestras de sobrenadante en bruto en una superficie de chip sensor CM5 previamente derivatizada con una alta densidad de anticuerpos anti-Fc humano usando química de acoplamiento de amina natural. Durante la etapa de captura, se inyectaron sobrenadantes a través de la superficie de anti-Fc humano a un caudal de 3 µl/min, durante un total de 3 minutos. La etapa de captura se siguió por una inyección de tampón de ejecución o analito a una concentración de 100 nM durante 2 minutos a un caudal de 35 µl/min. La disociación del antígeno del anticuerpo capturado se controló durante 6 minutos. El anticuerpo capturado se eliminó mediante una breve inyección de glicina 10 mM, pH 1,5. Todos los sensorgramas se referenciaron dos veces restando los sensorgramas de las inyecciones de tampón de los sensorgramas de analito, eliminando así los artefactos causados por la disociación del anticuerpo de la superficie de captura. Los datos de unión para cada anticuerpo se ajustaron a un modelo de unión 1:1 con transporte de masa usando el software de evaluación BIACORE™ T100 v2.1. Los resultados se muestran en las Tablas 20 y 21.

Tabla 20

Vk 1-39Jk5					
Anticuerpo con Cadena Ligera Común					
Anticuerpo	Antígeno E 100 nM		Anticuerpo	Antígeno E 100 nM	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)		K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2948	8,83	28	3015	29,1	11
2948G	95,0	1	3015G	65,9	0
2949	3,57	18	3016	4,99	17
2949G	6,37	9	3016G	18,9	4
2950	4,91	17	3017	9,83	8
2950G	13,6	5	3017G	55,4	2
2952	6,25	7	3018	11,3	36
2952G	7,16	4	3018G	32,5	3
2954	2,37	24	3019	1,54	59
2954G	5,30	9	3019G	2,29	42
2955	14,4	6	3020	5,41	39
2955G	12,0	4	3020G	41,9	6
2964	14,8	6	3021	50,1	6
2964G	13,0	9	3021G	26,8	4
2978	1,91	49	3022	25,7	17
2978G	1,80	58	3022G	20,8	12
2982	6,41	19	3023	263	9
2982G	16,3	9	3023G	103	5
2985	64,4	9	3024	58,8	7
2985G	2,44	8	3024G	7,09	10
2987	21,0	11	3025	35,2	6
2987G	37,6	4	3025G	42,5	8
2996	10,8	9	3027	7,15	6
2996G	24,0	2	3027G	4,24	18
2997	7,75	19	3028	6,89	37
2997G	151	1	3028G	7,23	22
3004	46,5	14	3030	46,2	7
3004G	1,93	91	3030G	128	3
3005	2,35	108	3032	53,2	9
3005G	6,96	27	3032G	13,0	1
3010	4,13	26	3033	4,61	17
3010G	2,10	49	3033G	12,0	5
3011	59,1	5	3036	284	12

(continuación)

Vk 1-39Jk5					
Anticuerpo con Cadena Ligera Común					
Anticuerpo	Antígeno E 100 nM		Anticuerpo	Antígeno E 100 nM	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)		K _D (nM)	T _{1/2} (min)
3011G	41,7	5	3036G	18,2	10
3012	9,71	20	3041	6,90	12
3012G	89,9	2	3041G	22,9	2
3013	20,2	20	3042	9,46	34
3013G	13,2	4	3042G	85,5	3
3014	213	4	3043	9,26	29
3014G	36,8	3	3043G	13,1	22

Tabla 21

Vk 3-20Jk1					
Anticuerpo con Cadena Ligera Común					
Anticuerpo	Antígeno E 100 nM		Anticuerpo	Antígeno E 100 nM	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)		K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2968	5,50	8	2973	5,35	39
2968G	305	0	2973G	11,0	44
2969	34,9	2	2974	256	0
2969G	181	1	2974G	138	0
2970G	12,3	3	2975	38,0	2
2971G	32,8	22	2975G	134	1
2972	6,02	13	2976	6,73	10
2972G	74,6	26	2976G	656	8

- Las afinidades de unión de los anticuerpos de cadena ligera común que comprenden los reordenamientos mostrados en las Tablas 14 y 15 varían, y casi todos muestran una K_D en el intervalo nanomolar. Los datos de afinidad son consistentes con los anticuerpos de cadena ligera común que son el resultado de la asociación combinatoria de dominios variables reordenados descritos en las Tablas 14 y 15 que son de alta afinidad, seleccionados clonalmente y mutados somáticamente. Junto con los datos mostrados anteriormente, los anticuerpos de cadena ligera común descritos en las Tablas 14 y 15 comprenden una colección de anticuerpos diversos de alta afinidad que muestran especificidad para uno o más epítomos en el Antígeno E.

Ejemplo XIX

Determinación de las Especificidades de unión de Anticuerpos de Cadena Ligera Común Específicos de Antígeno Mediante Ensayo LUMINEX™

- Se evaluó la capacidad de los anticuerpos seleccionados de cadena ligera común anti Antígeno E para unirse al ECD de las variantes de ECD del Antígeno E y del Antígeno E, incluido el ortólogo de mono cinomolgo (Antígeno E *Mf*), que difiere de la proteína humana en aproximadamente el 10 % de sus restos de aminoácidos; un mutante por delección de Antígeno E que carece de los últimos 10 aminoácidos del extremo C-terminal del ECD (Antígeno E-ΔCT); y dos mutantes que contienen una sustitución de alanina en lugares sospechosos de interacción con el Ligando Y (Antígeno E-Ala1 y Antígeno E-Ala2). Las proteínas del Antígeno E se produjeron en células CHO y cada una contenía una etiqueta de C-terminal myc-myc-His.
- Para los estudios de unión, la proteína del ECD del Antígeno E o la proteína variante (descrita anteriormente) de 1 ml de medio de cultivo se capturó por incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con 1 x 10⁶ microesferas (Luminex™) recubiertas de forma covalente con un anticuerpo monoclonal anti-myc (MAb 9E10, línea celular de hibridoma CRL-1729™; ATCC, Manassas, VA). Las perlas se lavaron con PBS antes de su uso. Los sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E se diluyeron 1:4 en tampón y se añadieron a placas de filtro de 96 pocillos. Se usó un sobrenadante simulado sin anticuerpos como control negativo. Las perlas que contienen las proteínas del Antígeno E capturadas se añadieron después a las muestras de anticuerpos (3000 perlas por pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavaron las perlas de muestra y se detectó el anticuerpo de cadena ligera común unido con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con R-ficoeritrina. La intensidad de fluorescencia de las perlas (aproximadamente 100 perlas contadas para cada muestra de anticuerpo que se une a cada proteína de Antígeno E) se midió con un analizador basado en citometría de flujo Luminex™, y se

registró la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) para al menos 100 perlas contadas por interacción perla/anticuerpo. Los resultados se muestran en las Tablas 22 y 23.

Tabla 22

Anticuerpos de Cadena Ligera común Vk 1-39Jk5					
Anticuerpo	Intensidad de Fluorescencia Media (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-Δ CT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Antígeno E <i>Mf</i>
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666

(continuación)

Anticuerpos de Cadena Ligera común Vk 1-39Jk5					
Anticuerpo	Intensidad de Fluorescencia Media (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-Δ CT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Antígeno E <i>Mf</i>
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

Tabla 23

Anticuerpos de Cadena Ligera común Vk 3-20Jk1					
Anticuerpo	Intensidad de Fluorescencia Media (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Antígeno E <i>Mf</i>
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021

(continuación)

Anticuerpos de Cadena Ligera común Vk 3-20Jk1					
Anticuerpo	Intensidad de Fluorescencia Media (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Antígeno E <i>Mf</i>
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

Los sobrenadantes de anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E mostraron una alta unión específica a las perlas unidas a Antígeno E-ECD (dominio extracelular del Antígeno E). Para estas perlas, el sobrenadante simulado de control negativo dio como resultado una señal insignificante (<10 MFI) cuando se combinó con la muestra de perlas Antígeno E-ECD, mientras que los sobrenadantes que contenían anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E mostraron una fuerte señal de unión (MFI promedio de 2627 para 98 sobrenadantes de anticuerpos; MFI > 500 para 91/98 muestras de anticuerpos).

Como una medida de la capacidad de los anticuerpos de cadena ligera común anti Antígeno E seleccionados para identificar diferentes epítomos en el ECD del Antígeno E, se determinó la unión relativa de los anticuerpos a las variantes. Las cuatro variantes de Antígeno E se capturaron en las perlas anti-myc LUMINEX™ como se describe anteriormente para los estudios de unión de Antígeno E-ECD naturales, y se determinaron las relaciones de unión relativas ($MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}}$). Para 98 sobrenadantes de anticuerpos de cadena ligera común probados que se muestran en las Tablas 21 y 22, las proporciones promedio ($MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}}$) diferían para cada variante, lo que probablemente reflejaba diferentes cantidades de captura de proteínas sobre las perlas (proporciones promedio de 0,61, 2,9, 2,0, y 1,0 para Antígeno E-ΔCT, Antígeno E-Ala1, Antígeno E-Ala2 y Antígeno E *Mf*, respectivamente). Para cada variante de proteína, la unión para un subconjunto de los 98 anticuerpos de cadena ligera común probados mostró una unión muy reducida, lo que indica sensibilidad a la mutación que caracterizó una variante dada. Por ejemplo, 19 de las muestras de anticuerpos de cadena ligera común se unieron al Antígeno E *Mf* con $MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}}$ de <8 %. Debido a que muchos en este grupo incluyen anticuerpos de alta o moderadamente alta afinidad (5 con $K_D < 5$ nM, 15 con $K_D < 50$ nM), es probable que la señal más baja para este grupo sea el resultado de la sensibilidad a las diferencias de secuencia (epítipo) entre Antígeno E-ECD natural y una variante dada en lugar de a afinidades más bajas.

Estos datos establecen que los anticuerpos de cadena ligera común descritos en las Tablas 14 y 15 representan un grupo diverso de anticuerpos de cadena ligera común específicos de Antígeno E que reconocen específicamente más de un epítipo sobre el Antígeno E.

REIVINDICACIONES

1. Un ratón cuyo genoma comprende:

- (a) al menos un segmento génico V_H humano no reordenado, al menos un segmento génico D_H humano no reordenado y al menos un segmento génico J_H humano no reordenado unidos operativamente a un gen de región constante de cadena pesada endógeno en un locus de cadena pesada endógeno;
- (b) un locus que comprende no más de una, o no más de dos, secuencias de ácido nucleico humano reordenadas V/J que codifican un dominio variable de cadena ligera unido operativamente a un gen constante de cadena ligera;
- y
- (c) una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6a de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un fragmento funcional de la misma y una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6b de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un fragmento funcional de la misma, en donde las proteínas, ortólogos, homólogos o fragmentos de ADAM6 son funcionales en un ratón macho, en donde dicha función está asociada con la fertilidad del ratón macho, en donde el ratón ha eliminado o reducido la función endógena de ADAM6.

2. El ratón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las secuencias de ácido nucleico ectópico están en una posición que no está dentro de un locus de cadena pesada de inmunoglobulina endógeno.

3. El ratón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el genoma del ratón comprende no más de dos secuencias Vk/Jk humanas reordenadas.

4. El ratón de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las no más de dos secuencias Vk/Jk humanas reordenadas se seleccionan del grupo que consiste en una secuencia Vk1-39/Jk humana reordenada y una secuencia Vk3-20/Jk humana reordenada.

5. El ratón de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el genoma del ratón comprende no más de una secuencia Vk/Jk humana reordenada.

6. El ratón de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la no más de una secuencia Vk/Jk humana reordenada se selecciona del grupo que consiste en una secuencia Vk1-39/Jk humana reordenada y una secuencia Vk3-20/Jk humana reordenada.

7. El ratón de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la secuencia Vk1-39/Jk humana reordenada es una secuencia Vk1-39/Jk5 humana reordenada.

8. El ratón de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la secuencia Vk3-20/Jk humana reordenada es una secuencia Vk3-20/Jk1 humana reordenada.

9. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde no más de una, o no más de dos, secuencias V/J de cadena ligera humana reordenadas están unidas operativamente a un gen constante de cadena ligera de ratón.

10. Un método de fabricación de un anticuerpo biespecífico que comprende:

- (a) exponer un primer ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a un primer antígeno de interés que comprende un primer epítipo;
- (b) exponer un segundo ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a un segundo antígeno de interés que comprende un segundo epítipo;
- (c) permitir que el primer y el segundo ratón monten respuestas inmunitarias a los antígenos de interés;
- (d) identificar en el primer ratón una primera región variable de cadena pesada humana que se une al primer epítipo del primer antígeno de interés, identificar en el segundo ratón una segunda región variable de cadena pesada humana que se une al segundo epítipo del segundo antígeno de interés, producir un primer gen de cadena pesada completamente humano que codifica una primera cadena pesada que se une al primer epítipo del primer antígeno de interés y que comprende la primera región variable de cadena pesada humana, producir un segundo gen de cadena pesada completamente humano que codifica una segunda cadena pesada que se une al segundo epítipo del segundo antígeno de interés y que comprende la segunda región variable de cadena pesada humana;
- (e) expresar la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada en una célula que expresa una única cadena ligera completamente humana derivada de un segmento génico Vk1-39 humano o Vk3-20 humano para formar un anticuerpo; y
- (f) aislar el anticuerpo biespecífico.

11. Uso de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para producir una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada humana o de dominio variable de cadena ligera humana de un anticuerpo.

12. Uso de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para producir una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

11. Una célula de ratón cuyo genoma comprende:

- 5
- (a) al menos un segmento génico V_H humano no reordenado, al menos un segmento génico D_H humano no reordenado y al menos un segmento génico J_H humano no reordenado unidos operativamente a un gen de región constante de cadena pesada endógeno en un locus de cadena pesada endógeno;
- 10
- (b) un locus que comprende no más de una, o no más de dos, secuencias de ácido nucleico humano reordenadas V/J que codifican un dominio variable de cadena ligera unido operativamente a un gen constante de cadena ligera;
- y
- (c) una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6a de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un fragmento funcional de la misma y una secuencia de ácido nucleico ectópico que codifica una proteína ADAM6b de ratón funcional o un ortólogo funcional, un homólogo funcional o un
- 15
- fragmento funcional de la misma, en donde las proteínas, ortólogos, homólogos o fragmentos de ADAM6 son funcionales en un ratón macho, en donde dicha función está asociada con la fertilidad del ratón macho,

en donde dicha célula ha eliminado o reducido la función endógena de ADAM6.

