

ANIMALI NON UMANI ESPRIMENTI ANTICORPI AVENTI UNA CATENA LEGGERA COMUNE

DESCRIZIONE

CAMPO DI APPLICAZIONE DELL'INVENZIONE

5 [001] Si fornisce un topo modificato geneticamente che esprime anticorpi aventi una catena leggera variabile umana/costante di topo comune associata con varie catene pesanti variabili umane/costanti di topo. Si fornisce un metodo per la produzione di un anticorpo bispecifico umano partendo da sequenze geniche di regione variabile umana di linfociti B del topo.

10 **STATO DELLA TECNICA PRECEDENTE**

[002] Tipicamente gli anticorpi comprendono una componente di catena pesante omodimerica, in cui ciascun monomero di catena pesante è associato con una catena leggera identica. Anticorpi aventi una componente di catena pesante eterodimerica (per esempio anticorpi bispecifici) sono auspicabili come anticorpi terapeutici. Tuttavia la
15 produzione di anticorpi bispecifici aventi una componente di catena leggera adatta che possa associarsi in maniera soddisfacente con ciascuna delle catene pesanti di un anticorpo bispecifico si è dimostrata problematica.

[003] In un approccio si potrebbe selezionare una catena leggera mediante lo studio di statistica di utilizzo relativa a tutti i domini variabili di catena leggera, l'identificazione
20 della catena leggera impiegata più frequentemente negli anticorpi umani e l'appaiamento di quella catena leggera *in vitro* con le due catene pesanti di specificità diversa.

[004] In un altro approccio si potrebbe selezionare una catena leggera mediante l'osservazione di sequenze di catena leggera in una libreria di clonaggio ed espressione di geni esogeni in vettori batteriofagici (*phage display* – espressione fagica) (per esempio una

libreria di espressione fagica comprendente sequenze di regione variabile di catena leggera umana, per esempio una libreria di scFv umani) e la selezione della regione variabile di catena leggera impiegata più diffusamente dalla libreria. Si può poi testare la catena leggera sulle due diverse catene pesanti di interesse.

5 **[005]** In un altro approccio si potrebbe selezionare una catena leggera mediante l'analisi di una libreria di espressione fagica di sequenze variabili di catena leggera impiegando le sequenze variabili di catena pesante di entrambe le catene pesanti di interesse come sonde. Si potrebbe selezionare una catena leggera che si associa con entrambe le sequenze variabili di catena pesante come catena leggera per le catene pesanti.

10 **[006]** In un altro approccio si potrebbe allineare una catena leggera candidata con le catene leggere affini a catene pesanti e si apportano modificazioni alla catena leggera perché si appai più strettamente alle caratteristiche di sequenza comuni alle catene leggere affini di entrambe le catene pesanti. Se è necessario far diminuire al minimo le probabilità di immunogenicità, preferibilmente le modificazioni si traducono in sequenze che sono
15 presenti in sequenze di catena leggera umana note, cosicché è improbabile che la trasformazione proteolitica generi un epitopo per linfocita T in base a parametri e a metodi noti nel settore per valutare la probabilità di immunogenicità (per esempio analisi mediante simulazione di elaboratore e per via umida).

[007] La totalità degli approcci di cui sopra si basa su metodi in vitro che, a priori,
20 comprendono un certo numero di vincoli, per esempio l'identità di sequenza, l'idoneità ad associarsi con specifiche catene pesanti selezionate in precedenza e così via. Vi è la necessità nel settore di disporre di composizioni e di metodi che non dipendano dalla manipolazione di condizioni in vitro ma che, invece, adottino approcci più razionali

biologicamente alla produzione di proteine di legame a epitopo umane che comprendano una catena leggera comune.

ESPOSIZIONE SINTETICA

[008] Si forniscono topi modificati geneticamente che esprimono domini variabili di
5 catena pesante e leggera di immunoglobulina umana in cui i topi hanno un repertorio di
variabili di catena leggera limitato. In particolare si fornisce un topo modificato
geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena
leggera (V_L) umana ricavato da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata che è presente
nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico $V\kappa$ di
10 immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un segmento genico $J\kappa$ di immunoglobulina
endogeno non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) V_L umano è associato con un
dominio variabile di catena pesante umana (V_H) ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana
riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-
1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. Si fornisce anche l'uso
15 di un tale topo nella produzione di un anticorpo comprendente un dominio variabile di
catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra
2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-
5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4 associata con una regione variabile di catena
leggera umana derivata da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata. Si fornisce inoltre
20 un metodo di produzione di un anticorpo diretto a un antigene di interesse comprendente
un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana
riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-
1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4 associata con una
regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana

riarrangiata, il metodo comprendente: (a) l'immunizzazione del topo dotato di un antigene di interesse; (b) l'ottenimento dal topo di un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4; e (c) l'impiego della sequenza di regione variabile di immunoglobulina ottenuta al punto (b) associata con detta regione variabile di catena leggera umana in un anticorpo che si lega specificamente all'antigene di interesse.

Si fornisce anche un topo modificato geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena leggera (V_L) umana ricavato da una sequenza $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico V_{κ} endogeno di immunoglobulina non riarrangiato e un segmento genico J_{κ} endogeno di immunoglobulina non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) V_L è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 oppure 3-53/1-1/4. Si fornisce inoltre l'uso di un tale topo fornito nella produzione di un anticorpo comprendente un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 oppure 3-53/1-1/4. Si fornisce anche l'uso di un tale topo fornito nella produzione di un anticorpo comprendente un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 oppure 3-53/1-1/4 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}$ umana riarrangiata. Si fornisce anche un metodo di produzione di un anticorpo diretto a un antigene di interesse comprendente un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3,

3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 oppure 3-53/1-1/4 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}$ umana riarrangiata, il metodo comprendente: (a) l'immunizzazione del topo dotato di un antigene di interesse; (b) l'ottenimento dal topo di un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 oppure
5 3-53/1-1/4; e (c) l'impiego della sequenza di regione variabile di immunoglobulina ottenuta al punto (b) associata con detta regione variabile di catena leggera umana in un anticorpo che si lega specificamente all'antigene di interesse.

Ci si riferisce anche a un sistema biologico per la generazione di un dominio
10 variabile di catena leggera umana che si associa ed esprime con un repertorio variegato di domini variabili di catena pesante umana maturati per affinità. Ci si riferisce anche a metodi per la produzione di proteine di legame comprendenti domini variabili di immunoglobulina, comprendenti l'immunizzazione di topi che hanno un repertorio di catene leggere di immunoglobulina limitato con un antigene di interesse e l'impiego di una
15 sequenza genica di regione variabile di immunoglobulina del topo in una proteina di legame che si lega specificamente all'antigene di interesse. I metodi comprendono metodi per la produzione di domini variabili di catena pesante umana di immunoglobulina adatti all'uso nella produzione di proteine di legame ad antigeni polispecifiche.

[009] I topi progettati geneticamente forniti possono selezionare adatti domini variabili
20 di catena pesante umana di immunoglobulina maturati per affinità ricavati da un repertorio di segmenti genici di regione variabile di catena pesante umana non riarrangiati, in cui domini variabili di catena pesante umana maturati per affinità si associano ed esprimono con un singolo dominio variabile di catena leggera umana ricavato da un segmento genico di regione variabile di catena leggera umana. Si forniscono anche topi progettati

geneticamente che presentano una scelta di due segmenti genici di regione variabile di catena leggera umana.

[010] [Cancellato]

[011] Si forniscono topi progettati geneticamente che esprimono un repertorio di domini
5 variabili di catena leggera umana limitato o un singolo dominio variabile di catena leggera
umana da un repertorio limitato di sequenze di regione variabile di catena leggera umana. I
topi sono progettati geneticamente perché comprendano una singola sequenza di catena
leggera umana V/J (o due sequenze V/J) che esprimono una regione variabile di una
singola catena leggera (o che esprimono l'una o l'altra o l'una e l'altra di due regioni
10 variabili). Le sequenze riarrangiate sono una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata, una
 $V\kappa 3-20/J\kappa$ umana riarrangiata o entrambe. Una catena leggera comprendente la sequenza
variabile è idonea ad appaiarsi con una molteplicità di catene pesanti umane maturate per
affinità scelte mediante clonaggio dal topo, in cui le regioni variabili di catena pesante si
legano specificamente a epitopi diversi.

[012] Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente che comprende un
15 singolo segmento genico di regione variabile di catena leggera (V_L) umana di
immunoglobulina che è idoneo a riarrangiarsi con un segmento genico J umano (scelto fra
uno o una molteplicità di segmenti J_L) e a codificare un dominio V_L umano di una catena
leggera di immunoglobulina. In un certo altro caso il topo non comprende più di due
20 segmenti genici V_L umani, ognuno dei quali è idoneo a riarrangiarsi con un segmento
genico J umano (scelto fra uno o una molteplicità di segmenti J_L) e a codificare un dominio
 V_L umano di una catena leggera di immunoglobulina.

[013] In un certo caso il singolo segmento genico V_L umano è unito funzionalmente a
un segmento genico J_L umano scelto fra $J\kappa 1$, $J\kappa 2$, $J\kappa 3$, $J\kappa 4$ e $J\kappa 5$ in cui il singolo segmento

genico V_L umano è idoneo a riarrangiarsi per la formazione di una sequenza codificante un gene di regione variabile di catena leggera con uno o più qualsiasi degli uno o più segmenti genici J_L umani.

[014] Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente che comprende un locus di catena leggera di immunoglobulina che non comprende un segmento genico V_L di topo endogeno che è idoneo a riarrangiarsi per la formazione di un gene di catena leggera di immunoglobulina in cui il locus V_L comprende un singolo segmento genico V_L umano che è idoneo a riarrangiarsi per codificare una regione V_L di un gene di catena leggera. In un caso particolare il segmento genico V_L umano è un segmento genico $V\kappa 1-39J\kappa 5$ umano o un segmento genico $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ umano. Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente comprendente un locus V_L che non comprende un segmento genico V_L di topo endogeno che è idoneo a riarrangiarsi per la formazione di un gene di catena leggera di immunoglobulina in cui il locus V_L non comprende più di due segmenti genici V_L umani che sono idonei a riarrangiarsi per codificare una regione V_L di un gene di catena leggera. In un caso particolare i non più di 2 segmenti genici V_L umani sono un segmento genico $V\kappa 1-39J\kappa$ umano e un segmento genico $V\kappa 3-20J\kappa$ umano.

[015] Sotto un certo aspetto il topo modificato geneticamente fornito comprende una singola regione variabile di catena leggera (V_L) umana di immunoglobulina (V/J) riarrangiata (per esempio una regione V_L/J_L) che codifica un dominio V_L umano di una catena leggera di immunoglobulina. Sotto un certo altro aspetto il topo non comprende più di due regioni V_L umane riarrangiate che sono idonee a codificare un dominio V_L umano di una catena leggera di immunoglobulina. Le sequenze riarrangiate sono una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ umana riarrangiata, una $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ umana riarrangiata o entrambe.

[016] La regione V_L è una sequenza $V_{\kappa 1-39J_{\kappa}}$ umana o una sequenza $V_{\kappa 3-20J_{\kappa}}$ umana. In una forma di realizzazione, il segmento J_L umano della sequenza V_L/J_L riarrangiata è scelto fra $J_{\kappa 1}$, $J_{\kappa 2}$, $J_{\kappa 3}$, $J_{\kappa 4}$, e $J_{\kappa 5}$. In un particolare esempio di realizzazione la regione V_L è una sequenza $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ umana o una sequenza $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ umana. In un particolare
 5 esempio di realizzazione il topo ha entrambe una sequenza $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ umana e una sequenza $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ umana.

[017] In un certo esempio di realizzazione il segmento genico V_L umano è unito funzionalmente a una sequenza veloce umana o di topo. In un particolare esempio di realizzazione la sequenza veloce è una sequenza veloce di topo. In un particolare esempio
 10 di realizzazione la sequenza veloce di topo è una sequenza veloce $V_{\kappa 3-7}$ di topo. In un particolare esempio di realizzazione la sequenza veloce è unita funzionalmente alla sequenza V_L/J_L umana riarrangiata.

[018] In un esempio di realizzazione il segmento genico V_L è unito funzionalmente a una sequenza di promotore di immunoglobulina. In un esempio di realizzazione la
 15 sequenza di promotore è una sequenza di promotore umano. In un particolare esempio di realizzazione il promotore di immunoglobulina umana è un promotore $V_{\kappa 3-15}$ umano. In un particolare esempio di realizzazione il promotore è unito funzionalmente alla sequenza V_L/J_L umana riarrangiata.

[019] Ci si riferisce anche a un locus di catena leggera che comprende una sequenza
 20 veloce fiancheggiata al 5' (rispetto alla direzione di trascrizione di un segmento genico V_L) da un promotore di immunoglobulina umana e fiancheggiata al 3' da un segmento genico V_L umano che si riarrangia con un segmento J umano e codifica un dominio V_L di una catena leggera chimerica inversa comprendente una regione costante di catena leggera (C_L)

di topo endogena. In un particolare esempio di realizzazione il segmento genico V_L è in corrispondenza del locus V_K di topo e la C_L di topo è una C_K di topo.

[020] In un esempio di realizzazione il locus di catena leggera comprende una sequenza veloce fiancheggiata al 5' (rispetto alla direzione di trascrizione di un segmento genico V_L) da un promotore di immunoglobulina umana e fiancheggiata al 3' da una regione V_L umana riarrangiata (sequenza V_L/J_L) e codifica un dominio V_L di una catena leggera chimerica inversa comprendente una regione costante di catena leggera (C_L) di topo endogena. In un particolare esempio di realizzazione la sequenza V_L/J_L umana riarrangiata è in corrispondenza del locus kappa (κ) di topo e la C_L di topo è una C_K di topo.

10 [021] In un esempio di realizzazione il locus V_L del topo modificato è un locus di catena leggera κ e il locus di catena leggera κ comprende un potenziatore intronico di κ di topo, un potenziatore al 3' di κ di topo o sia un potenziatore intronico, sia un potenziatore al 3'.

[022] In un esempio di realizzazione il topo comprende un locus di catena leggera lambda (λ) di immunoglobulina non funzionale. In un particolare esempio di realizzazione 15 il locus di catena leggera λ comprende una delezione di una o più sequenze del locus, in cui la una o più delezioni rendono il locus di catena leggera λ inadatto a riarrangiarsi per formare un gene di catena leggera. In un altro esempio di realizzazione tutti o sostanzialmente la totalità dei segmenti genici V_L del locus di catena leggera λ è delezionata.

20 [023] In un certo esempio di realizzazione il topo produce una catena leggera che comprende un dominio V_L mutato somaticamente ricavato dal segmento genico V_L umano. In un esempio di realizzazione la catena leggera comprende un dominio V_L mutato somaticamente ricavato dal segmento genico V_L umano e una regione C_K di topo. In un esempio di realizzazione il topo non esprime una catena leggera λ .

[024] In un esempio di realizzazione il topo modificato geneticamente è idoneo all'ipermutazione somatica della sequenza di regione V_L umana.

[025] In un esempio di realizzazione il topo comprende una cellula che esprime una catena leggera comprendente un dominio V_L umano mutato somaticamente unito a una C_K di topo, in cui la catena leggera si associa con una catena pesante comprendente un dominio V_H mutato somaticamente ricavato da un segmento genico V_H umano e in cui la catena pesante comprende una regione costante di catena pesante (C_H) di topo. In un particolare esempio di realizzazione la catena pesante comprende una C_{H1} di topo, una cerniera di topo, una C_{H2} di topo e una C_{H3} di topo. In un particolare esempio di realizzazione la catena pesante comprende una C_{H1} umana, una cerniera, una C_{H2} di topo e una C_{H3} di topo.

[026] In un esempio di realizzazione il topo comprende una sostituzione di segmenti genici V_H di topo endogeni con uno o più segmenti genici V_H umani, in cui i segmenti genici V_H umani sono uniti funzionalmente a un gene di regione C_H di topo sicché il topo riarrangi i segmenti genici V_H umani ed esprima una catena pesante di immunoglobulina chimerica inversa che comprende un dominio V_H umano e uno C_H di topo. In un esempio di realizzazione il 90-100% dei segmenti genici V_H di topo non riarrangiati è sostituito con almeno un segmento genico V_H umano non riarrangiato. In un particolare esempio di realizzazione tutti o sostanzialmente la totalità dei segmenti genici V_H di topo endogeni è sostituita con almeno un segmento genico V_H umano non riarrangiato. In un esempio di realizzazione la sostituzione è con almeno 19, almeno 39 o almeno 80 od 81 segmenti genici V_H umani non riarrangiati. In un esempio di realizzazione la sostituzione è con almeno 12 segmenti genici V_H umani non riarrangiati funzionali, almeno 25 segmenti genici V_H umani non riarrangiati funzionali o almeno 43 segmenti genici V_H umani non

riarrangiati funzionali. In un esempio di realizzazione il topo comprende una sostituzione di tutti i segmenti D_H e J_H di topo almeno con un segmento D_H umano non riarrangiato e almeno con un segmento J_H umano non riarrangiato. In un esempio di realizzazione l' almeno un segmento D_H umano non riarrangiato è scelto fra 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, 7-27 e una combinazione di questi. In un esempio di realizzazione l' almeno un segmento J_H umano non riarrangiato è scelto fra 1, 2, 3, 4, 5, 6 e una combinazione di questi. In un particolare esempio di realizzazione l' uno o più segmenti genici V_H umani sono scelti fra 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento genico V_H umano 6-1 e una combinazione di questi.

[027] Si fornisce un topo modificato geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena leggera (V_L) umana ricavato da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico $V\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un segmento genico $J\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) V_L umano è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana scelto fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. Si fornisce anche un topo modificato geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio V_L umano ricavato da una sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico $V\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un segmento genico $J\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) V_L umano è

associato con un dominio V_H umano ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

[27a] Ci si riferisce anche a un topo che comprende un linfocita B che esprime una proteina di legame che si lega specificamente a un antigene di interesse, in cui la proteina di legame comprende una catena leggera ricavata da un riarrangiamento di $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ umana o un riarrangiamento di $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ umana e in cui la cellula comprende un gene di catena pesante di immunoglobulina riarrangiata ricavato da un riarrangiamento di segmenti genici V_H umani scelti fra un segmento genico 1-69, 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 3-33, 3-53, 4-39, 4-59 e 5-51. In un certo caso l'uno o i più segmenti genici V_H umani sono riarrangiati con un segmento genico J_H di catena pesante umana scelto fra 1, 2, 3, 4, 5, e 6. In un certo caso l'uno o i più segmenti genici V_H e J_H umani sono riarrangiati con un segmento genico D_H umano scelto fra 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13 e 7-27. In un caso particolare il gene di catena leggera ha 1, 2, 3, 4 o 5 o più ipermutazioni somatiche.

[028] In un esempio di realizzazione il topo comprende un linfocita B che comprende una sequenza genica di regione variabile di catena pesante di immunoglobulina riarrangiata comprendente una regione $V_H/D_H/J_H$ scelta fra 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/3, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3-30/5-12/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7-27/5, 3-30/7-27/6, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, 4-39/1-26/3, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4, 4-59/3-22/3, 5-51/3-16/6, 5-51/5-5/3, 5-51/6-13/5, 3-53/1-1/4, 1-69/6-6/5 e 1-69/6-13/4. In un particolare esempio di realizzazione il linfocita B esprime una proteina di legame comprendente una regione variabile di catena pesante di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena pesante di topo e una

regione variabile di catena leggera di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena leggera di topo. In un esempio di realizzazione la regione V_L umana riarrangiata è una sequenza $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ umana e il topo esprime una catena leggera chimerica inversa comprendente (i) un dominio V_L ricavato dalla sequenza V_L/J_L umana e

5 (ii) una C_L di topo; in cui la catena leggera è associata con una catena pesante chimerica inversa comprendente (i) una C_H di topo e (ii) un dominio V_H umano mutato somaticamente ricavato da un segmento genico V_H umano scelto fra 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento genico V_H umano 6-1 e una combinazione di questi. In un esempio di

10 realizzazione il topo esprime una catena leggera che è mutata somaticamente. In un esempio di realizzazione la C_L è una C_{κ} di topo. In un particolare esempio di realizzazione il segmento genico V_H umano è scelto fra 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 4-59, 5-51 e un segmento genico 1-69. In un particolare esempio di realizzazione il dominio V_H umano mutato somaticamente comprende una sequenza ricavata da un segmento D_H scelto fra 1-1, 1-7, 2-

15 8, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13 e 7-27. In un particolare esempio di realizzazione il dominio V_H umano mutato somaticamente comprende una sequenza ricavata da un segmento J_H scelto fra 1, 2, 3, 4, 5 e 6. In un particolare esempio di realizzazione il dominio V_H umano mutato somaticamente è codificato da una sequenza

20 $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3-30/5-12/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7-27/5, 3-30/7-27/6, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4, 4-59/3-22/3, 5-51/5-5/3, 1-69/6-6/5 e 1-69/6-13/4.

[029] In un esempio di realizzazione il topo comprende un linfocita B che esprime una proteina di legame che si lega specificamente a un antigene di interesse, in cui la proteina di legame comprende una catena leggera ricavata da un riarrangiamento $V_{\kappa 1-39/J_{\kappa 5}}$ umano e in cui la cellula comprende una sequenza genica di regione variabile di catena pesante di immunoglobulina riarrangiata comprendente una regione $V_H/D_H/J_H$ scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 e 1-69/6-13/4. In un particolare esempio di realizzazione il linfocita B esprime una proteina di legame comprendente una regione variabile di catena pesante di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena pesante di topo e una regione variabile di catena leggera di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena leggera di topo.

[030] In un esempio di realizzazione la regione V_L umana riarrangiata è una sequenza $V_{\kappa 3-20/J_{\kappa 1}}$ umana e il topo esprime una catena leggera chimerica inversa comprendente (i) un dominio V_L ricavato dalla sequenza V_L/J_L umana riarrangiata e (ii) un C_L di topo; in cui la catena leggera è associata con una catena pesante chimerica inversa comprendente (i) un C_H di topo e (ii) un V_H umano mutato somaticamente ricavato da un segmento genico V_H umano scelto fra 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento genico V_H umano 6-1 e una combinazione di questi. In un esempio di realizzazione il topo esprime una catena leggera che è mutata somaticamente. In un esempio di realizzazione il C_L è un C_K di topo. In un particolare esempio di realizzazione il segmento genico V_H umano è scelto fra 3-30, 3-33, 3-53, 4-39 e un segmento genico 5-51. In un particolare esempio di realizzazione il dominio V_H umano mutato somaticamente comprende una sequenza ricavata da un segmento D_H scelto fra 1-1, 1-7, 1-26, 2-15, 3-3, 3-16 e 6-13. In un particolare esempio di

realizzazione il dominio V_H umano mutato somaticamente comprende una sequenza ricavata da un segmento J_H scelto fra 3, 4, 5 e 6. In un particolare esempio di realizzazione il dominio V_H umano mutato somaticamente è codificato da una sequenza $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, 4-39/1-26/3, 5-51/3-16/6, 5-51/6-13/5 e 3-53/1-1/4.

[031] In un esempio di realizzazione il topo comprende un linfocita B che esprime una proteina di legame che si lega specificamente a un antigene di interesse, in cui la proteina di legame comprende una catena leggera ricavata da un riarrangiamento $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}1$ umano e in cui la cellula comprende una sequenza genica di regione variabile di catena pesante di immunoglobulina riarrangiata comprendente una regione $V_H/D_H/J_H$ scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, e 3-53/1-1/4. In un particolare esempio di realizzazione il linfocita B esprime una proteina di legame comprendente una regione variabile di catena pesante di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena pesante di topo e una regione variabile di catena leggera di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena leggera di topo.

[032] In un esempio di realizzazione il topo comprende sia una sequenza $V_{\kappa}1-39/J_{\kappa}5$ umana riarrangiata, sia una sequenza $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}1$ umana riarrangiata e il topo esprime una catena leggera chimerica inversa comprendente (i) un dominio V_L ricavato dalla sequenza $V_{\kappa}1-39/J_{\kappa}5$ umana o la sequenza $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}1$ umana e (ii) un C_L di topo; in cui la catena leggera è associata con una catena pesante chimerica inversa comprendente (i) un C_H di topo; e (ii) un V_H umano mutato somaticamente ricavato da un segmento genico V_H umano scelto fra un 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, un segmento genico V_H umano 6-1 e una combinazione di

questi. In un esempio di realizzazione il topo esprime una catena leggera che è mutata somaticamente. In un esempio di realizzazione il C_L è un C_K di topo.

[033] In vari esempi di realizzazione la regione variabile di catena pesante di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena pesante di topo e la
 5 regione variabile di catena leggera di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di catena leggera di topo espresse dal linfocita B sono affini nel topo. In svariati esempi di realizzazione la catena leggera chimerica e la catena leggera pesante chimerica espresse dal topo sono affini nel topo.

[034] In un esempio di realizzazione il 90-100% dei segmenti genici V_H non riarrangiati
 10 endogeni di topo è sostituito almeno con un segmento genico V_H umano non riarrangiato. In un particolare esempio di realizzazione tutti o sostanzialmente la totalità dei segmenti genici V_H di topo non riarrangiati endogeni è sostituita almeno con un segmento genico V_H umano non riarrangiato. In un esempio di realizzazione la sostituzione è con almeno 18, almeno 39, almeno 80 od 81 segmenti genici V_H umani non riarrangiati. In un esempio di
 15 realizzazione la sostituzione è con almeno 12 segmenti genici V_H umani non riarrangiati funzionali, con almeno 25 segmenti genici V_H umani non riarrangiati funzionali o con almeno 43 segmenti genici V_H umani non riarrangiati.

[035] In un esempio di realizzazione il topo modificato geneticamente è un ceppo C57BL, in un particolare esempio di realizzazione scelto fra C57BL/A, C57BL/An,
 20 C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola. In un particolare esempio di realizzazione il topo modificato geneticamente è una miscela di un ceppo 129 citato sopra e un ceppo C57BL/6 citato sopra. In un altro particolare esempio di realizzazione il topo è una miscela di ceppi 129 citati sopra o una miscela di ceppi BL/6 citati sopra. In un

particolare esempio di realizzazione il ceppo 129 della miscela è un ceppo 129S6 (129/SvEvTac).

[036] In un esempio di realizzazione il topo esprime un anticorpo chimerico inverso comprendente una catena leggera che comprende un C κ di topo e un dominio V_L umano mutato somaticamente ricavato da una sequenza V κ 1-39J κ 5 umana riarrangiata o una sequenza V κ 3-20J κ 1 umana riarrangiata e una catena pesante che comprende un C_H di topo e un dominio V_H umano mutato somaticamente ricavato da un segmento genico V_H umano scelto fra un 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5- 51 e un segmento genico V_H umano 6-1, in cui il topo non esprime un anticorpo interamente di topo e non esprime un anticorpo interamente umano. In un esempio di realizzazione il topo comprende un locus di catena leggera κ che comprende una sostituzione di segmenti genici di catena leggera κ di topo endogeni con la sequenza V κ 1-39J κ 5 umana riarrangiata o la sequenza V κ 3-20J κ 1 umana riarrangiata e comprende una sostituzione di tutti o sostanzialmente di tutti i segmenti genici V_H di topo endogeni con un repertorio completo o sostanzialmente completo di segmenti genici V_H umani.

