

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-536478

(P2021-536478A)

(43) 公表日 令和3年12月27日(2021.12.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00 ZNA	4B065
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4C085
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4H045
A01K 67/027 (2006.01)	A01K 67/027	
C07K 1/14 (2006.01)	C07K 1/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2021-512749 (P2021-512749)
 (86) (22) 出願日 令和1年9月5日 (2019.9.5)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年4月27日 (2021.4.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/073767
 (87) 国際公開番号 W02020/049128
 (87) 国際公開日 令和2年3月12日 (2020.3.12)
 (31) 優先権主張番号 1814529.2
 (32) 優先日 平成30年9月6日 (2018.9.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)

(71) 出願人 512006066
 カイマブ・リミテッド
 イギリス・CB22・3AT・ケンブリッ
 ジ・バブラハム・リサーチ・キャンパス・
 ザ・ベネット・ビルディング・(B930
)
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対合していない可変ドメインを含む抗原結合分子

(57) 【要約】

抗原を結合するための対合していない可変ドメイン、例えば、重鎖可変(VH)ドメインを含む抗体。2つの免疫グロブリン(Ig)鎖を含む抗体であって、第1のIg鎖が可変ドメイン及び定常ドメインを含み、第2のIg鎖が定常ドメインを含み、第2のIg鎖は可変ドメインを欠き、したがって、第1のIg鎖の可変ドメインを対合していない状態とする、抗体。抗体は、2つのIg重鎖及び2つのIg軽鎖を含むことができ、各重鎖はVHドメインとCH1ドメインを含む定常領域とを含み、各軽鎖はCLドメインを含み、一方又は両方の軽鎖はVLドメインを欠き、それによって、一方又は両方のVHドメインを対合していない状態とする。軽鎖可変(VL)ドメインをコードする配列の欠失を含む、対合していないVHドメインを有する抗体を産生するように操作された非ヒト動物(例えば、マウス)。抗原結合分子を生成するための対合していないVHドメインの使用。

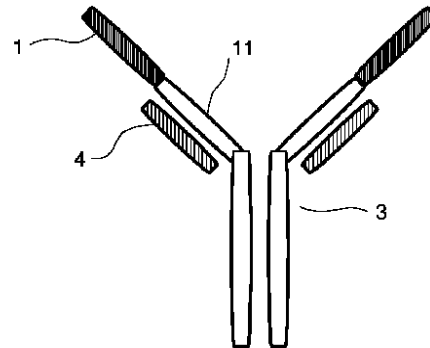


FIGURE 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

溶液中の単離された抗体を含む組成物であって、抗体は標的抗原を結合するための対合していない可変ドメインを含み、対合していない可変ドメインは定常領域に連結され、定常領域はCH1ドメインとCH1ドメインに結合するシールドドメインとを含む、組成物。

【請求項 2】

ヒト可変ドメイン及びCH1ドメインを含む第1のポリペプチドと、
前記CH1ドメインと対合しているシールドドメインを含む第2のポリペプチドであって、可変ドメインを欠き、それによって、第1のポリペプチドの可変ドメインを対合していない状態とする、第2のポリペプチドと
を含む組成物。

10

【請求項 3】

第1のポリペプチドは、VH-CH1-CH2-CH3を含む免疫グロブリン重鎖である、請求項2に記載の組成物。

【請求項 4】

シールドドメインはCLドメインである、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

CLはC である、請求項4に記載の組成物。

【請求項 6】

シールドドメインは 5免疫グロブリンドメインである、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 7】

Fc領域を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

対合していない可変ドメインはVHドメインである、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

2つの前記対合していない可変ドメインを含む4本鎖抗体である、請求項1から8のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

重鎖及び軽鎖を含む抗体であって、

重鎖は、標的抗原を結合するための対合していないヒトVHドメインと、CH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含み、

軽鎖はCLドメインを含み、

軽鎖はVLドメインを欠き、それによって、VHドメインを対合していない状態とする、抗体。

30

【請求項 11】

2つの重鎖及び2つの軽鎖を含み、

各重鎖は、ヒトVHドメインと、CH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含み、

各軽鎖はCLドメインを含み、

一方又は両方の軽鎖はVLドメインを欠き、それによって、一方又は両方のVHドメインを対合していない状態とする、

請求項10に記載の抗体。

40

【請求項 12】

2つの重鎖及び2つの軽鎖を含み、

各重鎖は、標的抗原を結合するための対合していないヒトVHドメインと、CH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含み、

各軽鎖はCLドメインを含み、軽鎖はVLドメインを欠く、請求項11に記載の抗体。

【請求項 13】

2つの対合していないVHドメインは同じ抗原又はエピトープに結合する、請求項12に記載

50

載の抗体。

【請求項 1 4】

2つの対合していないVHドメインはアミノ酸配列が同一である、請求項12又は13に記載の抗体。

【請求項 1 5】

重鎖定常領域は、CH1ドメイン及び1つ又は複数の更なるCHドメイン、任意選択でCH2ドメイン及びCH3ドメインを含む、請求項10から14のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 6】

CLはC である、請求項10から15のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 7】

重鎖定常領域はヒト重鎖定常領域である及び/又はCLはヒトのものである、請求項10から16のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 8】

CLは配列番号4のヒトC 配列を含む、請求項16又は17に記載の抗体。

【請求項 1 9】

シールドドメインは配列番号4のヒトC 配列からなる、請求項18に記載の抗体。

【請求項 2 0】

抗体はIgG又はIgMである、請求項1から9のいずれかに記載の組成物又は請求項10から19のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 1】

抗体は完全ヒト型抗体である、請求項1から20のいずれか一項に記載の組成物又は抗体。

【請求項 2 2】

対合していない可変ドメインは、免疫チェックポイント阻害剤(例えば、PD-L1、PD-1、CTLA-4、TIGIT、TIM-3、LAG-3及びVISTA、例えばTIGIT、TIM-3及びLAG-3)、免疫調節剤(例えば、BTLA、hHVEM、CSF1R、CCR4、CD39、CD40、CD73、CD96、CXCR2、CXCR4、CD200、GARP、SIRP、CXCL9、CXCL10、CXCL11及びCD155、例えば、GARP、SIRP、CXCR4、BTLA、hVEM及びCSF1R)、免疫賦活剤(例えば、CD137、GITR、OX40、CD40、CXCR3(例えば、アゴニスト抗CXCR3抗体)、CD27、CD3、ICOS(例えば、アゴニスト抗ICOS抗体)、例えば、ICOS、CD137、GITR及びOX40)から任意選択で選択される、ヒト抗原に結合する、請求項1から21の

【請求項 2 3】

請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体又はそのポリペプチド若しくは対合していない可変ドメインをコードする核酸。

【請求項 2 4】

請求項23に記載の核酸をゲノム中に含む、非ヒト動物又はその細胞。

【請求項 2 5】

請求項1から22のいずれか一項に記載の抗体を発現するBリンパ球を含む非ヒト動物。

【請求項 2 6】

Bリンパ球は、VLドメインを含む軽鎖の機能的発現を欠く、請求項24又は25に記載の動物。

【請求項 2 7】

CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数の可変領域遺伝子セグメント(任意選択でヒトセグメント)、及び

(i)可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCLドメインをコードする遺伝子、又は(ii) 5(任意選択でヒト 5又はマウス 5)の免疫グロブリンドメイン若しくはそのトランケートされたバージョンをコードする遺伝子を含むゲノムを有する、非ヒト動物又は非ヒト動物細胞。

【請求項 2 8】

10

20

30

40

50

抗原に結合するための対合していないヒトVHドメインを含む抗体を発現するBリンパ球を含む非ヒト動物を作出する方法であって、

CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数の可変領域遺伝子セグメント(任意選択でヒトセグメント)、及び

(i)可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCLドメインをコードする遺伝子、又は(ii)5(任意選択でヒト5又はマウス5)の免疫グロブリンドメイン若しくはそのトランケートされたバージョンをコードする遺伝子

を含むように、非ヒト動物細胞のゲノムを操作する工程と、

前記細胞から又は前記細胞を含む細胞群から動物を作出する工程とを含む方法。

10

【請求項29】

CLドメインをコードする遺伝子は、J-Cイントロンエンハンサーエレメント(任意選択でヒト又はマウスのエンハンサー)を含むイントロンによって分断されている、軽鎖可変領域リーダー配列をコードするエクソン(任意選択で、上流のプロモーター配列、例えば、ヒト、マウス又はラットのプロモーターを更に含む)及びCLドメインをコードするエクソンを含み、コードされたCLドメインはN末端シグナルペプチドを含む、請求項24から28のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

【請求項30】

CLドメインをコードする遺伝子は、ヒトJ-C イントロンエンハンサーエレメントを含むイントロンによって分断されている、ヒトV リーダー配列をコードするエクソン及びヒトC ドメインをコードするエクソンを含み、コードされたCLドメインは、N末端シグナルペプチドを含むヒトC ドメインである、請求項29に記載の動物、細胞又は方法。

20

【請求項31】

ヒトC ドメインは配列番号4又は配列番号6を含む、請求項30に記載の動物、細胞又は方法。

【請求項32】

動物は、げっ歯類(例えば、マウス又はラット、例えば、マウス)、ネコ又はイヌ等の、(非ヒト)哺乳動物である、請求項24から31のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

【請求項33】

請求項24から27若しくは29から32のいずれか一項に記載の動物を標的抗原による免疫原性刺激に曝露する工程、及び抗体又はそれをコードする核酸を動物から単離する工程を含む、抗原を結合するための対合していない可変(任意選択でVH)ドメインを含む抗体を生成する方法;又は請求項24から27若しくは29から32のいずれか一項に記載の動物を標的抗原による免疫原性刺激に曝露する工程、及び可変ドメイン又はそれをコードする核酸を動物から単離する工程を含む、抗原を結合するための可変(任意選択でVH)ドメインを生成する方法。

30

【請求項34】

コードする核酸を組換え宿主細胞にクローニングする工程と、可変ドメインを含むポリペプチドの発現のために細胞を培養する工程と、細胞又は培養培地からポリペプチドを回収する工程及び精製する工程と、を更に含む、請求項33に記載の方法。

40

【請求項35】

ポリペプチドは、単離可変ドメイン、抗体又はキメラ抗原受容体である、請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原を結合するための、対合していない抗体可変領域、例えば、対合していないVHドメインを含むポリペプチドに関する。本発明はまた、1つ若しくは複数の重鎖又

50

は重鎖可変領域を含む抗体を発現する動物、例えば、マウスに関するものであり、抗体は、重鎖可変ドメインと対合して、対合している抗原結合部位を形成する軽鎖可変ドメインが無い。

【背景技術】

【0002】

天然のヒト免疫グロブリンの抗原結合領域は、2種の可変ドメイン(重鎖可変(VH)ドメインと軽鎖可変(VL)ドメイン)から構成されており、これらが一緒に対合してFv領域を形成する。Fv領域は、可変アミノ酸配列の6つのループ(相補性決定領域(CDR))によってもたらされる抗原結合部位を有する。VHドメインはフレームワーク領域(FR)が散在するHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、VLドメインはFRが散在するLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む。VHドメインの及び/又はVLドメインの1つ又は複数のCDRが抗原に結合する。結合は、VHドメインとVLドメインの両方のCDRによって、又は1つのドメイン単独のCDRによって媒介され得る。VHドメインのHCDR3は多くの場合抗原結合において主要な役割を果たしているが、双方のドメインのうちのその他のCDRが寄与する場合もあり、多くの場合寄与する。抗原がもっぱら又は主としてVHドメインのCDRに結合する場合でも、FvにおけるVLドメインの存在によって、機能的結合立体配座にあたってVHは安定化することができる。

10

【0003】

抗体可変ドメインは、Bリンパ球系統の細胞内の免疫グロブリン(Ig)遺伝子座での遺伝子セグメントの組み合わせ再構成を通して *in vivo* で生成されるが、このことにより、免疫系が遭遇する多様な免疫原性刺激に結合することが可能なコードされたアミノ酸配列のレパートリーがもたらされる。ヒトのIg重鎖遺伝子座は、ハプロタイプに応じて、およそ41の機能的V遺伝子セグメント、27の機能的D遺伝子セグメント及び6つの機能的J遺伝子セグメントを有する。VHドメインをコードする核酸は、V-D-J遺伝子セグメントの組換えによって生成される。V遺伝子セグメントは、FR1、HCDR1、FR2、HCDR2、FR3及びHCDR3の開始を含むポリペプチド鎖のN末端領域をコードするが、一方、D遺伝子セグメントはHCDR3に包含され、J遺伝子セグメントはHCDR3の端とC末端フレームワーク領域FR4を提供する。抗体レパートリーにおけるHCDR3配列の高度に可変である特質は、様々な多くのV、D及びJの各セグメントの再構成によって生成される組み合わせ多様性を反映している。ヒトは、カッパ()及びラムダ()の2種のIg軽鎖遺伝子座を有する。ヒトIg軽鎖遺伝子座は、ハプロタイプに応じて、およそ40の機能的Vセグメント、5つの機能的Jセグメント、29の機能的Vセグメント及び4つの機能的Jセグメントを有する。VLドメインをコードする核酸は、カッパ()又はラムダ()の遺伝子座のいずれかにて2つの遺伝子セグメントV及びJの組換えによって産生される。v遺伝子セグメントはFR1、LCDR1、FR2、LCDR2、FR3及びLCDR3の最初の部分をコードし、一方、J遺伝子セグメントはLCDR3の第2の部分及びFR4を形成する。V-D-JとV-Jの組換えから、及びVH/VLの対合から生じる組み合わせ多様性に加えて、更に、抗体配列の多様性は、遺伝子セグメントの接合点での接合部突然変異によって及び抗原結合に応答した体細胞超突然変異の *in vivo* プロセスによって生成される。

20

30

【0004】

WO90/05144(MRC社)では、VHドメインが、重鎖及び軽鎖を含む完全抗体から単離された場合、1:1の比率で且つ完全抗体分子の結合定数に相当する大きさの結合定数で抗原に結合できることが、開示された。

40

【0005】

ラクダ類(ラクダやラマを含む動物の科)は、VLの非存在下で、対合していないVHドメインと抗原を結合する抗体を自然に産生する。このような抗体は、免疫グロブリン軽鎖を完全に欠いているとともに、ホモ二量体重鎖から構成される二価バインダーであり、それぞれが抗原結合単一VHドメイン又は「VHH」ドメイン、ヒンジ領域、及びCH2ドメイン及びCH3ドメインを含む二量体化定常領域を含む。古典的な哺乳動物抗体の重鎖と相同であるが、このような「重鎖抗体」(「HCAb」)は、mRNAのプロセッシング過程で切り出される定常領域(CH1)の第1のドメインを欠く(WO94/04678 Casterman & Hamers; WO96/34103 Hamers & Muyldermans)。

50

【0006】

類似の突然変異が、重鎖疾患として知られているヒトの病的状況で発生する。免疫グロブリン重鎖は、VH、CH2及びCH3の各ドメインを含むが、CH1ドメインを欠いて発現する。この疾患の患者では、軽鎖と対合して正常な抗体を形成する代わりに、重鎖が蓄積することが見いだされている。

【0007】

サメ等の軟骨魚も、重鎖で構成され、いかなる軽鎖をも欠く抗体を有する。こういった抗体はIgNAR(免疫グロブリン新抗原受容体)と称され、VNAR断片と呼ばれる単一ドメイン抗体の給源として使用されてきた。

【0008】

研究者らは、単一可変ドメイン抗体を医薬品に開発するために取り組んできた。ドメイン抗体(dAb)として知られるこれらの分子は、モノマーとして生理活性であり、そのサイズが小さいこと及び固有の安定性のせいで、より大きい分子に一体化して、血清半減期の延長及び/又は他の薬理活性を有する薬物を創製するのにも非常に適切である。抗体の単一可変ドメインを含む抗原結合分子として、免疫コンジュゲート(例えば、dAb毒素)及びキメラ抗原受容体(CAR)が挙げられる。この目的のため、抗体単一可変ドメインバインダーをクローニングし、組換え系で発現させ、そのようなバインダーの*in vitro*ライブラリーを、ファージディスプレイ等の系を使用して選択及びスクリーニング用に生み出してきた。

【0009】

マウス等の実験動物を、単一の抗原結合可変ドメインの更なる供給源として重鎖抗体を発現するように遺伝子操作してきた。動物の内因性Ig軽鎖遺伝子座をノックアウト(欠失又は不活化)することから始めることができる(WO92/03918 Genpharm社; WO03/000737 The Babraham Institute社)。次いで、重鎖のみを発現させ、ホモ二量体化する(図1a)。しかし、重鎖のCH1ドメインは天然変性であり、その同族パートナーである軽鎖のCドメイン又はCドメインと相互作用したときのみ通常免疫グロブリンフォールドを取る。Ig重鎖の発現は、CH1ドメインの誤った折畳みと凝集のせいで非生産的であると報告されてきた。それにもかかわらず、軽鎖欠失マウスでは、一部の機能的HCAbは、クラススイッチングメカニズムの変形形態を通して自発的に産生される。クラススイッチングでは、VHをコードする核酸は通常CH1-CH2-CH3定常領域をコードする核酸に連結するが、異常なメカニズムではVHはCH2-CH3のみに接合する。生成するHCAbは、ラクダ科のものと同様に、CH1ドメインを欠いており、このHCAbを抗原結合のために発現させ及び選択することができる。しかし、機能的HCAbはこの方法によって低効率でのみ生成するが、なぜなら、クラススイッチングの正常なメカニズムが優位を占め、CH1を含めて完全なIg重鎖を産生するからである。

【0010】

したがって、重鎖抗体を産生するのに使用されるマウス系統は、免疫グロブリン重鎖のCH1ドメインの遺伝子欠失及び軽鎖のノックアウトを有するように操作されてきた。このようなマウスは、二量体重鎖を含み、軽鎖を欠く抗体を産生し、各重鎖は、可変(VH)ドメインと定常領域CH2及びCH3とを有する。定常領域は二量体化してFc領域を形成し、一方、2つのVHドメインは二価抗原結合に利用できる(図1b)。標的抗原でマウスを免疫した後に、抗原に特異的な重鎖抗体を生成し、選択し、*in vivo*で親和性成熟を行い、そして単離することができる。次いで、VHドメインをコードする核酸を組換え発現させ、所望によりクローニングして、任意選択で、治療用途又は診断用途向けのCAR又はその他の製品等のより大きい分子という面において、VHドメインを含むポリペプチドを提供することができる。

【0011】

Erasmus Universiteit Rotterdamは、ラクダ科のVHHドメイン又は「ラクダ化」VHドメインからのエクソンと機能的CH1ドメインを発現しなかった重鎖定常領域遺伝子とをゲノム中に含むトランスジェニックマウスについて記載してきた(WO02/085944、WO02/085945

10

20

30

40

50

、WO2006/008548、WO2010/109165)。「ラクダ化」VHは、ラクダ科のVHHに似るように突然変異を起こさせたヒト(又は他の非ラクダ科の)VH配列である。このようなトランスジェニックプラットフォームでは、重鎖遺伝子は機能的CH1ドメインを排除するように操作されている。WO2/085944で報告されたように、CH1が非存在であると、重鎖抗体が軽鎖と会合して「従来の」抗体を形成することができず、なぜなら、CH1は軽鎖の定常ドメインの天然のパートナーであるからであった。WO2006/008548では、上記マウスにおける正常なB細胞成熟と抗体産生は、トランスジェニック遺伝子座に存在する各重鎖定常領域からのCH1配列の完全な非存在に左右されていることが報告された。WO2004/049794(The Babraham Institute社)では、マウスにおけるYAC導入遺伝子からのHCAbの産生について記載しており、この場合、重鎖のCH1ドメインがmRNAプロセッシング過程で切り出される。次いで、生成するマウスを、内因性の重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子をノックアウトしたマウスと交配させて、所望のHCAbのみを発現するマウスを作出することができた。

10

【0012】

残念なことに、そのIg重鎖にCH1欠失を担持する「重鎖のみ」のマウスは、正常なB細胞集団を有さない。CH1ドメインをコードするDNAを μ 重鎖定常領域遺伝子と重鎖定常領域遺伝子の両方から欠失させたマウスは、CH1を欠くIgM重鎖(CH1 μ)及びCH1を欠くIgG重鎖(CH1)を産生したが、こういったマウスでは未成熟B細胞の割合が増加し、濾胞帯B細胞と辺縁帯B細胞への分化は損なわれていた。それにもかかわらず、CH1の欠失は上記マウスにおいてIgM抗体とIgG抗体の両方の発現に不可欠であり、なぜなら、 μ 重鎖又は重鎖のいずれかにCH1ドメインを包含させると発現が非生産的であるという結果がもたらされたからである[1]。

20

【0013】

ヒトVHドメインは、ヒトへの投与にとって望ましく、なぜなら、ヒトVHドメインは、ラクダVHH等の非ヒト由来のポリペプチドの投与と比較して、患者において免疫原性副作用がより低いことと結びついているからである。ヒト抗体重鎖を発現するトランスジェニックマウスは、抗原結合に関するin vivo選択を受けるヒトVHドメインの供給源である。しかし、ヒト抗体は自然には、重鎖と軽鎖の両方を含有し、軽鎖が非存在であると、重鎖可変領域のサブセットのみが機能的重鎖抗体を生成することができる。したがって、重鎖のみのマウスで産生された重鎖抗体からのヒトVHドメインは、完全な免疫グロブリンからのVHドメインの配列多様性を欠いている。かかるマウスではヒトVHドメインのレパトリーの限定が、ヒトIg重鎖遺伝子がマウスゲノムのランダムな挿入点に導入される場合にいつそうひどくなるが、なぜなら、異所性トランスジェニック遺伝子座は、ヒトにおけるよりも短く(VDJ組換え過程で起こる限られたN付加に起因すると考えられている)そして限定された超突然変異を経るHCDR3配列を有するVHドメインを産生し、その結果、VHドメインの多様性に関してすでに低いということになるからである。このことは、ヒトの抗体生成にとっては既知のランダム挿入トランスジェニックプラットフォームに関する内在的限界であるように思われる。後者の問題については、ゲノム内のランダムな位置にではなく、宿主動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を組み込むことによって解決することができる[2]。かかるマウスでは天然遺伝子座での組換え及び体細胞超変異によって、より幅の広い多様性の配列が生成されて、これ由来の溶解性の低いVHドメインをin vivoで生物物理学的特性(例えば、溶解性)が改善されたドメインへと進化させる。

30

40

【0014】

WO2011/072204(Regeneron Pharmaceuticals社)では、ヒトVHドメインと、欠失CH1ドメインを有するマウス定常領域とを含む重鎖抗体を発現するマウスが記載された。こういったマウスは、内因性Ig定常領域遺伝子のCH1をコードする配列の生殖細胞系列欠失を含み、したがって、マウスがCH1ドメインをコードする配列を含むIgG mRNAを発現できなくなると言われていたが、IgMアイソタイプ定常ドメインのCH1ドメインが欠失されてないのに、マウスは正常な機能的IgM抗体を発現する能力を保持していた。WO2013/171505(Kymab Limited社)では、正常なIgM抗体とCH1欠失IgG抗体を発現するように操作されたマウスが記

50

載されたが、この場合、リンパ球におけるIgMからIgGへの段階特異的クラススイッチングは、内因性Ig軽鎖遺伝子座の不活化とIgG定常領域からのCH1の遺伝子欠失を伴い、その結果、軽鎖発現の非存在下で細胞によってIgG抗体が発現された。この改変により、抗体とB細胞コンパートメントの発現が、好ましい4鎖(H2L2)内因性IgM段階を通過し、その後、より初期の4鎖IgM段階によって提供される重鎖VDJ組換えの良好なプール由来の重鎖のみ(H2)抗体だけを選択する後続のIgG段階に進むことを可能としたが、この後続の段階では、4鎖抗体の可能性が本質的に排除された。

【 0 0 1 5 】

WO2018/039180(Teneobio、Inc社)では、HCAbのFR4の最初の位置にある天然アミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置き換えて、正常なFvではVH-VL接合部分(interface)に埋め込まれている、表面に露出した疎水性パッチを破壊することにより、凝集の傾向性が低いHCAbを調製できることが報告された。疎水性パッチの露出は、軽鎖の非存在下での重鎖の望ましくない凝集における、並びに軽鎖の存在下でのVH-VLドメイン対合における、要因であると特定された。ラットは、特定されたVH残基突然変異を含めてHCAbを発現するように遺伝子操作され、内因性軽鎖遺伝子座の不活化によって重鎖ホモ二量体化を実施した。

10

【 0 0 1 6 】

重鎖のみ抗体よりも一般的ではないが、当技術分野では、対合していないVLドメインを含む抗体の生産についても記載してきた。WO2009/143472(Aliva Biopharmaceuticals社)及びWO2015/143414(Regeneron Pharmaceuticals社)では、CH1ドメインの欠失を伴う重鎖定常領域にヒトVLドメインをコードする遺伝子配列を連結することにより、トランスジェニック動物において対合していないVLドメインを有する抗体を生成する方法が記載された。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 7 】

【 特許文献 1 】 WO90/05144(MRC社)

【 特許文献 2 】 WO94/04678 Casterman & Hamers

【 特許文献 3 】 WO96/34103 Hamers & Muyldermans

【 特許文献 4 】 WO92/03918 Genpharm社

【 特許文献 5 】 WO03/000737 The Babraham Institute社

30

【 特許文献 6 】 WO02/085944

【 特許文献 7 】 WO02/085945

【 特許文献 8 】 WO2006/008548

【 特許文献 9 】 WO2010/109165

【 特許文献 1 0 】 WO2004/049794(The Babraham Institute社)

【 特許文献 1 1 】 WO2011/072204(Regeneron Pharmaceuticals社)

【 特許文献 1 2 】 WO2013/171505(Kymab Limited社)

【 特許文献 1 3 】 WO2018/039180(Teneobio、Inc社)

【 特許文献 1 4 】 WO2009/143472(Aliva Biopharmaceuticals社)

【 特許文献 1 5 】 WO2015/143414(Regeneron Pharmaceuticals社)

40

【 特許文献 1 6 】 WO2011/004192(Genome Research Limited社)

【 特許文献 1 7 】 米国特許第5,731,168号

【 特許文献 1 8 】 WO2006/106905

【 特許文献 1 9 】 WO2013/157954

【 特許文献 2 0 】 WO2011/143545

【 特許文献 2 1 】 WO2007/110205

【 特許文献 2 2 】 WO2010/151792

【 特許文献 2 3 】 WO2013/061078

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

50

【0018】

対合していない可変ドメイン及びそれらを産生するためのトランスジェニック動物を含めた抗体の分野では、本発明は、今日まで本技術分野のテーマであった「重鎖のみ」抗体及び「重鎖のみマウス」からの移行を表す。本発明者らは、そのVHドメイン単独を介して抗原を結合する抗体を産生するために、CH1欠失も軽鎖非存在も必要ではないことに気付いた。本発明では、抗体のVLドメインが欠失され、CLドメインは保持される。これにより、重鎖及び軽鎖を含む抗体が産生され、重鎖は、抗原を結合するための対合していないVHドメインとCH1ドメインを含む定常領域とを含み、軽鎖はCLドメインを含み、VLドメインを含まない(図2)。VLドメインが非存在であることが、VHドメインを対合していない状態とする。保持されたCLドメインは、重鎖のCH1に結合し、抗体分子を安定化し、重鎖の凝集を阻害する。したがって、重鎖CH1ドメインを、任意選択で、完全な重鎖定常領域(例えば、CH1-CH2-CH3又はCH1-CH2-CH3-CH4)の一部として保持することができる。重鎖及び(残留)軽鎖は、CH1とCLの会合を通して対合している。

10

【0019】

類似の改変により、対合しているVHドメインの非存在下でVLドメインを通して抗原を結合する抗体を生成することも可能である。対合していないVHドメイン及び/又はVLドメインを含む抗体に、更なる改変を、例えば、抗体のフォーマット及び設計の変更を任意選択で含めることができる。

【0020】

マウス等のトランスジェニック動物を、VH-VL対(Fv)の背景外で抗原を結合することができる抗原特異的可変ドメインの*in vivo*生成及び選択のために、本発明による抗体を産生するように操作することができる。CH1を保持し、シールドドメインとのその対合及び安定化を可能にすることにより、本発明の抗体を発現する動物で生成することができる抗体レパートリーは、*in vivo*免疫応答がある点で限定されていたCH1欠失抗体プラットフォームよりも著しく大きい可能性がある。目的の標的抗原で免疫すると、本発明による動物は標的に対する抗体を生成し、抗体は、標的を結合する対合していない可変ドメインを含む。こういった抗体及び/又はそれをコードする核酸を動物から回収し、次いで、可変ドメインをコードするDNAを、組換え発現させ、任意選択で、対合していない可変ドメインを可変ドメイン及び1つ又は複数の更なるタンパク質ドメインを含む結合分子(例えば、抗体又はキメラ抗原受容体)に組み込むことができる。対合していない可変ドメイン、抗体及びこれを含む他の結合分子、それをコードする核酸、このような核酸を含有する細胞及びトランスジェニック動物、並びに前述のものを生成及び使用する方法は、全て本発明の態様である。

20

30

【課題を解決するための手段】

【0021】

第1の態様では、本発明は、定常領域に連結された、対合していない可変ドメイン(VHドメイン又はVLドメイン)を含む抗体を提供し、定常領域は、CH1ドメイン及びCH1ドメインと対合しているドメインを含む。CH1ドメインと対合しているドメインは、本明細書では「シールドドメイン」と称され、重鎖CH1ドメインとシールドドメインとの接合部分はCH1ドメインを安定化する働きを有することができる。その結果、抗体の溶解性を増大し及び/又は凝集を阻害する。シールドドメインは、ポリペプチドドメイン、例えば、免疫グロブリンドメイン、すなわち、免疫グロブリンフォールドを含むポリペプチドドメイン、とすることができる。シールドドメインは、CLドメイン(C₁又はC₂)又はサロゲート軽鎖 5タンパク質のIgドメインとすることができる。5タンパク質の例は、ヒト 5のN末端での50個のアミノ酸のユニークな領域が無いヒト 5ドメインであってもよく、又は5タンパク質の例は、ヒト 5のN末端での50個のアミノ酸のユニークな領域に相応する領域が無い非ヒト 5ドメインであってもよい。好ましくは、シールドドメインとはCLドメイン、例えば、C₁であり、その結果、定常領域がCH1:CLドメイン対を含む。対合していない可変ドメインは、例えば、融合タンパク質として、CH1ドメイン又はシールドドメインのいずれかに連結することができる。CH1:CL又はCH1: 5のドメイン対を含む定常領域に連結

40

50

された対合していない可変ドメインに関するこのコア構造は、単離して(その構造からなるタンパク質)提供してもよく、より大きいポリペプチド分子の一部として、任意選択で、更なる抗体定常ドメイン及び/又は機能性部分を含んで、提供してもよい。かかる更なるドメイン及び部分を含めることができるが、本発明の抗体は、抗原を結合するための対合していない可変ドメインを特徴的に含み、その結果、前記可変ドメインと対合して抗原結合部位を提供する任意のポリペプチドドメインが無い。

【0022】

定常領域は2種のポリペプチド鎖を含むことができ、1つはCH1ドメインを含み、1つはシールドドメインを含む。したがって、抗体は、

対合していない可変ドメインを含む第1のポリペプチドと、

第2のポリペプチドと

を含むことができ、

第1のポリペプチドはCH1ドメインを含み、第2のポリペプチドは、CH1ドメインと対合しているシールドドメインを含む、又は

第1のポリペプチドはシールドドメインを含み、第2のポリペプチドはCH1ドメインを含む。

【0023】

例えば、抗体は、

対合していない可変ドメイン(例えば、VHドメイン)及びCH1ドメインを含む第1のポリペプチドと、

CH1ドメインと対合しているシールドドメイン(例えば、CL又は 5)を含む第2のポリペプチドと

を含むことができる。

第1のポリペプチドでは、可変ドメインは好ましくはN末端ドメインであり、これに続いて、隣接するCH1ドメインであることが好ましい。第2のポリペプチドはN末端可変ドメインを欠き、それによって、第1のポリペプチドの可変ドメインを対合していない状態とする。第2のポリペプチドは、シールドドメインを含み、更なるドメインが無いとしてもよく、或いはシールドドメイン及び1つ若しくは複数の更なるドメイン(例えば、Ig定常ドメイン)のC末端伸長及び/又は機能性部分からなることができる。任意選択で、第2のポリペプチドはシールドドメインからなる。

【0024】

或いは、抗体は、

可変ドメイン(例えば、VHドメイン)及びシールドドメインを含む第1のポリペプチドと

、前記シールドドメインと対合しているCH1ドメインを含む第2のポリペプチドと

を含むことができ、

第2のポリペプチドは可変ドメインを欠き、それによって、第1のポリペプチドの可変ドメインを対合していない状態とする。

第1のポリペプチドでは、可変ドメインはN末端ドメインであり、これに続いて、隣接するシールドドメインであることが、好ましい。第2のポリペプチドはN末端可変ドメインを欠き、それによって、第1のポリペプチドの可変ドメインを対合していない状態とする。第2のポリペプチドは、CH1ドメインを含み且つ更なるドメインが無いとしてもよく、或いはCH1ドメイン及び1つ若しくは複数の更なるドメイン(例えば、Ig定常ドメイン)のC末端伸長及び/又は機能性部分からなることができる。任意選択で、第2のポリペプチドはCH1ドメインからなる。

【0025】

CH1ドメインとそのシールドドメインとの対合によって定常領域が形成され、この定常領域は、典型的にはC末端ドメインとして、CH2、CH3及び/又はCH4等の更なるドメインを付加的に含むことができる。第1の又は第2のポリペプチドは、それぞれ、CH1又はシールドドメインのC末端に連結されたCH2-CH3を含むことができる。第1のポリペプチドは、CH1

10

20

30

40

50

-CH2-CH3(例えば、VH-CH1-CH2-CH3)に連結された対合していない可変ドメインを(NからC方向に)含むことができ、第2のポリペプチドは、N末端可変ドメインを欠いて、シールドドメイン(例えば、CL又は λ 5)を含む、又はこれからなることができる。別の例として、第1のポリペプチドは、CH1に連結された対合していない可変ドメイン(例えば、VH-CH1)を(NからC方向に)含むことができ、第2のポリペプチドは、CH2-CH3に連結されたシールドドメイン(例えば、CH2-CH3に連結されたCL又は λ 5)を(NからC方向に)含む、又はこれからなることができる。ドメインは、ペプチド結合又はペプチドリinkerによって直接連結することができる。ヒンジ領域は通常、CH2ドメインの直上流に存在し、その結果、ポリペプチドは、抗体ヒンジ領域を介してCH2-CH3に連結されたCH1ドメイン又はシールドドメインを含むことができる。本発明による抗体の定常領域は、ヒト定常領域とすることができる。天然のヒトIgGの、例えば、ヒトIgG1の定常領域のアミノ酸配列を含む、又はこれからなることができる。或いは、定常領域は、げっ歯類(例えば、マウス定常領域又はラット定常領域)等の非ヒト動物に由来することもできる。本明細書に記載の非ヒト動物では、定常領域は、非ヒト動物のゲノム中の内因性免疫グロブリン遺伝子座によってコードされる内因性定常領域とすることができる。

10

【0026】

本発明の抗体における第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドの例示的な対合(NからC方向にドメインを示す)を、以下のTable 1(表1)

