

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5909449号
(P5909449)

(45) 発行日 平成28年4月26日(2016.4.26)

(24) 登録日 平成28年4月1日(2016.4.1)

(51) Int.Cl.

F 1

A01K	67/027	(2006.01)	A 01 K	67/027	Z N A
C12N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A
C07K	16/00	(2006.01)	C 07 K	16/00	
C12N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/10	
C12N	5/0735	(2010.01)	C 12 N	5/0735	

請求項の数 14 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2012-543304 (P2012-543304)
(86) (22) 出願日	平成22年12月10日 (2010.12.10)
(65) 公表番号	特表2013-513388 (P2013-513388A)
(43) 公表日	平成25年4月22日 (2013.4.22)
(86) 國際出願番号	PCT/US2010/059845
(87) 國際公開番号	W02011/072204
(87) 國際公開日	平成23年6月16日 (2011.6.16)
審査請求日	平成25年12月9日 (2013.12.9)
(31) 優先権主張番号	61/285, 250
(32) 優先日	平成21年12月10日 (2009.12.10)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者	597160510 リジエネロン・ファーマシューティカルズ ・インコーポレイテッド REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国 10591-6707 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソーミル・リバー・ロード 777 番
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】重鎖抗体を作製するマウス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座において生殖系列改変を含むトランスジェニックマウスであって、該改変は：

(a) 該内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座において内因性 Ig G 定常領域遺伝子の CH1 ドメインをコードしている核酸配列を欠失すること；および

(b) (a) の内因性 Ig G 定常領域遺伝子に作動可能に連結された 1 つ以上のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを含むこと；
を含み、

ここで、該マウスは、該内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座においてインタクトな内因性 Ig M 定常領域遺伝子を含み、そしてここで、該マウスは、Ig G 重鎖抗体を発現し、かつ、該 Ig G 重鎖抗体をその血清中へと分泌し、該 Ig G 重鎖抗体は、(i) (a) の内因性 Ig G 定常領域遺伝子に由来し、かつ CH1 ドメインを欠いた Ig G 定常ドメインに融合されたヒト可変ドメインを含んでおり、かつ (i) 同系の軽鎖を欠いている、マウス。

【請求項 2】

前記 Ig G 定常領域遺伝子が、Ig G 1 定常領域遺伝子、Ig G 2 b 定常領域遺伝子、Ig G 2 a 定常領域遺伝子、およびその組合せからなる群より選択される、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 3】

前記 I g G 定常領域遺伝子が I g G 1 定常領域遺伝子である、請求項 2 に記載のマウス。

【請求項 4】

前記マウスが、

- a) 野生型 I g G 3 タンパク質；
- b) 野生型 I g G 2 a タンパク質；および
- c) 野生型 I g G 2 b タンパク質

をさらに発現することを特徴とする、請求項 3 に記載のマウス。

【請求項 5】

前記マウスが、

10

- e) 野生型 I g M タンパク質；
- f) 野生型 I g D タンパク質；
- g) 野生型 I g A タンパク質；および
- h) 野生型 I g E タンパク質

を発現することをさらに特徴とする、請求項 4 に記載のマウス。

【請求項 6】

前記 I g G 定常ドメインが前記 C H 1 ドメインを完全に欠いていることを特徴とする、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 7】

前記 I g G 重鎖抗体が前記ヒト可変ドメイン、I g G 1 ヒンジ、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインを含む、請求項 1 に記載のマウス。

20

【請求項 8】

前記マウスが、機能性免疫グロブリン軽鎖遺伝子の遺伝子座を含む、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 9】

前記免疫グロブリン軽鎖遺伝子の遺伝子座が、軽鎖遺伝子の遺伝子座である、請求項 8 に記載のマウス。

【請求項 10】

前記免疫グロブリン軽鎖遺伝子の遺伝子座が、軽鎖遺伝子の遺伝子座である、請求項 8 に記載のマウス。

30

【請求項 11】

前記マウスが、129系統、C 57BL / 6 系統、および混合型 129 × C 57BL / 6 系統からなる群より選択される系統由来である、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 12】

前記マウスが 50% 129 および 50% C 57BL / 6 である、請求項 11 に記載のマウス。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のマウスの単離された細胞であって、該細胞は、

(a) 内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座において内因性 I g G 定常領域遺伝子の C H 1 ドメインをコードしている核酸配列を欠失しており；および

40

(b) (a) の内因性 I g G 定常領域遺伝子に作動可能に連結された 1 つ以上のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを含む、

改变された内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座を含み、

ここで、該細胞は、該内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座においてインタクトな内因性 I g M 定常領域遺伝子を含む、単離された細胞。

【請求項 14】

単離されたマウス胚性幹 (ES) 細胞であって、該細胞は、

(a) 内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座において内因性 I g G 定常領域遺伝子の C H 1 ドメインをコードしている核酸配列を欠失しており；および

50

(b) (a) の内因性 I g G 定常領域遺伝子に作動可能に連結された 1 つ以上のヒト重

鎖可変領域遺伝子セグメントを含む、

改变された内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座を含み、

ここで、該細胞は、該内因性重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座においてインタクトな内因性 IgM 定常領域遺伝子を含む、単離されたマウス ES 細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明の分野は、重鎖抗体が作製される遺伝子改变された非ヒト動物、特に、免疫グロブリン (IgG) 遺伝子の CH1ドメイン（またはCH1ドメインとヒンジ領域）をコードしている配列内にヌクレオチド配列の欠失を含むが、機能性CH1ドメインを欠いていないIgMを発現できる遺伝子改变された動物、特に、野生型IgM分子（すなわち、CH1ドメインを有する）の作製能を有するが、機能性CH1ドメイン（またはCH1ドメインとヒンジ領域）が欠如している重鎖IgG抗体が作製されるマウスである。

10

【背景技術】

【0002】

背景

ほとんどの動物では、正常な免疫グロブリン重鎖は、その同系の(cognate)軽鎖とカップリングされている場合でのみ良好に発現される。ヒトでは、重鎖可変部、CH1、または重鎖可変部とCH1ドメインの配列を欠いている機能不全性の重鎖によって症状発現する重鎖病で孤立重鎖が見られる。軽鎖が欠如している重鎖は、特定の種の魚類およびラクダに見られる。かかる重鎖は、機能性CH1ドメインを欠いており、重鎖可変ドメインにおいて非ヒト特徴を有する。ラクダまたは特定の種の魚類に見られるVHHドメインを模倣するラクダ化遺伝子を発現するようにマウスを変更することにより（一部において、IgMおよびIgG CH1ドメインを除去し、重鎖可変領域をラクダおよび／または特定の種の魚類のものと類似するように適合させることにより）、ラクダ化抗体を作製する試みがなされている。しかしながら、ラクダ化抗体では、非ラクダ動物において免疫応答が誘導されることが予測される。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0003】

当該技術分野において、非ラクダ類VHドメインを有する重鎖抗体が作製される遺伝子改变された非ヒト動物の必要性が存在している。

【課題を解決するための手段】

【0004】

概要

遺伝子改变された細胞、非ヒト胚、非ヒト動物ならびにそれらを作製および使用するための方法および組成物を提供する。ここで、該動物は、免疫グロブリンG (IgG) において機能性CH1配列を欠くように遺伝子改变され、任意選択で、該改变IgGにおいて機能性IgGヒンジ領域を欠くように改变され、ここで、該細胞、胚および動物には機能性IgM CH1配列が含まれている。一部の態様では、該マウスは、内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの1つ以上または全部の、1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含むものである。一部の態様では、内因性マウスV、DおよびJ遺伝子セグメントの全部が、1つ以上のヒトV、1つ以上のヒトDおよび1つ以上のヒトJ遺伝子セグメントで置き換えられている。

40

【0005】

一態様において、遺伝子改变がIgG定常領域をコードしているヌクレオチド配列の改变を含み、該改变によってIgG定常領域のCH1ドメインの機能喪失がもたらされる、遺伝子改变マウスを提供する。一実施形態において、該機能喪失改变は、CH1ドメインをコードしているヌクレオチド配列の欠失、またはCH1ドメインをコードしているヌク

50

レオチド配列内の欠失である。

【0006】

一実施形態において、 IgG は、 $IgG1$ 、 $IgG2a$ 、 $IgG2b$ およびその組合せから選択される。一実施形態では、 IgG は $IgG1$ である。一実施形態では、 IgG は、 $IgG1$ 、 $IgG2a$ 、および $IgG2b$ である。

【0007】

一実施形態において、該改変は、さらに、 $CH1$ 改変を含む IgG のヒンジ領域のヌクレオチド配列の欠失を含む。

【0008】

一実施形態において、遺伝子改変マウスは、129系統、C57BL/6系統、および
129×C57BL/6混合型から選択される。具体的な一実施形態では、該マウスは50%129および50%C57BL/6である。10

【0009】

一実施形態において、遺伝子改変マウスは、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1（例えば、129S1/SV、129S1/SvIm）、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6（129/SvEvTac）、129S7、129S8、129T1、129T2（例えば、Festingら（1999）Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10: 836参照）からなる群より選択される129系統である。一実施形態では、遺伝子改変マウスはC57BL系統であり、具体的な一実施形態では、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KalwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、C57BL/Olaから選択される。具体的な一実施形態では、遺伝子改変マウスは、前述の129系統と前述のC57BL/6系統の混合型である。別の具体的な実施形態では、該マウスは、前述の129系統の混合型、または前述のBL/6系統の混合型である。具体的な一実施形態では、該混合型の129系統は129S6（129/SvEvTac）系統である。20

【0010】

一実施形態において、該マウスは、該改変 IgG 定常領域配列に作動可能に連結された1つ以上の再構成されていない内因性マウス重鎖免疫グロブリン可変領域（mVR）遺伝子セグメントを含むものである。一実施形態では、該1つ以上のmVR遺伝子セグメントは、VH1、VH3、VH5、VH7、VH14およびその組合せから選択されるマウスVH遺伝子ファミリーに由来するものである。一実施形態では、該1つ以上のmVR遺伝子セグメントは、mVH 1-26、1-42、1-50、1-58、1-72、3-6、5-6、7-1、14-2およびその組合せから選択される。30

【0011】

一実施形態において、該マウスは、機能性 $CH1$ 領域を欠いている IgG 重鎖のFR1、FR2およびFR3をコードしている再構成遺伝子を含むものであり、該FR1、FR2およびFR3は各々、独立して、VH1、VH3、VH5、VH7およびVH14遺伝子ファミリーから選択されるmVH生殖系列配列に由来するFR1、FR2およびFR3と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。一実施形態において、mVH生殖系列配列は、1-26、1-42、1-50、1-58、1-72、3-6、5-6、7-1、14-2配列から選択される。40

【0012】

一実施形態において、該マウスは、DH1-1、2-14、3-1、3-2、3-3、4-1およびその組合せから選択されるDH遺伝子セグメントに由来するCDR3を含むものである。一実施形態において、該マウスCDR3は、JH1、JH2、JH3またはJH4であるJHにコードされた配列を含む。

【0013】

50

20

30

40

50

一実施形態において、該マウスは、D H 1 - 1、2 - 1 4、3 - 1、3 - 2、3 - 3、4 - 1、およびJ H 1、J H 2、J H 3またはJ H 4の再構成体に由来するC D R 3をコードしている再構成抗体配列を含むものである。

【0014】

一実施形態において、該マウスは、機能性C H 1領域を欠いているI g G重鎖のF R 4をコードしている再構成遺伝子を含むものであり、該F R 4は、J H 1、J H 2、J H 3またはJ H 4とのD H 1 - 1、2 - 1 4、3 - 1、3 - 2、3 - 3または4 - 1の再構成体にコードされたF R 4と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

【0015】

一実施形態において、該マウスは、再構成されていないヒト重鎖免疫グロブリン可変領域(h V R)遺伝子セグメントを、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子座に含むものである。一実施形態では、該マウスは、該改变I g G定常領域配列に作動可能に連結された再構成されていないh V R遺伝子セグメントを、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子座に含むものである。一実施形態において、h V R遺伝子セグメントは、V H 1、V H 3、V H 4およびその組合せから選択されるヒトV H遺伝子ファミリーに由来するものである。一実施形態において、1つ以上のh V R遺伝子セグメントが、1 - 2、1 - 8、1 - 1 8、1 - 4 6、1 - 6 9、3 - 2 1、3 - 7 2および4 - 5 9から選択される。具体的な一実施形態では、1つ以上のh V R遺伝子セグメントが、1 - 8、1 - 1 8および1 - 6 9から選択される。

10

【0016】

一実施形態において、マウス重鎖V遺伝子セグメントの全部または実質的に全部が、1つ以上のヒト重鎖V遺伝子セグメントで置き換えられている。一実施形態では、マウス重鎖VおよびD遺伝子セグメントの全部が、1つ以上のヒト重鎖VおよびD遺伝子セグメントで置き換えられている。一実施形態では、マウス重鎖V、DおよびJ遺伝子セグメントの全部が、1つ以上のヒト重鎖(c a h i n)V、1つ以上のヒト重鎖Dおよび1つ以上のヒト重鎖J遺伝子セグメントで置き換えられている。このような実施形態において、ヒト重鎖Vおよび/またはDおよび/またはJ遺伝子セグメントは、マウス内因性重鎖の遺伝子座に存在し、マウス定常領域遺伝子(1つもしくは複数)または改变マウス定常領域遺伝子(1つもしくは複数)に作動可能に連結される。

20

【0017】

一実施形態において、該マウスは、機能性C H 1領域を欠いているI g G重鎖のF R 1、F R 2およびF R 3配列をコードしており、かつ1 - 8、1 - 1 8または1 - 6 9ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントのヒト生殖系列ヌクレオチド配列由來のF R 1、F R 2およびF R 3と少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列を含むものであり；ここで、改变マウスのF R 1 + F R 2 + F R 3配列は、マウスおよびヒト配列のC D Rの配列に関係なく、記載のヒト生殖系列配列と最適にアラインメントされる(すなわち、該F Rは、比較対象のいずれのC D Rのアミノ酸の実体も考慮せずに最適にアラインメントされる)。具体的な実施形態では、該F R 1、F R 2およびF R 3は、1 - 8、1 - 1 8または1 - 6 9遺伝子セグメントである重鎖可変領域遺伝子セグメントのF R 1 + F R 2 + F R 3のヒト生殖系列ヌクレオチド配列と約85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

30

【0018】

一実施形態において、該マウスは、さらに、ヒトD 6 - 1 9 / J 6再構成、D 6 - 7 / J 4再構成、D 4 - 4 / J 4再構成、D 6 - 6 / J 2再構成、D 3 - 1 6 / J 6再構成、D 6 - 6 / J 4再構成、およびD 1 - 7 / J 4再構成によって形成されたF R 4と少なくとも80%同一であるF R 4を含むものである。具体的な実施形態では、該F R 4は、前述のD / J再構成によって形成されたF R 4と約85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

40

【0019】

50

一実施形態において、該マウスは、アミノ酸配列において1個以下、2個以下、3個以下、4個以下または5個以下のアミノ酸が、V 1 - 8、V 1 - 18およびV 1 - 69から選択されるヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの生殖系列配列にコードされたFR 1と異なるFR 1をコードしているヌクレオチド配列を含むものである。具体的な一実施形態では、該FR 1をコードしているヌクレオチド配列は、機能性CH 1配列を欠いているIg G定常領域をコードしている配列に作動可能に連結された再構成された配列である。

【0020】

一実施形態において、該マウスは、アミノ酸配列において1個以下、2個以下、3個以下、4個以下または5個以下のアミノ酸が、V 1 - 8、V 1 - 18およびV 1 - 69から選択されるヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの生殖系列配列にコードされたFR 2と異なるFR 2をコードしているヌクレオチド配列を含むものである。具体的な一実施形態では、該FR 2をコードしているヌクレオチド配列は、機能性CH 1配列を欠いているIg G定常領域をコードしている配列に作動可能に連結された再構成された配列である。10

【0021】

一実施形態において、該マウスは、アミノ酸配列において1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下または11個以下のアミノ酸が、V 1 - 8、V 1 - 18およびV 1 - 69から選択されるヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの生殖系列配列にコードされたFR 3と異なるFR 3をコードしているヌクレオチド配列を含むものである。具体的な一実施形態では、該FR 3をコードしているヌクレオチド配列は、機能性CH 1配列を欠いているIg G定常領域をコードしている配列に作動可能に連結された再構成された配列である。20

【0022】

一実施形態において、該マウスは、アミノ酸配列において1個以下、2個以下または3個以下のアミノ酸が、ヒトD 6 - 19 / J 6、D 6 - 7 / J 4、D 4 - 4 / J 4、D 6 - 6 / J 2、D 3 - 16 / J 6、D 6 - 6 / J 4、およびD 1 - 7 / J 4の再構成体にコードされたFR 4のアミノ酸配列と異なるFR 4をコードしているヌクレオチド配列を含むものである。具体的な一実施形態では、該FR 4をコードしているヌクレオチド配列は、機能性CH 1配列を欠いているIg G定常領域をコードしている配列に作動可能に連結された再構成された配列である。

【0023】

一実施形態において、該マウスは、ヒト重鎖D領域遺伝子セグメント(hDH)に由来する重鎖CDR3をコードしているヌクレオチド配列を含むものである。一実施形態において、hDHは、D 1 - 7、D 3 - 16、D 4 - 4、D 6 - 6、D 6 - 7およびD 6 - 19から選択される。30

【0024】

一実施形態において、該マウスは、ヒト重鎖接合遺伝子セグメント(JH)に由来する重鎖CDR3をコードしているヌクレオチド配列を含むものである。具体的な一実施形態では、JHはJ 2、J 4およびJ 6から選択される。