[037] Ci si riferisce anche a un topo che esprime una catena leggera di immunoglobulina da una sequenza di catena leggera di immunoglobulina riarrangiata nella linea germinale del topo, in cui la catena leggera di immunoglobulina comprende una sequenza variabile umana.

[038] In un esempio di realizzazione alla linea germinale del topo manca un segmento genico V di catena leggera di immunoglobulina non riarrangiato funzionale. In un esempio di realizzazione alla linea germinale del topo manca un segmento genico J di catena leggera di immunoglobulina non riarrangiato funzionale.

[039] In un esempio di realizzazione la linea germinale del topo non comprende più di una, non più di due o non più di tre sequenze di catena leggera (V/J) riarrangiate.

[040] La sequenza di catena leggera κ è una sequenza di catena leggera κ umana. La sequenza di catena leggera κ è scelta fra una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa 1$ umana, una sequenza
 5 $V\kappa 3-20/J\kappa 5$ umana e una combinazione di queste. In un particolare esempio di realizzazione la sequenza di catena leggera κ è una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ umana. In un particolare esempio di realizzazione la sequenza di catena leggera κ è una sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ umana.

[041] In un esempio di realizzazione il topo comprende inoltre nella sua linea germinale
 10 una sequenza scelta fra un potenziatore intronico di κ di topo al 5' rispetto alla sequenza di catena leggera di immunoglobulina riarrangiata, un potenziatore al 3' di κ di topo e una combinazione di questi.

[042] In un esempio di realizzazione il topo comprende un segmento genico V_H umano non riarrangiato, un segmento genico D_H umano non riarrangiato e un segmento genico J_H
 15 umano non riarrangiato in cui i detti segmenti genici V_H , D_H e J_H sono idonei a riarrangiarsi per formare una sequenza genica variabile di catena pesante di immunoglobulina unita funzionalmente a una sequenza genica costante di catena pesante. Il topo comprende una molteplicità di segmenti genici V_H , D_H e J_H . In un esempio di realizzazione specifico i segmenti genici V_H , D_H e J_H sostituiscono i segmenti genici V_H ,
 20 D_H e J_H di topo endogeni in corrispondenza del locus endogeno di catena pesante di immunoglobulina di topo. In un particolare esempio di realizzazione il topo comprende una sostituzione di tutti o sostanzialmente di tutti i segmenti genici V_H , D_H e J_H di topo funzionali con tutti o sostanzialmente tutti i segmenti genici V_H , D_H e J_H umani funzionali.

[043] In un esempio di realizzazione il topo esprime una catena leggera di immunoglobulina che comprende una sequenza costante di topo. In un esempio di realizzazione il topo esprime una catena leggera di immunoglobulina che comprende una sequenza costante umana.

5 **[044]** In un esempio di realizzazione il topo esprime una catena pesante di immunoglobulina che comprende una sequenza di topo scelta fra una sequenza C_{H1} , una sequenza di cerniera, una sequenza di C_{H2} , una sequenza di C_{H3} e una combinazione di queste.

10 **[045]** In un esempio di realizzazione il topo esprime una catena pesante di immunoglobulina che comprende una sequenza umana scelta fra una sequenza di C_{H1} , una sequenza di cerniera, una sequenza di C_{H2} , una sequenza di C_{H3} e una combinazione di queste.

15 **[046]** In un esempio di realizzazione la sequenza di catena leggera di immunoglobulina riarrangiata nella linea germinale del topo è in corrispondenza di un locus endogeno di catena leggera di immunoglobulina di topo. In un particolare esempio di realizzazione la sequenza di catena leggera di immunoglobulina riarrangiata nella linea germinale del topo sostituisce tutte o sostanzialmente tutte le sequenze V e J di catena leggera di topo in corrispondenza del locus endogeno di catena leggera di immunoglobulina di topo.

20 **[047]** Ci si riferisce anche a una cellula di topo che è isolata da un topo come descritto qui. In un certo caso la cellula è una cellula ES. In un certo caso la cellula è un linfocita. In un certo caso il linfocita è un linfocita B. In un certo caso il linfocita B esprime una catena pesante chimerica comprendente un dominio variabile ricavato da un segmento genico umano; e una catena leggera ricavata da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata, una sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa$ umana riarrangiata o una combinazione di queste; in cui il dominio

variabile di catena pesante è fuso a una regione costante di topo e il dominio variabile di catena leggera è fuso a una regione costante di topo o umana.

[048] Ci si riferisce anche a un linfocita B di topo che è isolato da un topo come descritto qui, in cui il linfocita B esprime una catena pesante chimerica ricavata da una sequenza $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 e 1-69/6-13/4; e una catena leggera chimerica ricavata da una sequenza $V_{\kappa 1-39/J_{\kappa 5}}$ umana riarrangiata; in cui il dominio variabile è fuso a una regione costante di topo e il dominio variabile di catena leggera è fuso a una regione costante di topo.

[049] Ci si riferisce anche a un linfocita B di topo che è isolato da un topo come descritto qui, in cui il linfocita B esprime una catena pesante chimerica ricavata da una sequenza $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-1 5/4 e 3-53/1-1/4; e una catena leggera chimerica ricavata da una sequenza $V_{\kappa 3-20/J_{\kappa 1}}$ umana riarrangiata; in cui il dominio variabile è fuso a una regione costante di topo e il dominio variabile di catena leggera è fuso a una regione costante di topo.

[050] In vari casi le catene pesante e leggera chimeriche espresse dal linfocita B isolato da un topo come descritto qui sono affini nel topo.

[051] Ci si riferisce anche a un ibridoma in cui l'ibridoma è prodotto con un linfocita B di un topo come descritto qui. In un caso particolare il linfocita B proviene da un topo come descritto qui che si è immunizzato con un immunogeno comprendente un epitopo di interesse e il linfocita B esprime una proteina di legame che si lega all'epitopo di interesse, la proteina di legame ha un dominio V_H umano e un C_H di topo mutati somaticamente e ha un dominio V_L umano ricavato da una $V_{\kappa 1-39/J_{\kappa 5}}$ umana riarrangiata o una $V_{\kappa 3-20/J_{\kappa 1}}$ umana riarrangiata e un C_L di topo.

[052] Ci si riferisce anche a un ibridoma che si produce con un linfocita B di un topo come descritto qui, in cui l'ibridoma esprime una catena pesante chimerica ricavata da una sequenza $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 e 1-69/6-13/4; e una catena leggera chimerica ricavata da una sequenza $V_{\kappa 1-39/J_{\kappa 5}}$ umana riarrangiata; in cui il dominio variabile è fuso a una regione costante di topo e il dominio variabile di catena leggera è fuso a una regione costante di topo.

[053] Ci si riferisce anche a un ibridoma che si produce con un linfocita B di un topo come descritto qui, in cui l'ibridoma esprime una catena pesante chimerica ricavata da una sequenza $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 e 3-53/1-1/4; e una catena leggera chimerica ricavata da una sequenza $V_{\kappa 3-20/J_{\kappa 1}}$ umana riarrangiata; in cui il dominio variabile è fuso a una regione costante di topo e il dominio variabile di catena leggera è fuso a una regione costante di topo.

[054] In vari casi le catene pesante e leggera chimeriche espresse dall'ibridoma che si produce con un linfocita B di un topo come descritto qui sono affini nell'ibridoma. In vari casi le catene pesante e leggera chimeriche espresse dall'ibridoma che si produce con un linfocita B di un topo come descritto qui sono affini nel linfocita B del topo.

[055] Ci si riferisce anche a un embrione di topo, in cui l'embrione comprende una cellula ES donatrice che si ricava da un topo come descritto qui.

[056] Ci si riferisce anche a un vettore di puntamento comprendente, dal 5' al 3' nella direzione di trascrizione, con riferimento alle sequenze dei bracci di omologia di topo al 5' e al 3' del vettore, un braccio di omologia di topo al 5', un promotore di immunoglobulina umano o di topo, una sequenza veloce umana o di topo e una regione V_L umana scelta fra una $V_{\kappa 1-39/J_{\kappa 5}}$ umana riarrangiata o una $V_{\kappa 3-20/J_{\kappa 1}}$ umana riarrangiata e un braccio di

omologia di topo al 3'. In un certo caso i bracci di omologia al 5' e al 3' puntano il vettore a una sequenza al 5' rispetto a una sequenza di potenziatore che è presente al 5' e prossimale al gene di C κ di topo. In un certo caso il promotore è un promotore di segmento genico di regione variabile di immunoglobulina umana. In un caso particolare il promotore
 5 è un promotore V κ 3-15 umano. In un certo caso la sequenza veloce è una sequenza veloce di topo. In un caso particolare la sequenza veloce di topo è una sequenza veloce VK3-7 di topo.

[057] Ci si riferisce anche a un vettore di puntamento come descritto sopra, ma al posto del braccio di omologia di topo al 5' il promotore umano o di topo è fiancheggiato al 5' da
 10 un sito di riconoscimento per ricombinasi specifico a sito (SRRS) e al posto del braccio di omologia di topo al 3' la regione V_L umana è fiancheggiata da un SRRS.

[058] Ci si riferisce anche a un anticorpo chimerico inverso prodotto da un topo come descritto qui, in cui l'anticorpo chimerico inverso comprende una catena leggera comprendente una V_L umana e una C_L di topo e una catena pesante comprendente una V_H
 15 umana e una C_H di topo.

[58a] Si fornisce anche un metodo di produzione di un anticorpo diretto a un antigene di interesse comprendente un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione V_H/D_H/J_H umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4
 20 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza V κ 1-39/J κ umana riarrangiata, il metodo comprendente:

- (a) l'immunizzazione del topo fornito con un antigene di interesse;
- (b) l'ottenimento dal topo di un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione V_H/D_H/J_H umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-

23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4; e

(c) l'impiego della sequenza di regione variabile di immunoglobulina ottenuta al punto (b) associata con detta regione variabile di catena leggera umana in un anticorpo che si lega specificamente all'antigene di interesse.

Si fornisce inoltre un metodo di produzione di un anticorpo diretto a un antigene di interesse comprendente un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza V_k3-20/J_k umana riarrangiata, il metodo comprendente:

(a) l'immunizzazione del topo fornito con un antigene di interesse;

(b) l'ottenimento dal topo di un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4; e

(c) l'impiego della sequenza di regione variabile di immunoglobulina ottenuta in (b) associata con detta regione variabile di catena leggera umana in un anticorpo che si lega specificamente all'antigene di interesse.

[059] Ci si riferisce anche a un metodo per la produzione di un anticorpo comprendente l'espressione in una singola cellula di (a) una prima sequenza genica di V_H di un topo immunizzato come descritto qui fusa con una sequenza genica di C_H umana; (b) una sequenza genica di V_L di un topo immunizzato come descritta qui fusa con una sequenza genica di C_L umana; e (c) il mantenimento della cellula in condizioni sufficienti a esprimere un anticorpo interamente umano e l'isolamento dell'anticorpo. In un certo caso la cellula comprende una seconda sequenza genica di V_H di un secondo topo immunizzato

come descritto qui fusa con una sequenza genica di C_H umana, la prima sequenza genica di V_H codifica un dominio V_H che riconosce un primo epitopo e la seconda sequenza genica di V_H codifica un dominio V_H che riconosce un secondo epitopo, in cui il primo epitopo e il secondo epitopo non sono identici.

5 **[060]** Ci si riferisce anche a un metodo per la produzione di una proteina di legame a epitopo comprendente l'esposizione di un topo come descritto qui con un immunogeno che comprende un epitopo di interesse, il mantenimento del topo in condizioni sufficienti al topo per generare una molecola di immunoglobulina che si lega specificamente all'epitopo di interesse e l'isolamento della molecola di immunoglobulina che si lega, specificamente,
10 all'epitopo di interesse;

in cui la proteina di legame a epitopo comprende una catena pesante che comprende un V_H umano e un C_H di topo mutati somaticamente associata con una catena leggera comprendente un C_L di topo e un V_L umano ricavati da una $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ umana riarrangiata o da una $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ umana riarrangiata.

15 **[061]** Ci si riferisce anche a una cellula che esprime una proteina di legame a epitopo, in cui la cellula comprende: (a) una sequenza nucleotidica umana codificante un dominio V_L umano che è ricavato da una $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ umana riarrangiata o una $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ umana riarrangiata, in cui la sequenza nucleotidica umana è fusa (direttamente o attraverso una parte di unione) a una sequenza di cDNA di dominio costante di catena leggera di
20 immunoglobulina umana (per esempio una sequenza di DNA di dominio costante κ umana); e (b) una prima sequenza nucleotidica di V_H umano codificante un dominio V_H umano ricavato da una prima sequenza nucleotidica di V_H umano, in cui la prima sequenza nucleotidica di V_H umano è fusa (direttamente o attraverso una parte di unione) a una sequenza di cDNA di dominio costante di catena pesante di immunoglobulina umana; in

cui la proteina di legame a epitopo riconosce un primo epitopo. In un certo caso la proteina di legame a epitopo si lega al primo epitopo con una costante di dissociazione minore di 10^{-6} M, minore di 10^{-8} M, minore di 10^{-9} M, minore di 10^{-10} M, minore di 10^{-11} M o minore di 10^{-12} M.

5 **[062]** In un certo caso la cellula comprende una seconda sequenza nucleotidica umana codificante un secondo dominio V_H , in cui la seconda sequenza umana è fusa (direttamente o attraverso una parte di unione) a una sequenza di cDNA di dominio costante di catena pesante di immunoglobulina umana e in cui il secondo dominio V_H umano non riconosce specificamente il primo epitopo (per esempio manifesta una costante di dissociazione, per
10 esempio, pari a 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M o maggiore) e in cui la proteina di legame a epitopo riconosce il primo epitopo e il secondo epitopo e in cui la prima e la seconda catene pesanti di immunoglobulina si associano, ciascuna, con una catena leggera di (a) identica.

[063] In un certo caso il secondo dominio V_H si lega al secondo epitopo con una costante di dissociazione che è minore di 10^{-6} M, minore di 10^{-7} M, minore di 10^{-8} M,
15 minore di 10^{-9} M, minore di 10^{-10} M, minore di 10^{-11} M o minore di 10^{-12} M.

[064] In un certo caso la proteina di legame a epitopo comprende una prima catena pesante di immunoglobulina e una seconda catena pesante di immunoglobulina, ciascuna associata con una catena leggera identica ricavata da una regione V_L umana riarrangiata scelta fra una $V\kappa 1-39J\kappa 5$ umana o una $V\kappa 3-20J\kappa 1$ umana, in cui la prima catena pesante di
20 immunoglobulina si lega a un primo epitopo con una costante di dissociazione nell'intervallo da nanomolare a picomolare, la seconda catena pesante di immunoglobulina si lega a un secondo epitopo con una costante di dissociazione nell'intervallo da nanomolare a picomolare, il primo epitopo e il secondo epitopo non sono identici, la prima catena pesante di immunoglobulina non si lega al secondo epitopo o si lega al secondo

epitopo con una costante di dissociazione più debole dell'intervallo micromolare (per esempio l'intervallo millimolare), la seconda catena pesante di immunoglobulina non si lega al primo epitopo o si lega al primo epitopo con una costante di dissociazione più debole dell'intervallo micromolare (per esempio l'intervallo millimolare) e uno o più del
5 V_L , del V_H della prima catena pesante di immunoglobulina e del V_H della seconda catena pesante di immunoglobulina sono mutati somaticamente.

[065] In un certo caso la prima catena pesante di immunoglobulina comprende un residuo di legame a proteina A e alla seconda catena pesante di immunoglobulina manca il residuo di legame a proteina A.

10 **[066]** In un certo caso la cellula è scelta fra CHO, COS, 293, HeLa e una cellula retinica esprime una sequenza di acido nucleico virale (per esempio una cellula PERC.6™).

[067] Ci si riferisce anche a un anticorpo chimerico inverso comprendente un dominio V_H umano e un dominio costante di catena pesante di topo, un dominio V_L umano e un costante di catena leggera di topo, in cui si produce l'anticorpo mediante un procedimento
15 che comprende l'immunizzazione di un topo come descritto qui con un immunogeno comprendente un epitopo e l'anticorpo si lega, specificamente, all'epitopo dell'immunogeno con il quale si era immunizzato il topo. In un certo caso il dominio V_L è mutato somaticamente. In un certo caso il dominio V_H è mutato somaticamente. In un certo caso sia il dominio V_L , sia il dominio V_H sono mutati somaticamente. In un certo caso il V_L
20 è unito a un dominio C κ di topo.

[068] Sotto un certo aspetto nel topo fornito il topo comprende segmenti genici V_H umani sostituendo tutti o sostanzialmente tutti i segmenti genici V_H di topo in corrispondenza del locus endogeno di catena pesante di topo; non più di una o due sequenze di V_L/J_L di catena leggera umana riarrangiata scelte fra una $V\kappa 1-39/J\kappa 5$

riarrangiata e V κ 3-20/J κ 1 riarrangiata o una combinazione di queste sostituenti tutti i segmenti genici di catena leggera di topo; in cui i segmenti genici di variabile di catena pesante umana sono uniti a un gene di costante di topo e le sequenze di catena leggera umana riarrangiata sono unite a un gene di costante umana o di topo.

5 [069] Ci si riferisce anche a una cellula ES di topo comprendente una sostituzione di tutti o sostanzialmente di tutti i segmenti genici di variabile di catena pesante di topo con segmenti genici di variabile di catena pesante umana e non più di una o di due sequenze di V_L/J_L di catena leggera umana riarrangiata, in cui i segmenti genici di variabile di catena pesante umana sono uniti a un gene di costante di catena pesante di immunoglobulina di
10 topo e le sequenze di V_L/J_L di catena leggera umana riarrangiata sono unite a un gene di costante di catena leggera di immunoglobulina di topo o umana. In un caso particolare il gene di costante di catena leggera è un gene di costante di topo.

[070] Ci si riferisce anche a una proteina di legame ad antigene prodotta da un topo come descritto qui. In un caso particolare la proteina di legame ad antigene comprende una
15 regione variabile di catena pesante di immunoglobulina umana fusa con una regione costante di topo e una regione variabile di catena leggera di immunoglobulina umana ricavata da un segmento genico V κ 1-39 o da un segmento genico V κ 3-20, in cui la regione costante di catena leggera è una regione costante di topo.

[071] Ci si riferisce anche a una proteina di legame ad antigene interamente umana
20 prodotta da una sequenza genica di regione variabile di immunoglobulina proveniente da un topo come descritto qui, in cui la proteina di legame ad antigene comprende una catena pesante interamente umana comprendente una regione variabile umana ricavata da una sequenza di un topo come descritto qui e una catena leggera interamente umana comprendente un V κ 1-39 o un V κ 3-20. In un certo caso la regione variabile di catena

leggera comprende da una a cinque mutazioni somatiche. In un certo caso la regione variabile di catena leggera è una regione variabile di catena leggera affine che è appaiata in un linfocita B del topo con la regione variabile di catena pesante.

[072] In un certo caso la proteina di legame ad antigene interamente umana comprende
5 una prima catena pesante e una seconda catena pesante, in cui la prima catena pesante e la seconda catena pesante comprendono regioni variabili non identiche ricavate, indipendentemente, da un topo come descritto qui e in cui ciascuna delle prima e seconda catene pesanti si esprime provenendo da una cellula ospite associata con una catena leggera umana ricavata da segmento genico V κ 1-39 o da un segmento genico V κ 3-20. In
10 un certo caso la prima catena pesante comprende una prima regione variabile di catena pesante che si lega specificamente a un primo epitopo di un primo antigene e la seconda catena pesante comprende una seconda regione variabile di catena pesante che si lega specificamente a un secondo epitopo di un secondo antigene. In un caso particolare il primo antigene e il secondo antigene sono diversi. In un caso particolare il primo antigene
15 e il secondo antigene sono uguali e il primo epitopo e il secondo epitopo non sono identici; in un caso particolare il legame al primo epitopo di una prima molecola della proteina di legame non blocca il legame al secondo epitopo di una seconda molecola della proteina di legame.

[073] In un certo caso una proteina di legame interamente umana ricavata da una
20 sequenza di immunoglobulina umana di un topo come descritto qui comprende una prima catena pesante di immunoglobulina e una seconda catena pesante di immunoglobulina, in cui la prima catena pesante di immunoglobulina comprende una prima regione variabile che non è identica a una regione variabile della seconda catena pesante di immunoglobulina e in cui la prima catena pesante di immunoglobulina comprende un

determinante di legame a proteina A di tipo selvatico e alla seconda catena pesante manca un determinante di legame a proteina A di tipo selvatico. In un certo caso la prima catena pesante di immunoglobulina si lega alla proteina A in condizioni di isolamento e la seconda catena pesante di immunoglobulina non si lega alla proteina A o si lega alla proteina A almeno 10 volte, cento volte o mille volte più debolmente di quanto la prima catena pesante di immunoglobulina non si leghi alla proteina A in condizioni di isolamento. In un caso particolare la prima e la seconda catene pesanti sono isotipi IgG1, in cui la seconda catena pesante comprende una modificazione scelta fra 95R (EU 435R), 96F (EU 436F) e una combinazione di queste e in cui alla prima catena pesante manca tale
5
10 modificazione.

[074] Ci si riferisce anche a un metodo per la produzione di una proteina di legame ad antigene bispecifica, comprendente l'esposizione di un primo topo come descritto qui a un primo antigene di interesse che comprende un primo epitopo, l'esposizione di un secondo topo come descritto qui a un secondo antigene di interesse che comprende un secondo epitopo, il lasciare che il primo e il secondo topo preparino ciascuno reazioni immuni agli
15 antigeni di interesse, l'identificazione nel primo topo di una prima regione variabile di catena pesante umana che si lega al primo epitopo del primo antigene di interesse, l'identificazione nel secondo topo di una seconda regione variabile di catena pesante umana che si lega al secondo epitopo del secondo antigene di interesse, la produzione di un
20 primo gene di catena pesante interamente umana che codifica una prima catena pesante che si lega al primo epitopo del primo antigene di interesse, la produzione di un secondo gene di catena pesante interamente umana che codifica una seconda catena pesante che si lega al secondo epitopo del secondo antigene di interesse, l'espressione della prima catena pesante e della seconda catena pesante in una cellula che esprime una singola catena leggera

interamente umana ricavata da un segmento genico Vκ1-39 umano o da uno Vκ3-20 umano perché si formi una proteina di legame ad antigene bispecifica e l'isolamento della proteina di legame ad antigene bispecifica.

[075] In un certo caso il primo antigene e il secondo antigene non sono identici.

5 [076] In un certo caso il primo antigene e il secondo antigene sono identici e il primo epitopo e il secondo epitopo non sono identici. In un certo caso il legame della prima regione variabile di catena pesante al primo epitopo non blocca il legame della seconda regione variabile di catena pesante al secondo epitopo.

[077] In un certo caso il primo antigene è scelto fra un antigene solubile e un antigene di
10 superficie cellulare (per esempio un antigene tumorale) e il secondo antigene comprende un recettore su superficie cellulare. In un caso particolare il recettore su superficie cellulare è un recettore per immunoglobulina. In un caso particolare il recettore per immunoglobulina è un recettore Fc. In un certo caso il primo antigene e il secondo antigene sono lo stesso recettore su superficie cellulare e il legame della prima catena
15 pesante al primo epitopo non blocca il legame della seconda catena pesante al secondo epitopo.

[078] In un certo caso il dominio variabile di catena leggera della catena leggera comprende da 2 a 5 mutazioni somatiche. In un certo caso il dominio variabile di catena leggera è una catena leggera mutata somaticamente affine espressa in un linfocita B del
20 primo o del secondo topo immunizzato con il primo o il secondo dominio variabile di catena pesante.

[079] In un certo caso la prima catena pesante interamente umana porta una modificazione aminoacidica che ne fa diminuire l'affinità alla proteina A e la seconda

catena pesante interamente umana non comprende una modificazione che ne fa diminuire l'affinità alla proteina A.

[080] Ci si riferisce anche a un anticorpo o a un anticorpo bispecifico comprendente un dominio variabile di catena pesante umana prodotto in conformità con l'invenzione. Ci si
5 riferisce anche all'uso di un topo come descritto qui per la produzione di un anticorpo interamente umano o di un anticorpo bispecifico interamente umano.

[081] In un certo caso un topo, un embrione modificato geneticamente o una cellula modificata geneticamente descritto o descritta qui comprende un locus di catena leggera κ nel quale sono ritenuti elementi regolativi o di controllo endogeni, per esempio un
10 potenziatore intronico di κ di topo, un potenziatore al 3' di κ di topo o sia un potenziatore intronico sia un potenziatore al 3', in cui gli elementi regolativi o di controllo facilitano la mutazione somatica e la maturazione per affinità di una sequenza espressa del locus di catena leggera κ .

[082] Ci si riferisce anche a un topo che comprende una popolazione di linfociti B
15 caratterizzati dall'aver catene leggere di immunoglobulina ricavate da non più di uno o non più di due segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina riarrangiati o non riarrangiati, in cui il topo esibisce un rapporto fra le catene leggere $\kappa:\lambda$ che è più o meno uguale a quello di un topo che comprende un complemento di segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina di tipo selvatico.

20 [083] In un certo caso le catene leggere di immunoglobulina sono ricavate da non più di uno o non più di due segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina riarrangiati. In un particolare esempio di realizzazione le catene leggere sono ricavate da non più di un segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina riarrangiati.

[084] In un certo caso il topo esibisce un rapporto fra le catene leggere $\kappa:\lambda$ che va più o meno da 55:1 a 75:1, da 60:1 a 70:1, da 63:1 a 68:1 o più o meno da 65:1 a 67:1 a confronto con un topo che comprende un complemento di tipo selvatico di segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina. In un caso particolare il topo esibisce un

5 rapporto fra catene leggere $\kappa:\lambda$ che è 66:1 a confronto con un topo che comprende un complemento di tipo selvatico di segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina. In un certo caso le catene leggere di immunoglobulina ricavate da non più di uno o da non più di due segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina riarrangiati o non riarrangiati comprendono segmenti genici $V\kappa$ e J umani scelti fra il $V\kappa 1-$

10 39 umano, il $V\kappa 3-20$ umano, il $J\kappa 1$ umano e il $J\kappa 5$ umano. In un caso particolare le catene leggere di immunoglobulina sono ricavate da una singola sequenza di catena leggera umana comprendente una sequenza $V\kappa 1-39$ umana.

[085] In un certo caso il topo esibisce un rapporto fra le catene leggere $\kappa:\lambda$ che va più o meno da 18:1 a 23:1 o più o meno da 19:1 a 22:1 a confronto con un topo che comprende

15 un complemento di tipo selvatico di segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina. In un certo caso il topo esibisce un rapporto fra le catene leggere $\kappa:\lambda$ che è di 21:1 a confronto con un topo che comprende un complemento di tipo selvatico di segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina. In un certo caso il topo esibisce un rapporto fra le catene leggere $\kappa:\lambda$ che è più o meno uguale o di 20:1 a

20 confronto con un topo che comprende un complemento di tipo selvatico di segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina. In un certo caso le catene leggere di immunoglobulina ricavate da non più di uno o da non più di due segmenti genici V e J di catena leggera di immunoglobulina riarrangiati o non riarrangiati comprendono segmenti genici $V\kappa$ e $J\kappa$ umani scelti fra il $V\kappa 1-39$ umano, il $V\kappa 3-20$ umano, il $J\kappa 1$ umano e il $J\kappa 5$

umano. In un caso particolare le catene leggere di immunoglobulina sono ricavate da una singola sequenza di catena leggera umana comprendente una sequenza V κ 3-20 umana.

