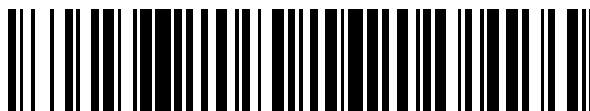


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 142**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2011** **E 11703799 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2501817**

54 Título: **Cadena ligera común de ratón**

30 Prioridad:

08.02.2010 US 302282 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2015

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;
MURPHY, ANDREW J. y
BUCKLER, DAVID R.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 547 142 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cadena ligera común de ratón

5 Campo de la invención

Se proporciona un ratón modificado genéticamente que expresa anticuerpos que tienen una cadena ligera variable de ser humano/constante de ratón común asociada con cadenas pesadas variables de ser humano/constantes de ratón distintas. Se proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico humano a partir de las
10 secuencias genéticas de la región variable humana de células B del ratón.

Antecedentes

Los anticuerpos comprenden típicamente un componente de cadena pesada homodimérica, donde cada monómero
15 de cadena pesada se asocia con una cadena ligera idéntica. Los anticuerpos que tienen un componente de cadena pesada heterodimérica (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) son deseables como anticuerpos terapéuticos. Pero producir anticuerpos que tengan un componente de cadena ligera adecuado que se pueda unir satisfactoriamente con cada una de las cadenas pesadas de un anticuerpo biespecífico resulta problemático.

20 En una estrategia, se puede seleccionar una cadena ligera supervisando las estadísticas de utilización de todos los dominios variables de cadena ligera, identificando la cadena ligera que más se utiliza en anticuerpos humanos, y emparejando esa cadena ligera in vitro con las dos cadenas pesadas de especificidad diferente.

25 En otra estrategia, se puede seleccionar una cadena ligera observando las secuencias de cadena ligera de una biblioteca de fagos de presentación (por ejemplo, una biblioteca de fagos de presentación que comprenden las secuencias de la región variable de cadena ligera humana, por ejemplo, una biblioteca de ScFV humanos) y seleccionando la región variable de cadena ligera más usada comúnmente de la biblioteca. Entonces, la cadena ligera se puede ensayar en las dos cadenas ligeras diferentes de interés.

30 En otra estrategia, se puede seleccionar una cadena ligera ensayando una biblioteca de fagos de presentación de secuencias variables de cadena ligera utilizando las secuencias variables de cadena pesada de ambas cadenas pesadas de interés como sondas. Se puede seleccionar na cadena ligera que se asocia con ambas secuencias variables de cadena pesada como cadena ligera para las cadenas pesadas.

35 En otra estrategia, una cadena ligera candidata se puede alinear con las cadenas ligeras equivalentes de las cadenas pesadas, y se hacen modificaciones en la cadena ligera para que coincida estrechamente en las características de secuencia comunes con las cadenas ligeras equivalentes de ambas cadenas pesadas. Si se necesita minimizar las probabilidades de inmunogenicidad, las modificaciones preferiblemente darán como resultado secuencias que están presentes en cadenas ligeras humanas conocidas, de forma que sea improbable que el
40 proceso proteolítico genere un epítipo para células T en base a los parámetros y métodos conocidos en la técnica para evaluar la probabilidad de inmunogenicidad (es decir, en sílice así como en ensayos húmedos).

45 Todas las estrategias anteriores se basan en métodos in vitro que incluye una serie de limitaciones a priori, por ejemplo, la identidad de secuencia, la capacidad para asociarse con cadenas pesadas específicas pre-seleccionadas, etc. Existe la necesidad en la técnica de composiciones y métodos que no se basen en la manipulación de las condiciones in vitro, sino que en su lugar emplee estrategias biológicamente más sensibles para producir proteínas de unión a epítipos humanos que incluyan una cadena ligera común.

Breve descripción de las figuras

50 La FIG. 1 ilustra una estrategia de dirección para reemplazar segmentos genéticos de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón con un gen de la región V κ 1-39J κ 5 humano.
La FIG. 2 ilustra una estrategia de dirección para reemplazar segmentos genéticos de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón con un gen de la región V κ 3-20J κ 1 humano.
55 La FIG. 3 ilustra una estrategia de dirección para reemplazar segmentos genéticos de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina endógena de ratón con un gen de la región VpreB/J λ 5 humano.

Sumario

60 Se proporcionan ratones modificados genéticamente que expresan dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humanos, donde los ratones tienen un repertorio variable de cadena ligera limitado. En particular, se proporciona un ratón donde el ratón comprende:

65 (a) una sustitución en el locus endógeno del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina con

un único segmento genético V κ 1-39/J κ 5 humano reordenado o un único segmento genético V κ 3-20/J κ humano reordenado, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante κ endógeno del ratón y donde el ratón carece de un locus de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que sea capaz de reordenar y formar un gen que codifique una región variable κ ; y,

(b) una sustitución de 90-100% del locus del gen endógeno del ratón de la región variable de cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno del ratón constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenar y formar un gen quimérico humano/ratón de cadena pesada reordenado.

También se proporciona una célula aislada a partir de un ratón modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula comprende:

(a) una sustitución en el locus endógeno del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina con un único segmento genético V κ 1-39/J κ 5 humano reordenado o un único segmento genético V κ 3-20/J κ humano reordenado, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante κ endógeno del ratón y donde el ratón carece de un locus de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que sea capaz de reordenar y formar un gen que codifique una región variable κ ; y,

(b) una sustitución de 90-100% del locus del gen endógeno del ratón de la región variable de cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno del ratón constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenar y formar un gen quimérico humano/ratón de cadena pesada reordenado.

Además se proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a un antígeno de interés que comprende la inmunización de dicho ratón con un antígeno de interés, obtención de una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina del ratón y el empleo de la secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina para producir un anticuerpo que se une al antígeno.

Adicionalmente se proporciona un método para producir un anticuerpo humano biespecífico, donde el método comprende la inmunización de dicho ratón y la producción del anticuerpo biespecífico utilizando secuencias genéticas de la región variable humanas de células B a partir del ratón.

También se proporciona el uso de dicho ratón para seleccionar un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina o segmento genético humanos.

También se hace referencia a un sistema biológico para genera un dominio variable de cadena ligera que se asocia y expresa con un repertorio diverso de dominios variables de cadena pesada humanos maduros de afinidad.

También se hace referencia a métodos para producir proteínas de unión que comprenden dominios variables de inmunoglobulina, que comprenden la inmunización de ratones que tienen un repertorio de cadena ligera de inmunoglobulina limitado con un antígeno de interés, y el empleo de una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina del ratón en una proteína de unión que se une específicamente al antígeno de interés. Los métodos incluyen métodos para producir dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humanos adecuados para su uso en la producción de proteínas de unión al antígeno multiespecífico.

Los ratones modificados genéticamente que se proporcionan pueden seleccionar dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina humanos maduros de afinidad derivados de un repertorio de segmentos genéticos de la región variable de cadena pesada humanos sin reordenar, donde los dominios variables de cadena pesada humanos maduros de afinidad se asocian expresan con un único dominio de cadena ligera humano derivado de un segmento genético de región variable de cadena humano.

Los ratones modificados genéticamente que se proporcionan expresan un único dominio variable de cadena ligera humano, a partir de un único segmento genético de la región variable de cadena ligera humano.

También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende un segmento genético de la región (VL) de cadena ligera que es capaz de reordenar y codificar un dominio VL humano de una cadena ligera de inmunoglobulina. En otro caso, el ratón no comprende más de dos segmentos genéticos VL humanos que son capaces de reordenar y codificar un dominio VL humano de una cadena ligera de inmunoglobulina.

El ratón modificado genéticamente que se proporciona comprende un único segmento humano de la región variable (VL) de cadena ligera de inmunoglobulina (V/J) reordenado (es decir, un segmento V/J) que codifica un dominio VL humano de cadena ligera de inmunoglobulina.

En una realización, el segmento genético es un es un segmento genético V κ 1-39/J κ 5 humano o un segmento genético V κ 3-20/J κ 1 humano.

En una realización, el segmento genético VL humano está unido operativamente a una secuencia líder humana o de ratón. En una realización, la secuencia es una secuencia líder de ratón. En una secuencia específica, la secuencia líder de ratón es una secuencia líder V κ 3-7 de ratón.

- 5 En una realización, el segmento genético está unido operativamente a una secuencia promotora de inmunoglobulina. En una realización, la secuencia promotora es una secuencia promotora humana. En una realización específica, el promotor humano de inmunoglobulina es un promotor V κ 3-15.

- 10 También se hace referencia a un ratón modificado genéticamente que comprende un locus que no comprende un segmento genético VL endógeno de ratón que sea capaz de reordenarse para formar un gen de cadena ligera de inmunoglobulina, donde el locus VL comprende un único segmento genético VL humano que es capaz de reordenarse para codificar una región VL de un gen de cadena ligera. En un caso específico, el segmento genético VL humano es un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o un segmento genético V κ 3-20J κ 1 humano.

- 15 En una realización, el locus VL comprende una secuencia líder flanqueada 5' (con respecto a la dirección transcripcional del segmento genético VL) con un promotor humano de inmunoglobulina y flanqueada 3' con un segmento genético VL humano que se reordena y codifica un dominio VL de una cadena ligera quimérica inversa que comprende una región constante de cadena ligera (CL) endógena de ratón. En una realización específica, el segmento genético VL está en el locus VL kappa (κ) de ratón, y la CL de ratón es una CL κ de ratón.

- 20 En una realización, el ratón comprende un locus de cadena ligera de inmunoglobulina lambda (λ) no funcional. En una realización específica, el locus λ comprende una eliminación de una o más secuencias del locus, donde la una o más eliminaciones hacen que el locus λ sea incapaz de reordenarse para formar un gen de cadena ligera. En otra realización todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos del locus λ se han eliminado.

- 25 En una realización, el locus VL del ratón modificado genéticamente es un locus κ , y el locus κ comprende un amplificador intrónico κ de ratón, un amplificador 3' κ de ratón, o ambos, el amplificador intrónico y el amplificador 3'.

- 30 En una realización, el ratón produce una cadena ligera que comprende un dominio VL somáticamente mutado derivado del segmento genético VL humano. En una realización, la cadena ligera comprende un dominio VL mutado somáticamente derivado del segmento genético VL humano, y una región CL κ de ratón. En una realización, el ratón no expresa una cadena ligera λ .

- 35 En una realización, el ratón modificado genéticamente es capaz de hipermutar somáticamente la secuencia de la región VL humana.

- En una realización, el ratón comprende una célula que expresa una cadena ligera que comprende un dominio VL humano mutado somáticamente unido a una CL κ de ratón, donde la cadena ligera se asocia con una cadena pesada que comprende un dominio VH mutado somáticamente derivado de un segmento genético VH humano y donde la cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada (CH) de ratón.

- 40 El ratón comprende una sustitución del 90-100% del locus genético endógeno de ratón de la región variable de la cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno de ratón constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenarse y formar un gen quimérico humano/de ratón de cadena pesada reordenado. El ratón reordena los segmentos genéticos VH humanos y expresa una cadena pesada inversa quimérica de inmunoglobulina que comprende un dominio VH humano y un CH de ratón. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos VH endógenos de ratón se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos. En una realización, la sustitución es con al menos 19, al menos 39, o al menos con 80 u 81 segmentos genéticos VH humanos no reordenados. En una realización, la sustitución es con al menos 12 segmentos genéticos VH humanos no reordenados, al menos 25 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales. En una realización, el ratón comprende una sustitución de todos los segmentos D y J de ratón con al menos un segmento D humano no reordenado y al menos un segmento J humano no reordenado. En una realización, el al menos un segmento D humano no reordenado se selecciona de entre D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, D7-27, y una combinación de los mismos. En una realización, el al menos un segmento J humano no reordenado se selecciona de entre J1, J3, J4, J5, J6, y una combinación de los mismos. En una realización específica el uno o más segmentos genéticos VH humanos se seleccionan de entre un segmento genético humano 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, y una combinación de los mismos.

- 65 En una realización, el ratón comprende una célula B que expresa una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno de interés, donde la proteína de unión comprende una cadena ligera derivada de un reordenamiento V κ 1-39/J κ 5 humano o un reordenamiento V κ 3-20/J κ 1 humano, y donde la células comprende un gen de cadena

pesada de inmunoglobulina reordenado derivado de un reordenamiento de segmentos genéticos humanos que se seleccionan de entre los segmentos genéticos VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH 4-39, VH4-59, y VH5-51. En una realización, el uno o más segmentos genéticos VH humanos están reordenados con un segmento genético J humano de cadena pesada que se selecciona de entre J1, J3, J4, J5, y J6. En una realización, el uno o más segmentos genéticos J y VH humanos están reordenados con un segmento genético D humano que se selecciona de entre D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, y D7-27. En una realización específica, el gen de cadena ligera tiene 1, 2, 3, 4, o 5 o más hipermutaciones somáticas.

En una realización, el ratón comprende una células B que comprende una secuencia genética de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina reordenada que comprende un segmento genético VH, JH y DH que se selecciona de entre VH 2-5 + JH1 + D6-6, VH3-23 + JH4 + D3, VH3-23 + JH4 + D3-10, VH3-30 + JH1 + D6-6, VH3-30 + JH3 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D1-7, VH3-30 + JH4 + D5-12, VH3-30 + JH4 + D6-13, VH3-30 + JH4 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D7-27, VH3-30 + JH5 + D3-22, VH3-30 + JH5 + D6-6, VH3-30 + JH5 + D7-27, VH4-39 + JH3 + D1-26, VH4-59 + JH3 + D3-16, VH4-59 + JH3 + D3-22, VH4-59 + JH4 + D3-16, VH5-51 + JH3 + D5-5, VH5-51 + JH5 + D6-13, y VH5-51 + JH6 + D3-16. En una realización específica, la célula B expresa una proteína de unión que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de cadena pesada de ratón, y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana fusionada con una región constante de cadena ligera de ratón.

En una realización, el segmento genético VL es un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano, y el ratón expresa un cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio VL derivado del segmento genético VL humano y (ii) una CL de ratón; donde la cadena ligera se asocia con la cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) una CH de ratón y (ii) un dominio VH humano mutado somáticamente derivado de un segmento genético VH humano que se selecciona de entre un segmento genético VH humano 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, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. La CL es una CL κ de ratón.

En una realización, el segmento genético VL humano es un segmento genético V κ 3-20J κ 1 humano, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica inversa que comprende (i) un dominio VL derivado del segmento genético VL humano, y (ii) una CL de ratón; donde la cadena ligera se asocia con una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) una CH de ratón, y (ii) una VH humana mutada somáticamente derivada de un segmento genético VH humano que se selecciona de entre un segmento genético VH humano 1-2, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 4-59, y 5-51, y una combinación de los mismos. En una realización, el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. La CL es una CL κ de ratón.

También se hace referencia a un ratón que comprende ambos, el segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano y el segmento genético V κ 3-20J κ 1 humano, y el ratón expresa una cadena ligera quimérica humana que comprende (i) un dominio VL derivado de un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o un segmento genético V κ 3-20J κ 1 humano, y (ii) una CL de ratón; donde la cadena ligera está asociada con una cadena pesada quimérica inversa que comprende (i) una CH de ratón, y (ii) una VH humana mutada somáticamente derivada de un segmento genético VH humano que se selecciona de entre los segmentos genéticos VH humanos 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, y una combinación de los mismos. En una realización el ratón expresa una cadena ligera que está mutada somáticamente. En un caso la CL es una CL κ de ratón.

El ratón que se proporciona comprende una sustitución del 90-100% del locus del gen endógeno del ratón de la región variable de la cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno de ratón constante de la cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada son capaces de reordenarse y formar un gen quimérico humano/de ratón de cadena pesada reordenado. En una realización específica, todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos de VH endógenos de ratón no reordenados se sustituyen con una pluralidad de segmentos genéticos VH humanos no reordenados. En una realización, la sustitución es con al menos 18, al menos 39, al menos 80, u 81 segmentos genéticos VH humanos no reordenados. En una realización, la sustitución es con al menos 12 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales, al menos 25 segmentos genéticos VH humanos no reordenados funcionales, o al menos 43 segmentos genéticos VH humanos no reordenados.

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

En una realización, el ratón expresa un anticuerpo quimérico inverso que comprende una cadena ligera que comprende una CL κ de ratón y un dominio VL humano mutado somáticamente derivado de un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o un segmento genético V κ 3-20J κ 1 humano, y una cadena pesada que comprende una CH de ratón y un dominio VH humano mutado somáticamente derivado de un segmento genético VH humano que se selecciona de entre los segmentos genéticos VH humanos 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, 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 una sustitución de segmentos humanos VL κ endógenos de ratón con el segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o el segmento genético V κ 3-20J κ 1 humano, y comprende una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos VH endógenos de ratón con un repertorio completo o sustancialmente completo de segmentos genéticos VH humanos.

También se hace referencia a una célula de ratón que se proporciona aislada de un ratón como se describe en el presente documento. Se proporciona una célula donde la célula es una célula aislada a partir de un ratón modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula comprende:

(a) una sustitución en el locus endógeno del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina con un único segmento genético V κ 1-39/J κ 5 humano reordenado o un único segmento genético V κ 3-20/J κ humano reordenado, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante κ endógeno del ratón y donde el ratón carece de un locus de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que sea capaz de reordenar y formar un gen que codifique una región variable κ ; y,

(b) una sustitución de 90-100% del locus del gen endógeno del ratón de la región variable de cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno del ratón constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenar y formar un gen quimérico humano/ratón de cadena pesada reordenado. En una realización la célula es una célula ES. En una realización, la célula es un linfocito. También se hace referencia a una célula de ratón aislada a partir de un ratón como se describe en el presente documento que es una célula B. En un caso, la célula B expresa una cadena pesada quimérica que comprende un dominio variable derivado de un segmento genético humano; y una cadena ligera derivada de un segmento V κ 1-39J κ 5 humano reordenado o, un segmento V κ 3-20J κ 1 humano reordenado; donde el dominio variable de la cadena pesada se fusiona a la región constante de ratón y el dominio variable de cadena ligera se fusiona a una región constante de ratón o humana.

