

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7010902号
(P7010902)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月17日(2022.1.17)

(51)国際特許分類

F I

A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	Z N A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	

請求項の数 32 外国語出願 (全116頁)

(21)出願番号	特願2019-148806(P2019-148806)	(73)特許権者	597160510 リジェネロン・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
(22)出願日	令和1年8月14日(2019.8.14)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(62)分割の表示	特願2019-6738(P2019-6738)の分割	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
原出願日	平成26年3月13日(2014.3.13)	(72)発明者	ロバート パブ アメリカ合衆国 ニュージャージー 07661, リバー エッジ, プアヒス ア 最終頁に続く
(65)公開番号	特開2019-213549(P2019-213549A)		
(43)公開日	令和1年12月19日(2019.12.19)		
審査請求日	令和1年9月12日(2019.9.12)		
(31)優先権主張番号	13/798,455		
(32)優先日	平成25年3月13日(2013.3.13)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 限られた免疫グロブリン軽鎖レパートリーを発現するマウス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

そのゲノム内に、

マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域配列に作動可能に連結された、ちょうど2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV 遺伝子セグメントと、5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ 遺伝子セグメントと

を含むように遺伝子改変されたマウス胚性幹(ES)細胞であって、該2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV 遺伝子セグメントがヒトV 1-39 遺伝子セグメントおよびヒトV 3-20 遺伝子セグメントであり、該5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ 遺伝子セグメントが、ヒトJ 1 遺伝子セグメント、ヒトJ 2 遺伝子セグメント、ヒトJ 3 遺伝子セグメント、ヒトJ 4 遺伝子セグメントおよびヒトJ 5 遺伝子セグメントである、遺伝子改変されたマウスES細胞。

【請求項2】

そのゲノム内に、

内因性重鎖遺伝子座においてマウス免疫グロブリン重鎖定常領域配列に作動可能に連結された、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンV_H 遺伝子セグメントと、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンD_H 遺伝子セグメントと、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_H 遺伝子セグメントとをさらに含む、請求項1に記載の遺伝子改変されたマウスES細胞。

【請求項3】

前記 E S 細胞の前記ゲノムが、再構成して免疫グロブリン重鎖可変領域を形成できる内因性マウス免疫グロブリン V_H 遺伝子セグメントを含まない、請求項 2 に記載の遺伝子改変された E S 細胞。

【請求項 4】

前記 2 つの再構成されていないヒト免疫グロブリン V_H 遺伝子セグメントと、5 つの再構成されていないヒト免疫グロブリン J_H 遺伝子セグメントが、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の遺伝子改変された E S 細胞。

【請求項 5】

前記遺伝子改変されたマウス E S 細胞の前記ゲノムが、機能的な 軽鎖遺伝子座を含まない、請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変された E S 細胞。

10

【請求項 6】

前記マウス軽鎖定常領域がマウス C_H 定常領域である、請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変されたマウス E S 細胞。

【請求項 7】

前記マウス C_H 定常領域が内因性マウス C_H 定常領域である、請求項 6 に記載の遺伝子改変されたマウス E S 細胞。

【請求項 8】

前記遺伝子改変されたマウス E S 細胞のゲノム内の前記ヒト V_H 1 - 3 9 遺伝子セグメントがヒト生殖系列 V_H 1 - 3 9 遺伝子セグメントであり、前記遺伝子改変されたマウス E S 細胞の前記ゲノム内の前記ヒト V_H 3 - 2 0 遺伝子セグメントがヒト生殖系列 V_H 3 - 2 0 遺伝子セグメントである、請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変されたマウス E S 細胞。

20

【請求項 9】

前記遺伝子改変されたマウス E S 細胞の前記ゲノムが、前記ヒト V_H 1 - 3 9 遺伝子セグメント、前記ヒト V_H 3 - 2 0 遺伝子セグメント、前記ヒト J_H 1 遺伝子セグメント、前記ヒト J_H 2 遺伝子セグメント、前記ヒト J_H 3 遺伝子セグメント、前記ヒト J_H 4 遺伝子セグメント、および、前記ヒト J_H 5 遺伝子セグメントを順に含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変されたマウス E S 細胞。

【請求項 10】

前記遺伝子改変されたマウス E S 細胞の前記ゲノムが、D L C - 5 J 遺伝子座を含み、該 D L C - 5 J 遺伝子座が、配列番号 3 8 ~ 4 9 より選択される h V_H / h J_H / m C 接合部配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたマウス E S 細胞。

30

【請求項 11】

請求項 1 または請求項 2 に記載の遺伝子改変された E S 細胞に由来するマウス胚。

【請求項 12】

代理母において請求項 11 に記載のマウス胚を懐胎させ、該代理母に、全体的にまたは部分的に前記遺伝子改変された E S 細胞に由来する子孫を出産させることを含む、マウスを作製する方法。

【請求項 13】

遺伝子改変されたマウス E S 細胞を作製する方法であって、E S 細胞を、そのゲノム内に、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域配列に作動可能に連結された、ちょうど 2 つの再構成されていないヒト免疫グロブリン V_H 遺伝子セグメントと、5 つの再構成されていないヒト免疫グロブリン J_H 遺伝子セグメントと

40

を含むように遺伝子改変することを含み、ここで、該 2 つの再構成されていないヒト免疫グロブリン V_H 遺伝子セグメントがヒト V_H 1 - 3 9 遺伝子セグメントおよびヒト V_H 3 - 2 0 遺伝子セグメントであり、該 5 つの再構成されていないヒト免疫グロブリン J_H 遺伝子セグメントが、ヒト J_H 1 遺伝子セグメント、ヒト J_H 2 遺伝子セグメント、ヒト J_H 3 遺伝子セグメント、ヒト J_H 4 遺伝子セグメントおよびヒト J_H 5 遺伝子セグメントである、方法。

【請求項 14】

50

前記遺伝子改変されたマウスES細胞が、そのゲノム内に、
内因性重鎖遺伝子座においてマウス免疫グロブリン重鎖定常領域配列に作動可能に連結された、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントと、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンD_H遺伝子セグメントと、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_H遺伝子セグメントとをさらに含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記マウス軽鎖定常領域がマウスC_κ定常領域である、請求項13または請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記マウス軽鎖定常領域が内因性マウスC_κ定常領域である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記遺伝子改変されたES細胞の前記ゲノムが、再構成して免疫グロブリン重鎖可変領域を形成できる内因性マウス免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントを含まない、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前記2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントと、5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_H遺伝子セグメントが、内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に存在する、請求項13～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記遺伝子改変されたマウスES細胞の前記ゲノムが機能的な軽鎖遺伝子座を含まない、請求項13または請求項14に記載の方法。

【請求項20】

前記遺伝子改変されたマウスES細胞の前記ゲノム内の前記ヒトV_H1-39遺伝子セグメントがヒト生殖系列V_H1-39遺伝子セグメントであり、前記遺伝子改変されたマウスES細胞の前記ゲノム内の前記ヒトV_H3-20遺伝子セグメントがヒト生殖系列V_H3-20遺伝子セグメントである、請求項13または請求項14に記載の方法。

【請求項21】

前記遺伝子改変されたマウスES細胞の前記ゲノムが、前記ヒトV_H1-39遺伝子セグメント、前記ヒトV_H3-20遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H1遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H2遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H3遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H4遺伝子セグメント、および、前記ヒトJ_H5遺伝子セグメントを順に含む、請求項13または請求項14に記載の方法。

【請求項22】

前記遺伝子改変されたマウスES細胞が、DLC-5J遺伝子座を含み、該DLC-5J遺伝子座が、配列番号38～49より選択されるhV_H/hJ_H/mC_κ接合部配列を含む、請求項13～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

遺伝子改変されたマウスを作製する方法であって、マウスの生殖系列ゲノムを、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域配列に作動可能に連結された、ちょうど2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントと、5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_H遺伝子セグメントとを含むように遺伝子改変することを含み、ここで、該2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントがヒトV_H1-39遺伝子セグメントおよびヒトV_H3-20遺伝子セグメントであり、該5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_H遺伝子セグメントが、ヒトJ_H1遺伝子セグメント、ヒトJ_H2遺伝子セグメント、ヒトJ_H3遺伝子セグメント、ヒトJ_H4遺伝子セグメントおよびヒトJ_H5遺伝子セグメントであり、

該遺伝子改変されたマウスが、そのゲノム内に、

内因性重鎖遺伝子座においてマウス免疫グロブリン重鎖定常領域配列に作動可能に連結さ

10

20

30

40

50

れた、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントと、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンD_H遺伝子セグメントと、1つまたは複数の再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_H遺伝子セグメントとをさらに含む、方法。

【請求項24】

前記マウス軽鎖定常領域がマウスC定常領域である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記マウス軽鎖定常領域が内因性マウスC定常領域である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記遺伝子改変されたマウスの前記ゲノムが、再構成して免疫グロブリン重鎖可変領域を形成できる内因性マウス免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントを含まない、請求項23に記載の方法。

10

【請求項27】

前記2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントと、5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_H遺伝子セグメントが、内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に存在する、請求項23～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記遺伝子改変されたマウスの前記ゲノムが非機能的な免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項29】

前記遺伝子改変されたマウスの前記ゲノムが機能的な軽鎖遺伝子座を含まない、請求項23に記載の方法。

20

【請求項30】

前記遺伝子改変されたマウスの前記ゲノム内の前記ヒトV_H1-39遺伝子セグメントがヒト生殖系列V_H1-39遺伝子セグメントであり、前記遺伝子改変されたマウスの前記ゲノム内の前記ヒトV_H3-20遺伝子セグメントがヒト生殖系列V_H3-20遺伝子セグメントである、請求項23に記載の方法。

【請求項31】

前記遺伝子改変されたマウスの前記ゲノムが、前記ヒトV_H1-39遺伝子セグメント、前記ヒトV_H3-20遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H1遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H2遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H3遺伝子セグメント、前記ヒトJ_H4遺伝子セグメント、および、前記ヒトJ_H5遺伝子セグメントを順に含む、請求項23に記載の方法。

30

【請求項32】

前記遺伝子改変されたマウスが、DLC-5J遺伝子座を含み、該DLC-5J遺伝子座が、配列番号38～49より選択されるhV_H/hJ_H/mC_H接合部配列を含む、請求項23～29のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

本出願は、2013年3月13日に提出された米国特許出願第13/798,455号の利益を、米国特許法§119(e)の下で請求し、この出願は、その全体が参照によって本明細書により組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願では、2014年3月13日に「2010794-0550__ST25」という名称のasciitxtファイルとして電子形式で提出された配列表に言及する。このtxtファイルは2014年3月11日に作成されたものであり、サイズは33kbである。

【0003】

50

多様なヒト可変/マウス定常重鎖と結合した共通のヒト可変/マウス定常軽鎖を有する抗体を発現する遺伝子改変マウスが提供される。マウスのB細胞のヒト可変領域遺伝子配列からヒト二重特異性抗体を作製するための方法が提供される。

【背景技術】

【0004】

抗体は、一般には、ホモ二量体重鎖成分を含み、各重鎖単量体は同一の軽鎖と結合している。治療用抗体としてはヘテロ二量体重鎖成分を有する抗体（例えば二重特異性抗体）が望ましい。しかし、二重特異性抗体の重鎖のそれぞれと十分に結合することができる適切な軽鎖成分を有する二重特異性抗体を作製することには問題があることが判明している。

【0005】

1つの手法では、全ての軽鎖可変ドメインに関する使用統計値を調査し、ヒト抗体において最も頻繁に使用される軽鎖を同定し、その軽鎖を *in vitro* において特異性が異なる2種の重鎖と対合させることによって軽鎖を選択することができる。

【0006】

別の手法では、ファージディスプレイライブラリー（例えば、ヒト軽鎖可変領域配列を含むファージディスプレイライブラリー、例えば、ヒト *scFv* ライブラリー）における軽鎖配列を観察し、最も一般的に使用される軽鎖可変領域をライブラリーから選択することによって軽鎖を選択することができる。次いで、その軽鎖を2種の異なる目的の重鎖に対して試験することができる。

【0007】

別の手法では、目的の重鎖の両方の重鎖可変配列をプローブとして使用して軽鎖可変配列のファージディスプレイライブラリーをアッセイすることによって軽鎖を選択することができる。重鎖可変配列の両方と結合する軽鎖をそれらの重鎖に対する軽鎖として選択することができる。

【0008】

別の手法では、候補軽鎖を重鎖のコグネイト軽鎖とアライメントし、両方の重鎖のコグネイト軽鎖に共通する配列特性により密接にマッチするように軽鎖に改変を行う。免疫原性の機会を最小化する必要がある場合、改変により、既知のヒト軽鎖配列に存在する配列がもたらされ、その結果、タンパク質プロセッシングにより免疫原性の可能性を評価するための当技術分野で公知のパラメータおよび方法（すなわち、*in silico* アッセイならびにウェットアッセイ）に基づいて、T細胞エピトープが生じる可能性が低くなることが好ましい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上記の手法は全て、いくつもの先験的な制約、例えば、配列同一性、特定の予め選択された重鎖と結合する能力などを包含する *in vitro* における方法に依拠する。当技術分野において、共通の軽鎖を含むヒトエピトープ結合タンパク質を作製するために、*in vitro* 条件を操作することには依拠せず、その代わりに、より生物学的に理にかなっている手法を使用する組成物および方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変ドメインを発現する遺伝子改変マウスであって、限定された軽鎖可変レパートリーを有するマウスが提供される。親和性成熟したヒト重鎖可変ドメインの多様なレパートリーと結合し、共に発現するヒト軽鎖可変ドメインを生成するための生物系が提供される。免疫グロブリン可変ドメインを含む結合タンパク質を作製するための方法であって、限定された免疫グロブリン軽鎖レパートリーを有するマウスを、目的の抗原を用いて免疫するステップ、および、マウスの免疫グロブリン可変領域遺伝子配列を、目的の抗原に特異的に結合する結合タンパク質に使用するステップを含む方法が提供される。方法は、多重特異性抗原結合タンパク質の作製において使用するために

10

20

30

40

50

適したヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを作製するための方法を含む。

【0011】

再構成されていないヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントのレポーターに由来する適切な親和性成熟したヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを選択する遺伝子操作されたマウスであって、親和性成熟したヒト重鎖可変ドメインが、1つのヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントに由来する単一のヒト軽鎖可変ドメインと結合し、共に発現するマウスが提供される。2つのヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントの選択を示す遺伝子操作されたマウスも提供される。種々の態様では、1つまたは2つの遺伝子セグメントはヒトV_H 1 - 39およびヒトV_H 3 - 20を含む。

【0012】

ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントの限定されたレポーターからヒト軽鎖可変ドメインの限定されたレポーターまたは単一のヒト軽鎖可変ドメインを発現する遺伝子操作されたマウスが提供される。一部の実施形態では、提供されるマウスは、再構成されて単一の軽鎖を発現する（または2つの軽鎖のいずれかもしくはその両方を発現する）再構成されたヒト軽鎖可変領域遺伝子（または2つの再構成された軽鎖可変領域遺伝子）を形成する単一の再構成されていないヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント（または2つのヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント）を含むように遺伝子操作されている。再構成されたヒト軽鎖可変ドメインは、マウスにより選択された複数の親和性成熟したヒト重鎖と対合させることができ、重鎖可変領域は異なるエピトープに特異的に結合する。

【0013】

ヒト軽鎖可変領域配列の限定されたレポーターからヒト軽鎖可変ドメインの限定されたレポーターまたは単一のヒト軽鎖可変ドメインを発現する遺伝子操作されたマウスが提供される。一部の実施形態では、提供されるマウスは、単一の軽鎖の可変領域を発現する（または2つの可変領域のいずれかもしくはその両方を発現する）単一のV/Jヒト軽鎖配列（または2つのV/J配列）を含むように遺伝子操作されている。可変配列を含む軽鎖は、マウスによりクローン選択された複数の親和性成熟したヒト重鎖と対合させることができ、重鎖可変領域は異なるエピトープに特異的に結合する。

【0014】

一態様では、ヒトJ遺伝子セグメント（1つまたは複数のJ_Lセグメントから選択される）と共に再構成することが可能であり、免疫グロブリン軽鎖のヒトV_Lドメインをコードする単一のヒト免疫グロブリン軽鎖可変（V_L）領域遺伝子セグメントを含む遺伝子改変マウスが提供される。別の態様では、それぞれが、ヒトJ遺伝子セグメント（1つまたは複数のJ_Lセグメントから選択される）と共に再構成することが可能であり、免疫グロブリン軽鎖のヒトV_Lドメインをコードする2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントを含む遺伝子改変マウスが提供される。一部の実施形態では、2つのヒトV_L遺伝子セグメントはマウスのゲノム内で並列している。一部の実施形態では、2つのヒトV_L遺伝子セグメントはマウスのゲノム内の異なる遺伝子座に存在する（例えば、第1の軽鎖対立遺伝子に第1のヒトV_Lセグメント、および第2の軽鎖対立遺伝子に第2のヒトV_Lセグメントを含み、第1のヒトV_Lセグメントと第2のヒトV_Lセグメントが同一ではないヘテロ接合体）。一部の実施形態では、2つのヒトV_L遺伝子セグメントはヒトV_H 1 - 39遺伝子セグメントおよびヒトV_H 3 - 20遺伝子セグメントである。一実施形態では、ヒトJ_L遺伝子セグメントは、J_L 1、J_L 2、J_L 3、J_L 4、J_L 5、およびこれらの対での組合せからなる群から選択される。種々の実施形態では、提供される遺伝子操作されたマウスは、内因性V_L遺伝子セグメントを含有する免疫グロブリン軽鎖を発現することができない。例えば、一部の実施形態では、提供される遺伝子操作されたマウスは、内因性V_L遺伝子セグメントの一部または全部が不活化され、かつ/または除去される遺伝子改変を含有する。

【0015】

一実施形態では、単一のヒトV_L遺伝子セグメントは、J_L 1、J_L 2、J_L 3、J_L 4、およびJ_L 5から選択されるヒトJ_L遺伝子セグメントに作動可能に連結しており、単

10

20

30

40

50

一のヒトV_L遺伝子セグメントは、軽鎖可変領域遺伝子をコードする配列が形成されるように1つまたは複数のヒトJ_L遺伝子セグメントのいずれかと共に再構成することが可能である。

【0016】

一実施形態では、提供される遺伝子改変マウスは、免疫グロブリン軽鎖遺伝子が形成されるように再構成することが可能な内因性マウスV_L遺伝子セグメントを含まない免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含み、V_L遺伝子座は、軽鎖遺伝子のV_L領域をコードするように再構成することが可能な単一のヒトV_L遺伝子セグメントを含有する。特定の実施形態では、ヒトV_L遺伝子セグメントは、ヒトV_{1-39J5}遺伝子セグメントまたはヒトV_{3-20J1}遺伝子セグメントである。一部の実施形態では、提供される遺伝子改変マウスは、免疫グロブリン軽鎖遺伝子が形成されるように再構成することが可能な内因性マウスV_L遺伝子セグメントを含まないV_L遺伝子座を含み、V_L遺伝子座は、軽鎖遺伝子のV_L領域をコードするように再構成することが可能な2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントを含む。いくつかのある特定の実施形態では、2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントは、ヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメント、ヒトV₃₋₂₀遺伝子セグメント、およびこれらの組合せからなる群から選択される。一部のある特定の実施形態では、2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントはヒトV_{1-39J5}遺伝子セグメントおよびヒトV_{3-20J1}遺伝子セグメントである。

10

【0017】

一態様では、免疫グロブリン軽鎖のヒトV_Lドメインをコードする単一の再構成された(V/J)ヒト免疫グロブリン軽鎖可変(V_L)領域(すなわち、V_L/J_L領域)を含む遺伝子改変マウスが提供される。別の態様では、マウスは、免疫グロブリン軽鎖のヒトV_Lドメインをコードすることができる2つ以下の再構成されたヒトV_L領域を含む。

20

【0018】

一実施形態では、V_L領域は、再構成されたヒトV_{1-39/J}配列または再構成されたヒトV_{3-20/J}配列である。一実施形態では、再構成されたV_L/J_L配列のヒトJ_Lセグメントは、J₁、J₂、J₃、J₄、およびJ₅から選択される。特定の実施形態では、V_L領域は、ヒトV_{1-39J5}配列またはヒトV_{3-20J1}配列である。特定の実施形態では、マウスはヒトV_{1-39J5}配列およびヒトV_{3-20J1}配列の両方を有する。

30

【0019】

一実施形態では、ヒトV_L遺伝子セグメントは、ヒトまたはマウスリーダー配列に作動可能に連結している。一実施形態では、リーダー配列はマウスリーダー配列である。特定の実施形態では、マウスリーダー配列はマウスV₃₋₇リーダー配列である。特定の実施形態では、リーダー配列は、再構成されていないヒトV_L遺伝子セグメントに作動可能に連結している。特定の実施形態では、リーダー配列は、再構成されたヒトV_L/J_L配列に作動可能に連結している。

【0020】

一実施形態では、V_L遺伝子セグメントは、免疫グロブリンプロモーター配列に作動可能に連結している。一実施形態では、プロモーター配列はヒトプロモーター配列である。特定の実施形態では、ヒト免疫グロブリンプロモーターはヒトV₃₋₁₅プロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターは、再構成されていないヒトV_L遺伝子セグメントに作動可能に連結している。特定の実施形態では、プロモーターは、再構成されたヒトV_L/J_L配列に作動可能に連結している。

40

【0021】

一実施形態では、軽鎖遺伝子座は、5'側(V_L遺伝子セグメントの転写方向に対して)がヒト免疫グロブリンプロモーターに隣接し、3'側が、ヒトJセグメントと共に再構成されたヒトV_L遺伝子セグメントに隣接するリーダー配列を含み、内因性マウス軽鎖定常領域(C_L)を含むリバースキメラ軽鎖のV_Lドメインをコードする。特定の実施形態では、V_L遺伝子セグメントはマウスV_L遺伝子座にあり、マウスC_LはマウスC_Lである。

50

【 0 0 2 2 】

一実施形態では、軽鎖遺伝子座は、5'側 (V_L 遺伝子セグメントの転写方向に対して) がヒト免疫グロブリンプロモーターに隣接し、3'側が再構成されたヒト V_L 領域 (V_L/J_L 配列) に隣接するリーダー配列を含み、内因性マウス軽鎖定常領域 (C_L) を含むリバースキメラ軽鎖の V_L ドメインをコードする。特定の実施形態では、再構成されたヒト V_L/J_L 配列はマウス κ () 遺伝子座にあり、マウス C_L はマウス C_L である。

【 0 0 2 3 】

一実施形態では、改変マウスの V_L 遺伝子座は 軽鎖遺伝子座であり、 軽鎖遺伝子座は、マウス κ イントロンエンハンサー、マウス λ 3'エンハンサーまたはイントロンエンハンサーと3'エンハンサーの両方を含む。

10

【 0 0 2 4 】

一実施形態では、マウスは、非機能的な免疫グロブリンラムダ () 軽鎖遺伝子座を含む。特定の実施形態では、 軽鎖遺伝子座は、遺伝子座の1つまたは複数の配列の欠失を含み、1つまたは複数の欠失により、 軽鎖遺伝子座は、再構成して軽鎖遺伝子を形成することができない。別の実施形態では、 軽鎖遺伝子座の V_L 遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全てが欠失している。

【 0 0 2 5 】

一実施形態では、マウスにより、ヒト V_L 遺伝子セグメントに由来する体細胞変異した V_L ドメインを含む軽鎖が作製される。一実施形態では、軽鎖は、ヒト V_L 遺伝子セグメントに由来する体細胞変異した V_L ドメイン、およびマウス C_L 領域を含む。一実施形態では、マウスは 軽鎖を発現しない。

20

【 0 0 2 6 】

一実施形態では、遺伝子改変マウスは、ヒト V_L 領域配列を体細胞超変異させることができる。特定の実施形態では、マウスは、再構成可能であり、 V_L ドメインをコードするヒト V_L 遺伝子セグメントに由来する再構成された免疫グロブリン軽鎖遺伝子を含む細胞を含み、再構成された免疫グロブリン軽鎖遺伝子は、体細胞変異した V_L ドメインを含む。

【 0 0 2 7 】

一実施形態では、マウスは、マウス C_H と連結した、体細胞変異したヒト V_H ドメインを含む軽鎖を発現する細胞を含み、軽鎖はヒト V_H 遺伝子セグメントに由来する体細胞変異した V_H ドメインを含む重鎖と結合しており、重鎖はマウス重鎖定常領域 (C_H) を含む。特定の実施形態では、重鎖は、マウス C_H1 、マウスヒンジ、マウス C_H2 、およびマウス C_H3 を含む。特定の実施形態では、重鎖は、ヒト C_H1 、ヒンジ、マウス C_H2 、およびマウス C_H3 を含む。

30

【 0 0 2 8 】

一実施形態では、マウスは、内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの、1つまたは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置き換えを含み、ヒト V_H 遺伝子セグメントはマウス C_H 領域遺伝子に作動可能に連結しており、その結果、マウスは、ヒト V_H 遺伝子セグメントを再構成し、ヒト V_H ドメインおよびマウス C_H を含むリバースキメラ免疫グロブリン重鎖を発現する。一実施形態では、再構成されていないマウス V_H 遺伝子セグメントの90 - 100%が少なくとも1つの再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントで置き換えられている。特定の実施形態では、内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全てが少なくとも1つの再構成されていないヒト V_H 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、置き換えは、少なくとも19個、少なくとも39個または少なくとも80個または81個の再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントによるものである。一実施形態では、置き換えは、少なくとも12個の機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメント、少なくとも25個の機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントまたは少なくとも43個の機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントによるものである。一実施形態では、マウスは、マウス D_H および J_H セグメントの全ての、少なくとも1つの再構成されていないヒト D_H セグメントおよび少なくとも1つの再構成されていないヒト J_H セグメントでの置き換えを含む。一実施形態では、少な

40

50

くとも1つの再構成されていないヒトD_Hセグメントは、1-1、D1-7、1-26、2-8、2-15、3-3、3-10、3-16、3-22、5-5、5-12、6-6、6-13、7-27、およびこれらの組合せから選択される。一実施形態では、少なくとも1つの再構成されていないヒトJ_Hセグメントは、1、2、3、4、5、6、およびこれらの組合せから選択される。特定の実施形態では、1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメントは、1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1ヒトV_H遺伝子セグメント、およびこれらの組合せから選択される。

【0029】

一実施形態では、マウスは、目的の抗原に特異的に結合する結合タンパク質を発現するB細胞を含み、結合タンパク質はヒトV_L 1-39/J_L 5再構成またはヒトV_L 3-20/J_L 1再構成に由来する軽鎖を含み、細胞は1-69、2-5、3-13、3-23、3-30、3-33、3-53、4-39、4-59、および5-51遺伝子セグメントから選択されるヒトV_H遺伝子セグメントの再構成に由来する再構成された免疫グロブリン重鎖遺伝子を含む。一実施形態では、1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメントは、1、2、3、4、5、および6から選択されるヒト重鎖J_H遺伝子セグメントと共に再構成される。一実施形態では、1つまたは複数のヒトV_HおよびJ_H遺伝子セグメントは、1-1、1-7、1-26、2-8、2-15、3-3、3-10、3-16、3-22、5-5、5-12、6-6、6-13、および7-27から選択されるヒトD_H遺伝子セグメントと共に再構成される。特定の実施形態では、軽鎖遺伝子は、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つまたはそれ超の体細胞超変異を有する。

【0030】

一実施形態では、マウスは、2-5/6-6/1、2-5/3-22/1、3-13/6-6/5、3-23/2-8/4、3-23/3-3/4、3-23/3-10/4、3-23/6-6/4、3-23/7-27/4、3-30/1-1/4、3-30/1-7/4、3-30/3-3/3、3-30/3-3/4、3-30/3-22/5、3-30/5-5/2、3-30/5-12/4、3-30/6-6/1、3-30/6-6/3、3-30/6-6/4、3-30/6-6/5、3-30/6-13/4、3-30/7-27/4、3-30/7-27/5、3-30/7-27/6、3-33/1-7/4、3-33/2-15/4、4-39/1-26/3、4-59/3-16/3、4-59/3-16/4、4-59/3-22/3、5-51/3-16/6、5-51/5-5/3、5-51/6-13/5、3-53/1-1/4、1-69/6-6/5、および1-69/6-13/4から選択されるV_H/D_H/J_H領域を含む再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含むB細胞を含む。特定の実施形態では、B細胞は、マウス重鎖定常領域と融合したヒト免疫グロブリン重鎖可変領域、およびマウス軽鎖定常領域と融合したヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む結合タンパク質を発現する。

【0031】

一実施形態では、再構成されたヒトV_L領域はヒトV_L 1-39/J_L 5配列であり、マウスは、(i)マウスC_H、および(ii)1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1ヒトV_H遺伝子セグメント、およびこれらの組合せから選択されるヒトV_H遺伝子セグメントに由来する体細胞変異したヒトV_Hドメインを含むリバースキメラ重鎖と結合した、(i)ヒトV_L/J_L配列に由来するV_Lドメイン、および(ii)マウスC_Lを含むリバースキメラ軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、体細胞変異した軽鎖を発現する。一実施形態では、C_LはマウスC_Lである。特定の実施形態では、ヒトV_H遺伝子セグメントは、2-5、3-13、3-23、3-30、4-59、5-51、および1-69遺伝子セグメントから選択される。特定の実施形態では、体細胞変異したヒトV_Hドメイン

10

20

30

40

50

は、1 - 1、1 - 7、2 - 8、3 - 3、3 - 10、3 - 16、3 - 22、5 - 5、5 - 12、6 - 6、6 - 13、および7 - 27から選択されるD_Hセグメントに由来する配列を含む。特定の実施形態では、体細胞変異したヒトV_Hドメインは、1、2、3、4、5、および6から選択されるJ_Hセグメントに由来する配列を含む。特定の実施形態では、体細胞変異したヒトV_Hドメインは、2 - 5 / 6 - 6 / 1、2 - 5 / 3 - 22 / 1、3 - 13 / 6 - 6 / 5、3 - 23 / 2 - 8 / 4、3 - 23 / 3 - 3 / 4、3 - 23 / 3 - 10 / 4、3 - 23 / 6 - 6 / 4、3 - 23 / 7 - 27 / 4、3 - 30 / 1 - 1 / 4、3 - 30 / 1 - 7 / 4、3 - 30 / 3 - 3 / 4、3 - 30 / 3 - 22 / 5、3 - 30 / 5 - 5 / 2、3 - 30 / 5 - 12 / 4、3 - 30 / 6 - 6 / 1、3 - 30 / 6 - 6 / 3、3 - 30 / 6 - 6 / 4、3 - 30 / 6 - 6 / 5、3 - 30 / 6 - 13 / 4、3 - 30 / 7 - 27 / 4、3 - 30 / 7 - 27 / 5、3 - 30 / 7 - 27 / 6、4 - 59 / 3 - 16 / 3、4 - 59 / 3 - 16 / 4、4 - 59 / 3 - 22 / 3、5 - 51 / 5 - 5 / 3、1 - 69 / 6 - 6 / 5、および1 - 69 / 6 - 13 / 4から選択される再構成されたヒトV_H / D_H / J_H配列によりコードされる。

10

【0032】

一実施形態では、再構成されたヒトV_L領域はヒトV_L 3 - 20 J 1配列であり、マウスは、(i) マウスC_H、および(ii) 1 - 2、1 - 8、1 - 24、1 - 69、2 - 5、3 - 7、3 - 9、3 - 11、3 - 13、3 - 15、3 - 20、3 - 23、3 - 30、3 - 33、3 - 48、3 - 53、4 - 31、4 - 39、4 - 59、5 - 51、6 - 1ヒトV_H遺伝子セグメント、およびこれらの組合せから選択されるヒトV_H遺伝子セグメントに由来する体細胞変異したヒトV_Hを含むリバースキメラ重鎖と結合した、(i) 再構成されたヒトV_L / J_L配列に由来するV_Lドメイン、および(ii) マウスC_Lを含むリバースキメラ軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、体細胞変異した軽鎖を発現する。一実施形態では、C_LはマウスC_Lである。特定の実施形態では、ヒトV_H遺伝子セグメントは、3 - 30、3 - 33、3 - 53、4 - 39、および5 - 51遺伝子セグメントから選択される。特定の実施形態では、体細胞変異したヒトV_Hドメインは、1 - 1、1 - 7、1 - 26、2 - 15、3 - 3、3 - 16、および6 - 13から選択されるD_Hセグメントに由来する配列を含む。特定の実施形態では、体細胞変異したヒトV_Hドメインは、3、4、5、および6から選択されるJ_Hセグメントに由来する配列を含む。特定の実施形態では、体細胞変異したヒトV_Hドメインは、3 - 30 / 1 - 1 / 4、3 - 30 / 3 - 3 / 3、3 - 33 / 1 - 7 / 4、3 - 33 / 2 - 15 / 4、4 - 39 / 1 - 26 / 3、5 - 51 / 3 - 16 / 6、5 - 51 / 6 - 13 / 5、および3 - 53 / 1 - 1 / 4から選択される再構成されたヒトV_H / D_H / J_H配列によりコードされる。

20

30

【0033】

一実施形態では、マウスは、再構成されたヒトV_L 1 - 39 J 5配列および再構成されたヒトV_L 3 - 20 J 1配列の両方を含み、マウスは、(i) マウスC_H、および(ii) 1 - 2、1 - 8、1 - 24、1 - 69、2 - 5、3 - 7、3 - 9、3 - 11、3 - 13、3 - 15、3 - 20、3 - 23、3 - 30、3 - 33、3 - 48、3 - 53、4 - 31、4 - 39、4 - 59、5 - 51、6 - 1ヒトV_H遺伝子セグメント、およびこれらの組合せから選択されるヒトV_H遺伝子セグメントに由来する体細胞変異したヒトV_Hを含むリバースキメラ重鎖と結合した(i) ヒトV_L 1 - 39 J 5配列またはヒトV_L 3 - 20 J 1配列に由来するV_Lドメインおよび(ii) マウスC_Lを含むリバースキメラ軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、体細胞変異した軽鎖を発現する。一実施形態では、C_LはマウスC_Lである。

40

【0034】

一実施形態では、内因性の再構成されていないマウスV_H遺伝子セグメントの90 - 100%が少なくとも1つの再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントで置き換えられている。特定の実施形態では、内因性の再構成されていないマウスV_H遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全てが少なくとも1つの再構成されていないヒトV_H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、置き換えは、少なくとも18個、少なくとも

50

39個、少なくとも80個または81個の再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントによるものである。一実施形態では、置き換えは、少なくとも12個の機能的な再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメント、少なくとも25個の機能的な再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントまたは少なくとも43個の再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントによるものである。

【0035】

一実施形態では、遺伝子改変マウスはC57BL系統であり、特定の実施形態では、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、およびC57BL/Olaから選択される。特定の実施形態では、遺伝子改変マウスは、上述の129系統と上述のC57BL/6系統との混合である。別の特定の実施形態では、マウスは、上述の129系統の混合または上述のBL/6系統の混合である。特定の実施形態では、混合の129系統は、129S6(129/SvEvTac)系統である。

10

【0036】

一実施形態では、マウスは、マウスC および再構成されたヒトV_H 1-39J 5配列または再構成されたヒトV_H 3-20J 1配列に由来する体細胞変異したヒトV_Lドメインを含む軽鎖、ならびにマウスC_Hおよび1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、および6-1ヒトV_H遺伝子セグメントから選択されるヒトV_H遺伝子セグメントに由来する体細胞変異したヒトV_Hドメインを含む重鎖を含むリバースキメラ抗体を発現し、マウスは完全マウス抗体を発現せず、完全ヒト抗体も発現しない。一実施形態では、マウスは、内因性マウス 軽鎖遺伝子セグメントの、再構成されたヒトV_H 1-39J 5配列または再構成されたヒトV_H 3-20J 1配列での置き換えを含み、内因性マウスV_H遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全ての、ヒトV_H遺伝子セグメントの完全なまたは実質的に完全なレパートリーでの置き換えを含む 軽鎖遺伝子座を含む。

20

【0037】

一態様では、本明細書に記載のマウスに由来する抗原特異的抗体の集団であって、抗体がヒトV_H 1-39/J 5再構成またはヒトV_H 3-20/J 1再構成に由来する軽鎖遺伝子を含み、抗体が、1-2、1-3、1-8、1-18、1-24、1-46、1-58、1-69、2-5、2-26、2-70、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-16、3-20、3-21、3-23、3-30、3-33、3-43、3-48、3-53、3-64、3-72、3-73、4-31、4-34、4-39、4-59、5-51、および6-1ヒトV_H遺伝子セグメントから選択されるヒトV_H遺伝子セグメントの再構成に由来する再構成された免疫グロブリン重鎖遺伝子を含む抗体の集団が提供される。一実施形態では、1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメントは、1、2、3、4、5、および6から選択されるヒト重鎖J_H遺伝子セグメントと共に再構成される。特定の実施形態では、軽鎖は、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つまたはそれ超の体細胞超変異を有する。

30

40

【0038】

一実施形態では、軽鎖は、1つ、2つ、3つまたは4つの体細胞超変異を有する。一実施形態では、軽鎖遺伝子は1つまたは2つの変異を有する。種々の実施形態では、軽鎖遺伝子は、その配列にそって多数の変異を受けることができる。

【0039】

一実施形態では、軽鎖が、ヒトV_H 1-39/J 5再構成に由来し、軽鎖は少なくとも1つまたは4つ以下の体細胞超変異を有する。一実施形態では、軽鎖は少なくとも2つの体細胞超変異を含む。一実施形態では、軽鎖は少なくとも3つの体細胞超変異を含む。一実施形態では、軽鎖は少なくとも4つの体細胞超変異を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのそのような体細胞超変異は軽鎖の1つまたは複数のフレームワーク領域(F

50

W) に存在する。特定の実施形態では、少なくとも1つのそのような体細胞超変異は軽鎖の1つまたは複数の相補性 (complementarity) 決定領域 (CDR) に存在する。特定の実施形態では、少なくとも1つのそのような体細胞超変異は軽鎖の1つもしくは複数のFWおよび/または1つもしくは複数のCDRに存在する。種々の実施形態では、フレームワーク領域は、フレームワーク1 (FW1)、フレームワーク2 (FW2)、フレームワーク3 (FW3)、および/またはその組合せから選択される。種々の実施形態では、CDRは、CDR1、CDR2、CDR3、および/またはその組合せから選択される。

【0040】

一実施形態では、重鎖は1つもしくは複数のFWまたは1つもしくは複数のCDRに少なくとも1つの変異を含む。一実施形態では、重鎖は1つまたは複数のFWおよび1つまたは複数のCDRに少なくとも1つの変異を含む。一実施形態では、重鎖は1つまたは複数のFWおよび1つまたは複数のCDRに少なくとも2つの変異を含む。一実施形態では、重鎖は1つまたは複数のFWおよび1つまたは複数のCDRに少なくとも3つの変異を含む。一実施形態では、重鎖は1つまたは複数のFWおよび1つまたは複数のCDRに少なくとも4つの変異を含む。一実施形態では、重鎖は1つまたは複数のFWおよび1つまたは複数のCDRに少なくとも5つまたは5つ超の変異を含み、特定の実施形態では、重鎖は2つのFWに少なくとも5つまたは5つ超の変異を含み、特定の実施形態では、重鎖は1つのFWおよび1つのCDRに少なくとも5つまたは5つ超の変異を含む。

10

【0041】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約9%がFW1に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも9%がFW1に存在する1つの変異を含む。一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約25%がCDR1に存在する少なくとも1つまたは2つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも19%がCDR1に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも5%がCDR1に存在する2つの変異を有する。

20

【0042】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約20%がFW2に存在する少なくとも1つまたは3つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも17%がFW2に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも1%がFW2に存在する2つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも1%がFW2に存在する3つの変異を有する。

30

【0043】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約10%がCDR2に存在する少なくとも1つまたは2つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも10%がCDR2に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも1%がCDR2に存在する2つの変異を有する。

【0044】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約29%がFW3に存在する少なくとも1つまたは4つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも21%がFW3に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも5%がFW3に存在する2つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも2%がFW3に存在する3つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも2%がFW3に存在する4つの変異を有する。

40

【0045】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約37%がCDR3に存在する少なくとも1つまたは4つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも27%がCDR3に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも8%がCDR3に存在する2つの変異を有し、一実施

50

形態では、軽鎖の少なくとも1%がCDR3に存在する3つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも1%がCDR3に存在する4つの変異を有する。

【0046】

一実施形態では、本明細書に記載のマウスに由来する抗原特異的抗体の集団であって、抗体がヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来する軽鎖を含み、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約9%がFW1に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約25%がCDR1に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約20%がFW2に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約10%がCDR2に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約29%がFW3に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_H 1-39/J_H 5由来の軽鎖の約37%がCDR3に存在する1つまたは複数の変異を有する抗体の集団が提供される。

10

【0047】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、重鎖の約35%がFW1に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも25%がFW1に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも9%がFW1に存在する2つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも1%がFW1に存在する3つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも1%がFW1に存在する5つ超の変異を有する。

【0048】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、重鎖の約92%がCDR1に存在する少なくとも1つまたは4つ以下の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも92%がCDR1に存在する少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも26%がCDR1に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも44%がCDR1に存在する2つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも19%がCDR1に存在する3つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも3%がCDR1に存在する4つの変異を有する。

20

【0049】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、重鎖の約66%がFW2に存在する少なくとも1つまたは3つ以下の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも66%がFW2に存在する少なくとも1つ、少なくとも2つまたは少なくとも3つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも35%がFW2に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも23%がFW2に存在する2つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも8%がFW2に存在する3つの変異を有する。

30

【0050】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、重鎖の約70%がCDR2に存在する少なくとも1つまたは4つ以下の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも70%がCDR2に存在する少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つの変異を有し、一実施形態では、少なくとも34%がCDR2に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも20%がCDR2に存在する2つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも12%がCDR2に存在する3つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも5%がCDR2に存在する4つの変異を有する。

40

【0051】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、重鎖の約91%がFW3に存在する少なくとも1つまたは5つまでまたはそれ超の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも91%がFW3に存在する少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたは少なくとも5つまたはそれ超の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも19%がFW3に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも33%がFW3に存在する2つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも22

50

%がFW3に存在する3つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも11%がFW3に存在する4つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも7%がFW3に存在する5つまたはそれ超の変異を有する。

【0052】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来し、重鎖の約63%がCDR3に存在する少なくとも1つまたは2つ以下の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも63%がCDR3に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも54%がCDR3に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも9%がCDR3に存在する2つの変異を有する。

【0053】

一実施形態では、本明細書に記載のマウスに由来する抗原特異的抗体の集団であって、抗体がヒトV_H 1-39/J_H 5再構成に由来する軽鎖を含み、重鎖の少なくとも35%がFW1に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約92%がCDR1に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約66%がFW2に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約70%がCDR2に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約91%がFW3に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約63%がCDR3に存在する1つまたは複数の変異を有する抗体の集団が提供される。

【0054】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 3-20/J_H 1再構成に由来し、軽鎖遺伝子は少なくとも1つまたは2つ以下の体細胞超変異を有し、一実施形態では、軽鎖遺伝子は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたはそれ超の体細胞超変異を有する。特定の実施形態では、変異は、軽鎖の1つまたは複数のフレームワーク領域に存在する。特定の実施形態では、変異は、軽鎖の1つまたは複数のCDR領域に存在する。特定の実施形態では、変異は、軽鎖の1つまたは複数のフレームワーク領域および/または1つまたは複数のCDR領域に存在する。種々の実施形態では、フレームワーク領域は、フレームワーク1(FW1)、フレームワーク2(FW2)、フレームワーク3(FW3)、および/またはその組合せから選択される。

