



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116193985 A

(43) 申请公布日 2023.05.30

(21) 申请号 202180060845.8

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

(22) 申请日 2021.07.12

有限公司 11038

(30) 优先权数据

专利代理人 张小勇

63/051,180 2020.07.13 US

(51) Int.Cl.

63/076,096 2020.09.09 US

A01K 67/027 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2021/050951 2021.07.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/011457 EN 2022.01.20

(71) 申请人 加拿大商木曾路生物科技公司

权利要求书11页 说明书43页 附图25页

地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 侯文洋 李鑫 L·达克鲁兹

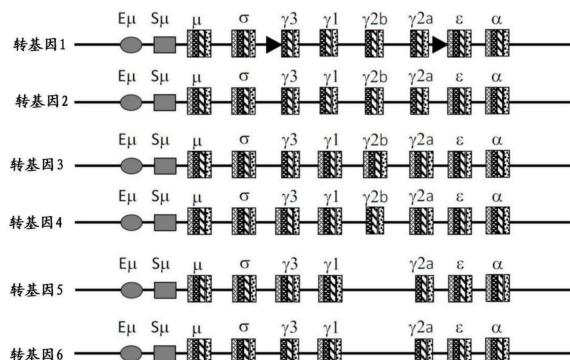
A·古普塔 D·S·杨

(54) 发明名称

表达重链抗体的转基因动物

(57) 摘要

本公开内容一般性涉及用于表达重链抗体(HCAb)的在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因动物以及用于生成该转基因动物的核酸构建体、细胞及方法。本公开内容还涉及包含衍生自由转基因动物产生的重链抗体的序列的结合剂。



1. 一种在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因非人类动物，其中该IgH基因座包含：a)未经重排的重链可变(V)、多样性(D)及连接(J)基因区段，且其中D和/或J基因区段包含驼类D和/或J基因区段；及b)至少一个缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因。

2. 如权利要求1的转基因非人类动物，其中该转基因非人类动物能够表达仅重链抗体(HCAb)或编码该抗体的核酸。

3. 如权利要求1或2的转基因非人类动物，其中该修饰包含a)将一个或多个内源性非人类D和/或J基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段，及b)至少一个IgG恒定区基因的CH1域的部分或完全缺失。

4. 如权利要求1或2的转基因非人类动物，其中该修饰包含a)插入一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段，及b)至少一个IgG恒定区基因的CH1域的部分或完全缺失。

5. 如权利要求1或2的转基因非人类动物，其中该修饰包含a)将一个或多个内源性非人类D和/或J基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段或插入一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段，及b)修饰至少一个IgG恒定区基因的CH1域。

6. 如权利要求1至5中任一项的转基因非人类动物，其中该修饰包含用未经重排的驼类D及J基因区段置换所有内源性非人类D及J区段。

7. 如权利要求1至6中任一项的转基因非人类动物，其中该驼类D和/或J基因区段来自单一驼类物种。

8. 如权利要求1至6中任一项的转基因非人类动物，其中该驼类D和/或J基因区段来自至少两个、至少三个或至少四个驼类物种。

9. 如权利要求1至8中任一项的转基因非人类动物，其中该修饰进一步包含用多个哺乳动物物种的V基因区段置换一个或多个内源性非人类V基因区段或插入多个哺乳动物物种的V基因区段。

10. 如权利要求1至8中任一项的转基因非人类动物，其中该修饰进一步包含用一个或多个驼类V基因区段置换一个或多个内源性非人类V基因区或插入驼类V基因区段。

11. 如权利要求10的转基因非人类动物，其中该修饰包含将所有内源性非人类V区段置换为驼类V基因区段。

12. 如权利要求1至11中任一项的转基因非人类动物，其中该V基因区段来自至少两个物种。

13. 如权利要求1至11中任一项的转基因非人类动物，其中该V基因区段来自至少三个物种。

14. 如权利要求1至11中任一项的转基因非人类动物，其中该V基因区段来自至少四个物种。

15. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物，其中该V基因区段编码VH或VHH多肽。

16. 如权利要求15的转基因非人类动物，其中该VH或VHH多肽为驼类VH或驼类VHH多肽。

17. 如权利要求16的转基因非人类动物，其中该驼类VH多肽来自羊驼、美洲驼、双峰驼、小羊驼或单峰驼。

18. 如权利要求16的转基因非人类动物，其中该驼类VHH多肽来自羊驼、美洲驼、双峰

驼、小羊驼或单峰驼。

19. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物包含来自羊驼的V区段、来自双峰驼的V区段、来自美洲驼的V区段、来自小羊驼的V区段和/或来自单峰驼的V区段。

20. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类D和/或J基因区段来自羊驼。

21. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类D和/或J基因区段来自双峰驼。

22. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类D和/或J基因区段来自美洲驼。

23. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类D和/或J基因区段来自单峰驼。

24. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类D和/或J基因区段来自小羊驼。

25. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含一个至至少七个羊驼D基因区段。

26. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含一个至至少七个羊驼J基因区段。

27. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含一个至至少七个双峰驼D基因区段。

28. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含一个至至少七个双峰驼J基因区段。

29. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物包含一个至至少六个羊驼V基因区段。

30. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物包含一个至至少十个双峰驼V基因区段。

31. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物包含一个至至少十个美洲驼V基因区段。

32. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物包含一个至至少六个单峰驼V基因区段。

33. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物包含一个至至少六个小羊驼V基因区段。

34. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该V基因区段、D基因区段和/或J基因区段编码天然存在的序列。

35. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该V基因区段、D基因区段和/或J基因区段编码突变序列。

36. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgG恒定区基因为内源性非人类IgG恒定区基因或其部分。

37. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgG恒定区基因为 γ 3恒定

区基因、 γ 1恒定区基因、 γ 2b恒定区基因或 γ 2a恒定区基因。

38. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中至少两个IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

39. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中至少三个IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

40. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中所有IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

41. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中至少一个IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失,且至少一个其他IgG恒定区基因完全或部分缺失。

42. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含 γ 3恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因处的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

43. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含 γ 1恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因处的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

44. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含 γ 2b恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因处的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

45. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该IgH基因座包含 γ 2a恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因处的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

46. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中转基因非人类动物基因组的至少一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含选自由以下组成的组的IgG恒定区基因: γ 3恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失; γ 1恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失; γ 2b恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失; γ 2a恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失;或其组合。

47. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含: γ 3及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失;及 γ 1及 γ 2a恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

48. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含 γ 2b恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

49. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含 γ 3恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

50. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含: γ 3恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失;及 γ 2a恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

51. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含: γ 3恒定区基因,其包含在编码CH1域的区

域中的部分或完全缺失； γ 2a恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

52. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座，该IgH基因座包含： γ 3恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

53. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的另一等位基因包含相同的IgH基因座或相同的IgG恒定区基因。

54. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的另一等位基因包含野生型IgH基因座或野生型IgG恒定区基因。

55. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的另一等位基因包含IgH基因座，其包含选自以下的修饰：编码至少一个或所有IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失、至少一个或所有其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失或其组合。

56. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中另一等位基因包含IgH基因座，其包含野生型非人类 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区基因。

57. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中另一等位基因包含IgH基因座，该IgH基因座含： γ 3、 γ 1及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失；及 γ 2a恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

58. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中另一等位基因包含IgH基因座，该IgH基因座含： γ 3及 γ 2a恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

59. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中另一等位基因包含IgH基因座，该IgH基因座包含 γ 3恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

60. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中另一等位基因包含IgH基因座，其包含 γ 3、 γ 1及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

61. 如权利要求46至52中任一项的转基因非人类动物，其中另一等位基因包含IgH基因座，该IgH基因座包含： γ 3及 γ 2a恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

62. 如权利要求1至37中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的两个等位基因均包含IgH基因座，该IgH基因座包含 γ 2b恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

63. 如权利要求1至37中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的两个等位基因均包含IgH基因座，该IgH基因座包含： γ 3及 γ 2a恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

64. 如权利要求1至37中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的两个等位基因均包含IgH基因座，该IgH基因座包含 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区基因，该恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

65. 如权利要求1至37中任一项的转基因非人类动物，其中转基因非人类动物基因组的

两个等位基因均包含IgH基因座,该IgH基因座包含 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区基因,该恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的完全缺失。

66. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中非人类动物基因组在每个等位基因上包含至少一个不同的V基因区段。

67. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中非人类动物基因组在其一个等位基因中包含一个物种的至少一个V基因区段并在另一等位基因中包含另一物种的至少一个V基因区段。

68. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物进一步包含IgM恒定区基因的生殖系修饰,其中该修饰包含将IgM CH1域置换为驼类CH1域。

69. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该非人类动物包含美洲驼、双峰驼和/或羊驼物种的至少约10kb、至少约20kb、至少约30kb、至少约40kb或至少约50kb的驼类V基因区段。

70. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该V基因区段、D基因区段及J基因区段能够进行VDJ重排。

71. 一种在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因非人类动物,其中该修饰选自由以下组成的组:

a. 内源性非人类动物 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的缺失,或;

b. 至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性非人类动物基因的CH1域的缺失与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性非人类动物基因的完全或部分缺失的组合。

72. 一种在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因非人类动物,其中该修饰选自由以下组成的组:

a. 内源性非人类动物 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的修饰,或

b. 至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性非人类动物基因的CH1域的修饰与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性非人类动物基因的完全或部分缺失的组合。

73. 如权利要求71或72的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物包含选自小鼠V、D和/或J、驼类V、D和/或J、或人类V、D和/或J或其组合的V、D和/或J区段。

74. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为杂合的。

75. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为纯合的。

76. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为转基因大鼠。

77. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为转基因小鼠。

78. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该非人类动物为包含编码缺乏CH1域的小鼠IgG1、小鼠IgG2a、小鼠IgG2b或小鼠IgG3恒定区的IgG恒定区基因的转基因小鼠。

79. 如权利要求78的转基因非人类动物,其中至少两个选自小鼠IgG1、小鼠IgG2a、小鼠IgG2b或小鼠IgG3恒定区的IgG恒定区基因缺乏CH1域。

80. 如权利要求78的转基因非人类动物,其中至少三个选自小鼠IgG1、小鼠IgG2a、小鼠IgG2b或小鼠IgG3恒定区的IgG恒定区基因缺乏CH1域。

81. 如权利要求78的转基因非人类动物,其中小鼠IgG1、小鼠IgG2a、小鼠IgG2b及小鼠IgG3恒定区中的每一种缺乏CH1域。

82. 如权利要求78至81中任一项的转基因非人类动物,其中小鼠IgG1、小鼠IgG2a、小鼠IgG2b或小鼠IgG3中的至少一者部分或完全缺失。

83. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为转基因小鼠,且其中所有内源性小鼠D及J基因区段经未经重排的驼类D及J基因区段置换。

84. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为转基因小鼠,且其中该转基因小鼠的该IgH基因座包含一个或多个小鼠V基因区段及未经重排的驼类V基因区段。

85. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为转基因小鼠,且其中所有内源性小鼠V基因区段经未经重排的驼类V基因区段置换。

86. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为具有至少一个缺乏功能性CH1域的内源性小鼠IgG恒定区基因的转基因小鼠。

87. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为具有缺乏功能性CH1域的一个等位基因的所有内源性小鼠IgG恒定区基因的转基因小鼠。

88. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为具有缺乏功能性CH1域的两个等位基因的所有内源性小鼠IgG恒定区基因的转基因小鼠。

89. 如权利要求78至88中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因小鼠为杂合的,且其中该小鼠基因组的一个等位基因包含在编码至少一个IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失及任选地至少一个其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失,且另一等位基因为野生型。

90. 如权利要求78至88中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因小鼠为杂合的,并且该小鼠基因组的一个等位基因包含在编码至少一个IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失及任选地至少一个或所有其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失,且另一等位基因任选地包含在编码至少一个IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失或至少一个或所有其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失或其组合。

91. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该修饰包含内源性 γ 3基因的CH1域的缺失。

92. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该修饰包含内源性 γ 2b基因的CH1域的缺失。

93. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该修饰包含该内源性 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因及 γ 2a基因中的每一种的CH1域的缺失。

94. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该修饰包含该内源性 γ 2a基因的CH1域的缺失及内源性 γ 2b基因的缺失。

95. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该修饰包含该内源性 γ 3基因

及 γ 2a基因中的每一种的CH1域的缺失及 γ 2b基因的缺失。

96. 如权利要求78至95中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因小鼠为纯合的。

97. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为转基因小鼠,且其中该IgH基因座处的该生殖系修饰包含a) 将内源性小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段;b) 将一个或多个内源性小鼠基因V区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段,或插入一个或多个未经重排的驼类V基因区段;及c) 缺失或修饰至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b或 γ 3基因的CH1域,使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b或 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

98. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因小鼠,其中该修饰包含缺失内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因及 γ 2a基因中的每一种的CH1域、将内源性小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段、插入来自多个驼类物种的驼类V基因区段,及任选地缺失至少一个或所有内源性小鼠V基因区段。

99. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该未经重排的驼类V基因区段包括相关内含子,其包含用于VDJ重排的重组信号序列。

100. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类V区段编码VH及VHH多肽。

101. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物能够表达仅重链抗体(HCAb)或编码该抗体的核酸,随后用抗原免疫接种。

102. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因非人类动物为能够表达仅重链抗体(HCAb)的转基因小鼠,该仅重链抗体包含在位置37、44、45和/或47处包含驼类典型框架突变的小鼠VH多肽。

103. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类V区段编码来自羊驼、双峰驼及美洲驼的VH和/或VHH多肽。

104. 如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物,其中该驼类V区段编码来自羊驼、双峰驼、美洲驼及单峰驼的VH和/或VHH多肽。

105. 如权利要求78至104中任一项的转基因非人类动物,其中该转基因小鼠具有特征为H-2^b的MHC单倍型。

106. 一种转基因小鼠,其包含内源性小鼠V、D及J区段及至少一个缺乏功能性CH1域的内源性小鼠IgG恒定区基因,其中该转基因小鼠能够表达仅重链抗体(HCAb)。

107. 如权利要求106的转基因小鼠,其中该转基因小鼠不包含外源性V、D或J区段。

108. 如权利要求106的转基因小鼠,其中该转基因小鼠包含驼类V、D和/或J区段。

109. 如权利要求106至109中任一项的转基因小鼠,其中该转基因小鼠能够表达仅重链抗体(HCAb),该仅重链抗体包含在位置37、44、45和/或47处包含驼类典型框架突变的小鼠VH多肽。

110. 一种获得抗原特异性的仅重链抗体(HCAb)或编码该HCAb或其部分的抗原结合域的核酸的方法,该方法包括用抗原对前述权利要求中任一项的转基因非人类动物免疫接种。

111. 如权利要求110的方法,其中该转基因非人类动物在用该抗原免疫接种后产生多

个HCAb，且其中该多个HCAb包含：至少一个HCAb物种，其包含由第一哺乳动物物种的V区段编码的V部分；及第二HCAb物种，其包含由第二哺乳动物物种的V区段编码的V部分。

112. 如权利要求110或111的方法，其中该方法进一步包括自该转基因非人类动物的PBMC收集总RNA或信使RNA。

113. 如前述权利要求中任一项的方法，其进一步包括确定该HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区的氨基酸序列或核酸序列。

114. 如权利要求113的方法，其进一步包括使用基于计算机的方法或软件以基于预定参数按簇组织序列信息。

115. 如权利要求114的方法，其进一步包括选择一个或多个序列以制造结合剂。

116. 如权利要求115的方法，其中该结合剂为抗体或其抗原结合片段。

117. 如权利要求115的方法，其中该结合剂包含VHH。

118. 如权利要求115的方法，其中该结合剂包含单域抗体。

119. 如前述权利要求中任一项的方法，其中该转基因非人类动物为在IgH基因座处包含生殖系修饰的转基因小鼠，该生殖系修饰包含a) 将一个或多个内源性小鼠V基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段，或插入未经重排的驼类V基因区段；b) 用驼类D及J区段置换至少一个或所有内源性小鼠D及J区段；及c) 缺失或修饰至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因的CH1域，使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

120. 如前述权利要求中任一项的方法，其中该转基因非人类动物为在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因小鼠，其中该修饰包含缺失内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因及 γ 2a基因中的每一种的CH1域、将小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段、插入来自多个驼类物种的驼类V基因区段，及任选地缺失至少一个或所有内源性小鼠V基因区段。

121. 一种用于制造结合剂的方法，该方法包括用抗原对如前述权利要求中任一项的转基因非人类动物免疫接种、获得至少一个HCAb物种的抗原结合域的氨基酸序列或核酸序列，及生成包含该氨基酸序列的结合剂。

122. 如权利要求121的方法，其中该抗原结合域包含至少一个HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区。

123. 如权利要求121或122的方法，其中获得多个HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区的氨基酸序列或核酸序列，且生成包含最具代表性或常见序列的结合剂。

124. 如权利要求121或122的方法，其中获得多个HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区的氨基酸序列或核酸序列，且生成包含最不具代表性或独特序列的结合剂。

125. 一种结合剂，其包含通过如权利要求121至124中任一项的方法获得的氨基酸序列或由通过如权利要求121至124中任一项的方法获得的核酸序列编码。

126. 一种结合剂，其包含氨基酸序列或由核酸序列编码，该氨基酸序列或核酸序列是通过对如权利要求1至105中任一项的转基因非人类动物免疫接种而获得。

127. 一种用于在IgH基因座处靶向置换非人类动物基因组D和/或J区段或插入驼类D和/或J区段的核酸构建体，其中该核酸构建体包含基因组驼类D和/或J区段且任选地包含基因组驼类V区段，且其中该核酸构建体包含内含子，该内含子包含用于VDJ重排的重组信

号序列。

128. 如权利要求127的核酸构建体,其中该核酸构建体包含来自至少一个物种的基因组驼类V区段。

129. 如权利要求127的核酸构建体,其中该核酸构建体包含来自至少两个物种的驼类V区段。

130. 如权利要求127的核酸构建体,其中该核酸构建体包含来自至少三个物种的驼类V区段。

131. 如权利要求127的核酸构建体,其中该核酸构建体包含来自至少四个物种的驼类V区段。

132. 如权利要求127至131中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含来自至少一个驼类物种的D及J区段。

133. 如权利要求127至131中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含来自至少两个驼类物种的D及J区段。

134. 如权利要求127至133中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少七个羊驼D基因区段。

135. 如权利要求127至134中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少七个羊驼J基因区段。

136. 如权利要求127至135中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少七个双峰驼D基因区段。

137. 如权利要求127至136中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少七个双峰驼J基因区段。

138. 如权利要求127至137中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少六个羊驼V基因区段。

139. 如权利要求127至138中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少十个双峰驼V基因区段。

140. 如权利要求127至139中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少十个美洲驼V基因区段。

141. 如权利要求127至140中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体包含一个至至少六个单峰驼V基因区段。

142. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

143. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

144. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

145. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

146. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含双峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH区段和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区

段。

147. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段、双峰驼D区段、双峰驼J区段及羊驼J区段。

148. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、双峰驼D区段及双峰驼J区段。

149. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含羊驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、单峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

150. 如前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中该核酸以5'至3'形式包含羊驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、单峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

151. 如权利要求127至150中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体在5'端或3'端处包含小鼠VH区段。

152. 如权利要求127至150中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体在5'端或3'端处不包含小鼠VH区段。

153. 如权利要求127至151中任一项的核酸构建体,其中该核酸构建体为人工染色体。

154. 权利要求127至152中任一项的核酸构建体的用途,其用于修饰胚胎非人类干细胞或用于制造转基因非人类动物。

155. 一种经分离的胚胎非人类干细胞,其通过权利要求127至154中任一项的核酸构建体修饰。

156. 一种细胞,其自前述权利要求中任一项的转基因非人类动物分离。

157. 在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的经分离的胚胎非人类干细胞,其中该IgH基因座包含:a)未经重排的重链可变(V)、多样性(D)及连接(J)基因区段,且其中该D和/或J基因区段包含驼类D和/或J基因区段;及b)至少一个缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因。

158. 如权利要求157的经分离的胚胎非人类干细胞,其中经分离的胚胎非人类干细胞为小鼠胚胎干细胞,且其中该修饰包含a)将一个或多个内源性小鼠V基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段,或插入未经重排的驼类V基因区段;b)用驼类D及J区段置换至少一个或所有内源性小鼠D及J区段;及c)缺失或修饰至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因的CH1域,使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

159. 如权利要求157的经分离的胚胎非人类干细胞,其中经分离的胚胎非人类干细胞为小鼠胚胎干细胞,且其中该修饰包含缺失内源性 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因及 γ 2a基因中的每一种的CH1域、将内源性小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段、插入来自多种驼类物种的驼类V基因区段,及任选地缺失至少一个或所有内源性小鼠V基因区段。

160. 权利要求155或157至159的胚胎非人类干细胞的用途,其用于制造转基因非人类动物。

161. 一种生产转基因非人类动物的方法,该方法包括以下步骤:将如权利要求155或157至159的胚胎非人类干细胞注射至小鼠囊胚中;将小鼠胚胎植入假孕小鼠中;及选择携带生殖系修饰的小鼠后代。

162. 一种制造转基因动物的方法,其包含使用如权利要求127至153中任一项的核酸构建体。

163. 一种制造转基因动物的方法,其包含将核酸构建体引入干细胞中,该核酸包含基因组驼类D和/或J区段且任选地包含基因组驼类V区段,且其中该核酸构建体包含内含子,该内含子包含用于VDJ重排的重组信号序列。

164. 如权利要求163的方法,其中该核酸包含来自至少两个、三个或四个不同物种的V、D和/或J基因序列。

165. 如权利要求163的方法,其中该核酸包含来自至少两个、三个或四个驼类物种的V、D和/或J基因序列。

166. 一种制造转基因小鼠的方法,其包含将显微注射有用如权利要求127至153中任一项的核酸构建体进行基因修饰的胚胎干细胞的囊胚植入假孕小鼠中;自同窝中选择嵌合小鼠并任选地通过使嵌合小鼠与野生型小鼠回交而生成F1杂合动物;及任选地通过与F1动物杂交而生成F2纯合动物。

167. 一种制造转基因小鼠的方法,其包含植入显微注射有如权利要求154或157至159中任一项的胚胎干细胞的囊胚;自同窝中选择嵌合小鼠并任选地通过使嵌合小鼠与野生型动物回交而生成F1杂合动物;及任选地通过与F1动物杂交而生成F2纯合动物。

表达重链抗体的转基因动物

技术领域

[0001] 本公开内容一般性涉及用于表达重链抗体(HCAb)的在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因动物以及用于生成转基因动物的核酸构建体、细胞及方法。本公开内容还涉及包含衍生自由转基因动物产生的重链抗体的序列的结合剂。

[0002] 背景

[0003] 驼类(camelid)及软骨鱼天然产生由功能性同二聚重链抗体(HCAb)构成的抗体(Hamers-Casterman等人,1993;Muyldermaans及Smider,2016)。HCAb的重链缺乏第一恒定域(CH1)且与经典抗体的不同之处仅在于轻链配对通常涉及的一些氨基酸取代(Muyldermaans等人,1994;Vu等人,1997)。这些取代(Va137Phe/Tyr、Gly44Glu、Leu45Arg及Trp47Gly)存在于框架区2(FR2)中。HCAb的抗原结合片段称作单域抗体(sdAb)、VHH或**nanobody®**。sdAb具有约15kDa的分子量,使得其适于需要增强的组织渗透或快速清除的应用,诸如基于放射性同位素的成像。

[0004] 驼类HCAb的可变区与相应经典CDR相比具有较长CDRH1及CDRH3环,从而增加互补位尺寸。较长CDR结合表位,其比经典抗体的表位更隐蔽。它们还可通过在催化位点中进入裂缝来抑制酶(Sircar等人,The Journal of Immunology,186,2011)。

[0005] 单域抗体目前被以各种抗体样形式(包括多特异性及多价形式)探索用作治疗剂及诊断剂。

[0006] 由于预期含有驼类序列的抗体会诱导人类中的免疫反应,因此最近的工作主要集中于在转基因小鼠中研发人类单域抗体。这些小鼠模型是通过使小鼠IgH基因座的部分失活或对其进行置换以编码人类可变(V)区段、多样性(D)区段及连接(J)区段来设计(参见WO2016/062990A1、US2011/0145937A1)。

[0007] 尽管单域抗体可通过驼类的免疫接种获得,但此方法耗时且昂贵。此外,需要大量免疫原,且所获得的抗体库(repertoire)受到限制。

[0008] 表达包含驼类VHH、驼类/人类杂交VH或人类VH的单域抗体的转基因小鼠是通过将重排或未经重排的微型基因座随机整合至缺失IgM的小鼠的基因组中而生成(Zhou等人,J. Immunol.,175(6):3369-79(2005);Janssens等人,PNAS 103(41):15130-15135(2006);Drabek等人,Front. Immunol.7:619(2016),美国专利第8,502,014号)。这些模型遭受以下限制:具有低表达且使得由免疫接种产生的HCAb池中的多样性不佳。

[0009] 概述

[0010] 申请人尤其在本文中提供用于产生驼类单域抗体的转基因非人类动物,其在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰。

[0011] 本文提供经基因修饰的动物,以促进驼类单域抗体的产生。

[0012] 在本公开内容的一些方面中,转基因动物用于表达各种同种型及不同遗传背景的HCAb。

[0013] 在本公开内容的其他方面中,提供用于增加所产生的HCAb库中的多样性的转基因动物。

[0014] 分析在免疫接种本文所公开的转基因动物后生成的仅抗原特异性抗体 (HCAb) 池且选择HCAb候选物。

[0015] 在一些实施方案中,HCAb用于制造结合剂。

[0016] 在一些实施方案中,HCAb用于制造治疗剂。

[0017] 在一些实施方案中,HCAb用于制造诊断剂。

[0018] 在一些方面及实施方案中,本公开内容涉及一种在免疫球蛋白重链 (IgH) 基因座处包含生殖系修饰的转基因非人类动物。

[0019] 在一些实施方案中,所有修饰均在同一等位基因上。在其他实施方案中,两个等位基因可相同。然而,在其他实施方案中,两个等位基因可不同。

[0020] 在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含例如选自由以下组成的组的生殖系修饰:

[0021] a. 内源性非人类动物 γ 球蛋白基因的CH1域的缺失,或;

[0022] b. 至少一个内源性非人类动物 γ 球蛋白的CH1域的缺失与至少一个其他内源性非人类动物 γ 球蛋白基因的完全或部分缺失的组合。

[0023] 在其他实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含选自例如以下组成的组的生殖系修饰:

[0024] a. 内源性非人类动物 γ 球蛋白基因的CH1域的修饰,或;

[0025] b. 至少一个内源性非人类动物 γ 球蛋白的CH1域的修饰与至少一个其他内源性非人类动物 γ 球蛋白基因的完全或部分缺失的组合。

[0026] 在一些实施方案中,CH1域的修饰产生非功能性CH1域。在一些实施方案中,非功能性CH1域修饰无法与轻链配对。

[0027] 在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物为包含选自例如由以下组成的组的生殖系修饰的小鼠:

[0028] a. 内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的缺失,或;

[0029] b. 至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的CH1域的缺失与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的完全或部分缺失的组合。

[0030] 在其他实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物为包含选自例如由以下组成的组的生殖系修饰的小鼠:

[0031] a. 内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的修饰,或;

[0032] b. 至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的CH1域的修饰与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的完全或部分缺失的组合。

[0033] 在示例性实施方案中,生殖系修饰包含内源性 γ 3基因的CH1域的缺失。

[0034] 在示例性实施方案中,生殖系修饰包含内源性 γ 1基因的CH1域的缺失。

[0035] 在另一示例性实施方案中,生殖系修饰包含内源性 γ 2b基因的CH1域的缺失。

[0036] 在另一示例性实施方案中,生殖系修饰包含内源性 γ 2a基因的CH1域的缺失。

[0037] 在另一示例性实施方案中,生殖系修饰包含内源性 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因及 γ 2a基因的CH1域的缺失。