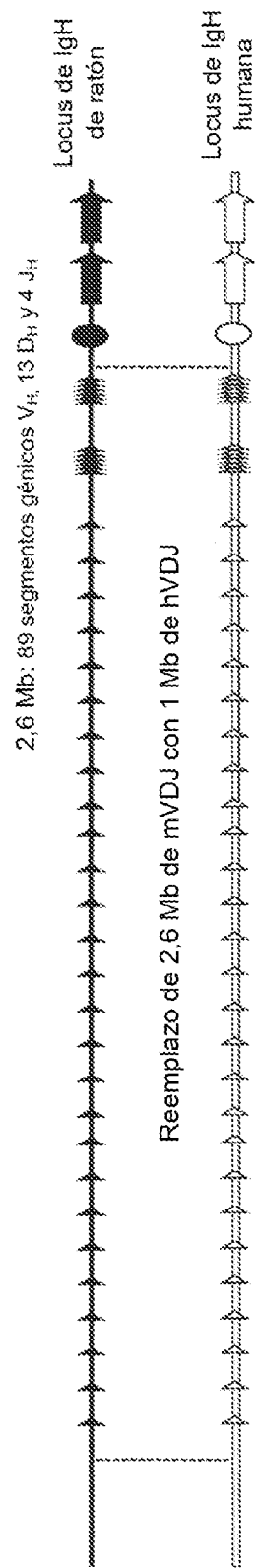


FIG. 1A

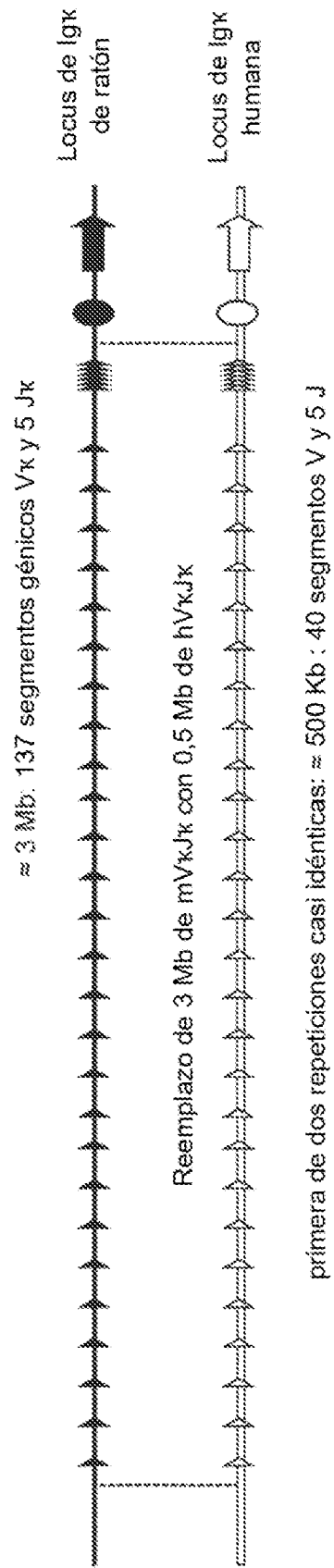


FIG. 1B

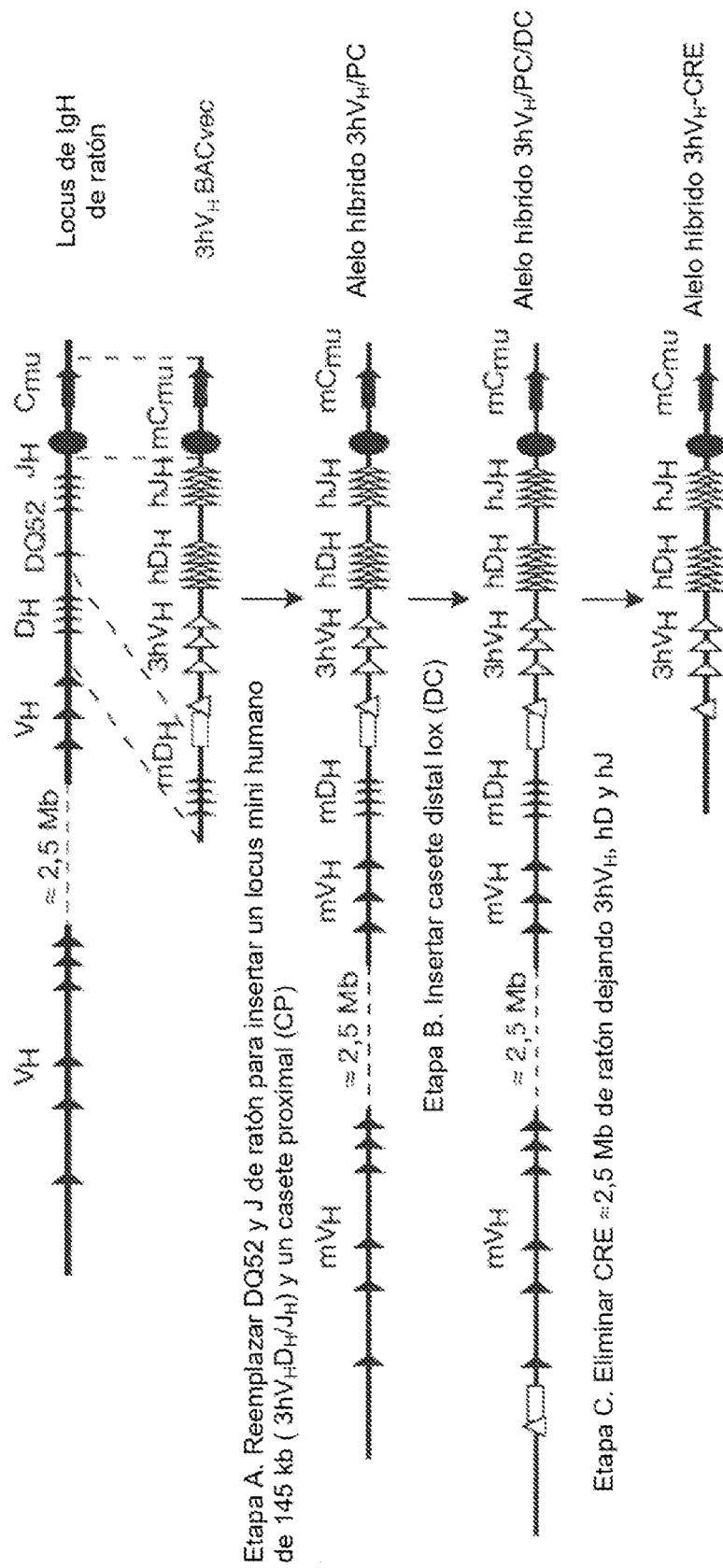


FIG. 2A

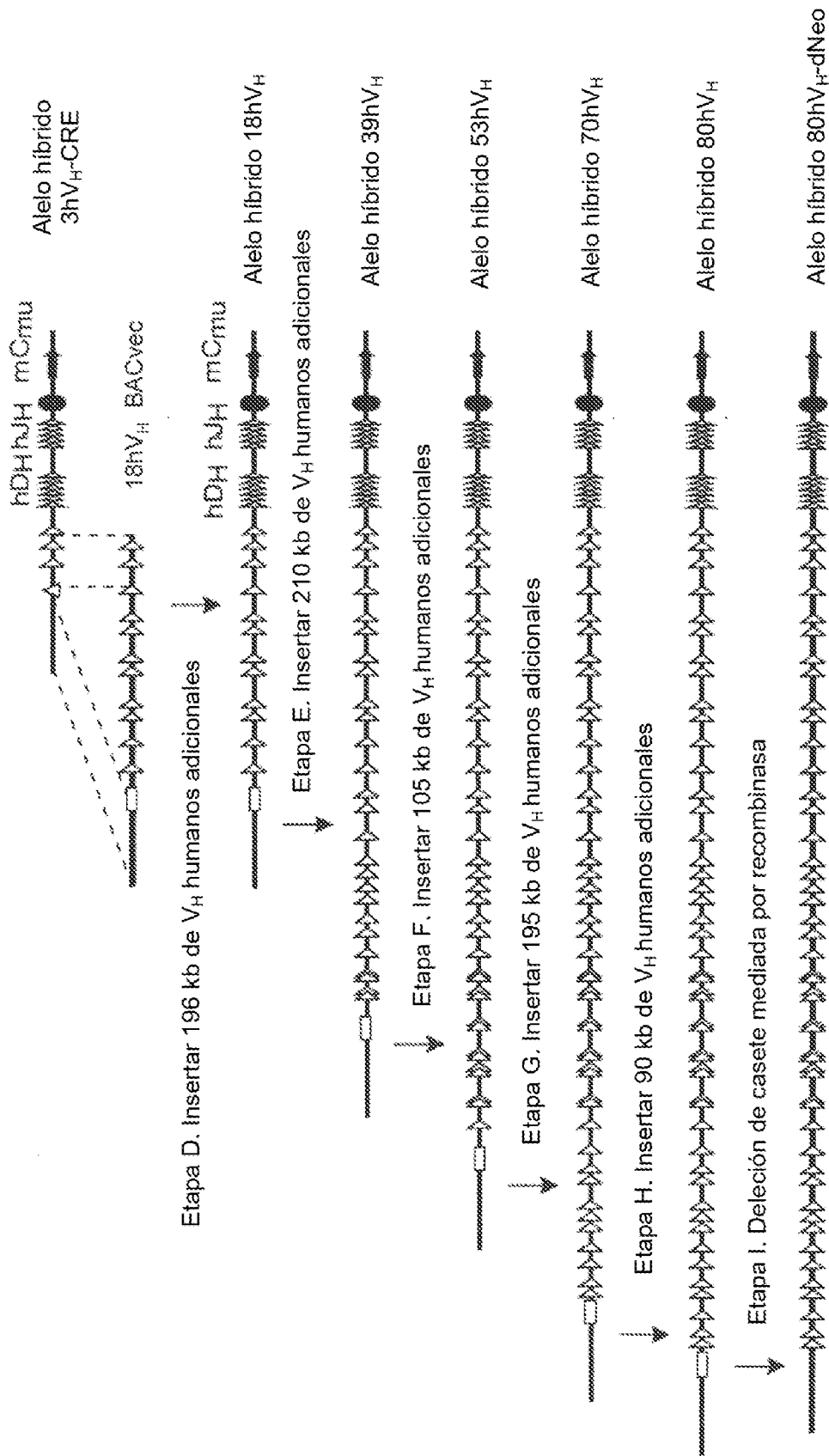


FIG. 2B

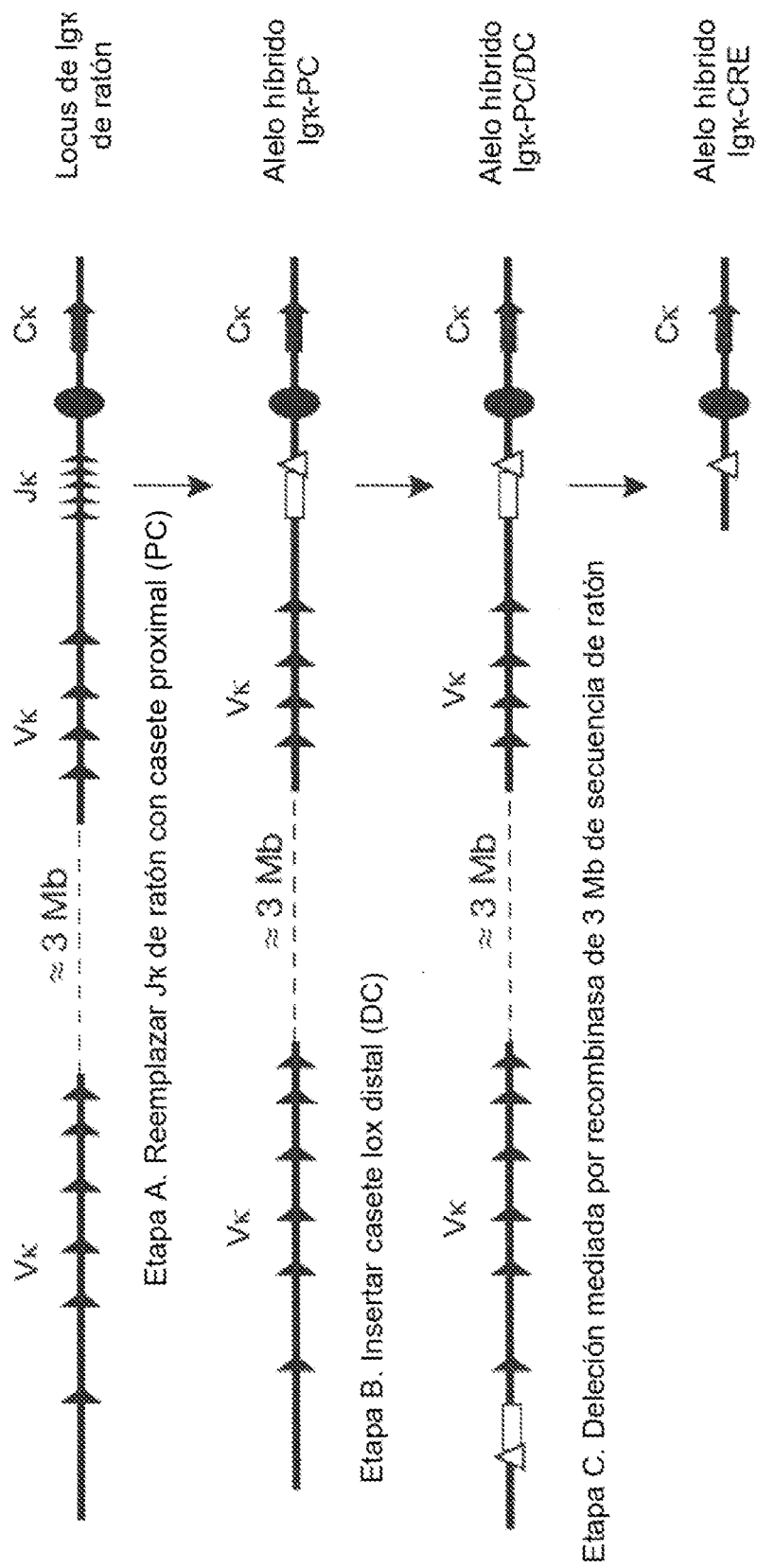


FIG. 2C

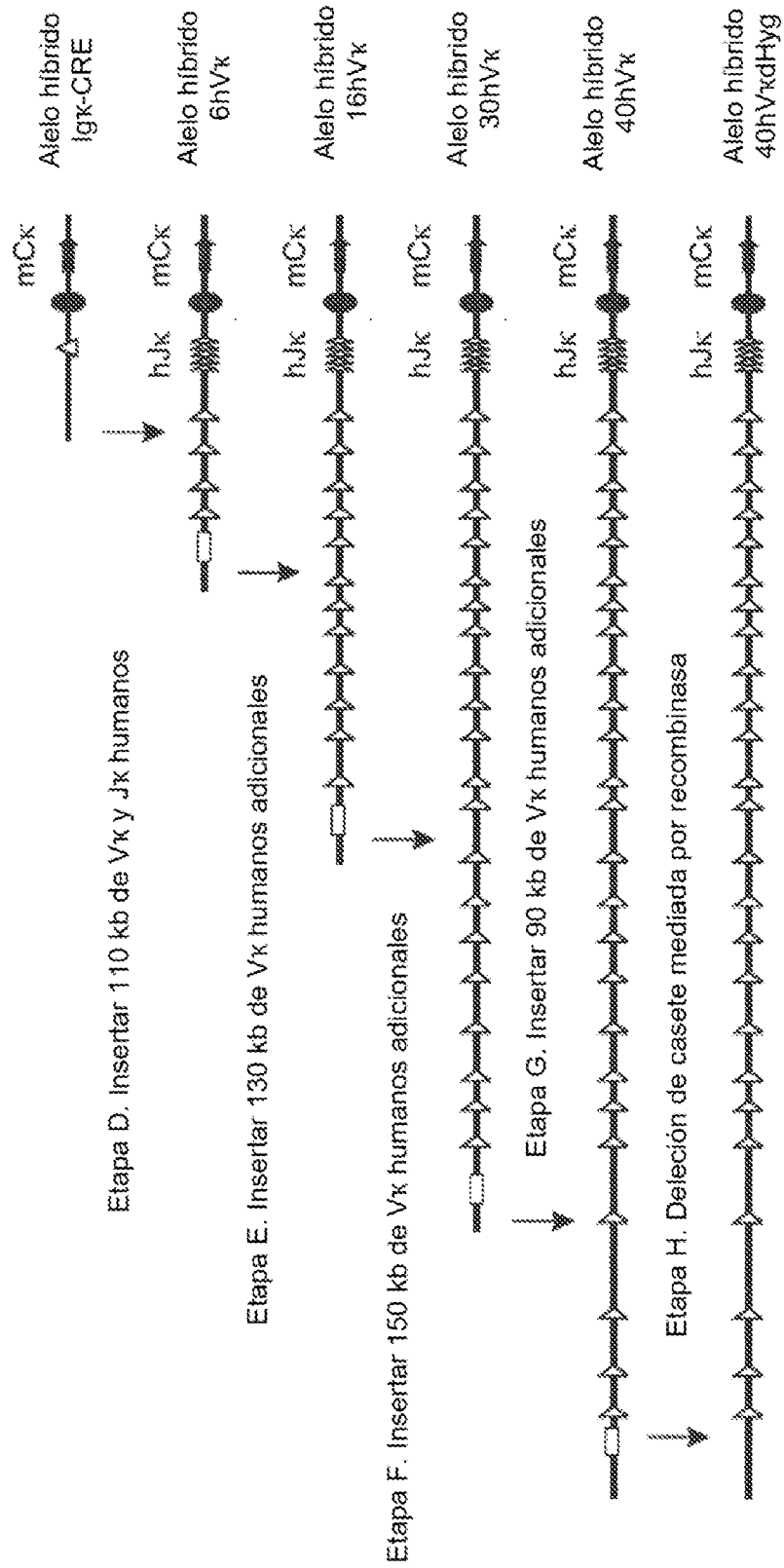


FIG. 2D

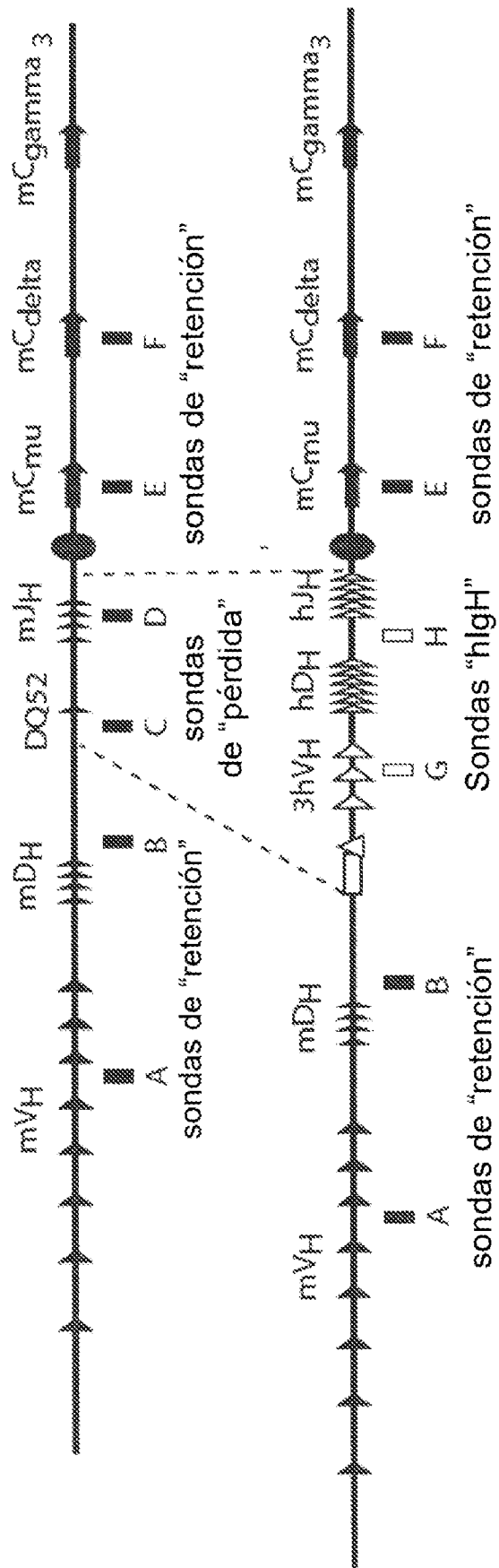


FIG. 3A

		A	B	C	D	E	F	G	H
ES precursoras	Número de copias teórico	2	2	2	2	2	2	0	0
	Número de copias observado	1,9	1,8	2,1	1,8	1,9	1,8	<0,01	<0,04
ES modificadas	Número de copias teórico	2	2	1	1	2	2	1	1
	Número de copias observado	1,9	2,4	1,0	1,0	2,0	1,9	+	+

FIG. 3B

	Número de copias	D	H
Ratones de TS	Teórico	2	0
	Observado 1	1,71	< 0,01
	Observado 2	2,07	< 0,01
	Observado 3	2,16	< 0,01
	Observado 4	1,88	< 0,01
Ratones Het	Teórico	1	1
	Observado 1	1,22	1,04
	Observado 2	0,94	1,02
	Observado 3	0,85	0,95
	Observado 4	1,02	1,00
Ratones Homo	Teórico	0	2
	Observado 1	< 0,01	2,37
	Observado 2	< 0,01	2,22
	Observado 3	< 0,01	2,43
	Observado 4	< 0,01	1,93