También se hace referencia un hibridoma, donde el hibridoma se produce con una célula B de un ratón como se describe en el presente documento. En un caso específico, la célula B es de un ratón como se describe en el presente documento que se ha inmunizado con un inmunógeno que comprende un epítipo de interés, y la célula B expresa una proteína de unión que se une al epítipo de interés, la proteína de unión tienen un dominio VH humano mutado somáticamente y una CH de ratón, y tiene un dominio VL humano derivado de un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o V κ 3-20J κ 1 humano y una CL de ratón.

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

En un aspecto, se hace referencia a un vector de direccionamiento, que comprende, desde 5' a 3' en la dirección transcripcional con referencia a las secuencias de los brazos de homología del ratón 5' y 3', un brazo de homología de ratón 5', un promotor de inmunoglobulina humano o de ratón, una secuencia líder humana o de ratón, y un segmento genético LCVR humano que se selecciona de entre un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o V κ 3-20J κ 1 humano, y un brazo de homología de ratón 3'. En un caso, los brazos de homología 5' y 3' dirigen el vector a una secuencia 5' con respecto a una secuencia amplificadora que está presente 5' y proximal al gen de la región constante κ de ratón. En un caso, el promotor es un promotor del segmento genético humano de la región variable de inmunoglobulina. En un caso específico, el promotor es un promotor V κ 3-15 humano. En un caso, la secuencia líder es una secuencia líder de ratón. En una realización específica, la secuencia líder es una secuencia líder V κ 3-7 de ratón.

En un caso, se proporciona un vector de direccionamiento como se describe anteriormente, pero en lugar del brazo de homología de ratón 5', el promotor humano o de ratón está flanqueado 5' con un sitio de reconocimiento de recombinasa específica del sitio (SRRS), y en lugar del brazo de homología de ratón 3', el segmento genético LCVR humano está flanqueado 3' por un SRRS.

También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso producido por un ratón como se describe en el presente documento, donde el anticuerpo quimérico inverso comprende una cadena ligera que comprende una CL de ratón y una VL humana, y la cadena pesada comprende una VH humana y una CH de ratón.

También se proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a un antígeno de interés que comprende inmunizar el ratón que se proporciona con un antígeno de interés, obtener una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina del ratón y emplear la secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina para producir un anticuerpo que se une al antígeno.

5 También se hace referencia un método para producir un anticuerpo que se proporciona, que comprende la expresión en una única célula de (a) una primera secuencia genética VH de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia genética CH humana; (b) una secuencia genética VL de un ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia genética CL humana; y, (c) mantener la células bajo condiciones suficientes para expresar un anticuerpo humano completo, y aislar el anticuerpo. En un caso, la célula comprende una segunda secuencia genética VH de un segundo ratón inmunizado como se describe en el presente documento fusionada con una secuencia genética CH humana, la primera secuencia genética codifica un dominio VH que reconoce un primer epítipo, y la segunda secuencia genética VH codifica un dominio VH que reconoce un segundo epítipo, donde el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos.

También se hace referencia a un método para producir una proteína de unión a un epítipo, que comprende la exposición de un ratón como se describe en el presente documento con un inmunógeno que comprende un epítipo de interés, mantener el ratón bajo 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; donde la proteína de unión al epítipo comprende una cadena pesada que comprende una VH humana mutada somáticamente y una CH de ratón, asociada con una cadena ligera que comprende una CL de ratón y una VL humana derivada de un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o V κ 3-20J κ 1 humano.

25 También se hace referencia a una célula que expresa una proteína de unión al epítipo, donde la célula comprende: (a) una secuencia de nucleótido VL humana que codifica un dominio VL humano derivado de un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o V κ 3-20J κ 1 humano, donde la secuencia de nucleótido está fusionada (directamente o mediante un enlazador) con una secuencia ADNc de un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina humana (por ejemplo, una secuencia ADN de un dominio constante κ humano); y, (b) una primera secuencia de nucleótido VH que codifica un dominio VH humano derivado de una primera secuencia de nucleótido VH humana, donde la primera secuencia de nucleótido VH humana está fusionada (directamente o mediante un enlazador) a una secuencia ADNc de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana; donde la proteína de unión al epítipo reconoce un primer epítipo. En un caso, la proteína de unión al epítipo se une al primer epítipo con una constante de disociación menor de 10^{-6} M, menor de 10^{-8} M, menor de 10^{-9} M, menor de 10^{-10} M, menor de 10^{-11} M, o menor de 10^{-12} M.

En un caso, la célula comprende una segunda secuencia de nucleótido VH humana que codifica un segundo dominio VH humano, donde la segunda secuencia VH humana está fusionada (directamente o mediante un enlazador) a una secuencia ADNc de un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina humana, y donde el segundo dominio VH humano 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 más), y donde la proteína de unión al epítipo reconoce el primer epítipo y el segundo epítipo, y donde las primera y segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina se asocian cada una con una cadena ligera idéntica de (a).

En un caso, el segundo dominio VH se une al segundo epítipo con una constante de disociación que es menor de 10^{-6} M, menor de 10^{-8} M, menor de 10^{-9} M, menor de 10^{-10} M, menor de 10^{-11} M, o menor de 10^{-12} M.

En un caso, la proteína de unión al epítipo comprende una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina, que se asocian cada una de ellas con una cadena ligera idéntica derivada de un segmento genético VL humano que se selecciona de entre un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o V κ 3-20J κ 1 humano, donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une al primer epítipo con una constante de disociación en un intervalo nanomolar a picomolar, la segunda cadena pesada de inmunoglobulina se une al segundo epítipo con una constante de disociación en el intervalo nanomolar a picomolar, 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, en 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, en el intervalo milimolar), y uno o más de las VL, la VH de la primera cadena pesada de inmunoglobulina, y la VH de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, están mutadas somáticamente.

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

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

5 También se hace referencia a un anticuerpo quimérico inverso, que comprende una VH humana y un dominio constante de cadena pesada de ratón, una VL humana y un dominio constante de cadena ligera de ratón, donde el anticuerpo se produce por un proceso que comprende la inmunización de un ratón como se describe en el presente documento con un inmunógeno que comprende un epítipo, y el anticuerpo se une específicamente al epítipo del inmunógeno con el que se inmunizó al ratón. En un caso, el dominio VL está mutado somáticamente. En un caso el dominio VH está mutado somáticamente. En un caso, ambos, el dominio VL y el dominio VH están mutados somáticamente. En un caso, el VL está unido a un dominio constante κ de ratón.

15 En un aspecto, en el ratón que se proporciona, el ratón comprende segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada que sustituyen todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos variables de cadena pesada del ratón en el locus endógeno de ratón; no más de un segmento genético humano variable de cadena ligera se selecciona de entre un segmento $V\kappa 1-39J\kappa 5$ reordenado y un $V\kappa 3-20J\kappa 1$ reordenado, sustituye todos los segmentos genéticos de ratón variables de cadena ligera; donde los segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada están unidos a un gen endógeno de ratón constante de cadena pesada, y el segmento genético humano variable de cadena ligera se une a un gen endógeno de ratón constante $C\kappa$.

20 También se hace referencia a una célula ES de ratón que comprende una sustitución de todos o sustancialmente todos los segmentos genéticos de ratón variables de cadena pesada con segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada, y no más de uno o dos segmentos humanos V/J de cadena ligera reordenados, donde los segmentos genéticos humanos variables de cadena pesada están unidos a un gen de ratón constante de cadena pesada de inmunoglobulina, y los segmentos humanos V/J de cadena ligera están unidos a un gen constante de cadena ligera de inmunoglobulina de ratón o humano. En un caso específico, el gen constante de cadena ligera es un gen constante de ratón.

30 También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno producida por un ratón como se describe en el presente documento. En un caso específico, la proteína de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se fusiona con una región constante de ratón, y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina humana se deriva de un segmento genético $V\kappa 1-39$ o un segmento genético $V\kappa 3-20$, donde la región constante de la cadena ligera es una región constante de ratón.

35 También se hace referencia a una proteína de unión al antígeno completamente humana que se produce a partir de un secuencia genética de región variable de inmunoglobulina de un ratón como se describe en el presente documento, donde la proteína de unión al antígeno comprende una cadena pesada completamente humana que comprende una región variable humana que se deriva de una secuencia de un ratón como se describe en el presente documento, y una cadena ligera completamente humana que comprende una región variable $V\kappa 1-39$ o $V\kappa 3-20$. En un caso, la región variable de la cadena ligera comprende una a cinco mutaciones somáticas. En un caso, la región variable de cadena ligera es una región variable de cadena ligera equivalente que se empareja en una célula B de ratón con la región variable de cadena pesada.

45 En un caso, la proteína de unión al antígeno completamente humana comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, donde la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada comprenden regiones variables no idénticas que se derivan independientemente de un ratón como se ha descrito en el presente documento, y donde cada una de las primera y segunda cadenas pesadas que se expresan a partir de una célula huésped se asocian con una cadena ligera humana derivada de un segmento genético $V\kappa 1-39$ o un segmento genético $V\kappa 3-20$. En un caso la primera cadena pesada comprende una primera región variable de cadena pesada que se une específicamente a un primer epítipo de un primer antígeno, y la segunda cadena pesada comprende una segunda región variable de cadena pesada que se une específicamente a un segundo epítipo de un segundo antígeno. En un caso específico, el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo, y el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos; en un caso específico, la unión del primer epítipo por la primera molécula de la proteína de unión no bloquea la unión del segundo epítipo por una segunda molécula de la proteína de unión.

55 En un caso, una proteína de unión completamente humana que se deriva de una secuencia de inmunoglobulina humana de un ratón como se describe en el presente documento comprende una primera cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina, donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una primera región variable que no es idéntica a una región variable de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, y donde la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un determinante de unión a la proteína A tipo silvestre, y la segunda cadena pesada carece de un determinante de unión de proteína A tipo silvestre. En un caso, la primera cadena pesada de inmunoglobulina se une a la proteína A bajo 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, cien veces, o mil veces más débilmente que como se une la primera cadena pesada de inmunoglobulina a la proteína A bajo condiciones de aislamiento. En una realización específica, las primera y segunda cadenas pesadas son isotipos IgG1, donde la segunda cadena pesada comprende una

modificación que se selecciona de entre 95R (EU 435R), 96F (EU 436F), y una combinación de los mismos, y donde la primera cadena pesada carece de tal modificación.

Se proporciona un método que es un método para producir un anticuerpo biespecífico humano, donde el método comprende la inmunización de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y produciendo el anticuerpo biespecífico utilizando secuencias genéticas humanas de la región variable de células B de ratón.

En un aspecto, el método para producir una proteína de unión al antígeno biespecífica comprende la exposición de un primer ratón como se proporciona a un primer antígeno de interés que comprende un primer epítipo, exponer un segundo ratón como se proporciona en el presente documento a un segundo antígeno de interés que comprende un segundo epítipo, permitir que el primer y segundo ratón tenga cada uno una respuesta inmunitaria a los antígenos de interés, identificar en el primer ratón una primera región variable de cadena pesada humana que se une con el 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 en el 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 que se deriva de un segmento genético V κ 1-39 humano o V κ 3-20 humano para formar una proteína de unión al antígeno biespecífica, y aislar la proteína de unión al antígeno biespecífica.

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

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

En una realización, el dominio variable de la cadena ligera comprende 2 a 5 mutaciones somáticas. En una realización, el dominio variable de la cadena ligera es una cadena ligera mutada somáticamente equivalente que se expresa en una célula B del primer o segundo ratón inmunizado con o bien el primero o el segundo dominio variable de cadena pesada.

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

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

Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento se pueden utilizar en conjunción con otra cualquiera, a menos de que se indique otra cosa o sea aparente por el contexto. Otras realizaciones llegarán a ser aparentes para los expertos en la técnica a partir de la revisión de la siguiente descripción.

Descripción detallada

La presente invención no se limita a los métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, por lo que tales métodos y condiciones pueden variar. También se tiene que entender que la terminología que se utiliza en el presente documento es solamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende que sea limitante, aunque el ámbito de la presente invención se define por las reivindicaciones.

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos y frases utilizados en el presente documento incluyen los significados que los términos y frases han alcanzado en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o sea claramente aparente a partir del contexto en el que se utiliza el término o frase. Aunque se puede utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, se describen ahora métodos y materiales particulares.

El término “anticuerpo”, como se utiliza en el presente documento, incluye moléculas 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 (VH) de cadena pesada y una región constante (CH) de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable (VL) de cadena ligera y una región constante (CL) de cadena ligera. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de la cadena pesada se pueden abreviar como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la cadena ligera se pueden abreviar como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). La expresión anticuerpo de “alta afinidad” se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D con respecto a su epítipo diana de aproximadamente 10^{-9} M o menor (por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, o aproximadamente 1×10^{-12} M). En una realización la K_D se mide por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo, BIACORE™; en otra realización, la K_D se mide por 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, que se unen específicamente cada cadena pesada a un epítipo diferente - o bien en dos moléculas diferentes (por ejemplo, epítopos diferentes en dos inmunógenos diferentes) o en la misma molécula (por ejemplo, diferentes epítopos en el mismo inmunógeno). Si el 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 al menos una a dos o tres a cuatro órdenes de magnitud más baja que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo y viceversa. Los epítopos que se unen específicamente al anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma o diferente diana (por ejemplo en la misma o diferente proteína). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopos del mismo inmunógeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo inmunógeno se pueden fusionar con las secuencias de ácido nucleico que codifican las mismas o diferentes regiones constantes de cadena pesada, y tales secuencias se pueden expresar en una célula que exprese una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas que tienen cada una tres CDR de cadena pesada, seguido por (hacia el extremo N o el extremo C) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que o bien no confiere especificidad de unión al epítipo pero que se puede asociar con cada cadena pesada, o se puede asociar con cada cadena pesada y se puede unir a uno o más de los epítopos que se unen a las regiones de unión al epítipo de la cadena pesada, o que se puede asociar con cada cadena pesada y es capaz de unirse a una o ambas cadenas pesadas por uno o ambos epítopos.

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

La frase “región determinante de complementariedad” o el término “CDR”, incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir en un animal de tipo silvestre) aparecen entre dos regiones estructurales en una región variable de una cadena ligera o una cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de célula T). Una CDR se puede codificar, por ejemplo, por una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por una célula B o una célula T intacta o madura. Una CDR puede estar mutada somáticamente (por ejemplo, varía de la secuencia codificada en la línea germinal de un animal), humanizada, y/o modificada con sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden codificarse 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 célula B, por ejemplo, como resultado de corte y empalme o conexión de las secuencias (por ejemplo, en la recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

El término “conservadora”, cuando se utiliza para describir una sustitución conservadora de aminoácidos, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R en la cadena lateral con

propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambia sustancialmente las propiedades de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de una región variable para unirse específicamente a un epítipo diana con una afinidad deseada. 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 alifáticas-hidroxilo 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 conservadora incluyen, por ejemplo valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservadora puede ser la sustitución de cualquier resto nativo en una proteína con alanina, como se utiliza, por ejemplo, en mutagénesis por selección de alanina. En algunas realizaciones, se produce una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad-log PAM250 desvelada en Gonnet et al. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45, que se incorpora de esta forma por referencia. En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservadora donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad log PAM250.

En algunas realizaciones, las posiciones de los restos en una cadena ligera o una cadena pesada de inmunoglobulina se diferencian por una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. 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 secreción a partir de, por ejemplo, una célula B) no son idénticas a una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se enumera en el presente documento, sino que se diferencia por una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

La frase “proteína de unión al epítipo” incluye una proteína que tiene al menos una CDR y que es capaz de reconocer selectivamente un epítipo, por ejemplo, es capaz de unirse a un epítipo con una K_D que es aproximadamente micromolar o más baja (por ejemplo una K_D que es aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, o aproximadamente 1×10^{-12} M). Las proteínas se unió al epítipo terapéuticos (por ejemplo, anticuerpo terapéuticos) frecuentemente necesitan una K_D que está en el intervalo nanomolar o picomolar.

La frase “fragmento funcional” incluye fragmentos de proteínas de unión al epítipo que se pueden expresar, segregar, y unir específicamente a un epítipo con una K_D que está al menos en el intervalo micromolar, intervalo nanomolar, o en el intervalo picomolar.

La expresión “línea germinal” incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina en una célula no mutada somáticamente, por ejemplo, una célula B o una pre-célula B o una célula hematopoyética no mutada somáticamente.

La frase “cadena pesada”, o “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una secuencia de una 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 de 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 (desde el extremo N al extremo C), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un epítipo (por ejemplo, que reconoce un epítipo con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar, o picomolar), que es capaz de expresarse y segregarse a partir de una célula, y que comprende al menos una CDR.

El término “identidad” cuando se utiliza en conexión con secuencia, incluye la identidad como se determina por un número de diferentes algoritmos que se conocen en la técnica y que se pueden utilizar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos y aminoácidos. En algunas realizaciones escritas en el presente documento, las identidades se determinan utilizando un alineamiento ClustalW v.1.83 (lento) empleando una falta de huecos abierta de 10,0, una falta de hueco extendida de 0,1, y utilizando una matriz de similitud de Gonnet (MaeVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de secuencias dependerá de las secuencias en particular, pero en el caso de un dominio constante de cadena ligera, la longitud debería contener una secuencia de longitud suficiente para plegarse en un dominio constante de cadena ligera que es capaz de auto-asociarse para formar un dominio constante de cadena ligera canónico, por ejemplo, que sea capaz de formar dos láminas beta que comprendan cadenas beta y capaces de interactuar con al menos un dominio CH1 de un ser humano o un ratón. En el caso de un dominio CH1, la longitud de secuencia debería contener una secuencia de suficiente longitud para plegarse en un dominio CH1 que sea capaz de formar dos láminas beta que comprenden cadenas beta y capaz de 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.