【0025】

一実施形態において、該マウスは、ヒトDHとヒトJHの再構成に由来するヌクレオチド配列にコードされた重鎖CDR3を含むものである。具体的な一実施形態では、該CDR3は、D 1 - 7 / J 4、D 3 - 16 / J 6、D 4 - 4 / J 4、D 6 - 6 / J 2、D 6 - 6 / J 4、D 6 - 7 / J 4、またはD 6 - 19 / J 6 再構成に由来するものである。40

【0026】

一実施形態において、該マウスは、内因性mVR遺伝子セグメントのhVR遺伝子セグメントでの置き換えを含むものである。具体的な一実施形態では、該mVR遺伝子セグメントのhVR遺伝子セグメントでの置き換えは、改変された重鎖定常領域と同じ対立遺伝子におけるものである。別の具体的な実施形態では、該mVR遺伝子セグメントのhVR遺伝子セグメントでの置き換えは、改変された重鎖定常領域と異なる対立遺伝子におけるものである。50

【0027】

一実施形態において、mVR遺伝子セグメントの90～100%が、少なくとも1つの遺伝子セグメントで置き換えられている。具体的な一実施形態では、内因性mVR遺伝子セグメントの全部または実質的に全部が、少なくとも1つのhVR遺伝子セグメントで置き換えられている。一実施形態において、該置き換えは、少なくとも18個、少なくとも39個、または少なくとも80個もしくは81個のhVR遺伝子セグメントによるものである。一実施形態において、該置き換えは、少なくとも12個の機能性hVR遺伝子セグメント、少なくとも25個の機能性hVR遺伝子セグメント、または少なくとも43個の機能性hVR遺伝子セグメントによるものである。

【0028】

一実施形態において、遺伝子改変マウスは、少なくとも1つの再構成されていないhVR遺伝子セグメント、少なくとも1つの再構成されていないヒトDセグメント、少なくとも1つの再構成されていないヒトJセグメント、および少なくとも1つのヒト重鎖定常配列を含む導入遺伝子を含むものである。一実施形態において、内因性マウス重鎖可変領域および軽鎖可変領域の遺伝子座は機能的にサイレンシングされている。具体的な一実施形態では、該マウスは、トランススイッチ(trans-switching)能を有し、機能性CH1ドメインを欠いているマウスIgG配列が隣接するヒト重鎖可変ドメインを含み、任意選択で、機能性CH1ドメインを欠いている該IgGのヒンジ領域を欠いているキメラヒト/マウス抗体を生成することができる。具体的な一実施形態では、該導入遺伝子は、さらに、CH1ドメインを欠いているIgG配列を含み、任意選択で、機能性CH1ドメインを有するIgMを含むものである。さらなる具体的な一実施形態では、IgG配列はヒンジ領域を欠いている。

【0029】

一実施形態において、該マウスは第1の重鎖可変領域の対立遺伝子と第2の重鎖可変領域の対立遺伝子を含むものであり、第1対立遺伝子と第2対立遺伝子はどちらも同じマウス系統由来のものである。一実施形態では、第1対立遺伝子は第1のマウス系統に由来し、第2対立遺伝子は第2のマウス系統に由来する。一実施形態において、第1および第2対立遺伝子のうち一方の対立遺伝子は、mVRの少なくとも1つのhVRでの置き換えを含む。別の実施形態では、両方の対立遺伝子がmVRの少なくとも1つの(on)hVRでの置き換えを含む。

【0030】

一態様において、CH1ドメインを含むIgMが発現され、機能性CH1ドメインを欠いているIgGが発現されるか、または機能性CH1ドメインを欠いているとともに機能性ヒンジ領域も欠いているIgGが発現される遺伝子改変マウスを提供する。

【0031】

一実施形態において、IgGはIgG1である。

【0032】

一実施形態において、該マウスでは、改変IgG1ならびに野生型IgG3、IgG2aおよびIgG2bである4種類のIgGが発現される。別の実施形態では、該マウスでは、改変IgG1および野生型IgG3である2種類以下のIgGが発現される。具体的な一実施形態では、該マウスでは、野生型IgM、野生型IgD、野生型IgG3、改変IgG1、野生型IgG2a、野生型IgG2b、野生型IgA、および野生型IgEである重鎖アイソタイプが発現される。別の具体的な実施形態では、該マウスでは、野生型IgM、野生型IgD、野生型IgG3、改変IgG1、野生型IgA、および野生型IgEである重鎖アイソタイプが発現される。種々の(various)実施形態において、IgG1の改変は、CH1ドメインの欠失、および任意選択でヒンジ領域の欠失を含む。

【0033】

一実施形態において、該マウスは、129、C56BL/6、混合型129×C57BL/6から選択される系統に由来するものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

一態様において、本質的に二量体重鎖からなる重鎖抗体が発現されるマウスを提供し、ここで、該重鎖は、機能性 C H 1 ドメインを欠いているか、または機能性 C H 1 ドメインと機能性ヒンジ領域の両方を欠いており、また、該重鎖は、生殖系列可変領域遺伝子にコードされた哺乳動物の重鎖可変ドメインと同一でない配列を含む哺乳動物の重鎖可変ドメインを含むものであり、また、該重鎖は、ヒトまたはマウスの C H 2 ドメインとヒトまたはマウスの C H 3 ドメインを含むものであり、該マウスでは、野生型ヒトまたはマウス Ig M が発現される。

【 0 0 3 5 】

一実施形態において、該マウスは、機能性免疫グロブリン軽鎖の遺伝子の遺伝子座を含むものである。 10

【 0 0 3 6 】

一実施形態において、哺乳動物の重鎖可変ドメインは、ヒトまたはマウス重鎖可変ドメインである。

【 0 0 3 7 】

一実施形態において、重鎖抗体は、本質的に、機能性 C H 1 ドメインを欠いており、機能性ヒンジ領域を欠いている二量体重鎖からなり、ここで、該重鎖は、少なくとも 1 つの体細胞変異を含むヒト可変ドメインを含み、 C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含む。具体的な一実施形態では、 C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインは、独立してマウスドメインおよびヒトドメインから選択される。具体的な一実施形態では、 C H 2 ドメインと C H 3 ドメインの両方がヒトのものであり；別の実施形態では、 C H 2 ドメインと C H 3 ドメインの両方がマウスのものである。 20

【 0 0 3 8 】

一態様において、非ラクダ類可変ドメインと C H 1 ドメインを欠いている重鎖定常領域とを含む重鎖を含む重鎖抗体を提供する。

【 0 0 3 9 】

一実施形態において、重鎖抗体は、さらにヒンジ領域を欠いている。

【 0 0 4 0 】

一実施形態において、重鎖抗体は、本質的にヒンジ領域、 C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインからなる定常領域を含む。別の実施形態では、重鎖抗体は、本質的に C H 2 ドメインと C H 3 ドメインからなる定常領域を含む。 30

【 0 0 4 1 】

一実施形態において、非ラクダ類可変ドメインは、ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを含むマウスまたは遺伝子改変マウス由来の B 細胞の Ig M または Ig G をコードしているヌクレオチド配列から得られる体細胞変異を有するヒトまたはマウス重鎖可変ドメインである。具体的な一実施形態では、該マウスは、ヒト化重鎖可変領域遺伝子セグメントを含むものである。別の実施形態では、該マウスは、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメント遺伝子座の、少なくとも 1 つのヒト可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含むものである。別の実施形態では、該マウスは、内因性マウス重鎖の遺伝子座の、少なくとも 1 つのヒト可変遺伝子セグメント、少なくとも 1 つのヒト D 遗伝子セグメント、および少なくとも 1 つのヒト J 遺伝子セグメントでの置き換えを含むものである。具体的な一実施形態では、内因性マウス免疫グロブリン可変領域遺伝子座は、全部または実質的に全部が、複数のヒト V 、 D および J 遗伝子セグメントを含むヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子座で置き換えられている。 40

【 0 0 4 2 】

一実施形態において、非ラクダ類可変ドメインはヒトまたはマウス可変ドメインである。別の実施形態では、非ラクダ類可変ドメインは、1 つ以上のラクダ化改変を含むヒトまたはマウス可変ドメインである。具体的な一実施形態では、ラクダ化改変は、 L 1 1 S 、 V 3 7 F 、 G 4 4 E 、 L 4 5 C 、 L 4 5 R 、および W 4 7 G (カバトによる番号付け) から選択される。具体的な一実施形態では、ラクダ化改変は V 3 7 F 、 G 4 4 E 、および L 50

45 C から選択される。具体的な一実施形態では、重鎖可変ドメインは、2つのシステムを含む相補性決定領域3(CDR3)を含むものである。

【0043】

一実施形態において、重鎖抗体は、第1の重鎖可変ドメインを含む第1の重鎖と、第2の重鎖可変ドメインを含む第2の重鎖の二量体で構成されており、第1および第2の重鎖は各々、CH1ドメインを欠いている(またはCH1ドメインとヒンジ領域を欠いている)。一実施形態において、該二量体の第1の重鎖のヒト可変ドメインは第1のエピトープに結合し、該二量体の第2の重鎖のヒト可変ドメインは第2のエピトープに結合し、第1および第2のエピトープは同一でない。具体的な一実施形態では、第1および第2の重鎖の重鎖可変ドメインは、本明細書に記載のヒト重鎖可変ドメインおよび/またはヒト重鎖FR領域を含む。10

【0044】

一態様において、遺伝子改変された非ヒト細胞を提供し、ここで、該遺伝子改変はIgG CH1ドメインの欠失を含み、該細胞は機能性IgMを発現する。具体的な一実施形態では、該細胞は、CH1ドメインをコードしている配列を含むIgM遺伝子を含む。

【0045】

一実施形態において、該細胞は、非ヒトES細胞、多能性細胞および全能細胞から選択される。具体的な一実施形態では、非ヒトES細胞は、マウスES細胞およびラットES細胞から選択される。20

【0046】

一態様において、遺伝子改変された非ヒト胚を提供し、ここで、該遺伝子改変は本明細書に記載の改変を含む。一実施形態では、該遺伝子改変はIgG CH1ドメインの欠失を含み、該非ヒト胚は機能性IgMを発現する。具体的な一実施形態では、該非ヒト胚は、CH1ドメインを含むIgM遺伝子を含む。20

【0047】

一実施形態において、非ヒト胚はマウス胚またはラット胚である。

【0048】

一態様において、ドナー細胞を含む非ヒト胚を提供し、ここで、該ドナー細胞は遺伝子改変されており、該遺伝子改変は本明細書に記載の改変である。一実施形態では、該遺伝子改変はIgG CH1ドメインの欠失を含み、該細胞は、CH1ドメインを含むIgM遺伝子を含む。30

【0049】

一実施形態において、非ヒト胚はマウス胚またはラット胚であり、ドナー細胞は、それぞれ、マウスES細胞またはラットES細胞である。

【0050】

一態様において、(a)5'側の第1の配列に相同であり、IgG CH1領域の開始部に直接隣接しているマウス相同性アーム；(b)マークーまたは薬物選択カセット；および(c)3'側の第2の配列に相同であり、IgG CH1領域の終結部に直接隣接している相同性アーム、あるいは3'側の第2の配列に相同であり、IgGヒンジ領域の終結部に直接隣接している相同性アームを含むDNA構築物を提供する。40

【0051】

一態様において、(a)IgGにおいて機能性CH1ドメインを欠いているか、またはIgGにおいて機能性CH1ドメインを欠いており、機能性ヒンジ領域を欠いている本明細書に記載の非ヒト動物を免疫化すること、ここで、該マウスでは、機能性CH1ドメインを含むIgMが発現される；(b)該非ヒト動物で抗体が作製されるのに充分な条件下で該非ヒト動物を維持すること；(c)機能性CH1ドメインを欠いているか、または機能性ヒンジ領域を欠いている、該マウスによって作製される抗体を同定すること；および(d)該マウスから該抗体、該抗体が作製される細胞、または該抗体の配列をコードしているヌクレオチド配列を単離することを含む、CH1ドメインを欠いている抗体の作製方法を提供する。50

【0052】

一実施形態において、該非ヒト動物は機能性免疫グロブリン軽鎖の遺伝子の遺伝子座を含む。

【0053】

一態様において、重鎖抗体を作製する遺伝子改変マウスを対象抗原で免疫化すること、該マウスに免疫応答を生じさせること、該マウスのB細胞においてコードされた該マウスのマウスVH領域を同定すること、ここで、該B細胞は該対象抗原に特異的に結合する、および該VH領域をヒト化することを含む、マウス重鎖抗体のヒト化方法を提供する。

【0054】

一実施形態において、重鎖抗体を作製する遺伝子改変マウスは本明細書に記載のマウスである。一実施形態において、該マウスは、インタクトなIgM遺伝子を含み、CH1ドメインを欠いているか、またはCH1ドメインを欠いており、ヒンジドメインを欠いているIgG遺伝子を含む重鎖定常遺伝子座に作動可能に連結された少なくとも1つのmVR遺伝子セグメントを含むものである。一実施形態において、IgG遺伝子はIgG1遺伝子である。一実施形態において、IgG遺伝子は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3およびその組合せから選択される。

10

【0055】

一実施形態において、該方法は、さらに、ヒト化VH領域をコードしているヌクレオチド配列を、ヒト免疫グロブリン定常領域のヌクレオチド配列上にクローニングすることを含む。

20

【0056】

一実施形態において、該マウスマVR遺伝子セグメントは、VH1およびVH14から選択されるマウスマVH遺伝子ファミリーに由来するものであり、ヒト化は、VH1またはVH14のマウスマームワークの、ヒトVH1遺伝子由来フレームワークでの置き換えを含む。一実施形態において、ヒトVH1遺伝子は、1-2、1-3、1-8、1-17、1-18、1-24、1-45、1-46、1-58、および1-69から選択される。具体的な実施形態では、該mVR遺伝子が1-58遺伝子であり、該ヒト遺伝子が1-18遺伝子である；該mVR遺伝子が1-26遺伝子であり、該ヒト遺伝子が1-2遺伝子である；該mVR遺伝子が1-50遺伝子であり、該ヒト遺伝子が1-46遺伝子である；該mVR遺伝子が1-17遺伝子であり、該ヒト遺伝子が1-2遺伝子である；該mVR遺伝子が1-42遺伝子であり、該ヒト遺伝子が1-2遺伝子である；該mVRが14-1遺伝子であり、該ヒト遺伝子が1-2遺伝子である；または該mVRが14-2遺伝子であり、該ヒト遺伝子が1-2遺伝子である。

30

【0057】

一実施形態において、該mVR遺伝子セグメントは、VH4、VH5、VH6、VH7、VH10、VH11およびVH13遺伝子から選択されるマウスマVH遺伝子に由来するものであり、ヒト化は、マウスマームワークの、ヒトVH3遺伝子由来フレームワークでの置き換えを含む。一実施形態において、ヒトVH3遺伝子は、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-16、3-20、3-21、3-23、3-30、3-33、3-35、3-38、3-43、3-48、3-49、3-53、3-64、3-66、3-72、3-73および3-74から選択される。具体的な一実施形態では、該mVR遺伝子が7-1遺伝子であり、該ヒト遺伝子が3-72遺伝子である；該mVR遺伝子が3-6遺伝子であり、該ヒト遺伝子が4-59遺伝子である；該mVR遺伝子が5-6遺伝子であり、該ヒト遺伝子が3-21遺伝子である。

40

【0058】

一実施形態において、該mVR遺伝子セグメントは、VH3およびVH12から選択されるマウスマVH遺伝子ファミリーに由来するものであり、ヒト化は、マウスマームワークの、ヒトVH4遺伝子由来フレームワークでの置き換えを含む。一実施形態において、ヒトVH4遺伝子は、4-4、4-28、4-31、4-34、4-39、4-59および4-61から選択される。

50

【0059】

一実施形態において、該mVR遺伝子セグメントはマウスVH4遺伝子ファミリーに由来するものであり、ヒト化は、マウスVH4フレームワークの、ヒトVH6遺伝子由来フレームワークでの置き換えを含む。一実施形態において、ヒトVH6遺伝子は6-1である。

【0060】

一実施形態において、該mVR遺伝子セグメントはマウスVH9遺伝子ファミリーに由来するものであり、ヒト化は、マウスVH9フレームワークの、ヒトVH7ファミリーのヒトVH遺伝子由来フレームワークでの置き換えを含む。一実施形態において、ヒトVH遺伝子は7-4-1および7-81から選択される。

10

【0061】

一実施形態において、ヒト化は、さらに、マウスCDR内に、該マウスCDRがより密接にヒトCDRに対応するように1つ以上の保存的もしくは非保存的置換、1つ以上の欠失および/または1つ以上の挿入を行なうことを含む。

【0062】

一実施形態において、ヒト化は、さらに、ヒトフレームワーク内に、該ヒトフレームワークがより密接にマウスフレームワークに対応するように、1つ以上の保存的もしくは非保存的置換、1つ以上の欠失および/または1つ以上の挿入を行なうことを含む。

【0063】

一態様において、機能性免疫グロブリン軽鎖遺伝子を含む遺伝子改变マウスを提供し、ここで、該マウスでは、軽鎖を欠いており、CH1領域を欠いているか、またはCH1領域とヒンジ領域を欠いている重鎖抗体が発現される。

20

【0064】

一実施形態において、該マウスは、CH1領域をコードしている配列を欠いているか、またはヒンジとCH1領域をコードしている配列を欠いている免疫グロブリン遺伝子を含むものである。一実施形態において、該配列を欠いている免疫グロブリン遺伝子は1つ以上の重鎖定常遺伝子である。具体的な一実施形態では、該配列を欠いている免疫グロブリン遺伝子は、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3遺伝子から選択される。具体的な一実施形態では、該マウスは、CH1領域、および/またはヒンジ領域、および/またはCH1領域とヒンジ領域を有するIgM遺伝子を含むものである。