[0038] 在另一示例性实施方案中,生殖系修饰包含内源性 γ 2a基因的CH1域的缺失及内源性 γ 2b基因的缺失。

[0039] 在另一示例性实施方案中,生殖系修饰包含内源性 γ 3基因及 γ 2a基因的CH1域的缺失及 γ 2b基因的缺失。

[0040] 在一些实施方案中,转基因非人类动物为包含内源性小鼠V、D及J区段及至少一个缺乏功能性CH1域的内源性小鼠IgG恒定区基因的转基因小鼠。

[0041] 在一些实施方案中,转基因小鼠能够表达仅重链抗体(HCAb)。

[0042] 在一些实施方案中,转基因小鼠不包含外源性V、D或J区段。

[0043] 在一些实施方案中,转基因小鼠不包含驼类V、D或J区段。

[0044] 在一些实施方案中,转基因小鼠包含驼类V、D和/或J区段。

[0045] 在一些实施方案中,转基因非人类动物为能够表达仅重链抗体(HCAb)的转基因小鼠,该重链抗体包含在位置37、44、45和/或47处包含驼类典型框架突变的小鼠VH多肽。

[0046] 在一些实施方案中,转基因非人类动物具有IgH基因座,其包含来自哺乳动物的未经重排的可变(V)、多样性(D)和/或连接(J)基因区段。

[0047] 在一些实施方案中,未经重排的驼类V、D和/或J基因区段包括相关内含子,其包含用于VDJ重排的重组信号序列(RSS)。

[0048] 在一些实施方案中,未经重排的驼类V区段包括周围调节区、内含子序列、前导序列及RSS。

[0049] 在一些实施方案中,未经重排的驼类D区段包括周围驼类调节区、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类RSS。

[0050] 在一些实施方案中,未经重排的驼类J区段包括周围驼类调节区、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类RSS。

[0051] 在一些实施方案中,V、D和/或J基因区段来自多于一个哺乳动物物种。

[0052] 在一些实施方案中,哺乳动物为驼类。在一些实施方案中,哺乳动物为人类。在一些实施方案中,哺乳动物为啮齿动物。在一些实施方案中,哺乳动物为非人类哺乳动物。

[0053] 在一些实施方案中,IgH基因座包含转基因非人类动物的内源性V基因区段。在其他实施方案中,所有V基因区段均为内源性的。

[0054] 在一些实施方案中,IgH基因座包含对于转基因非人类动物而言为外源性的V基因区段。

[0055] 在一些实施方案中,外源性V基因区段插入至转基因非人类动物基因组中(例如IgH基因座处)。在其他实施方案中,外源性V基因区段置换转基因非人类动物的一个或多个内源性V基因区段。因此,在一些实施方案中,转基因非人类动物包含内源性V基因区段、外源性V基因区段及内源性V基因区段与外源性V基因区段的组合。在其他实施方案中,外源性V基因区段置换转基因非人类动物的所有内源性V基因区段。

[0056] 在一些实施方案中,IgH基因座包含转基因非人类动物的内源性D基因区段。在其他实施方案中,所有D基因区段均为内源性的。

[0057] 在一些实施方案中,IgH基因座包含对于转基因非人类动物而言为外源性的D基因区段。

[0058] 在一些实施方案中,外源性D基因区段插入至转基因非人类动物基因组中(例如

IgH基因座处)。在其他实施方案中,外源性D基因区段置换转基因非人类动物的一个或多个内源性D基因区段。因此,在一些实施方案中,转基因非人类动物包含内源性D基因区段、外源性D基因区段及内源性D基因区段与外源性D基因区段的组合。在其他实施方案中,外源性D基因区段置换转基因非人类动物的所有内源性D基因区段。

[0059] 在一些实施方案中,IgH基因座包含转基因非人类动物的内源性J基因区段。在其他实施方案中,所有J基因区段均为内源性的。

[0060] 在一些实施方案中,IgH基因座包含对于转基因非人类动物而言为外源性的J基因区段。

[0061] 在一些实施方案中,外源性J基因区段插入至转基因非人类动物基因组中(例如IgH基因座处)。在其他实施方案中,外源性J基因区段置换转基因非人类动物的一个或多个内源性J基因区段。因此,在一些实施方案中,转基因非人类动物包含内源性J基因区段、外源性J基因区段及内源性J基因区段与外源性J基因区段的组合。在其他实施方案中,外源性J基因区段置换转基因非人类动物的所有内源性J基因区段。

[0062] 在一些实施方案中,V、D和/或J基因区段的置换或插入发生在天然V、D和/或J基因区段分别所处的位点。

[0063] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自驼类或来自另一哺乳动物的可变(V)、多样性(D)和/或连接(J)基因区段。

[0064] 举例而言,V、D和/或J区段可来自驼类、来自人类、来自啮齿动物或来自其组合。

[0065] 本文所公开的携带CH1缺失的转基因非人类动物可经修饰以包含驼类V、D和/或J基因区段。或者,本文所公开的携带CH1缺失的转基因非人类动物可经修饰以包含人类V、D和/或J区段。此外,本文所公开的携带CH1缺失的转基因非人类动物可经修饰以包含驼类及人类V、D和/或J区段的组合。此外,本文所公开的携带CH1缺失的转基因非人类动物可经修饰以包含驼类及小鼠V、D和/或J区段的组合。此外,本文所公开的携带CH1缺失的转基因非人类动物可经修饰以包含人类及小鼠V、D和/或J基因区段的组合。

[0066] 具体考虑驼类V、D和/或J基因区段。

[0067] 在一些实施方案中,驼类V、D和/或J区段未经重排。

[0068] 在一些实施方案中,未经重排的驼类V、D和/或J基因区段包括相关内含子,其包含用于VDJ重排的重组信号序列。

[0069] 在一些实施方案中,未经重排的驼类V区段包括周围调节区、内含子序列、前导序列及RSS。

[0070] 在一些实施方案中,未经重排的驼类D区段包括周围驼类调节区、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类RSS。

[0071] 在一些实施方案中,未经重排的驼类J区段包括周围驼类调节区、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类RSS。

[0072] 在一些实施方案中,驼类来自羊驼(Lama)属。

[0073] 在一些实施方案中,驼类来自小羊驼(Vicugna)属。

[0074] 在一些实施方案中,驼类来自驼类(Camelus)属。

[0075] 在一些实施方案中,驼类来自大羊驼(Lama glama)物种。在一些实施方案中,驼类来自南美羊驼(Vicugna pacos)物种。在一些实施方案中,驼类来自小羊驼(Vicugna

vicunia) 物种。在一些实施方案中, 驼类来自原驼 (*Lama guanicoe*) 物种。在一些实施方案中, 驼类来自双峰驼 (*Camelus Bactrianus*) 物种。在一些实施方案中, 驼类来自单峰驼 (*Camelus Dromedarius*) 物种。

[0076] 在一些实施方案中, 驼类V基因区段以保留一些或全部内源性V基因区段的方式插入动物基因组内。在示例性实施方案中, 保留所有内源性V基因区段。在示例性实施方案中, 至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个内源性V区段经移除或置换。因此, 在一些实施方案中, 至少1个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少2个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少3个内源性V区段经移除或替换。在一些实施方案中, 至少4个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少5个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少6个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少7个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少8个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少9个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少10个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少15个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少20个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少25个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少30个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少40个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少50个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少60个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少70个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少80个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少90个内源性V区段经移除或置换。在一些实施方案中, 多于100个内源性V区段经移除或置换。在示例性实施方案中, 所有内源性V区段经移除或置换。

[0077] 在一些实施方案中, 驼类D基因区段以保留一些或全部内源性D基因区段的方式插入动物基因组内。在示例性实施方案中, 保留所有内源性D区段。在示例性实施方案中, 至少1个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少2个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少3个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少4个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少5个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少6个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少7个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少8个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少9个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少10个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少11个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少12个内源性D区段经移除或置换。在一些实施方案中, 至少13个内源性D区段经移除或置换。在示例性实施方案中, 所有内源性D区段经移除或置换。

[0078] 在一些实施方案中, 驼类J基因区段以保留一些或全部内源性J基因区段的方式插入动物基因组内。在示例性实施方案中, 保留所有内源性J区段。在示例性实施方案中, 至少1个内源性J区段经移除或置换。在示例性实施方案中, 至少2个内源性J区段经移除或置换。在示例性实施方案中, 至少3个内源性J区段经移除或置换。在示例性实施方案中, 至少4个内源性J区段经移除或置换。在示例性实施方案中, 所有内源性J区段经移除或置换。

[0079] 或者,在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含 IgH 基因座,其包含a)未经重排的重链可变(V)、多样性(D)及连接(J)基因区段,该基因区段包含驼类D和/或J基因区段;及b)至少一个缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因。

[0080] 举例而言,转基因非人类动物的IgH基因座是通过a)将一个或多个内源性非人类D和/或J基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段及b)部分或完全缺失至少一个IgG恒定区基因的CH1域来修饰。

[0081] 或者,转基因非人类动物的IgH基因座是通过a)插入一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段及b)部分或完全缺失至少一个IgG恒定区基因的CH1域来修饰。

[0082] 在其他实施方案中,转基因非人类动物的IgH基因座是通过以下方式来修饰:a)将一个或多个内源性非人类D和/或J基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段,或插入一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段,及b)修饰至少一个IgG恒定区基因的CH1域。

[0083] 在一些实施方案中,转基因非人类动物的IgH基因座是通过用非人类哺乳动物D及J基因区段置换所有内源性非人类D及J区段来修饰。在一些实施方案中,转基因非人类动物的IgH基因座是通过用未经重排的非人类哺乳动物D及J基因区段置换所有内源性非人类D及J区段来修饰。

[0084] 在其他实施方案中,转基因非人类动物的IgH基因座是通过用未经重排的驼类D及J基因区段置换所有内源性非人类D及J区段来修饰。

[0085] 在一些实施方案中,可保留至少一个内源性非人类D和/或J区段。

[0086] 在一些实施方案中,可保留所有内源性非人类D和/或J区段。

[0087] 在示例性实施方案中,驼类D基因区段来自单一驼类物种。

[0088] 在另一示例性实施方案中,驼类D基因区段来自至少两种驼类物种。

[0089] 在另一示例性实施方案中,驼类D基因区段来自至少三种驼类物种。

[0090] 在另一示例性实施方案中,驼类D基因区段来自至少四种驼类物种。

[0091] 在另一示例性实施方案中,驼类D基因区段来自至少五种驼类物种。

[0092] 在示例性实施方案中,驼类J基因区段来自单一驼类物种。

[0093] 在另一示例性实施方案中,驼类J基因区段来自至少两种驼类物种。

[0094] 在另一示例性实施方案中,驼类J基因区段来自至少三种驼类物种。

[0095] 在另一示例性实施方案中,驼类J基因区段来自至少四种驼类物种。

[0096] 在另一示例性实施方案中,驼类J基因区段来自至少五种驼类物种。

[0097] 根据本公开内容,驼类D及J基因区段来自单一驼类物种。

[0098] 同样根据本公开内容,驼类D及J基因区段来自至少两种驼类物种。

[0099] 同样依据本公开内容,驼类D及J基因区段来自至少三种驼类物种。

[0100] 在一些实施方案中,转基因非人类动物的IgH基因座是通过用多种哺乳动物物种的V基因区段置换一个或多个内源性非人类V基因区段来修饰。

[0101] 在一些实施方案中,转基因非人类动物的IgH基因座是通过插入多种哺乳动物物种的V基因区段来修饰。

[0102] IgH基因座的修饰包括例如用一个或多个驼类V基因区段置换一个或多个内源性非人类V基因区段或插入驼类V基因区段。

- [0103] 在一些情况下,所有内源性非人类V区段经驼类V基因区段置换。
- [0104] 此类置换或插入通常在内源性V位点进行,使得驼类V基因区段与内源性V区段位于相同基因组区域。
- [0105] 在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含a)未经重排的重链可变(V)、多样性(D)及连接(J)基因区段,该基因区段包含来自多种驼类物种的V、D和/或J基因区段;及b)至少一个缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因。
- [0106] 在一些实施方案中,转基因非人类动物的IgG恒定区基因为缺乏功能性CH1域的内源性IgG恒定区基因。然而,在其他实施方案中,也可使用缺乏功能性CH1域的非内源性IgG恒定区(例如人类IgG恒定区或其他)基因。
- [0107] 在一些实施方案中,转基因非人类动物的驼类V基因区段来自单一驼类物种。
- [0108] 或者,在一些实施方案中,驼类V基因区段来自至少两种、至少三种或至少四种驼类物种。因此,在一些实施方案中,驼类V基因区段来自至少两种驼类物种。在一些实施方案中,驼类V基因区段来自至少三种驼类物种。在一些实施方案中,驼类V基因区段来自至少四种驼类物种。在一些实施方案中,驼类V基因区段来自至少五种驼类物种。
- [0109] 在一些实施方案中,V基因区段编码VH多肽。在一些特定实施方案中,VH为驼类VH。
- [0110] 在其他实施方案中,V基因区段编码VHH多肽。在一些特定实施方案中,VHH为驼类VHH。
- [0111] 在本公开内容的其他实施方案中,V基因区段编码VH多肽及VHH多肽。在一些特定实施方案中,VH及VHH为驼类VH及VHH。
- [0112] 在一些实施方案中,驼类VH和/或VHH来自羊驼、美洲驼、双峰驼、单峰驼、小羊驼或其组合。因此,在一些实施方案中,驼类VH和/或VHH包含来自羊驼的VH和/或VHH。在一些实施方案中,驼类VH和/或VHH包含来自美洲驼的VH和/或VHH。在一些实施方案中,驼类VH和/或VHH包含来自双峰驼的VH和/或VHH。在一些实施方案中,驼类VH和/或VHH包含来自单峰驼的VH和/或VHH。在一些实施方案中,驼类VH和/或VHH包含来自小羊驼的VH和/或VHH。
- [0113] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含例如来自羊驼的V区段、来自双峰驼的V区段、来自美洲驼的V区段和/或来自单峰驼、小羊驼的V区段或其组合。
- [0114] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自羊驼的驼类D基因区段。
- [0115] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自双峰驼的驼类D基因区段。
- [0116] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自美洲驼的驼类D基因区段。
- [0117] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自单峰驼的驼类D基因区段。
- [0118] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自小羊驼的驼类D基因区段。
- [0119] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自羊驼的驼类J基因区段。
- [0120] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自双峰驼的驼类J基因区段。
- [0121] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自美洲驼的驼类J基因区段。
- [0122] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自单峰驼的驼类J基因区段。
- [0123] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自小羊驼的驼类J基因区段。
- [0124] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自羊驼的驼类D及J基因区段。
- [0125] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自双峰驼的驼类D及J基因区段。
- [0126] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自美洲驼的驼类D及J基因区段。

[0127] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自单峰驼的驼类D和/或J基因区段。

[0128] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自小羊驼的驼类D和/或J基因区段。

[0129] 在一些示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少七个(包括1、2、3、4、5、6或7个)羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含1个羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个羊驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过7个羊驼D基因区段。

[0130] 在其他示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少七个(包括1、2、3、4、5、6或7个)羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含1个羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个羊驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过7个羊驼J基因区段。

[0131] 在其他示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少七个(包括1、2、3、4、5、6或7个)双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含1个双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个双峰驼D基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过7个双峰驼D基因区段。

[0132] 在一些示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少七个(包括1、2、3、4、5、6、7或超过7个)双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包括1个双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH

基因座包含6个双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个双峰驼J基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过7个双峰驼J基因区段。

[0133] 在其他示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少七个(包括1、2、3、4、5、6、7或超过7个)羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含1个羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过7个羊驼V基因区段。

[0134] 在额外示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少十个(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或超过10个)双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含1个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含8个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含9个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含10个双峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过10个双峰驼V基因区段。

[0135] 在其他示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少十个(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或超过10个)美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含1个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含8个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含9个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含10个美洲驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过10个美洲驼V基因区段。

[0136] 在一些示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少七个(包括1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包括1个单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个单峰驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过7个单峰驼V基因区段。

[0137] 在一些示例性实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含一个至至少七个(包括1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含1个小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含2个小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含3个小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含4个小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含5个小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含6个小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含7个小羊驼V基因区段。在一些实施方案中,本文所公开的转基因动物的IgH基因座包含超过7个小羊驼V基因区段。

[0138] 在一些实施方案中,V基因区段、D基因区段和/或J基因区段编码天然存在的序列。

[0139] 在其他实施方案中,V基因区段、D基因区段和/或J基因区段编码突变或非天然存在的序列。

[0140] 在一些示例性实施方案中,转基因动物的IgG恒定区基因为内源性非人类IgG恒定区基因或其部分。

[0141] 根据本公开内容,缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因可为小鼠 γ 3恒定区基因、小鼠 γ 1恒定区基因、小鼠 γ 2b恒定区基因或小鼠 γ 2a恒定区基因。

[0142] 根据本公开内容,缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因可为大鼠 γ 1恒定区基因、大鼠 γ 2b恒定区基因、大鼠 γ 2a恒定区基因或大鼠 γ 2c恒定区基因。

[0143] 举例而言,在一些实施方案中,转基因动物的IgH基因座包含 γ 3恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因中的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0144] 或者,在一些实施方案中,转基因动物的IgH基因座包含 γ 1恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因中的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0145] 此外,在一些实施方案中,转基因动物的IgH基因座包含 γ 2b恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因中的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0146] 此外,在一些实施方案中,转基因动物的IgH基因座包含 γ 2a恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因中的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0147] 此外,在其他实施方案中,转基因动物的IgH基因座包含 γ 2c恒定区基因,其包含在一个或两个等位基因中的编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0148] 在一些实施方案中,转基因动物包含至少一些与非转基因动物对应物相同的内源性 γ 球蛋白基因。在一些实施方案中,至少一个或所有内源性 γ 球蛋白基因经修饰以允许表达HCAb。

[0149] 在一些示例性实施方案中,转基因动物的至少两个IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0150] 在其他示例性实施方案中,转基因动物的至少三个IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0151] 在其他示例性实施方案中,转基因动物的所有IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0152] 在其他示例性实施方案中,转基因动物的至少一个IgG恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失,且至少一个其他IgG恒定区基因完全或部分缺失。

[0153] 举例而言,本公开内容的转基因非人类动物的基因组可具有至少一个等位基因,其具有包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失的 γ 3恒定区基因、在包含编码CH1域的区域中的部分或完全缺失的 γ 1恒定区基因、在包含编码CH1域的区域中的部分或完全缺失的 γ 2b恒定区基因和/或在包含编码CH1域的区域中的部分或完全缺失的 γ 2a恒定区基因或其组合。

[0154] 在其他示例性实施方案中,转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含 γ 3及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失,且 γ 1及 γ 2a恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0155] 在其他示例性实施方案中,转基因非人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含 γ 2b恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0156] 在其他示例性实施方案中,转基因人类动物基因组的一个等位基因包含IgH基因座,该IgH基因座包含: γ 3恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失,及任选地 γ 2a恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失,和/或 γ 2b恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0157] IgH基因座的修饰可发生在一个或两个等位基因中。因此,在一些实施方案中,转基因非人类动物基因组的另一等位基因包含相同的IgH基因座或相同的IgG恒定区基因。或者,在其他实施方案中,两个等位基因的IgH基因座不同。在一些实施方案中,每个等位基因携带在IgH基因座处或IgG恒定区基因中的不同修饰。

[0158] 在一些实施方案中,转基因非人类动物基因组的另一等位基因包含野生型IgH基因座或野生型IgG恒定区基因。

[0159] 因此,在一些示例性实施方案中,另一等位基因包含野生型内源性 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区基因。

[0160] 在其他示例性实施方案中,转基因非人类动物基因组的另一等位基因包含IgH基因座,其包含选自在编码至少一个或所有IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失、至少一个或所有其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失或其组合的修饰。

[0161] 在一些实施方案中,另一等位基因包含 γ 3、 γ 1及 γ 2b恒定区基因的完全缺失及 γ 2a恒定区基因,该2a恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0162] 在其他实施方案中,另一等位基因包含: γ 3及 γ 2a恒定区基因,其包含在编码CH1

域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

[0163] 在另外的实施方案中，另一等位基因包含 γ 3、 γ 1及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失及 α γ 2a恒定区基因，该2a恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0164] 在其他实施方案中，另一等位基因包含 γ 3恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0165] 在其他实施方案中，另一等位基因包含 γ 3、 γ 1及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

[0166] 在一些实施方案中，另一等位基因包含： γ 3及 γ 2a恒定区基因，其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

[0167] 在其他示例性实施方案中，转基因非人类动物基因组的两个等位基因均包含IgH基因座，其包含 γ 2b恒定区基因，该2b恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0168] 在其他示例性实施方案中，转基因非人类动物基因组的两个等位基因均包含IgH基因座，该IgH基因座包含： γ 3及 γ 2a恒定区基因，该恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失；及 γ 2b恒定区基因的部分或完全缺失。

[0169] 在另一示例性实施方案中，转基因非人类动物基因组的两个等位基因均包含IgH基因座，该IgH基因座包含 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区基因，该恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0170] 在另一示例性实施方案中，转基因非人类动物基因组的两个等位基因均包含IgH基因座，该IgH基因座包含 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区基因，该恒定区基因包含在编码CH1域的区域中的完全缺失。

[0171] 在其他方面及实施方案中，转基因非人类动物IgH基因座在每个等位基因上包含至少一个不同的V基因区段。

[0172] 同样根据本公开内容，转基因非人类动物IgH基因座在其一个等位基因中包含一个物种的至少一个V基因区段且在另一等位基因中包含另一物种的至少一个V基因区段。

[0173] 在本公开内容的方面及实施方案中，转基因非人类动物包含IgM恒定区基因的生殖系修饰。该修饰包含例如将IgM CH1域置换为驼类CH1域。

[0174] 在本公开内容的其他方面及实施方案中，转基因非人类动物包含IgA恒定区基因的生殖系修饰。该修饰包含例如将IgA CH1域置换为驼类CH1域。

[0175] 在本公开内容的又其他方面及实施方案中，转基因非人类动物包含IgE恒定区基因的生殖系修饰。该修饰包含例如将IgE CH1域置换为驼类CH1域。

[0176] 在本公开内容的其他方面及实施方案中，转基因非人类动物包含IgD恒定区基因的生殖系修饰。该修饰包含例如将IgD CH1域置换为驼类CH1域。

[0177] 根据本公开内容，转基因非人类动物包含至少约10kb的美洲驼、双峰驼和/或羊驼物种的驼类V基因区段。

[0178] 根据本公开内容，转基因非人类动物包含至少约20kb的美洲驼、双峰驼和/或羊驼物种的驼类V基因区段。

[0179] 根据本公开内容，转基因非人类动物包含至少约30kb的美洲驼、双峰驼和/或羊驼

物种的驼类V基因区段。

[0180] 根据本公开内容,转基因非人类动物包含至少约40kb的美洲驼、双峰驼和/或羊驼物种的驼类V基因区段。

[0181] 根据本公开内容,转基因非人类动物包含至少约50kb的美洲驼、双峰驼和/或羊驼物种的驼类V基因区段。

[0182] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含少于50kb的美洲驼、双峰驼和/或羊驼物种的驼类V基因区段。

[0183] 另外根据本公开内容,V基因区段、D基因区段及J基因区段能够进行VDJ重排。举例而言,内源性V基因区段可用驼类D及J区段重排。或者,驼类V基因区段可重排成驼类D及J。

[0184] 在一些实施方案中,转基因非人类动物为杂合的。

[0185] 在其他实施方案中,转基因非人类动物为纯合的。

[0186] 在示例性实施方案中,转基因非人类动物为转基因大鼠。

[0187] 在其他示例性实施方案中,转基因非人类动物为转基因小鼠。

[0188] 根据本公开内容的示例性实施方案,转基因非人类动物为具有IgH基因座的转基因小鼠,该IgH基因座包含编码缺乏CH1域的小鼠IgG1、小鼠IgG2a、小鼠IgG2b或小鼠IgG3恒定区的IgG恒定区基因。

[0189] 在示例性实施方案中,转基因小鼠具有至少两个选自缺乏CH1域的IgG1基因、IgG2a基因、IgG2b基因或IgG3基因的恒定区的IgG恒定区。

[0190] 在另一示例性实施方案中,转基因小鼠具有至少三个选自缺乏CH1域的IgG1基因、IgG2a基因、IgG2b基因或IgG3基因的恒定区的IgG恒定区。

[0191] 在又一示例性实施方案中,转基因小鼠IgG1基因、IgG2a基因、IgG2b基因或IgG3基因中的每一种缺乏CH1域。

[0192] 在另一示例性实施方案中,转基因小鼠的IgG1基因、IgG2a基因、IgG2b基因或IgG3基因中的至少一种部分或完全缺失。

[0193] 在一些示例性实施方案中,转基因小鼠的所有内源性小鼠D及J基因区段经未经重排的驼类D及J基因区段置换。

[0194] 在其他示例性实施方案中,转基因小鼠的IgH基因座包含一个或多个小鼠V基因区段及未经重排的驼类V基因区段。

[0195] 在其他示例性实施方案中,转基因小鼠的所有内源性小鼠V基因区段经未经重排的驼类V基因区段置换。

[0196] 在其他实施方案中,转基因小鼠具有至少一个缺乏功能性CH1域的内源性小鼠IgG恒定区基因。

[0197] 在另外的实施方案中,转基因小鼠的一个等位基因的所有内源性小鼠IgG恒定区基因缺乏功能性CH1域。

[0198] 在其他实施方案中,转基因小鼠的两个等位基因的所有内源性小鼠IgG恒定区基因均缺乏功能性CH1域。

[0199] 在一些示例性实施方案中,转基因小鼠为杂合的且具有一个等位基因,该位基因包含在编码至少一个IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失及任选地至少一个其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失,且另一等位基因为野生型。

[0200] 此外,在其他示例性实施方案中,转基因小鼠为杂合的且具有一个等位基因,该位基因包含在编码至少一个IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失及任选地至少一个或所有其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失,且另一等位基因任选地包含在编码至少一个IgG恒定区基因的CH1域的区域中的部分或完全缺失或至少一个或所有其他IgG恒定区基因的完全或部分缺失或其组合。

[0201] 在其他示例性实施方案中,转基因小鼠为纯合的。

[0202] 在另外的示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物为在IgH基因座处具有生殖系修饰的转基因小鼠,该生殖系修饰包含a)将内源性小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段;b)将一个或多个内源性小鼠V基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段,或插入一个或多个未经重排的驼类V基因区段;及c)缺失至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因的CH1域,使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

[0203] 在其他示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物为在IgH基因座处具有生殖系修饰的转基因小鼠,该生殖系修饰包含a)在内源性小鼠D和/或J位点插入未经重排的驼类D和/或J基因区段;b)将一个或多个内源性小鼠V基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段,或插入一个或多个未经重排的驼类V基因区段;及c)缺失至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因的CH1域,使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

[0204] 在另一示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物为在IgH基因座处具有生殖系修饰的转基因小鼠,该生殖系修饰包含a)将内源性小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段;b)将一个或多个内源性小鼠V基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段,或插入一个或多个未经重排的驼类V基因区段;及c)修饰至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因的CH1域,使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

[0205] 在另一示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物为在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的转基因小鼠,其中该修饰包含缺失内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因及 γ 2a基因中的每一种的CH1域、将小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段、插入来自多种驼类物种的驼类V基因区段,及任选地缺失至少一个或所有内源性小鼠V基因区段。