【0055】

一実施形態では、軽鎖は、ヒトV_H 3-20/J_H 1再構成に由来し、V_H 3-20/J_H 1由来の軽鎖の約10%がFW1に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも10%がFW1に1つの変異を有する。

【0056】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 3-20/J_H 1再構成に由来し、V_H 3-20/J_H 1由来の軽鎖の約53%がCDR1に存在する少なくとも1つまたは2つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも27%がCDR1に1つまたは複数の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の約54%がCDR1に存在する1つまたは2つの変異を有する。

【0057】

一実施形態では、軽鎖は、ヒトV_H 3-20/J_H 1再構成に由来し、V_H 3-20/J_H 1由来の軽鎖の約6%がFW2に存在する少なくとも1つまたは2つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも6%がFW2に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも3%がFW2に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも3%がFW2に存在する2つの変異を有する。

【0058】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 3-20/J_H 1再構成に由来し、V_H 3-20/J_H 1由来の軽鎖の少なくとも約3%がCDR2に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも3%がCDR2に1つの変異を有する。

【0059】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_H 3-20/J_H 1再構成に由来し、V_H 3-20/J_H 1由来の軽鎖の約17%またはそれ超がFW3に存在する少なくとも1つまたは2つ以下の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも20%がFW3に存在する1つの変異

10

20

30

40

50

を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも17%がFW3に存在する2つの変異を有する。

【0060】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_{3-20/J}1再構成に由来し、V_{3-20/J}1由来の軽鎖の少なくとも43%がCDR3に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも43%がCDR3に1つの変異を有する。

【0061】

一実施形態では、本明細書に記載のマウスに由来する抗原特異的抗体の集団であって、抗体がヒトV_{3-20/J}1再構成に由来する軽鎖を含み、V_{3-20/J}1由来の軽鎖の約10%が少なくとも存在する1つまたは複数の変異を有し、V_{3-20/J}1由来の軽鎖の約53%がCDR1に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_{3-20/J}1由来の軽鎖の約6%がFW2に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_{3-20/J}1由来の軽鎖の約3%がCDR2に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_{3-20/J}1由来の軽鎖の約37%がFW3に存在する1つまたは複数の変異を有し、V_{3-20/J}1由来の軽鎖の約43%がCDR3に存在する1つまたは複数の変異を有する抗体の集団が提供される。

10

【0062】

一実施形態では、軽鎖は、ヒトV_{3-20/J}1再構成に由来し、重鎖の約43%がFW1に存在する少なくとも1つまたは2つ以下の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも41%がFW1に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の約41%がFW1に存在する1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の約2%がFW1に存在する2つの変異を有する。

20

【0063】

一実施形態では、軽鎖は、ヒトV_{3-20/J}1再構成に由来し、重鎖の約92%がCDR1に存在する少なくとも1つまたは4つ以下の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも43%がCDR1に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも25%がCDR1に存在する少なくとも2つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも15%がCDR1に存在する少なくとも3つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも10%がCDR1に存在する4つまたはそれ超の変異を有する。

30

【0064】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_{3-20/J}1再構成に由来し、重鎖の約46%がFW2に存在する少なくとも1つまたは3つ以下の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも34%がFW2に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも10%がFW2に存在する2つまたはそれ超の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも2%がFW2に存在する3つまたはそれ超の変異を有する。

【0065】

一実施形態では、軽鎖は、ヒトV_{3-20/J}1再構成に由来し、重鎖の約84%がCDR2に存在する少なくとも1つまたは5つまでまたは5つ超の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも39%がCDR2に存在する1つまたは複数の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも18%がCDR2に存在する2つまたはそれ超の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも21%がCDR2に存在する3つまたはそれ超の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも3%がCDR2に存在する4つまたはそれ超の変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも2%がCDR2に存在する5つまたはそれ超の変異を有する。

40

【0066】

一実施形態では、軽鎖はヒトV_{3-20/J}1再構成に由来し、重鎖の約92%がFW3に存在する少なくとも1つまたは5つまでまたは5つ超の変異を有し、一実施形態では、軽鎖の少なくとも21%がFW3に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも20%がFW3に存在する少なくとも2つの変異を有し、一実

50

施形態では、重鎖の少なくとも13%がFW3に存在する少なくとも3つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも20%がFW3に少なくとも4つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の少なくとも18%がFW3に少なくとも5つの変異を有する。

【0067】

一実施形態では、軽鎖は、ヒトV₃₋₂₀/J₁再構成に由来し、重鎖の約7%がCDR3に存在する少なくとも1つの変異を有し、一実施形態では、重鎖の約7%がCDR3に1つの変異を有する。

【0068】

一実施形態では、本明細書に記載のマウスに由来する抗原特異的抗体の集団であって、抗体がヒトV₃₋₂₀/J₁再構成に由来する軽鎖を含み、重鎖の約43%がFW1に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約92%がCDR1に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約46%がFW2に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約84%がCDR2に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約92%がFW3に存在する1つまたは複数の変異を有し、重鎖の約7%がCDR3に存在する1つまたは複数の変異を有する抗体の集団が提供される。

10

【0069】

一態様では、再構成された免疫グロブリン軽鎖配列から免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスであって、再構成された免疫グロブリン軽鎖配列がマウスの生殖系列に存在し、免疫グロブリン軽鎖がヒト可変配列を含むマウスが提供される。一実施形態では、マウスの生殖系列は、再構成された軽鎖配列を含むマウスのB細胞の全てに存在する全ての非代替軽鎖配列と同じVセグメントおよび同じJセグメントに由来する再構成された免疫グロブリン軽鎖配列を含む。

20

【0070】

一実施形態では、マウスの生殖系列は、機能的な再構成されていない免疫グロブリン軽鎖V遺伝子セグメントを欠く。一実施形態では、マウスの生殖系列は、機能的な再構成されていない免疫グロブリン軽鎖J遺伝子セグメントを欠く。

【0071】

一実施形態では、マウスの生殖系列は、1つ以下、2つ以下または3つ以下の再構成された(V/J)軽鎖配列を含む。

【0072】

一実施形態では、再構成されたV/J配列は軽鎖配列を含む。特定の実施形態では、軽鎖配列はヒト軽鎖配列である。特定の実施形態では、軽鎖配列は、ヒトV₁₋₃₉/J配列、ヒトV₃₋₂₀/J配列、およびこれらの組合せから選択される。特定の実施形態では、軽鎖配列はヒトV₁₋₃₉/J₅配列である。特定の実施形態では、軽鎖配列はヒトV₃₋₂₀/J₁配列である。

30

【0073】

一実施形態では、マウスは、その生殖系列内に、再構成された免疫グロブリン軽鎖配列に対して5'側のマウスイントロンエンハンサー、マウス3'エンハンサー、およびこれらの組合せから選択される配列をさらに含む。

【0074】

一実施形態では、マウスは、再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメント、再構成されていないヒトD_H遺伝子セグメント、および再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメントを含み、前記V_H、D_H、およびJ_H遺伝子セグメントは、再構成して重鎖定常遺伝子配列に作動可能に連結した免疫グロブリン重鎖可変遺伝子配列を形成することができる。一実施形態では、マウスは、複数のヒトV_H、D_H、およびJ_H遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態では、内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、内因性マウスV_H、D_H、およびJ_H遺伝子セグメントをヒトV_H、D_H、およびJ_H遺伝子セグメントに置き換えている。特定の実施形態では、マウスは、機能的なマウスV_H、D_H、およびJ_H遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全ての、機能的なヒトV_H、D_H、およびJ_H遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全ての置き換えを含む。

40

50

【 0 0 7 5 】

一実施形態では、マウスは、マウス定常配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、ヒト定常配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【 0 0 7 6 】

一実施形態では、マウスは、C_H1配列、ヒンジ配列、C_H2配列、C_H3配列、およびこれらの組合せから選択されるマウス配列を含む免疫グロブリン重鎖を発現する。

【 0 0 7 7 】

一実施形態では、マウスは、C_H1配列、ヒンジ配列、C_H2配列、C_H3配列、およびこれらの組合せから選択されるヒト配列を含む免疫グロブリン重鎖を発現する。

【 0 0 7 8 】

一実施形態では、マウスの生殖系列内の再構成された免疫グロブリン軽鎖配列は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にある。特定の実施形態では、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座において、マウス軽鎖V配列およびJ配列の全てまたは実質的に全てをマウスの生殖系列内の再構成された免疫グロブリン軽鎖配列に置き換えている。

【 0 0 7 9 】

一態様では、単一のヒトV遺伝子セグメントおよび単一のヒトJ遺伝子セグメントから生成される再構成された軽鎖遺伝子を含む非代替軽鎖配列を含む各B細胞によって特徴付けられるB細胞集団を含むマウスであって、マウスの生殖系列内の軽鎖可変配列のみが単一のヒトVセグメントおよび単一のヒトJセグメントから生成される再構成された配列であり、再構成された軽鎖遺伝子を含む各B細胞はコグネイトヒト重鎖可変ドメインをコードする遺伝子をさらに含み、再構成された軽鎖遺伝子は少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つの体細胞超変異を含むマウスが提供される。

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態では、成熟B細胞集団が、各成熟B細胞が表面上に非代替軽鎖配列を含み、その配列が2つのヒトV_L遺伝子セグメントのうちの1つおよび5つ以下のヒトJ_L遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する再構成された軽鎖遺伝子を含むという点で特徴付けられるマウスであって、マウスの生殖系列内の軽鎖可変配列(V_LJ_L配列)のみが2つのヒトV_L遺伝子セグメントのうちの1つおよび5つ以下のヒトJ_L遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する再構成された配列であり、再構成された軽鎖遺伝子を含む各B細胞がコグネイトヒト重鎖可変ドメインをコードする遺伝子をさらに含み、再構成された軽鎖遺伝子が少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたは5つまたはそれ超の体細胞超変異を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、再構成された軽鎖遺伝子は、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの体細胞超変異を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のマウスは目的の抗原を用いて免疫されており、一部の実施形態では、成熟B細胞集団は目的の抗原に結合するB細胞が富化されている。

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態では、成熟B細胞集団が、各成熟B細胞が表面上に非代替軽鎖配列を含み、その配列が2つのヒトV_L遺伝子セグメントのうちの1つおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ_L遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する再構成された軽鎖遺伝子を含むという点で特徴付けられるマウスであって、V_L遺伝子セグメントが、同一ではない2つのV_L遺伝子セグメントから本質的になり、V_L遺伝子座が、2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ_L遺伝子セグメントを含み、再構成された軽鎖遺伝子を含む各B細胞が、コグネイトヒト重鎖可変ドメインをコードする遺伝子をさらに含み、再構成された軽鎖遺伝子が、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたは5つまたはそれ超の体細胞超変異を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、再構成された軽鎖遺伝子は、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの体細胞超変異を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のマウスは目的の抗原を用いて免疫されており、一部の実施形態では、成熟B細胞集団は目的の抗原に結合するB細胞が富化されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

一態様では、本明細書に記載のマウスに由来する多能性細胞、人工多能性細胞または全能性細胞が提供される。特定の実施形態では、細胞はマウス胚性幹 (E S) 細胞である。

【 0 0 8 3 】

一態様では、本明細書に記載のマウスに由来する組織が提供される。一実施形態では、組織は、本明細書に記載のマウスの脾臓、リンパ節または骨髄に由来する。

【 0 0 8 4 】

一態様では、本明細書に記載のマウスに由来する核が提供される。一実施形態では、核は、B細胞ではない二倍体細胞に由来する。

【 0 0 8 5 】

一態様では、本明細書に記載のマウスから単離されたマウス細胞が提供される。一実施形態では、細胞はE S細胞である。一実施形態では、細胞はリンパ球である。一実施形態では、リンパ球はB細胞である。一実施形態では、B細胞は、ヒト遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含むキメラ重鎖、および再構成されたヒトV_H 1 - 39 / J配列、再構成されたヒトV_L 3 - 20 / J配列、またはこれらの組合せに由来する軽鎖を発現し、重鎖可変ドメインはマウス定常領域と融合しており、軽鎖可変ドメインはマウスまたはヒト定常領域と融合している。

【 0 0 8 6 】

一態様では、本明細書に記載のマウスのB細胞を用いて作製されたハイブリドーマが提供される。特定の実施形態では、B細胞は目的のエピトープを含む免疫原を用いて免疫した本明細書に記載のマウス由来のものであり、B細胞は目的のエピトープに結合する結合タンパク質を発現し、結合タンパク質は体細胞変異したヒトV_HドメインおよびマウスC_Hを有し、再構成されたヒトV_H 1 - 39 J_H 5または再構成されたヒトV_H 3 - 20 J_H 1に由来するヒトV_LドメインおよびマウスC_Lを有する。

【 0 0 8 7 】

一態様では、本明細書に記載のマウスに由来するドナーE S細胞を含むマウス胚が提供される。

【 0 0 8 8 】

一態様では、ベクターの5'および3'マウス相同性アームの配列に関して、転写方向に5'から3'へ、5'マウス相同性アーム、ヒトまたはマウス免疫グロブリンプロモーター、ヒトまたはマウスリーダー配列、および再構成されたヒトV_H 1 - 39 J_H 5または再構成されたヒトV_H 3 - 20 J_H 1から選択されるヒトV_L領域、および3'マウス相同性アームを含むターゲティングベクターが提供される。一実施形態では、5'および3'相同性アームにより、マウスC_H遺伝子に対して5'側の近位に存在するエンハンサー配列に関して5'側の配列にベクターがターゲティングされる。一実施形態では、プロモーターは、ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントプロモーターである。特定の実施形態では、プロモーターはヒトV_H 3 - 15プロモーターである。一実施形態では、リーダー配列はマウスリーダー配列である。特定の実施形態では、マウスリーダー配列はマウスV_H 3 - 7リーダー配列である。

【 0 0 8 9 】

一態様では、上記の通りであるが、5'マウス相同性アームの代わりに、ヒトまたはマウスプロモーターの5'側に部位特異的リコンビナーゼ認識部位 (S R R S) が隣接し、3'マウス相同性アームの代わりに、ヒトV_L領域の3'側にS R R Sが隣接するターゲティングベクターが提供される。

【 0 0 9 0 】

一態様では、リバースキメラ抗体が本明細書に記載のマウスから作製され、リバースキメラ抗体は、ヒトV_LおよびマウスC_Lを含む軽鎖、およびヒトV_HおよびマウスC_Hを含む重鎖を含む。

【 0 0 9 1 】

一態様では、抗体を作製するための方法であって、単一細胞において、(a) ヒトC_H遺

10

20

30

40

50

伝子配列と融合した、本明細書に記載の免疫したマウスの第1のV_H遺伝子配列、(b) ヒトC_L遺伝子配列と融合した、本明細書に記載の免疫したマウスのV_L遺伝子配列を発現させるステップ、および、(c)細胞を、完全ヒト抗体が発現するのに十分な条件下で維持し、抗体を単離するステップを含む方法が提供される。一実施形態では、細胞は、ヒトC_H遺伝子配列と融合した、本明細書に記載の第2の免疫したマウスの第2のV_H遺伝子配列を含み、第1のV_H遺伝子配列は第1のエピトープを認識するV_Hドメインをコードし、第2のV_H遺伝子配列は第2のエピトープを認識するV_Hドメインをコードし、第1のエピトープと第2のエピトープは同一ではない。

【0092】

一態様では、エピトープ結合タンパク質を作製するための方法であって、本明細書に記載の Maus を、目的のエピトープを含む免疫原に曝露するステップ、 Maus を、 Maus が目的のエピトープに特異的に結合する免疫グロブリン分子を生成するのに十分な条件下で維持するステップ、および目的のエピトープに特異的に結合する免疫グロブリン分子を単離するステップを含み、エピトープ結合タンパク質が、 Maus C_Lおよび再構成されたヒト V_{1-39J5} または再構成されたヒト V_{3-20J1} 由来のヒト V_L を含む軽鎖と結合した体細胞変異したヒト V_H および Maus C_H を含む重鎖を含む方法が提供される。

10

【0093】

一態様では、第1のエピトープを認識するエピトープ結合タンパク質を発現する細胞であって、(a) ヒトヌクレオチド配列であって、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン cDNA 配列(例えば、ヒト 定常ドメイン DNA 配列)と(直接またはリンカーを通じて)融合しており、再構成されたヒト V_{1-39J5} または再構成されたヒト V_{3-20J1} に由来するヒト V_L ドメインをコードする、ヒトヌクレオチド配列;および(b) 第1のヒト V_Hヌクレオチド配列であって、ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメイン cDNA 配列と(直接またはリンカーを通じて)融合しており、第1のヒト V_Hヌクレオチド配列に由来するヒト V_Hドメインをコードする、第1のヒト V_Hヌクレオチド配列、を含む細胞が提供される。一実施形態では、エピトープ結合タンパク質は、第1のエピトープに、10⁻⁶M未満、10⁻⁸M未満、10⁻⁹M未満、10⁻¹⁰M未満、10⁻¹¹M未満または10⁻¹²M未満の解離定数で結合する。

20

【0094】

一実施形態では、細胞は、第2のヒト V_Hドメインをコードする第2のヒトヌクレオチド配列を含み、第2のヒト配列は、ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメイン cDNA 配列と融合しており(直接またはリンカーを通じて)、第2のヒト V_Hドメインは第1のエピトープを特異的には認識せず(例えば、例えば、10⁻⁶M、10⁻⁵M、10⁻⁴Mまたはそれ超の解離定数を示す)、エピトープ結合タンパク質は第1のエピトープおよび第2のエピトープを認識し、第1の免疫グロブリン重鎖および第2の免疫グロブリン重鎖はそれぞれ(a)の同一の軽鎖と結合している。

30

【0095】

一実施形態では、第2のV_Hドメインは、第2のエピトープに、10⁻⁶M未満、10⁻⁷M未満、10⁻⁸M未満、10⁻⁹M未満、10⁻¹⁰M未満、10⁻¹¹M未満または10⁻¹²M未満の解離定数で結合する。

40

【0096】

一実施形態では、エピトープ結合タンパク質はヒト V_{1-39J5} またはヒト V_{3-20J1} から選択される再構成されたヒト V_L 領域に由来する同一の軽鎖とそれぞれ結合した第1の免疫グロブリン重鎖および第2の免疫グロブリン重鎖を含み、第1の免疫グロブリン重鎖は第1のエピトープに、ナノモル濃度からピコモル濃度の範囲の解離定数で結合し、第2の免疫グロブリン重鎖は第2のエピトープに、ナノモル濃度からピコモル濃度の範囲の解離定数で結合し、第1のエピトープおよび第2のエピトープは同一ではなく、第1の免疫グロブリン重鎖は第2のエピトープに結合しないまたは第2のエピトープにマイクロモル濃度の範囲よりも弱い(例えば、ミリモル濃度範囲の)解離定数で結合し

50

、第2の免疫グロブリン重鎖は第1のエピトープに結合しないまたは第1のエピトープにマイクロモル濃度の範囲よりも弱い（例えば、ミリモル濃度範囲の）解離定数で結合し、第1の免疫グロブリン重鎖のV_L、V_Hのうちの1つまたは複数、および第2の免疫グロブリン重鎖のV_Hが体細胞変異したものである。

【0097】

一実施形態では、第1の免疫グロブリン重鎖はプロテインA結合残基を含み、第2の免疫グロブリン重鎖はプロテインA結合残基を欠く。

【0098】

一実施形態では、細胞は、CHO、COS、293、HeLa、およびウイルス核酸配列を発現する網膜細胞（例えば、PERC.6（商標）細胞）から選択される。

10

【0099】

一態様では、ヒトV_Hおよびマウス重鎖定常ドメイン、ヒトV_Lおよびマウス軽鎖定常ドメインを含むリバースキメラ抗体であって、本明細書に記載のマウスを、エピトープを含む免疫原を用いて免疫するステップを含むプロセスによって作製され、また、マウスを免疫した免疫原のエピトープに特異的に結合するリバースキメラ抗体が提供される。一実施形態では、V_Lドメインは体細胞変異したものである。一実施形態では、V_Hドメインは体細胞変異したものである。一実施形態では、V_LドメインとV_Hドメインはどちらも体細胞変異したものである。一実施形態では、V_LはマウスCドメインに連結している。

【0100】

一態様では、マウスであって、内因性マウス重鎖遺伝子座における全てまたは実質的に全てのマウスV_H遺伝子セグメントのヒトV_H遺伝子セグメントでの置き換え；全てのマウス軽鎖遺伝子セグメントの、再構成されたV_{1-39/J}および再構成されたV_{3-20/J}またはこれらの組合せから選択される1つ以下または2つの再構成されたヒト軽鎖V_{L/J}配列での置き換えを含み、ヒト重鎖可変遺伝子セグメントがマウス定常遺伝子に連結しており、再構成されたヒト軽鎖配列がヒトまたはマウス定常遺伝子に連結しているマウスが提供される。

20

【0101】

一部の実施形態では、内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、全てまたは実質的に全てのマウス免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントをえるヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメント；全てのマウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントを置き換える2つ以下の再構成されていないヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ）の再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントまたは5つのヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントを含むマウスであって、ヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントがマウス免疫グロブリン定数遺伝子に連結しており、再構成されていないヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントおよびヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントがヒトまたは非ヒト免疫グロブリン定数遺伝子に連結しているマウスが提供される。一部の実施形態では、非ヒト定数遺伝子はマウス免疫グロブリン定数遺伝子である。一部の実施形態では、非ヒト免疫グロブリン定数遺伝子はラット免疫グロブリン定数遺伝子である。

30

【0102】

一態様では、マウスES細胞は、全てまたは実質的に全てのマウス重鎖可変遺伝子セグメントのヒト重鎖可変遺伝子セグメントでの置き換え、および1つ以下または2つの再構成されたヒト軽鎖V_{L/J}配列を含み、ヒト重鎖可変遺伝子セグメントはマウス免疫グロブリン重鎖定常遺伝子に連結しており、再構成されたヒト軽鎖V_{L/J}配列はマウスまたはヒト免疫グロブリン軽鎖定常遺伝子に連結している。特定の実施形態では、軽鎖定常遺伝子はマウス定常遺伝子である。

40

【0103】

一部の実施形態では、全てまたは実質的に全てのマウス免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントの、ヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントおよび2つ以下の再構成されていないヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超（例えば、2つ、3つ

50

、4つまたは5つ)の再構成されていないヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントでの置き換えを含むマウスE_S細胞であって、ヒト免疫グロブリンV_H遺伝子セグメントがマウス免疫グロブリン重鎖定常遺伝子に連結しており、再構成されていないヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントおよびヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントが非ヒトまたはヒト免疫グロブリン軽鎖定常遺伝子に連結しているマウスE_S細胞が提供される。一部のある特定の実施形態では、非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常遺伝子はマウス免疫グロブリン定数遺伝子である。一部のある特定の実施形態では、マウスは、5つの再構成されていない免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントを含む。

【0104】

一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、少なくとも1つ、一部の実施形態では全てのマウスV_L遺伝子セグメントが1つのヒトV_L遺伝子セグメントまたは2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントで置き換えられているという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、マウスのヒトV_L遺伝子セグメントは、抗体の免疫グロブリンV_Lドメインをコードするように2つまたはそれ超のヒトJ_L遺伝子セグメントのうち1つへと再構成することが可能である。一部の実施形態では、本明細書に記載のマウスの軽鎖遺伝子座のヒトV_L遺伝子セグメント(複数可)は、2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ_L遺伝子セグメントに作動可能に連結している。

10

【0105】

一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、内因性V_L遺伝子セグメントをコードする再構成前のヌクレオチド配列を含有しないという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、内因性J_L遺伝子セグメントをコードする再構成前のヌクレオチド配列を含有しないという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、内因性V_LおよびJ_L遺伝子セグメントをコードする再構成前のヌクレオチドを含有しないという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。

20

【0106】

一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、内因性V_L遺伝子セグメントをコードする再構成後のヌクレオチド配列を含有しないという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、内因性J_L遺伝子セグメントをコードする再構成後のヌクレオチド配列を含有しないという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、内因性V_LおよびJ_L遺伝子セグメントをコードする再構成後のヌクレオチド配列を含有しないという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。

30

【0107】

一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、再構成前の2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ_L遺伝子セグメントを含有するという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、再構成前の2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ_L遺伝子セグメントを含有するという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。

40

【0108】

一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、再構成後の2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび5つまたはそれ未満(例えば、5つ、4つ、3つ、2つまたは1つ)のヒトJ_L遺伝子セグメントを含有するという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、再構成後の2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヒトJ_L遺伝子セグメントを含有するという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマ

50

ウスが提供される。

【0109】

一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、再構成後の1つのヒトV_L遺伝子セグメントおよび5つまたはそれ未満（例えば、5つ、4つ、3つ、2つまたは1つ）のヒトJ_L遺伝子セグメントを含有するという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、再構成後の1つのヒトV_L遺伝子セグメントおよび1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヒトJ_L遺伝子セグメントを含有するという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。

【0110】

種々の実施形態では、ヒトV_L遺伝子セグメントおよびヒトJ_L遺伝子セグメントはヒトV_L遺伝子セグメントおよびヒトJ_L遺伝子セグメントである。種々の実施形態では、ヒトV_Lセグメントは、ヒトV_L1-39遺伝子セグメントおよびヒトV_L3-20遺伝子セグメントから選択される。一部の実施形態では、ヒトV_LセグメントはヒトV_L1-39およびヒトV_L3-20である。一部の実施形態では、ヒトJ_Lセグメントは、J_L1、J_L2、J_L3、J_L4、J_L5遺伝子セグメント、およびこれらの組合せから選択される。一部の実施形態では、ヒトJ_L遺伝子セグメントはヒトJ_L1、J_L2、J_L3、J_L4、およびJ_L5である。

【0111】

一部の実施形態では、構造が図19の参照構造の軽鎖遺伝子座とは、再構成前の図1、図2、図3または図9の構造の軽鎖遺伝子座と実質的に同じ構造を含有するという点で異なる軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、構造が再構成前の図1、図2、図3または図9の構造と同一である軽鎖遺伝子座を含むマウスが提供される。

【0112】

一態様では、本明細書に記載のマウスにより作製される抗原結合タンパク質が提供される。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、マウス定常領域と融合したヒト免疫グロブリン重鎖可変領域、およびV_H1-39遺伝子セグメントまたはV_H3-20遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖定常領域はマウス定常領域である。

【0113】

一態様では、本明細書に記載のマウス由来の免疫グロブリン可変領域遺伝子配列から生じる完全ヒト抗原結合タンパク質であって、本明細書に記載のマウスの配列に由来するヒト可変領域を含む完全ヒト重鎖、およびV_H1-39またはV_H3-20を含む完全ヒト軽鎖を含む抗原結合タンパク質が提供される。一実施形態では、軽鎖可変領域は、1つ~5つの体細胞変異を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域は、マウスのB細胞において重鎖可変領域と対合させているコグネイト軽鎖可変領域である。

【0114】

一実施形態では、完全ヒト抗原結合タンパク質は第1の重鎖および第2の重鎖を含み、第1の重鎖および第2の重鎖は、それぞれ独立に、本明細書に記載のマウスに由来する同一でない可変領域を含み、第1の重鎖および第2の重鎖のそれぞれがV_H1-39遺伝子セグメントまたはV_H3-20遺伝子セグメントに由来するヒト軽鎖と結合して宿主細胞から発現する。一実施形態では、第1の重鎖は第1の抗原の第1のエピトープに特異的に結合する第1の重鎖可変領域を含み、第2の重鎖は第2の抗原の第2のエピトープに特異的に結合する第2の重鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、第1の抗原と第2の抗原は異なる。特定の実施形態では、第1の抗原と第2の抗原は同じであり、第1のエピトープと第2のエピトープは同一ではなく、特定の実施形態では、第1のエピトープに結合タンパク質の第1の分子が結合することにより第2のエピトープへの結合タンパク質の第2の分子の結合は遮断されない。

【0115】

一態様では、本明細書に記載のマウスのヒト免疫グロブリン配列に由来する完全ヒト結合

10

20

30

40

50

タンパク質は、第1の免疫グロブリン重鎖および第2の免疫グロブリン重鎖を含み、第1の免疫グロブリン重鎖は第2の免疫グロブリン重鎖の変領域と同一ではない第1の変領域を含み、また、第1の免疫グロブリン重鎖は野生型プロテインA結合決定基を含み、第2の重鎖は野生型プロテインA結合決定基を欠く。一実施形態では、第1の免疫グロブリン重鎖は単離条件下でプロテインAに結合し、第2の免疫グロブリン重鎖はプロテインAに結合しないまたは第1の免疫グロブリン重鎖が単離条件下でプロテインAに結合するよりも少なくとも10分の1、100分の1または1000分の1の弱さでプロテインAに結合する。特定の実施形態では、第1の重鎖および第2の重鎖はIgG1アイソタイプであり、第2の重鎖は95R(EU435R)、96F(EU436F)、およびこれらの組合せから選択される改変を含み、第1の重鎖はそのような改変を欠く。

10

【0116】

一態様では、二重特異性抗原結合タンパク質を作製するための方法であって、本明細書に記載の第1のマウスを第1のエピトープを含む目的の第1の抗原に曝露するステップ、本明細書に記載の第2のマウスを第2のエピトープを含む目的の第2の抗原に曝露するステップ、第1および第2のマウスにそれぞれ目的の抗原に対する免疫応答を開始させるステップ、第1のマウスにおいて目的の第1の抗原の第1のエピトープに結合する第1のヒト重鎖可変領域を同定するステップ、第2のマウスにおいて目的の第2の抗原の第2のエピトープに結合する第2のヒト重鎖可変領域を同定するステップ、目的の第1の抗原の第1のエピトープに結合する第1の重鎖をコードする第1の完全ヒト重鎖遺伝子を作製するステップ、目的の第2の抗原の第2のエピトープに結合する第2の重鎖をコードする第2の完全ヒト重鎖遺伝子を作製するステップ、第1の重鎖および第2の重鎖をヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントに由来する単一の完全ヒト軽鎖を発現する細胞において発現させて二重特異性抗原結合タンパク質を形成するステップ、および二重特異性抗原結合タンパク質を単離するステップを含む方法が提供される。

20

【0117】

一実施形態では、第1の抗原および第2の抗原は同一ではない。

【0118】

一実施形態では、第1の抗原および第2の抗原は同一であり、第1のエピトープと第2のエピトープは同一ではない。一実施形態では、第1の重鎖可変領域が第1のエピトープに結合することにより第2の重鎖可変領域の第2のエピトープへの結合は遮断されない。

30

【0119】

一実施形態では、ヒト軽鎖は、第1の重鎖と対合させている場合には第1の抗原の第1のエピトープに特異的に結合し、第2の重鎖と対合させている場合には第2の抗原の第2のエピトープに特異的に結合する。

【0120】

一実施形態では、第1の抗原は可溶性抗原および細胞表面抗原(例えば、腫瘍抗原)から選択され、第2の抗原は細胞表面受容体を含む。特定の実施形態では、細胞表面受容体は免疫グロブリン受容体である。特定の実施形態では、免疫グロブリン受容体はFc受容体である。一実施形態では、第1の抗原と第2の抗原は同じ細胞表面受容体であり、第1の重鎖が第1のエピトープに結合することにより第2の重鎖の第2のエピトープへの結合は遮断されない。

40

【0121】

一実施形態では、軽鎖の軽鎖可変ドメインは2つ~5つの体細胞変異を含む。一実施形態では、軽鎖可変ドメインは、第1の免疫したマウスまたは第2の免疫したマウスのB細胞において第1の重鎖可変ドメインまたは第2の重鎖可変ドメインのいずれかと共に発現する体細胞変異したコグネイト軽鎖である。一実施形態では、細胞の軽鎖は生殖系列配列を含む。

【0122】

一実施形態では、第1の完全ヒト重鎖はプロテインAに対するその親和性を低下させるアミノ酸の改変を有し、第2の完全ヒト重鎖はプロテインAに対するその親和性を低下させ

50

る改変を含まない。

【0123】

一態様では、第1および第2の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体を調製する方法であって、(a)第1の抗原に対して特異的である第1のヒト重鎖可変(V_H)ドメインをコードする第1の核酸配列を同定するステップ；(b)第2の抗原に対して特異的である第2のヒト重鎖可変(V_H)ドメインをコードする第2の核酸配列を同定するステップ；(c)(a)のV_H領域と対合させている場合には第1の抗原に特異的に結合し、(b)のV_H領域と対合させている場合には第2の抗原に特異的に結合するヒト軽鎖可変(V_L)領域をコードする第3の核酸配列をもたらしステップ；(d)第1の核酸配列、第2の核酸配列、および第3の核酸配列を含む宿主細胞を培養して、第1のヒトV_H領域および第2のヒトV_H領域およびヒトV_L領域を発現させて二重特異性抗体を形成するステップ；ならびに(d)前記二重特異性抗体を回収するステップを含む方法が提供される。種々の態様では、第1および第2の抗原は互いに異なる。種々の態様では、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、マウスの生殖系列内にある再構成された免疫グロブリン軽鎖配列からヒト免疫グロブリンV_L領域を発現する免疫したマウスから単離される。

10

【0124】

一実施形態では、ヒトV_L領域は、ヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメントまたはヒトV₃₋₂₀遺伝子セグメントを含む再構成されたヒト軽鎖配列に由来する。特定の実施形態では、再構成されたヒト軽鎖配列は生殖系列配列である(すなわち、V遺伝子セグメント配列内に体細胞超変異を含まない)。

20

【0125】

一実施形態では、第3の核酸配列は、マウスの生殖系列内の再構成された免疫グロブリン軽鎖配列からヒト免疫グロブリンV_L領域を発現するマウスから単離される。一実施形態では、再構成された免疫グロブリン軽鎖配列はヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメントまたはヒトV₃₋₂₀遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態では、再構成された免疫グロブリン軽鎖配列はヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメントを含む。一実施形態では、ヒト免疫グロブリンV_L領域は改変された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から発現する。

【0126】

一実施形態では、第1および第2の抗原は1つの分子上に存在する。一実施形態では、第1および第2の抗原は異なる分子上に存在する。種々の実施形態では、第1または第2の核酸配列は、コードされる重鎖のプロテインAに対するその親和性を低下させる改変を含む。

30

【0127】

一実施形態では、第1の核酸配列または第2の核酸配列は、V_H1-2、V_H1-3、V_H1-8、V_H1-18、V_H1-24、V_H1-46、V_H1-58、V_H1-69、V_H2-5、V_H2-26、V_H2-70、V_H3-7、V_H3-9、V_H3-11、V_H3-13、V_H3-15、V_H3-20、V_H3-21、V_H3-23、V_H3-30、V_H3-33、V_H3-43、V_H3-48、V_H3-53、V_H3-64、V_H3-72、V_H3-73、V_H4-31、V_H4-34、V_H4-39、V_H4-59、V_H5-51、およびV_H6-1から選択されるヒト重鎖遺伝子セグメントを含む再構成されたヒト重鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態では、重鎖遺伝子セグメントはV_H2-5、V_H3-23またはV_H3-30である。

40

【0128】

一態様では、第1および第2の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体を調製する方法であって、(a)第1の抗原に対して特異的である第1のヒト重鎖可変(V_H)ドメインをコードする第1の核酸配列を同定するステップ；(b)第2の抗原に対して特異的である第2のヒト重鎖可変(V_H)ドメインをコードする第2の核酸配列を同定するステップ；(c)(a)のV_H領域と対合させている場合には第1の抗原に特異的に結合し、(b)のV_H領域と対合させている場合には第2の抗原に特異的に結合するヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメントまたはヒトV₃₋₂₀遺伝子セグメントに由来するヒト軽鎖可変(V_L

50

)領域をコードする第3の核酸配列をもたらすステップ；(d)第1の核酸配列、第2の核酸配列、および第3の核酸配列を含む宿主細胞を培養して、第1のヒトV_H領域および第2のヒトV_H領域およびヒトV_L領域を発現させて二重特異性抗体を形成するステップ；ならびに(d)前記二重特異性抗体を回収するステップを含む方法が提供される。種々の態様では、第1の抗原と第2の抗原は互いに異なる。種々の態様では、ヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントに由来する再構成された免疫グロブリン配列由来のヒト免疫グロブリンV_L領域を発現する免疫したマウスから第1の核酸配列および第2の核酸配列を単離し、また、当該再構成されたヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはV_H 3-30遺伝子セグメントはマウスの生殖系列内にある。

【0129】

一実施形態では、第3の核酸配列は生殖系列配列である(すなわち、V遺伝子セグメント配列内に体細胞超変異を含まない)。一実施形態では、第3の核酸配列は、マウスの生殖系列内の再構成された免疫グロブリン軽鎖配列からヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリンV_L領域を発現するマウスから単離される。特定の実施形態では、第3の核酸配列は、相補性決定領域(CDR)および/またはフレームワーク領域(FWR)内に2つ~5つの体細胞超変異を含む。一実施形態では、ヒト免疫グロブリンV_L領域は改変された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から発現する。

【0130】

一実施形態では、第1および第2の抗原は1つの分子上に存在する。一実施形態では、第1および第2の抗原は異なる分子上に存在する。一実施形態では、第1または第2の核酸配列は、コードされる重鎖のプロテインAに対するその親和性を低下させる改変を含む。

【0131】

一実施形態では、第1の核酸配列または第2の核酸配列は、V_H 1-2、V_H 1-3、V_H 1-8、V_H 1-18、V_H 1-24、V_H 1-46、V_H 1-58、V_H 1-69、V_H 2-5、V_H 2-26、V_H 2-70、V_H 3-7、V_H 3-9、V_H 3-11、V_H 3-13、V_H 3-15、V_H 3-20、V_H 3-21、V_H 3-23、V_H 3-30、V_H 3-33、V_H 3-43、V_H 3-48、V_H 3-53、V_H 3-64、V_H 3-72、V_H 3-73、V_H 4-31、V_H 4-34、V_H 4-39、V_H 4-59、V_H 5-51、およびV_H 6-1から選択されるヒト重鎖遺伝子セグメントを含む再構成されたヒト重鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態では、重鎖遺伝子セグメントはV_H 2-5、V_H 3-23またはV_H 3-30である。

【0132】

一態様では、二重特異性抗体を作製するための方法であって、本明細書に記載のマウスを目的の抗原に曝露するステップ、マウスに目的の抗原に対する免疫応答を開始させるステップ、目的の抗原の第1のエピトープに結合する第1のヒト重鎖可変領域を同定するステップ、目的の抗原の第2のエピトープに結合する第2のヒト重鎖可変領域を同定するステップ、目的の抗原の第1のエピトープに結合する第1の重鎖をコードする第1の完全ヒト重鎖遺伝子を作製するステップ、目的の抗原の第2のエピトープに結合する第2の重鎖をコードする第2の完全ヒト重鎖遺伝子を作製するステップ、第1の重鎖および第2の重鎖をヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントに由来する単一の完全ヒト軽鎖を発現する細胞において発現させて二重特異性抗体を形成するステップ、および二重特異性抗原結合タンパク質を単離するステップを含む方法が提供される。

【0133】

一実施形態では、第1のエピトープと第2のエピトープは同一ではない。一実施形態では、第1の重鎖可変領域が第1のエピトープに結合することにより第2の重鎖可変領域の第2のエピトープへの結合は遮断されない。一実施形態では、第1の重鎖および第2の重鎖は、第1のエピトープと第2のエピトープに同時に結合することができる。

【0134】

一実施形態では、二重特異性抗体は第1のエピトープと第2のエピトープに同時に結合す

10

20

30

40

50

る。一実施形態では、二重特異性抗体は第1のエピトープと第2のエピトープにそれぞれ独立に結合する。

【0135】

一実施形態では、二重特異性抗体の抗原に対する結合応答は第1の重鎖可変領域の抗原に対する結合応答の約2倍高い。一実施形態では、二重特異性抗体の抗原に対する結合応答は第2の重鎖可変領域の抗原に対する結合応答の約2倍高い。一実施形態では、二重特異性抗体の抗原に対する結合応答は第1の重鎖可変領域および/または第2の重鎖可変領域の抗原に対する結合応答とほぼ同じであるまたはほぼ等しい。

【0136】

一実施形態では、抗原は、可溶性抗原、細胞表面抗原（例えば、腫瘍抗原）および細胞表面受容体から選択される。特定の実施形態では、細胞表面受容体は免疫グロブリン受容体である。特定の実施形態では、免疫グロブリン受容体はFc受容体である。

10

【0137】

一実施形態では、軽鎖の軽鎖可変ドメインは2つ～5つの体細胞変異を含む。一実施形態では、軽鎖可変ドメインは、第1の重鎖可変ドメインまたは第2の重鎖可変ドメインのいずれかとともに、免疫したマウスのB細胞において発現する体細胞変異したコグネイト軽鎖である。

【0138】

一実施形態では、第1の完全ヒト重鎖はプロテインAに対するその親和性を低下させるアミノ酸の改変を有し、第2の完全ヒト重鎖はプロテインAに対するその親和性を低下させる改変を含まない。

20

【0139】

種々の実施形態では、二重特異性抗体を作製するための方法は、二重特異性抗体の各重鎖可変領域との対合に共通の軽鎖を使用することにより増強される。種々の実施形態では、本明細書に記載の共通の軽鎖を使用することにより、元のコグネイト軽鎖を使用することと比較して、二重特異性を欠く不適切な種の免疫グロブリンの数が減少する。種々の実施形態では、共通の軽鎖を含む単一特異性抗体から二重特異性抗体の重鎖可変領域を同定する。種々の実施形態では、二重特異性抗体の重鎖可変領域は、ヒト重鎖とコグネイトである限定されたヒト軽鎖レパートリーまたは単一のヒト軽鎖を発現するように予め操作された（engineered）マウスB細胞内にin vivoで再構成されたヒト重鎖可変遺伝子セグメントを含み、目的の抗原での曝露に应答して、可能性のあるヒト軽鎖可変領域の1つまたは2つのうちの1つとコグネイトである複数のヒト重鎖可変領域を含有するキメラ抗体レパートリーを生じ、当該キメラ抗体が目的の抗原に特異的である。

30

【0140】

種々の態様では、二重特異性抗体を調製する方法であって、二重特異性抗体が、1)第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドであって、該第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが二量体を形成することを可能にする多量体形成ドメイン（例えば、免疫グロブリンFcドメイン）をそれぞれが含み、多量体形成ドメインにより第1のポリペプチドと第2のポリペプチドの間の安定な相互作用が促進され、多量体形成ドメインのうちの一方がプロテインAに対するその親和性を低下させるアミノ酸の改変を有し、他方の多量体形成ドメインが当該改変を欠く第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチド、2)第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドのそれぞれの結合ドメインであって、各結合ドメインが可変重鎖および可変軽鎖を含み、第1のポリペプチドの可変軽鎖および第2のポリペプチドの可変軽鎖が共通のアミノ酸配列を有し、共通の配列がポリペプチドのそれぞれの元の軽鎖に対して少なくとも80%の、少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%および最も好ましくは100%の配列同一性を有する結合ドメインを含む方法が提供される。種々の実施形態では、可変軽鎖は、ヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントに由来する。種々の実施形態では、可変軽鎖は再構成されたヒト軽鎖配列である。種々の実施形態では、可変軽鎖は本明細書に記載のマウスから単離される。

40

50

【0141】

種々の実施形態では、方法は、(i)第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、および共通の軽鎖をコードする核酸を含む宿主細胞を培養するステップであって、当該核酸を発現させるステップ；および(ii)二重特異性抗体を宿主細胞培養物から回収するステップを含み、一実施形態では、第1のポリペプチドをコードする核酸または第2のポリペプチドをコードする核酸はプロテインAに対するその親和性を低下させるアミノ酸の改変を有する。一実施形態では、第1のポリペプチド、第2のポリペプチド、および共通の軽鎖をコードする核酸は単一のベクターまたは別々のベクターに存在する。一実施形態では、前述の段落に従って、宿主細胞を使用して二重特異性抗体を作製する。