30

【0065】

一実施形態において、該抗体は抗原に応答して発現され、該抗体は該抗原に特異的に結合する。

【0066】

一実施形態において、該抗体はマウスVHドメインを含む。具体的な一実施形態では、該マウスVHドメインは、1-26、1-42、1-50、1-58、1-72、3-6、5-6、7-1、14-1および14-2から選択されるマウスVH遺伝子セグメントを含む。

【0067】

一実施形態において、該抗体はヒトVHドメインを含む。具体的な一実施形態では、ヒトVHドメインは、1-2、1-18、1-46、3-21、3-72および4-59から選択されるヒトVH遺伝子セグメントに由来する配列を含む。

40

【0068】

一態様において、本質的に、各々CH1ドメインを欠いている2つのIgG1重鎖からなる結合タンパク質を発現する遺伝子改变マウスを提供し、ここで、該マウスではCH1領域を含むIgMが発現され、該マウスはそのゲノムから、IgG1のCH1ドメインをコードしているヌクレオチド配列を含むmRNAを発現できない。

【0069】

一実施形態において、各々CH1ドメインを欠いている免疫グロブリン重鎖は、本質的に、N末端からC末端に向かって、ヒトまたはマウス重鎖免疫グロブリン可変領域、任意

50

選択でヒンジ領域、マウスCH2領域、およびマウスCH3領域からなる。具体的な一実施形態では、該重鎖免疫グロブリン可変領域はヒト可変領域であり、ヒンジ領域が存在しており、該マウスは機能性免疫グロブリン軽鎖の遺伝子の遺伝子座を含む。

【0070】

一態様において、軽鎖を欠いており、CH1領域を完全に、または一部欠いている重鎖抗体を発現するマウスを提供し、ここで、該マウスでは、B細胞上にB細胞受容体が発現され、その表面上の該B細胞受容体は、免疫グロブリンヒンジ領域に直接融合された、またはCH2領域に直接融合された免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む結合分子をディスプレイする。該結合分子はCH1領域を欠いている。一実施形態において、該結合分子はIgG1のCH2およびCH3領域を含む。

10

【0071】

一態様において、マウスを対象抗原で免疫化すること（ここで、該マウスは、CH1領域をコードしている配列を欠いているIgG遺伝子を含むものであり、該マウスはインタクトなIgM定常領域遺伝子を含む）、該マウスに該対象抗原に対する免疫応答を生じさせること、および該マウスから、該対象抗原を特異的に認識する細胞またはタンパク質を単離すること（ここで、該細胞またはタンパク質は、CH1ドメインを欠いており、同系の軽鎖を欠いており、該対象抗原に特異的に結合する重鎖抗体を含む）を含む、重鎖抗体の作製方法を提供する。

【0072】

一実施形態において、該マウスは、機能性軽鎖遺伝子を含むものである。一実施形態において、該マウスは、、およびその組合せから選択される機能性軽鎖遺伝子を含むものである。

20

【0073】

一実施形態において、該マウスは、マウス重鎖V、D、J遺伝子セグメントの全部または実質的に全部の1つ以上のヒトV、D、J遺伝子セグメントでの置き換えを含むものである。

【0074】

一実施形態において、CH1をコードしている配列を欠いているIgG遺伝子は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3およびその組合せから選択される。

【0075】

一実施形態において、CH1配列を欠いているIgG遺伝子はIgG1であり、該マウスは、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはその組合せをコードしている遺伝子を欠いている。一実施形態では、CH1配列を欠いているIgG遺伝子はIgG2aであり、該マウスは、IgG1、IgG2b、IgG3、またはその組合せをコードしている遺伝子を欠いている。一実施形態では、CH1配列を欠いているIgG遺伝子はIgG2bであり、該マウスは、IgG1、IgG2a、IgG3、またはその組合せをコードしている遺伝子を欠いている。一実施形態では、CH1配列を欠いているIgG遺伝子はIgG3であり、該マウスは、IgG1、IgG2a、IgG2b、またはその組合せをコードしている遺伝子を欠いている。

30

【0076】

一実施形態において、該マウスは、表面上にB細胞受容体を有するB細胞を含むものであり、該B細胞受容体は、対象抗原に結合する再構成重鎖VDJを含み、また、該B細胞受容体は、CH1領域を含むIgMを含み、該IgMは軽鎖を含む。一実施形態において、該軽鎖はVJが再構成されている。具体的な一実施形態では、該軽鎖は、対象抗原に結合する再構成重鎖VDJと同系の軽鎖または軽鎖である。

40

【0077】

一態様において、本発明によるマウスにおいて作製されるマウス重鎖抗体、ヒト重鎖抗体、またはキメラヒトノマウス重鎖抗体を提供する。

【0078】

一態様において、本発明によるマウスにおいて作製される重鎖可変領域ヌクレオチド配

50

列またはその断片を用いて作製されるマウス重鎖抗体、ヒト重鎖抗体、キメラヒト／マウス重鎖抗体、またはヒト化重鎖抗体を提供する。

【0079】

他の実施形態を記載するが、当業者には、以下の詳細説明を検討すると自明となろう。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

生殖系列遺伝子改変を含むマウスであって、該生殖系列遺伝子改変は、IgGのCH1をコードしているヌクレオチド配列の欠失を含み、該マウスは、

CH1ドメインを含むIgMを発現し、

CH1ドメインおよび軽鎖を欠いているIgG抗体を血清中で発現し、かつ

CH1ドメインをコードしている配列を含むIgG mRNAを発現できない、
マウス。

(項目2)

前記CH1をコードしている前記ヌクレオチド配列の前記欠失が、IgG1遺伝子内に存在している、項目1に記載のマウス。

(項目3)

機能性免疫グロブリン軽鎖遺伝子の遺伝子座を含む、項目1に記載のマウス。

(項目4)

軽鎖を欠いている前記IgG抗体が、ヒト可変ドメインと、CH1ドメインを欠いているマウス定常ドメインとを含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目5)

軽鎖を欠いている前記IgG抗体が、マウス可変ドメインと、CH1ドメインを欠いているマウス定常ドメインとを含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目6)

IgG2a遺伝子の欠失を含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目7)

IgG2b遺伝子の欠失を含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目8)

IgG2a遺伝子の欠失およびIgG2b遺伝子の欠失を含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目9)

IgG2a遺伝子の欠失およびIgG2b遺伝子の欠失を含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目10)

1つ以上の内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメントの1つ以上のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目11)

前記1つ以上のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントがヒトVH1ファミリー遺伝子セグメントである、項目10に記載の遺伝子改変マウス。

(項目12)

前記VH1ファミリー遺伝子セグメントが、ヒトVH遺伝子セグメント1-8、1-18、および1-69のFR1、FR2およびFR3遺伝子セグメントと少なくとも90%同一であるFR1、FR2およびFR3領域を含む、項目11に記載の遺伝子改変マウス。

(項目13)

さらに、ヒトD遺伝子セグメントおよびヒトJ遺伝子セグメントを含む、項目11に記載の遺伝子改変マウス。

(項目14)

項目11に記載の遺伝子改変マウスであって、該マウスが、FR4をコードしている再構成免疫グロブリン遺伝子を含み、該FR4が、ヒトD1-7/J4、D3-16/J6

10

20

30

40

50

、D 4 - 4 / J 4、D 6 - 6 / J 4、D 6 - 6 / J 2、D 6 - 7 / J 4、またはD 6 - 19 / J 6 によってコードされたF R 4と少なくとも90%同一である、遺伝子改変マウス。

(項目15)

1つ以上の内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメントの1つ以上のラクダ化ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含む、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目16)

マウスにおいて体細胞変異重鎖抗体を作製するための方法であって、該方法は、

a. マウスを抗原で免疫化する工程であって、ここで、該マウスは、再構成されていないヒトまたはマウス重鎖免疫グロブリンの可変領域遺伝子セグメントを含み、機能性IgG C H 1ドメインをコードする少なくとも1つの対立遺伝子のヌクレオチド配列を欠いており、かつC H 1ドメインを含むIgMを発現する、工程；

b. 該マウスを、該抗原に対する免疫応答が起こるのに充分な条件下で維持する工程；および

c. 該マウスから体細胞変異重鎖抗体を単離する工程であって、ここで、該体細胞変異重鎖抗体は、該ヒトまたはマウス重鎖免疫グロブリンの可変領域遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含み、かつ該抗原に特異的に結合する、工程を含む、方法。

(項目17)

V、DおよびJ遺伝子セグメントの全部または実質的に全部の1つ以上のヒトV、ヒトDおよびヒトJ遺伝子セグメントでの置き換えを含む遺伝子改変マウスであって、該1つ以上のヒトV、DおよびJ遺伝子セグメントは、内因性マウス遺伝子座でマウス重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座に作動可能に連結されており、該マウス重鎖定常領域遺伝子の遺伝子座は、完全長IgM遺伝子、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3およびその組合せから選択されるIgG遺伝子内のC H 1ドメインをコードしているヌクレオチド配列内に欠失を含むIgG遺伝子を含み、該マウスは、C H 1領域を有するIgMを含むB細胞受容体を発現し、該IgMは、同系の または 軽鎖と会合している重鎖を含む、遺伝子改変マウス。

(項目18)

前記1つ以上のヒトV、DおよびJ遺伝子セグメントが、V H 1、V H 3、V H 4およびその組合せから選択される可変領域ファミリー由来のヒト遺伝子セグメントを含む、項目17に記載の遺伝子改変マウス。

(項目19)

前記1つ以上のヒト遺伝子セグメントが、1-2、1-8、1-18、1-46、1-69、3-21、3-72、4-59およびその組合せから選択される、項目18に記載の遺伝子改変マウス。

(項目20)

前記1つ以上のヒトV、DおよびJ遺伝子セグメントが、D 1 - 7、D 3 - 16、D 4 - 4、D 6 - 6、D 6 - 7、D 6 - 19、J 2、J 3、J 4およびその組合せを含む、項目18に記載の遺伝子改変マウス。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、マウスの野生型IgG1遺伝子座(IgG1, 上部)(C H 1遺伝子セグメントと融合されたJ H領域遺伝子セグメント、続いて、ヒンジ領域、C H 2遺伝子セグメント、およびC H 3遺伝子セグメントを示す)；C H 1ドメインが欠失している構築物で標的化されるIgG1遺伝子座(IgG1 C H 1, 中央)；ならびにC H 1ドメインとヒンジ領域の両方が欠失している構築物で標的化されるIgG1遺伝子座(IgG1 C H 1 - ヒンジ, 下部)を示す。

【図2】図2は、C H 1ドメインを欠いているIgG1が発現される遺伝子改変された遺伝子座を作製するためのマウスIgG1遺伝子の標的化を示す。

10

20

30

40

50

【図3】図3は、CH1ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いているIgG1が発現される遺伝子改変された遺伝子座を作製するためのマウスIgG1遺伝子の標的化を示す。

【図4】図4は、CH1ドメインを欠いているIgG1が発現され、IgG2bまたはIgG2aは発現されない遺伝子改変された遺伝子座を作製するためのマウス重鎖定常領域遺伝子座の標的化を示す。

【図5】図5は、CH1ドメインが欠失しており、ヒンジ領域が欠失しており、IgG2b遺伝子とIgG2a遺伝子が欠失している構築物で標的化されるマウス重鎖定常領域を示す。

【図6】図6は、CH1ドメインを欠いているか、またはCH1ドメインとヒンジ領域を欠いているIgG1を有する遺伝子改変マウスの重鎖定常領域（上部）、およびCH1ドメインを欠いているか、またはCH1ドメインとヒンジ領域を欠いているIgG1を有し、また、IgG2a遺伝子を欠いており、IgG2b遺伝子を欠いている遺伝子改変マウスの重鎖定常領域（下部）を示す。

【図7】図7は、独立して、対照（マウスFcとのサイトカインエクトドメイン融合体）、CH1ドメインを欠いているキメラ（ヒトVR）/（マウスFc）重鎖抗体（hVR-mFc CH1）、CH1ドメインを欠いているラクダ化キメラ（ヒトVR）/（マウスFc）重鎖抗体（hVR^{*}-mFc CH1）、キメラ（ヒトVR）/（マウスFc）重鎖抗体（hVR-mFc）、ラクダ化キメラ（ヒトVR）/（マウスFc）重鎖抗体（hVR^{*}-mFc）CH1ドメインを有するmFc (mFc) またはCH1ドメインを有しないmFc (mFc CH1)を発現するように操作されたCHO細胞由来のCHO細胞上清みのウエスタンプロットを示す。

【図8】図8は、野生型マウス（左）およびIgG1のCH1ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いている（ヘテロ接合性）遺伝子改変マウス（右）由来のマウス血清の還元SDS-PAGEのウエスタンプロットの画像を示す（抗マウスIgGを用いてプロット）；該重鎖の模式図も示しており、これらは分子量マーカー位置としてのものである。

【図9】図9は、野生型マウス（WT）およびIgG1のCH1ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いている4匹の遺伝子改変マウス（ホモ接合性；それぞれ、HO 1、HO 2、HO 3、HO 4と表記）由来のマウス血清の非還元SDS-PAGEからのウエスタンプロットの画像を示す（抗マウスIgGを用いてプロット）；各マウス（WTまたはHO）を2つのレーンで表示し、各動物について血清の1：5および1：10の希釈物に対応するレーンの上部に角括弧を示している（各々、左から右に連続するレーン）。

【図10】図10は、正常なIgG1抗体（左）およびCH1ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いている重鎖抗体の模式図を示す。

【図11】図11は、野生型マウス（WT）およびCH1ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いているIgG1を含む遺伝子改変マウス（HO；CH1ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いている重鎖抗体が発現されるホモ接合性マウス）のIgG1およびIgG2bの別々の血清免疫グロブリンアッセイを示す。対照はプールされたヒト血清である。

【図12】図12は、IgG1のCH1とヒンジ領域配列が欠如している改変内因性マウス重鎖の遺伝子座に、マウス重鎖遺伝子配列を有するマウスの脾細胞（splenocyte）のRNAから增幅させた11個の独立したRT-PCRクローニングのタンパク質の配列を示す。B1=配列番号：19；B2=配列番号：21；B3=配列番号：23；B5=配列番号：25；D2=配列番号：27；D5=配列番号：29；D6=配列番号：31；E2=配列番号：33；E8=配列番号：35；E10=配列番号：37；F6=配列番号：39。小文字の塩基は、組換えの間の変異および/またはN付加のいずれかにより生じた非生殖系列の塩基を示す。点は、フレームワーク（FR）および相補性決定領域（CDR）（配列の上部に表記）の適正なアラインメントのための配列内の人為的ギャップを表す。内因性IgG1のCH2領域（CH2）である定常領域由来の最初の9個のア

10

20

30

40

50

ミノ酸を各クローンについて示す。

【図13】図13は、IgG1 CH1領域配列が欠如している改変内因性マウス重鎖の遺伝子座にヒト重鎖遺伝子配列を有するマウスの脾細胞のRNAから増幅させた7つの独立したRT-PCRクローンのタンパク質の配列を示す。A8=配列番号：51；C2=配列番号：53；D9=配列番号：55；C4=配列番号：57；H8=配列番号：59；A5=配列番号：61；A2=配列番号：63。小文字の塩基は、組換え時の変異および/またはN付加のいずれかにより生じた非生殖系列の塩基を示す。点は、フレームワーク(FR)および相補性決定領域(CDR)(配列の上部に表記)の適正なアラインメントのための配列内の人為的ギャップを表す。13個のアミノ酸の内因性IgG1のヒンジ領域(HINGE)である定常領域の最初の7個のアミノ酸を各クローンについて示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0081】

詳細説明

本発明は記載の特定の方法および実験条件に限定されず、したがって、方法および条件は種々であり得る。本明細書で用いる専門用語は、特定の実施形態を説明する目的のためにすぎず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定を意図するものでない。

【0082】

特に定義していない限り、本明細書で用いる科学技術用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または等価な任意の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、特定の方法および材料を以下に記載する。本明細書において挙げた刊行物はすべて、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0083】

CH1ドメインおよび抗体の生成

CH1ドメインを欠いている抗体、例えば、重鎖抗体、すなわち、軽鎖を欠いている抗体を作製する遺伝子改変された非ヒト動物を提供する。該遺伝子改変された非ヒト動物は、機能性免疫グロブリン重鎖ドメイン(CH1ドメイン)、例えば、IgG1 CH1ドメインの欠如を含む遺伝子改変を含むものであり、一部の実施形態では、機能性CH1ドメインを欠いている該免疫グロブリン重鎖においてヒンジ領域の欠失を含むさらなる改変を含むものであり、該非ヒト動物は機能性IgMを発現する。他の改変としては、IgG1およびIgM以外のアイソタイプを非機能性にすること、例えば、IgD、IgG3、IgG2a、IgG2b、IgAおよびIgEに対して遺伝子における欠失、または遺伝子の欠失を行なうことが挙げられる。また、遺伝子改変された非ヒト胚、細胞、ならびに非ヒト動物、非ヒト胚および細胞を作製するための標的化構築物も提供する。

30

【0084】

重鎖抗体(すなわち、軽鎖を欠いている抗体)を作製し得る遺伝子改変細胞を作製する取組みでは、他の種、例えば、ラクダ類および特定の魚類における重鎖抗体の模倣に重点が置かれている。このアプローチは、マウスES細胞を遺伝子改変してIgMおよびIgGの免疫グロブリン定常領域遺伝子においてCH1ドメインを欠失させるため、また、ラクダ類またはラクダ化ES細胞に重鎖可変領域(すなわち、VHHまたはVHH様)を導入するために使用されている。IgMおよびIgG CH1ドメインの欠失は、おそらく、遺伝子改変された遺伝子座からのラクダ化抗体の形成と競合する内因性の天然抗体の形成を抑制するために行なわれる。VHH遺伝子セグメントの付加は、おそらく、CH1欠失との組合せで重鎖抗体の形成を模倣させるために行なわれる。かかる動物由来の重鎖抗体はVHH遺伝子セグメントを含む。インビトロ試験により、非ラクダ類VHドメインは、CH1ドメインを欠いている重鎖内に存在している場合では、発現可能な重鎖抗体を必ずしも満足に形成しないことが示されているため、VHH遺伝子セグメントは、おそらく、重鎖抗体の適正な発現に必要であると考えられている。