[086] Ci si riferisce anche a un topo che esprime una catena leggera di immunoglobulina ricavata da non più di una o da non più di due sequenze V κ /J κ umane, in cui il topo comprende una sostituzione di tutti o sostanzialmente di tutti i segmenti genici di regione variabile di catena pesante di topo endogeni con uno o più segmenti genici di regione variabile di catena pesante umana e il topo esibisce un rapporto fra (a) linfociti B CD19⁺ che esprimono un'immunoglobulina avente una catena leggera λ e (b) linfociti B CD19⁺ che esprimono un'immunoglobulina avente una catena leggera κ da 1 circa a 20 circa.

[087] In un certo caso il topo esprime una singola catena leggera κ ricavata da una sequenza V κ 1-39J κ 5 umana e il rapporto fra linfociti B CD19⁺ che esprimono un'immunoglobulina avente una catena leggera λ e linfociti B CD19⁺ che esprimono un'immunoglobulina avente una catena leggera κ va da 1 circa a 20 circa; in un certo caso la proporzione è di 1 circa ad almeno 66 circa; in un particolare esempio di realizzazione la proporzione è di 1 a 66 circa.

[088] In un certo caso il topo esprime una singola catena leggera ricavata da una sequenza V κ 3-20J κ 5 umana e il rapporto fra linfociti B CD19⁺ che esprimono un'immunoglobulina avente una catena leggera λ e linfociti B CD19⁺ che esprimono un'immunoglobulina avente una catena leggera κ è di 1 circa a 20 circa; in un certo caso il rapporto è di 1 circa a 21 circa. In particolari esempi di realizzazione il rapporto è di 1 a 20 o di 1 a 21.

[089] Ci si riferisce anche e si fornisce un topo modificato geneticamente che esprime una singola catena leggera κ riarrangiata, in cui il topo comprende un locus di catena

leggera λ funzionale e in cui il topo esprime una popolazione di linfociti B che comprende cellule $Ig\kappa^+$ che esprimono una catena leggera κ ricavata dalla stessa catena leggera κ riarrangiata. In un certo caso la percentuale di linfociti B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ nel topo è più o meno uguale a quella in un topo di tipo selvatico. In un caso particolare la percentuale di linfociti B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ nel topo va dal 2 circa al 6 per cento circa. In un caso particolare la percentuale di linfociti B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ in un topo in cui la singola catena leggera κ riarrangiata è ricavata da una sequenza $V\kappa 1-39J\kappa 5$ va da 2 circa a 3 circa; in un caso particolare il 2,6 circa. In un particolare esempio di realizzazione la percentuale di linfociti B $Ig\kappa^+Ig\lambda^+$ in un topo in cui la singola catena leggera κ riarrangiata è ricavata da una sequenza $V\kappa 3-20J\kappa 1$ va da 4 circa a 8 circa; in un particolare esempio di realizzazione è di 6 circa.

[090] Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente, in cui il topo esprime una singola catena leggera κ riarrangiata ricavata da un segmento genico $V\kappa$ e $J\kappa$ umano, in cui il topo esprime una popolazione di linfociti B che comprende una singola catena leggera κ ricavata dalla singola sequenza di catena leggera κ riarrangiata, in cui non si è reso il topo modificato geneticamente resistente a ipermutazioni somatiche. In un esempio di realizzazione almeno il 90% delle catene leggere κ espresse su un linfocita B del topo esibisce da almeno una ad almeno cinque ipermutazioni somatiche circa.

[091] Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente che è modificato per esprimere una singola catena leggera κ ricavata da non più di una o da non più di due sequenze di catena leggera κ riarrangiate, in cui il topo esibisce un utilizzo di catena leggera κ che è due volte circa o più, almeno tre volte circa o più o almeno quattro volte circa o più maggiore dell'utilizzo di catena leggera κ esibito da un topo di tipo selvatico o maggiore dell'utilizzo di catena leggera κ esibito da un topo dello stesso ceppo che comprende un repertorio di tipo selvatico di segmenti genici di catena leggera κ . In un caso

particolare il topo esprime la singola catena leggera κ proveniente da non più di una sequenza di catena leggera κ riarrangiata. In un caso più particolare la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è scelta fra una sequenza $V\kappa 1-39J\kappa 5$ e una $V\kappa 3-20J\kappa 1$. In un certo caso la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è una sequenza $V\kappa 1-39J\kappa 5$. In un certo caso la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è una sequenza $V\kappa 3-20J\kappa 1$.

[092] Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente che esprime una singola catena leggera κ ricavata da non più di una o da non più di due sequenze di catena leggera κ riarrangiate, in cui il topo esibisce un utilizzo di catena leggera κ che è 100 volte circa o più, almeno 200 volte circa o più, almeno 300 volte circa o più, almeno 400 volte circa o più, almeno 500 volte circa o più, almeno 600 volte circa o più, almeno 700 volte circa o più, almeno 800 volte circa o più, almeno 900 volte circa o più, almeno 1000 volte circa o più maggiore dell'utilizzo della stessa catena leggera κ esibito da un topo portatore di un locus di catena leggera κ umana completa o sostanzialmente completa. In un caso particolare al topo portatore di un locus di catena leggera κ umana completa o sostanzialmente completa manca una sequenza di catena leggera κ di topo non riarrangiata funzionale. In un caso particolare il topo esprime la singola catena leggera κ proveniente da non più di una sequenza di catena leggera κ riarrangiata. In un certo caso il topo comprende una copia di una sequenza di catena κ riarrangiata (per esempio un eterozigote). In un certo esempio di realizzazione il topo comprende due copie di una sequenza di catena leggera κ riarrangiata (per esempio un omozigote). In un caso più particolare la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è scelta fra una sequenza $V\kappa 1-39J\kappa 5$ e $V\kappa 3-20J\kappa 1$. In un certo caso la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è una sequenza $V\kappa 1-39J\kappa 5$. In un certo caso la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è una sequenza $V\kappa 3-20J\kappa 1$.

[093] Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente che esprime una singola catena leggera ricavata da non più di uno, o da non più di due sequenze di catena leggera riarrangiate, in cui la catena leggera nel topo modificato geneticamente esibisce un livello di espressione che è almeno da 10 volte a 1000 volte circa, da 100 volte a 1000 volte circa, da 200 volte a 1000 volte circa, da 300 volte a 1000 volte circa, da 400 volte a 1000 volte circa, da 500 volte a 1000 volte circa, da 600 volte a 1000 volte circa, da 700 volte a 1000 volte circa, da 800 volte a 1000 volte circa o da 900 volte a 1000 volte circa più alto dell'espressione della stessa catena leggera riarrangiata esibita da un topo portatore di un locus di catena leggera completa o sostanzialmente completa. In un certo caso la catena leggera comprende una sequenza umana. In un caso particolare la sequenza umana è una sequenza κ . In un certo caso la sequenza umana è una sequenza di λ . In un certo caso la catena leggera è una catena leggera interamente umana.

[094] In un certo caso il livello di espressione è caratterizzato dalla quantificazione di mRNA di sequenza di catena leggera trascritta e il confronto di questa con la sequenza di catena leggera trascritta di un topo portatore di un locus di catena leggera completa o sostanzialmente completa.

[095] Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente che esprime una singola catena leggera κ ricavata da non più di una o da non più di due sequenze di catena leggera κ riarrangiate, in cui il topo, al momento dell'immunizzazione con antigene, esibisce un titolo sierico che è simile a quello di un topo di tipo selvatico immunizzato con lo stesso antigene. In un caso particolare il topo esprime una singola catena leggera κ da non più di una sequenza di catena leggera κ riarrangiata. In un certo caso il titolo sierico è caratterizzato come immunoglobulina totale. In un caso particolare il titolo sierico è caratterizzato come titolo di IgM specifico. In un caso particolare il titolo sierico è

caratterizzato come titolo di IgG specifico. In un caso più particolare la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è scelta fra una sequenza V κ 1-39J κ 5 e V κ 3-20J κ 1. In un certo caso la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è una sequenza V κ 1-39J κ 5. In un certo caso la sequenza di catena leggera κ riarrangiata è una sequenza V κ 3-20J κ 1.

- 5 **[096]** Ci si riferisce anche a un topo modificato geneticamente che esprime una molteplicità di catene leggere di immunoglobulina associate con una singola catena leggera. In un certo caso la catena pesante comprende una sequenza umana. In svariati casi la sequenza umana è scelta fra una sequenza variabile, una CH₁, una cerniera, una CH₂, una CH₃ e una combinazione di queste. In un certo caso la singola catena leggera
- 10 comprende una sequenza umana. In svariati casi la sequenza umana è scelta fra una sequenza di variabile, una sequenza di costante e una combinazione di queste. In un certo caso il topo comprende un locus di immunoglobulina endogeno neutralizzato ed esprime la catena pesante e/o la catena leggera da un transgene o episoma extracromosomico. In un certo caso il topo comprende una sostituzione in corrispondenza di un locus di topo
- 15 endogeno di alcuni o di tutti i segmenti genici endogeni di catena pesante di topo (cioè V, D, J) e/o di alcune o di tutte le sequenze costanti endogene di catena pesante di topo (per esempio CH₁, cerniera, CH₂, CH₃ o una combinazione di queste) e/o di alcune o di tutte le sequenze endogene di catena leggera di topo (per esempio V, J, costante o una combinazione di queste) con una o più sequenze di immunoglobulina umana.
- 20 **[097]** Ci si riferisce anche a un topo adatto alla produzione di anticorpi che hanno la catena leggera uguale, in cui tutti o sostanzialmente tutti gli anticorpi prodotti nel topo sono espressi con la stessa catena leggera. In un certo caso la catena leggera è espressa da un locus di catena leggera endogeno.

[098] Ci si riferisce anche a un metodo per la produzione di una catena leggera per un anticorpo umano comprendente l'ottenimento da un topo come descritto qui di una sequenza di catena leggera e di una sequenza di catena pesante e l'impiego della sequenza di catena leggera e della sequenza di catena pesante nella produzione di un anticorpo umano. In un certo caso l'anticorpo umano è un anticorpo bispecifico.

[099] [Cancellato]

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

[100] La **FIG. 1** illustra una strategia di puntamento per la sostituzione di segmenti genici di regione variabile endogeni di catena leggera di immunoglobulina di topo con una regione genica V κ 1-39J κ 5 umana.

[101] La **FIG. 2** illustra una strategia di puntamento per la sostituzione di segmenti genici di regione variabile endogeni di catena leggera di immunoglobulina di topo con una regione genica V κ 3-20J κ 5 umana.

[102] La **FIG. 3** illustra una strategia di puntamento per la sostituzione di segmenti genici di regione variabile endogeni di catena leggera di immunoglobulina di topo con una regione genica VpreB/J λ 5 umana.

[103] La **FIG. 4** illustra la percentuale di linfociti B CD19⁺ (asse delle y) provenienti da sangue periferico relativa a topi di tipo selvatico (WT), a topi omozigoti per una regione di catena leggera V κ 1-39J κ 5 riarrangiata umana progettata (V κ 1-39J κ 5 HO) e a topi omozigoti per una regione di catena leggera V κ 3-20J κ 1 riarrangiata umana progettata (V κ 3-20J κ 1 HO).

[104] La **FIG. 5A** illustra l'espressione di mRNA relativa (asse delle y) di una catena leggera ricavata da V κ 1-39 in un'analisi di PCR quantitativa usando sonde specifiche alla giunzione di una regione di catena leggera V κ 1-39J κ 5 riarrangiata umana progettata

(sonda di giunzione Vκ1-39Jκ5) e del segmento genico Vκ1-39 umano (sonda Vκ1-39) in un topo omozigote per una sostituzione dei segmenti genici Vκ e Jκ endogeni con segmenti genici Vκ e Jκ umani (Hκ), in un topo di tipo selvatico (WT) e in un topo eterozigote per una regione di catena leggera Vκ1-39Jκ5 riarrangiata umana progettata (Vκ1-39Jκ5 HET). I segnali sono normalizzati all'espressione di Cκ di topo. N. D.: non rivelato.

[105] La **FIG. 5B** illustra l'espressione di mRNA relativa (asse delle y) di una catena leggera ricavata da Vκ1-39 in un'analisi di PCR quantitativa usando sonde specifiche alla giunzione di una regione di catena leggera Vκ1-39Jκ5 riarrangiata umana progettata (sonda di giunzione Vκ1-39Jκ5) e del segmento genico Vκ1-39 umano (sonda Vκ1-39) in un topo omozigote per una sostituzione dei segmenti genici Vκ e Jκ endogeni con segmenti genici Vκ e Jκ umani (Hκ), in un topo di tipo selvatico (WT) e in un topo omozigote per una regione di catena leggera Vκ1-39Jκ5 riarrangiata umana progettata (Vκ1-39Jκ5 HO). I segnali sono normalizzati all'espressione di Cκ di topo.

[106] La **FIG. 5C** illustra l'espressione di mRNA relativa (asse delle y) di una catena leggera ricavata da Vκ3-20 in un'analisi di PCR quantitativa usando sonde specifiche alla giunzione di una regione di catena leggera Vκ3-20Jκ1 riarrangiata umana progettata (sonda di giunzione Vκ3-20Jκ1) e del segmento genico Vκ3-20 umano (sonda Vκ3-20) in un topo omozigote per una sostituzione dei segmenti genici Vκ e Jκ endogeni con segmenti genici Vκ e Jκ umani (Hκ), in un topo di tipo selvatico (WT) e in un topo eterozigote (HET) e omozigote (HO) per una regione di catena leggera Vκ3-20Jκ1 riarrangiata umana progettata. I segnali sono normalizzati all'espressione di Cκ di topo.

[107] La **FIG. 6A** illustra il titolo di IgM (a sinistra) e di IgG (a destra) in topi di tipo selvatico (WT; N=2) e in topi omozigoti per una regione di catena leggera V κ 1-39J κ 5 riarrangiata umana progettata (V κ 1-39J κ 5 HO; N=2) immunizzati con β -galattosidasi.

[108] La **FIG. 6B** illustra il titolo di immunoglobulina totale (IgM, IgG, IgA) in topi di
5 tipo selvatico (WT; N=5) e in topi omozigoti per una regione di catena leggera V κ 3-20J κ 1 riarrangiata umana progettata (V κ 3-20J κ 1 HO; N=5) immunizzati con β -galattosidasi.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

[109] La presente invenzione non è limitata a metodi particolari e alle condizioni sperimentali descritte poiché tali metodi e condizioni possono variare. Si deve altresì
10 comprendere che la terminologia adottata qui è al fine di descrivere solo particolari esempi di realizzazione e non si vuole che sia limitativa poiché l'ambito di tutela della presente invenzione è definito dalle rivendicazioni.

[110] **[Cancellato]**

[111] Il sostantivo "anticorpo", nell'accezione adottata qui, comprende molecole di
15 immunoglobulina comprendenti quattro catene polipeptidiche, due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) unite da legami disolfurici. Ciascuna catena pesante comprende una regione variabile di catena pesante (V_H) e una regione costante di catena pesante (C_H). La regione costante di catena pesante comprende tre domini, C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}. Ciascuna catena leggera comprende una regione variabile di catena leggera (V_L) e una regione costante di
20 catena leggera (C_L). Le regioni V_H e V_L possono essere suddivise inoltre in regioni di ipervariabilità denominate regioni determinanti la complementarietà (CDR) disseminate di regioni che sono conservate maggiormente denominate regioni cornice (FR). Ciascuna V_H e V_L comprende tre CDR e quattro FR disposte dall'estremità amminica all'estremità carbossilica nell'ordine seguente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (si possono

abbreviare le CDR di catena pesante come HCDR1, HCDR2 e HCDR3; si possono abbreviare le CDR di catena leggera come LCDR1, LCDR2 e LCDR3. L'espressione anticorpo di "alta affinità" indica un anticorpo che ha una K_D rispetto al suo epitopo bersaglio di 10^{-9} M circa o minore (per esempio di 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M circa, o di 1×10^{-12} M circa). In un esempio di realizzazione si misura la K_D mediante risonanza plasmonica di superficie, per esempio BIACORE™; in un altro esempio di realizzazione si misura la K_D mediante ELISA.

[112] L'espressione "anticorpo bispecifico" comprende un anticorpo idoneo a legarsi selettivamente a due o a più epitopi. Gli anticorpi bispecifici in genere comprendono due molecole pesanti non identiche, con ciascuna catena pesante che si lega specificamente a un epitopo diverso – su due molecole diverse (per esempio epitopi diversi su due immunogeni diversi) o sulla stessa molecola (per esempio epitopi diversi sullo stesso immunogeno). Se un anticorpo bispecifico è idoneo a legarsi selettivamente a due epitopi diversi (un primo epitopo e un secondo epitopo) l'affinità della prima catena pesante per il primo epitopo in generale sarà almeno da una a due o tre o quattro o più ordini di grandezza minore dell'affinità della prima catena pesante per il secondo epitopo e vice versa. Epitopi ai quali si lega specificamente l'anticorpo bispecifico possono trovarsi sullo stesso bersaglio o su un bersaglio diverso (per esempio sulla stessa proteina o su una proteina diversa). Si possono produrre anticorpi bispecifici, per esempio, mediante la combinazione di catene pesanti che riconoscono epitopi diversi dello stesso immunogeno. Per esempio sequenze di acido nucleico codificanti sequenze variabili di catena pesante che riconoscono epitopi diversi dello stesso immunogeno possono essere fuse a sequenze di acido nucleico codificanti regioni costanti di catena pesante uguali o diverse e tali sequenze possono essere espresse in una cellula che esprime una catena leggera di

immunoglobulina. Un tipico anticorpo bispecifico ha due catene pesanti, ciascuna avente tre CDR di catena pesante, seguite (dall'estremità amminica all'estremità carbossilica) da un dominio C_{H1} , una cerniera, un dominio C_{H2} e un dominio C_{H3} e una catena leggera di immunoglobulina che non conferisce specificità di legame a epitopo ma che può associarsi con ciascuna catena pesante, o che può associarsi con ciascuna catena pesante e che può legarsi a uno o più degli epitopi ai quali si legano le regioni di legame a epitopo di catena pesante o che si possono associare con ciascuna catena pesante e attivare il legame di una o dell'una e l'altra delle catene pesanti a uno o a entrambi gli epitopi.

[113] Il sostantivo “cellula” comprende qualunque cellula che è adatta all'espressione di una sequenza di acido nucleico ricombinante. Le cellule comprendono quelle di procarioti e di eucarioti (a cellula singola o a cellule molteplici), cellule batteriche (per esempio ceppi di *E. coli*, di *Bacillus spp.*, di *Streptomyces spp.* e così via), cellule micobatteriche, cellule fungine, cellule di lieviti (per esempio *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* e così via), cellule vegetali, cellule di insetto (per esempio SF-9, SF-21, cellule di insetto infettate da baculovirus, *Trichoplusia ni*, ecc.), cellule di animale non umano, cellule umane o fusioni di cellule come, per esempio, ibridomi o quadromi. In alcuni casi la cellula è una cellula umana, di scimmia, di primate, di criceto, di ratto o di topo. In un certo caso la cellula è eucariote ed è scelta fra le cellule seguenti: CHO (per esempio CHO K1, DXB-1 1 CHO, Veggie-CHO), COS (per esempio COS-7), cellula retinica, Vero, CV1, di rene (per esempio HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (per esempio BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidermica), CV-1, U937, 3T3, cellula L, cellula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, cellula di Sertoli, cellula BRL 3A, cellula H1080, cellula di mieloma, cellula tumorale e una linea di cellule ricavata da una cellula citata sopra. In alcuni esempi di

realizzazione la cellula comprende uno o più geni virali, per esempio una cellula retinica che esprime un gene virale (per esempio una cellula PER.C6™).

[114] L'espressione "regione determinante la complementarietà" o l'acronimo "CDR" comprende una sequenza aminoacidica codificata da una sequenza di acido nucleico dei
5 geni di immunoglobulina di un organismo che, normalmente (cioè in un animale di tipo selvatico), si presenta fra due regioni cornice in una regione variabile di una catena leggera o di una pesante di una molecola di immunoglobulina (per esempio un anticorpo o un recettore di linfocita T). Una CDR può essere codificata, per esempio, da una sequenza di
10 linea germinale o da una sequenza riarrangiata o non riarrangiata e, per esempio, da un linfocita B o da un linfocita T non esposto ad antigene o maturo. Una CDR può essere mutata somaticamente (per esempio variare da una sequenza codificata nella linea germinale di un animale), umanizzata e/o modificata con sostituzioni, addizioni o delezioni aminoacidiche. In alcune circostanze (per esempio per una CDR3) le CDR possono essere
15 codificate da due o più sequenze (per esempio sequenze di linea germinale) che non sono contigue (per esempio in una sequenza di acido nucleico non riarrangiata) ma sono contigue in una sequenza di acido nucleico di linfocita B, per esempio in conseguenza di saldatura, o *splicing*, o dell'unione delle sequenze (per esempio la ricombinazione di V-D-J per la formazione di una CDR3 di catena pesante).

[115] L'aggettivo "conservativo", nell'accezione adottata per descrivere una
20 sostituzione aminoacidica conservativa, comprende la sostituzione di un residuo aminoacidico con un altro residuo aminoacidico avente un gruppo R di catena laterale con proprietà chimiche simili (per esempio carica elettrica o idrofobia). In generale una sostituzione aminoacidica conservativa non modificherà sostanzialmente le proprietà funzionali di interesse di una proteina, per esempio l'idoneità di una regione variabile a

legarsi specificamente a un epitopo bersaglio con un'affinità desiderata. Esempi di gruppi di aminoacidi che hanno catene laterali con proprietà chimiche simili comprendono catene laterali alifatiche come, per esempio glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; catene laterali alifatiche-idrossiliche come, per esempio, serina e treonina; catene laterali

5 contenenti ammidi come, per esempio, asparagina e glutammina; catene laterali aromatiche come, per esempio, fenilalanina, tirosina e triptofano; catene laterali basiche come, per esempio, lisina, arginina e istidina; catene laterali acide come, per esempio, acido aspartico e acido glutammico; e catene laterali contenenti zolfo come, per esempio, cisteina e metionina. Gruppi di sostituzione aminoacidica conservativa comprendono, per

10 esempio, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutammato/aspartato e asparagina/glutammina. In alcuni esempi di realizzazione una sostituzione aminoacidica conservativa può essere la sostituzione di un residuo nativo qualsiasi in una proteina con alanina nell'accezione adottata, per esempio, nella mutagenesi di scansione in alanina. In alcuni esempi di realizzazione si effettua una

15 sostituzione conservativa che ha un valore positivo nel logaritmo di matrice di probabilità PAM250 insegnato in Gonnet et al. (1992) Appaiamento esauriente di base di dati dell'intera sequenza proteica, *Science* 256: 1443-45. In alcuni esempi di realizzazione la sostituzione è una sostituzione moderatamente conservativa in cui la sostituzione ha un valore non negativo nel logaritmo di matrice di probabilità PAM250.

20 **[016]** In alcuni casi posizioni residue in una catena leggera o catena pesante di immunoglobulina sono diverse di una o più sostituzioni aminoacidiche conservative. In alcuni esempi di realizzazione le posizioni dei residui in una catena leggera di immunoglobulina o in un frammento funzionale di questa (per esempio un frammento che permette l'espressione e la secrezione, per esempio, da un linfocita B) non sono identiche a

quelle in una catena leggera la cui sequenza aminoacidica è elencata qui, ma sono diverse di una o più sostituzioni aminoacidiche conservative.

[117] L'espressione "proteina di legame a epitopo" comprende una proteina avente almeno una CDR e che è idonea a riconoscere selettivamente un epitopo, per esempio è idonea a legarsi a un epitopo con una K_D che è uno micromolare circa o minore (per esempio una K_D che è 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M o 1×10^{-12} M circa). Le proteine di legame a epitopo terapeutiche (per esempio anticorpi terapeutici) spesso necessitano di una K_D che è nell'intervallo nanomolare o in quello picomolare.

[118] L'espressione " frammento funzionale" comprende frammenti di proteine di legame a epitopo che possono essere espressi, secreti e che si legano specificamente a un epitopo con una K_D nell'intervallo micromolare, nanomolare o picomolare. Il riconoscimento specifico comprende avere una K_D che è, almeno, nell'intervallo micromolare, nell'intervallo nanomolare o nell'intervallo picomolare.

[119] L'espressione "linea germinale" comprende il riferimento a una sequenza di acido nucleico di immunoglobulina in una cellula non mutata somaticamente, per esempio, un linfocita B non mutato somaticamente o un linfocita pre-B o una cellula ematopoietica.

[120] L'espressione "catena pesante" o "catena pesante di immunoglobulina" comprende una sequenza di regione costante di catena pesante di immunoglobulina proveniente da un organismo qualsiasi. I domini variabili di catena pesante comprendono tre CDR e quattro regioni FR di catena pesante a meno che non si specifichi diversamente. I frammenti di catene pesanti comprendono CDR, CDR e FR e combinazioni di queste. Una tipica catena pesante ha, di seguito al dominio variabile (dall'estremità amminica all'estremità carbossilica) un dominio C_{H1} , una cerniera, un dominio C_{H2} e un dominio

C_{H3} . Un frammento funzionale di una catena pesante comprende un frammento che è idoneo a riconoscere specificamente un epitopo (per esempio a riconoscere l'epitopo con una K_D nell'intervallo micromolare, nanomolare o picomolare), che è idoneo a esprimersi e secernere da una cellula e che comprende almeno una CDR.

5 [121] Il sostantivo “identità”, nell'accezione adottata con riferimento alla sequenza comprende l'identità come determinata mediante un certo numero di algoritmi diversi noti nel settore che si possono usare per misurare l'identità di sequenze nucleotidiche e/o aminoacidiche. In alcuni esempi di realizzazione descritti qui si determinano le identità usando un allineamento (lento) ClustalW v. 1.83 impiegante una penalità per apertura di
 10 spazio vuoto pari a 10,0, una penalità per estensione di spazio vuoto pari a 0,1 e impiegando una matrice di similitudine di Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La lunghezza delle sequenze a confronto con rispetto all'identità di sequenze dipenderà dalle sequenze particolari ma nel caso di un dominio costante di catena leggera la lunghezza dovrebbe contenere sequenza di lunghezza sufficiente a piegarsi in un
 15 dominio costante di catena leggera che sia idoneo ad auto-associazione per formare un dominio costante di catena leggera canonico, per esempio idoneo a formare due foglietti beta comprendenti filamenti beta e idoneo a interagire almeno con un dominio C_{H1} di un essere umano o di un topo. Nel caso del dominio C_{H1} la lunghezza della sequenza dovrebbe contenere sequenza di lunghezza sufficiente a piegarsi in un dominio C_{H1} che sia
 20 idoneo a formare due foglietti beta comprendenti filamenti beta e idoneo a interagire almeno con un dominio costante di catena leggera di un topo o di un essere umano.

[122] L'espressione “molecola di immunoglobulina” comprende due catene pesanti di immunoglobulina e due catene leggere di immunoglobulina. Le catene pesanti possono essere identiche o diverse e le catene leggere possono essere identiche o diverse.