【0142】

一態様では、二重特異性抗体を調製する方法であって、(a)本明細書に記載のマウスから単離された第1のヒト重鎖可変領域をコードする第1の核酸を選択するステップ；(b)本明細書に記載の同じまたは別のマウスから単離された第2のヒト重鎖可変領域をコードする第2の核酸を選択するステップ；(c)本明細書に記載のマウスから単離されたまたは本明細書に記載の再構成されたヒト軽鎖可変領域に由来するヒト軽鎖可変領域をコードする第3の核酸をもたすステップ；(c)第1の核酸、第2の核酸および第3の核酸を宿主細胞に導入し、第1の核酸、第2の核酸および第3の核酸の発現が起こるように宿主細胞を培養するステップ；ならびに(d)形成された二重特異性抗体を細胞培養物から回収するステップを含む方法が提供される。

【0143】

一実施形態では、第1のヒト重鎖可変領域および第2のヒト重鎖可変領域は体細胞変異したものである。特定の実施形態では、第1のヒト重鎖可変領域および第2のヒト重鎖可変領域は、それぞれ独立に、1-2、1-3、1-8、1-18、1-24、1-46、1-58、1-69、2-5、2-26、2-70、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-16、3-20、3-21、3-23、3-30、3-33、3-43、3-48、3-53、3-64、3-72、3-73、4-31、4-34、4-39、4-59、5-51、および6-1ヒトV_H遺伝子セグメントから選択される再構成されたヒトV_H遺伝子セグメントに由来する。一実施形態では、第1のヒト重鎖可変領域および第2のヒト重鎖可変領域は、それぞれ独立に、2-5、3-30および3-23から選択される再構成されたヒトV_H遺伝子セグメントに由来する。一実施形態では、第1のヒト重鎖可変領域はヒトV_H2-5遺伝子セグメントに由来し、第2のヒト重鎖可変領域はヒトV_H3-30遺伝子セグメントに由来する。一実施形態では、第1のヒト重鎖可変領域はヒトV_H3-30遺伝子セグメントに由来し、第2のヒト重鎖可変領域はヒトV_H3-23遺伝子セグメントに由来する。一実施形態では、第1のヒト重鎖可変領域はヒトV_H3-23遺伝子セグメントに由来し、第2のヒト重鎖可変領域はヒトV_H3-30遺伝子セグメントに由来する。

【0144】

一実施形態では、第1の核酸または第2の核酸をステップ(c)の前に、プロテインAに対する親和性が低下するように改変する。

【0145】

一実施形態では、第3の核酸は、本明細書に記載のマウスから単離される。一実施形態では、第3の核酸は2つ~5つの体細胞変異を含む。一実施形態では、第3の核酸は、ヒトV_H1-39遺伝子セグメントに由来するヒト軽鎖可変領域をコードする。一実施形態では、第3の核酸は、ヒトV_H3-20遺伝子セグメントに由来するヒト軽鎖可変領域をコードする。

【0146】

一実施形態では、第3の核酸は、再構成されたヒト軽鎖可変領域に由来する。一実施形態では、再構成されたヒト軽鎖可変領域は、ヒトV_H1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H3-20遺伝子セグメントに由来する配列を含む。一実施形態では、再構成されたヒト軽鎖可変領域は、生殖系列ヒトV_H1-39配列を含む(すなわち、V_H遺伝子セグメン

10

20

30

40

50

ト配列内に体細胞超変異を含まない)。一実施形態では、再構成されたヒト軽鎖可変領域は、生殖系列ヒトV_H 3 - 20配列を含む。

【0147】

種々の実施形態では、生殖系列内に再構成ヒト軽鎖配列を欠く改変マウスに由来する可変ドメインを含む第1のヒト重鎖が組み入れられる二重特異性抗体を調製する方法であって、第1のヒト重鎖を、ヒトV_H 1 - 39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3 - 20遺伝子セグメントに由来する再構成されたヒト軽鎖可変領域を含むコグネイトヒト軽鎖と対合させる方法が提供される。種々の実施形態では、第1のヒト重鎖とは特異性が異なる第2のヒト重鎖を本明細書に記載の免疫したマウスから同定する。2種の重鎖および共通の軽鎖をコードする核酸を、前述の段落に記載の通り、3つの鎖全ての発現が起こるように宿主細胞に導入し、二重特異性抗体を細胞培養物から回収する。

10

【0148】

一実施形態では、マウスを、第1のヒト重鎖可変ドメインを生成するために使用したものと同一抗原を用いて免疫する。一実施形態では、マウスを、第1のヒト重鎖可変ドメインを生成するために使用したものと異なる抗原を用いて免疫する。

【0149】

一態様では、二重特異性抗体をコードする核酸および当該核酸を含む宿主細胞を含めた、二重特異性抗体を作製するために単一のヒト軽鎖と対合させることができるヒト重鎖を選択する方法が提供される。

【0150】

一態様では、細胞培養物中の所望の二重特異性抗体の量を単一特異性抗体などの望ましくない産物を上回って増加させる方法であって、二重特異性抗体の重鎖の1つを、プロテインAに対する親和性が低下するように改変する方法が提供される。

20

【0151】

一態様では、単離された宿主細胞であって、(a)第1の抗原に結合する第1のヒト重鎖可変領域をコードする第1の核酸配列であって、マウスの生殖系列内の再構成された免疫グロブリン軽鎖配列からヒト免疫グロブリンV_L領域を発現する、第1の抗原を用いて免疫したマウスから単離された第1の核酸配列；(b)第2の抗原に結合する第2のヒト重鎖可変領域をコードする第2の核酸配列であって、マウスの生殖系列内の再構成された免疫グロブリン軽鎖配列からヒト免疫グロブリンV_L領域を発現する、第2の抗原を用いて免疫したマウスから単離された第2の核酸配列；(c)(a)の重鎖可変領域と対合させている場合には第1の抗原に特異的に結合し、(b)の重鎖可変領域と対合させている場合には第2の抗原に特異的に結合するヒト軽鎖可変領域をコードする第3の核酸配列を含む宿主細胞が提供される。

30

【0152】

種々の態様では、第1および第2の抗原は互いに異なる。種々の態様では、第1、第2および第3の核酸配列の発現により、第1および第2の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体の形成がもたらされる。

【0153】

一実施形態では、ヒトV_L領域は、ヒトV_H 1 - 39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3 - 20遺伝子セグメントを含む再構成されたヒト軽鎖配列に由来する。特定の実施形態では、再構成されたヒト軽鎖配列は生殖系列配列である(すなわち、可変ドメイン内に体細胞超変異を含まない)。一実施形態では、第3の核酸配列は再構成された免疫グロブリン軽鎖配列からヒト免疫グロブリンV_L領域を発現するマウスから単離され、当該再構成されたヒト軽鎖配列はマウスの生殖系列に存在する。一実施形態では、再構成された免疫グロブリン軽鎖配列は、ヒトV_H 1 - 39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3 - 20遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態では、ヒトV_H 1 - 39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3 - 20遺伝子セグメントは、相補性決定領域(CDR)またはフレームワーク領域(FWR)内に少なくとも1つの体細胞超変異を含む。特定の実施形態では、第1、第2および第3の核酸配列は、再構成された免疫グロブリン軽鎖配列からヒトV_H 1 - 39遺

40

50

伝子セグメントまたはヒトV_L 3 - 20 遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリンV_L 領域を発現するマウスから単離され、当該再構成された免疫グロブリン軽鎖配列はマウスの生殖系列に存在する。

【0154】

種々の実施形態では、マウスは、再構成して免疫グロブリン軽鎖を形成することが可能な内因性軽鎖可変領域遺伝子セグメントを含有しない。

【0155】

一実施形態では、ヒト免疫グロブリンV_L 領域は改変された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から発現する。一実施形態では、第1および第2の抗原は1つの分子上に存在する。一実施形態では、第1および第2の抗原は異なる分子上に存在する。一実施形態では、第1または第2の核酸配列は、コードされる重鎖のプロテインAに対する親和性を低下させる改変を含む。

10

【0156】

一実施形態では、第1または第2の核酸配列は、V_H1 - 2、V_H1 - 3、V_H1 - 8、V_H1 - 18、V_H1 - 24、V_H1 - 46、V_H1 - 58、V_H1 - 69、V_H2 - 5、V_H2 - 26、V_H2 - 70、V_H3 - 7、V_H3 - 9、V_H3 - 11、V_H3 - 13、V_H3 - 15、V_H3 - 20、V_H3 - 21、V_H3 - 23、V_H3 - 30、V_H3 - 33、V_H3 - 43、V_H3 - 48、V_H3 - 53、V_H3 - 64、V_H3 - 72、V_H3 - 73、V_H4 - 31、V_H4 - 34、V_H4 - 39、V_H4 - 59、V_H5 - 51、およびV_H6 - 1から選択されるヒト重鎖遺伝子セグメントを含む再構成されたヒト重鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態では、重鎖遺伝子セグメントはV_H2 - 5、V_H3 - 23またはV_H3 - 30である。

20

【0157】

一態様では、本発明に従って作製されたヒト重鎖可変ドメインを含む抗体または二重特異性抗体が提供される。別の態様では、完全ヒト抗体または完全ヒト二重特異性抗体を作製するための、本明細書に記載のマウスの使用が提供される。

【0158】

一態様では、本明細書に記載の遺伝子改変マウス、胚または細胞は、内因性調節または制御エレメント、例えば、マウスイントロンエンハンサー、マウス3'エンハンサーまたはイントロンエンハンサーと3'エンハンサーの両方を保持する軽鎖遺伝子座を含み、調節または制御エレメントにより、軽鎖遺伝子座の発現された配列の体細胞変異および親和性成熟が容易になる。

30

【0159】

一態様では、1つ以下または2つ以下の再構成されたまたは再構成されていない免疫グロブリン軽鎖V_L 遺伝子セグメントおよびJ_L 遺伝子セグメントに由来する免疫グロブリン軽鎖を有することによって特徴付けられるB細胞集団を含むマウスであって、免疫グロブリン軽鎖V_L 遺伝子セグメントおよびJ_L 遺伝子セグメントの野生型相補物を含むマウスとほぼ同じ軽鎖比を示すマウスが提供される。

【0160】

一実施形態では、免疫グロブリン軽鎖は、1つ以下または2つ以下の再構成された免疫グロブリン軽鎖V_L 遺伝子セグメントおよびJ_L 遺伝子セグメントに由来する。特定の実施形態では、軽鎖は、1つ以下の再構成された免疫グロブリン軽鎖V_L 遺伝子セグメントおよびJ_L 遺伝子セグメントに由来する。一実施形態では、免疫グロブリン軽鎖は2つの再構成されていない免疫グロブリンV_L 遺伝子セグメントのうちの1つおよび1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの免疫グロブリンJ_L 遺伝子セグメントのうちの1つから生成される。一実施形態では、免疫グロブリン軽鎖は2つの再構成されていない免疫グロブリンV_L 遺伝子セグメントのうちの1つおよび1つの免疫グロブリンJ_L 遺伝子セグメントから生成される。

40

【0161】

一態様では、1つ以下または2つ以下のヒトV_L / J_L 配列に由来する免疫グロブリン軽

50

鎖を発現する本明細書に記載のマウスであって、全てまたは実質的に全ての内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメントの、1つまたは複数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み、また、(a) 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19+B細胞の(b) 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19+B細胞に対する比が約1~約20であるマウスが提供される。

【0162】

一実施形態では、マウスはヒトV_H 1-39J 5配列に由来する単一の軽鎖を発現し、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19+B細胞の、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19+B細胞に対する比は約1~約20であり、一実施形態では、当該比は約1~少なくとも約66であり、特定の実施形態では、当該比は約1~66である。

10

【0163】

一実施形態では、マウスはヒトV_H 3-20J 5配列に由来する単一の軽鎖を発現し、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19+B細胞の、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19+B細胞に対する比は約1~約20であり、一実施形態では、当該比は約1~約21である。特定の実施形態では、当該比は1~20または1~21である。

【0164】

一部の実施形態では、本発明は、配列が2つのヒトV_H 遺伝子セグメントのうちの1つの、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヒトJ_H 遺伝子セグメントとの再構成によって実現される配列と同一である免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスを提供する。

20

【0165】

一部の実施形態では、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントのうちの1つおよび1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヒトJ_H 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成により生成する免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスであって、全てまたは実質的に全ての内因性免疫グロブリンV_H 遺伝子セグメントの、1つまたは複数のヒト免疫グロブリンV_H 遺伝子セグメント、1つまたは複数のD_H 遺伝子セグメント、および1つまたは複数のJ_H 遺伝子セグメントでの置き換えを含み、(a) 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現する骨髄中のB細胞の、(b) 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現する骨髄中のB細胞に対する比が約1~約15であるマウスが提供される。一部の実施形態では、再構成にはヒトV_H 1-39遺伝子セグメントが含まれる。一部の実施形態では、再構成にはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントが含まれる。一部の実施形態では、内因性免疫グロブリンV_H 遺伝子セグメントの置き換えは内因性免疫グロブリンV_H 遺伝子座に存在する。一部の実施形態では、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントは内因性免疫グロブリンV_H 遺伝子座に存在し、一部の実施形態では、全てまたは実質的に全てのマウス免疫グロブリンV_H 遺伝子セグメントを2つのヒトV_H 遺伝子セグメントに置き換えている。一部の実施形態では、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントは内因性免疫グロブリンV_H 遺伝子座に存在し、一部の実施形態では、全てまたは実質的に全てのマウス免疫グロブリンV_H 遺伝子セグメントおよびJ_H 遺伝子セグメントを2つのヒトV_H 遺伝子セグメントに置き換えている。種々の実施形態では、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントは、2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つ、5つ)のヒトJ_H 遺伝子セグメントに作動可能に連結している。

30

40

【0166】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、ヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ_H 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する軽鎖を発現し、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現する骨髄中の未成熟B細胞の、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現する未成熟B細胞に対する比は約1~約13である。

【0167】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、ヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまた

50

は5つ)のヒトJ 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する軽鎖を発現し、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現する骨髄中の成熟B細胞の、軽鎖を有する免疫グロブリンを発現する未成熟B細胞に対する比は約1～約7である。

【0168】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、ヒトV 1 - 39 遺伝子セグメントまたはヒトV 3 - 20 遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する軽鎖を発現し、例えば、細胞約 2.5×10^4 個、 3.0×10^4 個、 3.5×10^4 個、 4.0×10^4 個、 4.5×10^4 個、 5.0×10^4 個、 5.5×10^4 個、 6.0×10^4 個、 6.5×10^4 個、 7.0×10^4 個、 7.5×10^4 個、 8.0×10^4 個、 8.5×10^4 個、 9.0×10^4 個、 9.5×10^4 個、 1.0×10^5 個または 1.5×10^5 個を含めた、細胞約 2.5×10^4 ～約 1.5×10^5 個の範囲内のプロB細胞集団を骨髄中に有し、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 2.88×10^4 個のプロB細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 6.42×10^4 個のプロB細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 9.16×10^4 個のプロB細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.19×10^5 個のプロB細胞集団を骨髄中に含む。本明細書に記載の遺伝子改変マウスの骨髄中の例示的なプロB細胞は、CD19、CD43、c - k i t および/またはその組合せの発現(例えば、CD19⁺、CD43⁺、c - k i t⁺)によって特徴付けられる。

10

20

【0169】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、ヒトV 1 - 39 遺伝子セグメントまたはヒトV 3 - 20 遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する軽鎖を発現し、例えば、細胞約 1.0×10^6 個、 1.1×10^6 個、 1.2×10^6 個、 1.3×10^6 個、 1.4×10^6 個、 1.5×10^6 個、 1.6×10^6 個、 1.7×10^6 個、 1.8×10^6 個、 1.9×10^6 個または 2.0×10^6 個を含めた、細胞約 1×10^6 ～約 2×10^6 個の範囲内のプレB細胞集団を骨髄中に有し、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.25×10^6 個のプレB細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.46×10^6 個のプレB細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.64×10^6 個のプレB細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 2.03×10^6 個のプレB細胞集団を骨髄中に含む。本明細書に記載の遺伝子改変マウスの骨髄中の例示的なプレB細胞は、CD19、CD43、c - k i t および/またはその組合せの発現(例えば、CD19⁺、CD43⁻、c - k i t⁻)によって特徴付けられる。

30

【0170】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、ヒトV 1 - 39 遺伝子セグメントまたはヒトV 3 - 20 遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒトJ 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する軽鎖を発現し、例えば、細胞約 5.0×10^5 個、 5.1×10^5 個、 5.2×10^5 個、 5.3×10^5 個、 5.4×10^5 個、 5.5×10^5 個、 5.6×10^5 個、 5.7×10^5 個、 5.8×10^5 個、 5.9×10^5 個、 6.0×10^5 個、 6.1×10^5 個、 6.2×10^5 個、 6.3×10^5 個、 6.4×10^5 個、 6.5×10^5 個、 6.6×10^5 個、 6.7×10^5 個、 6.8×10^5 個、 6.9×10^5 個または 7.0×10^5 個を含めた、細胞約 5×10^5 ～約 7×10^5 個の範囲内の未成熟B細胞集団を骨髄中に有し、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 5.33×10^5 個の未成熟B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 5.80×10^5 個の未成熟B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 5.92×10^5 個の未成熟B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、マウスは、細胞約 6.67×10^5 個の未成熟B細胞集団を骨髄中に含む。本明細書に記載の遺伝子

40

50

改変マウスの骨髄中の例示的な未成熟B細胞は、IgM、B220および/またはその組合せの発現（例えば、IgM⁺、B220^{int}）によって特徴付けられる。

【0171】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、ヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ）のヒトJ_H 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する軽鎖を発現し、例えば、細胞約3.0×10⁴個、3.5×10⁴個、4.0×10⁴個、4.5×10⁴個、5.0×10⁴個、5.5×10⁴個、6.0×10⁴個、6.5×10⁴個、7.0×10⁴個、7.5×10⁴個、8.0×10⁴個、8.5×10⁴個、9.0×10⁴個、9.5×10⁴個、1.0×10⁵個または1.5×10⁵個を含めた、細胞約3×10⁴～約1.5×10⁵個の範囲内の成熟B細胞集団を骨髄中に有し、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約3.11×10⁴個の成熟B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.09×10⁵個の成熟B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.16×10⁵個の成熟B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.44×10⁵個の成熟B細胞集団を骨髄中に含む。本明細書に記載の遺伝子改変マウスの骨髄中の例示的な成熟B細胞は、IgM、B220および/またはその組合せの発現（例えば、IgM⁺、B220^{hi}）によって特徴付けられる。

10

【0172】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、ヒトV_H 1-39遺伝子セグメントまたはヒトV_H 3-20遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ）のヒトJ_H 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する軽鎖を発現し、例えば、細胞約1.0×10⁶個、1.1×10⁶個、1.2×10⁶個、1.3×10⁶個、1.4×10⁶個、1.5×10⁶個、1.6×10⁶個、1.7×10⁶個、1.8×10⁶個、1.9×10⁶個、2.0×10⁶個、2.1×10⁶個、2.2×10⁶個、2.3×10⁶個、2.4×10⁶個、2.5×10⁶個、2.6×10⁶個、2.7×10⁶個、2.8×10⁶個、2.9×10⁶個または2.0×10⁶個を含めた、細胞約1×10⁶～約3×10⁶個の範囲内の総B細胞集団を骨髄中に有し、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.59×10⁶個の総B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.75×10⁶個の総B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約2.13×10⁶個の総B細胞集団を骨髄中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約2.55×10⁶個の総B細胞集団を骨髄中に含む。本明細書に記載の遺伝子改変マウスの骨髄中の例示的な総B細胞は、CD19、CD20および/またはその組合せの発現（例えば、CD19⁺）によって特徴付けられる。

20

30

【0173】

一態様では、単一の再構成された軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、機能的な軽鎖遺伝子座を含み、同じ単一の再構成された軽鎖に由来する軽鎖を発現するIg⁺細胞を含むB細胞集団を発現するマウスが提供される。一実施形態では、マウスにおけるIg⁺Ig⁺B細胞のパーセントは野生型マウスにおけるものとほぼ同じである。特定の実施形態では、マウスにおけるIg⁺Ig⁺B細胞のパーセントは約2～約6パーセントである。特定の実施形態では、単一の再構成された軽鎖がV_H 1-39J_H 5配列に由来する場合のマウスにおけるIg⁺Ig⁺B細胞のパーセントは約2～約3であり、特定の実施形態では、当該パーセントは約2.6である。特定の実施形態では、単一の再構成された軽鎖がV_H 3-20J_H 1配列に由来する場合のマウスにおけるIg⁺Ig⁺B細胞のパーセントは約4～約8であり、特定の実施形態では、当該パーセントは約6である。

40

【0174】

一部の実施形態では、再構成されたヒト免疫グロブリンV_H/J_H配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、機能的な免疫グロブリン軽鎖遺伝子座

50

を含み、約1～約8であり、一部の実施形態では約1～約5であるIg + B細胞のIg + B細胞に対する比を含む脾性B細胞集団を含むマウスが提供される。一部の実施形態では、再構成されたヒト免疫グロブリンV / J 配列は、2つのヒト免疫グロブリンV 遺伝子セグメントのうちの1つおよび1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヒト免疫グロブリンJ 遺伝子セグメントのうちの1つの再構成によって生成する。一部の実施形態では、再構成されたヒト免疫グロブリンV / J 配列は、ヒト免疫グロブリンV 1 - 39 遺伝子セグメントおよびJ 1、J 2、J 3、J 4、J 5、およびこれらの組合せから選択されるヒト免疫グロブリンJ 遺伝子セグメントの再構成によって生成する。一部の実施形態では、再構成されたヒト免疫グロブリンV / J 配列は、ヒト免疫グロブリンV 3 - 20 遺伝子セグメントおよびJ 1、J 2、J 3、J 4、J 5、およびこれらの組合せから選択されるヒト免疫グロブリンJ 遺伝子セグメントの再構成によって生成する。

10

【0175】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、細胞約 2.0×10^6 個、 2.5×10^6 個、 3.0×10^6 個、 3.5×10^6 個、 4.0×10^6 個、 4.5×10^6 個、 5.0×10^6 個、 5.5×10^6 個、 6.0×10^6 個、 6.5×10^6 個または 7.0×10^6 個を含めた、細胞約 2×10^6 個～約 7×10^6 個の範囲内のCD19 + 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 2.74×10^6 個のCD19 + 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 4.30×10^6 個のCD19 + 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 5.53×10^6 個のCD19 + 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 6.18×10^6 個のCD19 + 脾性B細胞集団を含む。

20

【0176】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、細胞約 1.0×10^6 個、 1.5×10^6 個、 2.0×10^6 個、 2.5×10^6 個、 3.0×10^6 個、 3.5×10^6 個、 4.0×10^6 個を含めた、細胞約 1×10^6 ～約 4×10^6 個の範囲内のCD19 +、IgDhi、IgMlo 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、約 1.30×10^6 個のCD19 +、IgDhi、IgMlo 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 2.13×10^6 個のCD19 +、IgDhi、IgMlo 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 3.15×10^6 個のCD19 +、IgDhi、IgMlo 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 3.93×10^6 個のCD19 +、IgDhi、IgMlo 脾性B細胞集団を含む。

30

【0177】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、細胞約 9.0×10^5 個、 9.25×10^5 個、 9.5×10^5 個、 9.75×10^5 個、 1.0×10^6 個、 1.25×10^6 個、 1.50×10^6 個、 1.75×10^6 個、 2.0×10^6 個を含めた、細胞約 9×10^5 個～約 2×10^6 個の範囲内のCD19 +、IgDlo、IgMhi 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、約 9.52×10^5 個のCD19 +、IgDlo、IgMhi 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.23×10^6 個のCD19 +、IgDlo、IgMhi 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.40×10^6 個のCD19 +、IgDlo、IgMhi 脾性B細胞集団を含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.42×10^6 個のCD19 +、IgDlo、IgMhi 脾性B細胞集団を含む。

40

【0178】

一部の実施形態では、遺伝子改変マウスであって、2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV 遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)の再構成されていないヒトJ 遺伝子セグメントを含む免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、免疫グロブリン 軽鎖V 遺伝子セグメントおよびJ 遺伝子セグメントの野

50

生型相補物を含むマウスとほぼ同じ移行（例えば、T1、T2およびT3）B細胞集団を含む末梢脾性B細胞集団を含む遺伝子改変マウスが提供される。本明細書に記載の遺伝子改変マウスの脾臓中の例示的な移行B細胞集団（例えば、T1、T2およびT3）は、IgM、CD23、CD93、B220および/またはその組合せの発現によって特徴付けられる。

【0179】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、約 2.0×10^6 個、 2.5×10^6 個、 3.0×10^6 個、 3.5×10^6 個、 4.0×10^6 個、 4.5×10^6 個、 5.0×10^6 個、 5.5×10^6 個、 6.0×10^6 個、 6.5×10^6 個または 7.0×10^6 個を含めた、細胞約 2×10^6 個～約 7×10^6 個の範囲内のT1 B細胞集団（例えば、CD93⁺、B220⁺、IgM^{hi}、CD23⁻）を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 2.16×10^6 個のT1 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 3.63×10^6 個のT1 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、約 3.91×10^6 個のT1 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 6.83×10^6 個のT1 B細胞集団を脾臓中に含む。

10

【0180】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、約 1.0×10^6 個、 1.5×10^6 個、 2.0×10^6 個、 2.5×10^6 個、 3.0×10^6 個、 3.5×10^6 個、 4.0×10^6 個、 4.5×10^6 個、 5.0×10^6 個、 5.5×10^6 個、 6.0×10^6 個、 6.5×10^6 個または 7.0×10^6 個を含めた、細胞約 1×10^6 個～約 7×10^6 個の範囲内のT2 B細胞集団（例えば、CD93⁺、B220⁺、IgM^{hi}、CD23⁺）を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.30×10^6 個のT2 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 2.46×10^6 個のT2 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、約 3.24×10^6 個のT2 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 6.52×10^6 個のT2 B細胞集団を脾臓中に含む。

20

【0181】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、約 1.0×10^6 個、 1.5×10^6 個、 2.0×10^6 個、 2.5×10^6 個、 3.0×10^6 個、 3.5×10^6 個または 4.0×10^6 個を含めた、細胞約 1×10^6 個～約 4×10^6 個の範囲内のT3 B細胞集団（例えば、CD93⁺、B220⁺、IgM^{lo}、CD23⁺）を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.08×10^6 個のT3 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 1.35×10^6 個のT3 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、約 3.37×10^6 個のT3 B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約 3.63×10^6 個のT1 B細胞集団を脾臓中に含む。

30

【0182】

一部の実施形態では、遺伝子改変マウスであって、2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV遺伝子セグメントおよび1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ遺伝子セグメントを含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含み、免疫グロブリンV遺伝子セグメントおよびJ遺伝子セグメントの野生型相補物を含むマウスとほぼ同じである辺縁帯および辺縁帯前駆B細胞集団（marginal zone precursor B cell population）を含む末梢脾性B細胞集団を含む遺伝子改変マウスが提供される。本明細書に記載の遺伝子改変マウスの脾臓中の例示的な辺縁帯B細胞集団は、IgM、CD21/35、CD23、CD93、B220および/またはその組合せの発現によって特徴付けられる。

40

【0183】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、細胞約 1.0×10^6 個、 1.5×1

50

0⁶個、2.0 × 10⁶個、2.5 × 10⁶個または3.0 × 10⁶個を含めた、細胞約1 × 10⁶個～約3 × 10⁶個の範囲内の辺縁帯B細胞集団(例えば、CD93⁻、B220⁺、IgM^{hi}、CD21/35^{hi}、CD23⁻)を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.47 × 10⁶個の辺縁帯B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.49 × 10⁶個の辺縁帯B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約2.26 × 10⁶個の辺縁帯B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約2.33 × 10⁶個の辺縁帯B細胞集団を脾臓中に含む。

【0184】

一部の実施形態では、遺伝子改変マウスであって、2つの再構成されていないヒト免疫グロブリンV 遺伝子セグメントおよび1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの再構成されていないヒト免疫グロブリンJ 遺伝子セグメントを含む免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、免疫グロブリンV 遺伝子セグメントおよびJ 遺伝子セグメントの野生型相補物を含むマウスとほぼ同じである濾胞(例えば、FO-IおよびFO-II)B細胞集団(複数可)を含む末梢脾性B細胞集団を含む遺伝子改変マウスが提供される。本明細書に記載の遺伝子改変マウスの脾臓中の例示的な濾胞B細胞集団(例えば、FO-IおよびFO-II)は、IgM、IgD、CD21/35、CD93、B220および/またはその組合せの発現によって特徴付けられる。

10

【0185】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、細胞約3.0 × 10⁶個、3.5 × 10⁶個、4.0 × 10⁶個、4.5 × 10⁶個、5.0 × 10⁶個、5.5 × 10⁶個、6.0 × 10⁶個、6.5 × 10⁶個、7.0 × 10⁶個、7.5 × 10⁶個、8.0 × 10⁶個、8.5 × 10⁶個、9.0 × 10⁶個、9.5 × 10⁶個、1.0 × 10⁷個または1.5 × 10⁷個を含めた、細胞約3 × 10⁶個～約1.5 × 10⁷個の範囲内の濾胞1型B細胞集団(例えば、CD93⁻、B220⁺、CD21/35^{int}、IgM^{lo}、IgD^{hi})を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約3.57 × 10⁶個の濾胞1型B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約6.31 × 10⁶個の濾胞1型B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約9.42 × 10⁶個の濾胞1型B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.14 × 10⁷個の濾胞1型B細胞集団を脾臓中に含む。

20

30

【0186】

一部の実施形態では、本発明のマウスは、例えば、細胞1.0 × 10⁶個、1.25 × 10⁶個、1.5 × 10⁶個、1.75 × 10⁶個または2.0 × 10⁶個を含めた、細胞約1 × 10⁶個～約2 × 10⁶個の範囲内の濾胞2型B細胞集団(例えば、CD93⁻、B220⁺、CD21/35^{int}、IgM^{int}、IgD^{hi})を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.14 × 10⁶個の濾胞2型B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約1.45 × 10⁶個の濾胞2型B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、約1.80 × 10⁶個の濾胞2型B細胞集団を脾臓中に含み、一部の実施形態では、本発明のマウスは、細胞約2.06 × 10⁶個の濾胞2型B細胞集団を脾臓中に含む。

40

【0187】

一態様では、ヒトV およびJ 遺伝子セグメントに由来する単一の再構成された 軽鎖を発現し、単一の再構成された 軽鎖配列に由来する単一の 軽鎖を含むB細胞集団を発現し、体細胞超変異に対して抵抗性にされていない遺伝子改変マウスが提供される。一実施形態では、マウスのB細胞において発現される 軽鎖の少なくとも90%が少なくとも1つ～約5つの体細胞超変異を示す。

【0188】

一態様では、1つ以下または2つ以下の再構成された 軽鎖配列に由来する単一の 軽鎖を発現するように改変された遺伝子改変マウスであって、野生型マウスによって示される

50

軽鎖の使用の、または 軽鎖遺伝子セグメントの野生型レパートリーを含む同じ系統のマウスによって示される 軽鎖の使用の約 2 倍もしくはそれ超、少なくとも約 3 倍もしくはそれ超または少なくとも約 4 倍もしくはそれ超の 軽鎖の使用を示すマウスが提供される。特定の実施形態では、マウスは、1 つ以下の再構成された 軽鎖配列から単一の 軽鎖を発現する。その他の特定の実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{1-39J} 5 配列および V_{3-20J} 1 配列から選択される。一実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{1-39J} 5 配列である。一実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{3-20J} 1 配列である。

【0189】

一態様では、1 つ以下または 2 つ以下の再構成された 軽鎖配列に由来する単一の 軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、完全なまたは実質的に完全なヒト 軽鎖遺伝子座を有するマウスによって示される同じ 軽鎖の使用の約 100 倍またはそれ超、少なくとも約 200 倍またはそれ超、少なくとも約 300 倍またはそれ超、少なくとも約 400 倍またはそれ超、少なくとも約 500 倍またはそれ超、少なくとも約 600 倍またはそれ超、少なくとも約 700 倍またはそれ超、少なくとも約 800 倍またはそれ超、少なくとも約 900 倍またはそれ超、少なくとも約 1000 倍またはそれ超の 軽鎖の使用を示すマウスが提供される。特定の実施形態では、完全なまたは実質的に完全なヒト 軽鎖遺伝子座を有するマウスは、機能的な再構成されていないマウス 軽鎖配列を欠く。特定の実施形態では、マウスは、1 つ以下の再構成された 軽鎖配列から単一の 軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、再構成された 軽鎖配列の 1 つのコピー（例えば、ヘテロ接合体）を含む。一実施形態では、マウスは、再構成された 軽鎖配列の 2 つのコピーを含む（例えば、ホモ接合体）。その他の特定の実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{1-39J} 5 配列および V_{3-20J} 1 配列から選択される。一実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{1-39J} 5 配列である。一実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{3-20J} 1 配列である。

【0190】

一態様では、1 つ以下または 2 つ以下の再構成された軽鎖配列に由来する単一の軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、該マウスにおける軽鎖が、完全なまたは実質的に完全な軽鎖遺伝子座を有するマウスによって示される同じ再構成された軽鎖の発現の少なくとも 10 倍～約 1,000 倍、100 倍～約 1,000 倍、200 倍～約 1,000 倍、300 倍～約 1,000 倍、400 倍～約 1,000 倍、500 倍～約 1,000 倍、600 倍～約 1,000 倍、700 倍～約 1,000 倍、800 倍～約 1,000 倍または 900 倍～約 1,000 倍高い発現のレベルを示す遺伝子改変マウスが提供される。一実施形態では、軽鎖はヒト配列を含む。特定の実施形態では、ヒト配列は 配列である。一実施形態では、ヒト配列は 配列である。一実施形態では、軽鎖は完全ヒト軽鎖である。

【0191】

一実施形態では、発現レベルは、転写された軽鎖配列の mRNA を定量し、それを完全なまたは実質的に完全な軽鎖遺伝子座を有するマウスの転写された軽鎖配列と比較することによって特徴付けられる。

【0192】

一態様では、1 つ以下または 2 つ以下の再構成された 軽鎖配列に由来する単一の 軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、抗原を用いて免疫されると、同じ抗原を用いて免疫した野生型マウスに匹敵する血清力価を示すマウスが提供される。特定の実施形態では、マウスは、1 つ以下の再構成された 軽鎖配列から単一の 軽鎖を発現する。一実施形態では、血清力価は総免疫グロブリンとして特徴付けられる。特定の実施形態では、血清力価は IgM 特異的力価として特徴付けられる。特定の実施形態では、血清力価は IgG 特異的力価として特徴付けられる。その他の特定の実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{1-39J} 5 配列および V_{3-20J} 1 配列から選択される。一実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{1-39J} 5 配列である。一実施形態では、再構成された 軽鎖配列は V_{3-20J} 1 配列である。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 3 】

一態様では、抗原特異的抗体の集団を発現する遺伝子改変マウスであって、抗原特異的抗体の集団の免疫グロブリン軽鎖の全てが同じ単一のヒトV_L遺伝子セグメントに由来するヒト軽鎖可変(V_L)領域を含み、免疫グロブリン重鎖が複数のヒトV_H遺伝子セグメントのうちの1つに由来するヒト重鎖可変(V_H)領域を含むマウスが提供される。

【 0 1 9 4 】

種々の実施形態では、ヒトV_H遺伝子セグメントは、V_H1 - 2、V_H1 - 3、V_H1 - 8、V_H1 - 18、V_H1 - 24、V_H1 - 46、V_H1 - 58、V_H1 - 69、V_H2 - 5、V_H2 - 26、V_H2 - 70、V_H3 - 7、V_H3 - 9、V_H3 - 11、V_H3 - 13、V_H3 - 15、V_H3 - 20、V_H3 - 21、V_H3 - 23、V_H3 - 30、V_H3 - 33、V_H3 - 43、V_H3 - 48、V_H3 - 53、V_H3 - 64、V_H3 - 72、V_H3 - 73、V_H4 - 31、V_H4 - 34、V_H4 - 39、V_H4 - 59、V_H5 - 51、およびV_H6 - 1から選択される。

10

【 0 1 9 5 】

種々の実施形態では、同じ単一のヒトV_L遺伝子セグメントは、ヒトV_L1 - 39遺伝子セグメントおよびヒトV_L3 - 20遺伝子セグメントから選択される。種々の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖の全てが、J_L遺伝子セグメントおよびJ_H遺伝子セグメントから選択されるヒト軽鎖J_L(J_L)遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態では、ヒトJ_L遺伝子セグメントは、ヒトJ_L1遺伝子セグメントおよびヒトJ_L5遺伝子セグメントから選択される。種々の実施形態では、マウスは、マウス免疫グロブリンV_L遺伝子セグメント、マウス免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメント、およびこれらの組合せから選択される配列を欠く。種々の実施形態では、ヒトV_L領域は、ヒト、マウス、またはラット免疫グロブリン軽鎖定常(C_L)領域に作動可能に連結している。特定の実施形態では、ヒトV_L領域はマウスC_L領域に作動可能に連結している。特定の実施形態では、ヒトV_L領域はラットC_L領域に作動可能に連結している。

20

【 0 1 9 6 】

種々の実施形態では、ヒトV_L領域は、内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から発現する。種々の実施形態では、ヒトV_H領域は、ヒト、マウス、またはラット免疫グロブリン重鎖定常(C_H)領域に作動可能に連結している。種々の実施形態では、(C_H)領域は、C_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3、C_H4、および/またはその組合せから選択されるヒト配列を含む。種々の実施形態では、ヒトV_H領域は、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座から発現する。

30

【 0 1 9 7 】

一態様では、単一の軽鎖と結合した複数の免疫グロブリン重鎖を発現する遺伝子改変マウスが提供される。一実施形態では、重鎖はヒト配列を含む。種々の実施形態では、ヒト配列は、可変配列、C_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3、およびこれらの組合せから選択される。一実施形態では、単一の軽鎖はヒト配列を含む。種々の実施形態では、ヒト配列は、可変配列、定常配列、およびこれらの組合せから選択される。一実施形態では、マウスは、機能しない内因性免疫グロブリン遺伝子座を含み、導入遺伝子または染色体外エピソームから重鎖および/または軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、内因性マウス遺伝子座において一部もしくは全ての内因性マウス重鎖遺伝子セグメント(すなわち、V、D、J)、および/または一部もしくは全ての内因性マウス重鎖定常配列(例えば、C_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3、またはこれらの組合せ)、および/または一部もしくは全ての内因性マウス軽鎖配列(例えば、V、J、定常、またはこれらの組合せ)の、1つまたは複数のヒト免疫グロブリン配列での置き換えを含む。

40

【 0 1 9 8 】

一態様では、同じ軽鎖を有する抗体の作製に適したマウスであって、該マウスにおいて作製する全てまたは実質的に全ての抗体が同じ軽鎖とともに発現するマウスが提供される。一実施形態では、軽鎖は内因性軽鎖遺伝子座から発現する。

【 0 1 9 9 】

50

一態様では、ヒト抗体のための軽鎖を作製するための方法であって、本明細書に記載のマウスから軽鎖配列および重鎖配列を得るステップ、およびヒト抗体の作製において当該軽鎖配列および重鎖配列を使用するステップを含む方法が提供される。一実施形態では、ヒト抗体は二重特異性抗体である。

【0200】

一態様では、本明細書に記載の操作された軽鎖と共に目的の抗原と結合することができるヒト重鎖可変ドメインを同定するための方法であって、抗原に結合することができる第1の抗体に由来する重鎖可変ドメインをもたらすステップ、重鎖可変ドメインを生殖系列軽鎖配列と再対合せ (repairing)、細胞をトランスフェクトし、したがって、それぞれが発現して第2の抗体を形成するステップ、第2の抗体を抗原に曝露するステップ、および第2の抗体の抗原への結合を測定するステップを含む方法が提供される。

10

【0201】

一実施形態では、第1の抗体の軽鎖はヒトV_H 1-39配列を含む。一実施形態では、第1の抗体の軽鎖はヒトV_H 3-20配列を含む。一実施形態では、生殖系列軽鎖配列はヒトV_H 1-39配列またはヒトV_H 3-20配列を含む。種々の実施形態では、第2の抗体の抗原への結合を第1の抗体の抗原への結合との比較によって決定する。

【0202】

別段の指定がある場合または文脈から明らかである場合を除き、本明細書に記載されている実施形態および態様はいずれも互いと併せて使用することができる。以下の記載を精査することで他の実施形態が当業者には明らかである。

20

【図面の簡単な説明】

【0203】

【図1】図1は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒトV_H 1-39 J_H 5 遺伝子領域で置き換えるためのターゲティング戦略を例示する図である。

【0204】

【図2】図2は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒトV_H 3-20 J_H 1 遺伝子領域で置き換えるためのターゲティング戦略を例示する図である。

【0205】

【図3】図3は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒトV_H p r e B / J_H 5 遺伝子領域で置き換えるためのターゲティング戦略を例示する図である。

30

【0206】

【図4】図4は、野生型マウス (W T)、操作された再構成されたヒトV_H 1-39 J_H 5 軽鎖領域についてホモ接合性のマウス (V_H 1-39 J_H 5 H O) および操作された再構成されたヒトV_H 3-20 J_H 1 軽鎖領域についてホモ接合性のマウス (V_H 3-20 J_H 1 H O) についての、末梢血由来のC D 19 + B細胞のパーセント (y軸) を示すグラフである。

【0207】

【図5A】図5Aは、内因性V_H およびJ_H 遺伝子セグメントの、ヒトV_H およびJ_H 遺伝子セグメント (H) での置き換えについてホモ接合性のマウス、野生型マウス (W T)、および操作された再構成されたヒトV_H 1-39 J_H 5 軽鎖領域についてヘテロ接合性のマウス (V_H 1-39 J_H 5 H E T) における、操作された再構成されたヒトV_H 1-39 J_H 5 軽鎖領域の接合部に特異的なプローブ (V_H 1-39 J_H 5 接合部プローブ) およびヒトV_H 1-39 遺伝子セグメントに特異的なプローブ (V_H 1-39 プローブ) を使用した定量的P C RアッセイでのV_H 1-39由来軽鎖の相対的なm R N Aの発現 (y軸) を示すグラフである。シグナルはマウスC_Hの発現に対して正規化されている。N . D . : 検出されず。

40

【0208】

【図5B】図5Bは、内因性V_H およびJ_H 遺伝子セグメントの、ヒトV_H およびJ_H 遺伝子セグメント (H) での置き換えについてホモ接合性のマウス、野生型マウス (W T)、および操作された再構成されたヒトV_H 1-39 J_H 5 軽鎖領域についてホモ接合性

50

の Maus (V 1 - 3 9 J 5 H O) における、操作された再構成されたヒト V 1 - 3 9 J 5 軽鎖領域の接合部に特異的なプローブ (V 1 - 3 9 J 5 接合部プローブ) およびヒト V 1 - 3 9 遺伝子セグメントに特異的なプローブ (V 1 - 3 9 プローブ) を使用した定量的 PCR アッセイでの V 1 - 3 9 由来軽鎖の相対的な mRNA の発現 (y 軸) を示す図である。シグナルは Maus C の発現に対して正規化されている。

【 0 2 0 9 】

【 図 5 C 】 図 5 C は、内因性 V および J 遺伝子セグメントのヒト V および J 遺伝子セグメント (H) での置き換えについてホモ接合性の Maus、野生型 Maus (W T)、ならびに操作された再構成されたヒト V 3 - 2 0 J 1 軽鎖領域についてヘテロ接合性 (H E T) の Maus およびホモ接合性 (H O) の Maus における、操作された再構成されたヒト V 3 - 2 0 J 1 軽鎖領域の接合部に特異的なプローブ (V 3 - 2 0 J 1 接合部プローブ) およびヒト V 3 - 2 0 遺伝子セグメントに特異的なプローブ (V 3 - 2 0 プローブ) を使用した定量的 PCR アッセイでの V 3 - 2 0 由来の軽鎖の相対的な mRNA の発現 (y 軸) を示すグラフである。シグナルは Maus C の発現に対して正規化されている。