40

【0085】

50

しかしながら、ラクダ類（および一部の軟骨魚類）では、C H 1 ドメインまたはC H 1 様ドメインを含む遺伝子が存在している。C H 1 ドメインを欠いているV H H 含有抗体は、R N A のスプライシングによって、またはC H 1 領域をコードしているであろうD N A 配列の再構成によって生じると考えられている。したがって、ラクダ類であっても、C H 1 領域をコードしているD N A 配列は保持される。ヒトは（ある状況下において）、C H 1 領域を完全に、または一部欠いている重鎖抗体を作製することがあり得るため（例えば、ヒト重鎖病において）、一連の所与の状況下において、非ラクダ類（マウスなど）においてC H 1 領域を欠いている重鎖が形成されるようにすることが可能であり得る。このアプローチは、C H の生殖系列構造の破壊に依存するのではなく、動物の軽鎖の遺伝子座を非機能性にすることに依存するものである。このアプローチでは、非機能性の軽鎖の遺伝子座があると、発現に同系の軽鎖を必要とする重鎖（例えば、C H 1 領域を有する完全長重鎖）は、または軽鎖いすれかを欠くため作製されず、そのため、軽鎖なしで発現および分泌され得る重鎖（すなわち、C H 1 領域を欠いている重鎖）のみが発現および分泌されると仮定している。該アプローチは、再構成されて機能性軽鎖遺伝子が形成され得る機能性 または 遺伝子セグメントがないこと、およびなんら機能性の再構成軽鎖遺伝子がないことに依存するものであり、したがって、両方の生殖系列軽鎖の遺伝子座の機能性を破壊するために遺伝子操作（例えば、ノックアウト）が必要とされる。該アプローチは「天然の」プロセスに依存するものであるため内因性C H 1 ヌクレオチド配列の使用が不要となり、C H 1 サイレンシングの「天然の」プロセスはクラススイッチにおいて起こるものである。機能性軽鎖遺伝子を含む動物ではいすれも、かかるプロセスの使用の可能性は全くないようである。さらに、「天然の」プロセスには、大量の正常なR N A（すなわち、C H 1 領域をコードしている領域を含むR N A）の合成が含まれることは明らかである。
10

【0086】

免疫グロブリンC H 1 ドメイン（および任意選択でヒンジ領域）を欠いている抗体、例えば重鎖抗体、および例えば、V H ドメイン（例えば、マウスまたはヒトV H ドメイン）を含む抗体を作製するマウスを作製するための組成物および方法を提供する。該方法は、内因性非I g M C H 1 領域を選択的に非機能性にすること（例えば、C H 1 ドメインの配列の欠失により）、および再構成されていない内因性マウス可変領域（m V R）遺伝子セグメントまたは再構成されていないヒト可変領域（h V R）遺伝子セグメントのいすれかを内因性マウス可変領域遺伝子座において使用し、マウスにおいてキメラヒト／マウス抗体を作製することを含む。C H 1 ドメインの欠失は1つ以上のI g G 遺伝子において行なわれるが、I g M 遺伝子には行なわない。該アプローチでは、1つ以上のI g G C H 1 ドメインを選択的に非機能性にするが、機能性I g Mはそのままにしておく。1つ以上のI g G C H 1 ドメインの欠失に加え、さらなる実施形態は、C H 1 ドメインが欠失されているか、または非機能性にされたI g G（1つまたは複数）のヒンジ領域の欠失、または該領域を非機能性にすることを提供する。
20

【0087】

遺伝子改変された非ヒト動物のすべてのI g アイソタイプが非機能性C H 1 またはC H 1 ドメイン（および任意選択でヒンジ）の欠失を示すとは限らないため、I g G C H 1 欠失アプローチでは、動物における天然のB 細胞発生における比較的保存的な破壊が使用される。したがって、C H 1 改変はI g M 分子では起こらず、したがって、機能性C H 1 を有するI g M に依存するB 細胞発生の初期の段階に影響を及ぼさない。I g M は改変されないため、I g G のC H 1 ドメイン（および任意選択でI g G のヒンジ領域）の1つ以上の欠失を有するが、I g M のC H 1 ドメインは有しない動物では、I g G の状況の可変ドメインの提示前に、クローン選択段階において、可変領域の満足できる大量のレパートリーがプロセッシングされ得るはずである。したがって、種々の実施形態において、重鎖抗体における使用に利用可能な多様な可変領域に対する遺伝子改変（1つまたは複数）の有害な影響（あれば）によって、I g G に関連する選択に利用可能な可変領域のプールは、マイナスの影響を受けないはずである。さらに、生殖系列において非機能性にする（例
30
40
50

えば、欠失される) C H 1 配列が I g G 1 である場合、マウスは、C H 1 ドメインをコードする R N A の作製能を欠いている。

【 0 0 8 8 】

非ヒト動物を遺伝子改変して 1 つ以上の I g G アイソタイプの C H 1 ドメインまたは C H 1 ドメインとヒンジ領域を非機能性にすると、V H 領域の完全なまたは実質的に完全なレパートリーから、重鎖抗体において発現する適當な V H 領域を選択し得るマウスがもたらされ得る。I g G アイソタイプを選択的に改変すると(I g M はしない)、C H 1 ドメインを欠くため、または I g M の C H 1 ドメインを欠くため、選択に残る V H 領域の数が減少する可能性が回避される。したがって、V H 領域のより完全なレパートリーが、I g G (C H 1 ドメインを欠いているか、または C H 1 ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いている)の状況で選択に利用可能になる。したがって、本発明による遺伝子改変マウスにおける V H ドメインの選択は、例えば、I g M 構造の改変によるものである初期の I g M 依存性 B 細胞発生のハードルの克服が、どの V H ドメインによって補助され得るかに依存するものでない。そうではなく、初期の I g M 依存性段階は通常どおりに起こるはずであり、C H 1 ドメインを欠いているか、または C H 1 ドメインを欠いており、ヒンジ領域を欠いている I g G の状況で発現するための好適性に関する選択に利用可能な重鎖の大きなレパートリーがもたらされる。10

【 0 0 8 9 】

したがって、種々の実施形態において、本発明による遺伝子改変マウスでは機能性 I g M の発現が維持されるはずであり、これにより、より自然なクローニング選択プロセスの機会がもたらされるはずである。例えば、機能性 I g M (例えば、C H 1 ドメインを欠いていない I g M) がある場合、サロゲート軽鎖と同系の軽鎖の両方が I g M の C H 1 ドメインを介して結合することができ、初期の B 細胞発生における選択プロセスに関与することができる。本発明による遺伝子改変マウスでは、I g G アイソタイプへのクラススイッチが最初の選択段階であり、ここでは、機能性 C H 1 ドメインを欠いているか、または機能性 C H 1 ドメインと機能性ヒンジを欠いている定常ドメインの状況で発現され得る重鎖可変ドメインの任意の選択がみられると考えられる。20

【 0 0 9 0 】

B 細胞発生における I g M

ラクダ類、特定の魚類および病的状態における観察結果により、ある状況下では、同系の軽鎖の非存在下において、重鎖定常領域の C H 1 ドメインを欠いている抗体が発現され得ることが示されているが、抗体産生 B 細胞の正常な発生には、一般的に C H 1 ドメインの存在が必要とされる。I g M を含む重鎖アイソタイプにはすべて C H 1 ドメインが含まれている。サロゲート軽鎖および同系の軽鎖はともに、I g M の状況の重鎖の C H 1 ドメインを介して所与の重鎖と相互作用すると考えられる。重鎖抗体の発生が構造の完全性または I g M アイソタイプ重鎖の機能性に依存する範囲では、I g M の構造の完全性または機能の破壊は望ましくないであろう。30

【 0 0 9 1 】

抗体の正常な発生には、抗体が、機能性で有用な抗体の残存および最終的な発現をもたらす数多くの複雑な選択スキームを経て残存することが必要とされる。抗体構造の破壊は、該構造破壊によって抗体が 1 つ以上の自然な抗体選択スキームの充足に対して有効に競合して進化する能力の消失がもたらされる程度まで、抗体の残存および最終的な発現に有害であると示されることがあり得る。40

【 0 0 9 2 】

抗体発生の初期では、抗体重鎖は、さまざまな選択スキームを経て自然選択により適当な重鎖がさらなる選択を受けて最終的に機能性の親和性成熟抗体が形成される選択プロセスを受ける。前駆 B 細胞(またはプロ B 細胞)内で組換えを受けた重鎖遺伝子セグメントから発現された抗体重鎖は、正常に、I g M アイソタイプにおいて、プロ B 細胞の表面上への提示のためにサロゲート軽鎖と対を形成し、プレ B 細胞受容体またはプレ B C R と称される構造(これは、他の共受容体を含む)を形成する。プレ B C R が該細胞表面上に提50

示されたら、プレB C Rは、その複合体の適切な形成を該細胞にシグナル伝達し、該細胞に対して、重鎖がこの初期の選択段階を通過したことを有効に指示すると考えられる。したがって、該細胞には、重鎖がさらなる選択を受けるかもしれないことが情報伝達される。重鎖が、IgMおよびサロゲート軽鎖の状況において提示された場合にプレB C Rの形成に有害な欠陥を含む場合、該細胞はアポトーシスを受ける。該細胞がアポトーシスを受けると、重鎖の重鎖可変領域の有用性、または多様性に対する寄与が失われる。したがって、抗体選択の非常に初期の段階では、IgMアイソタイプの状況で重鎖とともにサロゲート軽鎖の提示が必要とされる。サロゲート軽鎖はIgMと、少なくとも一部においてIgMのCH1ドメインを介して相互作用すると考えられる。この初期の接合部（例えば、非機能性CH1ドメイン）における抗体構造の機能不全または破壊により、クローニング選択機能不全、重鎖を発現するプロB細胞の減少、および有用な抗体において特定の重鎖可変ドメインが使用される可能の低下がもたらされ得る。10

【0093】

プレB C Rを有する細胞がこの選択段階を経たら、次の選択段階で、重鎖は同系の軽鎖と対合することが必要とされる（例えば、マウスおよびヒトの または のいずれか）。対合した重鎖 / 同系の軽鎖構造は、細胞、ここでは、IgMのCH1ドメインを通して IgMアイソタイプの状況において、ナイーブなプレB細胞の表面上に再度提示される。この表面上の複合体により、機能性の膜結合型B細胞受容体（BCR）がもたらされる。このBCRは、細胞に、該重鎖がさらなる選択に適していること、および該細胞は、今度は、この特定の軽鎖を発現するように拘束され得、さらなるB細胞成熟段階（例えば、親和性成熟およびクラススイッチ）に進み得ることをシグナル伝達すると考えられる。重鎖が、IgMおよびその同系の軽鎖の状況で提示された場合にBCRの形成に対して有害な欠陥を含む場合、該細胞はアポトーシスを受ける。該細胞がアポトーシスを受けると、該重鎖の重鎖可変領域の有用性または多様性に対する寄与が失われる。したがって、抗体選択の非常に初期の段階では、重鎖とともにIgMアイソタイプの状況のサロゲート軽鎖の提示が必要とされる。この場合も、この初期の接合部の抗体構造（例えば、非機能性CH1ドメイン）の欠損または破壊により、クローニング選択の失敗および該重鎖を発現するプレB細胞の付随的な減少がもたらされることがあり得る。20

【0094】

ここまで選択に残ったら、IgMの状況においてその同系の軽鎖と対合している該重鎖を提示しているプレB細胞は、次いで成熟プロセスを受け、該プロセスにより、最終的にクラススイッチ、および該重鎖と同系の軽鎖がIgGアイソタイプの状況でB細胞表面上に提示されるさらなる選択機構がもたらされる。CH1ドメインを欠いている、またはCH1ドメインとヒンジ領域を欠いているIgG重鎖の選択（あれば）が起こっているとしたら、この段階かもしれない。本発明による動物では、重鎖可変領域の通常のレパートリーが、可変ドメインが残ってCH1ドメインを欠いているか、またはCH1ドメインとヒンジ領域を欠いているIgG重鎖に発現され得るかどうかに基づいた選択に利用可能であり得ると考えられる。対照的に、IgMが障害されたマウスは、障害IgMの状況で選択に残り得る可変領域のみがクラススイッチに利用可能となり得るため、おそらく、重鎖可変領域の完全なレパートリーを提示しない。30

【0095】

したがって、機能性IgMを欠いている動物では、そうでない場合は適当な重鎖可変遺伝子セグメントの再構成後にB細胞集団を作製する能力の著しい低下が起こり得る。かかる場合では、豊富な供給量の重鎖可変領域が利用可能である（すなわち、動物は再構成され得る適当な数の重鎖可変領域遺伝子セグメントを有する）場合であっても、選択プロセス中の該重鎖の残存を抑制するIgMの欠陥のため、望ましい度合の多様性を示す満足なB細胞集団が形成されないことがあり得る。40

【0096】

機能性IgM遺伝子での重鎖抗体の生成

対象免疫原で非ヒト動物を免疫化することによる抗体の作製に充分な多様性をもたらす50

ために、B細胞発生中に提示されたときにIgMの状況で有効に選択に残り得る適當な数の再構成された重鎖可変領域が維持されていることが望ましい。したがって、免疫グロブリン重鎖に非機能性CH1ドメインまたは非機能性CH1ドメインと非機能性ヒンジ領域を含む遺伝子改変された非ヒト動物は、両方のIgM対立遺伝子にCH1欠失を含むべきではない。

【0097】

一部の実施形態では、遺伝子改変された動物において重鎖抗体を作製するためにするすべてのIgAアイソタイプのCH1ドメインを欠失させることは望ましくない。したがって、IgGのCH1ドメインまたはその断片をコードしているヌクレオチド配列を無効にする、欠失させる、あるいは非機能性にする（一部の実施形態では、IgGのヒンジ領域も無効にする、欠失させる、あるいは非機能性にする）が、他のアイソタイプ（例えば、IgM）では機能性CH1ドメインが保持されるようにすることにより、遺伝子改変された非ヒト動物において重鎖抗体を作製するための方法および組成物を提供する。他のアイソタイプのCH1ドメイン（選択された1つ以上のIgG CH1ドメイン以外）の機能性により、重鎖可変ドメインが非IgGアイソタイプの状況（例えば、IgMアイソタイプ）で提示される発生段階が破壊されない、または実質的に破壊されないB細胞発生プロセスがもたらされると考えられる。したがって、例えば、B細胞発生中でのIgM依存性段階の破壊は比較的小限になる。本発明（これは特許請求の範囲に記載）に関して制限するものでないが、本発明者らは、IgMの状況の重鎖可変ドメインの提示と関連している初期の選択段階の破壊を最小限にすると、残ってIgGアイソタイプへのクラススイッチを受け、機能性CH1ドメインを欠いている、または機能性CH1ドメインを欠いており、機能性ヒンジ領域を欠いているIgGの状況での選択を受ける重鎖可変領域を有する細胞がより多くもたらされることを提案する。

10

【0098】

したがって、遺伝子改変された非ヒト動物を、該動物を作製するための方法および組成物とともに提供し、ここで、該遺伝子改変により、IgMドメインでないIgドメインにおいて機能性CH1ドメインを欠くことになる（さらなる実施形態では機能性ヒンジ領域を欠くことになる）。種々の実施形態において、CH1またはCH1とヒンジ領域（あるいはその実質的に機能性の部分）をコードしている配列が遺伝子改変された動物のゲノムにおいて欠失している。遺伝子改変された非ヒト動物は、重鎖抗体（すなわち、軽鎖を欠いている抗体）、例えば、完全ヒト抗体（ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むように遺伝子改変されたマウスにおいて）ならびにキメラヒト／マウス抗体（例えば、ヒト可変領域遺伝子セグメント、D領域およびJ領域を含むように遺伝子改変されたマウスにおいて、あるいは機能性CH1ドメインを欠いているか、または機能性CH1ドメインを欠いており、機能性ヒンジ領域を欠いている遺伝子改変IgGアイソタイプにトランススイッチされ得るヒト導入遺伝子を有するマウスにおいて）の作製において有用である。

20

【0099】

重鎖抗体

抗体はヒト治療薬として有用である。また、重鎖抗体、すなわち、軽鎖を欠いている抗体もヒト治療薬として有用である。重鎖抗体は軽鎖を欠いているため小型になり、したがって、軽鎖を含む抗体よりも良好な組織浸透を示すが、従来の抗体と比較すると類似した、またはより有利な薬物動態プロフィールを有し、類似したエフェクター機能が保持されていることが予測される。また、重鎖抗体は小型になるため、所与の容量でより高い用量での投与が可能になる。よく使用される抗体投与方法は皮下注射であり、所与の投薬量の抗体に対する投与容量の低減により、患者に有益性がもたらされ、大容量の皮下注射による合併症および痛みが回避され得る。

30

【0100】

重鎖抗体の別の利点は、单一の治療薬において、2種類の異なるエピトープに対する特異性を有する重鎖をヘテロ二量体化することにより二重特異性抗体を作製できることである。重鎖抗体は軽鎖を欠いていることから、いずれかの重鎖の結合親和性または特異性を

40

50

妨げないだけでなく、二重特異性抗体の適当な発現を可能にし得る共通する軽鎖を操作する必要がないため、二重特異性抗体の作製に特に適している。

【0101】

本発明の遺伝子改変された動物を用いて多種多様な重鎖抗体が作製され得る。本明細書に記載の遺伝子改変は、例えば、任意の適当なマウス系統において行なわれ得る。マウス系統は、選択される重鎖抗体の作製に適した任意の遺伝的背景を有するものであり得る。具体的な実施形態が包含される数例の遺伝的背景を以下に示す。