[123] L'espressione "catena leggera" comprende una sequenza di catena leggera di immunoglobulina proveniente da qualunque organismo e, a meno che non si specifichi diversamente, comprende catene leggere κ e λ umane e un V_{preB} , nonché catene leggere surrogate. I domini variabili di catena leggera (V_L) tipicamente comprendono tre CDR di
5 catena leggera e quattro regioni cornice (FR) a meno che non si specifichi diversamente. In generale una catena leggera intera comprende, dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, un dominio V_L che comprende FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 e un dominio costante di catena leggera. Le catene leggere comprendono quelle, per esempio, che non si legano selettivamente né a un primo, né a un secondo epitopo al quale si lega
10 selettivamente la proteina di legame a epitopo nella quale essi compaiono. Le catene leggere comprendono anche quelle che si legano e riconoscono, o adiuvano la catena pesante a legarsi e a riconoscere uno o più epitopi ai quali si lega selettivamente la proteina di legame a epitopo in cui essi compaiono. Le catene leggere comuni sono quelle ricavate da una sequenza $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ umana riarrangiata o una sequenza $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ umana
15 riarrangiata e comprendono versioni mutate somaticamente (per esempio maturate per affinità).

[124] Si vuole che l'espressione "intervallo micromolare" indichi 1-999 micromolare; si vuole che l'espressione "intervallo nanomolare" indichi 1-999 nanomolare; si vuole che l'espressione "intervallo picomolare" indichi 1-999 picomolare.

20 [125] L'espressione "mutato somaticamente" comprende il riferimento a una sequenza di acido nucleico proveniente da un linfocita B che ha subito commutazione di classe, in cui la sequenza di acido nucleico di una regione variabile di immunoglobulina (per esempio un dominio variabile di catena pesante o comprendente una sequenza di CDR o di FR di catena pesante) nel linfocita B che ha subito commutazione di classe non è identica

alla sequenza di acido nucleico nel linfocita B prima della commutazione di classe come, per esempio, una differenza in una sequenza di acido nucleico di CDR o di cornice fra un linfocita B che non ha subito commutazione di classe e un linfocita B che ha subito commutazione di classe. “Mutato somaticamente” comprende il riferimento a sequenze di acido nucleico provenienti da linfociti B maturati per affinità che non sono identiche a sequenze di regione variabile di immunoglobulina corrispondenti in linfociti B che non si sono fatti maturare per affinità (cioè sequenze nel genoma di cellule di linea germinale). L’espressione “mutato somaticamente” comprende anche il riferimento a una sequenza di acido nucleico di regione variabile di immunoglobulina proveniente da un linfocita B dopo esposizione del linfocita B a un epitopo di interesse, in cui la sequenza di acido nucleico è diversa dalla sequenza di acido nucleico corrispondente prima dell’esposizione del linfocita B all’epitopo di interesse. L’espressione “mutato somaticamente” indica sequenze da anticorpi che sono stati generati in un animale, per esempio un topo avente sequenze di acido nucleico di regione variabile di immunoglobulina umana, in reazione a una prova di immunità mediante somministrazione di un immunogeno e che derivano dai procedimenti di selezione intrinsecamente funzionanti in un tale animale.

[126] Il verbo “non riarrangiato” con riferimento a una sequenza di acido nucleico, comprende sequenze di acido nucleico che esistono nella linea germinale di una cellula di animale.

[127] L’espressione “dominio variabile” comprende una sequenza aminoacidica di una catena leggera o pesante di immunoglobulina (modificata come si desidera) che comprende le regioni aminoacidiche seguenti in sequenza dall’estremità amminica all’estremità carbossilica (a meno che non si indichi diversamente): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Catena leggera comune

[128] Sforzi precedenti per la produzione di proteine di legame a epitopo polispecifiche utili, per esempio anticorpi bispecifici, sono stati ostacolati da una varietà di problemi che spesso condividono un paradigma comune: la selezione o manipolazione di sequenze *in vitro* per progettare razionalmente o per progettare attraverso prova ed errore, un formato adatto all'appaiamento di una immunoglobulina umana bispecifica eterodimerica. Purtroppo la maggior parte se non la totalità degli approcci di progettazione *in vitro* fornisce in gran parte soluzioni *ad hoc* che sono idonee, se lo sono affatto, a singole molecole. D'altra parte non si sono realizzati metodi *in vivo* per l'impiego di organismi complessi per la selezione di appaiamenti appropriati che sono idonei a condurre ad agenti terapeutici per gli esseri umani.

[129] In generale le sequenze di topo native spesso non costituiscono una sorgente buona di sequenze terapeutiche umane. Almeno per quella ragione la generazione di regioni variabili di catena pesante di immunoglobulina di topo che si appaiano con una catena leggera umana comune è di utilità pratica limitata. Si profonderebbero più sforzi di progettazione *in vitro* in un procedimento di prova ed errore per cercare di umanizzare le sequenze variabili di catena pesante di topo, sperando nel contempo di mantenere la specificità e l'affinità a epitopo, mantenendo nel frattempo l'idoneità ad accoppiarsi con la catena leggera umana comune con esito incerto. Alla fine di un tale procedimento il prodotto finale può mantenere una parte delle sue specificità e affinità e associarsi con la catena leggera comune, ma in definitiva è probabile che l'immunogenicità in un essere umano resterebbe un grave rischio.

[130] Perciò un topo adatto alla produzione di agenti terapeutici per gli esseri umani comprenderebbe un repertorio adeguatamente ampio di segmenti genici di variabile di

catena pesante umana al posto di segmenti genici di regione variabile di catena pesante di topo. I segmenti genici di regione variabile di catena pesante umana dovrebbero essere idonei a riarrangiarsi e a ricombinarsi con un dominio costante di catena pesante di topo endogeno per la formazione di una catena pesante chimerica inversa (cioè una catena pesante comprendente un dominio variabile umano e una regione costante di topo). La regione costante dovrebbe essere idonea a commutazione di classe e a ipermutazione somatica cosicché sia disponibile un repertorio di domini variabili di catena pesante adeguatamente ampio al topo perché ne selezionano uno che possa associarsi con il repertorio limitato di regioni variabili di catena leggera umana.

- 10 **[131]** Un topo che selezioni una catena leggera comune per una molteplicità di catene pesanti ha utilità pratica. In svariati esempi di realizzazione anticorpi che si esprimono in un topo che può solo esprimere una catena leggera comune avranno catene pesanti che possono associarsi ed esprimere con una catena leggera identica o sostanzialmente identica. Questo è particolarmente utile nella produzione di anticorpi bispecifici. Per esempio si può immunizzare un tale topo con un primo immunogeno per la generazione di un linfocita B che esprima un anticorpo che si lega specificamente a un primo epitopo. Si può immunizzare il topo (o un topo geneticamente uguale) con un secondo immunogeno per generare un linfocita B che esprima un anticorpo che si lega specificamente al secondo epitopo. Si possono clonare regioni pesanti variabili dai linfociti B ed esprime con la stessa regione costante di catena pesante e la stessa catena leggera ed espresse in una cellula per la produzione di un anticorpo bispecifico, in cui la componente di catena leggera dell'anticorpo bispecifico è stata selezionata da un topo perché si associ e sia espressa con la componente di catena leggera.

[132] Gli inventori hanno progettato un topo per la generazione di catene leggere di immunoglobulina che si appaieranno adeguatamente con una famiglia alquanto eterogenea di catene pesanti comprendenti catene pesanti le cui regioni variabili deviano da sequenze di linea germinale, per esempio regioni variabili maturate per affinità o mutate somaticamente. In svariati esempi di realizzazione il topo è concepito perché appai domini 5 variabili di catena leggera umana con domini variabili di catena pesante umana che comprendono mutazioni somatiche, rendendo pertanto possibile una via verso proteine di legame ad alta affinità adatte all'uso come agenti terapeutici per gli esseri umani.

[133] Il topo progettato geneticamente attraverso il processo lungo e complesso di 10 selezione anticorpale entro un organismo fa scelte appropriate biologicamente nell'appaiare una raccolta eterogenea di domini variabili di catena pesante umana con un numero limitato di opzioni di catene leggere umane. Al fine di realizzare questo il topo è progettato perché presenti un numero limitato di opzioni di domini variabili di catena leggera umana insieme con un'ampia varietà di opzioni di domini variabili di catena 15 pesante umana. Al momento della prova di immunità mediante la somministrazione di un immunogeno il topo fa aumentare al massimo il numero di soluzioni nel proprio repertorio per lo sviluppo di un anticorpo diretto all'immunogeno, limitato in gran parte o esclusivamente dal numero di opzioni di catene leggere nel proprio repertorio. In svariati esempi di realizzazione questo comprende il lasciare che il topo realizzi mutazioni 20 somatiche adatte e compatibili del dominio variabile di catena leggera che, ciononostante, saranno compatibili con una varietà relativamente grande di domini variabili di catena pesante umana comprendenti, in particolare, domini variabili di catena pesante umana mutati somaticamente.

[134] Per realizzare un repertorio limitato di opzioni di catena leggera si progetta il topo perché renda non funzionale o sostanzialmente non funzionale la propria idoneità a produrre o a riarrangiare un dominio variabile di catena leggera di topo nativo. Si può realizzare questo, per esempio, mediante la delezione dei segmenti genici di regione
 5 variabile di catena leggera del topo. Si può poi modificare il locus di topo endogeno mediante un segmento genico di regione variabile di catena leggera umana esogeno adatto di scelta unito funzionalmente con il dominio costante di catena leggera di topo endogeno in maniera tale che i segmenti genici di regione variabile umana esogeni possano combinarsi con il gene endogeno di regione costante di catena leggera di topo e formare un
 10 gene di catena leggera chimerica inversa riarrangiato (variabile umana, costante di topo). In svariati esempi di realizzazione la regione variabile di catena leggera è idonea a essere mutata somaticamente. In svariati esempi di realizzazione per far aumentare al massimo l'idoneità della regione variabile di catena leggera ad acquisire mutazioni somatiche nel topo è ritenuto il potenziatore (o i potenziatori) appropriato. Per esempio, nel modificare
 15 un locus di catena leggera κ di topo per sostituire segmenti genici di catena leggera κ di topo endogeni con segmenti genici di catena leggera κ umana il potenziatore intronico di κ di topo e il potenziatore al 3' di topo sono ritenuti funzionalmente o li si disestano.

[135] Si fornisce un topo progettato geneticamente che esprime un repertorio limitato di catene leggere (variabile umana, costante di topo) chimeriche inverse associate con una
 20 varietà di catene pesanti (variabile umana, costante di topo) chimeriche inverse. In svariati esempi di realizzazione si delezionano i segmenti genici di catena leggera κ di topo endogeni e li si sostituiscono con una singola regione (o due) di catena leggera umana riarrangiata unita funzionalmente al gene di $C\kappa$ di topo endogeno. In esempi di realizzazione per far aumentare al massimo l'ipermutazione somatica della regione di

catena leggera umana riarrangiata sono ritenuti il potenziatore intronico di κ di topo e il potenziatore al 3' di κ di topo. In svariati esempi di realizzazione il topo comprende anche un locus di catena leggera λ non funzionale o una delezione di questo o una delezione che rende il locus inidoneo alla produzione di una catena leggera λ .

- 5 **[135a]** Per tale ragione si fornisce un topo modificato geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena leggera (V_L) umana ricavato da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico $V\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un segmento genico $J\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato; e in cui il
- 10 dominio (o i domini) V_L umano è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. Si fornisce anche un modificato geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena leggera (V_L)
- 15 umana ricavato da una sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico endogeno di $V\kappa$ di immunoglobulina non riarrangiato e un segmento genico $J\kappa$ endogeno di immunoglobulina non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) V_L umano è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana
- 20 riarrangiata scelta fra 30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

[136] Il topo modificato geneticamente fornito in svariati esempi di realizzazione comprende un locus di regione variabile di catena leggera al quale mancano segmenti genici V_L e J_L di catena leggera di topo endogeni e comprendente una regione variabile di catena leggera umana riarrangiata che è una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata o una

sequenza $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa}$ umana unite funzionalmente a una regione costante di topo, in cui il locus è idoneo a subire ipermutazione somatica e in cui il locus esprime una catena leggera comprendente la sequenza V_L/J_L umana unita a una regione costante di topo. In svariati esempi di realizzazione il locus comprende pertanto un potenziatore al 3' di κ di topo che è correlato con un livello di ipermutazione somatica normale, o di tipo selvatico.

[137] Il topo progettato geneticamente in svariati esempi di realizzazione, quando lo si immunizza con un antigene di interesse, genera linfociti B che manifestano una varietà di riarrangiamenti di regioni variabili di catena pesante di immunoglobulina umana che esprimono e funzionano con una o con due catene leggere riarrangiate, comprendendo esempi di realizzazione nei quali la una o le due catene leggere comprendono regioni variabili di catena leggera umana che comprendono, per esempio, da 1 a 5 mutazioni somatiche. In svariati esempi di realizzazione le catene leggere umane così espresse sono idonee ad associarsi e a esprimersi con qualunque regione variabile di catena pesante di immunoglobulina umana espressa nel topo. In un certo caso il topo modificato geneticamente comprende un linfocita B che esprime un dominio V_L umano ricavato da una sequenza $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa}$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico V_{κ} di immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un segmento genico J_{κ} di immunoglobulina endogeno non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) variabile di catena leggera (V_L) umana è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4. In un certo altro caso il topo modificato geneticamente comprende un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena leggera (V_L) umana ricavato da una sequenza $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa}$ umana riarrangiata che

è presente nella linea germinale di topo, in cui al topo manca un segmento genico V_{κ} di immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un segmento genico J_{κ} di immunoglobulina endogeno non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) variabile V_L umano è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.

Proteine di legame a epitopo leganti a più di un epitopo

[138] Si possono usare le composizioni e adottare i metodi descritti qui per la produzione di proteine di legame che si legano a più di un epitopo con alta affinità, per esempio anticorpi bispecifici. I vantaggi dell'invenzione comprendono l'idoneità a selezionare catene di immunoglobulina di catena pesante di legame adeguatamente alto (per esempio maturate per affinità), ciascuna delle quali si assocerà con una singola catena leggera.

[139] La sintesi e l'espressione di proteine di legame bispecifiche è stata problematica in parte a causa di questioni associate con l'identificazione di una catena leggera adatta che possa associarsi ed esprimersi con due catene pesanti diverse e in parte a causa di questioni di isolamento. I metodi e le composizioni descritti qui permettono a un topo modificato geneticamente di selezionare, attraverso processi altrimenti naturali, una catena leggera adatta che si possa associare ed esprimere con più di una catena pesante, comprendente catene pesanti che sono mutate somaticamente (per esempio maturate per affinità). Si possono identificare e clonare sequenze V_L e V_H umane provenienti da linfociti B adatti di topi immunizzati come descritto qui che esprimono anticorpi maturati per affinità aventi catene pesanti chimeriche inverse (per esempio variabile umana e costante di topo) in cornice in un vettore di espressione con una sequenza genica di regione costante umana adatta (per esempio una IgG1 umana). Si possono preparare due tali costrutti, in cui

ciascun costrutto codifica un dominio variabile di catena pesante umana che si lega a un epitopo diverso. Uno dei V_L umani (per esempio il $V\kappa 1-39J\kappa 5$ umano o il $V\kappa 3-20J\kappa 1$ umano) in sequenza di linea germinale o proveniente da un linfocita B in cui si è mutata somaticamente la sequenza può essere fuso in schema a un gene di regione costante umana
5 adatto (per esempio un gene di costante di κ umana). Questi tre costrutti pesante e leggero interamente umani possono essere posti in una cellula adatta per l'espressione. La cellula esprimerà due specie molto importanti: una catena pesante omodimerica con la catena leggera identica e una catena pesante eterodimerica con la catena leggera identica. Per permettere una separazione senza difficoltà di queste specie molto importanti si modifica
10 una delle catene pesanti per omettere un determinante di legame a proteina A, traducendosi in un'affinità differenziale di una proteina di legame omodimerica da quella di una proteina di legame eterodimerica. Le composizioni e i metodi che si concentrano su questo problema sono descritti nella Domanda di brevetto americano No. USSN-12/832 838 depositata il 25 Giugno 2010, avente per titolo "Anticorpi bispecifici isolati senza
15 difficoltà con formato di immunoglobulina nativa", pubblicata con il numero US-2010/0331527-A1.

[140] In un certo caso ci si riferisce a una proteina di legame a epitopo come descritta qui, in cui le sequenze V_L e V_H umane sono ricavate da topi descritti qui che si sono immunizzati con un antigene comprendente un epitopo di interesse.

20 **[141]** Ci si riferisce anche a una proteina di legame a epitopo che comprende un primo e un secondo polipeptide, il primo polipeptide comprendendo, dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, una prima regione di legame a epitopo che si lega selettivamente a un primo epitopo seguita da una regione costante che comprende una prima regione di C_{H3} di una IgG umana scelta fra IgG1, IgG2, IgG4 e una combinazione di queste; e un

secondo polipeptide comprendente, dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, una seconda regione di legame a epitopo che si lega selettivamente a un secondo epitopo seguita da una regione costante che comprende una seconda regione di C_H3 di una IgG umana scelta fra IgG1, IgG2, IgG4 e una combinazione di queste, in cui la seconda regione
 5 di C_H3 comprende una modificazione che fa diminuire o elimina il legame del secondo dominio C_H3 alla proteina A.

[142] In un certo caso la seconda regione di C_H3 comprende una modificazione H95R (con la numerazione di esoni IMGT; H435R con la numerazione EU). In un altro esempio di realizzazione la seconda regione di CH3 comprende inoltre una modificazione Y96F
 10 (IMGF; Y436F con EU).

[143] In un certo caso la seconda regione di C_H3 proviene da una IgG1 umana modificata e comprende inoltre una modificazione scelta dal gruppo costituito da D16E, L18M, N44S, K52N, V57M e V82I (IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M e V422I con EU).

15 **[144]** In un certo caso la seconda regione di C_H3 proviene da una IgG2 umana modificata e comprende inoltre una modificazione scelta dal gruppo costituito da N44S, K52N e V82I (IMGT; N384S, K392N e V422I con EU).

[145] In un certo caso la seconda regione di C_H3 proviene da una IgG4 umana modificata e comprende inoltre una modificazione scelta dal gruppo costituito da Q15R,
 20 N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q e V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q e V4221 con EU).

[146] Un metodo a cui ci si riferisce qui per la produzione di una proteina di legame a epitopo che si lega a più di un epitopo è quello di immunizzare un primo topo in conformità con l'invenzione con un antigene che comprende un primo epitopo di interesse,

in cui il topo comprende un locus endogeno di regione variabile di catena leggera di immunoglobulina che non contiene una V_L endogena di topo che è idoneo a riarrangiarsi e a formare una catena leggera in cui, almeno in corrispondenza del locus endogeno di regione variabile di catena leggera di immunoglobulina di topo, vi è una singola regione

5 V_L umana riarrangiata unita funzionalmente al gene di regione costante di catena leggera endogeno di topo e la regione V_L umana riarrangiata è scelta fra un $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ umano e un $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ umano e si sono sostituiti i segmenti genici V_H di topo endogeni del tutto o parzialmente con segmenti genici V_H umani sicché le catene pesanti di immunoglobulina prodotte dal topo siano solamente o sostanzialmente catene pesanti che comprendono

10 domini variabili umani e domini costanti di topo. Quando lo si immunizza tale topo produrrà un anticorpo chimerico inverso comprendente solo uno di due domini variabili di catena leggera umana (per esempio uno di $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ umano o $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ umano). Una volta che si identifica un linfocita B che codifica un V_H che si lega all'epitopo di interesse si può recuperare (per esempio mediante PCR) la sequenza nucleotidica del V_H (e,

15 facoltativamente, del V_L) e la si può clonare in un costrutto di espressione in schema con un adatto dominio costante di immunoglobulina umana. Si può ripetere questo procedimento per identificare un secondo dominio V_H che si lega a un secondo epitopo e si può recuperare e clonare una seconda sequenza genica di V_H in un vettore di espressione in schema con un secondo adatto dominio costante di immunoglobulina. Il primo e il secondo

20 domini costanti di immunoglobulina possono essere dello stesso isotipo o di isotipo diverso e si può modificare uno dei domini costanti di immunoglobulina (ma non l'altro) come descritto qui o nella Pubblicazione di domanda di brevetto americano No. US-2010/0331527-A1 e si può esprimere la proteina di legame a epitopo in una cellula adatta e la si può isolare in base alla sua affinità differenziale per la Proteina A in confronto a una

proteina di legame a epitopo omodimerica come descritto, per esempio, nella Pubblicazione No. US-2010/0331527-A1.

[147] Ci si riferisce anche a un metodo per la produzione di una proteina di legame a epitopo bispecifica, comprendente l'identificazione di una prima sequenza nucleotidica V_H umana (V_{H1}) maturata per affinità (per esempio comprendente una o più ipermutazioni somatiche) proveniente da un topo come descritto qui, l'identificazione di una seconda sequenza nucleotidica V_H umana (V_{H2}) maturata per affinità (per esempio comprendente una o più ipermutazioni somatiche) proveniente da un topo come descritto qui, il clonaggio di V_{H1} in schema con una catena pesante umana alla quale manca una modificazione di determinante di proteina A come descritto nella Pubblicazione No. US-2010/0331527-A1 per la formazione di catena pesante 1 (HC1), il clonaggio di V_{H2} in schema con una catena pesante umana comprendente un determinante di proteina A come descritto nella Pubblicazione No. US-2010/0331527-A1 per la formazione di catena pesante 2 (HC2), l'introduzione di un vettore di espressione comprendente la HC1 e di un vettore di espressione uguale o diverso comprendente la HC2 in una cellula, in cui la cellula esprime anche una catena leggera di immunoglobulina umana che comprende una $V_{\kappa 1-39}$ umana/ $J_{\kappa 5}$ umana o una $V_{\kappa 3-20}$ umana/ $J_{\kappa 1}$ umana fusa a un dominio costante di catena leggera umana, il lasciare che la cellula esprima una proteina di legame a epitopo bispecifica comprendente un dominio V_H codificato da V_{H1} e un dominio V_H codificato da V_{H2} e l'isolamento della proteina di legame a epitopo bispecifica in base alla sua idoneità differenziale a legarsi alla Proteina A in confronto a una proteina di legame a epitopo omodimerica monospecifica. In un caso particolare la HC1 è una IgG1 e la HC2 è una IgG1 che comprende la modificazione H95R (IMGT; H435R con EU) e comprende inoltre

la modificazione Y96F (IMGF; Y436F con EU). In un certo caso il dominio V_H codificato da V_{H1} , il dominio di V_H codificato da V_{H2} o entrambi sono mutati somaticamente.

Geni di V_H umani che esprimono con un V_L umano comune

[148] Si fece esprimere una varietà di regioni variabili umane provenienti da anticorpi maturati per affinità generati contro quattro antigeni diversi con la loro catena leggera affine o almeno con una di una catena leggera umana scelta fra la $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ umana, la $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ umana o la $V_{preBJ\lambda 5}$ umana (si veda l'Esempio 1). Per anticorpi diretti a ciascuno degli antigeni si appaiarono con successo catene pesanti di alta affinità mutate somaticamente da famiglie geniche diverse con le regioni $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ e $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ di linea germinale umana riarrangiate ed erano secrete da cellule esprimenti le catene pesante e leggera. Per la $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ e la $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ i domini V_H ricavati dalle famiglie geniche di V_H umano seguenti si espressero favorevolmente: 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 e 6-1. Un topo che è progettato per esprimere un repertorio limitato di domini V_L umani provenienti da una di $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ e $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ o da entrambe genererà una popolazione eterogenea di domini V_H umani mutati somaticamente provenienti da un locus di V_H modificato per sostituire i segmenti genici V_H di topo con segmenti genici V_H umani.

[149] Topi progettati geneticamente per esprimere catene pesanti di immunoglobulina chimeriche inverse (variabile umana, costante di topo) si associarono con una singola catena leggera riarrangiata (per esempio una $V_{\kappa 1-39/J}$ o una $V_{\kappa 3-20/J}$) quando li si immunizzano con un antigene di interesse, generarono linfociti B che comprendevano una varietà di riarrangiamenti V_H umani ed espressero una varietà di anticorpi specifici ad antigene ad alta affinità con varie proprietà rispetto alla loro idoneità a bloccare il legame

dell'antigene al proprio legante e rispetto alla loro idoneità a legarsi a varianti dell'antigene (si vedano gli Esempi dal 5 al 10).

[150] I topi e i metodi descritti qui sono pertanto utili nella produzione e nella selezione di domini variabili di catena pesante di immunoglobulina umana comprendenti domini variabili di catena pesante umana mutata somaticamente che derivano da una varietà di riarrangiamenti, che esibiscono un'ampia varietà di affinità (comprendenti l'esibizione di una K_D pari a un nanomolare o minore), un'ampia varietà di specificità (comprendenti il legame a diversi epitopi dello stesso antigene) e che si associano ed esprimono con una regione variabile di catena leggera di immunoglobulina umana uguale o sostanzialmente uguale.

[151] Si forniscono i seguenti Esempi così da descrivere ai tecnici nel settore come produrre e adottare i metodi e le composizioni dell'invenzione e non si vuole che limitino l'ambito di tutela di quanto gli inventori considerano come la loro invenzione. Si sono profusi sforzi per assicurare accuratezza rispetto ai numeri usati (per esempio le quantità, la temperatura, ecc.) ma si dovrebbe tenere conto di alcuni errori e deviazioni sperimentali. A meno che non si indichi diversamente le parti sono parti in peso, il peso molecolare è il peso molecolare medio, la temperatura è indicata in Celsius e la pressione è in corrispondenza o in prossimità di quella atmosferica.

ESEMPI

[152] Si forniscono gli Esempi seguenti così da descrivere come produrre e adottare i metodi e le composizioni dell'invenzione e non si vuole che limitino l'ambito di tutela di quanto gli inventori considerano la loro invenzione. A meno che non si indichi diversamente la temperatura è indicata in Celsius e la pressione è in corrispondenza o in prossimità di quella atmosferica.

Esempio 1

Identificazione di regioni V_H umane che si associano con regioni V_L umane selezionate

[153] Si costruì un sistema di espressione *in vitro* per determinare se una singola catena
5 leggera di linea germinale umana riarrangiata potesse essere co-espressa con catene pesanti
umane provenienti da anticorpi umani specifici ad antigene.

[154] Metodi per la generazione di anticorpi umani in topi modificati geneticamente
sono noti (si veda, per esempio, il Brevetto americano No. US-6 596 541, Regeneron
Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®). La tecnologia VELOCIMMUNE® implica la
10 generazione di un topo modificato geneticamente avente un genoma comprendente regioni
variabili di catena pesante e leggera umane unite funzionalmente a loci endogeni di regione
costante di topo sicché il topo produca un anticorpo comprendente una regione variabile
umana e una regione costante di topo in reazione a stimolazione antigenica. Il DNA
codificante le regioni variabili delle catene pesante e leggera degli anticorpi prodotti
15 provenienti da un topo VELOCIMMUNE® è interamente umano. Inizialmente si isolano
anticorpi chimerici di alta affinità aventi una regione variabile umana e una regione
costante di topo. Come descritto sotto gli anticorpi sono caratterizzati e scelti per
caratteristiche auspicabili comprendenti l'affinità, la selettività, l'epitopo ecc. Le regioni
costanti di topo sono sostituite con una regione costante umana desiderata per generare un
20 anticorpo interamente umano contenente un isotipo non IgM, per esempio di tipo selvatico
o IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificato. Benché la regione costante scelta possa variare a
seconda dell'uso specifico le caratteristiche di legame ad antigene di alta affinità e di alta
specificità di bersaglio risiedono nella regione variabile.