- 5 La frase “cadena ligera” incluye una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos de que se especifique otra cosa incluye cadenas ligeras κ y λ humanas y una VpreB, así como cadenas ligeras equivalentes. Los dominios variables (VL) de cadena ligera incluyen típicamente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones estructurales (FR), a menos de que se especifique otra cosa. En general, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino al término carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y un dominio constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras incluyen, por ejemplo, las que no se unen selectivamente ni a un primer ni a un segundo epítipo unido selectivamente a una proteína de unión al epítipo en la que aparecen. Las cadenas ligeras también incluyen las que se unen y reconocen, o ayudan a la cadena pesada en la unión y reconocimiento, de uno o más epítopos unidos a una proteína de unión al epítipo en la que aparecen. Las cadenas ligeras comunes se las derivadas de un segmento genético V κ 1-39J κ 5 humano o un segmento genético V κ 3-20J κ 1 humano, e incluyen versiones mutadas somáticamente (por ejemplo, de afinidad madurada) de las mismas.

La frase “intervalo micromolar” pretende significar 1-999 micromolar; la frase “intervalo nanomolar” pretende significar 1-999 nanomolar; la frase “intervalo picomolar” pretende significar 1-999 picomolar.

- 20 La frase “mutado somáticamente” incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de una célula B que ha sufrido un cambio de clase, donde la secuencia del ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada que incluye una secuencia CDR o FR de cadena pesada) de la célula B que está cambiada de clase no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico de la célula B antes del cambio de clase, tal como por ejemplo, una diferencia en una secuencia de ácido nucleico de CDR o estructural entre una célula B que no ha sufrido un cambio de clase y una célula B que ha sufrido un cambio de clase. “Mutado somáticamente” incluye la referencia a secuencias de ácido nucleico de células B de afinidad madurada que no son idénticas a las correspondientes secuencias de la región variable de inmunoglobulina correspondiente en las células B que no son de afinidad madurada (es decir, secuencias en el genoma de las células germinales). La frase “mutado somáticamente” incluye también la referencia a una secuencia de ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina de una célula B tras la exposición de la célula B a un epítipo de interés, donde la secuencia de ácido nucleico se diferencia de la secuencia de ácido nucleico correspondiente antes de la exposición de la célula B al epítipo de interés. La frase “mutado somáticamente” se refiere a secuencias de los anticuerpos que se han generado en un animal, por ejemplo, un ratón que tiene secuencias de ácido nucleico de la región variable de inmunoglobulina humana, en respuesta a un desafío inmunógeno, y que resultan de los procesos de selección operativos inherentemente en tal animal.

La expresión “no reordenado”, en referencia a una secuencia de ácido nucleico, incluye secuencias de ácidos nucleicos que existen en la línea germinal de una célula animal.

- 40 La frase “dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o cadena pesada (modificadas como se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en una secuencia desde el extremo N al extremo C (a menos de que se indique otra cosa): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

45 Cadena ligera común

Los esfuerzos anteriores para producir proteínas de unión al epítipo multiespecíficas útiles, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, fueron obstaculizados por una variedad de problemas que frecuentemente compartían un paradigma común: la selección o manipulación in vitro de secuencias para modificar racionalmente, o para modificar por medio de ensayo y error, un formato adecuado para emparejar una inmunoglobulina humana biespecífica heterodimérica. Desafortunadamente, la mayoría si no todas las estrategias de modificación in vitro proporciona extensamente fijos *ad hoc* que son adecuados, como mucho, para moléculas individuales. Por otra parte, los métodos in vivo que emplean organismos complejos para seleccionar los emparejamientos apropiados que sean capaces de dar lugar a una terapéutica en seres humanos no se han conseguido.

- 55 En general, las secuencias nativas de ratón no son frecuentemente una buena fuente para las secuencias terapéuticas humanas. Por al menos esta razón, generar regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón que se empareje con una cadena ligera común tiene una utilidad práctica limitada. Más esfuerzos de modificación in vitro se emplearían en un proceso de ensayo y error para intentar humanizar las secuencias variables de cadena pesada de ratón mientras que se espera que mantengan la especificidad y afinidad por el epítipo mientras que se mantiene la capacidad para acoplarse con la cadena ligera humana común, con un resultado incierto. Al final de tal proceso, el producto final puede mantener alguna de la especificidad y afinidad, y se asocia con la cadena ligera común, pero en último término la inmunogenicidad en un ser humano probablemente tenía un grave riesgo.

65

Por lo tanto, un ratón adecuado para producir una terapéutica humana incluiría un gran repertorio adecuado de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada en lugar de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de la cadena pesada. Los segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada deberían ser capaces de reorganizarse y recombinarse con el dominio constante de cadena pesada endógena del ratón 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 debería ser capaz de cambiar de clase y de hipermutación somática de forma que un gran repertorio adecuado de dominios variables de cadena pesada esté disponible para el ratón, para seleccionar uno que se puede asociar con el limitado repertorio de regiones variables de cadena ligera humanas.

Un ratón que selecciona una cadena ligera común para una pluralidad de cadenas pesadas tiene una utilidad práctica. En varias realizaciones, los anticuerpos que se expresan en un ratón que solo pueda expresar una cadena ligera común tendrán cadenas pesadas que se pueden asociar y expresar con una cadena ligera idéntica o sustancialmente idéntica. Esto es particularmente útil en la producción de anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, tal ratón se puede inmunizar con un primer inmunógeno para generar una célula B que exprese 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 una célula B que expresa un anticuerpo que se une específicamente al segundo epítipo. Las regiones variables pesadas se pueden clonar a partir de las células B y expresarse con la misma región constante de cadena pesada, y la misma cadena ligera, y se expresa en una célula para producir un anticuerpo biespecífico, donde el componente de cadena ligera del anticuerpo biespecífico se ha seleccionado por medio de un ratón para asociarse y expresarse con el componente de cadena ligera.

Los inventores han modificado genéticamente un ratón para que genere cadenas ligeras de inmunoglobulina que ese emparejarán adecuadamente con una familia más diversa de cadenas pesadas, que incluyen cadenas pesadas cuyas regiones variables parten de secuencias de la línea germinal, por ejemplo, regiones variables con afinidad madurada o mutadas somáticamente. En varias realizaciones, el ratón se concibe para emparejar dominios variables de cadena ligera con dominios variables de cadena pesada que comprenden mutaciones somáticas, por lo tanto haciendo posible una ruta de proteínas de unión de alta afinidad adecuadas para su uso como terapéutica humana.

El ratón modificado genéticamente, por medio del largo y complejo proceso de selección de anticuerpos en un organismo, hace las elecciones biológicamente apropiadas para el emparejamiento de una colección diversa de dominios humanos variables de cadena pesada con un número limitado de opciones de dominios humanos variables de cadena ligera. Con el fin de conseguir esto, el ratón se modifica para que presente un número limitado de opciones de dominios humanos variables de cadena ligera en conjunción con una amplia diversidad de opciones de dominios humanos variables de cadena pesada. Al desafiar con un inmunógeno, el ratón maximiza el número de soluciones en su repertorio para desarrollar un anticuerpo contra el inmunógeno, limitado en gran manera o únicamente por el número de opciones de cadena ligera en su repertorio. En varias realizaciones, esto incluye permitir al ratón que consiga mutaciones somáticas compatibles del dominio variable de cadena ligera que sin embargo serán compatibles con una variedad relativamente grande de dominios humanos variables de cadena pesada, incluyendo en particular los dominios humanos variables de cadena pesada mutados somáticamente.

Para conseguir un repertorio limitado de opciones de cadena ligera, el ratón se modifica para convertir en no funcional o sustancialmente no funcional su capacidad para producir, o reordenar, un dominio variable de cadena ligera nativo de ratón. Esto se puede conseguir, por ejemplo, eliminando los segmentos genéticos de la región variable de cadena ligera de ratón. El locus endógeno del ratón se puede modificar entonces por un segmento genético del gen humano de la región variable de la cadena ligera exógeno adecuado de elección, unido adecuadamente al dominio constante de cadena ligera endógeno de ratón, de manera tal que los segmentos genéticos exógenos humanos de la región variable pueden reordenarse y recombinarse con el gen endógeno de ratón de la región constante de la cadena ligera y formar un gen (humano variable, constante de ratón) de cadena ligera quimérico inverso reordenado. En varias realizaciones, la región variable de cadena ligera es capaz de mutarse somáticamente. En varias realizaciones, para maximizar la capacidad de la región variable de cadena ligera para adquirir mutaciones somáticas, se retiene el amplificador(es) adecuado en el ratón. Por ejemplo, al modificar un locus κ de ratón para sustituir los segmentos genéticos de la región variable κ endógena de ratón con segmentos genéticos humanos de la región variable κ , se mantienen funcionalmente el amplificador intrónico κ el ratón y el amplificador κ 3' del ratón, o no se destruyen.

El ratón modificado genéticamente proporcionado expresa un repertorio limitado de cadenas ligeras (variables humanas, constantes de ratón) quiméricas inversas asociadas con una diversidad de cadenas pesadas (variables humanas, constantes de ratón) quiméricas inversas. En varias realizaciones, los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera κ se eliminan y se sustituyen con segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena ligera, unidos operativamente al gen de la región constante κ endógena del ratón. En realizaciones para maximizar la hipermutación somática de los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena ligera, el amplificador intrónico κ de ratón y el amplificador κ 3' de ratón se mantienen. En varias realizaciones, el ratón también comprende un locus de cadena ligera λ no funcional, o una eliminación del mismo o una eliminación que convierte el locus en incapaz para producir una cadena ligera λ .

Por lo tanto se proporciona un ratón que es un ratón que comprende:

- 5 (a) una sustitución en el locus endógeno del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina con un único segmento genético $V_{\kappa}1-39/J_{\kappa}5$ humano reordenado o un único segmento genético $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}$ humano reordenado, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante κ endógeno del ratón y donde el ratón carece de un locus de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que sea capaz de reordenar y formar un gen que codifique una región variable κ ; y,
- 10 (b) una sustitución de 90-100% del locus del gen endógeno del ratón de la región variable de cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno del ratón constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenar y formar un gen quimérico humano/ratón de cadena pesada
- 15 reordenado.

El ratón modificado genéticamente que se proporciona, en varias realizaciones, comprende un locus de la región variable de cadena ligera que carece de un segmento genético endógeno del ratón variable de cadena ligera y que comprende un segmento genético humano variable, en una realización una secuencia V/J humana reordenada, unida operativamente a una región constante de ratón, donde el locus es capaz de sufrir una hipermutación somática, y donde el locus expresa una cadena ligera que comprende la secuencia V/J humana unida a una región constante de ratón. Por lo tanto, en varias realizaciones, el locus comprende un amplificador 3' κ de ratón, que se correlación con un nivel normal, o de tipo silvestre, de hipermutación somática.

El ratón modificado genéticamente en varias realizaciones cuando se inmuniza con un antígeno de interés genera células B que muestran una diversidad de reordenamientos de regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina humana que expresa y funciona con una cadena ligera reordenada, incluyendo realizaciones donde la cadena ligera comprende regiones variables de cadena ligera humana que comprenden, por ejemplo, 1 a 5 mutaciones somáticas. En varias realizaciones, las cadenas ligeras expresadas de esta manera son capaces de asociarse y expresarse con cualquier región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana que se expresa en el ratón.

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

- 35 Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para producir proteínas de unión que se unen a más de un epítipo con alta afinidad, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Las ventajas de la invención incluyen la capacidad para seleccionar adecuadamente cadenas de cadena pesada de inmunoglobulina de alta unión (por ejemplo, afinidad madurada) cada una de las cuales se asociará con una única cadena ligera.
- 40 La síntesis y expresión de proteínas de unión biespecífica han sido problemáticas, en parte debido a problemas asociados con la identificación de una cadena ligera adecuada que se pueda asociar y expresar con dos cadenas pesadas diferentes, y en parte debido a problemas de aislamiento. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento permiten un ratón modificado genéticamente para seleccionar, por medio de procesos por otra parte naturales, una cadena ligera adecuada que se puede asociar y expresar con más de una cadena pesada, que incluye cadenas pesadas que están mutadas somáticamente (por ejemplo, de afinidad madurada). Las secuencias VL y VH de células B adecuadas de ratones inmunizados como se describen en el presente documento que expresan anticuerpos de afinidad madurada que tienen cadenas pesadas quiméricas inversas (es decir, variables humanas y constantes de ratón) se pueden identificar y clonar en fase en un vector de expresión con una secuencia genética humana de la región constante adecuada (por ejemplo, una IgG1 humana). Se pueden preparar dos de tales construcciones, donde cada construcción codifica un dominio variable de cadena pesada humano que se une a un epítipo diferente. Uno de las VL humanas (por ejemplo, $V_{\kappa}1-39/J_{\kappa}5$ humano o $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}1$ humano), de la secuencia de la línea germinal o de una células B donde la secuencia se ha mutado somáticamente, se pueden fusionar en fase con un gen humano de la región constante adecuado (por ejemplo, un gen constante κ humano). Estas tres construcciones ligeras y pesadas completamente humanas se pueden situar en una célula adecuada para su 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 la separación fácil de estas tres especies principales, se modifica una de las cadenas pesadas para omitir el determinante de unión a la proteína A, dando como resultado una afinidad diferencial de una proteína de unión homodimérica de una proteína de unión heterodimérica. Las composiciones y métodos que se dirigen a este problema se describen en el documento 12/832.838, presentada el 25 de junio de 2010, titulada "Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format," publicada como el documento US 2010/0331527A1.
- 60

En un caso, se hace referencia a una proteína de unión al epítipo como se describe en el presente documento, donde las secuencias VL y VH humanas se derivan del ratón descrito en el presente documento que se ha inmunizado con un antígeno que comprende un epítipo de interés.

También se hace referencia una proteína de unión al epítipo que comprende un primer y segundo polipéptido, el primer polipéptido comprende, desde el extremo N al extremo C, una primera región de unión al epítipo que se une selectivamente a un primer epítipo, seguido por una región constante que comprende una primera región CH3 de una IgG humana que se selecciona de entre IgG1, IgG2, IgG4, y una combinación de las mismas; y, un segundo

5 polipéptido que comprende, del extremo N al extremo C, una segunda región de unión al epítipo que se une selectivamente a un segundo epítipo, seguido por una región constante que comprende una segunda región CH3 de una IgG seleccionada de entre IgG1, IgG2, IgG4, y una combinación de las mismas, donde la segunda región CH3 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio CH3 a la proteína A.

10 En un caso, la segunda región CH3 comprende una modificación H95R (por la numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). En otra realización, la segunda región CH3 comprende además una modificación Y96F (IMGT; Y436F por EU).

15 En un caso, la segunda región CH3 es de una IgG1 humana modificada, y comprende además una modificación que se selecciona de entre el grupo que consiste en D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I por EU).

20 En un caso, la segunda región CH3 es de una IgG2 humana modificada, y comprende además una modificación que se selecciona de entre el grupo que consiste en N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I por EU).

En un caso, la segunda región CH3 es de una IgG4 humana modificada, y comprende además una modificación que se selecciona de entre el grupo que consiste en Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por EU).

25 Un método para producir una proteína de unión al epítipo que se une a más de un epítipo es inmunizar un primer ratón de acuerdo con la invención con un antígeno que comprende un primer epítipo de interés, donde el ratón comprende un locus de la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que no contiene una VL endógena del ratón que sea capaz de reordenarse y formar una cadena ligera, donde en locus endógeno del ratón variable de

30 cadena ligera de inmunoglobulina hay un único segmento genético VL humano unido operativamente al gen endógeno del ratón de la región constante de cadena ligera, y el segmento genético VL humano se selecciona de entre un V κ 1-39J κ 5 humano y un V κ 3-20J κ 1 humano, y los segmentos genéticos endógenos del ratón VH se han sustituido en parte o totalmente con segmentos genéticos VH humanos, tal que las cadenas pesadas de inmunoglobulinas producidas por el ratón son solamente o sustancialmente cadenas pesadas que comprenden dominios variables humanos y dominios constantes de ratón. Cuando se inmuniza, tal ratón producirá un anticuerpo

35 quimérico inverso que comprende solo uno o dos dominios humanos variables de cadena ligera (por ejemplo, uno de V κ 1-39J κ 5 humano o V κ 3-20J κ 1 humano). Una vez que se identifica la célula B que codifica una VH que se une al epítipo de interés, se puede recuperar (por ejemplo, por PCR) la secuencia de nucleótidos de la VH (y opcionalmente, la VL) y clonarse en una construcción de expresión en fase con un dominio humano constante de inmunoglobulina adecuado. Este proceso se puede repetir para identificar un segundo dominio VH que se une a un

40 segundo epítipo, y se puede recuperar una segunda secuencia genética VH y clonarse en un vector de expresión en fase con un segundo dominio constante de inmunoglobulina adecuado. El primer y segundo dominios constantes de inmunoglobulina pueden ser el mismo isotipo o diferente, y se puede modificar uno de los dominios constantes de inmunoglobulina (pero no el otro) como se describe en el presente documento o en el documento US 2010/0331527A1, y se puede expresar la proteína de unión al epítipo, por ejemplo, como se describe en el

45 documento US 2010/0331527A1.

También se hace referencia a un método para producir una proteína de unión al epítipo biespecífico, que comprende la identificación de una primera secuencia de nucleótidos VH humana (VH1) de afinidad madurada (or

50 ejemplo, que comprende una o más hipermutaciones somáticas) a partir de un ratón como se describe en el presente documento, identificar una segunda secuencia de nucleótidos humana (VH2) de afinidad madurada (por ejemplo que comprende una o más hipermutaciones somáticas) a partir de un ratón como se describe en el presente documento, clonar la VH1 en fase con una cadena pesada humana que carece de una modificación del determinante de proteína A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar una cadena pesada 1 (HC1), clonar la VH2 en fase con una cadena pesada humana que comprende un determinante de Proteína

55 A como se describe en el documento US 2010/0331527A1 para formar una cadena pesada 2 (HC2), introducir un vector de expresión que comprende HC1 y el mismo vector de expresión o uno diferente que comprende HC2 dentro de la célula, donde la célula también expresa una cadena ligera de inmunoglobulina humana que comprende un V κ 1-39J κ 5 humano o un V κ 3-20J κ 1 humano que se fusiona a un dominio humano constante de cadena ligera, permitiendo a la célula que exprese una proteína de unión al epítipo biespecífica que comprende un dominio VH codificado por VH1 y un dominio VH codificado por VH2, y aislar la proteína de unión al epítipo biespecífica en base a su capacidad diferencial de unirse a la Proteína A en comparación con la proteína de unión al epítipo homodimérica. En un caso específico, la HC1 es una IgG1, y la HC2 es una IgG1 que comprende la modificación H95R (IMGT; H435R por EU) y comprende además la modificación Y96F (IMGT; Y436F por EU). En un caso, el dominio VH codificado por VH1, el dominio VH codificado por VH2, o ambos, están mutados somáticamente.