【0102】

遺伝子改変された動物は、本発明に従う遺伝子改変と、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子座と置き換えた1つ以上の再構成されていないヒト可変領域遺伝子セグメント、1つ以上の再構成されていないD領域遺伝子セグメント、および1つ以上の再構成されていないJ領域遺伝子セグメントとを含むマウスであり得る。かかるマウスでは、ヒト化可変領域遺伝子座が、内因性マウス定常ドメイン配列の上流に再構成された可変領域遺伝子が形成されるように組み換えられ得る（この場合、該免疫グロブリン定常領域遺伝子の1つ以上が本明細書に記載のようにして改変される）。したがって、該マウスではキメラヒト可変／マウス定常重鎖抗体が作製され得る。対象免疫原に曝露されると、該マウスでは、親和性成熟し、該対象免疫原のエピトープに特異的に結合し得る本発明による重鎖抗体が生成され得る。

【0103】

遺伝子改変された動物は、再構成されていない内因性マウス可変領域遺伝子セグメント、再構成されていない内因性マウスD領域遺伝子セグメント、および再構成されていない内因性マウスJ領域遺伝子セグメントを含む内因性マウス可変領域を含むマウスであってもよく、ここで、該マウスは、本明細書に記載のマウス重鎖定常領域の遺伝子改変を含むものである。したがって、該マウスではマウス重鎖抗体が作製され得る。対象免疫原に曝露されると、該マウスでは、親和性成熟し、該対象免疫原のエピトープに特異的に結合し得る本発明による重鎖抗体が生成され得る。

【0104】

遺伝子改変された動物は、再構成されていないヒト可変領域遺伝子セグメント、再構成されていないヒトD遺伝子セグメント、および再構成されていないヒトJ遺伝子セグメント、ミュー遺伝子、ならびにトランススイッチを可能にする配列を含むヒト導入遺伝子を含むマウスであってもよい。該マウスは、さらに、本明細書に記載のマウス重鎖定常領域の改変を含むものであってもよい。したがって、該マウスでは、完全ヒトIgM抗体、およびトランススイッチによりキメラヒト可変／マウス定常抗体が作製され得、ここで、該定常ドメインは、本明細書に記載の遺伝子改変を含む。対象免疫原に曝露されると、該マウスでは、親和性成熟し、該対象免疫原のエピトープに特異的に結合し得る本発明による重鎖抗体が生成され得る。

【0105】

重鎖抗体のインビトロ発現

本発明者らは、通常のヒトまたはマウス重鎖可変領域（hVRまたはmVR）が、機能性CH1ドメインを欠いているIgGの状況のインビトロ系において発現され得ることを確立した。本発明者らは、野生型マウスIgMを有するマウスの再構成されていないhVRミニ遺伝子座からhVRを発現させた。発現されたhVRはCH1ドメインを欠いているIgG2b上にクローニングされ（その結果、hVR-IgG2b-CH1が発現される）、hVR-IgG2b-CH1構築物で一過的にトランスフェクトしたCHO細胞によって分泌され、野生型IgMを有するマウスにおいて選択されたhVRは、機能性CH1ドメインを欠いているIgGにスイッチされると、すなわち、重鎖抗体として細胞によって発現され分泌され得ることが有効に確立された。

【0106】

本発明者らは、CH1ドメインを欠いており、hVRまたはヒトラクダ化VR（hVR*）を有する重鎖をCHO細胞において発現させるためのインビトロ系を構築した。VR

10

20

30

40

50

は、内因性マウス重鎖の遺伝子座のヒト重鎖可変領域ミニ遺伝子座（3つのヒトV領域遺伝子セグメント6-1、1-2および1-3、すべてのヒトD H遺伝子セグメント、ならびにすべてのヒトJ H遺伝子セグメントを有する）での置き換えを含むR A Gマウスから得た。内因性マウス免疫グロブリンの および 軽鎖の遺伝子座はインタクトで機能性であった。

【0107】

キメラ重鎖（h V R - m F c）およびラクダ化重鎖（h V R * - m F c）の構築物を、C H O細胞内での発現のために、上記のミニ遺伝子座を有するマウスから得たV R配列を用いて作製した。キメラ重鎖は、キメラ重鎖（h V R - m F c）とマウス軽鎖を含む機能性抗体が形成される該マウスにおけるB細胞発生中の通常のV - D - J組換えの産物であった。h V R - m F c および h V R * - m F c の構築物は、C H 1ドメインを有するものとC H 1ドメインを欠いているものの両方を作製した。10

【0108】

C H O細胞内でのh V R - m F c およびh c V R - m F c の構築物の一過性トランスフェクションにより、C H 1ドメインがないと、h V R およびh V R * を有する重鎖が発現され、上清み中で可溶性のままであることが示された。C H 1ドメインが存在する場合は、h V R またはh V R * のいずれかを含む重鎖は上清み中に発現されなかった。この観察結果により、かかる重鎖抗体は、C H 1ドメインを欠いている重鎖抗体においてラクダ類V H Hドメインを使用することなく、例えば、ヒトまたはマウスV Hドメインを用いて作製され得ることが示唆された。20

【0109】

ヒト化重鎖抗体

本発明の重鎖抗体のヒト化型を生成させるためには、該改変についてホモ接合性である動物を抗原で免疫化し、動物の特異的免疫応答が確立されたら、該免疫化動物の脾臓の細胞を適当な不死細胞（例えば、骨髄腫細胞）と融合させてハイブリドーマ細胞を得る。あるいはまた、該免疫化動物のB細胞から直接抗体を得てもよい。ハイブリドーマ細胞（または例えば、単離したB細胞）由来の上清みを、酵素免疫測定法（E L I S A）によって抗体の存在についてスクリーニングし、抗原に特異的な抗体が所望の特徴に基づいて選択され得る。30

【0110】

重鎖可変領域（V H）核酸はハイブリドーマおよび／またはB細胞から、当該技術分野において知られた標準的な分子生物学的手法を用いて単離され得る（Sambrookら 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubelら 1995. Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, Wiley & Sons）。V H核酸配列が決定されたら、推定アミノ酸配列を得、他のヒトV H配列と比較し、類似した配列を有する一群の関連するV H配列を同定することができる。関連するV H配列は、当業者に利用可能な抗体データベース、例えば、The International ImmunoGenetics Information System(登録商標) (IMGT(登録商標))を用いて得ることができる。この比較は、目によって、あるいはまた電子的にアラインメントプログラム（例えば、CLUSTAL）の使用によってのいずれかでなされる配列のアラインメントによって行なわれ得る。この比較において、相補性決定領域（CDR）とフレームワーク領域（FR）が特定される。CDRおよびFR残基は、標準的な配列規定（例えば、Kabatら 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md.; ChothiaおよびLesk, 1987. J. Mol. Biol. 196: 901-917）に従って決定される。当業者には、場合によっては免疫グロブリン重鎖のCDR領域およびFR領域の配列の番号付けおよび決定の方法に不一致が存在することがあり得ることは認識されよう。かかる場合では、構4050

造による定義が好ましいが、配列定義法によって同定される残基を、重鎖配列の比較に基づいてどのフレームワーク残基を置き換えるかを決定するのに重要な F R 残基とみなす。

【 0 1 1 1 】

アラインメントされたら、V H 配列内の置換可能な位置を特定する。単離された V H 配列内のある位置のアミノ酸の正体がその他のヒト V H 配列と比較したときに異なる場合、該位置を、単離された V H 配列の該位置での置換の好適性について評価する。したがって、単離された V H 配列において、比較対象のその他の関連ヒト V H 配列（1つまたは複数）と異なる任意の位置が、その他の関連ヒト V H 配列の1つまたはいずれかに見られる対応する位置のアミノ酸と置換され得る位置として潜在的に役立ち得る。他の関連ヒト V H 配列と同一性を共有する位置、すなわち、可変性が示されない位置は、置換可能でない位置と判定される。種々の実施形態において、上記の方法を用いてコンセンサスヒト重鎖抗体配列が得られる。

【 0 1 1 2 】

本明細書に記載の目的のためのヒト化重鎖抗体は、所定の抗原に対する結合能を有し、ヒト F R アミノ酸配列と比べて実質的に類似したまたは同一のアミノ酸配列を有する F R 領域と、非ヒト C D R アミノ酸配列と実質的に類似したまたは同一のアミノ酸配列を有する C D R を含む免疫グロブリン重鎖のアミノ酸配列バリエントまたはその断片である。一般に、ヒト化重鎖抗体は、非ヒト供給源に由来する1つ以上のアミノ酸残基を有する。かかる残基は、典型的には重鎖可変ドメイン由来のものである。さらに、このような残基は、関連する特徴、例えば、親和性および／または特異性ならびに抗体機能と関連している他の望ましい生物学的活性などを有するものであり得る。

【 0 1 1 3 】

種々の実施形態において、ヒト化重鎖抗体は、C D R 領域の全部または実質的に全部が非ヒト V H ドメインのものに対応し、F R 領域の全部または実質的に全部がヒト V H ドメイン配列のものである少なくとも1つ、他の実施形態では、少なくとも2つのV H ドメインの実質的に全部を含むものである。ヒト化重鎖抗体は、一実施形態では、少なくとも C H 1 ドメインを欠いている、一実施形態では、ヒト F c のヒンジ領域も欠いている特殊な免疫グロブリン定常領域（F c）を含む。一実施形態では、重鎖抗体は、軽鎖を含まず、免疫グロブリン G (I g G) 重鎖定常領域の C H 2 および C H 3 領域を含む。一実施形態において、重鎖抗体の定常領域には、I g G 重鎖 F c のヒンジ、C H 2 および C H 3 領域が含まれている。一実施形態において、重鎖抗体の定常領域には I g M の C H 1 領域が含まれている。

【 0 1 1 4 】

ヒト化重鎖抗体は、任意のクラスの I g G、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 から選択される。種々の実施形態において、定常領域は、1つより多くのクラスの I g G に由来する配列を含むものであり得、所望のエフェクター機能を最適化するための具体的な定常領域の選択は、当該技術分野の通常の技能の範囲内である。

【 0 1 1 5 】

一般に、ヒト化重鎖抗体の重鎖 F R および重鎖 C D R 領域は、親配列に厳密に対応している必要はなく、例えば、非ヒト重鎖 C D R またはヒト重鎖 F R は、少なくとも1つの残基の置換、挿入または欠失によって、所与の部位の重鎖 C D R または重鎖 F R 残基がヒト重鎖 F R 配列または非ヒト重鎖 C D R 配列のいずれにも対応しないように変えられ得る。しかしながら、かかる変異は広範性でない。一実施形態ではヒト化重鎖抗体残基の少なくとも 75 % が親の重鎖 F R および重鎖 C D R 配列のものに対応し、別の実施形態では 90 %、別の実施形態では 95 % より多くが対応する。

【 0 1 1 6 】

本明細書に開示したヒト化重鎖抗体は、一実施形態において、親配列および種々の概念的ヒト化コンポジット配列をインシリコで、当業者に利用可能であり知られているコンピュータプログラムを用いて解析する方法によって調製される。ヒト化型を作製するため、および／または例えば免疫原性、親和性などの特徴を変更するための配列改変は、当該技

10

20

30

40

50

術分野において知られた方法を用いて行なわれる（例えば、U S 5 , 5 6 5 , 3 3 2 H oogenboomら；U S 5 , 6 3 9 , 6 4 1 Pedersenら；U S 5 , 7 6 6 , 8 8 6 Studnickaら；U S 5 , 8 5 9 , 2 0 5 Adairら；U S 6 , 0 5 4 , 2 9 7 Carterら；U S 6 , 4 0 7 , 2 1 3 Carterら；U S 6 , 6 3 9 , 0 5 5 Carterら；U S 6 , 8 4 9 , 4 2 5 Huseら；U S 6 , 8 8 1 , 5 5 7 Foote；U S 7 , 0 9 8 , 0 0 6 Gormanら；U S 7 , 1 7 5 , 9 9 6 Watkinsら；U S 7 , 2 3 5 , 6 4 3 Nicolaidesら；U S 7 , 3 9 3 , 6 4 8 Rotherら；U S 7 , 4 6 2 , 6 9 7 Coutoら）。

【0117】

種々の実施形態において、親重鎖抗体のバリアントを作製するための親重鎖抗体配列に対する所望の置換は、一実施形態では、親重鎖抗体の抗原結合活性が維持されるもの、または別の実施形態では、該活性が増大するものである。一般に、親重鎖抗体の重鎖抗体のバリアントは、特定の抗原に対する親重鎖抗体の結合親和性の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも100%（例えば、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも1000%または少なくとも10,000%まで）である抗原結合親和性を有する。一部の実施形態では、バリアント重鎖抗体は、親重鎖抗体と比較すると单一の置換を含むものである。しかしながら、他の実施形態では、親重鎖抗体配列と比べていくつかのアミノ酸、例えば、約5個までまたは10個までそれが置換されており、これらは、所与の位置において同一性を共有している他のヒト重鎖配列に由来するものである。置換は、一実施形態では、保存的であり（すなわち、置き換えられる残基と類似した特性を共有しているアミノ酸）、別の実施形態では、非保存的である（すなわち、置き換えられる残基と異なる特性を共有しているアミノ酸）。種々の実施形態において、得られたバリアント重鎖抗体を試験し、所望の結合親和性および/または特異性が、置き換えられた残基によって有意に低下していないことを確認する。一部の実施形態では、異なるヒト重鎖配列由来のアミノ酸の置換によって改善されたバリアント重鎖抗体が生成される。

【0118】

天然に存在している重鎖抗体（例えば、ラクダ類に見られる）は、従来の抗体分子（すなわち、2つの重鎖と2つの軽鎖）の重鎖可変領域と軽鎖可変領域との境界部に対応する位置に独特なアミノ酸残基を含むことが示されている。このような境界部の残基は、従来の抗体において、互いに対する2つの鎖の近接性または向きに影響を及ぼすことが知られている。このような天然の重鎖抗体は、軽鎖可変領域の非存在と相關している残基の置き換えを含むことが知られているが、該抗体は、従来の抗体と比較すると、配列内の他の位置に、特徴的な免疫グロブリンのフォールディングを保存するための残基を保持している。天然の重鎖抗体に見られる置換は、L 1 1 S、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 RまたはL 4 5 C、W 4 7 Gおよび重鎖可変領域のCDR1とCDR3との間のジスルフィド結合に寄与するさらなるシステイン残基である。一部の実施形態では、本発明の重鎖抗体は、これらの位置に親抗体の残基が保持されたものあり得る。他の実施形態では、親抗体は、これらの位置に、天然の重鎖抗体の残基と関連している変異を示すものあり得る。一部の実施形態において、単離されたVH配列に由来するヒト化重鎖抗体を本明細書に記載の遺伝子改変マウスから作製する際に、これらの位置の少なくとも1つに、または一実施形態ではこれらの位置の全部に親重鎖抗体に見られるものと同じ残基が保持されているのが望ましい場合があり得る。種々の実施形態において、当業者には、このような境界部の残基は、本明細書に記載の遺伝子改変マウスによって作製される重鎖抗体における鎖間相互作用に関与していることが合理的に予測されないことが理解されよう。

【0119】

遺伝子改変動物の作製

重鎖抗体が発現される動物を作製するための遺伝子改変は、実例としての該マウスを使用することにより簡便に示される。本発明による遺伝子改変マウスはさまざまな様式で作

10

20

30

40

50

製され得、その具体的な実施形態を以下に論考する。

【0120】

IgG1遺伝子座の模式図（一定の縮尺でない）を図1（上部）に示し、IgG1遺伝子座におけるCHドメインの配置を示す。図示のように、ドメインCH1、CH2およびCH3ならびにヒンジ領域は、スイッチ領域の下流の容易に識別可能なヌクレオチド範囲に存在している。

【0121】

IgG1のCH1ドメインをコードしているヌクレオチド配列を欠いているがヒンジ領域を含む遺伝子改変マウスは、任意の当該技術分野において知られた方法によって作製され得る。例えば、IgG1遺伝子をCH1ドメインを欠いているがヒンジを含む切断型IgG1で置き換える標的化ベクターが作製され得る。図2は、内因性CH1ドメインの上流の配列、続いて、IgG1ヒンジ、IgG1 CH2ドメイン、IgG1 CH3ドメイン、薬物選択カセット（例えば、lox ed耐性遺伝子）、およびIgG1膜貫通ドメインをコードしているヌクレオチド配列を含む5'側（ゲノムIgG1遺伝子の転写の方向に対して）の相同性アームと、膜貫通ドメインに対して3'側の配列を含む3'側の相同性アームを有する標的化構築物によって標的化されるマウスゲノム（上部）を示す。該遺伝子座において相同組換えが起こり、薬物選択カセットが除去されると（例えば、Cre処理によって）、内因性IgG1は、CH1ドメインを欠いているIgG1で置き換えられる（図2の下部；lox部位は図示せず）。図1（IgG1 CH1，中央）は、得られた遺伝子座の構造を示し、該遺伝子座により、ヒンジ配列と融合されたJ領域配列を有するIgG1が発現される。

【0122】

IgG1のCH1ドメインをコードしているヌクレオチド配列を欠いており、ヒンジ領域をコードしているヌクレオチド配列を欠いている遺伝子改変マウスは、任意の当該技術分野において知られた方法によって作製され得る。例えば、IgG1遺伝子をCH1ドメインをコードしている配列を欠いており、ヒンジ領域をコードしている配列を欠いている切断型IgG1で置き換える標的化ベクターが作製され得る。図3は、内因性CH1ドメインの上流の配列、続いて、IgG1 CH2ドメイン、IgG1 CH3ドメイン、薬物選択カセット（例えば、lox ed耐性遺伝子）、およびIgG1膜貫通ドメインをコードしているヌクレオチド配列を含む5'側（ゲノムIgG1遺伝子の転写の方向に対して）の相同性アームと、膜貫通ドメインに対して3'側の配列を含む3'側の相同性アームを有する標的化構築物によって標的化されるマウスゲノム（上部）を示す。該遺伝子座において相同組換えが起こり、薬物選択カセットが除去されると（例えば、Cre処理によって）、内因性IgG1遺伝子は、CH1ドメインをコードしている配列を欠いているIgG1遺伝子で置き換えられる（図3の下部；lox部位は図示せず）。図1（IgG1 CH1 - ヒンジ，下部）は、得られた遺伝子座の構造を示し、該遺伝子座により、CH2ドメインと融合されたJ領域配列を有するIgG1が発現される。