[155] Si immunizzò un topo VELOCIMMUNE® con un fattore di crescita che promuove l'angiogenesi (Antigene C) e si isolarono anticorpi umani specifici ad antigene e li si sequenziarono per l'utilizzo dei geni di V impiegando tecniche tradizionali riconosciute nel settore. Si clonarono anticorpi selezionati su regioni costanti di catena pesante e leggera umane e si scelsero 69 catene pesanti per l'appaiamento con una di tre catene leggere umane: (1) la catena leggera κ affine unita a una regione costante di κ umana, (2) una V κ 1-39J κ 5 di linea germinale umana riarrangiata unita a una regione costante di κ umana oppure (3) una V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiata unita a una regione costante di κ umana. Si co-trasfettò ciascun paio di catena pesante e di catena leggera in cellule CHO-K1 usando tecniche tradizionali. Si rivelò la presenza di anticorpo nel surnatante mediante anti-IgG umana in un saggio ELISA. Si determinò il titolo anticorpale (ng/ml) relativamente a ciascun paio di catena pesante/catena leggera e si confrontarono i titoli con le diverse catene leggere di linea germinale riarrangiate con i titoli ottenuti con la molecola anticorpale progenitrice (cioè catena pesante appaiata con catena leggera affine) e si calcolò la percentuale del titolo nativo (Tabella 1). V_H: gene di variabile di catena pesante. ND: non si rivelò alcuna espressione nelle condizioni sperimentali attuali.

Tabella 1

V _H	Titolo anticorpale (ng/ml)			Percentuale del titolo nativo	
	LC affine	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

V _H	Titolo anticorpale (ng/ml)			Percentuale del titolo nativo	
	LC affine	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
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

V _H	Titolo anticorpale (ng/ml)			Percentuale del titolo nativo	
	LC affine	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-33	19	38	ND	200,5	-
3-11	48	ND	203	-	423,6
-	11	23	8	212,7	74,5
3-33	168	138	182	82,0	108,2
3-20	117	67	100	57,5	86,1
3-23	86	61	132	70,7	154,1
3-33	20	12	33	60,9	165,3
4-31	69	92	52	133,8	75,0
3-23	87	78	62	89,5	71,2
1-2	31	82	51	263,0	164,6
3-23	53	93	151	175,4	285,4
-	11	8	17	75,7	151,4
3-33	114	36	27	31,6	23,4
3-15	73	39	44	53,7	59,6
3-33	1	34	16	5600,0	2683,3
3-9	58	112	57	192,9	97,6
3-33	67	20	105	30,1	157,0
3-33	34	21	24	62,7	70,4

V _H	Titolo anticorpale (ng/ml)			Percentuale del titolo nativo	
	LC affine	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
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

V _H	Titolo anticorpale (ng/ml)			Percentuale del titolo nativo	
	LC affine	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
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

[156] In un esperimento simile si immunizzarono topi VELOCIMMUNE® con parecchi antigeni diversi e si testarono catene pesanti di anticorpi umani specifici ad antigene selezionati per la loro idoneità ad appaiarsi a catene leggere di linea germinale umana riarrangiate diverse (come descritto sopra). Gli antigeni usati in questo esperimento comprendevano un enzima implicato nella omeostasi del colesterolo (Antigene A), un ormone sierico implicato nella regolazione della omeostasi del glucosio (Antigene B), un fattore di crescita che promuove l'angiogenesi (Antigene C) e un recettore su superficie

cellulare (Antigene D). Si isolarono anticorpi specifici ad antigene da topi di ciascun gruppo di immunizzazione e si clonarono e sequenziarono le regioni variabili di catena pesante e di catena leggera. Dalla sequenza delle catene pesante e leggera si determinò l'utilizzo dei geni di V e si appaiarono catene pesanti selezionate con la catena leggera a loro affine o una regione V κ 1-39J κ 5 di linea geminale umana riarrangiata. Si co-trasfettò ciascun paio di catena pesante/leggera in cellule CHO-K1 e si rivelò la presenza di anticorpo nel surnatante mediante anti-IgG umana in un saggio ELISA. Si determinò il titolo anticorpale (μ g/ml) relativamente a ciascun appaiamento di catena pesante/catena leggera e si confrontarono i titoli con le diverse catene leggere di linea germinale umana riarrangiate con i titoli ottenuti con la molecola anticorpale progenitrice (cioè catena pesante appaiata con catena leggera affine) e si calcolò la percentuale del titolo nativo (Tabella 2). V_H: gene di variabile di catena pesante. V κ : gene di variabile di catena leggera κ . ND: non si rivelò alcuna espressione nelle condizioni sperimentali attuali.

Tabella 2

Antigene	Anticorp o	V _H	V κ	Titolo (μ g/ml)			Percentuale del titolo nativo
				Solo V _H	V _H + 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

Antigene	Anticorp o	V _H	V _κ	Titolo (μg/ml)			Percentuale del titolo nativo
				Solo V _H	V _H + V _κ	V _H + V _κ 1-39J _κ 5	
	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
	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

Antigene	Anticorp o	V _H	V _κ	Titolo (μg/ml)			Percentuale del titolo nativo
				Solo V _H	V _H + V _κ	V _H + V _κ 1-39J _κ 5	
C	706	3-33	1-16	0,3	3,6	3,0	84
	744	1-18	1-12	0,4	5,1	3,0	59
	696	3-11	1-16	0,4	3,0	2,9	97
	685	3-13	3-20	0,3	0,5	3,4	734
	732	3-15	1-17	0,3	4,5	3,2	72
	694	3-15	1-5	0,4	5,2	2,9	55
	743	3-23	1-12	0,3	3,2	0,3	10
	742	3-23	2-28	0,4	4,2	3,1	74
	693	3-23	1-12	0,5	4,2	4,0	94
D	136	3-23	2-28	0,4	5,0	2,7	55
	155	3-30	1-16	0,4	1,0	2,2	221
	163	3-30	1-16	0,3	0,6	3,0	506
	171	3-30	1-16	0,3	1,0	2,8	295
	145	3-43	1-5	0,4	4,4	2,9	65

Antigene	Anticorp o	V _H	V _κ	Titolo (μg/ml)			Percentuale del titolo nativo
				Solo	V _H +	V _H +	
				V _H	V _κ	V _κ 1-39J _κ 5	
	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

[157] I risultati ottenuti da questi esperimenti confermano che catene pesanti di alta affinità mutate somaticamente provenienti da famiglie geniche diverse sono idonee ad appaiarsi con regioni V_κ1-39J_κ5 e V_κ3-20J_κ1 di linea germinale umana riarrangiate e a essere secrete dalla cellula sotto forma di una molecola anticorpale normale. Come

5 riportato nella Tabella 1 il titolo anticorpale risultò aumentato per il 61% circa (42 su 69) di catene pesanti quando erano appaiate con la catena leggera V_κ1-39J_κ5 umana riarrangiata e per il 29% circa (20 su 69) di catene pesanti quando erano appaiate con la catena leggera V_κ3-20J_κ1 umana riarrangiata a confronto con la catena leggera affine

10 dell'anticorpo precursore. Per il 20% circa (14 su 69) delle catene pesanti entrambe le catene leggere di linea germinale umana riarrangiate conferirono un aumento di espressione in confronto alla catena leggera affine dell'anticorpo progenitore. Come

riportato nella Tabella 2 la regione V κ 1-39J κ 5 di linea germinale umana riarrangiata conferì un aumento di espressione di parecchie catene pesanti specifiche a una gamma di classi diverse di antigeni in confronto alla catena leggera affine per gli anticorpi progenitori. Si fece aumentare il titolo anticorpale di più di due volte per il 35% circa (15/43) delle catene pesanti in confronto alla catena leggera affine degli anticorpi progenitori. Per due catene pesanti (315 e 316) l'aumento era maggiore di dieci volte in confronto all'anticorpo progenitore. Entro tutte le catene pesanti che manifestarono un'espressione aumentata rispetto alla catena leggera affine dell'anticorpo progenitore le catene pesanti della famiglia tre (V_H3) sono sovra-rappresentate in confronto ad altre famiglie geniche di regione variabile di catena pesante. Questo conferma una relazione favorevole delle catene pesanti V_H3 umane ad appaiarsi con le catene leggere V κ 1-39J κ 5 e V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiate.

Esempio 2

Generazione di un locus di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata

[158] Si produssero svariati vettori di puntamento di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata impiegando la tecnologia VELOCIGENE® (si veda, per esempio, il Brevetto americano No. US-6 586 251 e Valenzuela *et al.* (2003) Progettazione di alto volume del genoma di topo accoppiata con analisi di espressione ad alta risoluzione, Nature Biotech. 21(6): 652-659) per modificare i cloni di Cromosoma Batterico artificiale (BAC) 302g12 e 254m04 (Invitrogen). Usando questi due cloni di BAC si progettarono costrutti genomici perché contenessero una singola regione di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata e li si inserarono in un locus di catena leggera κ endogeno che si era modificato in precedenza per delezionare i segmenti genici di variabile e di giunzione di κ endogeni.

[159] Costruzione di vettori di puntamento di catena leggera di linea germinale

umana riarrangiata. Si produssero tre regioni di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata diverse impiegando tecniche di biologia molecolare tradizionali riconosciute nel settore. I segmenti genici di variabile umani usati per la costruzione di queste tre
5 regioni comprendevano la sequenza V κ 1-39J κ 5 umana riarrangiata, una sequenza V κ 3-20J κ 1 umana riarrangiata e una sequenza VpreBJ λ 5 umana riarrangiata.

[160] Si produsse un segmento di DNA contenente l'esone 1 (codificante il peptide di sequenza veloce) e l'introne 1 del gene V κ 3-7 di topo mediante sintesi di DNA de novo (Integrated DNA Technologies). Si integrò parte della regione non tradotta al 5' fino a un

10 sito per enzima di restrizione B κ l κ l presente in natura. Si ampliarono con PCR gli esoni dei geni V κ 1-39 e V κ 3-20 umani provenienti da librerie genomiche di BAC umani. Gli inneschi in avanti avevano un'estensione al 5' contenente il sito accettore di *splicing* dell'introne 1 del gene V κ 3-7 di topo. L'innesco inverso usato per la PCR della sequenza V κ 1-39 umana comprendeva un'estensione codificante il J κ 5 umano mentre l'innesco
15 inverso usato per la PCR della sequenza V κ 3-20 umana comprendeva un'estensione codificante il J κ 1 umano. Si produsse la sequenza VpreBJ λ 5 umana mediante sintesi di DNA de novo (Integrated DNA Technologies). Si amplificò mediante PCR una porzione dell'introne J κ -C κ umano comprendente il sito di donatore di *splicing* dal plasmide pBS-296-HA18-PI κ Scel. L'innesco di PCR in avanti comprendeva un'estensione codificante
20 parte di una sequenza di J κ 5, J κ 1 o J κ 5 umano. L'innesco inverso comprendeva un sito PI-Scel la cui integrazione nell'introne si era progettata in precedenza.

[161] Si cucirono insieme l'esone1/introne 1 di V κ 3-7 di topo, gli esoni di catena leggera variabile umana e i frammenti intronici J κ -C κ umani mediante PCR con sovrapposizione di estensioni, li si fecero digerire con B κ l κ l e PI-Scel e legarono nel

plasmide pBS-296-HA18-PI-SceI che conteneva il promotore proveniente dal segmento genico variabile V κ 3-15 umano. Si sostituì una cassetta di igromicina integrata con lox entro il plasmide pBS-296-HA18-PI-SceI con una cassetta di igromicina integrata con FRT fiancheggiata da siti NotI e Ascl. Si legò il frammento con NotI/PI-SceI di questo plasmide
 5 nel BAC 254m04 di topo modificato che conteneva parte dell'introne J κ -C κ di topo, l'esone C κ di topo e 75 kb circa di sequenza genomica a valle del locus κ di topo che fornì un braccio di omologia al 3' per la ricombinazione omologa in cellule ES di topo. Si legò poi il frammento con NotI/Ascl di questo BAC nel BAC 302g12 di topo modificato che conteneva la cassetta di neomicina integrata con FRT e 23 kb circa di sequenza genomica a
 10 monte del locus κ endogeno per la ricombinazione omologa in cellule ES di topo.

[162] Vettore di puntamento V κ 1-39J κ 5 di linea germinale umana riarrangiato (FIG. 1). Si introdussero siti per enzimi di restrizione alle estremità al 5' e al 3' di un inserto di catena leggera progettato per il clonaggio in un vettore di puntamento: un sito Ascl all'estremità al 5' e un sito PI-SceI all'estremità al 3'. Entro il sito Ascl al 5' e il sito
 15 PI-SceI al 3' il costrutto di puntamento dal 5' al 3' comprendeva un braccio di omologia al 5' contenente sequenza al 5' rispetto al locus endogeno di catena leggera κ di topo ottenuto dal clone di BAC 302g12 di topo, un gene di resistenza a neomicina integrato con FRT, una sequenza genomica comprendente il promotore V κ 3-15 umano, una sequenza veloce del segmento genico di variabile V κ 3-7 di topo, una sequenza intronica del segmento
 20 genico di variabile V κ 3-7 di topo, uno schema di lettura aperto di una regione V κ 1-39J κ 5 di linea germinale umana riarrangiata, una sequenza genomica contenente una porzione dell'introne J κ -C κ umano e un braccio di omologia al 3' contenente la sequenza al 3' del segmento genico J κ 5 di topo endogeno ottenuto dal clone di BAC 254m04 di topo (Figura 1, al centro). I geni e/o le sequenze a monte del locus endogeno di catena leggera κ di topo

e a valle del segmento genico Jκ più al 3' (per esempio il potenziatore al 3' endogeno) non furono modificati dal costrutto di puntamento (si veda la Figura 1). La sequenza del locus Vκ1-39Jκ5 umano progettato è illustrata nella ID di SEQ No: 1.

[163] Si confermò l'inserzione puntata della regione Vκ1-39Jκ5 di linea germinale umana riarrangiata nel DNA di BAC mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) usando inneschi posizionati in sequenze entro la regione di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata. In sintesi si confermò la sequenza intronica al 3' rispetto alla sequenza veloce Vκ3-7 di topo con gli inneschi ULC-m1F (AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG; ID di SEQ No: 2) e ULC-m1R (TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA; ID di SEQ No: 3). Si confermò lo schema di lettura aperto della regione Vκ1-39Jκ5 di linea germinale umana riarrangiata con gli inneschi 1633-h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A; ID di SEQ No: 4) e 1633-h2R (TGCAAACCTGG ATGCAGCATA G; ID di SEQ No: 5). Si confermò la cassetta di neomicina con gli inneschi neoF (GGTGGAGAGG CTATTCGGC; ID di SEQ No: 6) e neoR (GAACACGGCG GCATCAG; ID di SEQ No: 7). Si usò poi DNA di BAC puntato per l'elettroporazione di cellule ES di topo per creare cellule ES modificate per la generazione di topi chimerici che esprimono una regione Vκ1-39Jκ5 di linea germinale umana riarrangiata.

[164] Si confermarono i cloni di cellule ES positivi mediante controllo e selezione TAQMAN™ e cariotipizzazione impiegando sonde specifiche alla regione di catena leggera Vκ1-39Jκ5 progettata inserita nel locus endogeno. In sintesi la sonda neoP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; ID di SEQ No: 8) che si lega entro il gene marcatore di neomicina, la sonda ULC-m1P (CCATTATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC; ID di SEQ No: 9) che si lega entro la sequenza intronica al 3' rispetto alla

sequenza veloce V κ 3-7 di topo e la sonda 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT; ID di SEQ No: 10) che si lega entro lo schema di lettura aperto V κ 1-39J κ 5 di linea germinale umana riarrangiato. Si usarono poi i cloni di cellule ES positivi per impiantare in topi femmina perché si facesse nascere una figliata di cuccioli esprimenti la regione di catena leggera V κ 1-39J κ 5 di linea germinale.

[165] Alternativamente si trasfettano cellule ES portatrici della regione di catena leggera V κ 1-39J κ 5 di linea germinale umana riarrangiata con un costrutto che esprime FLP al fine di rimuovere la cassetta di neomicina integrata con FRT introdotta mediante il costrutto di puntamento. Facoltativamente si rimuove la cassetta di neomicina mediante l'allevamento di topi che esprimono la ricombinasi FRP (per esempio Brevetto americano No. US-6 774 279). Facoltativamente la cassetta di neomicina è ritenuta nei topi.

[166] Vettore di puntamento V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiato (FIG. 2). In una maniera simile si produsse un locus di catena leggera progettato esprimere una regione V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiata usando un costrutto di puntamento comprendente, dal 5' al 3', un braccio di omologia al 5' contenente sequenza al 5' rispetto al locus endogeno di catena leggera κ di topo ottenuto dal clone di BAC 302g12, un gene di resistenza a neomicina integrato con FRT, una sequenza genomica comprendente il promotore V κ 3-15 umano, una sequenza veloce del segmento genico di variabile V κ 3-7 di topo, una sequenza intronica del segmento genico di variabile V κ 3-7 di topo, uno schema di lettura aperto di una regione V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiata, una sequenza genomica contenente una porzione dell'introne J κ -C κ umano e un braccio di omologia al 3' contenente la sequenza al 3' del segmento genico J κ 5 di topo endogeno ottenuto dal clone di BAC 254m04 di topo (Figura

2, al centro). La sequenza del locus V κ 3-20J κ 1 umano progettato è illustrata nella ID di SEQ No: 11.

[167] Si confermò l'inserzione puntata della regione V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiata nel DNA di BAC mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) usando inneschi posizionati in corrispondenza di sequenze entro la regione di catena leggera V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiata. In sintesi si confermò la sequenza intronica al 3' rispetto alla sequenza veloce V κ 3-7 di topo con gli inneschi ULC-m1F (ID di SEQ No: 2) e ULC-m1R (ID di SEQ No: 3). Si confermò lo schema di lettura aperto della regione V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiata con gli inneschi 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; ID di SEQ No: 12) e 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; ID di SEQ No: 13). Si confermò la cassetta di neomicina con gli inneschi neoF (ID di SEQ No: 6) e neoR (ID di SEQ No: 7). Si usò poi DNA di BAC puntato per l'elettroporazione di cellule ES di topo per creare cellule ES modificate per la generazione di topi chimerici che esprimono la catena leggera V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana riarrangiata.

[168] Si confermarono i cloni di cellule ES positivi mediante controllo e selezione TAQMANTM e cariotipizzazione impiegando sonde specifiche alla regione di catena leggera V κ 3-20J κ 1 progettata insertata nel locus κ di catena leggera endogeno. In sintesi la sonda neoP (ID di SEQ No: 8) che si lega entro il gene marcatore di neomicina, la sonda ULC-m1P (ID di SEQ No: 9) che si lega entro la sequenza veloce V κ 3-7 di topo e la sonda 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG; ID di SEQ No: 14) che si lega entro lo schema di lettura aperto V κ 3-20J κ 1 umano. Si usarono poi i cloni di cellule ES positivi per l'impianto in topi femmina. Una figliata di cuccioli esprimenti la regione di catena leggera V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana.

[169] Alternativamente si possono trasfettare le cellule ES portatrici della regione di catena leggera V κ 3-20J κ 1 di linea germinale umana con un costrutto che esprime FLP al fine di rimuovere la cassetta di neomicina integrata con FRT introdotta mediante il costrutto di puntamento. Facoltativamente si può rimuovere la cassetta di neomicina
 5 mediante l'allevamento di topi che esprimono la ricombinasi FRP (per esempio Brevetto americano No. US-6 774 279). Facoltativamente la cassetta di neomicina è ritenuta nei topi.

[170] **Vettore di puntamento VpreBJ λ 5 di linea germinale umana riarrangiato (FIG. 3).** In una maniera simile si produsse un locus di catena leggera progettato
 10 esprimente una regione VpreBJ λ 5 di linea germinale umana riarrangiata usando un costrutto di puntamento comprendente, dal 5' al 3', un braccio di omologia al 5' contenente sequenza al 5' rispetto al locus endogeno di catena leggera κ di topo ottenuto dal clone di BAC 302g12, un gene di resistenza a neomicina integrato con FRT, una sequenza genomica comprendente il promotore V κ 3-15 umano, una sequenza veloce del
 15 segmento genico di variabile V κ 3-7 di topo, una sequenza intronica del segmento genico di variabile V κ 3-7 di topo, uno schema di lettura aperto di una regione VpreBJ λ 5 di linea germinale umana riarrangiata, una sequenza genomica contenente una porzione dell'introne J κ -C κ umano e un braccio di omologia al 3' contenente la sequenza al 3' del segmento genico J κ 5 di topo endogeno ottenuto dal clone di BAC 254m04 di topo (Figura
 20 3, al centro). La sequenza del locus VpreBJ λ 5 umano progettato è illustrata nella ID di SEQ No: 15.

[171] Si confermò l'inserzione puntata della regione VpreBJ λ 5 di linea germinale umana riarrangiata nel DNA di BAC mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) usando inneschi posizionati in corrispondenza di sequenze entro la regione di catena

leggera VpreBJλ5 di linea germinale umana riarrangiata. In sintesi si confermò la sequenza intronica al 3' rispetto alla sequenza veloce Vκ3-7 di topo con gli inneschi ULC-m1F (ID di SEQ No: 2) e ULC-m1R (ID di SEQ No: 3). Si confermò lo schema di lettura aperto della regione VpreBJλ5 di linea germinale umana riarrangiata con gli inneschi 1616-h1F
 5 (TGTCCTCGGC CCTTGGA; ID di SEQ No: 16) e 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCCCT; ID di SEQ. No: 17). Si confermò la cassetta di neomicina con gli inneschi neoF (ID di SEQ No: 6) e neoR (ID di SEQ No: 7). Si usò poi DNA di BAC puntato per l'elettroporazione di cellule ES di topo per creare cellule ES modificate per la generazione di topi chimerici che esprimono la catena leggera VpreBJλ5 di linea germinale
 10 umana riarrangiata.

[172] Si confermano i cloni di cellule ES positivi mediante controllo e selezione TAQMAN™ e cariotipizzazione impiegando sonde specifiche alla regione di catena leggera VpreBJλ5 progettata inserita nel locus endogeno di catena leggera κ. In sintesi la sonda neoP (ID di SEQ No: 8) che si lega entro il gene marcatore di neomicina, la sonda
 15 ULC-m1P (ID di SEQ No: 9) che si lega entro la sequenza veloce IgVκ3-7 di topo e la sonda 1616h1P (ACAATCCGCC TCACCTGCAC CCT; ID di SEQ No: 18) che si lega entro lo schema di lettura aperto VpreBJλ5 umano. Si usano poi i cloni di cellule ES positivi da l'impianto in topi femmina per far nascere una figliata di cuccioli esprimenti una regione di catena leggera di linea germinale.

20 **[173]** Alternativamente si trasfettano cellule ES portatrici della regione di catena leggera VpreBJλ5 di linea germinale umana riarrangiata con un costrutto che esprime FLP al fine di rimuovere la cassetta di neomicina integrata con FRT introdotta mediante il costrutto di puntamento. Facoltativamente si rimuove la cassetta di neomicina mediante l'allevamento

ottenendo topi che esprimono la ricombinasi FRP (per esempio Brevetto americano No. US-6 774 279). Facoltativamente la cassetta di neomicina è ritenuta nei topi.

Esempio 3

Generazione di topi esprimenti una singola catena leggera umana riarrangiata

5 [174] Si usarono le cellule ES bersagliate descritte sopra come cellule ES donatrici e le si introdussero in un embrione di topo in stadio di 8 cellule mediante il metodo VELOCIMOUSE® (si veda, per esempio, il Brevetto americano No. US-7 294 754 e Poueymirou *et al.* (2007) Topi di generazione F0 che sono, sostanzialmente, interamente ricavati dalle cellule ES con geni bersagliati donatrici permettenti analisi fenotipiche
10 immediate Nature Biotech. 25(1): 91-99. Si identificano VELOCIMICE® portatori, indipendentemente, di una regione di catena leggera V κ 1-39J κ 5 di linea germinale umana progettata, di una regione di catena leggera V κ 3-20J κ 1 o di una regione di catena leggera VpreBJ λ 5 mediante genotipizzazione impiegando un'analisi di modificazione di allele (Valenzuela *et al.*, già citato) che rivela la presenza della particolare regione di catena
15 leggera di linea germinale umana riarrangiata.

[175] Si genotipizzano i cuccioli e si scelgono un cucciolo eterozigote od omozigote per la particolare regione di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata per l'espressione caratterizzante della regione di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata.

20 [176] **Citometria a flusso.** Si convalidò l'espressione della regione di catena leggera umana riarrangiata nel normale repertorio anticorpale di topi con catena leggera comune mediante analisi di espressione di κ e λ di immunoglobulina in splenociti e in sangue periferico di topi con catena leggera comune. Si produssero sospensioni cellulari provenienti da milze prelevate e da sangue periferico di topi di tipo selvatico (n=5),

eterozigoti per la catena leggera comune $V\kappa 1-39J\kappa 5$ (n=3), omozigoti per la catena leggera comune $V\kappa 1-39J\kappa 5$ (n=3), eterozigoti per la catena leggera comune $V\kappa 3-20J\kappa 1$ (n=2) e omozigoti per la catena leggera comune $V\kappa 3-20J\kappa 1$ (n=2) adottando metodi tradizionali e le si colorarono con $CD19^+$, $Ig\lambda^+$ e $Ig\kappa^+$ impiegando anticorpi integrati con marcatori
 5 fluorescenti (BD Pharmigen).

[177] In sintesi si fecero incubare 1×10^6 cellule con anti-CD16/CD32 di topo (clone 2.4G2, BD Pharmigen) su ghiaccio per 10 minuti a cui si fece seguire l'integrazione di marcatore con la seguente miscela di anticorpi per 30 minuti su ghiaccio: anti-CD19 di topo coniugato ad APC (clone 1D3, BD Pharmigen), anti-CD3 di topo coniugato a PerCP-Cy5.5 (clone 17A2, BioLegend), anti $Ig\kappa$ di topo coniugato a FITC (clone 187.1, BD Pharmigen), anti $Ig\lambda$ di topo coniugato a PE (clone RML-42, BioLegend). In seguito alla colorazione si lavarono le cellule e le si fissarono in 2% di formaldeide. Si eseguì l'acquisizione dei dati in un citometro a flusso LSRII e li si analizzarono con FlowJo. Circostrizione a un'area di calcolo: linfociti B totali ($CD19^+CD3^-$), linfociti B $Ig\kappa^+$ ($Ig\kappa^+Ig\lambda^-CD19^+CD3^-$), linfociti B $Ig\lambda^+$ ($Ig\kappa^-Ig\lambda^+CD19^+CD3^-$). I dati raccolti da campioni di sangue e di splenociti confermarono risultati simili. In Tabella 3 è riportata la percentuale di linfociti B $CD19^+$ positivi provenienti da sangue periferico di un topo rappresentativo proveniente da ciascun gruppo che sono $Ig\lambda^+$, $Ig\kappa^+$ o $Ig\lambda^+Ig\kappa^+$. La percentuale di linfociti B $CD19^+$ nel sangue periferico da topi di tipo selvatico (WT) e
 15
 20 omozigoti per la catena leggera comune $V\kappa 1-39J\kappa 5$ o $V\kappa 3-20J\kappa 1$ è rappresentata graficamente nella FIG. 4.