【0027】

【表1】

20

第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
VH-CH1-CH2-CH3	CL
VH-CH1-CH2-CH3	λ 5
VH-CH1	CL-CH2-CH3
VH-CH1	λ 5-CH2-CH3
VL-CH1-CH2-CH3	CL
VL-CH1-CH2-CH3	λ 5
VL-CH1	CL-CH2-CH3
VL-CH1	λ 5-CH2-CH3
VH-CL	CH1-CH2-CH3
VH- λ 5	CH1-CH2-CH3
VH-CL-CH2-CH3	CH1
VH- λ 5-CH2-CH3	CH1
VL-CL	CH1-CH2-CH3
VL- λ 5	CH1-CH2-CH3
VL-CL-CH2-CH3	CH1
VL- λ 5-CH2-CH3	CH1

30

40

Table 1. 第1のポリペプチドと第2のポリペプチドの対

【0028】

に示す。

【0029】

CH2-CH3を含むポリペプチドは、更なるドメインを含むことができる、例えば、一部の

50

抗体アイソタイプは、CH4を含む。

【0030】

所与のCH1:シールドドメイン対では、更なる任意の定常ドメイン(例えば、CH2-CH3)は通常、CH1ドメインとシールドドメインいずれかのうちの一方のみに連結される。しかし、CH2-CH3定常領域は自然に二量体化して抗体Fc領域を形成する。CH2-CH3を含むポリペプチドは、CH2領域間及び/又はCH3領域間の鎖間対合を介してCH2-CH3を含む第2のポリペプチドと会合して、二量体化CH2-CH3を含むFc領域を形成することができる。鎖間ジスルフィド結合が形成することができ、これは通常、天然抗体に存在する。かかる二量体化は、多重の抗原結合部位を含む抗体を産生することができる。例えば、抗体は、2つの対合していない可変ドメインを含むことができ、それぞれが、CH2及び/又はCH3を含む定常領域に連結されている。

10

【0031】

抗体は、2つの第1のポリペプチド及び2つの第2のポリペプチドを含むことができる。第1のポリペプチドと第2のポリペプチドの対は、上のTable 1(表1)に示されるものから独立して選択することができる。抗体は、2つの第1のポリペプチド及び2つの第2のポリペプチドを含むことができ、

各第1のポリペプチドは対合していない可変ドメイン及びCH1ドメインを含み、

各第2のポリペプチドは、CH1ドメインと対合しているシールドドメインを含み、

前記第2のポリペプチドの一方又は両方が可変ドメインを欠く。

【0032】

好ましくは、抗体は2つの対合していない可変ドメインを含む。例えば、4本鎖抗体は、それぞれがCH1:シールドドメイン対に連結された2つの対合していない可変ドメイン(例えば、2つのVHドメイン)、及びFc領域を含むことができる。任意選択で、4本鎖抗体は、2つの第1のポリペプチド及び2つの第2のポリペプチドを含み、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドは両方とも同じドメイン構造、例えば、2つの第1のポリペプチドVH-CH1-CH2-CH3及び2つの第2のポリペプチドCLからなる。したがって、4本鎖抗体は2つの第1のポリペプチドと、第1のポリペプチドはTable 1(表1)に示した第1のポリペプチドのいずれかであり、2つの第2のポリペプチドとを含むことができ、第2のポリペプチドはTable 1(表1)に示した対応する第2のポリペプチドである。2つの第1のポリペプチドは同一のアミノ酸配列を有することができる、すなわち、抗体は同じ第1のポリペプチドの2つのコピーを含むことができる。2つの第2のポリペプチドは、同一のアミノ酸配列を有することができる、すなわち、抗体は、同じ第2のポリペプチドの2つのコピーを含むことができる。或いは、2つの第1のポリペプチドの配列は互いに異なっていてもよく、及び/又は2つの第2のポリペプチドの配列は互いに異なっていてもよい。配列の違いは、任意選択で可変ドメイン内に(例えば、その内だけに)ある、例えば、抗体は、異なる2つの対合していない可変ドメインを含むことができる。

20

30

【0033】

2つの重鎖-軽鎖対を含む完全な4本鎖免疫グロブリンの構造を参照すると、各重鎖はVH-CH1-CH2-CH3を含み、各軽鎖はVL-CLを含み、対合していないVHドメインを有する抗体は、1つ又は両方のVLドメインを除去し、CLドメインを所定位置に残すことによって産生することができる。本発明による抗体は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含むことができ、各重鎖は、VHドメインとCH1ドメインを含む定常領域とを含み、各軽鎖はCLドメインを含み、一方又は両方の軽鎖はVLドメインを欠き、それによって、一方又は両方のVHドメインを対合していない状態とする。逆に、対合していないVLドメインを有する抗体を、一方又は両方のVHドメインを除去し、CH1ドメインを所定位置に残すことによって産生することができる。変形形態は、他の抗体フォーマットを参照して説明することができ、このいくつかについて本明細書で論じる。トランスジェニック動物での発現及び抗原結合に関する選択は、4本鎖抗体が同一の2つの第1のポリペプチド(例えば、同一の2つの重鎖)及び同一の2つの第2ポリペプチド(例えば、同一の2つの軽鎖)から構成される場合に容易となり、なぜなら、これは、マウスやヒト等の動物の抗体産生細胞の表面での抗体の発現、集合、及び提

40

50

示の自然なモードに影響を与えるからである。

【0034】

好ましい実施形態では、抗体の両方のVLドメインが欠失され、それにより、VLドメインが非存在であることを除いては、免疫グロブリンの自然の構造(例えば、IgG又はIgM)を有する4本鎖免疫グロブリンが産生される(図2)。同様に、対合していないVLドメインを有する抗体を、VHドメインを欠失させ、対合CH1:CLドメインを保持することによって生成することができる。

【0035】

本発明による抗体は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含むことができ、

各重鎖は、標的抗原を結合するための対合していないVHドメインとCH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含み、

各軽鎖はシールドドメイン(例えば、CLドメイン)を含み、軽鎖はVLドメインを欠く。

【0036】

軽鎖は、シールドドメインを含み且つ更なるドメインが無いとしてもよく、或いは、シールドドメイン及び1つ若しくは複数の更なるドメインのC末端伸長(例えば、Ig定常ドメイン)及び/又は機能部分からなることができる。任意選択で、軽鎖はシールドドメインからなる。抗体は、VHドメインと対合して抗原結合部位を形成するVLドメイン又は他のドメインが無く、その結果、対合していないVHドメインが標的抗原への結合部位を提供する。

【0037】

任意選択で、CH1ドメイン及びシールドドメイン(例えば、CL)の位置は、天然のヒト抗体におけるそれらの位置に対して交換することができる。2本の結合アームを含む4本鎖抗体では、CH1ドメイン及びシールドドメインの位置は、一方のアームのみにおいて、又は両方のアームにおいて交換することができる。したがって、分子の全体的なフォーマットは対称的であっても非対称的であってもよい。

【0038】

同様に、VHドメインとVLドメインの天然の位置は交換可能であり、その結果、任意選択でVHドメインがシールドドメインに連結されるか、又はVLドメインがCH1ドメインに連結される。

【0039】

異なる抗体鎖フォーマットを組み合わせてヘテロ二量体(例えば、対合していない可変ドメイン及び二本鎖定常領域を含むヘテロ二量体のうちのそれぞれ半分)を形成することができ、任意選択で、ヘテロ二量体は抗原結合に関して二重特異性である。抗体は、1つの抗原又はエピトープに特異的な1つの対合していない可変ドメインと、異なる抗原又はエピトープに特異的な第2の対合していない可変ドメインとを含むことができる。第1の及び第2の抗原又はエピトープをそれぞれ結合することができる対合していない可変ドメインを含む二重特異性抗体はまた、同一フォーマットのポリペプチドの二量体化によって集合させることができる(二量体のそれぞれ半分は、対合していない可変ドメイン及び2本鎖定常領域を含む)。したがって、任意選択で、対合していない可変ドメインのみがアミノ酸配列において異なり、抗体分子は他の点では対称的である。更なる抗原結合領域を任意選択で組み込んで、三重特異性又は更なる次数の多特異性結合を提供することができる。

【0040】

本発明によるポリペプチドドメイン及び抗体はヒトのものであるのが好ましい。対合していない可変ドメインはヒトのものですることができる。抗体は完全ヒト型とすることができる。

【0041】

非ヒト動物ゲノムを、本発明による抗体を産生するように操作することができる。対合していないヒト可変ドメインを含む抗体の生成の場合、これらは、ヒト免疫グロブリン遺伝子が組み込まれているゲノムを有するトランスジェニック動物となるであろう。非ヒト動物は、本発明による対合していない可変ドメインを含む抗体を発現するように操作された免疫グロブリン遺伝子座を含むゲノムを有することができる。そのような動物のBリン

10

20

30

40

50

パ球は、抗原刺激に応答して本発明による抗体を発現することができ、対合していない可変ドメインを含む抗体を、標的抗原を動物に投与することによって生成することができる。対合していない可変ドメインを有する抗体の産生のための非ヒト動物及びこれらの細胞、遺伝子工学によってこれらを作成する方法、及び抗体を生成するための動物又は細胞の使用は全て、本発明の更なる態様を表す。適切な非ヒト動物として、げっ歯類、例えば、マウス及びラット等の実験動物が挙げられる。

【0042】

一実施形態では、本発明による動物、例えばマウスは、1つ若しくは複数の重鎖又はVHドメインを含む抗体を発現し、抗体は、VHドメインと対合してFv領域を形成するVLドメインが無く、重鎖がCH1ドメインを含む(又はVHドメインがCH1ドメインに連結されている)ことを特徴とし、抗体はCH1ドメインと対合しているシールドドメインを含む。

10

【0043】

非ヒト動物又は非ヒト動物細胞のゲノムを、本発明による抗体の発現のために操作することができ、例えば、このゲノムを、

CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数の可変領域遺伝子セグメント、及び

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くシールドドメイン、例えばCLドメインをコードする遺伝子を含むように操作することができる。

20

【0044】

別の実施形態では、本発明による動物、例えばマウスは1つ若しくは複数の重鎖又はVHドメインを含む抗体を発現し、抗体は、VHドメインと対合してFv領域を形成するVLドメインが無く、重鎖がシールドドメインを含む(又はVHドメインがシールドドメインに連結されている)ことを特徴とし、抗体はシールドドメインと対合しているCH1ドメインを含む。

【0045】

非ヒト動物又は非ヒト動物細胞のゲノムを、

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠く、シールドドメイン(例えば、CLドメイン)をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数の可変領域遺伝子セグメント、及び

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子を含むように操作することができる。

30

【0046】

抗原を結合するための対合していないVHドメインを含む抗体の発現の場合、内因性軽鎖可変ドメインの機能的発現を、例えば、ラムダ及び/又はカッパ遺伝子座から可変領域遺伝子セグメントの内因性発現をノックアウトすることによって、動物において不活化することができる。好ましくは、軽鎖遺伝子セグメントのVJ再構成は、本発明による動物のBリンパ球では生じないか、又は非生産的である。VpreBの機能的発現を、場合によっては、例えば、内因性VpreB遺伝子を欠失又は突然変異させてこれを非機能的とすることによって動物において不活化することができ、その結果、動物はVpreBポリペプチドを機能的に発現しない。本発明による動物、細胞(例えば、Bリンパ球)及び抗体は、VLドメイン及びVpreBが無くてもよい。或いは、細胞又は動物(例えば、動物のBリンパ球)におけるVLドメイン及び/又はVpreBの発現は、対合していないVHドメインを含む抗体のその発現と比較して、最小限、例えば、10%未満、任意選択で5%未満とすることもできる。

40

【0047】

本発明による動物は、対合していない可変ドメインを有する抗体を産生するための従来技術のプラットフォームからの方向転換を表す。今まで、単一結合ドメインを含む又はこれらからなる結合分子は、重鎖のみ(又は軽鎖のみ)の抗体という背景で作製され、したがって、重鎖(又は軽鎖)を単離して発現させ、結合部位がVH-VL対によって提供されている抗体と比較して、安定性、溶解性及び/又はその他の特性の喪失に対抗するように分子を

50

操作した。重鎖CH1ドメインによって引き起こされる凝集の問題は、そのドメインを欠失させることによって先に解決され、CH1欠失アプローチに基づいて様々な異なる抗体発見プラットフォームが作製された。本発明は抗体発見プラットフォームを独自に提供するが、この場合、CH1ドメインがシールドドメインと対合することを通してCH1ドメインが保持及び安定化され、その結果、他の面では天然の抗体構造という状況で、天然の4本鎖抗体のCL:CH1対合を反映すること、及び対合していない抗体可変ドメインを提供する免疫グロブリンのレパートリーから単一結合ドメインをin vivoで選択することを可能にする。目的の抗体は、本発明によるトランスジェニック動物で生成された抗体のレパートリーから直接選択することができる。かかる抗体の対合していない可変ドメインもまた、単一ドメイン結合分子の形で、バインダーとして選択及び使用することができ、或いは、それらを、対合していない可変ドメインが抗原結合部位を提供しているキメラ抗原受容体(CAR)等のより大きい結合分子に組み込むことができる。

10

20

30

40

50

【0048】

非ヒト動物又は非ヒト動物細胞のゲノムを、

本発明による重鎖又は第1のポリペプチドを発現することができる第1の免疫グロブリン遺伝子座であって、重鎖又は第1のポリペプチドは可変ドメイン(例えば、VHドメイン)及びCH1ドメインを含む、第1の免疫グロブリン遺伝子座、並びに

本発明による軽鎖又は第2のポリペプチドを発現することができる第2の免疫グロブリン遺伝子座であって、軽鎖又は第2のポリペプチドは前記CH1ドメインと対合しているシールドドメイン(例えば、Cドメイン)を含み、軽鎖又は第2のポリペプチドは可変ドメインを欠く、第2の免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作することができ、

前記それぞれの遺伝子座から発現される重鎖又は第1のポリペプチド及び軽鎖又は第2のポリペプチドは、CH1ドメインとシールドドメインとの会合を通して対合することができ、軽鎖又は第2のポリペプチドにおける可変ドメインの非存在が、重鎖又は第1のポリペプチドの可変ドメインを対合していない状態とする。

【0049】

例えば、非ヒト動物又は非ヒト動物細胞のゲノムを、

ヒトVHドメイン及びCH1ドメインを含む免疫グロブリン重鎖をコードする又はコードするように再構成することができる免疫グロブリン重鎖遺伝子座、並びに

CH1と対合しているシールドドメイン(例えば、ラムダ又はカッパCLドメイン、又は5)を含むポリペプチドを発現するように操作されている免疫グロブリン遺伝子座であって、ポリペプチドは可変ドメインを含まない、免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作することができる。軽鎖のVLドメインをコードする核酸を非存在とすることができ、及び/又は遺伝子座でのV-J再構成を不活化とすることができる。好ましくは、動物は、VLドメインを含む軽鎖の機能的発現を完全に欠いており、したがって、内因性軽鎖遺伝子座を、VLドメインの機能的発現を防ぐように改変することができる。

【0050】

好ましくは、免疫グロブリンの重鎖遺伝子座及び/又は軽鎖遺伝子座は、動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座である。したがって、マウスの染色体12上の内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座(単数)(又は遺伝子座(複数))をヒト重鎖遺伝子座のDNAを含有するように操作することができ、その結果、ヒトVHを含む重鎖を発現する。免疫グロブリン軽鎖遺伝子座(単数)(又は遺伝子座(複数))を、マウス染色体6上の内因性免疫グロブリンカッパ軽鎖遺伝子座及び/又はマウス染色体16上の内因性免疫グロブリンラムダ軽鎖遺伝子座(単数)(又は遺伝子座(複数))とすることができる。CH1と対合するための免疫グロブリンドメイン(シールドドメイン)を、動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座で、ヒト又は内因性の転写制御エレメント(プロモーター/エンハンサー)の制御下で発現させることができる、例えば、CLドメインを含むポリペプチドを内因性軽鎖遺伝子座で発現させることができる。軽鎖遺伝子座はラムダであってもカッパであってもよい。任意選択で、ラムダ遺伝子座とカッパ遺伝子座の両方を、CLドメインを含みVLドメインを欠く軽鎖を発現するように操作

する。

【0051】

本発明による非ヒト動物は、抗原を結合するための対合していないVHドメインを含む抗体を発現するBリンパ球を含むことができ、動物のゲノムは、

CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数の可変領域遺伝子セグメント、及び

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCLドメインをコードする遺伝子を含む。

【0052】

動物のBリンパ球内では、ゲノムは、

CH1ドメインに連結された抗原結合可変ドメイン、及び

CLドメインを含む軽鎖であって、VLドメイン欠き、それによって、抗原結合可変ドメインを対合していない状態とする、軽鎖

を含む抗体を発現するように機能性である。

【0053】

抗原を結合するための対合していないVHドメインを含む抗体を発現するBリンパ球を含む非ヒト動物の作出の場合、適切な方法は、

CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数の可変領域遺伝子セグメント、及び

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCLドメインをコードする遺伝子

を含むように、非ヒト動物細胞(例えば、胚幹細胞又は接合体)のゲノムを操作する工程と

前記細胞から又は前記細胞を含む細胞群から動物を作出する工程とを含む。

【0054】

可変領域遺伝子セグメントは、標的抗原を結合するためのVHドメイン又はVLドメインをコードするように再構成することができる。VHドメインは、1つのV遺伝子セグメント、1つのD遺伝子セグメント及び1つのJ遺伝子セグメントの再構成によって生成され、VHドメインをコードするように再構成するために1つ又は複数のV遺伝子セグメント、1つ又は複数のD遺伝子セグメント及び1つ又は複数のJ遺伝子を含むように、ゲノムを操作することが

できる。最小は1つのV、1つのD、及び1つのJとなるが、より多数のV、D及び/又はJの各遺伝子セグメントを包含すると、より大きい多様性のコード可能なVHドメインがもたらされる。或いは、抗体の対合していない可変ドメインがVLドメインとなる場合、VLドメインをコードするように再構成するために、1つ又は複数のV遺伝子セグメント及び1つ又は複数のJ遺伝子セグメントを含むように、ゲノムを操作することができる。最小は1つのV及び1つのJとなるが、より多数のV及びJの各遺伝子セグメントを包含すると、より大きい多様性のコード可能なVLドメインがもたらされる。

【0055】

好ましくは、遺伝子セグメントはヒトのものである。例えば、ヒト重鎖のV、D及びJの各遺伝子セグメントのフルセットを含めることができる、又はヒト軽鎖のV及びJの各遺伝子セグメントのフルセットを含めることができる。ゲノムは、41のヒト重鎖V遺伝子セグメントを含むことができる。ゲノムはヒト重鎖D遺伝子セグメントを含むことができる。ゲノムは6つのヒト重鎖J遺伝子セグメントを含むことができる。ゲノムは38の軽鎖V遺伝子セグメントを含むことができる。ゲノムは、5つのヒト軽鎖J遺伝子セグメントを含むことができる。好ましくは、CLドメインは、ヒトCLドメイン、例えば、ヒトC_H1又はヒトC_Lである。

【0056】

CLドメインをコードする遺伝子はヒトIg軽鎖遺伝子座の挿入DNAを含むことができ、J-イントロンエンハンサーエレメントを含むイントロンによって分断されている、軽鎖可変領域リーダー配列(例えば、ヒトV_Hリーダー配列)をコードするエクソンとCLドメイン(例

10

20

30

40

50

例えば、ヒトCドメイン)をコードするエクソンとを含む。DNAの転写によって、イントロンが切り出されることになり、それによって2つのエクソンを接合し、したがって、シグナルペプチドをコードする上流(5')リーダー配列に連結されたCLドメインをコードする核酸(例えば、配列番号5のヌクレオチド配列を含む)をもたらす。ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントは機能的に発現されておらず、非存在である場合もあり(動物ゲノムから欠失されているか、含まれていない)、不活化の場合もある。コードされたCLドメインは、配列番号4を含むヒトCドメインとすることができる。コードされた配列は、N末端シグナルペプチド配列番号2が含まれる配列番号6を含む又はこれからなることができ、これは、翻訳後切断されて、Cドメイン配列番号4を残すことができる。図3。

【0057】

ヒト可変領域遺伝子セグメントを、ゲノムの内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座にて挿入することができる。ヒトCLドメインをコードする遺伝子を、ゲノムの内因性軽鎖遺伝子座(例えば、Ig遺伝子座)にて挿入することができる。一実施形態では、ヒト転写制御エレメントがコード配列と一緒に含まれている。しかし、任意選択で、挿入されたヒトDNAを、動物ゲノムにおいて内因性転写制御エレメントの制御下に置くことができる。

一実施形態では、挿入ヒトDNAは、

- (i)内因性制御エレメント;
- (ii)げっ歯類制御エレメント;
- (iii)マウス制御エレメント;
- (iv)ラット制御エレメント;
- (v)霊長類制御エレメント;
- (vi)非ヒト霊長類(例えば、サル)制御エレメント;
- (vii)ヒト制御エレメント;又は

(viii)(i)~(vii)の2つの混合物、かかるヒトとげっ歯類(例えば、マウス又はラット)のエレメント(例えば、ヒトプロモーターとげっ歯類イントロンエンハンサー及び/又は3'遺伝子座エンハンサー)

から選択される1つ又は複数の制御エレメント(例えば、プロモーター及び/又はエンハンサー(イントロンエンハンサー及び/又は3'遺伝子座エンハンサー等の))の制御下にある。

【0058】

別の例では、制御エレメントは哺乳動物のものとするすることができる。

【0059】

内因性Igの重鎖及び/又は軽鎖の発現を、例えば、可変領域遺伝子セグメントの欠失又は不活化によって不活化することができる。一例では、内因性ラムダ遺伝子座は、内因性ラムダ可変ドメイン発現を不活化するように少なくとも100、150又は200kbのDNAの欠失を含む(任意選択で、これは、本明細書に記載のシールドドメインをコードするように改変された内因性カッパ遺伝子座と組み合わせである)。一例では、内因性カッパ遺伝子座は、内因性カッパ可変ドメイン発現を不活化するように少なくとも100、150又は200kbのDNAの欠失を含む(任意選択で、これは、本明細書に記載のシールドドメインをコードするように改変された内因性ラムダ遺伝子座と組み合わせである)。

【0060】

マウス又はマウス細胞のゲノムを、マウス染色体12上の内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、ヒトCH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするヒトDNAの上流に、ヒト可変ドメインをコードするように再構成することができる複数のヒト可変領域遺伝子セグメントの挿入によって改変することができる。同様に、ヒトCLドメイン(例えば、C)をコードするDNAを、マウス染色体6上の内因性Ig軽鎖遺伝子座において挿入することができる。ヒトCLドメイン(例えば、C)をコードするDNAを、代替的又は追加的に、マウス染色体16の内因性IgA遺伝子座において挿入することができる。マウスの重鎖及び軽鎖(及び/又は)の発現を、例えば、コードするDNAの欠失によって又はその発現を非機能的にすることによって、不活化することができる。

【0061】

10

20

30

40

50

本発明による抗体を、本発明の動物において生成することができる。抗体を一般的には、動物のBリンパ球において発現させることになる。対合していない可変ドメインの未感作レポーターが、抗原による免疫の前に動物から得られる。抗原特異的なレポーターが、抗原による免疫の後に得られる。動物における抗体発現Bリンパ球の少なくとも50%(例えば、75%以上、又は全ての抗体発現Bリンパ球)が、本発明による対合していない可変ドメインを含む抗体を発現することができる。動物を標的抗原に免疫原性曝露した後に、標的抗原を結合する対合していない可変ドメインを含む抗体を発現するBリンパ球は、免疫系によって正の選択を受け、増殖及び体細胞超突然変異を経ることになり、その結果、標的抗原を認識する可変ドメインのレポーターを生成する。次いで、1つ又は複数のかかる抗体、又はこれらの抗原結合可変ドメイン、又はそれらのコードされた核酸を、動物から回収し、組換え発現、より大きい抗原結合ポリペプチドへの組み込み、及び/又は治療用途等の下流工程で使用することができ、これらの例を本明細書に記載する。

10

20

30

40

50

【0062】

抗原を結合するための対合していない可変ドメインを含む抗体を生成する方法は、本発明の非ヒト動物を標的抗原による免疫原性刺激に曝露する工程を含むことができる。次いで、抗体及び/又はそれをコードする核酸を動物から単離することができ(例えば、血液、骨髄及び/又は脾臓からBリンパ球を単離することにより)、その結果、可変ドメイン配列(ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列)の特定が可能になる。任意選択で、例えば、1つ若しくは複数のCDRにおいて又は1つ若しくは複数のFRにおいて、非生殖細胞系列フレームワーク残基の生殖細胞系列への復帰変異、可変ドメイン内の残基の挿入、置換又は欠失等の突然変異を配列に導入して、結合親和性等の可変ドメインの特性、又は安定性や溶解性等の物理的特性を洗練させることができる。次いで、1つ又は複数の突然変異を含む可変ドメインをコードするDNAを、例えば、プラスミド、発現ベクター、形質移入ベクター又はクローニングベクター等のベクターで提供することができる。可変ドメインをコードする配列を、可変ドメイン及び1つ又は複数の更なるドメインを含むポリペプチドをコードするより大きい配列の一部として提供することができる。かかるポリペプチドの例には、抗体及びCARが含まれ、これらについては本明細書において他の箇所で詳述されている。好ましくは、可変ドメインはかかるポリペプチドのN末端ドメインであり、これは、免疫グロブリンにおいてその天然の位置であり、可変ドメイン結合部位のCDRを露出させるからである。しかし、他のフォーマットが可能であり、可変ドメインを任意選択でペプチドリinkerを介してN末端ドメインに接続することができ、可変ドメインは、なおもその抗原結合能力を保持することができる。コードする核酸を宿主細胞のゲノムに導入することができ、次いで、組換えDNAを含む細胞を、抗体、単離可変ドメイン又は対合していない可変ドメインを含むポリペプチドの発現のために培養することができる。次いで、抗体、単離可変ドメイン又はポリペプチドを、細胞から又は細胞培養培地から精製し、薬学的に許容される賦形剤を含む組成物に製剤化できるとともに、対合していない可変ドメインが認識する標的抗原を結合することによる処置に適合する疾患及び状態の処置(任意選択で予防的処置)において治療的に使用することができる。コードする核酸、及び/又はこれを含む細胞はまた、潜在的な治療用製品自体を表す。例えば、Tリンパ球を、対合していない可変ドメインを含むCARを発現するように操作することができ、Tリンパ球を、対合していない可変ドメインによって認識される抗原を標的とすることによる免疫療法に使用することができる。

【0063】

本発明による抗体はまた、抗原を結合するために、*in vitro*で、例えば、診断方法において使用することができる。標的抗原を結合する抗体を、標的抗原が試料中に存在するかどうかを検出する方法において、任意選択で標的抗原を定量化するために、又は他の分子に囲まれてその抗原を含む混合物(任意選択で溶液中)から標的抗原を選択するために、使用することができる。抗体を、表面に、例えば、ビーズ又はマトリックスに、任意選択でカラム内に、任意選択で固定化し、抗体:抗原複合体の単離を容易にすることができる。逆に、標的抗原(表面に、例えば、ビーズ又はマトリックスに、任意選択でカラム内に、

任意選択で固定化)を使用して、他の分子(例えば、異なる対合していない可変ドメインを有する他の抗体)に囲まれたその抗体を含む混合物(例えば、溶液)を接触させることにより、その標的抗原を結合することができる本発明の抗体を選択することができる。抗体の対合していない可変ドメインが標的抗原に結合することによって、抗体:抗原複合体が形成され、次いでこれを単離することができる(例えば、溶液から分離する)。1回又は複数の洗浄工程を実施して非結合抗体又は非結合抗原を除去することができる。全体として、抗体:抗原複合体を調製する方法は、

標的抗原を本発明による抗体に *in vitro* で曝露する工程、

対合していない可変ドメインと標的抗原との結合を可能にし、それにより抗体:抗原複合体を形成する工程、及び

抗体:抗原複合体を単離する工程を含むことができる。

【0064】

方法は、抗体:抗原複合体中の抗体又は抗原の配列又は同一性を決定する工程、及び/又は形成される抗体:抗原複合体の数を定量化する工程を更に含むことができる。

【0065】

次に、添付の図面を参照して、本発明についてより詳細に説明する。本文書内の表題は、単にナビゲーションの補助を行うために含まれているものであり、限定的なものとして解釈されるべきではない。別々に記載されている本発明の実施形態は、文脈上指示がある場合を除いて、組み合わせることができる。当業者は、単なる日常的な実験を使用して、本明細書に記載する本発明の特定の実施形態の多くの等価物を付加的に認識するか、又は確認することが可能である。かかる等価物は、添付の特許請求の保護の範囲内にあることが意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1A】(a)2つの重鎖を含み、軽鎖を欠く重鎖のみ抗体(HCAb)を示す図である。各重鎖は、(N末端からC末端方向に)VHドメイン(1)と、ドメインCH1(11)、CH2及びCH3を含む定常領域とを有する。2つの重鎖のCH2-CH3領域は二量体化してFc領域(3)を形成するが、一方、VHドメイン(1)及びCH1ドメイン(11)は対合していない。

【図1B】(b)2つの重鎖を含み、軽鎖を欠くCH1欠失HCAbを示す図である。各重鎖は、(N末端からC末端方向に)ドメインCH2及びCH3を含むがドメインCH1を欠く定常領域に融合したVHドメイン(1)を有する。2つの重鎖の定常領域は二量体化してFc領域(3)を形成し、一方、2つの対合していないVHドメイン(1)は二価の抗原結合に利用できる。

【図2】本発明による抗体の一実施形態を示す図である。抗体は2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む。各重鎖は、(N末端からC末端方向に)VHドメイン(1)と、ドメインCH1(11)、CH2及びCH3を含む定常領域とを有する。2つの重鎖のCH2-CH3領域は二量体化して、Fc領域を形成する(3)。各軽鎖はCLドメイン(4)を含み、更なる任意のドメインを欠く。CLドメイン(4)はCH1ドメイン(11)と対合し、その結果、抗体は2つの重鎖:軽鎖対を含み、Fc領域(3)のH2-CH3を介して4本鎖抗体分子に二量体化している。各重鎖のVHドメイン(1)は対合しておらず、抗体の2つのVHドメインは2価の抗原結合に利用できる。

【図3A】本発明による、C_Hシールドドメインの発現のための免疫グロブリン遺伝子座の構築、及び生成するC_H配列を示す図である。a)90kb欠失を含むヒト_H遺伝子座DNAを有するマウス_H遺伝子座のヒト化によるC_Hシールドドメインをコードする遺伝子の生成の図である。

【図3B】本発明による、C_Hシールドドメインの発現のための免疫グロブリン遺伝子座の構築、及び生成するC_H配列を示す図である。b)シグナルペプチドを有するヒトC_HシールドドメインcDNAの図である。シグナルペプチドをコードする核酸、配列番号1。単離C_Hシールドドメインをコードする核酸、配列番号3。シグナルペプチドを含むC_Hをコードする核酸、配列番号5。

【図3C】本発明による、C_Hシールドドメインの発現のための免疫グロブリン遺伝子座

10

20

30

40

50

の構築、及び生成するC配列を示す図である。c) 翻訳Cシールドドメインの図である。シグナルペプチド、配列番号2。シグナルペプチドの予測切断の後の単離C配列、配列番号4。シグナルペプチドを含むコードされたC配列、配列番号6。

【図4A】未改変ヒト遺伝子座のヒトV1-5配列を示す図である。a) V1-5のcDNA配列番号9。V1-5リーダー配列の核酸配列番号11。

【図4B】未改変ヒト遺伝子座のヒトV1-5配列を示す図である。b) 翻訳されたV1-5。シグナルペプチドを含むコードされたV1-5配列番号10。シグナルペプチド配列番号12。

【図5】SignalPソフトウェアを使用して作製した、本発明によるCシールドドメインにおけるシグナルペプチド切断の予測を示す図である。N末端配列は、残基22と23の間に切断部位を持つ予測シグナルペプチドである。

【図6A】本発明による5シールドドメインの発現のための免疫グロブリン遺伝子座の構築を示す図である。

【図6B】本発明による5シールドドメインの発現のための免疫グロブリン遺伝子座の構築を示す図である。

【図7】ヒトIg重鎖遺伝子座の大きい断片を含有する、マウス染色体12上のマウスIg重鎖遺伝子座の概要を示す図である。ヒトDNAは、M(C μ)からA2(C μ)までの重鎖定常遺伝子のセットをコードする遺伝子上流に、41のV遺伝子セグメントのセット、Dの遺伝子セグメントのセット、及び6つのJ遺伝子セグメントのセットを(5'から3'の順序で)含む。この遺伝子座は、本発明によるトランスジェニック動物又はトランスジェニック動物細胞に存在

することができる。

【図8】V1-5からj5までの欠失を含むヒトIg軽鎖遺伝子座の大きい断片を含有する、マウス染色体6の内因性遺伝子座におけるマウスIg軽鎖遺伝子座の概要を示す図である。ヒトDNAは、C μ 遺伝子上流に、V μ 遺伝子セグメントのセットとシグナルペプチドSPをコードするV1-5のリーダー配列とを(5'から3'の順序で)含む。この遺伝子座は、本発明によるトランスジェニック動物又はトランスジェニック動物細胞に存在することができる。

【図9】マウス染色体16上の不活化マウス遺伝子座の概要を示す図である。

【図10】染色体16から大きい(200kb)ゲノム断片の欠失による内因性マウス遺伝子座の不活化に関するより詳細な計画を示す図である。不活化については、V μ 2、V μ 3、V μ 1に加えてJ μ 2/C μ 2クラスターを除去し、J μ 3/C μ 3及びJ μ 1/C μ 1のクラスターを残す、大きい欠失によって行った。

【図11】マウスリンパ球RNAからのカッパ軽鎖(KLC)及び/又はトランケートされたカッパ軽鎖断片(KCF)のRT-PCR増幅に使用されるプライマーを示す図である。

【図12】ヒトカッパ断片遺伝子座(KCF)、未改変のヒト化カッパ遺伝子座(KLC)、に加えてWTコントロールのRT-PCR分析を示す図である。PCR1では、ヒトC μ のフォワードオリゴ及びリバーズオリゴを使用し(プライマー-HCP428/HCP431)、したがって、両方の遺伝子座から同じ産物が得られる。PCR2では、ヒトV1-5 5'UTRのフォワードオリゴを使用し、ヒトC μ 3'UTRのリバーズオリゴを使用する(プライマー-HCP446/HCP451)。PCR2は、KLC遺伝子座からの全長カッパ軽鎖と比較してKCFについて予想されるより小さいサイズの産物を示す。

【図13】複数のKCF動物からのRT-PCR産物(PCR2)と予測KCF転写物の参照配列との配列アラインメントを示す図であり、正しいV1-5エクソン1/C μ スプライスジャンクションの存在を示す。

【図14】ヒト5導入遺伝子を導入するためのWTマウスカッパ遺伝子座の改変を示す図である。ベクターは、1kbのマウスの3'及び5'相同性アーム、ヒトV μ プロモーター(白いボックス)、ヒトイントロン及びイントロンエンハンサー(縦ハッシュのボックス)及びトランケートされたヒト5(対角ハッシュのボックス)を含む。ベクターはまた、最終的な標的とされた遺伝子座から除去される削除可能なポジティブ/ネガティブ選択カセットを含むことができる。このベクターの標的指向化は、内因性マウスJ μ 1-J μ 5、イントロン