[0206] 在一些实施方案中,驼类V区段编码驼类VH及驼类VHH多肽。

[0207] 在一些实施方案中,转基因非人类动物在用抗原进行免疫接种后能够表达仅重链抗体(HCAb)或编码该抗体的核酸。

[0208] 在一些实施方案中,驼类V区段编码来自羊驼、双峰驼及美洲驼的VH和/或VHH多肽。

[0209] 在一些实施方案中,驼类V区段编码来自羊驼、双峰驼、美洲驼及单峰驼的VH和/或VHH多肽。

[0210] 在一些实施方案中,驼类V区段编码来自羊驼、双峰驼、美洲驼、小羊驼及单峰驼的VH和/或VHH多肽。

[0211] 在示例性实施方案中,转基因小鼠具有表征为H-2^b的MHC单倍型。

- [0212] 在其他示例性实施方案中,转基因小鼠具有C57BL/6小鼠品系的遗传背景。
- [0213] 在一些实施方案中,转基因小鼠具有近亲品系的遗传背景,包括例如但不限于C3H、FVB或129/Sv。
- [0214] 在一些实施方案中,转基因小鼠具有远亲杂交品系的遗传背景,包括例如但不限于CD-1或CF-1。
- [0215] 在另一方面中,本公开内容涉及一种用于获得仅重链抗体(HCAb)或HCAb的抗原结合域、编码HCAb的核酸、HCAb的抗原结合域或其一部分的方法。
- [0216] 在示例性实施方案中,该方法包括用抗原对本文所公开的转基因非人类动物进行免疫接种。
- [0217] 该转基因非人类动物可以在用抗原免疫接种后产生多个HCAb。多个HCAb可以包含例如至少一种HCAb物种,其包含由第一驼类物种的V区编码的V部分;及第二HCAb物种,其包含由第二驼类物种的V区编码的V部分。
- [0218] 在一些实施方案中,本公开内容的方法包括自转基因非人类动物收集总RNA或信使RNA的步骤。
- [0219] 在一些实施方案中,收集血清样品和/或脾脏组织且提取RNA以构建一个或多个可变重链(VH)文库。
- [0220] 在一些实施方案中,HCAb基于其针对抗原的结合特性加以选择。
- [0221] 在一些实施方案中,该方法包括确定HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区的氨基酸序列或核酸序列的步骤。
- [0222] 在示例性实施方案中,该方法基于计算机的且包含用于基于预定参数在簇中组织序列信息的软件。
- [0223] 在一些实施方案中,本公开内容的方法包括选择HCAb的一个或多个序列以制造结合剂的步骤。
- [0224] 结合剂的示例性实施方案包括例如但不限于抗体(包括双特异性、三特异性、多特异性抗体)、单域抗体、单链Fv、嵌合抗原受体(CAR)、双特异性T细胞接合子构建体(BiTE)、双特异性杀伤细胞接合子(BiKE)、三特异性杀伤细胞接合子(TriKE)或其抗原结合片段。
- [0225] 在示例性实施方案中,结合剂呈以下中所阐述的形式:美国临时申请第62/951,701号及2021年6月24日公开的PCT/CA2020/051753中,编号为W02021119832A1,或如Deyev, S.M等人(BioEssays 30:904-918, 2008)中所述,所有参考文献的全部内容以引用的方式并入本文中。
- [0226] 在一些实施方案中,结合剂包含例如内源性VH部分。
- [0227] 在一些实施方案中,结合剂包含例如驼类VHH部分。
- [0228] 在一些实施方案中,结合剂包含例如驼类VH部分。
- [0229] 在一些实施方案中,结合剂包含例如驼类D部分。
- [0230] 在一些实施方案中,结合剂包含例如驼类J部分。
- [0231] 在一些实施方案中,结合剂为多价和/或多特异性抗体。
- [0232] 此外,根据本公开内容,可以对转基因小鼠进行该方法,该转基因小鼠在IgH基因座处包含生殖系修饰,该生殖系修饰包含a)将一个或多个内源性小鼠V基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段,或插入未经重排的驼类V基因区段;b)用驼类D及J区

段置换至少一个或所有内源性小鼠D及J区段；及c)缺失或修饰至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b或 γ 3基因的CH1域，使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b或 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

[0233] 本公开内容还涵盖用于制造结合剂的方法。

[0234] 在一些实施方案中，该方法包括用抗原对本公开内容的转基因非人类动物进行免疫接种、获得至少一种HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区的氨基酸序列或核酸序列，及生成包含该氨基酸序列的结合剂。

[0235] 在示例性实施方案中，获得多个HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区的氨基酸序列或核酸序列，并生成包含最具代表性或常见序列的结合剂。

[0236] 在另一示例性实施方案中，获得多个HCAb物种的一个或多个互补决定区或可变区的氨基酸序列或核酸序列，并生成包含最不具代表性或独特序列的结合剂。

[0237] 本公开内容还涉及一种结合剂，其包含氨基酸序列或由核酸序列编码，该核酸序列是通过本文所公开的方法获得或自本文所公开的转基因非人类动物分离或获得。

[0238] 本公开内容还涉及一种结合剂，其包含氨基酸序列或由核酸序列编码，该核酸序列是通过用抗原对本文所公开的转基因非人类动物进行免疫接种而获得。

[0239] 在一些实施方案中，该抗原为由人类细胞表达的抗原。

[0240] 在一些实施方案中，抗原为肿瘤抗原。

[0241] 在一些实施方案中，抗原为检查点蛋白质。

[0242] 在一些实施方案中，抗原为在免疫细胞表面表达的蛋白质。

[0243] 在一些实施方案中，抗原来自病原体，且包括例如但不限于细菌抗原、病毒抗原、寄生虫抗原。

[0244] 本公开内容还涉及用于在IgH基因座处靶向置换基因区段的核酸构建体。

[0245] 本公开内容还涉及用于在IgH基因座处靶向插入基因区段的核酸构建体。

[0246] 在一些实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组非人类D和/或J区段。在一些实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组人类D和/或J区段。

[0247] 在一些实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组驼类D和/或J区段。

[0248] 在一些实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组内源性小鼠D和/或J区段。

[0249] 在一些实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组内源性小鼠D和/或J区段及基因组驼类D和/或J区段。

[0250] 在一些实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组非人类V、D和/或J区段。在一些实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组人类V、D和/或J区段。

[0251] 在其他实施方案中，本公开内容的核酸构建体包含基因组驼类V、D和/或J区段。

[0252] 在一个实施方案中，该核酸构建体为DNA构建体。

[0253] 根据本公开内容，该DNA构建体包含基因组驼类V区段及包含用于VDJ重排的重组信号序列的内含子。

[0254] 在示例性实施方案中，DNA构建体包含来自至少一种物种的驼类V区段。

[0255] 在另一示例性实施方案中，DNA构建体包含来自至少两种物种的驼类V区段。

[0256] 在又一示例性实施方案中，DNA构建体包含来自至少三种物种的驼类V区段。

- [0257] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体包含来自至少四种物种的驼类V区段。
- [0258] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体包含来自至少五种物种的驼类V区段。
- [0259] 根据本公开内容,驼类V区段编码驼类VH或驼类VHH多肽。
- [0260] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含来自一种驼类物种的D及J区段。
- [0261] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含来自两种驼类物种的D及J区段。
- [0262] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含来自三种驼类物种的D及J区段。
- [0263] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含来自四种驼类物种的D及J区段。
- [0264] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含来自五种驼类物种的D及J区段。
- [0265] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个羊驼D基因区段。
- [0266] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个羊驼J基因区段。
- [0267] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个双峰驼D基因区段。
- [0268] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个双峰驼J基因区段。
- [0269] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个美洲驼D基因区段。
- [0270] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个美洲驼J基因区段。
- [0271] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个单峰驼D基因区段。
- [0272] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个单峰驼J基因区段。
- [0273] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个小羊驼D基因区段。
- [0274] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少七个小羊驼J基因区段。
- [0275] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少十个羊驼V基因区段。
- [0276] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少十个双峰驼V基因区段。
- [0277] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少十个美洲驼V基因区段。
- [0278] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少十个单峰驼V基因区段。
- [0279] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体包含一个至至少十个羊驼V基因区段。
- [0280] 在示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含小鼠VH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0281] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含小鼠VH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0282] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0283] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH区段和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0284] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含小鼠VH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0285] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双驼峰VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段、双驼峰D区段、双驼峰J区段及羊驼J区段。
- [0286] 在示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双驼峰VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、双驼峰D区段及双驼峰J区段。

[0287] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含羊驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、单峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0288] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体以5'至3'形式包含羊驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、单峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0289] 根据本公开内容,DNA构建体以人工染色体形式提供。举例而言,在一些实施方案中,DNA构建体以细菌人工染色体(BAC)形式提供。在一些实施方案中,DNA构建体以酵母人工染色体(YAC)形式提供。在一些实施方案中,DNA构建体以哺乳动物人工染色体(MAC)形式提供。

[0290] 本发明还涉及本文所公开的DNA构建体用于修饰胚胎非人类干细胞或用于制造转基因非人类动物的用途。

[0291] 本发明还涉及通过本文所公开的DNA构建体修饰的经分离的胚胎非人类干细胞。

[0292] 在示例性实施方案中,本公开内容的经分离的胚胎非人类干细胞在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰,该免疫球蛋白重链(IgH)基因座包含:a)未经重排的重链可变(V)、多样性(D)及连接(J)基因区段,且其中D和/或J基因区段包含驼类D和/或J基因区段;及b)至少一个缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因。

[0293] 对内源性IgG恒定区进行修饰。

[0294] 本文所公开的胚胎非人类干细胞可用于制造转基因非人类动物。

[0295] 本公开内容还提供一种制造转基因非人类动物的方法。

[0296] 在一些实施方案中,该方法包括以下步骤:将本文所公开的胚胎非人类干细胞注射至小鼠囊胚中,将小鼠囊胚或胚胎植入假孕小鼠中,及选择携带生殖系修饰的小鼠后代。

[0297] 本公开内容还涉及自本文所公开的转基因非人类动物分离的细胞。

[0298] 在一些方面中,提供制造转基因动物的方法,其包含使用如本文所述的核酸构建体。

[0299] 在一些实施方案中,制造转基因动物的方法包括将核酸构建体引入干细胞中,该核酸包含基因组驼类D和/或J区段,且任选地包含基因组驼类V区段,且其中该核酸构建体包含内含子,该内含子包含用于VDJ重排的重组信号序列。

[0300] 在其他示例性实施方案中,制造转基因动物的方法包括向假孕小鼠植入显微注射了本文所公开的经基因修饰的胚胎干细胞的囊胚。

[0301] 在其他示例性实施方案中,制造转基因动物的方法包括向假孕小鼠植入显微注射了经本文所公开的核酸构建体基因修饰的胚胎干细胞的囊胚。

[0302] 在一些实施方案中,该方法可包含自同窝中选择嵌合小鼠。

[0303] 在一些实施方案中,该方法可包含通过使嵌合小鼠与野生型小鼠回交而生成F1杂合动物。

[0304] 在一些实施方案中,该方法可包含通过与F1动物杂交而生成F2纯合动物。

[0305] 举例而言,将显微注射有经本文所公开的核酸构建体基因修饰的胚胎干细胞的囊胚植入假孕小鼠中,自同窝中选择嵌合小鼠,并任选地通过使嵌合小鼠与野生型小鼠回交

而生成F1杂合动物，并且任选地通过与F1动物杂交而生成F2纯合动物。

[0306] 在另一实例中，将显微注射有本文所公开的胚胎干细胞的囊胚植入假孕小鼠中，自同窝中选择嵌合小鼠，并任选地通过使嵌合小鼠与野生型小鼠回交而生成F1杂合动物，并且任选地通过与F1动物杂交而生成F2纯合动物。

[0307] 在一些实施方案中，核酸包含来自至少两种、三种或四种不同物种的V、D和/或J基因序列。

[0308] 在一些实施方案中，核酸包含来自至少两种、三种或四种驼类物种的V、D和/或J基因序列。

[0309] 附图简要说明

[0310] 图1：在小鼠IgH基因座上的小鼠 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区中将细菌人工染色体(BAC1)构建体与CH1域缺失(外显子2)进行靶向整合的示意图。

[0311] 图2：经由小鼠ES细胞中的CRISPR靶向使 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区的CH1域缺失的逐步策略的示意图。

[0312] 图3：使小鼠受精卵中的 γ 3、 γ 2b及 γ 2a恒定区的CH1域缺失的CRISPR靶向策略的示意图。

[0313] 图4：代表性转基因系的IgH基因座的基因修饰的示意图。

[0314] 图5：对获自预免疫的转基因4动物(TG 4)或转基因6动物(TG 6)的血清样品的蛋白质印迹分析(还原条件)。

[0315] 图6A至6C：对获自预免疫的转基因4动物(TG 4)(图6A)、转基因6动物(TG 6)(图6B)或转基因2动物(TG 2)(图6C)的血清样品的蛋白质印迹分析(非还原条件)。

[0316] 图6D至6E：通过轻链检测对获自预免疫的转基因4动物(TG 4)及转基因6动物(TG 6)(图6D)或转基因2动物(TG 2)(图6E)的血清样品进行蛋白质印迹分析(非还原条件)。

[0317] 图6F至6I：对获自转基因2动物(TG 2)的血清样本中的IgG3(图6F)、IgG1(图6G)、IgG2b(图6H)及IgG2a(图6I)抗体的ELISA定量。

[0318] 图7A：本图显示用靶标1抗原免疫接种转基因6动物之后的抗体效价，如通过ELISA(稀释度1/100及1/15000)所测量。每条线代表不同转基因6动物。

[0319] 图7B：对来自经具有抗IgG2a或抗IgG3的靶标1免疫接种的转基因6动物的血清样品的蛋白质印迹分析。

[0320] 图7C：本图显示在用CD3抗原(靶标2)免疫接种转基因6动物之后的抗体效价，如通过ELISA所测量(稀释度1/150及1/12150)。每条线代表不同转基因6动物。

[0321] 图7D：本图显示在用靶标3抗原免疫接种转基因6动物之后的抗体效价，如通过ELISA所测量(稀释度1/100及1/15000)。每条线代表不同转基因6动物。

[0322] 图7E：本图显示用野生型SARS-CoV-2刺突蛋白免疫接种的转基因6动物对刺突糖蛋白变异数B.1.351(β)的血清交叉反应性，如通过ELISA所测量(第1天及第38天的血清样品，稀释度1/100、1/4000及1/640000)。

[0323] 图7F：本图显示用SARS-CoV-2野生型刺突蛋白免疫接种的转基因6动物对刺突糖蛋白变异数B.1.1.7(α)的血清交叉反应性，如通过ELISA所测量(第1天及第38天的血清样品，稀释度1/100、1/4000及1/640000)。

[0324] 图7G：本图显示SARS-CoV-2野生型刺突蛋白与人类ACE2(hACE2)靶标的结合的血

清中和。

[0325] 图7H:本图显示用靶标3抗原免疫接种转基因2动物之后的抗体效价,如通过ELISA所测量(稀释度1/100及1/15000)。每条线代表不同转基因2动物。

[0326] 图7I:本图显示获自用SARS-CoV-2野生型刺突蛋白免疫接种的转基因2动物的血清对刺突糖蛋白变体B.1.351 (β) 的交叉反应性,如通过ELISA所测量(第1天及第38天的血清样品,稀释度1/100、1/4288及1/643393)。

[0327] 图7J:本图显示获自用SARS-CoV-2野生型刺突蛋白免疫接种的转基因2动物的血清对刺突糖蛋白变体B.1.1.7 (a) 的交叉反应性,如通过ELISA所测量(第1天及第38天的血清样品,稀释度1/100、1/4288及1/643393)。

[0328] 图8A:下一代测序(NGS)分析,其比较衍生自转基因6动物及经靶标1免疫接种的羊驼的免疫文库。

[0329] 图8B:举例说明转基因6动物及羊驼免疫文库中的重叠序列的示意图。

[0330] 图9A:本图显示来自转基因6文库的所选sdAb-Fc与不同物种的重组靶标1的结合,如通过ELISA所测量。

[0331] 图9B:本图显示来自转基因6文库的所选sdAb-Fc与表达靶标1的细胞的结合,如通过FACS所测量。

[0332] 图10A:举例说明用获自转基因6动物免疫文库的所选sdAb-Fc处理植入了MDA-MB-453三阴性乳房肿瘤细胞的NCG小鼠的流程。

[0333] 图10B:本图显示用所选抗靶标1sdAb-Fc标记的sdAb1-sdAb4处理的NCG小鼠中MDA-MB-453的已确立免疫肿瘤学模型中随时间推移的肿瘤体积。

[0334] 图11A:显示驼类V区段及周围驼类调节序列的基因组组织的示意图。

[0335] 图11B及11C:用于生成转基因动物的示例性DNA构建体的示意图(未举例说明恒定区基因座)。

[0336] 图12:示例性细菌人工染色体构建体与多物种VHH/VH基因区段及来自羊驼的整个D及J基因区段的靶向整合的示意图。

[0337] 图13A-C:代表性转基因系的IgH基因座的示例性基因修饰的示意图;插入双峰驼及羊驼VH/VHH区段及用羊驼D/J区段置换小鼠D/J区段(图13A);插入美洲驼、双峰驼及羊驼VH/VHH区段及用羊驼D/J区段置换小鼠D/J区段(图13B);或插入双峰驼、美洲驼及羊驼VH/VHH区段及用羊驼D/J区段(Bac4b构建体)置换小鼠D/J区段(图14C)。

[0338] 图14A-B:在转基因动物的D及J基因上进行的基因修饰的示意图;在携带BAC4b的ES克隆中用双驼峰D及J区段置换羊驼D及J区段以生成BAC6 ES克隆及转基因动物(图14A),及将双驼峰D及J区段插入包含羊驼D及J区段的转基因小鼠中(图14B)。

[0339] 图15A:对携带BAC4a修饰的ES克隆进行基因修饰以生成BAC5 ES克隆的示意图(未举例说明恒定区基因座)。

[0340] 图15B:对携带BAC5修饰的ES克隆进行基因修饰以生成BAC7 ES克隆的示意图(未举例说明恒定区基因座)。

[0341] 图16A:使用抗驼类VHH抗体对来自嵌合动物的BAC4b预免疫的血清样品的血清样品进行的蛋白质印迹检测。

[0342] 图16B:使用抗驼类VHH抗体对BAC4b预免疫的F1杂合动物的血清样品进行的蛋白

质印迹检测。

[0343] 详述

[0344] 定义

[0345] 除非另有指示,否则用于二聚域的氨基酸编号根据EU编号系统。

[0346] 除非本文另有指示或明显与上下文相矛盾,否则在描述实施方案的上下文中(尤其在申请专利范围的上下文中)使用术语“a”和“an”及“the”及类似参照词应理解为涵盖单数及复数。

[0347] 除非明确陈述或自上下文显而易见,否则如本文所用的术语“或”应理解为包括性的且涵盖“或”与“和”。

[0348] 本文所使用的“和/或”应被视为特定公开每一指定特征或组分(在另一特征或组分存在或不存在的情况下)。

[0349] 除非另外指出,否则术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”及“含有(containing)”应理解为开放式术语(即表示“包括但不限于”)。术语“由.....组成”被视为封闭式的。

[0350] 术语“治疗”出于本发明的目的是指治疗性处理及防治性或预防性措施。需要治疗者包括已患该病症者以及易患该病症者;以及有待预防该病症者。

[0351] 关于给定值的术语“约”或“大约”表示涵盖值的变化。在一些实施方案中,术语“约”或“大约”一般将表示在给定值或范围的+/-20%内、+/-10%内、+/-5%内、+/-4%内、+/-3%内、+/-2%内或+/-1%内的范围。

[0352] 在本文中应理解,关于给定值的术语“至少”意欲包括该值及上位值。举例而言,术语“至少一个”包括“至少两个”、“至少三个”、“至少四个”、“至少五个”、“至少六个”、“至少七个”、“至少八个”、“至少九个”、“至少十个”等。举例而言,术语“至少80%”包括“至少81%”、“至少82%”、“至少83%”、“至少84%”、“至少85%”、“至少86%”、“至少87%”、“至少88%”、“至少89%”、“至少90%”、“至少91%”、“至少92%”、“至少93%”、“至少94%”、“至少95%”、“至少96%”、“至少97%”、“至少98%”、“至少99%”、“至少99.1%”、“至少99.2%”、“至少99.3%”、“至少99.4%”、“至少99.5%”、“至少99.6%”、“至少99.7%”、“至少99.8%”、“至少99.9%”及100%。

[0353] 如本文所用,术语“结合剂”是指包含抗体或其抗原结合片段的抗原结合域的化合物。

[0354] 如本文所用,术语“抗原结合域”是指涉及与抗原结合的抗体的域,且包括CDRH3、CDRH1、CDRH2及CDRH3的组合、或抗体或其抗原结合片段的完整可变区。

[0355] 如本文所用,术语“抗体”涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、人类抗体、单域抗体(诸如VHH、VH、VL、纳米抗体或来自驼类或鲨鱼及其类似物的单域抗体)等。术语“抗体”涵盖具有与天然存在的抗体(例如IgG、IgM、IgD、IgA、IgE、单域抗体等)的形式或其他形式(诸如双特异性抗体、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体及类似物)类似的形式的分子。

[0356] 如本文所用,术语“转基因”是指引入至诸如非人类动物的宿主的基因组中的基因或其部分。

[0357] 如本文所用,术语“转基因非人类动物”或“转基因动物”是指携带一个或多个转基

因且涵盖嵌合动物、杂合动物及纯合动物的非人类动物。

- [0358] 术语“VH”是指经典抗体重链的可变区。
- [0359] 术语“VHH”是指仅重链抗体的可变区。
- [0360] 术语VH区段是指经典抗体重链的V区段。
- [0361] 术语VHH区段是指仅重链抗体的V区段。
- [0362] 应理解,如本文所用的术语V区段是指VH区段或VHH区段。
- [0363] 术语VH多肽是指由VH区段编码的氨基酸序列。
- [0364] 术语VHH多肽是指由VHH区段编码的氨基酸序列。
- [0365] 关于基因或区段的术语“内源性”是指动物基因组的天然基因或区段。
- [0366] 术语“内源性V位点”是指V区段位于动物基因组中的位点或位置。
- [0367] 术语“内源性D位点”是指D区段位于动物基因组中的位点或位置。
- [0368] 术语“内源性J位点”是指J区段位于动物基因组中的位点或位置。
- [0369] 关于基因或区段的术语“非内源性”是指外源性基因或区段。
- [0370] 术语“野生型”是指尚未修饰(即未经修饰(non-modified或unmodified))或在自然界中存在的序列。
- [0371] 术语“功能性CH1域”是指包含允许与轻链配对的氨基酸残基的CH1域。
- [0372] 术语“CH1域的缺失”是指CH1域中负责使重链与轻链配对的一个或多个氨基酸残基的缺失、包含此类氨基酸残基的部分的缺失(即称为部分缺失)或整个CH1域的缺失(称为完全缺失)。
- [0373] 术语“CH1域的修饰”是指防止重链与轻链配对的氨基酸突变或取代。
- [0374] 关于给定基因的术语“完全或部分缺失”是指产生通常由未表达的基因编码的给定蛋白质或外显子的缺失。
- [0375] 在本公开内容中,动物的基因组经修饰以表达单域抗体。本文所公开的一些转基因动物可有利地产生各种遗传背景及同种型的单域抗体。
- [0376] 生成本公开内容的转基因动物涉及设计或生成包含所需修饰的核酸构建体,及获得经基因修饰的胚胎干细胞或受精卵。将这些胚胎干细胞或受精卵显微注射至囊胚期胚胎中,并植入假孕雌性小鼠中。选择包含转基因的嵌合体用于后续育种。获得具有所需基因修饰的杂合或纯合动物。
- [0377] 在本公开内容中,本文公开携带经修饰IgH基因座的转基因动物。
- [0378] 核酸构建体
- [0379] 因此,本文所公开的核酸构建体包含允许修饰动物的IgH基因座的序列。
- [0380] 在示例性实施方案中,DNA构建体设计成允许修饰小鼠或小鼠胚胎干细胞中的IgH基因座。
- [0381] DNA构建体包含用于同源重组的序列且通常包含抗生素抗性基因或标记物,其允许选择已结合转基因的细胞。举例而言,DNA构建体可包含loxP位点及同源臂,使得所关注的基因插入动物基因组内的所需位置处,诸如小鼠IgH基因座处。
- [0382] 在一些情况下,DNA构建体与靶向内部同源序列的CRISPR构建体共同注射以增强该结合。
- [0383] 在其他情况下,DNA构建体包含用基因编辑工具靶向基因的序列,该基因编辑工具

诸如规律成簇的间隔回文重复 (CRISPR) -Cas9系统、锌指核酸酶 (ZFN) 系统、转录活化因子样效应物核酸酶 (TALENS) 系统或类似物。

[0384] 本公开内容的DNA构建体包含例如基因,其具有内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的缺失或修饰。

[0385] CH1域的缺失包括CH1域的部分缺失或完全缺失。尤其考虑CH1域的完全缺失。

[0386] CH1域的修饰包括涉及与轻链配对的氨基酸残基的突变,其导致显著减少或缺乏或配对。CH1域中的其他修饰包括导致CH1外显子未结合至信使RNA中的核酸突变。

[0387] 或者,DNA构建体包含基因,该基因具有至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的CH1域的缺失或修饰与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的完全或部分缺失的组合。

[0388] 在一些情况下,DNA构建体还可包含V、D和/或J基因区段(诸如未经重排的V、D和/或J基因区段)及相关内含子,其包含用于VDJ重排的重组信号序列。

[0389] DNA构建体可包含多个D和/或J基因区段。在某些情况下,多个D和/或J基因区段均来源于单一物种。在其他情况下,多个D和/或J基因区段来源于至少两个物种。在其他情况下,多个D和/或J基因区段来源于至少三个物种(包括4个及5个物种)。

[0390] DNA构建体可包含多个V基因区段。在某些情况下,多个V基因区段均来源于单一物种。在其他情况下,多个V基因区段来源于至少两个物种。在其他情况下,多个V基因区段来源于至少三个物种。在其他情况下,多个V基因区段来源于至少四个物种。在其他情况下,多个V基因区段来源于至少五个物种。

[0391] DNA构建体可因此包含一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段及包含至少一个IgG恒定区基因的CH1域的部分或完全缺失或修饰的基因。

[0392] 或者,DNA构建体可包含一个或多个未经重排的驼类V、D和/或J基因区段及包含至少一个IgG恒定区基因的CH1域的部分或完全缺失或修饰的基因。

[0393] 在一些情况下,DNA构建体中所包括的经修饰IgG恒定区基因为经修饰小鼠IgG恒定区基因。

[0394] 在其他情况下,DNA构建体中所包括的经修饰IgG恒定区基因为经修饰的人类IgG恒定区基因。

[0395] DNA构建体可包含本文所公开的经修饰免疫球蛋白 γ 基因中的任一个。

[0396] DNA构建体可包含本文所公开的V、D及J区段组合中的任一个。

[0397] 目前用于基因操纵的DNA构建体包括人工染色体,诸如但不限于细菌人工染色体、酵母人工染色体或哺乳动物人工染色体。

[0398] 动物基因组中所整合的序列可经鉴别为转基因。

[0399] V、D及J区段及转基因

[0400] 如本文所公开,转基因非人类动物包含来自驼类或来自另一哺乳动物(诸如,人类或啮齿动物或其组合)的未经重排的V、D和/或J基因区段。

[0401] 在一些实施方案中,该转基因非人类动物包含来自驼类的基因组V、D和/或J基因区段。

[0402] 因此,该转基因非人类动物包含基因组驼类V、D和/或J基因区段,其包括与每个V、D和/或J区段相关的原始驼类调节序列。

[0403] 举例而言,每个驼类V区段包括在上游约5kb及在下游约5kb的V区段,且包括围绕该V区段的驼类调节序列、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类重组信号序列。

[0404] 因此,未经重排的驼类V区段包括周围驼类调节区、周围驼类内含子序列、周围驼类前导序列及周围驼类RSS。

[0405] 在一些实施方案中,未经重排的驼类D区段包括周围驼类调节区、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类RSS。

[0406] 举例而言,每个驼类D区段包括围绕该D区段的驼类调节序列、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类重组信号序列。

[0407] 在一些实施方案中,未经重排的驼类J区段包括周围驼类调节区、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类RSS。

[0408] 举例而言,每个驼类J区段包括围绕该J区段的驼类调节序列、驼类内含子序列、驼类前导序列及驼类重组信号序列。

[0409] 因此,DNA构建体、转基因或转基因非人类动物的驼类调节序列、驼类内含子序列、驼类前导序列和/或驼类重组信号序列对应于基因组驼类调节序列、基因组驼类内含子序列、基因组驼类前导序列和/或基因组驼类重组信号序列。