10

【 0 2 1 0 】

【 図 6 A 】 図 6 A は、 - ガラクトシダーゼを用いて免疫した、野生型 Maus (W T ; N = 2) および操作された再構成されたヒト V 1 - 3 9 J 5 軽鎖領域についてホモ接合性の Maus (V 1 - 3 9 J 5 H O ; N = 2) における I g M 力価 (左側) および I g G 力価 (右側) を示すグラフである。

20

【 0 2 1 1 】

【 図 6 B 】 図 6 B は、 - ガラクトシダーゼを用いて免疫した、野生型 Maus (W T ; N = 5) および操作された再構成されたヒト V 3 - 2 0 J 1 軽鎖領域についてホモ接合性の Maus (V 3 - 2 0 J 1 H O ; N = 5) における総免疫グロブリン (I g M、I g G、I g A) 力価を示すグラフである。

【 0 2 1 2 】

【 図 7 A 】 図 7 A は、単一特異性抗体 (親 - 1 および親 - 2) ならびに各親単一特異性抗体由来の重鎖可変領域から構築された二重特異性抗体 (二重特異性) の概略図である。二重特異性抗体における共通の軽鎖可変領域 (濃くしてある) が示されている。

【 0 2 1 3 】

【 図 7 B 】 図 7 B は、2つの親モノクローナル抗体 (親 - 1 および親 - 2) の目的の抗原に対する結合特性、ならびに各単一特異性親抗体由来の重鎖可変領域を共通の軽鎖と対合させることで構築された二重特異性抗体の結合特性についての概略図である。目的の抗原の2つの別個のエピトープに別々に (左下) または同時に (右下) 結合する二重特異性抗体の能力が示されている。

30

【 0 2 1 4 】

【 図 8 】 図 8 は、300 n M の二重特異性抗体 (濃い棒) および単一特異性抗体 (斜線の入った棒および灰色の棒) の、捕捉された単量体抗原 E 表面への結合の B I A C O R E (商標) 単位 (R U) で示す棒グラフである。モノクローナル親 - 1 抗体 (P 1 A b)、モノクローナル親 - 2 (P 2 A b) および二重特異性抗体 (B s A b) が示されている。

40

【 0 2 1 5 】

【 図 9 】 図 9 は、2つの遺伝子改変内因性免疫グロブリン軽鎖 (例えば、軽鎖) 遺伝子座を示す図である。上の遺伝子座 (D L C - 5 J) は、2つのヒト V 遺伝子セグメントおよび5つのヒト J 遺伝子セグメントを含有する操作されたヒト DNA 断片 (斜線の入った線) を含有する。下の遺伝子座 (D L C - 1 J) は、2つのヒト V 遺伝子セグメントおよび1つのヒト J 遺伝子セグメントを含有する操作されたヒト DNA 断片 (斜線の入った線) を含有する。各遺伝子座は、再構成して、内因性軽鎖定常領域 (例えば、C) に作動可能に連結したヒト V 領域を形成することができる。免疫グロブリンプロモーター (遺伝子座の上の矢印)、リーダーエクソン (黒塗りの矢印)、および2つのヒト V 遺伝子セグメント (白抜きの矢印)、それら全部の上流 (5 ') に隣接する (f l a n k

50

e d) F r t 組換え部位を含有するネオマイシンカセットが示されている。ヒト遺伝子セグメント (V および J) のそれぞれを用いて操作された組換えシグナル配列が各遺伝子セグメントに近接した白抜きの楕円により示されている。

【 0 2 1 6 】

【 図 1 0 A 】 図 1 0 A の上のパネルは、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) 由来の、B 細胞および T 細胞 (それぞれ C D 1 9 + および C D 3 +) について染色した骨髄の代表的な等高線図を示す。下のパネルは、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) 由来の、C D 1 9 + についてゲーティングし、c k i t + および C D 4 3 + について染色した骨髄の代表的な等高線図を示す。下のパネルの等高線図にはプロ B 細胞およびプレ B 細胞が示されている。

10

【 0 2 1 7 】

【 図 1 0 B 】 図 1 0 B は、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) の大腿骨から採取した骨髄中のプロ B 細胞 (C D 1 9 + C D 4 3 + c k i t +) およびプレ B 細胞 (C D 1 9 + C D 4 3 - c k i t -) の数を示すグラフである。

【 0 2 1 8 】

【 図 1 1 A 】 図 1 1 A は、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) 由来の、免疫グロブリン M (I g M) および B 2 2 0 について染色したシングルレットについてゲーティングした骨髄の代表的な等高線図を示す。未成熟 B 細胞、成熟 B 細胞およびプロ / プレ B 細胞が等高線図のそれぞれに示されている。

20

【 図 1 1 B 】 図 1 1 B は、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) の大腿骨から単離した骨髄中の B 細胞 (C D 1 9 +) 、未成熟 B 細胞 (B 2 2 0 i n t I g M +) および成熟 B 細胞 (B 2 2 0 h i I g M +) の総数を示すグラフである。

【 0 2 1 9 】

【 図 1 2 A 】 図 1 2 A は、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) 由来の、免疫グロブリン M (I g M) および B 2 2 0 について染色したシングルレットについてゲーティングした骨髄の代表的な等高線図を示す。未成熟 B 細胞、成熟 B 細胞およびプロ / プレ B 細胞が等高線図のそれぞれに示されている。

30

【 図 1 2 B 】 図 1 2 B は、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) の大腿骨から単離した、I g および I g 発現について染色した未成熟 B 細胞 (B 2 2 0 i n t I g M +) および成熟 B 細胞 (B 2 2 0 h i I g M +) についてゲーティングした骨髄の代表的な等高線図を示す。

【 0 2 2 0 】

【 図 1 3 A 】 図 1 3 A の上のパネルは、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) 由来の、シングルレットについてゲーティングし、B 細胞および T 細胞 (それぞれ C D 1 9 + および C D 3 +) について染色した脾細胞の代表的な等高線図を示す。下のパネルは、野生型マウス (W T) ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス (D L C - 5 J) 由来の、C D 1 9 + についてゲーティングし、免疫グロブリン D (I g D) および免疫グロブリン M (I g M) について染色した脾細胞の代表的な等高線図を示す。成熟 B 細胞 (W T について 5 4 、 D L C - 5 J について 5 6 . 9) および移行 B 細胞 (W T について 2 3 . 6 、 D L C - 5 J について 2 5 . 6) が等高線図のそれぞれに示されている。

40

【 0 2 2 1 】

50

【図13B】図13Bは、野生型マウス(WT)ならびに2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-5J)から採取した脾臓中のCD19+B細胞、移行B細胞(CD19+IgMhiIgDlo)および成熟B細胞(CD19+IgMloIgDhi)の総数を示すグラフである。

【0222】

【図14A】図14Aは、野生型マウス(WT)ならびに2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-5J)由来の、CD19+についてゲーティングしたIg +およびIg +脾細胞の代表的な等高線図を示す。

【0223】

【図14B】図14Bは、野生型マウス(WT)ならびに2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-5J)から採取した脾臓中のB細胞(CD19+)、Ig +B細胞(CD19+Ig +)およびIg +B細胞(CD19+Ig +)の総数を示すグラフである。

【0224】

【図15A】図15Aは、2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウスにおける末梢B細胞発生を示す図を示す。第1(左端)の等高線図はCD19+についてゲーティングしたCD93+およびB220+脾細胞を示し、これにより、未成熟B細胞(39.6)および成熟B細胞(57.8)が示されている。第2(中央上)の等高線図は未成熟B細胞におけるIgM+およびCD23+発現を示し、これにより、T1 B細胞集団(33.7; IgD-IgM+CD21loCD23-)、T2 B細胞集団(21.2; IgDhiIgMhiCD21midCD23+)およびT3 B細胞集団(29.1)が示されている。第3(中央下)の等高線図は成熟B細胞のCD21+(CD35+)およびIgM+発現を示し、これにより、辺縁帯B細胞を生じる小集団(14.8)および濾胞(FO)B細胞を生じる第2の集団(70.5)が示されている。第4(右上)の等高線図は成熟B細胞におけるB220+およびCD23+発現を示し、これにより、辺縁帯B細胞集団(90.5; MZ)および辺縁帯前駆B細胞集団(7.3; IgMhiIgDhiCD21hiCD23+)が示されている。第5(右下)の等高線図は成熟B細胞におけるIgD+およびIgM+発現を示し、これにより、FO-I B細胞集団(79.0; IgDhiIgMloCD21midCD23+)およびFO-II B細胞集団(15.1; IgDhiIgMhiCD21midCD23+)が示されている。各ゲーティングされた領域内の細胞の百分率が示されている。

【0225】

【図15B】図15Bは、野生型マウスにおける末梢B細胞発生を示す図を示す。第1(左端)の等高線図はCD19+についてゲーティングしたCD93+およびB220+脾細胞を示し、これにより、未成熟B細胞(31.1)および成熟B細胞(64.4)が示されている。第2(中央上)の等高線図は未成熟B細胞におけるIgM+およびCD23+発現を示し、これにより、T1 B細胞集団(28.5; IgD-IgM+CD21loCD23-)、T2 B細胞集団(28.7; IgDhiIgMhiCD21midCD23+)およびT3 B細胞集団(30.7)が示されている。第3(中央下)の等高線図は成熟B細胞のCD21+(CD35+)およびIgM+発現を示し、これにより、辺縁帯B細胞を生じる小集団(7.69)および濾胞(FO)B細胞を生じる第2の集団(78.5)が示されている。第4(右上)の等高線図は成熟B細胞におけるB220+およびCD23+発現を示し、これにより、辺縁帯B細胞集団(79.9; MZ)および辺縁帯前駆B細胞集団(19.4; IgMhiIgDhiCD21hiCD23+)が示されている。第5(右下)の等高線図は成熟B細胞におけるIgD+およびIgM+発現を示し、これにより、FO-I B細胞集団(83.6; IgDhiIgMloCD21midCD23+)およびFO-II B細胞集団(13.1; IgDhiIgMhiCD21midCD23+)が示されている。各ゲーティングされた領域内の細胞の百分率が

10

20

30

40

50

示されている。

【0226】

【図16】図16は、野生型マウス(WT)ならびに2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-5J)から採取した脾臓中の移行B細胞集団、辺縁帯B細胞集団および濾胞B細胞集団の総数を示すグラフである。

【0227】

【図17】図17は、内因性V およびJ 遺伝子セグメントの、ヒトV およびJ 遺伝子セグメント(H)での置き換えについてホモ接合性のマウス、野生型マウス(WT)、2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-5J)および2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび1つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-1J)における、V₃₋₂₀ 遺伝子セグメントまたはV₁₋₃₉ 遺伝子セグメントに特異的なプローブを使用した定量的PCRアッセイでの骨髄におけるV₃₋₂₀由来軽鎖およびV₁₋₃₉由来軽鎖の相対的なmRNAの発現(y軸)を示すグラフである。シグナルはマウスCの発現に対して正規化されている。ND:検出されず。

10

【0228】

【図18】図18は、内因性V およびJ 遺伝子セグメントの、ヒトV およびJ 遺伝子セグメント(H)での置き換えについてホモ接合性のマウス、野生型マウス(WT)、2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-5J)および2つのヒトV 遺伝子セグメントおよび1つのヒトJ 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-1J)における、V₃₋₂₀ 遺伝子セグメントまたはV₁₋₃₉ 遺伝子セグメントに特異的なプローブを使用した定量的PCRアッセイでの脾臓全体におけるV₃₋₂₀由来軽鎖およびV₁₋₃₉由来軽鎖の相対的なmRNAの発現(y軸)を示すグラフである。シグナルはマウスCの発現に対して正規化されている。ND:検出されず。

20

【0229】

【図19】図19は、マウスにおける免疫グロブリン 軽鎖対立遺伝子のV遺伝子セグメントおよびJ遺伝子セグメントの組換えおよび再構成前(上)および再構成後(下)の軽鎖遺伝子座の構造の概略図を示す。示されているそのような再構成は、いくつかの可能性のある再構成事象のうちの1つのみである。

30

【発明を実施するための形態】

【0230】

記載されている特定の方法および実験条件は変動するので、本発明はそのような方法および条件に限定されない。本発明の範囲は特許請求の範囲によって定義されるので、本明細書において使用される用語法は、特定の実施形態を記載するためだけのものであり、限定的なものではないことも理解される。

【0231】

別段の定義のない限り、本明細書で使用される用語および句は全て、それに反することが明示されているまたはこの用語もしくは句が使用される文脈から明らかである場合を除き、当技術分野においてその用語および句に与えられる意味を包含する。本明細書に記載の方法および材料と類似した、またはそれと等しい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がここに記載されている。言及されている刊行物は全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0232】

「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ジスルフィド結合によって相互接続した2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖の4つのポリペプチド鎖を含む免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は重鎖可変(V_H)領域および重鎖定常領域(C_H)を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}を含む。各軽鎖は軽鎖可変(V_L)領域および軽鎖定常領域(C_L)を含む。V_HおよびV_L領域は、フレームワー

50

ク領域（FR）と称されるより保存的な領域が間に入る相補性決定領域（CDR）と称される超可変性の領域にさらに細分することができる。V_HおよびV_Lはそれぞれ、3つのCDRおよび4つのFRを含み、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4（重鎖CDRはHCDR1、HCDR2およびHCDR3と省略することができ、軽鎖CDRはLCDR1、LCDR2およびLCDR3と省略することができる。「高親和性」抗体という用語は、その標的エピトープに対して約 10^{-9} Mまたはそれ未満（例えば、約 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} Mまたは約 1×10^{-12} M）のK_Dを有する抗体を指す。一実施形態では、K_Dは表面プラズモン共鳴、例えば、BIA CORE（商標）によって測定され、別の実施形態では、K_DはELISAによって測定される。

10

【0233】

「二重特異性抗体」という句は、2つまたはそれ超のエピトープに選択的に結合することができる抗体を指す。二重特異性抗体は、2種の異なるモノクローナル抗体の断片を含み（図7A）、一般には、2種の異なるモノクローナル抗体に由来する2つの同一でない重鎖を含み、各重鎖が、2種の異なる分子上の異なるエピトープ（例えば、2種の異なる免疫原上の異なるエピトープ；図7B、左下を参照されたい）または同じ分子上の異なるエピトープ（例えば、同じ免疫原上の異なるエピトープ；図7B、右下を参照されたい）のいずれかに特異的に結合する。二重特異性抗体が2種の異なるエピトープ（第1のエピトープおよび第2のエピトープ）に選択的に結合することができる場合、第1の重鎖の第1のエピトープに対する親和性は、一般に、第1の重鎖の第2のエピトープに対する親和性よりも少なくとも1桁～2桁または3桁または4桁またはそれ超の桁低く、逆もまた同じである。二重特異性抗体が特異的に結合するエピトープは同じ標的上にあっても異なる標的上にあってもよい（例えば、同じタンパク質にあってもまたは異なるタンパク質にあってもよい；図7Bを参照されたい）。例示的な二重特異性抗体としては、腫瘍抗原に特異的な第1の重鎖および細胞傷害性マーカー、例えば、Fc受容体（例えば、FcRI、FcRII、FcRIIIなど）またはT細胞マーカー（例えば、CD3、CD28など）に特異的な第2の重鎖を有するものが挙げられる。さらに、第2の重鎖可変領域は異なる所望の特異性を有する重鎖可変領域で置換することができる。例えば、二重特異性抗体は、腫瘍抗原に特異的な第1の重鎖および毒素に特異的な第2の重鎖でを対合させ、それにより、毒素（例えば、サポリン、ピンカアルカロイドなど）を腫瘍細胞に送達することができる。他の例示的な二重特異性抗体としては、活性化受容体（例えば、B細胞受容体、FcRI、FcRIIA、FcRIIIA、FcRIV、T細胞受容体など）に特異的な第1の重鎖および阻害性受容体（例えば、FcRIIB、CD5、CD22、CD72、CD300aなど）に特異的な第2の重鎖を有するものが挙げられる。細胞活性化に関連する治療的状態（例えば、アレルギーおよび喘息）に対してそのような二重特異性抗体を構築することができる。二重特異性抗体は、例えば、同じ免疫原または異なる免疫原の異なるエピトープを認識する重鎖を組み合わせることによって作製することができる（図7B）。例えば、同じ免疫原または異なる免疫原の異なるエピトープを認識する重鎖可変配列をコードする核酸配列を同じ重鎖定常領域または異なる重鎖定常領域をコードする核酸配列と融合することができ、そのような配列を、免疫グロブリン軽鎖を発現する細胞において発現させることができる。典型的な二重特異性抗体は、それぞれが3種の重鎖CDR、その後（N末端からC末端へ）CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを有する2種の重鎖、ならびに、免疫グロブリン軽鎖であって、エピトープ結合特異性は付与しないが各重鎖と結合することができるか、または各重鎖と結合することができ、かつ重鎖エピトープ結合領域が結合するエピトープのうちの1つまたは複数に結合することができるか、または各重鎖と結合することができ、かつ重鎖の一方または両方がエピトープの一方または両方に結合することを可能にする免疫グロブリン軽鎖を有する。

20

30

40

【0234】

50

「細胞」という用語は、組換え核酸配列を発現させるために適した任意の細胞を包含する。細胞としては、原核生物および真核生物の細胞（単一細胞または複数の細胞）、細菌細胞（例えば、*E. coli*、*Bacillus spp.*、*Streptomyces spp.*の株など）、マイコプラズマ細胞、真菌細胞、酵母細胞（例えば、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、*P. pastoris*、*P. methanolicus*など）、植物細胞、昆虫細胞（例えば、SF-9、SF-21、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞、*Trichoplusia ni*など）、非ヒト動物細胞、ヒト細胞または例えばハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合物が挙げられる。一部の実施形態では、細胞は、ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラットまたはマウスの細胞である。一部の実施形態では、細胞は真核生物の細胞であり、以下の細胞から選択される：CHO（例えば、CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO）、COS（例えば、COS-7）、網膜細胞、Vero、CV1、腎臓（例えば、HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK）、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60、（例えば、BHK21）、Jurkat、Daudi、A431（表皮）、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT060562、Sertoli細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞、および上述の細胞に由来する細胞株。一部の実施形態では、細胞は、1つまたは複数のウイルス遺伝子を含む、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞（例えば、PER.C6（商標）細胞）である。

10

20

【0235】

「相補性（complementarity）決定領域」という句または「CDR」という用語は、通常（すなわち、野生型動物において）免疫グロブリン分子（例えば、抗体またはT細胞受容体）の軽鎖または重鎖の可変領域内の2つのフレームワーク領域間に見られる生物体の免疫グロブリン遺伝子の核酸配列によりコードされるアミノ酸配列を包含する。CDRは、例えば、生殖系列配列または再構成された配列もしくは再構成されていない配列によって、および、例えば、ナイーブなB細胞もしくはT細胞または成熟B細胞もしくはT細胞によってコードされ得る。CDRは、体細胞変異され得（例えば、動物の生殖系列においてコードされる配列と異なる）、ヒト化され得、かつ/またはアミノ酸の置換、付加または欠失によって改変され得る。一部の 경우에는（例えば、CDR3に関して）、CDRは、連続していない（例えば、再構成されていない核酸配列内では）が、B細胞核酸配列内では、例えば、配列のスプライシングまたは連結の結果として（例えば、重鎖CDR3が形成されるV-D-J組換え）連続している2つまたはそれ超の配列（例えば、生殖系列配列）によりコードされ得る。

30

【0236】

「保存的」という用語は、保存的アミノ酸置換を記載するために使用される場合、アミノ酸残基の、化学的性質（例えば、電荷または疎水性）が類似した側鎖R基を有する別のアミノ酸残基での置換を含む。一般に、保存的アミノ酸置換により、タンパク質の目的の機能的性質、例えば、可変領域の、標的エピトープに所望の親和性で特異的に結合する能力は実質的に変化しない。化学的性質が類似した側鎖を有するアミノ酸の群の例としては、脂肪族側鎖、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン；脂肪族ヒドロキシル側鎖、例えば、セリンおよびトレオニン；アミドを含有する側鎖、例えば、アスパラギンおよびグルタミン；芳香族側鎖、例えば、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；塩基性側鎖、例えば、リシン、アルギニン、およびヒスチジン；酸性側鎖、例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸；ならびに、硫黄を含有する側鎖、例えば、システインおよびメチオニンが挙げられる。保存的アミノ酸置換群としては、例えば、バリン/ロイシン/イソロイシン、フェニルアラニン/チロシン、リシン/アルギニン、アラニン/バリン、グルタミン酸/アスパラギン酸、およびアスパラギン/グルタミンが挙げられる。一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、例えばアラニンスキヤニング変異誘発で使用されるように、タンパク質内の任意のネイティブな残基のアラニ

40

50

ンでの置換であってよい。一部の実施形態では、保存的置換は、本明細書によって参照により組み込まれるGonnetら((1992年) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database、Science 256巻: 1443~45頁)に開示されているPAM250対数尤度行列において正の値を有するように成される。一部の実施形態では、置換は、置換がPAM250対数尤度行列において負ではない値を有する、中程度に保存的な置換である。

【0237】

一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖または重鎖の残基の位置は1つまたは複数の保存的アミノ酸置換によって異なる。一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖またはその機能性断片(例えば、例えばB細胞からの発現および分泌を可能にする断片)の残基の位置は、本明細書においてアミノ酸配列が列挙されている軽鎖と同一ではないが、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換によって異なる。

10

【0238】

「エピトープ結合タンパク質」という句は、少なくとも1つのCDRを有し、エピトープを選択的に認識することができる、例えば、エピトープと約1マイクロモル濃度またはそれ未満(例えば、約 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} Mまたは約 1×10^{-12} Mの K_D)の K_D で結合することができるタンパク質を包含する。治療用エピトープ結合タンパク質(例えば、治療用抗体)にはナノモル濃度範囲またはピコモル濃度範囲の K_D が必要であることが多い。

【0239】

「機能性断片」という句は、発現させ、分泌させることができ、エピトープにマイクロモル濃度範囲、ナノモル濃度範囲またはピコモル濃度範囲の K_D で特異的に結合するエピトープ結合タンパク質の断片を包含する。特異的な認識とは、少なくともマイクロモル濃度範囲、ナノモル濃度範囲またはピコモル濃度範囲の K_D を有することを含む。

20

【0240】

「生殖系列」という用語は、体細胞変異していない細胞、例えば、体細胞変異していないB細胞またはプレB細胞または造血細胞内の免疫グロブリン核酸配列への言及を包含する。

【0241】

「重鎖」または「免疫グロブリン重鎖」という句は、任意の生物体由来の免疫グロブリン重鎖定常領域配列を包含する。重鎖可変ドメインは、別段の指定がない限り3つの重鎖CDRおよび4つのFR領域を含む。重鎖の断片はCDR、CDRおよびFR、ならびにこれらの組合せを含む。典型的な重鎖は、可変ドメインの後に(N末端からC末端へ)、CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを有する。重鎖の機能性断片は、エピトープを特異的に認識する(例えば、マイクロモル濃度範囲、ナノモル濃度範囲またはピコモル濃度範囲の K_D でエピトープを認識する)ことができ、細胞から発現させ、分泌させることができ、かつ少なくとも1つのCDRを含む断片を含む。

30

【0242】

「同一性」という用語は、配列に関連して使用される場合、ヌクレオチド配列同一性および/またはアミノ酸配列同一性を測定するために使用することができる当技術分野で公知のいくつもの異なるアルゴリズムによって決定される同一性を包含する。本明細書に記載の一部の実施形態では、オープンギャップペナルティ10.0、伸長ギャップペナルティ0.1を使用したClustalW v.1.83(slow)アライメントを使用し、Gonnet類似度行列(MACVECTOR(商標)10.0.2、MacVector Inc.、2008年)を使用して同一性を決定する。配列の同一性に関して比較される配列の長さは特定の配列に左右されるが、軽鎖定常ドメインの場合では、当該長さは、自己会合して標準的な軽鎖定常ドメインを形成することができる、例えば、ベータ鎖を含む2つのベータシートを形成することができ、ヒトまたはマウスの少なくとも1つのCH1ドメインと相互作用することができる、軽鎖定常ドメインにフォールディングされるのに十分な長さの配列を含有するべきである。CH1ドメインの場合では、配列の長さは、ベータ鎖を含む2つのベータシートを形成することができ、マウスまたはヒトの少なく

40

50

とも1つの軽鎖定常ドメインと相互作用することができるC_H1ドメインにフォールディングされるのに十分な長さの配列を含有するべきである。

【0243】

「免疫グロブリン分子」という句は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖を含む。重鎖は同一であっても異なってもよく、軽鎖は同一であっても異なってもよい。

【0244】

「軽鎖」という句は、任意の生物体由来の免疫グロブリン軽鎖配列を包含し、別段の指定がない限り、ヒト軽鎖および軽鎖およびV_LpreB、ならびに代替軽鎖を包含する。軽鎖可変(V_L)ドメインは、別段の指定がない限り、一般には、3つの軽鎖CDRおよび4つのフレームワーク(FR)領域を含む。一般に、全長の軽鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端までに、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を含むV_Lドメイン、および軽鎖定常ドメインを含む。軽鎖は、例えば、それらが出現するエピトープ結合タンパク質が選択的に結合した第1のエピトープにも第2のエピトープにも選択的には結合しないものを包含する。軽鎖は、それらが出現するエピトープ結合タンパク質が選択的に結合した1つまたは複数のエピトープに結合し、それらを認識するもの、または重鎖が当該エピトープに結合し、それらを認識することを補助するものも包含する。共通の軽鎖とは、再構成されたヒトV_L1-39J5配列または再構成されたヒトV_L3-20J1配列に由来するものであり、体細胞変異した(例えば、親和性成熟した)バージョンを包含する。

【0245】

「マイクロモル濃度範囲」という句は1~999マイクロモル濃度を意味するものとし、「ナノモル濃度範囲」という句は1~999ナノモル濃度を意味するものとし、「ピコモル濃度範囲」という句は1~999ピコモル濃度を意味するものとする。

【0246】

「体細胞変異した」という句は、クラススイッチしたB細胞内の免疫グロブリン可変領域(例えば、重鎖可変ドメインまたは重鎖CDR配列もしくはFR配列を含む)の核酸配列がクラススイッチ前のB細胞内の核酸配列と同一ではない、クラススイッチを受けたB細胞由来の核酸配列、例えば、クラススイッチを受けていないB細胞とクラススイッチを受けたB細胞の間のCDRまたはフレームワーク核酸配列の差異などへの言及を包含する。

「体細胞変異した」とは、B細胞内の親和性成熟していない対応する免疫グロブリン可変領域配列(すなわち、生殖系列細胞のゲノム内の配列)と同一ではない親和性成熟したB細胞由来の核酸配列への言及を包含する。「体細胞変異した」という句は、B細胞を目的のエピトープに曝露した後のB細胞由来の免疫グロブリン可変領域核酸配列への言及も包含し、当該核酸配列は、B細胞を目的のエピトープに曝露する前の対応する核酸配列とは異なる。「体細胞変異した」という句は、ヒト免疫グロブリン可変領域核酸配列を有する動物、例えばマウスにおいて免疫原による攻撃に应答して生成し、そのような動物において本質的に作用する選択プロセスによりもたらされる抗体由来の配列を指す。

【0247】

「再構成されていない」という用語は、核酸配列に関しては、動物細胞の生殖系列内に存在する核酸配列を包含する。

【0248】

「可変ドメイン」という句は、N末端からC末端へ(別段の指定のない限り)、以下のアミノ酸領域:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4を順に含む免疫グロブリン軽鎖または重鎖(所望の通り改変されたもの)のアミノ酸配列を包含する。

【0249】

ユニバーサル軽鎖(universal light chain)

有用な多重特異性エピトープ結合タンパク質、例えば二重特異性抗体を作製するための以前の試みは、共通のパラダイムが頻繁に共有される様々な問題:ヘテロ二量体の二重特異

10

20

30

40

50

性ヒト免疫グロブリンを対合させるための適切な形式を合理的に操作するため、または試行錯誤を通じて操作するための配列の *in vitro* における選択または処理によって妨げられている。残念ながら、*in vitro* における操作手法 (*engineering approach*) の全てではないにしろ大多数では、全ての場合、個々の分子に適するほとんどその場限りの調整 (*fix*) がもたらされる。他方では、複雑な生物体を使用して、ヒト治療薬をもたらすことができる適切な対合を選択するための *in vivo* における方法は実現されていない。

【0250】

マウスゲノムにランダムに挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子座、可変領域および定常領域を含有するマウスは当技術分野で公知である。そのようなマウスの最初の系統は、限られた数のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを含有するものであった。特に、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントを含有する少数の系統は、1つ、3つまたは4つのヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントおよび5つのヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントを含有するものであった (Taylorら、1992年、*Nucleic Acids Research* 20巻(23号): 6287~6295頁; Fishwildら、1996年、*Nature Biotechnology* 14巻: 845~851頁; Lonbergら、1994年、*Nature* 368巻: 856~859頁; Greenら、1994年、*Nature Genetics* 7巻: 13~21頁; GreenおよびJakobovits 1998年、*J. Exp. Med.* 188巻(3号): 483~495頁; Green 1999年、*J. Immunol. Methods* 231巻: 11~23頁)。ほんの少数のヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントを、マウスゲノムにランダムに挿入された完全ヒト導入遺伝子の一部として含有するこれらのマウスでは、B細胞数の減少、B細胞発生の障害および他の免疫不全が実証された。B細胞でのヒトC_Hの表面発現によって検出されるヒト免疫グロブリンV_L遺伝子の発現は、野生型と比較して、内因性軽鎖よりも低かった。驚いたことに、本発明は、マウスが内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座において1つまたは2つのヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントを含有するように操作されている場合に関してはB細胞数および発生がほぼ野生型であるマウスを提供する(例えば、実施例2および実施例14、表3、表25および表26、ならびに図4、図10A-18)。さらに、一部の実施形態では、本発明によって提供されるマウスは、抗原に应答して、ヒトV_HドメインおよびV_Lドメインを含有するいくつかの高親和性リバースキメラ抗体を生成することができ、V_Lドメインはそれぞれ、2つの可能性のあるヒトV_L遺伝子セグメントのうちの1つおよび5つの可能性のあるヒトJ_L遺伝子セグメントのうちの1つを含有する(例えば、実施例5-10、実施例12、および実施例14を参照されたい)。したがって、ヒト免疫グロブリン軽鎖ミニ遺伝子座 (*mini locus*) (すなわち、限られた数のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメント) を用いて操作された予備系統の (*preliminary strain*) マウスとは対照的に、限られた数のヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメント(1つまたは2つ)、および一部の実施形態では2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメントを含有する、現在提供される操作されたマウスは、驚いたことに、正常なB細胞数、正常な免疫グロブリン軽鎖発現、および正常なB細胞発生を示す。さらに、そのような提供されるマウスは、限定された免疫グロブリン軽鎖レパートリーの結果として、複数の抗原に対するロバスタな免疫応答を開始する能力の低下も障害も示すことがない。したがって、2つ以下の再構成されていないヒト免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超(例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ)のヒト免疫グロブリンJ_L遺伝子セグメント - または2つ以下の再構成されたヒトV_LJ_Lセグメント - を含むヒト化V_L遺伝子座を含み、数に関して野生型のB細胞集団を示し、野生型B細胞発生を示すマウスが提供される。

【0251】

一般に、ネイティブなマウスの配列は、ヒト治療用配列の良好な供給源ではないことが多い。少なくともその理由のため、共通のヒト軽鎖と対合させるマウス重鎖免疫グロブリン可変領域の生成の実用的な有用性が限定される。さらなる *in vitro* における操作

10

20

30

40

50

の試み (engineering effort) は、エピトープ特異性および親和性を保持することを望みながらマウス重鎖可変配列をヒト化する一方で共通のヒト軽鎖とカップリングする能力を維持しようとし、不確実な結果が伴う試行錯誤プロセスに費やされる。そのようなプロセスの最後に、最終産物は特異性および親和性の一部を維持し、共通の軽鎖と結合する可能性があるが、ヒトにおける最終的な免疫原性が恐らくきわめて大きなリスクのままになる。

【0252】

したがって、ヒト治療薬を作製するために適したマウスは、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメントの代わりに、ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの適切に大きなレパートリーを含む。ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは、内因性マウス重鎖定常ドメインと共に再構成し、組み換えて、リバースキメラ重鎖 (すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常領域を含む重鎖) を形成することができるものであるべきである。重鎖はクラススイッチおよび体細胞超変異可能であるべきである。それにより、重鎖可変ドメインの適切に大きなレパートリーをマウスが利用して、ヒト軽鎖可変領域の限定されたレパートリーと結合することができるものを選択することが可能になる。

10

【0253】

複数の重鎖に対する共通の軽鎖を選択するマウスは実用的な有用性を有する。種々の実施形態では、共通の軽鎖のみを発現することができるマウスにおいて発現する抗体は、同一のまたは実質的に同一の軽鎖と結合し、共に発現することができる重鎖を有する。これは、二重特異性抗体の作製において特に有用である。例えば、そのようなマウスを第1の免疫原で免疫して、第1のエピトープに特異的に結合する抗体を発現するB細胞を生成することができる。当該マウス (または遺伝学的に同じマウス) を第2の免疫原で免疫して、第2のエピトープに特異的に結合する抗体を発現するB細胞を生成することができる。可変重鎖領域をB細胞からクローニングし、同じ重鎖定常領域および同じ可変軽鎖領域 (例えば、共通軽鎖) と共に細胞において発現させて、二重特異性抗体を作製することができ、当該二重特異性抗体の重鎖成分は、可変軽鎖 (または共通軽鎖) 成分と結合し、共に発現するようにマウスにより選択されたものである。

20

【0254】

本発明者らは、重鎖であって、その可変領域が生殖系列配列から離れた、例えば、親和性成熟したまたは体細胞変異した可変領域である重鎖を含めた、重鎖のある程度多様なファミリーと適切に対合する免疫グロブリン軽鎖を生成するためにマウスを操作した。種々の実施形態では、体細胞変異を含むヒト重鎖可変ドメインがヒト軽鎖可変ドメインに対合させ、それによって、ヒト治療薬として使用するために適した親和性の高い結合タンパク質への経路を可能にするマウスを作り出した。

30

【0255】

遺伝子操作されたマウスは、生物体内での抗体選択の長く複雑なプロセスを通じて、ヒト重鎖可変ドメインの多様なコレクションと限られた数のヒト軽鎖選択肢の対合における生物学的に適切な選択を行う。これを実現するために、マウスを、限られた数のヒト軽鎖可変ドメイン選択肢を多様性の大きなヒト重鎖可変ドメイン選択肢と併せて提示するように操作する。免疫原を用いて攻撃すると、マウスは免疫原に対する抗体を発生させるために、主にまたはもっぱらそのレパートリーにおける数または軽鎖選択肢によって限定されるそのレパートリーにおける解の数を最大にする。種々の実施形態では、これは、マウスに、それにもかかわらず、特に体細胞変異したヒト重鎖可変ドメインを含めた比較的様々なヒト重鎖可変ドメインと適合する軽鎖可変ドメインの適切かつ適合する体細胞変異を実現させる。

40

【0256】

軽鎖選択肢の限定されたレパートリーを実現するために、マウスを、ネイティブなマウス軽鎖可変ドメインを作製または再構成するその能力が非機能的または実質的に非機能的になるように操作する。これは、例えば、マウスの軽鎖可変領域遺伝子セグメントを欠失させることによって実現することができる。次いで、内因性マウス遺伝子座を、外因性ヒト

50

可変領域遺伝子セグメントが内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子と組み合わせたり、再構成されたリバースキメラ軽鎖遺伝子（ヒト可変、マウス定常）が形成されるように、内因性マウス軽鎖定常ドメインに作動可能に連結した選択された外因性の適切なヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントによって改変することができる。種々の実施形態では、軽鎖可変領域は、体細胞変異可能である。種々の実施形態では、軽鎖可変領域の体細胞変異を獲得する能力を最大にするために、マウス内に適切なエンハンサー（複数可）を保持する。例えば、内因性マウス軽鎖遺伝子セグメントをヒト軽鎖遺伝子セグメントで置き換えるためのマウス軽鎖遺伝子座の改変では、マウスイントロンエンハンサーおよびマウス3'エンハンサーを機能的に維持するまたは破壊しない。

【0257】

リバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）軽鎖の限定されたレパートリーとリバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）重鎖の多様性を結びつけて発現する遺伝子操作されたマウスが提供される。種々の実施形態では、内因性マウス軽鎖遺伝子セグメントは欠失しており、内因性マウスC遺伝子に作動可能に連結した単一の（または2つの）再構成されたヒト軽鎖領域で置き換えられている。複数の実施形態では、再構成されたヒト軽鎖領域の体細胞超変異を最大にするために、マウスイントロンエンハンサーおよびマウス3'エンハンサーを維持する。種々の実施形態では、マウスはまた、非機能的な軽鎖遺伝子座または軽鎖遺伝子座の欠失または当該遺伝子座が軽鎖を作製できなくなる欠失も含む。

【0258】

種々の実施形態において、内因性マウス軽鎖V_LおよびJ_L遺伝子セグメントを欠き、マウス定常領域に作動可能に連結した、再構成されたヒト軽鎖可変領域、一実施形態では再構成されたヒトV_L/J_L配列を含む軽鎖可変領域遺伝子座を含む遺伝子操作されたマウスであって、遺伝子座が体細胞超変異を受けることができ、また、マウス定常領域と連結したヒトV_L/J_L配列を含む軽鎖を発現するマウスが提供される。したがって、種々の実施形態では、遺伝子座は、マウス3'エンハンサーを含み、これは、体細胞超変異の正常なまたは野生型レベルと相関する。

【0259】

1つまたは2つの軽鎖が、例えば1つ～5つの体細胞変異を含むヒト軽鎖可変領域を含む実施形態を含めた種々の実施形態では、遺伝子操作されたマウスは、目的の抗原を用いて免疫すると、1つまたは2つの再構成された軽鎖とともに発現し、該軽鎖とともに機能する、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の再構成の多様性を示すB細胞を生成する。種々の実施形態では、そのように発現したヒト軽鎖は、マウスにおいて発現する任意のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域と結合し、それとともに発現することができる。

【0260】

本明細書に記載の制限された免疫グロブリン軽鎖レパートリー（例えば、単一のヒトV_L遺伝子セグメントまたは2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメント、および、1つのヒトJ_L遺伝子セグメントまたは必要に応じて2つまたはそれ超のヒトJ_L遺伝子セグメント）を含む遺伝子操作されたマウスに加えて、本明細書では、単一のヒトV_L遺伝子セグメントまたは2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントを含む他の遺伝子改変非ヒト動物も提供される。一部の実施形態では、そのような非ヒト動物は、再構成されたヒトV_L/J_L配列で構成される単一の再構成されたヒトV_L領域を含む。一部の実施形態では、そのような非ヒト動物は、2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つ）のヒトJ_L遺伝子セグメントを含む。種々の実施形態では、ヒト遺伝子セグメントは、非ヒト軽鎖定常領域、例えば、マウスラット軽鎖定常領域に作動可能に連結している。

【0261】

そのような非ヒト動物は、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ（例えば、雌ウシ、雄ウシ、パッファロー）、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）からなる群から選択することができる。適切な遺伝子改変可能なES細胞が容易に入手可能ではない非ヒト動物については、本明細書に記

10

20

30

40

50

載の遺伝子改変を含む非ヒト動物を作製するために他の方法が使用される。そのような方法は、例えば、非ES細胞ゲノム（例えば、線維芽細胞または人工多能性細胞）を改変し、改変されたゲノムを、核移植を使用して適切な細胞、例えば卵母細胞に移入し、改変された細胞（例えば、改変された卵母細胞）を非ヒト動物において適切な条件下で熟させて（gestating）胚を形成することを含む。

【0262】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は哺乳動物である。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、例えばDipodidae上科またはMuridae上科の小さな哺乳動物である。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改変動物はげっ歯類である。一部の実施形態では、本発明のげっ歯類は、マウス、ラット、およびハムスターから選択される。一部の実施形態では、本発明のげっ歯類は、Muridae上科から選択される。一部の実施形態では、本発明の遺伝子改変動物は、Calomyscidae（例えばマウス様ハムスター（mouse-like hamster））、Cricetidae（例えば、ハムスター、新世界ラットおよび新世界マウス（New World rats and mice）、ハタネズミ）、Muridae（真性マウスおよび真性ラット（true mice and rats）、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ）、Nesomyidae（キノボリマウス（climbing mice）、イワマウス（rock mice）、オジロハムスターモドキ（with-tailed rat）、マダガスカルラットおよびマダガスカルマウス（Malagasy rats and mice））、Platacanthomyidae（例えば、トゲヤマネ）、およびSpalacidae（例えば、デバネズミ（molerates）、タケネズミ、およびモグラネズミ）から選択される科の動物に由来する。一部の特定の形態では、本発明の遺伝子改変げっ歯類は、真性マウスまたは真性ラット（Muridae科）、アレチネズミ、トゲマウス、およびタテガミネズミから選択される。一部の特定の形態では、本発明の遺伝子改変マウスはMuridae科のメンバーに由来する。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物はげっ歯類である。一部の特定の形態では、本発明のげっ歯類は、マウスおよびラットから選択される。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物はマウスである。

【0263】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、およびC57BL/Olaから選択されるC57BL系統のマウスであるげっ歯類である。一部の特定の形態では、本発明のマウスは、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1（例えば、129S1/SV、129S1/SvIm）、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6（129/SvEvTac）、129S7、129S8、129T1、129T2である系統からなる群から選択される129系統である（例えば、Festingら、1999年、MammalianGenome10巻：836頁；Auerbachら、2000年、Biotechniques29巻（5号）：1024～1028頁、1030頁、1032頁を参照されたい）。一部の特定の形態では、本発明の遺伝子改変マウスは、上述の129系統と上述のC57BL/6系統の混合である。一部の特定の形態では、本発明のマウスは、上述の129系統の混合または上述のBL/6系統の混合である。一部の特定の形態では、本明細書に記載の混合の129系統は129S6（129/SvEvTac）系統である。一部の実施形態では、本発明のマウスはBALB系統、例えばBALB/c系統である。一部の実施形態では、本発明のマウスはBALB系統と別の上述の系統の混合である。

【0264】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物はラットである。一部の特定の形態では、本発明のラットはWistarラット、LEA系統、Sprague Dawley

10

20

30

40

50

系統、Fischer系統、F344、F6、およびDark Agoutiから選択される。一部のある特定の実施形態では、本明細書に記載のラット系統は、Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6、およびDark Agoutiからなる群から選択される2つまたはそれ超の系統の混合である。

【0265】

2つ以上のエピトープに結合するエピトープ結合タンパク質

本明細書に記載の組成物および方法を使用して、2つ以上のエピトープに高親和性で結合する結合タンパク質、例えば二重特異性抗体を作製することができる。本発明の利点としては、重鎖免疫グロブリン鎖であって、そのそれぞれが単一の軽鎖と結合する、適切に高い結合性（例えば、親和性成熟した）の重鎖免疫グロブリン鎖を選択できることが挙げられる。