65 **Genes VH humanos que se expresan con una VL humana común**

Se expresó una variedad de regiones variables humanas a partir de anticuerpos de afinidad madurada producidos contra cuatro antígenos diferentes con o su cadena ligera equivalente, o al menos una de las cadenas ligeras humanas seleccionadas de entre V κ 1-39J κ 5 humana, V κ 3-20J κ 1 humana o VpreBJ λ 5 humana (véase el Ejemplo 1). Para los anticuerpos contra cada uno de los antígenos, se emparejaron satisfactoriamente las cadenas pesadas de alta afinidad mutadas somáticamente de diferentes familias genéticas con las regiones de la línea germinativa humana V κ 1-39J κ 5 y V κ 3-20J κ 1 reordenadas y se segregaron a partir de las células que expresaban las cadenas pesada y ligera. Para V κ 1-39J κ 5 y V κ 3-20J κ 1, se expresaron favorablemente los dominios VH derivados de las siguientes familias VH humanas: 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, y 6-1. Por lo tanto un ratón que se modifica para expresar un repertorio limitado de dominios VL humanos a partir de uno o ambos V κ 1-39J κ 5 y V κ 3-20J κ 1 generará una población diversa de dominios VH humanos mutados somáticamente a partir de locus VH modificado genéticamente para sustituir los segmentos genéticos VH de ratón por segmentos genéticos VH humanos.

Los ratones modificados genéticamente para expresar cadenas pesadas de inmunoglobulina quiméricas inversas (variables humanas, constantes de ratón) que se asocian con una única cadena pesada reordenada (por ejemplo, una V κ 1-39/J o una V κ 3-20/J), cuando se inmunizan con un antígeno de interés, generan células B que comprenden una diversidad de reordenamientos del segmento V humano y expresan una diversidad de anticuerpos específicos de antígeno con 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 (véase los Ejemplos 5 a 10).

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

Se proporcionan los siguientes ejemplos para describir a los expertos habituados en la técnica cómo hacer y utilizar los métodos y composiciones de la invención, y no se pretende limitar el ámbito de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero se debería contar con algunos errores experimentales o desviaciones. A menos de que se indique otra cosa, las partes son partes por peso, el peso molecular es el peso molecular medio, las temperaturas se indican en grados Celsius, y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Ejemplos

Ejemplo 1. Identificación de las regiones humanas variables de cadena pesada que se asocian con regiones humanas variables de cadena ligera seleccionadas

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

Los métodos para generar anticuerpos humanos en ratones modificados genéticamente se conocen (véase por ejemplo, el documento US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®). La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón modificado genéticamente que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas unidas operativamente a loci endógenos del ratón de región constante tal 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 pesada y ligera de los anticuerpos producidos a partir de un ratón VELOCIMMUNE® son completamente humanos. Inicialmente los anticuerpos quiméricos de alta afinidad que se aíslan tienen una región variable y una región constante de ratón. Como se describe posteriormente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan por sus características deseables, que incluyen la afinidad, selectividad, epítipo, etc. Las regiones constantes de ratón se sustituyen con una región constante humana deseable para generar un anticuerpo completamente humano que contiene un isotipo no IgM, por ejemplo, un IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo silvestre o modificado genéticamente. Aunque la región constante que se selecciona puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión al antígeno con alta afinidad y la especificidad de diana residen en la región variable.

Se inmunizó un ratón VELOCIMMUNE® con un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis (Antígeno C) y se aislaron los anticuerpos humanos específicos del antígeno y se secuenciaron con respecto a la utilización del gen V utilizando las técnicas de referencia que se reconocen en la técnica. Los anticuerpos seleccionados se clonaron en regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas y se seleccionaron 69 cadenas pesadas para emparejarlas con una de las tres cadenas ligeras humanas: (1) la cadena ligera κ equivalente unida a una región

constante κ humana, (2) una línea germinal V κ 1-39J κ 5 humana reordenada unida a una región constante κ humana, o (3) una línea germinal V κ 3-20J κ 1 humana reordenada unida a una región constante κ humana. Cada pareja de cadena pesada y cadena ligera se co-transfectaron en células CHO-K1 utilizando técnicas de referencia. La presencia de anticuerpo en el sobrenadante se detectó por anti-IgG humana en un ensayo ELISA. El título de anticuerpos (ng/ml) se determinó para cada pareja de cadena pesada/ligera y se compararon los títulos de las diferentes cadenas ligeras de la línea germinal reordenadas con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada emparejada con la cadena ligera equivalente) y se calculó el porcentaje del título nativo (Tabla 1). V κ : gen variable de cadena pesada. ND: expresión no detectada bajo las condiciones experimentales en curso.

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

ES 2 547 142 T3

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	-
3-33	56	39	20	69,9	36,1
3-33	10	53	1	520,6	6,9
3-33	20	67	10	337,2	52,3
3-33	11	36	18	316,8	158,4
3-23	12	42	32	356,8	272,9
3-33	66	95	15	143,6	22,5
3-15	55	68	ND	123,1	-
-	32	68	3	210,9	10,6
1-8	28	48	ND	170,9	-
3-33	124	192	21	154,3	17,0
3-33	0	113	ND	56550,0	-
3-33	10	157	1	1505,8	12,5
3-33	6	86	15	1385,5	243,5
3-23	70	115	22	163,5	31,0
3-7	71	117	21	164,6	29,6

3-33	82	100	47	122,7	57,1
3-7	124	161	41	130,0	33,5

En un experimento similar, los ratones VELOCIMMUNE® se inmunizaron con varios antígenos diferentes y las cadenas pesadas de anticuerpos humanos específicos del antígeno que se seleccionaron se ensayaron en cuanto a su capacidad para emparejarse con diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas (como se ha descrito anteriormente). Los antígenos que se utilizan en este experimento incluyen 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 superficie celular (Antígeno D). Los anticuerpos específicos del antígeno se aislaron del ratón en cada grupo de inmunización y se clonaron y secuenciaron las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada. A partir de la secuencia de las cadenas pesada y ligera, se determinó el uso del gen V y las cadenas pesadas que se seleccionaron se emparejaron con o bien su cadena ligera equivalente o con la región de la línea germinal V κ 1-39J κ 5 humana reordenada. Cada par de cadenas pesada/ligera se co-transfectó en células CHO-K1 y se detectó la presencia del anticuerpo en el sobrenadante por anti-IgG humana en un ensayo ELISA. El título de anticuerpos (μ g/ml) se determinó para cada emparejamiento de cadena pesada/ligera y se compararon los títulos de diferentes cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas con los títulos obtenidos con la molécula de anticuerpo parental (es decir, la cadena pesada emparejada con la cadena ligera equivalente) y se calculó el porcentaje del título nativo (Tabla 2). V_H: gen variable de cadena pesada. V κ : gen variable de cadena ligera κ . ND: expresión no detectada bajo las condiciones experimentales en curso.

Tabla 2							
Antígeno	Anticuerpo	V _H	V κ	Título (mg/ml)			Porcentaje de título nativo
				V _H Sola	V _n + V κ	V _H + V κ 1-39J κ 5	
A	320	1-18	2-30	0,3	3,1	2,0	66
	321	2-5	2-28	0,4	0,4	1,9	448
	334	2-5	2-28	0,4	2,7	2,0	73
	313	3-13	3-15	0,5	0,7	4,5	670
	316	3-23	4-1	0,3	0,2	4,1	2174
	315	3-30	4-1	0,3	0,2	3,2	1327
	318	4-59	1-17	0,3	4,6	4,0	86
B	257	3-13	1-5	0,4	3,1	3,2	104
	283	3-13	1-5	0,4	5,4	3,7	69
	637	3-13	1-5	0,4	4,3	3,0	70
	638	3-13	1-5	0,4	4,1	3,3	82
	624	3-23	1-17	0,3	5,0	3,9	79
	284	3-30	1-17	0,3	4,6	3,4	75
	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
	136	3-23	2-28	0,4	5,0	2,7	55
D	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, mutadas somáticamente de diferentes familias genéticas eran capaces de emparejarse con regiones V κ 1-39J κ 5 y V κ 3-20J κ 1 de la línea germinal humana reordenadas y se segregaban a partir de la célula como una molécula de anticuerpo normal. Como se muestra en la Tabla 1, el título de anticuerpo aumentaba aproximadamente un 61% (42 de 69) de cadenas pesadas cuando se emparejaban con la cadena ligera V κ 1-39J κ 5 humana reordenada y aproximadamente un 29% (20 de 69) de cadenas pesadas cuando se emparejaban con la cadena ligera V κ 3-20J κ 1 humana reordenada en comparación con la cadena ligera equivalente el anticuerpo parental. Para aproximadamente el 20% (14 de 69) de las cadenas pesadas, ambas cadenas ligeras de la línea germinal reordenadas conferían un aumento de la expresión cuando se compara a la cadena ligera equivalente del anticuerpo parental. Como se muestra en la Tabla 2, la región V κ 1-39J κ 5 de la línea germinal humana reordenada confería un aumento de la expresión de varias cadenas pesadas específicas para un intervalo de diferentes clases de antígeno en comparación con la cadena ligera equivalente de los anticuerpos parentales. En todas las cadenas pesadas que mostraban un aumento de la expresión con respecto a la cadena ligera equivalente del anticuerpo parental, la familia tres de cadenas pesadas (V H 3) estaba sobre-representadas en comparación con otras familias genéticas de la región variable de cadena pesada. Esto demuestra una relación favorable de las cadenas V H 3 humanas para emparejarse con cadenas ligeras V κ 3-20J κ 1 y VpreB/J λ 5 de la línea germinal humana reordenadas.

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

Se produjeron varios vectores dirigidos a la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada utilizando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N° 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 clones de Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC) genómicos de ratón 302g12 y 254m04 (Invitrogen). Utilizando estos dos clones BAC, se modificaron construcciones genómicas para que

contuvieran una única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada y se insertó en un locus de cadena ligera κ endógena que se había modificado genéticamente previamente para eliminar los segmentos genéticos de unión y variable κ endógena.

5 A. Construcción de vectores que se dirigen a la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada

Se produjeron tres diferentes regiones de cadena ligera de la línea germinal humana reordenadas utilizando técnicas de biología molecular de referencia. Los segmentos genéticos variables humanos utilizados para construir estas tres regiones incluían la secuencia V κ 1-39J κ 5 humana reordenada, una secuencia V κ 3-20J κ 1 humana reordenada y una secuencia VpreBJ λ 5 humana reordenada.

Un segmento de ADN que contiene el exón 1 (que codifica el péptido líder) y el intrón 1 del gen V κ 3-7 del ratón se produjo por síntesis de ADN de novo (Integrated DNA Technologies). Se incluyó parte de la región sin traducir 5' hasta un sitio de restricción enzimática BlnI de origen natural. Los exones de los genes V κ 1-39 y V κ 3-20 humanos se amplificaron por PCR a partir de las bibliotecas de BAC genómicos humanos. Los cebadores directos tenían una extensión 5' que contenía el sitio receptor de corte y empalme del intrón 1 del gen V κ 3-7 del ratón. El cebador inverso que se utiliza para la PCR de la secuencia V κ 1-39 incluye una extensión que codifica el J κ 5 humano, mientras que el cebador inverso utilizado para la PCR de la secuencia V κ 3-20 incluía una extensión que codificaba el J κ 1 humano. La secuencia VpreBJ λ 5 se produjo por síntesis de ADN de novo (Integrated DNA Technologies). Una parte del intrón J κ -C κ humano incluyendo el sitio donante de corte y empalme se amplificó por PCR a partir del plásmido pBS-296-HA18-PI-SceI. El cebador directo de la PCR incluía una extensión que codificaba parte de una secuencia o J κ 5, J κ 1 o J λ 5. El cebador inverso incluía un sitio PI-SceI, que se había modificado genéticamente anteriormente en el intrón.

El exón1/intrón1 V κ 3-7, los exones de cadena ligera variable humanos, y los fragmentos de intrón J κ -C κ humanos se cosieron juntos por solapamiento de extensiones de PCR, se digirieron con BlnI y PI-SceI, y se ligaron en el plásmido pBS-296-HA18-PI-SceI, que contenía el promotor del segmento genético variable V κ 3-15 humano. Un casete de higromicina flanqueado por sitios loxP (floxado) dentro del plásmido pBS-296-HA18-PI-SceI se substituyó con un casete de higromicina con sitios FRT flanqueado por los sitios NotI y AscI. El fragmento NotI/PI-SceI de este plásmido se ligó en el ratón modificado genéticamente BAC 254m04, que contenía parte del intrón J κ -C κ de ratón, el exón C κ de ratón, y aproximadamente 75 kb de secuencia genómica corriente abajo del locus κ de ratón que proporcionaba un brazo de homología 3' para la recombinación homóloga en las células ES de ratón. El fragmento NotI/AscI de este BAC se ligaba entonces en una ratón modificado genéticamente BAC 302g12, que contenía un casete de neomicina con sitios FRT y aproximadamente 23 kb de secuencia genómica corriente arriba del locus κ endógeno para la recombinación homóloga en células ES de ratón.

B. Vector de direccionamiento de V κ 1-39J κ 5 de la línea germinal (Figura 1)

Los sitios de restricción enzimática se introdujeron en los extremos 5' y 3' de una inserción de cadena ligera modificada para la clonación en un vector de direccionamiento; un sitio AscI en el extremo 5' y un sitio PI-SceI en el extremo 3'. Con el sitio AscI 5' y el sitio PI-SceI 3' la construcción dirigida de 5' a 3' se incluía un brazo de homología 5' que contenía una secuencia 5' del locus de cadena ligera κ de ratón que se obtiene del clon BAC 302g12, un gen de resistencia a la neomicina con sitios FRT, una secuencia genómica que incluye un promotor V κ 3-15, una secuencia líder del segmento genético variable V κ 3-7 de ratón, una secuencia de intrón del segmento genético variable V κ 3-7 de ratón, una fase de lectura abierta de una región V κ 1-39J κ 5 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón J κ -C κ , y un brazo de homología 3' que contenía la secuencia 30 del segmento genético J κ 5 endógeno de ratón del clon BAC 254m04 de ratón (Figura 1, en el centro). Los genes y/o secuencias corriente arriba el locus de cadena ligera κ endógeno de ratón y corriente abajo de la mayoría del segmento genético J κ 3' (por ejemplo, el amplificador 3' endógeno) no se modificaban por la construcción dirigida (véase la Figura 1). La secuencia del locus V κ 1-39J κ 5 humano modificado genéticamente se muestra en la SEC ID N° 1.

La inserción dirigida de región V κ 1-39J κ 5 de la línea germinal humana reordenada en el ADN BAC se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores localizados en las secuencias de la región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia de intrón 3' de la secuencia líder V κ 3-7 de ratón se confirmó con los cebadores ULC-m1F (AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG; SEC ID N° 2) y ULC-m1R (TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA; SEC ID N° 3). La fase de lectura abierta de la región V κ 1-39 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1633-h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGCA; SEC ID N° 4) y 1633-h2R (TGCAAAGTGG ATGCAGCATAG; SEC ID N° 5). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (GGTGGAGAGG CTATTCGGC; SEC ID N° 6) y neoR (GAACACGGCG GCATCAG; SEC ID N° 7). El ADN BAC dirigido se utilizó entonces para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones quiméricos que expresan una región V κ 1-39J κ 5 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones celulares ES positivos se confirmaron por selección TAQMAN™ y cariotipaje utilizando sondas específicas para la región de cadena ligera Vκ1-39Jκ5 modificada insertada en el locus endógeno. En resumen, la sonda neoP (TGGGCACAACAGACAATCGG CTG; SEC ID N° 8) que se une con el gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (CCATTATGATGCTCCATGCC TCTCTGTTC; SEC ID N° 9) que se une con la secuencia del intrón 3' a la secuencia líder Vκ3-7, y la sonda 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT; SEC ID N° 10) que se une con la fase de lectura abierta Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada. Los clones celulares ES positivos se utilizaron entonces para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresaban la región de cadena ligera Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal.

De manera alternativa, las células ES que contienen la región de cadena ligera Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada se transfectaron con una construcción que expresa FLP con el fin de retirar el casete de neomicina con el sitio FRT que se introduce por la construcción dirigida. Opcionalmente, el casete de neomicina se elimina cruzando los ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

C. Vector de direccionamiento Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada (Figura2).

De manera similar, un locus de cadena ligera modificado genéticamente que exprese una región Vκ1-39Jκ5 de la línea germinal humana reordenada se produjo utilizando una construcción dirigida que incluye, desde 5' a 3', un brazo de homología 5' que contiene una secuencia 5' del locus de cadena ligera κ endógeno de ratón que se obtiene de un clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con sitio FRT, una secuencia genómica que incluye el promotor Vκ3-15 humano, una secuencia líder del segmento genético variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia intrón del segmento genético variable Vκ3-7 de ratón, una fase de lectura abierta de una región Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia 30 del segmento genético Jκ5 endógeno del ratón que se obtiene de un clon BAC 254m04 de ratón (Figura 2, en el centro). La secuencia del locus Vκ3-20Jκ1 humano modificado genéticamente se muestra en la SEC ID N° 11.