[0410] 因此,未经重排的驼类V基因区段包含相关内含子,其包含用于VDJ重排的重组信号序列。

[0411] 每个驼类V基因区段包含其原始的调节序列。

[0412] 转基因可通过在IgH基因座处基因敲除/基因敲入技术引入动物基因组内。

[0413] 重链的V区段编码抗体可变区的主要部分,包括框架1(FR1)、CDRH1、框架2(FR2)、CDRH2、框架3(FR3)及CDR3的一部分。

[0414] D及J区段编码CDR3的其余部分,而J区段也编码框架四(4)。

[0415] 本公开内容的一些转基因非人类动物携带包含驼类D和/或J区段的转基因。在一些情况下,所有驼类D和/或J段均来自一个驼类物种。在其他情况下,驼类D和/或J区段来自多个驼类物种。在示例性实施方案中,所有内源性D和/或J区段经置换为驼类D和/或J区段。在其他示例性实施方案中,保留一些内源性D和/或J区段,并插入驼类D和/或J区段。在其他示例性实施方案中,保留所有内源性D和/或J区段,并插入驼类D和/或J区段。

[0416] 本公开内容的一些转基因非人类动物可携带来自多个物种的V基因区段的组合。例如,该转基因非人类动物除外源性V基因区段之外可包含内源性V基因区段。本公开内容的转基因小鼠包含例如小鼠V区段以及驼类V区段。然而,本文还涵盖来自啮齿动物、驼类或人类的V区段的任何组合。

[0417] 本公开内容的一些转基因非人类动物携带包含驼类V基因区段的转基因。在某些情况下,V基因区段均来自一个驼类物种。在其他情况下,V基因区段来自至少两个驼类物种。在其他情况下,V基因区段来自至少三个驼类物种。在额外情况下,V基因区段来自至少四个驼类物种。在额外情况下,V基因区段来自至少五个驼类物种。

[0418] 在一些示例性实施方案中,该转基因非人类动物包含转基因,该转基因包含来自驼类的V、D及J基因区段。在其他示例性实施方案中,转基因包含来自人类的V、D及J基因区段。在额外示例性实施方案中,转基因包含来自啮齿动物的V、D及J基因区段。

[0419] 在示例性实施方案中,V区段来自啮齿类动物且D及J区段来自驼类。在示例性实施

方案中,V区段来自啮齿动物且D及J区段来自啮齿动物及驼类。在示例性实施方案中,V区段来自啮齿动物及驼类且D及J区段来自啮齿动物及驼类。

[0420] 在示例性实施方案中,V、D和/或J基因区段选自羊驼、双峰驼、美洲驼、小羊驼和/或单峰驼或其组合。

[0421] 在示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0422] 在另一示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0423] 在另一示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0424] 在又一示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0425] 在另一示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0426] 在另一示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段、双峰驼D区段、双峰驼J区段及羊驼J区段。

[0427] 在示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、双峰驼D区段及双峰驼J区段。

[0428] 在示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含小鼠VH区段、羊驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、单峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0429] 在示例性实施方案中,V、D及J区段以一定方式组合,使得DNA构建体或转基因以5'至3'形式包含羊驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、单峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。

[0430] DNA构建体或转基因可包含例如一个至至少七个羊驼D基因区段。

[0431] 或者,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个羊驼J基因区段。

[0432] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)双峰驼D基因区段。

[0433] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如,1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)双峰驼J基因区段。

[0434] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如,1、

2、3、4、5、6、7个或超过7个)单峰驼D基因区段。

[0435] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如,1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)单峰驼J基因区段。

[0436] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如,1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)美洲驼D基因区段。

[0437] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如,1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)美洲驼J基因区段。

[0438] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如,1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)小羊驼D基因区段。

[0439] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少七个(例如,1、2、3、4、5、6、7个或超过7个)小羊驼J基因区段。

[0440] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少六个(例如1、2、3、4、5、6个或超过6个)羊驼V基因区段。

[0441] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含所有羊驼V基因区段。

[0442] 在又一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少十个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或超过10个)双峰驼V基因区段。

[0443] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含所有双峰驼V基因区段。

[0444] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少十个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或超过10个)美洲驼V基因区段。

[0445] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含所有美洲驼V基因区段。

[0446] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少六个(例如,1、2、3、4、5、6个或超过6个)单峰驼V基因区段。

[0447] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含所有单峰驼V基因区段。

[0448] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含一个至至少六个(例如,1、2、3、4、5、6个或超过6个)小羊驼V基因区段。

[0449] 在另一示例性实施方案中,DNA构建体或转基因可包含所有小羊驼V基因区段。

[0450] 本文提供由V、D和/或J区段编码的驼类VH/VHH、D及J多肽的示例性及非限制性实施方案。

[0451] 在一些实施方案中,DNA构建体、转基因或转基因动物包含如表1中所概述的V、D及J区段(也可包括小鼠VH、D或J)。然而,其他配置是可能的。表1中的V区段的顺序及数目可改变。表1中的D区段的顺序及数目可改变。表1中的J区段的顺序及数目可改变。

[0452] 表1

| V 区段 | D 区段 | J 区段 |
|--|-----------|-----------|
| 一个羊驼 VH 一个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |
| 三个双峰驼 VH 三个双峰驼 VHH 一个羊驼 VH 一个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |

[0453]

| V 区段 | D 区段 | J 区段 |
|---|--------------------------|-------------------------|
| 两个美洲驼 VH 三个美洲驼 VHH 一个羊驼 VH 一个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |
| 两个美洲驼 VH 三个美洲驼 VHH 三个双峰驼 VH 三个双峰驼 VHH 一个羊驼 VH 一个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |
| 两个双峰驼 VH 两位双峰驼 VHH 两个美洲驼 VH 三个美洲驼 VHH 一个羊驼 VH 一个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |
| 两个美洲驼 VH 三个美洲驼 VHH 三个双峰驼 VH 三个双峰驼 VHH 一个羊驼 VH 一个羊驼 VHH | 七个双峰驼 D 区段 | 七个双峰驼 J 区段 |
| 两个美洲驼 VH 三个美洲驼 VHH 三个双峰驼 VH 三个双峰驼 VHH 一个羊驼 VH 一个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 七个双峰 驼 D 区段 | 七个双峰驼 J 区段 七个羊驼 J 区段 |
| 一个美洲驼 VH 两个美洲驼 VHH 一个单峰驼 VH 三个单峰驼 VHH 两个羊驼 VH 两个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |
| 三个双峰驼 VH 三个双峰驼 VHH 两个羊驼 VH 两个羊驼 VHH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |

[0454]

| V 区段 | D 区段 | J 区段 |
|--|------------|------------|
| 三个双峰驼 VHH 两个双峰驼 VH 两个美洲驼 VHH 两个美洲驼 VH 一个羊驼 VHH 一个羊驼 VH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |
| 三个双峰驼 VHH 三个双峰驼 VH 四个美洲驼 VHH 三个美洲驼 VH 三个羊驼 VHH 三个羊驼 VH 三个单峰驼 VHH 一个单峰驼 VH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |
| 三个双峰驼 VHH 两个双峰驼 VH 两个美洲驼 VHH 两个美洲驼 VH 一个羊驼 VHH 一个羊驼 VH | 七个双峰驼 D 区段 | 七个双峰驼 J 区段 |
| 六个双峰驼 VHH 六个双峰驼 VH 四个美洲驼 VHH 三个美洲驼 VH 五个羊驼 VHH 五个羊驼 VH 三个单峰驼 VHH 一个单峰驼 VH | 七个羊驼 D 区段 | 七个羊驼 J 区段 |

[0456] 在一些实施方案中,驼类V、D和/或J区段可尤其在框架区中修饰。框架区的修饰包括用与天然存在的序列至少80%相同的序列置换驼类框架区。其他修饰包括将驼类框架区置换为与人类框架区约80%至约100% (例如约80%、85%、90%、95%、99%或100%) 相同的框架,以便产生具有驼类CDR的人源化HCAb。

[0457] 胚胎干细胞

[0458] 基于所需动物物种及所需遗传背景选择胚胎干细胞。

[0459] 通过电穿孔包含经修饰基因的DNA构建体以及用于同源重组及选择的序列来获得经基因修饰的胚胎干细胞。

[0460] 在一些实施方案中,胚胎干细胞为在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的经分离胚胎非人类干细胞,该生殖系修饰包含a) 将一个或多个内源性小鼠V基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V基因区段,或插入未经重排的驼类V基因区段;b) 用

驼类D及J区段置换至少一个或所有内源性小鼠D及J区段；及c)缺失或修饰至少一个或所有内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因的CH1域，使得自该内源性小鼠 γ 1、 γ 2a、 γ 2b及 γ 3基因表达的多肽不包含功能性CH1域。

[0461] 在一些实施方案中，胚胎干细胞为在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处包含生殖系修饰的经分离胚胎非人类干细胞，该生殖系修饰包含缺失内源性 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因及 γ 2a基因中的每一种的CH1域、将小鼠D及J基因区段置换为未经重排的驼类D及J基因区段、插入来自多种驼类物种的驼类V基因区段，及任选地缺失至少一个或所有内源性小鼠V基因区段。

[0462] 或者，胚胎干细胞可以用基因编辑工具进行基因修饰，该基因编辑工具诸如规律成簇的间隔回文重复(CRISPR)-Cas9系统、锌指核酸酶(ZFN)系统、转录活化因子样效应物核酸酶(TALENS)系统或类似物。

[0463] ES细胞基因组中转基因的存在是通过测序确认，并且扩增携带正确序列的ES细胞以供后续使用。通常还进行质量控制测试，诸如核型分析。

[0464] 胚胎干细胞可为分化全能、多潜能或分化多能的。然而，分化全能胚胎干细胞通常用于生成转基因非人类动物。

[0465] 本公开内容涵盖包含本文所描述的基因修饰的胚胎干细胞。

[0466] 胚胎干细胞可衍生自任一本文所公开的转基因动物。

[0467] 已经基因修饰的胚胎干细胞(无论是通过同源重组抑或自转基因动物分离)可视需要用于进行进一步基因修饰。

[0468] 转基因非人类动物

[0469] 本公开内容的转基因非人类动物包括适用于基因操纵的小动物。然而，诸如牛、羊等的大动物也可以是适合的。因此，在一些实施方案中，提供一种制造转基因非人类动物的方法，其包含使用本文所公开的核酸构建体中的任一种或多种。

[0470] 基于本申请的目的，尤其选择诸如大鼠及小鼠的啮齿动物。然而，其他小动物可为适合的，诸如兔子或鸡。

[0471] 用于抗体表达的小动物的选择与若干优点相关。举例而言，少量抗原足以产生免疫反应且少量来自经免疫动物的血液可足以表示完整抗体文库。另外，如本文所公开修饰基因组以包括来自多个驼类物种的V、D和/或J区段会增加所产生单域抗体的多样性。此外，其特征在于短繁殖周期。

[0472] 最后，在转基因动物中产生包含来自多个驼类物种的序列的单域抗体比在驼类中产生单域抗体更有利，因为生成相同多样性的抗体将需要对每种驼类物种进行单独免疫接种。

[0473] 还预期如本文所公开在各种遗传背景的小鼠中表达单域抗体会增加多样性。

[0474] 可使用获得转基因非人类动物的各种方法。

[0475] 此类方法之一涉及使用经基因修饰的胚胎干细胞。另一种方法涉及使用经基因修饰的受精卵。

[0476] 将经基因修饰的胚胎干细胞或受精卵显微注射至囊胚期胚胎中，然后将其植入假孕雌性小鼠中。选择在其生殖细胞中包含转基因的嵌合体用于后续育种。

[0477] 本公开内容的转基因非人类动物包含在免疫球蛋白重链(IgH)基因座处的生殖系

修饰。

[0478] 在一些实施方案中,生成所有修饰均在同一等位基因上的转基因非人类动物。在一些实施方案中,生成修饰在两个等位基因上的转基因非人类动物。在一些实施方案中,两个等位基因可相同。在其他实施方案中,两个等位基因不同。

[0479] 该修饰包括例如内源性免疫球蛋白 γ 基因的CH1域的缺失或修饰。其他修饰包括例如内源性免疫球蛋白 γ 基因的CH1域的缺失或修饰与至少一个其他内源性免疫球蛋白 γ 基因的部分或完全缺失或修饰的组合。

[0480] 该修饰包括例如内源性非人类动物 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的缺失或修饰。

[0481] 其他修饰包括至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性非人类动物基因的CH1域的缺失或修饰与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性非人类动物基因的完全或部分缺失的组合。

[0482] 在一些情况下,内源性免疫球蛋白 γ 基因中的修饰也伴随着可变区中的修饰。

[0483] 举例而言,一些修饰包括a)将一个或多个内源性非人类D和/或J基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段,及b)至少一个IgG恒定区基因的CH1域的部分或完全缺失或修饰。其他修饰包括例如a)在IgH基因座处插入一个或多个未经重排的驼类D和/或J基因区段,及b)至少一个IgG恒定区基因的CH1域的部分或完全缺失或修饰。

[0484] 其他修饰包括a)将一个或多个内源性非人类V、D和/或J基因区段置换为一个或多个未经重排的驼类V、D和/或J基因区段,及b)至少一个IgG恒定区基因的CH1域的部分或完全缺失或修饰。

[0485] 此外,这些修饰还可与至少一个内源性免疫球蛋白 γ 基因的部分或完全缺失组合。

[0486] IgH基因座中的修饰可存在于两个等位基因中,诸如在纯合动物的情况下如此。因此,转基因非人类动物基因组的两个等位基因可包含相同的IgH基因座。

[0487] 或者,IgH基因座中的修饰可存在于单一等位基因中,诸如在杂合动物的情况下如此。

[0488] 在一些情况下,转基因非人类动物基因组的一个等位基因可包含经修饰的IgH基因座,且另一等位基因可为野生型。

[0489] 在其他情况下,转基因非人类动物基因组的两个等位基因可包含相同的恒定区基因及不同的V、D和/或J区段。

[0490] 在其他情况下,转基因非人类动物基因组的两个等位基因可包含不同的恒定区基因及相同的V、D和/或J区段。

[0491] 在其他情况下,转基因非人类动物基因组的两个等位基因可包含不同的恒定区基因及V、D和/或J区段中的不同区段。

[0492] 本公开内容涵盖携带本文所公开的恒定区中的任何修饰和/或携带本文所公开的V、D和/或J区段或转基因的转基因非人类动物。

[0493] 在示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物在IgH基因座处包含选自由以下组成的组的生殖系修饰:

[0494] a. 内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的缺失,或;

[0495] b. 至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的CH1域的缺失与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的完全或部分缺失的组合。

[0496] 在另一示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物在IgH基因座处包含选自由以下组成的组的生殖系修饰:

[0497] a. 内源性小鼠 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的CH1域的修饰,或;

[0498] b. 至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的CH1域的修饰与至少一个选自 γ 3基因、 γ 1基因、 γ 2b基因和/或 γ 2a基因的内源性小鼠基因的完全或部分缺失的组合。

[0499] 应理解,在本文中,本公开内容涵盖CH1域的任何缺失或修饰,只要CH1域自最终多肽序列缺失或只要该缺失或修饰导致重链无法与轻链配对即可。

[0500] 本公开内容的一些转基因非人类动物可经修饰以表达来自各种物种的重链可变区,包括例如驼类VH/VHH、D和/或J多肽或人类VH、D和/或J多肽或其组合。

[0501] 本公开内容的一些转基因非人类动物可经修饰以表达经修饰重链可变区,包括例如非天然存在或经修饰的驼类VH/VHH、D和/或J多肽、非天然存在或经修饰的人类VH、D和/或J多肽、或来自啮齿动物的非天然存在或经修饰的VH、D和/或J多肽。

[0502] 在一些示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含:a) 未经重排的重链可变(V)、多样性(D)及连接(J)基因区段,且其中D和/或J基因区段包含驼类D和/或J基因区段;及b) 至少一个缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因。

[0503] 在其他示例性实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含:a) 未经重排的重链可变(V)、多样性(D)及连接(J)基因区段,且其中V、D和/或J基因区段c包含驼类V、D和/或J基因区段;及b) 至少一个缺乏功能性CH1域的IgG恒定区基因。

[0504] 在一些实施方案中,转基因非人类动物的IgG恒定区基因包含内源性IgG恒定区基因。

[0505] 在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含:

[0506] a. γ 3恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失;

[0507] b. γ 1恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失;

[0508] c. γ 2b恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失;

[0509] d. γ 2a恒定区基因,其包含在编码CH1域的区域中的部分或完全缺失;或

[0510] e. 它们的组合。

[0511] 在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含在编码 γ 3、 γ 1、 γ 2b、 γ 2a恒定区基因中的至少两者的CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0512] 在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含在编码 γ 3、 γ 1、 γ 2b、 γ 2a恒定区基因中的至少三者的CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0513] 在一些实施方案中,本公开内容的转基因非人类动物包含在编码 γ 3、 γ 1、 γ 2b、 γ 2a恒定区基因中的每一种的CH1域的区域中的部分或完全缺失。

[0514] 在一些实施方案中,用未经重排的驼类D及J区段置换转基因非人类动物的内源性D及J区段。在其他实施方案中,可以在不缺失内源性D及J区段的情况下插入驼类D及J区段,使得至少一些或所有内源性D及J区段得以保留。

- [0515] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自羊驼的未经重排的D及J区段。
- [0516] 在其他实施方案中,转基因非人类动物包含来自双峰驼的未经重排的D及J区段。
- [0517] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自美洲驼的未经重排的D及J区段。
- [0518] 在其他实施方案中,转基因非人类动物包含来自单峰驼的未经重排的D及J区段。
- [0519] 在其他实施方案中,转基因非人类动物包含来自小羊驼的未经重排的D及J区段。
- [0520] 在其他实施方案中,用未经重排的驼类V区段置换内源性V区段。然而,可以在不缺失内源性V区段的情况下插入未经重排的驼类V区段,使得至少一些或所有内源性V区段得以保留。
- [0521] 在一些实施方案中,未经重排的V区段编码来自羊驼的一个或多个VH和/或VHH多肽。
- [0522] 在一些实施方案中,未经重排的V区段编码来自双峰驼的一个或多个VH和/或VHH多肽。
- [0523] 在一些实施方案中,未经重排的V区段编码来自美洲驼的一个或多个VH和/或VHH多肽。
- [0524] 在一些实施方案中,未经重排的V区段编码来自单峰驼的一个或多个VH和/或VHH多肽。
- [0525] 在一些实施方案中,未经重排的V区段编码来自小羊驼的一个或多个VH和/或VHH多肽。
- [0526] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自多个驼类物种(包括例如但不限于来自羊驼、美洲驼、双峰驼、小羊驼或单峰驼)的未经重排的V、D和/或J区段。
- [0527] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含来自羊驼及双峰驼的未经重排的D及J区段。
- [0528] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0529] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0530] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0531] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0532] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的双峰驼VH和/或VHH区段、美洲驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段及羊驼J区段。
- [0533] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、羊驼D区段、双峰驼D区段、双峰驼J区段及羊驼J区段。
- [0534] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的美洲驼VH和/或VHH区段、双峰驼VH和/或VHH区段、羊驼VH和/或VHH区段、双峰驼D区段及双峰驼J区段。
- [0535] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的V区段,其编码一个或多个小鼠VH多肽。

[0536] 在一些实施方案中,转基因非人类动物包含未经重排的V区段,其编码一个或多个人类VH多肽。

[0537] 转基因非人类动物还可携带额外的基因修饰。例如,该转基因非人类动物可包含免疫球蛋白κ和/或免疫球蛋白λ基因座的部分或完全缺失。

[0538] 还可通过对本文所公开的转基因非人类动物进行进一步基因修饰来插入额外V、D和/或J区段。

[0539] 仅重链抗体(HCAB)

[0540] 在一些方面中,使用标准免疫接种方案用所关注抗原对本公开内容的转基因动物进行免疫接种。

[0541] 收集来自经免疫接种的转基因动物的血液样品且确定多种抗体物种中的一种或多种的氨基酸或核酸序列。

[0542] 在一些情况下,获得一个或多个互补决定区的序列。举例而言,确定CDRH3区的序列。在其他情况下,获得CDRH1、CDRH2及CDRH3区的序列。在其他情况下,获得整个可变区的序列。在其他情况下,获得整个抗体的序列。

[0543] 使用基于计算机的技术,按簇来组织序列。确定代表性抗体物种、抗体池的一部分或簇内的整个抗体池的生物功能(例如结合、特异性、亲和力、有效性或其他)。在一些情况下,建立生物功能的基于计算机的预测模型。

[0544] 使用一个或多个所选单域抗体的序列信息制造结合剂,诸如但不限于抗体(包括双特异性抗体、三特异性抗体、多特异性抗体)、单域抗体、单链Fv、嵌合抗原受体(CAR)、双特异性T细胞接合子(BiTE)、双特异性杀伤细胞接合子(BiKE)、三特异性杀伤细胞接合子(TriKE)、具有如美国临时申请第62/951,701号(其全部内容以引用的方式并入本文中)所公开的形式的结合剂或其抗原结合片段。

[0545] 因此,在其他方面及实施方案中,本公开内容提供结合剂,其包含获自由本公开内容的转基因非人类动物生成的至少一个单域抗体的氨基酸序列。

[0546] 下文参考附图详细描述各种实施方案的另外的实施方案、特征及优点,以及结构及操作。

实施例

[0547] 实施例1-制备用于小鼠IgH基因座的靶向修饰的DNA构建体

[0548] BAC1为经工程改造的细菌人工染色体(BAC)构建体,其含有小鼠γ3、γ1、γ2b及γ2a的整个恒定区并缺失CH1域(对于所有四个子类为外显子2)。BAC1构建体的长度为92kb且以5'至3'形式包含γ3恒定区,其中外显子2(CH1域)经侧接2个loxP位点的新霉素(Neomycin)/卡那霉素(Kanamycin)抗性基因盒置换,然后是CH1缺失的γ1及γ2b基因及γ2a恒定区,其中外显子2(CH1域)经侧接2个loxP5171位点的潮霉素(hygromycin)抗性基因盒置换。

[0549] BAC2为经工程改造的细菌人工染色体构建体,其含有羊驼(南美羊驼)VHH3-1(IMGT基因,IGHV3-3)及VH3-1(IMGT基因,IGHV3-1)可变重链基因区段、整个羊驼IGHD基因区段(IMGT ID:IGHD1-IGHD8)及羊驼IGHJ基因区段(IMGT ID:IGHJ1-IGHJ7)。BAC2构建体的长度为100kb且以5'至3'形式包括靶向小鼠基因组IGHV5-1及IGHV2-1基因的小鼠同源序列

的5kb臂,然后是侧接两个FRT位点的新霉素/卡那霉素抗性基因盒、羊驼基因组DNA片段插入物、侧接两个FRT-F3位点的潮霉素抗性基因盒及小鼠同源序列的5kb臂。

[0550] BAC3a为包括羊驼及双峰驼VHH及VH基因区段的多物种构建体。BAC3a为147kb构建体,其基于通过在新霉素/卡那霉素抗性基因盒与羊驼基因组DNA片段之间插入47kb的双峰驼DNA片段所修饰的BAC2构建体。双峰驼DNA片段含有三个VHH基因区段(BctVhh_*1、BctVhh_*2、BctVhh_*3)及三个VH基因区段(BctVh_*1、BctVh_*2、BctVh_*3)。

[0551] BAC3b为包括羊驼及美洲驼VHH及VH基因区段的多物种构建体。BAC3b为160kb构建体,其基于通过在新霉素/卡那霉素抗性基因盒与羊驼基因组DNA片段之间插入60kb的美洲驼DNA片段所修饰的BAC2构建体。美洲驼DNA片段含有两个VHH基因区段(LmVhh3_*3及LmVhh3_*4)及两个VH基因区段(1mVh_*1、1mVh_*2)。

[0552] BAC4a为包括羊驼、双峰驼及美洲驼VHH及VH基因区段的多物种构建体。BAC4a构建体为196kb,其基于通过在新霉素/卡那霉素抗性基因盒与双峰驼DNA片段之间插入49kb的美洲驼DNA片段所修饰的BAC3a构建体。美洲驼DNA片段包含两个VHH基因区段(LmVhh3_*3及LmVhh3_*4)及两个VH基因区段(LmVh_*1及LmVh_*2)。

[0553] BAC4b为包括羊驼、双峰驼及美洲驼VHH及VH基因区段的多物种构建体。BAC4b构建体为212kb,其基于通过在新霉素/卡那霉素抗性基因盒与美洲驼DNA片段之间插入52kb的双峰驼DNA片段所修饰的BAC3b构建体。双峰驼DNA片段含有三个VHH基因区段(BacVhh3_*10、BacVhh3_*11及BacVhh3_*12)及两个VH基因区段(BacVh_*4及BacVh_*5)。

[0554] BAC5为包括美洲驼、单峰驼及羊驼VHH及VH基因区段的多物种构建体。BAC5构建体的长度为148kb,其靶向所鉴别的Bac4a阳性ES细胞克隆中的Bac4a构建体上游的5'以引入额外VHH及VH基因。42kb的美洲驼DNA片段含有两个VHH基因区段(LmVhh3_*1及LmVhh3_*2)及一个VH基因区段(LmVh_*3)。54kb的单峰驼DNA片段含有三个VHH基因区段(DmdVhh3_*5、DmdVhh3_*6及DmdVhh3_*7)及一个VH基因区段(DmdVh_*1)。33kb的羊驼DNA片段包含两个VHH基因区段(a1Vhh3_*1及a1Vhh3_*2)及两个VH基因区段(a1Vh_*1及a1Vh_*2)。

[0555] BAC6为含有DNA片段的经工程改造的BAC构建体,基于对已知羊驼及单峰驼基因组序列的序列比对分析,该DNA片段包括整个双峰驼IGHD基因区段及双峰驼IGHJ基因区段。BAC6构建体的长度为59kb且以5'至3'形式包括靶向羊驼D/J基因区段上游的5'羊驼同源序列的3kb臂,然后是侧接两个Loxp511位点的潮霉素抗性基因盒、双峰驼基因组DNA片段插入物、小鼠同源序列的3kb臂。

[0556] BAC7为包括羊驼及双峰驼VHH及VH基因区段的多物种构建体。BAC7构建体的长度为129kb,其靶向所鉴别的BAC5阳性ES细胞克隆中的Bac5构建体上游的5',以引入额外VHH及VH基因。48kb的羊驼DNA片段含有两个VHH基因区段(a1Vhh3_*3及a1Vhh3_*5)及两个VH基因区段(a1Vh_*3、a1Vh_*4)。72kb的双峰驼DNA片段含有三个VHH基因区段(BacVhh3_*9、BacVhh3_*4及BacVhh3_*5)及三个VH基因区段(BacVh_*6、BacVh_*7及BacVh_*8)。

[0557] 实施例2-生成经基因修饰的ES细胞及受精卵

[0558] 通过使用Cre/Loxp重组将包含 γ 3、 γ 1、 γ 2b和/或 γ 2a恒定区中的每一种的CH1外显子的缺失的BAC1靶向整合至小鼠IgH基因座获得经基因修饰的胚胎干细胞(图1)。将BAC1及表达靶向内部小鼠同源区的Cas9或单引导RNA(sgRNA)序列的两个构建体一起电穿孔至ES细胞中。对经转染ES细胞进行新霉素(G418)及潮霉素选择。总计228个克隆经分离且

通过5'及3'长期PCR筛选。通过南方墨点分析,使用内部及外部探针进一步分析PCR阳性克隆。确认克隆(#183)具有正确插入(图4上的转基因1)。

[0559] 同时,在胚胎干细胞或受精胚胎中进行整个恒定区基因的特异性CH1外显子的CRISPR靶向缺失(图2及图3)。简言之,将表达靶向 γ 3、 γ 1、 γ 2b和/或 γ 2a恒定区中的每一种的CH1外显子的侧接区的Cas9及sgRNA序列的构建体一起电穿孔至ES细胞中或注射至受精小鼠胚胎的原核区中。通过PCR基因分型筛选ES细胞克隆及注射的动物。使用ES细胞靶向方法鉴别具有成功整合的一个ES克隆(13A10)(图4上的转基因2)。使用胚胎靶向方法鉴别在恒定区中携带可变突变的四个转基因系(图4中的转基因3、转基因4、转基因5及转基因6)。