FIG. 3C

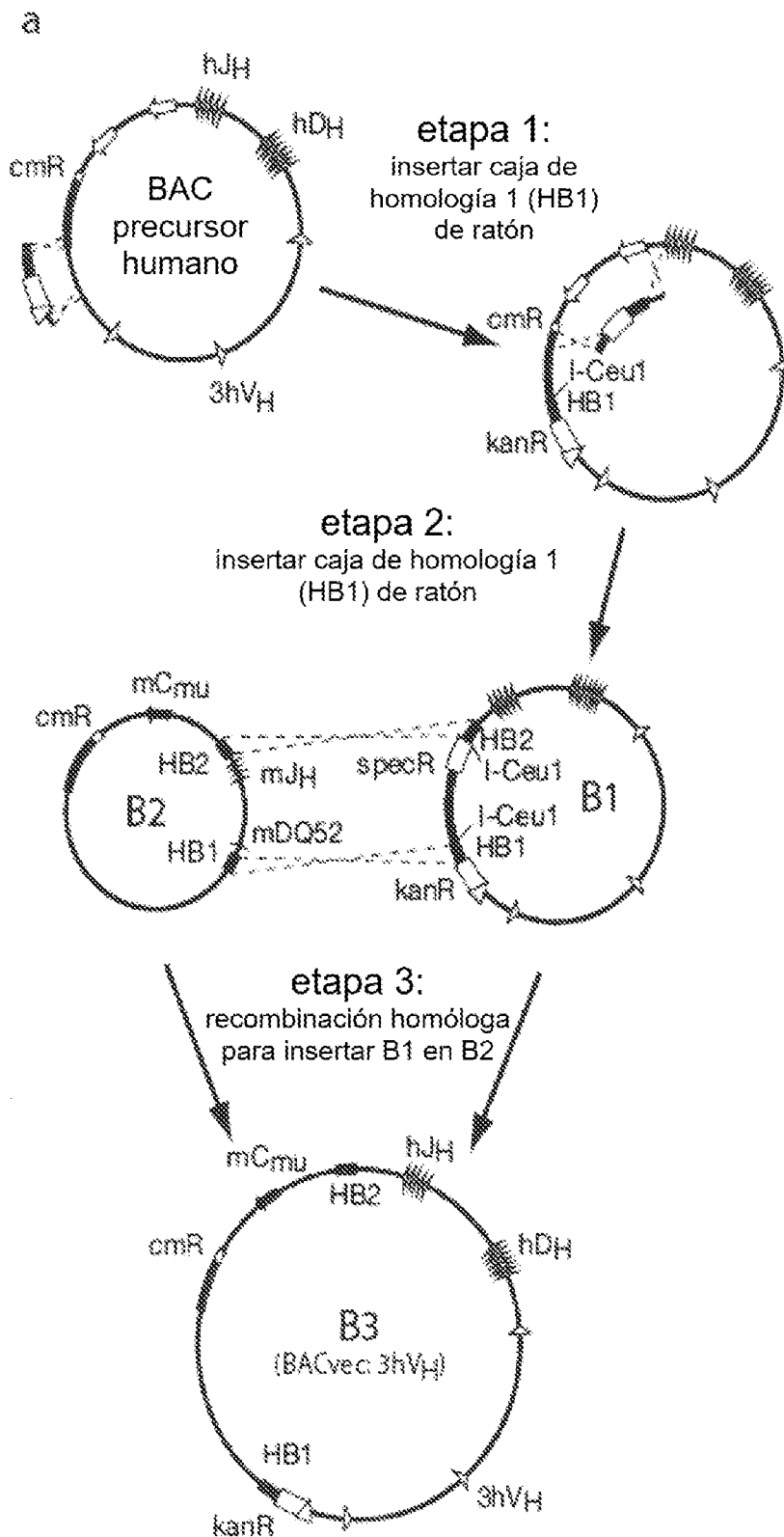


FIG. 4A

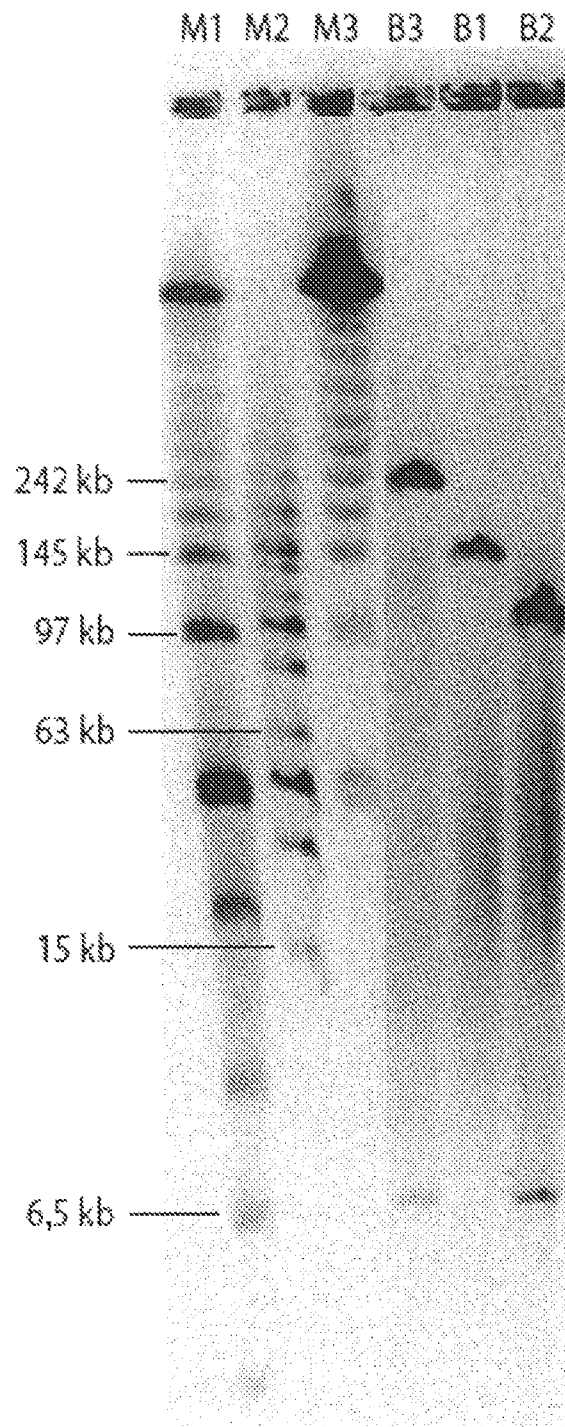


FIG. 4B

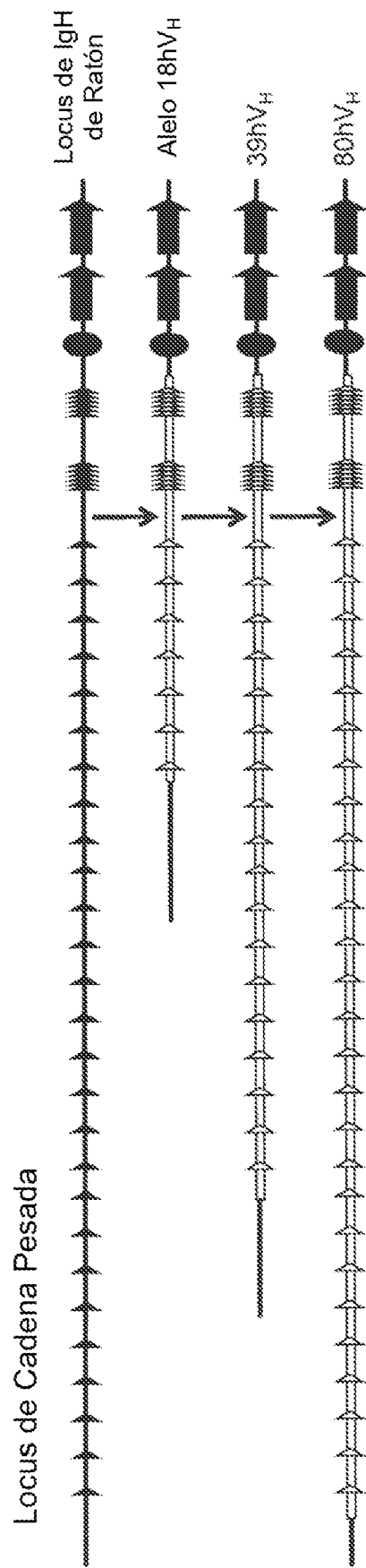


FIG. 5A

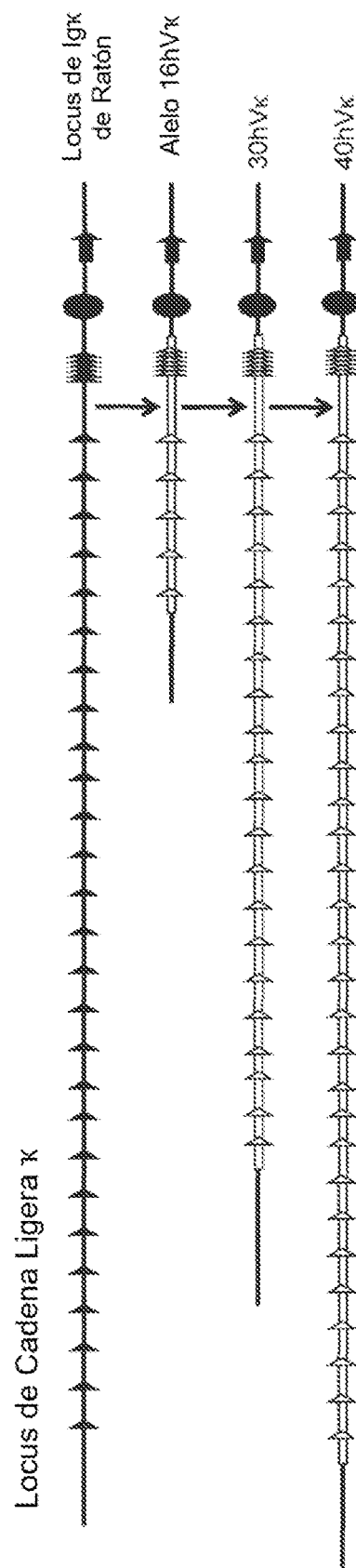


FIG. 5B

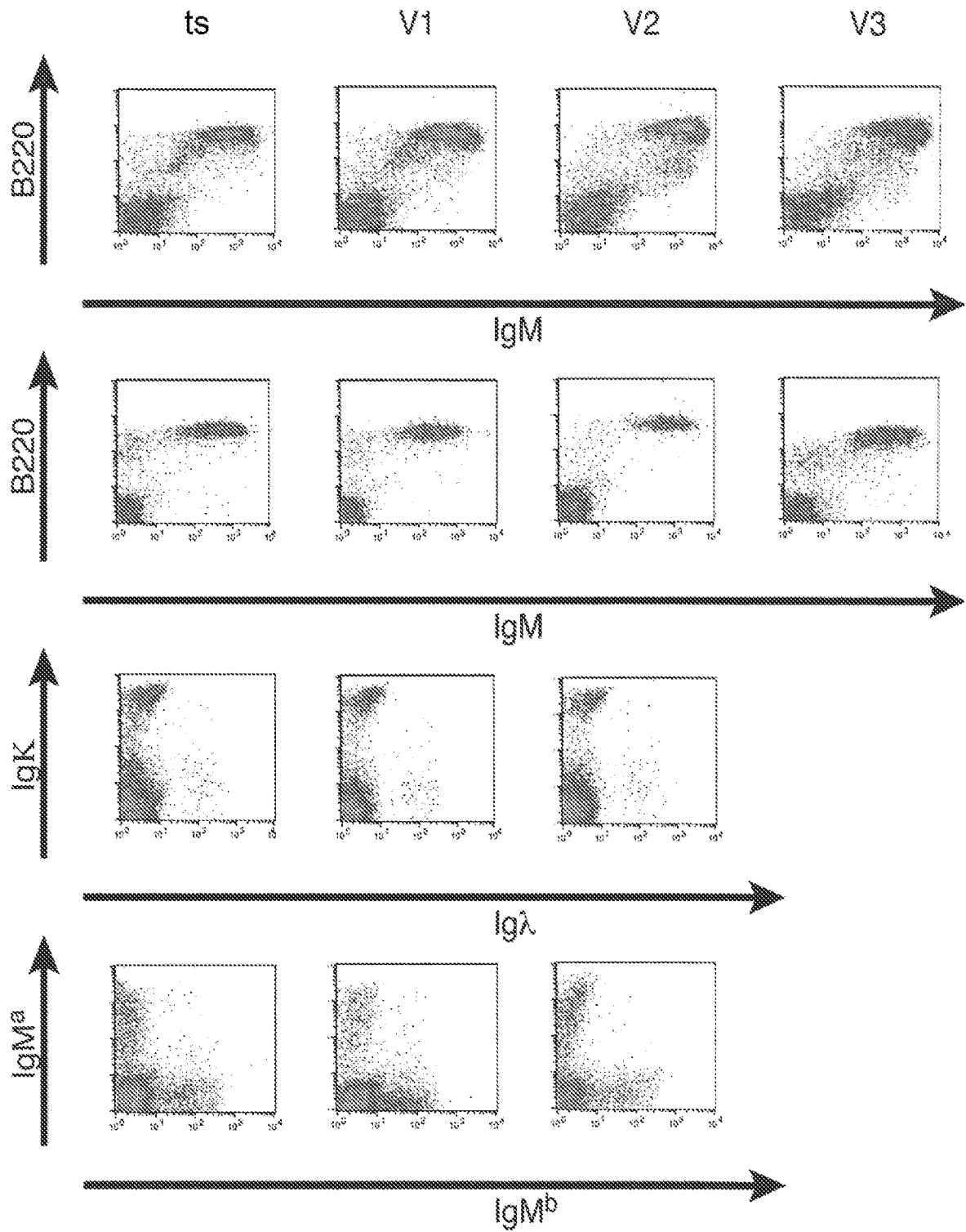


FIG. 6

3'V _H	N	D _H	N	5'J _H
(3-72) GCTAG	(D _H 1-26)	GGTATAGTGGGAGCTACTAC		
(3-9) GCAAAAG		TAGTGGGgcCTAC	AGGC	CTTTTGATATC(3)
(3-7) GCGAGAGA	CCCAGGG	AGTGGCAGCTACTAC	ACCT	ATGCTTTTGATATC(3)
(4-59) GCGAGAG	G	GGTATAGTGGGAGCTACT	GAGG	ACTTTGATATC(4)
(3-23) GCGAAA	GGAC	AGTGGGAGC	CCF	CTTTGACTAC(4)
	CC	TAGTGGGAGCTACT	C	CTGGTTGGACCCC(5)
	(D _H 1-7)	GGTATAACTGGAACTAC		
(4-34) GCGAGAG	AGGAG	GGTATAACTGGAACT	CGA	ATGCTTTTGATATC(3)
(1-2) GCGAGAG	GA	TATAACTGGA		ACTACTTTGACTAC(4)
(3-23) GCGAAAGA		GTATAACTGGAACT	TGG	TACTTTGACTAC(4)
(3-7) GCGAGAGA	G	ATAACTGGAAC	CCC	CTTTGACTAC(4)
(4-59) GCGAG	GGGA	TATAACTGGAACT	TTTCTTTT	TTTGACTAC(4)
(4-39) GCGAGA	GC	TAACTGGAAC	CTCTGGG	CTTTGACTAC(4)
	(D _H 3-10)	GTATTACTATGGTTCGGGAGTTATTATAAC		
(3-30) GCGA	AAAGGC	TACTATGGTTCGGGAG	CTC	TTGACTAC(4)
(1-2) GCGAGAGA		TATTACTATGGTTCGGGAGTTATTATAAC	GAAGGT	CTACGGTATGGACGTC(6)
	(D _H 6-6)	GAGTATAGCAGCTCGTCC		
(1-2) GCGAGAGA		GTATAGCAG		CTTTGACTAC(4)
(3-48) GCGAGA	GA	GAGTATAGCAGCTCGT	TG	TGACTAC(4)
(3-13) GCAAGAGA	GG	ATAGGAGCTCGCCC	CTCGGG	TACTTTGACTAC(4)
	(D _H 7-27)	CTAACTGGGGA		
(3-7) GCGAGAGA	TCT	TGGGGA	AGG	CTAC(4)
(3-15) ACCAC	CCA	TAACTGGGGA	GGG	TTTGACTAC(4)
(3-48) GCGAGA	GATA	GGGGA		CCg(5)

FIG. 7A

3'Vκ	N	5' Jκ
(1-6) CAACAGAGTTATAGTACCCCTCC	GGA	GACG(1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACCCCTC		GGACG(1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACC		ATTCACT(3)
(1-9) CAACAttTTAATAGTTACCC		GCTCACT(4)
(3-15) CAGCAGTATAATAACTGGCCTC		TCACT(4)
(1-17) CTACAGCATAATAGTTACCC		GTGGACG(1)
(1-17) CTACAGCATAATAGTTACCCCTC		GGACG(1)
(3-20) CAGCAGTATGGTAGCTCACCTC		GGACG(1)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGACG(1)
(2-30) ATGCAAGGttCACACTGGCC		GTACACT(2)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GCTCACT(4)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCCTCC		CACT(3)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCCTCC		ATTCACT(3)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCCTCC	CG	TCACT(4)
(1-33) CAACAGTATGATAATCTCCCTCC		GATCACC(5)
(1-37) CAACGGAtTTACAATGCC	GA	CACC(5)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTC	CA	TGTACACT(2)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTC		TCACT(4)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACTCCTCC		CACT(4)