10

20

30

40

50

及びイントロンエンハンサー、及びC をベクターインサートに置き換える。

【図15】マウスカッパ/ヒト 5遺伝子座によって生成される転写物及びタンパク質を示す図である。

【図16a】(a)正常な再構成後のマウスカッパ遺伝子座を示す図である。

【図16b】(b)カッパ断片遺伝子座を生成するための欠失後のマウスカッパ遺伝子座を示す図である。

【図17A】カッパ断片遺伝子座のV 3-2バージョン及びV 3-4バージョンのスプライシングを経たコード配列とタンパク質を示す図である。

【図17B】図17A参照。

【図18】トランケートされたマウスK断片を発現するように標的指向化ベクターによるマウスカッパ遺伝子座の改変を示す図である。ベクターは、およそ1kbのマウス3'及び5'相同性アーム、マウスV プロモーター(垂直ハッシュのボックス)、マウスV イントロンを含むマウスV リーダー(黒色のボックス)、及び部分マウスJ 5(白色のボックス)を含む。ベクターはまた、最終的な標的とされた遺伝子座から除去される削除可能なポジティブ/ネガティブ選択カセットを含むことができる。このベクターの標的指向化は、内因性マウスJ 1-J 5のみを置き換え、その結果、マウスkイントロンエンハンサーを含めてマウスカッパ遺伝子座の残部をインタクトとする。

【図19A】トランケートされたカッパV 6-17又はトランケートされたカッパV 10-96の各断片によって標的とされるマウス遺伝子座からのスプライシングを経たコード配列及びタンパク質産物を示す図である。

【図19B】図19A参照。

【発明を実施するための形態】

【0067】

対合していない可変ドメインを含むポリペプチド

ポリペプチドドメイン間の対合とは、空間的に隣接するドメイン間の接合部分での分子会合を指す。対合には一般に非共有結合(例えば、疎水性及び/又は静電相互作用)が関与するが、ドメインどうしは、例えば、1つ又は複数のジスルフィド結合又は他の分子リンカーを介して付加的に共有結合で連結することができる。対合しているドメインは、任意選択で同じポリペプチドの一部であってもよく、したがって共有結合で連結したものであってもよく、同様に非共有結合で対合したものであってもよく、一次ポリペプチド配列において隣接していても他の1つ又は複数のドメインによって隔てられていてもよい。対合しているドメインの例は、抗体Fv領域のVH:VL対(それぞれVHドメイン及びVLドメインを含む別々のポリペプチドによって形成されているか、又は単鎖Fv(scFv)によって形成されているかにかかわらず)、抗体の重鎖と軽鎖の間のCH1:CL対、及び抗体Fc領域の定常領域間の(CH2-CH3):(CH2-CH3)対、である。対合しているドメインは、ヘテロ二量体であってもホモ二量体であってもよい。拡大すると、対合しているポリペプチドの概念は、例えば、それぞれのポリペプチドのドメインの対合を介して、2つのポリペプチド間の分子会合を含む。例えば、抗体が、対合している重鎖及び軽鎖(又は「重鎖:軽鎖対」)を含んでいると言及される場合もあり、この場合、例えば、重鎖のCH1ドメインは軽鎖のCLドメインと対合している。

【0068】

対合していないドメインは、別のドメインと対合していないドメインである。対合していない可変ドメインは、VHドメイン又はVLドメインのいずれかが除去された抗体Fv領域に相当する。対合していない可変ドメインは、VHであってもVLであってもよい。対合していない可変ドメインは、Fvの背景外で抗原を結合することができる可能性がある。したがって、VHドメインは、抗原結合のために対合しているVLドメインの存在が不要な場合もある。逆に、VLドメインは、抗原結合のために対合しているVHドメインの存在が不要な場合もある。実際、多くの場合、特に可変ドメインが、その対合していない状態で抗原結合に関して選択される場合(トランスジェニックマウスの免疫によってin vivoで抗原特異的抗体を生成する方法等の、本明細書の方法に記載のように)、対合していない可変ドメインは

10

20

30

40

50

、その標的に対して産生された「正常な」抗体からのFv領域の親和性に匹敵する親和性を持って、その標的抗原を特異的に結合することができる。更に、その三次元構造にクレフト又は深い結合ポケットを有するものを含めて、少なくともある特定の範疇の抗原の場合、本発明による対合していない可変ドメインを含む抗体が全Fv領域より好ましい。これは、なぜなら、対合していない可変ドメインの構造がより狭いことによって、抗原内に埋もれるエピトープに到達することができる、より小さい結合部位が提示される一方で、そのようなエピトープは完全なFv領域による結合へとアクセスするのが不能であるか又はアクセスしにくい可能性があるからである。例としての標的抗原及びこれらに対する抗体の産生については、本明細書において他の箇所にて詳述されている。

【0069】

対合とは非共有結合相互作用(任意選択でドメイン間の共有結合によって補足される)を示すが、本明細書での連結への言及は概して共有結合付着を示す。ポリペプチドのドメインは、ペプチド結合又はペプチドリンカーを介して連結することができる。部分は、他の適切な共有結合付着によって連結されている場合もあり、その範囲はタンパク質化学者にとって明らかであろう。

【0070】

ポリペプチドのドメインは、折りたたみ構造、例えば、免疫グロブリンフォールド又は他の安定した立体配座の形を取る配列を含む。ポリペプチドがより長いポリペプチド配列の一部としてドメインを含む場合、ドメインは一般に、ポリペプチドの残部とは独立しているか又は区別可能である三次構造を有することになる。一般に、ドメインは、タンパク質の個別の機能特性を担い、多くの場合、タンパク質の残りの機能及び/又はドメインの機能を喪失することなく、付加し、除去し、又は他のタンパク質に移すことができる。

【0071】

抗体は免疫グロブリンドメインを含み、このドメインは、ジスルフィド結合と疎水性相互作用によって連結された逆平行鎖の2つのシートの「免疫グロブリンフォールド」を有する。本明細書に言及される定常ドメインとは、免疫グロブリン定常ドメイン、例えば、CH1、CH2、CH3又はCLの各ドメインとすることができる。定常領域は、互いに連結及び/又は対合している、1つ又は複数の定常ドメインを含むことができる。抗体定常領域については、本明細書において他の箇所にて詳述されている。

【0072】

ポリペプチドの多重ドメインが本明細書で記述されている場合、文脈上指示がない限り、それらは通常、標準のN末端からC末端の方向で整列されることになる。例えば、そうでないと指示されていない限り、VHドメインとCH1ドメインとを含むポリペプチドは、CH1ドメインの「上流」にVHドメインを含む。ポリペプチドは、VH-CH1等のそのドメイン構造によって表すことができ、この場合、ドメインは、左から右へのN末端からC末端の方向で示される。

【0073】

任意選択で、本発明による抗体又はポリペプチド鎖を、更なるポリペプチド配列に及び/又は標識、タグ、毒素若しくは他の分子に融合又はコンジュゲートして、例えば、免疫サイトカインを形成することができる。例えば、抗体の定常領域又はシールドドメインを、IL-2等のサイトカインに連結することができる。ポリペプチド又はペプチドの配列間の連結を、それら2つの(又はそれ超)配列を直列で含む融合タンパク質を生成することによって、都合よく作製することができる。

【0074】

抗体、可変ドメイン及び特定の抗原結合

本明細書における「抗体」という用語は、モノクローナル抗体(免疫グロブリンFc領域を有する完全長抗体を含めて)、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び単鎖分子、並びに抗体断片を含む。本発明による対合していない可変ドメインを含む抗体は、抗体の1つ又は複数のFv領域を対合していない可変ドメインに置き換えるという改変を条件として、天然又は既知の抗体構造を含むこと

10

20

30

40

50

16nM、4nMにて、チップの捕捉面にわたって試験抗原を通過させる工程;及び

4. 例えば、上で論議のSPR条件下で(例えば、生理学的緩衝剤中25 で)、表面プラズモン共鳴を使用して試験抗原に対する試験抗体/鎖の結合の親和性を決定する工程、

によってSPRを使用して決定する。
SPRを、Biacore(商標)による又はProteOn XPR36TM(Bio-Rad(登録商標)社)を使用する等の、任意の標準SPR装置を使用して行うことができる。

【0079】

捕捉表面の再生は、pH1.7での10mMグリシンで行うことができる。これにより、捕捉された抗体が除去され、表面が別の相互作用に使用できるようになる。結合データは、標準技法を使用して固有の1:1モデルに、例えば、ProteOn XPR36TM分析ソフトウェアに固有のモデルを使用して、適合させることができる。

【0080】

抗体定常領域

抗体の定常領域は、1つ又は複数のヒト定常ドメインを含むことができ、ヒト定常領域とすることができる。例えば、対合していない可変ドメイン(例えば、VLドメイン)を、これのC末端で、抗体軽鎖の定常ドメイン又は定常ドメインに付着させることができる。対合していない可変ドメイン(例えば、VHドメイン)を、これのC末端で、任意の抗体アイソタイプ、例えば、IgG、IgA、IgE及びIgM、並びにIgG1やIgG4等のアイソタイプサブクラスのいずれかに由来する免疫グロブリン重鎖定常領域の全部又は一部(例えば、CH1ドメイン又はFc領域)に付着させることができる。

【0081】

抗体定常領域は、ヒトIgG、IgM、IgA、IgD又はIgEの各定常領域を含むことができる。抗体重鎖定常領域は、ヒト重鎖IgG、IgM、IgA、IgD又はIgEの各定常領域を含むことができる。

【0082】

例示的なヒト定常領域の配列を、添付のTable A(表2)に提供する。

【0083】

或いは、本発明の抗体の定常領域は非ヒト定常領域であってもよい。例えば、抗体をトランスジェニック動物で生成する場合(その例については、本明細書において他の箇所で記載されている)、キメラ抗体を、ヒト可変領域と非ヒト(宿主動物)定常領域とを含んで産生することができる。一部のトランスジェニック動物は完全ヒト型抗体を生成する。他のものは、キメラ重鎖及び完全ヒト型軽鎖を含んで抗体を生成するように操作されている。抗体が1つ又は複数の非ヒト定常領域を含む場合、これらをヒト定常領域に置き換えて、治療組成物としてヒトへの投与により適した抗体を提供することができるが、なぜなら、それによって、それら抗体の免疫原性が低下するからである。

【0084】

免疫グロブリン全体を酵素パインで消化すると、「Fab」断片としても知られている同一の2つの抗原結合断片と、「Fc」断片とがもたらされ、抗原結合活性を持たないが結晶化する能力を有する。本明細書で使用される場合、「Fab」とは、重鎖及び軽鎖のそれぞれの1つの定常ドメインと1つの可変ドメインとを含む抗体の断片を指す。本明細書で「Fc領域」という用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含めて、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するのに使用される。「Fc断片」とは、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のH鎖のカルボキシ末端部分を指す。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列によって決定され、この領域はまた、ある特定のタイプの細胞上に見られるFc受容体(FcR)によって認識される。

【0085】

ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有するトランスジェニック動物

非ヒト動物ゲノムを、ヒトVHドメインの発現のために、1つ又は複数のヒト重鎖V遺伝子セグメント、1つ又は複数のヒト重鎖D遺伝子セグメント及び1つ又は複数のヒト重鎖J遺伝子セグメントを含有するように操作することができる。非ヒト動物ゲノムは、ヒト重鎖の

10

20

30

40

50

V、D及びJの各遺伝子セグメント全てのフルセットを含有することができる。ヒトVDJ遺伝子セグメントを、定常領域に連結されたVHドメインの産生のために、定常領域の上流に挿入することができる。

【0086】

同様に、非ヒト動物ゲノムを、ヒトVLドメインの発現のために、1つ又は複数のヒト軽鎖V遺伝子セグメント及び1つ又は複数のヒト軽鎖J遺伝子セグメントを含有するように操作することができる。遺伝子セグメントは であっても あってもよい。非ヒト動物ゲノムは、ヒト 又は の各遺伝子セグメント全てのフルセットを含有することができる。ヒトVJ遺伝子セグメントを、定常領域に連結されたVLドメインの産生のために、定常領域の上流に挿入することができる。

10

【0087】

本発明の抗体は対合していない形態のVHドメイン又はVLドメインを含むので、ゲノムは、軽鎖遺伝子セグメントの非存在下で(又は軽鎖遺伝子セグメントの発現が不活化されている場合)重鎖遺伝子セグメントを含むことができる、或いはゲノムは、重鎖遺伝子セグメントの非存在下で(又は重鎖遺伝子セグメントの発現が不活化されている場合)、軽鎖遺伝子セグメントを含むことができる。

【0088】

V(D)J遺伝子セグメントの組換えによって、各可変ドメインで組み合わせ多様性が生成される。ヒト重(又は軽)鎖遺伝子セグメントのフルセットを包含することで、ヒト可変ドメインの完全組み合わせ多様性をトランスジェニック動物プラットフォームに組み込むことができる。次いで、こういった可変ドメインの親和性成熟が、体細胞超突然変異及び選択の自然の *in vivo* プロセスを通して進行し、その結果、広範且つ多様な配列レパートリーが提供され、このレパートリーから、望ましい特性を有する抗原特異的可変ドメインを特定し、それらの配列を回収することができる。本明細書に記載の抗体産生プラットフォームは、シールドドメインと対合するCH1の自然の機能を利用し、その結果、完全なヒト重鎖レパートリーを維持することを可能にするとともに、ヒト重鎖を再操作する必要性を回避する。好ましくは、上記重鎖免疫グロブリン遺伝子座は、未改変ヒト重鎖遺伝子座であるか又はこれを含み、且つ/又はヒトで生成されるものにあらゆる点で匹敵するヒト免疫グロブリン重鎖を発現する。このようなプラットフォームは、抗原を結合するための対合していないヒトVHドメインを含む抗体の完全なレパートリーを供給し、その結果、医薬品への開発に適した目的の所望の分子の選択を可能にする。

20

30

【0089】

ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むゲノムを有するトランスジェニック動物を作出する方法は、当技術分野でよく知られている。かかる動物を使用して、医薬品として現在市場に出ているヒト可変ドメインを含むいくつかの抗体を発見及び生産してきたが、開発パイプラインでは更に多数のものがあるという状況である。ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを含有するように非ヒト動物ゲノムを操作する方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO2011/004192(Genome Research Limited社)に記載されている。トランスジェニック非ヒト動物の例として、Kymouse(商標)(例えば、WO2011/004192に記載の)、VelociMouse(登録商標)、OmniMouse(登録商標)、Omni-rat(登録商標)、XenoMouse(登録商標)、HuMabmouse(登録商標)及びMeMo Mouse(登録商標)が挙げられる。

40

【0090】

可変領域に加えて、非ヒト動物のゲノムは、本明細書に記載の抗体の定常領域をコードする。可変領域遺伝子セグメントを含む遺伝子座は、定常領域遺伝子又は複数の遺伝子、例えば、CH1を含む重鎖定常領域(例えば、ドメインCH1、CH2及びCH3を含む)、又はCLを含む定常領域(例えば、ドメインCL、CH2及びCH3を含む)を更に含む。遺伝子座での定常領域はヒト定常領域とすることができる、すなわち、この場合、ドメインはヒト起源のものである。非ヒト動物ゲノムを、1つ又は複数のヒト定常領域遺伝子を含有するように操作することができる。非ヒト動物ゲノムは、ヒト定常領域遺伝子:それぞれM、D、G3、G1、A1、G2、G4、E及びA2の完全なレパートリーを、任意選択でこれらの遺伝子を含有するヒト

50

ゲノムDNAの断片を挿入することにより、含有することができる。

【0091】

定常領域は、C μ から(及び任意選択で含めて)5'-ほとんどの1エクソンまでを含めて;任意選択で、全ての1CH1-3又はCH1-M2エクソンを含めて、ヒトIgH遺伝子座の断片を含むことができる。別の形態では、断片はS μ 又はE μ 由来のものであり、S μ 又はE μ を含むものである。別の形態では、断片は、IgH J-Cイントロンの最初の400、500、600、700 800又は900ヌクレオチド内のポイント由来のものであり、断片は、E μ 及びC μ のイントロンDNA 5'及びこれらと隣接するイントロンDNA 5'を含む。

【0092】

定常領域は、少なくとも1つのIgH C遺伝子セグメント、例えば、C μ 遺伝子セグメント、及び任意選択で、アルファ、デルタ、イプシロン及びガンマ(例えば、ガンマ-1)C遺伝子セグメントのうちの一つ又は複数も、含むことができる。一実施形態では、定常領域は、C μ 及びC γ (例えば、ガンマ-1、ヒトガンマ-1、マウスガンマ-1又はラットガンマ-1 Cの各セグメント)を含む。C μ とC γ の一方又は両方は、非ヒト動物に内因性とすることができる;例えば、C μ は内因性であり、C γ は内因性又はヒトのものである。一例では、C領域の遺伝子セグメントは、ヒト、げっ歯類、ラット又はマウスの各ゲノムのIgH遺伝子座又はIgL遺伝子座に見られるCセグメントの生殖細胞系列の順序である。一例では、C領域の遺伝子セグメントは、マウスゲノムのIgH遺伝子座又はIgL遺伝子座に見られるCセグメントの生殖細胞系列の順序にある。この順序は当業者であれば知られている。

【0093】

一例では、抗体C遺伝子セグメントは、非ヒト動物の内因性セグメントであり、任意選択で、定常領域とは、内因性重鎖遺伝子座での内因性重鎖定常領域、又は内因性軽鎖遺伝子座での内因性軽鎖(カッパ又はラムダ)定常領域である。したがって、動物がマウスである場合、Cセグメントは、染色体12(IgH Cセグメントの場合)、染色体6(Ig Cセグメントの場合)又は染色体16(Ig Cセグメントの場合)上のものである。

【0094】

非ヒト動物ゲノムを、第1の及び第2の遺伝子座を含有するように操作することができ、第1の遺伝子座を、本発明による第1のポリペプチド又は重鎖を発現し、且つ、第2の遺伝子座を、本発明による第2のポリペプチド又は軽鎖を発現するように操作する。第1の及び第2の遺伝子座は同じ染色体上にあっても異なる染色体上にあってもよい。

【0095】

第1の遺伝子座を、遺伝子間領域及び調節エレメントと一緒にVDJセグメントと定常領域遺伝子とを含んで、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の断片を含むように操作することができる。或いは、第1の遺伝子座を、遺伝子間領域及び調節エレメントと一緒にVJセグメントと定常領域遺伝子とを含んで、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座又は軽鎖遺伝子座の断片を含むように操作することができる。

【0096】

V(D)J遺伝子セグメントを、内因性非ヒト動物定常領域である定常領域に連結することができる。これは、内因性免疫グロブリン遺伝子座に内因性定常領域の上流で非ヒト動物ゲノムにヒト可変領域遺伝子セグメントを挿入することによって行うことができる。或いは、定常領域はヒトのものであり、V(D)J遺伝子セグメント及びヒト定常領域を含むヒトDNAを内因性遺伝子座に挿入し、これによって、その遺伝子座を完全にヒト化することができる。ヒト免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子間エレメント及び調節エレメントもまた含まれることが好ましい。

【0097】

ヒト重鎖遺伝子を、染色体12上のマウス重鎖遺伝子座に挿入して、本明細書に記載の、第1のポリペプチドをコードする第1の遺伝子座又は重鎖遺伝子座を提供することができる。図7。

【0098】

第2の遺伝子座を、シールドドメインの発現のために操作することができる。第2の遺伝

10

20

30

40

50

子座は、ヒト 定常領域遺伝子及び任意選択で関連するヒト遺伝子間エレメント及び調節エレメントを含むヒト 軽鎖遺伝子座のDNAを含むことができる。したがって、非ヒト動物ゲノムを、定常領域遺伝子及び調節エレメントを含むヒト 遺伝子座の断片を含むように操作することができる。可変領域遺伝子セグメントの生産的な再構成を、例えば、全てのJ 遺伝子セグメントの欠失によって不活化する。ヒトC 遺伝子を染色体6上のマウス 遺伝子座で挿入することができる。図8。

【0099】

非ヒト動物における内因性Ig遺伝子座(単数)又は遺伝子座(複数)由来の内因性可変領域遺伝子セグメントの発現を、例えば、内因性V(D)J領域を含む一続きのDNAの欠失又は逆位によって不活化することができる。任意選択で、内因性 遺伝子座は未改変である。しかし、内因性 遺伝子座は、場合によっては、不活化することもできる(図9)。

10

【0100】

一例では、ヒト重鎖可変領域DNA及び/又は定常領域DNAを、非ヒト動物(例えば、マウス)の内因性抗体遺伝子座で組み込む。任意選択で、ドナー遺伝子座とレシピエント遺伝子座を整合させ、その結果、ヒト重鎖遺伝子座DNAを内因性重鎖遺伝子座に組み込むことができ、ヒト 軽鎖遺伝子座DNAを内因性 軽鎖遺伝子座に組み込むことができ、ヒト 軽鎖遺伝子座DNAを内因性 軽鎖遺伝子座に組み込むことができるが、このような整合は必須ではない。

【0101】

定常領域は、内因性(例えば、マウス)抗体定常遺伝子セグメントを含むことができる。定常領域は、1つ又は複数のヒト定常遺伝子セグメントを付加的に含むことができる。抗体遺伝子座はIgH遺伝子座とすることができ、定常領域は、内因性C μ 定常遺伝子セグメント及びヒトC 定常遺伝子セグメントを含む。抗体遺伝子座は、IgH遺伝子座とすることができ、C μ (例えば、内因性C μ)の上流に作動可能に連結された内因性S μ を含む。例えば、遺伝子座は、内因性イントロンエンハンサー(例えば、抗体遺伝子座がIgHである場合はE μ ;又は抗体遺伝子座がIg である場合はiE)を含む。遺伝子座は、抗体遺伝子座の内因性3'エンハンサーを含むことができる。

20

【0102】

非ヒト動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座でのヒトDNAの標的とされた組込みの代替形態として、動物ゲノムへのヒトDNAのランダムな組込み、又は内因性免疫グロブリン遺伝子座とは別の(任意選択で、これとは異なる染色体上の)遺伝子座でのヒトDNAの標的とされた組込みが挙げられる。Rosa26遺伝子座は簡便な標的とすることができる。したがって、任意選択で、第1の及び/又は第2の遺伝子座は内因性抗体遺伝子座ではなく、例えば、DNAを動物の生殖細胞系列ゲノムにランダムに挿入したものであってもよい。一実施形態では、定常領域は、外因性抗体定常遺伝子セグメントを含む(したがって、抗体は、内因性抗体定常遺伝子セグメントを含まない)。外因性の定常遺伝子セグメントは、動物と同じ種のものであっても異なる種のものであってもよく、例えば、ヒト定常遺伝子セグメントであってげっ歯類(例えば、マウス又はラット)定常遺伝子セグメントであってよい。

30

【0103】

トランスジェニック非ヒト動物及び非ヒト動物細胞ゲノムは、好ましくは、ヒトV、D及びJの各遺伝子セグメントの完全なレパートリーと全てのヒト定常領域遺伝子に加えてヒトエンハンサーを含有する完全ヒト化型重鎖遺伝子座を含む。ランダム挿入とは対照的に、非ヒト動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座へのヒト免疫グロブリン遺伝子座DNAの*in situ*標的指向化によって、免疫応答の正確且つ精密な調節が容易になる。したがって、本発明のトランスジェニック動物は、標的抗原を含む免疫原性組成物への曝露の後に、体細胞超突然変異及び抗体可変ドメインの親和性成熟を含めて、確固たる免疫応答を提示することができる。内因性マウス重鎖遺伝子座由来のマウス重鎖の発現を、可変領域の逆位及びマウス定常領域をヒト重鎖定常領域ゲノム断片に置き換えることによって不活化することができる。マウス可変領域遺伝子セグメントの欠失は、内因性DNAの置換及び/又は逆位

40

50

の代替形態である。例えば、マウス重鎖V及び/又はJの遺伝子セグメントを欠失することができる。

【0104】

現在では、十分に検証された方法が動物のゲノム工学に利用可能であり、利用可能な技法は引き続き改善されている。ES細胞の操作については、相同組換え又はリコンビナーゼカセット交換によって実施することができる[2; WO2011/004192]及び染色体工学は、接合体でも実施することができる[3]。

【0105】

一実施形態では、第1の遺伝子座を、胚幹細胞(ES細胞)又は前記動物の種のiPS細胞(例えば、マウス細胞)の内因性IgH遺伝子座に可変領域遺伝子セグメントを挿入することによって作製する。続いて、第2の遺伝子座を、導入遺伝子として細胞(又はその子孫細胞又は接合体)のゲノムに導入することができ、導入遺伝子を、細胞又は接合体のゲノムに挿入する。次いで、非ヒト動物を、細胞、接合体、又はそれらの子孫から発生させる。或いは、当技術分野で知られているように、遺伝子座を別々の非ヒト動物細胞(例えば、ES細胞、iPS細胞又は接合体)において操作することができ、この細胞を、その生殖細胞系列DNA中に操作された遺伝子座を含む動物へと発生させ、個々の動物を共に繁殖させて、子孫動物の生殖細胞系列ゲノムにおいて遺伝子座を組み合わせる。したがって、その生殖細胞系列ゲノムが第1の遺伝子座を含む第1の動物とその生殖細胞系列ゲノムが第2の遺伝子座を含む第2の動物を交尾させて、その生殖細胞系列ゲノムが両方の遺伝子座を含む子孫動物を作出する。子孫動物は、本明細書に記載のように、抗体を発現するリンパ球を産生することが観察できる。

10

20

【0106】

本発明による動物は、本明細書に記載のように、第1の遺伝子座又は重鎖遺伝子座についてホモ接合型とすることができ、及び/又は第2の遺伝子座又は軽鎖遺伝子座についてホモ接合型とすることができる。別の形態では、脊椎動物は遺伝子座又はかかる遺伝子座それぞれについてヘテロ接合型である。好ましくは、動物は、ヒト化の重鎖遺伝子座及び軽鎖遺伝子座にてホモ接合型である。動物は、3種の免疫グロブリン遺伝子座全てにて、すなわち、重鎖遺伝子座、遺伝子座及び遺伝子座にてホモ接合型とすることができる。上述の通り、ヘテロ接合型動物を最初に各遺伝子座に対して作出し、繁殖させてダブル又はトリプルホモ接合型動物を作出し(改変遺伝子座の数に応じて)、その結果、安定した繁殖集団が作り出される。トランスジェニック動物の繁殖コロニーを、任意選択で無菌又は特定病原体除去(SPF)条件下で、動物舎に収容することができる。雌雄マウスを別々にグループとしても一緒にグループとしてもよい。

30

【0107】

一例では、本明細書に記載のヒト化重鎖遺伝子座を含むマウス、本明細書に記載のヒト化遺伝子座を含む動物、及び任意選択で本明細書に記載の不活化遺伝子座を含む動物を別々に作出し、次いで一緒に繁殖させて、完全ヒト型重鎖が内因性Ig重鎖遺伝子座で発現し、内因性遺伝子座でのVJ再構成がJ領域の欠失によって不活化され、且つ遺伝子座がC断片を発現する(例えば、配列番号4)、品種を作り出す。図3c。Cは可変ドメイン配列を含有しない。Cはシールドドメインとして機能し、発現した抗体の重鎖のCH1を安定化する。

40

【0108】

マウスの内因性遺伝子座を、不活化(例えば、全体的又は部分的に欠失)することができ、その結果、この遺伝子座はVLドメインを含む軽鎖を発現しない。遺伝子座からの機能的なポリペプチド発現は無いとしてよい。しかし、他の実施形態では、マウスの遺伝子座は未改変であってもよい。遺伝子座からの発現は、マウスでは低レベルのみで天然に存在する。更に、遺伝子座が活性である場合、例えば、遺伝子座がシールドドメイン(例えば、CLドメイン又は5ドメイン)をコード及び発現する場合、遺伝子座を、Bリンパ球における対立遺伝子排除の天然プロセスを通して発現停止することができる。したがって、対立遺伝子排除によって天然に、ゲノムの操作によって、又は他の任意の方法で

50

あろうといずれにせよ、 遺伝子座からの発現を本発明による動物(例えば、マウス)のBリンパ球において発現停止することができる。欠失による遺伝子座の不活化を実施例3に例示する。

【0109】

本明細書の態様は、非ヒト動物がマウスであるという観点から表現されているとすることができるが、他の実験動物又は家畜動物又は他の任意のあらゆる非ヒト脊椎動物が本発明を実施するのに適しているとし得ることを理解されたい。脊椎動物は、げっ歯類、例えば、マウス又はラットとすることができる。他の例では、脊椎動物は、鳥(例えば、ニワトリ)、魚(例えば、サメ又はゼブラフィッシュ)、哺乳動物(例えば、ウサギ)、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ又はヤギ)、又はラクダ科(例えば、ラマ、アルパカ又はラクダ)である。一実施形態では、マウス系統は、129(又は129ハイブリッド)、C57BL6(又はC57BL6ハイブリッド)であるか、又はAB2.1、AB2.2、JM8、BALB/c、又はF1H4 ES細胞株に由来する。

10

【0110】

ノックアウトを使用して、ヒト/非ヒト(例えば、ヒト/マウス)交差反応性抗体へのアクセスを提供することができる。したがって、上記の改変に加えて、内因性標的の発現を、非ヒト動物のゲノムにおいて不活化することができる。得られるノックアウト動物は、標的抗原による免疫に使用することができ、内因性標的を発現する動物と比較して、標的に対するより強い免疫応答(例えば、より高い抗体力価及び/又はより大きい抗体多様性)を生成することができる。これは、なぜなら、標的抗原(例えば、ヒトタンパク質X)が非ヒト動物の内因性標的(例えば、マウスタンパク質X)と相同性を持つ場合、非ヒト動物の免疫レパートリーは、自己抗原に対してネガティブ選択を受けたことになり、その結果、ヒトタンパク質による免疫によって、ヒトタンパク質に対して選択的であり且つ非ヒト動物由来の内因性タンパク質と交差反応性ではない抗体が優勢に生成される、からである。したがって、ノックアウト動物を使用すると、種間で保存されたエピトープを認識するものを含めて、免疫から得られる抗体の多様性が向上し、潜在的に有用な交差反応性の抗体を生成することができる。

20

【0111】

5及びB細胞の発生

Bリンパ球(B細胞)の発生は、免疫グロブリン可変領域遺伝子の秩序だった再構成によって特徴付けられる。重鎖遺伝子セグメントのVDJ再構成後、前駆B細胞(pre-B細胞)が生成される。軽鎖遺伝子セグメントのVJ再構成後、pre-B細胞は細胞表面に、抗原に提示され得るIgMを保有する成熟B細胞に発生する。重鎖及び軽鎖を含む集合抗体はB細胞表面に輸送され、一方、遊離重鎖は70kDaのヒートショックタンパク質シャペロンBiPと会合して小胞体(ER)に保持される。

30

【0112】

B細胞分化の非常に重要なステップとは、重鎖遺伝子セグメントの生産的な再構成から生じる機能的 μ 重鎖を有する細胞の選択的増殖である。これは、 μ 重鎖とサロゲート軽鎖タンパク質 5及びVpreB及びシグナル伝達ヘテロ二量体Ig との会合によって行われ、その結果、pre-B細胞受容体(pre-BCR)を形成する。サロゲート軽鎖は軽鎖の全体にわたる構造を有するが、VpreB(VLに相同)と 5(CLに相同)の非共有結合ヘテロ二量体である。5のN末端領域は、通常のIgドメインの一部ではないエキストラ -鎖を表し、一方、VpreBのIgドメインはカノニカル 鎖の1つを欠く。 5においてエキストラ 鎖によるVpreBの不完全Igドメインの補完が、これらのタンパク質の折畳み及び集合にとってサロゲート軽鎖を作製するのに必要且つ十分である[4]。 5は、pre-B細胞の μ 重鎖にジスルフィド結合することができる。pre-BCR Fab様断片の高解像度構造が2007年に公表され、VpreBと5のユニークな領域が互いにそして重鎖CDR3と相互作用し、その結果、抗体レパートリーの選択に影響を及ぼす可能性があることが示された[5]。

40

【0113】

サロゲート軽鎖はシャペロンとして機能し、ERに存在するBiPをCH1ドメインから変位さ

50

せ、Ig μ と一緒に重鎖 μ を細胞表面にエスコートする[6]。pre-BCRの発現及び形成は、pre-B細胞の増殖性増大をシグナル伝達することにより、pre-B細胞及びB細胞の産生の効率を劇的に改善する。膜結合 μ 鎖の表面提示は、これらの細胞のクローン増殖と軽鎖遺伝子再構成の開始に不可欠である。

【0114】

次いで、サロゲート軽鎖が抑圧され、一方、軽鎖遺伝子セグメントが再構成される。再構成に成功した軽鎖遺伝子の産物は重鎖と対合して、未成熟B細胞の表面に、抗原結合能力を有するBCRを形成する。このような細胞は末梢血及び二次リンパ器官に移動し、その後の抗原との遭遇に備えができていた成熟B細胞へと発生する[7]。VpreB及び μ 5の発現は、pro-B細胞及びpre-B細胞の各段階の後に発現停止するため、これらのタンパク質はBリンパ球に自然には存在しない。

10

【0115】

1996年、Papavasiliou、Jankovic及びNussenzweig[8]が、B細胞発生の誘導のための2つの経路に関する証拠について記載した；サロゲート軽鎖(μ 5)とIgMを通して活性化されるもの、及び通常型の軽鎖(μ 又は μ)とIgMを通して活性化されるものである。研究対象のマウスで μ 軽鎖及び μ 軽鎖の発現がない場合、 μ 5の発現によって、B細胞発生のシグナルを送達するIgMの表面提示がレスキューされた。Gulogluら[9]はまた、重鎖DNAをトランスフェクトしたRAG/ μ 5ダブルロックアウトマウスのB細胞で、重鎖は発現しなかったが、 μ 5又は μ 5免疫グロブリンフォールドに先行するN末端ユニーク領域を排除しているトランケートされた μ 5いずれかをコトランスフェクトした場合、マウスのB細胞表面で発現できることを、後に報告した。

20

【0116】

VpreBノックアウトマウスを使用することで、VpreBが、効率的なB細胞の発生に、特にpre-BCR保有細胞への移行(pre-BIIステージ)に必要であることが示されてきた[7、10]。シグナル伝達にIg μ を必要としなかった重鎖突然変異体を発現するHEK細胞では、VpreBが無い完全 μ 5ポリペプチドの発現は、IgMの表面提示をもたらさなかった。しかし、VpreBが無いトランケートされた μ 5の発現は、IgMの表面提示を可能にした。実際、トランケートされた μ 5のみを発現する細胞におけるIgMの表面提示は、完全サロゲート軽鎖(VpreBと μ 5の両方)を発現する細胞におけるIgMの表面提示に勝った。Ig μ 軽鎖が発現した場合、IgMの表面提示は更により高かった[11]。

30

【0117】

クラススイッチングを受けたアイソタイプにおけるCH1ドメインの選択的欠失
シールドドメインのCH1ドメインを含むポリペプチドとの共発現によって、多大な免疫学的メリットをもたらされ、対合していない可変ドメインを含む抗体の発見がおおいに容易となる。しかし、CH1欠失を保有する定常領域に連結された対合していない可変ドメインを含む抗体を生成することがそれでもなお望ましい状況がある。このことが所望の場合、抗体が(pre-BCR中に存在するCH1欠失を有するのではなく)親和性成熟を経た後に最も実現される。したがって、クラススイッチングを受けた抗体中に存在する重鎖定常領域を、CH1欠失を担持するように選択的に操作することができる。

【0118】

CH1ドメインを、IgM以外の重鎖定常領域遺伝子から任意選択で欠失させ、 μ 定常領域遺伝子中に保持する。IgM重鎖を発現させ、本発明のシールドドメイン(例えば、本明細書の他の箇所で詳述の操作された μ 遺伝子座からの、 μ 5、又はC μ)と組み合わせることができる。その後、CH1欠失非 μ 重鎖(例えば、IgG又はIgA重鎖)を、リンパ球においてクラススイッチング後に発現させることができる。ゲノム改変のこのような組み合わせを含むBリンパ球では、シールドドメインは μ 重鎖のCH1と対合してIgM抗体を形成し、次いで、Bリンパ球でのクラススイッチングが、対合していないVHドメインとCH1ドメインを欠く定常領域とを含む重鎖を有する重鎖のみ抗体、例えば、CH1-欠失IgG及びCH1-欠失IgA、を生成する。WO2013/171505(Kymab Limited社)は、正常なIgM抗体とCH1欠失IgG抗体を発現する非ヒト動物について記載したが、この場合、リンパ球におけるIgMからIgGへの段階特異