[0560] 实施例3-生成具有经修饰恒定区的转基因小鼠

[0561] 通过将显微注射了ES克隆13A10的囊胚植入假孕小鼠中而获得转基因小鼠。ES克隆13A10及囊胚均处于C57/B6遗传背景下。通过PCR基因分型确认嵌合F0的生成。嵌合小鼠与野生型C57/B6动物回交以生成通过PCR基因分型确认的F1杂合动物。纯合F2动物由F1杂合杂交生成。

[0562] 或者,通过将显微注射了ES克隆#183的囊胚植入假孕小鼠中而获得转基因小鼠。生成高度嵌合体且与野生型C57/B6动物一起培育以生成F1杂合动物。对F1尾部活检样品进行PCR基因分型,确认BAC1构建体所携带的所需突变的生殖系传递。

[0563] 使用实施例2及实施例3中所描述的方法,获得具有“转基因1”、“转基因2”、“转基因3”、“转基因4”、“转基因5”或“转基因6”基因组组织的杂合ES细胞、杂合动物或纯合动物(图4)。更具体地,已获得具有“转基因2”、“转基因3”、“转基因4”、“转基因5”或“转基因6”基因组组织的纯合转基因动物,且在本文中将其称为“转基因2动物”、“转基因3动物”、“转基因4动物”、“转基因5动物”或“转基因6动物”。

[0564] 实施例4-单域抗体的表达

[0565] 使用以下示例的实验条件,在还原或非还原条件下,通过蛋白质印迹法验证缺乏CH1域的重链或来自纯合转基因动物的单域抗体的表达。

[0566] 简言之,将血清样品以1/50的比率稀释于水中且在还原条件下将5 μ L的经稀释血清样品上样于凝胶(Bis-Tris 4-12%)上。将HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG2a(Abcam ab97245)、HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG2b(Abcam ab97250)及HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG3(Abcam ab97260)的二抗以1/20,000稀释度使用以供检测。在 γ 2b中携带CH1缺失的转基因4动物显示经截短IgG2b重链的表达(图5A)。在 γ 3及 γ 2a中携带CH1缺失的转基因6动物显示经截短IgG3及IgG2a重链的表达(图5B)。

[0567] 或者,在非还原条件下,将血清样品以1/50的比率稀释于水中且将12 μ L的经稀释血清样品上样于凝胶上(Tris甘氨酸8%)。将HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG2a(Abcam ab97245)、HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG2b(Abcam ab97250)及HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG3(Abcam ab97260)的二抗以1/10,000稀释度使用以供检测,或以1/10,000稀释度使用HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG轻链(Millipore, AP200P)。在 γ 2b中携带CH1缺失的转基因4动物显示单域抗体IgG2b子类别的表达(图6A)。在 γ 3及 γ 2a中携带CH1缺失的转基因6动物显示来自IgG3及IgG2a子类别的单域抗体的表达(图6B)。在 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a中携带CH1缺失的转基因2动物显示来自IgG3、IgG1、IgG2b及IgG2a子类别的单域抗体的表达(图6C)。

[0568] 总之,我们对获自经预免疫的转基因2动物、转基因4动物或转基因6动物的血清样品的蛋白质印迹分析显示缺乏CH1域的重链(图5,针对转基因4动物及转基因6动物的还原性条件)及缺乏CH1域的仅重链抗体(图6A至6C,针对转基因4动物(图6A)、转基因6动物(图6B)及转基因2动物(图6C)的还原性条件)的表达。

[0569] 最后,对获自预免疫的转基因2动物、转基因4动物或转基因6动物的血清样品的蛋白质印迹分析在使用针对 κ 及 λ 轻链的检测抗体时并未显示单域抗体的表达,表明转基因2动物、转基因4动物或转基因6动物中所表达的单域抗体未与 κ 或 λ 轻链缔合(图6D;针对转基因4动物及转基因6动物的非还原性条件;及图6E;针对转基因2动物的非还原性条件)。

[0570] 用ELISA检测试剂盒进行抗体子分类别的定量。将血清样品以250ng/ μ L的浓度稀释于TBS中,且将50 μ L经稀释抗体与对每个IgG子分类别具有特异性的检测抗体混合(快速ELISA小鼠mAb分型试剂盒,目录37503,Thermofisher)。将转基因2动物中每个抗体子类别的表达与野生型对照血清样品进行比较。如图6F至6I中所示例,IgG3、IgG1及IgG2b子类别抗体的表达在转基因2动物与野生型对照之间是相当的;与野生型对照动物相比,IgG2a子类别抗体在转基因2动物中的表达减少。

[0571] 实施例5-单域抗体在携带CH1缺失的转基因小鼠中的表达

[0572] 通过用人类细胞中表达的肿瘤特异性抗原(靶标1)、免疫细胞上表达的对照抗原(CD3;靶标2)或病毒抗原(SARS-CoV2刺突;靶标3)对转基因动物进行免疫接种来评估抗原特异性单域抗体的表达。

[0573] 简言之,使用一组5只纯合转基因6动物(雌性,8-12周大)进行人类靶标(靶标1)的免疫接种实验。在每次免疫接种之前,通过尾部出血采集80至100 μ L血液样品以评估免疫接种反应的效价。对于每次免疫接种,以0.5 μ g/ μ L的浓度经腹膜内注射100 μ L乳化人类重组蛋白。在5周期间共进行4次免疫接种。在最后一次注射后3天,处死动物。收集骨髓及脾脏组织。为制造噬菌粒文库,自收集自经免疫接种的动物的骨髓及脾脏组织中提取总RNA并将其制成为cDNA样品。使用小鼠VH特异性引物以利用cDNA模板扩增sdAb可变序列。随后将总sdAb扩增子文库亚克隆至pMECS-GG载体中并电穿孔至大肠杆菌(E.coli)TG1细胞中(Agilent 200123),以制造噬菌体文库。

[0574] 使用噬菌粒免疫文库进行一系列淘选(panning)。简言之,使用人类重组靶标1蛋白与对照蛋白完成前三轮淘选,然后使用靶标1-阳性细胞株及靶标1-阴性细胞株的对照完成第四轮淘选。随机克隆挑选与NGS分析两者均在淘选完成后进行。

[0575] 收集血清样品且使用1/100及1/15000的稀释度以通过ELISA来评估抗靶标1单域抗体的抗体效价。使用二级山羊抗小鼠IgG抗体(Jackson immuno Research,111-035-062)来检测血清抗体。进行蛋白质印迹实验以检测IgG2a或IgG3抗体子类别。用5%牛奶/PBS-Tween 0.1%封闭印迹(blot),且接着用多克隆山羊抗小鼠IgG2a或IgG3抗体(ab97245、ab97260,Abcam)进行探测。

[0576] 如图7A中所示例,ELISA检测显示收集自经免疫接种的转基因动物的血清样品中针对靶标1的抗体增加,且在第二次追加免疫接种后将效价保持在稳定水平。在对血清进行15000倍稀释之后,仍可由ELISA检测到抗体效价。使用在对靶标1进行免疫接种之前及之后收集的血清样品来评估sdAb表达。如图7B中所示例,对IgG2a及IgG3子类别两者而言,通过蛋白质印迹法在免疫接种后样品中观测sdAb表达增加。

[0577] 使用一组5个纯合转基因6动物来进行以CD3作为抗原(靶标2)的免疫接种实验。简言之,以 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度经腹膜内向每只转基因小鼠注射具有CD3 ϵ 及8亚单位的 $100\mu\text{L}$ 经乳化人类重组蛋白。在5周期间进行共4次免疫接种注射。在最后一次注射后3天处死动物。收集血清样品及脾脏组织并提取RNA以构建可变重链(VH)文库。使用噬菌体显示对重组人类CD3 ϵ 及8亚单位进行两轮淘选。通过NGS收集及分析DNA样品(Miseq, v600循环, 2500万读数)。同时,自第二轮淘选中挑选96个噬菌体克隆,并且通过ELISA测试与重组人类CD3蛋白的结合,并通过流式细胞测量术测试与人类PBMC的结合。获得阳性结合子的核酸并将其用于生成抗体或抗体样分子。收集血清样品且使用1/150及1/12150的稀释度以通过ELISA来评估抗CD3单域抗体的抗体效价。

[0578] 如图7C中所示例,由转基因6动物产生抗CD3抗体。抗体效价在第二次免疫接种注射之后维持在稳定水平。在对血清进行 >12000 倍稀释之后,仍可由ELISA检测到抗体效价。

[0579] 使用一组5个纯合转基因6动物来进行以野生型SARS-CoV-2刺突蛋白(UniProtKB寄存:P0DTC2)作为抗原(靶标3)的免疫接种实验。简言之,以 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度经腹膜内向每只转基因小鼠注射 $100\mu\text{L}$ 经乳化刺突蛋白。在5周期间进行共4次免疫接种注射。在最后一次注射后3天处死动物。收集血清样品及脾脏组织并提取RNA以构建可变重链(VH)文库。收集血清样品且使用1/100及1/15000的稀释度以通过ELISA来评估抗靶标3单域抗体的抗体效价。

[0580] 如图7D中所示例,由转基因6动物产生抗刺突抗体。抗体效价在第三次免疫接种注射后维持在稳定水平。在对血清的1/15000稀释度下,仍可由ELISA检测到抗体效价。

[0581] 为了评估由经野生型SARS-CoV-2刺突蛋白免疫接种的转基因6动物生成的sdAb是否会与其他刺突蛋白变异数体交叉反应,通过ELISA测试所有五只动物的第38天的血清样品与刺突糖蛋白变异数体B.1.351(β) (图7E)及刺突糖蛋白变异数体B.1.1.7(α) (图7F)的结合。在两种测试中,来自小鼠1、2、4及5的血清样品显示出以较低及较高稀释度(1:100及1:4000)与两种变异蛋白的结合。

[0582] 为了评估SARS-CoV-2刺突糖蛋白的中和作用,将经野生型SARS-CoV-2刺突糖蛋白免疫接种的五只转基因6动物的第38天的血清在阻断缓冲液中稀释至1/350,并通过中和分析测试(图7G)。简言之,将血清样品以1:1体积比与HRP结合的刺突-糖蛋白结合域(RBD)一起培育,随后将混合物添加至hACE2预涂盘中且在室温下培育15分钟。在培养之后,用洗涤缓冲液洗涤孔四次。在室温下用TMB溶液培育每个孔15分钟,随后添加停止溶液以淬灭反应物。紧接着在SpectraMax™ i3x多模式酶标仪(Molecular Devices)上读取培养盘。使用第1天的数据作为在不同免疫接种点处收集的血清的基线来计算抑制百分比。在第38天自小鼠1、2及3收集的血清与RBD及hACE2竞争且展现 $>94\%$ 抑制。在第38天自小鼠4及5收集的血清与RBD及hACE2竞争且展现 $>77\%$ 抑制。

[0583] 使用一组4个纯合转基因2动物来进行以野生型SARS-CoV-2刺突蛋白作为抗原(靶标3)的免疫接种实验。简言之,以 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度经腹膜内向每只转基因小鼠注射 $100\mu\text{L}$ 经乳化刺突蛋白。在5周期间进行共4次免疫接种注射。在最后一次注射后3天处死动物。收集血清样品及脾脏组织并提取RNA以构建可变重链(VH)文库。收集血清样品且使用1/100及1/15000的稀释度以通过ELISA来评估抗靶标3单域抗体的抗体效价。

[0584] 如图7H中所示例,由转基因2动物产生抗刺突抗体。抗体效价在第三次免疫接种注

射后维持在稳定水平。对于4只动物中的2只，在对血清的1/15000稀释度下，仍可由ELISA检测到抗体效价。

[0585] 为了评估由经野生型SARS-CoV-2刺突蛋白免疫接种的转基因2动物生成的sdAb是否会与其他SARS-CoV-2刺突蛋白变异数体交叉反应，通过ELISA测试所有四只动物的第38天的血清样品与刺突糖蛋白变异数体B.1.351(β) (图7I) 及刺突糖蛋白变异数体B.1.1.7(α) (图7J) 的结合。在两个测试中，来自小鼠1的血清样品显示出以较低及较高稀释度(1:100及1:4288)与两种变异数蛋白的结合，来自小鼠2、3及4的血清样品显示出仅以较低稀释度(1:100)与两种变异数蛋白的结合。

[0586] 为了评估SARS-CoV-2刺突糖蛋白的中和作用，将经野生型SARS-CoV-2刺突糖蛋白免疫接种的四只转基因2动物的第38天的血清在阻断缓冲液中稀释至1/350，并通过中和分析测试。将血清与HRP结合的刺突-糖蛋白结合域(RBD)一起培育，接着添加至hACE2预涂培养皿中。使用从第1天开始的数据来计算抑制百分比。

[0587] 结论是，用靶标1、CD3(靶标2)或SARS-CoV-2野生型刺突蛋白(靶标3)免疫接种本文所公开的两个HCAb转基因动物(转基因2及转基因6)，使得成功表达靶标特异性单域抗体。

[0588] 实施例6-表征通过免疫接种携带CH1缺失的转基因小鼠而获得的抗体文库

[0589] 对来自用靶标1进行免疫接种的转基因6动物(来自4只转基因小鼠的4个免疫文库)及羊驼(来自两只羊驼的2个免疫文库)的DNA样品进行基于扩增子的NGS分析(Miseq V3,600循环)。自两个羊驼文库样品获得总共200万个配对读数，且通过NGS测序自四个转基因6文库样品获得总共470万个配对读数。

[0590] 如图8A中所示例，转基因小鼠与羊驼免疫文库之间的独特序列总数是相当的(在羊驼中为723,000个，相对于在转基因小鼠中为665,000个)。自转基因6动物获得的免疫文库的大小比羊驼免疫文库小(转基因6动物文库为4E+6，相对于羊驼文库为1E+8)。

[0591] 如图8B中所示例，在转基因6免疫文库与羊驼免疫文库之间有少数序列重叠。在两个文库中仅发现具有100%序列同一性的10个序列。

[0592] 这些结果表明，尽管用相同抗原进行了免疫接种，衍生自转基因动物的抗体显示与衍生自羊驼的抗体几乎不重叠或无序列重叠，表明靶标1的独特抗体库。尽管由转基因6动物生成较小大小的文库，但两个物种之间的独特序列(依据NGS的不相同sdAb序列)的数目是相当的。这表明转基因动物对靶标1的免疫反应的复杂性较高。

[0593] 针对位置37、44、45及47处的四个驼类VHH特征突变评估来自四个转基因6免疫文库的所有独特序列。将百分比计算为具有所有四个驼类VHH突变的序列的总数/独特序列的总数。可在所有四个转基因6免疫文库中检测驼类VHH典型框架突变(表2)。含有所有四个位置处的VHH特征突变的sdAb的范围为0.03%至0.06%。sdAb中较高百分比含有这些突变中的至少一个。

[0594] 表2

| 位置 | 37 | 44 | 45 | 47 |
|-----------|-----|-----------|-----|---------|
| 驼类VHH共有序列 | F/Y | E/Q | R/C | F/G/L/W |
| 小鼠VH共有序列 | V | G/A/R/S/K | L/P | W |

[0596] 驼类VHH框架突变有助于减少疏水性，因此增加sdAb结构的稳定性。通过NGS深度

测序,表明转基因6动物可能由于抗体成熟期间的突变事件而产生具有典型驼类框架突变的sdAb。

[0597] 实施例7-表征通过免疫接种携带CH1缺失的转基因小鼠而获得的所选单域抗体物种

[0598] 将十个随机挑选的sdAb的可变区与人类IgG1 Fc融合。所得的同种型二聚结合剂(sdAb-Fc1至sdAb-Fc10)自细胞产生及分离,且通过ELISA评估该结合剂对于靶标1的结合特异性及亲和力。此外,使用来自不同物种的重组蛋白(重组靶标1)来评估抗体的交叉反应性。以357nM的单一浓度测试所有抗体,随后以1/5000稀释度的二级山羊抗人类IgG-Fc抗体(Jackson immune research,目录号109-035-098)进行检测。

[0599] 如图9A中所示例,所有10个sdAb-Fc均结合至人类靶标1重组蛋白。10个sdAb-Fc中8个显示出对来自所测试的所有四个物种的靶标1的交叉反应性。

[0600] 使用两个靶标1阳性细胞株及一个阴性细胞株来评估所有10个来源于转基因6免疫文库的sdAb-Fc的结合。在每一孔中,使用100,000个细胞以714nM的浓度与sdAb-Fc一起培育。随后使用1/500稀释度的抗人类IgG Fc抗体(Biolegend,目录号409306)作为二抗,随后在FACS之前与人类7AAD(Biolegend,目录号422302)一起培育。

[0601] 如图9B中所示例,所有10个sdAb-Fc显示出与靶标1阳性细胞株的特异性结合,而不是与阴性对照的特异性结合。

[0602] 这些数据表明,衍生自转基因6免疫文库的可变区序列可用于生成对靶标1的结合剂。

[0603] 我们进一步自10个阳性结合子中选择4个sdAb-Fc,以使用已建立的三阴性乳房肿瘤模型MDA-MB-453评估其在NCG小鼠中的抗癌疗效。每一治疗组含有6只NCG小鼠(雌性,5-6周大,Charles Rivers Laboratories)。将500万个MDA-MB-453乳房肿瘤细胞经皮下注射至小鼠中。当肿瘤体积大小达到至少100mm³时,通过静脉内注射接种1000万个人类PBMC(第-1天)。次日(第0天),将小鼠随机分为两组且针对每一个组,以8mg/kg的剂量经腹膜内注射抗体,或每周两次PBS注射,总共4周(图10A中所示的治疗方案)。如图10B中所示例,在用所有4个sdAb-Fc抗体处理的动物中观测到肿瘤消退。

[0604] 这些数据表明,衍生自转基因6动物免疫文库的可变区序列可用于生成对靶标1的功能活性结合剂,因为所有4个sdAb-Fc均引起肿瘤消退。

[0605] 实施例8-自羊驼、双峰驼、美洲驼及单峰驼IgH基因座选择序列(重新测序)

[0606] 自羊驼、双峰驼、美洲驼及单峰驼的睾丸组织中提取基因组DNA(gDNA)。用hindIII酶消化纯化的gDNA样品。使用超过100Kb的消化片段为所有四种物种构建不同的BAC文库。引物基于每种物种的V区段、D区段、J区段及IgM恒定区的相同序列来设计,且用于筛选及分离BAC文库中的阳性克隆。对于每个文库,选择6个对V区段为阳性但对D及J区段为阴性的克隆、2个对V、D、J区段及IgM恒定区为阳性的克隆及2个对IgM恒定区为阳性但对J区段为阴性的克隆,并对其进行单分子实时(Single Molecular Real-time;SMRT)测序(PacBio)。使用此方法,鉴别出445Kb的部分羊驼IgH基因组序列,包括先前鉴别的223Kb片段(GenBank ID AM773729.1,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AM773729>) ;分别通过SMRT测序鉴别出455kb的美洲驼部分IgH基因组序列、445kb的单峰驼部分IgH基因组序列及超过773Kb的双峰驼部分IgH基因组序列。就申请人所知,申请人首次发现了这些大型双峰驼及美洲驼

基因组IgH基因座序列。

[0607] 每个驼类V区段包括V区段的上游约5kb及下游5kb,且因此包括与该V区段相关的调节序列、内含子序列、前导序列及重组信号序列。因此,每个驼类V基因区段包含与驼类基因组DNA中的此类V区段相关联的原始调节序列。

[0608] 编码VH及VHH的V区段经克隆至细菌人工染色体中以用于生成ES细胞及转基因动物。

[0609] 实施例9-生成具有经修饰可变区的ES克隆及转基因小鼠

[0610] 通过在携带所需CH1缺失的ES细胞中单一或连续靶向整合细菌人工染色体(例如,BAC2、BAC3a、BAC3b、BAC4a、BAC4b、BAC5、BAC6、BAC7)来生成表达驼类VH、VHH、D及J序列的ES细胞克隆及转基因小鼠,如图12、14及15中所示例,从而产生图11B、图11C及图13中所示例的携带转基因的ES细胞克隆及转基因小鼠。

[0611] 举例而言,用包含驼类V、D和/或J区段的BAC构建体转染携带 γ 3、 γ 1、 γ 2b及 γ 2a恒定区基因中的CH1外显子的缺失的鼠类ES细胞(如图4中由转基因2示例),并且使用携带适当重组事件(如图11B、11C或13中所示例)的ES克隆来制造嵌合动物的。通过将显微注射有所选ES克隆的囊胚植入假孕小鼠中而获得嵌合动物。使嵌合小鼠与野生型C57/B6动物回交以生成通过PCR基因分型确认的F1杂合动物。通过F1杂合杂交生成纯合F2动物。

[0612] 更具体地,使用BAC2构建体靶向内源性小鼠D及J基因区段并将其用小鼠IgH基因座处的羊驼D及J基因区段置换。通过PCR基因分型确认BAC2构建体的靶向整合。选择包含图11B中所示例的BAC2转基因的ES细胞克隆。该构建体用作为构建额外BAC(包括BaC3a)的中间体。

[0613] 使用BAC3a构建体靶向及置换内源性小鼠D及J基因,且在IgH基因座处添加驼类VH及VHH。通过PCR基因分型确认BAC3a构建体的靶向整合。选择包含图11B中所示例的BAC3a转基因的ES细胞克隆。该构建体用作为构建额外BAC(包括BaC4a)的中间体。

[0614] 使用BAC3b构建体靶向及置换内源性小鼠D及J基因,且在IgH基因座处添加驼类VH及VHH。通过PCR基因分型确认BAC3b构建体的靶向整合。选择包含图11B中所示例的BAC3b转基因的ES细胞克隆。该构建体用作为构建额外BAC(包括BaC4b)的中间体。

[0615] 将BAC4a构建体及表达靶向小鼠同源臂的内部区的Cas9或单引导RNA(sgRNA)序列的构建体一起电穿孔至 Δ CH1 ES细胞克隆13A10(携带转基因2)中。转染的ES细胞接受新霉素(G418)。BAC4a靶向且置换内源性小鼠D及J基因,并在IgH基因座处添加驼类VH及VHH。总计228个克隆经分离且通过5'及3'长期PCR筛选。通过PCR基因分型确认BAC4a构建体的靶向整合。选择包含图11B中所示例的BAC4a转基因的ES细胞克隆用于囊胚注射,包括克隆1F4、3H5及1F10。诞生存活率为54/60的囊胚。对尾部活检样品进行PCR基因分型以确认转基因的存在。

[0616] 将BAC4b构建体电穿孔至 Δ CH1 ES细胞克隆13A10(携带转基因2)中以靶向及置换内源性小鼠D及J基因,并在IgH基因座处添加驼类VH及VHH。在PCR筛选后,鉴别并确认若干BAC4b-阳性ES克隆(>20)(包括克隆1D4、5D10及5C4)用于靶向整合如图11C中所示例的BAC4b构建体。选择克隆1D4、5D10及5C4进行囊胚注射。诞生存活率为15/40的囊胚。利用野生型雌性动物建立衍生自克隆5D10的雄性嵌合体且得到一窝8只幼仔。8只动物中的5只传输通过对尾部活检样品的PCR基因分型所确认的BAC4b基因。

[0617] 将BAC5构建体电穿孔至BAC4a-阳性ES细胞克隆1F4、3H5和/或1F10中,以用于靶向置换小鼠VH区段并整合来自羊驼、美洲驼及单峰驼的额外VHH。在PCR筛选之后,鉴别并确认BAC5-阳性ES克隆用于靶向整合如图11C中所示例的BAC5构建体。选择克隆用于进一步实验。

[0618] 将BAC6构建体电穿孔至BAC4b-阳性ES细胞克隆5D10中,以用双峰驼D/J区段靶向置换羊驼D/J区段。在PCR筛选之后,鉴别并确认若干BAC6-阳性ES克隆用于靶向整合如图11C中所示例的BAC6构建体。克隆1B10、1E6及1D5用于囊胚注射。总共有24只幼仔出生。

[0619] 将BAC7构建体电穿孔至BAC5阳性ES细胞克隆中以靶向移除所有小鼠VH并插入额外的羊驼及双峰驼VHH。在PCR筛选之后,鉴别并确认阳性BAC7 ES克隆对如图11C中所示例的BAC7构建体的靶向整合。选择阳性克隆进行进一步实验。

[0620] 含有来自羊驼、美洲驼、双峰驼及单峰驼的13个新颖VHH基因的BAC5及BAC7构建体置换IgH基因座上的整个小鼠内源性VH基因。在BAC5构建体中,引入来自单峰驼(第四种驼类物种)的VHH基因,以增加驼类VHH基因库的多样性。逐步引入BAC5及BAC7以靶向小鼠IgH基因座。

[0621] 首先引入BAC5构建体以自BAC4a阳性ES细胞克隆移除内源性新霉素抗性标记物。Bac5含有潮霉素抗性基因盒,以便能够选择Bac5阳性ES细胞克隆。随后将BAC7构建体引入BAC5阳性ES克隆中以靶向移除BAC5阳性ES克隆上的内源性新霉素抗性标记物。使用Bac7构建体上的新霉素抗性基因盒选择Bac7阳性ES细胞克隆。进行完整PCR筛选,以确认用于囊胚注射的阳性ES细胞克隆。

[0622] 因此,在携带CH1缺失(例如,转基因2)的ES细胞克隆中整合BAC2、BAC3a、BAC3b、BAC4a、BAC4b、BAC5、BAC6和/或BAC7构建体产生ES细胞克隆,其包含图11B、图11C及图13中所示例的转基因(为简洁起见未示出转基因2恒定区)。扩增所需转基因的阳性ES细胞克隆并储存以供进一步实验。

[0623] 如实施例3中所述获得转基因小鼠。用所需抗原对转基因小鼠(嵌合小鼠、杂合小鼠或纯合小鼠)进行免疫接种以产生抗原特异性单域抗体。

[0624] 实施例10-携带驼类V、D和/J域的单域抗体的表达

[0625] 在还原或非还原条件下,对携带驼类V、D及J区段的经预免疫的动物的血清样品进行蛋白质印迹实验。简言之,在还原条件下,将血清样品以1/50的比率稀释于水中且将5μL经稀释血清样品上样于凝胶上(Bis-Tris 4-12%)。以1/20,000稀释度使用二抗,诸如HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG2a (Abcam ab97245)、山羊pAb抗小鼠IgG2bHRP (Abcam ab97250)及HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG3 (Abcam ab97260),以供检测。在非还原条件下,将血清样品以1/50的比率稀释于水中且将12μL经稀释血清样品上样于凝胶上(Tris甘氨酸8%)。以1/10,000稀释度使用二抗,诸如HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG2a (Abcam ab97245)、HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG2b (Abcam ab97250)及HRP结合的山羊pAb抗小鼠IgG3 (Abcam ab97260),以供检测。

[0626] 通过ELISA或流式细胞测量术进行抗体子类别的定量。将血清样品以250ng/μL的浓度稀释于TBS中,且将50μL经稀释抗体对每个IgG子类别具有特异性的检测抗体混合(快速ELISA小鼠mAb分型试剂盒,目录37503,Thermofisher)。按野生型对照血清样品标准化转基因动物中的每个子类别抗体的表达。

[0627] 如上文所述进行蛋白质印迹实验以评估BAC4b嵌合动物中的驼类sdAb的表达。在非还原条件下使用每只小鼠血清2μl且使用半干燥系统转移至硝基纤维素膜。用5%牛奶/PBS-Tween 0.1%封闭印迹，并接着用兔单克隆抗驼类抗体(A01861, Genscript)进行探测，然后用HRP结合的山羊抗兔IgG(H+L)抗体(111-035-045, Jackson ImmunoResearch)进行探测。

[0628] 如图16A中所示例，4个获自经预免疫的BAC4b嵌合体的血清样品中的3个显示出驼类VHH表达，而未插入驼类VHH的转基因2动物未显示出驼类VHH表达。

[0629] 如图16B中所示例，将来自5个来源于建立者的动物的经预免疫的F1杂合同窝的血清样品用于蛋白质印迹检测。5只动物中的4只显示驼类VHH表达，而转基因2动物或野生型对照样品均不显示VHH表达。