La inserción dirigida de la región Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada en el ADN BAC se confirmó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores localizados en secuencias de la región de cadena ligera Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia de intrón 3' de la secuencia líder Vκ3-7 del ratón se confirmó con cebadores ULCm1 F (SEC ID N° 2) y ULC-m1 R (SEC ID N° 3). La fase de lectura abierta de la región Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; SEC ID N° 12) y 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; SEC ID N° 13). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEC ID N° 6) y neoR (SEC ID N° 7). El ADN BAC dirigido se utilizó entonces para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que generaban ratones quiméricos que expresen la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones celulares ES positivos se confirmaron por selección Taqman™ y cariotipaje utilizando sondas específicas para la región de cadena ligera Vκ3-20Jκ1 modificada insertada en el locus de cadena ligera κ endógeno. En resumen, la sonda neoP (SEC ID N° 8) que se une con el gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (SEC ID N° 9) que se une en la secuencia líder Vκ3-7 de ratón, y la sonda 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG; SEC ID N° 14) que se une con la fase de lectura abierta Vκ3-20Jκ1 humana. Los clones ES positivos se utilizaron entonces para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresan la región de cadena ligera Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana.

De manera alternativa, las células ES que contienen la región de cadena ligera Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana se puede transfectar con una construcción que exprese FLP con el fin de eliminar el casete de neomicina con sitio FRT introducido por la construcción dirigida. Opcionalmente el casete de neomicina se puede eliminar cruzando los ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

D. Vector de direccionamiento VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada (Figura 3)

De manera similar, un locus de cadena ligera modificado genéticamente que exprese una región VpreBJλ5 de la línea germinal humana reordenada se produjo utilizando una construcción dirigida que incluye, desde 5' a 3', un brazo de homología 5' que contiene una secuencia 5' del locus de cadena ligera κ endógeno de ratón que se obtiene de un clon BAC 302g12 de ratón, un gen de resistencia a la neomicina con sitio FRT, una secuencia genómica que incluye el promotor Vκ3-15 humano, una secuencia líder del segmento genético variable Vκ3-7 de ratón, una secuencia intrón del segmento genético variable Vκ3-7 de ratón, una fase de lectura abierta de una región Vκ3-20Jκ1 de la línea germinal humana reordenada, una secuencia genómica que contiene una porción del intrón Jκ-Cκ humano, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia 30 del segmento genético Jκ5 endógeno del ratón que se obtiene de un clon BAC 254m04 de ratón

(Figura 3, en el centro). La secuencia del locus V κ 3-20J κ 1 humano modificado genéticamente se muestra en la SEC ID N° 15.

La inserción dirigida de la región VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada en el ADN BAC se confirmó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores localizados en secuencias de la región de cadena ligera VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada. En resumen, la secuencia de intrón 3' de la secuencia líder V κ 3-7 del ratón se confirmó con cebadores ULCm1 F (SEC ID N° 2) y ULC-m1 R (SEC ID N° 3). La fase de lectura abierta de la región V κ 3-20J κ 1 de la línea germinal humana reordenada se confirmó con los cebadores 1616-h1F (TGTCCTCGGC CTTGGA; SEC ID N° 16) y 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCTCT; SEC ID N° 17). El casete de neomicina se confirmó con los cebadores neoF (SEC ID N° 6) y neoR (SEC ID N° 7). El ADN BAC dirigido se utilizó entonces para electroporar células ES de ratón para crear células ES modificadas que generaban ratones quiméricos que expresen la cadena ligera VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana reordenada.

Los clones celulares ES positivos se confirmaron por selección TAQMAN™ y cariotipaje utilizando sondas específicas para la región de cadena ligera V κ 3-20J κ 1 modificada insertada en el locus de cadena ligera κ endógeno. En resumen, la sonda neoP (SEC ID N° 8) que se une con el gen marcador de neomicina, la sonda ULC-m1 P (SEC ID N° 9) que se une en la secuencia líder V κ 3-7 de ratón, y la sonda 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCTCT; SEC ID N° 17) que se une con la fase de lectura abierta VpreBJ λ 5 humana. Los clones ES positivos se utilizaron entonces para implantar ratones hembra para dar lugar a una camada de crías que expresan la región de cadena ligera V κ 3-20J κ 1 de la línea germinal humana.

De manera alternativa, las células ES que contienen la región de cadena ligera VpreBJ λ 5 de la línea germinal humana se puede transfectar con una construcción que exprese FLP con el fin de eliminar el casete de neomicina con sitio FRT introducido por la construcción dirigida. Opcionalmente el casete de neomicina se puede eliminar cruzando los ratones que expresan FLP recombinasa (por ejemplo, el documento US 6.774.279). Opcionalmente, el casete de neomicina se mantiene en los ratones.

Ejemplo 3. Generación de ratones que expresan una única cadena ligera de la línea germinal humana reordenada

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se utilizaron como células ES donantes y se introducen en embriones de ratón en estadio de 8 células por el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N° 7.294.754 y Poueymirou et al. (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. Los VELOCIMICE® contenían independientemente una región de cadena ligera V κ 1-39J κ 5 de la línea germinal humana modificada, una región de cadena ligera V κ 3-20J κ 1 o una región de cadena ligera VpreBJ λ 5 se identificaron por genotipaje utilizando un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela et al., *supra*) que detecta la presencia de la única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

Las crías se genotipan y se seleccionan las crías heterocigotas para la única región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada para caracterización de la expresión de la región de la cadena ligera de la línea germinal humana reordenada.

Ejemplo 4. Cruzamiento de ratones que expresan una única cadena ligera de la línea germinal humana reordenada

A. Anulación (KO) de Ig λ endógena.

Para optimizar el uso del locus de cadena ligera modificada, los ratones que contenían una de las regiones de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada se cruzan con otro ratón que contiene una eliminación en el locus de cadena ligera λ endógeno. De esta manera la progenie obtenida expresará, como su única cadena ligera, la región de cadena ligera de la línea germinal humana reordenada como se ha descrito en el Ejemplo 2. El cruzamiento se lleva a cabo por técnicas de referencia reconocidas en la técnica y, de manera alternativa, por un criador comercial (por ejemplo, The Jackson Laboratory). Las cepas de ratón que contienen un locus de cadena ligera modificada y una eliminación del locus de cadena ligera λ endógeno se seleccionan por la presencia de la única región de cadena ligera y la ausencia de las cadenas ligeras λ endógenas del ratón.

B. Locus endógeno humanizado de cadena pesada

Los ratones que contienen un locus de cadena ligera de la línea germinal humana modificado genéticamente se cruzan con ratones que contienen una sustitución del locus del gen variable de cadena pesada endógeno de ratón con el locus genético variable de cadena pesada humana (véase, el documento 6.596.541; the VELOCIMMUNE® mouse, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). El ratón VELOCIMMUNE® comprende un genoma que comprende un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada humanas unidas operativamente a loci de región constante endógena del ratón tal 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 una estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos se aísla y está unido operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada humanas. El ADN se expresa entonces en una célula capaz de expresar la cadena pesada completamente humana del anticuerpo.

Se obtienen ratones que contienen una sustitución del locus VH endógeno de ratón con el locus VH humano y una única región VL de la línea germinal humana reordenada en el locus de la cadena ligera κ endógena. Se obtienen anticuerpos quiméricos inversos que contienen cadenas pesadas mutadas somáticamente (VH humana y VL de ratón) tras la inmunización con un antígeno de interés. Las secuencias de nucleótidos VH y VL de las células B que expresan los anticuerpos se identifican y los anticuerpos completamente humanos se producen por la fusión de las secuencias de nucleótidos VH y VL con las secuencias de nucleótidos CH y CL humanas en un sistema de expresión adecuado.

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

Tras cruzar los ratones que contienen la región de cadena ligera humana modificada con varias cepas deseadas que contienen modificaciones y eliminaciones de otros loci de Ig endógena (como se describe en el Ejemplo 4), se pueden inmunizar los ratones seleccionados con un antígeno de interés.

En general, un ratón VELOCIMMUNE® que contiene una de las regiones únicas de cadena ligera de la línea germinal humana reordenadas se desafía con un antígeno, y se recuperan las células linfáticas (tal como las células B) del suero de los animales. Las células linfáticas se fusionan con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares inmortales de hibridoma, y tales líneas celulares de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos que contienen cadenas variables de cadena pesada humana y cadenas ligeras de la línea germinal humana reordenadas que son específicas contra el antígeno que se utilizó 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 de la cadena pesada y la cadena ligera. Debido a la presencia de las secuencias endógenas de ratón y cualquiera de los elementos que actúan cis adicionales presentes en el locus endógeno, la única cadena ligera de cada anticuerpo se mutar somáticamente. Esto añade una diversidad adicional al repertorio específico del antígeno que comprende una única cadena ligera y secuencias de cadena pesada distintas. Las secuencias de anticuerpo clonadas resultantes se expresan posteriormente en una célula, tal como una célula CHO. De manera alternativa, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos del antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se identifican directamente a partir de los linfocitos específicos del antígeno.

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

Se inmunizaron distintas cohortes de ratones VELOCIMMUNE® que contenían una sustitución del locus endógeno de ratón de cadena pesada con segmentos genéticos V, D, y J humanos y una sustitución del locus de cadena ligera κ con o bien la región de cadena ligera V κ 1-39J κ 5 de la línea germinal humana V κ 1-39J κ 5 modificada o la región de la cadena ligera humana V κ 3-20J κ 1 de la línea germinal humana (descritas anteriormente) con una proteína de receptor de superficie celular humano (Antígeno E). El antígeno E se administra directamente en la almohadilla plantar del ratón con seis inyecciones consecutivas cada 3-4 días. Se mezclaron dos a tres microgramos de Antígeno E con 10 μ g de oligonucleótido CpG (nº de Cat. tlr1-modn - oligonucleótido ODN1826; InVivogen, San Diego, CA) y 25 μ g de Adju-Phos (gel adyuvante de fosfato de aluminio, nº Cat. H-71639-250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark) antes de la inyección. Se pusieron un total de seis inyecciones antes del refuerzo con antígeno final, que se ponía 3-5 días antes del sacrificio. Se recolectaron extracciones de sangre tras la 4ª y 6ª inyección y se controló la respuesta inmunitaria de anticuerpos por inmunoensayo específico del antígeno de referencia.

Cuando se consigue una respuesta inmunitaria deseada se recolectan los esplenocitos y se fusionan con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar las líneas celulares que producen anticuerpos con cadenas ligeras comunes específicas del Antígeno E. Utilizando esta técnica, se obtienen varios anticuerpos con cadena ligera común específicos anti-Antígeno E (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de cadena pesada humanos, el mismo dominio de cadena ligera humana, y dominios constantes de ratón).

De manera alternativa, se aíslan directamente anticuerpos de cadena ligera común anti-Antígeno E a partir de células B positivas al antígeno sin fusión a células de mieloma, como se describe en el documento U.S. 2007/0280945A1. Utilizando este método, se obtuvieron varios anticuerpos de cadena ligera común anti-Antígeno E (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables de cadena pesada humanos, o bien una región de cadena ligera $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ humana modificada o una región de cadena ligera $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ humana modificada, y dominios constantes humanos).

Las propiedades biológicas de los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E que se genera de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen con detalle en las secciones que se exponen posteriormente.

Ejemplo 6. Utilización del segmento genético de cadena pesada en anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno

Para analizar la estructura de los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E que se producen, se clonaron y secuenciaron los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo. A partir de las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos previstas de los anticuerpos, se identificó la utilización genética para la región variable de cadena pesada (HCVR) de anticuerpos seleccionados con cadena ligera común que se obtenían a partir de ratones VELOCIMMUNE® que contenían o bien la cadena ligera $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ humana modificada o la cadena ligera $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ humana modificada. Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4, que demuestran que los ratones de acuerdo con la invención generan anticuerpos con cadena ligera común específicas de antígeno de una variedad de segmentos genéticos de cadena pesada humana, debido a una variedad de reordenamientos, cuando se emplean o un ratón que expresa solo una cadena ligera derivada de $V_{\kappa 1-39}$ humana o una cadena ligera derivada de $V_{\kappa 3-20}$. Los segmentos genéticos V_H humanos de las 2, 3, 4 y 5 familias reordenadas con una variedad de segmentos D_H humanos y segmentos J_H humanos producen anticuerpos específicos del antígeno.

Tabla 3			
Anticuerpos con cadena ligera $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ común			
Anticuerpo	HCVR		
	V_H	D_H	J_H
2952	2-5	6-6	1
3022	3-23	3-10	4
3028	3-23	3-3	4
2955	3-30	6-6	1
3043	3-30	6-6	3
3014	3-30	1-7	4
3015	3-30	1-7	4
3023	3-30	1-7	4
3024	3-30	1-7	4
3032	3-30	1-7	4
3013	3-30	5-12	4
3042	3-30	5-12	4
2985	3-30	6-13	4
2997	3-30	6-13	4
3011	3-30	6-13	4
3047	3-30	6-13	4
3018	3-30	6-6	4
2948	3-30	7-27	4
2987	3-30	7-27	4

2996	3-30	7-27	4
3005	3-30	7-27	4
3012	3-30	7-27	4
3020	3-30	7-27	4
3021	3-30	7-27	4
3025	3-30	7-27	4
3030	3-30	7-27	4
3036	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5
2949	3-30	6-6	5
2950	3-30	6-6	5
2954	3-30	6-6	5
2978	3-30	6-6	5
3016	3-30	6-6	5
3017	3-30	6-6	5
3033	3-30	6-6	5
3041	3-30	6-6	5
3004	3-30	7-27	5
3010	4-59	3-16	3
3019	4-59	3-16	3
2964	4-59	3-22	3
3027	4-59	3-16	4
3046	5-51	5-5	3

Tabla 4			
Anticuerpos con cadena ligera Vκ3-20Jκ1 común			
Anticuerpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H
2968	4-39	1-26	3
2975	5-51	6-13	5
2972	5-51	3-16	6

Ejemplo 7. Determinación de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno por ensayo Luminex™

Se ensayaron noventa y ocho anticuerpos con cadena ligera común humanos que se producían contra el Antígeno E en cuanto a su capacidad para bloquear la unión de ligando natural del antígeno E (Ligando Y) al antígeno E en un ensayo basado en perlas.

Se conjugó el dominio extracelular (ECD) del antígeno E con dos marcadores de epítipo myc y un marcador 6x histidina (Antígeno E-mmH) y se acoplaron mediante grupo amino a las microsferas carboxiladas a una concentración de 20 µg/ml en tampón MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente seguido

- por la desactivación de las perlas con Tris 1 M a pH 8,0 seguido por lavado en PBS con un 0,05% (v/v) de Tween-20. Luego se bloquearon las perlas con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía un 2% (p/v) de BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa filtro de 96 pocillos, se diluyeron 1:15 los sobrenadantes que contenían los anticuerpos con cadena ligera común específicas del Antígeno E, en el tampón. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante falso con los mismos componentes de los medios como sobrenadante de anticuerpo. Se añadieron perlas marcadas con antígeno E a los sobrenadantes y se incubaron durante una noche a 4 °C. Se añadió proteína Ligando Y biotinilada a una concentración final de 0,06 M y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Se determinó la unión del ligando Y biotinilado a las perlas marcadas con Antígeno E-myc-myc-6His con R-Ficoeritrina conjugada con Estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD) seguido por la medición con un analizador basado en citometría de flujo Luminex™. Se retó La intensidad de fluorescencia media de fondo (MFI) de una muestra sin Ligando Y de todas las muestras. Se calculó el porcentaje de bloqueo dividiendo la resta de la MFI del fondo de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante de 100.
- En un experimento similar, se ensayaron los mismo 98 anticuerpos con cadena ligera común humanos que se producen contra el Antígeno E en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a perlas marcadas con Ligando Y.
- En resumen, el Ligando Y acoplado por el grupo amino a microsferas carboxiladas a una concentración de 20 µg/ml diluidas en tampón MES. La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente seguido por la desactivación de las perlas con Tris 1 M a pH 8 y luego se lavó con PBS con 0,05% (v/v) de Tween-20. Luego se bloquearon las perlas con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía un 2% p/v de BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). En una placa filtro de 96 pocillos, se diluyeron 1:15 en tampón los sobrenadantes que contenían anticuerpos con cadena ligera común específica de Antígeno E. Se preparó un control negativo que contenía un sobrenadante falso con los mismos componentes del medio como sobrenadante de anticuerpo. Se añadió mmH-Antígeno E biotinilado a una concentración final de 0,42 nM y se incubó durante una noche a 4 °C. Las perlas marcadas con Ligando Y se añadieron entonces a la mezcla de anticuerpo/Antígeno E y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La detección de la unión de mmH-Antígeno E biotinilado con perlas con Ligando E se determinó con R-Ficoeritrina conjugada con Estreptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD) seguido por la medición con un analizador basado en citometría de flujo Luminex™. Se restó la intensidad de fluorescencia media de fondo (MFI) de una muestra sin Antígeno E de todas las muestras. Se calculó el porcentaje de bloqueo dividiendo la resta de la MFI del fondo de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor resultante de 100.
- Las Tablas 5 y 6 muestran el porcentaje de bloqueo de los 98 anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E ensayados en ambos ensayos Luminex™. ND: no determinado bajo las condiciones experimentales en curso.
- En el primer experimento Luminex™ descrito anteriormente, se ensayaron 80 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 modificada en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Ligando Y a las perlas marcadas con Antígeno E. De estos 80 anticuerpos con cadena ligera común, 68 demostraban > 50% de bloqueo, mientras que 12 demostraban < 50% de bloqueo (6 con 25-50% de bloqueo y 6 con < 25% de bloqueo). Para los 18 anticuerpos con cadena común que contenían la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 modificada, 12 demostraban > 50% de bloqueo, mientras que 6 demostraban < 50% de bloqueo (3 el 25-50% de bloqueo y 17 con < 25% de bloqueo) de la unión del ligando Y a las perlas marcadas con Antígeno E.
- En el segundo experimento Luminex™ descrito anteriormente, se ensayaron los mismos 80 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vκ1-39Jκ5 modificada en cuanto a su capacidad de unión del Antígeno E a perlas marcadas con Ligando Y. De estos 80 anticuerpos con cadena ligera común, 36 demostraron > 50% de bloqueo (27 con un 25-50% de bloqueo y 17 con < 25% de bloqueo). Para los 18 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera Vκ3-20Jκ1 modificada, 1 demostraba > 50% de bloqueo, mientras que < 50% de bloqueo (5 con el 25-50% de bloqueo y 12 con < 25% de bloqueo) de unión del Antígeno E a las perlas marcadas con Ligando Y.
- Los datos de las tablas 5 y 6 establecen que los reordenamientos descritos en las Tablas 3 y 4 generan anticuerpos con cadena ligera común específica del Antígeno E que bloquean la unión del Ligando Y a su receptor equivalente Antígeno E con varios grados de eficacia, lo que es consistente con los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E de las tablas 3 y 4 que comprende anticuerpos con especificidad de epítipo solapada o no solapada con respecto al antígeno E.