40

50

的クラススイッチングは、IgG定常領域由来のCH1の遺伝子欠失を伴い、その結果、IgG重鎖のみ抗体が発現された。参照により本明細書に組み込まれるWO2013/171505の方法及び実施形態を、本発明において用いることができる。

【0119】

一実施形態では、CH1をコードする領域を、非ヒト動物の重鎖遺伝子座(例えば、トランスジェニック動物のヒト化重鎖遺伝子座)中のIgA定常領域遺伝子から欠失させる。CH1ドメインを、非ヒト動物の内因性重鎖遺伝子座に挿入された完全ヒト重鎖遺伝子座との関連において任意選択で欠失させる。IgAは多量に存在し、IgGからIgAへのスイッチングが頻繁に観察される。したがって、IgMアイソタイプの完全重鎖を保持しつつIgAアイソタイプにおいて選択的にCH1を欠失させることより、完全重鎖を有する初期B細胞の発生が可能となり、この細胞は正常な方法で親和性成熟を経て、これに続いて、CH1欠失を伴う重鎖を含むIgA抗体へのアイソタイプスイッチングを受ける。抗体は、このin vivo進化全体を通して対合していない可変ドメイン(例えば、VHドメイン)を含むことができ、その結果、単一の単離された抗原結合ドメインとして有効である可変ドメインのレパートリーのための選択が確実となる。

10

【0120】

二重特異性抗体

本発明による抗体は、二重特異性又は多重特異性の抗原結合を呈することができる。したがって、抗体は、第1の及び第2の対合していない可変ドメインを含むことができ、第1の対合していない可変ドメインは、第1の抗原又はエピトープに特異的に結合し、第2の対合していない可変ドメインは、第2の抗原又はエピトープに特異的に結合する。第1の及び第2の可変ドメインは、それぞれ異なる第1の及び第2の抗原/エピトープに結合するために、互いに異なるアミノ酸配列を有することができる。異なるエピトープは、1つの抗原の又は様々な抗原のエピトープとすることができる。したがって、例えば、第1の対合していない可変ドメインは、抗原A(抗原Bではなく)を特異的に結合することができ、第2の対合していない可変ドメインは、抗原B(抗原Aではなく)を特異的に結合することができる。

20

【0121】

ちょうど、従来技術の「重鎖のみ」抗体が、二重特異性及び多重特異性抗体のためにしばしば選択されたフォーマットであったように、本発明の抗体もまたこの目的に適している。

30

【0122】

単一ポリペプチド鎖の一部として発現可能な対合していない可変ドメイン内に抗原結合部位を提供することには利点があり、なぜなら、異なる可変ドメイン(したがって、異なる抗原結合部位)を含むそのような2つポリペプチドの会合(例えば、共発現後)を通して二重特異性抗体を生成することができるからである。このことは、異なる2つの重鎖:軽鎖対、したがって異なる4つのポリペプチド鎖を含む通常の4鎖二重特異性抗体のより複雑な生成とは対照的であり、これらを一緒に発現させると異なる10の可能性のある抗体分子に集合する可能性があり、これには、ホモ二量体(ホモ二量体抗A結合アーム及びホモ二量体抗B結合アーム)、一方又は両方の軽鎖がHL対間で交換される分子、並びに「正しい」二重特異性ヘテロ二量体構造、が挙げられる。

40

【0123】

本発明の抗体フォーマットによって、抗体が比較的単純な二本鎖又は三本鎖分子として発現することが可能になる。これを定常領域の設計と組み合わせ、所望の二重特異性フォーマットへの集合を強力に助けることができる。

【0124】

二重特異性抗体作製のための「ノブイントゥーホール」技術が、両方とも参照により本明細書に組み込まれる、[12]及び米国特許第5,731,168号に記載された。原理は、一方のH3ドメインが「ノブ」を含有し、もう一方のCH3ドメインが立体的に反対の位置に「ホール」を含有するように、ヘテロ二量体重鎖の対合しているCH3ドメインを操作することである。ノブはCH3ドメイン間の接合部分で小さいアミノ酸側鎖を置き換えることによって

50

創製され、一方、ホールは大きい側鎖を小さい側鎖に置き換えることによって創製される。ノブはホールに挿入するように設計されており、ホモ二量体の形成を不安定にしつつ、様々なCH3ドメインのヘテロ二量体化を助ける。集合して二重特異性抗体を形成する抗体の重鎖と軽鎖の混合物では、したがって、対合しているヘテロ二量体重鎖を有するIgG分子の割合が増加し、その結果、活性分子の収量や回収が上昇する。

【0125】

突然変異Y349C及び/又はT366Wを含めて、IgG CH3ドメインに「ノブ」を形成することができる。突然変異E356C、T366S、L368A及び/又はY407Vを含めて、IgG CH3ドメインに「ホール」を形成することができる。ノブとホールを、任意のヒトIgG CH3ドメイン、例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4の各CH3ドメインに導入することができる。好ましい例はIgG 4である。IgG4は、「P」及び/又は「E」突然変異等の更なる改変を含むことができる。ヒンジ(S228P)の228位での「P」置換は、重鎖のヒンジ領域を安定化する。235位(L235S)でのCH2領域の「E」置換は、FC Rへの結合を無効にする。本発明の二重特異性抗体は、IgG 4 PEヒト重鎖定常領域を含有することができ、任意選択でかかる2つの対合している定常領域を含み、任意選択で、この場合、1つは「ノブ」突然変異を有し、1つは「ホール」突然変異を有する。

10

【0126】

ノブイントゥーホール技術では、二重特異性ヘテロ二量体の対合しているCH3ドメインの接合部分に相補的な分子形状を創製するようにアミノ酸側鎖を操作する工程を伴うが、一方、ヘテロ二量体の形成を促進し且つホモ二量体の形成を妨げる別の方法は、反対電荷有するようにアミノ酸側鎖を操作することである。重鎖ヘテロ二量体のCH3ドメインの会合は、反対に帯電した残基の対合によって助けられるが、一方、対合している正電荷又は対合している負電荷によって、ホモ二量体の形成はエネルギー的に不利となるであろう。WO2006/106905は、2種以上のタイプのポリペプチド(異なる2つ抗体重鎖のヘテロ二量体のような)から構成されるヘテロ多量体を産生する方法について記載したが、ヘテロ多量体会合が調節されるように、前記ポリペプチド間の接合部分を形成するアミノ酸残基における置換を含み、その方法は：

20

(a)1つ又は複数の多量体を形成するポリペプチド間の会合が2種以上のタイプの多量体を形成することができるヘテロ多量体において阻害されるように、本来の核酸からのポリペプチド間の接合部分を形成するアミノ酸残基をコードする核酸を改変する工程；

30

(b)工程(a)によって改変された核酸配列が発現されるように宿主細胞を培養する工程；及び

(c)宿主細胞培養物から前記ヘテロ多量体を回収する工程を、含み、
工程(a)の改変とは、

1つ又は複数のアミノ酸残基を接合部分で置換し、その結果、接合部分を形成する、突然変異残基を含めて2種以上のアミノ酸残基が同種の正電荷又は負電荷を担持するように、
本来の核酸を改変する工程である。

【0127】

これの一例は、重鎖ホモ二量体の接合部分に静電反発力を導入することによって、例えば、CH3ドメインの接合部分で互いに接触するアミノ酸残基を改変することによって、重鎖間の会合を抑制することであり、それには、

40

残基の番号付けはEUの番号付けシステムに準拠するが、

356位と439位、

357位と370位、

399位と409位

が挙げられる。

【0128】

残基のこれらの対のうちの1つ又は複数を、第1の重鎖のCH3ドメインに同様の電荷(両方が正又は両方が負)を有するように改変することにより、重鎖ホモ二量体の対合が静電反

50

発力によって阻害される。第2の(異なる)重鎖のCH3ドメインの残基の同じ対(単数)又は対(複数)を、第1の重鎖の対応する残基と比較して反対電荷を有するように操作することにより、第1の及び第2の重鎖のヘテロ二量体対合が、静電引力によって促進される。

【0129】

一例では、重鎖定常領域CH3接合部分でのアミノ酸を、電荷対を導入するように改変するが、その突然変異はWO2006/106905の表1に列挙されている。CH3接合部分に電荷誘導分子反発力を導入するように重鎖の356位、357位、370位、399位、409位及び439位のアミノ酸を改変することは、意図する二重特異性抗体の形成効率を高める効果がある、ことが報告された。WO2006/106905では、IgG4のCH3ドメインがノブイントゥーホール突然変異で操作されている二重特異性IgG抗体も例示された。

10

【0130】

電荷対の更なる例がWO2013/157954に開示されており、これは、単一の細胞からの、ヘテロ二量体CH3ドメインを含む分子を産生する方法について記載したが、この分子は面を形成することができる2つのCH3ドメインを含む。この方法は、細胞内に、

(a)第1のCH3ドメインを含むポリペプチド鎖であって、EUナンバリングシステムに準拠して366位にK残基を含む第1のCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、をコードする第1の核酸分子、及び

(b)第2のCH3ドメインを含むポリペプチド鎖であって、EUナンバリングシステムに準拠して351位にD残基を含む第2のCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、をコードする第2の核酸分子、

20

を提供する工程を含み、

この方法は、宿主細胞を培養する工程と、2つの核酸分子の発現を可能にする工程と、培養物からヘテロ二量体CH3ドメインを含む分子を収集する工程とを更に含んだ。

【0131】

ホモ二量体形成よりもヘテロ二量体形成を促進するためにポリペプチド鎖における静電相互作用を操作する更なる方法が、WO2011/143545に記載された。

【0132】

CH3-CH3接合部分での操作に関する別の例は、鎖交換操作ドメイン(SEED)CH3ヘテロ二量体である。CH3ドメインは、ヒトIgA CH3配列及びIgG CH3配列の交互のセグメントで構成され、「SEED体」と呼ばれる相補的なSEEDヘテロ二量体の対を形成する[13; WO2007/110205]。

30

【0133】

二重特異性はまた、プロテインA等の精製試薬に結合するためのその親和性を変えるようにCH3ドメインで差次的に改変されているヘテロ二量体化重鎖でも産生されてきた。

WO2010/151792は、

N末端からC末端に、第1のエピトープを選択的に結合する第1のエピトープ結合領域、IgG1、IgG2、及びIgG4から選択されるヒトIgGの第1のCH3領域を含む免疫グロブリン定常領域を含む第1のポリペプチドと;

N末端からC末端に、第2のエピトープを選択的に結合する第2のエピトープ結合領域、IgG1、IgG2、及びIgG4から選択されるヒトIgGの第2のCH3領域を含む免疫グロブリン定常領域を含む第2のポリペプチドであって、

40

第2のCH3領域は第2のCH3ドメインのプロテインAへの結合を低減又は排除する改変を含む、

第2のポリペプチドと

を含む、ヘテロ二量体化二重特異性抗原結合タンパク質について記載した。

【0134】

本発明の抗体は、所望により、これらの技法及び分子フォーマットのいずれも用いることができる。

【0135】

免疫

50

本発明の更なる態様は、標的抗原を特異的に結合する対合していない可変ドメインを含む抗体を産生するための、本明細書に記載の非ヒト動物の使用である。対合していない可変ドメインを含む抗体は、本明細書に記載のように非ヒト動物を標的抗原による免疫原性刺激に曝露する工程によって産生することができる。

【0136】

標的抗原を結合する抗体を産生する方法は、本明細書に記載のようにゲノムを有する非ヒト動物を用意する工程、並びに

(a) 標的抗原で(例えば、抗原を発現する細胞で又は精製された組換え抗原で)で動物を免疫する工程と;

(b) 動物によって生成された抗体を単離する工程と;

(c) 抗原を結合する能力について抗体を試験する工程と;

(d) 抗原を結合する1つ又は複数の抗体を選択する工程とを含むことができる。

10

【0137】

非ヒト動物は、(例えば、ヒト標的抗原のオルソログの)標的の内因性発現が不活化されているノックアウト動物とすることができる。

【0138】

本明細書に記載の非ヒト動物を標的抗原で負荷することができ、次いで、リンパ細胞(B細胞等)を、抗体を発現する動物から回収することができる。リンパ球を骨髄腫細胞株と融合させて不死化ハイブリドーマ細胞株を調製し、このようなハイブリドーマ細胞株をスクリーニング及び選択して、目的の抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を特定する。可変領域をコードする核酸を、単離し、望ましいアイソタイプ定常領域に連結することができる。このような抗体を、CHO細胞等の細胞中で産生することができる。或いは、可変ドメインをコードする核酸を、リンパ球から直接単離してもよい。

20

【0139】

選択された抗体の抗体重鎖可変ドメイン及び/又は抗体軽鎖可変ドメインをコードする核酸を単離することができる。このような核酸は、完全抗体の重鎖及び/又は軽鎖、又は関連する定常領域のない可変ドメインをコードすることができる。上述の通り、コードするヌクレオチド配列はリンパ球から得ることができる。

【0140】

抗体の発見は、対合している抗原結合ドメイン(重鎖:軽鎖対によって提供される)よりもむしろ、対合していない可変ドメイン(重鎖又は軽鎖のいずれかによって提供される)を含む抗体を用いて作業することによって著しく容易になるが、なぜなら、正しく対合している配列の特定が必要ないからである。in vivoでの抗体発見の先行する技法は、B細胞からの可変ドメインのバルク配列決定を含み、これは、「古典的」であるシステムでは、膨大な数のVHドメイン配列及びVLドメイン配列を生成するが、これらの配列については、どのVHドメイン配列がどのVLドメイン配列と対合したかということ把握することが強く望ましい。ペアワイズトラッキングでは、余分な階層による複雑性が増す可能性があり、例えば、分析のために単一細胞をプレートの個々のウェルにソーティングする必要があり、その結果、VH及びVLの配列情報が各細胞から同時に特定される。対照的に、可変ドメイン配列情報がB細胞毎に単一のVHドメイン配列又はVLドメイン配列に含有される場合、抗体配列を、個々の細胞としてではなく、バルクで都合よく処理することができる。免疫動物のB細胞のバルク配列決定を、抗原特異的細胞ソーティングの工程の有無にかかわらず実施することができる。

30

40

【0141】

任意選択で、可変ドメインをコードする核酸が得られると、これを、所望の定常領域又は他のポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列にコンジュゲートさせて、対合していない可変ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸を提供する。

【0142】

免疫哺乳動物が非ヒト定常領域を有するキメラ抗体を産生する場合、この抗体をヒト定

50

常領域に置き換えて、医薬としてヒトに投与した場合に免疫原性が低いことになる抗体を生成することができる。特定のヒトアイソタイプ常領域の提供もまた、抗体のエフェクター機能を決定するのに重要であり、本明細書ではいくつかの適切な重鎖定常領域について論議する。或いは、可変ドメインをコードする核酸を、例えば、CARをコードするために、非抗体ポリペプチドドメインに連結することができる。

【0143】

残基の突然変異及び変異体の作出等の、抗体の重鎖可変ドメイン及び/又は軽鎖可変ドメインをコードする核酸に対する他の変更形態を実施することができる。大規模製造のための抗体配列の最適化、精製の容易化、安定性の強化、又は所望の医薬品製剤への包含適合性の改善を含む、変異体を創製することが望ましいとし得る多くの理由が存在する。タンパク質操作の作業を、例えば、1つのアミノ酸を代替アミノ酸で置換するように、(任意選択で、Cys及びMetを例外とする可能性もあるが、この位置において全ての天然型アミノ酸を含有する変異体を作成するように)、及び機能及び発現へのその影響を監視して最適な置換を決定するように、配列中の1個又は複数の選択された残基において実施することができる。場合によっては、残基をCys又はMetで置換すること、又はこれらの残基を配列に導入することは、そうすることが(例を挙げると、新しい分子内又は分子間のシステイン-システイン結合の形成により)製造上の困難性を生み出す可能性があるため、望ましくない。リード候補が選択され、製造及び臨床開発用に最適化されている場合、その抗原結合特性を可能な限り変化させないこと、又は親分子の親和性及び効力を少なくとも保持することが、一般には望ましいであろう。しかし、親和性、交差反応性、又は中和能力等のキーとなる抗体特性を調節するために、変異体を作成してもよい。

10

20

【0144】

単離された(任意選択で突然変異された)核酸を、宿主細胞、例えば、CHO細胞に導入することができる。次いで、宿主細胞を、可変ドメインを含むポリペプチドの発現のための条件下で培養する。

【0145】

抗体は、細胞表面受容体、例えば、かかる受容体の細胞外ドメインを結合することができる。それらの細胞表面上に抗原又はその所望の断片を発現する細胞(例えば、抗原又は断片をコードする核酸でトランスフェクトされ、その抗原又は断片を高レベルで発現する細胞)を免疫に使用することができる。

30

【0146】

抗原のカテゴリの例として、7回膜貫通受容体、例えば、Gタンパク質結合受容体(GPCR)等の膜貫通受容体が挙げられる。受容体は、細胞外(EC)ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞質側ドメインを含むことができる。ECドメインは、患者に注射された抗体にとってより利用しやすいので、抗体を使用して受容体のECドメインを標的にするのが一般的である。目的の受容体は、ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、増殖因子、細胞接着分子、又は栄養素等のリガンドを結合することができる。標的抗原は、病原体又は感染細胞に結合する抗体(及び単離された対合していない可変ドメイン)を生成するための、病原体の抗原とすることができる。

40

【0147】

多くの想定される状況では、標的抗原はヒト抗原である。

【0148】

本発明により産生された抗体は、ヒト抗原と抗原の非ヒトオルソログを結合することができ、例えば、ヒト抗原とげっ歯類(例えば、マウス又はラット)抗原の両方を結合することができる。本明細書に記載の方法によって生成された抗体を、ヒト及び非ヒト動物の標的抗原への特異的結合を確認するために、試験することができる。したがって、交差反応性抗体を選択することができ、これを、本明細書に記載の他の望ましい特性についてスクリーニングすることができる。

【0149】

内因性抗原(例えば、内因性マウス抗原)の発現が動物においてノックアウトされている

50

当該抗原で当該動物を免疫することを通して、抗原(例えば、ヒト抗原)に対する抗体を生成する方法を、ヒト可変ドメインを含む抗体を生成することができる動物において実施することができる。かかる動物のゲノムを、ヒト可変領域遺伝子セグメント、及び任意選択で内因性定常領域又はヒト定常領域をコードするヒト又はヒト化の免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作することができる。ヒト可変領域遺伝子セグメントの組換えによってヒト抗体が生成され、これは、非ヒト又はヒトの定常領域のいずれかを有することができる。その後、非ヒト定常領域を、抗体がヒトでの *in vivo* 使用を意図する場合、ヒト定常領域によって置き換えることができる。かかる方法及びロックアウトトランスジェニック動物については本明細書の他の箇所及びWO2013/061078に記載されている。

【0150】

コードする核酸及び発現方法

本発明による抗体をコードする、単離された核酸を提供することができる。核酸は、DNA及び/又はRNAとすることができる。合成起源のゲノムDNA、cDNA、mRNA、若しくは他のRNA、又はそれらの任意の組み合わせは、抗体をコードすることができる。

【0151】

本発明は、上の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写カセット又は発現カセットの形態の構築物を提供する。例示的なヌクレオチド配列を、配列表に含める。本明細書に記載のヌクレオチド配列への言及は、文脈が他の意味を必要としない限り、特定の配列を有するDNA分子を包含し、UがTに代わる特定の配列を有するRNA分子を包含する。

【0152】

本発明はまた、抗体をコードする1つ又は複数の核酸を含む組換え宿主細胞も提供する。コードされた抗体を産生する方法は、例えば、核酸を含有する組換え宿主細胞を培養することによる、核酸からの発現を含むことができる。抗体を、そのように得ることができ、適切な任意の技法を使用して単離及び/又は精製することができ、次いで適宜使用することができる。産生方法は、薬学的に許容される賦形剤等の少なくとも1種の更なる成分を含む組成物に産物を製剤化する工程を含むことができる。

【0153】

様々な異なる宿主細胞中のポリペプチドのクローニング及び発現のための系は、よく知られている。適切な宿主細胞には、細菌、哺乳動物細胞、植物細胞、糸状菌、酵母及びバキュロウイルス系、並びにトランスジェニックの植物及び動物が含まれる。

【0154】

原核細胞での抗体及び抗体断片の発現は、当技術分野において十分に確立されている。一般的な細菌宿主は、大腸菌(*E. coli*)である。培養中の真核細胞での発現も、製造のための選択肢として当業者に利用可能である。異種ポリペプチドの発現のために当技術分野において利用可能な哺乳動物細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NSOマウス黒色腫細胞、YB2/0ラット骨髄腫細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞、ヒト胎児由来網膜細胞、他多数が含まれる。

【0155】

ベクターは、プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、及び適宜他の配列を含めて、適切な調節配列を含有することができる。抗体をコードする核酸を宿主細胞に導入することができる。リン酸カルシウム形質移入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リボソーム介在形質移入及びレトロウイルス又は他のウイルス、例えば、ワクシニア又は、昆虫細胞の場合はバキュロウイルスを使用した形質導入を含めて、様々な方法によって、真核細胞に核酸を導入することができる。宿主細胞での、特に真核細胞での核酸の導入については、ウイルスベースの又はプラスミドベースの系を使用することができる。プラスミド系を、エピソーム的に維持してもよく、宿主細胞に又は人工染色体に挿入してもよい。挿入は、単一の又は多重遺伝子座での1つ又は複数のコピーのランダム組込み又は標的化された組込みのいずれかによるものとするすることができる。細菌細胞の場合、適切な技法には、塩化カルシウム形質

10

20

30

40

50

転換、エレクトロポレーション及びバクテリオファージを使用した形質移入が含まれる。導入に続いて、例えば、遺伝子の発現のための条件下で宿主細胞を培養し、次いで任意選択で、抗体を単離又は精製することによって、核酸を発現させてもよい。

【0156】

本発明の核酸を、宿主細胞のゲノム(例えば、染色体)に組み込むことができる。標準的な技法に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列の包含によって、組込みを促進することができる。

【0157】

本発明はまた、抗体を発現させるために、発現系において本明細書に記載の核酸を使用することを含む方法も提供する。

10

【0158】

組成物

本発明による抗体及びそれをコードする核酸を、単離された形態で及び/又は溶液、例えば水性溶液で提供することができる。

【0159】

本発明は、本明細書に開示の本発明の本発明によって得られる又は得ることができる、抗体、二重特異性抗体、ポリペプチド、抗体の重鎖若しくは軽鎖、VHドメイン、VLドメイン、又はそれらのヌクレオチド配列を含む組成物(例えば、医薬組成物又は医学的使用のための組成物)を、更に提供する。

20

【0160】

抗体はモノクローナルであってもポリクローナルであってもよいが、治療的使用のためのモノクローナル抗体として提供されるのが好ましい。それらは、任意選択で異なる結合特異性の抗体を含めて、他の抗体の混合物の一部として提供することができる。

【0161】

本発明による抗体、及びコードする核酸は通常、単離された形態で提供されるであろう。したがって、抗体、VHドメイン及び/又はVLドメイン、並びに核酸を、これらの自然環境又はこれらの生産環境から精製して提供することができる。単離された抗体及び単離された核酸は、これらが自然では会合している物質、例えば、これらがin vivoで共に見いだされる他のポリペプチド又は核酸を含まないか又は実質的に含まない、或いは、かかる調製がin vitroでの組換えDNA技術によるものである場合にこれらが調製される(例えば、細胞培養)環境を含まないか又は実質的に含まない。任意選択で、単離された抗体又は核酸は、(1)これが通常共に見いだされるであろう少なくともいくつかの他のタンパク質を含まないか、(2)同源からの、例えば、同種由来の他のタンパク質を本質的に含まないか、(3)異なる種由来の細胞によって発現されているか、(4)自然界でこれが会合しているポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、又は他の物質の少なくとも約50%から単離されているか、(5)自然界では会合していないポリペプチドと作動可能に会合しているか(共有結合若しくは非共有結合相互作用によって)、或いは、(6)自然界では存在しない。

30

【0162】

抗体又は核酸を、希釈剤又はアジュバントとともに製剤化し、なおも実際の目的のために単離することができ、例えばそれらを、免疫アッセイに使用するためのマイクロタイタープレートをコーティングするのに使用する場合、担体と混合してもよく、療法に使用する場合、薬学的に許容される担体又は希釈剤と混合してもよい。本明細書の他の箇所に記載のように、他の活性成分を治療調製物に含めてもよい。抗体を、in vivoで自然に、又はCHO細胞等の異種真核細胞系によってグリコシル化してもよく、或いは、(例えば、原核細胞での発現によって産生される場合)非グリコシル化してもよい。本発明は、改変グリコシル化パターンを有する抗体を包含する。一部の適用では、望ましくないグリコシル化部位を除去するための改変が、又は、例えば、ADCC機能を向上させるためのフコース部分の除去が、有用である場合がある[14]。他の適用では、CDCを改変するためにグリコシル化の改変をなすことができる。

40

【0163】

50

典型的には、単離された産物は、所与の試料の少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%、又は少なくとも約50%を構成する。抗体は、その自然環境又は産生環境に見いだされる、その治療、診断、予防、研究、又はその他の各使用を妨げるであろうタンパク質又はポリペプチド又は他の汚染物質を実質的に含まないものとすることができる。

【0164】

抗体は、その産生環境の成分から(例えば、天然で又は組換えで)特定、単離、及び/又は回収されたものとするすることができる。単離された抗体は、例えば、当該抗体がFDAによって承認見込みの基準又は承認された基準へと単離されたものであるように、その産生環境からの他の全ての成分との会合がないとすることができる。組換えトランスフェクト細胞から生じるもの等の、その産生環境の汚染成分は、抗体に関する研究、診断、又は治療の各使用を通常には妨げるであろう物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク性又は非タンパク性溶質を含む場合もある。一部の実施形態では、抗体は:(1)例えばローリー法によって決定して、95質量%超の抗体までに、一部の実施形態では、99質量%超の抗体までに、(2)スピニングカップ配列決定装置(spinning cup sequenator)を使用することによって、N末端若しくは内部アミノ酸配列のうちの少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度までに、又は(3)クマシーブルー又は銀染色を使用して、非還元若しくは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性までに、精製されることになる。単離された抗体は、抗体の自然環境のうちの少なくとも1つの成分が存在しないことになるので、組換え細胞内で*in situ*で当該抗体を含む。しかし、通常は、単離された抗体又はそれをコードする核酸は、少なくとも1つの精製工程によって調製されることになる。

10

20

【0165】

対合していない可変ドメインを含むポリペプチド(例えば、抗体)、又はそれをコードする核酸は、患者への所望の投与経路のために、例えば、注射用の液体(任意選択で水性溶液)で製剤化されてもよい。組成物は、医療注射緩衝液と及び/又はアジュバントと組み合わせ、ポリペプチド又は核酸を含んでもよい。様々な送達系が既知であり、本発明の医薬組成物を投与するために使用することができる。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口の各経路が挙げられるが、これらに限定されない。

【0166】

組成物は、希釈剤、賦形剤又は担体を含むことができる。組成物が医薬組成物又は医学的使用のための組成物である場合、希釈剤、賦形剤又は担体は薬学的に許容されるものである。「薬学的に許容される」とは、USA Federal若しくは州政府の規制機関によって承認されたか、又は承認見込みのもの、又はU.S.Pharmacopeia若しくはヒトを含めて動物での使用が一般的に認められている他の薬局方に列挙されたものを指す。「薬学的に許容される担体、賦形剤、又はアジュバント」とは、薬剤と一緒に、例えば、本明細書に記載の任意の抗体、VL又は抗体鎖と一緒に対象に投与することができ、治療量の薬剤を送達するのに十分な用量で投与された場合に、その薬理活性を破壊せず且つ無毒である、担体、賦形剤、又はアジュバントを指す。

30

【0167】

本明細書に記載のポリペプチド又は核酸を含む組成物を、*in vitro*で無菌容器に含有することができる。組成物が、IV注射器に接続されたバッグ又は他の医療容器に存在してもよい。組成物が、バイアル、注射器又は注射デバイス内に存在してもよい。一例では、抗体、ポリペプチド又は核酸に加えて、本明細書に記載の治療方法で使用するためのパッケージ及び取扱説明書を含むキットが提供される。

40

【0168】

本発明は、本明細書に記載の対合していない可変ドメインを含むポリペプチドを含む治療用組成物を提供する。かかるポリペプチドをコードする核酸を含む治療用組成物も提供される。コードする核酸は、本明細書において他の箇所でもより詳細に記載されており、これにはDNA及びRNA、例えば、mRNAが含まれる。本明細書に記載の治療方法では、抗体をコードする核酸の使用、及び/又はかかる核酸を含有する細胞の使用を、抗体自体を含む組

50

成物の代替形態として(又はこれに加えて)使用することができる。任意選択で核酸がゲノムに安定して組み込まれている、抗体をコードする核酸を含有する細胞(例えば、ヒト細胞、例えば、ヒトリンパ球)とは、したがって、患者における治療的使用のための医薬を表す。CARを発現する細胞、例えば、CAR-T細胞が一例である。或いは、本発明の抗体をコードする核酸を、ヒトリンパ球に、任意選択で、意図された患者に由来し*ex vivo*で改変されたリンパ球に導入することができる。任意選択で、メモリーB細胞が使用される。コードする核酸を含有する細胞の患者への投与によって、抗体を発現することができる細胞のリザーバが提供され、これは、単離された核酸又は単離された抗体の投与と比較して、より長期間にわたって治療効果を可能とする。

【0169】

10

キメラ抗原受容体(CAR)

本発明による抗体及び非ヒト動物とは、様々なモジュラー分子設計に組み込むことができる対合していない抗原結合可変ドメインの供給源を表し、その1つはキメラ抗原受容体(CAR)である。CARは、典型的にはT細胞活性化細胞質側ドメインも含む膜貫通受容体において、T細胞活性化部分に融合された抗原結合部分を含む。標的抗原を結合するためのVHドメインを含むCAR-T構造について記載されている[15、16]。

【0170】

したがって、対合していない可変ドメインをT細胞活性化部分に連結して、CARを提供することができる。任意選択で、Tリンパ球をその表面でCARを発現するように操作する。CAR及び細胞はヒトのものであるのが好ましい。

20

【0171】

これらの因子がリンパ器官のT細胞ゾーンの維持に重要であると報告されてきたので、IL-7及びCCL19を発現するようにCAR-T細胞を操作することが望ましいとすることができる[17]。

【0172】

本明細書に記載のように産生された対合していない可変ドメインを使用してヒトCARをコードする核酸を構築した後に、これをヒトT細胞に形質移入すること及び/又はT細胞ゲノムに組み込むことができる。CARの活性は、例えば、同系腫瘍担持動物及び/又はヒト細胞株にCAR-T細胞を導入することによって、及び標的細胞への影響を観察することによって評価することができる。

30

【0173】

本明細書で別段の指定がない限り又は文脈が許す限り、本明細書の任意の対合していない可変ドメインは、VH(重鎖可変ドメイン、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、魚又は鳥のVHドメイン)、VHH(例えば、ヒト化の有無にかかわらずラクダ可変ドメイン)又はVL(カッパVL又はラムダVL等の軽鎖可変ドメイン、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、魚又は鳥のVLドメイン)、とすることができる。

【0174】

本明細書で別段の指定がない限り又は文脈が許す限り、任意の対合していない可変ドメインは、ヒト、ヒト化、キメラ(例えば、マウス-ヒトキメラ又はラット-ヒトキメラ)、げっ歯類(例えば、マウス又はラット)、イヌ、ネコ、ウマ、魚又は鳥の可変ドメインとすることができる。

40

【0175】

本明細書で別段の指定がない限り又は文脈が許す限り、任意の挿入DNA(例えば、重鎖遺伝子座のヒト可変領域DNA)及び/又はシールドドメインコードするDNAは、ヒト、ヒト化、キメラ(例えば、マウス-ヒトキメラ又はラット-ヒトキメラ)、げっ歯類(例えば、マウス又はラット)、イヌ、ネコ、ウマ、魚又は鳥のDNA、好ましくはヒトDNA、とすることができる。例えば、本明細書の任意の重鎖遺伝子座は、Table C(a)(表4、表5)に開示の1つ又は複数の可変領域遺伝子セグメントを含むことができ、又はかかる遺伝子セグメントの少なくとも50%、60%又は90%を含むことができ、又はかかる遺伝子セグメントの全てを含むことができる。

50

【 0 1 7 6 】

シールドドメインの例は、Table C(b)(表6)に示す遺伝子セグメントによってコードされるC である。

【 0 1 7 7 】

適切な抗原(例えば、本発明の動物が免疫される又は本発明の抗体又は可変ドメインが結合する抗原)の一例は、

ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; アグレカン; AGR2; AICDA; AW
 1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AIYIH; AMHR2; ANGPT1; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; AP
 C; APOC1; AR; AZGP1(垂鉛-a-糖タンパク質); B7.1; B7.2; BAD; BAFF; BAG1; BAI1; BCL
 2; BCL6; BDNF; BLNK; BLR1(MDR15); B1yS; BMP1; BMP2; BMP3B(GDF10); BMP4; BMP6; BM
 P8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1(プレクチン); BRCA1; Clorf10(IL27w); C3; C4A; C
 5; C5R1; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2(D6/JAB61); CCL1(I-309); CCL11(エオタキ
 シン); CCL13(MCP-4); CCL15(MIP-id); CCL16(HCC-4); CCL17(TARC); CCL18(PARC); CCL1
 9(MIP-3b); CCL2(MCP-1); MCAF; CCL20(MIP-3a); CCL21(MIP-2); SLC; エクソダス-2; CCL
 22(MDC/STC-1); CCL23(MPIF-1); CCL24(MPIF-2 I エオタキシン-2); CCL25(TECK); CCL2
 6(エオタキシン-3); CCL27(CTACK /ILC); CCL28; CCL3(MIP-1a); CCL4(MIP-1b); CCL5(RA
 NTES); CCL7(MCP-3); CCL8(mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1(CKR1/HM
 145); CCR2(mcp-1RB/RA); CCR3(CKR3/CMKBR3); CCR4; CCR5(CMKBR5/ChemR13); CCR6(CMKB
 R6/CKR-L3/STRL22/DRY6); CCR7(CKR7/EBI1); CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1); CCR9(GPR-9-6)
 ; CCRL1(VSHK1); CCRL2(L-CCR); CD164; CD19; CD1C; CD20; CD200; CD-22; CD24; CD28;
 CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD52; CD69;
 CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CDH1(E-カドヘリン); CDH10
 ; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; C
 DK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A(p21Wap1/Cip1); CDKN1B(p27Kip1); CDKN1C; CDKN2A(p16
 INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; キチナーゼ; CHST10; CKLFS
 F2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7(クラウジ
 ン-7); CLN3; CLU(クラスチリン); CMKLR1; CMKOR1(RDC1); CNR1; COL18A1; COL1A1; COL
 4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSF1(M-CSF); CSF2(GM-CSF); CSF3(GCSF); CTLA4; CTNBN1(b-カ
 テニン); CTSB(カテプシンB); CX3CL1(SCYDi); CX3CR1(V28); CXCL1(GRO1); CXCL10(IP-1
 0); CXCL11(I-TAC/IP-9); CXCL12(SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2(GRO2); CXCL3
 (GRO3); CXCL5(ENA-78 I LIX); CXCL6(GCP-2); CXCL9(MIG); CXCR3(GPR9/CKR-L2); CXCR4
 ; CXCR6(TYMSTR I STRL33 I Bonzo); CYB5; CYC1; CYSLTR1; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118
 ; DNCL1; DPP4; E2F1; EGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; EN
 O1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2(Her-2); EREG; ERK8; ESR1; ESR2; F3(TF); FADD;
 FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1(aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B;
 FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2(bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF2
 3; FGF3(int-2); FGF4(HST); FGF5; FGF6(HST-2); FGF7(KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF
 (VEGFD); FIL1(EPSILON); FIL1(ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1(フィブロネクチン);
 FLT1; FOS; FOSL1(FRA-1); FY(DARC); GABRP(GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-65T;
 GATA3; GDF5; GF11; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2(CCR10); GPR31; GPR44; GPR81(
 FKSG80); GRCC10(C10); GRP; GSN(ゲルゾリン); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; EDAC5; HDAC7A;
 HDAC9; HGF; HIF1A; HIP1; ヒスタミン及びヒスタミン受容体; HLA-A; HLA-DRA; HM74; H
 MOX1; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; 1D2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; I
 FNA7; IFNB1; IFNgamma; TFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6;
 IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2;
 1L13; IL13RA1; IL13RA2; 1L14; 1L15; IL15RA; IL16; 1L17; IL17B; IL17C; IL17R; 1L
 18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; 1L19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F
 8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2 IL1RN
 ; 1L2; 1L20; IL2ORA; IL21R; 1L22; 1L22R; 1L22RA2; 1L23; 1L24; 1L25; 1L26; 1L27;
 1L28A; 1L28B; 1L29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; 1L3; 1L30; IL3RA; 1L4; IL4R; 1L5; IL5RA