[0630] 这些结果显示，BAC4b转基因小鼠可在VDJ重组中成功地使用来自BAC4b插入的驼类VHH、D及J基因以表达sdAb，并在循环血液中被检测到。

[0631] 用抗原，诸如用如本文所述的靶标1、重组人类CD3ε及δ亚单位、SARS-CoV-2刺突，或用另一种抗原对携带驼类V、D及J区段的转基因小鼠进行免疫接种。收集血清样品及脾脏组织以构建可变重链(VHH)的文库。使用噬菌体显示技术对抗原进行两轮淘选。收集DNA样品且通过NGS分析(Miseq, v600循环, 2500万读数)。同时，自第二轮淘选中挑选96个噬菌体克隆，并且通过ELISA测试与重组蛋白的结合，并通过流式细胞测量术测试与人类PBMC的结合。获得阳性结合子的核酸。

[0632] 实施例11-增加所表达的可变区及单域抗体的多样性

[0633] 为了增加来自抗原免疫接种的抗体的多样性，使不同纯合转基因动物杂交以生成携带具有一个或多个不同V、D、和/或J区段的不同IgH等位基因的杂合动物。举例而言，将携带BAC4b转基因的纯合动物与携带BAC6转基因的纯合动物杂交，产生携带两种转基因的杂合动物且因此增加通过免疫接种产生的sdAb的多样性。

[0634] 实施例12-生成单特异性、多特异性及多价结合剂

[0635] 如本文所述，可克隆所选结合子的可变区以并入恒定区Fc或其他形式，包括但不限于以下中所公开的那些：Deyev, S.M等人(BioEssays 30:904-918, 2008)及于2021年6月24日公开的PCT/CA2020/051753, 编号W02021119832A1。

[0636] 因此，测试所产生的结合剂的结合特异性、亲和力和/或生物活性。

[0637] 本发明不限于本文所述的特定材料、方法或实验条件，因为该材料、方法或实验条件可变化。本文所述的实施方案及实施例为示例性的且并非意欲限制如所要求保护的本公开内容的范畴。本领域技术人员将认识到或者能够仅使用常规实验即可确定本文所描述的本发明的特定实施方案的许多等效物。本公开内容意欲涵盖实施方案的变化形式，包括替代方案、修改组合、排列及等效物。

[0638] 本申请所引用的所有文件、专利、期刊文章及其他数据，在此以引用的方式并入本文中。

[0639] 参考文献

[0640] 本申请通篇提及的所有专利、专利申请及出版物的内容以引用的方式并入本文中。

[0641] Deyev, S.M等人BioEssays 30:904-918 (2008)。

- [0642] Drabek等人Front. Immunol. 7:619 (2016)。
- [0643] Janssens等人,PNAS 103(41):15130-15135 (2006)。
- [0644] Hamers-Casterman C,等人,Naturally-occurring Antibodies Devoid of Light-chains.Nature 1993,363:446-448。
- [0645] Muyldermans,S及Smider,2016.Distinct Antibody Species:Structural Differences Creating Therapeutic Opportunities.Current Opinion in Immunology 2016,40:7-13。
- [0646] Muyldermans,S等人,1994.Sequence and Structure of VH Domain From Naturally Occurring Camel Heavy Chain Immunoglobulins Lacking Light Chains.Protein Eng.7:1129-1135。
- [0647] Sircar等人,The Journal of Immunology,186,2011。
- [0648] 美国专利第8,502,014号,其在Grosveld名下。
- [0649] US2011/0145937A1,其在Regeneron名下。
- [0650] WO2016/062990A1,其在Crescendo Biologics Limited名下。
- [0651] WO2021119832A1,其在KisoJi Biotechnology Inc名下。
- [0652] Zhou等人J. Immunol.,175(6):3369-79 (2005)。

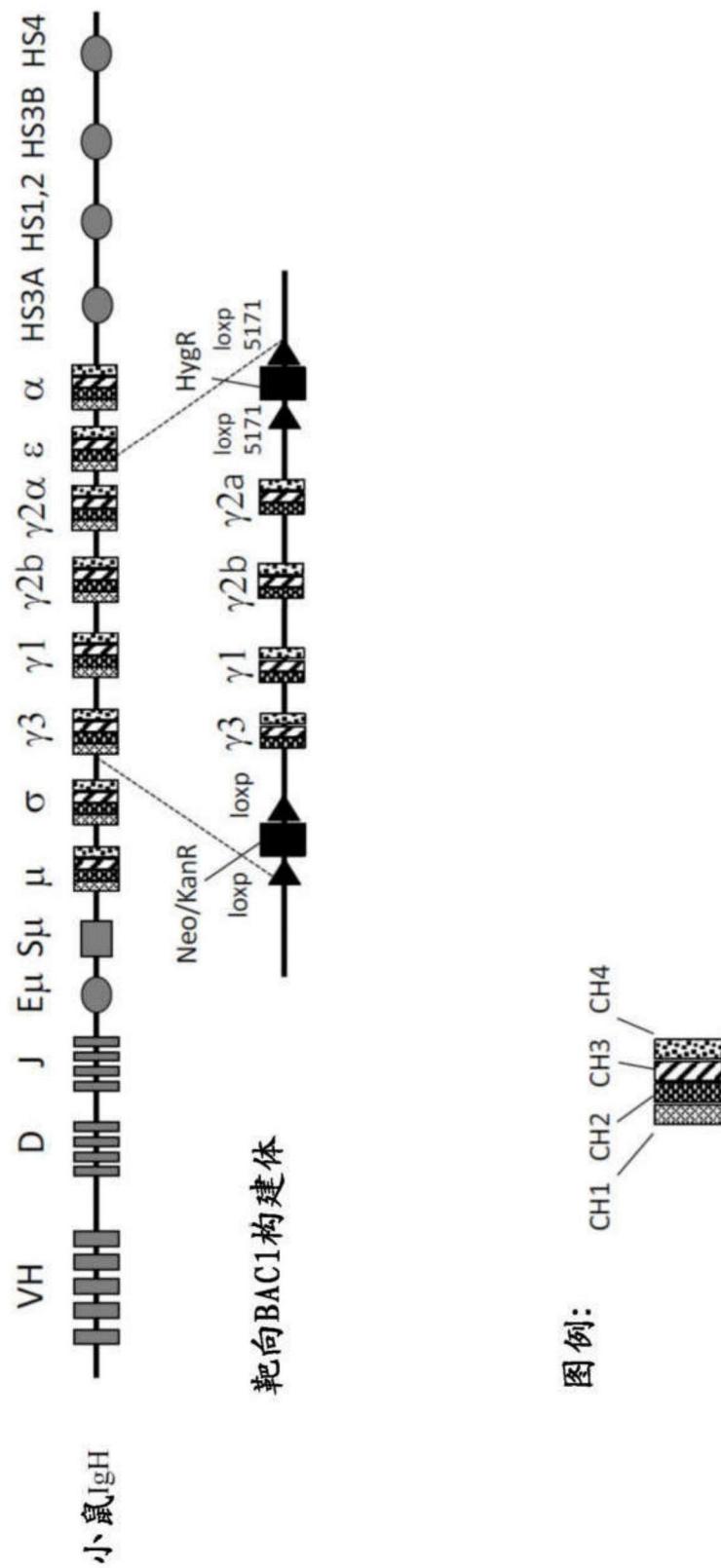


图1

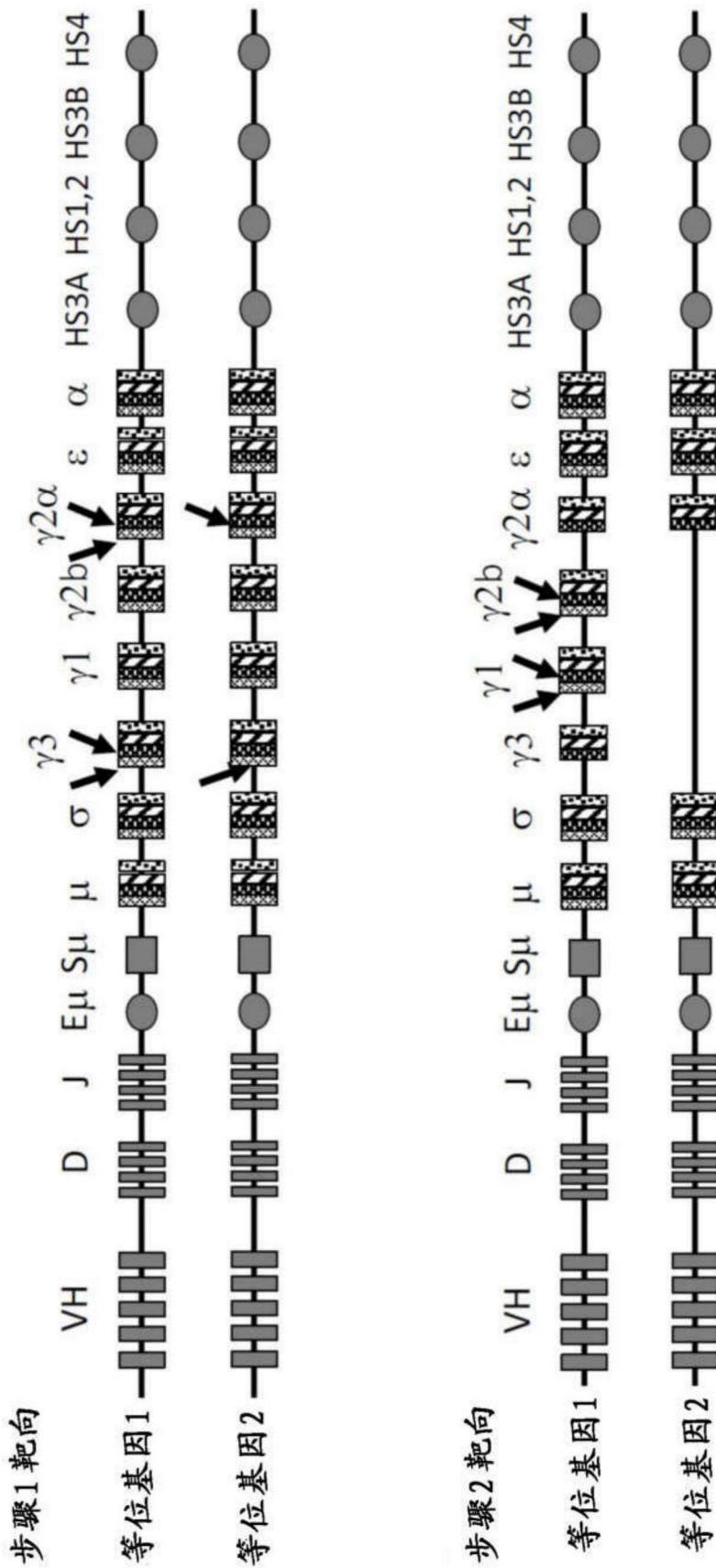


图2

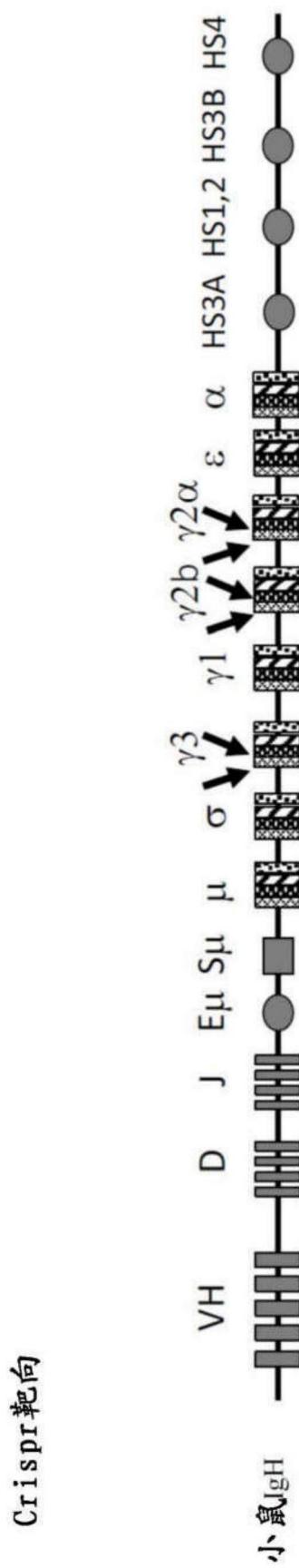


图3

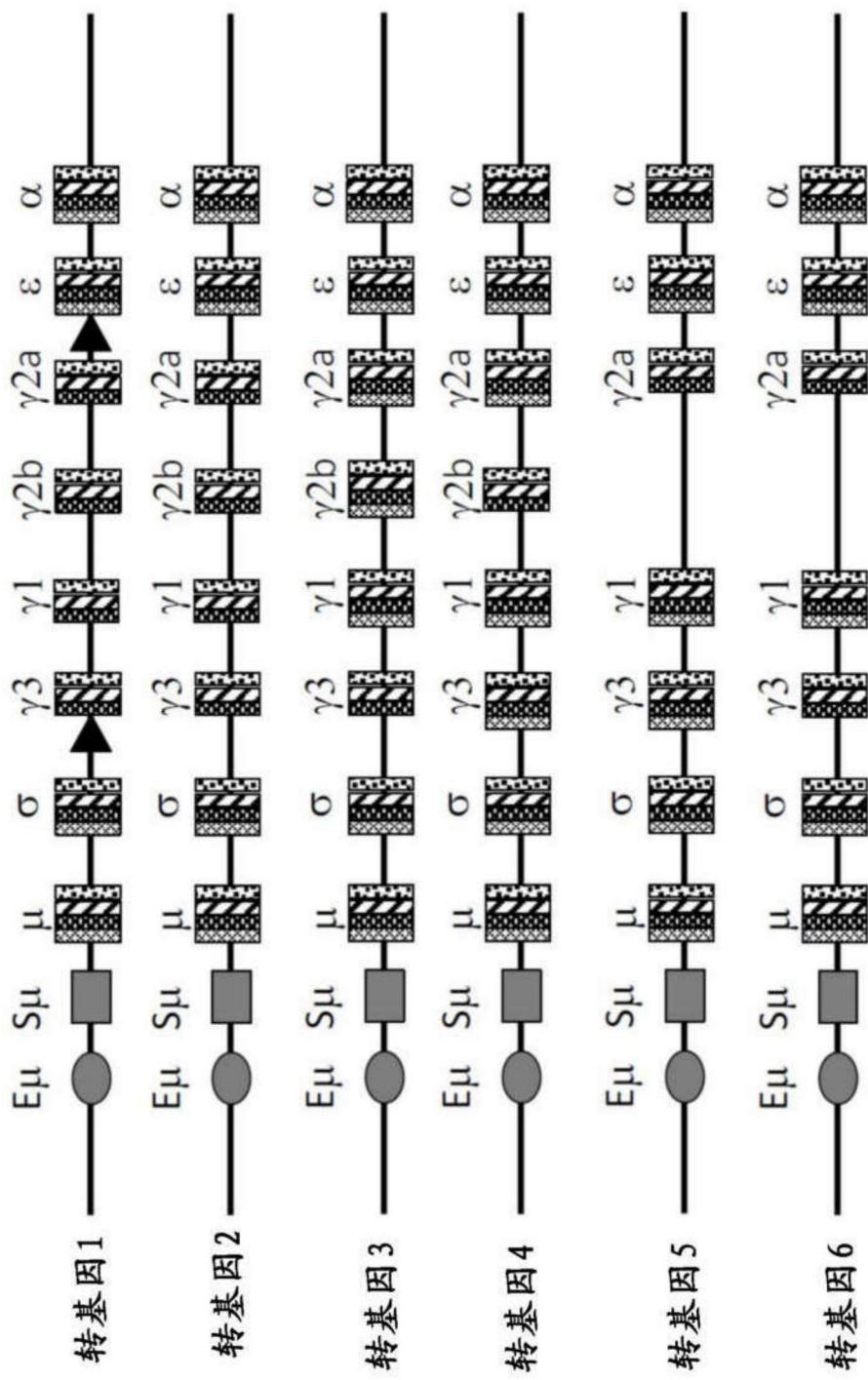


图4

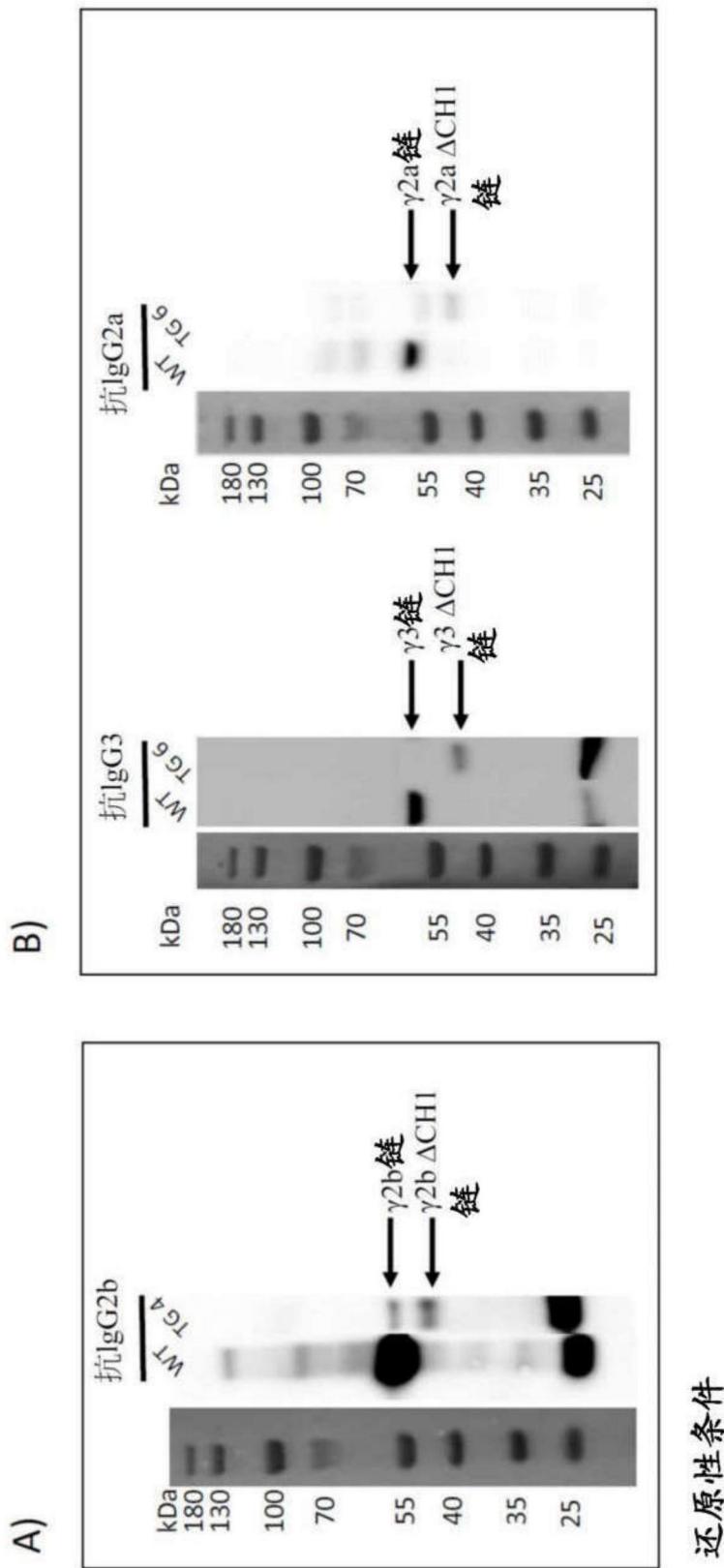


图5

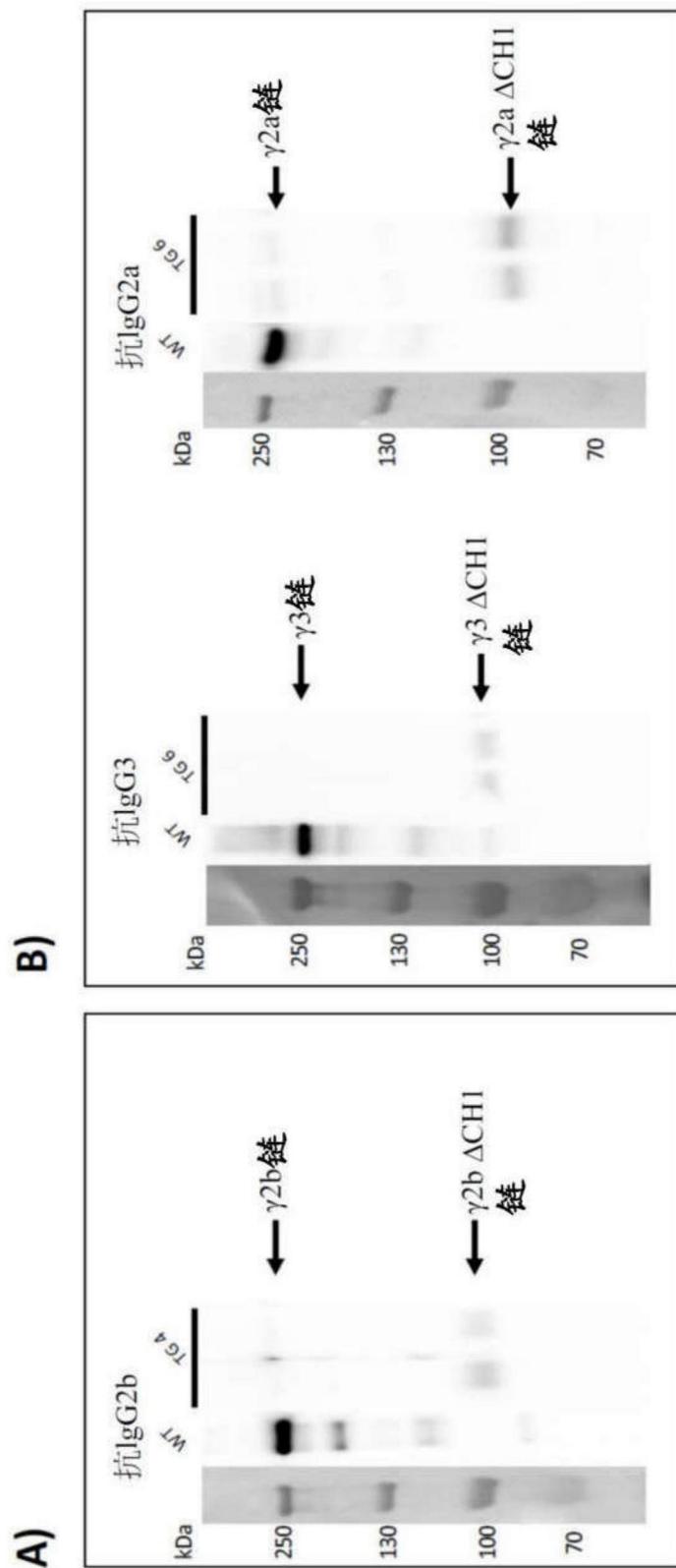


图6

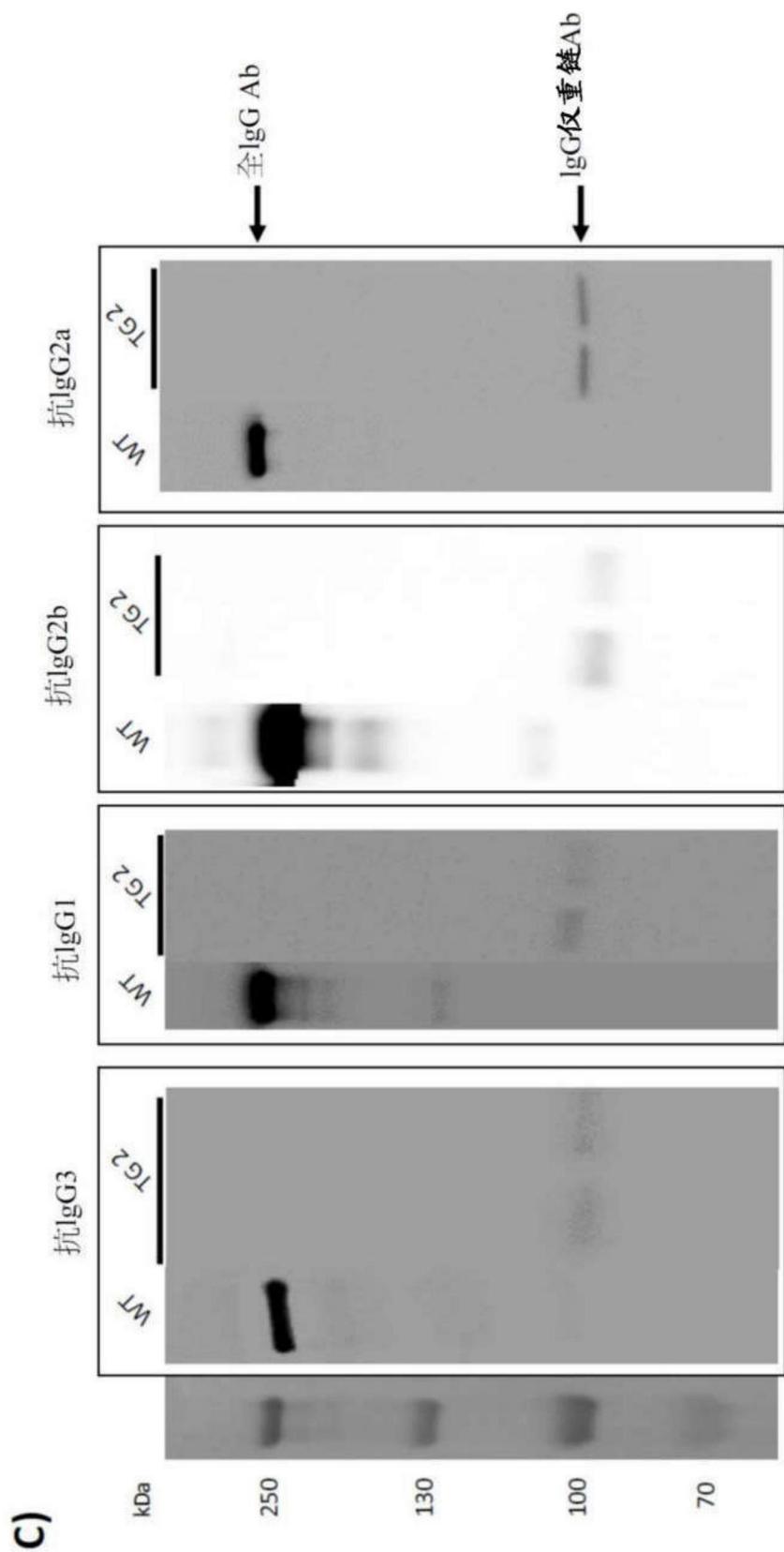


图6(续)