Tabla 5		
Anticuerpos con cadena ligera Vκ1-39Jκ5 común		
Anticuerpo	% de bloqueo de perlas marcadas con Antígeno E	% de bloqueo de Antígeno E en solución
2948	81,1	47,8
2948G	38,6	ND
2949	97,6	78,8
2949G	97,1	73,7
2950	96,2	81,9
2950G	89,8	31,4
2952	96,1	74,3
2952G	93,5	39,9
2954	93,7	70,1
2954G	91,7	30,1
2955	75,8	30,0
2955G	71,8	ND
2964	92,1	31,4
2964G	94,6	43,0
2978	98,0	95,1
2978G	13,9	94,1
2982	92,8	78,5
2982G	41,9	52,4
2985	39,5	31,2
2985G	2,0	5,0
2987	81,7	67,8
2987G	26,6	29,3
2996	87,3	55,3
2996G	95,9	38,4
2997	93,4	70,6
2997G	9,7	7,5
3004	79,0	48,4
3004G	60,3	40,7
3005	97,4	93,5
3005G	77,5	75,6
3010	98,0	82,6
3010G	97,9	81,0
3011	87,4	42,8
3011G	83,5	41,7

ES 2 547 142 T3

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

Ejemplo 8. Determinación de la capacidad de bloqueo de los anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno por ELISA

5 Los anticuerpos con cadena ligera común humanos que aparecen contra al Antígeno E se ensayaron en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a una superficie revestida con el Ligando Y en un ensayo ELISA.

10 Se revistió con Ligando Y placas de 96 pocillos a una concentración de 2 µg/ml en PBS y se incubaron durante una noche seguido por el lavado 4 veces con PBS con un 0,05% de Tween-20. La placa se bloqueó entonces con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) que contenía un 0,5% (p/v) de BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) durante una hora a temperatura ambiente. En una placa distinta se diluyeron 1:10 los sobrenadantes que contenían anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E en tampón. Se utilizó un sobrenadante falso con los mismos

componentes que los anticuerpos como control negativo. Se añadió Antígeno E-mmH (descrito anteriormente) 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 entonces 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 una peroxidasa de rábano rusticano (HRP) conjugada con un anticuerpo anti-Penta-His (Qiagen, Valencia, CA) y se desarrolló por respuesta colorimétrica de referencia utilizando un sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Jose, CA) neutralizado por ácido sulfúrico. Se leyó la absorbancia a una DO450 durante 0,1 s. Se restó la absorbancia de fondo de una muestra sin Antígeno E de todas las muestras. Se calculó el porcentaje de bloqueo dividiendo la MFI con el fondo sustraído de cada muestra por el valor del control negativo ajustado, multiplicando por 100 y restando el valor del resultado de 100.

Las Tablas 7 y 8 muestran el porcentaje de bloqueo de los 98 anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E ensayados en el ensayo ELISA. ND: no determinado bajo las condiciones experimentales en curso.

Como se describe en el presente Ejemplo, de los 80 anticuerpos con cadena ligera común que contenían una cadena ligera V κ 1-39J κ 5 modificada que se ensayaron en cuanto a su capacidad para bloquear la unión del Antígeno E a una superficie revestida con Ligando Y, 22 demostraron > 50% de bloqueo, mientras que 58 demostraron < 50% de bloqueo (20 con un 25-50% de bloqueo y 38 con < 25% de bloqueo). Para los 18 anticuerpos con cadena ligera común que contenían la cadena ligera V κ 3-20J κ 1 modificada, 1 demostraba > 50% de bloqueo, mientras que 17 demostraban < 50% de bloqueo (5 con 25-50% de bloqueo y 12 < 25% de bloqueo) de la unión del Antígeno E a la superficie revestida con el Ligando Y.

Estos resultados también son consistentes con el grupo de anticuerpos con cadena ligera común específica de Antígeno E que comprende anticuerpos que especificidad de epítipo solapada o no solapada con respecto al Antígeno E.

Tabla 7	
Anticuerpos con cadena ligera V κ 1-39J κ 5 común	
Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en solución
2948	21,8
2948G	22,9
2949	79,5
2949G	71,5
2950	80,4
2950G	30,9
2952	66,9
2952G	47,3
2954	55,9
2954G	44,7
2955	12,1
2955G	25,6
2964	34,8
2964G	47,7
2978	90,0
2978G	90,2
2982	59,0
2982G	20,4
2985	10,5
2985G	ND

ES 2 547 142 T3

2987	31,4
2987G	ND
2996	29,3
2996G	ND
2997	48,7
2997G	ND
3004	16,7
3004G	3,5
3005	87,2
3005G	54,3
3010	74,5
3010G	84,6
3011	19,4
3011G	ND
3012	45,0
3012G	12,6
3013	39,0
3013G	9,6
3014	5,2
3014G	17,1
3015	23,7
3015G	10,2
3016	78,1
3016G	37,4
3017	61,6
3017G	25,2
3018	40,6
3018G	14,5
3019	94,6
3019G	92,3
3020	80,8
3020G	ND
3021	7,6
3021G	20,7
3022	2,4
3022G	15,0
3023	9,1
3023G	19,2

3024	7,5
3024G	15,2
3025	ND
3025G	13,9
3027	61,4
3027G	82,7
3028	40,3
3028G	12,3
3030	ND
3030G	9,5
3032	ND
3032G	13,1
3033	77,1
3033G	32,9
3036	17,6
3036G	24,6
3041	59,3
3041G	30,7
3042	39,9
3042G	16,1
3043	57,4
3043G	46,1

Tabla 8	
Anticuerpos con cadena ligera Vκ3-20Jκ1 común	
Anticuerpo	% de bloqueo del Antígeno E en solución
2968	68,9
2968G	15,2
2969	10,1
2969G	23,6
2970	34,3
2970G	41,3
2971	6,3
2971G	27,1
2972	9,6
2972G	35,7
2973	20,7
2973G	23,1

2974	ND
2974G	22,0
2975	8,7
2975G	19,2
2976	4,6
2976G	26,7

Ejemplo 9. Determinación de afinidad por BIAcore™ para los anticuerpos con cadena ligera común específica del antígeno

- 5 Se determinaron las constantes de disociación de equilibrio (K_D) para sobrenadantes con anticuerpos seleccionados por SPR (Resonancia de plasmones superficiales) utilizando un dispositivo T100 BIAcore™ (GE Healthcare). Todos los datos se obtuvieron utilizando HBS-EP (10 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 0,3 mM de EDTA, un 0,05% de Tensioactivo P20, pH 7,4) tanto los tampones de ejecución y de muestras, a 25 °C. Los anticuerpos se capturaron de las muestras de sobrenadante brutas sobre una superficie de un chip sensor CM5 derivado previamente con una alta densidad de anticuerpos anti-Fc humano utilizando química de acoplamiento a grupos amino de referencia.
- 10 Durante la etapa de captura, se inyectaron los sobrenadantes a través de la superficie anti-Fc humano con una tasa de flujo de 3 μ l/min, durante un total de 3 minutos. La etapa de captura continuaba con una inyección de o bien el tampón de ejecución o el analito a una concentración de 100 nM durante 2 minutos con una tasa de flujo de 35 μ l/min. La disociación del antígeno del anticuerpo capturado se controló durante 6 minutos. El anticuerpo capturado se eliminó con una breve inyección de glicina 10 mM, pH 1,5. Todos los sensogramas se referenciaron doblemente restando los sensogramas de las inyecciones de tampón de los sensogramas de analito, eliminando de esta manera los artefactos producidos por la disociación del anticuerpo de la superficie de captura. Los datos de la unión de cada anticuerpos se ajustó a un modelo de unión 1:1 con transporte de masa utilizando el software de evaluación T100 de BIAcore v2.1. Los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

- 20 Las afinidades de unión de los anticuerpos con cadena ligera común comprenden los reordenamientos que se muestran en las Tablas 3 y 4 varían, mostrando casi todos una K_D en el intervalo nanomolar. Los datos de afinidad son consistentes con los anticuerpos con cadena ligera común que resultan de la asociación combinatoria de dominios variables reordenados descritos en las Tablas 3 y 4 que son de alta afinidad, seleccionados por clones, y mutados somáticamente. Emparejados con los datos mostrados previamente, los anticuerpos con cadena ligera común descritos en las Tablas 3 y 4 comprenden una colección de distintos anticuerpos de alta afinidad que muestran especificidad para uno o más epítomos en el Antígeno E.

Tabla 9		
Anticuerpos con cadena ligera V κ 1-39J κ 5 común		
Anticuerpo	100 nM de Antígeno E	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (min)
2948	8,83	28
2948G	95,0	1
2949	3,57	18
2949G	6,37	9
2950	4,91	17
2950G	13,6	5
2952	6,25	7
2952G	7,16	4
2954	2,37	24
2954G	5,30	9
2955	14,4	6

ES 2 547 142 T3

2955G	12,0	4
2964	14,8	6
2964G	13,0	9
2978	1,91	49
2978G	1,80	58
2982	6,41	19
2982G	16,3	9
2985	64,4	9
2985G	2,44	8
2987	21,0	11
2987G	37,6	4
2996	10,8	9
2996G	24,0	2
2997	7,75	19
2997G	151	1
3004	46,5	14
3004G	1,93	91
3005	2,35	108
3005G	6,96	27
3010	4,13	26
3010G	2,10	49
3011	59,1	5
3011 G	41,7	5
3012	9,71	20
3012G	89,9	2
3013	20,2	20
3013G	13,2	4
3014	213	4
3014G	36,8	3
3015	29,1	11
3015G	65,9	0
3016	4,99	17
3016G	18,9	4
3017	9,83	8
3017G	55,4	2
3018	11,3	36
3018G	32,5	3
3019	1,54	59

3019G	2,29	42
3020	5,41	39
3020G	41,9	6
3021	50,1	6
3021 G	26,8	4
3022	25,7	17
3022G	20,8	12
3023	263	9
3023G	103	5
3024	58,8	7
3024G	7,09	10
3025	35,2	6
3025G	42,5	8
3027	7,15	6
3027G	4,24	18
3028	6,89	37
3028G	7,23	22
3030	46,2	7
3030G	128	3
3032	53,2	9
3032G	13,0	1
3033	4,61	17
3033G	12,0	5
3036	284	12
3036G	18,2	10
3041	6,90	12
3041 G	22,9	2
3042	9,46	34
3042G	85,5	3
3043	9,26	29
3043G	13,1	22

Tabla 10		
Anticuerpos con cadena ligera Vκ3-20Jκ1 común		
Anticuerpo	100 nM de Antígeno E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2968	5,50	8

2968G	305	0
2969	34,9	2
2969G	181	1
2970G	12,3	3
2971G	32,8	22
2972	6,02	13
2972G	74,6	26
2973	5,35	39
2973G	11,0	44
2974	256	0
2974G	138	0
2975	38,0	2
2975G	134	1
2976	6,73	10
2976G	656	8

Ejemplo 10. Determinación de especificidades de unión de anticuerpos con cadena ligera común específica de antígeno por ensayo Luminex™

- 5 Se ensayaron los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E en cuanto a su capacidad para unirse al ECD del Antígeno E y variantes de ECD Antígeno E, que incluyen el ortólogo de mono Cynomolgus (*Mf* Antígeno E), que se diferencia de la proteína humana en aproximadamente el 10% de sus restos de aminoácidos; una eliminación mutante de Antígeno E que carece de los últimos 10 aminoácidos del extremo C del ECD (Antígeno E- Δ CT); y dos
- 10 mutantes que contenían una sustitución de alanina en localizaciones sospechosas de interacción con el Ligando Y (Antígeno E-Ala1 y Antígeno E-Ala2). Las proteínas de Antígeno E se produjeron en células CHO que contenían cada una un marcador myc-myc-His en el extremo C.

Para los estudios de unión, se capturó la proteína Antígeno E ECD o una variante de la proteína (descrito anteriormente) de 1 ml de medio de cultivo por incubación durante 2 h a temperatura ambiente con 1×10^6 perlas

15 microesféricas (Luminex™) revestidas covalentemente con un anticuerpo monoclonal anti-myc (MAb 9E10, línea celular de hibridoma CRL-1729™; ATCC, Manassas, VA). Las perlas se lavaron entonces con PBS antes de su uso. Los sobrenadantes que contenían los anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E se diluyeron 1:4 en tampón y se añadieron a placas filtro de 96 pocillos. Un sobrenadante falso sin anticuerpo se utilizó como control negativo. Las perlas que contenían las proteínas de Antígeno E capturado se añadieron entonces a las muestras de

20 anticuerpo (3000 perlas por pocillo) y se incubaron durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las perlas de muestra se lavaron y se detectó la unión de anticuerpos con cadena ligera común con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con R-ficoeritrina. La intensidad de fluorescencia de las perlas (aproximadamente se contaron 100 perlas para cada muestra de anticuerpo unido a cada proteína de Antígeno E) se midió con un analizador basado en citometría Luminex™, y se registró la intensidad media de fluorescencia (MFI) para al menos 100 perlas que se

25 contaron por interacción perla/anticuerpo. Los resultados se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11					
Anticuerpos con cadena ligera V κ 1-39Jk5 común					
Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E- Δ CT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	<i>Mf</i> Antígeno E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514

ES 2 547 142 T3

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
3011 G	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

ES 2 547 142 T3

3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
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 12					
Anticuerpos con cadena ligera Vκ3-20Jκ1 común					
Anticuerpo	Intensidad media de fluorescencia (MFI)				
	Antígeno E-ECD	Antígeno E-ΔCT	Antígeno E-Ala1	Antígeno E-Ala2	Mf Antígeno E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

Los sobrenadantes con anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E mostraban una unión altamente específica a las perlas unidas al Antígeno E-ECD. En estas perlas, el sobrenadante falso de control negativo daba como resultado una señal insignificante (< 10 MFI) cuando se combina con la muestra de perlas con el Antígeno E-ECD, mientras que los sobrenadantes que contenían anticuerpos con cadena ligera común anti-Antígeno E mostraban una fuerte señal de unión (MFI media de 2627 para los 98 sobrenadantes con anticuerpo; MFI > 500 para 91/98 muestras de anticuerpo).

Como se mide en cuanto a la capacidad de los anticuerpos seleccionados con cadena ligera común anti-Antígeno E, se determinó la unión relativa de los anticuerpos con las variantes. Las cuatro variantes de Antígeno E cuando se capturaron con perlas Luminex™ anti-myc como se describe anteriormente para los estudios de unión con el Antígeno E-ECD nativo, y se determinaron las relaciones de unión relativas ($MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}}$). Para los 98 sobrenadantes con anticuerpos con cadena ligera común que se muestran en las Tablas 11 y 12, las relaciones medias ($MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}}$) son diferentes para cada variante, probablemente reflejando diferentes cantidades de captura de las proteínas en las perlas (relaciones medias de 0,61, 2,9, 2,0, y 1,0 para Antígeno E-ΔCT, Antígeno E-Ala1, Antígeno E-Ala2 y Mf Antígeno E, respectivamente). Para cada variante de proteína, la unión para un subgrupo de los 98 anticuerpos con cadena ligera común ensayados mostraba una unión muy reducida, indicando la sensibilidad de la mutación que caracterizaba una variante determinada. Por ejemplo, 19 de las muestras de anticuerpo con cadena ligera común del Mf Antígeno E con $MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{Antígeno E-ECD}} < 8\%$. Mientras que muchos de este grupos incluyen anticuerpos con una afinidad alta o moderadamente alta (5 con $K_D < 5$ nM, 15 con $K_D < 50$ nM), es probable que la señal más baja para este grupo sea como resultado de la sensibilidad a las diferencias de secuencia (epítipo) entre el Antígeno E-ECD nativo u una variante determinada más que por afinidades más bajas.

Estos datos establecen que los anticuerpos con cadena ligera común descritos en las Tablas 3 y 4 representan además un grupo diverso de anticuerpos con cadena ligera común específicos de Antígeno E que reconocen específicamente más de un epítipo sobre el Antígeno E.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MCWHIRTER, John MACDONALD, Lynn STEVENS, Sean DAVIS, Samuel MURPHY, Andrew J.