10

【0266】

組換え細胞培養物から二重特異性抗体断片を作製させるためのいくつかの技法が報告されている。しかし、二重特異性結合タンパク質の合成および発現には、2種の異なる重鎖と結合し、共に発現することができる適切な軽鎖の同定に関連する問題の一部起因し、単離の問題の一部起因する問題がある。種々の実施形態では、本明細書に記載の組成物および方法により、成分の安定性/相互作用を増大させることによって従来の免疫グロブリン構造を維持するために特別な改変（複数可）を必要としない全長の二重特異性抗体の利点をもたらされる（図7A）。種々の実施形態では、そのような改変（複数可）は煩雑であり、二重特異性抗体技術の開発、およびヒト疾患の処置におけるそれらの潜在的な使用の障害となることが判明している。したがって、種々の実施形態では、複数の特異性という性質が付加された天然の免疫グロブリン構造（すなわち、全長のもの）をもたらすことにより、全長の二重特異性抗体が以前の二重特異性断片には欠けていたそれらの重大なエフェクター機能を維持し、より長い半減期という重要な薬物動態パラメータが実証される治療薬をさらにもたらす。

20

【0267】

本明細書に記載の方法および組成物により、遺伝子改変マウスが、他の点では天然のプロセスにより、体細胞変異した（例えば、親和性成熟した）重鎖を含めた2種以上の重鎖と結合し、共に発現することができる適切な軽鎖を選択することが可能になる。リバースキメラ重鎖（すなわち、ヒト可変およびマウス定常）を有する親和性成熟した抗体を発現する本明細書に記載の免疫したマウスの適切なB細胞由来のヒトV_LおよびV_H配列を同定し、発現ベクターに適切なヒト定常領域遺伝子配列（例えば、ヒトIgG1）と共にインフレームでクローニングすることができる。そのような構築物を2つ調製することができ、各構築物は、異なるエピトープに結合するヒト重鎖可変ドメインをコードする。生殖系配列内のまたは配列が体細胞変異したB細胞由来のヒトV_Lのうちの1つ（例えば、ヒトV_L 1-39J 5またはヒトV_L 3-20J 1）を適切なヒト定常領域遺伝子（例えば、ヒト定常遺伝子）とインフレームで融合することができる。これらの3つの完全ヒト重鎖構築物および軽鎖構築物を、発現させるために適切な細胞に配置することができる。当該細胞は2つの主要な種：同一の軽鎖を伴うホモ二量体重鎖、および同一の軽鎖を伴うヘテロ二量体重鎖を発現する。これらの主要な種の容易な分離を可能にするために、重鎖の1つを改変してプロテインA結合決定基を除き、それによりホモ二量体結合タンパク質のヘテロ二量体結合タンパク質からの示差的親和性をもたらす。この問題に対処する組成物および方法は、本明細書よって参照により組み込まれる、US2010/0331527A1として公開された2010年6月25日提出のUS2010/0331527A1、表題「Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format」に記載されている。

30

40

【0268】

一態様では、本明細書に記載のエピトープ結合タンパク質であって、ヒトV_LおよびV_H配列が目的のエピトープを含む抗原を用いて免疫した本明細書に記載のマウスに由来する

50

タンパク質が提供される。

【0269】

一実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含むエピトープ結合タンパク質であって、第1のポリペプチドが、N末端からC末端へ、第1のエピトープに選択的に結合する第1のエピトープ結合領域、その後、IgG1、IgG2、IgG4、およびこれらの組合せから選択されるヒトIgGの第1のCH3領域を含む定常領域を含み、第2のポリペプチドが、N末端からC末端へ、第2のエピトープに選択的に結合する第2のエピトープ結合領域、その後、IgG1、IgG2、IgG4、およびこれらの組合せから選択されるヒトIgGの第2のCH3領域を含む定常領域を含み、第2のCH3領域が、第2のCH3ドメインのプロテインAへの結合性を低下させるまたは消失させる改変を含むタンパク質が提供される。

10

【0270】

一実施形態では、第2のCH3領域は、H95R改変(IMGTEクソン番号付けによる;EU番号付けによるとH435R)を含む。別の実施形態では、第2のCH3領域は、Y96F改変(IMGTE;EUによるとY436F)をさらに含む。

【0271】

一実施形態では、第2のCH3領域は改変されたヒトIgG1に由来し、D16E、L18M、N44S、K52N、V57M、およびV82I(IMGTE;EUによるとD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、およびV422I)からなる群から選択される改変をさらに含む。

20

【0272】

一実施形態では、第2のCH3領域は改変されたヒトIgG2に由来し、N44S、K52N、およびV82I(IMGTE;EUによるとN384S、K392N、およびV422I)からなる群から選択される改変をさらに含む。

【0273】

一実施形態では、第2のCH3領域は改変されたヒトIgG4に由来し、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、およびV82I(IMGTE;EUによるとQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、およびV422I)からなる群から選択される改変をさらに含む。

【0274】

2つ以上のエピトープに結合するエピトープ結合タンパク質を作製するための1つの方法は、本発明による第1のマウスを、目的の第1のエピトープを含む抗原を用いて免疫することであり、当該マウスは軽鎖の再構成および形成が可能な内因性マウスV_Lを含有しない内因性免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を含み、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座は、マウス内因性軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結した単一の再構成されたヒトV_L領域であり、再構成されたヒトV_L領域は、ヒトV_L1-39J5およびヒトV_L3-20J1から選択され、内因性マウスV_H遺伝子セグメントは、全体的にまたは部分的にヒトV_H遺伝子セグメントで置き換えられており、その結果、マウスにより作製される免疫グロブリン重鎖は、もっぱらまたは実質的に、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを含む重鎖である。免疫されると、そのようなマウスは、2つのヒト軽鎖可変ドメインのうちの一つのみ(例えば、ヒトV_L1-39J5またはヒトV_L3-20J1のうちの一つ)を含むリバースキメラ抗体を作製する。B細胞が目的のエピトープに結合するV_Hをコードすることが同定されたら、V_H(および、必要に応じてV_L)のヌクレオチド配列を取得し(例えば、PCRによる)、発現構築物へと適切なヒト免疫グロブリン定常ドメインとインフレームでクローニングすることができる。このプロセスを繰り返して、第2のエピトープに結合する第2のV_Hドメインを同定することができ、第2のV_H遺伝子配列を取得し、発現ベクターへと第2の適切な免疫グロブリン定常ドメインにインフレームでクローニングすることができる。第1の免疫グロブリン定常ドメインと第2の免疫グロブリン定常ドメインは同アイソタイプであっても異なるアイソタイプであってもよく、免疫グロブリン定常ドメインのうち的一方は、本明細書または

30

40

50

US 2010/0331527 A1に記載の通り改変されていてよく（しかし他方は改変されていない）、エピトープ結合タンパク質は、例えば、US 2010/0331527 A1に記載の通り、適切な細胞において発現させ、プロテインAに対するホモ二量体エピトープ結合タンパク質と比較したその示差的親和性に基づいて単離することができる。

【0275】

一実施形態では、二重特異性エピトープ結合タンパク質を作製するための方法であって、本明細書に記載のマウス由来の第1の親和性成熟（例えば、1つまたは複数の体細胞超変異を含む）ヒトV_Hヌクレオチド配列（V_H1）を同定するステップ、本明細書に記載のマウス由来の第2の親和性成熟（例えば、1つまたは複数の体細胞超変異を含む）ヒトV_Hヌクレオチド配列（V_H2）を同定するステップ、重鎖1（HC1）を形成するためにV_H1をUS 2010/0331527 A1に記載のプロテインA決定基改変を欠くヒト重鎖とインフレームでクローニングするステップ、重鎖2（HC2）を形成するためにV_H2をUS 2010/0331527 A1に記載のプロテインA決定基を含むヒト重鎖とインフレームでクローニングするステップ、HC1を含む発現ベクターおよびHC2を含む同じまたは異なる発現ベクターを細胞に導入するステップであって、当該細胞が、ヒト軽鎖定常ドメインと融合したヒトV_L1-39/ヒトJ_L5またはヒトV_L3-20/ヒトJ_L1を含むヒト免疫グロブリン軽鎖も発現し、それにより、細胞がV_H1によりコードされるV_HドメインおよびV_H2によりコードされるV_Hドメインを含む二重特異性エピトープ結合タンパク質を発現するステップ、ならびに、二重特異性エピトープ結合タンパク質を、単一特異性ホモ二量体エピトープ結合タンパク質と比較した、プロテインAに結合する示差的能力に基づいて単離するステップを含む方法が提供される。特定の実施形態では、HC1はIgG1であり、HC2は、改変H95R（IMGT；EUによるとH435R）を含み、改変Y96F（IMGT；EUによるとY436F）をさらに含むIgG1である。一実施形態では、V_H1によりコードされるV_Hドメイン、V_H2によりコードされるV_Hドメインまたはその両方が体細胞変異したものである。

【0276】

共通ヒトV_Lと共に発現するヒトV_H遺伝子

4種の異なる抗原に対して生じた親和性成熟した抗体由来の種々のヒト可変領域を、それらのコグネイト軽鎖またはヒトV_L1-39/J_L5、ヒトV_L3-20/J_L1またはヒトV_LpreB/J_L5から選択されるヒト軽鎖の少なくとも1つのいずれかと共に発現させた（実施例1を参照されたい）。抗原のそれぞれに対する抗体について、異なる遺伝子ファミリー由来の体細胞変異した高親和性重鎖は再構成されたヒト生殖系列V_H1-39/J_H5領域およびV_H3-20/J_H1領域と首尾よく対合し、重鎖および軽鎖を発現している細胞から分泌された。V_H1-39/J_H5およびV_H3-20/J_H1については、以下のヒトV_H遺伝子ファミリーに由来するV_Hドメインが好都合に発現した：1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51、および6-1。したがって、V_H1-39/J_H5およびV_H3-20/J_H1の一方または両方由来のヒトV_Lドメインの限定されたレパートリーを発現するように操作されたマウスは、マウスV_H遺伝子セグメントをヒトV_H遺伝子セグメントで置き換えるように改変されたV_H遺伝子座から体細胞変異したヒトV_Hドメインの多様な集団を生成する。

【0277】

単一の再構成された軽鎖（例えば、V_L1-39/J_LまたはV_L3-20/J_L）と結合したリバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）免疫グロブリン重鎖を発現するように遺伝子操作されたマウスは、目的の抗原を用いて免疫すると、ヒトV_H再構成の多様性を含み、抗原特異的抗体であって、抗原とそのリガンドの結合を遮断するそれらの能力に関して、および抗原のバリエーションに結合するそれらの能力に関して多様な性質を有する高親和性の抗原特異的抗体の多様性を発現するB細胞を生成した（実施例5から10を参照されたい）。

【0278】

10

20

30

40

50

したがって、本明細書に記載のマウスおよび方法は、再構成の多様性から生じる体細胞変異したヒト重鎖可変ドメイン、多種多様な親和性を示す（ほぼナノモル濃度またはそれ未満のK_Dを示すことを含む）、多種多様な特異性を示す（同じ抗原の異なるエピトープへの結合を含む）体細胞変異したヒト重鎖可変ドメイン、および同じまたは実質的に同じヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域と結合し、共に発現する体細胞変異したヒト重鎖可変ドメインを含めたヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの作製および選択において有用である。

【0279】

共通の軽鎖を有する完全ヒト二重特異性抗体

種々の実施形態における第1のステップとして、それぞれヒト重鎖可変ドメイン（および二重特異性抗体を形成する任意のさらなる核酸配列）をコードする第1の核酸配列および第2の核酸配列を、例えば、異なるエピトープに結合できること（図7Aおよび図7Bを参照されたい）、異なる親和性を有することなどのような所望の特性を有する親モノクローナル抗体から選択する。通常、ヒト重鎖可変ドメインをコードする核酸配列は本明細書に記載の通り免疫したマウスから単離し、ヒトへの投与に適するようにヒト重鎖定常領域との融合を可能にする。二重特異性抗体にさらなる機能性を付加する変異を導入することによって行うことができる配列（複数可）へのさらなる改変を実現することができ、その改変としては、例えば、血清半減期を増加させること（例えば、U.S. 7, 217, 797を参照されたい）および/または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性を高めること（例えば、U.S. 6, 737, 056を参照されたい）が挙げられる。抗体の定常領域への変異の導入は当技術分野で公知である。さらに、二重特異性抗体の一部は組換えによって細胞培養物中で作製させることができ、当該分子の他の部分（複数可）は上記の技法によって作製することができる。

【0280】

抗体を産生するためのいくつかの技法が記載されている。例えば、種々の実施形態では、本明細書に記載のマウスにおいてキメラ抗体を産生させる。免疫したマウスのB細胞から抗体を直接単離することができ（例えば、U.S. 2007/0280945A1を参照されたい）、かつ/または免疫したマウスのB細胞を使用してハイブリドーマを作製することができる（KohlerおよびMilstein、1975年、Nature 256巻：495～497頁）。本明細書に記載のマウス由来の抗体（ヒト重鎖および/または軽鎖）をコードするDNAは、従来技法を使用して容易に単離し、配列決定することができる。本明細書に記載のマウスに由来するハイブリドーマおよび/またはB細胞はそのようなDNAの好ましい供給源として機能する。DNAを単離したら、それを発現ベクターに配置することができ、次いでそれを、そうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。DNAは、例えば、ヒト重鎖定常ドメインおよびヒト軽鎖定常ドメインのコード配列でマウス配列を置換することによって改変することもできる。

【0281】

種々の実施形態では、DNAを単離し、所望の特異性/親和性を有する第1のヒト重鎖可変ドメインおよび第2のヒト重鎖可変ドメインをコードする第1の核酸配列および第2の核酸配列、ならびに、ヒト軽鎖ドメイン（再構成された生殖系列配列または本明細書に記載のマウスから単離された軽鎖配列）をコードする第3の核酸配列を選択した後、当技術分野において広範に利用可能な組換え技法を使用して、これらの分子をコードする3つの核酸配列を発現させて二重特異性抗体を形成する。多くの場合、選択される発現系は、哺乳動物細胞発現ベクターおよび宿主を伴い、したがって、二重特異性抗体は適切にグリコシル化される（例えば、グリコシル化された抗体ドメインを含む二重特異性抗体の場合）。しかし、当該分子は原核生物発現系においても産生され得る。通常、宿主細胞は単一のベクターまたは独立したベクター上の第1のヒト重鎖可変ドメイン、第2のヒト重鎖可変ドメイン、ヒト軽鎖ドメインの両者をコードするDNAで形質転換される。しかし、第1のヒト重鎖可変ドメイン、第2のヒト重鎖可変ドメイン、およびヒト軽鎖ドメイン（二重特異性抗体成分）を独立した発現系で発現させ、発現したポリペプチドを *in vitro*

10

20

30

40

50

oでカップリングすることが可能である。種々の実施形態では、ヒト軽鎖ドメインは生殖系列配列を含む。種々の実施形態では、ヒト軽鎖ドメインは、軽鎖ドメインの軽鎖可変配列に対して1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下または5つ以下の体細胞超変異を含む。

【0282】

種々の実施形態では、2種の重鎖および単一のヒト軽鎖をコードする核酸（複数可）（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）を、さらにクローニングし（DNAの増幅）、かつ/または発現させるために、複製可能なベクターに挿入する。多くのベクターが利用可能であり、一般に、それらは、これだけに限定されないが、以下のうちの1つまたは複数を含む：シグナル配列、複製開始点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。各成分は、個別にまたは宿主細胞の選択もしくは実験的に決定される他の基準に基づいて選択することができる。各成分のいくつかの例が当技術分野で公知である。

10

【0283】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、宿主生物体によって認識され、また、二重特異性抗体の成分のそれぞれまたは全てをコードする核酸配列に作動可能に連結しているプロモーターを含有する。種々の潜在的な宿主細胞によって認識される多数のプロモーターは周知である。これらのプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化により取り出し、単離されたプロモーター配列をベクターに挿入することによって二重特異性抗体をコードするDNAに作動可能に連結される。

20

【0284】

真核生物宿主細胞（酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞、ヒト細胞または他の多細胞生物体由来の有核細胞）に使用する発現ベクターは、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列も含有してよい。そのような配列は、一般に、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域、時には3'非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、二重特異性抗体成分をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアダニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。種々の実施形態のための適切な発現ベクターとしては、二重特異性抗体をコードするDNAの、哺乳動物細胞における一過性発現をもたらすものが挙げられる。一般に、一過性発現には、宿主細胞において効率的に複製することができ、その結果、宿主細胞に発現ベクターの多くのコピーが蓄積し、今度は、発現ベクターによりコードされる所望のポリペプチドが高レベルで合成されるような発現ベクターの使用が関与する。適切な発現ベクターおよび宿主細胞を含む一過性発現系により、クローニングされたDNAによりコードされるポリペプチドの都合のよい明確な同定、ならびに第1のヒト重鎖可変ドメインまたは第2のヒト重鎖可変ドメインのホモ二量体を有する親抗体と比較して、所望の結合特異性/親和性または所望のゲル移動特性を有する二重特異性抗体の迅速なスクリーニングが可能になる。

30

【0285】

種々の実施形態では、二重特異性抗体の成分をコードするDNAを上記の所望のベクター（複数可）に集合させたら、それらを、発現させ回収するために適切な宿主細胞に導入する。宿主細胞のトランスフェクトは、選択された宿主細胞に適した当技術分野で公知の標準の技法（例えば、電気穿孔、核微量注入、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリカチオン、例えば、ポリブレン、ポリオルニチンなど）を使用して実現することができる。

40

【0286】

種々の実施形態では、成分を含有する発現ベクターに最も適し、二重特異性抗体種の最も効率的かつ好都合な産生を可能にする宿主細胞を選択する。発現のための例示的な宿主細胞としては、原核生物および真核生物の細胞（単一細胞または複数の細胞）、細菌細胞（例えば、*E. coli*、*Bacillus spp.*、*Streptomyces spp.*などの株）、マイコバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞（例えば、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、*P. pastoris*、*P. methanolicus*など）

50

、植物細胞、昆虫細胞（例えば、SF - 9、SF - 21、バキュロウイルスに感染した昆虫細胞、Trichoplusia niなど）、非ヒト動物細胞、ヒト細胞または例えばハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合物が挙げられる。種々の実施形態では、細胞は、ヒト細胞、サル細胞、類人猿細胞、ハムスター細胞、ラット細胞またはマウス細胞である。種々の実施形態では、細胞は、CHO（例えば、CHO K1、DXB - 11 CHO、Veggie - CHO）、COS（例えば、COS - 7）、網膜細胞、Vero、CV1、腎臓（例えば、HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK）、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL - 60、（例えば、BHK21）、Jurkat、Daudi、A431（表皮）、CV - 1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2 / 0、NS - 0、MMT060562、Sertoli細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髓腫細胞、腫瘍細胞、および上述の細胞に由来する細胞株から選択される真核細胞である。種々の実施形態では、細胞は、1つまたは複数のウイルス遺伝子を含む、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞（例えば、PER.C6（商標）細胞）である。

10

【0287】

二重特異性抗体を産生させるために使用する哺乳動物宿主細胞は、種々の培地で培養することができる。ハムF10（Sigma）、最小必須培地（MEM）、Sigma）、RPMI - 1640（Sigma）、およびダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、Sigma）などの市販の培地が宿主細胞の培養に適している。培地には、必要な場合、ホルモンおよび/または他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリンまたは上皮増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、緩衝液（例えば、HEPES）、ヌクレオシド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、GENTAMYCIN（商標））、微量元素（通常マイクロモル濃度範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、およびグルコースまたは同等のエネルギー供給源を補充することができる。当業者に公知の通り任意の他の補充物質も適切な濃度で含めることができる。種々の実施形態では、培養条件、例えば温度、pHなどは、発現させるために選択した宿主細胞で以前に使用されたものであり、これは当業者には明らかである。

20

【0288】

種々の実施形態では、二重特異性抗体を培養培地から分泌ポリペプチドとして回収するが、分泌シグナルを伴わずに直接産生された場合には宿主細胞溶解物から回収することもできる。二重特異性抗体が膜に結合している場合には、適切な界面活性剤溶液（例えば、トリトン - X100）を使用して膜から放出させることができる。本明細書に記載の二重特異性抗体は第1の免疫グロブリンCH3ドメインおよび第2の免疫グロブリンCH3ドメインの使用を伴い、第1の免疫グロブリンCH3ドメインと第2の免疫グロブリンCH3ドメインは少なくとも1つのアミノ酸により互いに異なり、少なくとも1つのアミノ酸の差異により、二重特異性抗体のプロテインAに対する結合性が、アミノ酸の差異を欠く二重特異性抗体と比較して低下することが好ましい（U.S. 2010 / 0331527 A1参照；参照により本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、第1の免疫グロブリンCH3ドメインはプロテインAに結合し、第2の免疫グロブリンCH3ドメインは、プロテインA結合性を低下または消滅させる変異、例えばH95R改変（IMGTエクソン番号付けによる；EU番号付けによるとH435R）を含有する。第2のCH3は、Y96F改変（IMGTによる；EUによるとY436F）をさらに含んでよい。第2のCH3内に見いだすことができるさらなる改変としては、IgG1抗体の場合には、D16E、L18M、N44S、K52N、V57M、およびV82I（IMGTによる；EUによるとD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、およびV422I）；IgG2抗体の場合には、N44S、K52N、およびV82I（IMGT；EUによるとN384S、K392N、およびV422I）；ならびにIgG4抗体の場合には、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、およびV82I（I

30

40

50

MGTによる；EUによるとQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、およびV422I)が挙げられる。上記の二重特異性抗体形式の変動が本発明の範囲内で意図されている。

【0289】

二重特異性抗体の二重性(すなわち、1つのポリペプチドの異なるエピトープに特異的であってもよく、2つ以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有してもよい、図7Bを参照されたい；例えば、Tuttlら、1991年、J.Immunol.147巻：60～69頁；Kuferら、2004年、TrendsBiotechnol.22巻：238～244頁も参照されたい)に起因して、二重特異性抗体には、治療への適用に対する多くの有用な利点がある。例えば、二重特異性抗体は、再指向細胞傷害性(re-directed cytotoxicity)のため(例えば、腫瘍細胞を死滅させるため)、ワクチンアジュバントとして、血栓溶解剤をクロットに送達するため、酵素により活性化されるプロドラッグを標的部位(例えば、腫瘍)において変換させるため、感染症を処置するため、免疫複合体を細胞表面受容体にターゲティングするため、または免疫毒素を腫瘍細胞に送達するために使用することができる。

10

【0290】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、酵素イムノアッセイ、2部位イムノアッセイ、種々の疾患(例えばがん)の*in vitro*または*in vivo*における免疫診断、競合結合アッセイ、直接サンドイッチアッセイ、間接サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイなどの、いくつかの治療的および非治療的ならびに/または診断的アッセイ方法において使用することもできる。二重特異性抗体に関する他の使用は、当業者には明らかである。

20

【0291】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をどのように作製し使用するかを当業者に説明するために提供され、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定するものではない。使用される数字(例えば、量、温度など)に関しては正確さを確実にするための試みが行われているが、いくらかの実験的な誤差および偏差が考慮されるべきである。別段の指定のない限り、部分は重量による部分であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏で示されており、圧力は大気または大気付近の圧力である。

【実施例】

30

【0292】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をどのように作製し使用するかを当業者に説明するために提供され、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定するものではない。使用される数字(例えば、量、温度など)に関しては正確さを確実にするための試みが行われているが、いくらかの実験的な誤差および偏差が考慮されるべきである。別段の指定のない限り、温度は摂氏で示されており、圧力は大気または大気付近の圧力であり、部分は重量による部分であり、分子量は平均分子量である。

【0293】

(実施例1)

選択されたヒトV_Lと結合するヒトV_H領域の同定

40

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖を抗原特異的ヒト抗体由来のヒト重鎖と共発現させることができるかどうかを決定するために*in vitro*発現系を構築した。

【0294】

遺伝子改変マウスにおいてヒト抗体を生成するための方法は公知である(例えば、US6,596,541、Regeneron Pharmaceuticals、VELOCI IMMUNE(登録商標)を参照されたい)。VELOCI IMMUNE(登録商標)技術は、内因性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結したヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含むゲノムを有し、その結果、抗原による刺激に反応してヒト可変領域およびマウス定常領域を含む抗体を産生する遺伝子改変マウスの生成を伴う。VELOCI IMMUNE(登録商標)マウスにより産生される抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をコード

50

するDNAは完全ヒトである。最初に、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する高親和性キメラ抗体を単離する。下記の通り、抗体を特徴付け、親和性、選択性、エピトープなどを含めた望ましい特性について選択する。マウス定常領域を所望のヒト定常領域で置き換えて、非IgMアイソタイプ、例えば、野生型または改変されたIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含有する完全ヒト抗体を生成する。選択する定常領域は、特定の使用に応じて変動してよいが、可変領域には高親和性抗原結合特性および標的特異性特性が存在する。

【0295】

VELOCIIMMUNE（登録商標）マウスを、血管新生を促進する増殖因子（抗原C）を用いて免疫し、抗原特異的なヒト抗体を単離し、当技術分野において認められている標準の技法を使用してV遺伝子使用について配列決定した。選択された抗体をヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域にクローニングし、3種のヒト軽鎖：（1）ヒト定常領域と連結したコグネイト軽鎖、（2）ヒト定常領域と連結した再構成されたヒト生殖系列V₁-39J₅、または（3）ヒト定常領域と連結した再構成されたヒト生殖系列V₃-20J₁のうちの1つと対合させるために69種の重鎖を選択した。各重鎖および軽鎖対を、標準の技法を使用してCHO-K1細胞に共トランスフェクトした。上清中の抗体の存在をELISAアッセイにおいて抗ヒトIgGによって検出した。各重鎖/軽鎖対について抗体価（ng/ml）を決定し、異なる再構成された生殖系列軽鎖での力価を親抗体分子（すなわち、コグネイト軽鎖と対合させた重鎖）で得られた力価と比較し、ネイティブな力価に対するパーセントを算出した（表1）。V_H：重鎖可変遺伝子。ND：現行の実験条件下では発現は検出されず。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1

V _H	コグネイト LC	抗体価(ng/mL)		ネイティブな力価に対するパーセント	
		Vk1-39Jk5	Vk3-20Jk1	Vk1-39Jk5	Vk3-20Jk1
3-15	63	23	11	36.2	17.5
1-2	103	53	ND	51.1	-
3-23	83	60	23	72.0	27.5
3-33	15	77	ND	499.4	-
4-31	22	69	17	309.4	76.7
3-7	53	35	28	65.2	53.1
-	22	32	19	148.8	89.3
1-24	3	13	ND	455.2	-
3-33	1	47	ND	5266.7	-
3-33	58	37	ND	63.1	-
-	110	67	18	60.6	16.5
3-23	127	123	21	96.5	16.3
3-33	28	16	2	57.7	7.1
3-23	32	50	38	157.1	119.4
-	18	45	18	254.3	101.7
3-9	1	30	23	2508.3	1900.0
3-11	12	26	6	225.9	48.3
1-8	16	ND	13	-	81.8
3-33	54	81	10	150.7	19.1
-	34	9	ND	25.9	-
3-20	7	14	54	203.0	809.0
3-33	19	38	ND	200.5	-
3-11	48	ND	203	-	423.6
-	11	23	8	212.7	74.5
3-33	168	138	182	82.0	108.2
3-20	117	67	100	57.5	86.1
3-23	86	61	132	70.7	154.1
3-33	20	12	33	60.9	165.3
4-31	69	92	52	133.8	75.0
3-23	87	78	62	89.5	71.2
1-2	31	82	51	263.0	164.6
3-23	53	93	151	175.4	285.4
-	11	8	17	75.7	151.4
3-33	114	36	27	31.6	23.4
3-15	73	39	44	53.7	59.6
3-33	1	34	16	5600.0	2683.3
3-9	58	112	57	192.9	97.6
3-33	67	20	105	30.1	157.0
3-33	34	21	24	62.7	70.4
3-20	10	49	91	478.4	888.2
3-33	66	32	25	48.6	38.2
3-23	17	59	56	342.7	329.8
-	58	108	19	184.4	32.9

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

-	68	54	20	79.4	29.9
3-33	42	35	32	83.3	75.4
-	29	19	13	67.1	43.9
3-9	24	34	29	137.3	118.4
3-30/33	17	33	7	195.2	43.1
3-7	25	70	74	284.6	301.6
3-33	87	127	ND	145.1	-
6-1	28	56	ND	201.8	-
3-33	56	39	20	69.9	36.1
3-33	10	53	1	520.6	6.9
3-33	20	67	10	337.2	52.3
3-33	11	36	18	316.8	158.4
3-23	12	42	32	356.8	272.9
3-33	66	95	15	143.6	22.5
3-15	55	68	ND	123.1	-
-	32	68	3	210.9	10.6
1-8	28	48	ND	170.9	-
3-33	124	192	21	154.3	17.0
3-33	0	113	ND	56550.0	-
3-33	10	157	1	1505.8	12.5
3-33	6	86	15	1385.5	243.5
3-23	70	115	22	163.5	31.0
3-7	71	117	21	164.6	29.6
3-33	82	100	47	122.7	57.1
3-7	124	161	41	130.0	33.5

10

20

【 0 2 9 6 】

同様の実験において、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスを、いくつかの異なる抗原を用いて免疫し、選択された抗原特異的なヒト抗体の重鎖を、異なる再構成されたヒト生殖系列軽鎖（上記の通り）と対合するそれらの能力について試験した。本実験で使用した抗原は、コレステロール恒常性に関与する酵素（抗原A）、グルコース恒常性の調節に関与する血清ホルモン（抗原B）、血管新生を促進する増殖因子（抗原C）および細胞表面受容体（抗原D）を含むものであった。各免疫群のマウスから抗原特異的抗体を単離し、重鎖可変領域および軽鎖可変領域をクローニングし、配列決定した。重鎖および軽鎖の配列からV遺伝子使用を決定し、選択された重鎖を、それらのコグネイト軽鎖または再構成されたヒト生殖系列V_H 1-39J_H 5領域のいずれかと対合させた。各重鎖/軽鎖対をCHO-K1細胞に共トランスフェクトし、上清中の抗体の存在をELISAアッセイにおいて抗ヒトIgGによって検出した。各重鎖/軽鎖対合について抗体価（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を決定し、異なる再構成されたヒト生殖系列軽鎖での力価を親抗体分子（すなわち、コグネイト軽鎖と対合させた重鎖）で得られた力価と比較し、ネイティブな力価に対するパーセントを算出した（表2）。V_H：重鎖可変遺伝子。V_L：軽鎖可変遺伝子。ND：現行の実験条件下では発現は検出されず。

30

40

50

【表 2】

表2

抗原	抗体	V _H	V _K	カ価(μg/ml)			ネイティブな カ価に対する パーセント
				V _H 単独	V _H +V _K	V _H + V _K 1-39Jk5	
A	320	1-18	2-30	0.3	3.1	2.0	66
	321	2-5	2-28	0.4	0.4	1.9	448
	334	2-5	2-28	0.4	2.7	2.0	73
	313	3-13	3-15	0.5	0.7	4.5	670
	316	3-23	4-1	0.3	0.2	4.1	2174
	315	3-30	4-1	0.3	0.2	3.2	1327
	318	4-59	1-17	0.3	4.6	4.0	86
B	257	3-13	1-5	0.4	3.1	3.2	104
	283	3-13	1-5	0.4	5.4	3.7	69
	637	3-13	1-5	0.4	4.3	3.0	70
	638	3-13	1-5	0.4	4.1	3.3	82
	624	3-23	1-17	0.3	5.0	3.9	79
	284	3-30	1-17	0.3	4.6	3.4	75
	653	3-33	1-17	0.3	4.3	0.3	7
	268	4-34	1-27	0.3	5.5	3.8	69
633	4-34	1-27	0.6	6.9	3.0	44	
C	730	3-7	1-5	0.3	1.1	2.8	249
	728	3-7	1-5	0.3	2.0	3.2	157
	691	3-9	3-20	0.3	2.8	3.1	109
	749	3-33	3-15	0.3	3.8	2.3	62
	750	3-33	1-16	0.3	3.0	2.8	92
	724	3-33	1-17	0.3	2.3	3.4	151
	706	3-33	1-16	0.3	3.6	3.0	84
	744	1-18	1-12	0.4	5.1	3.0	59
	696	3-11	1-16	0.4	3.0	2.9	97
	685	3-13	3-20	0.3	0.5	3.4	734
	732	3-15	1-17	0.3	4.5	3.2	72
	694	3-15	1-5	0.4	5.2	2.9	55
	743	3-23	1-12	0.3	3.2	0.3	10
	742	3-23	2-28	0.4	4.2	3.1	74
693	3-23	1-12	0.5	4.2	4.0	94	
D	136	3-23	2-28	0.4	5.0	2.7	55
	155	3-30	1-16	0.4	1.0	2.2	221
	163	3-30	1-16	0.3	0.6	3.0	506
	171	3-30	1-16	0.3	1.0	2.8	295
	145	3-43	1-5	0.4	4.4	2.9	65
	49	3-48	3-11	0.3	1.7	2.6	155
	51	3-48	1-39	0.1	1.9	0.1	4
	159	3-7	6-21	0.4	3.9	3.6	92
	169	3-7	6-21	0.3	1.3	3.1	235
	134	3-9	1-5	0.4	5.0	2.9	58
	141	4-31	1-33	2.4	4.2	2.6	63
	142	4-31	1-33	0.4	4.2	2.8	67

10

20

30

40

【0297】

これらの実験から得られた結果により、異なる遺伝子ファミリー由来の体細胞変異した高親和性重鎖が、再構成されたヒト生殖系列V_H 1-39J_K5領域およびV_H 3-20J_K1領域と対合して、正常な抗体分子として細胞から分泌され得ることが実証される。表1に示されている通り、抗体価は、親抗体のコグネイト軽鎖と比較して、再構成されたヒトV_H 1-39J_K5軽鎖と対合させた場合には重鎖の約61%（69種のうち42種）で上昇し、再構成されたヒトV_H 3-20J_K1軽鎖と対合させた場合には重鎖の約29%（69種のうち20種）で上昇した。重鎖の約20%（69種のうち14種）については、再構成されたヒト生殖系列軽鎖の両方とも親抗体のコグネイト軽鎖と比較して発現の

50

増加が付与された。表 2 に示されている通り、再構成されたヒト生殖系列 V_H 1 - 3 9 J_H 5 領域により、親抗体のコグネイト軽鎖と比較して、様々な異なるクラスの抗原に特異的なくつかの重鎖の発現の増加が付与された。重鎖の約 35% (15 種 / 43 種) については、抗体価が親抗体のコグネイト軽鎖と比較して 2 倍超上昇した。2 種の重鎖 (315 および 316) については、上昇は親抗体と比較して 10 倍を超えた。親抗体のコグネイト軽鎖と比較して発現の増加を示した全ての重鎖の中で、ファミリー 3 (V_H 3) 重鎖は他の重鎖可変領域遺伝子ファミリーと比較して過剰発現する。これにより、ヒト V_H 3 重鎖の、再構成されたヒト生殖系列 V_H 1 - 3 9 J_H 5 軽鎖および V_H 3 - 2 0 J_H 1 軽鎖と対合することとの好都合な関係が実証される。

【0298】

(実施例 2)

再構成されたヒト生殖系列軽鎖遺伝子座の生成

VELOCI GENE (登録商標) 技術 (例えば、米国特許第 6,586,251 号および Valenzuela ら (2003 年) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis、Nature Biotech. 21 巻 (6 号) : 652 ~ 659 頁を参照されたい) を使用して種々の再構成されたヒト生殖系列軽鎖ターゲティングベクターを作製して、マウスゲノム細菌人工染色体 (BAC) クローン 302g12 および 254m04 (Invitrogen) を改変した。これらの 2 種の BAC クローンを使用して、ゲノム構築物を、単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を含有するように操作し、内因性可変遺伝子セグメントおよび内因性連結遺伝子セグメントが欠失するように予め改変した内因性軽鎖遺伝子座に挿入した。

【0299】

再構成されたヒト生殖系列軽鎖ターゲティングベクターの構築。

当技術分野において認められている標準の分子生物学技法を使用して 3 種の異なる再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を作製した。これらの 3 種の領域を構築するために使用したヒト可変遺伝子セグメントは、再構成されたヒト V_H 1 - 3 9 J_H 5 配列、再構成されたヒト V_H 3 - 2 0 J_H 1 配列および再構成されたヒト V_H pre B J_H 5 配列を含むものであった。

【0300】

マウス V_H 3 - 7 遺伝子のエクソン 1 (リーダーペプチドをコードする) およびイントロン 1 を含有する DNA セグメントをデノボ DNA 合成 (Integrated DNA Technologies) によって作製した。5' 非翻訳領域の一部から天然に存在する B1pI 制限酵素部位までを含めた。ヒト V_H 1 - 3 9 遺伝子およびヒト V_H 3 - 2 0 遺伝子のエクソンをヒトゲノム BAC ライブラリーから PCR 増幅した。フォワードプライマーはマウス V_H 3 - 7 遺伝子のイントロン 1 のスプライスアクセプター部位を含有する 5' 伸長を有した。ヒト V_H 1 - 3 9 配列の PCR のために使用したリバースプライマーはヒト J_H 5 をコードする伸長を含むものであり、ヒト V_H 3 - 2 0 配列の PCR のために使用したリバースプライマーはヒト J_H 1 をコードする伸長を含むものであった。ヒト V_H pre B J_H 5 配列をデノボ DNA 合成 (Integrated DNA Technologies) によって作製した。スプライスドナー部位を含むヒト J_H - C_H イントロンの一部をプラスミド pBS - 296 - HA18 - PISceI から PCR 増幅した。フォワード PCR プライマーはヒト J_H 5 配列、J_H 1 配列または J_H 5 配列のいずれかの一部をコードする伸長を含むものであった。リバースプライマーはイントロンに予め操作された PISceI 部位を含むものであった。

【0301】

マウス V_H 3 - 7 エクソン 1 / イントロン 1、ヒト可変軽鎖エクソン、およびヒト J_H - C_H イントロン断片をオーバーラップ伸長 PCR によってつなぎ合わせ、B1pI および PISceI を用いて消化し、ヒト V_H 3 - 15 可変遺伝子セグメント由来のプロモーターを含有するプラスミド pBS - 296 - HA18 - PISceI へとライゲーションした。プラスミド pBS - 296 - HA18 - PISceI 内の loxed ハイグロマイ

10

20

30

40

50

シンカセットをNot I部位およびAsc I部位で挟まれたFRTedハイグロマイシンカセットで置き換えた。このプラスミドのNot I / P I - S c e I断片を、マウスJ - Cイントロン、マウスCエクソン、およびマウス遺伝子座の下流の約75 kbのゲノム配列の一部を含有する改変マウスBAC 254m04へとライゲーションし、これによりマウスES細胞における相同組換えのための3'相同性アームをもたらした。次いで、このBACのNot I / A s c I断片を、マウスES細胞における相同組換えのために、FRTedネオマイシンカセットおよび内因性遺伝子座の上流の約23 kbのゲノム配列を含有する改変マウスBAC 302g12へとライゲーションした。

【0302】

再構成されたヒト生殖系列V 1 - 39 J 5ターゲティングベクター(図1)。操作された軽鎖挿入物の5'末端および3'末端に、ターゲティングベクターへのクローニングのための制限酵素部位を導入した: 5'末端にA s c I部位および3'末端にP I - S c e I部位。5' A s c I部位から3' P I - S c e I部位内で、ターゲティング構築物は、5'から3'へ、マウスBACクローン302g12から得た内因性マウス軽鎖遺伝子座に対して5'側の5'相同性アーム含有配列、FRTedネオマイシン耐性遺伝子、ヒトV 3 - 15プロモーターを含むゲノム配列、マウスV 3 - 7可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスV 3 - 7可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列V 1 - 39 J 5領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJ - Cイントロンの一部を含有するゲノム配列、およびマウスBACクローン254m04から得た内因性マウスJ 5遺伝子セグメントの3'側の3'相同性アーム含有配列を含んだ(図1、中央)。内因性マウス軽鎖遺伝子座の上流および最も3'側のJ 5遺伝子セグメント(例えば、内因性3'エンハンサー)の下流の遺伝子および/または配列はターゲティング構築物によって改変しなかった(図1参照)。操作されたヒトV 1 - 39 J 5遺伝子座の配列が配列番号1に示されている。

【0303】

再構成されたヒト生殖系列V 1 - 39 J 5領域のBAC DNAへの標的化挿入を、再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域内の配列に位置するプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって確認した。簡単に述べると、マウスV 3 - 7リーダー配列に対して3'側のイントロン配列を、プライマーULC - m1F (AGGTGAGGGTACAGATAAGT GTTATGAG; 配列番号2)およびULC - m1R (TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA; 配列番号3)を用いて確認した。再構成されたヒト生殖系列V 1 - 39 J 5領域のオープンリーディングフレームを、プライマー1633 - h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A; 配列番号4)および1633 - h2R (TGCAAACTGG ATGCAGCATA G; 配列番号5)を用いて確認した。ネオマイシンカセットを、プライマーneoF (GGTGGAGAGG CTATTCGGC; 配列番号6)およびneoR (GAACACGGCG GCATCAG; 配列番号7)を用いて確認した。次いで、標的BAC DNAを使用して、マウスES細胞に電気穿孔し、再構成されたヒト生殖系列V 1 - 39 J 5領域を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を作製した。

【0304】

陽性ES細胞クローンを、内因性遺伝子座に挿入された操作されたV 1 - 39 J 5軽鎖領域に特異的なプローブを使用したTAQMAN(商標)スクリーニングおよび核型分析によって確認した。簡単に述べると、ネオマイシンマーカージェン型内結合するプローブneoP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; 配列番号8)、マウスV 3 - 7リーダー配列に対して3'側のイントロン配列内に結合するプローブULC - m1P (CCATTAATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC; 配列番号9)、および再構成されたヒト生殖系列V 1 - 39 J 5オープンリーディングフレーム内に結合するプローブ1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCT; 配列番号10)。次いで、陽性ES細胞クローンを使用して雌マウスに移植して、生殖系列V 1 - 39 J 5軽鎖領域を発現する同腹仔を生じさせた。

【0305】

あるいは、ターゲティング構築物により導入されたFRTEdネオマイシンカセットを除去するために、再構成されたヒト生殖系列V_{1-39J}5軽鎖領域を有するES細胞にFLPを発現する構築物をトランスフェクトする。必要に応じて、FLPリコンビナーゼを発現するマウスと掛け合わせることによってネオマイシンカセットを除去する（例えば、US6,774,279）。必要に応じて、ネオマイシンカセットはマウス内に保持される。

【0306】

再構成されたヒト生殖系列V_{3-20J}1ターゲティングベクター（図2）。同様に、再構成されたヒト生殖系列V_{3-20J}1領域を発現する、操作された軽鎖遺伝子座を、5'から3'へ、マウスBACクローン302g12から得た内因性マウス軽鎖遺伝子座に対して5'側の5'相同性アーム含有配列、FRTEdネオマイシン耐性遺伝子、ヒトV₃₋₁₅プロモーターを含むゲノム配列、マウスV₃₋₇可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスV₃₋₇可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列V_{3-20J}1領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJ_{1-C}イントロンの一部を含有するゲノム配列、およびマウスBACクローン254m04から得た内因性マウスJ₅遺伝子セグメントの3'側の3'相同性アーム含有配列を含むターゲティング構築物を使用して作製した（図2、中央）。操作されたヒトV_{3-20J}1遺伝子座の配列が配列番号11に示されている。

【0307】

再構成されたヒト生殖系列V_{3-20J}1領域のBAC DNAへの標的化挿入を、再構成されたヒト生殖系列V_{3-20J}1軽鎖領域内の配列に位置するプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって確認した。簡単に述べると、マウスV₃₋₇リーダー配列に対して3'側のイントロン配列を、プライマーULC-m1F（配列番号2）およびULC-m1R（配列番号3）を用いて確認した。再構成されたヒト生殖系列V_{3-20J}1領域のオープンリーディングフレームを、プライマー1635-h2F（TCCAGGCACCCTGTCTTTG；配列番号12）および1635-h2R（AAGTAGCTGCTGCTAACACTCTGACT；配列番号13）を用いて確認した。ネオマイシンカセットを、プライマーneoF（配列番号6）およびneoR（配列番号7）を用いて確認した。次いで、標的BAC DNAを使用して、マウスES細胞に電気穿孔し、再構成されたヒト生殖系列V_{3-20J}1軽鎖を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を作製した。