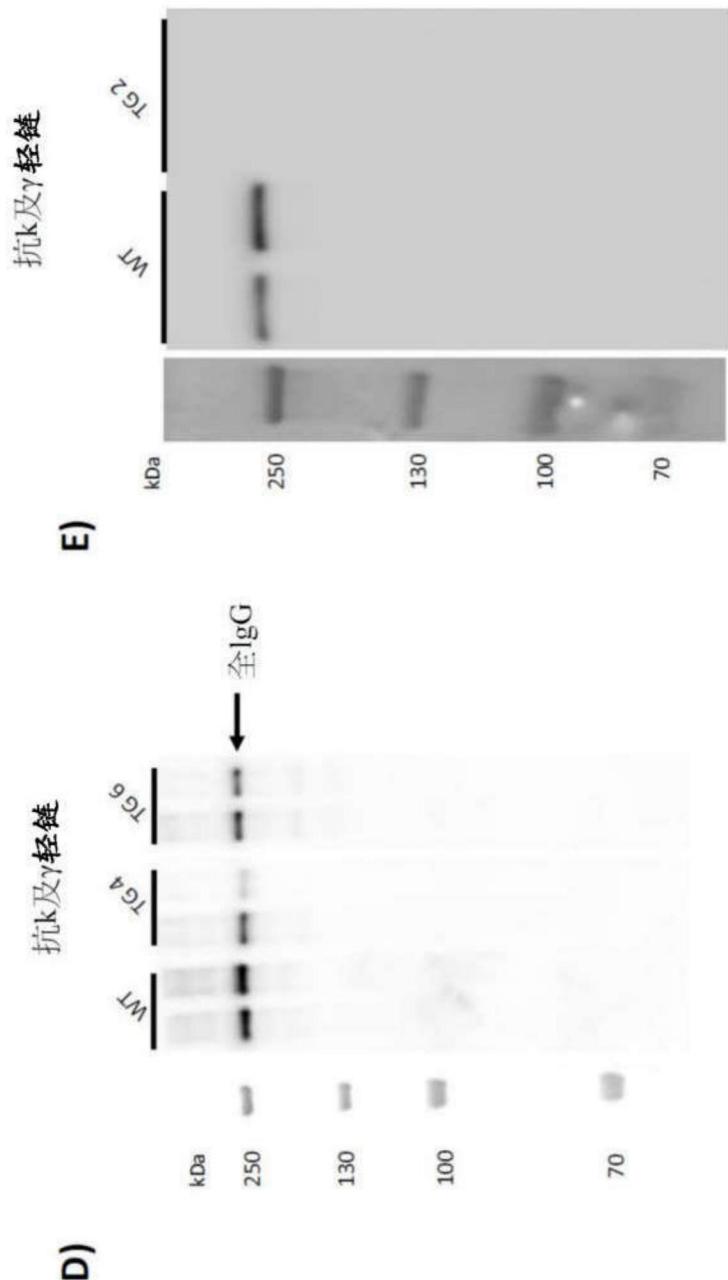


图6(续)

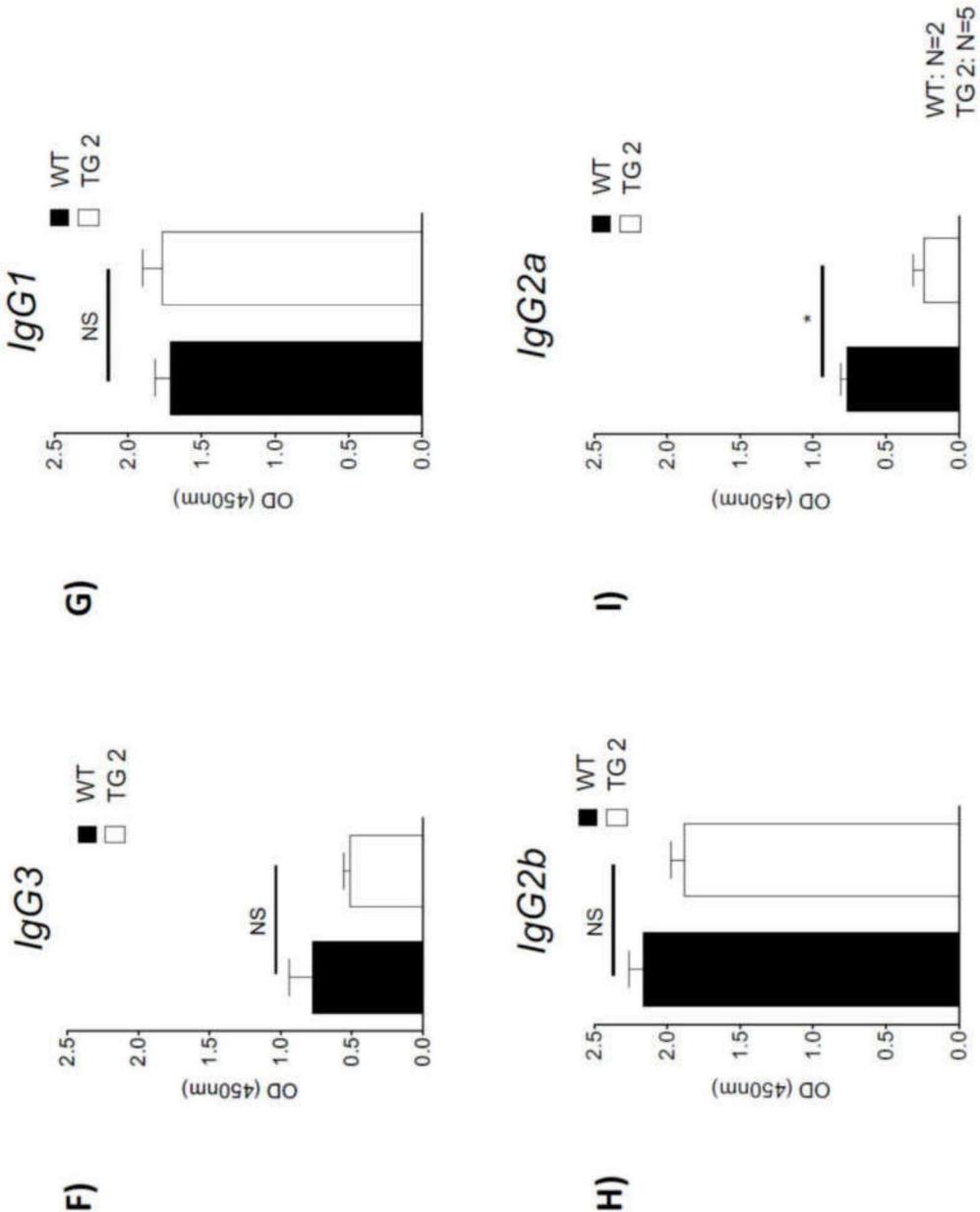


图6(续)

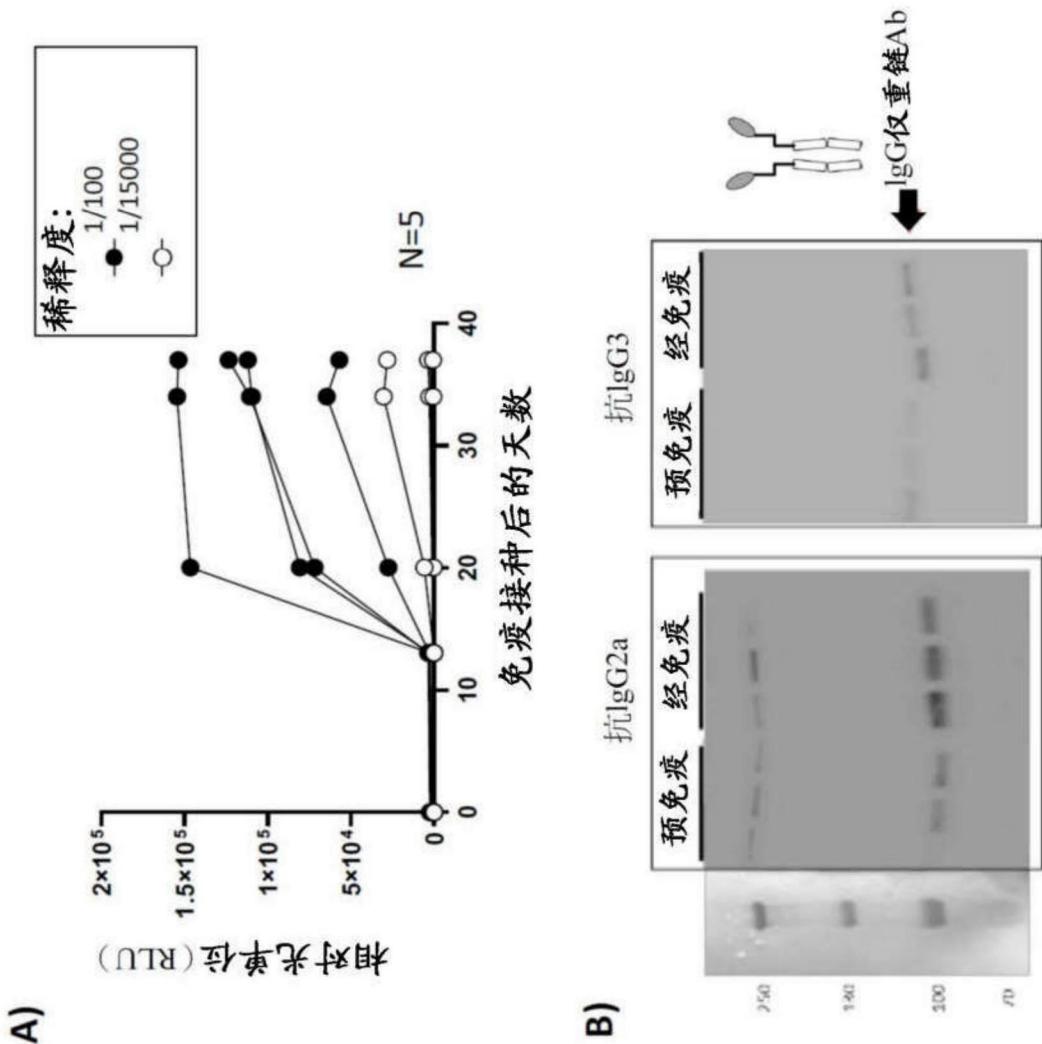


图7

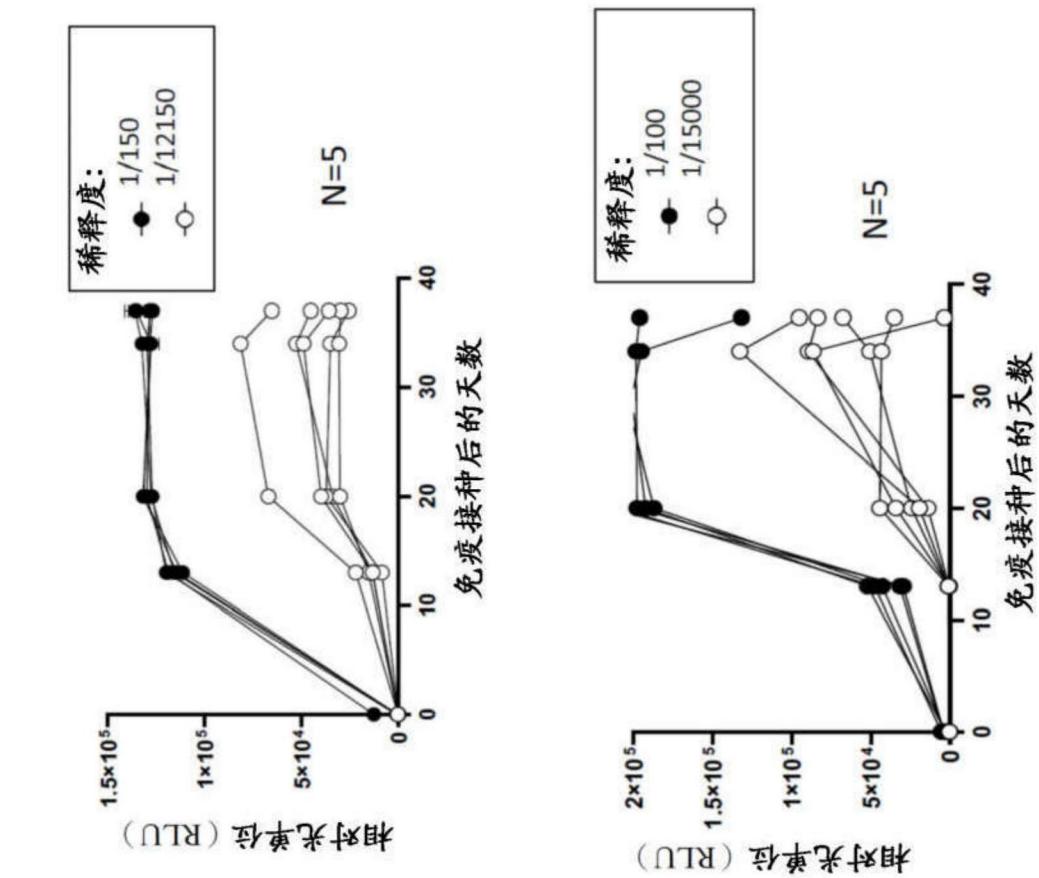


图7(续)

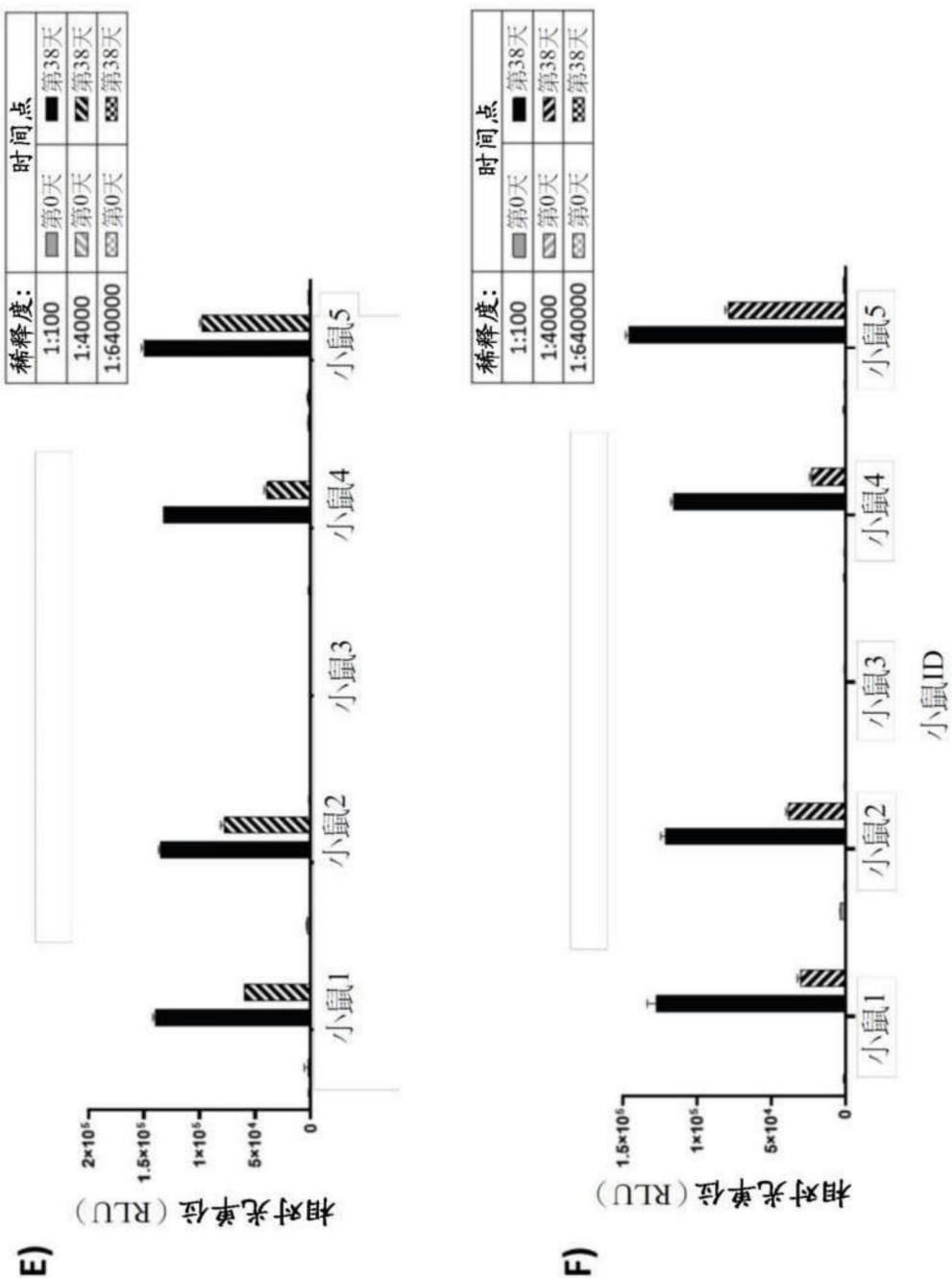


图7(续)

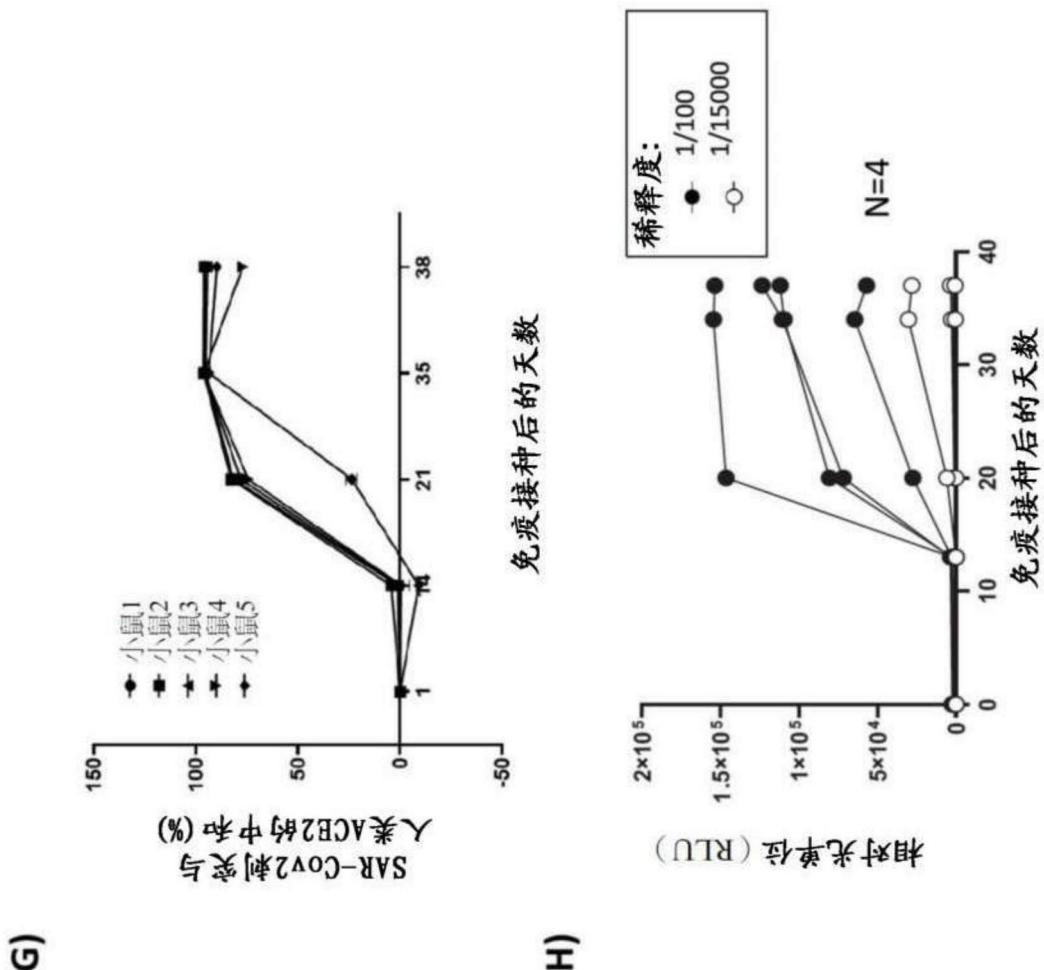


图7(续)

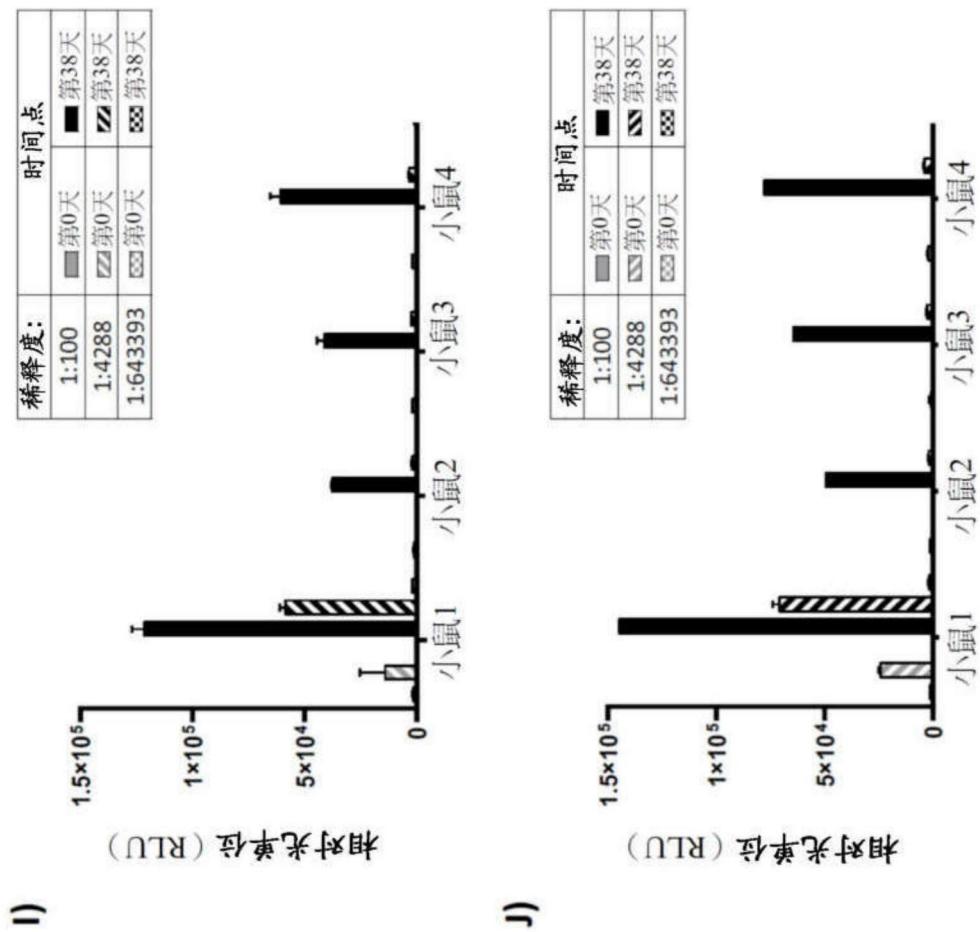


图7(续)

| 免疫文库靶标 | 靶标1 |
|---------------|-------------|
| 文库类型 | 羊驼(sdAb) |
| 文库的数目 | 2 |
| 平均文库大小 | 1E+08 |
| NGS测得的独特序列的总数 | 723K |
| 两个之间的重叠 | <0.002% |
| | <0.002% |

A)

B)