<120> Cadena ligera común de ratón

<130> 0802A-WO

<140> A asignar

<141>

<150> 61/302.282

<151> 08-02-2010

<160> 18

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 3155

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 1

ggcgcgcggt	agctttgaat	tttaaacatc	tatttgacaa	gaaatgcata	gttcccttctc	60
tttaaaataa	tgtaatgttt	ctttcaagaa	taagcttggt	ttgatgcctc	tctccccaac	120
atgatagaag	tgtagcataa	atctatgaaa	aattccattt	ccctgtgcct	acaacaacta	180
cctgggattg	aaaacttctt	cccttgcctc	agtcctttct	tctacaccta	cttccacatc	240
atctgtgact	caaaacaata	cttgtcagga	aagatcccg	aaagagcaaa	aaagacttcc	300
ttagagggtg	cagagattcc	tatgccacta	tctgtcatct	ctagaagggg	ttgtgagtat	360
gaggaagagc	agagcttgta	aattttctac	ttgctttgac	ttccactgta	tttcctaaca	420
acaacaacca	cagcaacacc	cataacatca	caggacaaa	ttctagtact	tccaaggctt	480
tagtctcagt	aatctctctc	tacctccatc	acagcagcta	gaagggttga	tactcataca	540
aatagtactg	tagctttctg	ttcataattg	gaaaaataga	caagacccaa	tgtaatacag	600
gctttccctc	agccagttag	cgttcagttt	ttggatcacc	attgcacaca	tatacccagc	660
atatgtctaa	tatatatgta	gaaatccgtg	aagcaagagt	tataatagct	tgtgttttct	720
attgtattgt	attttccctc	tatatcatct	tcttcttctg	tcattaaaaa	aaaaccgttc	780
aagtaggtct	aaattaatta	ttggatcata	agtagataaa	atattttatt	tcataacaca	840
ttgaccgat	gaatatgttt	ctttgccaga	catagtcctc	atttccaagg	taacaagcct	900
gaaaaaatta	tactggagca	agtcaacagg	taatgatggt	agcttttctc	tattgtcctg	960
gggcaagaat	aagacaaaag	ataacagggt	agaataaaga	ttgtgtaaga	aagaaggaca	1020
gcaacaggac	atgggaacct	tttatagagt	aacattttga	taatggatga	tgagaattaa	1080
tgagttagac	agggatgggt	gggaatgatt	gaagggtgtg	gtacttttagc	acagattaag	1140
accaaactcat	taggatttaa	agagttgtgt	agagtttagt	aaggaaaagc	cttagaatta	1200
aatttggctg	cggataaaac	attcttggat	tagactgaag	actcttttct	gtgctaagta	1260
agtatatatta	tgataatgat	gatgactgta	gtgctgaata	tttaataaat	aaaaacaaaa	1320
ttaattgccc	catacataat	gtcctgaata	ctattgtaaa	tgttttattc	tatttccctt	1380
aaactgtcta	cagcactata	aggtagggtac	cagtattgtc	acagttacac	agatatggaa	1440
accgagacac	agggaaagta	agttacttga	tcaattttcaa	gcaatcggca	agccatggag	1500
catctatgtc	agggctgcca	ggacatgtga	ctgtaaacag	aagtttttca	ctttttaact	1560
caaagagggg	atgtggctgg	gttaatggaa	agcttcagga	ccctcagaaa	acattactaa	1620
caagcaaag	aaagggtgtat	ctggaagatt	aagttttaac	agactcttca	tttccatcga	1680
tccaataatg	cacttaggga	gatgactggg	catattgagg	ataggaagag	agaagtgaaa	1740
acacagcttt	ttatattgtt	cttaacaggc	ttgtgccaaa	catcttcttg	gtggatttag	1800
gtgattgagg	agaagaaaga	cacaggagcg	aaattctctg	agcacaaggg	aggagttcta	1860
cactcagact	gagccaacag	acttttcttg	cctgacaacc	agggcggcgc	aggatgctca	1920
gtgcagagag	gaagaagcag	gtggtccttg	cagctgaaag	ctcagctgat	ttgcatatgg	1980
agtcattata	caacatccca	gaattcttta	agggcagctg	ccaggaagct	aagaagcatc	2040
ctctcttcta	gctctcagag	atggagacag	acacactcct	gctatgggtg	ctgctgctct	2100
gggttccagg	tgagggtaca	gataagtgtt	atgagcaacc	tctgtggcca	ttatgatgct	2160
ccatgcctct	ctgttcttga	tcactataat	tagggcattt	gtcactgggt	ttaagtttcc	2220
ccagtccctc	gaattttcca	ttttctcaga	gtgatgtcca	aaattattct	taaaaattta	2280
aatgaaaagg	tcctctgctg	tgaaggcttt	taaagatata	taaaaataat	ctttgtgttt	2340
atcattccag	gtgccagatg	tgacatccag	atgaccagct	ctccatcctc	cctgtctgca	2400
tctgtaggag	acagagtcac	catcacttgc	cgggcaagtc	agagcattag	cagctattta	2460
aattggtatc	agcagaaacc	agggaaagcc	cctaagctcc	tgatctatgc	tgcatccagt	2520
ttgcaaagtg	gggtcccatc	aaggttcagt	ggcagtggtg	ctgggacaga	tttactctc	2580
accatcagca	gtctgcaacc	tgaagatttt	gcaacttact	actgtcaaca	gagttacagt	2640
accctccga	tcaccttcgg	ccaagggaca	cgactggaga	ttaaacgtaa	gtaatttttc	2700
actattgtct	tctgaaattt	gggtctgatg	gccagtattg	acttttagag	gcttaaatag	2760
gagtttggtg	aagattggta	aatgagggca	tttaagattt	gccatgggtt	gcaaaagtta	2820
aactcagctt	caaaaatgga	tttgagagaa	aaaagattaa	attgctctaa	actgaatgac	2880
acaaagttaa	aaaaaaaaag	gtaactaaaa	aggaacctt	gtatttctaa	ggagcaaaag	2940
taaatttatt	tttgttcact	cttgccaaat	attgtattgg	ttgttgctga	ttatgcatga	3000
tacagaaaag	tggaaaaata	catttttttag	tctttctccc	ttttgtttga	taaattattt	3060
tgtcagacaa	caataaaaaat	caatagcacg	ccctaagatc	tagatgcatg	ctcgagtgcc	3120
atttcattac	ctctttctcc	gcacccgaca	tagat			3155

<210> 2
<211> 28
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 5
 <400> 2
 aggtgagggt acagataagt gttatgag 28
 10
 <210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 3
 tgacaaatgc cctaattata gtgatca 27
 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 4
 gggcaagtca gagcattagc a 21
 30
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 5
 tgcaaactgg atgcagcata g 21
 40
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sintética
 50
 <400> 6
 ggtggagagg ctattcggc 19
 55
 <210> 7
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 7
 gaacacggcg gcatcag 17
 65
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
5	<400> 8	
	tgggcacaac agacaatcgg ctg	23
10	<210> 9	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 9	
	ccattatgat gctccatgcc tctctgttc 29	
20	<210> 10	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 10	
30	atcagcagaa accagggaaa gccct 26	
	<210> 11	
	<211> 3166	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 11	

ggcgcgccgt	agctttgaat	tttaaacaac	tatttgacaa	gaaatgcata	gttcccttctc	60
tttaaaataa	tgtaatgttt	ctttcaagaa	taagcttggg	ttgatgcctc	tctccccaac	120
atgatagaag	tgtagcataa	atctatgaaa	aattccattt	ccctgtgcct	acaacaacta	180
cctgggattg	aaaacttctt	cccttgcctc	agtcctttct	tctacaccta	cttccacatc	240
atctgtgact	caaaacaata	cttgtcagga	aagatcccg	aaagagcaaa	aaagacttcc	300
ttagagggtg	cagagattcc	tatgccacta	tctgtcatct	ctagaagggg	ttgtgagtat	360
gaggaagagc	agagcttgta	aattttctac	ttgctttgac	ttccactgta	tttccctaaca	420
acaacaacca	cagcaacacc	cataacatca	caggacaaac	ttctagtact	tccaaggctt	480
tagtctcagt	aaatcttctc	tacctccatc	acagcagcta	gaagggttga	tactcataca	540
aatagtaactg	tagctttctg	ttcataattg	gaaaaataga	caagacccaa	tgtaatacag	600
gctttccctc	agccagttag	cgttcagttt	ttggatcacc	attgcacaca	tatacccgag	660
atatgtctaa	tatatatgta	gaaatccgtg	aagcaagagt	tataatagct	tgtgttttct	720
attgtattgt	atcttctctc	tatatcatct	tcttcttctg	tcattaaaaa	aaaaccgctc	780
aagtaggtct	aaattaatta	ttggatcata	agtagataaa	atattttatt	tcataacaca	840
ttgacccgat	gaatatgttt	ctttgccaga	catagtccct	atttccaagg	taacaagcct	900
gaaaaaatta	tactggagca	agtcaacagg	taatgatggg	agcttttcc	tattgtccctg	960
gggcaagaat	aagacaaaag	ataacagggt	agaataaaga	ttgtgtaaga	aagaaggaca	1020
gcaacaggac	atgggaacct	tttatagagt	aacattttga	taatggatga	tgagaattaa	1080
tgagttagac	agggatgggt	gggaatgatt	gaagggtgta	gtacttttagc	acagattaag	1140
accaaatacat	taggatttaa	agagttgtgt	agagtttagt	aaggaaaagc	cttagaatta	1200
aatttggctg	cggataaaac	attcttggat	tagactgaag	actcttttct	gtgctaagta	1260
agtataatta	tgataatgat	gatgactgta	gtgctgaata	tttaataaat	aaaaacaaaa	1320
ttaattgccg	catacataat	gtcctgaata	ctattgtaaa	tgttttatct	tatttccctt	1380
aaactgtcta	cagcactata	aggtagggtc	cagtattgtc	acagttacac	agatattgga	1440
accgagacac	agggaagtta	agttacttga	tcaatttcaa	gcaatcggca	agccatggag	1500
catctatgtc	agggtctcca	ggacatgtga	ctgtaaacag	aagtttttca	ctttttaact	1560
caaagagggt	atgtggctgg	gttaatggaa	agcttcagga	ccctcagaaa	acattactaa	1620
caagcaaatg	aaagggtgat	ctggaagatt	aagttttaac	agactcttca	tttccatcga	1680
tccaataatg	cacttaggga	gatgactggg	catattgagg	ataggaagag	agaagtgaag	1740
acacagcttt	ttatatgttt	cttaacaggc	ttgtgccaac	catcttctgg	gtggatttag	1800
gtgattgagg	agaagaaaga	cacaggagcg	aaattctctg	agcacaaggg	aggagtctta	1860
cactcagact	gagccaacag	acttttctgg	cctgacaacc	agggcggcgc	aggatgctca	1920
gtgcagagag	gaagaagcag	gtggtctttg	cagctgaaag	ctcagctgat	ttgcatatgg	1980
agtcattata	caacatccca	gaattcttta	agggcagctg	ccaggaagct	aagaagcatc	2040
ctctcttcta	gctctcagag	atggagacag	acacactcct	gctatgggtg	ctgctgctct	2100
gggttccagg	tgagggtaca	gataagtgtt	atgagcaacc	tctgtggcca	ttatgatgct	2160
ccatgcctct	ctgttcttga	tcactataat	tagggcattt	gtcactgggt	tttaagtttcc	2220
ccagtcctct	gaattttcca	ttttctcaga	gtgatgtcca	aaattattct	taaaaattta	2280
aatgaaaagg	tctctgtctg	tgaaggcttt	taaagatata	taaaaataat	ctttgtgttt	2340
atcattccag	gtgccagatg	tataccaccg	gagaaattgt	gttgacgcag	tctccaggca	2400
ccctgtcttt	gtctccaggg	gaaagagcca	ccctctctctg	cagggccagt	cagagtgtta	2460
gcagcagcta	cttagcctgg	taccagcaga	aacctggcca	ggctcccagg	ctcctcatct	2520
atgggtgcac	cagcagggcc	actggcatcc	cagacagggt	cagtggcagt	gggtctggga	2580
cagacttcac	tctcaccatc	agcagactgg	agcctgaaga	ttttgcagtg	tattactgtc	2640
agcagtatgg	tagctcacct	tggacgttcc	gccaaaggac	caagggtgaa	atcaaacgta	2700
agtaattttt	cactattgtc	ttctgaaatt	tgggtctgat	ggccagtatt	gacttttaga	2760
ggcttaataa	ggagtttggg	aaagatttgt	aaatgagggc	atttaagatt	tgccatgggt	2820
tgcaaaaagt	aaactcagct	tcaaaaatgg	atttggagaa	aaaaagatta	aattgctcta	2880
aactgaatga	cacaaagtaa	aaaaaaaaag	tgtaactaaa	aaggaaccct	tgtatttcta	2940
aggagcaaaa	gtaaatttat	ttttgttcac	tcttgccaaa	tattgtattg	gttgttgctg	3000
attatgcattg	atacagaaaa	gtggaaaaat	acatttttta	gtctttctcc	cttttgtttg	3060
ataaattatt	ttgtcagaca	acaataaaaa	tcaatagcac	gcctaagat	ctagatgcac	3120
gctcgaggtgc	catttcatta	cctctttctc	cgcacccgac	atagat		3166

<210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

5 <400> 12
tccaggcacc ctgtcttg 19

10 <210> 13
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

<400> 13
aagtagctgc tgctaact ctgact 26

20 <210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

<400> 14
aaagagccac cctctcctgc aggg 24

30 <210> 15
<211> 3187
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 15

ggcgcgcgcgt	agcttttgaat	tttaaacatc	tatttgacaa	gaaatgcata	gttcctttctc	60
tttaaaaataa	tgtaaatgttt	ctttcaagaa	taagcttggg	ttgatgcctc	tctccccaac	120
atgatagaag	tgtagcataa	atctatgaaa	aattccattt	ccctgtgcct	acaacaacta	180
cctgggattg	aaaactttctt	cccttgctct	agtcctttct	tctacacctc	cttcacacac	240
atctgtgact	caaaacaata	cttgtcagga	aagatcccg	aaagagcaaa	aaagacttcc	300
ttagagggtg	cagagattcc	tatgccacta	tctgtcatct	ctagaagggg	ttgtgagtat	360
gaggaagagc	agagcittgta	aattttctac	ttgctttgac	ttccactgta	tttcttaaca	420
acaacaacca	cagcaacacc	cataacatca	caggacaaac	ttctagtact	tccaaggctt	480
tagtctcagt	aaatctttctc	tacctccatc	acagcagcta	gaagggttga	tactcatata	540
aatagtactg	tagctttctg	ttcataattg	gaaaaataga	caagacccaa	tgtaatacag	600
gctttccttc	agccagttag	cgttcagttt	ttggatcacc	attgcacaca	tatacccgag	660
atatgtctaa	tatatatgta	gaaatccgtg	aagcaagagt	tataatagct	tgtgttttct	720
attgtattgt	attttcctct	tatatcatct	tcttcttcgt	tcattaaaaa	aaaaccgttc	780
aagtaggtct	aaattaatta	ttggatcata	agtagataaa	atattttatt	tcataacaca	840

40

ES 2 547 142 T3

```

ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtcctc atttccaagg taacaagcct 900
gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggt agcttttctt tattgtcctg 960
gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020
gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
tgagtttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgtg gtacttttag acagattaag 1140
accaaatcat taggatttaa agagtttgtg agagtttagt aaggaaaagc cttagaatta 1200
aatttggtctg cggataaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260
agtatatatta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata tttataaat aaaaacaaaa 1320
ttaattgccc catacataat gtccctgaata ctattgtaaa tgttttatct tatttctctt 1380
aaactgtcta cagcactata aggtagggtac cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
accgagacac aggggaagta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500
catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560
caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620
caagcaaatg aaagggtgat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680
tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaaagag agaagtgaag 1740
acacagcttt ttatatgtt cttaacaggc ttgtgccaaa catcttcttg gtggatttag 1800
gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctta 1860
cactcagaat gagccaacag acttttcttg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
gtgcagagag gaagaagcag gtggtctttg cagctgaaag ctcagctgat ttgcatatgg 1980
agtcatata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100
gggttccagg tgaggggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160
ccatgcctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtttcc 2220
ccagtccctt gaatttttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
aatgaaaagg tctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340
atcattccag gtgccagatg tgttgtgtg ctcagccggt gctgcatcag ccgcgggcca 2400
tgtctcggc ccttggaacc acaatccgcc tcacctgcac cctgaggaac gaccatgaca 2460
tgggtgtgta cagcgtctac tgggtaccag agaggccggg ccacctccc aggttctctg 2520
tgagatattt ctcaaatca gacaagagcc agggccccc ggtccccct cgttctctg 2580
gatccaaaga tgtggccagg aacagggggg atttgagcat ctctgagctg cagcctgagg 2640
acgaggctat gtattactgt gctatgcata actcagtgac gcatgtgttt ggcagcggga 2700
cccagctcac cgttttaagt aagtaatttt tcaactattgt cttctgaaat ttgggtctga 2760
tggccagtat tgacttttag aggcttaaat aggagtttg taaagatttg taaatgaggg 2820
catttaagat ttgccatggg ttgcaaaagt taaactcagc ttcaaaaatg gatttgaga 2880
aaaaaagatt aaattgctct aaactgaatg acacaaaagta aaaaaaaaaa gtgtaactaa 2940
aaaggaacc ttgtatttct aaggagcaaa agtaaattta tttttgttca ctcttgccaa 3000
atattgtatt ggttgtgtgt gattatgcat gatacagaaa agtggaaaaa tacatttttt 3060
agtctttctc ccttttgttt gataaattat tttgtcagac aacaataaaa atcaatagca 3120
cgccctaaga tctagatgca tgctcgagtg ccatttcatt acctcttct ccgcaccga 3180
catagat

```

<210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 16
 tgtctcggc ccttga 17

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 17

ccgatgtcat ggtcgttct 20

5 <210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 18
acaatccgcc tcacctgcac cct 23

REIVINDICACIONES

1. Un ratón que comprende:

(a) una sustitución en el locus endógeno del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina con un único segmento genético $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa 5}$ humano reordenado o un único segmento genético $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa}$ humano reordenado, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante κ endógeno del ratón y donde el ratón carece de un locus de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que sea capaz de reordenar y formar un gen que codifique una región variable κ ; y,

(b) una sustitución de 90-100% del locus del gen endógeno del ratón de la región variable de cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno del ratón constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenar y formar un gen quimérico humano/ratón de cadena pesada reordenado.