【0308】

陽性ES細胞クローンを、内因性軽鎖遺伝子座に挿入された操作されたV_{3-20J}1軽鎖領域に特異的なプローブを使用したTAQMAN（商標）スクリーニングおよび核型分析によって確認した。簡単に述べると、ネオマイシンマーカ遺伝子内に結合するプローブneoP（配列番号8）、マウスV₃₋₇リーダー配列内に結合するプローブULC-m1P（配列番号9）、およびヒトV_{3-20J}1オープンリーディングフレーム内に結合するプローブ1635h2P（AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG；配列番号14）。次いで、陽性ES細胞クローンを使用して雌マウスに移植した。ヒト生殖系列V_{3-20J}1軽鎖領域を発現する同腹仔。

【0309】

あるいは、ターゲティング構築物により導入されたFRTEdネオマイシンカセットを除去するために、ヒト生殖系列V_{3-20J}1軽鎖領域を有するES細胞にFLPを発現する構築物をトランスフェクトすることができる。必要に応じて、FLPリコンビナーゼを発現するマウスと掛け合わせることによってネオマイシンカセットを除去することができる（例えば、US6,774,279）。必要に応じて、ネオマイシンカセットはマウス内に保持される。

【0310】

再構成されたヒト生殖系列VpreBJ5ターゲティングベクター（図3）。

同様に、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域を発現する、操作された軽鎖遺伝子座を、5'から3'へ、マウスBACクローン302g12から得た内因性マウス軽鎖遺伝子座に対して5'側の5'相同性アーム含有配列、FRTedネオマイシン耐性遺伝子、ヒトV3-15プロモーターを含むゲノム配列、マウスV3-7可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスV3-7可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJ-Cイントロンの一部を含有するゲノム配列、およびマウスBACクローン254m04から得た内因性マウスJ5遺伝子セグメントの3'側の3'相同性アーム含有配列を含むターゲティング構築物を使用して作製した(図3、中央)。操作されたヒトVpreBJ 5遺伝子座の配列が配列番号15に示されている。

10

【0311】

再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域のBAC DNAへの標的化挿入を、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域軽鎖領域内の配列に位置するプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって確認した。簡単に述べると、マウスV3-7リーダー配列に対して3'側のイントロン配列を、プライマーULC-m1F(配列番号2)およびULC-m1R(配列番号3)を用いて確認した。再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域のオープンリーディングフレームを、プライマー1616-h1F(TGTCCTCGGC CCTTGGA;配列番号16)および1616-h1R(CCGATGTCAT GGTCGTTCCCT;配列番号17)を用いて確認した。ネオマイシンカセットを、プライマーneoF(配列番号6)およびneoR(配列番号7)を用いて確認した。次いで、標的BAC DNAを使用して、マウスES細胞に電気穿孔し、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5軽鎖を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を作製した。

20

【0312】

陽性ES細胞クローンを、内因性軽鎖遺伝子座に挿入された操作されたVpreBJ 5軽鎖領域に特異的なプローブを使用したTAQMAN(商標)スクリーニングおよび核型分析によって確認する。簡単に述べると、ネオマイシンマーカージン内結合するプローブneoP(配列番号8)、マウスIgV3-7リーダー配列内に結合するプローブULC-m1P(配列番号9)、およびヒトVpreBJ 5オープンリーディングフレーム内に結合するプローブ1616h1P(ACAATCCGCC TCACCTGC AC CCT;配列番号18)。次いで、陽性ES細胞クローンを使用して雌マウスに移植して、生殖系列軽鎖領域を発現する同腹仔を生じさせる。

30

【0313】

あるいは、ターゲティング構築物により導入されたFRTedネオマイシンカセットを除去するために、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5軽鎖領域を有するES細胞にFLPを発現する構築物をトランスフェクトする。必要に応じて、FLPリコンビナーゼを発現するマウスと掛け合わせることでネオマイシンカセットを除去する(例えば、US6,774,279)。必要に応じて、ネオマイシンカセットはマウス内に保持される。

【0314】

(実施例3)

単一の再構成されたヒト軽鎖を発現するマウスの生成

上記の標的ES細胞をドナーES細胞として使用し、VELOCIMOUSE(登録商標)法(例えば、米国特許第7,294,754号、およびPoueymirouら(2007年) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25巻(1号):91~99頁を参照されたい)によって8細胞期マウス胚に導入した。操作されたヒト生殖系列V1-39J 5軽鎖領域、V3-20J 1軽鎖領域またはVpreBJ 5軽鎖領域をそれぞれ独立に有するVELOCIMICE(登録商標)を、対立遺伝子アッセイ(Valenzuelaら、上記)の改変を使用した遺伝子型決定

40

50

によって同定し、それにより独特の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の存在を検出する。

【0315】

仔の遺伝子型決定を行い、独特の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域についてヘテロ接合性またはホモ接合性の仔を、再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の発現を特徴付けるために選択する。

【0316】

フローサイトメトリー。

共通軽鎖マウスの正常な抗体レパートリーにおける再構成されたヒト軽鎖領域の発現を、共通軽鎖マウスの脾細胞および末梢血における免疫グロブリン および 発現を分析することにより検証した。野生型マウス (n = 5)、V 1 - 39 J 5 共通軽鎖ヘテロ接合体マウス (n = 3)、V 1 - 39 J 5 共通軽鎖ホモ接合体マウス (n = 3)、V 3 - 20 J 1 共通軽鎖ヘテロ接合体マウス (n = 2)、および V 3 - 20 J 1 共通軽鎖ホモ接合体マウス (n = 2) から採取した脾臓および末梢血から、標準の方法を使用して細胞懸濁物を作製し、蛍光標識された抗体 (BD Pharmingen) を使用して CD19⁺、Ig⁺ および Ig⁺ で染色した。

10

【0317】

簡単に述べると、細胞 1 × 10⁶ 個を、抗マウス CD16 / CD32 (クローン 2.4 G2、BD Pharmingen) と共に氷上で 10 分インキュベートし、その後、以下の抗体カクテルを用いて氷上で 30 分標識した: APC とコンジュゲートした抗マウス CD19 (クローン 1D3、BD Pharmingen)、PerCP-Cy5.5 とコンジュゲートした抗マウス CD3 (クローン 17A2、BioLegend)、FITC とコンジュゲートした抗マウス Ig (クローン 187.1、BD Pharmingen)、PE とコンジュゲートした抗マウス Ig (クローン RML-42、BioLegend)。染色後、細胞を洗浄し、2%ホルムアルデヒド中に固定した。LSRIIFローサイトメーターでデータの取得を実施し、FlowJoを用いて分析した。ゲーティング: 総 B 細胞 (CD19⁺CD3⁻)、Ig⁺ B 細胞 (Ig⁺Ig⁻CD19⁺CD3⁻)、Ig⁺ B 細胞 (Ig⁻Ig⁺CD19⁺CD3⁻)。血液試料および脾細胞試料から収集したデータにより同様の結果が実証された。表3には、Ig⁺、Ig⁺ または Ig⁺Ig⁺ である各群からの代表的なマウス 1 匹の末梢血由来の CD19⁺ B 細胞における陽性の割合が示されている。野生型マウス (WT) および V 1 - 39 J 5 または V 3 - 20 J 1 共通軽鎖のいずれかについてホモ接合性のマウス由来の末梢血中の CD19⁺ B 細胞のパーセントが図4に示されている。

20

30

【表3】

表3

マウス	CD19 ⁺ B細胞		
	Igλ ⁺	Igκ ⁺	Igλ ⁺ Igκ ⁺
野生型	4.8	93	0.53
Vκ1-39Jk5	1.4	93	2.6
Vκ3-20Jk1	4.2	88	6

40

【0318】

共通軽鎖発現。

各共通軽鎖 (V 1 - 39 J 5 および V 3 - 20 J 1) の発現を、ヘテロ接合性マウスおよびホモ接合性マウスにおいて定量的 PCR アッセイ (例えば、TAQMAN (商標)) を使用して解析した。

【0319】

簡単に述べると、CD19⁺ B 細胞を、野生型マウス、マウス重鎖および 軽鎖可変領域遺伝子座の、対応するヒト重鎖および 軽鎖可変領域遺伝子座 (H) での置き換えにつ

50

いてホモ接合性のマウス、ならびに各再構成されたヒト軽鎖領域 (V_{1-39J5} または V_{3-20J1}) についてホモ接合性のマウスおよびヘテロ接合性のマウスの脾臓から mouse CD19 Microbeads (Miltenyi Biotec) を製造業者の仕様書に従って使用して精製した。RNeasy Mini kit (Qiagen) を製造業者の仕様書に従って使用して CD19⁺B 細胞から全 RNA を精製し、RNase-free DNase on-column treatment (Qiagen) を使用してゲノム RNA を取り出した。First Stand cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を使用して 200 ng の mRNA を cDNA に逆転写し、生じた cDNA を、Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて増幅した。全ての反応を、プライマーおよび (1) 両方の共通軽鎖についての V_{1-39J5} 接合部、(2) 単独の V_{3-20J1} 遺伝子 (すなわち、V₁₋₃₉ および V₃₋₂₀)、ならびに (3) マウス C 領域にわたる Taqman MGB プローブを使用した ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用して実施した。表 4 には、このアッセイに使用したプライマーおよびプローブの配列が示されている。相対的な発現をマウス C 領域の発現に対して正規化した。結果が図 5 A、図 5 B および図 5 C に示されている。

【表 4】

表 4

領域	プライマー/プローブの説明(5'-3')	配列番号
Vk1-39Jk5接合部	(センス) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	19
	(アンチセンス) GTTTAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	20
	(プローブ) CCTCCGATCA CCTTC	21
Vk1-39	(センス) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	22
	(アンチセンス) ATGGGACCCC ACTTTGCA	23
	(プローブ) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	24
Vk3-20Jk1接合部	(センス) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	25
	(アンチセンス) TGATTTCCAC CTTGGTCCCT T	26
	(プローブ) TAGCTCACCT TGGACGTT	27
Vk3-20	(センス) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	28
	(アンチセンス) GACCCACTGC CACTGAACCT	29
	(プローブ) CCACTGGCAT CCC	30
マウスCk	(センス) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	31
	(アンチセンス) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	32
	(プローブ) ACCAAGGACG AGTATGAA	33

【0320】

抗原特異的共通軽鎖抗体。

内因性マウス 軽鎖遺伝子座に V_{1-39J5} 共通軽鎖または V_{3-20J1} 共通軽鎖のいずれかを有する共通軽鎖マウスを、 α -ガラクトシダーゼを用いて免疫し、抗体価を測定した。

【0321】

簡単に述べると、 α -ガラクトシダーゼ (Sigma) を titermax adjuvant (Sigma) 中に製造業者の指示通り乳化した。野生型 (n=7)、V_{1-39J5} 共通軽鎖ホモ接合体 (n=2) および V_{3-20J1} 共通軽鎖ホモ接合体 (n=5) を、100 μ g の α -ガラクトシダーゼ/Titermax を皮下注射することによって免疫した。マウスに 50 μ g の α -ガラクトシダーゼ/Titermax を 3 週間離して 2 回皮下注射することによって追加刺激を行った。2 回目の追加刺激後、麻酔し

たマウスから後眼窩採血を使用して製造業者の指示通り血清分離チューブ (BD Biosciences) 中に血液を採取した。抗 - ガラクトシダーゼ IgM 抗体または抗 - ガラクトシダーゼ IgG 抗体を測定するために、ELISA プレート (Nunc) を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の - ガラクトシダーゼを用いて 4 で一晩コーティングした。過剰の抗原を洗い流した後、1% BSA を含む PBS を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。血清の段階希釈物をプレートに加え、室温で 1 時間インキュベートした後、洗浄した。次いで、プレートを、HRP とコンジュゲートした抗 IgM (Southern Biotech) または抗 IgG (Southern Biotech) と共に室温で 1 時間インキュベートした。さらに洗浄した後、プレートを、TMB 基質 (BD Biosciences) を用いて発色させた。1N の硫酸を用いて反応を停止させ、Victor X5 Plate Reader (Perkin Elmer) を使用して OD₄₅₀ を読み取った。GraphPad Prism を用いてデータを解析し、シグナルを、バックグラウンドを 2 倍上回る血清の希釈度として算出した。結果が図 6 A および図 6 B に示されている。

【0322】

この実施例に示されているように、V_{1-39J} 5 共通軽鎖マウスおよび V_{3-20J} 1 共通軽鎖マウスの脾臓区画と末梢区画のどちらにおいても / B 細胞の比が野生型パターンに近いことが実証された (表 3 および図 4)。しかし、VpreBJ 5 共通軽鎖マウスでは、末梢 B 細胞がより少なく、その約 1 - 2% が操作されたヒト軽鎖領域を発現することが実証された (データは示していない)。内因性 軽鎖遺伝子座からの V_{1-39J} 5 再構成ヒト軽鎖および V_{3-20J} 1 再構成ヒト軽鎖の発現レベルは、マウス V_{1-39J} および J_{1-39J} 遺伝子セグメントの、ヒト V_{1-39J} および J_{1-39J} 遺伝子セグメントでの完全な置き換えを含有する内因性 軽鎖遺伝子座と比較して上昇した (図 5 A、図 5 B および図 5 C)。VpreBJ 5 再構成ヒト軽鎖領域の発現レベルは、ヘテロ接合性マウスとホモ接合性マウスのどちらにおいても内因性 軽鎖遺伝子座からの同様の高い発現が実証された (データは示していない)。これにより、マウス V_{1-39J}、または両方の内因性軽鎖遺伝子座との直接競合において、単一の再構成されたヒト V_L/J_L 配列により、内因性 軽鎖遺伝子座からの野生型レベル発現よりも良好な収量を得ることができ、正常な脾性 B 細胞および血液 B 細胞の発生頻度が生じることが実証される。さらに、ヒト V_{1-39J} 5 配列またはヒト V_{3-20J} 1 配列のいずれかを有する操作された 軽鎖遺伝子座が存在することはマウスにより十分に許容され、免疫応答の体液性成分中の軽鎖レパートリーの実質的な部分を表すことにより、野生型の様式で機能するようである (図 6 A および図 6 B)。

【0323】

(実施例 4)

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖を発現するマウスの掛け合わせ

この実施例では、本明細書に記載の共通軽鎖マウスの任意の 1 つと掛け合わせて、複数の遺伝子改変免疫グロブリン遺伝子座を有する複数の遺伝子改変マウス系統を作製することができるいくつかの他の遺伝子改変マウス系統が記載されている。

【0324】

内因性 Ig₁ ノックアウト (KO)。

操作された軽鎖遺伝子座の使用を最適化するために、再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域のうちの 1 つを有するマウスを、内因性 軽鎖遺伝子座に欠失を含有する別のマウスと掛け合わせる。このように、実施例 2 に記載の通り、得られた後代は、それらの唯一の軽鎖として、再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を発現する。掛け合わせは、当技術分野において認められている標準の技法によって実施する、あるいは、商業的なブリーダー (例えば、Jackson Laboratory) によって実施される。操作された、軽鎖遺伝子座および内因性 軽鎖遺伝子座の欠失を有するマウス系統を、独特の軽鎖領域の存在および内因性マウス 軽鎖の非存在についてスクリーニングする。

【0325】

ヒト化内因性重鎖遺伝子座。

操作された、ヒト生殖系列軽鎖遺伝子座を有するマウスを、内因性マウス重鎖可変遺伝子遺伝子座の、ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座での置き換えを含有するマウス（US 6, 596, 541を参照されたい；VELOCIMMUNE（登録商標）マウス、Regeneration Pharmaceuticals, Inc.）と掛け合わせる。VELOCIMMUNE（登録商標）マウスは、内因性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結したヒト重鎖可変領域を含むゲノムを含み、その結果、マウスは、抗原による刺激に应答して、ヒト重鎖可変領域およびマウス重鎖定常領域を含む抗体を産生する。抗体の重鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、ヒト重鎖定常領域をコードするDNAに作動可能に連結する。次いで、DNAを、抗体の完全ヒト重鎖を発現することができる細胞において発現させる。

10

【0326】

内因性マウスV_H遺伝子座の、ヒトV_H遺伝子座での置き換えおよび内因性軽鎖遺伝子座における単一の再構成されたヒト生殖系列V_Lを有するマウスを得る。目的の抗原を用いて免疫すると、体細胞変異した重鎖（ヒトV_HおよびマウスC_H）を単一のヒト軽鎖（ヒトV_LおよびマウスC_L）と共に含有するリバースキメラ抗体が得られる。当該抗体を発現するB細胞のV_HおよびV_Lヌクレオチド配列を同定し、適切な発現系においてV_HおよびV_Lヌクレオチド配列をヒトC_HおよびC_Lヌクレオチド配列と融合することによって完全ヒト抗体を作製する。

【0327】

(実施例5)

ヒト重鎖および再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を発現するマウスからの抗体の生成操作されたヒト軽鎖領域を含有するマウスと他の内因性Ig遺伝子座の改変および欠失を含有する種々の所望の系統と掛け合わせた後（実施例4に記載の通り）、選択されたマウスを、目的の抗原を用いて免疫することができる。

20

【0328】

一般に、単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域のうちの1つを含有するVELOCIMMUNE（登録商標）マウスに抗原を用いた攻撃を行い、リンパ系細胞（例えば、B細胞）を動物の血清から回収する。リンパ系細胞を骨髓腫細胞株と融合して不死ハイブリドーマ細胞株を調製し、そのようなハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、選択して、免疫に使用する抗原に特異的な、ヒト重鎖可変および再構成されたヒト生殖系列軽鎖を含有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定する。重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、望ましいアイソタイプの重鎖および軽鎖の定常領域と連結する。内因性マウス配列および内因性遺伝子座に存在する任意のさらなるシス作用性エレメントの存在に起因して、各抗体の単一の軽鎖は体細胞変異し得る。これにより、単一の軽鎖配列および多様な重鎖配列を含む抗原特異的レパートリーにさらなる多様性が付加される。その後、生じたクローニングされた抗体配列をCHO細胞などの細胞において発現させる。あるいは、抗原特異的キメラ抗体または軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードするDNAを抗原特異的リンパ球から直接同定する。

30

【0329】

最初に、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する高親和性キメラ抗体を単離する。上記の通り、抗体を特徴付け、親和性、選択性、エピトープなどを含めた望ましい特性について選択する。マウス定常領域を所望のヒト定常領域で置き換えて、体細胞変異したヒト重鎖および本発明の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域に由来する単一の軽鎖を含有する完全ヒト抗体を生成する。適切なヒト定常領域としては、例えば、野生型または改変されたIgG1またはIgG4が挙げられる。

40

【0330】

内因性マウス重鎖遺伝子座の、ヒトV_H、D_H、およびJ_H遺伝子セグメントでの置き換え、ならびに内因性マウス軽鎖遺伝子座の、操作された生殖系列V_{1-39J}5ヒト軽鎖領域または操作された生殖系列V_{3-20J}1ヒト軽鎖領域（上記）のいずれかでの置き換えを含有するVELOCIMMUNE（登録商標）マウスの別のコホートを

50

、ヒト細胞表面受容体タンパク質（抗原 E）で免疫した。抗原 E を直接マウスの後足蹠に 3 - 4 日毎に 6 回の連続した注射で投与する。注射前に、2 ~ 3 マイクログラムの抗原 E を 10 μ g の CpG オリゴヌクレオチド（カタログ番号 tlr1-modn-ODN1826 オリゴヌクレオチド；Invivogen、San Diego、CA）および 25 μ g の Adju-Phos（リン酸アルミニウムゲルアジュバント、カタログ番号 H-71639-250；Brenntag Biosector、Frederikssund、Denmark）と混合する。合計 6 回の注射を与えた後、最終的な抗原記憶（antigen recall）を与え、その 3 - 5 日後に 殺す。4 回目および 6 回目の注射の後に採血し、抗体免疫応答を標準の抗原特異的イムノアッセイによってモニターする。

10

【0331】

所望の免疫応答が実現されたら、脾細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞と融合してそれらの生存能力を保存し、ハイブリドーマ細胞株を形成する。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、選択して、抗原 E 特異的共通軽鎖抗体を産生する細胞株を同定する。この技法を使用して、いくつかの抗抗原 E 特異的共通軽鎖抗体（すなわち、ヒト重鎖可変ドメイン、同じヒト軽鎖可変ドメイン、およびマウス定常ドメインを有する抗体）を得る。

【0332】

あるいは、その全体が参照により明確に本明細書に組み込まれる U.S. 2007/0280945 A1 に記載の通り、骨髄腫細胞との融合を伴わずに抗原陽性 B 細胞から直接、抗抗原 E 共通軽鎖抗体を単離する。この方法を使用して、いくつかの完全ヒト抗抗原 E 共通軽鎖抗体（すなわち、ヒト重鎖可変ドメイン、操作されたヒト V_H 1-39 J_H 5 軽鎖または操作されたヒト V_H 3-20 J_H 1 軽鎖領域のいずれか、およびヒト定常ドメインを有する抗体）を得た。

20

【0333】

この実施例の方法に従って生成される例示的な抗抗原 E 共通軽鎖抗体の生物学的性質は、下記の節に詳しく記載されている。

【0334】

（実施例 6）

抗原特異的共通軽鎖抗体における重鎖遺伝子セグメントの使用

産生されるヒト抗抗原 E 共通軽鎖抗体の構造を解析するために、重鎖抗体可変領域をコードする核酸をクローニングし、配列決定した。抗体の核酸配列および予測されるアミノ酸配列から、操作されたヒト V_H 1-39 J_H 5 軽鎖または操作されたヒト V_H 3-20 J_H 1 軽鎖領域のいずれかを含有する免疫した V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスから得た、選択された共通軽鎖抗体の重鎖可変領域（H C V R）について遺伝子使用を同定した。結果が表 5 および表 6 に示されており、これにより、ヒト V_H 1-39 由来の軽鎖またはヒト V_H 3-20 由来の軽鎖のいずれかのみから軽鎖を発現するマウスを使用した場合、本発明によるマウスが、種々の再構成に起因して種々のヒト重鎖遺伝子セグメントから抗原特異的共通軽鎖抗体を生成することが実証される。2、3、4、および 5 ファミリーのヒト V_H 遺伝子セグメントを種々のヒト D_H セグメントおよびヒト J_H セグメントと共に再構成して抗原特異的抗体をもたらす。

30

40

【表 5 - 1】

表5

VK1-39Jk5 共通軽鎖抗体							
抗体	HCVR			抗体	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
2952	2-5	6-6	1	6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1	6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1	2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5	2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4	3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4	3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4	5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4	6002	3-30	6-13	4
6011	3-23	7-27	4	6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4	6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4	6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4	6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4	6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4	6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4	6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4	6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4	6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4	2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4	2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5	2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5	3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5	3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2	3020	3-30	7-27	4
3013	3-30	5-12	4	3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4	3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1	3030	3-30	7-27	4
3043	3-30	6-6	3	3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4	5997	3-30	7-27	4
2949	3-30	6-6	5	6033	3-30	7-27	4
2950	3-30	6-6	5	3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5	6028	3-30	7-27	6
2978	3-30	6-6	5	3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5	3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5	6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5	6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5	6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5	6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5	6037	4-59	3-16	3
6004	3-30	6-6	5	2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5	3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5	3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5	6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5	6006	1-69	6-6	5

10

20

30

40

【表 5 - 2】

6023	3-30	6-6	5	6008	1-69	6-13	4
------	------	-----	---	------	------	------	---

50

【表 6】

表6

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

10

【 0 3 3 5 】

(実施例 7)

LUMINEX (商標) アッセイによる抗原特異的共通軽鎖抗体の遮断能の決定
 抗原 E に対して生じたヒト共通軽鎖抗体 9 8 種を、抗原 E の天然のリガンド (リガンド Y) の、抗原 E への結合を遮断するそれらの能力についてビーズに基づくアッセイで試験した。

20

【 0 3 3 6 】

抗原 E の細胞外ドメイン (E C D) を 2 つの myc エピトープタグおよび 6 × ヒスチジンタグとコンジュゲートし (抗原 E - mmH)、M E S 緩衝液中 2 0 μ g / m L の濃度でカルボキシル化マイクロスフェアにアミン - カップリングした。混合物を室温で 2 時間インキュベートし、その後、1 M の T r i s、p H 8 . 0 を用いてビーズを非活性化し、その後、0 . 0 5 % (v / v) T w e e n - 2 0 を含む P B S で洗浄した。次いで、2 % (w / v) B S A (S i g m a - A l d r i c h C o r p .、S t . L o u i s、M O) を含有する P B S (I r v i n e S c i e n t i f i c、S a n t a A n a、C A) を用いてビーズをブロックした。9 6 ウェルフィルタープレートにおいて、抗原 E 特異的共通軽鎖抗体を含有する上清を緩衝液中 1 : 1 5 に希釈した。抗体上清と同じ培地成分を有する偽上清を含有する陰性対照を調製した。抗原 E で標識したビーズを上清に加え、4 で一晩インキュベートした。ビオチン化リガンド Y タンパク質を、最終濃度 0 . 0 6 n M まで加え、室温で 2 時間インキュベートした。抗原 E - m y c - m y c - 6 H i s で標識したビーズに結合したビオチン化リガンド Y の検出を、ストレプトアビジンとコンジュゲートした R - フニコエリトリン (M o s s I n c、P a s a d e n a、M D) を用いて行い、その後、LUMINEX (商標) フローサイトメトリーに基づく分析機器で測定した。リガンド Y を伴わない試料のバックグラウンド平均蛍光強度 (M F I) を全ての試料から引いた。パーセント遮断を、各試料についてバックグラウンドを引いた M F I を、調整した陰性対照値で割り、1 0 0 を掛け、得られた値を 1 0 0 から引くことによって算出した。

30

40

【 0 3 3 7 】

同様の実験において、同じ 9 8 種の、抗原 E に対して生じたヒト共通軽鎖抗体を、リガンド Y で標識したビーズへの抗原 E の結合を遮断するそれらの能力について試験した。

【 0 3 3 8 】

簡単に述べると、リガンド Y を M E S 緩衝液中に希釈した 2 0 μ g / m L の濃度でカルボキシル化マイクロスフェアにアミン - カップリングした。混合し室温で 2 時間インキュベートし、その後、1 M の T r i s、p H 8 を用いてビーズを非活性化し、次いで、0 . 0 5

50

% (v/v) Tween - 20 を含む PBS で洗浄した。次いで、2% (w/v) BSA (Sigma - Aldrich Corp.、St. Louis、MO) を含有する PBS (Irvine Scientific、Santa Ana、CA) を用いてビーズをブロッキングした。96 ウェルフィルタープレートで、抗原 E 特異的共通軽鎖抗体を含有する上清を緩衝液中 1 : 15 に希釈した。抗体上清と同じ培地成分を有する偽上清を含有する陰性対照を調製した。ビオチン化抗原 E - mmH を 0 . 42 nM の最終濃度まで加え、4 で一晩インキュベートした。次いで、リガンド Y で標識したビーズを抗体 / 抗原 E 混合物に加え、室温で 2 時間インキュベートした。リガンド Y - ビーズに結合したビオチン化抗原 E - mmH の検出をストレプトアビジンとコンジュゲートした R - フィコエリトリン (Moss Inc、Pasadena、MD) を用いて行い、その後、LUMINEX (商標) フローサイトメトリーに基づく分析機器で測定した。抗原 E 含まない試料のバックグラウンド平均蛍光強度 (MFI) を全ての試料から引いた。パーセント遮断を、各試料についてバックグラウンドを引いた MFI を、調整した陰性対照値で割り、100 を掛け、得られた値を 100 から引くことによって算出した。

10

【0339】

表 7 および表 8 には、両方の LUMINEX (商標) アッセイにおいて試験した抗抗原 E 共通軽鎖抗体 98 種全てについてのパーセント遮断が示されている。ND : 現行の実験条件では決定されず。

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表7

Vk1-39Jk5 共通軽鎖抗体		
抗体	抗原Eで標識した ビーズの%遮断	溶液中の抗原Eの %遮断
2948	81.1	47.8
2948G	38.6	ND
2949	97.6	78.8
2949G	97.1	73.7
2950	96.2	81.9
2950G	89.8	31.4
2952	96.1	74.3
2952G	93.5	39.9
2954	93.7	70.1
2954G	91.7	30.1
2955	75.8	30.0
2955G	71.8	ND
2964	92.1	31.4
2964G	94.6	43.0
2978	98.0	95.1
2978G	13.9	94.1
2982	92.8	78.5
2982G	41.9	52.4
2985	39.5	31.2
2985G	2.0	5.0
2987	81.7	67.8
2987G	26.6	29.3
2996	87.3	55.3
2996G	95.9	38.4
2997	93.4	70.6
2997G	9.7	7.5
3004	79.0	48.4
3004G	60.3	40.7
3005	97.4	93.5
3005G	77.5	75.6
3010	98.0	82.6
3010G	97.9	81.0
3011	87.4	42.8
3011G	83.5	41.7
3012	91.0	60.8
3012G	52.4	16.8
3013	80.3	65.8
3013G	17.5	15.4
3014	63.4	20.7
3014G	74.4	28.5
3015	89.1	55.7
3015G	58.8	17.3
3016	97.1	81.6

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

3016G	93.1	66.4	
3017	94.8	70.2	
3017G	87.9	40.8	
3018	85.4	54.0	
3018G	26.1	12.7	
3019	99.3	92.4	
3019G	99.3	88.1	
3020	96.7	90.3	
3020G	85.2	41.5	10
3021	74.5	26.1	
3021G	81.1	27.4	
3022	65.2	17.6	
3022G	67.2	9.1	
3023	71.4	28.5	
3023G	73.8	29.7	
3024	73.9	32.6	
3024G	89.0	10.0	
3025	70.7	15.6	
3025G	76.7	24.3	20
3027	96.2	61.6	
3027G	98.6	75.3	
3028	92.4	29.0	
3028G	87.3	28.8	
3030	6.0	10.6	
3030G	41.3	14.2	
3032	76.5	31.4	
3032G	17.7	11.0	
3033	98.2	86.1	
3033G	93.6	64.0	
3036	74.7	32.7	30
3036G	90.1	51.2	
3041	95.3	75.9	
3041G	92.4	51.6	
3042	88.1	73.3	
3042G	60.9	25.2	
3043	90.8	65.8	
3043G	92.8	60.3	

40

50

【表 8】

表8

Vk3-20Jk1
共通軽鎖抗体

抗体	抗原Eで標識した ビーズの%遮断	溶液中の抗原Eの %遮断
2968	97.1	73.3
2968G	67.1	14.6
2969	51.7	20.3
2969G	37.2	16.5
2970	92.2	34.2
2970G	92.7	27.2
2971	23.4	11.6
2971G	18.8	18.9
2972	67.1	38.8
2972G	64.5	39.2
2973	77.7	27.0
2973G	51.1	20.7
2974	57.8	12.4
2974G	69.9	17.6
2975	49.4	18.2
2975G	32.0	19.5
2976	1.0	1.0
2976G	50.4	20.4

10

20

【0340】

上記の第1のLUMINEX(商標)実験において、V 1 - 39 J 5操作軽鎖(engineered light chain)を含有する共通軽鎖抗体80種を、抗原Eで標識したビーズへのリガンドYの結合を遮断するそれらの能力について試験した。これらの80種の共通軽鎖抗体のうち、68種で>50%遮断が実証され、12種で<50%遮断が実証された(6種が25-50%遮断および6種が<25%遮断)。V 3 - 20 J 1操作軽鎖を含有する共通軽鎖抗体18種については、抗原Eで標識したビーズへのリガンドYの結合に関して、12種で>50%遮断が実証され、6種で<50%遮断が実証された(3種が25-50%遮断および3種が<25%遮断)。

30

【0341】

上記の第2のLUMINEX(商標)実験において、同じ80種の、V 1 - 39 J 5操作軽鎖を含有する共通軽鎖抗体を、リガンドYで標識したビーズへの抗原Eの結合を遮断するそれらの能力について試験した。これらの80種の共通軽鎖抗体のうち、36種で>50%遮断が実証され、44種で<50%遮断が実証された(27種が25-50%遮断および17種が<25%遮断)。V 3 - 20 J 1操作軽鎖を含有する共通軽鎖抗体18種については、リガンドYで標識したビーズへの抗原Eの結合に関して、1種で>50%遮断が実証され、17種で<50%遮断が実証された(5種が25-50%遮断および12種が<25%遮断)。

40

【0342】

表7および表8のデータにより、表5および表6に記載されている再構成により、リガンドYとそのコグネイト受容体である抗原Eの結合を種々の程度の有効性で遮断する抗抗原E特異的共通軽鎖抗体が生成されることが確立され、これは、抗原Eに関してエピトープ特異性が重複している抗体および重複していない抗体を含む表5および表6の抗抗原E共通軽鎖抗体と一致する。

【0343】

50

(実施例 8)

E L I S A による抗原特異的共通軽鎖抗体の遮断能の決定

抗原 E に対して生じたヒト共通軽鎖抗体を、リガンド Y をコーティングした表面への抗原 E の結合を遮断するそれらの能力について E L I S A アッセイにおいて試験した。

【0344】

リガンド Y を P B S で $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度に希釈して 96 ウェルプレート上にコーティングし、一晩インキュベートし、その後、0.05% Tween - 20 を含む P B S で 4 回洗浄した。次いで、0.5% (w/v) B S A (Sigma - Aldrich Corp ., St . Louis, MO) を含有する P B S (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) を用いて室温で 1 時間、プレートをブロッキングした。別のプレートにおいて、抗抗原 E 共通軽鎖抗体を含有する上清を緩衝液中 1 : 10 に希釈した。同じ抗体の成分を含む偽上清を陰性対照として使用した。抗原 E - mmH (上記) を、0.150 nM の最終濃度まで加え、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、抗体 / 抗原 E - mmH 混合物を、リガンド Y を含有するプレートに加え、室温で 1 時間インキュベートした。リガンド Y と結合した抗原 E - mmH の検出を、抗ペンタ - His 抗体とコンジュゲートした西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (Qiagen, Valencia, CA) を用いて行い、テトラメチルベンジジン (TMB) 基質 (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用し硫酸により中和する標準の比色定量応答によって発色させた。吸光度を OD 450 において 0.1 秒にわたって読み取った。抗原 E を含まない試料のバックグラウンド吸光度を全ての試料から引いた。パーセント遮断を、各試料についてバックグラウンドを引いた M F I を、調整した陰性対照値で割り、100 を掛け、得られた値を 100 から引くことによって算出した。

【0345】

表 9 および表 10 には、E L I S A アッセイにおいて試験した抗抗原 E 共通軽鎖抗体 98 種全てについてのパーセント遮断が示されている。ND : 現行の実験条件では決定されず。

10

20

30

40

50

【表 9】

表9

Vk1-39Jk5 共通軽鎖抗体			
抗体	溶液中の抗原Eの %遮断	抗体	溶液中の抗原Eの %遮断
2948	21.8	3015	23.7
2948G	22.9	3015G	10.2
2949	79.5	3016	78.1
2949G	71.5	3016G	37.4
2950	80.4	3017	61.6
2950G	30.9	3017G	25.2
2952	66.9	3018	40.6
2952G	47.3	3018G	14.5
2954	55.9	3019	94.6
2954G	44.7	3019G	92.3
2955	12.1	3020	80.8
2955G	25.6	3020G	ND
2964	34.8	3021	7.6
2964G	47.7	3021G	20.7
2978	90.0	3022	2.4
2978G	90.2	3022G	15.0
2982	59.0	3023	9.1
2982G	20.4	3023G	19.2
2985	10.5	3024	7.5
2985G	ND	3024G	15.2
2987	31.4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13.9
2996	29.3	3027	61.4
2996G	ND	3027G	82.7
2997	48.7	3028	40.3
2997G	ND	3028G	12.3
3004	16.7	3030	ND
3004G	3.5	3030G	9.5
3005	87.2	3032	ND
3005G	54.3	3032G	13.1
3010	74.5	3033	77.1
3010G	84.6	3033G	32.9
3011	19.4	3036	17.6
3011G	ND	3036G	24.6
3012	45.0	3041	59.3
3012G	12.6	3041G	30.7
3013	39.0	3042	39.9
3013G	9.6	3042G	16.1
3014	5.2	3043	57.4
3014G	17.1	3043G	46.1

10

20

30

40

50

【表 10】

表10

Vk3-20Jk1 共通軽鎖抗体			
抗体	溶液中の抗原Eの %遮断	抗体	溶液中の抗原Eの %遮断
2968	68.9	2972G	35.7
2968G	15.2	2973	20.7
2969	10.1	2973G	23.1
2969G	23.6	2974	ND
2970	34.3	2974G	22.0
2970G	41.3	2975	8.7
2971	6.3	2975G	19.2
2971G	27.1	2976	4.6
2972	9.6	2976G	26.7

【0346】

この実施例に記載の通り、V 1 - 39 J 5 操作軽鎖を含有する共通軽鎖抗体 80 種の、リガンド Y をコーティングした表面への抗原 E の結合を遮断するそれらの能力について試験し、22 種で > 50 % 遮断が実証され、58 種で < 50 % 遮断が実証された（20 種が 25 - 50 % 遮断および 38 種が < 25 % 遮断）。V 3 - 20 J 1 操作軽鎖を含有する共通軽鎖抗体 18 種については、リガンド Y をコーティングした表面への抗原 E の結合に関して、1 種で > 50 % 遮断が実証され、17 種で < 50 % 遮断が実証された（5 種が 25 - 50 % 遮断および 12 種が < 25 % 遮断）。

【0347】

これらの結果は、抗原 E に関してエピトープ特異性が重複している抗体および重複していない抗体を含む抗原 E 特異的共通軽鎖抗体プールとも一致する。

【0348】

（実施例 9）

抗原特異的共通軽鎖抗体についての B I A C O R E（商標）親和性決定
 選択された抗体上清についての平衡解離定数（ K_D ）を、B I A C O R E（商標）T 1 0 0 機器（G E H e a l t h c a r e）を使用した S P R（表面プラズモン共鳴）によって決定した。H B S - E P（10 mM の H e p e s、150 mM の N a C l、0.3 mM の E D T A、0.05 % 界面活性剤 P 2 0、p H 7.4）をランニング緩衝液および試料緩衝液の両方として使用して、25 で全てのデータを得た。抗体を、粗上清試料から、標準のアミンカップリング化学を使用して高密度の抗ヒト F c 抗体で予め誘導体化した C M 5 センサーチップ表面に捕捉した。捕捉ステップの間に、上清を抗ヒト F c 表面にわたって毎分 3 μ L の流速で合計 3 分間注入した。捕捉ステップの後に、ランニング緩衝液または濃度 100 n M の分析物のいずれかを、毎分 35 μ L の流速で 2 分間注入した。捕捉された抗体からの抗原の解離を 6 分間モニターした。10 mM のグリシン、p H 1.5 を簡単に注入することによって捕捉された抗体を取り出した。全てのセンサーグラムを、分析物センサーグラムから緩衝液の注入由来のセンサーグラムを引き、それにより、捕捉表面からの抗体の解離によって引き起こされるアーチファクトを除くことによって 2 重参照した。B I A c o r e T 1 0 0 E v a l u a t i o n s o f t w a r e v 2.1 を使用した質量伝達を用いて各抗体についての結合データを 1 : 1 結合モデルに対してフィッティングした。結果が表 11 および表 12 に示されている。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表11

Vk1-39Jk5 共通軽鎖抗体						
抗体	100nMの抗原E		抗体	100nMの抗原E		
	K _D (nM)	T _{1/2} (分)		K _D (nM)	T _{1/2} (分)	
2948	8.83	28	3015	29.1	11	
2948G	95.0	1	3015G	65.9	0	
2949	3.57	18	3016	4.99	17	
2949G	6.37	9	3016G	18.9	4	10
2950	4.91	17	3017	9.83	8	
2950G	13.6	5	3017G	55.4	2	
2952	6.25	7	3018	11.3	36	
2952G	7.16	4	3018G	32.5	3	
2954	2.37	24	3019	1.54	59	
2954G	5.30	9	3019G	2.29	42	
2955	14.4	6	3020	5.41	39	
2955G	12.0	4	3020G	41.9	6	
2964	14.8	6	3021	50.1	6	
2964G	13.0	9	3021G	26.8	4	
2978	1.91	49	3022	25.7	17	
2978G	1.80	58	3022G	20.8	12	20
2982	6.41	19	3023	263	9	
2982G	16.3	9	3023G	103	5	
2985	64.4	9	3024	58.8	7	
2985G	2.44	8	3024G	7.09	10	
2987	21.0	11	3025	35.2	6	
2987G	37.6	4	3025G	42.5	8	
2996	10.8	9	3027	7.15	6	
2996G	24.0	2	3027G	4.24	18	
2997	7.75	19	3028	6.89	37	
2997G	151	1	3028G	7.23	22	
3004	46.5	14	3030	46.2	7	
3004G	1.93	91	3030G	128	3	30
3005	2.35	108	3032	53.2	9	
3005G	6.96	27	3032G	13.0	1	
3010	4.13	26	3033	4.61	17	
3010G	2.10	49	3033G	12.0	5	
3011	59.1	5	3036	284	12	
3011G	41.7	5	3036G	18.2	10	
3012	9.71	20	3041	6.90	12	
3012G	89.9	2	3041G	22.9	2	
3013	20.2	20	3042	9.46	34	
3013G	13.2	4	3042G	85.5	3	
3014	213	4	3043	9.26	29	
3014G	36.8	3	3043G	13.1	22	40

【表 1 2】

表12

Vk3-20Jk1 共通軽鎖抗体					
抗体	100nMの抗原E		抗体	100nMの抗原E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (分)		K _D (nM)	T _{1/2} (分)
2968	5.50	8	2973	5.35	39
2968G	305	0	2973G	11.0	44
2969	34.9	2	2974	256	0
2969G	181	1	2974G	138	0
2970G	12.3	3	2975	38.0	2
2971G	32.8	22	2975G	134	1
2972	6.02	13	2976	6.73	10
2972G	74.6	26	2976G	656	8

【0349】

表5および表6に示されている再構成を含む共通軽鎖抗体の結合親和性は変動し、ほぼ全てがナノモル濃度範囲のK_Dを示す。親和性データは、高親和性であり、クローン選択されたものであり、体細胞変異したものである、表5および表6に記載されている再構成された可変ドメインのコンビナトリアル結合によって生じる共通軽鎖抗体と一致する。以前示されたデータと併せて、表5および表6に記載されている共通軽鎖抗体は、抗原E上の1種または複数種のエピトープに対する特異性を示す多様な高親和性抗体のコレクションを含む。

【0350】

(実施例10)

LUMINEX(商標)アッセイによる抗原特異的共通軽鎖抗体の結合特異性の決定
 選択された抗抗原E共通軽鎖抗体を、ヒトタンパク質とはアミノ酸残基のおよそ10%が異なるカニクイザル(cynomolgous monkey)オルソログを含めた抗原EのECDおよび抗原E-ECDバリエーション(Mf抗原E); ECDのC末端から最後の10アミノ酸を欠く抗原Eの欠失変異体(抗原E-CT);ならびにリガンドYとの相互作用が推測される位置にアラニン置換を含有する2つの変異体(抗原E-A1a1および抗原E-A1a2)に結合するそれらの能力について試験した。抗原Eタンパク質をCHO細胞において産生させ、それぞれがmyc-myc-His C末端タグを含有した。