FIG. 7B

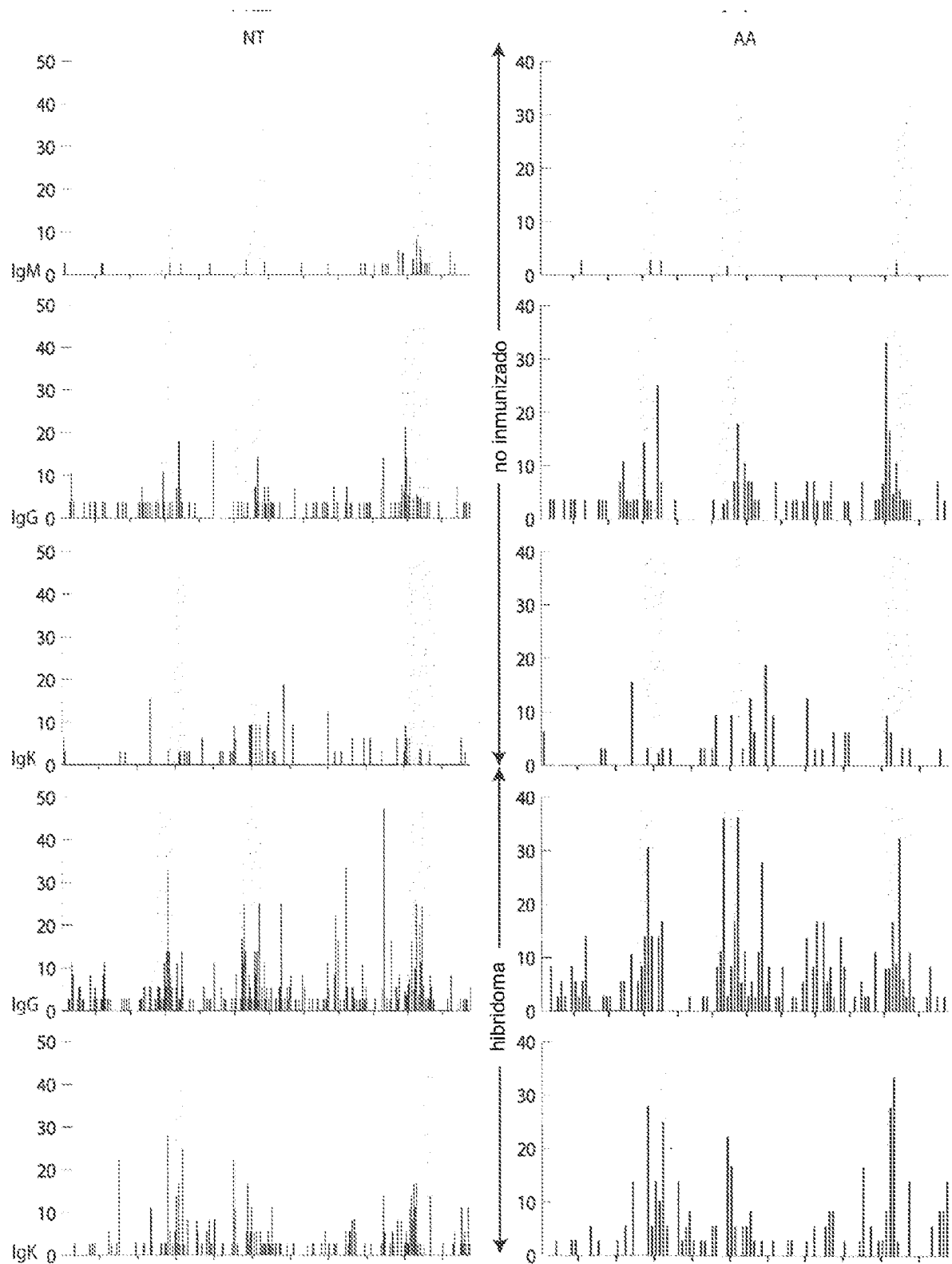


FIG. 8

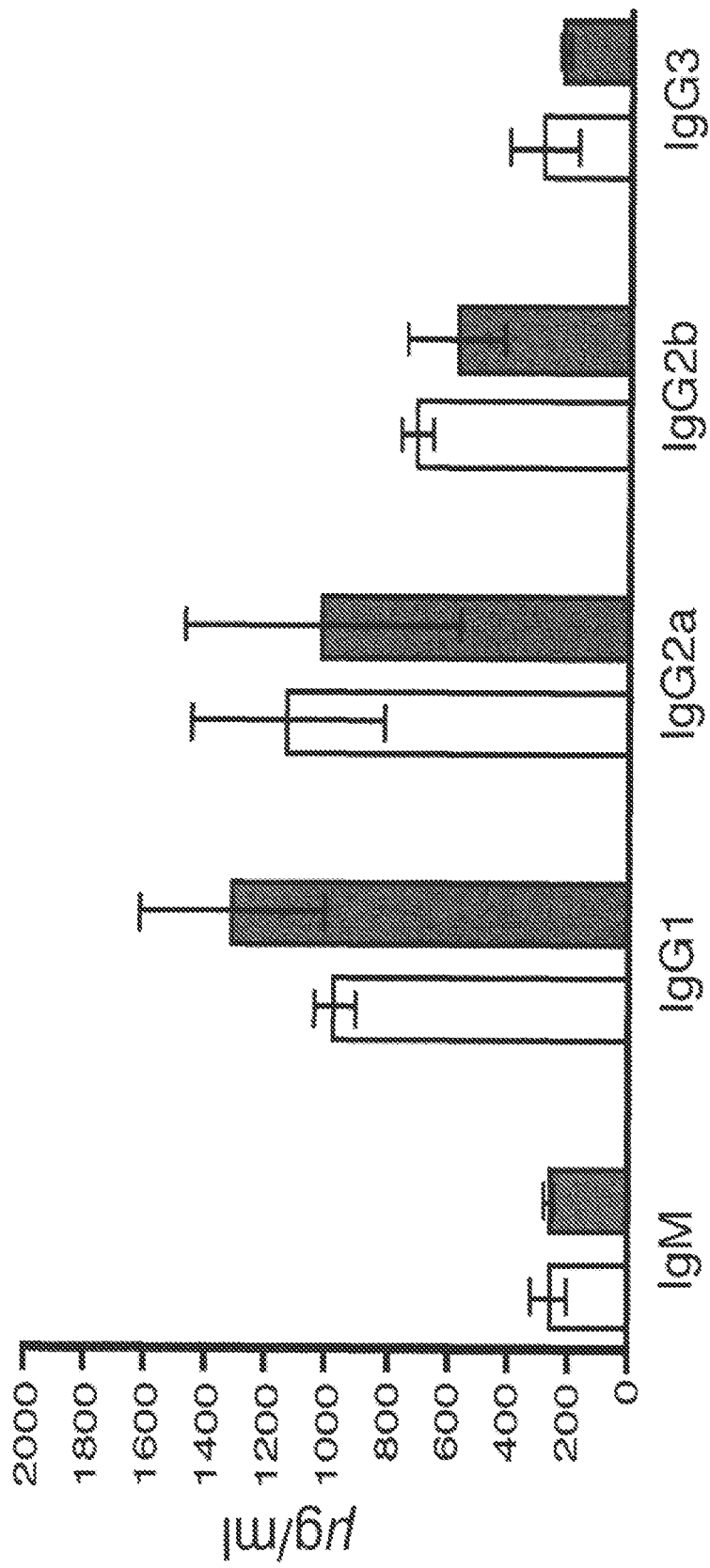


FIG. 9A

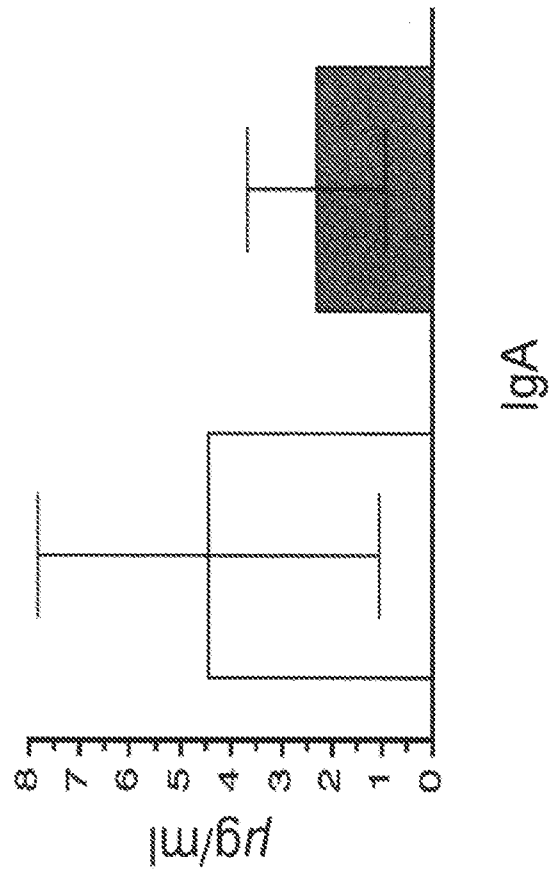


FIG. 9B

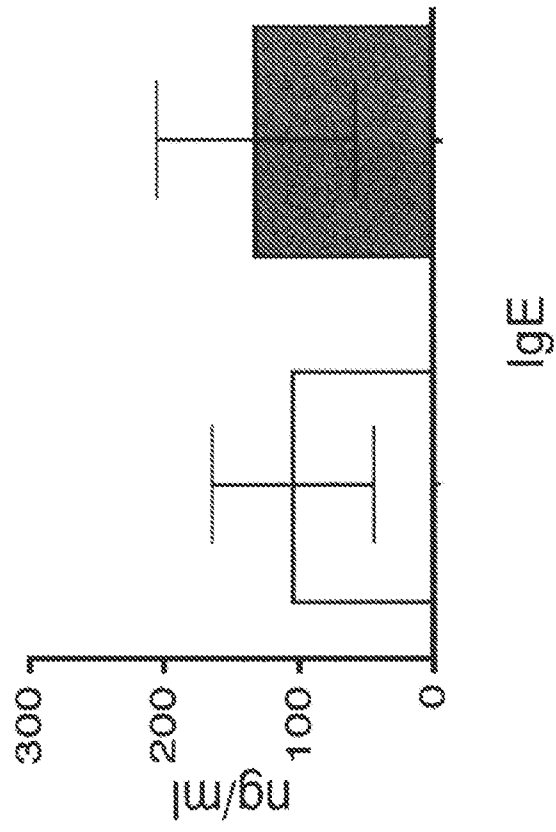


FIG. 9C

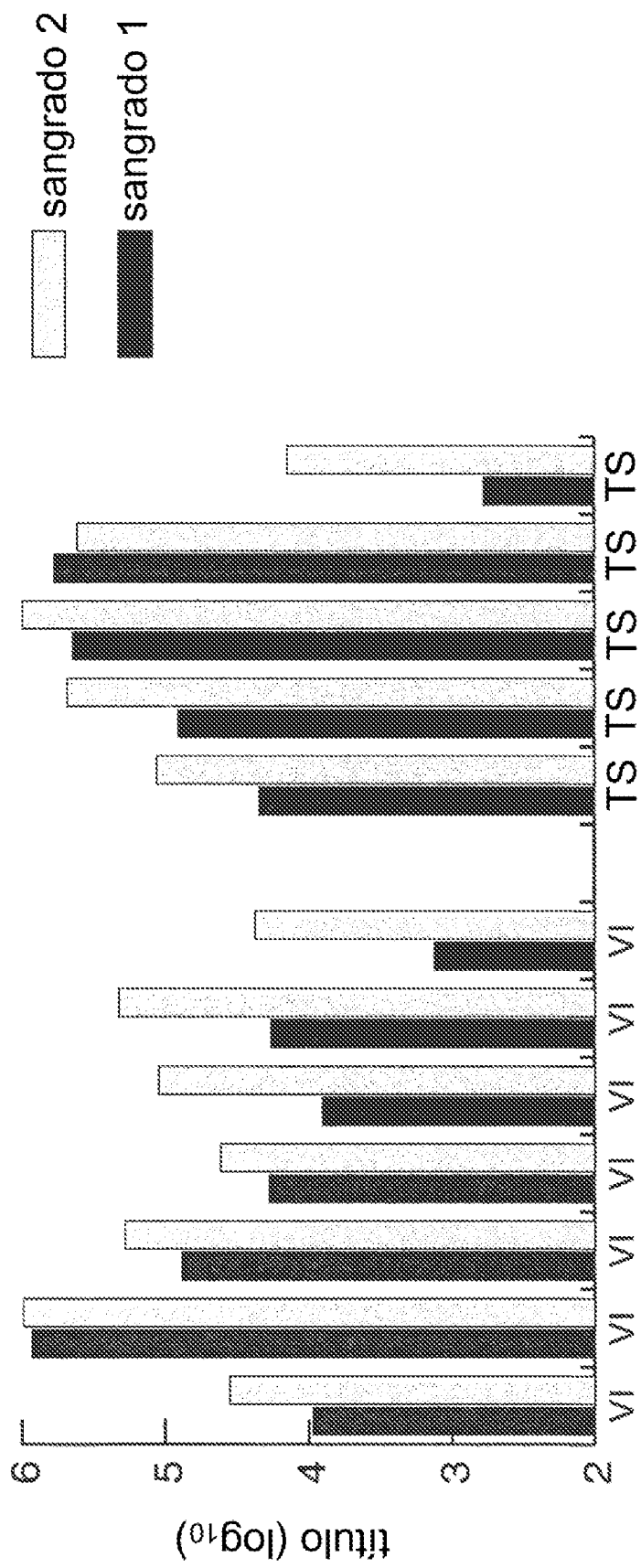


FIG. 10A

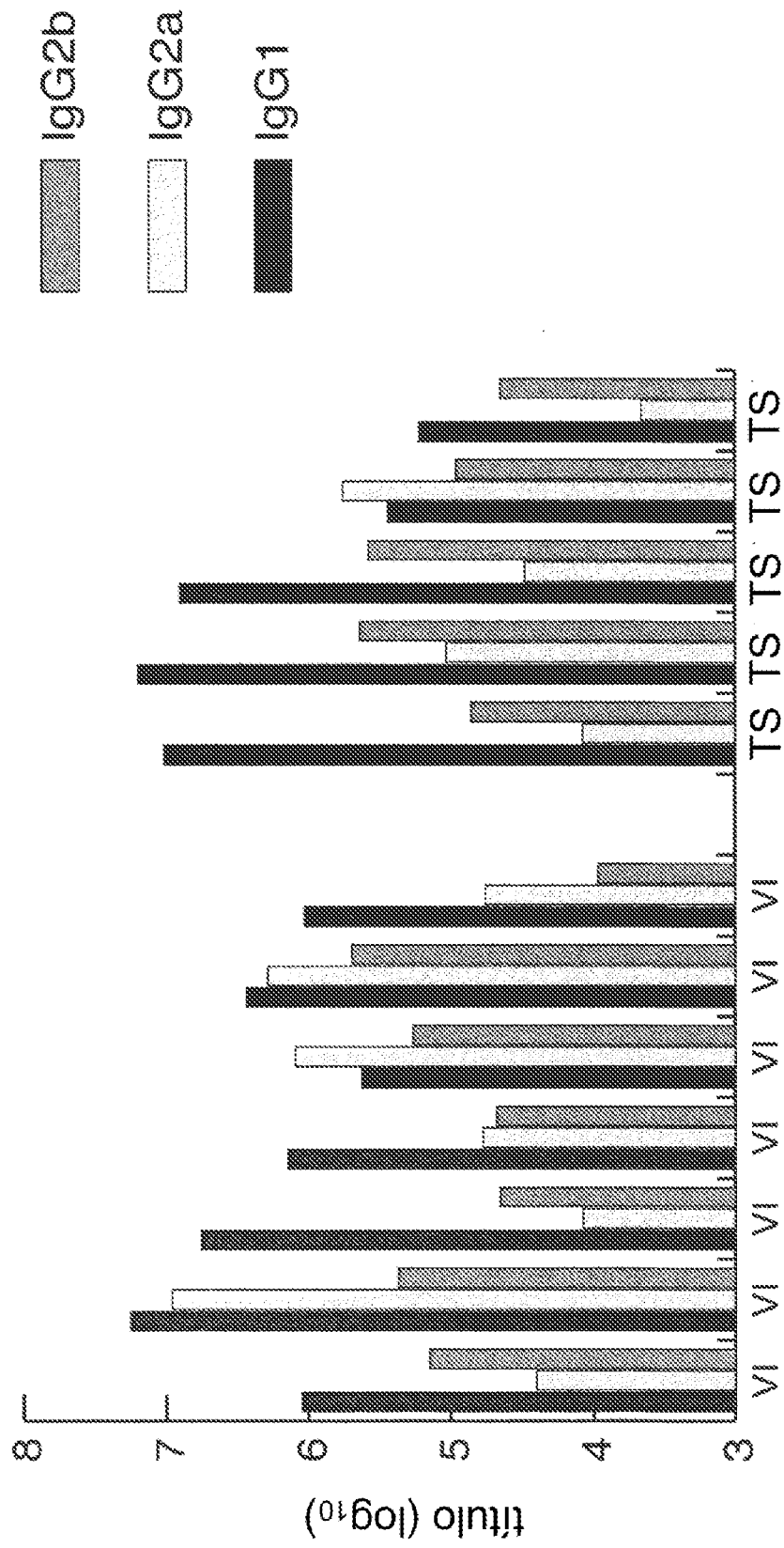


FIG. 10B