; 1L6; IL6R; IL6ST(糖タンパク質130); 1L7; TL7R; 1L8; IL8RA; IL8RB; IL8RB; 1L9; IL9R; ILK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; IRAK2; ITGA1; ITGA2; 1TGA3; ITGA6(a6インテグリン); ITGAV; ITGB3; ITGB4(b 4インテグリン); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; MTLG; KLF5(GCボックスBP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19(ケラチン19); KRT2A; KRTHB6(毛髪特異的I型ケラチン); LAMA5; LEP(レプチン); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS; LTA(TNF-b); LTB; LTB4R(GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG又はOmgp; MAP2K7(c-Jun); MDK; MIB1; ミッドカイン; MIF; MIP-2; MK167(Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3(メタロチオネクチン-ifi); MTSS 1; MUC 1(ムチン); MYC; MYD88; NCK2; ニューロカン; NFKB 1; NFKB2; NGFB(NGF); NGFR; NgR-Lingo; NgR-Nogo66(Nogo); NgR-p75; NgR-Troy; NME1(NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NROB2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR1I2; NR1I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZ1; OPRD1; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAM1; PF4(CXCL4); PGF; PGR; ホスファカン; PIAS2; PIK3CG; PLAU(uPA); PLG; PLXDC1; PPBP(CXCL7); PPID; PR1; PRKCQ; PRKD1; PRL; PROK; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2(COX-2); PTN; RAC2(p21Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110(ZNF144); ROBO2; S100A2; SCGB1D2(リボフィリンB); SCGB2A1(マンマグロビン2); SCGB2A2(マンマグロビン1); SCYE1(内皮単球活性化サイトカイン); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERPINB5(マスピン); SERPINE1(PAT-i); SERPINF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B(Spri); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB1I1; TGFB2; TGFB3; TGFB1; TGFB1R1; TGFB1R2; TGFB1R3; TH1L; THBS1(トロンボスポンジン-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE(Tie-i); TIMP3; 組織因子; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFAIP2(B94); TNFAIP3; TNFRSF1 1A; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6(Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10(TRAIL); TNFSF1 1(TRANCE); TNFSF12(APO3L); TNFSF13(April); TNFSF13B; TNFSF14(HVEM-L); TNFSF15(VEG1); TNFSF1 8; TNFSF4(OX40(OX40)リガンド); TNFSF5(CD40リガンド); TNFSF6(FasL); TNFSF7(CD27リガンド); TNFSF8(CD30リガンド); TNFSF9(4-1BBリガンド); TOLLIP; Toll様受容体; TOP2A(トポイソメラーゼIIa); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VEGF; VEGFB; VEGFC; パーシカン; VHL C5; VLA-4; XCL1(リンホタクチン); XCL2(SCM-1b); XCR1(GPR5/CCXCR1); YY1; 及びZFPM2からなる群から選択される。

10

20

30

40

【 0 1 7 8 】

例えば、抗原は以下のリストから選択される(例えば、抗体又は可変ドメインは、がん又は自己免疫状態を処置するためにヒト又は動物の対象に投与するためのものである): 免疫チェックポイント阻害剤(例えば、PD-L1、PD-1、CTLA-4、TIGIT、TIM-3、LAG-3及びVISTA、例えばTIGIT、TIM-3及びLAG-3)、免疫調節剤(例えば、BTLA、hVEM、CSF1R、CCR4、CD39、CD40、CD73、CD96、CXCR2、CXCR4、CD200、GARP、SIRP、CXCL9、CXCL10、CXCL11及びCD155、例えば、GARP、SIRP、CXCR4、BTLA、hVEM及びCSF1R)、免疫賦活剤(例えば、CD137、GITR、OX40、CD40、CXCR3(例えば、アゴニスト抗CXCR3抗体)、CD27、CD3、ICOS(例えば、アゴニスト抗ICOS抗体)、例えば、ICOS、CD137、GITR及びOX40)。

【 0 1 7 9 】

一例では、本明細書の 5シールドドメインは、配列番号77によってコードされるアミノ酸配列を含む又はそれからなる。

【 0 1 8 0 】

本明細書の例では、本発明の動物は、配列番号77、78、81、83、85、87、89、91、93又は100を含む軽鎖遺伝子座(カッパ又はラムダの遺伝子座)を含む。

【 0 1 8 1 】

本明細書の一例では、本発明の動物は、配列番号82、84、86、88、90又は101を発現する。

50

【0182】

一例では、本発明の動物は、本明細書に記載のカッパ軽鎖遺伝子座(ヘテロ接合型又はホモ接合型状態)を含む。任意選択で、遺伝子座は、内因性V 遺伝子と内因性J 遺伝子との間に欠失を含むが、V エクソン1に加えて、V エクソン2の5'末端及びJの3'末端に内因性スプライスジャンクションを保持する。別の例では、本発明の動物は、可変領域プロモーター、マウス又はヒトのV のリーダー(エクソン1、イントロン、部分エクソン2)に加えてV エクソン2の5'末端及びJの3'末端に内因性スプライスジャンクションを保持するJ の断片をコードする標的指向化ベクターによる、内因性J 遺伝子の置換えを含む。これらの戦略のどちらも結果は、内因性又はヒトのV プロモーター制御下で転写物を発現する遺伝子座であり、これはスプライシングされて、V リーダー配列と部分的J配列を有するC を生成する。この戦略によれば、マウスカッパレパートリーの任意のV 及びJを活用することができる。戦略1では、J 5とともにV 3-2又はV 3-4を使用する。この理由は、V 3-2又はV 3-4が遺伝子座の3'末端に近く、その結果、必要な欠失のサイズを縮小するからであり、加えてマウスでは利用頻度がかかなり高いことが文献で示されてきたからである。カッパ遺伝子座構造の概要については図16を、上記2例の改変遺伝子座からの予測発現配列については図4を参照されたい。V 6-17又はV 10-96をJ 5と一緒に使用することができるが、こういったVは、マウスレパートリーでは最も高度に使用されるものであることが示されてきたからである(参考文献18を参照されたい)。標的指向化戦略/遺伝子座の概要の例については図18を、V 6-17及びV 10-96を使用した予測発現配列については図19を参照されたい。

10

20

【0183】

一例では、改変遺伝子座の全てのノンコーディング性調節エレメントは内因性である。改変カッパ遺伝子座の場合、これは、V /J /C 断片の特異的プロモーター、内因性イントロンエンハンサー(J 5とC の間に位置する)及び内因性 3'エンハンサーを含む。これらの内因性プロモーター/エンハンサーと 遺伝子座からの発現に關与する内因性(例えばマウス)エフェクターとの相互作用は、内因性エフェクターとヒト調節配列との相互作用よりも効果的である可能性があり、したがってより活性化遺伝子座が得られる可能性がある。

【0184】

項

本発明の実施形態を説明する以下の番号付き項は、本明細書の一部である。

30

1. 溶液中の単離された抗体を含む組成物であって、抗体は標的抗原を結合するための対合していない可変ドメインを含み、対合していない可変ドメインは定常領域に連結され、定常領域はCH1ドメインとCH1ドメインを結合するシールドドメインとを含む、組成物。

2. 対合していない可変ドメインは定常領域のCH1ドメインに連結されている、項1に記載の組成物。

3. ヒト可変ドメイン及びCH1ドメインを含む第1のポリペプチドと、

前記CH1ドメインと対合しているシールドドメインを含む第2のポリペプチドであって、可変ドメインを欠き、それによって、第1のポリペプチドの可変ドメインを対合していない状態とする、第2のポリペプチドと、

40

を含む、組成物。

4. 第1のポリペプチドは、VH-CH1-CH2-CH3を含む免疫グロブリン重鎖である、項3に記載の組成物。

5. 第2のポリペプチドはシールドドメインからなる、項3又は4に記載の組成物。

6. シールドドメインはCLドメインである、項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

7. CLはC である、項6に記載の組成物。

8. CLはC である、項6に記載の組成物。

9. シールドドメインは 5免疫グロブリンドメインである、項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

10. Fc領域を含む、項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

50

11. 対合していない可変ドメインはVHドメインである、項1から10のいずれか一項に記載の組成物。
12. 前記対合していない可変ドメインの2つを含む4本鎖抗体である、項1から11のいずれか一項に記載の組成物。
13. 溶液中の単離された抗体を含む組成物であって、抗体は2つの第1のポリペプチド及び2つの第2のポリペプチドを含み、
各第1のポリペプチドはヒト可変ドメインとCH1ドメインを含み、
各第2のポリペプチドは、第1のポリペプチドのCH1ドメインと対合しているシールドドメインを含み、
前記第2のポリペプチドの一方又は両方が可変ドメインを欠き、それによって、第1のポリペプチドの一方又は両方の可変ドメインを対合していない状態とする、組成物。 10
14. 両方の第1のポリペプチドの可変ドメインは対合していない可変ドメインである、項13に記載の組成物。
15. 各前記第1のポリペプチドはVHドメインを含む、項13又は14に記載の組成物。
16. 各前記第1のポリペプチドはVH-CH1-CH2-CH3を含む、項13から15のいずれか一項に記載の組成物。
17. 2つの第1のポリペプチドは同一である、項13から16のいずれか一項に記載の組成物。
18. 2つの第2のポリペプチドは同一である、項13から17のいずれか一項に記載の組成物。 20
19. 各前記第2のポリペプチドはシールドドメインからなる、項13から18のいずれか一項に記載の組成物。
20. シールドドメインはCLドメインである、項13から19のいずれか一項に記載の組成物。
21. CLはC である、項20に記載の組成物。
22. CLはC である、項20に記載の組成物。
23. シールドドメインは 5免疫グロブリンドメインである、項13から19のいずれか一項に記載の組成物。
24. 重鎖及び軽鎖を含む抗体であって、
重鎖は、標的抗原を結合するための対合していないヒトVHドメインと、CH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含み、
軽鎖はCLドメインを含み、
軽鎖はVLドメインを欠き、それによって、VHドメインを対合していない状態とする、抗体。 30
25. 2つの重鎖及び2つの軽鎖を含み、
各重鎖は、ヒトVHドメインと、CH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含み、
各軽鎖はCLドメインを含み、
一方又は両方の軽鎖はVLドメインを欠き、それによって、一方又は両方のVHドメインを対合していない状態とする、項24に記載の抗体。
26. 2つの重鎖及び2つの軽鎖を含み、 40
各重鎖は、標的抗原を結合するための対合していないヒトVHドメインと、CH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含み、
各軽鎖はCLドメインを含み、軽鎖はVLドメインを欠く、項25に記載の抗体。
27. 2つの対合していないVHドメインは同じ抗原又はエピトープを結合する、項26に記載の抗体。
28. 2つの対合していないVHドメインはアミノ酸配列が同一である、項26又は27に記載の抗体。
29. 2つの第1のポリペプチドは配列が同一である及び/又は2つの第2のポリペプチドは配列が同一である、項25から28のいずれか一項に記載の抗体。
30. 重鎖定常領域は、CH1ドメイン及び1つ又は複数の更なるCHドメインを含む、項24か 50

ら29のいずれか一項に記載の抗体。

31. 重鎖定常領域はCH2ドメイン及びCH3ドメインを含む、項30に記載の抗体。

32. CLはC である、項24から31のいずれか一項に記載の抗体。

33. CLはC である、項24から28のいずれか一項に記載の抗体。

34. 軽鎖はCLドメインからなる、項24から33のいずれか一項に記載の抗体。

35. 重鎖定常領域はヒト重鎖定常領域である、項24から34のいずれか一項に記載の抗体

。

36. CLはヒトC 又はヒトC である、項24から35のいずれか一項に記載の抗体。

37. CLは配列番号4のヒトC 配列を含む、項36に記載の抗体。

38. CLは配列番号4のヒトC 配列からなる、項37に記載の抗体。

10

39. 抗体はIgGである、項1から23のいずれか一項に記載の組成物又は24から38のいずれか一項に記載の抗体。

40. 抗体はIgMである、項24から38のいずれか一項に記載の抗体。

41. 抗体は完全ヒト型抗体である、項1から40のいずれか一項に記載の組成物又は抗体。

42. 対合していない可変ドメインはヒト抗原を結合する、項1から41のいずれか一項に記載の組成物又は抗体。

43. 対合していない可変ドメインは受容体の細胞外ドメインを結合する、項1から42のいずれか一項に記載の組成物又は抗体。

44. 項1から43のいずれか一項に記載の抗体又はそのポリペプチド若しくは対合していない可変ドメインをコードする核酸。

20

45. 標的抗原を結合するためのヒトVHドメインと、CH1ドメインを含む重鎖定常領域とを含む重鎖、及び

可変ドメインを欠く、CLドメインを含む軽鎖

をコードするヌクレオチド配列を含む、項44項に記載の核酸。

46. 軽鎖は、C 定常ドメインに融合したシグナルペプチドを含む、項45に記載の核酸。

47. 軽鎖は配列番号6を含む、項46に記載の核酸。

48. 軽鎖をコードする配列番号5のヌクレオチド配列を含む、項47に記載の核酸。

49. 項44から48のいずれか一項に記載の核酸をゲノム中に含む、非ヒト動物又はその細胞。

50. 項1から43のいずれか一項に記載の抗体を発現するBリンパ球を含む非ヒト動物。

30

51. 免疫原性刺激をすると、動物中の抗体発現Bリンパ球の少なくとも50%が、項1から43のいずれか一項に記載の抗体を発現する、項50に記載の動物。

52. Bリンパ球は、VLドメインを含む軽鎖の機能的発現を欠く、項50又は51に記載の動物

。

53. CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数のヒト可変領域遺伝子セグメント、及び

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCLドメインをコードする遺伝子、又は5の免疫グロブリンドメインをコードする遺伝子

を含むゲノムを有する非ヒト動物細胞。

40

54. 抗原を結合するための対合していないヒトVHドメインを含む抗体を発現するBリンパ球を含む非ヒト動物であって、動物のゲノムは、

CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数のヒト可変領域遺伝子セグメント、及び

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCLドメインをコードする遺伝子、又は5の免疫グロブリンドメインをコードする遺伝子

を含む非ヒト動物。

5免疫グロブリンドメインは、ヒト、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ又は哺乳動物、脊椎動物の各ドメインとすることができる。5免疫グロブリンドメインは、本明細書に記載のトランケート化を有するドメインであってもよい。

50

55. 抗原を結合するための対合していないヒトVHドメインを含む抗体を発現するBリンパ球を含む非ヒト動物を作出する方法であって、

CH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするDNAの上流に、可変ドメインをコードするように再構成することができる複数の可変領域遺伝子セグメント、及び

可変領域遺伝子セグメントの機能的発現を欠くCLドメインをコードする遺伝子、又は5の免疫グロブリンドメインをコードする遺伝子

を含むように、非ヒト動物細胞のゲノムを操作する工程と、

前記細胞から又は前記細胞を含む細胞群から動物を作出する工程とを含む方法。

56. 細胞は胚幹細胞又は接合体である、項53に記載の細胞又は項55条記載の方法。

10

57. 複数の可変領域遺伝子セグメントは、VHドメインをコードするように再構成することができる、1つ又は複数のV遺伝子セグメント、1つ又は複数のD遺伝子セグメント及び1つ又は複数のJ遺伝子セグメントを含む、項53から56のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

58. 1つ又は複数のV遺伝子セグメント、1つ又は複数のD遺伝子セグメント及び1つ又は複数のJ遺伝子セグメントは、多重ヒトV遺伝子セグメント、多重ヒトD遺伝子セグメント及び多重ヒトJ遺伝子セグメントを含む、項57項に記載の動物、細胞又は方法。

59. 複数の可変領域遺伝子セグメントは、動物の内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座にある、項53から58のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

60. CLドメインはヒトのCLドメインである、項53から59のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

20

61. ヒトCLドメインはヒトC_H1である、項60に記載の動物、細胞又は方法。

62. CLドメインをコードする遺伝子は、J-Cイントロンエンハンサーエレメントを含むイントロンによって分断されている、軽鎖可変領域リーダー配列をコードするエクソン及びCLドメインをコードするエクソンを含み、コードされたCLドメインはN末端シグナルペプチドを含む、項53から61のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

63. CLドメインをコードする遺伝子は、ヒトJ-C_H1イントロンエンハンサーエレメントを含むイントロンによって分断されている、ヒトV_H1リーダー配列をコードするエクソン及びヒトC_H1ドメインをコードするエクソンを含み、コードされたCLドメインは、N末端シグナルペプチドを含むヒトC_H1ドメインである、項62に記載の動物、細胞又は方法。

30

64. ヒトC_H1ドメインは配列番号4又は配列番号6を含む、項63に記載の動物、細胞又は方法。

65. CLドメインをコードする遺伝子の転写が、配列番号5を含む核酸を産生する、項64に記載の動物、細胞又は方法。

66. CLドメインをコードする遺伝子は動物の内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にある、項53から66のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

67. 内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座は内因性Ig_κ遺伝子座である、項66に記載の動物、細胞又は方法。

68. 内因性免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントの発現が不活化されている、項53から67のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

40

69. 内因性免疫グロブリン軽鎖の発現が不活化されている、項69に記載の動物、細胞又は方法。

70. 内因性免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの発現が不活化されている、項53から66のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

71. 内因性免疫グロブリン重鎖の発現が不活化されている、項70に記載の動物、細胞又は方法。

72. 動物はげっ歯類である、項53から71のいずれか一項に記載の動物、細胞又は方法。

73. 動物はマウス又はラットである、項72に記載の動物、細胞又は方法。

74. ヒトCH1ドメインを含む免疫グロブリン定常領域をコードするヒトDNAの上流で、ヒト可変ドメインをコードするように再構成することができる複数のヒト可変領域遺伝子セ

50

グメントが、マウス染色体12上の内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において挿入され、マウス重鎖の発現が不活化されている。項73項に記載の動物、細胞又は方法。

75. ヒトC ドメインをコードする遺伝子がマウス染色体6上の内因性Ig 軽鎖遺伝子座において挿入され、マウスIg 軽鎖の発現が不活化されている、項73又は74に記載の動物、細胞又は方法。

76. 項55から75のいずれか一項に記載の方法によって作出された動物。

77. 動物のBリンパ球が項1から43のいずれか一項に記載の抗体を発現する、項54から76のいずれか一項に記載の動物又は方法。

78. 免疫原性刺激をすると、動物中の抗体発現Bリンパ球の少なくとも50%が、項1から43のいずれか一項に記載の抗体を発現する、項77に記載の動物又は方法。

79. 項49から52、54又は57から78のいずれか一項に記載の動物を標的抗原による免疫原性刺激に曝露する工程を含む、抗原を結合するための対合していないVHドメインを含む抗体を生成する方法。

80. 抗体又はそれをコードする核酸を動物から単離する工程を含む、項79に記載の方法

81. 抗体の対合していない可変ドメイン又はそれをコードする核酸の配列を決定する工程を含む、項79又は80に記載の方法。

82. 可変ドメインをコードする核酸のヌクレオチド配列に1つ又は複数の突然変異を導入する工程を含む、項80又は81に記載の方法。

83. コードする核酸を含むDNAベクターを用意する工程を含む、項81又は82に記載の方法

84. 核酸は、可変ドメイン及び1つ又は複数の更なるドメインを含むポリペプチドをコードする、項83に記載の方法。

85. コードする核酸を組換え宿主細胞にクローニングする工程を更に含む、項80から84のいずれか一項に記載の方法。

86. 可変ドメインを含むポリペプチドの発現のために細胞を培養する工程を更に含む、項85に記載の方法。

87. 細胞又は培養培地からポリペプチドを回収する工程及び精製する工程を含む、項86に記載の方法。

88. ポリペプチドは、単離可変ドメイン、抗体、又はキメラ抗原受容体である、項84から87のいずれか一項に記載の方法。

89. ポリペプチドを、薬学的に許容される賦形剤を含む組成物に製剤化する工程を含む、項87又は88に記載の方法。

90. 療法による人体の処置に使用するための、項1から43のいずれか一項に記載の抗体。

91. 項1から43のいずれか一項に記載の抗体に標的抗原を *in vitro* で曝露する工程、対合していない可変ドメインの標的抗原への結合を可能にし、それにより抗体:抗原複合体を形成する工程、及び

抗体:抗原複合体を単離する工程

を含む、抗体:抗原複合体を調製する方法。

【実施例】

【0185】

実験例

(実施例1)

C を含みVLドメインが無いヒトIg軽鎖を発現するように操作されたマウスゲノム

マウスを、C ドメイン断片を含むトランケートされた 軽鎖が、対合していないVHドメインを含む完全ヒト型重鎖のCH1と対合している抗体を発現するように操作する。図2。

【0186】

マウスは、マウス染色体12上にヒト化重鎖遺伝子座(図7)、マウス染色体6上に改変された完全ヒト化型 遺伝子座(図8)、及び染色体16上に活性若しくは不活化内因性 遺伝子座又は不活化ヒト化 遺伝子座(図9)を含有する。

10

20

30

40

50

【0187】

このマウスでは、ヒト化 遺伝子座が改変されて、正常なvj再構成を不活化し、代わりにC ドメイン断片を発現する。

【0188】

ヒト 遺伝子座の大きい欠失(およそ90kb)によって、V 1-5からJ 5のエクソン2を包含する90kb断片が除去される。これにより、V 2-4、V 7-3、V 5-2、V 4-1、J 1、J 2、J 3、J 4及びJ 5の全てが除去されるが、V 1-5シグナルペプチドの大部分をコードするV 1-5のエクソン1、エンハンサー及びC 遺伝子をそのままとする。したがって、後者のエレメントはインタクトの状態に残る。上流のV遺伝子セグメントは、J遺伝子セグメントの完全なセットの非存在下では再構成することができない。したがって、正常な VJ組換えは不活化されている。したがって、残りのV 1-5エクソン1(すなわち、リーダー配列)はC 上へとスプライシングされ、シグナルペプチドを含むC ポリペプチドをコードする新規転写物を創製する(図3)。

10

【0189】

本発明の改変された 遺伝子座のヌクレオチド及びタンパク質の配列(図3b、3c)を、未改変ヒトV 1-5配列(図4a、4b)と比較することができる。

【0190】

C 断片転写物と生成するタンパク質の配列は、シグナルペプチドの予測切断部位を含む(図5)。シグナルペプチドの切断後、C は抗体重鎖のCH1ドメインと対合することができ、その適切な折畳みと安定化が可能になる。

20

【0191】

改変された 遺伝子座を、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及び修復テンプレートを提供して所望の欠失を促進することによって、生成することができる。遺伝子欠失は、ヒト化 遺伝子座を含むマウス細胞で、例えば、ヒト化 遺伝子座を含有するマウス胚幹細胞で実施することができ、又は、ヒト化 遺伝子座をゲノム中に含むマウス由来の接合体に試薬を注入することができる。

【0192】

次いで、所望のC 遺伝子座を有する動物を、完全型ヒト重鎖遺伝子座を含有する動物と交尾させて、対合していないVHドメインを含む完全ヒト型抗体を生成することができるマウスを作出する。

30

【0193】

遺伝子座は、このプラットフォームでは未改変であるか不活化されているか、いずれかとしてよい。

【0194】

データを実施例4に提示する。

【0195】

(実施例2)

CH1と 5シールドドメインとの対合

軽鎖の非存在では、Ig重鎖はB細胞表面で発現しないことが知られている。しかし、 5は、骨髄でのB細胞の初期発生を超えた段階で発現した場合、Ig重鎖の表面発現をレスキューすることができる。VpreBの非存在下で表面IgM提示をレスキューすることができる[11]、トランケートされた 5タンパク質が特に適していると思われる。ヒト 5のN末端での50個のアミノ酸のユニークな領域は、VpreBの非存在下で 5折畳みの割合を制限すると考えられる[4]。このN末端ユニーク領域を欠く 5の免疫グロブリンドメインは、重鎖定常ドメインCH1を結合し、その結果、本発明におけるシールドドメインを表す。 5は、その天然シグナルペプチド、又はV 1-5リーダー配列又は 1リーダー配列によってコードされるもの等の非天然シグナルペプチドを含む。シグナルペプチドは翻訳後に切断することができる。

40

【0196】

軽鎖 免疫グロブリン遺伝子座のJ 領域を、 5免疫グロブリンドメインをコードする

50

遺伝子に置き換えることによって、 κ 5発現がIg 遺伝子座の制御下に置かれる。5kbの置換えで十分である。 κ 5 折畳みに先行する 鎖(J)を保持することができる。或いは、Igドメイン自体のみを含めて、これを省略する。サロゲート軽鎖の関連において、このJ鎖はVpreB Igドメインの失われた 鎖を供給する[4、5]。VpreBはIg (又はIg)軽鎖の発現中には発現せず、したがって、 κ 5はVpreBの非存在下で発現することになる。

【0197】

図6に、ヒト κ 5導入遺伝子を導入するための標的指向化ベクターによるヒト化カップタ遺伝子座の改変を示す。このベクターは、マウスの3'及び5' 相同性アーム、ヒトV プロモーター、ヒトイントロン及びイントロンエンハンサー、並びにトランケートされたヒト κ 5を含む。このベクターの標的指向化は、ヒトJ 1-J 5、イントロン及びイントロンエンハンサー並びにC をベクターインサートに置き換える。

【0198】

上記の改変を含むヒトIg 遺伝子座を非ヒト動物、例えばマウスのゲノムに挿入して、ヒトIg 転写制御エレメントの制御下でヒト κ 5遺伝子を発現するトランスジェニック動物を作出する。ヒトDNAを、動物の内因性Ig 遺伝子座に、又は動物ゲノムの独立(異所性)遺伝子座に挿入する。動物ゲノムにおける 及び/又は の軽鎖遺伝子座の不活化を、ヒト κ 5遺伝子又はその突然変異体の全部又は一部をコードする導入遺伝子の挿入と組み合わせることができる。ここで、 κ 5導入遺伝子を、不活化された 及び/又は の軽鎖遺伝子座において挿入し、プロモーター/エンハンサーエレメントを含むヒト 又は の遺伝子制御エレメントの制御下に置く。

【0199】

(実施例3)

内因性 軽鎖の不活化

遺伝子座の大きい欠失(200kb)によって、v2からv1まで(V2、V3、J2C2及びV1を含むセグメント)が除去されるが、J3C3、J1C1、及び下流のエンハンサーをインタクトの状態とする。これにより、 軽鎖の発現が不活化される。図9及び図10。

【0200】

遺伝子座を、 ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及び修復テンプレートを提供して所望の欠失を促進することによって、生成する。

【0201】

不活化された 遺伝子座を、本明細書に記載の完全ヒト化型重鎖遺伝子座及び改変されたカップタ遺伝子座を含む動物とこのゲノム改変を含む動物とを繁殖させることによって、組み合わせる。これにより、対立遺伝子排除が無い場合でも、内因性 遺伝子座から軽鎖がまったく発現されないことを確実にする。

【0202】

軽鎖が無い場合、C ドメインは、発現した抗体の重鎖CH1と対合する。

【0203】

(実施例4)

C 領域を含むトランケートされた 軽鎖遺伝子座を含有するマウスの成績

細胞質注射によって作出されたモザイクF0動物を、この動物は、KCF遺伝子座と呼ばれる(実施例1を参照)トランケートされたカップC 断片の発現を可能とする欠失を有する所望の完全ヒト型カップタ遺伝子座に加えて、WT対立遺伝子と特徴付けされていないインデル突然変異の混合物を含有するが、個々に交尾させてこのモザイク型を隔離し、その結果、単一F0由来の対立遺伝子をそれぞれ有するF1動物を作出した。早期解析に適したF1動物を作出するために、モザイクF0それぞれを、不活化カップタ遺伝子座(J 5とC の間のカップタ遺伝子座内にネオマイシンカセットを挿入し、その結果、正常なカップ組換えを防止することによる不活化)を含有する動物と繁殖させた。得られるヘテロ接合型動物を、この動物は所望の改変されたカップタ遺伝子座に加えて不活化されたマウスカップタ遺伝子座を含有するが、転写物レベル及びタンパク質レベルで解析した。

【0204】

10

20

30

40

50

TRIzol(登録商標)Reagent(Invitrogen(商標)社)と標準プロトコルを使用して、そのヘテロ接合体由来の及び未改変完全ヒト型カップ遺伝子座を有する対照動物由来の、脾細胞から、RNAを抽出した。SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMixキット(Invitrogen(商標)社)及びヒトCコード領域に特異的なオリゴ又はOligo(dT)プライマーのいずれかを使用して、第1鎖DNA合成を実施した。次いで、第1鎖DNAを、ヒトカップ定常コード領域に特異的なプライマー又はヒトV1-5リーダー配列若しくは5'UTRに特異的なオリゴと組み合わせた3'UTRによるPCRのテンプレートとして使用した。予測されるトランケートされたカップ断片について予想されるサイズを有する単一PCR産物を、ヒトV1-5 5'UTR及びヒトC3'UTRのオリゴを有する改変カップ遺伝子座から特定した。このPCR産物の配列決定により、この転写物は、ヒトV1-5エクソン1とヒトC遺伝子の間に予測スプライスジャンクションを含有することが確認された。このことは、ヒト化カップ遺伝子座中に作製された大きい欠失によって予測されるトランケートされたカップ断片転写物の発現が実際もたらされるという、証拠である。プライマーの詳細については図11、PCR結果については図12、配列決定の結果については図13、を参照されたい。

【0205】

トランケートされたヒトカップシールドドメインの正しくスプライシングを経た転写物の存在が、KCF遺伝子座を含有する複数の動物からの試料について確認された。

【0206】

(実施例5)

ヒト5シールドドメインを有するマウス

本発明の実施形態は、ヒト、げっ歯類、非ヒト霊長類又は他の哺乳動物のラムダ5(5)遺伝子、又はその突然変異体の全部又は一部をコードする導入遺伝子の挿入と組み合わせた、内因性又はヒト化のいずれかの、不活化されたカップ及び/又はラムダの軽鎖遺伝子座を含有するマウスを提供する。5導入遺伝子は、不活化されたカップ及び/又はラムダの軽鎖遺伝子座に挿入され、内因性及び/又は外因性の軽鎖のプロモーター及びエンハンサーの制御下にある。例えば、ヒトのプロモーター及びエンハンサー;又はマウスのプロモーター及びエンハンサー;又はヒト可変領域プロモーター及びマウスエンハンサー(マウスのイントロン及び3'の軽鎖遺伝子座エンハンサー等の)、が使用される。

【0207】

カップ遺伝子座の不活化は:

- 1)J1-J5遺伝子の欠失又は置換え(実施例6)
- 2)J1-J5遺伝子及びC遺伝子の欠失又は置換え(実施例5)
- 3)C遺伝子の欠失又は置換え
- 4)全てのV遺伝子の欠失又は置換え
- 5)全てのV遺伝子、J1-J5遺伝子に加えてC遺伝子の欠失又は置換え
- 6)J1-J5遺伝子とC遺伝子間の正常なスプライシングを妨げるカセットの挿入(解析のためにモザイク動物と繁殖させたカップ「KO」対立遺伝子)によって行うことができる。

【0208】

ラムダ遺伝子座の不活化は:

- 1)V2、V3、V1に加えてJ2/C2クラスターの欠失又は置換え、J3/C3及びJ2/C1のクラスターを残す(実施例3)
 - 2)V1に加えてJ2/C2、J3/C3及びJ1/C1の各クラスターの欠失又は置換え、V2とV3を残す、
 - 3)V1、V3、V1に加えてJ2/C2、J3/C3及びJ1/C1の各クラスターの欠失又は置換え、
- によって行うことができる。

【0209】

標的指向化ベクターであって、トランケートされたヒト5コード領域(配列番号77)をコードし、カップJ1の上流及びカップCの下流にマウスゲノム配列に相同な800~1kbの

アームが隣接する、ヒトカッププロモーター及びリーダー(ヒトV 1-5由来)が先行した、ヒトカップイントロンエンハンサーを含めてヒトカップイントロン領域(配列番号78)をコードする、標的指向化ベクター(相同性アームを含む完全導入遺伝子、配列番号79)。この配列を、単一断片として合成し、pUCベクターへ(Genscript(商標)社製)にクローニングした。図14を参照されたい。

【0210】

このベクターは、次の2つの方法のいずれかで使用することができる:

1) 5導入遺伝子を導入するためのマウス胚の改変:

これは、マウス2細胞胚に必要な試薬を注入して、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及び上記のプラスミドベクターを修復テンプレートとして提供して、相同組換えによる所望の欠失/挿入を促進することによって行うことになる。

2) 5導入遺伝子を導入するためのマウス胚幹細胞(mESC)の改変:

これは、mESCに必要な試薬をトランスフェクトして、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及び上記のプラスミドベクターを修復テンプレートとして提供して、相同組換えによる所望の欠失/挿入を促進することによって行った。ポジティブ/ネガティブ選択カセットを、5'相同性アームのすぐ下流で、ベクターにクローニングした。このカセットによって、ピューロマイシン耐性、及びPiggyBacトランスポザーゼ互換の3'及び5'末端逆位配列が隣接するフィアルリジン感受性(チミジンキナーゼ遺伝子)が付与される。これにより、マウス胚幹細胞でのポジティブピューロマイシン選択下でのベクターの効率的な標的指向化、これに続いてネガティブフィアルリジン選択下でのこのカセットのPiggyBac誘導性切除を確実にした。このベクターを、WTマウスカップ遺伝子座を標的とするように設計し、129株のマウス胚幹細胞(mESC)(AB2.1細胞株)で使用した。選択カセットを含む完全な標的指向化ベクターインサート配列、配列番号80。図14に含まれるマウスカップ遺伝子座のこの修飾を要約した図。予測導入遺伝子産物の配列:配列番号81及び配列番号82。選択カセットを含めて完全な標的指向化ベクターインサート配列、配列番号80。マウスカップ遺伝子座のこの改変を要約するダイアグラムを図14に含めた。予測導入遺伝子産物の配列:配列番号81及び配列番号82。

【0211】

このベクターを、WTマウスのカップ遺伝子座を標的とするように設計し、129株のマウス胚幹細胞(mESC)(AB2.1細胞株)で使用した。改変ベクターを用いた同様のアプローチを使用して、かかる遺伝子座を含有するmESCにおいてヒト化カップ遺伝子座を標的にすることができた。同様のベクターを使用して、細胞質注入によりマウス2細胞期胚において直接改変を実施し、その結果、WTマウスラムダ遺伝子座又はヒト化ラムダ遺伝子座のいずれかを改変することができた。