【0123】

IgG1 CH1配列を欠いている（IgG1 CH1）、またはIgG1 CH1配列を欠いており、ヒンジを欠いている（IgG1 CH1 - ヒンジ）遺伝子改変マウスを、該改変IgG1アイソタイプの使用に好都合となるように、1つ以上の他のIgGアイソタイプを欠失させることにより、例えば、IgG2bおよびIgG2aをコードしている配列を欠失させること、または機能的に無効にすることによりさらに改変してもよい。例えば、内因性ヒンジ領域配列の上流（または内因性CH1ドメイン配列の上流）の配列、IgG1 CH2およびCH3ドメイン、薬物選択カセットをコードしている配列、続いて、IgG1膜貫通ドメイン、続いて所望により別の薬物選択カセットをコードしている配列を含む5'側の相同性アームを有する標的化構築物を作製する。該遺伝子座において相同組換えが起こり、薬物選択カセット（1つまたは複数）が除去されると（例えば、Cre処理によって）、内因性の重鎖定常遺伝子座は、2つだけのIgG遺伝子：内因性IgG3と、IgG1 CH1（図4，下部参照；レコンビナーゼ部位（1つもしくは

10

20

30

40

50

複数)は図示せず; 図6(下部参照)またはIgG1 CH1- ヒンジ(図5(下部参照); レコンビナーゼ部位(1つもしくは複数)は図示せず; 図6(下部参照))とを含む。

【0124】

IgG1 CH1- ヒンジまたはIgG1 CH1 IgG2a IgG2b対立遺伝子を有する遺伝子改変マウスにおいて発現されるIgG1は、図10の右パネルに示すような構造を有する、すなわち、VHドメインはCH2ドメインと融合されている。図10の左パネルは、比較のため、野生型IgG1抗体を示し、そのCH1ドメインが、ヒンジ領域によってCH2ドメインに連結され、ジスルフィド結合によって軽鎖定常ドメインCLに連結されていることを示す。対照的に、遺伝子改変マウスによって作製される抗体は、ヒンジおよびCH1ドメインを欠いており、したがって、CLドメインを完全に欠いている。

10

【0125】

上記および他の遺伝子改変マウスは、適当な標的化構築物を適当なマウスES細胞内に導入することにより作製され(1回以上の独立した標的化にて)、該標的化構築物のマークーまたは選択カセットを含む陽性クローニングを確認し、増殖させる。次いで、該クローニングを宿主胚において、キメラマウスまたは完全ES細胞由来マウスの作製に適した条件下でドナーES細胞として使用する。該マークーまたは選択カセットは、ES細胞の段階またはキメラもしくはES細胞由来マウスにおいてのいずれかで、例えば、loxedカセットを用い、Cre含有系統と交配することにより、またはES細胞にCre発現ベクターをエレクトロポレーションすることにより、任意選択で除去してもよい。

20

【0126】

IgG1 CH1- ヒンジ対立遺伝子(ヘテロ接合性)を有する遺伝子改変マウスを本発明の一実施形態に従って作製した。血清を該マウスから単離し、抗マウスIgG1抗体を用いてウエスタン様式(還元条件)でプロットし、重鎖を検出した。野生型IgG1重鎖のサイズに対応するバンドが示された野生型マウスとは対照的に、IgG1 CH1- ヒンジ対立遺伝子を含むように遺伝子改変されたマウスでは、VH、CH2およびCH3ドメインからなる重鎖抗体の予測サイズを有する抗マウスIgG1抗体と反応する重鎖も発現された(図8参照)。

【実施例】

【0127】

30

実施例

実施例1：重鎖抗体のインビトロ発現

分子生物学的手法(例えば、Maniatisら 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory参照)を用いてヒト可変領域とマウスIgG2b(mIgG2b)定常領域と融合させ、キメラ重鎖構築物を作製した。各構築物のヒト可変遺伝子セグメントは、両方のエキソン(すなわち、リーダー配列+成熟配列)、(内因性マウス免疫グロブリン重鎖の遺伝子座の3つのhVR遺伝子セグメントでの置き換えを含むナイーブRAGマウスから単離されたIgMのhVRから同定)、全hDH遺伝子セグメント、および全hJH遺伝子セグメントを含む完全長ヒト可変遺伝子セグメントとした。IgM抗体の軽鎖はマウス軽鎖とした。

40

【0128】

mIgG2b配列のうち2つの型; CH1ドメインを有するものと、有しないものを使用した。また、いくつかの他の構築物も作製して、トランスフェクションおよび発現の対照として供した。第1の対照構築物は、マウスIgG2a(mIgG2a)定常領域のCH2およびCH3ドメインと融合されたサイトカイン受容体を用いて作製した(対照I)。他の2つの対照は、マウスRORシグナル配列を、CH1ドメインを有する、または有しないマウスIgG2a配列と融合されることにより構築した(それぞれ、対照IIおよびIII)。

【0129】

50

また、各ヒト可変領域のラクダ化型も P C R 部位特異的変異誘発手法を用いて作製した（例えば、H u t c h i n s o n ら 1 9 7 8 . M u t a g e n e s i s a t a s p e c i f i c p o s i t i o n i n a D N A s e q u e n c e . J . B i o l . C h e m . 2 5 3 (1 8) : 6 5 5 1 - 6 0 参照）。各可変領域に対して 2 組の特異的プライマーセットを用いてヒト可変領域配列内に特異的変異を作出し、ラクダ様特徴を含むヒト可変領域配列を得た。該可変領域の 5' 側の半分を含む産物の増幅にはプライマー L 1 (配列番号 : 1) および H H 1 . 2 mut B O T (配列番号 : 2) を使用し、一方、該可変領域の 3' 側の半分の増幅には、プライマー H H 1 . 2 mut T O P (配列番号 : 3) および m 1 8 . 3 . 1 (配列番号 : 4) を使用した。これらの産物を精製して一緒に混合し、プライマー L 1 および m 1 8 . 3 . 1 を用いた第 3 の P C R 反応のための鋳型として供した。得られたラクダ化ヒト可変領域の P C R 産物をクローニングし、精製し、配列決定することによって確認した。

【 0 1 3 0 】

後で付着末端でのライゲーションによって一体にすることが可能となるように制限酵素部位を含むプライマーを使用し、ヒト可変領域（ラクダ化および非ラクダ化）と定常領域を増幅させることにより、完全長重鎖構築物（可変および定常）を作製した。すべての完全長重鎖構築物を発現ベクター内にクローニングし、精製し、再度配列決定することによって確認した。表 1 は、各構築物に関する各重鎖構築物、その配列番号および簡単な説明を示す。

【 0 1 3 1 】

【 表 1 】

10

20

表1		
構築物	説明	配列番号 (DNA/タンパク質)
hVR-mFc	マウス IgG2b と融合させられた非ラクダ化ヒト可変領域	5/6
hVR*-mFc	マウス IgG2b と融合させられたラクダ化ヒト可変領域	7/8
hVR-mFcΔCH1	CH1ドメインを欠いているマウス IgG2b と融合させられた非ラクダ化ヒト可変領域	9/10
hVR*-mFcΔCH1	CH1ドメインを欠いているマウス IgG2b と融合させられたラクダ化ヒト可変領域	11/12

30

キメラ重鎖構築物で、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O - K 1) を一過的にトランスフェクトさせ、免疫グロブリン軽鎖の非存在下における発現を解析した。上清みおよび細胞溶解物をウエスタンプロットによって調べ、重鎖の存在を検出した（ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) コンジュゲート抗マウス I g G 抗体 (P r o m e g a) を用いて化学発光 (c h e m i l u m e s c e n c e) により）。キメラ重鎖構築物はすべて、独立して 6 回、一過的にトランスフェクトさせた。トランスフェクションの代表的なウエスタンプロットを図 7 に示す。

40

【 0 1 3 2 】

すべてのキメラ重鎖構築物 (C H 1 ドメインを含むもの、および含まないもの) ならびに対照構築物が細胞溶解物中に検出された。 C H 1 ドメインを欠いている構築物のみ、上清み中に観察された（図 7 , 左）。また、対照 I および対照 I I I (C H 1 ドメインを欠いているマウス F c タンパク質) も検出された（図 7 ）が、 C H 1 ドメインを含むマウス F c タンパク質は検出されなかった。 C H 1 ドメインを含む非ラクダ化およびラクダ化の重鎖構築物はどちらも、いずれもトランスフェクションでも上清み中には検出されなかつた（図 7 , 右）。しかしながら、 C H 1 ドメインを欠いている非ラクダ化およびラクダ化ヒト重鎖構築物はどちらも、すべてのトランスフェクションで上清み中に検出された。総

50

合すると、この結果により、C H 1 ドメインを欠いているh V R（通常またはラクダ化）は、免疫グロブリン軽鎖の非存在下において、一過的にトランスフェクトさせたC H O 細胞で発現され、分泌され得るが、C H 1 ドメインを含むh V R（通常またはラクダ化）は、軽鎖の非存在下では分泌され得ないことが確立される。

【0133】

実施例2：マウス重鎖I g G 1 定常領域の改変

A . マウスI g G 1 - C H 1 - ヒンジ標的化ベクター（図3）の調製

V E L O C I M M U N E（登録商標）マウス（後述）のE S 細胞由来のC 5 7 B L / 6 対立遺伝子に対して、マウスI g G 1 定常ドメインのC H 1 とヒンジ領域の欠失を導入するための標的化構築物を構築した。

10

【0134】

標的化構築物を、V E L O C I G E N E（登録商標）技術（例えば、米国特許第6 , 5 8 6 , 2 5 1号およびV a l e n z u e l a r a (2 0 0 3) H i g h - t h r o u g h p u t e n g i n e e r i n g o f t h e m o u s e g e n o m e c o u p l e d w i t h h i g h - r e s o l u t i o n e x p r e s s i o n a n a l y s i s , N a t u r e B i o t e c h . 2 1 (6) : 6 5 2 - 6 5 9 参照）を用いて作製して、バクテリア人工染色体（B A C ）B M Q 7 0 p 0 8 を改変した。B M Q 7 0 p 0 8 B A C D N A は、I g G 1 定常ドメインのC H 1 とヒンジ領域は欠失されるがI g G 1 遺伝子の残部（例えば、C H 2 、C H 3 および膜貫通エキソン）はインタクトなままとなるように改変した。

20

【0135】

簡単には、上流および下流の相同性アームを、それぞれ、プライマーm 1 0 2（配列番号：1 3 ）とm 1 0 4（配列番号：1 4 ）およびm 1 0 0（配列番号：1 5 ）とm 9 9（配列番号：1 6 ）を用いて作製した。この相同性アームを使用し、I g G 1 の定常ドメインのC H 1 とヒンジ領域は欠失しているがI g G 1 定常ドメインのC H 2 、C H 3 および膜貫通領域は保持されたカセットを作製した（例えば、図3参照）。標的化構築物には、l o x e d ハイグロマイシン耐性遺伝子をI g G 1 遺伝子のC H 3 と膜貫通ドメインエキソンの間の位置に含めた。C H 1 およびヒンジエキソンの上流の遺伝子（例えば、I g G 3 、I g D 、I g M ）ならびにI g G 1 膜貫通エキソンの下流の遺伝子（例えば、I g G 2 b 、I g G 2 1 、I g E 、I g A など）は、標的化構築物で改変されなかった。すべての定常ドメインのスイッチ領域は、標的化構築物で改変されなかった。該消失前後のヌクレオチド配列には、以下のもの（これは、該消失点に存在するスライスアクセプター配列を示す）：T G A C A G T G T A A T C A C A T A T A C T T T T T C T T G T (A G) T C C C A G A A G T A T C A T C（配列番号：1 7 ）を含めた。この消失配列はスライスアクセプター（上記の括弧内に記載のA G ）を含み、スライスアクセプターの5' 側はプレC H 1 配列であり、スライスアクセプターの3' 側はC H 2 エキソン配列である。

30

【0136】

B . マウスI g G 1 - C H 1 標的化ベクター（図2）の調製

V E L O C I M M U N E（登録商標）マウス（後述）のE S 細胞由来の1 2 9 / S v E v T a c 対立遺伝子に対してマウスI g G 1 定常ドメインのC H 1 の欠失を導入するための第2の標的化構築物を、この実施例のセクションAに記載のものと同様の様式で構築した。

40

【0137】

標的化構築物を、V E L O C I G E N E（登録商標）技術（例えば、米国特許第6 , 5 8 6 , 2 5 1号およびV a l e n z u e l a r a (2 0 0 3) H i g h - t h r o u g h p u t e n g i n e e r i n g o f t h e m o u s e g e n o m e c o u p l e d w i t h h i g h - r e s o l u t i o n e x p r e s s i o n a n a l y s i s , N a t u r e B i o t e c h . 2 1 (6) : 6 5 2 - 6 5 9 参照）を用いて作製して、バクテリア人工染色体（B A C ）B M Q 7 0 p 0 8 を改変した。B M Q 7

50

0 p 0 8 B A C D N A は、 I g G 1 定常ドメインの C H 1 領域は欠失されるが I g G 1 遺伝子の残部（例えば、ヒンジ、 C H 2 、 C H 3 および膜貫通エキソン；図 2 参照）はインタクトなままとなるように改変した。

【 0 1 3 8 】

第 2 の標的化構築物の相同意アームは、 C H 1 - ヒンジ標的化ベクター（この実施例のセクション A において上記）の場合と同じものとした。この相同意アームを使用し、 I g G 1 定常ドメインの C H 1 領域は欠失しているが I g G 1 定常ドメインのヒンジ、 C H 2 、 C H 3 および膜貫通領域は保持されたカセットを作製した（例えば、図 2 参照）。標的化構築物には、 l o x e d ハイグロマイシン耐性遺伝子を I g G 1 遺伝子の C H 3 と膜貫通ドメインエキソンの間の位置に含めた。 C H 1 エキソンの上流の遺伝子（例えば、 I g G 3 、 I g D 、 I g M ）および I g G 1 膜貫通エキソンの下流の遺伝子（例えば、 I g G 2 b 、 I g G 2 1 、 I g E 、 I g A など）は、標的化構築物で改変されなかった。すべての定常ドメインのスイッチ領域は、標的化構築物で改変されなかった。該欠失前後のヌクレオチド配列には、以下のもの（これは、該欠失点に存在するスライスアクセプター配列を示す）： T G A C A G T G T A A T C A C A T A T A C T T T T C T T G T (A G) T G C C C A G G G A T T G T G G T T G T A A G C C T T G C A T A T G T A C A G G T A A G T C A G T A G G C C T T T C A C C C T G A C C C (配列番号： 64) を含めた。この欠失配列はスライスアクセプター（上記の括弧内に記載の A G ）を含み、スライスアクセプターの 5' 側はプレ C H 1 配列であり、スライスアクセプターの 3' 側はヒンジエキソン配列である。

10

20

【 0 1 3 9 】

実施例 3 : E S 細胞におけるマウス重鎖定常領域の改変

A . I g G 1 - C H 1 - ヒンジ標的化ベクターでのマウス E S 細胞の標的化

マウス E S 細胞を、上記の標的化構築物（すなわち、 I g G 1 遺伝子の C H 1 とヒンジ領域の欠失を導入する標的化構築物）で標的化した。 E S 細胞は V E L O C I M M U N E （登録商標）マウス由来のものとした。このマウスは、 129 系統と C 57 B L / 6 系統の 50 / 50 混合型であり、マウス重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントの再構成されていないヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含む遺伝子改変を有する。 C 57 B L / 6 との交配に使用した 129 系統は、マウス重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントのヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含む系統である。

30

【 0 1 4 0 】

ヘテロ接合性 V E L O C I M M U N E （登録商標）マウスは、 129 系統由来の一組の内因性マウス重鎖定常領域遺伝子を一方の対立遺伝子に、および C 57 B L / 6 系統由来の一組の内因性マウス重鎖定常領域遺伝子を他方の対立遺伝子に有する。 129 重鎖の対立遺伝子は、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメント（すなわち、内因性マウス遺伝子座）が置き換えられたヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントである重鎖可変領域遺伝子セグメントの遺伝子座と隣接している。 B L / 6 重鎖の対立遺伝子は、野生型マウス重鎖可変領域遺伝子セグメントと隣接している。また、 V E L O C I M M U N E （登録商標）マウスは野生型内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子も有する。したがって、 129 対立遺伝子を、 I g G 、 D 、 E または A の C H 1 欠失を含む構築物で標的化することにより、キメラヒト / マウス重鎖抗体が生成され得、一方、 C 57 B L / 6 対立遺伝子を同様の構築物で標的化することにより、 C H 1 ドメインを欠き、ヒンジを欠いている完全マウス重鎖抗体が生成され得る。

40

【 0 1 4 1 】

上記の V E L O C I M M U N E （登録商標）マウス由来の E S 細胞を、実施例 2 のセクション A の線状化した標的化ベクターでエレクトロポレーションし、ハイグロマイシン耐性遺伝子の存在により選択した。