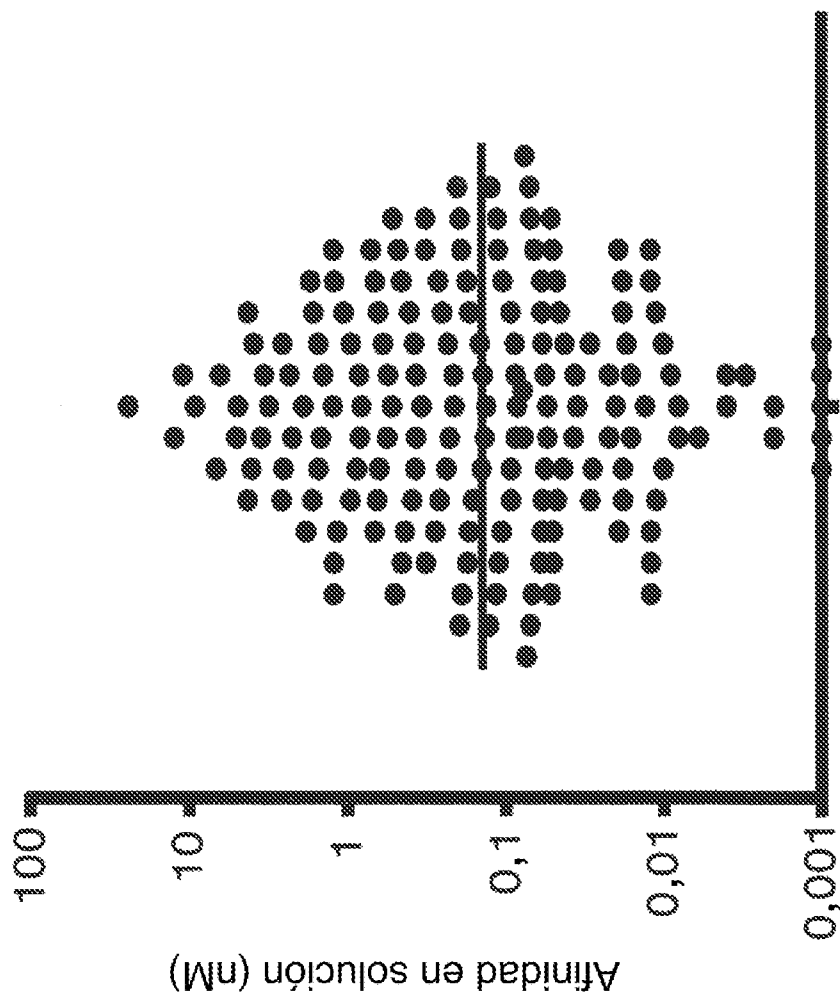


FIG. 11A

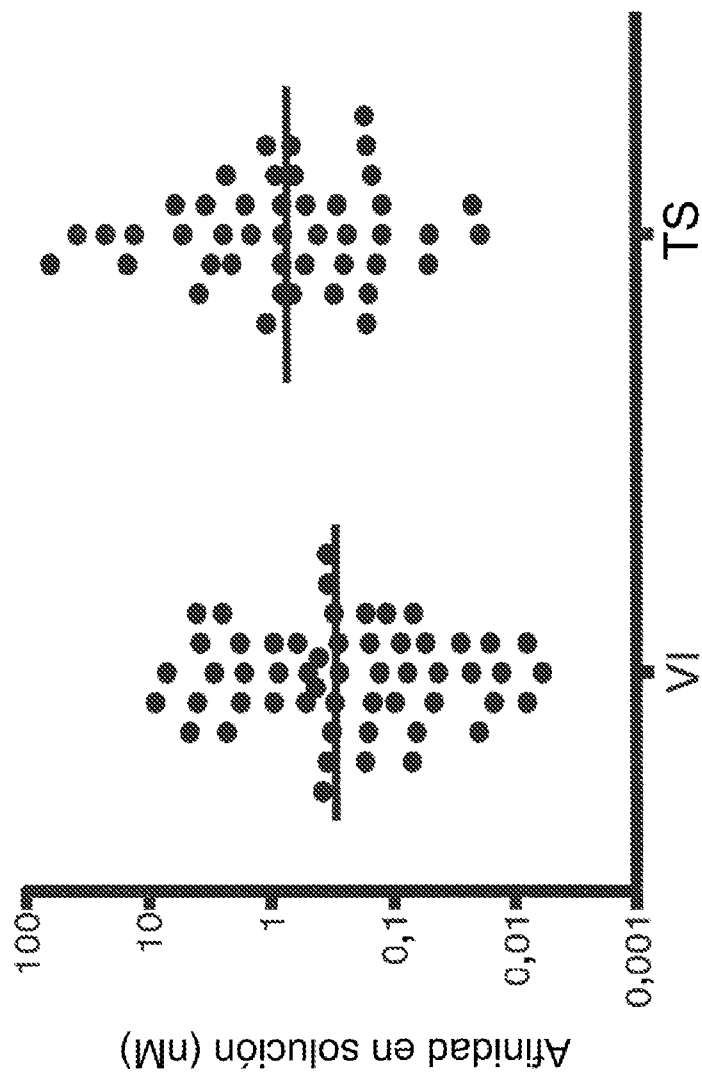


FIG. 11B

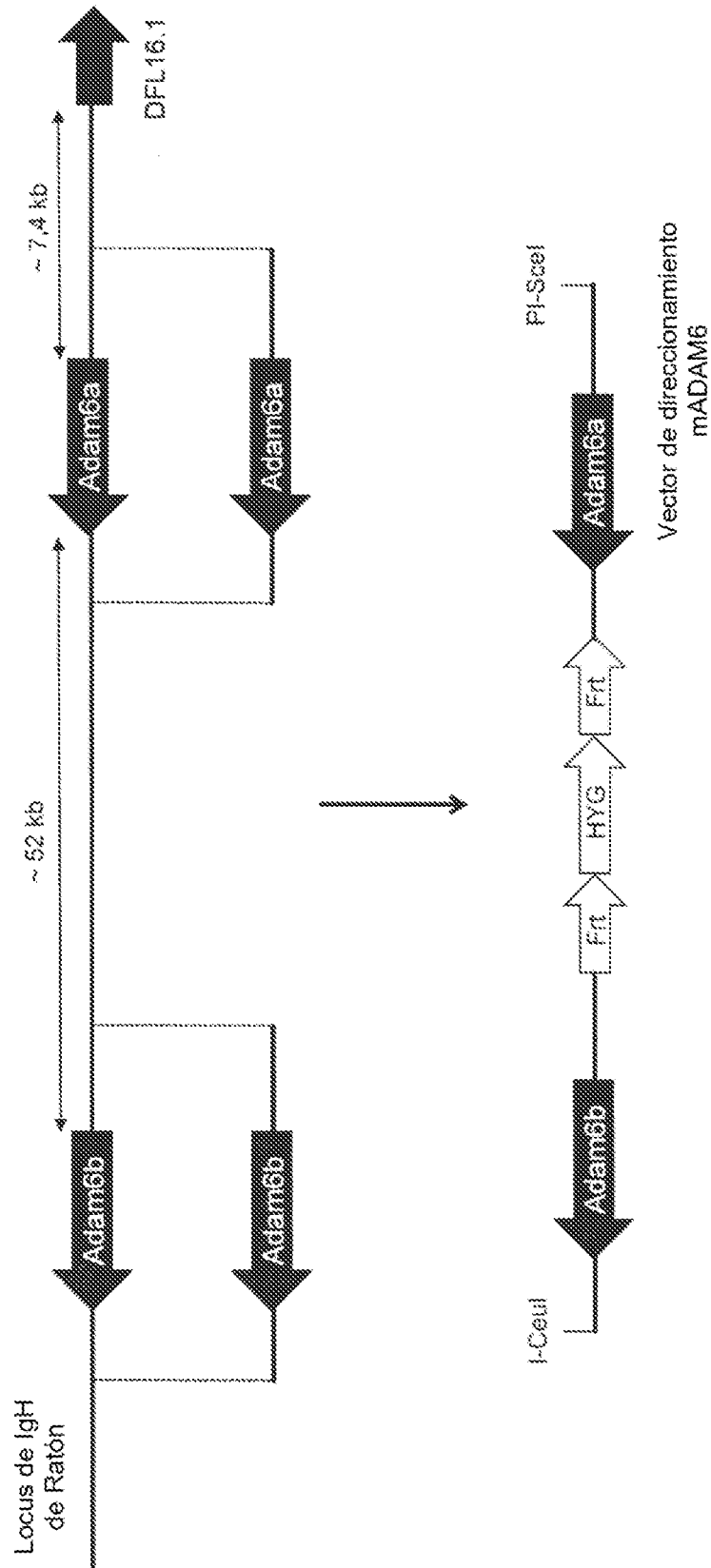


FIG. 12

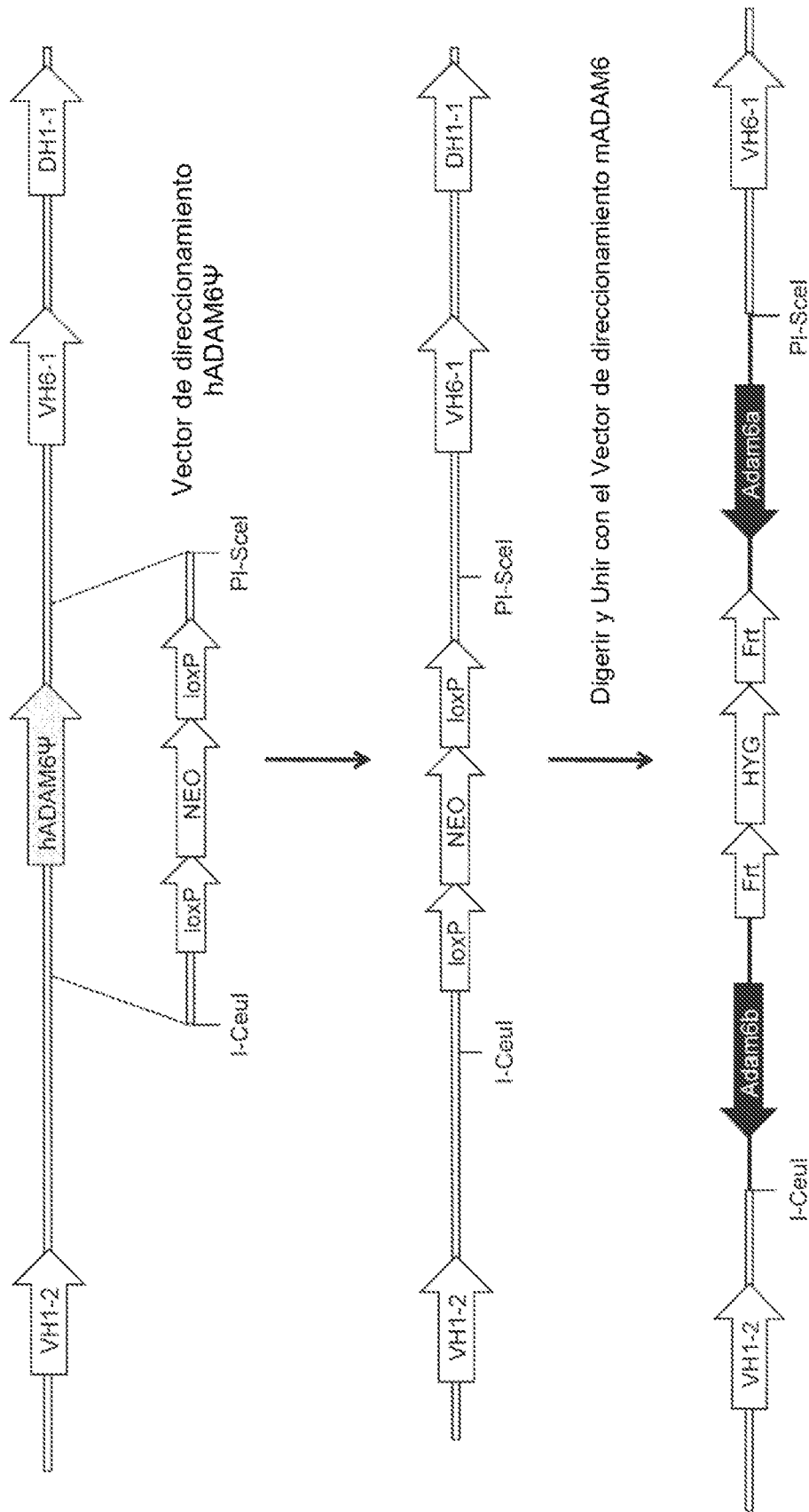


FIG. 13

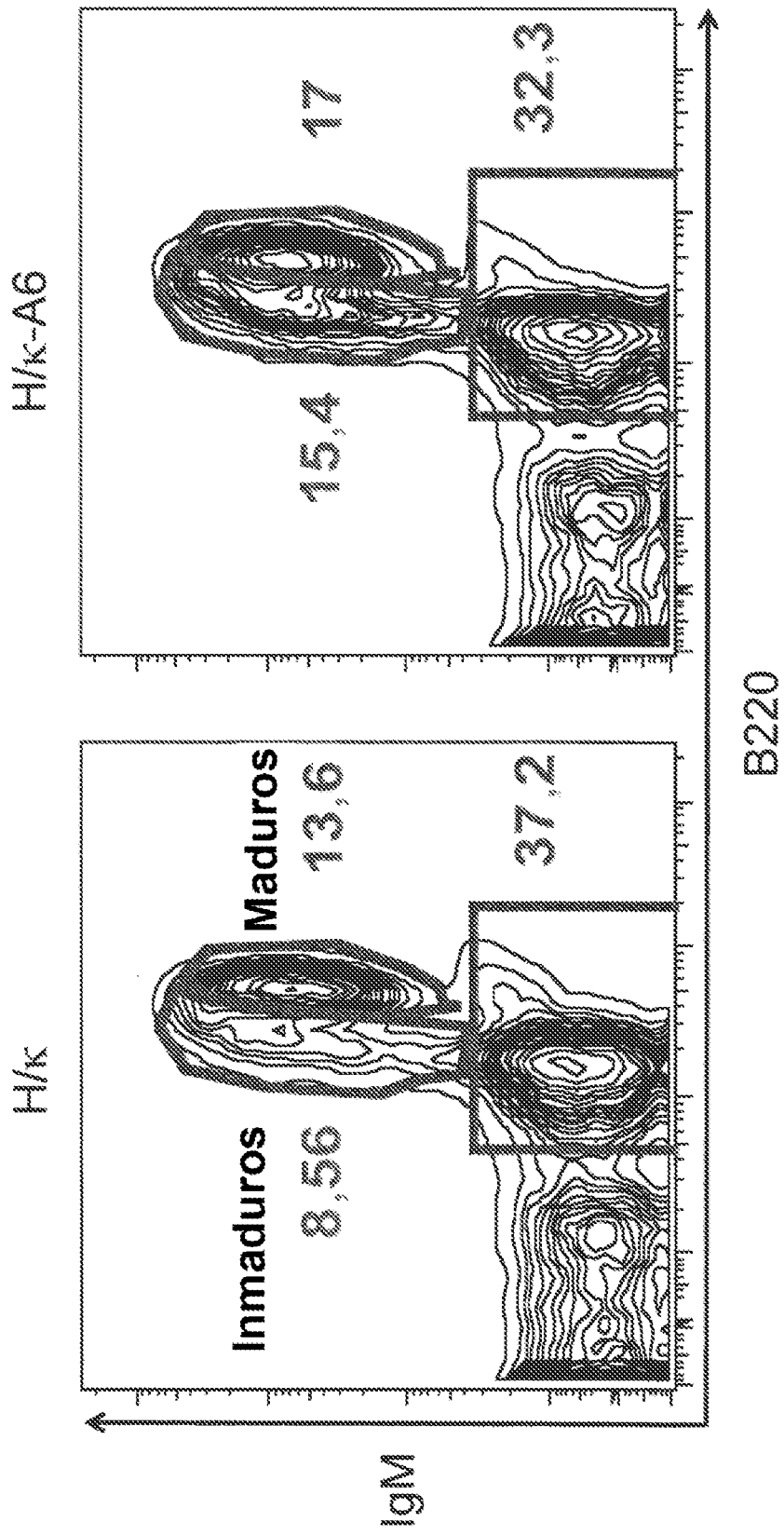


FIG. 14A

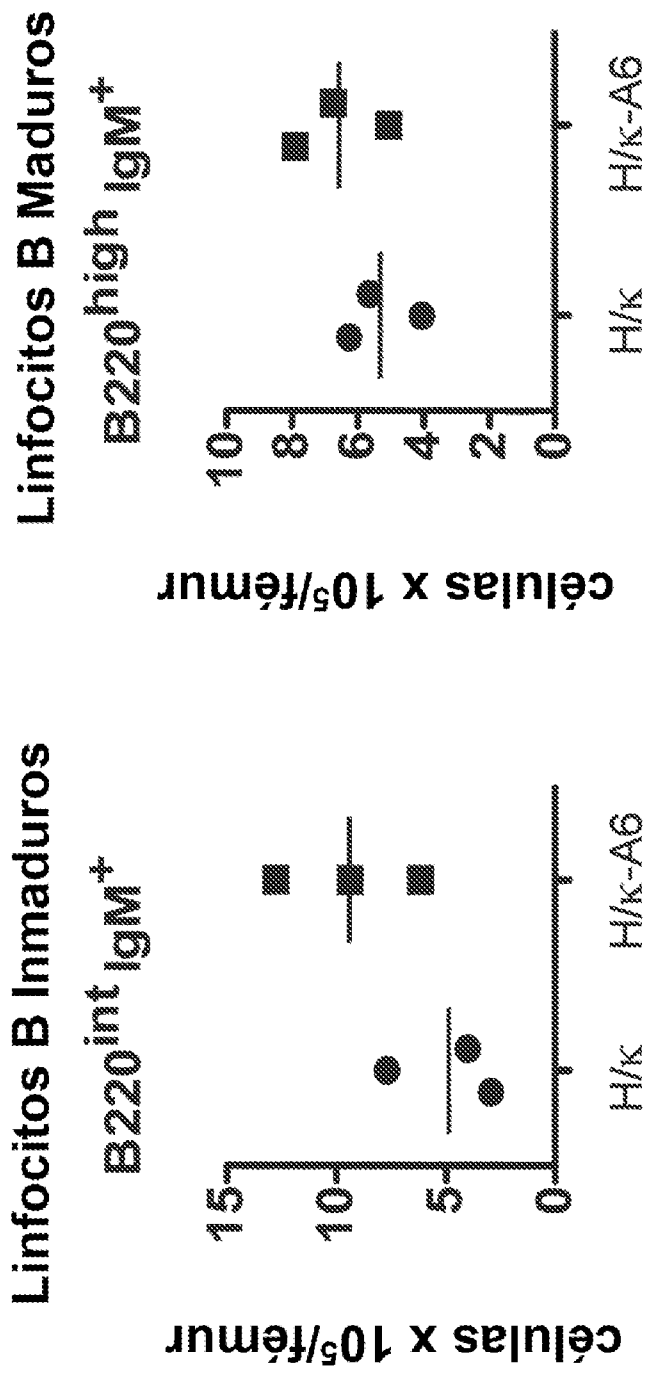


FIG. 14B