Tabella 3

Topo	Linfociti B $CD19^+$

	Ig λ ⁺	Ig κ ⁺	Ig λ ⁺ Ig κ ⁺
Tipo selvatico	4,8	93	0,53
V κ 1-39J κ 5	1,4	93	2,6
V κ 3-20J κ 1	4,2	88	6

[178] Espressione di catena leggera comune. Si analizzò l'espressione di ciascuna catena leggera comune (V κ 1-39J κ 5 e V κ 3-20J κ 1) in topi eterozigoti e omozigoti usando un saggio di PCR quantitativo (per esempio il TAQMAN™).

- 5 **[179]** In sintesi si purificarono linfociti B CD19⁺ provenienti dalle milze di topi di tipo selvatico, omozigoti per una sostituzione dei loci di regione variabile di catena pesante e di catena leggera κ di topo con loci di regione variabile di catena pesante e di catena leggera κ umana (H κ) corrispondenti, nonché di topi omozigoti ed eterozigoti per ciascuna regione di catena leggera umana riarrangiata (V κ 1-39J κ 5 o V κ 3-20J κ 1) usando sfere
- 10 Microbeads con CD19 di topo (Miltenyi Biotec) secondo le specifiche del produttore. Si purificò l'RNA totale proveniente da linfociti B CD19⁺ usando il corredo RNeasy Mini (Qiagen) secondo le specifiche del produttore e si rimosse l'RNA genomico usando un
- 15 trattamento in colonna con DNAsi priva di RNAsi (Qiagen). Si retro-trascrissero 200 ng di mRNA in cDNA usando il corredo di sintesi di primo filamento di cDNA First Strand (Invitrogen) e si amplificò il cDNA risultante con la miscela originale per PCR Universale Taqman Master Mix (Applied Biosystems). Si eseguirono tutte le reazioni usando il sistema di rivelazione di sequenze ABI 7900 (Applied Biosystems) usando inneschi e sonde MGB Taqman estententisi su (1) la giunzione V κ -J κ per entrambe le catene leggere comuni, (2) il solo gene di V κ (cioè V κ 1-39 e V κ 3-20) e (3) la regione C κ di topo. Nella

Tabella 4 sono riportate le sequenze degli inneschi e delle sonde impiegati per questa analisi. Si normalizzò l'espressione relativa all'espressione della regione Cκ di topo. I risultati sono rappresentati graficamente in FIG. 5A, 5B e 5C.

5

Tabella 4

Regione	Descrizione di innesco/sonda (5'-3')	ID di SEQ No:
Giunzione Vκ1- 39Jκ5	(senso) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	19
	(anti-senso) GTTTAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	20
	(sonda) CCTCCGATCA CCTTC	21
Vκ1-39	(senso) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	22
	(anti-senso) ATGGGACCCC ACTTTGCA	23
	(sonda) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	24
Giunzione Vκ3- 20Jκ1	(senso) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	25
	(anti-senso) TGATTTCCAC CTTGGTCCCT T	26
	(sonda) TAGCTCACCT TGGACGTT	27
Vκ3-20	(senso) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	28
	(anti-senso) GACCCACTGC CACTGAACCT	29
	(sonda) CCACTGGCAT CCC	30
Cκ di topo	(senso) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	31

Regione	Descrizione di innesco/sonda (5'-3')	ID di SEQ No:
	(anti-senso) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	32
	(sonda) ACCAAGGACG·AGTATGAA	33

- [180] Anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene.** Si immunizzarono topi con catena leggera comune portatori di una catena leggera comune V κ 1-39J κ 5 or V κ 3-20J κ 1 in corrispondenza del locus endogeno di catena leggera κ di topo con β -galattosidasi e si misurò il titolo anticorpale.
- [181]** In sintesi si emulsionò la β -galattosidasi (Sigma) in adiuvante titermax (Sigma) secondo le istruzioni del produttore. Si immunizzarono di tipo selvatico (n=7), omozigoti per la catena leggera comune V κ 1-39J κ 5 (n=2) e omozigoti per la catena leggera comune V κ 3-20J κ 1 (n=5) mediante iniezione sottocutanea con 100 μ g di β -galattosidasi/Titermax.
- Si richiamarono i topi mediante iniezione sottocutanea due volte a 3 settimane di intervallo con 50 μ g di β -galattosidasi/Titermax. Dopo il secondo richiamo si prelevò il sangue da topi anestetizzati impiegando un sanguinamento retro-orbitale in provette con separatore di siero (BD Biosciences) secondo le istruzioni del produttore. Per misurare gli anticorpi anti- β -galattosidasi IgM o IgG si rivestirono piastre per ELISA (Nunc) con 1 μ g/ml di β -galattosidasi per una notte intera a 4 °C. Si rimosse mediante lavaggio l'antigene in eccesso prima del blocco con PBS con 1% di BSA per un'ora a temperatura ambiente. Si aggiunsero alle piastre diluizioni seriali di siero e le si fecero incubare per un'ora a temperatura ambiente prima del lavaggio. Si fecero incubare poi le piastre con anti-IgM

(Southern Biotech) o anti-IgG coniugata con HRP (Southern Biotech) per un'ora a temperatura ambiente. In seguito a un altro lavaggio si svilupparono le piastre con substrato di TMB (BD Biosciences). Si fecero arrestare le reazioni con acido solforico 1 N e si lesse la OD₄₅₀ usando un lettore di piastre Victor X5 (Perkin Elmer). Si analizzarono i
 5 dati con GraphPad Prism e si calcolò il segnale come la diluizione del siero che è due volte al di sopra del fondo. I risultati sono rappresentati graficamente nelle FIGG. 6A e 6B.

[182] Come illustrato in questo Esempio il rapporto κ/λ dei linfociti B nei compartimenti sia splenico sia periferico dei topi con catena leggera comune V κ 1-39J κ 5 e V κ 3-20J κ 1 confermò un motivo quasi di tipo selvatico (Tabella 3 e FIG. 4). Tuttavia i topi con catena
 10 leggera comune VpreBJ λ 5 manifestarono meno linfociti B periferici dei quali l'1-2% circa esprimono la regione di catena leggera umana progettata (dati non illustrati). I livelli di espressione delle regioni di catena leggera umana riarrangiate V κ 1-39J κ 5 e V κ 3-20J κ 1 dal locus endogeno di catena leggera κ erano elevati in confronto a un locus endogeno di catena leggera κ contenente una sostituzione completa dei segmenti genici V κ e J κ di topo
 15 con i segmenti genici V κ e J κ umani (FIGG. 5A, 5B e 5C). I livelli di espressione della regione di catena leggera umana VpreBJ λ 5 riarrangiata manifestarono espressione alta simile dal locus endogeno di catena leggera κ in topi sia eterozigoti sia omozigoti (dati non illustrati). Questo conferma che, in competizione diretta con la λ , la κ o con entrambi i loci di catena leggera di topo endogeni, una singola sequenza V_L/J_L umana riarrangiata può
 20 fornire un'espressione di livello migliore di quello del tipo selvatico dal locus endogeno di catena leggera κ e dare origine a una frequenza normale nelle cellule spleniche e nei linfociti B. Inoltre la presenza di un locus di catena leggera κ progettato avente una sequenza V κ 1-39J κ 5 umana o V κ 3-20J κ 1 umana fu tollerata bene dai topi e sembra che funzioni in una maniera di tipo selvatico rappresentando una porzione sostanziosa del

repertorio di catene leggere nella componente umorale della reazione immune (FIG 6A e 6B).

Esempio 4

Allevamento di topi esprimenti una singola catena leggera di linea germinale umana riarrangiata

[183] Questo Esempio descrive parecchi altri ceppi di topo modificato geneticamente che si possono allevare per ottenere uno qualsiasi dei topi con catena leggera comune descritti qui per creare molteplici ceppi di topo modificato geneticamente annidanti molteplici loci di immunoglobulina modificata geneticamente.

10 [184] **Soppressione (KO) di $Ig\lambda$ endogena.** Per ottimizzare l'utilizzo del locus di catena leggera progettato si allevano topi portatori di una delle regioni di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata per ottenere un altro topo contenente una delezione nel locus endogeno di catena leggera λ . In questo modo la progenie ottenuta esprimerà, come loro sola catena, la regione di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata come
 15 descritto nell'Esempio 2. Si effettua l'allevamento mediante tecniche tradizionali riconosciute nel settore e, alternativamente, mediante un allevatore commerciale (per esempio The Jackson Laboratory). Si controllano e selezionano ceppi di topo portatori di un locus di catena leggera progettato e di una delezione del locus endogeno di catena leggera λ relativamente alla presenza della particolare regione di catena leggera e
 20 all'assenza di catene leggere λ di topo endogene.

[185] **Locus endogeno di catena pesante umanizzato.** Si allevano topi portatori di un locus di catena leggera di linea germinale umana progettata con topi che contengono una sostituzione del locus genico endogeno di variabile di catena pesante di topo con il locus genico di variabile di catena pesante umana (si veda il Brevetto americano No. US-6 596

541; il topo VELOCIMMUNE®, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). Il topo VELCIMMUNE® comprende un genoma comprendente regioni variabili di catena pesante umana unite funzionalmente a loci endogeni di regione costante di topo cosicché il topo produca anticorpi comprendenti una regione variabile di catena pesante umana e una
 5 regione costante di catena pesante di topo in reazione a stimolazione antigenica. Si isola il DNA codificante le regioni variabili delle catene pesanti degli anticorpi e lo si unisce funzionalmente a DNA codificante le regioni costanti di catena pesante umana. Si fa poi esprimere il DNA in una cellula idonea a esprimere la catena pesante interamente umana dell'anticorpo.

10 **[186]** Si ottengono topi portatori di una sostituzione del locus V_H di topo endogeno con il locus V_H umano e una singola regione V_L di linea germinale umana riarrangiata in corrispondenza del locus endogeno di catena leggera κ . Si ottengono anticorpi chimerici inversi contenenti catene pesanti (V_H umana e C_H di topo) mutate somaticamente con una
 15 singola catena leggera umana (V_L umana e C_L di topo) al momento dell'immunizzazione con un antigene di interesse. Si identificano le sequenze nucleotidiche V_H e V_L di linfociti B esprimenti gli anticorpi e si producono anticorpi interamente umani mediante fusione delle sequenze nucleotidiche V_H e V_L a sequenze nucleotidiche C_H e C_L umane in un sistema di espressione adatto.

Esempio 5

20 **Generazione di anticorpi provenienti da topi esprimenti catene pesanti umane e una regione di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata**

[187] Dopo avere allevato topi che contengono la regione di catena leggera umana progettata per ottenere svariati ceppi desiderati contenenti modificazioni e delezioni di altri

loci di Ig endogeni (come descritto nell'Esempio 4) si possono immunizzare topi selezionati con un antigene di interesse.

[188] In generale si sottopone a prova di immunità mediante la somministrazione di un antigene un topo VELOCIMMUNE® contenente una delle singole regioni di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata e si recuperano cellule linfatiche (come, per esempio, i linfociti B) dal siero degli animali. Si fanno fondere le cellule linfatiche con una linea di cellule di mieloma per preparare linee di cellule di ibridoma immortali e si controllano e selezionano tali linee di cellule di ibridoma per identificare linee di cellule di ibridoma che producono anticorpi contenenti variabili di catena pesante umana e una catene leggere di linea germinale umana riarrangiate che sono specifiche all'antigene impiegato per l'immunizzazione. Si isolano il DNA codificante le regioni variabili delle catene pesanti e della catena leggera e li si uniscono a regioni costanti isotipiche desiderate della catena pesante e della catena leggera. A causa della presenza delle sequenze endogene di topo e di eventuali altri elementi ad azione dalla stessa molecola presenti nel locus endogeno si può far mutare somaticamente la singola catena leggera di ciascun anticorpo. Questo aggiunge ulteriore varietà al repertorio specifico ad antigene comprendente una singola di catena leggera e svariate di sequenze di catena pesante. Si fanno esprimere successivamente le sequenze anticorpali clonate risultanti in una cellula come, per esempio, una cellula CHO. Alternativamente si identifica il DNA codificante gli anticorpi chimerici specifici ad antigene o i domini variabili delle catene leggera e pesante direttamente da linfociti specifici ad antigene.

[189] All'inizio si isolano anticorpi chimerici di alta affinità aventi una regione variabile umana e una regione costante di topo. Come descritto sopra si caratterizzano e selezionano gli anticorpi per caratteristiche desiderate comprendenti l'affinità, la selettività, l'epitopo e

così via. Le regioni costanti di topo sono sostituite con una regione costante umana desiderata per generare l'anticorpo interamente umano contenente una catena pesante umana mutata somaticamente e una singola catena leggera ricavata da una regione di catena leggera di linea germinale umana riarrangiata dell'invenzione. Regioni costanti
5 umane adatte comprendono, per esempio, IgG1 o IgG4 di tipo selvatico o modificata.

[190] Si immunizzarono coorti distinte di topi VELOCIMMUNE® contenenti una sostituzione del locus endogeno di catena pesante di topo con segmenti genici V_H , D_H e J_H umani e una sostituzione del locus endogeno di catena leggera κ di topo con la regione di catena leggera umana $V\kappa 1-39J\kappa 5$ di linea germinale progettata o la regione di catena
10 leggera umana $V\kappa 3-20J\kappa 1$ di linea germinale progettata (descritta sopra) con una proteina di recettore di superficie cellulare umana (Antigene E). Si somministra l'antigene E direttamente sul cuscinetto di zampa posteriore di topi con sei iniezioni consecutive ogni 3-4 giorni. Si miscelano da due a tre microgrammi di Antigene E con 10 μg di oligonucleotide con CpG (Cat No. t1rl-modn – oligonucleotide ODN1826; InVivogen, San
15 Diego, California) e 25 μg di Adju-Phos (adiuvante in gel di fosfato di alluminio, Cat No. H-71639-250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Danimarca) prima dell'iniezione. Si somministra un totale di sei iniezioni prima del richiamo con antigene finale che si somministra 3-5 giorni prima del sacrificio. Si raccolgono i sanguinamenti dopo la 4a e la 6a iniezione e si controlla la reazione immune anticorpale mediante un dosaggio
20 immunologico specifico ad antigene tradizionale.

[191] Quando si realizza una reazione immune desiderata si raccolgono gli splenociti e li si fanno fondere con cellule di mieloma di topo per proteggerne la vitalità e la formazione di linee di cellule di ibridoma. Si controllano le linee di cellule di ibridoma e le si selezionano per identificare linee di cellule che producono anticorpi con catena leggera

comune specifici ad antigene E. Usando questa tecnica si ottengono parecchi anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene E (cioè anticorpi che posseggono domini variabili di catena pesante umana, lo stesso dominio variabile di catena leggera umana e domini costanti di topo).

5 [192] Alternativamente si isolano anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E direttamente da linfociti B positivi ad antigene senza la fusione a cellule di mieloma come descritto nella Pubblicazione No. US-2007/0280945-A1, integrata qui, in particolare, mediante riferimento nella sua interezza. Adottando questo metodo si ottennero parecchi anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E interamente umani (cioè anticorpi che
10 possedevano domini variabili di catena pesante umani, una regione di catena leggera Vκ1-39Jκ5 umana progettata o una di catena leggera Vκ3-20Jκ1 umana progettata e domini costanti umani).

[193] Le proprietà biologiche degli anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E esemplificativi generati in conformità con i metodi di questo Esempio sono descritte in
15 dettaglio nelle sezioni esposte nel seguito.

Esempio 6

Utilizzo di segmenti genici di catena pesante in anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene

[194] Per analizzare la struttura degli anticorpi con catena leggera comune anti-antigene
20 E umani prodotti si clonarono e sequenziarono acidi nucleici codificanti regioni variabili di catena pesante anticorpale. Dalle sequenze di acido nucleico e dalle sequenze aminoacidiche predette degli anticorpi si identificò l'utilizzo dei geni relativamente alla regione variabile di catena pesante (HCVR) di anticorpi con catena leggera comune scelti ottenuti da topi VELOCIMMUNE® immunizzati contenenti la regione di catena leggera

Vκ1-39Jκ5 umana progettata o di catena leggera Vκ3-20Jκ1 umana progettata. I risultati sono riportati nelle Tabella 5 e 6 che confermano che i topi secondo l'invenzione generano anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigeni provenienti da una varietà di segmenti genici di catena pesante umana a causa di una varietà di riarrangiamenti quando si impiega un topo che esprime una catena leggera proveniente solo da una catena leggera ricavata da Vκ1-39 umana o da Vκ3-20 umana. I segmenti genici V_H umani delle famiglie 2, 3, 4 e 5 si riarrangiavano con una varietà di segmenti D_H umani e di segmenti J_H umani per fornire anticorpi specifici ad antigeni.

Tabella 5

Vκ1-39Jκ5							
Anticorpi con catena leggera comune							
Anticorpo	HCVR			Anticorpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
2952	2-5	6-6	1	6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1	6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1	2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5	2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4	3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4	3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4	5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4	6002	3-30	6-13	4

Vκ1-39Jκ5							
Anticorpi con catena leggera comune							
Anticorpo	HCVR			Anticorpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
6011	3-23	7-27	4	6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4	6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4	6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4	6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4	6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4	6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4	6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4	6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4	6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4	2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4	2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5	2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5	3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5	3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2	3020	3-30	7-27	4

VK1-39JK5							
Anticorpi con catena leggera comune							
Anticorpo	HCVR			Anticorpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
3013	3-30	5-12	4	3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4	3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1	3030	3-30	7-27	4
3043	3-30	6-6	3	3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4	5997	3-30	7-27	4
2949	3-30	6-6	5	6033	3-30	7-27	4
2950	3-30	6-6	5	3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5	6028	3-30	7-27	6
2978	3-30	6-6	5	3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5	3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5	6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5	6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5	6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5	6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5	6037	4-59	3-16	3

VK1-39JK5							
Anticorpi con catena leggera comune							
Anticorpo	HCVR			Anticorpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
6004	3-30	6-6	5	2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5	3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5	3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5	6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5	6006	1-69	6-6	5
6023	3-30	6-6	5	6008	1-69	6-13	4

Tabella 6

Anticorpi con catena leggera comune

VK3-20JK1

Anticorpo	HCVR			Anticorpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
5989	3-30	3-3	3	5992	4-39	1-26	3
5994	3-33	1-7	4	2975	5-51	6-13	5
5985	3-33	2-15	4	2972	5-51	3-16	6
5987	3-33	2-15	4	5986	5-51	3-16	6

 Anticorpi con catena leggera comune

 VK3-20JK1

Anticorpo	HCVR			Anticorpo	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
5995	3-33	2-15	4	5993	5-51	3-16	6
2968	4-39	1-26	3	5996	5-51	3-16	6
5988	4-39	1-26	3	5984	3-53	1-1	4
5990	4-39	1-26	3				

Esempio 7
Determinazione dell'idoneità al blocco degli anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene mediante il saggio LUMINEX™

5 [195] Si esaminarono novantotto anticorpi con catena leggera comune umana ottenuti contro l'antigene E relativamente alla loro idoneità a bloccare il legame del legante naturale dell'antigene E (il legante Y) all'antigene E in un'analisi basata su sferette.

[196] Si fece coniugare il dominio extracellulare (ECD) di antigene E a due etichette epitopiche di myc e a un'etichetta di istidina 6X (antigene E-mmH) e lo si fece accoppiare
 10 tramite ammine a microsferi carbossilate a una concentrazione di 20 µg/ml in tampone a base di MES. Si fece incubare la miscela per due ore a temperatura ambiente, a cui si fece seguire la disattivazione delle sferette con Tris 1 M a pH 8,0 a cui si fece seguire il lavaggio in PBS con 0,05 % (v/v) di Tween-20. Si bloccarono poi le sferette con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contenente 2% (p/v) di BSA (Sigma Aldrich Corp., St.

Louis, MO). In una piastra filtro a 96 pozzetti si diluirono 1:15 in tampone i surnatanti contenenti anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene E. Si preparò un controllo negativo contenente un surnatante di riferimento con le componenti del terreno uguali a quelle per il surnatante di anticorpo. Si aggiunsero sferette integrate con marcatore di antigene E ai surnatanti e le si fecero incubare per una notte intera a 4 °C. Si aggiunse proteina di legante Y biotinilata fino a una concentrazione finale di 0,06 nM e la si fece incubare per due ore a temperatura ambiente. Si determinò la rivelazione di legante Y biotinilato legato a sferette integrate con marcatore di antigene E-myc-myc-6His con R-ficoeritrina coniugata a streptavidina (Moss Inc, Pasadena, MD) a cui si fece seguire la misurazione in un analizzatore basato su citometria a flusso LUMINEX™. Si sottrasse l'intensità di fluorescenza media di fondo (MFI) di un campione senza il legante Y da tutti i campioni. Si calcolò il blocco in percentuale mediante la divisione dell'MFI dalla quale si era sottratto il fondo di ciascun campione per il valore di controllo negativo corretto, la moltiplicazione per 100 e la sottrazione del valore risultante da 100.

[197] In un esperimento simile si esaminarono gli stessi 98 anticorpi con catena leggera comune umani ottenuti contro l'antigene E relativamente alla loro idoneità a bloccare il legame dell'antigene E a sferette integrate con marcatore di legante Y.

[198] In sintesi si fece accoppiare tramite le ammine il legante Y a microsferette carbossilate a una concentrazione di 20 µg/ml diluito in tampone a base di MES. La miscela e si fa incubare due ore a temperatura ambiente a cui si fece seguire disattivazione delle sferette con Tris 1 M a pH 8, poi il lavaggio in PBS con 0,05 % (v/v) di Tween-20. Si bloccarono poi le sferette con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contenenti 2% (p/v) di BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). In una piastra di filtro a 96 pozzetti si diluirono a 1:15 in tampone i surnatanti contenenti anticorpi con catena leggera comune

specifici ad antigene E. Si preparò un controllo negativo contenente un surnatante di riferimento con le componenti del terreno uguali a quelle per il surnatante di anticorpo. Si aggiunse un antigene E-mmH biotinilato fino a una concentrazione finale di 0,42 nM e lo si fece incubare per una notte intera a 4 °C. Si aggiunsero poi sferette integrate con
 5 marcatore di legante Y alla miscela di anticorpo/antigene E e le si fecero incubare per due ore a temperatura ambiente. Si determinò la rivelazione di antigene E-mmH biotinilato legato a sferette integrate con marcatore di legante Y con R-ficoeritrina coniugata a streptavidina (Miss Inc, Pasadena, MD) a cui si fece seguire la misurazione in un
 10 analizzatore basato su citometria a flusso LUMINEX™. Si sottrasse l'intensità di fluorescenza media di fondo (MFI) di un campione senza l'antigene E da tutti i campioni. Si calcolò il blocco in percentuale mediante la divisione dell'MFI dalla quale si era sottratto il fondo di ciascun campione per il valore di controllo negativo corretto, la moltiplicazione per 100 e la sottrazione del valore risultante da 100.

[199] Nelle Tabelle 7 e 8 è riportato il blocco in percentuale relativo a tutti i 98 anticorpi
 15 con catena leggera comune anti-antigene E testati in entrambi i saggi LUMINEX™. ND: non determinato nelle attuali condizioni sperimentali.

Tabella 7

Anticorpi con catena leggera comune		
Vκ1-39Jκ5		
Anticorpo	% di blocco di sferette integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
2948	81,1	47,8
2948G	38,6	ND

Anticorpi con catena leggera comune		
Vκ1-39Jκ5		
Anticorpo	% di blocco di sfere integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
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

Anticorpi con catena leggera comune		
Vκ1-39Jκ5		
Anticorpo	% di blocco di sfere integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
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

Anticorpi con catena leggera comune		
Vκ1-39Jκ5		
Anticorpo	% di blocco di sferette integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
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

Anticorpi con catena leggera comune		
Vκ1-39Jκ5		
Anticorpo	% di blocco di sfere integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
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

Anticorpi con catena leggera comune		
Vκ1-39Jκ5		
Anticorpo	% di blocco di sfere integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
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

Tabella 8

Anticorpi con catena leggera comune		
VK3-20JK1		
Anticorpo	% di blocco di sferette integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
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

Anticorpi con catena leggera comune		
Vκ3-20Jκ1		
Anticorpo	% di blocco di sferette integrate con marcatore di antigene E	% di blocco di antigene E in soluzione
2976	1,0	1,0
2976G	50,4	20,4

[200] Nel primo esperimento con LUMINEX™ descritto sopra si esaminarono 80 anticorpi con catena leggera comune contenenti la catena leggera Vκ1-39Jκ5 progettata relativamente alla loro idoneità a bloccare il legame del legante Y a sferette integrate con marcatore di antigene E. Di questi 80 anticorpi con catena leggera comune 68 manifestarono >50% di blocco mentre 12 manifestarono <50% di blocco (6 a 20-25% di blocco e 6 a <25% di blocco). Per i 18 anticorpi con catena leggera comune contenenti la catena leggera progettata Vκ3-20Jκ1 12 manifestarono >50% di blocco mentre 6 manifestarono <50% di blocco (3 a 25-50% di blocco e 3 a <25% di blocco) di legame del legante Y a sferette integrate con marcatore di antigene E.

[201] Nel secondo esperimento con LUMINEX™ descritto sopra si esaminarono gli stessi 80 anticorpi con catena leggera comune contenenti la catena leggera progettata Vκ1-39Jκ5 relativamente alla loro idoneità a bloccare il legame di antigene E a sferette integrate con marcatore di legante Y. Di questi 80 anticorpi con catena leggera comune 36 manifestarono >50% di blocco mentre 44 manifestarono <50% di blocco (27 a 20-25% di blocco e 17 a <25% di blocco). Per i 18 anticorpi con catena leggera comune contenenti la catena leggera progettata Vκ3-20Jκ1 uno manifestò >50% di blocco mentre 17

manifestarono <50% di blocco (5 a 25-50% di blocco e 12 a <25% di blocco) di legame di antigene E a sferette integrate con marcatore di legante Y.

[202] I dati delle Tabelle 7 e 8 stabiliscono che i riarrangiamenti descritti nelle Tabelle 5 e 6 generarono anticorpi con catena leggera comune specifici anti-antigene E che bloccarono il legame del legante Y al suo antigene E di recettore affine con svariati gradi di efficacia, cosa che è in linea con gli anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E delle Tabelle 5 e 6 comprendenti anticorpi con specificità a epitopo sovrapposte e non sovrapposte rispetto all'antigene E.

Esempio 8

10 Determinazione dell'idoneità al blocco di anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene mediante ELISA

[203] Si esaminarono anticorpi con catena leggera comune umana ottenuti contro l'antigene E relativamente alla loro idoneità a bloccare il legame di antigene E a una superficie rivestita con il legante Y in un saggio ELISA.