【 0 1 4 2 】

B . I g G 1 - C H 1 標的化ベクターでのマウス E S 細胞の標的化

50

同様の様式で、マウスES細胞を、実施例2のセクションB（図2も参照のこと）に記載のCH1標的化構築物で標的化した。ES細胞はVELOCIMMUNE（登録商標）マウス（129/SvEvTac系統とC57BL/6系統の50/50混合型であり、マウス重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントの再構成されていないヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含む遺伝子改変を有するマウス）由来のものとした。C57BL/6との交配に使用した129/SvEvTac系統は、マウス重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントのヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子セグメントでの置き換えを含む系統である。

【0143】

ヘテロ接合性VELOCIMMUNE（登録商標）マウスは、129/SvEvTac系統由来の一組の内因性マウス重鎖定常領域遺伝子を一方の対立遺伝子に、およびC57BL/6系統由来の一組の内因性マウス重鎖定常領域遺伝子を他方の対立遺伝子に有する。129/SvEvTac重鎖の対立遺伝子は、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメント（すなわち、内因性マウス遺伝子座）が置き換えられたヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントである重鎖可変領域遺伝子セグメントの遺伝子座と隣接している。BL/6重鎖の対立遺伝子は、野生型マウス重鎖可変領域遺伝子セグメントと隣接している。また、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスは野生型内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子も有する。したがって、129/SvEvTac対立遺伝子を、IgG、D、EまたはAのCH1欠失を含む構築物で標的化することにより、キメラヒト/マウス重鎖抗体が生成され得、一方、C57BL/6対立遺伝子を同様の構築物で標的化することにより、CH1ドメインを欠き、ヒンジを欠いている完全マウス重鎖抗体が生成され得る。
10
20

【0144】

上記のVELOCIMMUNE（登録商標）マウス由来のES細胞を、実施例2のセクションBに記載の線状化した標的化ベクターでエレクトロポレーションし、ハイグロマイシン耐性遺伝子の存在により選択した。

【0145】

実施例4：改変IgG1定常領域を有するマウスの作製

A. IgG1 - CH1 - ヒンジ欠失を有するマウス

上記の標的とされるES細胞をドナーES細胞として使用し、8細胞期のマウス胚にVELOCIMOUSE（登録商標）での方法によって導入した（例えば、米国特許第7,294,754号およびPoueymirouら（2007）F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1) : 91-99参照）。標的とされるC57BL/6 IgG1対立遺伝子を有するVELOCIMICE（登録商標）（完全にドナーES細胞に由来するF0マウス）を、欠失しているヒンジおよびCH1領域の上流および下流に位置する配列の存在を検出する変形型の対立遺伝子アッセイ（Venezuela, 上掲）を用いて遺伝子型分類することにより確認した。
30
40

【0146】

IgG1のCH1とヒンジの欠失（C57BL/6対立遺伝子内、すなわち、マウス対立遺伝子内）について遺伝子型分類されたマウスを、IgG1 CH3エキソンの下流でIgG1膜貫通エキソンの上流のlox ed hygカセット（標的化構築物（例えば、図3参照）によって導入）を除去するために、Cre deleterマウス系統（例えば、国際特許出願公開公報番号WO2009/114400参照）と交配した。幼獣を遺伝子型分類し、IgG1のCH1とヒンジの欠失についてヘテロ接合性の幼獣を選択し、C57BL/6対立遺伝子から発現されたIgG1重鎖を幼獣の血清中において調べた。

【0147】

B. IgG1 - CH1欠失を有するマウス

同様の様式で、IgG1 CH1領域の欠失を有する標的とされるES細胞をドナーE

50

S細胞として使用し、8細胞期のマウス胚にVELOCIMOUSE（登録商標）での方法によって導入した（例えば、米国特許第7,294,754号およびPoueymirouら(2007)F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1): 91-99参照）。標的とされる129SvEv/Tac対立遺伝子を有するVELOCIMICE（登録商標）（完全にドナーES細胞に由来するF0マウス）を、欠失しているCH1領域の上流および下流に位置する配列の存在を検出する変形型の対立遺伝子アッセイ（Valenzuelaら、上掲）を用いて遺伝子型分類することにより確認した。

10

【0148】

IgG1 CH1欠失(129/SvEvTac対立遺伝子内、すなわち、ヒト対立遺伝子内)について遺伝子型分類されたマウスを、IgG1 CH3エキソンの下流でIgG1膜貫通エキソンの上流のlox ed hygカセット（標的化構築物（例えば、図2参照）によって導入）を除去するために、Cre deleterマウス系統（例えば、国際特許出願公開公報番号WO2009/114400参照）と交配した。幼獣を遺伝子型分類し、IgG1 CH1欠失についてホモ接合性の幼獣を選択し、改変IgG1重鎖の発現を調べた。

【0149】

実施例5：改変IgG1遺伝子を有するマウス由来の重鎖抗体

A. IgG1 - CH1 - ヒンジマウス

CH1とヒンジの欠失を含むと上記で確認されたマウス幼獣と野生型幼獣を交配し、交配マウス由来の血清をウエスタンプロッティングのために調製し、血清中に発現されたいづれかのIgGを、抗mIgG1抗体を用いて同定した。簡単には、マウス血清の10μLの1:100希釈物を還元性SDS-PAGEに使用し、ゲルをPVDF膜に移した。プロットを0.05%Tween-20を含む5%脱脂乳含有Tris緩衝生理食塩水(TBST; Sigma)で一晩ブロックし、TBSで4回洗浄し（1回あたり5分間の洗浄）、次いで、一次抗体（HRPにコンジュゲートさせたヤギ抗mIgG1, Sout hern Biotech）（1%脱脂乳含有TBS中で1:1,000に希釈）に室温で2時間曝露した。プロットを6回洗浄した（1回あたり5分間の洗浄）。プロットを5分間、SuperSignal（商標）West Pico Chemiluminescent Substrate（Thermo Scientific）を用いて発色させ、次いでフィルムに1分間露光した。

20

30

【0150】

標的とされるドナーES細胞から得られたVELOCIMOUSE（登録商標）（50%野生型BL/6；50%CH1 - ヒンジBL/6）由来の血清では、混合バンド：約57.5kD（野生型IgGの予測サイズ）のバンド1つ、および約45kD（CH1ドメインとヒンジを欠いているIgGの予測サイズ）にバンド1つが示された（図8）。この結果は、野生型BL/6対立遺伝子由来の通常のマウス重鎖と、そのCH1 - ヒンジBL/6対立遺伝子由來のCH1 / ヒンジマウス重鎖が発現されるVELOCIMOUSE（登録商標）と整合している。この結果により、機能性IgM遺伝子およびCH1ドメインとヒンジドメインを欠いているIgG遺伝子を有する遺伝子改変マウスは、血清中において重鎖抗体を発現できることが確立される。

40

【0151】

B. IgG1 - CH1マウス

同様の様式で、CH1欠失についてホモ接合性のマウス幼獣と野生型幼獣を交配した。交配マウス由来の血漿および血清（5匹のホモ接合型；2匹の野生型について）をウエスタンプロッティングのために調製し、血清中に発現されたいづれかのIgGを、抗mIgG1抗体を用いて同定した（上記のとおりに）。IgG1 - CH1欠失についてホモ接

50

合性のマウス由来の血清および血漿のウエスタンプロットでは、混合物バンド：約45kD（CH1ドメインを欠いている一本鎖IgG1の予測サイズ）のバンド1つ、および約75kD（CH1ドメインを欠いている二量体IgGの予測サイズ）にバンド1つが示された（データ表示せず）。この結果は、一方または両方いずれかの重鎖の遺伝子座に由来するIgG1-CH1重鎖が発現されるホモ接合性のVELOCIMICE（登録商標）と整合している。この結果により、機能性IgM遺伝子とCH1ドメインを欠いているIgG遺伝子を有する遺伝子改変マウスは、該動物の免疫系の末梢リンパ球画分において重鎖抗体を発現できることが確立される。

【0152】

実施例6：IgG1-CH1-ヒンジ欠失についてホモ接合性のマウスの特性評価

10

CH1-ヒンジ欠失についてヘテロ接合性のVELOCIMICE（登録商標）同士を交配し、該欠失についてホモ接合性のマウスを得た。4匹のマウス幼獣が、IgG1-CH1-ヒンジについてホモ接合性であると確認された。これらの4匹のマウスと野生型マウスを交配し、交配マウス由来の血清を、ウエスタンプロッティングのために調製し、血清中に発現されたいずれかのIgGを、抗mIgG1抗体を用いて同定した（上記のとおりに）。図9は、この実験で使用したPVDF膜から発色させたフィルムを示す。血清を1:5および1:10に希釈し、10μLの各希釈物を各マウスに対して並列でゲルに負荷した。ゲル画像の上部において、レーンに各マウスならびにIgG1(1)およびIgG2a(2a)対照の表示をしている。

【0153】

20

野生型マウス由来の血清では、2つの重鎖と2つの軽鎖を含む通常の抗体（およそ150kD）が発現されるという野生型マウスについて予測されたパターンが示された。4匹すべてのマウス（IgG1-CH1-ヒンジについてホモ接合性）では各々、混合バンド：約150kD（IgG1以外の野生型IgG（例えば、IgG2a、IgG2bまたはIgG3）の予測サイズ）のバンド1つ、および約45kD（CH1ドメインとヒンジを欠いているIgGの予測サイズ）にバンド1つが示された（図9）。この結果は、CH1ドメインとヒンジ領域を欠いており、軽鎖を欠いているIgG1重鎖抗体が発現されるマウスと整合している。この結果により、さらに、機能性IgM遺伝子およびCH1ドメインとヒンジ領域を欠いているIgG遺伝子を有する遺伝子改変マウスは、血清中において重鎖抗体を発現できることが確立される。

30

【0154】

別の実験において、IgGの血清中発現を、IgG1-CH1-ヒンジについてホモ接合性のマウスでELISAアッセイを用いて決定した。簡単には、mIgG1またはmIgG2b（Pharmingen）のいずれかに特異的な抗体を別々に希釈し、100μL/ウェルをプレート上に、2μg/mL（1×PBS（Irvine Scientific）中）でコートし、4で一晩インキュベートした。翌日、プレートを0.05%Tween-20含有PBS（PBST；Sigma）で4回洗浄した。4回目の洗浄後、プレートを250μL/ウェルの5%BSA含有PBST（Sigma）でプロックし、室温で1時間インキュベートした。血清および標準を、400ng/mL（mIgG1）または600ng/mL（mIgG2b）の開始濃度で、0.5%BSA含有PBST中でプレートの下方に向かって（上から下に）連続希釈した（希釈係数は0.316）。プロックした後、プレートを再度PBSTで4回洗浄した。4回目の洗浄後、100μLの血清または標準をプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを再度PBSTで4回洗浄した。洗浄後、100μLのビオチン化検出抗体（10ng/mLのラット抗mIgG1または250ng/mLの抗mIgG2b；Pharmingen）をプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、上記のようにして再度洗浄した。洗浄後、100μL/ウェルのストレプトアビシンにコンジュゲートさせたホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP-SA）の1:20,000希釈物（PBST中）をプレートに添加し、プレートを室温で30分間インキュベートした。次いで、プレートをPBSTで6回洗浄した後、基質AおよびB（BD OPTEIA（

40

50

商標) ; BD Biosciences の 100 μL / ウエルの 1 : 1 希釀物を添加し、プレートを暗所に維持した。反応液を暗所内で発色させ、所望により 1 N リン酸を用いて停止させた(およそ 15 分間)。停止させた反応液の読み出しを、450 nm の吸光波長(1.0 秒 / 読み出し)で Wallac 1420 Work Station VI CTO R (商標) Plate Reader において行ない、結果をグラフにプロットした(図 11)。

【0155】

野生型マウス由来の血清では、通常レベルの Ig G1 および Ig G2b が示された。Ig G1 CH1 - ヒンジについてホモ接合性のマウスは、末梢において、CH1 ドメインとヒンジ領域を欠いている Ig G1 を発現できた(血清; 図 11 の左側)。さらに、他の Ig G アイソタイプ(例えば、Ig G2b) の血清レベルは、野生型レベルより著しくは低減しなかった(図 11 の右側)。この結果により、さらに、機能性 Ig M 遺伝子および CH1 ドメインとヒンジ領域を欠いている Ig G 遺伝子を有する遺伝子改変マウスは、血清中に検出され得る改変 Ig G1 アイソタイプ(すなわち、CH1 ドメインとヒンジを欠いている)を発現できることが確立される。

【0156】

実施例 7 : Ig G1 改変マウスにおける V - D - J 再構成の解析

A. Ig G1 - CH1 - ヒンジ欠失についてホモ接合性のマウス

Ig G1 CH1 - ヒンジについてホモ接合性のマウス改変を、V - D - J 組換えおよび重鎖遺伝子の使用について、脾細胞から単離された RNA を用いて逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT - PCR)によって解析した。

【0157】

簡単には、脾臓を収集し、滅菌使い捨てバッグ内で 10 mL の 5% HI - FBS 含有 RPMI - 1640 (Sigma) を灌流させた。次いで、1 つの脾臓を含む各バッグを STOMACHER (商標)(Seward) 内に入れ、ミディアム設定で 30 秒間ホモジナイズした。ホモジナイズした脾臓を 0.7 μm セルストレーナーを用いて濾過し、次いで、遠心分離機を用いてペレット化し(1000 rpm で 10 分間)、赤血球(RBC)を BD PHARM LYSE (商標)(BD Biosciences) 中で 3 分間溶解させた。脾細胞を RPMI - 1640 で希釀し、再度遠心分離した後、1 mL の PBS (Irvine Scientific) 中に再懸濁させた。RNA は、ペレット化した脾細胞から当該技術分野において知られた標準的な手法を用いて単離した。

【0158】

RT - PCR は脾細胞 RNA に対して、マウス重鎖可変領域(VH) 遺伝子セグメント(Novagen)に特異的な一組の縮重プライマー、およびマウス Ig G1 CH2 プライマー(CGATGGGGGC AGGGAAAGCT GCAC; 配列番号: 40)を用いて行なった。PCR 産物をゲル精製し、pCR 2.1 - TOPO TA (Invitrogen) 内にクローニングし、M13 フォワード(GTAAAAACGAC GGCGAG; 配列番号: 41)および M13 リバース(CAGGAAACAG CTATGAC; 配列番号: 42)プライマー(ベクター配列内クローニング部位にランギングする位置に配置)を用いて配列決定した。19 個のクローンを配列決定し、重鎖遺伝子の使用および Ig G1 定常領域の再構成 VH と CH2 の接合部の配列を決定した(表 2)。

【0159】

【表2 - 1】

クローン	表2 重鎖遺伝子の使用		
	V _H	D _H	J _H
B1	1-58	3-2	2
B2	1-26	4-1	1
B3	1-50	2-14	2
B4	1-58	3-2	2
B5	14-2	4-1	4
D2	3-6	1-1	4
D5	14-1	3-3	2
D6	14-2	4-1	3
D7	3-6	1-1	4

10

【0160】

【表2 - 2】

E2	7-1	3-1	4
E3	1-50	2-14	2
E4	1-50	2-14	2
E7	1-50	2-14	2
E8	1-72	1-1	4
E10	1-42	1-1	1
F6	5-6	1-1	1
F7	5-6	1-1	1
F8	5-6	1-1	1
F10	5-6	1-1	1

20

図12は、19個のRT-PCRクローンのうち11個の、IgG1定常領域のCH2に対して再構成されたVHドメインの配列アラインメントを示す。図12に示した配列は、異なるマウス重鎖V、DおよびJ遺伝子セグメントならびにCH1とヒンジ領域が欠如しているマウスIgG1が関与する独特な再構成を示す。内因性IgG1定常領域遺伝子のCH1とヒンジ領域の欠失についてホモ接合性のマウスは、CH1とヒンジ領域が欠如しているマウスIgG1定常領域由来のCH2-CH3領域に作動可能に連結されたマウスVHドメインを含む重鎖の產生能を有し、CH1とヒンジ領域が欠如しており、軽鎖を欠いているマウスIgG1重鎖を発現するB細胞の生成能を有した(図8および9)。このような再構成は、該変異遺伝子座により、このようなマウスにおいて、多数の個々のB細胞内でマウス重鎖遺伝子セグメントが独立して再構成され得、通常ラクダに見られるものと類似した重鎖抗体が生成されたことを示す。さらに、この実施例は、内因性IgG1のCH1とヒンジ領域の欠失により、該遺伝子座が作動不可能にならなかった、または該変異IgG1定常領域が関与する組換えは抑制されなかつたことを示す。このようなマウスでは、B細胞発生になんら検出可能な欠陥を有することなく内因性レパートリーの一部として、CH1とヒンジ領域が欠如しているIgG1を含む機能性の重鎖抗体が作製された。

30

【0161】

B. IgG1-CH1欠失についてホモ接合性のマウス

同様の様式で、IgG1-CH1変異についてホモ接合性のマウスを、V-D-J組換えおよびヒト重鎖遺伝子の使用について、脾細胞から単離されたRNAを用いて逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって解析した。

40

50

【0162】

簡単には、脾臓を2匹のホモ接合性 IgG1 - CH1マウスから、この実施例のセクションAにおいて上記のようにして単離した。CD19⁺ B細胞を、磁気細胞分取(MACS, Miltenyi Biotech)を用いてプールされた脾細胞から単離した。分取したCD19⁺ B細胞から、Qiagen ALLPREP(商標)DNA/RNAミニキット(Qiagen)を用いてRNAを抽出した。第1鎖cDNAを、SUPERSCRIP(商標)III逆転写酵素およびOligo(dT)20プライマー(Invitrogen)を用いて合成した。次いで、このcDNAを、ヒト重鎖可変リーダー配列に結合するように設計された3'マウスIgG1ヒンジ特異的プライマーおよび5'縮重プライマーを用いて行なうPCR用の鑄型として使用した(表3)。PCR産物をPCR2.1 TOPO(商標)TAベクター(Invitrogen)内にクローニングし、M13フォワードおよびM13リバースプライマーを用いて配列決定した(この実施例のセクションAにおいて上記のとおりに)。