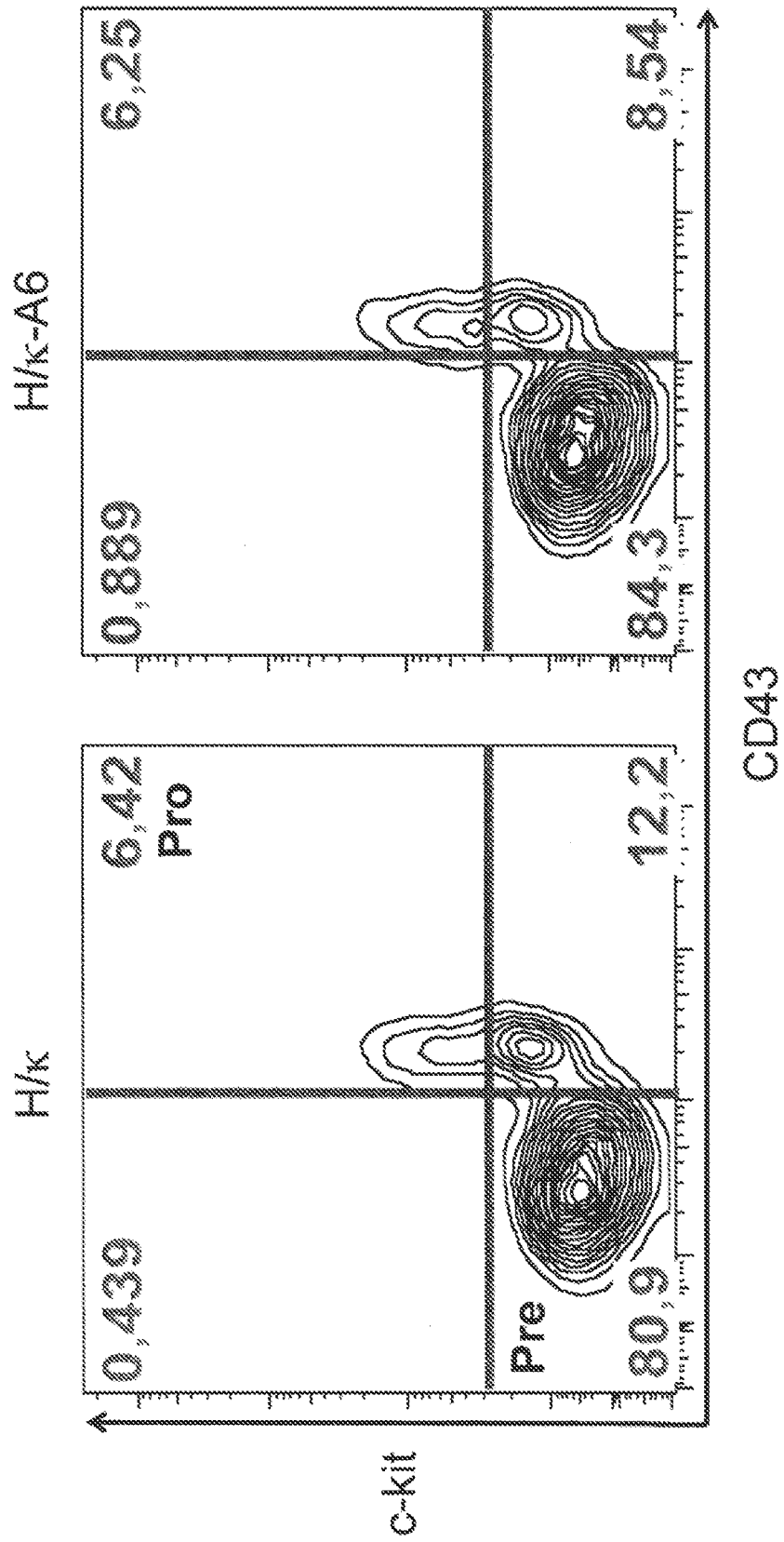


FIG. 15A

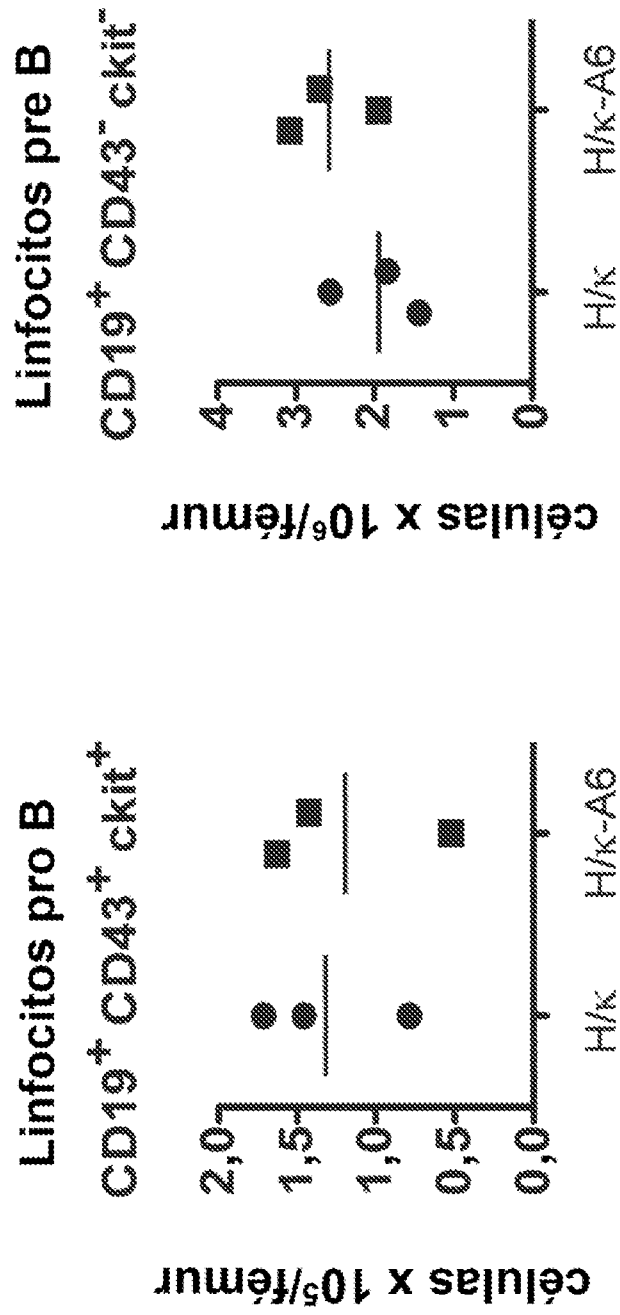


FIG. 15B

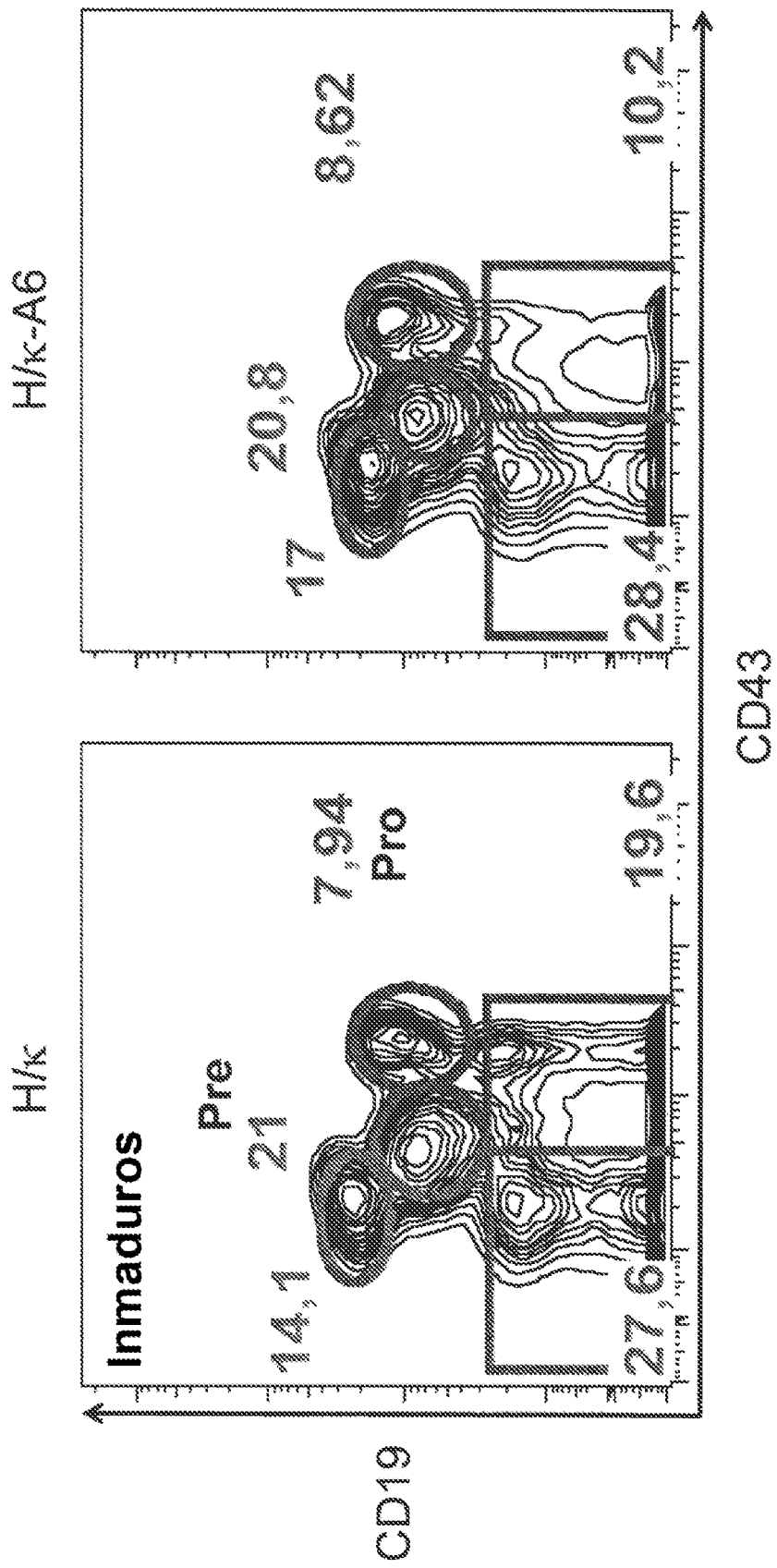


FIG. 16A

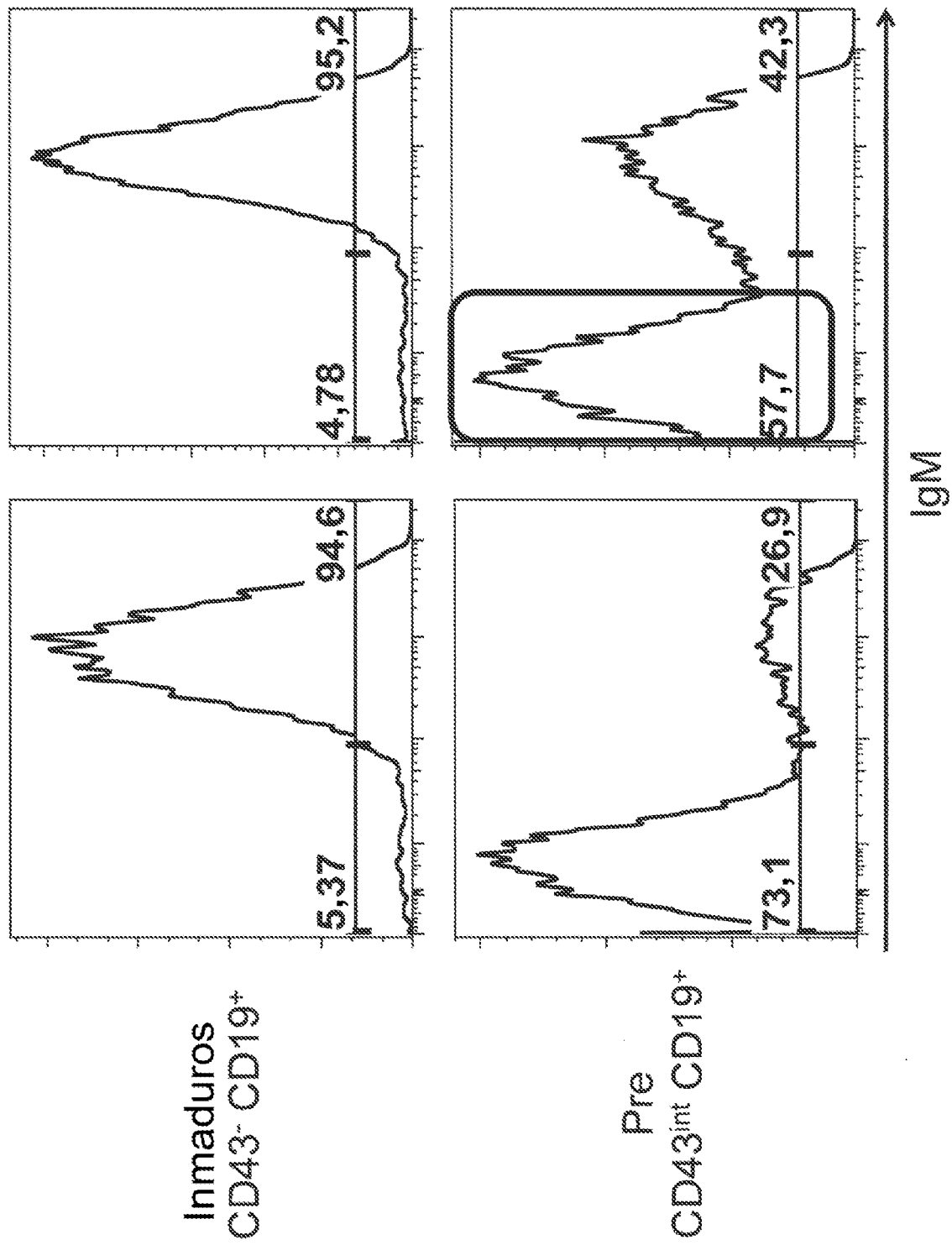


FIG. 16B

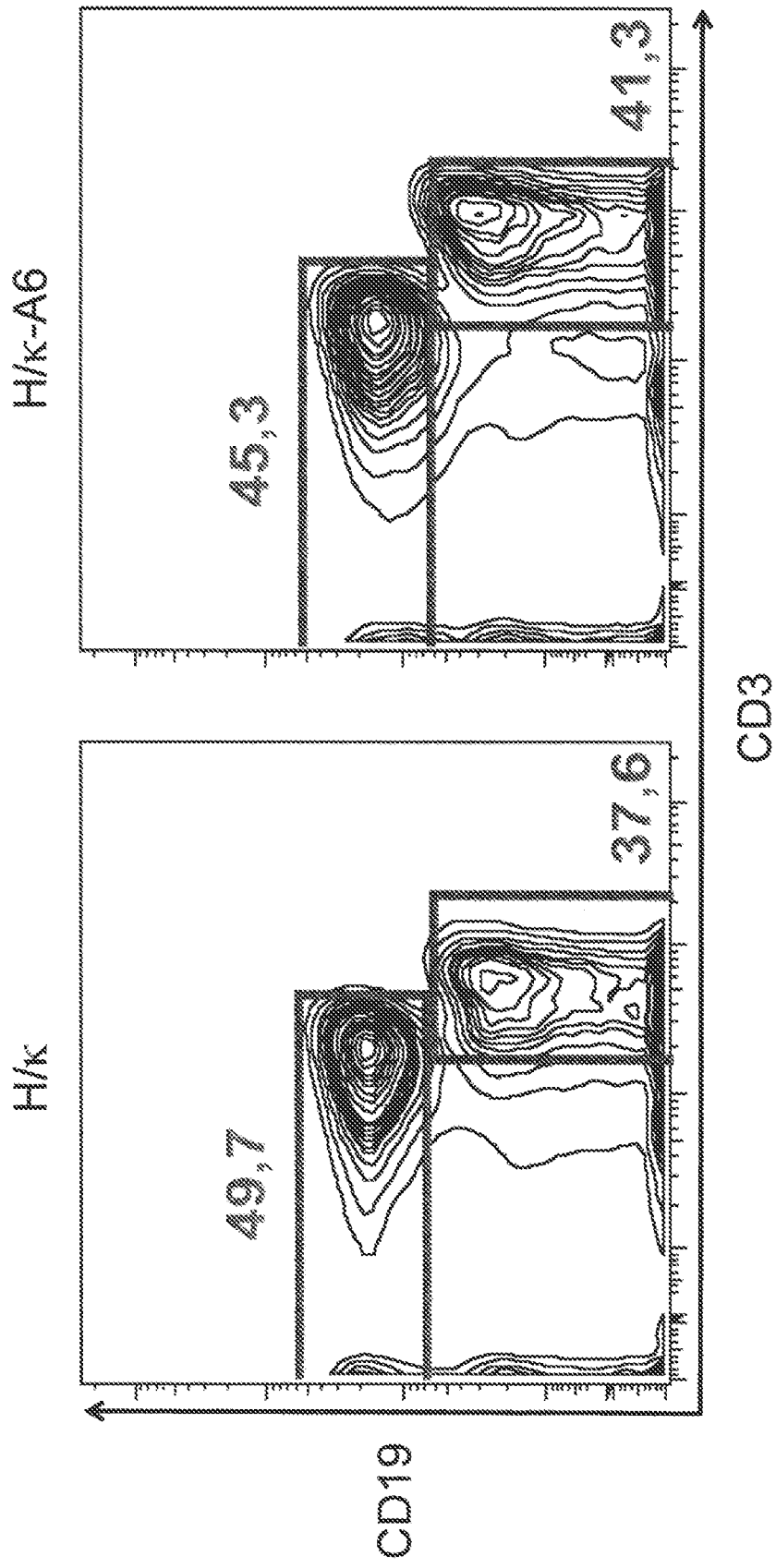


FIG. 17A

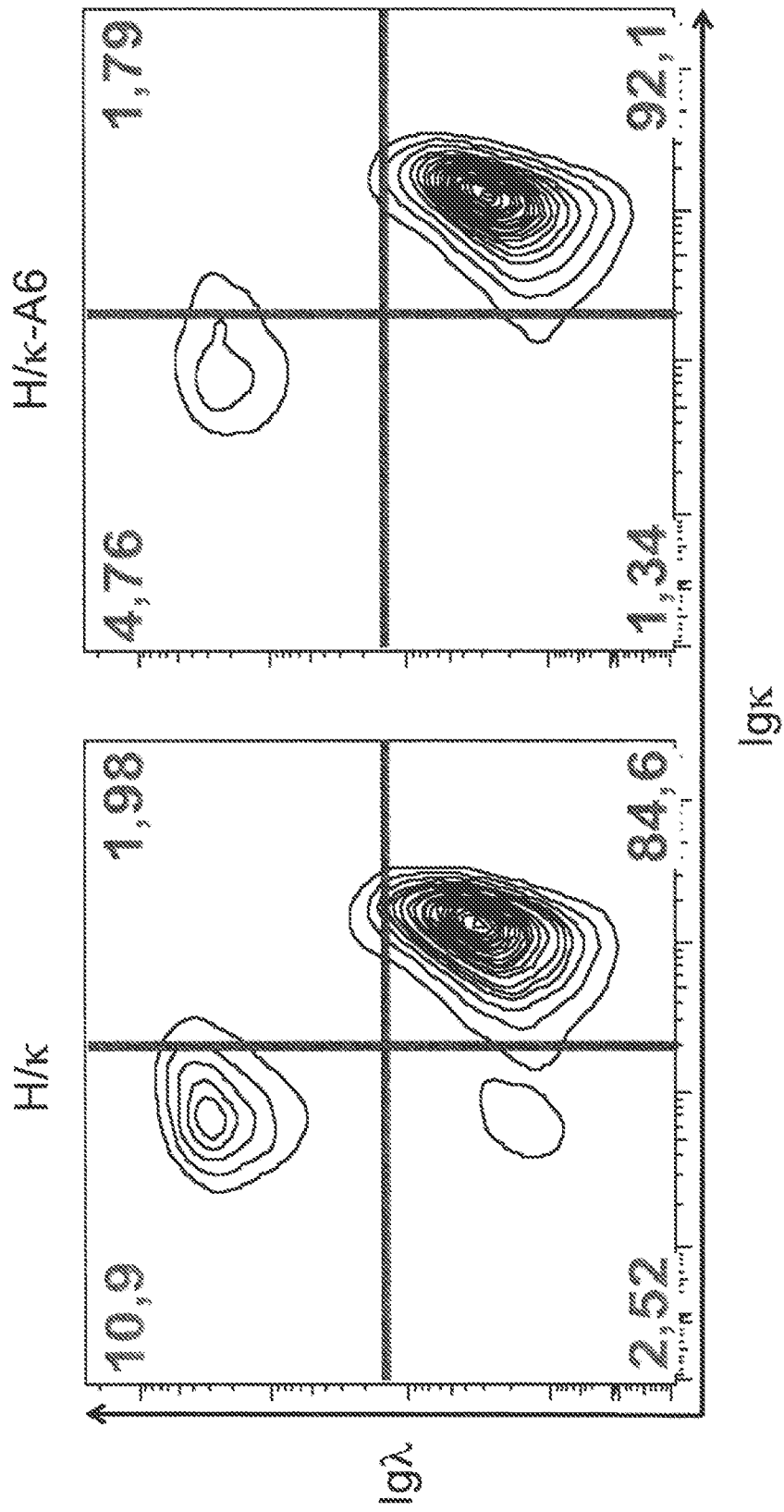


FIG. 17B