【0212】

代替形態の戦略は、WTマウスのカップ又はラムダの遺伝子座、又はヒト化カップ/ラムダ遺伝子座を、マウス(配列番号100及び配列番号101を参照)、別のげっ歯類、非ヒト霊長類又は他の哺乳動物の供給源からのトランケートされた 5配列を含有するベクターで改変することを含むであろう。

【0213】

不活化カップ遺伝子座/ヒト 5導入遺伝子を含有するmESCを、RAG-1^{-/-}(B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J)マウスに由来する胚盤胞にマイクロインジェクションした。このRAG-1突然変異についてホモ接合型のマウスは、V(D)J組換えの不成功に起因して、成熟B細胞又はT細胞を有さない。このことにより、こういった背景で生成されたキメラにおいて導入遺伝子座の機能に関する初期解析が可能となるが、なぜなら、これらの動物のリンパ器官に存在する任意の成熟リンパ球は、注入される導入遺伝子含有mESC系統に由来することになるからである。導入遺伝子の生殖細胞系列移行を有する安定したマウス系統の作出のために、同じmESC系統もWTCB7b1/6胚盤胞に注入した。

【0214】

内因性マウス 軽鎖遺伝子座を不活化するために、一部の 5mESC系統で更なる工程を

実施した。これは、mESCに必要な試薬をトランスフェクトして、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及び小さい一本鎖DNAドナー断片を修復テンプレートとして提供して、所望の欠失を促進することによって行った。欠失される領域は、実施例3で記載のものと同じである(V2からV1まで(V2、V3、J2C2及びV1を含むセグメント)を除去するが、J3C3、J1 C1、及び下流エンハンサーをインタクトの状態とする)。

【0215】

RAG-1 -/- バックグラウンドで生成される初期キメラの解析は次のように実施されるであろう：

5導入遺伝子をRAG-1 -/- mESCに注入することにより作出されたキメラマウス由来のリンパ器官を、マウス 軽鎖ノックアウト遺伝子座の有無にかかわらず分離し、生じる細胞を、抗ヒト 5抗体と一緒にマウスリンパ球のマーカーを含有する染色パネルとともにインキュベートし、これに続いてフローサイトメトリーで解析する。陽性の結果から、ヒト 5導入遺伝子の発現の成功及び内因性マウス重鎖との集合により、in vivoでの「VHのみ」抗体の細胞表面発現が可能になることが、示唆されるであろう。

【0216】

リンパ球の表面での 5発現に対して陽性であるマウス系統を、他のマウス品種と交配して、完全ヒト型重遺伝子座とマウスラムダノックアウトの両方を導入することになる。これにより、完全ヒト型VHのみ抗体を生成する動物がもたらされることになる。

【0217】

(実施例6)

内因性調節制御を有するマウスカッパ定常断片シールドドメイン

この実施形態は、正常なカッパ軽鎖再構成を不活化するように、且つ、カッパ定常領域(Ck)に加えてV リーダー及び部分的J断片から構成されるトランケートされたカッパ鎖を代わりに発現するように、改変されたカッパ遺伝子座を含有するマウスである。これは、次のいずれかによって行われる：

1)マウス内因性V 遺伝子とマウスJ 遺伝子の間に欠失を作製し、その結果、V とJのコード配列のほとんどを除去するが、V エクソン1に加えてVKエクソン2の5'末端及びJの3'末端での内因性スプライスジャンクションを保持する。

2)マウスJ 遺伝子を、マウスV のプロモーター、リーダー(エクソン1、イントロン、部分エクソン2)に加えてJ 遺伝子の小さい断片をコードする標的指向化ベクターに置き換え、その結果、ここでも、V エクソン2の5'末端及びJの3'末端での内因性スプライスジャンクションも保持する。

【0218】

これらの戦略のどちらも結果は、内因性V プロモーター制御下で転写物を発現する遺伝子座であり、これはスプライシングされて、V リーダー配列と部分的J配列を有するC を生成する。この戦略によれば、マウスカッパレパートリーの任意のV 及びJを活用することができる。戦略1では、J 5とともにV 3-2又はV 3-4を使用する。この理由は、V 3-2又はV 3-4が遺伝子座の3'末端に近く、その結果、必要な欠失のサイズを縮小するからであり、加えてマウスでは利用頻度がかなり高いことが文献で示されてきたからである。カッパ遺伝子座構造の概要については図16を、2例の改変遺伝子座からの予測発現配列については図4を参照されたい。戦略2では、V 6-17又はV 10-96をJ 5と一緒に使用することになるが、こういったVはマウスレパートリーでは最も高度に使用されるものであることが示されてきたからである(参考文献18を参照されたい)。標的指向化戦略/遺伝子座の概要の例については図18を、V 6-17及びV 10-96を使用した予測発現配列については図19を参照されたい。

【0219】

このマウスは、目下の例では、改変遺伝子座のノンコーディング性調節エレメント全てが内因性であるという点で、ヒト制御エレメントを有するバージョンとは異なる。このマウスは、V /J /C 断片の特定のプロモーター、マウス イントロンエンハンサー(J 5とC の間に位置する)、及びマウス 3'エンハンサーを含む。これらの内因性プロモータ

-/エンハンサーと 遺伝子座からの発現に關与するマウスエフェクターとの相互作用は、マウスエフェクターと実施例2及び4に存在するヒト調節配列との相互作用よりも効果的である可能性があり、したがってより活性化遺伝子座が得られる可能性がある。

【0220】

戦略1による改変遺伝子座の生成には、25kb(V₃₋₂バージョンの場合)又は54kb(V₃₋₄バージョン)のいずれかの大きい、精密な欠失が關与する。このマウス遺伝子座は、多重の方法で生成することができた：

1)細胞質注入によるマウスカッパ遺伝子座の直接改変:これは、マウス1細胞接合体又は2細胞胚に必要な試薬を注入して、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及び修復テンプレートを提供して、所望の欠失を促進することによって行われる。

10

2)mESCでのマウスカッパ遺伝子座の改変:これは、mESCに必要な試薬をトランスフェクトして、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及び修復テンプレートを提供して、所望の欠失を促進することによって行われる。

【0221】

図16に、この方法による 遺伝子座の改変を要約し、図17に、改変遺伝子座によって発現される予測されるコードする配列及び翻訳配列の注釈付き配列ダイアグラムを含める。2つのバージョンについて、予測遺伝子産物、コードする配列及び翻訳タンパク質配列を、配列番号83、配列番号84、配列番号85及び配列番号86に提供する。

【0222】

戦略2による改変遺伝子座の生成には、マウスカッパ遺伝子座(J₁₋₅)の1.5kb領域を、部分的なV_{1/J}断片をコードする1.3kb配列に置き換えることが關与する。これは、以下によって行うことができた：

20

1)細胞質注入によるマウス胚のカッパ遺伝子座の改変:

これは、マウス2細胞胚に必要な試薬を注入して、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及びプラスミドベクターを修復テンプレートとして提供して、相同組換えによる所望の欠失/挿入を促進することによって行うことができる。

2)マウス胚幹細胞(mESC)のカッパ遺伝子座の改変:これはmESCに必要な試薬をトランスフェクトして、ゲノム遺伝子座の定義の位置に二本鎖切断を作製すること、及びプラスミドベクターを修復テンプレートとして提供して、相同組換えによる所望の欠失/挿入を促進することによって行うことができる。ポジティブ/ネガティブ選択カセットを、5'相同性アームのすぐ下流で、ベクターにクローニングした。

30

【0223】

標的指向化ベクターインサートを、単一断片として合成し、pUCベクター(Genscript(商標)社製)にクローニングする。図18に、この方法による 遺伝子座の改変を要約し、図19に、改変遺伝子座によって発現される予測されるコードする配列及び翻訳配列の注釈付き配列ダイアグラムを含める。2つのバージョン(V₆₋₁₇及びV₁₀₋₉₆)について、標的指向化ベクターインサート配列(マイナス選択カセット)に加えて、予測遺伝子産物、コードする配列及び翻訳タンパク質配列を、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93及び配列番号94に提供する。

40

【0224】

この方法によって生成されるmESC系統の初期解析を、実施例5と同じ方法で実施する、すなわち、RAG-1^{-/-}胚盤胞への注入、これに続くトランケートされたカッパ断片の発現に関するキメラ由来リンパ球の解析である。リンパ球の表面で、重鎖と対合しているトランケートされたマウスカッパ断片を発現するマウス系統を、他の系統と交配して、完全ヒト型重遺伝子座とマウスラムダノックアウトの両方を導入することになる(実施例3に詳述のように)。これにより、完全ヒト型重鎖とマウスカッパC断片を有するVHのみ抗体を生成する動物がもたらされることになる。

【0225】

(参考文献)

50

- 1 Janssens et al. PNAS 103(41):15130-15135 2006
- 2 Lee et al., Nature Biotech 32(4):356-363 2014
- 3 Boroviak et al., Genesis 54(2):78-85 2016
- 4 Minegishi, Hendershot & Conley PNAS 96:3041 1998
- 5 Bankovich et al., Science 316(5822):291-294 2007
- 6 Melchers et al., Immunol Today 14(2):60-68 1993
- 7 Sabbattini & Dillon, Seminars in Immunology 17(2):121-127 2005
- 8 Papavasiliou, Jankovic & Nussenzweig, J Exp Med 184:2025-2030 1996 10
- 9 Guloglu et al., J Immunol 175:358-366 2005
- 10 Mårtensson et al, Int Immunol 11(3):453-460 1999
- 11 Fang, Smith & Roman, J Immunol 167:3846-3857 2001
- 12 Ridgway et al., Protein Eng. 9:617-621 1996
- 13 Davis JH *et al.*, PEDS 23:195-202)
- 14 Shields et al. (2002) JBC 277:26733
- 15 Iri-Sofla et al., Experimental Cell Research 317:2630-2641 2011
- 16 Jamnani et al., Biochim BiophysActa, 1840:378-386 2014
- 17 Adachi et al., Nature Biotech. 36(4):346-351 2018
- 18 Aoki-Ota M, Torkamani A, Ota T, Schork N, Nemazee D. Skewed primary Igk repertoire and V-J joining in C57BL/6 mice: implications for recombination accessibility and receptor editing. J Immunol. 2012;188(5):2305-2315 20

【 符号の説明 】

【 0 2 2 6 】

- 1 VHドメイン
- 3 Fc領域
- 4 CLドメイン 30
- 11 CH1ドメイン

【 0 2 2 7 】

配列番号1:C シグナルペプチドをコードする核酸

Artificial sequence

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctcccaggaactgtggct

配列番号2:C シグナルペプチド

Artificial sequence

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGTVA

配列番号3:単離C 配列をコードする核酸

ホモ・サピエンス(Homo sapiens) 40

gcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataa
 ctctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggaggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacag
 agcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtc
 tacgctgcaagtacccatcaggccctgagctcgccctcacaagagcttcaacaggggagagtggtta

配列番号4:単離C 配列

ホモ・サピエンス

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号5:シグナルペプチドとの VC融合物をコードする核酸

Artificial sequence 50

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctcccaggaactgtggctgcaccatctgtctt
 catcttccccccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagag
 aggccaaagtacagtggaagggtgataaacgcccccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaag
 gacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgacctgcgaagt
 cacccatcagggcctgagctcgccccgcacaaagagcttcaacaggggagagtggtta

配列番号6: シグナルペプチドとの VC融合物

Artificial sequence

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号7: 完全C ドメインをコードする核酸

10

ホモ・サピエンス

ggaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccccccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtg
 cctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtgataaacgcccccaatcgggtaactcccagg
 agagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgag
 aaacacaaagtctacgacctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgccccgcacaaagagcttcaacaggggagagtg
 tta

注記: 配列番号7の最初のヌクレオチドgを、CLドメインをコードする核酸にスプライスす
 るV エクソンによって提供する。

配列番号8: 完全C ドメイン

20

ホモ・サピエンス

GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注記: 配列番号8のN末端アミノ酸Gは、CLドメインをコードする核酸へのv エクソンの
 スプライシングによって形成されるggaコドンによってコードされる。最初のgはV エク
 ソンのv エクソン3'末端によって提供され、一方、コドン(ga)の残りはC エクソンの5'
 末端によって提供される。一部の定義の下では、C ドメインは配列番号8、すなわち、TV
 A...の第2の残基から始まると考えられている。

配列番号9 スプライシングを経たV 1-5遺伝子セグメントのcDNA

ホモ・サピエンス

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctcccaggtgccaatgtgacatccagatgac
 ccagctccttccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacccatcacttgccgggcccagtcagagtattagtagct
 ggttggcctgggtatcagcagaaaccagggaaagcccccaagctcctgatctataaggcgtctagtttagaaagtggggctc
 ccatcaaggtcagcggcagtggtatctgggacagaattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgatgatcttgaac
 ttattactgccaacagtataatagttattct

30

配列番号10 シグナルペプチドを含むV のコードされたセグメント

ホモ・サピエンス

MDMRVPAQLLGLLLLWLPQAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSISWLAWYQQKPKGKAPKLLIYKASSLES
 GVP
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYS

配列番号11 V 1-5シグナルペプチドをコードする核酸

40

ホモ・サピエンス

atggacatgaggggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctcccaggtgccaatgt

配列番号12 V 1-5シグナルペプチド

ホモ・サピエンス

MDMRVPAQLLGLLLLWLPQAKC

【 0 2 2 8 】

【表 2 A】

Table A: ヒト抗体定常領域の配列

配列番号	ヒト IgG1 定常領域	説明	配列
13	IGHG1*01	ヒト重鎖定常領域(IGHG1*01)ヌクレオチド配列	gctcacaaggccatggtctccctggcacctctccaagacacctctggggcacagcgg ccctggctgctgtaaggactactctcccgaaaccggtagcgggtgctggaactcaggcgcctgac cagcggcgtgcaacacctcccgctctctacagctcctcagactctactcctcagcagcgtggtagccg tgcctccagcagctggcaccgacacatctgcaacgtaaatcaacaagccacagcaaccacaagg tggacaagaagttagcccaatctgtgacaaaactcacatgcccaccgtgccagcactgaact cctgggggaccgtcagctctctctcccccacaccccaaggacacccctcatgctcccggaacctg aggtcacatgctggtgtagcgtgagccaagaccctgaggtcaagttaactggtacgtgacg gctggaggtgcataatgccaagacaagccgaggagcagtagacaacagcagctaccgggtggt cagcgtctcaccgtctgaccagactgctgaatggcaaggagtaagaagtgcaaggctccaaca agccctccagccccatcgagaacacatctccaaagccaaggcagccccgagaaccacaggtgt acaacctgccccatccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaggctt ctatccagcagatgcccgtgagtgaggagcaatgggagccggagcaacaactacaagaccag cctccgctgtagctccgacggctctctctctctacagcaagctcaccgtgacaagcaggtggca gcaagggaacgtctctcatgctcctgtagcaggtgctctgcaaacactacaagcaggaagcctc tcctgctccgggtaaa
14		ヒト重鎖定常領域(IGHG1*01)タンパク質配列(P01857)	ASTKGPSVFLPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKVEPKSCDKTHTCTPCPCP APELLGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRWWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

【表 2 B】

配列番号 15	ヒト IgG1 定常領域	IGHG1*02 又は IGHG1*05	ヒト重鎖定常領域(IGHG1*02 又は IGHG1*05)ヌクレオチド配列	<pre> gctccaccaaggcccatggtttccctggcacctctccaagagcacctctggggcacagcgg ccctggctgctggtcaaggactacttcccgaaccggtgacggtgacggtgctggaactcaggccctgac cagcggctgcaacactcccggctctctacagctcctcagactactcctcagcagcgtggtgaccg tgcctccagcagctggcaccagaccatctgcaacgtgaaatcaaacgcccagcaaccacaagg tggacaagaagtggccccaaatcttgacaactcaacatgcccccggtcccagcaactgaaact cctgggggaccgtcagcttctctcccccaaaacccaaggacacccatgatctccggaccctg aggtcacatgctggtgggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaactggtacgtggacg gctggaggtgcataatccaagacaagccgggagagcagtagacaacagcagctaccgtggtt cagctctcaccgtcctcagcaggtggtgaaatggcaaggagtagaagtgcaaggtctccaaca agcctccagccccatcgagaaaaccatctcaaaagccaaagggcagccccgagaaaccacaggtgt acacctgccccatccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaaaggctt ctatccagcgatccgctggagtgaggagcaatgggagccggagacaactacaagaccag cctccgtgctgactccgacggctcctctctctacagcaagctcagcagcaggtggcagcaggtggca gcaggggaaacgtctctcagctccgtgatgaggtgctctgcaaacactacaacgagagagcctc tccctgctccgggtaaa </pre>
配列番号 16	ヒト重鎖定常領域	IGHG1*02 又は IGHG1*05	ヒト重鎖定常領域(IGHG1*02)タンパク質配列	<pre> ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRWSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLD SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 D】

配列番号 19	ヒト IgG1 定常領域	IGHG1* 04	ヒト重鎖定常領域(IGHG1.*04)ヌク レオチド配列	<pre> gcctcacaagaaggccatcggtttcccccctggcacccctcctcaagagcacctctgggggcaagcagcgg ccctggctgctggtcaaggactactccccgaaccggtagcgggtgctgtagcctcagcggccctgac cagcggcgtgcaacactccggctgctctacagctcctcagactactcctcagcagcgtggtgaccg tgccctccagcagctggcaccagacctacatgcaacgtaacgtaatacaagcccaagcaacaccagg tgacaagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacatgccccacgtgccagcacctgaact cctgggggaccgtcagctctctctcccccaaaaacccaaggaacacccatgatctcccgggaccctg aggtcaatgctggtggtggaagcagcagcaaacgaaacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggaccg gctgagggtgcataatccaagacaaagccgggaggaagcagtaacaacagcaactaccgtggtgt cagcgtctcaccgtcctgaccaggaactgctgaaatggaaggaaggtacaagtgcaaggtctccaaca agccctccagccccatcgagaacacatctcaaaagccaaagggcagccccgagaaaccacaggtgt acaacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctggtggtcaaggtctt ctatcccagcgaatcgcctggagtgaggagcaatggcagccggagaaacactacaagaccacg cctccggtgctgactccgacggctctctctctctctacagcaagctaccgtggaacaagagcaggtggca gcaggggaacatctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcaacaacactacacgcagagaagcctc tcctgtctccgggtaaaa </pre>
配列番号 20	ヒト重鎖定常領域(IGHG1.*04)タンパク質配列			<pre> ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTRKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMIHEALTHNYTQKLSLSLSPGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 E】

配列番号 21	無効化ヒト IgG1 重鎖定常領域	無効化ヒト IGHG1*01	無効化ヒト IGHG1*01 重鎖定常領域ヌクレオチド配列	<pre> gacctcaacaggccatcggtctccctctgcaacctctccaagagcaacctgtggggcacagcgg ccctggctgctgtaagactctcccgaaccggtagcgggtgtgtgaaactcaggcggccctgac cagcggcgtgacacactcccgctgtctacagttccctcagctcactcctcctcagcagcgtgtgaccg tgcctccagcagcttggcaccagaccatcatctgcaacgtaatacaagccccaagcaacacaaagg tggacaagaaagtggacccaaatcttctgacaaactcacacatgcccccgctgcccagcacctggaac tcgcgggggaccgctcagttctctctctcccccacaaacccaaaggacacacctatgatctcccggaacct gaggtcacaigtggtggtgagcgtgagccagagaccctgaggtcaagttcaactggtgtaactggtgac ggcgtggaggtgcaataatgccaagacaaagccgggaggtacagtaacaacagcacgtaccgtgtgg tcagcgtctcaccgtctcaccagactggtgtaattggcaaggagtaacaagtcaaggctctccaaca aagccctccagcccccatgagaaaaccatctccaagccaaaggcagccccgagaaaccacaggtg tacacctgcccccatccccggatgagctgacctgaccaaagcaggctcagctgacctgctggtcaaggct tctatcccaagcacaicgctggtgagtgagcaatggcagccgggagacaactacaagaccac gacctccgtgctgactccgacggctctctctctcagcaagctcaccgtgacaaagcaggtggc agcaggggaacgtctctcagctccgtgtagtggctctgcaaacaccactacacagcagaagacct ctccctgtctccgggtaaa </pre>
配列番号 22			無効化ヒト IGHG1*01 重鎖定常領域アミノ酸配列。野生型配列と異なる 2 残基が太文字で特定されている。	<pre> ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSTWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKVEPKSCDKTHTCTPPCPA PELAAGAPSVFLFPPKPKDRLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRWSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 F】

配列番号 23	ヒト IgG2 定常領域	IGHG2*01 又は IGHG2*04 又は IGHG2*05	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*01 又は IGHG2*03 又は IGHG2*05)ヌクレオチド配列	<pre> gctccaccaggccatcggtcttccccctggccctgctccagggcacctccgagagcacagccg ccctggctgctgtaagactctccccgaaccggtagcgtgctggaactcaggcgctctgac cagcggctgacacactccagctgctctacagctccagactctactccctcagcagcgtgtagccg tgcctccagcaactcggcaccagacctaccctgcaacgtagatcaaacgcccaaaccaagg tgacaagacagttgagcgcaaatgttctgtagtccccagctgccccagcaccactgtggcaggac cgtcagtcttcttcccccaaaacccaagacacccctcatgctcccggaaccctgagggtcagctg tggtggtagcgtgagccacgagagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggaaggcgtgagggtg cataatgccaagacaaagccacgggagggagcagttcaacagcagcttccgtggtcagcgtctcacc gittgaccagcagctgacggaacggaaggagtagcaaggtcacaaggtctccaacaagaagcctcccc ccccatcgagaaaaacatctcaaaaccaaaggcagccccgagaccacaggtgtacacctgcccc catccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctggtcaaaagccttaccaccagcg acatgcccgtgagtgaggagagcaatgggagccggagcaactacaagaccacacctccatgctg gactccgacggctcctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagggggaac gittctcatgctccggtgatgcatgaggctctgcaaacaccactacagcagaagagcctcctcctccg ggtaaa </pre>
配列番号 24	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*01)タンパク質配列			<pre> ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTFAVL QSSGLYSLSWTVPSSNFGTQTYTCNVDHFKPSNTKVDKTKVERKCCVCEPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDSHEDPEVQFNVYDGVVEVHNAKTK PREEQFNSTFRWWSVLTWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 G】

配列番号 25	ヒト IgG2 定常領域	IGHG2* 02	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*02)ヌクレオチド質配列	<p>GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGACGGTGTGTTGGAACCTCAGGGGCTCTGACCAGGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGACC</p> <p>TCCAGCAACTTCGGCACCAGACTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGACAAGACTTGGCGCAATGTTGTGCGAGTGCCACCGTGGCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCTTCCCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACCCCTCATGTCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAACCCCGAGGTCCAGTTCAGTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCAGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGTTCCCGTGTGGTACAGCTCCACCGTCTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCTCCAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCGAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCCGGAGAACAACTACAAGCCACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGGAAAGCTTCTCATGCTCCGCTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTAAA</p>
配列番号 26	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*02)タンパク質配列			<p>ASTKGPSVFLPACSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSWVTVSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTRKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPKPKDLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRWSVLTVHQQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMILDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

10

20

30

40

【表 2 H】

配列番号 27	ヒト IgG2 定常領域	IGHG2* 04	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*04)ヌク レオチド質配列	<pre> gctctaccacaggcccatcggtcttccccctggccctgctccagggacacctccggagacagcagcg gacctgggctgctgaaggactacttccccaaacgggtgacggtgctggaactcaggcgctctga ccaggcgtgcaacacctccccagctgctctactcctcaggactactcctcagcagcgtggtgacc gtgacctcagcagcgtggcaccagacctaccctgcaacgtagatcacagcccccaacaccaaag gtggaagaagcaggtgagcgaatgtgtgctgagtgccccagtgccccagcaccctgtggcagga ccgtcagttctcttcccccaaaaaccaaaggacacctatgatctcccggaacctgagggtcacgtgc gtggtggtgacgtgagccacgaaagaccccgaggtccagtccaactggtacgtggagcgtggagggt gcataatgccaagacaaagccacggaggagcagttcaacagcagcagtcctggtggtcagcgtctcac cgttgcaccagactgctgaacggcaaggagtaacaagtgaaggtctccaacaaaggcctccccag ccccatcgagaaaaccatctcaaaaacaaaggcagcccccgagaccacaggtgtacacacctgccc ccatccggaggagatgaccaaagacccaggtcagcctgacctgctgctcaaaaggctttaccaccagc gacatgccgtggagtgaggagcaatggcagccggagacaaactacaagaacacacctcccatgct ggactccgacggctctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaa cgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacacaccactacacgagagaagcctctccctctcc gggtaaaa </pre>
配列番号 28	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*04)タン パク質配列			<pre> ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTTFAVL QSSGLYSLSSTWTPSSSLGTQTYTCNV/DHKPSNTKVDKTVVERKCCCECPAPP VAGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVWVDSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRW/SVLTWVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGQIVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSPGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 I】

配列番号 29	ヒト IgG2 定常領域	IGHG2* 06	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*06)ヌク レオチド質配列	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGGGCCCTGCTCCAGGAGCACCC TCCGAGAGCACAGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCG GTGACGGTGTGTTGGAATCAGGGGCTGACCAGGGGCTGACACACCTTCCCG GCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGC TCCAGCAACTTCGGCACCAGACTACACTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAATGTTGTGCGAGTGCCACCGT GCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGGACGT GAGCCAGAACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCAGGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTTG TGGTCAGCGTCTCACCGTGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAAACAAGGCTCCAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAACCATCTCCAA AACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCAATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCC CAGGACATCTCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACCTCCCATGCTGGACTCCGAGCGGCTCTTCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAA
配列番号 30	ヒト重鎖定常領域(IGHG2*06)タン パク質配列			ASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSWVTPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPP VAGPSVFLFPKPKDLMISRTPETCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTFRWSVLTVWHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

【表 2 J】

配列番号 31	ヒト IgG4 定常領域	IGHG4*01 又は IGHG4*04	ヒト重鎖定常領域(IGHG4*01 又は IGHG4*04)ヌクレオチド配列	<pre> gcttcaccaaggcccatcctcttccccctggccctgtccaggagcacctccagagcacagccg ccctggctgctgtaaggaactctccccgaaacgggtgacggtgctggaactcaggccctgac cagcggctgcaacctcccgctgctctacagctccaggaactctactctccctcagcagcgtggaccg tgcctccagcagctggcaggaagacctacacctgcaacgtatgatacaagcccagcaacccaagg tgacaagagagttgagtcacaatatgtccccatgtccccatgtccccagcaactgagttctctggggg accatcagctctctgttcccccaaaacccaaggaactctcatgtctccccgacccctgaggtcacgtg cgtggtggagcgtgagccaggaagaccggagggtccagttcaactgtactcgtggtggcgtggagg tgataatgccaagacaagccgaggaggagcagttcaacagcagtaaccgtggtggtcagcgtctca cgtctgcaccagactggtgaaacggcaaggagtaacaaggtcaaggtcacaacaaaggccctccgt cctccatcagaaaaccatctccaaagccaaaggaggccccggagccccaggtgtacacccctgcccc catccaggaggagatgaccaagaaaccaggctcagcctgacctgctgtcaaggcttctaccaccagcg acatgccgtggagtgaggagcaatggcagccggagaaacactacaagaccaacgctccctcgtctg gactccgacggctctctctctacagcaggttaaccgtggaacagagcaggtggcaggagggaat gtcttctcagctccgtgagtcatgaggctctgcacaaccactacacacagaaagagcctctccctctctg ggtaaa </pre>
配列番号 32			ヒト重鎖定常領域(IGHG4*01)タンパク質配列(P01861)	<pre> ASTKGFPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSPCAPEF LGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPTEVTCVWDVVSQEDPEVQFNFVYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK </pre>

10

20

30

40

【表 2 K】

配列番号 33	ヒト IgG4 定常領域	IGHG4* 02	ヒト重鎖定常領域(IGHG4*02)ヌク レオチド配列	<pre> gcttcaccaaggggccatccgtcttccccctggcgccctgctccagagcacctccgagagcacagccg ccctggctgctgtaaggactctccggaaccggtgacggtgacggtgtaactcagcggccctgac cagcgggtgacacctcccgcttctcagctcctcagctcctcctcagcagcgtggtgaccg tgccctcagcagcctggcagcaaacctcacctgcaacgtagatcaaacgcccagcaacccaagg tggacaagagagttgagtcacaatatgtccccctgccccctgccccctgccccctgccccctg accatcagctcttctctcccccaaaacccaaggacactcctatgaltctccccggaaccctgagtcacgtg cggtgggtgagcgtgagccaggaaagccccgaggtccagttcaactggtacgttgatggcgtggagg tgataatgccaagacaagccgagcggagagcagttcaacagcagcgtaccggtggtcagcgtcctca ccgtcgtgaccagcagcgtgtaacgcaagagtagtaacagtgcaaggtctccaacaaaaggcctccgt cctccatcgagaaaaccatctccaaagccaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgcccc catccaggaggagatgaccaagaaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggcttctacccccagc acatcgcgtgggtggagagcaatggcagccggagaaacactacaagaccacgctcccggtctg gactccgagcgtccttctctctacagcaggttaaccgtggacaagagcaggtggcagaggggaat gtcttctcagctccgtgagtcagtgaggctctgcaaacaccactacacgcagaaagagcctctccctctctctg ggtaaa </pre>
配列番号 34			ヒト重鎖定常領域(IGHG4*02)タン パク質配列	<pre> ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVWTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCSPCAPEF LGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPVETCVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRWWSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTTISKAGGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 L】

配列番号 35	ヒト IgG4 定常領域	IGHG4* 03	ヒト重鎖定常領域(IGHG4*03)ヌク レオ子ド配列	<pre> gttccaccaaggcccattccttccccctggccctgctccaggagcacctccgagagcacagccg ccctggctgcctggtcaaggactactctccccgaacgggtgacgggtgctgtgaaactcaggcgccctgac cagcggctgacacacctcccgctgctctacagctccaggactctactctccctcagcagcgtggtgaccg tgccctccagcagctggcaggaagacctaacctgcaacgtagatcacagccagcaaacacaaagg tgacaagagagttgagtcacaatatgtccccatgtccccatgcccagcaacctgagttcctctggggg accatcagctctctgttcccccaaaaaccaaggacactctctatctccccgagccccctgaggtcacgtg cgtggtggtgagcgtgagccaggaagaccggaggtccagttcaactgtactcgtggtggtggtggagg tgataatgccaagacaagccggggaggagcagttcaacagcagctaccgtgtgtggtcagcgtctctca ccgtcctgcaaccagactgtgaaacggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaggccctccctg cctccatgagaaaaccatctcaaaagccaaaggcagccccggagagccacaggtgtacacacctgcccc catccaggaggagatgaccaagaaccagggtcagctgacctgctggtcaaaaggctttaccctccagcg acatcgcctggagtgaggagcaatgggagccggagaaacaactacaagaaccaacctccctcgtctg gactccgacggctcctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgagggagggggaaac gtcttctcagctcctcctgcatgaggtctgcaacaaccactacacagcagaagagcctctccctctctctg ggtaaa </pre>
配列番号 36	ヒト重鎖定常領域(IGHG4*03)タン パク質配列			<pre> ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTTPAVL QSSGLYSLSWVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPKSTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQEAGNWFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 M】

配列番号 37	ヒト IgG4-PE 定常領域	IGHG4-PE ヒト重鎖定常領域(IGHG4-PE)ヌクレオチド配列バージョン A	<pre> gctcaccacaaaggccatccgtttccctggcgccctgctcagagcacctccgagacgagcagcgccg ccctggctgcctgggtcaaggactacttcccgaacccaagtgacggtgtggaactcaggcgccctgac cagcgcggtgcacacctccggctgtctacagtcctcagactctactcctcagcagcgtggtagccg tgccctccagcagcttggcagaaagacctacacctgcaacgtagatcaaaagcccagcaacaccaaagg tggacaagagagttgagtcacaatagttccccatgtccccatgtccccatgtccccatgtccccatgt gacctcagttcttctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgattccccggaccctgaggtcacgt ggctgtgtggagcgtgagccaggagaccctggaggtccagttcaactgtacgttgatggcgtggag gtgataatgccaaagacgacgagggagcagttcaacagcagtcacgtgtgtggtagcgtctctc accgtctgcaccagactgtgacgcaagagtagtaaaaggtcctcccaaaagggcctccc gtcattgatcgagaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaccacaggtgtacacccctgc ccccatccagggagagatgaccaagaaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaaggcttctaccoca ggcagatcgccgtggagtgaggaatggcagccggagaaacaaactacaagaccacgacctccggt gctggactccgacggatcttctctacagcaggtaccggtgacaagagcaggtggcaggagggg gaatgttctctcatgctcctcgatgaggtctgcacaacacactacacacagaaagacctctccctgtc tctgggtaaa </pre>
---------	-----------------	---	---

10

20

30

40

【表 2 N】

配列番号 38	ヒト重鎖定常領域(IGHG4-PE)ヌクレオチド配列バージョン B	<pre> gctcaccacaagggaactagcgtgttcctctcgcccctgttccagggtccacaagcgagtcaccgcgtgc ctcggctgtctgtgtaagactacttcccagagccggtgaccgtctcctctggaatagcggagccctgaacct cggcgtgcacacattcccgcgtgctgcagagcagcggactgtatagccgtgagcagcgtgtgaccgt gcccagctccagcctcggcaccaaaacctaccctgcaacgtggaccacaagccctccaaccaagggt ggacaagcgggtgagagcaagtaccggcccccttgcctctctctgccccctgagttcagggagg accctcgtttcctgtttcccccaaaccaaggacacccctgatgatctcccggacacccgaggtgacct gtgtgtcgtggaactcagccaggaggacccccagggtgcagttcaactgtatgtggacggcgtggag gtgcaaatgccaaaaccagccagggaggcagttcaatccacctacaggggtgtgagcgtgct gaccgtcctgcatacaggattggtgaaacggcaaggagtacaagtgaaggttccaacaaggactgc ccagctccatcgagaagaccatcagcaaggttaaggccagccgaggaggccccaggtgtataccctg cctcctagccaggaaagagatgaccaagaaccaagtgtcccctgacctgtgtgaaaggatttaccctc ccgacatgcgctggagtgggagagcaatggccagccccgaaactacaatacaaacccccctccggtg ctcgatagcgcggcagcttcttctctacagccggtcagcagtgagacaagcaggtggcagaggggc aacgtttctcctgttccgtgatgcacgaggccccgtgcaatcactacacccccagaagagcctcctctcc ctgggcaag </pre>
---------	-----------------------------------	---

10

20

30

40

【表 2 P】

配列番号 41	不活化ヒト IgG4 定常領域	不活化IGHG4	不活化ヒト重鎖定常領域(IGHG4) ヌクレオチド配列	<pre> gctccaccaaggccatcctgcttccctctgctccctgctccagagcaacctccgagagcaaggccg ccctggctgctgctcaaggactctccccgaaccagtgacggtgctggaactcaggcgccctgac cagcggtgcaacactccgctgctctacagctcctcagactctcctcagcagcggtgacgg tgccctcagcagcttggcaggaaccctacacctgcaacagtagatcaagcccaacacaaagg tggacaagaggtggtccaaatagtccccctgccccctgccccctcagctcagctgctggggg gacctagcttctctgcttcccccaaaacccaaggacctctctgctccctgacccctgaggtcagct gctggtggtgacgtgagccaggaagccccaggtccagttcaacagcagctaccgtggtcagcgtctc gtgcataatgccaagacaagccgagggagcagttcaacagcagctaccgtggtcagcgtctc accgtctcagccagactggtgacggcaagagtagaagtgcaaggtctcccaaaaggccctccc gtcctgctcagcaaaacccatctccaaagcccaagggcagccccgagagcagctgtaccctgctc ccccatccagggagatgaccaaagaccaggtcagctgacctgctgctcaaaagctctaccctca gcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggagccggagacaactacaagaccagcctccctg gctggactccgagctcctctctctacagcaggtaccgtggacaagagcaggtggcagggaggg gaaatctctctcagctcctggtgcatgaggtctgcaaacactacacagagagcctctccctgctc tctgggtaaa </pre>
配列番号 42			不活化ヒト重鎖定常領域(IGHG4) タンパク質配列(ヒト IgG4 からの 不活化突然変異は太文字で示され ている)	<pre> ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPP VAGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSQEDPEVQFNNWVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTRWSVLTVLHQDWLNGKEKVSNKGLPSSIEKTISKAGQPR EPQVTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVESNGQPENNIKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK </pre>