15 [204] Si rivestirono con il legante Y piastre a 96 pozzetti a una concentrazione di 2 µg/ml diluito in PBS e le si fecero incubare per una notte intera a cui si fece seguire il lavaggio quattro volte in PBS con 0,05 % di Tween-20. Si bloccò poi la piastra con PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contenente 0,5 % (p/v) di BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) per un'ora a temperatura ambiente. In una piastra distinta si diluirono a
20 1:10 in tampone surnatanti contenenti anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E. Si usò come controllo negativo un surnatante di riferimento con le stesse componenti degli anticorpi. Si aggiunse un antigene E-mmH (descritto sopra) fino a una concentrazione finale di 0,150 nM e lo si fece incubare per un'ora a temperatura ambiente. Si aggiunse poi la miscela di anticorpo/antigene E-mmH alla piastra contenente il legante Y e la si fece

- incubare per un'ora a temperatura ambiente. Si determinò la rivelazione di antigene E-mmH legato al legante Y con perossidasi di barbaforte (HRP) coniugata ad anticorpo anti-Penta-His (Qiagen, Valencia, CA) e la si sviluppò mediante reazione colorimetrica tradizionale usando substrato di tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Jose, CA) neutralizzato con acido solforico. Si lesse l'assorbanza in corrispondenza di OD450 per 0,1 s. Si sottrasse l'assorbanza di fondo di un campione senza l'antigene E da tutti i campioni. Si calcolò il blocco in percentuale mediante la divisione dell'MFI dalla quale si era sottratto il fondo di ciascun campione per il valore di controllo negativo corretto, la moltiplicazione per 100 e la sottrazione del valore risultante da 100.
- 10 [205] Nelle Tabelle 9 e 10 è riportato il blocco in percentuale relativo a tutti i 98 anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E esaminati nel saggio ELISA. ND: non determinato nelle attuali condizioni sperimentali.

Tabella 9

Anticorpi con catena leggera comune			
VK1-39JK5			
Anticorpo	% di blocco di antigene E in soluzione	Anticorpo	% di blocco di antigene E in soluzione
2948	21,8	3015	23,7
2948G	22,9	3015G	10,2
2949	79,5	3016	78,1
2949G	71,5	3016G	37,4
2950	80,4	3017	61,6

2950G	30,9	3017G	25,2
2952	66,9	3018	40,6
2952G	47,3	3018G	14,5
2954	55,9	3019	94,6
2954G	44,7	3019G	92,3
2955	12,1	3020	80,8
2955G	25,6	3020G	ND
2964	34,8	3021	7,6
2964G	47,7	3021G	20,7
2978	90,0	3022	2,4
2978G	90,2	3022G	15,0
2982	59,0	3023	9,1
2982G	20,4	3023G	19,2
2985	10,5	3024	7,5
2985G	ND	3024G	15,2
2987	31,4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13,9
2996	29,3	3027	61,4
2996G	ND	3027G	82,7
2997	48,7	3028	40,3

2997G	ND	3028G	12,3
3004	16,7	3030	ND
3004G	3,5	3030G	9,5
3005	87,2	3032	ND
3005G	54,3	3032G	13,1
3010	74,5	3033	77,1
3010G	84,6	3033G	32,9
3011	19,4	3036	17,6
3011G	ND	3036G	24,6
3012	45,0	3041	59,3
3012G	12,6	3041G	30,7
3013	39,0	3042	39,9
3013G	9,6	3042G	16,1
3014	5,2	3043	57,4
3014G	17,1	3043G	46,1

Tabella 10

Anticorpi con catena leggera comune

Vκ3-20Jκ1

Anticorpo	% di blocco di antigene E in soluzione	Anticorpo	% di blocco di antigene E in soluzione
2968	68,9	2972G	35,7
2968G	15,2	2973	20,7
2969	10,1	2973G	23,1
2969G	23,6	2974	ND
2970	34,3	2974G	22,0
2970G	41,3	2975	8,7
2971	6,3	2975G	19,2
2971G	27,1	2976	4,6
2972	9,6	2976G	26,7

[206] Come descritto in questo Esempio degli 80 anticorpi con catena leggera comune contenenti la catena leggera Vκ1-39Jκ5 progettata esaminati relativamente alla loro idoneità a bloccare il legame dell'antigene E a una superficie rivestita con il legante Y 22

5 manifestarono >50% di blocco, mentre 58 manifestarono <50% di blocco (20 a 25-50% di blocco e 38 a <25% di blocco). Per i 18 anticorpi con catena leggera comune contenenti la catena leggera progettata Vκ3-20Jκ1 uno manifestò >50% di blocco mentre 17 manifestarono <50% di blocco (5 a 25-50% di blocco e 12 a <25% di blocco) di legame di antigene E a una superficie rivestita con il legante Y.

[207] Questi risultati sono anche in linea con il gruppo di anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene E comprendenti anticorpi con specificità a epitopo sovrapposte e non sovrapposte rispetto all'antigene E.

Esempio 9

5 Determinazione di affinità con BIACORE™ per anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene

[208] Si determinarono le costanti di dissociazione (K_D) all'equilibrio per surnatanti di anticorpi scelti mediante SPR (risonanza plasmonica di superficie) usando uno strumento BIACORE™ T100 (GE Healthcare). Si ottennero tutti i dati usando HBS-EP (Hepes 10
10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,3 mM, 0,05 % di tensioattivo P20, pH 7,4) come tampone sia di corsa, sia di campione a 25 °C. Si catturarono gli anticorpi da campioni di surnatante grezzo su una superficie di biosensore CM25 derivatizzata in precedenza con un'alta densità di anticorpi anti-Fc umano usando chimica di accoppiamento di ammine tradizionale. Durante la fase di cattura si iniettarono i surnatanti su tutta la superficie di
15 anti-Fc umano a una portata di flusso di 3 μ l/min per un totale di 3 minuti. La fase di cattura fu seguita da un'iniezione di tampone di corsa o di analita a una concentrazione di 100 nM per 2 minuti a una portata di flusso di 35 μ l/min. Si controllò la dissociazione di antigene dall'anticorpo catturato per 6 minuti. Si rimosse l'anticorpo catturato mediante una breve iniezione di glicina 10 mM, pH 1,5. Si raffrontarono due volte tutti i
20 sensorgrammi mediante la sottrazione dei sensorgrammi da iniezioni di tampone dai sensorgrammi degli analiti, rimuovendo in tal modo le deviazioni causate dalla dissociazione dell'anticorpo dalla superficie di cattura. Si adattarono i dati di legame relativi a ciascun anticorpo a un modello di legame 1:1 con trasporto di massa usando il software di valutazione BIAcore T100 v2.1. I risultati sono riportati nelle Tabelle 11 e 12.

Tabella 11

Anticorpi con catena leggera comune					
VK1-39JK5					
Anticorpo	Antigene E 100 nM		Anticorpo	Antigene E 100 nM	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)		K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2948	8,83	28	3015	29,1	11
2948G	95,0	1	3015G	65,9	0
2949	3,57	18	3016	4,99	17
2949G	6,37	9	3016G	18,9	4
2950	4,91	17	3017	9,83	8
2950G	13,6	5	3017G	55,4	2
2952	6,25	7	3018	11,3	36
2952G	7,16	4	3018G	32,5	3
2954	2,37	24	3019	1,54	59
2954G	5,30	9	3019G	2,29	42
2955	14,4	6	3020	5,41	39
2955G	12,0	4	3020G	41,9	6
2964	14,8	6	3021	50,1	6
2964G	13,0	9	3021G	26,8	4
2978	1,91	49	3022	25,7	17

2978G	1,80	58	3022G	20,8	12
2982	6,41	19	3023	263	9
2982G	16,3	9	3023G	103	5
2985	64,4	9	3024	58,8	7
2985G	2,44	8	3024G	7,09	10
2987	21,0	11	3025	35,2	6
2987G	37,6	4	3025G	42,5	8
2996	10,8	9	3027	7,15	6
2996G	24,0	2	3027G	4,24	18
2997	7,75	19	3028	6,89	37
2997G	151	1	3028G	7,23	22
3004	46,5	14	3030	46,2	7
3004G	1,93	91	3030G	128	3
3005	2,35	108	3032	53,2	9
3005G	6,96	27	3032G	13,0	1
3010	4,13	26	3033	4,61	17
3010G	2,10	49	3033G	12,0	5
3011	59,1	5	3036	284	12
3011G	41,7	5	3036G	18,2	10
3012	9,71	20	3041	6,90	12

Anticorpi con catena leggera comune					
VK1-39Jκ5					
Anticorpo	Antigene E 100 nM		Anticorpo	Antigene E 100 nM	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)		K _D (nM)	T _{1/2} (min)
3012G	89,9	2	3041G	22,9	2
3013	20,2	20	3042	9,46	34
3013G	13,2	4	3042G	85,5	3
3014	213	4	3043	9,26	29
3014G	36,8	3	3043G	13,1	22

Tabella 12

Anticorpi con catena leggera comune					
VK3-20Jκ1					
Anticorpo	Antigene E 100 nM		Anticorpo	Antigene E 100 nM	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)		K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2968	5,50	8	2973	5,35	39
2968G	305	0	2973G	11,0	44
2969	34,9	2	2974	256	0
2969G	181	1	2974G	138	0
2970G	12,3	3	2975	38,0	2

Anticorpi con catena leggera comune					
Vκ3-20Jκ1					
Anticorpo	Antigene E 100 nM		Anticorpo	Antigene E 100 nM	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)		K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2971G	32,8	22	2975G	134	1
2972	6,02	13	2976	6,73	10
2972G	74,6	26	2976G	656	8

[209] Le affinità di legame di anticorpi con catena leggera comune comprendenti i riarrangiamenti riportati nelle Tabella 5 e 6 variano, con quasi tutti che esibiscono una K_D nell'intervallo nanomolare. I dati di affinità sono in linea con quelli di anticorpi con catena

5 leggera comune risultanti dall'associazione combinatoria dei domini variabili riarrangiati descritti nelle Tabelle 5 e 6 che sono di alta affinità, selezionati clonalmente e mutati somaticamente. Accoppiati con dati illustrati in precedenza gli anticorpi con catena leggera comune descritti nelle Tabelle 5 e 6 comprendono una raccolta di anticorpi di alta affinità variegati che esibiscono specificità per uno o più epitopi sull'antigene E.

10 **Esempio 10**

Determinazione di specificità di legame di anticorpi con catena leggera comune specifici ad antigene mediante l'analisi LUMINEX™

[210] Si esaminarono anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E selezionati relativamente alla loro idoneità a legarsi al ECD di antigene E e agli ECD di varianti di

15 antigene E comprendenti l'ortologo di scimmia cinomolgo (Antigene E *Mf*) che è diverso

dalla proteina umana nel 10% circa dei suoi residui aminoacidici; un mutante di delezione di antigene E al quale mancano gli ultimi 10 aminoacidi dall'estremità carbossilica del ECD (Antigene E- Δ CT); e due mutanti contenenti una sostituzione di alanina in posizioni sospettate di interazione con il legante Y (Antigene E-Ala1 e Antigene E-Ala2). Si
5 produssero le proteine di antigene E in cellule CHO e ciascuna conteneva un'etichetta di myc-myc-His all'estremità carbossilica.

[211] Per gli studi di legame si catturò la proteina di ECD o la proteina variante di antigene E (descritta sopra) da 1 ml di terreno di coltura mediante incubazione per 2 ore a temperatura ambiente con 1×10^6 sfere Microsphere (LUMINEX™) rivestite mediante
10 legame covalente con un anticorpo monoclonale anti-myc (MAb 9E10, linea di cellule di ibridoma CRL-1729™; ATCC, Manassas, VA). Si lavarono poi le sfere con PBS prima dell'uso. Si diluirono a 1:4 in tampone i surnatanti contenenti anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E e li si aggiunsero a piastre di filtro a 96 pozzetti. Come controllo negativo si usò un surnatante di riferimento senza alcun anticorpo. Si aggiunsero poi le
15 sfere contenenti le proteine di antigene E catturate ai campioni anticorpali (3000 sfere per pozzetto) e le si fecero incubare per una notte intera a 4 °C. Il giorno successivo si lavarono le sfere campione e si rivelò l'anticorpo con catena leggera comune legato con anticorpo anti-IgG umana coniugato con R-ficoeritrina. Si misurò l'intensità di fluorescenza delle sfere (100 sfere circa contate per ciascun campione di anticorpo
20 che si lega a ciascuna proteina di antigene E) con un analizzatore basato su citometria a flusso LUMINEX™ e si registrò l'intensità di fluorescenza media (MFI) almeno per 100 sfere conteggiate per interazione sfera/anticorpo. I risultati sono riportati nelle Tabelle 13 e 14.

Tabella 13

Anticorpi con catena leggera comune Vκ1-39Jκ5					
Anticorpo	Intensità di fluorescenza media (MFI)				
	Antigene E- ECD	Antigene E- ΔCT	Antigene E- Ala1	Antigene E- Ala2	Antigene E <i>Mf</i>
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452

Anticorpi con catena leggera comune Vκ1-39Jκ5					
Anticorpo	Intensità di fluorescenza media (MFI)				
	Antigene E- ECD	Antigene E- ΔCT	Antigene E- Ala1	Antigene E- Ala2	Antigene E <i>Mf</i>
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

Anticorpi con catena leggera comune Vκ1-39Jκ5					
Anticorpo	Intensità di fluorescenza media (MFI)				
	Antigene E- ECD	Antigene E- ΔCT	Antigene E- Ala1	Antigene E- Ala2	Antigene E <i>Mf</i>
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
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

Anticorpi con catena leggera comune Vκ1-39Jκ5					
Anticorpo	Intensità di fluorescenza media (MFI)				
	Antigene E- ECD	Antigene E- ΔCT	Antigene E- Ala1	Antigene E- Ala2	Antigene E <i>Mf</i>
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

Anticorpi con catena leggera comune Vκ1-39Jκ5					
Anticorpo	Intensità di fluorescenza media (MFI)				
	Antigene E- ECD	Antigene E- ΔCT	Antigene E- Ala1	Antigene E- Ala2	Antigene E <i>Mf</i>
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
3041 G	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

Tabella 14

Anticorpi con catena leggera comune Vκ3-20Jκ1					
Anticorpo	Intensità di fluorescenza media (MFI)				
	Antigene E- ECD	Antigene E- ΔCT	Antigene E- Ala1	Antigene E- Ala2	Antigen E <i>Mf</i>
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

Anticorpi con catena leggera comune Vκ3-20Jκ1					
Anticorpo	Intensità di fluorescenza media (MFI)				
	Antigene E- ECD	Antigene E- ΔCT	Antigene E- Ala1	Antigene E- Ala2	Antigen E <i>Mf</i>
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

[212] I surnatanti di anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E esibirono un alto legame specifico alle sfere unite ad antigene E-ECD. Per queste sfere il surnatante di riferimento di controllo negativo si tradusse in un segnale trascurabile (<10

5 MFI) quando lo si combinò con il campione di sfere con antigene E-ECD mentre i surnatanti contenenti anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E esibivano un segnale di legame intenso (MFI media di 2627 per i surnatanti di 98 anticorpi; MFI>500 per 91/98 campioni anticorpali).

[213] Come misura dell'idoneità degli anticorpi con catena leggera comune anti-antigene E scelti a identificare epitopi diversi sul ECD di antigene E, o antigene E-ECD, si determinò il legame relativo degli anticorpi alle varianti. Si catturarono tutte le quattro varianti di antigene E sulle sfere anti-myc LUMINEX™ come descritto sopra per gli studi di legame ad antigene E-ECD nativo e si determinarono i rapporti di legame relativo ($MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{antigene E-ECD}}$). Per i surnatanti dei 98 anticorpi con catena leggera comune

10

esaminati riportati nelle Tabelle 12 e 13 i rapporti medi ($MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{antigene E-ECD}}$) erano diversi per ciascuna variante, probabilmente riflettendo le diverse entità di cattura di proteine sulle sferette (rapporti medi di 0,61, 2,9, 2,0 e 1,0 rispettivamente per l'antigene E- Δ CT, l'antigene E-Ala1, l'antigene E-Ala2 e l'antigene E *Mf*). Per ciascuna variante

5 proteica il legame relativo a un sotto-insieme dei 98 anticorpi con catena leggera comune esaminati manifestò un legame ridotto fortemente, indicando sensibilità alla mutazione che caratterizzava una data variante. Per esempio 19 dei campioni di anticorpi con catena leggera comune si legarono all'antigene E *Mf* con $MFI_{\text{variante}}/MFI_{\text{antigene E-ECD}}$ di <8%.

Poiché molti in questo gruppo comprendono anticorpi con affinità alta o moderatamente

10 alta (5 con $K_D < 5$ nM, 15 con $K_D < 50$ nM) è probabile che il segnale meno intenso relativo a questo gruppo derivi da differenze di sensibilità alla sequenza (epitopo) fra l'antigene E-ECD nativo e una data variante piuttosto che da affinità minori.

[214] Questi dati stabiliscono che gli anticorpi con catena leggera comune descritti nelle Tabelle 5 e 6 rappresentano un gruppo eterogeneo di anticorpi con catena leggera comune

15 specifici ad antigene E che riconoscono specificamente più di un epitopo sull'antigene E.

RIVENDICAZIONI

1. Topo modificato geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena leggera (V_L) umana ricavato da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico $V\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un segmento genico $J\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) V_L umano è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4.
2. Topo della rivendicazione 1, in cui:

 - (a) la sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa 5$ umana è unita funzionalmente a una sequenza di regione $C\kappa$ di topo;
 - (b) una sequenza codificante il dominio V_H umano è unita funzionalmente a una sequenza codificante una sequenza di regione costante di catena pesante (C_H) di topo scelta fra una C_{H1} , una cerniera, una C_{H2} , una C_{H3} o una combinazione di queste; oppure
 - (c) il dominio V_H umano è espresso da un locus endogeno di catena pesante di immunoglobulina.
3. Topo della rivendicazione 1, in cui tutti o sostanzialmente tutti i segmenti genici $V\kappa$ e $J\kappa$ di topo sono sostituiti dalla sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata.
4. Topo della rivendicazione 1, in cui la sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata è unita funzionalmente a una sequenza di regione costante di catena leggera di immunoglobulina scelta fra una sequenza di topo, di ratto o umana.

5. Topo modificato geneticamente comprendente un linfocita B che esprime un dominio variabile di catena leggera (V_L) umana ricavato da una sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa$ umana riarrangiata che è presente nella linea germinale del topo, in cui al topo manca un segmento genico $V\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato e un
- 5 segmento genico $J\kappa$ di immunoglobulina endogeno non riarrangiato; e in cui il dominio (o i domini) V_L umano è associato con un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4.
6. Topo della rivendicazione 5, in cui:
- 10 (a) la sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ umana è unita funzionalmente a una sequenza di regione $C\kappa$ di topo;
- (b) una sequenza codificante il dominio V_H umano è unita funzionalmente a una sequenza codificante una sequenza di regione C_H di topo scelta fra una C_{H1} , una cerniera, una C_{H2} , una C_{H3} o una combinazione di queste; oppure
- 15 (c) il dominio V_H umano è espresso da un locus endogeno di catena pesante di immunoglobulina.
7. Topo della rivendicazione 5, in cui tutti o sostanzialmente tutti i segmenti genici $V\kappa$ e $J\kappa$ di topo sono sostituiti dalla sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ umana riarrangiata.
8. Topo della rivendicazione 5, in cui la sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa 1$ umana riarrangiata è
- 20 unita funzionalmente a una sequenza di regione costante di catena leggera di immunoglobulina scelta fra una sequenza di topo, di ratto o umana.
9. Topo di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il topo comprende un locus di catena leggera lambda (λ) di immunoglobulina non funzionale.

10. Uso del topo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 nella produzione di un anticorpo comprendente un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-5 69/6-6/5 o 1-69/6-13/4 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata.
11. Uso della rivendicazione 10, in cui l'anticorpo è un anticorpo bispecifico.
12. Uso di un topo di una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8 nella produzione di un anticorpo comprendente un dominio variabile di catena pesante (V_H) umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-10 33/2-15/4 o 3-53/1-1/4 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa$ umana riarrangiata.
13. Uso della rivendicazione 12, in cui l'anticorpo è un anticorpo bispecifico.
14. Uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 11 e 13, in cui la produzione è mediante un metodo comprendente fasi di espressione dei domini variabili di catena pesante 15 umana in una singola cellula.
15. Uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 10-14, in cui le catene pesanti dell'anticorpo sono interamente umane.
16. Uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 10 o 11, in cui le catene pesanti 20 comprendenti i domini variabili di catena pesante umana si appaiano con una catena leggera comprendente il dominio V_L umano ricavato da una sequenza $V\kappa 1-39/J\kappa$ umana riarrangiata.
17. Uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 12 o 13, in cui le catene pesanti comprendenti i domini variabili di catena pesante umana si appaiano con una catena

leggera comprendente il dominio V_L umano ricavato da una sequenza $V_{\kappa 3-20/J_{\kappa}}$ umana riarrangiata.

18. Uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 10-17, in cui si selezionano il dominio (o i domini) variabile di catena pesante umana mediante l'immunizzazione del topo con un antigene di interesse, la determinazione delle sequenze di domini variabili di catena pesante umana espresse dal topo e l'espressione delle sequenze nella cellula.
19. Metodo per la produzione di un anticorpo diretto a un antigene di interesse comprendente un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza $V_{\kappa 1-39/J_{\kappa}}$ umana riarrangiata, il metodo comprendente:
- (a) l'immunizzazione del topo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 con un antigene di interesse:
- (b) l'ottenimento dal topo di un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelta fra 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/4, 3-30/5-5/2, 3-30/7-27/6, 1-69/6-6/5 o 1-69/6-13/4;
- e
- (c) l'impiego della sequenza di regione variabile di immunoglobulina ottenuta al punto (b) associata con detta regione variabile di catena leggera umana in un anticorpo che si lega specificamente all'antigene di interesse.
20. Metodo per la produzione di un anticorpo diretto a un antigene di interesse comprendente un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione

$V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelto fra 30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4 associata con una regione variabile di catena leggera umana derivata da una sequenza $V\kappa 3-20/J\kappa$ umana riarrangiata, il metodo comprendente:

5 (a) l'immunizzazione del topo di una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8 con un antigene di interesse:

(b) l'ottenimento dal topo di un dominio variabile di catena pesante umana ricavato da una regione $V_H/D_H/J_H$ umana riarrangiata scelto fra 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4 o 3-53/1-1/4;

e

10 (c) l'impiego della sequenza di regione variabile di immunoglobulina ottenuta al punto (b) associata con detta regione variabile di catena leggera umana in un anticorpo che si lega specificamente all'antigene di interesse.