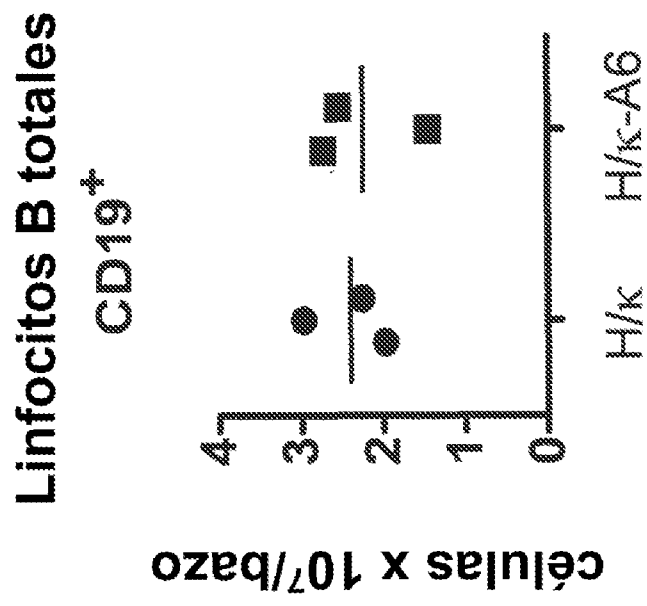


FIG. 17C

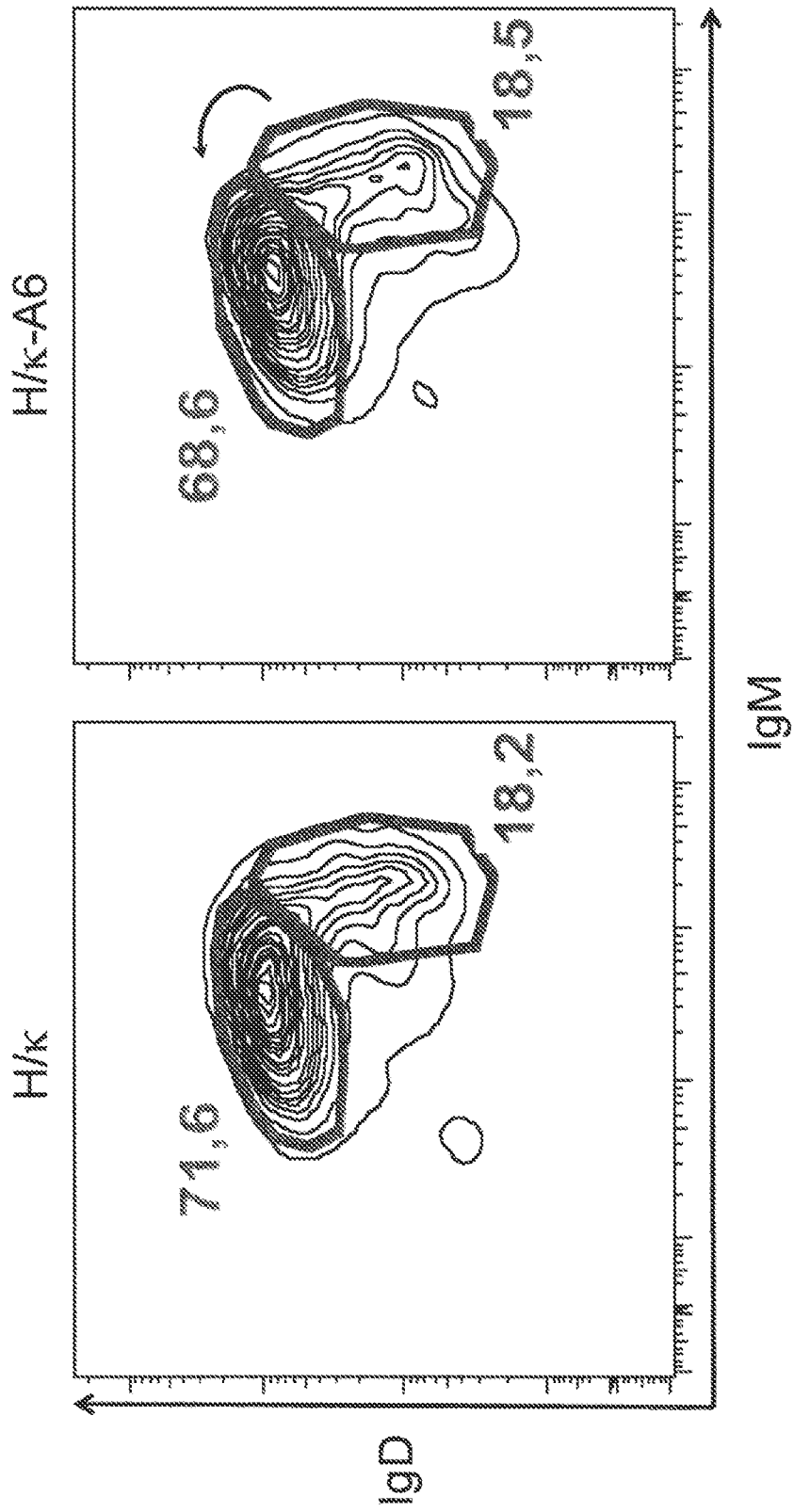


FIG. 18A

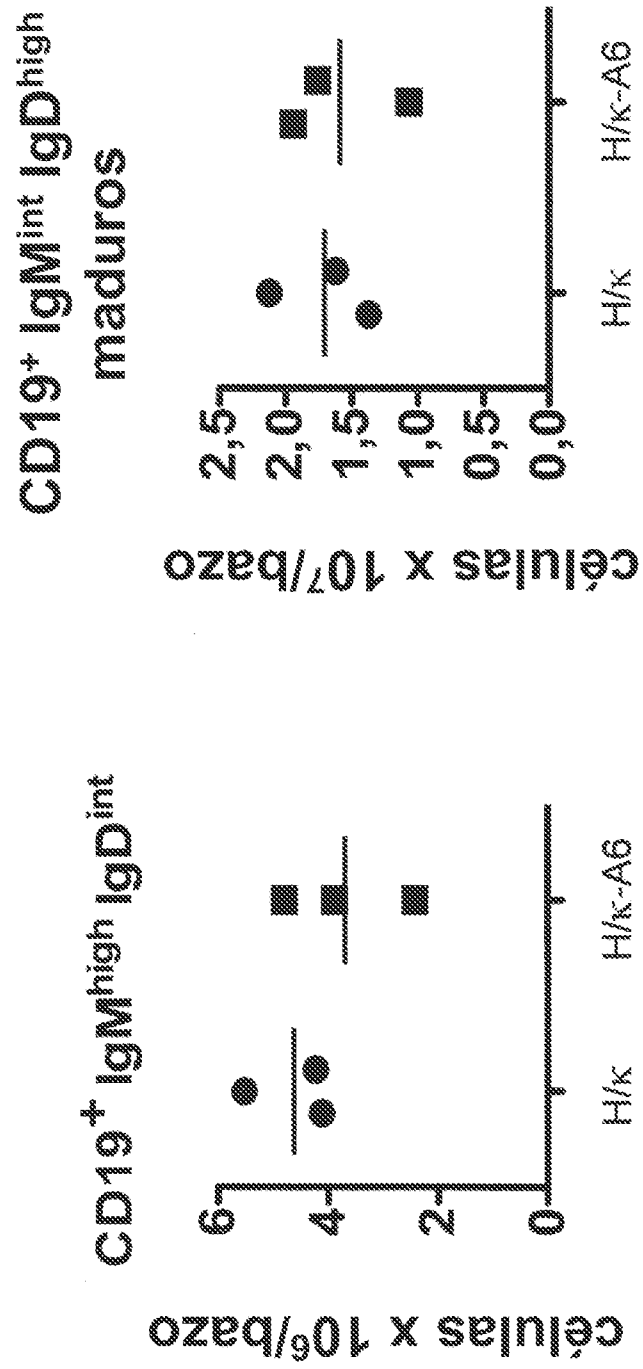


FIG. 18B

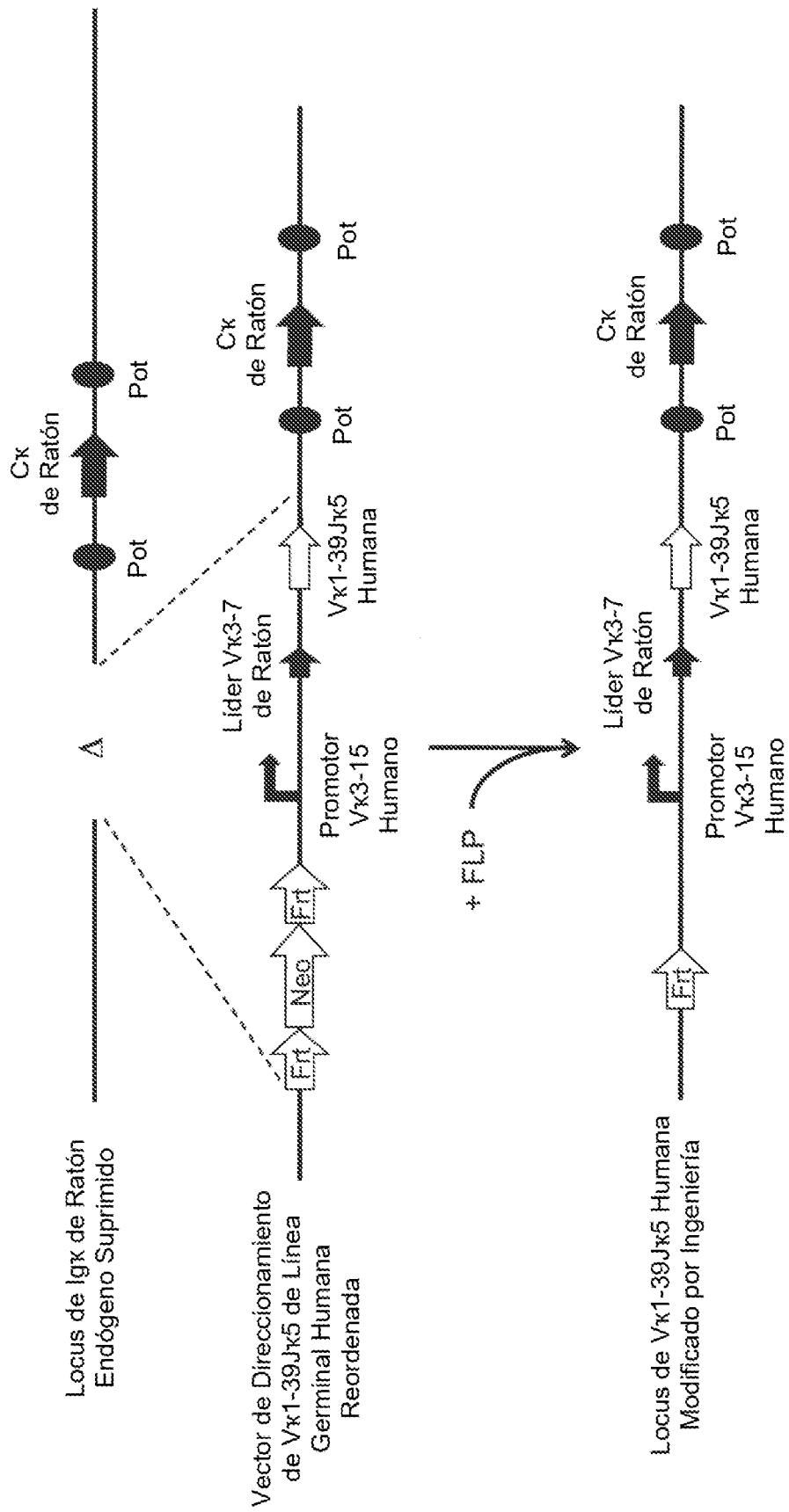


FIG. 19

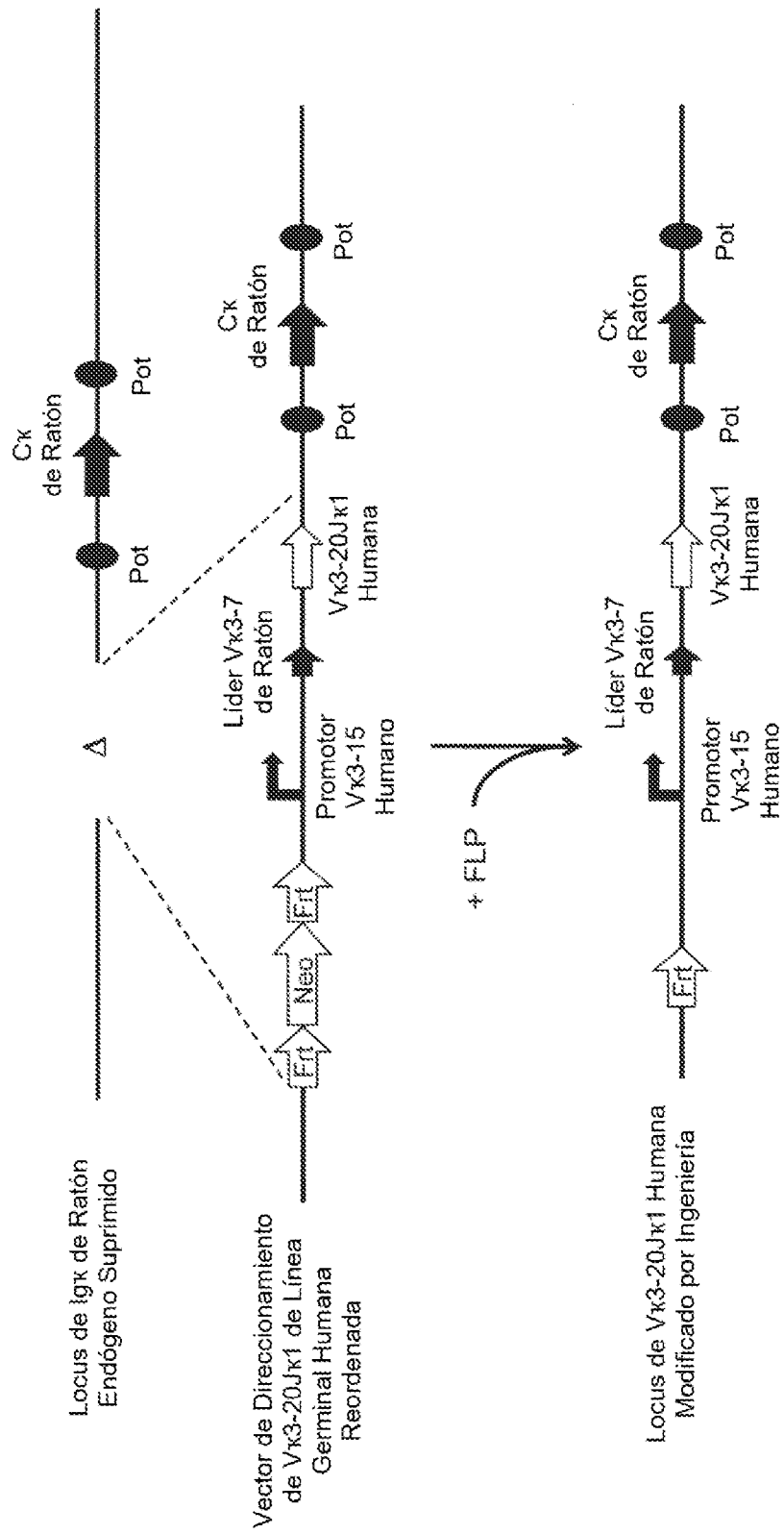


FIG. 20

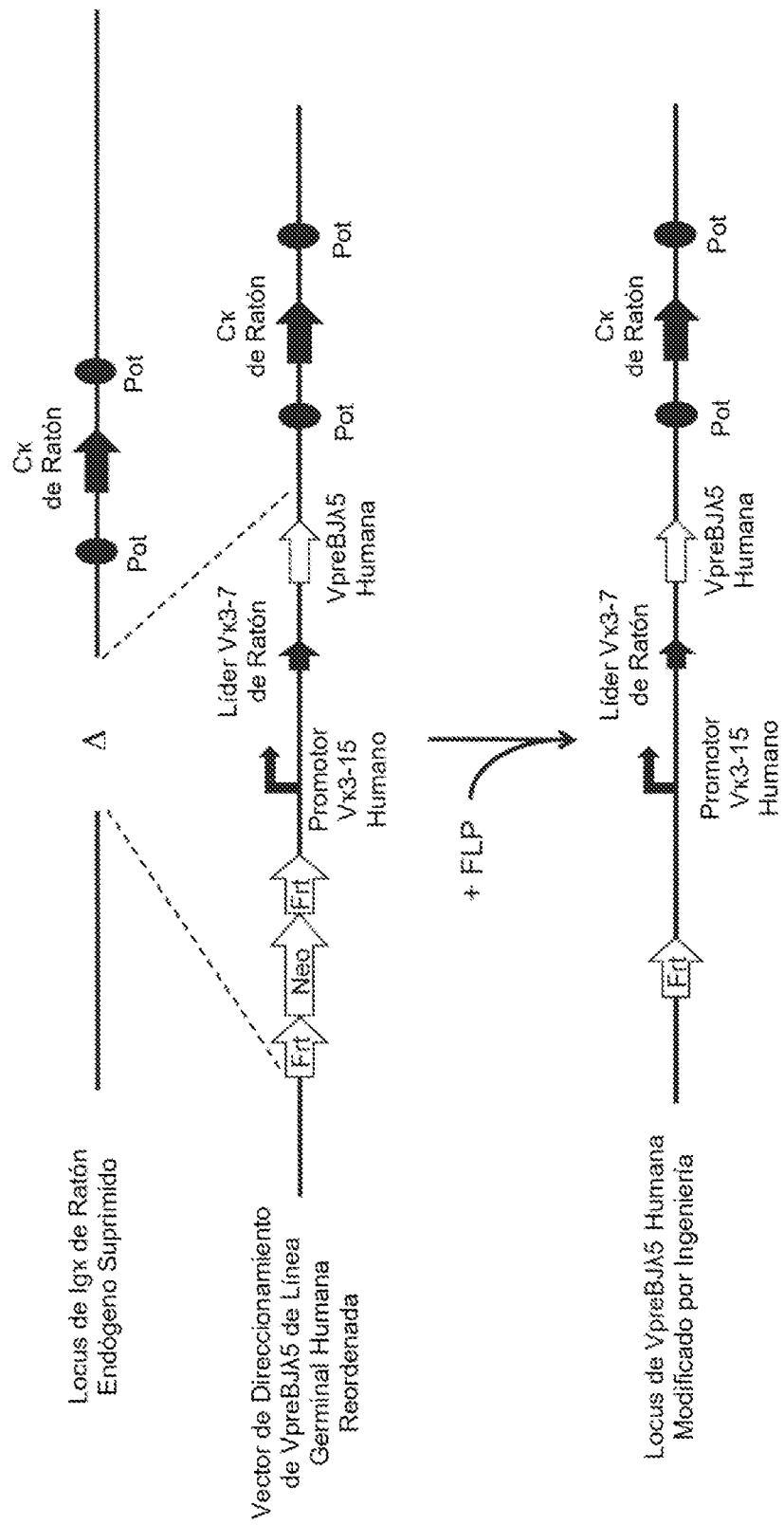


FIG. 21