【0163】

【表3】

表3		
プライマー	配列(5'-3')	配列番号
hVHL-1	TCACCATGGA CTGSACCTGG A	43
hVHL-2	CCATGGACAC ACTTTGYTCC AC	44
hVHL-3	TCACCATGGA GTTTGGGCTG AGC	45
hVHL-4	AGAACATGAA ACAYCTGTGG TTCTT	46
hVHL-5	ATGGGGTCAA CCGCCATCCT	47
hVHL-6	ACAATGTCTG TCTCCTTCCT CAT	48
3' mIgG1 ヒンジ	GCAAGGCTTA CAACCACAAAT C	49

IgG1 CH1についてホモ接合性のマウスにおける重鎖遺伝子の使用を決定するため、28個のRT-PCRクローナーを配列決定した。これらのクローナーにおいて、ヒトV、DおよびJ遺伝子セグメントの7つの独特な再構成が観察された(表4)。

【0164】

【表4】

クローナー	表4		
	重鎖遺伝子の使用		
	V _H	D _H	J _H
A2	1-69	6-19	6
A5	1-69	6-7	4
A8	1-8	4-4	4
C2	1-18	6-6	2
C4	1-18	3-16	6
D9	1-18	6-6	4
H8	1-18	1-7	4

図13は、表4に示した7つの再構成の、IgG1定常領域のヒンジ-CH2-CH3に対して再構成されたVHドメインの配列アラインメントを示す。図13に示す配列は、異なるヒト重鎖V、DおよびJ遺伝子セグメントおよびCH1領域が欠如しているマウスIgG1が関与する独特な再構成を示す。内因性IgG1定常領域遺伝子のCH1領域の欠失についてホモ接合性のマウスは、CH1が欠如しているマウスIgG1定常領域由来のヒンジ-CH2-CH3領域に作動可能に連結されたヒトVHドメインを含む重鎖の產生能を有し、CH1領域が欠如しており、軽鎖を欠いているマウスIgG1重鎖を発現す

10

20

30

40

50

るB細胞の生成能を有した(データ表示せず)。このような再構成は、改変遺伝子座(IgG1 C H 1 - ヒンジおよびIgG1 C H 1)の一方または両方いずれかにより、このようなマウスにおいて、多数の個々のB細胞内で重鎖遺伝子セグメント(マウスおよびヒト)が独立して再構成され得、通常ラクダに見られるものと類似した重鎖抗体が生成されたことを示す。さらに、この実施例は、内因性IgG1 C H 1の欠失により、該遺伝子座が作動不可能にならなかつた、またはヒト重鎖V、DおよびJ遺伝子セグメントならびに改変マウスIgG1定常領域が関与する組換えは抑制されなかつたことを示す。このようなマウスでは、B細胞発生になんら検出可能な欠陥を有することなく内因性レパートリーの一部として、ヒト重鎖VドメインおよびC H 1が欠如しているマウスIgG1を含む機能性の重鎖抗体が作製された。

10

【図1】

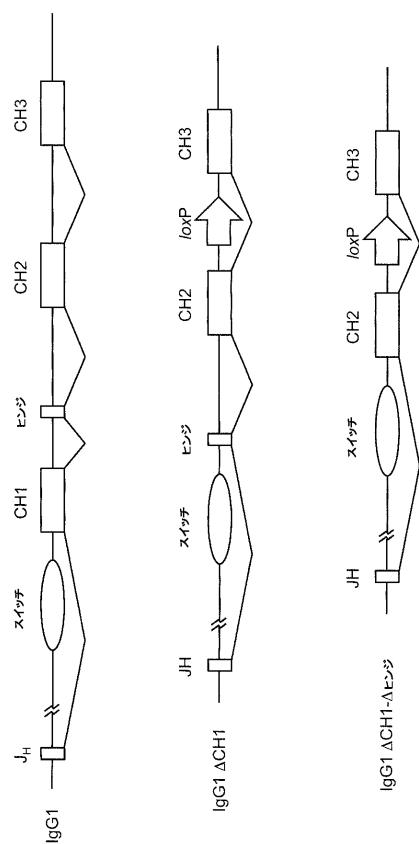


Figure 1

【図2】

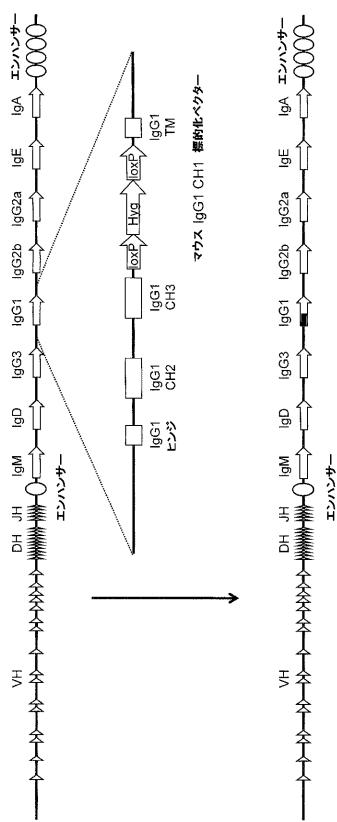
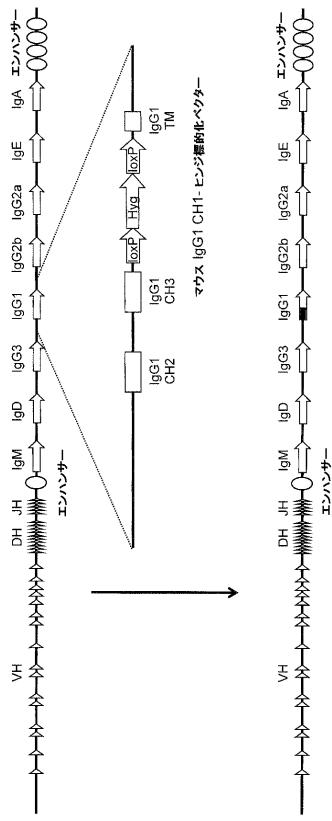


Figure 2

【図3】



【図4】

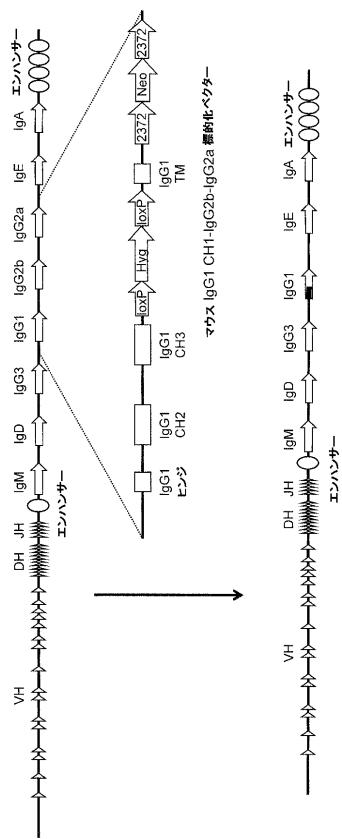
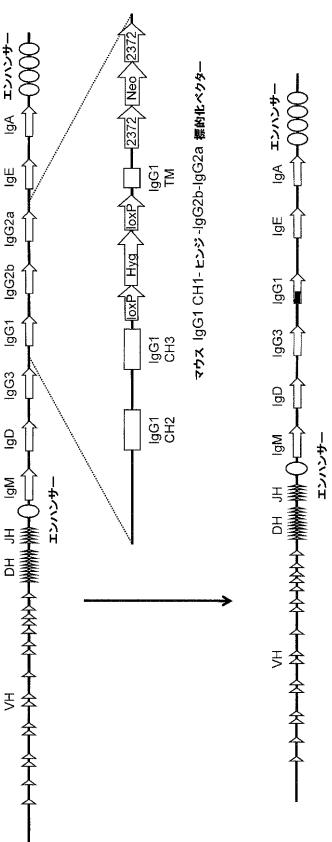


Figure 4

Figure 3

【図5】



【図6】

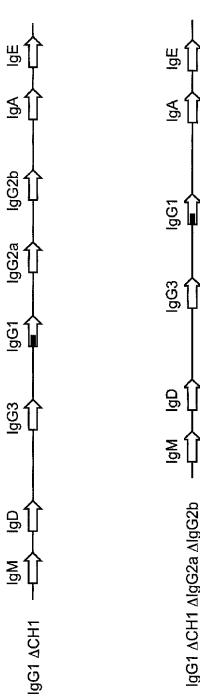


Figure 6

Figure 5

【図7】

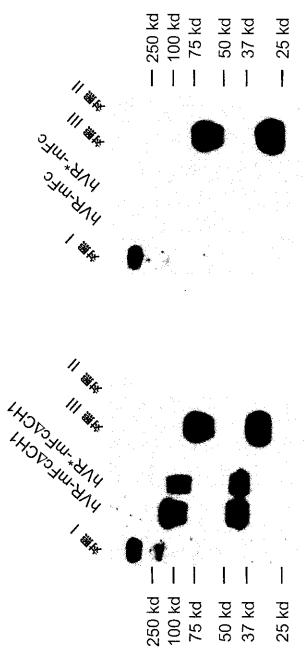


Figure 7

【図8】

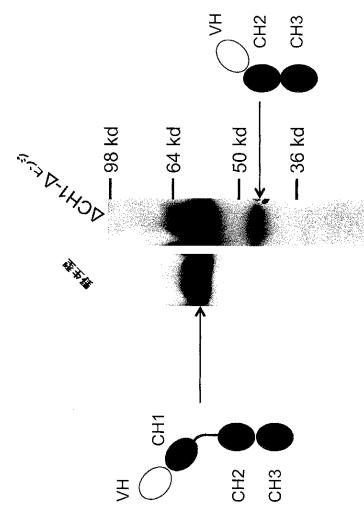


Figure 8

【図9】

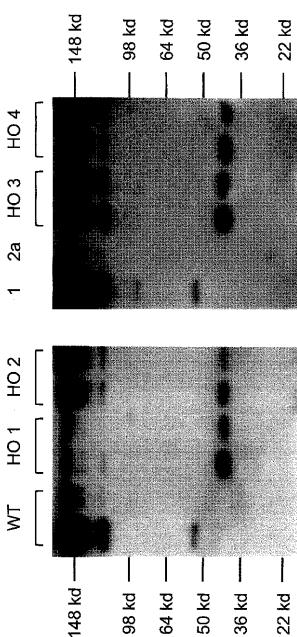


Figure 9

【図10】

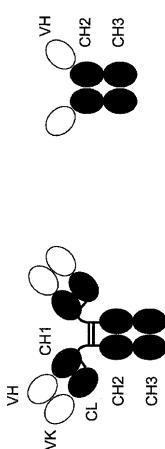


Figure 10

【図11】

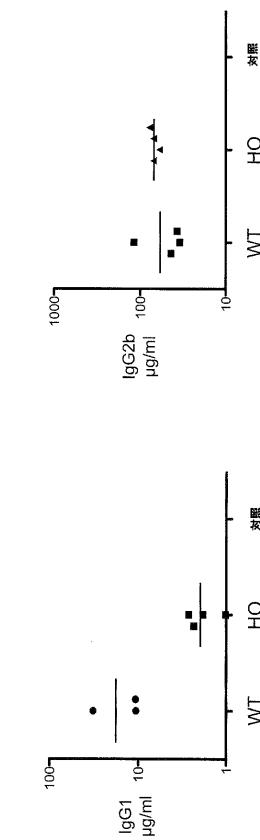


Figure 11

【図13】

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
A8	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKCAS	GYTFSTSD.	INWVROAQPQGLEIENGW	MNPNSGTT..	GYAQKFQ
C2	QVQLVQSGAEmKPGASVKVSKCAS	GYTFSTSY.	ISWVRQAFQGLEIENGW	ISAYNGNT..	YYAQnLQ
D9	QVQLVQSGAEmKPGASVKVSKCAS	GYTFSTG.	ISWVRQAFQGLEIENGW	ISAYNGNT..	YYAQnLQ
C4	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKCAS	GYTFSTG.	ISWVRQAFQGLEIENGW	ISAYNGNT..	NYAQKLQ
H8	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKCAS	GYTFSTG.	ISWVRQAFQGLEIENGW	ISAYNGNT..	NYAQnLQ
A5	QVQLVQSGAEVKPGGSVKVSKCAS	GFTFSSYA.	ISWVRQAFQGLEIENGW	IIP.FGTA..	NYAQKFQ
A2	QVQLVQSGAEVKPGGSVKVSKCAS	GFTFSSYA.	ISWVRQAFQGLEIENGW	IIP.FGTA..	NYAQKFQ
					t=22
			FR3	FR4	
A8	GRVATMTDKTSISTPAYNELLRSRSDTAVYC	ArdgfStNyd..	FDY WGQTLTVVSS	VPRDCGC	
C2	GRVATMTDKTSAfDfLRSRSDTAVYC	ArdgfStSSL..DY	WGQTLTVVSS	VPRDCGC
D9	GRVATMTDKTSAfDfLRSRSDTAVYC	ArdgfStSSL..DY	WGQTLTVVSS	VPRDCGC
C4	GRVATMTDKTSISTPAYNELLRSRSDTAVYC	ArddMTfPGViAnYYYGMDV	WGQTTTVVVS	VPRDCGC	
H8	GRVATMTDKTSISTPAYNELLRSRSDTAVYC	ArdeEL..DY	WGQTLTVVSS	VPRDCGC
A5	GRVATMTDKTSISTPAYNELLRSRSDTAVYC	ArdgfStSSL..DY	WGQTLTVVSS	VPRDCGC
A2	GRVATMTDKTSISTPAYNELLRSRSDTAVYC	AviAVAGT..YYYGMDV	WGQGTTVVSS1	VPRDCGC

Figure 13

【図12】

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
B1	EYOLQSGAEIPLRGSSVKKMSCKTS	GTFPSYCG..	INWVKORPQOQLEWIGY	TYTGCGT..	EYNEKFK
B2	EYOLQSGAEIPLRGASVAmSCLAS	GTFDLYM..	INWVKORPQOQLEWIGD	INPNNGS..	NYNQRKX
B3	OYOLQOPGAELVKGASVKKMSCKTS	GTFPSY..	INWVKORPQOQLEWIGE	IDPSGTY..	NYNQRKX
B5	EYOLQSGAEIPLKGASVKKMSCKTS	GTFPSY..	INWVKORPQOQLEWIGF	IDPSGTY..	NYNQRKX
D2	DYOLQSGEPGLVKGASVKKMSCKTS	GTSITGTY..	INWVKORPQOQLEWIGY	ISYDFG..	NMPLKX
D5	EYOLQSGAEIPLRGASVKKMSCKTS	GFIKIDY..	INWVKORPQOQLEWIGY	IDPEGDT..	ETAPKQ
D6	EYOLQSGAEIPLRGASVKKMSCKTS	GPNWDF..	INWVKORPQOQLEWIGZ	IVPEGEOT..	KSAKPQ
E2	EYKLVESGGELVKGASVKKMSCKTS	GTFSDP..	INWVKORPQOQLEWIGZ	ISNKAIDTP..	EFSASVX
E8	OYOLQSGEPGLVKGASVKKMSCKTS	GTFPSY..	INWVKORPQOQLEWIGZ	IDPSGTY..	KYNEKFK
E10	EYOLQSGAEIPLRGASVKKMSCKTS	GTFPSY..	INWVKORPQOQLEWIGZ	IDPSGTY..	NYNQRKX
F6	EYOLQSGEPGLVKGASVKKMSCKTS	GTFPSYCG..	INWVKORPQOQLEWIGZ	IDPSGTY..	YPPDSVK
			FR3	FR4	CH2
B1	GRATLTSDSSSTAYNQLSSLSSEDAVYC	ArgFGY..YFY	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
B2	GRATLTVDKSSSTAYMRLSLSEDAVYC	ArgLGRD..WFDV	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
B3	GRATLTVDKSSSTAYMRLSLSEDAVYC	ArgC..YFY	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
B5	GRATLTADTSSTAYNQLSSLSSEDAVYC	ArgGIGRE..YFY	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
D2	NRISLTfTfDfSfNQfFLfLSSLSSEDAVYC	ArgFVGD..YFY	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
D5	GRATLTADTSSTAYNQLSSLSSEDAVYC	TWSRF..YFY	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
D6	drt-Tl-TdTfDfSfNQfFLfLSSLSSEDAVYC	ArgNPP..Y	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
E2	GRFIVSRDfSfQfLfLQfNLfLSSLSSEDAVYC	ArgASfGfDf..YFY	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
E8	neKATLTfDfSfNQfFLfLSSLSSEDAVYC	ArgELINTYGTfGMDY..YFY	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
E10	AKATLTfDfSfNQfFLfLSSLSSEDAVYC	ArgDfYfSSfG..WYFDV	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI
F6	GRFTfSDfNQfFLfLSSLSSEDAVYC	ArgHfYfSSfG..WYFDV	WGQGTIVVSS	VPEVSSVTI

Figure 12

【配列表】

0005909449000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 マクドナルド, リン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10605, ホワイト ブレインズ, ゲッドニー ウェイ
16

(72)発明者 スティーブンズ, ショーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94158, サンフランシスコ, ベリー ストリート 3
55 ナンバー413

(72)発明者 マーフィー, アンドリュー ジェイ.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10520, クロトン-オン-ハドソン, ニュートン コー
ト 10

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第2008/035216 (WO, A2)

JANSSENS RICK, GENERATION OF HEAVY-CHAIN-ONLY ANTIBODIES IN MICE, PROCEEDINGS OF THE N
ATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), 米国, NATIONAL ACADEMY OF SCI
ENCE, 2006年10月10日, V103 N41, P15130-15135

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00

C12N 15/00

C12N 5/00

A01K 67/027

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

WPI DS (STN)