【0351】

結合試験のために、培養培地1mLから、抗原E-ECDタンパク質またはバリエーションタンパク質(上記)を、抗mycモノクローナル抗体(MAb 9E10、ハイブリドーマ細胞株CRL-1729(商標); ATCC、Manassas、VA)を共有結合によってコーティングしたマイクロスフェア(LUMINEX(商標))ビーズ1×10⁶個と共に室温で2時間インキュベートすることによって捕捉した。次いで、ビーズを使用する前にPBSで洗浄した。抗抗原E共通軽鎖抗体を含有する上清を緩衝液中1:4に希釈し、96ウェルフィルタープレートに加えた。抗体を含まない偽上清を陰性対照として使用した。次いで、捕捉された抗原Eタンパク質を含有するビーズを抗体試料に加え(ウェル当たりビーズ3000個)、4で一晚インキュベートした。翌日、試料ビーズを洗浄し、結合した共通軽鎖抗体を、R-フィコエリトリンとコンジュゲートした抗ヒトIgG抗体を用いて検出した。ビーズ(各抗原Eタンパク質に結合する各抗体試料についておよそ100個のビーズを計数した)の蛍光強度を、LUMINEX(商標)フローサイトメトリーに基づく分析機器を用いて測定し、ビーズ/抗体相互作用当たり少なくとも100個の計数したビーズについての蛍光強度中央値(MFI)を記録した。結果が表13および

表 1 4 に示されている。

【表 1 3 - 1】

表13

Vk1-39Jk5 共通軽鎖抗体					
平均蛍光強度(MFI)					
抗体	抗原E- ECD	抗原E- ΔCT	抗原E- Ala1	抗原E- Ala2	Mf 抗原E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表14

Vk3-20Jk1 共通軽鎖抗体					
平均蛍光強度(MFI)					
抗体	抗原E- ECD	抗原E- ΔCT	抗原E- Ala1	抗原E- Ala2	Mf 抗原E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

【 0 3 5 2】

抗抗原 E 共通軽鎖抗体上清は、抗原 E - E C D に連結したビーズに対して高い特異的結合を示した。これらのビーズについて、陰性対照である偽上清では、抗原 E - E C D ビーズ試料と合わせると無視できるシグナル (< 10 の M F I) がもたらされたが、抗抗原 E 共通軽鎖抗体を含有する上清では、強い結合シグナル (抗体上清 9 8 種について 2 6 2 7 の平均 M F I ; 抗体試料 9 8 種のうち 9 1 種について M F I $> 5 0 0$) が示された。

【 0 3 5 3】

選択された抗抗原 E 共通軽鎖抗体の、抗原 E の E C D 上の異なるエピトープを同定する能力の尺度として、バリエーションへの抗体の相対的な結合を決定した。ネイティブな抗原 E - E C D 結合試験のために抗原 E バリエーション 4 種全てを上記のとおり、抗 m y c L U M I N E X (商標) ビーズに捕捉し、相対的な結合比 (M F I バリエーション / M F I 抗原 E - E C D) を決定した。表 1 2 および表 1 3 に示されている試験した共通軽鎖抗体上清 9 8 種について、比の平均 (M F I バリエーション / M F I 抗原 E - E C D) は各バリエーションで異なり、これはビーズへのタンパク質の異なる捕捉量を反映する可能性がある (比の平均は抗原 E - Δ C T、抗原 E - A l a 1、抗原 E - A l a 2、および M f 抗原 E についてそれぞれ 0 . 6 1、2 . 9、2 . 0、および 1 . 0 であった)。各タンパク質バリエーションについて、試験した共通軽鎖抗体 9 8 種のサブセットについての結合は、結合の著しい低下を示し、これにより、所与のバリエーションを特徴付ける変異に対する感受性が示された。例えば、共通軽鎖抗体試料のうち 1 9 種は、M f 抗原 E に < 8 % の M F I バリエーション / M F I 抗原 E - E C D で結合した。この群の多くが高度または中程度に高い親和性抗体 ($K_D < 5$ n M、1 5 種で $K_D < 5 0$ n M) を含むので、この群のシグナルが低いことは、親和性が低いことではなく、ネイティブな抗原 E - E C D と所与のバリエーションの間の配列 (エピトープ) 差異に対する感受性に起因する可能性がある。

【 0 3 5 4】

これらのデータにより、表 5 および表 6 に記載されている共通軽鎖抗体が、抗原 E 上の 2

10

20

30

40

50

種以上のエピトープを特異的に認識する抗原 E 特異的の共通軽鎖抗体の多様な群を表すことが確立される。

【 0 3 5 5 】

(実施例 1 1)

共通軽鎖抗体における軽鎖シャッフリング

選択された抗原特異的の共通軽鎖抗体の重鎖を、重鎖を生殖系列 V 1 - 3 9 J 5 操作軽鎖または生殖系列 V 3 - 2 0 J 1 操作軽鎖のいずれかと再対合させた (実施例 1 に記載の通り) 後の抗原 E への結合について試験した。

【 0 3 5 6 】

簡単に述べると、抗原 E 特異的の共通軽鎖抗体 (V 1 - 3 9 J 5 および V 3 - 2 0 J 1) の重鎖 2 4 7 種に、生殖系列 V 1 - 3 9 操作軽鎖または生殖系列 V 3 - 2 0 操作軽鎖のいずれかをトランスフェクトし、LUMINEX (商標) アッセイによって抗原 E への結合について再スクリーニングした (実施例 7 および実施例 1 0 に記載の通り) 。抗原 E への結合を BIACORE (商標) によって確認した (実施例 9 に記載の通り) 。結果が表 1 5 に示されている。

10

【 0 3 5 7 】

この実施例に示されている通り、抗原 E に特異的な共通軽鎖抗体 2 8 種が、軽鎖の生殖系列形態と再対合した場合に抗原 E に結合することができた。

【 表 1 5 】

表15

20

元の軽鎖	再対合させた軽鎖	試験数	確認された結合体の数
1-39	1-39	198	23
3-20	3-20	49	5

【 0 3 5 8 】

(実施例 1 2)

共通軽鎖抗体における重鎖遺伝子使用および体細胞超変異の発生頻度

VELCOIMMUNE (登録商標) マウス (例えば、US 6 , 5 9 6 , 5 4 1 および US 7 , 1 0 5 , 3 4 8) において生じた抗体の重鎖配列および軽鎖配列 (> 6 0 0 0) を、抗体鎖の重鎖遺伝子セグメントの使用および体細胞超変異の発生頻度を比較するために操作された軽鎖マウス (上記) を使用する多抗原免疫スキームによって得られる共通軽鎖抗体の重鎖配列および軽鎖配列 (> 6 0 0) と共にまとめた。

30

【 0 3 5 9 】

重鎖遺伝子使用。

ヒト細胞表面受容体 (抗原 E) 、 2 種のヒト細胞表面糖タンパク質のヘテロ二量体 (抗原 F) 、 ヒトサイトカイン受容体 (抗原 G) およびヒト腫瘍分化抗原 (抗原 H) を用いて免疫した、内因性マウス重鎖遺伝子座のヒト V_H、D_H、および J_H 遺伝子セグメントでの置き換えおよび内因性マウス 軽鎖遺伝子座の操作された生殖系列 V 1 - 3 9 J 5 ヒト軽鎖領域または操作された生殖系列 V 3 - 2 0 J 1 ヒト軽鎖領域のいずれかでの置き換えを含有する VELCOIMMUNE (登録商標) マウス (実施例 2 に記載の通り) から得た重鎖配列および軽鎖配列を、重鎖遺伝子セグメントの使用について分析し、V_H および J_H 遺伝子セグメントを記録した。結果が表 1 6 - 1 8 に示されている。表 1 6 - 1 8 中の百分率は丸めた値を表し、足し合わせたときに 1 0 0 % と等しくならない場合があり得る。

40

【 0 3 6 0 】

表 1 6 には、VELCOIMMUNE (登録商標) マウス由来の抗体 (V I) 、コグネイト V 1 - 3 9 軽鎖を有する VELCOIMMUNE (登録商標) マウス由来の抗体 (V I - V 1 - 3 9) 、 V 1 - 3 9 操作軽鎖マウス由来の抗体 (V 1 - 3 9) 、コグネイト V 3 - 2 0 軽鎖を有する VELCOIMMUNE (登録商標) マウス由来の抗体 (

50

V I - V 3 - 2 0)、およびV 3 - 2 0操作軽鎖マウス由来の抗体(V 3 - 2 0)についてのパーセント重鎖ファミリー使用が示されている。表17には、V E L C O I M M U N E (登録商標)マウス由来の抗体(V I)、コグネイトV 1 - 3 9軽鎖を有するV E L C O I M M U N E (登録商標)マウス由来の抗体(V I - V 1 - 3 9)、V 1 - 3 9操作軽鎖マウス由来の抗体(V 1 - 3 9)、コグネイトV 3 - 2 0軽鎖を有するV E L C O I M M U N E (登録商標)マウス由来の抗体(V I - V 3 - 2 0)、およびV 3 - 2 0操作軽鎖マウス由来の抗体(V 3 - 2 0)についてのパーセントV_HおよびJ_H遺伝子使用が示されている。表18には、各免疫群(抗原E、F、GおよびH)からのV 1 - 3 9操作軽鎖マウス(V 1 - 3 9マウス)由来の抗体についてのパーセントV_H遺伝子使用、ならびに選択された免疫群(抗原EおよびG)からのV 3 - 2 0操作軽鎖マウス(V 3 - 2 0マウス)由来の抗体についてのパーセントV_H遺伝子使用が示されている。

10

【0361】

この実施例に示されているように、V 1 - 3 9 J 5 - 操作軽鎖マウスにおいて試験した抗原についての重鎖遺伝子使用はV_HファミリーI I Iサブグループ(V_H3 - 7、V_H3 - 9、V_H3 - 11、V_H3 - 13、V_H3 - 20、V_H3 - 23、V_H3 - 30、V_H3 - 33およびV_H3 - 48)が優勢であることによって特徴付けられた。注目すべき他のV_Hファミリーサブグループの使用はV_H1 - 18、V_H1 - 69、V_H2 - 5、V_H4 - 59およびV_H6 - 1の使用によって特徴付けられた。V 3 - 2 0 J 1操作軽鎖マウスにおいて試験した抗原については、重鎖遺伝子使用はV_HファミリーI I I、V_HファミリーI VおよびV_HファミリーVサブグループ(V_H3 - 11、V_H3 - 30、V_H3 - 33、V_H4 - 39、V_H4 - 59およびV_H5 - 51)が優勢であることによって特徴付けられた。注目すべき他のV_Hファミリーサブグループの使用はV_H1 - 18、V_H1 - 69、V_H2 - 70およびV_H6 - 1の使用によって特徴付けられた。

20

【0362】

体細胞超変異の発生頻度。

V E L C O I M M U N E (登録商標)マウスおよびに操作された軽鎖マウス(上記)において生じた抗体由来の重鎖および軽鎖を、各重鎖および/または軽鎖について実証された重鎖および軽鎖の遺伝子使用に応じて生殖系列配列に対してアライメントした。各配列の重鎖と軽鎖の両方についての各フレームワーク領域(FW)および相補性決定領域(CDR)のアミノ酸の変化を算出した。結果が表19 - 22に示されている。表21 - 24中の百分率は丸めた値を表し、足し合わせたときに100%と等しくない場合があり得る。

30

【0363】

表19には、V E L C O I M M U N E (登録商標)マウス由来の抗体の重鎖、V 1 - 3 9操作軽鎖マウス(V 1 - 3 9マウス)由来の抗体の重鎖およびV 3 - 2 0操作軽鎖マウス(V 3 - 2 0マウス)由来の抗体の重鎖の各FW領域およびCDR領域において観察されたアミノ酸(AA)変化の数が示されている。表20には、V E L C O I M M U N E (登録商標)マウス由来の抗体の軽鎖、V 1 - 3 9操作マウス(V 1 - 3 9マウス)由来の抗体の軽鎖およびV 3 - 2 0操作マウス(V 3 - 2 0マウス)由来の抗体の軽鎖の各FW領域およびCDR領域において観察されたアミノ酸(AA)変化の数が示されている。表21には、選択された免疫群(抗原E、FおよびH)についてのV 1 - 3 9操作軽鎖マウス(V 1 - 3 9マウス)由来の抗体の重鎖の各FW領域およびCDR領域において観察されたアミノ酸(AA)変化の数が示されている。表22には、選択された免疫群(抗原EおよびG)についてのV 3 - 2 0操作軽鎖マウス(V 3 - 2 0マウス)由来の抗体の重鎖の各FW領域およびCDR領域において観察されたアミノ酸(AA)変化の数が示されている。

40

50

【表 1 6】

表16

V _H ファミリー	VI	VI - V _K 1-39	V _K 1-39	VI - V _K 3-20	V _K 3-20
1	9.0	14.8	3.3	7.1	4.9
2	2.2	1.8	4.6	0	1.6
3	77.8	69.8	77.3	61.4	29.5
4	8.4	8.3	11.2	27.1	39.3
5	0.9	0	0.7	4.3	23.0
6	1.7	5.3	3.0	0	1.6

10

20

30

40

50

【表 17】

表17

V _H 遺伝子	VI	VI - V _K 1-39	V _K 1-39	VI - V _K 3-20	V _K 3-20
1-2	3.9	8.3	0	2.9	0
1-3	0	0	0	0	0
1-8	1.3	0.6	0	1.4	0
1-18	3.0	0.6	1.3	2.1	1.6
1-24	0.4	3.6	0	0.7	0
1-46	0.1	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0
1-69	0.3	1.8	2.0	0	3.3
2-5	1.9	0	4.6	0	0
2-26	0.2	1.8	0.0	0	0
2-70	0.1	0	0	0	1.6
3-7	3.0	14.8	0	1.4	0
3-9	8.5	3.6	29.6	16.4	0
3-11	5.4	10.7	0	7.1	1.6
3-13	3.2	1.8	0.7	2.1	0
3-15	4.0	4.7	0.3	0.7	0
3-20	1.0	0.6	0.3	5.0	0
3-21	0.8	0.6	0	2.1	0
3-23	20.4	8.9	3.3	8.6	0
3-30	17.6	4.1	35.2	12.9	1.6
3-33	12.6	14.8	0	5.0	26.2
3-43	0.2	0.6	0	0	0
3-48	0.8	1.2	7.2	0	0
3-53	0.3	3.6	0.3	0	0
3-64	0	0	0.3	0	0
3-72	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0
4-31	2.7	0	0.7	8.6	0
4-34	1.8	0.6	0.3	14.3	0
4-39	1.6	0.6	3.0	2.1	14.8
4-59	2.3	7.1	7.2	2.1	24.6
5-51	0.9	0	0.7	4.3	23.0
6-1	1.7	5.3	3.0	0	1.6

J _H 遺伝子	VI	VI - V _K 1-39	V _K 1-39	VI - V _K 3-20	V _K 3-20
1	1.5	1.2	7.1	0	0
2	4.5	2.4	0.7	5.0	26.9
3	10.5	16.6	13.1	13.6	26.9
4	44.0	34.3	32.3	50.7	9.6
5	9.6	10.1	16.8	7.9	1.9
6	29.7	35.5	30.0	22.9	34.6

10

20

30

40

50

【表 18】

表18

V _H 遺伝子	Vk1-39マウス				Vk3-20マウス	
	抗原E	抗原F	抗原G	抗原H	抗原E	抗原G
1-2	0	0	0	0	0	0
1-3	0	0	0	0	0	0
1-8	0	0	0	0	0	0
1-18	0	0	0	8.3	0	3.1
1-24	0	0	0	0	0	0
1-46	0	0	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0	0
1-69	2.9	0	25.0	0	0	6.3
2-5	8.2	0	0	0	0	0
2-26	0	0	0	0	0	0
2-70	0	0	0	0	0	3.1
3-7	0	0	0	0	0	0
3-9	1.2	98.8	0	14.6	0	0
3-11	0	0	0	0	0	3.1
3-13	0.6	0	25.0	0	0	0
3-15	0	1.2	0	0	0	0
3-20	0	0	25.0	0	0	0
3-21	0	0	0	0	0	0
3-23	4.1	0	25.0	4.2	0	0
3-30	62.9	0	0	0	3.4	0
3-33	0	0	0	0	13.8	37.5
3-43	0	0	0	0	0	0
3-48	0.6	0	0	43.8	0	0
3-53	1.6	0	0	0	0	0
3-64	1.6	0	0	0	0	0
3-72	0	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0	0
4-31	0	0	0	4.2	0	0
4-34	0	0	0	2.1	0	0
4-39	5.3	0	0	0	31.0	0
4-59	11.8	0	0	4.2	3.4	43.8
5-51	1.2	0	0	0	48.3	0
6-1	0	0	0	18.8	0	3.1

10

20

30

40

50

【表 19】

表19

アミノ酸変化の数	VELCOIMMUNE(登録商標)マウス由来の抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	63	32	36	26	12	82
1	23	32	41	31	22	17
2	9	25	17	23	27	1
3	4	10	5	16	13	0
4	0	1	1	3	12	0
>5	1	0	0	1	14	0

10

アミノ酸変化の数	Vk1-39マウス由来の抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	8	34	30	9	37
1	25	26	35	34	19	54
2	9	44	23	20	33	9
3	1	19	8	12	22	0
4	0	3	0	5	11	0
>5	1	0	0	0	7	0

20

アミノ酸変化の数	Vk3-20マウス由来の抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	57	8	54	16	8	93
1	41	43	34	39	21	7
2	2	25	10	18	20	0
3	0	15	2	21	13	0
4	0	10	0	3	20	0
>5	0	0	0	2	18	0

30

40

50

【表 2 0】

表20

アミノ酸変化の数	VELCOIMMUNE(登録商標)マウス由来の抗体の軽鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	24	49	60	33	23
1	24	20	34	31	27	38
2	9	27	16	9	18	28
3	1	20	1	0	14	7
4	0	7	0	0	4	3
>5	1	1	0	0	3	0

10

アミノ酸変化の数	Vk1-39マウス由来の抗体の軽鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	91	75	80	90	71	63
1	9	19	17	10	21	27
2	0	5	1	1	5	8
3	0	0	1	0	2	1
4	0	0	0	0	2	1
>5	0	0	0	0	0	0

20

アミノ酸変化の数	Vk3-20マウス由来の抗体の軽鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	90	47	93	97	63	57
1	10	27	3	3	20	43
2	0	27	3	0	17	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
>5	0	0	0	0	0	0

30

40

50

【表 2 1】

表21

アミノ酸変化の数	Vk1-39マウス由来の抗抗原E抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	75	8	49	41	14	36
1	21	25	33	35	25	52
2	4	43	14	18	28	12
3	0	20	4	5	16	0
4	0	5	0	1	12	0
>5	1	0	0	0	5	0

10

アミノ酸変化の数	Vk1-39マウス由来の抗抗原F抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	52	0	6	6	2	15
1	35	24	32	35	15	78
2	11	59	46	22	49	7
3	0	17	16	24	29	0
4	0	0	0	12	4	0
>5	1	0	0	0	1	0

20

アミノ酸変化の数	Vk1-39マウス由来の抗抗原H抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	54	21	29	33	4	77
1	17	35	50	27	6	23
2	23	21	15	21	25	0
3	6	21	4	15	27	0
4	0	2	2	2	15	0
>5	0	0	0	2	23	0

30

【表 2 2】

表22

アミノ酸変化の数	Vk3-20マウス由来の抗抗原E抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	79	17	62	24	17	90
1	21	28	34	55	31	10
2	0	28	3	21	24	0
3	0	14	0	0	10	0
4	0	14	0	0	3	0
>5	0	0	0	0	14	0

40

アミノ酸変化の数	Vk3-20マウス由来の抗抗原G抗体の重鎖					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	38	0	47	9	0	97
1	59	56	34	25	13	3
2	3	22	16	16	16	0
3	0	16	3	41	16	0
4	0	6	0	6	34	0
>5	0	0	0	3	22	0

50

【0364】

(実施例13)

ユニバーサル軽鎖を有する二重特異性抗体の結合親和性

選択された単一特異性抗抗原E共通軽鎖抗体(実施例5に記載)のクローニングされたヒト重鎖可変領域から当技術分野で公知の標準の組換えDNA技法を使用して完全ヒト二重特異性抗体を構築した。表23には、選択された親単一特異性抗体由来のヒト重鎖(HC-1およびHC-2)の対合が示されており、各対を、各二重特異性抗体を構築するために生殖系列再構成されたヒトV_H1-39/J_H1軽鎖と共に使用した。

【0365】

二重特異性抗抗原E抗体または親単一特異性抗抗原E抗体の、抗原Eの細胞外ドメイン(ECD)への結合を、BIACORE(商標)2000機器(GE Healthcare)でのリアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサーアッセイを使用して決定した。EDC-NHS化学を使用して抗c-myc特異的モノクローナル抗体(クローン#9E10)で誘導体化されたCM5 BIACORE(商標)センサー表面を使用してC末端myc-myc-ヘキサヒスチジンタグを付けた抗原EのECD(抗原E-mmh)を捕捉した。およそ190RUの抗原E-mmhがBIACORE(商標)センサー表面上に捕捉され、その後、300nM濃度および50nM濃度の異なる二重特異性抗抗原E抗体または親単一特異性抗抗原E抗体を毎分50μlの流速で注入した。この実験は25、HBSTランニング緩衝液(0.01MのHEPES、pH7.4、0.15MのNaCl、3mMのEDTA、0.05%v/vの界面活性剤P20)中で実施した。300nM濃度で抗原E-mmh表面に結合した抗体の量を、抗体注入の終了前に3秒間記録し、プロットした。

10

20

【0366】

表24および図8には各二重特異性抗体(BsAb)および単一特異性親抗体(PAb-1、PAb-2)について観察された結合応答(BIACORE(商標)単位;RU)が記載されている。各抗体を飽和条件下で同一の抗原E-mmh表面にわたって注入したので、結合応答は抗原捕捉表面に結合した各抗体についての結合化学量論を反映する。

【0367】

この実施例において示されている通り、各二重特異性抗体について観察された結合応答は、各親単一特異性抗体についての結合応答のおよそ2倍であり(表24および図8)、これにより、二重特異性抗体であって、抗原特異的モノクローナル抗体の重鎖および共通軽鎖を使用した、該二重特異性抗体分子の各Fabアームが細胞表面受容体(抗原E;図7B、左下を参照されたい)の細胞外ドメイン上の別個のエピトープに同時に結合する、二重特異性抗体の機能的構築が実証された。

30

【表23】

表23

二重特異性抗体	親HC-1	親HC-2
3108	2952	2978
3109	2978	3022
3111	2952	3005
3112	3022	3005

40

【表 2 4】

表24

二重特異性抗体	結合応答(RU)		
	PAb-1	PAb-2	BsAb
3108	236	229	485
3109	236	197	408
3111	202	229	435
3112	202	197	345

10

【0368】

(実施例14)

2つのヒト軽鎖を発現するマウスの生成および分析

実施例2に記載されている方法を使用して、2つのヒトV_H 遺伝子セグメント(例えば、ヒトV_H 1-39 遺伝子セグメントおよびヒトV_H 3-20 遺伝子セグメント)を含有する2つのさらなる操作された軽鎖遺伝子座を構築した(図9)。1つの操作された軽鎖遺伝子座は、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ_H 遺伝子セグメントを、再構成されていない立体配置(DLC-5J)で含有した。第2の操作された軽鎖遺伝子座は、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントおよび1つのヒトJ_H 遺伝子セグメントを、再構成されていない立体配置(DLC-1J)で含有した。2つのさらなる操作された軽鎖遺伝子座のそれぞれについて、ヒト遺伝子セグメントは3'に組換えシグナル配列が隣接し、B細胞においてヒト遺伝子セグメントの*in vivo*再構成が可能になった。

20

【0369】

マウス配列(すなわち、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の上流および下流の配列)に作動可能に連結した操作された軽鎖遺伝子座のそれぞれを別々に含有する改変されたBAC DNAクローンを、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントを含有する各操作された軽鎖遺伝子座内の配列に位置するプライマーを使用したPCRによって確認し、その後、ES細胞に電気穿孔により導入して、2つのヒトV_H 遺伝子セグメント(上記)のいずれかを発現するマウスを作製した。上記の操作された軽鎖遺伝子座のいずれかを含有する陽性ES細胞クローンを、操作された軽鎖遺伝子座(上記のとおり)に特異的なプローブを使用したTAQMAN(商標)スクリーニングおよび核型分析によって確認した。次いで、確認されたES細胞クローンを使用して雌マウスに移植して、本明細書では二重軽鎖(DLC)マウスと称される、マウスC_Hドメインと融合したヒト軽鎖可変ドメインを発現する同腹仔を生じさせた。

30

【0370】

あるいは、ターゲティング構築物により導入されたFRTEドネオマイシンカセットを除去するために、操作された軽鎖遺伝子座を有するES細胞にFLPを発現する構築物をトランスフェクトすることができる。必要に応じて、FLPリコンビナーゼを発現するマウスと掛け合わせることによってネオマイシンカセットを除去する(例えば、US6, 774, 279)。必要に応じて、ネオマイシンカセットはマウス内に保持される。

40

【0371】

フローサイトメトリー

DLCマウスにおけるB細胞集団およびB細胞発生を脾細胞調製物および骨髄調製物のフローサイトメトリー分析によって検証した。2つのヒトV_H 遺伝子セグメントおよび5つのヒトJ_H 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(n=4)、2つのヒトV_H 遺伝子セグメントおよび1つのヒトJ_H 遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(n=4)、および野生型マウス(n=4)からの細胞懸濁物を、標準の方法(上記)を使用して作製し、蛍光標識された抗体で染色した(実施例3に記載の通り)。

50

【0372】

簡単に述べると、細胞 1×10^6 個を、抗マウス CD16 / CD32 (クローン 2.4G2、BD Pharmingen) と共に氷上で 10 分インキュベートし、その後、以下の抗体カクテルを用いて氷上で 30 分にわたって標識した：APC-H7 とコンジュゲートした抗マウス CD19 (クローン 1D3、BD Pharmingen)、Pacific Blue とコンジュゲートした抗マウス CD3 (クローン 17A2、BioLegend)、FITC とコンジュゲートした抗マウス Ig (クローン 187.1、BD Pharmingen) または抗マウス CD43 (クローン 1B11、BioLegend)、PE とコンジュゲートした抗マウス Ig (クローン RML-42、BioLegend) または抗マウス c-kit (クローン 2B8、BioLegend)、PerCP-Cy5.5 とコンジュゲートした抗マウス IgD (BioLegend)、PE-Cy7 とコンジュゲートした抗マウス IgM (クローン II/41、eBioscience)、APC とコンジュゲートした抗マウス B220 (クローン RA3-6B2、eBioscience)。染色後、細胞を洗浄し、2%ホルムアルデヒド中に固定した。LSRIIFローサイトメーターでデータの取得を実施し、FlowJo (Tree Star, Inc.) を用いて分析した。ゲーティング：総 B 細胞 (CD19 + CD3⁻)、Ig⁺ B 細胞 (Ig⁺ Ig⁻ CD19 + CD3⁻)、Ig⁺ B 細胞 (Ig⁻ Ig⁺ CD19 + CD3⁻)。骨髓区画についての結果が図 10A - 図 12B に示されている。脾臓区画についての結果が図 13A - 図 16 に示されている。

10

【0373】

この実施例において示されている通り、DLC-5J マウスでは脾臓区画および骨髓区画内で正常な B 細胞集団が実証される (図 10A - 16)。DLC-5J マウスでは、骨髓区画内に野生型同腹仔において観察されたものと実質的に同じである未成熟 B 細胞集団、成熟 B 細胞集団およびプレ/プロ B 細胞集団が実証された。実際、DLC-5J 遺伝子座は、内因性 軽鎖遺伝子座と競合して、野生型マウスにおいて観察されたものと実質的に同じである：比をもたすことができた (図 14B)。また、DLC-5J マウスでは、B 細胞が脾臓区画内の種々の段階 (例えば、未成熟、成熟、T1、T2、T3、辺縁帯前駆体、辺縁帯、濾胞-I、濾胞-II など) による進行が、野生型マウスにおいて観察されたものと実質的に同じ様式で起こるので、正常な末梢 B 細胞発生が実証される (図 15A - 16)。対照的に、DLC-1J マウスでは、操作された 軽鎖と比較して B 細胞の総数の減少および 軽鎖の使用の増加が実証された (データは示していない)。

20

30

【0374】

二重軽鎖発現

ホモ接合性のマウスにおいて両方のヒト V 遺伝子セグメントの発現を実施例 3 に従って定量的 PCR アッセイを使用して解析した。簡単に述べると、CD19 + B 細胞を野生型マウス、マウス重鎖および 軽鎖可変遺伝子座の、対応するヒト重鎖および 軽鎖可変領域遺伝子座 (H) での置き換えについてホモ接合性のマウス、ならびに 2 つのヒト V 遺伝子セグメントおよび 5 つのヒト J 遺伝子セグメント (DLC-5J) または 1 つのヒト J 遺伝子セグメント (DLC-1J) のいずれかを含有する、操作された 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスの骨髓および脾臓全体から精製した。相対的な発現をマウス C 領域の発現に対して正規化した (マウス群当たり $n = 3 \sim 5$)。結果が図 17 および図 18 に示されている。

40

【0375】

再構成されたヒト V 3-20 遺伝子セグメントまたはヒト V 1-39 遺伝子セグメントを含有する軽鎖の発現は DLC-5J マウスおよび DLC-1J マウスの骨髓および脾臓のどちらでも検出された (図 17 および図 18)。骨髓区画では、DLC マウスの両方の系統におけるヒト V 3-20 由来軽鎖およびヒト V 1-39 由来軽鎖の両方の発現が、マウス V および J 遺伝子セグメントの、対応するヒト V および J 遺伝子セグメント (H ; 図 17) での置き換えを含むマウスと比較して有意に高かった。ヒト V 3-20 由来軽鎖の発現は、H マウスにおける発現の約 6 倍 (DLC-5J) ~ 1.5 倍

50

(DLC-1J)高いことが観察された。DLC-1Jマウスでは、骨髄区画においてDLC-5Jマウスよりも約2倍高いヒトV₃₋₂₀由来軽鎖の発現が実証された。ヒトV₁₋₃₉由来軽鎖の発現はH₁マウスにおける発現の約6倍(DLC-5J)~13倍(DLC-1J)高いことが観察された。DLC-1Jマウスでは、骨髄区画においてDLC-5Jマウスよりも約2倍高いヒトV₁₋₃₉由来軽鎖の発現が実証された。

【0376】

脾臓区画では、DLCマウスの両方の系統におけるヒトV₃₋₂₀由来軽鎖およびヒトV₁₋₃₉由来軽鎖の両方の発現がH₁マウスと比較して有意に高かった(図18)。ヒトV₃₋₂₀由来軽鎖の発現は、H₁マウスにおける発現の約4倍(DLC-5J)および8倍(DLC-1J)高いことが観察された。DLC-1Jマウスでは、脾臓区画においてDLC-5Jマウスよりも約2倍高いヒトV₃₋₂₀由来軽鎖の発現が実証された。ヒトV₁₋₃₉由来軽鎖の発現はH₁マウスにおける発現の約4倍(DLC-5J)~5倍(DLC-1J)高いことが観察された。DLC-1Jマウスでは、脾臓区画においてDLC-5Jマウスと比較して同様のヒトV₁₋₃₉由来軽鎖の発現が実証された。

【0377】

DLC-5JマウスにおけるヒトV_L/J_L使用。

2つの再構成されていないヒトV_L遺伝子セグメントおよび5つの再構成されていないヒトJ_L遺伝子セグメントについてホモ接合性のマウス(DLC-5J)を、脾性B細胞におけるヒトV_L/J_L遺伝子セグメントの使用について逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって分析した。

【0378】

簡単に述べると、ホモ接合性DLC-5Jマウス(n=3)および野生型マウス(n=2)から脾臓を採取し、すりガラススライドを使用して10%熱失活ウシ胎児血清を含有するRPMI1640(Sigma)10mL中にメッシュで濾して単一細胞懸濁物を作製した。遠心分離機(1200rpmで5分)を用いて脾細胞をペレット化し、赤血球をACK溶解緩衝液(GIBCO)5mLに3分にわたって溶解させた。脾細胞をPBS(Irvine Scientific)で希釈し、0.7μmの細胞濾過器を用いて濾過し、再度遠心分離して細胞をペレット化し、その後それを1mLのPBS中に再懸濁させた。

【0379】

AllPrep DNA/RNA mini kit(Qiagen)を製造業者の仕様書に従って使用してペレット化した脾細胞からRNAを単離した。脾細胞RNAに対して、マウスC_H1遺伝子に特異的なプライマーを用いて5'RACE(cDNA末端の急速増幅)システムを製造業者の仕様書(Invitrogen)に従って使用してRT-PCRを実施した。マウスC_H1遺伝子に特異的なプライマーは、3'mIg C_H1 RACE1(AAGAAGCACACGACTGAGGCAC;配列番号34)およびmIg C_H3'-1(CTCACTGGATGGTGGGAAGATGGA;配列番号35)であった。PCR産物をゲル精製し、pCR(登録商標)2.1-TOPO(登録商標)vector(TOPO(登録商標)TA Cloning(登録商標)Kit、Invitrogen)にクローニングし、ベクター内のクローニング部位に隣接する位置に配置されるM13フォワードプライマー(GTAAACGACGGCCAG;配列番号36)およびM13リバースプライマー(CAGGAACAGCTATGAC;配列番号37)を用いて配列決定した。各脾臓試料由来の10クローンについて配列決定した。配列をIMGT/V-QUEST参照ディレクトリーセットからのマウスおよびヒト免疫グロブリンセットと比較してV_L/J_L使用を決定した。表25には、各脾臓試料由来のRT-PCRクローンにおいて観察された選択されたクローンについてのV_L/J_L組合せが示されている。表26には、DLC-5Jホモ接合性マウス由来の選択されたRT-PCRクローンのヒトV_L/ヒトJ_L接合部およびヒトJ_L/マウスC_H1接合部のアミノ酸配列が示されている。小文字は可変領域のアミノ酸配列の変異または組換えの間にNおよび/もしくはP付加によって生じる非鋳型付加を示す。

10

20

30

40

50

【0380】

この実施例において示されている通り、マウスC 遺伝子に作動可能に連結した2つの再構成されていないヒトV 遺伝子セグメントおよび5つの再構成されていないヒトJ 遺伝子セグメント(DLC-5J)についてホモ接合性のマウスは、両方のヒトV 遺伝子セグメントを複数のヒトJ 遺伝子セグメントと生産的に組換えて、限定された免疫グロブリン軽鎖レパートリーを産生することができる。表25に示されているDLC-5Jホモ接合性のマウスにおける再構成の中で、V 1-39/J 2(1)、V 1-39/J 3(1)、V 3-20/J 1(7)、V 3-20/J 2(4)およびV 3-20/J 3(1)について独特のヒトV /J 再構成が観察された。さらに、そのような独特の再構成では、発生の中のヒトV およびJ 遺伝子セグメントの変異および/または組換えのいずれかによって生じる軽鎖のCDR3領域内の独特のアミノ酸の存在(表26)による接合部の多様性が実証された。全ての再構成でマウスC への機能的なリードスルーが示された(表26)。

10

【0381】

総合すると、これらのデータにより、どちらも再構成することが可能な(例えば、1つまたは複数、一部の実施形態では5つまでのヒトJ L 遺伝子セグメントと)2つ以下のヒトV L 遺伝子セグメントの選択を提示するように操作されており、免疫グロブリン軽鎖のヒトV L ドメインをコードするマウスが、全ての態様においてほぼ野生型であるB細胞数および発生を有することが実証される。そのようなマウスは、コレクション内に存在する2つの可能性のあるヒトV L 遺伝子セグメントのうちの1つを有する免疫グロブリン軽鎖を有する抗体のコレクションを産生する。この抗体のコレクションは抗原による攻撃に应答してマウスによって産生され、リバースキメラ(ヒト可変/マウス定常)重鎖の多様性と関連する。

20

30

40

50

【表 2 5】

表25

マウスID番号	遺伝子型	クローン	Vk/Jk組合せ
1089451	DLC-5J	1-2	1-39/3
		1-4	3-20/2
		1-7	3-20/1
		1-8	3-20/2
1089452	DLC-5J	2-2	3-20/1
		2-3	3-20/1
		2-6	3-20/2
		2-8	3-20/2
		2-9	3-20/1
		2-10	1-39/2
1092594	DLC-5J	3-1	3-20/1
		3-2	3-20/1
		3-4	3-20/1
		3-6	3-20/3
		3-9	3-20/2
1092587	WT	1-1	19-93/1
		1-2	6-25/1
		1-3	4-91/5
		1-5	3-10/4
		1-6	4-86/4
		1-8	19-93/1
		1-10	19-93/2
1092591	WT	2-1	19-93/1
		2-3	6-20/5
		2-4	6-25/5
		2-5	1-117/1
		2-6	8-30/1
		2-7	8-19/2
		2-8	8-30/1
		2-10	1-117/1

10

20

30

【表 2 6】

表26

クローン	Vk/Jk	hVk/hJk/mCk接合部の配列 (CDR3に下線が引かれており、mlgkCがイタリック体で示されている)	配列番号
2-10	1-39/2	QPEDFATYYC <u>QQSYSTPYTF</u> GQGTKLEIKRADAAPT <i>VS</i> /	38
1-2	1-39/3	QPEDFATYYC <u>QQSYSTPFTF</u> GPGTKVDIKRADAAPT <i>VS</i> /	39
1-7	3-20/1	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSPrTF</u> GQGTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> /	40
2-2	3-20/1	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSrTF</u> GQGTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> /	41
2-3	3-20/1	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSPWTf</u> GQGTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> /	42
2-9	3-20/1	dPEDFAVYYC <u>QQYGSSPrTF</u> GQGTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> /	44
3-1	3-20/1	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSPrTF</u> GQGTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> /	45
3-2	3-20/1	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSPWTf</u> GQGTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> /	46
3-4	3-20/1	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSPPTf</u> GQGTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> /	47
3-9	3-20/2	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSPYTF</u> GQGTKLEIKRADAAPT <i>VS</i> /	48
3-6	3-20/3	EPEDFAVYYC <u>QQYGSSiTF</u> GPGTKVDIKRADAAPT <i>VS</i> /	49

40

50

(項目1)

マウスであって、

マウスまたはラット軽鎖定常領域に作動可能に連結した2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超のヒトJ_L遺伝子セグメント；ならびに

非ヒト定常領域に作動可能に連結した1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、および1つまたは複数のヒトJ_H遺伝子セグメント

を含み、

該ヒト遺伝子セグメントが、再構成することが可能であって、抗体のヒト可変ドメインをコードしており、

さらに、該マウスが、免疫グロブリン軽鎖が形成されるように再構成することが可能な内因性V_L遺伝子セグメントを含まない、マウス。

10

(項目2)

前記軽鎖定常領域がラットC領域である、項目1に記載のマウス。

(項目3)

前記軽鎖定常領域がマウスC領域である、項目1に記載のマウス。

(項目4)

2つのヒトV_L遺伝子セグメントが前記マウスまたはラット軽鎖定常領域に作動可能に連結している、項目1から3のいずれか一項に記載のマウス。

(項目5)

2つから5つまでのヒトJ_L遺伝子セグメントが前記マウスまたはラット軽鎖定常領域に作動可能に連結している、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

20

(項目6)

5つのヒトJ_L遺伝子セグメントを含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目7)

前記5つのヒトJ_L遺伝子セグメントが、ヒトJ₁、J₂、J₃、J₄およびJ₅である、項目6に記載のマウス。

(項目8)

前記2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントが、ヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメント、ヒトV₃₋₂₀遺伝子セグメント、またはこれらの組合せから選択される、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

30

(項目9)

前記2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントが、ヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメントおよびヒトV₃₋₂₀遺伝子セグメントである、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目10)

前記2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超のヒトJ_L遺伝子セグメントが、内因性軽鎖遺伝子座に存在する、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目11)

前記1つまたは複数のヒトV_H遺伝子セグメント、1つまたは複数のヒトD_H遺伝子セグメント、および1つまたは複数のヒトJ_H遺伝子セグメントが、マウス定常領域に作動可能に連結している、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

40

(項目12)

機能的な軽鎖遺伝子座を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目13)

非機能的な軽鎖遺伝子座を含む、項目1から11のいずれか一項に記載のマウス。

(項目14)

マウスまたはラット軽鎖定常領域に作動可能に連結した前記2つ以下のヒトV_L遺伝子セグメントおよび2つまたはそれ超のヒトJ_L遺伝子セグメントが、ヒトV₁₋₃₉遺伝子セグメントおよびヒトV₃₋₂₀遺伝子セグメントである2つのヒトV_Lセグメント、ならびにヒトJ₁、J₂、J₃、J₄およびJ₅を順番に含む遺伝子座に存在

50

する、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目15)

図9のDLCLJ-5J遺伝子座を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目16)

骨髄中に、CD19⁺、CD43⁺、c-kit⁺発現によって特徴付けられる細胞約 2.5×10^4 個～約 1.5×10^5 個の範囲内のプロB細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目17)

骨髄中に、CD19⁺、CD43⁻、c-kit⁻発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個～約 2×10^6 個の範囲内のプレB細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

10

(項目18)

骨髄中に、IgM⁺、B220^{int}発現によって特徴付けられる細胞約 5×10^5 個～約 7×10^5 個の範囲内の未成熟B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目19)

骨髄中に、IgM⁺、B220^{hi}発現によって特徴付けられる細胞約 3×10^4 個～約 1.5×10^5 個の範囲内の成熟B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目20)

骨髄中に、細胞約 1×10^6 個～約 3×10^6 個の範囲内の総CD19⁺B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

20

(項目21)

細胞約 2×10^6 個～約 7×10^6 個の範囲内のCD19⁺脾性B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目22)

細胞約 1×10^6 個～約 4×10^6 個の範囲内のCD19⁺、IgD^{hi}、IgM^{lo}脾性B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目23)

細胞約 9×10^5 個～約 2×10^6 個の範囲内のCD19⁺、IgD^{lo}、IgM^{hi}脾性B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

30

(項目24)

CD93⁺B220⁺IgM^{hi}CD23⁻発現によって特徴付けられる細胞約 2×10^6 個～約 7×10^6 個の範囲内の移行T1脾性B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目25)

CD93⁺B220⁺IgM^{hi}CD23⁺発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個～約 7×10^6 個の範囲内の移行T2脾性B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目26)

CD93⁺B220⁺IgM^{lo}CD23⁺発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個～約 4×10^6 個の範囲内の移行T3脾性B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

40

(項目27)

CD93⁻B220⁺IgM^{hi}CD21/35^{hi}CD23⁻発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個～約 3×10^6 個の範囲内の辺縁帯脾性B細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目28)

CD93⁻B220⁺CD21/35^{int}IgM^{lo}IgD^{hi}発現によって特徴付けられる細胞約 3×10^6 個～約 1.5×10^7 個の範囲内の濾胞1型(FO-I)脾性B

50

細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 29)

CD93 - B220 + CD21 / 35 i n t I g M i n t I g D h i 発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個 ~ 約 2×10^6 個の範囲内の濾胞 2 型 (F O - I I) 脾性 B 細胞集団を含む、前記項目のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 30)

前記項目のいずれか一項に記載のマウスの単離された細胞。

(項目 31)

胚性幹 (E S) 細胞である、項目 30 に記載の細胞。

(項目 32)

項目 31 に記載の E S 細胞を含むマウス胚。

(項目 33)

B 細胞である、項目 30 に記載の細胞。

(項目 34)

項目 33 に記載の B 細胞を用いて作製されたハイブリドーマ。

(項目 35)

抗体を生成するため、またはヒト重鎖可変領域をコードする核酸配列を同定するための、項目 1 から 29 のいずれか一項に記載のマウスの使用。

(項目 36)