10

20

30

40

【表 2 Q】

配列番号 43	ヒト C κ 定常領域	IGKC*0 1	ヒト C κ 軽鎖定常領域(IGKC*01) ヌクレオチド配列	cgtacggtagccgctccctcgtgttcatcttccacccttcgacgagcagctgagtgccgacccgcttct gtgtgtgctgctgaaacttctatcccccgaggccaagtgcaaggtagtgagaaagtgacaacgcccctg cagtcggcaactcccaggaatccgfgaccgagcagactccaaggagacagcactactccctgctcctcca ccctgacccctgccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgctcgaagtgaccaccacaggggc ctgtctagccccgtgaccaggtttcaacggggcgagtggt
配列番号 44			C κ 軽鎖定常領域(IGKC*01)アミノ 酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWVCLLNNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 45	ヒト C κ 定常領域	IGKC*0 2	C κ 軽鎖定常領域(IGKC*02)ヌクレ オチド配列	cgaactgtggtgcaccatcttcttcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctg ttgtgtcctgctgaaataacttctatccccagagagccaaagtagcagtggaagtgataacgcccctcca atcgggtaactcccagagagtgatcagagcagcagagagcaagagcagcacctacagcctcagcagc accctgacgctgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgcccggcgaagtcaaccatcagggg cctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtggt
配列番号 46			C κ 軽鎖定常領域(IGKC*02)アミノ 酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWVCLLNNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQESKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAGEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 47	ヒト C κ 定常領域	IGKC*0 3	C κ 軽鎖定常領域(IGKC*03)ヌクレ オチド配列	cgaactgtggtgcaccatctgcttcttcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctg ttgtgtcctgctgaaataacttctatccccagagagccaaagtagcagcggaaagtgataacgcccctcca atcgggtaactcccagagagtgatcagagcagcagagcaagagcagcacctacagcctcagcagc accctgacgctgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgcccggcgaagtcaaccatcagggg cctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtggt
配列番号 48			C κ 軽鎖定常領域(IGKC*03)アミノ 酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWVCLLNNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQESKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【表 2 R】

配列番号 49	ヒト C κ 定常領域	IGKC*0 4	C κ 軽鎖定常領域(IGKC*04)ヌクレオチド配列	cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctctgtaataacttctatccagagagccaaagtagcagtggaaggtggataaacgcccctcaatcgggtaactcccaggagagtgtaacagagcagagcagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacctgagcaagcagactacagagaaacaaactctacgctggaagtcaccccatcagggcctgagctgcccgtcaaaagagcttaacaggggagagtggt
配列番号 50			C κ 軽鎖定常領域(IGKC*04)アミノ酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 51	ヒト C κ 定常領域	IGKC*0 5	C κ 軽鎖定常領域(IGKC*05)ヌクレオチド配列	cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctctgtaataacttctatccagagagccaaagtagcagtggaaggtggataaacgcccctcaatcgggtaactcccaggagagtgtaacagagcagagcaaggacactacagcctcagcaaacacctgacgctgagcaaacagactacgagaaacaaagtagcagctgcaagtcacccatcagggcctgagctgcccgtcaaaagagcttaacaggggagagtgct
配列番号 52			C κ 軽鎖定常領域(IGKC*05)アミノ酸配列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSNLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 53	ヒト C λ 定常領域	IGLC1* 01	C λ 軽鎖定常領域(IGLC1*01)ヌクレオチド配列 (ENST00000390321.2)	cccaaggccaaccacggctactgttccgccctctctgagggagctccaagccaacaaggccacac tagtgtctgatcagtgacttctaccgggagctgtgacagtgcttggaaggcagatggcagccccgt caaggcgggagtgagagcaaacacccctcaaacagagcaacaacagtagcggccagcagccta cctgagcctgacgcccagcagtggaagtcaccacagaaagtagcagctgcccaggtcagcatgaaagga gcaaccgtggagaagacagtggtcccctacagaatgttca
配列番号 54			C λ 軽鎖定常領域(IGLC1*01)アミノ酸配列(A0A075B6K8)	PKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNINIKYAASSYLSLTPSEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【表 25】

配列番号 55	ヒト Cλ 定常領域	IGLC1* 02	Cλ 軽鎖定常領域(IGLC1*02)ヌク レオチド配列バージョン A	ggtcagcccaaggccaaccccaactgtcaactctgttccgcctcctctctgagagctccaagccaacaagg ccacactagtgtctgtatcagtgacttctaccgggagctgtgacagtgccctggaagcgagatggcag ccccgtcaaggcgggagtgagaccaccaaacctccaacagagacaacaagaagtaacgagcagc agctacctgagccctgacgcccggagcagtggaagtcccaacagagctacagctgcccaggtcacgcatga agggagaccctgtggagagacagtgggcccctacagaaatgttca
配列番号 56			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC1*02)ヌク レオチド配列バージョン B	ggtcagcccaaggccaaccccaactgtcaactctgttccgcctcctctctgagagctccaagccaacaagg ccacactagtgtctgtatcagtgacttctaccgggagctgtgacagtgccctggaagcgagatggcag ccccgtcaaggcgggagtgagaccaccaaacctccaacagagacaacaagaagtaacgagcagc agctacctgagccctgacgcccggagcagtggaagtcccaacagagctacagctgcccaggtcacgcatga agggagaccctgtggagagacagtgggcccctacagaaatgttca
配列番号 57			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC1*02)アミ ノ酸配列	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETT KPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTEKTVAPTECS
配列番号 58	ヒト Cλ 定常領域	IGLC2* 01	Cλ 軽鎖定常領域(IGLC2*01)ヌク レオチド配列バージョン A	ggccagcctaaggccgctcctctgtgaccctgttccccctctcctccaggaactgcaggtacaagggc cacctctgtgctctgacagcacttaccctggtgcccgtgaccctggtggaaggtgtagctctc ctgtgaggccggcggtggaacacacaccccttccaaagctccaacaaatacgcgcccctcctccta cctgtcccctgaccccctgagcagtggaagtcaccacgggtcctacagctgccaagtgaccacgagggctcc accgtggaaaagaccgtggctcctaccgagtgctcc
配列番号 59			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC2*01)ヌク レオチド配列バージョン B	ggccagcctaaggccgctcctctgtgaccctgttccccctcctccagcagggagctccaacaagg ccacctctgtgctgtatctcgcacttctatccccggcgtgtgaccctgcttgaaagccgactccagcc ctgtcaagccggcggtggagaccacacacccctccaagcagtcacaacaagaagtaacgagcagc atctctcccctgaccccctgagcagtggaagtcaccacgggtcctactcctctgaggtagcccaagggctcc accgtggaaaagaccgtggcccaccacggagtgctcc
配列番号 60			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC2*02)アミ ノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTEKTVAPTECS

10

20

30

40

【表 2 T】

配列番号 61	ヒト Cλ 定常領域	IIGLC2*02 又は IIGLC2*03	Cλ 軽鎖定常領域(IIGLC2*02)又は IIGLC2*03)ヌクレオチド配列	gggtcagcccaaggctgcccctcgtgctactctgtttccgcccctcctctgagggacttcaagccaacaaggc cacactggtgttctcataagtgacttctaccggggagccgtgacgtggcctggaaggcagatagcag ccccgtrcaaggcgggagtgagaccaccaccctccaacaagaacaacaagtaacgagccagc agtactctgagccctgacgctgagcagtggaaggtcccaagaagctacagctgcccagggtcacgcatgaa gggagcaccgtgagagaagacagtgcccctacagaatgttca
配列番号 62			Cλ 軽鎖定常領域(IIGLC2*02)アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 63	ヒト Cλ 定常領域	IIGLC3*01	Cλ 軽鎖定常領域(IIGLC3*01)ヌクレオチド配列	cccaaggctgcccctcgtgctactctgttccaccctcctctgagggacttcaagccaacaaggccacact ggtgttctcataagtgacttctaccggggagccgtgacgtggcctggaaggcagatagcagccccgtc aaggcggggtgagaccaccaccctccaacaagaacaacaagtaacgagccagcagctacc tgagcctgacgctgagcagtggaagtcccaacaagaagctacagctgcccagggtcacgcatgaaaggagc accgtgagagaagacagtgcccctacgggaatgttca
配列番号 64			Cλ 軽鎖定常領域(IIGLC3*01)アミノ酸配列	PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 65	ヒト Cλ 定常領域	IIGLC3*02	Cλ 軽鎖定常領域(IIGLC3*02)ヌクレオチド配列	gggtcagcccaaggctgcccctcgtgctactctgttccaccctcctctgagggacttcaagccaacaaggc cacactggtgttctcataagtgacttctaccggggcagtgacgtggcctggaaggcagatagcagc cccgtrcaaggcggggtgagaccaccaccctccaacaagaacaacaagtaacgagccagcagca gctactctgagccctgacgctgagcagtggaagtcccaacaagaagctacagctgcccagggtcacgcatgaa gggagcaccgtgagagaagacagtgcccctacgggaatgttca
配列番号 66			Cλ 軽鎖定常領域(IIGLC1*02)アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【表 2 U】

配列番号 67	ヒト Cλ 定常領域	IGLC3* 03	Cλ 軽鎖定常領域(IGLC3*03)ヌク レオチド配列	ggtcagcccaaggctgccccctcggctcaactctgttccaccctctctgagggacttcaagcccaacaagcc cacactggtgttctcataagtgacttctaccggagccgtagcagtgccctggaagccagatagcag ccccgtcaaggcgggagtgagaccaccaccctcaacaagcaacaagcagcagcagccagc agctacctgagcctgagcctgagcagtggaagtcaccacaagaagctacagctgccaggtcaagcagcatgaa gggagcaccgtggagaagacagtgccccctacagaatgttca
配列番号 68			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC3*03)アミ ノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTT PSKQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 69	ヒト Cλ 定常領域	IGLC3* 04	Cλ 軽鎖定常領域(IGLC3*04)ヌク レオチド配列	ggtcagcccaaggctgccccctcggctcaactctgttccgccccctctgagggacttcaagcccaacaagcc cacactggtgttctcataagtgacttctaccggagccgtagcagtgccctggaagccagatagcag ccccgtcaaggcgggagtgagaccaccaccctcaacaagaagcaacaagctacgagcagcagcagc agctacctgagcctgagcctgagcagtggaagtcaccacaagaagctacagctgccaggtcaagcagcatgaa gggagcaccgtggagaagacagtgccccctacagaatgttca
配列番号 70			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC3*04)アミ ノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTT PSKQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 71	ヒト Cλ 定常領域	IGLC6* 01	Cλ 軽鎖定常領域(IGLC6*01)ヌク レオチド配列	ggtcagcccaaggctgccccctcggctcaactctgttccgccccctctgagggacttcaagcccaacaagcc cacactggtgtgctgctgactcagtgacttctaccgggagctgaaagtgccctggaagccagatggcag ccccgtcaacaaggagtgagaccaccaccctcaacaagcagcaacaagctacgagcagcagcagc agctacctgagcctgagcctgagcagtggaagtcaccacaagaagctacagctgccaggtcaagcagcatgaa gggagcaccgtggagaagacagtgccccctcagaatgttca
配列番号 72			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC6*01)アミ ノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVNTGVETTT TPSKQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS

【表 2 V】

配列番号 73	ヒト Cλ 定常領域	IGLC7* 01 又は IGLC7* 02	Cλ 軽鎖定常領域(IGLC7*01 又は IGLC7*02)ヌクレオチド配列	ggtcagccaaggctgccccatggtcactctgtcccaacctctctgaggagcttcaagccaacaagggc cactgtgtgtctctgtaagtgacttctaccgggagccggtgacagtgccctggaaggcagatggcag ccccgtaagggtgggagagaccaccaaacctccaacaaagcaacaagaatgtagggccagc agdtacctgagccctgacgcccggagcagtggaagtcccaagagctacagctgccgggtcaagcgcataga agggagcaccctgggagagacagtgggcccctgcagaatgctct
配列番号 74			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC7*01)アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLYSDLYPGAVTVAWKADGSPVKVGVETT KPSKQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS
配列番号 75	ヒト Cλ 定常領域	IGLC7* 03	Cλ 軽鎖定常領域(IGLC7*03)ヌクレオチド配列	GGTCAGCCCCAAGGCTGCCCCCTGGTCACTCTGTTCCACCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCGTAAGTGACTTCAACCCGGGA GCCGTGACAGTGGCCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCGTCAAGGTGGGAGTGGGA GACCACAAACCCCTCCAACAACAAGCAACAAGTATGGGGCCAGCAGCTACCTG AGCCTGACGCCCGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGTCCCGGGTCAAG CATGAAGGGAGCACCCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTGCAGAATGCTCT
配列番号 76			Cλ 軽鎖定常領域(IGLC7*03)アミノ酸配列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLYSDLYPGAVTVAWKADGSPVKVGVETT KPSKQSNINKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

【 0 2 5 0 】

10

20

30

40

【表 3 A】

Table B: 異なる配列表

配列番号	配列情報	配列
配列番号 77	短縮化ヒトλ5コード領域	GTGTTTGGCAGGGGACCCAGCTCACCGTTTTAAGTCAGCCCAAGGCCACCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCGTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAAACAAGGCTACACTGGTGTCTCATGAATGACTTTTATCCGGGAATCTTGACGGTGACCTGGAAGGCAGATGTTACCCCAATCACCCAGGGGTGGAGATGACCAAGCCCTCCAACAGAGCAACAA CAAGTACCGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCGAGCAGTGGAGGTCCCGCAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCATGCACGAAGGGGACCCGTGGAGAAGACCGGTGCCCCCTGCAGAATGTTTCATAG
配列番号 78	ヒトカッパイントロンエ ンハンサーを含むイント ロンを有するヒトカッパ プロモーター及びリーダ ー(ヒトVκ1-5由来)	ATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCTGGGGCTCTGGTCTGGTCCCAGGTAAGTAATTTTTCACATAATTGCTCTGAAATTTGGGTCTGATGGCCAGTATTGACTTTTAGAGGCTTAAATAGGAGTTTGGTAAAGATTGGTAAATGAGGATGAGGATGAGGATTTGCCATGGTTGCAAAAGTTAAACTCAGCTTCAAAAAATGGATTTGGAGAAAAAAGA TTAAATTTGCTCTAACTGAATGACACAAAAGTAAAAAAGTAACTAAAAAGAACCTTGTATTTCTAAGGAGCAAAAGTAAATTTTGTTCACCTTGGCCAAATTTGATTTGGTTGCTGATTATGCATGATACAGAAA AGTGGAAAAATACATTTTAGTCTTTCTCCCTTTTGTGATAAATTTTTGTCAGACAACAATAAAAATCAATAGCACGCCCTAAGAAAAATCAGGAAAAGTGAAGTGTACCTATTTGCTATGTAGAAGGCGAGCTTACTTGA TCCAGCAGCAATGTTGTTTTAGAGTCTGTAATAAGTAATAAACTCAAAAAAGACACATTTCTATAGGAATAAGGGCTT CACAGATAGAGCTCATTTTTAAAAATCCAATTTGTACATTAGACTAAACGTGAAATTTATCTCTATTGTAATGGT GGAAAGGTGTTATTTCCCAAAAGCTCAATCTCAAGAAATGTGTTTAAATGAAAAAAGTAAATAATGCAATTTT TAATGACCGTGGGTCTGTGAAAAAATAGGAAATATTTAAAGAGTATGTTCTTTCAATATCCTCTGTTATTACTT GTCTACATTTTATTCTGCCAAGAGGCCGTGGCACCAGGCTGTAGACAGAGCCGGTCTTCTCGATTGAG TGGCTTTGGTGGCCATGCCACCGGCTTTGGGGCAGCCGCTTGGCCGTAGTGGCCGTGGCCACCCCTGTGCT GCCCGATTGATGCTGCCGTAGCCAGCTTTCCCTGATGCACAGTATACAAATAATGCCACTAAGGGAAAGAGAAC GAAACGTAATGGGGCTGAGCTGGGAAACCAGGGAGAGACTGATTTATTAGAGATTTTCAAGAAATAAAATTCAC ATTCATTATGATATCTCATTAGTGAAAAATTTCCATTAGGGGATTGTAATAAATTTAAAGCTTTTTTTTTTTCAGT

10

20

30

40

【 0 2 5 1 】

【表 3 B】

GCTATTTAATTATTTCAATATCCTCTCATCAAAATGTATTTAAATAACAAAAGCTCAACAAAAGAAAGAAATATG TAAATCTTTTCCAGAGTAAAAATCACCCCTGACCTGGCCACTGAGGGCTTGATCAATTCACCTTTGAATTTGGCATT AAATACCATTAAGGTATATAAAGTATTTAAATAAGATAATTCGTGACCATGTTTTAACTTTCAAAAATGTA GCTGCCAGTGTGATTTTATTTTCAAGTTGTACAAAATATCTAAAACCTATAGCAATGTGATTAATAAAAACCTAAAC ATATTTCCAGTACCTTAATCTGTGATAGGAAAATTTAATCTGAGTATTTAATTTTATAATCTCTAAAATAGTT TAAATGATTTGTCATTTGCTGCTGTTTACCCAGCTGATCTCAAAAGTGATATTTAAGGAGATATTTTGGTC TGCAACAACCTTGATAGGACTATTTAGGGCCTTTTAAAGCTCTATTAACAACCTTCAACCGATTCAAAACCTGT TTTAAACTATTTCAAAAATGATTTTAGAGCCCTTTTGAACACTCTTTTAAACACTTTTTTAAACTCTATTAACAACCTAATA AGATAACTTGAATAAATTTTCAATGTCAAAATACATTAACCTGTTTAAATGTTTAAATGCCAGATGAAAAATGTAAAAGCT ATCAAGAAATCACCCAGATAGGAGTATCTCATAGCATGTTTTCCCTGCTTATTTCCAGTGATCACATTTATTTT GCTACCATGGTTATTTATACAATTTATCTGAAAAAAATTAGTTATGAAGATTAAGAGAGAAGAAAATATTAACAT AAGAGATTCAGTCTTTTCAATGTTGAACCTGTTGGTTAACAGTGAAGTTAGTTTTAAAAAAAANAANAACCTATTTCTG TTATCAGCTGACTTCTCCCTATCTGTTGACTTCTCCAGCAAAAGATTTCTTATTTTACATTTTAACTACTGCTCTCC CACCAACGGGTGGAATCCCCAGAGGGGATTTCCAAGAGGCCACCTGGCAGTTGCTGAGGGTCAGAAGTGAA GCTAGCCACTTCCCTTAGGCAGGTGGCCAAGATACAGTTGACCTCTCCTGGTATGGCTGAAAATTTGCTGCATA TGTTACAGGCCCTTGAGGCCCTTTGGGAGGGCTTAGAGAGTTGCTGGAACAGTCAGAAGGTGGAGGGGCTGACAC CACCAAGGGCAGAGGGCTCAGGGCCTGCTCTGAGGGGATTTAGCCAGCCCAAGTAAACCC CGGGAGCCTGTTATCCAGCACAGTCTGGAAGAGGACAGGGGAAATAAAGCGGACGGAGGCTTTCCCTTGAC TCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTCAGACCTGTTCTGAATTTCTAAACTCTGAGGGGTCGGATGACGTGGCCATTTCT TTGCCATAAGCATTGAGTTTACTGCAAGGTGAGAAAAGCATGCAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAAGAGCTCCAA CAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACG CTTCTTGGTCTCCTTGTATAAATTAATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGCCCTAACATGCCCTGTGATTA TCCGCAACAACACACACCCCAAGGGCAGAACTTTGTACTTAAACACCATCCTGTTGCTTCTTCCCTCAGGTGCCAA ATGT	10
	20
	30
	40

【表 3 C】

配列番号 79	完全入遺伝子に えて相同性アム	<p>GCTGAATCTTGAATGACAGCTCAAGGGATAGGGAGGACAGGGTGTTCAGAAGCAGAGAAGATGCCTTGTAAATG TGGAAGGCTGTGGCAGGATGGAAAGGACTTTGGGGTGTAGGAAGGGGATGGGAATGGGTGTTACAAGAGAA ACAAAGACTGTAGTAAATAAAGCTGAAACTCAAAGCAAGCTTTCAGCATCTTTAATTTGGAGACACAAACTTCAAAGG TATCATGAATGTGGTTGATCTTGGTGAAGTTGAGCTTCACTGTCTCAACAACAGACCAATCCATGAGTGAAG CTTATCTTTCTCCTTTAATGTTGCTTGTATCCATACTCAATCCAAAGGATATGAACCTTAAACATATAG ATATAATTTGTACCTTCTATGAAACAGCATTAAAGCAAGAAGTTCAAATAGAAAGACTGGCTTAGTATTAT TAACTAAGAGATGCTAGTGAGTTCTAAATTAATACCAATTTAAATTTATAATTTGCAGAAATACCAACCACCCAC CACTCAGCCAGGAAAGTTACAAGAAGCTGGCTATCCAAATTTGTTTCTCCTCTTTTAGAGTCTTTTATT TATGTTGAGTGAATGCCATGTACTTATGGATGCAGAGGCTGTCAAGATTCCTTGCAGCTGGAGTAATAGACAGTT GTGAGCTACTTAGTACTAGAACTAAGATCCTATGGAAGAGCAGCGAGTGCCACTAACTGCTGAGCCACCTCTC CAGCCCATTTCTTTATTTTCAATGAACAAAATAAAGCAGTCTTATGTACATGCTTTAAAGCAAAAAGATATAA TATTTAGTATTATACATTAATAAATAACATTTCTTAAGAAATGAAAGTCTCAACTATGAAAATCAGCAG TTCTCTGCAGAGAAGATGCCAGTTTCATCTGGATCCAAGTCTTCTCCATGTACATAGACAATTTGCTTGATAA GAGATTGAGTATGTTTTCTAAAGGTGTTAACAGGGAGGCTGGTGTCTGGTCAGGATGATGTCCCCATGCAC TGATAAAAAGTATAAGAANAAGTGTCTTATGTTGATGGCAGGGACATGCTCCGTGCAGTGGCCACCCCTCAC TAAGACAGATGAACTTTGGGAAAATAACCCAAATGGCAGAAAAGAGGTAGACTATGAAGGTACCCAAAACAAGA ATAAGGTGCACCTCAATTTAGTCTCTGGGTATTAAGAGACCTGCAGTCTTGTAGTGGTGGATCTGTGAGTGTCT GCATGCATGGAGACAACACGGTATCATCTTTGTATATCTGTAATAAAATGCTTGTATCTAATACTAGTAAGAACA GGCATAACACCATTACCTAATACCAATAATAGCATCATGCCGATACATTTATTTTAAATTTTTTTTAGAAA GGAAACAATGTTAACTCACAGAAATGTTGCAGGTATAGCACAATACCCCTTCCCTACCCGGAATCTTATGAGA GTCTTTTGAAGACTTGAAATCCTACCATCTAACATTTACTATGTGTTTCTACAACAAGAATATTTCTCCTAAA TAATCCTGATACACCAATGAAATACATTTACTCTATCGGCTCTGAGGAAATTTAAATTTCTCAAAAAATACCTA AAAAATGTTTCTCATAATAAAAATAGTCCCAAGTAGAACAACATTTCTGCAGACAAAATTTGTGCTACCCCTGGTCTT ACCTGGGACACCTGGGACACTGAGTGGTGTGTTACTGAGATGAGCCAGCTCTGCAGCTGTGCCAGGCT GCCCATCCCTGCTCATTTGCATGTTCCAGAGCACAACTCCTGCCCTGAAAGCCTTATTAATAGGCTGGTCACA</p>
---------	--------------------	---

10

20

30

40

【表 3 D】

CTTTGTGAGGAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG
 CTGCTCTGGCTCCAGGTAAGTAAATTTTCACTATTGTTCTCTGAAATTTGGGTCTGATGGCCAGTATTGACTTTT
 AGAGGCTTAAATAGGAGTTGGTAAAGATTGGTAAATGAGGGCATTAAAGATTGGCCATGGGTTGCAAAAAGTTAA
 ACTCAGCTTCAAAAATGGATTTGGAGAAAAAAGATTAAATTTGCTCTAAACTGAATGACACAAAAGTAAAAA
 AGTTAACTAAAAGAACCTTGTATTTCTAAGGAGCAAAAGTAAATTTATTTTTGTTCACTCTTGCCAAATATT
 GTATTGGTTGTTGCTGATTGCATGATACAGAAAAGTGGAAAAATACATTTTTAGTCTTTCTCCCTTTTGTITG
 ATAAATTTTTGTGACACAACAATAAAAATCAATAGCAGCCCTAAGAAAAATCAGGGAAAAAGTGAAGTGTACCT
 ATTTGCTATGTAGAAGAGGCAGCTTACTTGAANAATCAGCAGCAATGTTGTTTTTAGAGTCTGTAATAAGTAATAA
 ACTCAAAAAGACACATTTCTATAGGAATAAGGGCTTACAGATAGAGCTCATTTTTAAAAATCCAATTTGTACATT
 AGACTAAACGTGAAATTTCTCTTATTGTAATGGTGGAAAGGTGTTATTTCCAAAAGCTCAATCTCAAAGAAAT
 GTGTTAAATGAAAAAAGTAAATAATGCATTTTAATGACCGTGGGTCTGTGAAAAAATAGGAAATATTTTTA
 AAGAGTATGTTCTTTCAATTCCTCTGTTACTTGTCTACATTTTTTCTGCCAAGAAGCCGTGGCACCGCG
 AGCTGTAGACAGAGCCGGTCTTCTCGATTGAGTGGCTTTGGTGGCCATGCCACCCGCTCTTGGGGCAGCC
 GCCTTCCCCTAGTGGCCGTGGCCACCCTGTGCTGCCCGATTGATGCTGCCGTAGCCAGCTTTCCTGATGCACA
 GTGATACAAATAATGCCACTAAGGGAAGAGAACAGAAACGTAATGGGGCTGAGCTGGGAAACCAGGGAGAA
 GACTGATTTATTAGAGATTCAGAAATAAAATTCACATTCATTATGATATCTCATTAGTGAAAAATTTCCATTAGGG
 GATTGTAATAATTTAAAGCTTTTTTTTTTTTTCAGTGCTATTTAATTTTCAATATCCTCTCATCAAATGTTTAA
 AATAACAAAAGCTCAACCCAAAAAGAAAGAAATATGTAATTTCTTTCAGAGTAAAAATCACACCCATGACCTGGCCAC
 TGAGGGCTTGATCAATTCACTTTGAAATTTGGCATTAAATACCAATTAAGGTATATAAAGTATTTTTAAAAATAAGATA
 TATTCGTGACCATGTTTTAACTTTCAAAAATGTAGCTGCCAGTGTGATTTTTATTTTCAGTTGTACAAAAATATCT
 AAACCTATAGCAATGTGATTAATAAAAACTTAAACATAATTTCCAGTACCTTAATTTCTGTATAGGAAAAATTTTAA
 TCTGAGTATTTAAATTCATAATCTTAAAAATAGTTAATGATTTGTCTTGTGTTGCTGTTTACCCAGCTG
 ATCTCAAAAAGTGATATTTAAGGAGATTTATTTTGGTCTGCAACAACCTTGATAGGACTATTTTAGGGCTTTTTTAAAG
 CTCTATAAAAACTAAGTACAAACGATTTCAAAAAGTTTTTAAACTATTTTCAAAAATGATTTTAGAGCTTTTTGAAAAC
 CTTTTAAACACTTTTTAAACTCTATTAAACTAATAAGATAAAGTGAATAAATTTTCAATGTCAAAATACATTAAGTGT

10

20

30

40

【表 3 F】

<p>GAGGCATCTCCTAGTTTTCTCCCTAAGTCGTCAAAGTCTCAAAGGGGGACAGTCTTTACAAGCACATGTTCTGTAATCTGATCAACCTACCCAGTAACTTGGCGAAGCAAAGTAGAATCAATATCACAGGAAGCAAAGGCAACC TAAATGTCAAGCAATAGGAAAATGTGGAAGCCCATCATAGTACTTGGACTTCATCTGCTTTTGTGCCTTCACTA AGTTTTAAACATGAGCTGGCTCCTATCTGCCATTGGCAAGGCTGGCCTACCCACAACCTACTTCAAGGACCT CTATACCGTGAGATTACACACATACATCAAAAATTTGGGAAAAGTTCTACCAAGCTGAGAGCTGATCACCCCACTCT TAGGTGCTTATCTCTGTACACCAGAAACCTTAAGAAGCAACCAGTATTGAGAGAC</p>	<p>GCTGAATCTTGAATGACAGCTCAAGGGATAGGGAGGACAGGGTGTTCAGAAGCAGAGAAGATGCTTGTAAAATG TGGAAAGCTGTGGCAGGATTGGAAGGACTTTGGGGTGTAGGAAGGGGATGGGAATGGGTGTTACAAGAGAA ACAAGACTGTAGTAAATAAAGCTGAAACTCAAAGCAAGCTTTCAGCATCTTTAATGGAGACACAAACTTCAAAGG TATCATGAATGTGGTTGATCTTGGTAAAGTTGAGCTTCACTGTCCCTAACACAGACCAATCCATGAGTGAAAG CTTATCTTCTCCTTTAATTAATGTTGCTTGTATCCATAACTCAATCCAAAAGGATATGAACCTTAACATATAG ATATAAATTTGTGTACCTTCTATGAAACAGCATTAAAGCAAAAGAAAGTTCAAATAGAAAAGACTGGCTTAGTTATTAT TAACTAAGAGATGCTAGTGAGTTCTAAATTAATACCATTTAAAATTTATAATTTGCAGAAATACCACCACCAC CACTCAGCCAGGANAAGTTCAAAGAAGTGGCTATCCAATTTGTTGTTTTCTCCTTTTTAGAGTTCTTTTTAT TATGTGTGAGTGAATGCCATGTACTTATGGATGCAGAGGCTGTCAGATTCCTTGCAGCTGGAGTAATAGACAGTT GTGAGCTACTTATAGTACTAGAACTAAGATCCTATGGAAGAGCAGCGAGTGCCACTAAGCTGAGCCACCTCTC CAGCCATTTCTTTAATTTCAATGAACAAATAAAGCAGTCCCTATGTGACATGCTTCTAAAAGCAAAAGATATAA TATTTAGTATTATACATTAATAAATAAATACATTAATCTTAAGAAATGAAAGTCTCAACTATGAAAATCAGCAG TTCTCTGCAGAGAAGATGCCAGTTTCATCTGGATCCAAGTCTTCCATGTACATAGACAATCTTTTTAACC CTAGAAAAGTAGTCTGCGTAAAATGACGCATGCAATCTTGAATAATGCTCTCTTTCTAAAATAGCCGGAATCC GTCGCTGTGCATTAGGACATCTCAGTCGCCGCTTGAGCTCCCGTGAGGCGTGTGTCAAATGCGGTAAGTGT CACTGATTTTGAACATAAACGACCGGCTGAGTCAAAATGACCGCATGATTTATCTTTACGTGACTTTTAAAGATTTAA CTCATACGATAATTATATTGTTATTTTCATGTTCTACTTACGTGATAACTTATATATATATATATATTTTTCTTTGTTATAGA TATCTACCGGGTAGGGGAGGGGCTTTTCCCAAGGCGAGTCTGGAGCATGGGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTT</p>
<p>配列番号 80</p>	<p>ポジティブ/ネガティブ選 択カセットを含む完全1.5 標的指向化ベクター サート</p>

10

20

30

40

【表 3 H】

CTTGGACGTCTTGGCCAAACGCCTCCGTCCCATGCACGCTCTTTATCCTGGATTACGACCAATCGCCCCGGCTG
 CCGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCCCGGCTCCATACCGACGAT
 CTGGACCTGGCGGCACGTTTGCOCGGAGATGGGGAGGTAACCTAGCTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTC
 GACTGTGCCCTTAGTGGCAGCCATCTGTTTGGCCCTCCCGCTCCCTTCCCTGACCCCTGGAAGGTGCCAC
 TCCCACTGTCCTTCCATAAAATGAGGAAATGGCATGGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG
 TGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATGGGAAGACAAAGCAGGCATGCTGGGATGGGGTGGGCTCT
 ATGGCTTCTGAGGGGAAAGAACCCAGCTGGGGCTCGAGATCCACTAGTTAAAAGTTTGTACTTTATAGAAGAA
 ATTTTGAATTTTGTTTTTTAAATAAAATAAACATAAAATAAAATGTTTGTGAAATTTATTTAGTATGTAA
 GTGTAATATAATAAACTTAATATCTATTCAAATTAATAAATAAACCTCGATATACAGCCGATAAAAACACATGC
 GTCAATTTACGCATGATTATCTTTAACGTACGTACAATATGATTTCTTTCTAGGGTTAATCTAGTATAATTGC
 TTGATAAGAGATTGAGTATGTTTTTCCCTAAAGGTGTTAACAGGGAGGCTGGTGTCTGGTCAGGATGATGTCCC
 CATGCACTGATAAAAAGTATAAGAAGAAAGTGTCAATTGATGGTGCATGGCAGGGACATGCTCCGTGCAGTGGCC
 ACCCTCACTAAGACAGATGAACCTTTGGGAAATAATACCCAATGGCAGAAAAGAGGTAGACTATGAAGGTACCCA
 AAACAAGAAATAAGGTGCACCTCATTTAGTCTCTGGGTTAAAGAGACCTGCAGTTCTTGATAGTGGTGGATCTG
 TGAGTGTGCATGCATGGAGACAAACCGGTATCATCTTTGTATCTGTATAAAATGCTTGTACTAATACTAGTA
 AGAACAAAGGCATAACACCATACCTAATACTTACAAATATAGCATCATGCCGATACATTTTAAATTTT
 TTTAGAAAGGAAACAATGTTAAACTCACAGAAATGTTGCAGGTATAGCACAATTAACCCCTTCCCTACCCGGAATCT
 TATGAGAGTCTTTTGAAGACTTGAGAACTCCATCAACTTAACTATGTTTCTACAAAACAAGAATAATTC
 TCCTAAATAATCCTGATACACCAATGAAATACATTAATCTATCGGCTCCTGAGGAATAATTAATAATTTCAAAAA
 ATACCTAAAAATTTTCTCATAATAAATAGTCCCGTAGAAACACATTTCTGCAGACAAAATTTGTGCTACCC
 TGGTCTTACCTGGGACACTGGGACACTGAGCTGGTGTGAGTTACTGAGATGAGCCAGCTCTGCAGCTGTGC
 CCAGCCTGCCCATCCCTGCTCATTTGCATGTTCCAGAGCACAACTCCTGCCCTGAAGCCTTATAATAGGCT
 GGTACACTTTGTGCAGGAGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGG
 GCTCCTGCTGCTGGCTCCAGGTAAGTAAATTTTCACTATTGCTTCTGAAATTTGGGTCTGATGGCCAGTAT
 TGACTTTAGAGGCTTAAATAGGAGTTTGGTAAAGATTGGTAAATGAGGGCATTAAAGATTTGCCATGGGTTGCA