2. El ratón de la reivindicación 1, donde:

(a) el ratón comprende además un amplificador intrónico κ de ratón 5' respecto a la región constante de cadena ligera del ratón; o

(b) el ratón comprende además un amplificador κ de ratón 3'

3. El ratón de la reivindicación 2, donde:

(a) la pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada comprende un segmento que se selecciona de entre el grupo que consiste en los segmentos genéticos humanos de la región variable de inmunoglobulina 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, y una combinación de los mismos;

(b) la pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada comprende un segmento que se selecciona de entre el grupo que consisten en los segmentos genéticos D1-7, D1-26, D3-3, D3-10, D3-16, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, y D7-27, y una combinación de los mismos;

(c) el ratón comprende una célula B que comprende una secuencia genética de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina reordenada que comprende un gen humano de la región variable de cadena pesada derivado de un segmento genético VH que se selecciona de entre el grupo que consiste en VH2-5, VH3-23, VH3-30, VH4-39, VH4-59, y VH5-51, y se derivan de un segmento genético D que se selecciona de entre el grupo que consiste en D1-7, D1-26, D3-3, D3-16, D3-10, D3-22, D5-5, D5-12, D6-6, D6-13, y D7-27; o

(d) el ratón comprende una célula B que comprende una secuencia genética de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina reordenada que comprende un segmento genético VH, JH y DH que se selecciona de entre el grupo que consiste en VH 2-5 + JH 1 + D6-6, VH3-23 + JH4 + D3, VH3-23 + JH4 + D3-10, VH3-30 + JH 1 + D6-6, VH3-30 + JH3 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D1 -7, VH3-30 + JH4 + D5-12, VH3-30 + JH4 + D6-13, VH3-30 + JH4 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D7-27, VH3-30 + JH5 + D3-22, VH3-30 + JH5 + D6-6, VH3-30 + JH5 + D7-27, VH4-39 + JH3 + D1 -26, VH4- 59 + JH3 + D3-16, VH4-59 + JH3 + D3-22, VH4-59 + JH4 + D3-16, VH5-51 + JH3 + D5-5, VH5-51 + JH5 + D6-13, y VH5-51 + JH6 + D3-16.

4. El ratón de la reivindicación 1, donde:

(a) el segmento genético $V_{\kappa 1-39}$ está presente en un reordenamiento con un segmento genético $J_{\kappa 5}$; o

(b) el segmento genético $V_{\kappa 3-20}$ está presente en un reordenamiento con un segmento genético $J_{\kappa 1}$.

5. Una célula aislada de un ratón modificado genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la célula comprende:

(a) una sustitución en el locus endógeno del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de los segmentos genéticos endógenos del ratón de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina con un único segmento genético $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa 5}$ humano reordenado o un único segmento genético $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa}$ humano reordenado, donde el segmento genético humano está unido operativamente a un gen constante κ endógeno del ratón y donde el ratón carece de un locus de la región variable de cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón que sea capaz de reordenar y formar un gen que codifique una región variable κ ; y,

(b) una sustitución de 90-100% del locus del gen endógeno del ratón de la región variable de cadena pesada con una pluralidad de segmentos genéticos humanos de la región variable de la cadena pesada, donde los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada están unidos operativamente a un gen endógeno del ratón constante de cadena pesada, y los segmentos genéticos humanos de la región variable de cadena pesada son capaces de reordenar y formar un gen quimérico humano/ratón de cadena pesada reordenado.

6. Un método no terapéutico para producir un anticuerpo que se une a un antígeno de interés que comprende inmunizar un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con un antígeno de interés, obtener una secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina del ratón y emplear la secuencia genética de la región variable de inmunoglobulina para producir un anticuerpo que se une al antígeno.

7. El método de la reivindicación 6 que comprende además:

- expresar en una sola célula: (a) una primera secuencia genética de la región variable de cadena pesada (V_H) de acuerdo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 del ratón que se ha inmunizado, donde la secuencia genética V_H se fusiona con una secuencia genética humana región constante de cadena pesada (C_H); y (b) una secuencia genética de la región variable de cadena ligera (V_L) del ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se ha inmunizado, donde la secuencia genética V_L se fusiona con una secuencia genética humana de la región constante de la cadena ligera (C_L);
- mantener la célula bajo condiciones suficientes para expresar un anticuerpo completamente humano; y
- aislar el anticuerpo.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la célula comprende una segunda secuencia genética V_H de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se ha inmunizado, donde la secuencia V_H se fusiona con una secuencia genética C_H humana, donde la primera secuencia genética V_H codifica un dominio V_H que reconoce un primer epítipo, y la segunda secuencia genética V_H codifica un dominio V_H que reconoce un segundo epítipo, donde el primer epítipo y el segundo epítipo no son idénticos.

9. Un método no terapéutico para producir un anticuerpo biespecífico humano, donde el método comprende inmunizar un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y produciendo el anticuerpo específico utilizando secuencias genéticas de la región variable humana de células B del ratón.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde el método comprende:

- (a) identificar un linfocito seleccionado por clonación del ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el ratón se ha inmunizado y se le ha permitido desarrollar una respuesta inmunitaria a un antígeno de interés, donde el linfocito expresa un anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés;
- (b) obtener del linfocito o el anticuerpo una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada humana del anticuerpo que se une específicamente al antígeno de interés; y
- (c) emplear la secuencia de nucleótidos de (b) para producir un anticuerpo biespecífico.

11. El método de la reivindicación 10, donde las etapas (a) a (c) se llevan a cabo una primera vez para un primer antígeno de interés para generar una primera secuencia de región variable de cadena pesada humana, y las etapas (a) a (c) se llevan a cabo una segunda vez para un segundo antígeno para generar una segunda secuencia de la región variable de cadena pesada humana, y donde la primera secuencia de región variable de cadena pesada humana se expresa fusionada con una primera región constante de cadena pesada humana para formar una primera cadena pesada humana, la segunda secuencia de región variable de cadena pesada humana se expresa fusionada con una segunda región constante de cadena pesada humana para formar una segunda cadena pesada humana, donde la primera y segunda cadenas pesadas humanas se expresan en presencia de una única cadena ligera humana que se expresa a partir de un segmento genético $V_{\kappa 1-39}$ o $V_{\kappa 3-20}$.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde el método comprende:

(a) clonar las secuencias de la región variable de la cadena pesada de células B de:

- el ratón de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 4 que se han inmunizado con un primer antígeno de interés; y
- el mismo ratón, o un ratón diferente que es genéticamente el mismo, que se ha inmunizado con un segundo antígeno de interés

(b) expresar en una célula las secuencias de la región variable de cadena pesada humana de (a) con la misma región constante de cadena pesada y la misma cadena ligera para producir un anticuerpo biespecífico.

13. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde la primera cadena pesada humana comprende una modificación que elimina o reduce sustancialmente la afinidad de la primera cadena pesada humana a la proteína A, y una segunda cadena pesada humana que mantiene la capacidad de unirse a la proteína A, donde la modificación que elimina o reduce sustancialmente la afinidad de la primera cadena pesada humana a la proteína A se selecciona de entre una 95R (EU 435R), una 96F (EU 436F), y una combinación de las mismas.

14. El uso de un ratón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para seleccionar un dominio o segmento genético variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana.

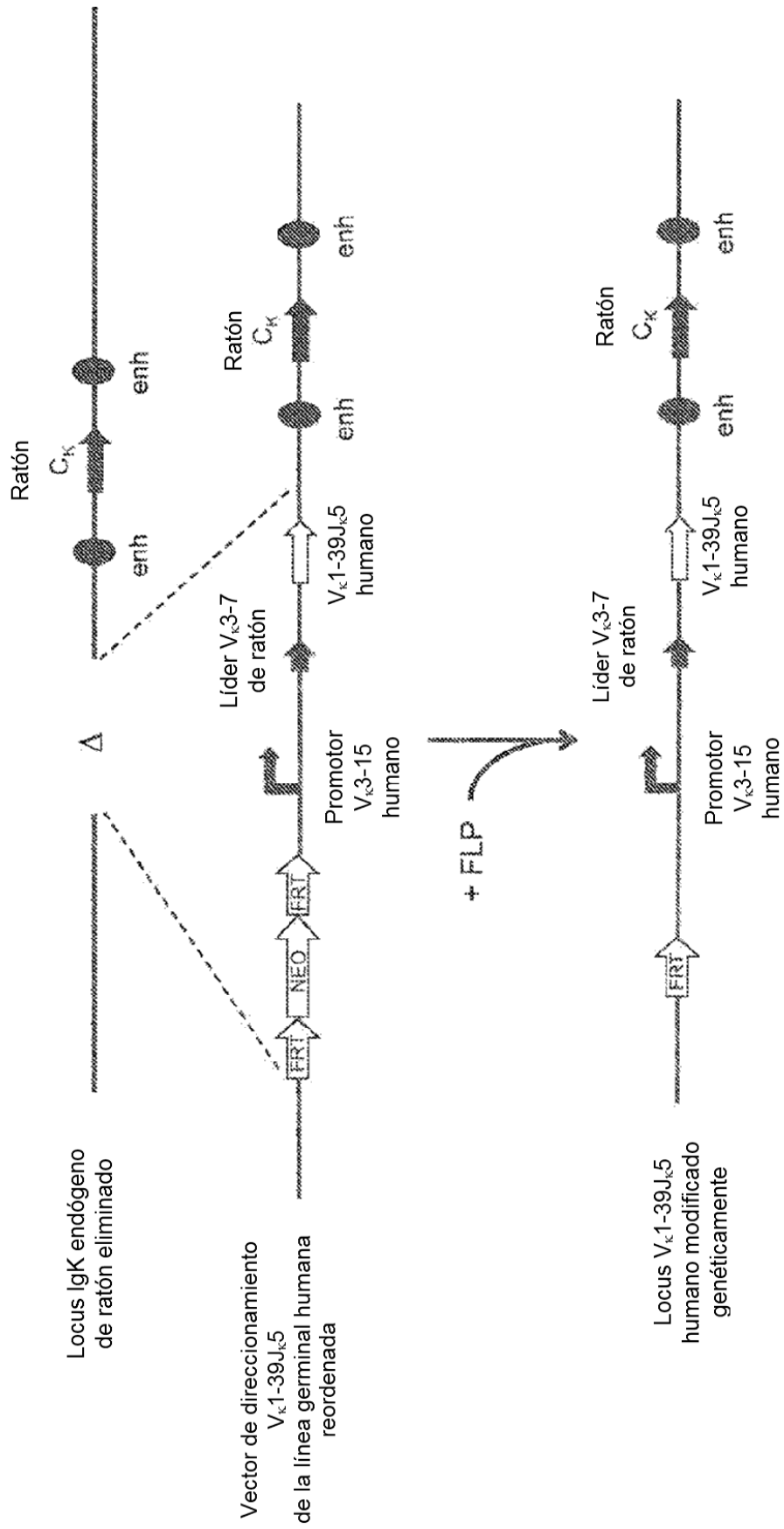


Figura 1

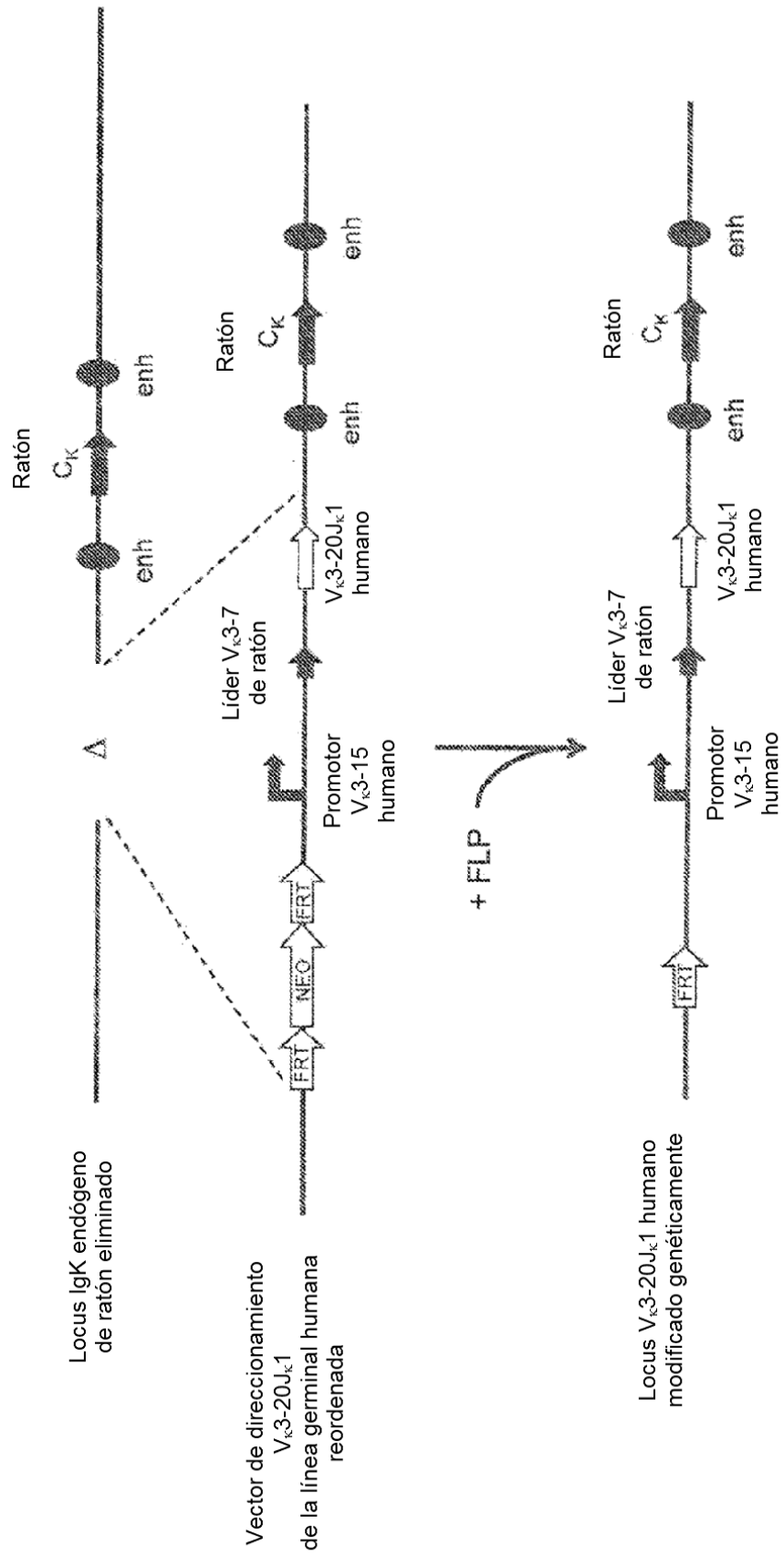


Figura 2

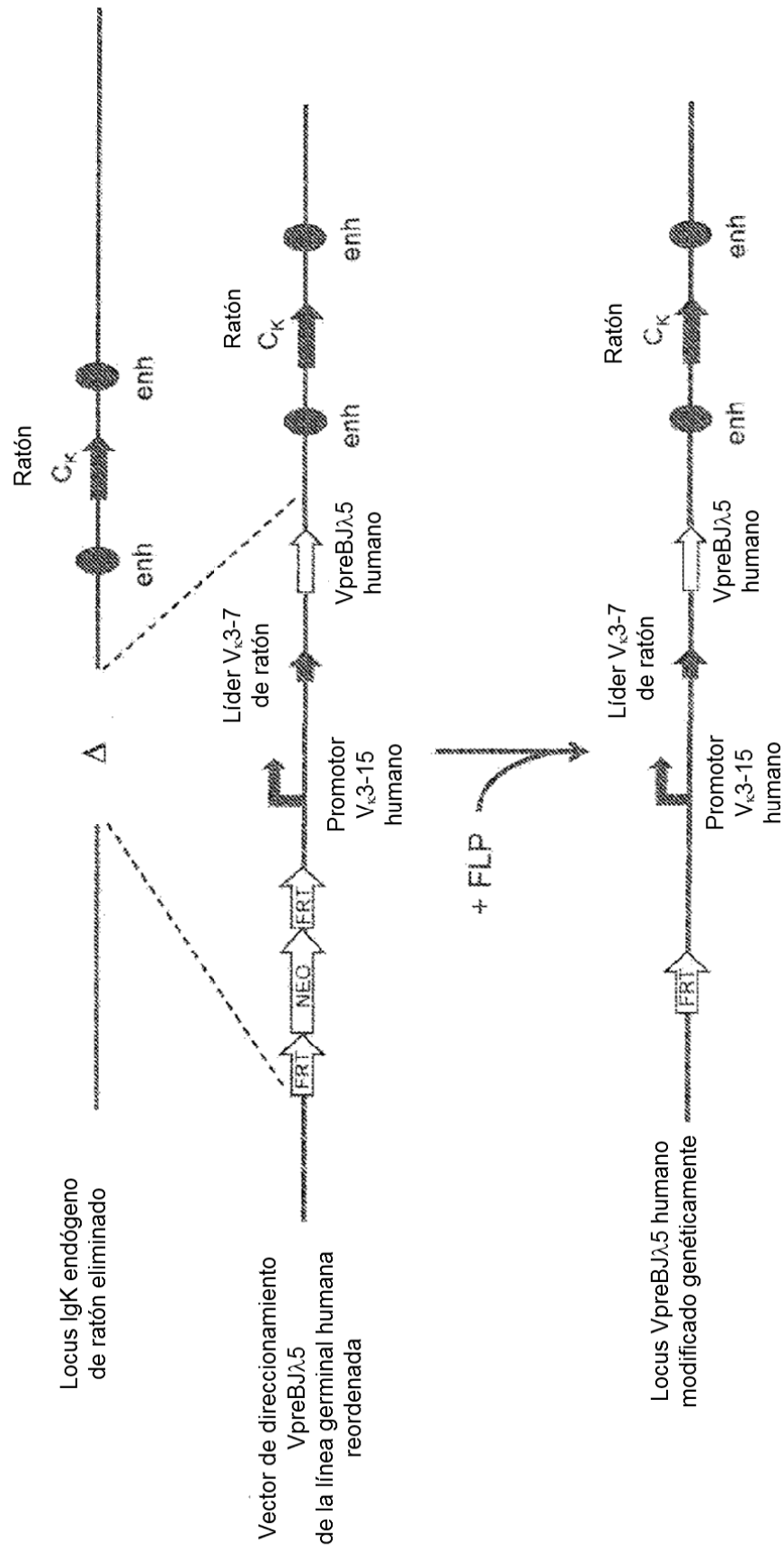


Figura 3