DISEGNI

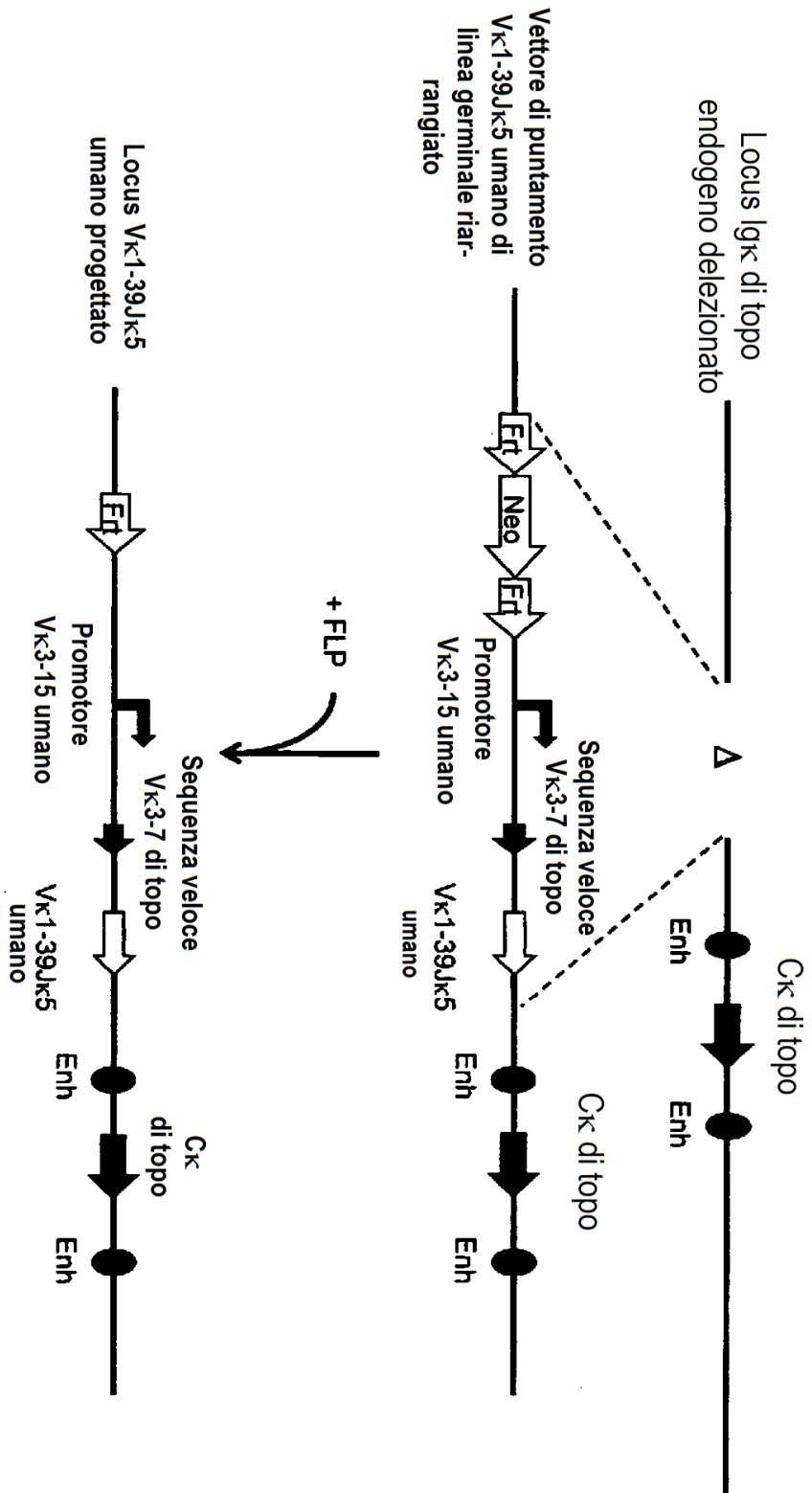


FIG. 1

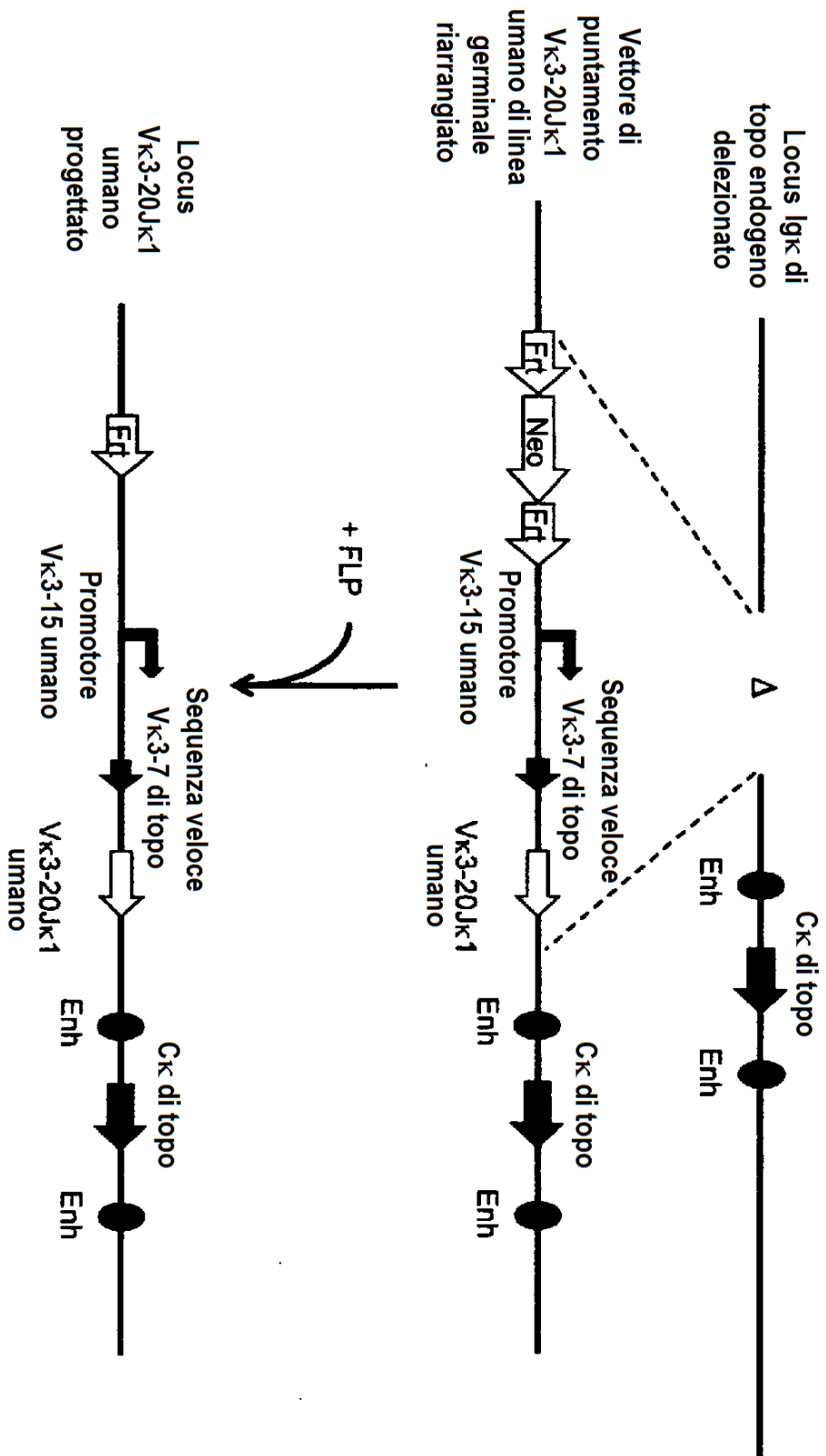


FIG. 2

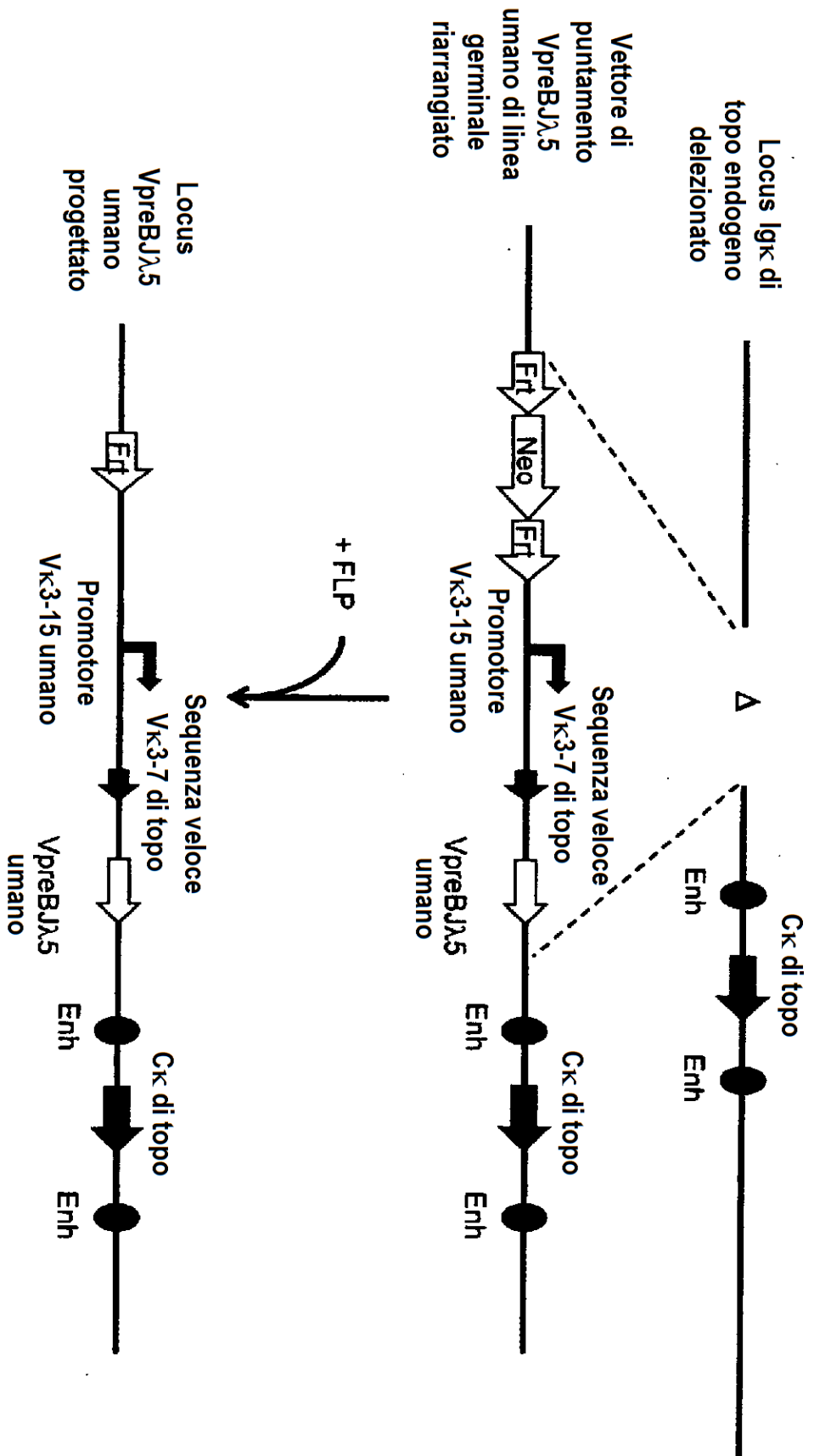


FIG. 3

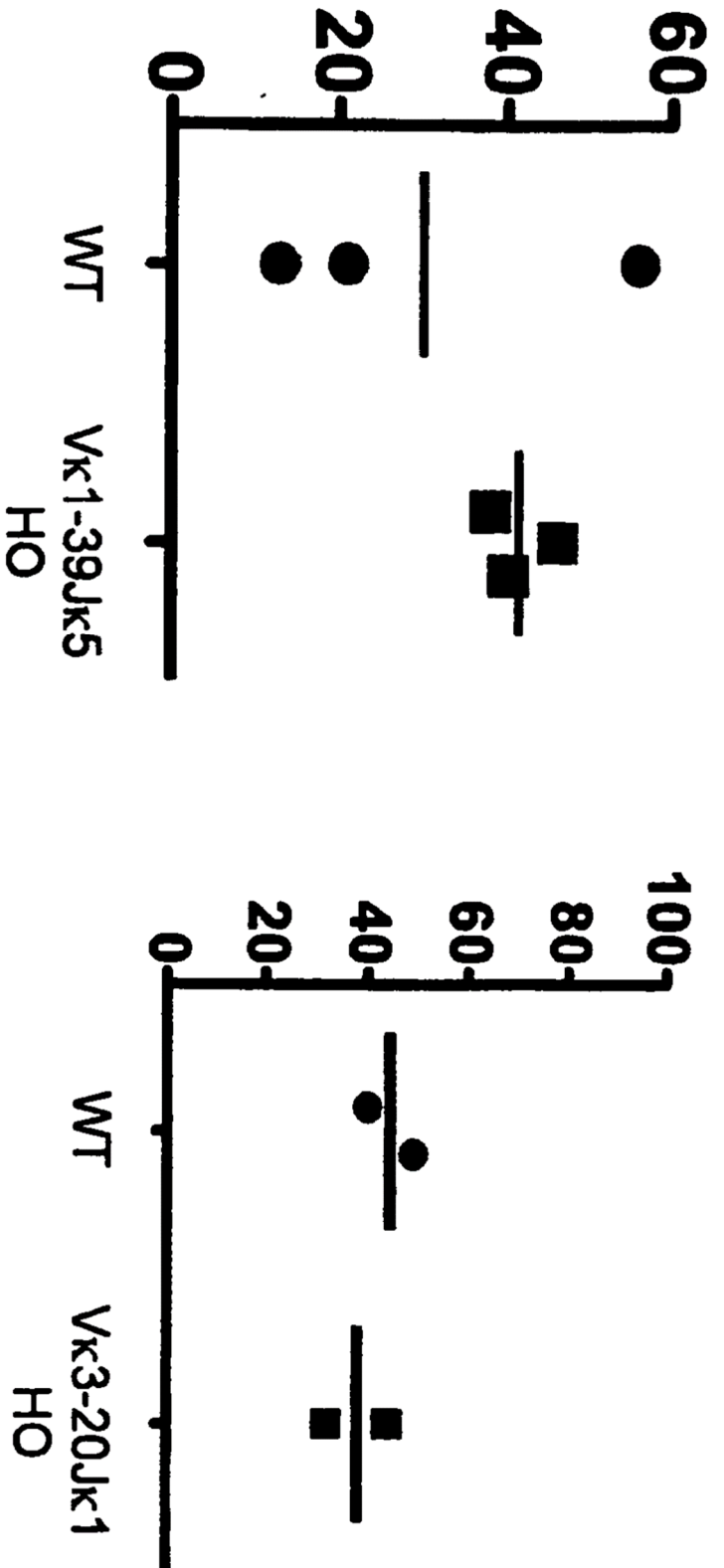


FIG. 4

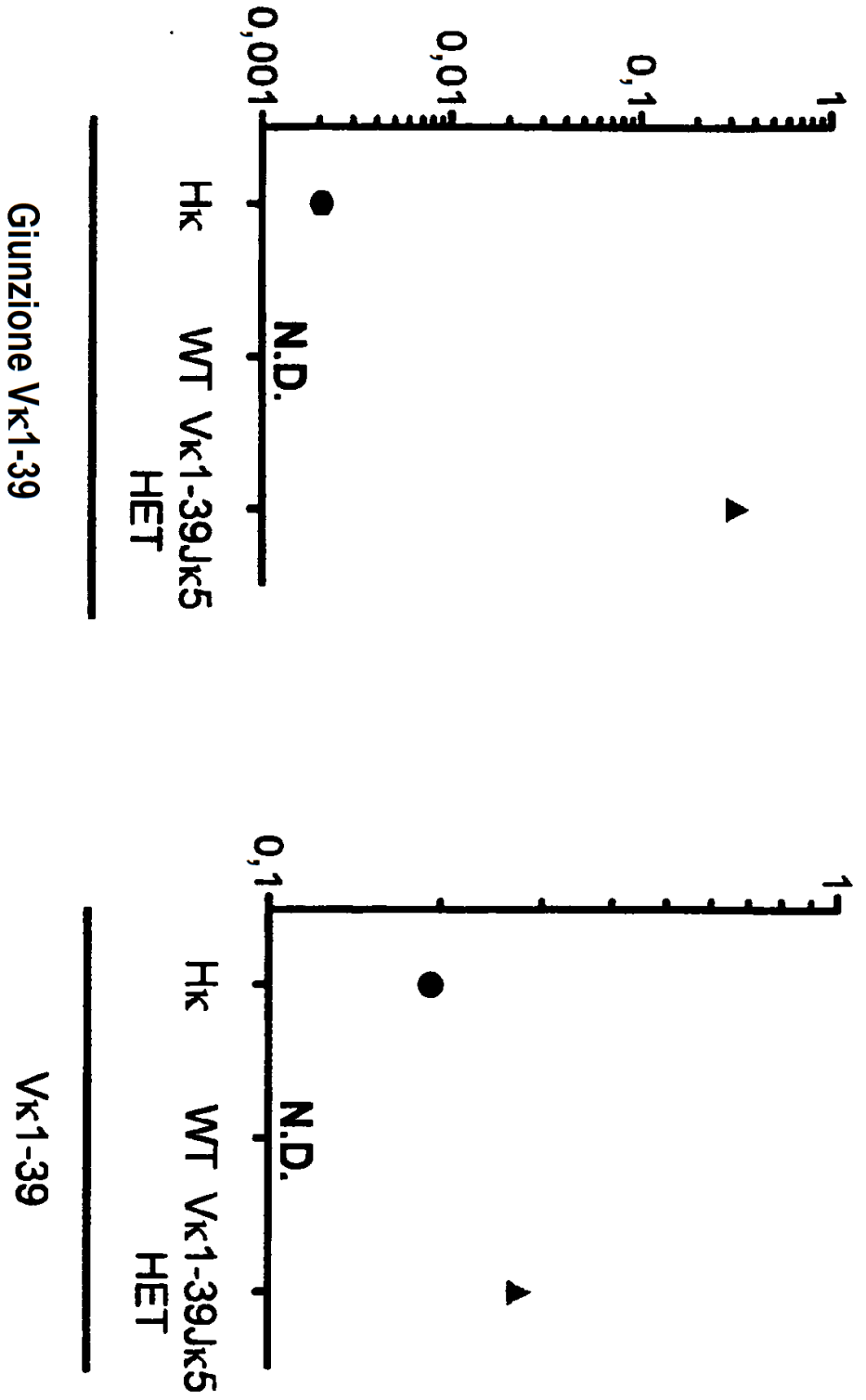


FIG. 5A

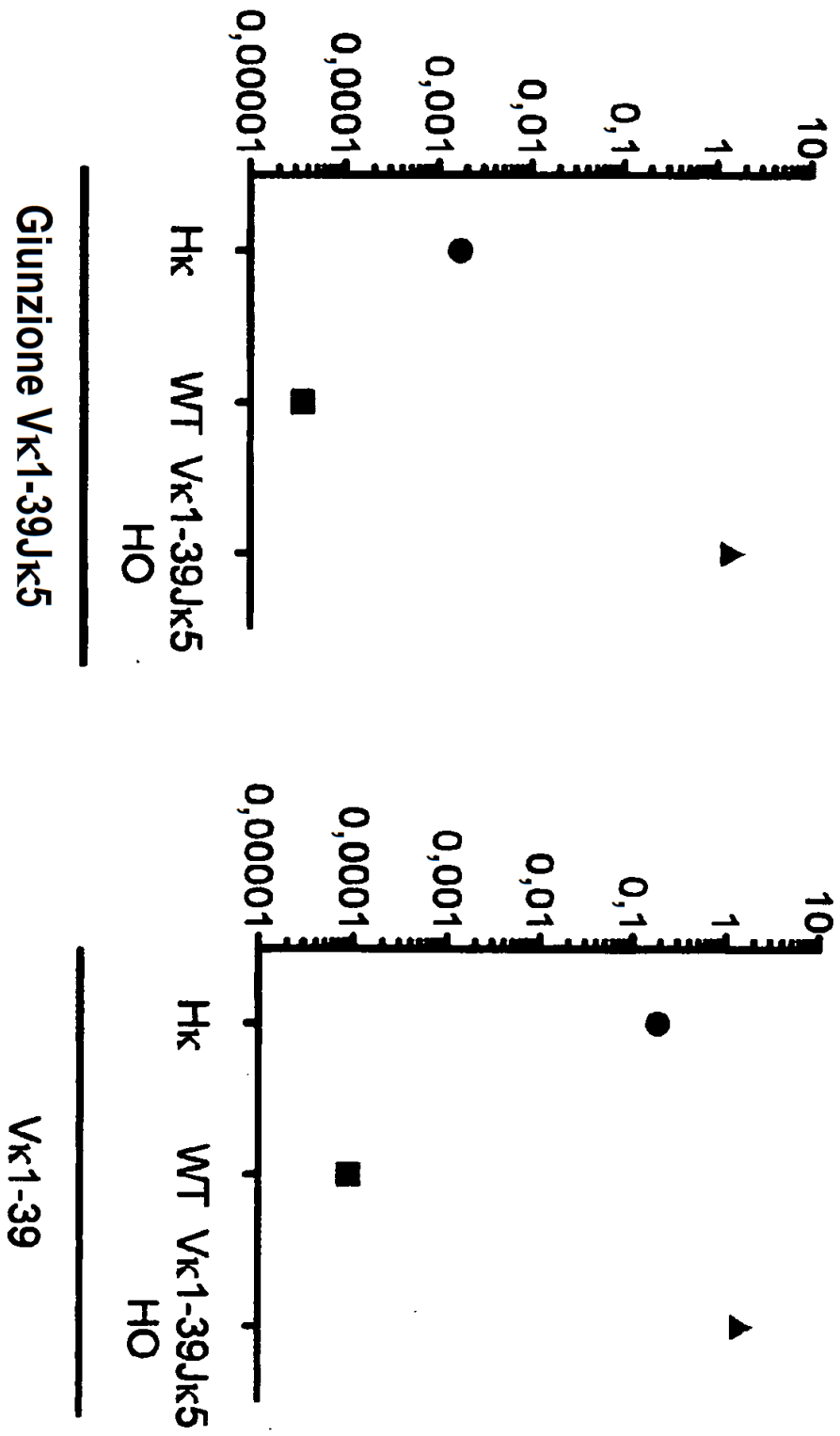


FIG. 5B

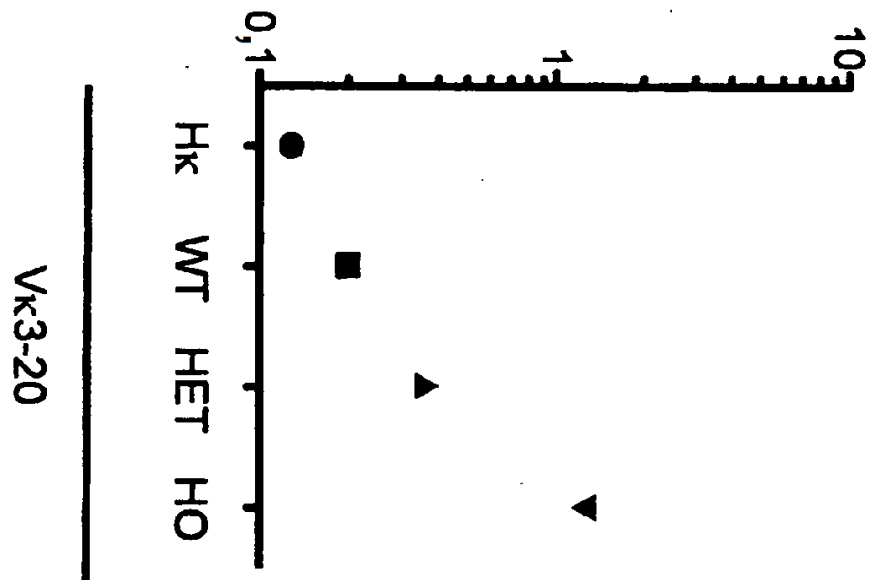
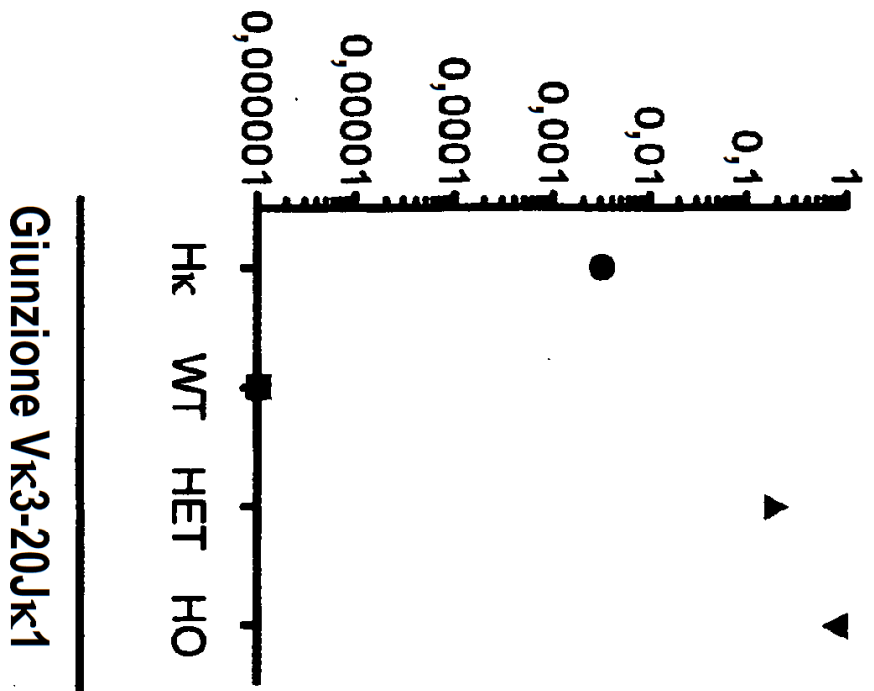


FIG. 5C

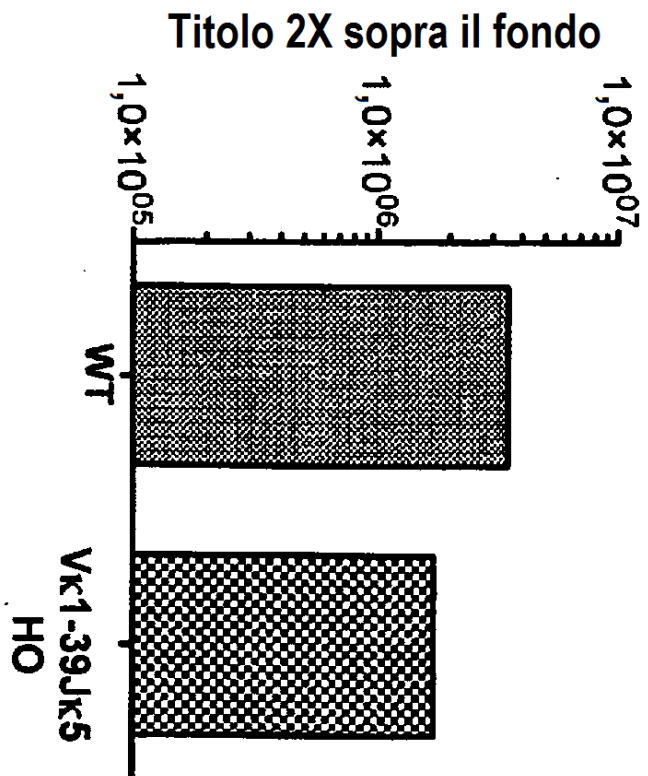
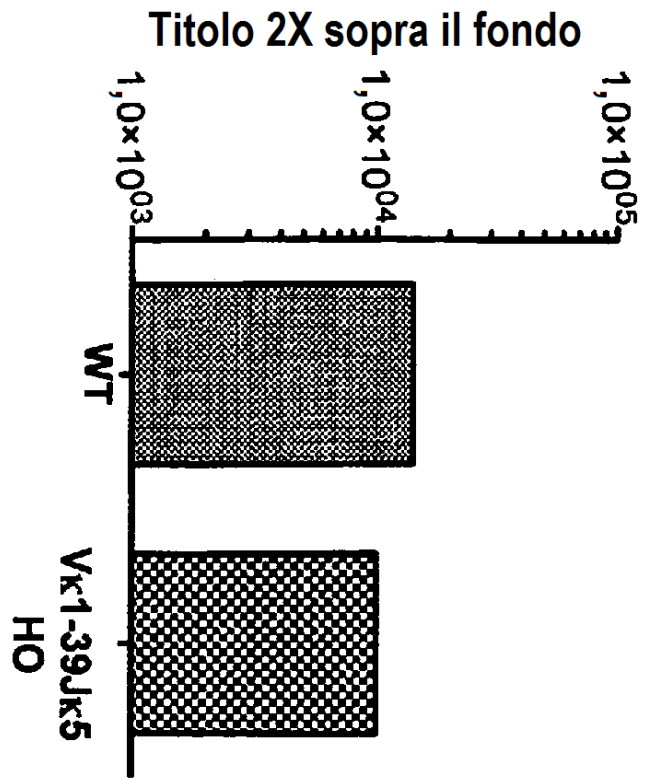


FIG. 6A

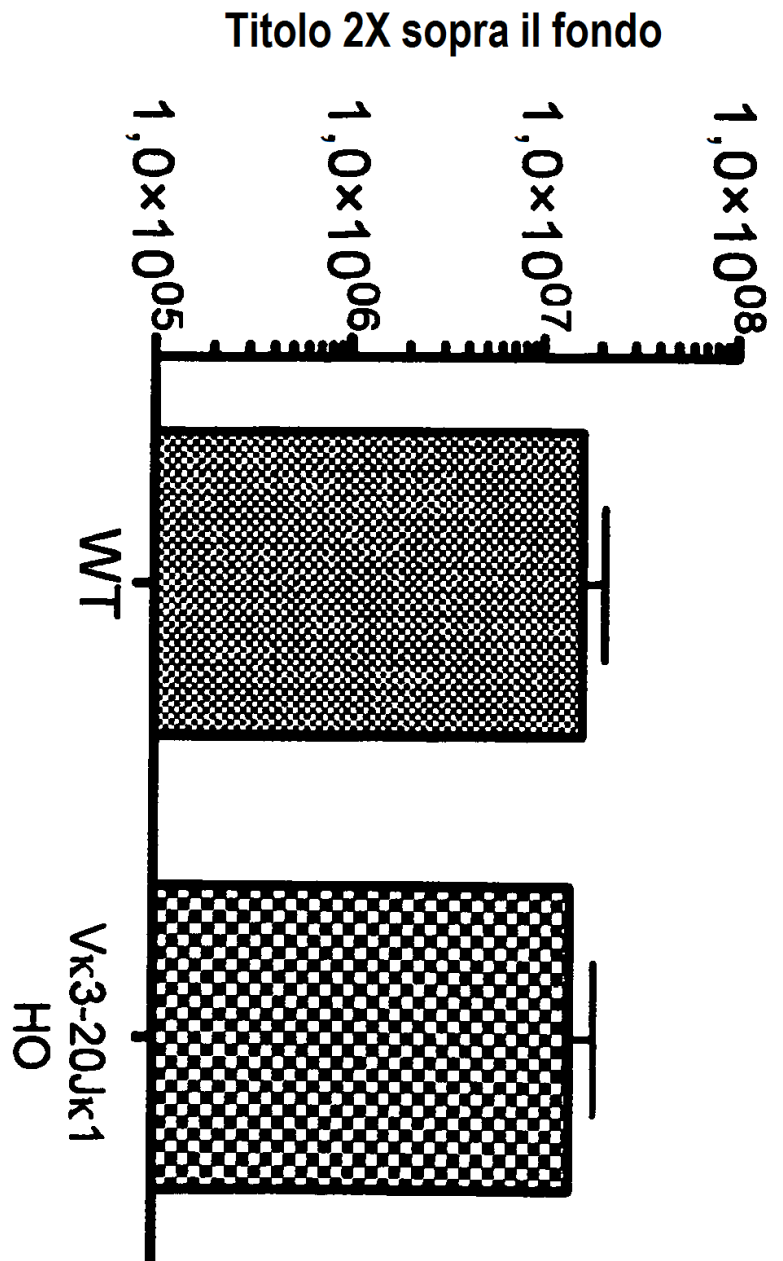


FIG. 6B