目的の抗原に結合する抗体を作製するための方法であって、項目 1 から 29 のいずれか一項に記載のマウスを、目的の抗原を用いて免疫するステップ、該マウスから免疫グロブリン可変領域遺伝子配列を得るステップ、および該免疫グロブリン可変領域遺伝子配列を使用して、該抗原に結合する抗体を産生させるステップ

を含む方法。

(項目 37)

単一細胞において、

(a) 免疫された項目 1 から 29 のいずれか一項に記載のマウスの第 1 の V_H 遺伝子配列であって、ヒト C_H 遺伝子配列と融合した第 1 の V_H 遺伝子配列；および

(b) ヒト C_L 遺伝子配列と融合した V_L 遺伝子配列

を発現させるステップ、

該細胞を、完全ヒト抗体を発現するのに十分な条件下で維持するステップ；ならびに該抗体を該細胞から単離するステップ

をさらに含む、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記細胞が免疫された項目 1 から 29 のいずれか一項に記載のマウスの第 2 の V_H 遺伝子配列を含み、該 V_H 遺伝子配列がヒト C_H 遺伝子配列と融合しており、前記第 1 の V_H 遺伝子配列が第 1 のエピトープを認識する V_H ドメインをコードし、該第 2 の V_H 遺伝子配列が第 2 のエピトープを認識する V_H ドメインをコードし、該第 1 のエピトープおよび該第 2 のエピトープが同一ではなく、該第 1 の V_H ドメインおよび該第 2 の V_H ドメインが前記 V_L 遺伝子配列によりコードされる V_L ドメインと相互作用する、項目 37 に記載の方法。

(項目 39)

ヒト二重特異性抗体の作製における、項目 1 から 29 のいずれか一項に記載のマウスの使用。

(項目 40)

ヒト二重特異性抗体を作製するための方法であって、項目 1 から 29 のいずれか一項に記載のマウスを免疫するステップ、および該マウス由来の B 細胞のヒト可変領域遺伝子配列を使用して該二重特異性抗体を作製するステップを含む方法。

(項目 41)

10

20

30

40

50

(a) 項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載のマウスのクローン選択されたリンパ球を同定するステップであって、該マウスが免疫され、目的の抗原に対する免疫応答を生じるようにされており、該リンパ球が該目的の抗原に特異的に結合する抗体を発現するステップ；
 (b) 該リンパ球または該抗体から、該目的の抗原に特異的に結合するヒト重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を得るステップ；および
 (c) (c) のヌクレオチド配列を二重特異性抗体の作製に使用するステップ
 を含む、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

1 回目に第 1 のヒト重鎖可変領域配列を生成するために目的の第 1 の抗原に対してステップ (a) から (c) までを実施し、2 回目に第 2 のヒト重鎖可変領域配列を生成するために目的の第 2 の抗原に対してステップ (a) から (c) までを実施し、該第 1 のヒト重鎖可変領域配列が第 1 のヒト重鎖定常領域と融合して発現して第 1 のヒト重鎖を形成し、該第 2 のヒト重鎖可変領域配列が第 2 のヒト重鎖定常領域と融合して発現して第 2 のヒト重鎖を形成し、該第 1 のヒト重鎖および該第 2 のヒト重鎖が V_H 1 - 3 9 遺伝子セグメントまたは V_H 3 - 2 0 遺伝子セグメントから発現した単一のヒト軽鎖の存在下で発現する、項目 4 1 に記載の方法。

10

(項目 4 3)

(a)

- 第 1 の免疫原を用いて免疫された項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載のマウス；および
 - 第 2 の免疫原を用いて免疫された同じマウス、または遺伝学的には同じである異なるマウス

20

由来の B 細胞から可変重鎖領域をクローニングするステップ、

(b) 細胞において、同じ前記重鎖定常領域および同じ前記軽鎖とともに (a) の可変重鎖領域を発現させて二重特異性抗体を作製するステップ
 を含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記第 1 のヒト重鎖が、前記第 1 のヒト重鎖のプロテイン A に対する親和性を消失させるまたは実質的に低下させる改変を含み、前記第 2 のヒト重鎖がプロテイン A に結合する能力を保持し、該第 1 のヒト重鎖のプロテイン A に対する親和性を消失させるまたは実質的に低下させる改変が、9 5 R (E U 4 3 5 R)、9 6 F (E U 4 3 6 F)、およびこれらの組合せから選択される、項目 4 3 に記載の方法。

30

(項目 4 5)

ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン遺伝子セグメントを選択するための、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載のマウスの使用。

(項目 4 6)

免疫されている、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 4 7)

抗体を産生する方法であって、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載のマウスを、抗原を用いて免疫するステップ、および結果として生ずる、該マウスにより該抗原に対して産生された抗体から重鎖可変領域アミノ酸配列またはコードするヌクレオチド配列を得るステップ、および該重鎖可変領域アミノ酸配列または核酸配列を抗体の作製に利用するステップを含む方法。

40

(項目 4 8)

(a) 前記マウスを免疫した前記抗原の異なるエピトープに対する 2 種の異なる抗体から前記重鎖可変領域アミノ酸配列またはコードするヌクレオチド配列を同定するステップ；または

(b) 項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載のマウスと同じマウス、またはさらなるマウスを、異なる抗原を用いて免疫し、次いで、該第 2 の抗原に特異的である、該マウスによって産生された抗体から重鎖可変領域配列アミノ酸配列またはコードするヌクレオチド配列を同定するステップを含み、

50

該 2 種の異なる重鎖可変領域を使用して二重特異性抗体を生成するステップをさらに含む、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記抗体または 2 つの抗体から軽鎖可変領域配列も同定するステップをさらに含む、項目 4 7 または 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

項目 4 9 に記載の方法であって、該方法によって産生された抗体において同定された 1 つまたは複数の軽鎖重鎖可変領域も使用することを含む、方法。

(項目 A 1)

マウスであって、

免疫グロブリン軽鎖定常領域に作動可能に連結した 2 つのヒト免疫グロブリン V_L 遺伝子セグメントおよび 2 つまたはそれ超のヒト免疫グロブリン J_L 遺伝子セグメントであって、ここで、該 2 つのヒト免疫グロブリン V_L 遺伝子セグメントが、ヒト V_L 1 - 3 9 遺伝子セグメントおよびヒト V_L 3 - 2 0 遺伝子セグメントであり、該 2 つまたはそれ超のヒト免疫グロブリン J_L 遺伝子セグメントが、ヒト J_L 1、J_L 2、J_L 3、J_L 4、および J_L 5 からなる群から選択される、2 つのヒト免疫グロブリン V_L 遺伝子セグメントおよび 2 つまたはそれ超のヒト免疫グロブリン J_L 遺伝子セグメント；ならびに

非ヒト免疫グロブリン定常領域に作動可能に連結した 1 つまたは複数のヒト免疫グロブリン V_H 遺伝子セグメント、1 つまたは複数のヒト免疫グロブリン D_H 遺伝子セグメント、および 1 つまたは複数のヒト免疫グロブリン J_H 遺伝子セグメント

を含み、

該ヒト遺伝子セグメントが、再構成することが可能であって、抗体のヒト可変ドメインをコードしており、さらに、該マウスが、免疫グロブリン軽鎖が形成されるように再構成することが可能な内因性免疫グロブリン V_L 遺伝子セグメントを含まない、マウス。

(項目 A 2)

前記 2 つのヒト V_L 遺伝子セグメントおよび 2 つまたはそれ超のヒト J_L 遺伝子セグメントが、マウスまたはラット免疫グロブリン軽鎖定常領域に作動可能に連結される、項目 A 1 に記載のマウス

(項目 A 3)

前記軽鎖定常領域がラット C_L 領域である、項目 A 2 に記載のマウス。

(項目 A 4)

前記軽鎖定常領域がマウス C_L 領域である、項目 A 2 に記載のマウス。

(項目 A 5)

5 つのヒト J_L 遺伝子セグメントを含む、前記項目 A のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 6)

前記 5 つのヒト J_L 遺伝子セグメントが、ヒト J_L 1、J_L 2、J_L 3、J_L 4 および J_L 5 である、項目 A 5 に記載のマウス。

(項目 A 7)

前記 2 つのヒト V_L 遺伝子セグメントおよび 2 つまたはそれ超のヒト J_L 遺伝子セグメントが、内因性軽鎖遺伝子座に存在する、前記項目 A のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 8)

前記 1 つまたは複数のヒト V_H 遺伝子セグメント、1 つまたは複数のヒト D_H 遺伝子セグメント、および 1 つまたは複数のヒト J_H 遺伝子セグメントが、マウス定常領域に作動可能に連結している、前記項目 A のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 9)

機能的な 軽鎖遺伝子座を含む、前記項目 A のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 1 0)

非機能的な 軽鎖遺伝子座を含む、項目 A 1 から A 8 のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 1 1)

マウスまたはラット軽鎖定常領域に作動可能に連結した前記 2 つのヒト V_L 遺伝子セグメント

10

20

30

40

50

ントおよび2つまたはそれ超のヒトJ_L遺伝子セグメントが、ヒトV_H 1 - 39 遺伝子セグメントおよびヒトV_H 3 - 20 遺伝子セグメントである2つのヒトV_H セグメント、ならびにヒトJ_H 1、J_H 2 J_H 3、J_H 4 および J_H 5 を順番に含む遺伝子座に存在する、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 1 2)

図9のDLCLJ - 5 J 遺伝子座を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 1 3)

骨髄中に、CD19⁺、CD43⁺、c - k i t⁺ 発現によって特徴付けられる細胞約 2.5×10^4 個 ~ 約 1.5×10^5 個の範囲内のプロB細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

10

(項目A 1 4)

骨髄中に、CD19⁺、CD43⁻、c - k i t⁻ 発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個 ~ 約 2×10^6 個の範囲内のプレB細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 1 5)

骨髄中に、IgM⁺、B220^{int} 発現によって特徴付けられる細胞約 5×10^5 個 ~ 約 7×10^5 個の範囲内の未成熟B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 1 6)

骨髄中に、IgM⁺、B220^{hi} 発現によって特徴付けられる細胞約 3×10^4 個 ~ 約 1.5×10^5 個の範囲内の成熟B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

20

(項目A 1 7)

骨髄中に、細胞約 1×10^6 個 ~ 約 3×10^6 個の範囲内の総CD19⁺ B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 1 8)

細胞約 2×10^6 個 ~ 約 7×10^6 個の範囲内のCD19⁺ 脾性B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 1 9)

細胞約 1×10^6 個 ~ 約 4×10^6 個の範囲内のCD19⁺、IgD^{hi}、IgM^{lo} 脾性B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

30

(項目A 2 0)

細胞約 9×10^5 個 ~ 約 2×10^6 個の範囲内のCD19⁺、IgD^{lo}、IgM^{hi} 脾性B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 2 1)

CD93⁺ B220⁺ IgM^{hi} CD23⁻ 発現によって特徴付けられる細胞約 2×10^6 個 ~ 約 7×10^6 個の範囲内の移行T1脾性B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 2 2)

CD93⁺ B220⁺ IgM^{hi} CD23⁺ 発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個 ~ 約 7×10^6 個の範囲内の移行T2脾性B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

40

(項目A 2 3)

CD93⁺ B220⁺ IgM^{lo} CD23⁺ 発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個 ~ 約 4×10^6 個の範囲内の移行T3脾性B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

(項目A 2 4)

CD93⁻ B220⁺ IgM^{hi} CD21/35^{hi} CD23⁻ 発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個 ~ 約 3×10^6 個の範囲内の辺縁帯脾性B細胞集団を含む、前記項目Aのいずれか一項に記載のマウス。

50

(項目 A 2 5)

CD93 - B220 + CD21 / 35 int IgM l o Ig D h i 発現によって特徴付けられる細胞約 3×10^6 個 ~ 約 1.5×10^7 個の範囲内の濾胞 1 型 (FO - I) 脾性 B 細胞集団を含む、前記項目 A のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 2 6)

CD93 - B220 + CD21 / 35 int IgM i n t Ig D h i 発現によって特徴付けられる細胞約 1×10^6 個 ~ 約 2×10^6 個の範囲内の濾胞 2 型 (FO - I I) 脾性 B 細胞集団を含む、前記項目 A のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 2 7)

前記項目 A のいずれか一項に記載のマウスの単離された細胞。

10

(項目 A 2 8)

胚性幹 (ES) 細胞である、項目 A 2 7 に記載の細胞。

(項目 A 2 9)

項目 A 2 8 に記載の ES 細胞を含むマウス胚。

(項目 A 3 0)

B 細胞である、項目 A 2 7 に記載の細胞。

(項目 A 3 1)

項目 A 3 0 に記載の B 細胞を用いて作製されたハイブリドーマ。

(項目 A 3 2)

抗体を生成するため、またはヒト免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする核酸配列を同定するための、項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスの使用。

20

(項目 A 3 3)

目的の抗原に結合する抗体を作製するための方法であって、
項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスを、目的の抗原を用いて免疫するステップ、
該マウスから免疫グロブリン可変領域遺伝子配列を得るステップ、および
該免疫グロブリン可変領域遺伝子配列を使用して、該抗原に結合する抗体を産生させるステップ
を含む方法。

(項目 A 3 4)

単一細胞において、
(a) 免疫された項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスの第 1 の V_H 遺伝子配列であって、ヒト C_H 遺伝子配列と融合した第 1 の V_H 遺伝子配列；および
(b) ヒト C_L 遺伝子配列と融合した V_L 遺伝子配列
を発現させるステップ、
該細胞を、完全ヒト抗体を発現するのに十分な条件下で維持するステップ；ならびに
該抗体を該細胞から単離するステップ
をさらに含む、項目 A 3 3 に記載の方法。

30

(項目 A 3 5)

前記細胞が免疫された項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスの第 2 の V_H 遺伝子配列を含み、該 V_H 遺伝子配列がヒト C_H 遺伝子配列と融合しており、前記第 1 の V_H 遺伝子配列が第 1 のエピトープを認識する V_H ドメインをコードし、該第 2 の V_H 遺伝子配列が第 2 のエピトープを認識する V_H ドメインをコードし、該第 1 のエピトープおよび該第 2 のエピトープが同一ではなく、該第 1 の V_H ドメインおよび該第 2 の V_H ドメインが前記 V_L 遺伝子配列によりコードされる V_L ドメインと相互作用する、項目 A 3 4 に記載の方法。

40

(項目 A 3 6)

ヒト二重特異性抗体の作製における、項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスの使用。

(項目 A 3 7)

50

ヒト二重特異性抗体を作製するための方法であって、項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスを免疫するステップ、および該マウス由来の B 細胞のヒト可変領域遺伝子配列を使用して該二重特異性抗体を作製するステップを含む方法。

(項目 A 3 8)

(a) 項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスのクローン選択されたリンパ球を同定するステップであって、該マウスが免疫され、目的の抗原に対する免疫応答を生じるようにされており、該リンパ球が該目的の抗原に特異的に結合する抗体を発現するステップ；

(b) 該リンパ球または該抗体から、該目的の抗原に特異的に結合するヒト重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を得るステップ；および

(c) (c) のヌクレオチド配列を二重特異性抗体の作製に使用するステップを含む、項目 A 3 7 に記載の方法。

(項目 A 3 9)

1 回目に第 1 のヒト重鎖可変領域配列を生成するために目的の第 1 の抗原に対してステップ (a) から (c) までを実施し、2 回目に第 2 のヒト重鎖可変領域配列を生成するために目的の第 2 の抗原に対してステップ (a) から (c) までを実施し、該第 1 のヒト重鎖可変領域配列が第 1 のヒト重鎖定常領域と融合して発現して第 1 のヒト重鎖を形成し、該第 2 のヒト重鎖可変領域配列が第 2 のヒト重鎖定常領域と融合して発現して第 2 のヒト重鎖を形成し、該第 1 のヒト重鎖および該第 2 のヒト重鎖が V_H 1 - 3 9 遺伝子セグメントまたは V_H 3 - 2 0 遺伝子セグメントから発現した単一のヒト軽鎖の存在下で発現する、項目 A 3 8 に記載の方法。

(項目 A 4 0)

(a)

- 第 1 の免疫原を用いて免疫された項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウス；および

- 第 2 の免疫原を用いて免疫された同じマウス、または遺伝学的には同じである異なるマウス

由来の B 細胞から可変重鎖領域をクローニングするステップ、

(b) 細胞において、同じ前記重鎖定常領域および同じ前記軽鎖とともに (a) の可変重鎖領域を発現させて二重特異性抗体を作製するステップ

を含む、項目 A 3 9 に記載の方法。

(項目 A 4 1)

前記第 1 のヒト重鎖が、前記第 1 のヒト重鎖のプロテイン A に対する親和性を消失させるまたは実質的に低下させる改変を含み、前記第 2 のヒト重鎖がプロテイン A に結合する能力を保持し、該第 1 のヒト重鎖のプロテイン A に対する親和性を消失させるまたは実質的に低下させる改変が、9 5 R (E U 4 3 5 R)、9 6 F (E U 4 3 6 F)、およびこれらの組合せから選択される、項目 A 4 0 に記載の方法。

(項目 A 4 2)

ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン遺伝子セグメントを選択するための、項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスの使用。

(項目 A 4 3)

免疫されている、項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウス。

(項目 A 4 4)

抗体を産生する方法であって、項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスを、抗原を用いて免疫するステップ、および結果として生ずる、該マウスにより該抗原に対して産生された抗体から重鎖可変領域アミノ酸配列またはコードするヌクレオチド配列を得るステップ、および該重鎖可変領域アミノ酸配列または核酸配列を抗体の作製に利用するステップを含む方法。

(項目 A 4 5)

(a) 前記マウスを免疫した前記抗原の異なるエピトープに対する 2 種の異なる抗体から

10

20

30

40

50

前記重鎖可変領域アミノ酸配列またはコードするヌクレオチド配列を同定するステップ；
または

(b) 項目 A 1 から A 2 6 のいずれか一項に記載のマウスと同じマウス、またはさらなる
マウスを、異なる抗原を用いて免疫し、次いで、該第 2 の抗原に特異的である、該マウス
によって産生された抗体から重鎖可変領域配列アミノ酸配列またはコードするヌクレオチ
ド配列を同定するステップを含み、

該 2 種の異なる重鎖可変領域を使用して二重特異性抗体を生成するステップをさらに含む
、項目 A 4 4 に記載の方法。

(項目 A 4 6)

前記抗体または 2 つの抗体から軽鎖可変領域配列も同定するステップをさらに含む、項目
A 4 4 または A 4 5 に記載の方法。

(項目 A 4 7)

項目 A 4 6 に記載の方法であって、該方法によって産生された抗体において同定された 1
つまたは複数の軽鎖重鎖可変領域も使用することを含む、方法。

【図面】

【図 1】

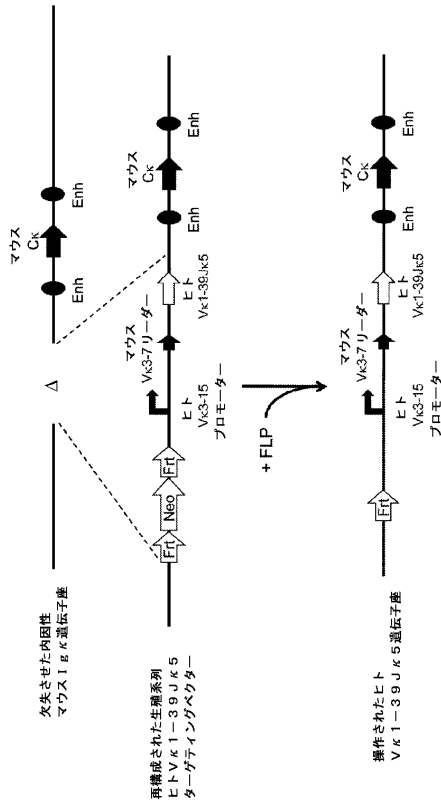


FIG. 1

【図 2】

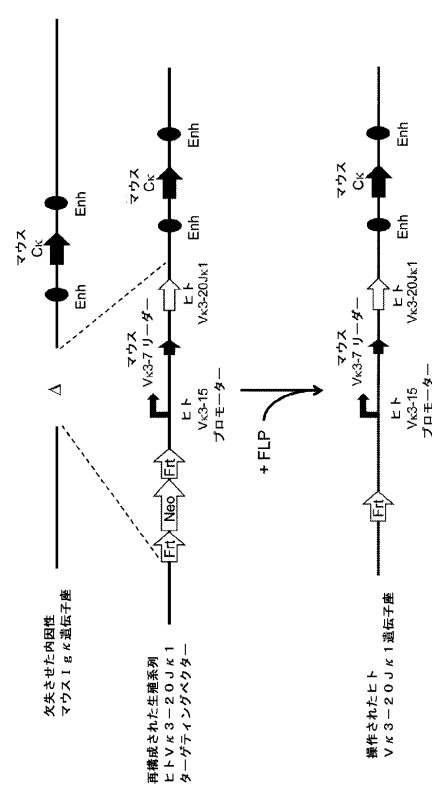


FIG. 2

10

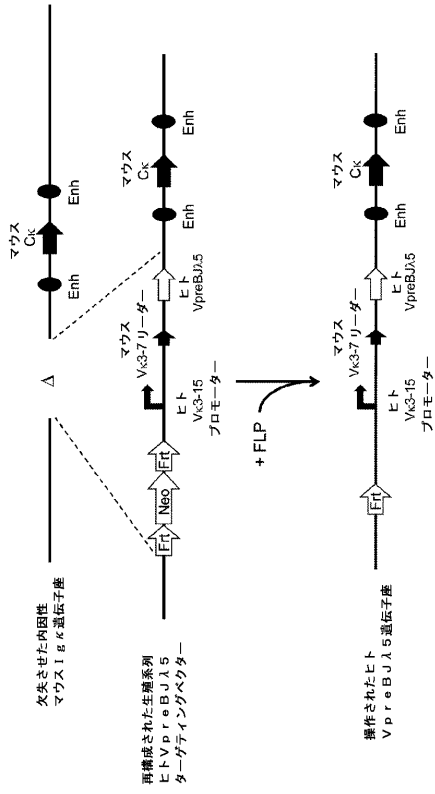
20

30

40

50

【 図 3 】



【 図 4 】

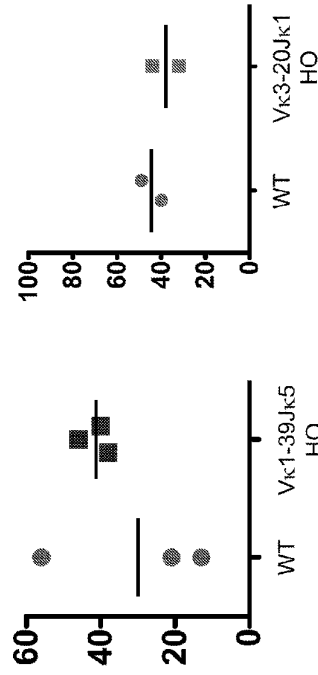
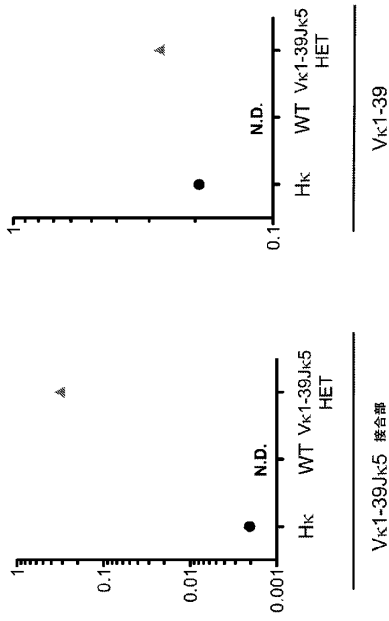


FIG. 3

FIG. 4

【 図 5 A 】



【 図 5 B 】

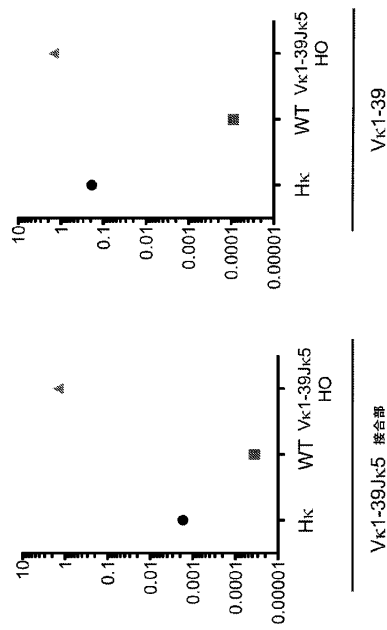
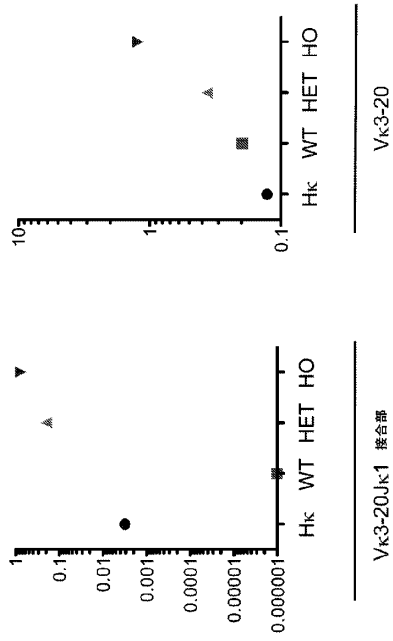


FIG. 5A

FIG. 5B

【図 5 C】



【図 6 A】

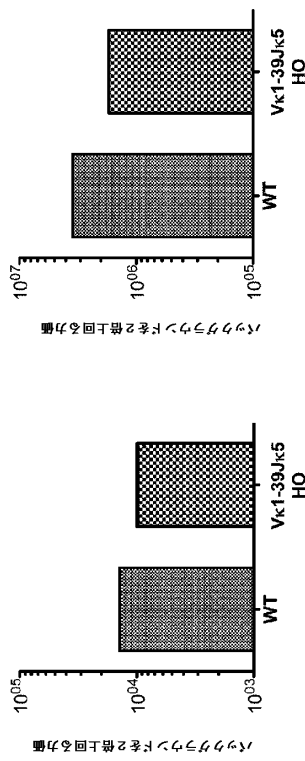


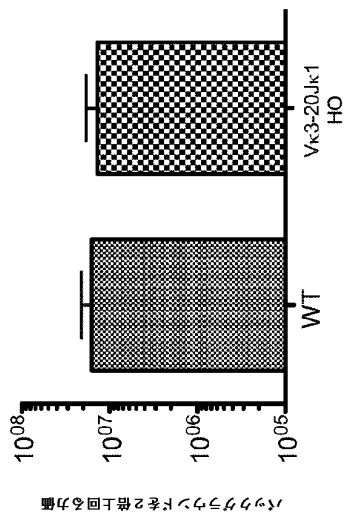
FIG. 5C

FIG. 6A

10

20

【図 6 B】



【図 7 A】

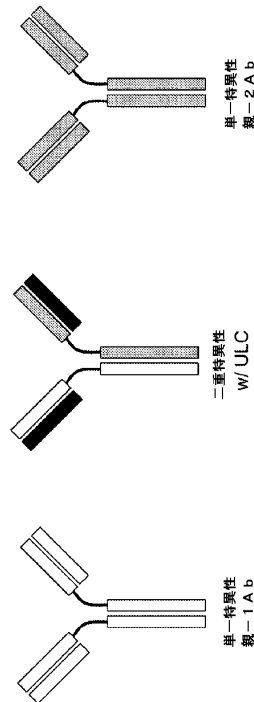


FIG. 6B

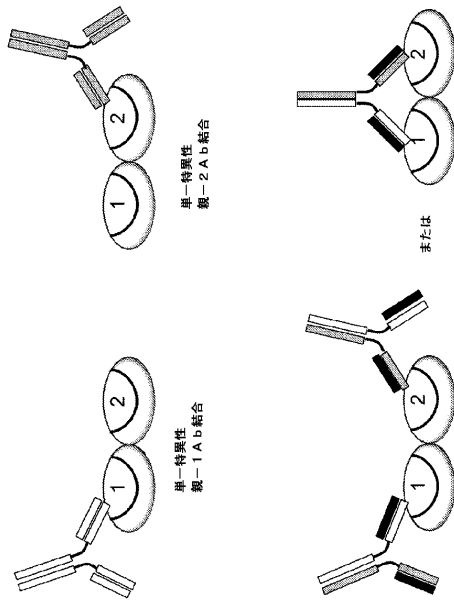
FIG. 7A

30

40

50

【 図 7 B 】



二重特異性A b 結合
FIG. 7B

【 図 8 】

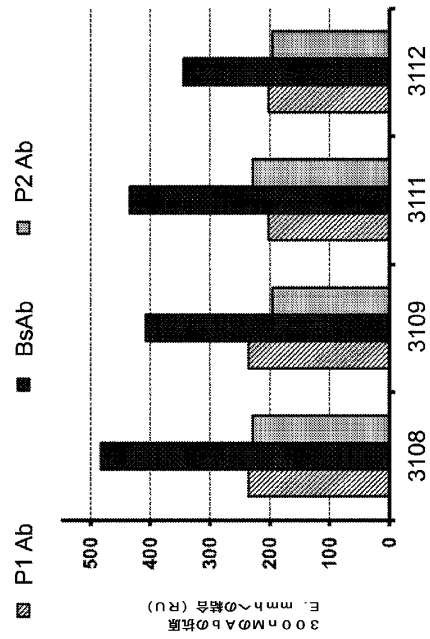


FIG. 8

【 図 9 】

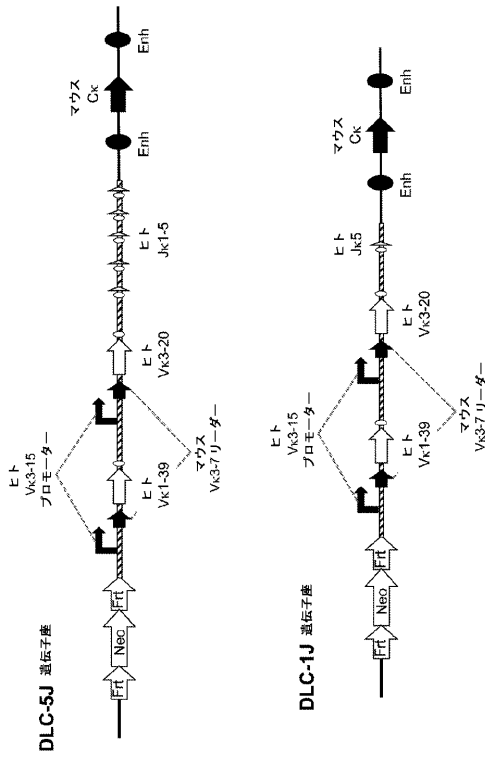


FIG. 9

【 図 10 A 】

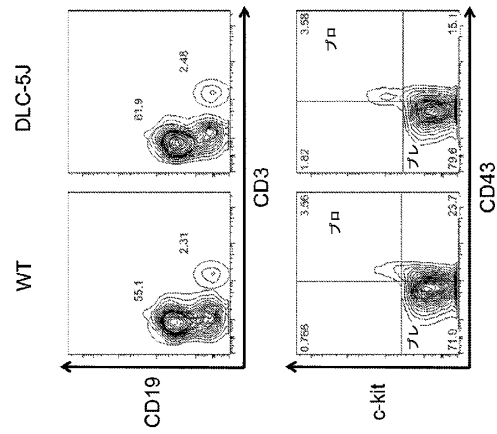


FIG. 10A

【 図 1 0 B 】

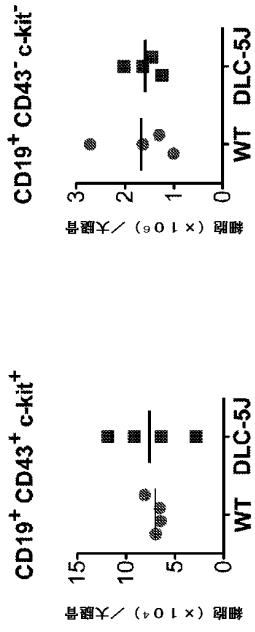


FIG. 10B

【 図 1 1 A 】

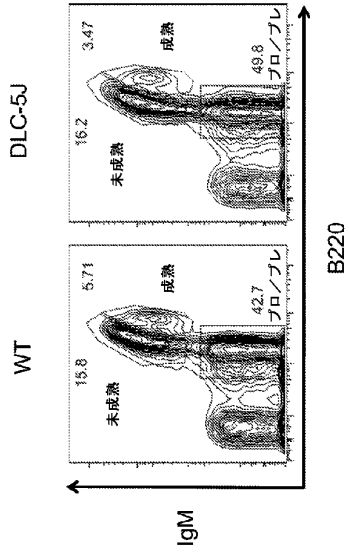


FIG. 11A

【 図 1 1 B 】

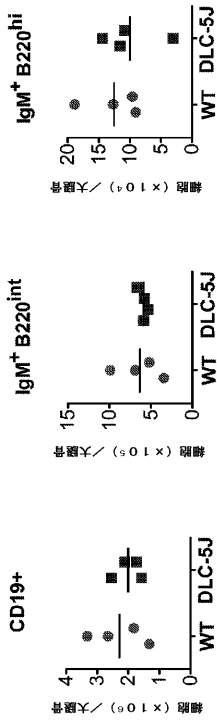


FIG. 11B

【 図 1 2 A 】

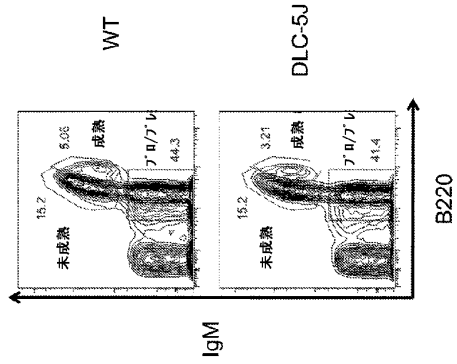


FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

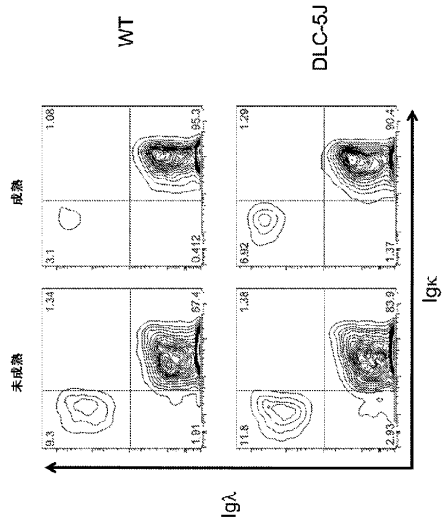


FIG. 12B

【 図 1 3 A 】

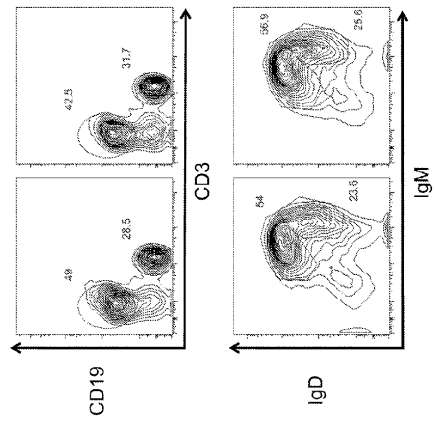


FIG. 13A

【 図 1 3 B 】

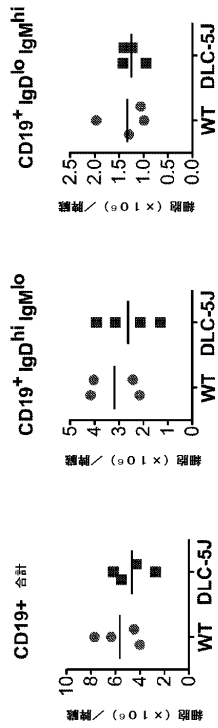


FIG. 13B

【 図 1 4 A 】

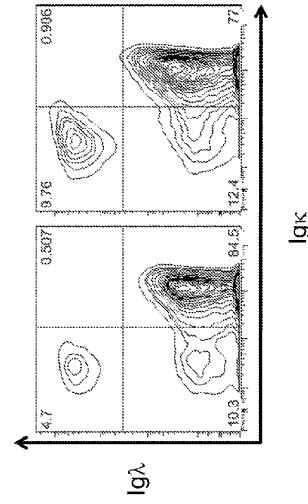


FIG. 14A

10

20

30

40

50

【 図 1 4 B 】

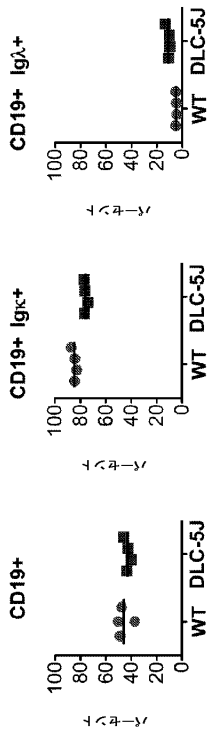


FIG. 14B

【 図 1 5 A 】

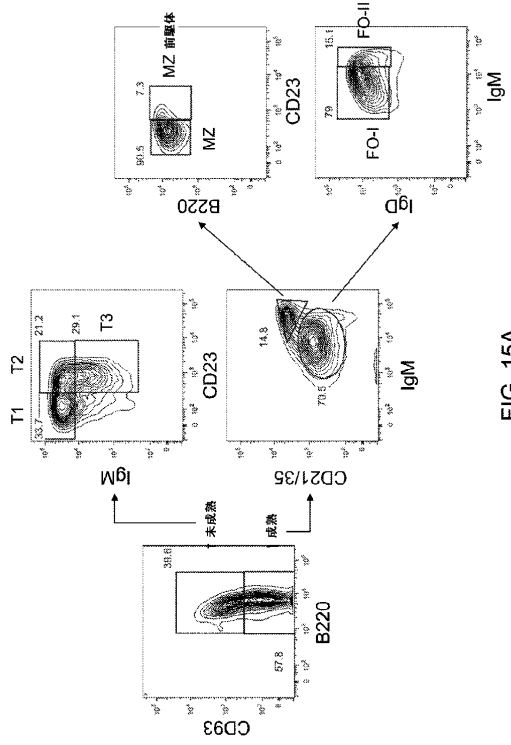


FIG. 15A

【 図 1 5 B 】

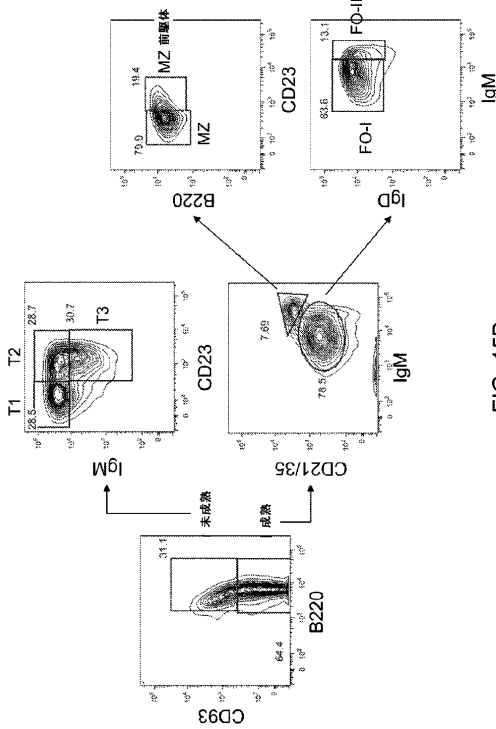


FIG. 15B

【 図 1 6 】

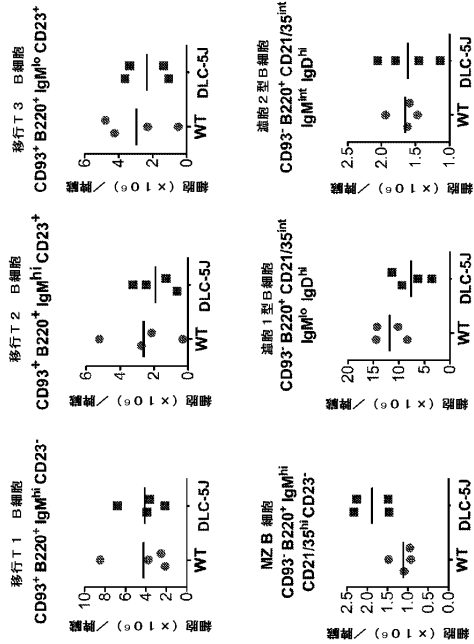


FIG. 16

10

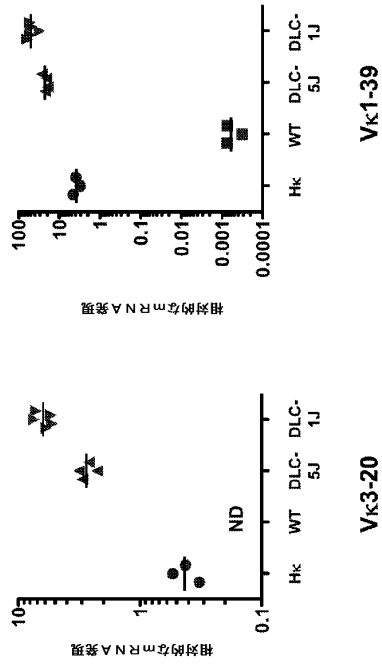
20

30

40

50

【図 17】



【図 18】

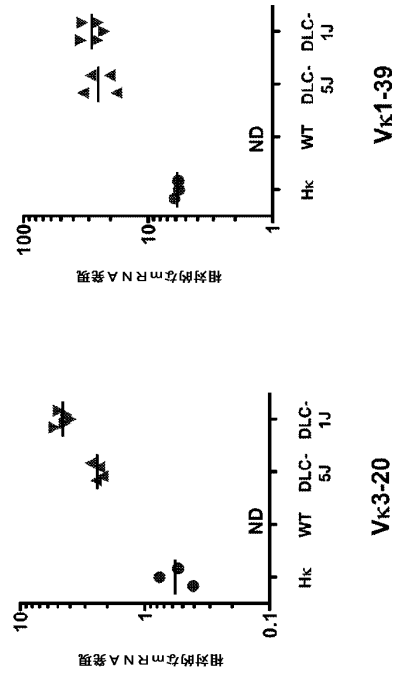


FIG. 17

FIG. 18

【図 19】

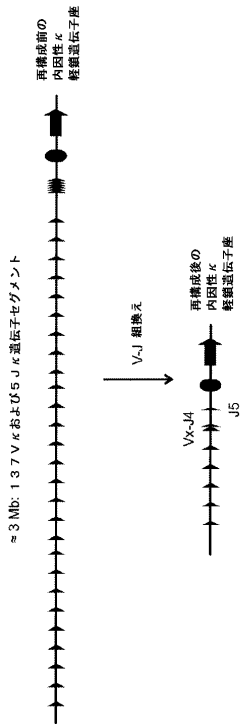


FIG. 19

10

20

30

40

50

【配列表】

0007010902000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- ベニュー 292
- (72)発明者 ジョン ミクウィルター
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, クレセント ドライブ 2152
- (72)発明者 リン マクドナルド
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10605, ホワイト プレインズ, ゲッドニー ウェイ 16
- (72)発明者 ショーン スティーブンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122, サンディエゴ, カミノ カルマ 3954
- (72)発明者 サミュエル デイビス
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10024, ニューヨーク, ウエスト 88ティールエイチ ストリート 332, アパートメント ビー2
- (72)発明者 デイビッド アール. バックラー
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07930, チェスター, エリック コート 6
- (72)発明者 カロライナ エー. ミーガー
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, チャーチ ストリート 14, 2エヌディー フロア
- (72)発明者 アンドリュー ジェイ. マーフィー
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 小金井 悟
- (56)参考文献 国際公開第2012/148873 (WO, A2)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
- A01K 67/027
C12N 1/00 - 7/08
C12P 1/00 - 41/00
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)