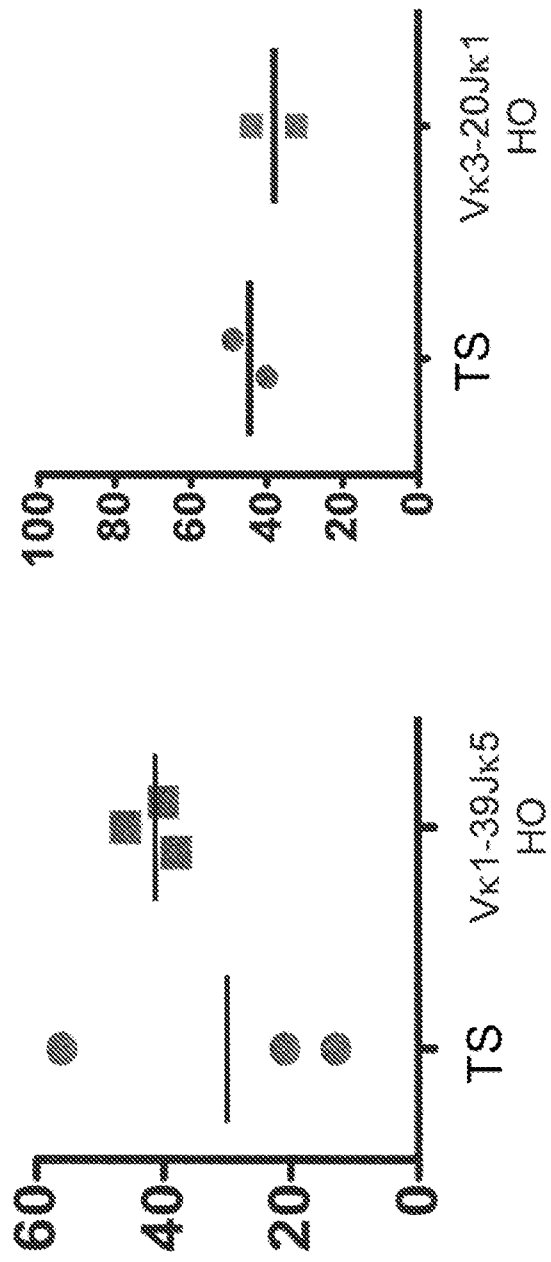


FIG. 22

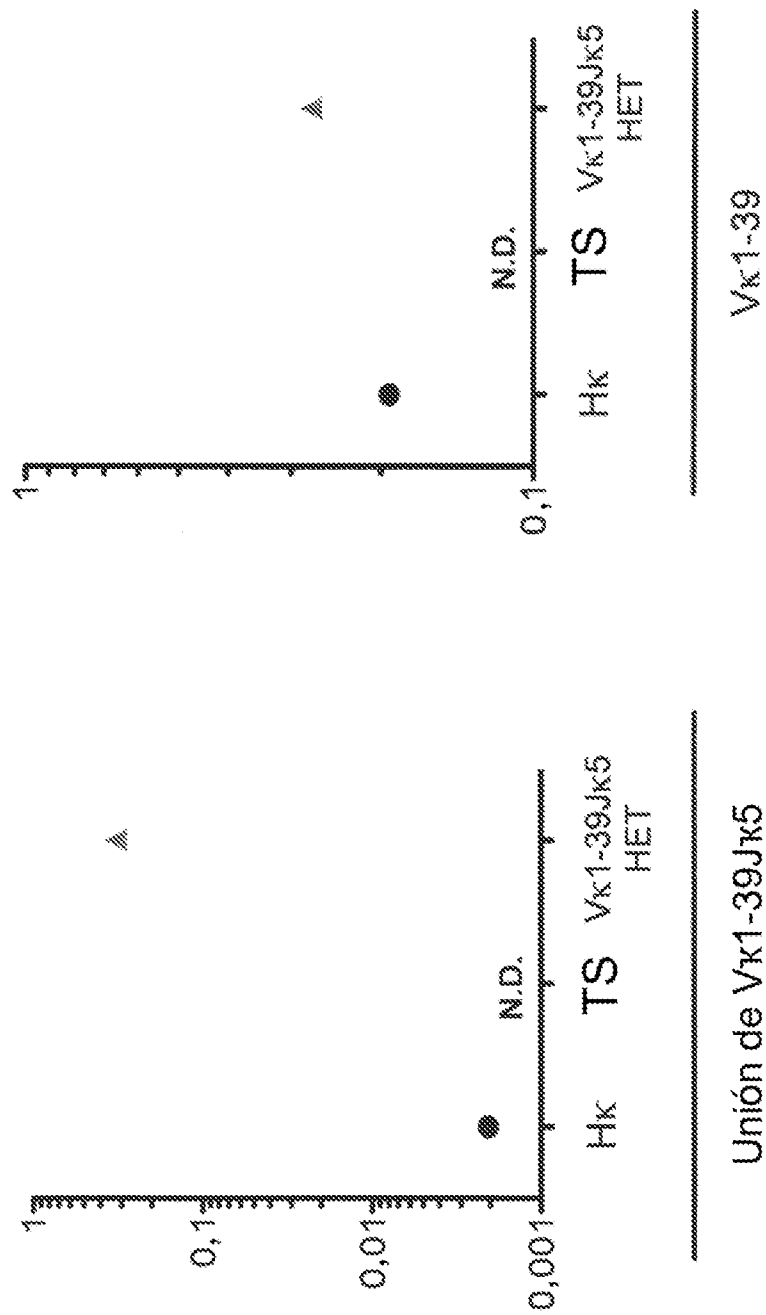


FIG. 23A

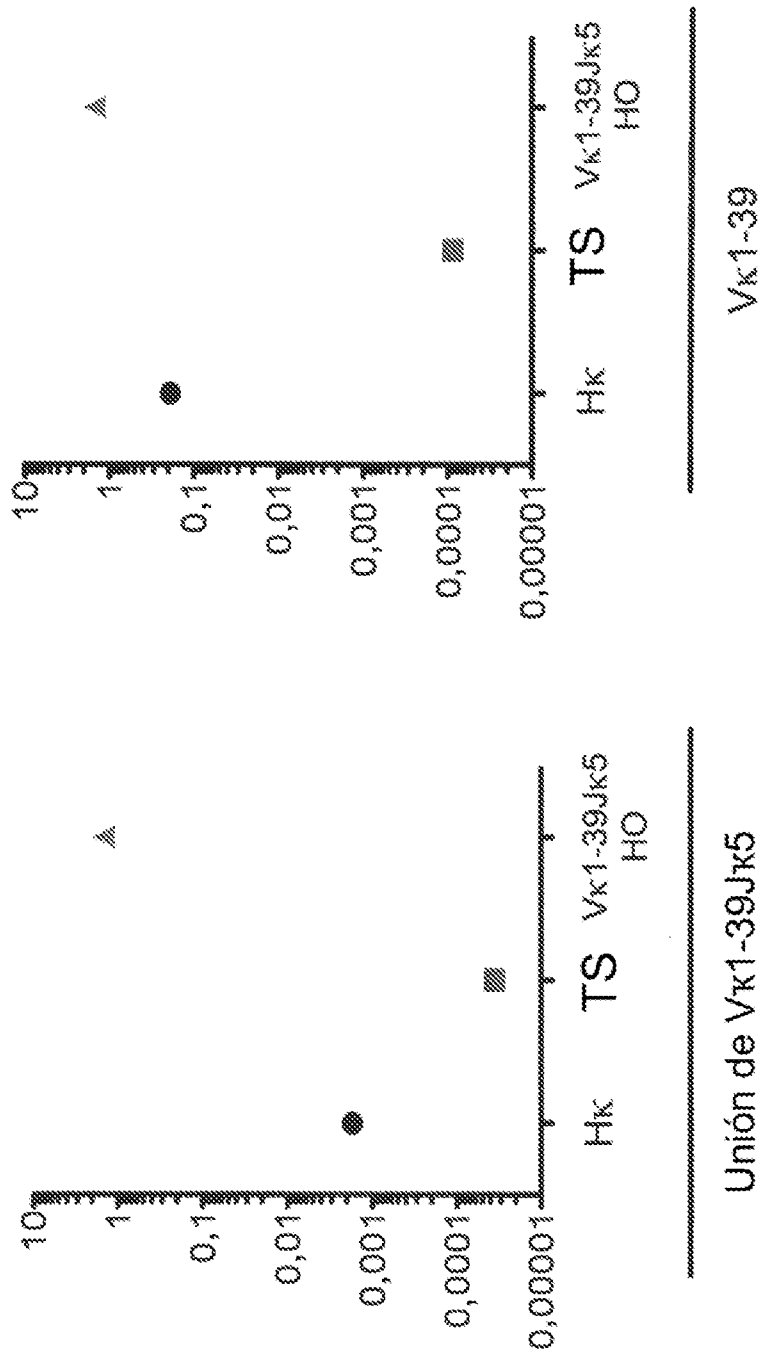


FIG. 23B

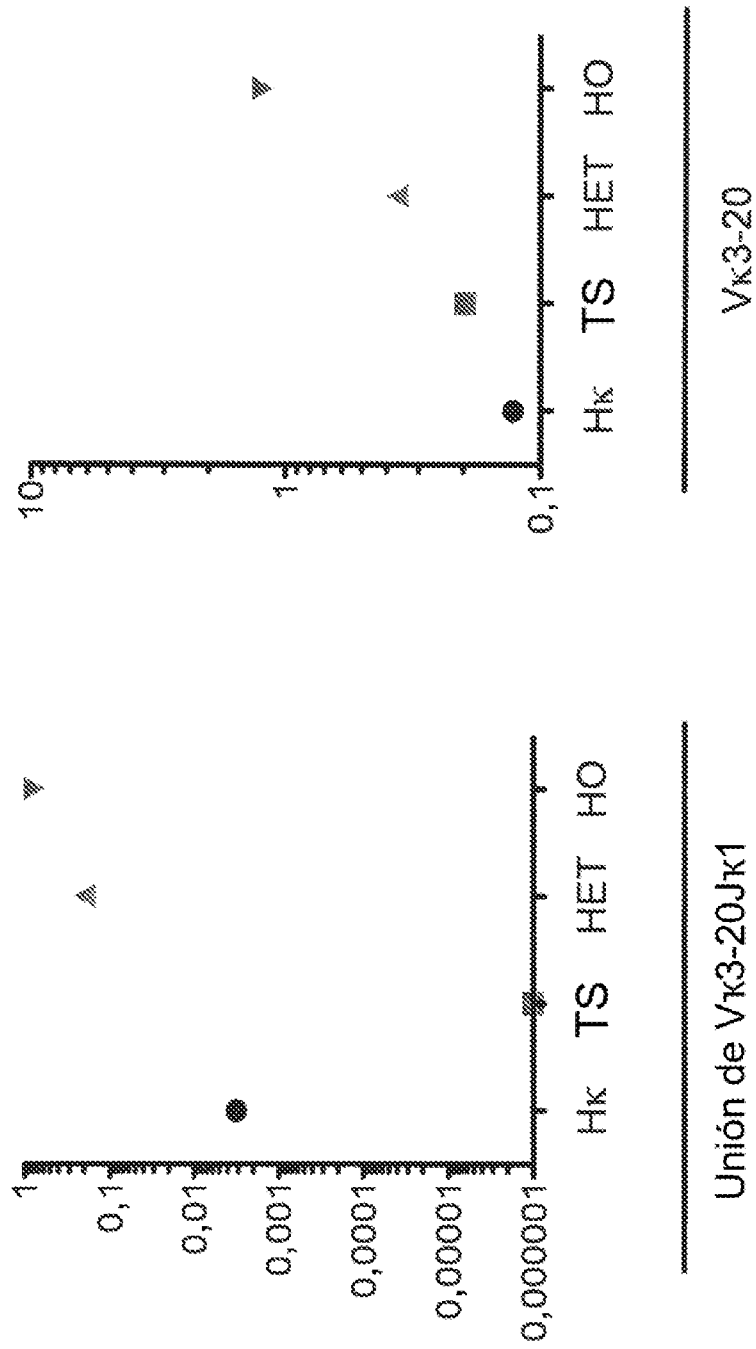


FIG. 23C

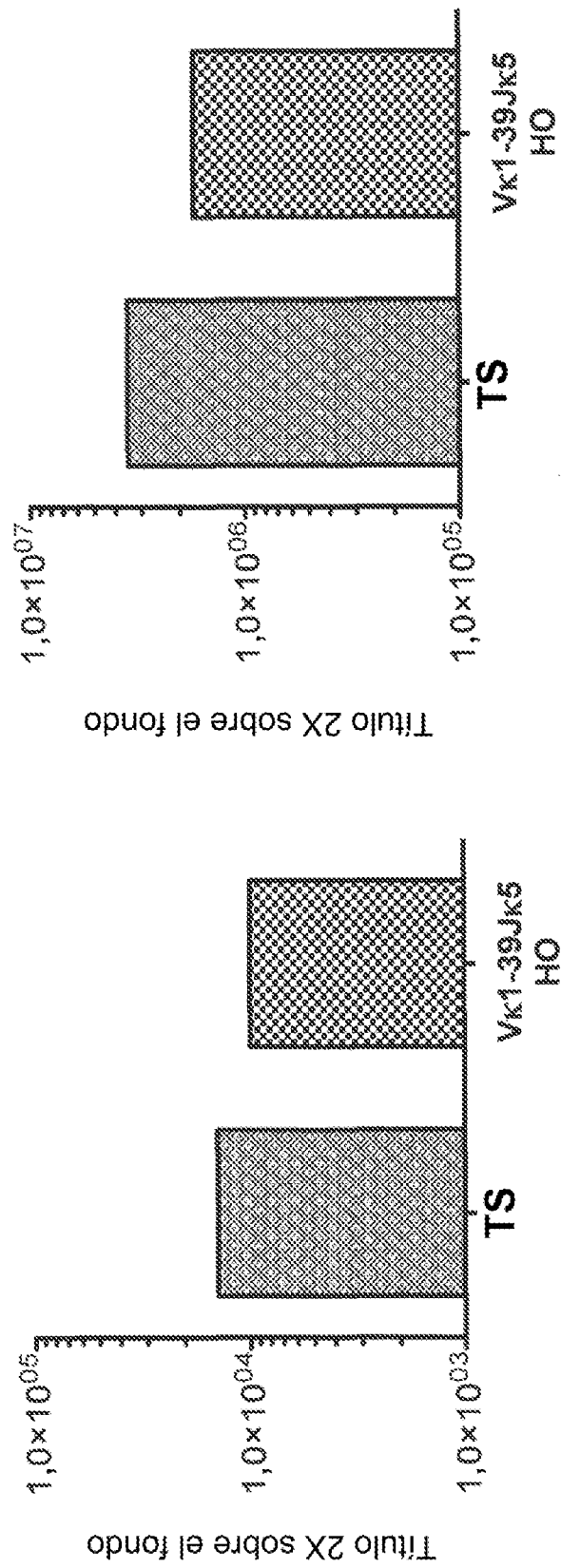


FIG. 24A

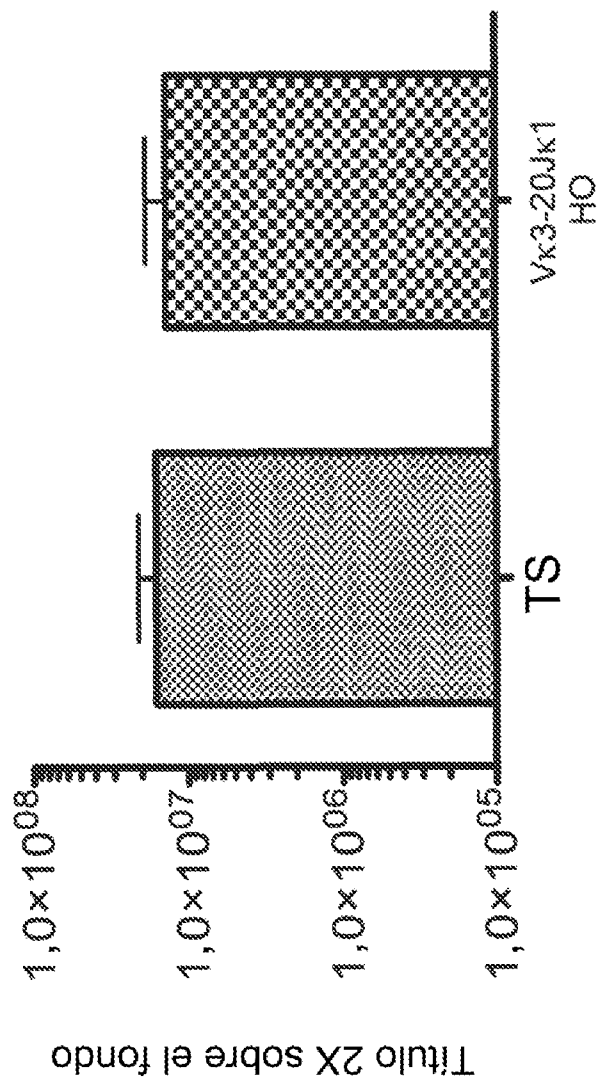


FIG. 24B