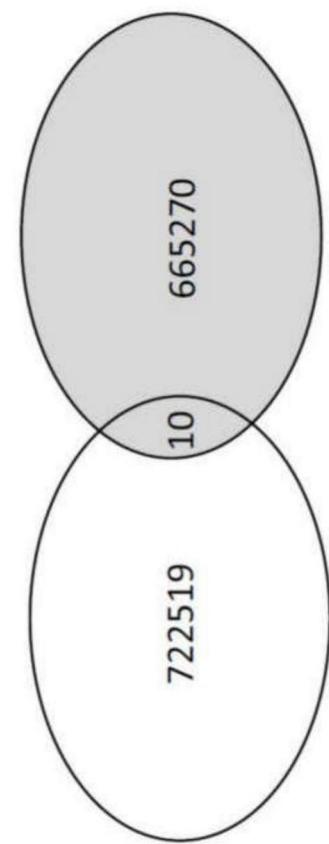
转基
因6动物羊
驼

图8

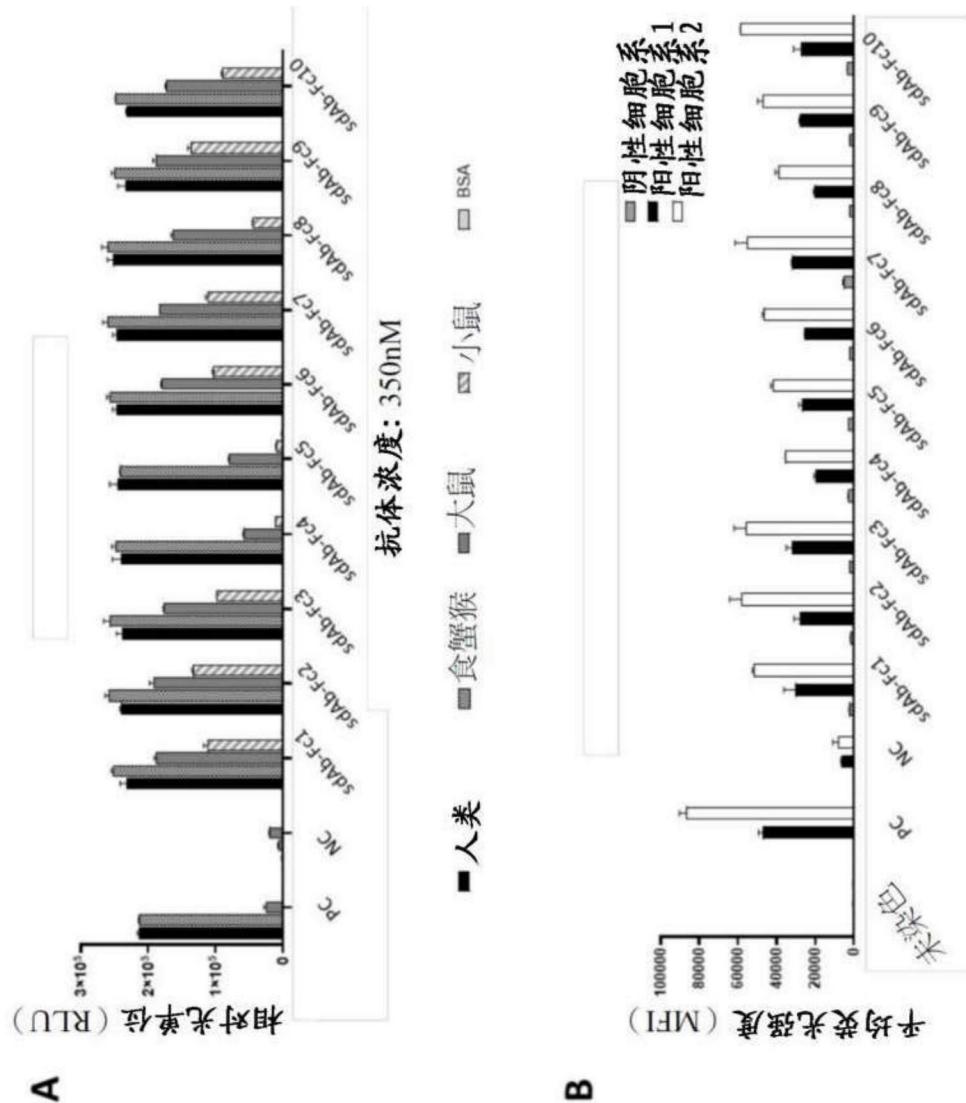


图9

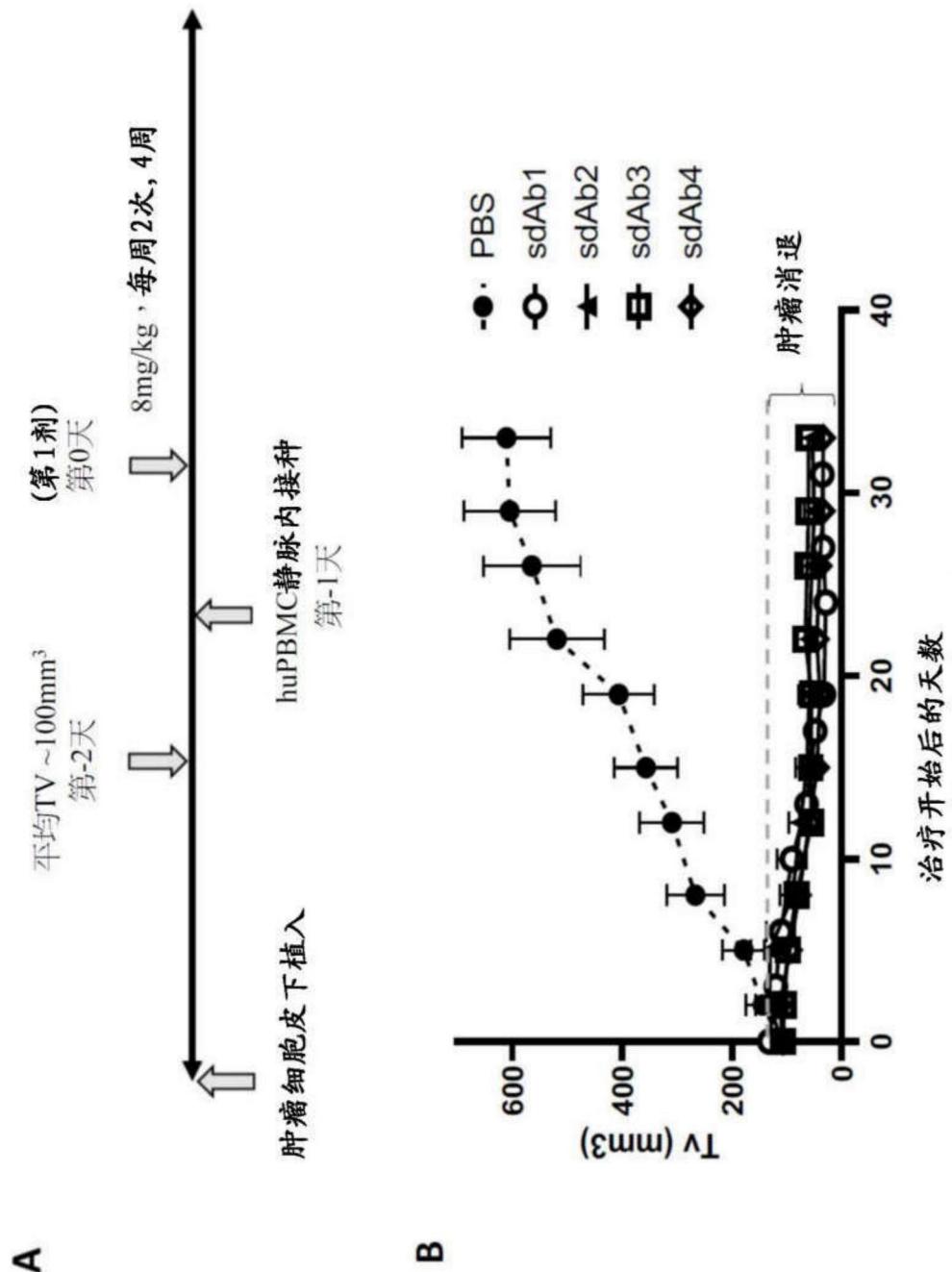


图10

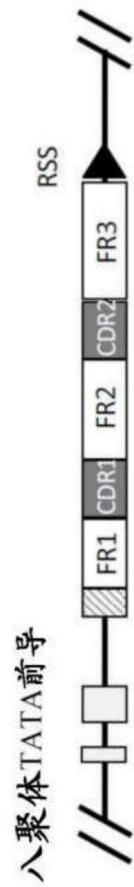


图11A

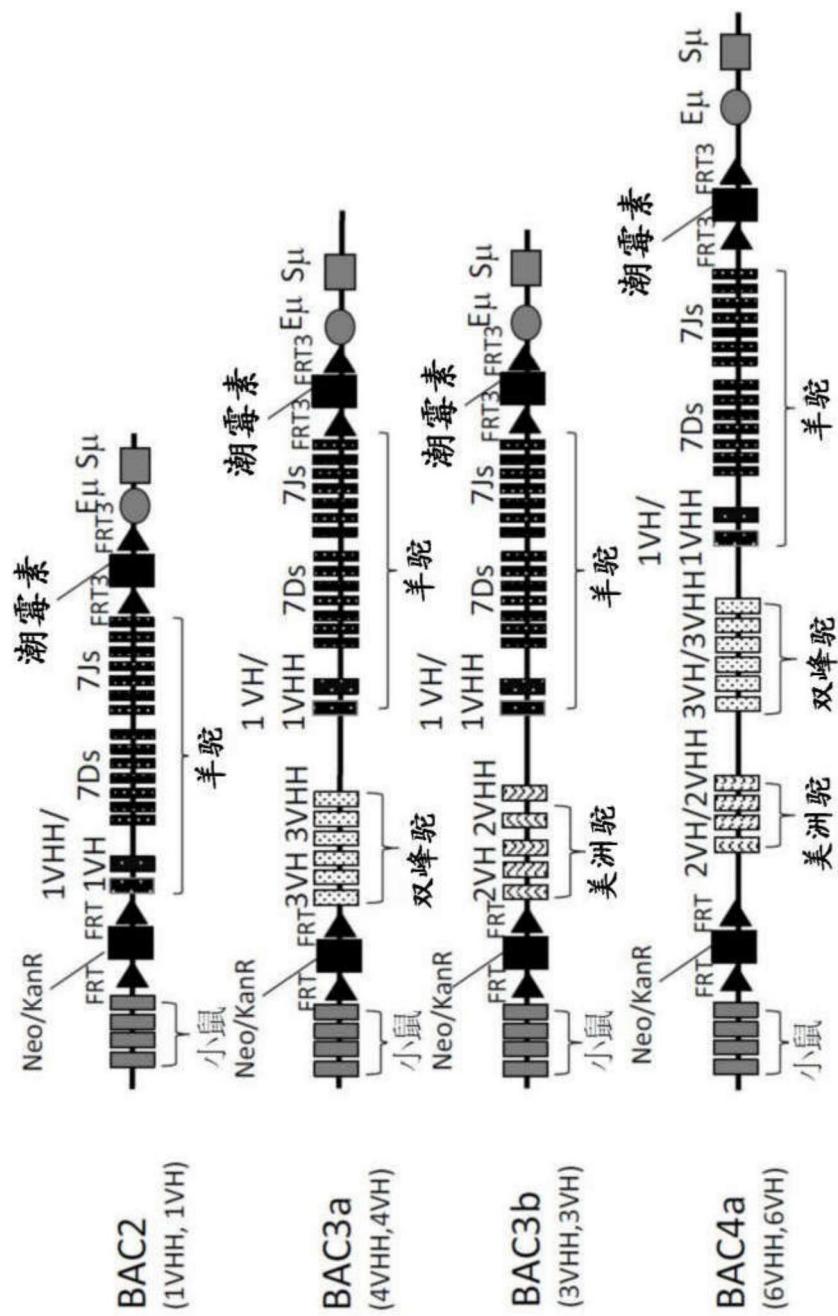


图11B

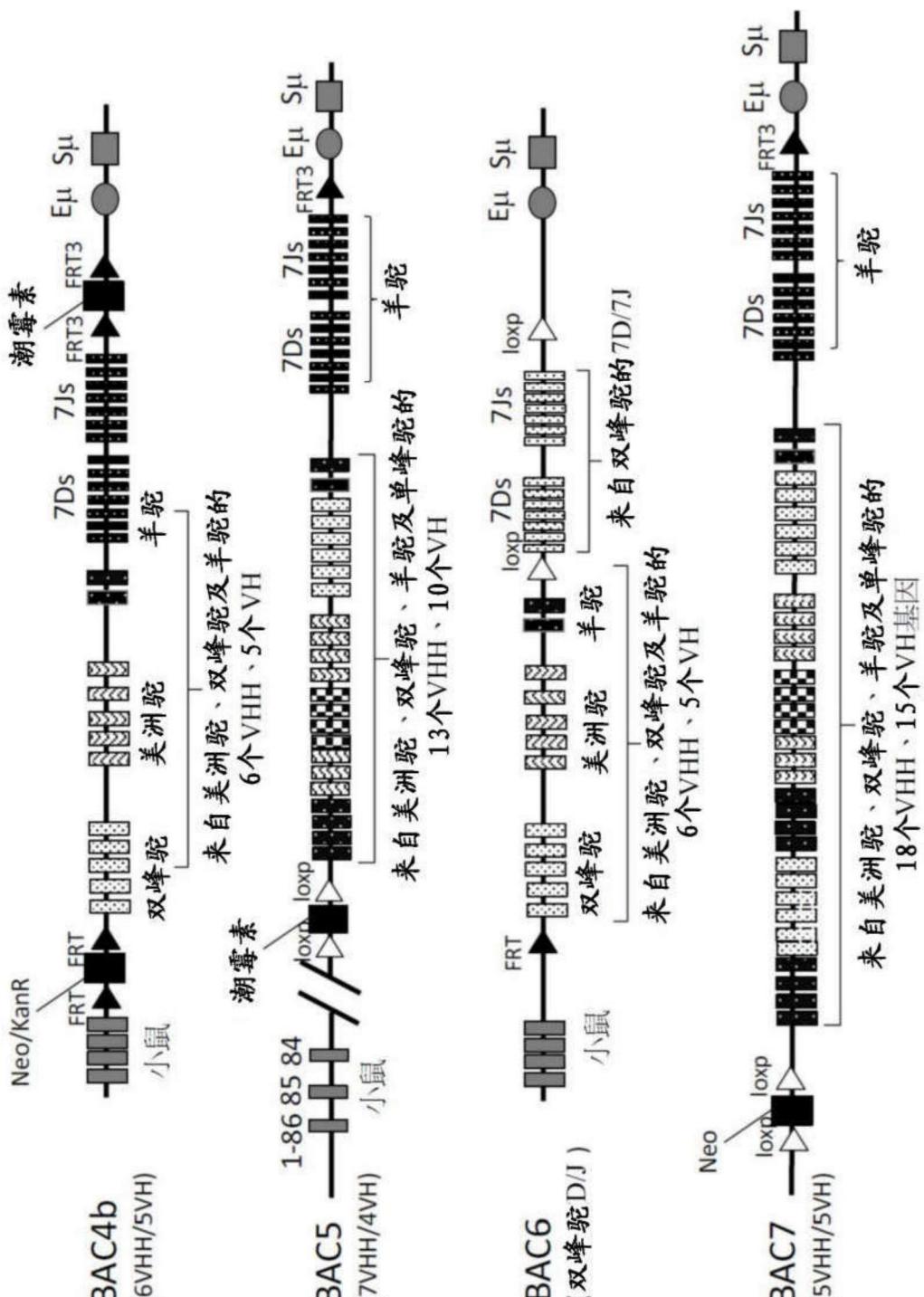


图11C

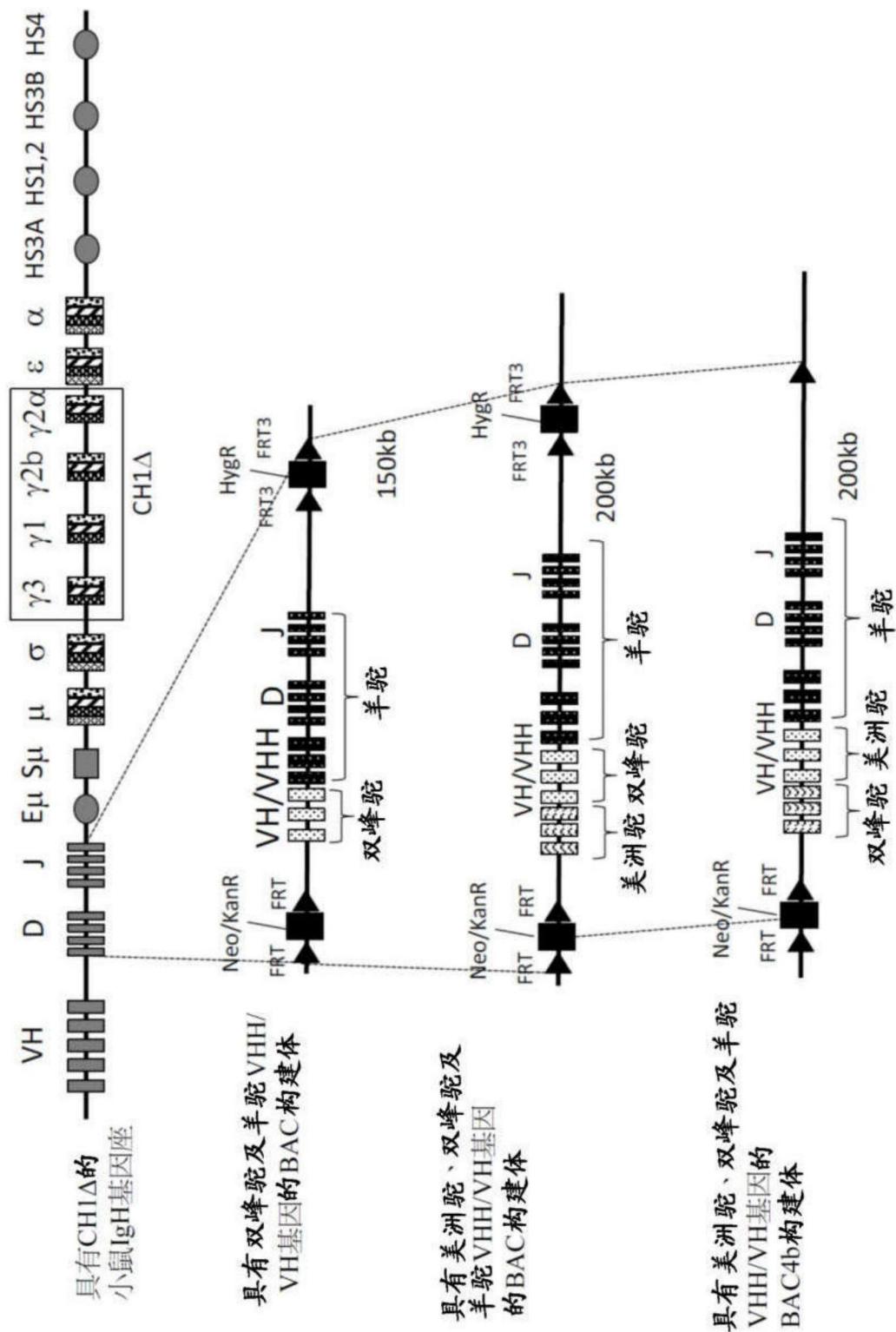


图12

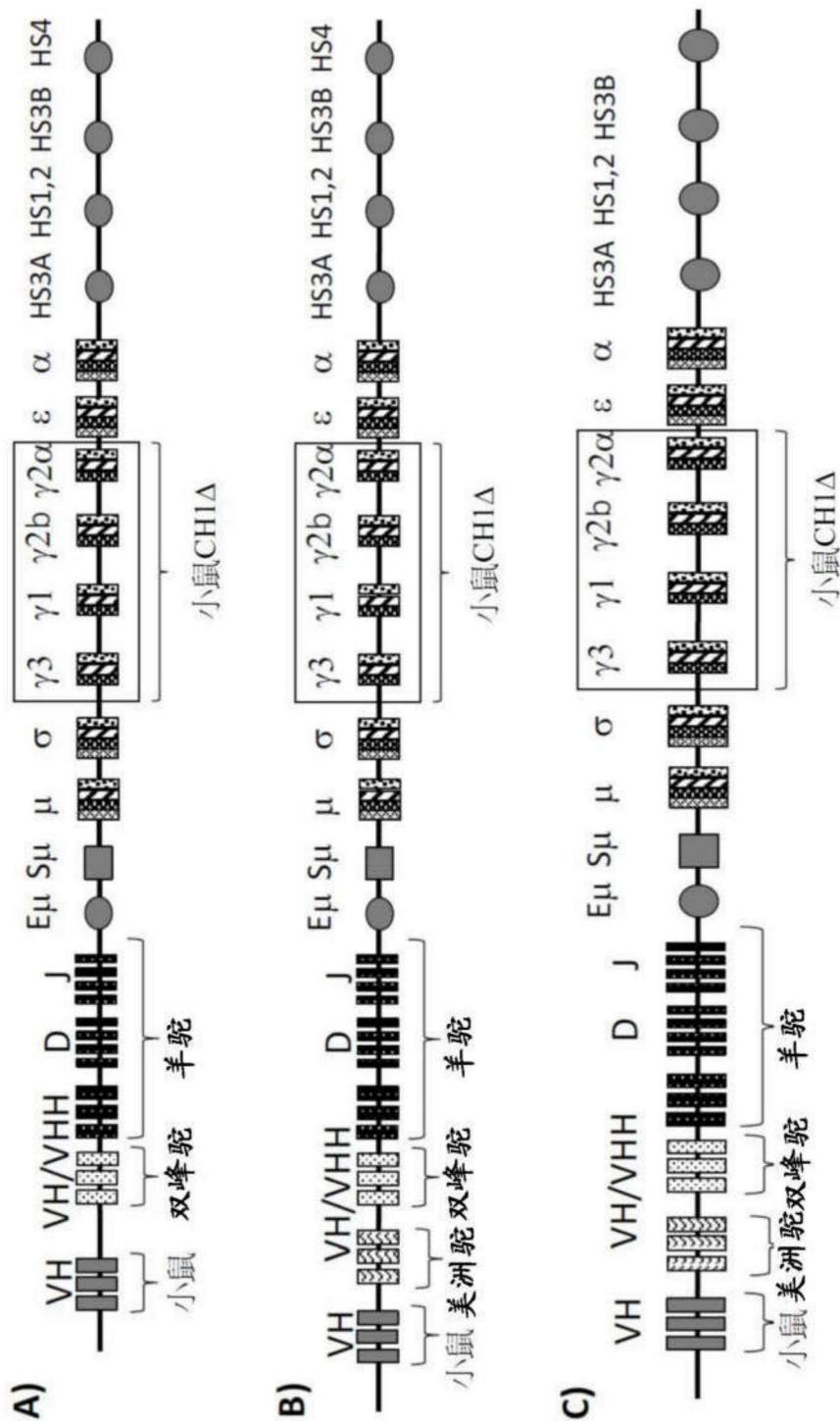


图13

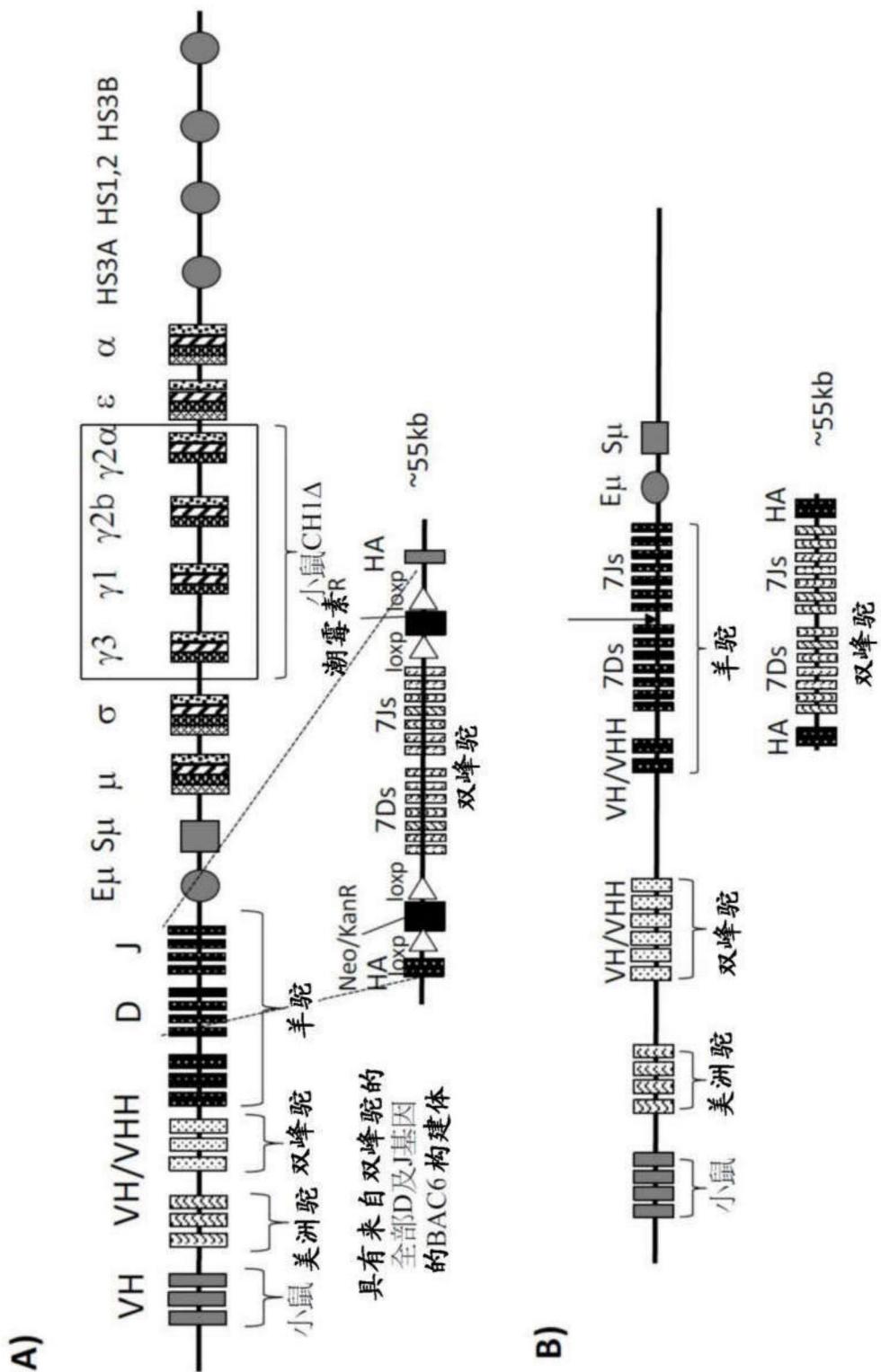


图14

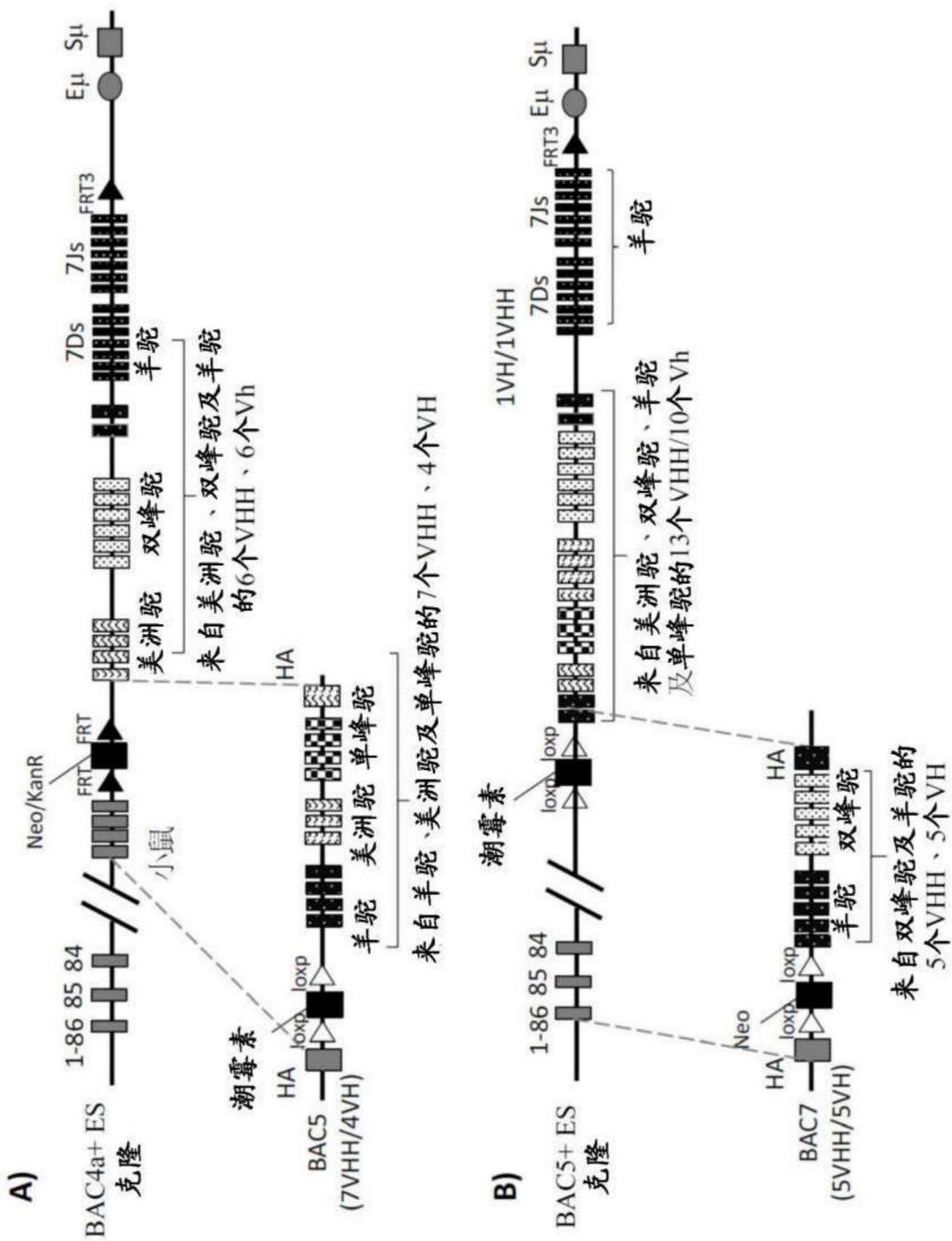


图15

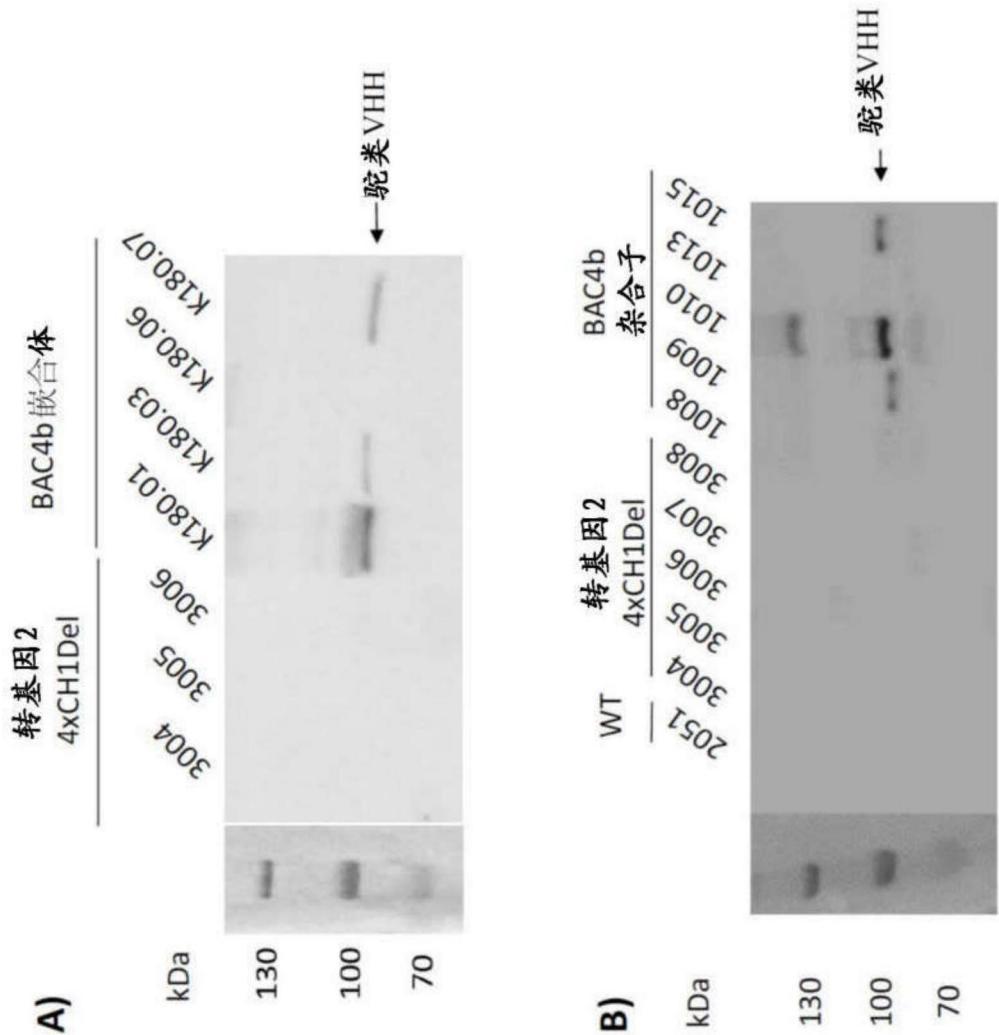


图16