10

20

30

40

【表 3 I】

AAAAGTTAAACTCAGCTTCAAAAAATGGATTTGGAGAAAAAAGATTAAATGCTCTAAACTGAATGACACAAAAGTAA
 AAAAAAAGTGTAACTAAAAAGGAACCCCTTGATTTCTAAGGAGCAAAAAGTAAATTTATTTTTGTTCACTCTTGC
 CAAATAITGTATTGGTTGCTGATTATGCATGATACAGAAAAAGTGAAAAATACATTTTTTAGTCTTTCTCCCT
 TTTGTTTGATAAATTTTTGTCAGACAACAATAAAAAATCAATAGCACGCCCTAAGAAAAATCAGGAAAAAAGTGAA
 GTGTACCTATTTGCTATGTAGAAGAGGCAGCTTACTTGAAAAATCAGCAGCAATGTTGTTTTAGAGTCTGTAATA
 AGTAAATAAACTCAAAAAGACACATTTCTATAGGAATAAGGGCTTACAGATAGAGCTCATTTTTAAAAATCCAAT
 TGTACATTAGACTAAACGTGAAATTTACTCTTATTGTAATGGTGGAAAGTGGTTATTTCCAAAAGCTCAATCTCA
 AAGAAATGTTTTAAATGAAAAAAGTAAATAATGCATTTTTAAATGACCGTGGGTCTGTGAAAAAAAATAGGAA
 ATATTTAAAGAGTATGTTCTTTTCATTTATCCCTCTGTTATTACTTGTCTACATTTTTTATTCTGCCAAGAAGCCGCTG
 GCACCGGAGCTGTAGACAGAGCCGGCTTTCTCGATTGAGTGGCTTTGGTGGCCATGCCACCGGCTCTTG
 GGGCAGCCGCTTGCCGCTAGTGGCCGTGGCCACCCCTGTCTGCCGATTGATGCTGCCGTAGCCAGCTTCC
 TGATGCACAGTGTACAAATAATGCCACTAAGGGAAGAGAACAGAAACGTAATGGGCGCTGAGCTGGGAAAC
 CAGGGAGAAGACTGATTTATTAGAGATTTAGAGATTTAGAGATTTAGAGATTTAGATATCTCATTTAGTGAAAAATTT
 CCATTAGGGGATTTGAAATAATTTAAAGCTTTTTTTTTTTTTTCAAGTCTATTTAAATTTTCAATATCCTCTCATCAA
 ATGTATTTAAATAACAAAAGCTCAACCAAAAAAGAAAATAATGTAATTTCTTTCAGAGTAAAAATCACCCCATGA
 CCTGGCCACTGAGGGCTTGATCAATTCACTTTGAATTTGGCATTAAATACCATTAAGGTATATTAAGTATTTAA
 AATAAGATATTCGTGACCATGTTTTTAACTTTCAAAAATGTAGCTGCCAGTGTGATTTTATTTTCAGTTGTAC
 AAAATATCTAAACCTATAGCAATGTGATTAATAAAAACCTTAAACATATTTTCCAGTACCTTAAATTTCTGTGATAGGA
 AAAATTTAATCTGAGTATTTTAAATTTTCATAATCTCTAAAAATAGTTTTAATGATTTTGTCAATTTGTTGCTGCTTTA
 CCCCAGCTGATCTCAAAAGTGATTTAAGGAGATTTATTTGGTCTGCAACAACCTTGATAGGACTATTTTAGGGC
 CTTTTAAAGCTCTATAAACTAACTTACAACGATTTCAAACTGTTTTAACTATTTCAAAATGATTTTAGAGCCT
 TTTGAAAACTCTTTAAACACTTTTAAACTCTATAAACTAATAAGATAACTTGAATAAATTTTCATGTCAAATA
 CATTAACTGTTTAAATGTTTAAATGCCAGATGAAAAATGTAAAGCTATCAAGAAATTCACCCAGATAGGAGTATCTTC
 ATAGCATGTTTTCCCTGCTTATTTCCAGTGATCACATTTATTTGCTACCATGGTTATTTTATACAAATATCTGA
 AAAAAATTAGTTATGAAGATTAAGAGAGAGAAAAATTTAAACATAAGAGATTCAGTCTTTTCATGTTGAACCTGCTT

10

20

30

40

【表 3 J】

GGTTAACAGTGAAGTTAGTTTTAAAAAATAATTTCTGTTATCAGCTGACTTCTCCCTATCTGTTGACT
TCTCCAGCAAAAGATTCTTATTTTACATTTAACTACTGCTCTCCACCACCAAGGGTGGAAATCCCCAGAGGGG
GATTTCCAAGAGGCCACCTGGCAGTTGCTGAGGGTCAGAAAGTGAAGCTAGCCACTTCTCTTAGGCAGGTGGCC
AAGATTACAGTTGACCTCTCTGATGGTGAATAATGCTGCATATGGTTACAGGCCTTGAGGCCTTTTGGGAGG
GCTTAGAGAGTTGCTGGAACAGTCAGAAAGTGGAGGGGCTGACACCCAGCCAGGGCAGAGGGCAGGGCTCAGGG
CCTGCTCTGCAGGGAGTTTTAGCCAGCCCAAGTAACCCCGGGAGCCTGTTATCCACGACACAGTCCCTG
GAAGAGCACAGGGGAAATAAAAGCGGACGGAGGCTTCTTGACTCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTTACAGACCT
GTTCTGAATTTAAACTCTGAGGGGGTGGATGACGTGGCCATTTCTTGCCTAAAGCATTGAGTTTACTGCAAGG
TCAGAAAAGCATGCAAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAGAGCTCCAACAACAAATTTAGAACTTTATTAAGGAAT
AGGGGAAGCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTAAATACGCTTCTGGTCTCCTTGCATAAATATCTG
GGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGCCCTAACATGCCCTGTGATATCCGCAACACACACCCAAAGGGCAGAA
CTTTGTTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTCTCAGGTGCCAAATGTGTGTTGGCAGCGGACCCAGCT
CACCGTTTTAAGTCAGCCCAAGGCCACCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCGTCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAA
CAAGGCTACACTGGTGTCTCATGAATGACTTTATCCGGGAATCTTGACGGTGACCTGGAAGGCAGATGGTAC
CCCCATCACCCAGGGGTGGAGATGACCAGCCCTCCAACAGAGCAACAAGTACCGCGCCAGCAGCTACCT
GAGCCTGACGCCGAGCAGTGGAGGTCCCGCAGAAAGTACAGCTGCCAGGTCAAGCAGAAAGGGAGCACCGTGG
AGAAAGCGGTGGCCCTGCAGAAATGTTTATAGACAAGGTCTGAGACGCCACCCAGCTCCCAAGCTCCAT
CCTATCTTCCCTTCTAAGGTCTTGGAGGCTTCCCAACAAGCGACCTACCAGTGTGGGGTGTCCAAACCTCCTCC
CCACCTCCTTCTCCTCCTCCCTTCTGCTTCTTATCATGTAATATTTGCAGAAAATAATCAATAAAGTGA
GTCTTTGCACCTGAGATCTGTCTTTCTTACTAAATGGTAGTAATCAGTTGTTTTCCAGTTACCTGGGTTTCTC
TTCTAAAGAAGTTAAATGTTAGTTGCCCTGAAATCCACACACTTAAAGGATAAATAAACCCCTCCACTTGGCCT
GGTTGGCTGTCCACTACATGGCAGTCTTTCTAAGGTTACGAGTACTATTCATGGCTTATTTCTCTGGGCCATG
GTAGGTTTGAAGGACATACTTCTAGTTTTCTTCCCTAAGTCGTCAAAAGTCTGAAAGGGGACAGTCTTTTACA
AGCACATGTTCTGTAATCTGATTC AACCTACCCAGTAAACTTGGGAAAGCAAAAGTGAATCATTATCACAGGAAG
CAAAGGCAACCTAAATGTGCAAGCAATAGGAAAATGTGGAAGCCCATCATAGTACTTGGACTTCACTGCTCTTGG

10

20

30

40

【表 3 K】

	<p>TGCCTCACTAAGTTTTAAACATGAGCTGGCTCCTATCTGCCATTGGCAAGGCTGGGCACTACCCACAACCTAC TTC AAGGACCTCTATACCGTGAGATTACACACATACATCAAAATTTGGAAAAGTTCTACCAAGCTGAGAGCTGA TCACCCCACTTTAGGTGCTTATCTCTGTACACAGAAACCTTAAGAAGCAACCAGTATTGAGAGAC</p>		
<p>配列番号 81</p>	<p>λ5 導入遺伝子-スプライ シングを経た予測コード 配列</p>	<p>ATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCTGCTGCTGGCTCCAGGTGCCAAATGTGTGTTGG CAGCGGACCCAGCTCACCCTTTAAGTCAGCCCAAGGCCACCCCTCGGTCACTGTTCCCGCCGTCCTCTGA GGAGCTCAAGCCCAAGGCTACACTGGTGTCTCATGAATGACTTTTATCCGGGAATCTTGACGGTGACCTG GAAAGCAGATGGTACCCCATCACCCAGGGCTGGAGATGACCACGCCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGC GGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGGAGCAGTGGAGGTCGCCGCAAGCTACAGCTGCCAGGTCATGCACG AAGGAGCACCGTGGAGAGACGGTGGCCCTGCAGAAATGTTTCATAG</p>	
<p>配列番号 82</p>	<p>λ5 導入遺伝子-予測タン パク質</p>	<p>MDMRVPAQLLGLLLWLPQAKCVFSGTQLTVLSQPKATPSVTLFPPSSEELQAINKATLVCLMNDYFYPGILTVTWKA DGTPTIQVEMTTPSKQSNINKYAASSYLSLTPEQWRRRRSYSCQVMHEGSTVEKTVAPAECS.</p>	
<p>配列番号 83</p>	<p>Vκ3-2 断片遺伝子座-スプ ライシングを経た予測コ ード配列</p>	<p>ATGGAGAAAGACACACTCCTGCTATGGGTCTGCTCTCTGGGTTCCAGGTTCCACAGGTGACATTGTGCTGAAA CGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTC GTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAATTGATGGCAGTGAACGACAAAT GGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACGGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACC AAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAG AGCTTCAACAGGAATGAGTGTAG</p>	
<p>配列番号 84</p>	<p>Vκ3-2 断片遺伝子座-予測 タンパク質</p>	<p>MEKDTLLLWVLLWVPGSTGDIVLKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVL NSWTDQDSKIDSTYGMSSLLTLTKDEYERHNSYTCETHKTKTSTSPIVKSFNRNEC.</p>	

10

20

30

40

【表 3 M】

配列番号 91	Vκ6-17 完全導入遺伝子: イントロン及び J5 断片を 含むプロモーター及びリ ーダー	GGGTTAGGTGCATCGATATCTCTGAATGAACACAGACCCAGCAGTACTCTTCTGTATGTGTGGTGGCCATCAT ATCAGCTGGTGTATGCTGCCTGTTGGTGATCCAGTGTGGAGAGATCTCGGGGTCAGATTAATTGAGACAG TTGGACTTCTACAGGGTCACTGCTCCTCAACTTCTTTCAGTCTTCCCTAAATTCACAACACAGGAGTCAGCTGC TTCTGTCCATTGGTTGGGTGCAATACCTGCATCTAGCTCAACTGCTTGTGTATCTTCTAGAGTGAGGTCAATGC TAGGTCCCTTTCTGTGAGTCTTCATAGCCTCAATGATGTCAGGCCCTTGTGGCTGCCACTTGAGCTGGATTCT CACTTTGGACCTGTCGCTGGACCTTCTTTCTTCAGGCTCCCTCCATTTCCATCCCTGTAATCTTTCAGACAGG AACAAATATGGGTCAGAGTTGTAACCTGAGGATGGCACCCCTCCCTCATTTGATGCCCTGCTTCCCTGCTGGAG GTGGGCTCTAGAAAGTTCCCTCTCCCTACTGTTGGGCATTTTATCCCTTTGATTCCTGAGAGTCTCTCACCTGCAA GGTCTCTGGTGCAATCTGGAGGGTCTCCCAACCTCCTACCTCCTGAGGTGCCTGCTTCCATCTTTCAGCTGG CCCTCAGTGCTTTCAGTCCCTTACCCTCACCCAAATCTGATTTGATGGAAGCCTATCATGAGAGCATCTATACAC TTGTGGTTTCAGAGCTTTAAATGGTCTTTCAGCTTCTATTTTGACTTCCCTCCAGTGATTAATCCCTTATTTGATGACTCC GTTGTACTTTTGACTGTTTATTTAACCTGGATACTCTCAAACCCGCTGTGTAATTAATCCCTTATTTGATGACTCC TTTGCATAGATCCCTAGAGGCCAGCCAGCTGCTCATGATTTATAAACCCAGGCTTTTGCAGTGAGATATGAAATG CATCACACCAGCATGGGCATCAAAATGGAGTCAAGATTCAGGCTTTTGTATTCGTTTCTCTGGTTTCTCTGGT GAGACATGTAAACTTTTATAATATCTTAAAGTAAATTCATTTAAATATCTATTTCCCTATAAGAACCAATATTAG GCAGACAAATGCTATTAGATAAGACATTTGGATTTCAACATTTGTATCATGAAGTCTTTGTATGTGTAAGTGTATA CACATTATCTGTTTCTGTTTGCAGGTTTGACGGGACATTTGTGCTGAAAC
---------	---	--

10

20

30

40

【表 3 N】

配列番号 92	<p>相同性アームを含む V_K6-17 完全標的指向北ベクタ ーインサート</p> <p>GCTGAATCTTGAATGACAGCTCAAGGGATAGGGAGGACAGGGTGTTCAGAAAGCAGAGAAGATGCCTTGTAAATG TGGAAAGGCTGTGGCAGGATTGGAAGGACTTTGGGGTGGTAGGAAGGGGATGGGAATGGGTGGTTACAAGAGAA ACAAGACTGTAGTAAATAAAGCTGAAACTCAAAGCAAGCTTTACAGCATCTTTAATTGGAGACACAAACTTCAAAGG TATCATGAATGTGGTTGATCTTGGTGAAGTTGAGCTTCACTGTCTCACTAACAACAGACCAATCCATGAGTGAAG CTTATCTTCTCCTTATTAATGGTTGCTGTGTATCCATAACTCAATCCAAAGGATATGAACCTTAAACATATAG ATATAATTTGTACCTTCTATGAAACAGCATTAAAGCAAAGATTCAAAATAGAAAGACTGGCTTAGTTATTAT TAACTAAGAGATGCTAGTGAGTTCTAAATTAATACCATTTAAATTTAATAATTTGCAGAAATACCACCACCAAC CACTCAGCCAGGAAAAGTTACAAGAAGCTGGCTATCCAAATTTGTTTCTCTCTCTTTTAGAGTTCTTTTATT TATGTGTGAGTGAATGCCATGTACTTATGGATGCAGAGGCTGCAGATTCCTTGCAGCTGGAGTAATAGACAGTT GTGAGCTACTTATAGTACTAGAACTAAGATCCTATGGAAGAGCAGCGAGTGCCACTAAGCTGTGAGCCACCTCTC CAGCCCATTTCTTATTTCAATGAACAAATAAAGCAGTCTATGTGACATGCTTCTAAAGCAAAGATATAA TATTTAGTATTATACATTAATAATAATAACATTTCTTCTAAGAAATGAAAGTCTCAACTATGAAAATCAGCAG TTCTCTGCAGAGAAGGGTTAGGTGCATCGATATCTCTGAATGAACACAGACCCAGCAGTACTCTTCTGTATGT GTGTTGGTGGCATCATACAGCTGGTGTATGCTGCCTGTTGGTGATCCAGTGTTCAGAGATCTCGGGGGTCC AGATTAATGAGACAGTTGGACTTCTACAGGGTCACTGTCTCTCAACTTCTTTCAGTCTTCCCTAATTC AAC AACAGGAGTCAGCTGCTTCTGTCCATTTGGTTGGGTGCAATACCTGCATCTAGCTCAACTGCTTGTGTATCTTC TAGAGTGAGGTGCTAGGTCCCTTTCTGTGAGTTCTTATAGCCCAATGATGATGTCAGGCCCTTGTGGCTGC CACTTGAGCTGGATTCACATTTGGACCTGTGCTGGACCTTCTTTTCTTTCAGGGCTCCCTCCATTTCCATCCCTGT AATTTCTTTCAGACAGGAACAAATATGGGTGAGAGTTGTAAGTGGATGGACCCCTCCCTCATTTGATGCC TGTCTTCCCTGCTGGAGGTGGGCTTAGAAGTTCCCTCCTCCTACTGTTGGCATTTTATCCCTTTGATTCCTGAG AGTCTCACCTGCAAGGTCTCTGGTGCATCTGGAGGTCTCCCAACCTCCTACCTCTGAGGTGGCTTGCCTGCTT CCATTTCTTTCAGCTGGCCCTCAGTCTTCACTTACCTTACCTCAGCCAAATCTGATTTGATGGAAGCCTATCAT GAGAGCATCTATACACTTGTGGTTTCAGAGCTTTAAATGGTCTTGGCTTCTATTTTGAATTTCTTCCAGTGA TTAATTTCTGCTTTGGTTGTACTTTTGAAGTGTATTTAACTGGATCTCTCAAAACCCGCTGTGTAATTTACTTC CTTATTTGATGACTCCTTTGCATAGATCCCTAGAGGCCAGCCAGCTGCTCATGATTTATAAACCCAGGCTCTTTGCA</p>
---------	---

10

20

30

40

【表 30】

<p>GTGAGATGAAATGCATCACACCAGCATGGGCATCAAAATGGAGTCACAGATTCCAGGCTTTGTATTCGGTGTTCCTGTTGCTGGTGAGACATGTAACCTTTATAATATCTTAAAGTAATTCATTTAAATATCTATTCCTATAAGAACCAATATTAGGCAGACAATGCTATTAGATAAGACATTTGGATTCTAACATTTGTATCATGAAGTCTTTGTATGTAAAGTGTATACACATTACTGTTTCTGTTTGCAGGTGTGACGGAGACATTTGTCTGAAACGTAAGTACACTTTTCTCATCTTTTATGTAAAGACACAGGTTTTCATGTTAGGAGTTAAAGTCAGTTCAGAAAATCTTGAGAAAATGGAGGGCTCATTATCAGTTGACGTGGCATACAGTGTACAGATTTCTGTTTATCAAGCTAGTGAGATTAGGGCAAAAAGAGGCTTTAGTTGAGAGGAAAGTAATTAATACTATGGTCACCATCCAAGAGATTGGATCGGAGAATAAGCATGAGTAGTTATTGAGATCTGGGCTGACTGCAGGTAGCGTGGTCTTCTAGACGTTTAAAGTGGAGATTTGGAGGGATGAGGAATGAAGGAACCTCAGGATAGAAAAGGGCTGAAGTCAAGTTCAGCTCCTAAAATGGATGTGGAGCAAACTTTGAAGATAAACTGAATGACCCAGAGGATGAACAGCCAGATCAAGAGGGCCCTGGAGCTCTGAGAAGAGAGGAGACTCATCCGTGTGAGTTCCACAAGTACTGCTTGAGTTTGCAATAAAAAGTGGGATAGCAGATTGAGTGAGCCGTAGGCTGAGTCTCTCTTTTGTCTCCTAAGTTTTATGACTACAAAATCAGTAGTATGTCCTGAAAATAATCAATTAAGCTGTTTGAAGGTATGACTGCTTGCCATGTAGATACCATGGCTTGCTGAATAATCAGAAGAGGTGACTCTTATTCTAAAATTTGTACAAAATGTCAAAAATGAGAGACTCTGTAGGAACGAGTCTTGACAGACGCTCAAGGGGTTTTTCCCTTGTCTCATTTCTACATGAAAAGTAAAATTTGAAATGATCTTTTTTATTATAAGTAGTAAAAATACAGTTGGGTTTGAACATATATGTTTTAATGGCCCGGTTTTGTAAAGACATTTGGTCCCTTTGTTTTCCCAGTTTACTCGATTGTAATTTTATATCGCCAGCAATGGACTGAAACGGTCCGCAACCTCTCTTTACAACCTGGTGACCTCGGGCTG</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	---

【表 3 P】

配列番号 93	V _K 10-96 完全導入遺伝子: イントロン及び J5 断片を 含むプロモーター及びびり ーダ―	ACAGTGGGTAATAGTCTCTGGCAGGACAGCGCTGATGATCATGAGGGCTTCCTCTCAGCAATTAAGACTACAAT GGGAACATATCCATAACACAGTGCAGTGTGACTGGTACTAGGGATGTCCTTTTACACTGTGCTTAATTTT GTTGGGATTCATTATTTATCCAATCGTAGGAACCAATGTAAACATCCAGAGTACCCAGTAGCAGTGTCTTCTGTT ATAGTATTC AAGGATATCTTCACTAGTCAAACGCTGATGCTGAAGAAATGTGGTAAATATTAGCAAGTACAAGAA AAGTGTTTAAGTAGATGATCCCAAACTGAGCAAGGGTACATCCCATTATCCCAAGAGAAATAATATACTTTTCAT ATTCATGTGGACAAGAAATTCCTTGTGATATAGGTTGCTGGGATCAGGAAATATATGTGCCCATATTTTGCATTT ACTCATTACTGTATTAACACGGCTAATCTGTTAAATCTTACTTTTTAAATTCACCAAAAAGAGTCCCTGATAAA TTATACTTTAATTAAGACATGATTAATCAACAAAATGTTTCAAGGATAATATGTAGTATTTTAAAA GCAATTGAATTTAATCTGATTAATAATCTCCTGTTTGAATAATTTCTAGAAAACAAGATGTTTTTATATTAC ACCCAATGTATATTTGATATATAGTATTACAATTAGAGTTCATGTATAGTAGAAATTTTCAAATAACCTTCAAAT GACATCTGTAAATTTAAAACCTTAAAAATGAAGTGTGATCTCAAAGCCATATGTTCACTCTGACCTTGGGCAAAG AGGGTCACTGTGCTTGTGCTAAGTCCCTGAGAAAGTTAGCCTTGAGCTGTGCTCAGCCCTAAATAGTTCCTCAA AAATTTGCATGCTCCTCCTATCTTTGGGTACTTTTTCATATACCAGTCAGATTTGTAGCCATTGTAATTTGAA GTCAAGACTCAGCCCTGGACATGATGCTCCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTGTTTTCAAGGTAAAAAT TTACTACAATGGGAAATTTGCTGTTGCACAGTATCTTGTGACTGGAATTTTGGAGGGGTCTCTTTCTTTCTCT GCTTAACTCTGTGGGTAATTTATATGTCTCCACTCCTAGGTACCAGATGTGATATCCAGCTGAAAC
---------	--	---

10

20

30

40

【表 3 Q】

<p>配列番号 94</p>	<p>相同性アームを含む V_K 10-96 完全標的指向化ベ クターインサート</p>	<p>GCTGAATCTTGAATGACAGCTCAAGGGATAGGGAGGACAGGGTGTTCAGAAGCAGAGAAGATGCCTTGTAAATG TGAAGGCTGTGGCAGGATTGGAAGGACTTTGGGGTGTAGGAAGGGGATGGAAATGGGTGTACAAAGAGAA ACAAGACTGTAGTAAATAAAGCTGAAACTCAAGCAAGCTTTCAGCATCTTTAATTTGGAGACACAAACTTCAAAGG TATCATGAATGTGGTTGATCTTGGTAAAGTTGAGCTTCACTGTCTCAACAACAGACCAATCCATGAGTGAAAG CTTATCTTCTCCTTTAATGATGGTGTGTATCCATAACTCAATCCAAAGGATATGAACCTTAACATATAG ATATAATTTGTGTACCTTCTATGAAACAGCATTAAAGCAAGAAGTTCAAAATAGAAAGACTGGCTTAGTATTAT TAACTAAGAGATGCTAGTGAGTTCTAAAATTAATACCATTTAAAATTTATAAATTTGCAGAAATACCAACCACCCAC CACTCAGCCAGGAAAAGTTACAAGAAGCTGGCTATCCAAATTTGTTTCTCCTTTTTAGAGTCTTTTTATT TATGTGTGAGTGAATGCCATGTACTTATGGATGCAGAGGCTGCAGATTCCTTGACGTGGAGTATAGACAGTT GTGAGCTACTTAGTACTAGAACTAAGATCCTATGGAAGAGCAGCGAGTGCCACTAACTGCTGAGCCACCTCTC CAGCCCATTTCTTTAATTTCAATGAACAAAATAAAGCAGTCTTATGTACATGCTTCTAAAGCAAAAGATAAA TATTTAGTATTATATACATTAATAATAAATAACATTTCTTAAAGAAATGAAGTCTCAACTATGAAAATCAGCAG TTCTCTGCAGAGAAGACAGTGGTAAATAGTCTCTGGCAGGACAGCGCTGATGATCATGAGGGCTTCCCTCTCAGC AATTAAGACTACAATGGGAACATATCCATAACACAGTGCAGTGTGGACTGGTATACAGGGATGTCCTTTTA CACTGTGCTTAAATTTGTTGGATTCAATTTTATCCAAATCGTAGGAACCAAAATGTAACATCCAGAGTACCCAGTA GCAGTGTCTGTGTATAGTATCAAGGATATCTTCACTAGTCAAAGTGTATGCTGAAGAAATTTGGTAAATAT TAGCAAGTACAAGAAAAGTGTAAAGTAGATGATCCCAAAGTGAAGGATACATCCCAATTTATTTCCCAAGAGA ATAAATATACTTTTCATATTCATGTGGACAAAAGAAATTCCTTTGTGATATAGGTTGCTGGGATCAGGAAATATATGTG CCCATAATTTGCATTTACTCATTACTGTATTAACACGGCTAAATCTGTTAAATCTTACTTTTTAATCCACAAA AAGAGTCTGTATAAATTAATCTTAATTAAGACATGATTAATCAACACAAATGGTTCACAAGGATAATA TGTAGTATTTAAAGCAATGAAATTAATCTGATTAATAATCTCCTGTTTGAATAATTTCTAGAAAACAAGA TTGTTTTTATATTACACCCCAATGTATTTGATATATAGTATTAACAATAGAGCTCATGTATAGTAAATTTTC AAATAACCTTCAAAAATGACATCTGTAATTTTAAAACCTTAAAAATGAAGTGTGATCTCCAAAAGCCATATGTTCACT CTGACCTTGGGCAAAAGAGGGGTCACTGTGCTTGTGCTAAGTCCGTGAGAAGAGTTAGCCTTGACAGCTGTGCTCAG CCCTAAAATAGTTCCCAAAAATTTGCATGCTCTCACTTCTCTTGGGTACTTTTTTCATATACCAAGTCAGATTGT</p>
----------------	--	---

10

20

30

40

【表 3 R】

		GAGCCATTGTAATTGAAGTCAAGACTCAGCCTGGACATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTC TGTTTTCAAGGTAAAATTTACTACAATGGGAAATTTGCTGTTGCACAGTGATTCCTGTTGACTGGAATTTGGAG GGGTCTTTCTTTCCCTGCTTAACTCTGTGGGATTTATATGTCTCCACTCTAGGTACCAGATGTGATATCCAG CTGAAACGTAAAGTACACTTTTCTCATCTTTTATGTGTAAAGACACAGGTTTTTCATGTTAGGAGTTAAAGTCAAGT TCAGAAAATCTTGAGAAAATGGAGAGGGCTCATATCAGTTGACGTGGCATACAGTGCAGATTTCTGTTATC AAGCTAGTGAGATTAGGGGCAAAAAGAGGCTTAGTTGAGAGGAAAAGTAAATTAATACTATGGTACCATCCAAGA GATTGGATCGGAGAATAAGCATGAGTAGTTATTGAGATCTGGGTCTGACTGCAGGTAGCGTGGTCTTCTAGACG TTTAAAGTGGGAGATTTGGAGGGGATGAGGAAATGAAGGAACTTCAGGATAGAAAAGGGCTGAAGTCAAGTTCAGC TCCTAAAATGGATGTGGGAGCAAACTTTGAAGATAAAGTAACTGAATGACCCAGAGGATGAAACAGCCAGATCAAAGA GGGGCTGGAGCTCTGAGAAGAGAGGAGACTCATCCGTGTTGAGTTCACAAAGTACTGTCTTGAAGTTTTGCA ATAAAGTGGGATAGCAGAGTTGAGTGAGCCGTAGGCTGAGTTCCTCTTTTGTCTCCTAAGTTTTATGACTAC AAAAATCAGTAGTATGTCCTGAAAATAATCATTAAAGCTGTTGAAAGTATGACTGCTTGCATGTAGATACCATGG CTTGCTGAAATAATCAGAAGAGGTGACTCTTATTCTAAAATTTGTACAAAATGTCAAAAATGAGAGACTCTGTA GGAACGAGTCTTGACAGACAGCTCAAGGGTTTTTCCCTTGTCTCATTTCTACATGAAAAGTAAAATTTGAAAT GATCTTTTTATTATAAGAGTAGAAAATACAGTTGGGTTTGAAGTATATGTTTAAATGGCCACGGTTTTTGTAGACA TTTGGTCTTTGTTTTCCAGTTATTACTCGATTGTAATTTATATCGCCAGCAATGGACTGAAACGGTCCGCAAC CTCTTCTTTACAACCTGGGTGACCTCGGGCTG
配列番号 95	プライマー-HCP428	GCTCTGGCTCCAGGAACTG
配列番号 96	プライマー-HCP431	GTCTGCTCTGTGACTCT
配列番号 97	プライマー-HCP446	TTTGTGACGGAGTCAGACCCAG
配列番号 98	プライマー-HCP451	AAAAGGTCAGAGGCCAAAAGGAT
配列番号 99	プライマー-HCP428	GCTCTGGCTCCAGGAACTG

10

20

30

40

【表 3 5】

配列番号 100	マウスλ5 遺伝子断片、正しいJ-セグメント様ドメイン及びC-セグメント様ドメインを含むように短縮化	GTCTTTGGTGGTGGGACCCAGCTCACAATCCTAGGTCAGCCCAAGTCTGACCCCTTGGTCACTCTGTTCCTGCCTTCCTTAAAGAATCTTCAGCCCAAGCCACACGTCAGTGTGTTGGTGAGCGAATTCACCCAGGTACTTTGGTGTGGACTGGAAGGTAGATGGGTCCTGTCACTCAGGGGTAGAGACAACCCCAACCTCCAAAACAGACCAACAACAATAACATGGTCAGCAGCTACCTGACACTGATATCTGACCAGTGGATGCCTCACAGTAGATACAGCTGCCCGGGTCACTCATGAAAGGAAACACTGTGGAGAAAGAGTGTGTCACTGCTGAGTGTCTTAG
配列番号 101	マウスλ5 遺伝子断片、正しいJ-セグメント様ドメイン及びC-セグメント様ドメイン-翻訳済みを含むように短縮化	VFGGGTQLTILGQPKSDPLVTLFLPSLKNLQANKATLVCLVSEFYPGTLWDWKVDGVPVTQGVETTQPSKQTNMKYMVSSYLTLISDQWMPHSRYSRVTHEGNTVEKSVSPAEC

10

20

30

40

【 0 2 6 9 】

表C: 本発明のマウスの遺伝子座に包含するためのヒト対立遺伝子の例

50

(a) 及び (b) において以下の遺伝子セグメントのうちの一つ、複数又は全てが、それぞれ、重鎖遺伝子座又は軽鎖(カッパ又はラムダ)遺伝子座によって含まれ得る。

(a) 重鎖遺伝子座

【 0 2 7 0 】

【 表 4 】

定常領域	対立遺伝子
IGHA1	
IGHA2	02
IGHD	
IGHE	04
IGHG1	02
IGHG2	06
IGHG3	10
IGHG4	
IGHM	03

10

【 0 2 7 1 】

20

【表 5】

可変エレメント	対立遺伝子	可変エレメント	対立遺伝子	可変エレメント	対立遺伝子	可変エレメント	対立遺伝子
JH6	02	D1-14	01	VH2-5	10	VH3-43	01
JH5	02	D6-13	01	VH3-7	01	VH1-45	02
JH4	02	D5-12	01	VH1-8	01	VH1-46	01
JH3	02	D4-11	01	VH3-9	01	VH3-48	01
JH2	01	D3-10	01	VH3-11	01	VH3-49	05
JH1	01	D3-9	01	VH3-13	01	VH5-51	01
D7-27	02	D2-8	01	VH3-15	01	VH3-53	01
D1-26	01	D1-7	01	VH1-18	01	VH1-58	01
D6-25	01	D6-6	01	VH3-20	01 又は d01	VH4-59	01
D5-24	01	D5-5	01	VH3-21	03	VH4-61	01
D4-23	01	D4-4	01	VH3-23	04	VH3-64	02
D3-22	01	D3-3	01	VH1-24	01 又は d01	VH3-66	03
D2-21	02	D2-2	02	VH2-26	01 又は d01	VH1-69	12
D1-20	01	D1-1	01	VH4-28	05	VH2-70	04
D6-19	01	VH6-1	01	VH3-30	18	VH3-72	01
D5-18	01	VH1-2	02	VH4-31	03	VH3-73	02
D4-17	01	VH1-3	01	VH3-33	01	VH3-74	01
D3-16	02	VH4-4	02	VH4-34	01		
D2-15	01	VH7-4	01	VH4-39	01		

【 0 2 7 2 】

(b) カッパ定常ドメインシールド

10

20

30

40

50

【 0 2 7 3 】

【 表 6 】

定常エレメント	対立遺伝子
IGKC	01

【 図 1 A 】

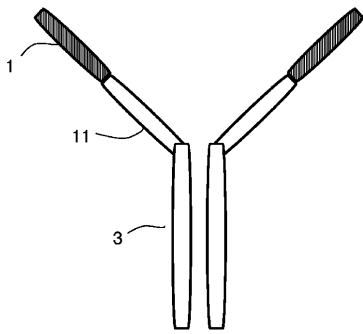


FIGURE 1A

【 図 1 B 】

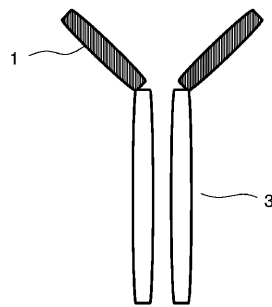


FIGURE 1B

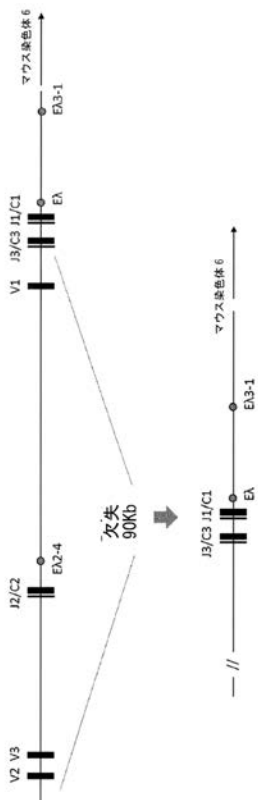
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

プライマー名	プライマー配列	プライマー方向	プライマー位置/詳細
HCP428	gcctgctctccaggaactg	逆方向	トランケートされたカフ/断片におけるヒトV _H C1-5エクソン1/C _H コード領域シランクションは、完全長マウス κ 軽鎖からのC _K を導出する
HCP431	gctcgtctctgacacctc	逆方向	マウスC _K コード領域
HCP446	tttctcagggtcagaccag	逆方向	ヒトV _H C1-5 3'UTR
HCP451	ataagggtctcaggccaaggat	逆方向	マウスC _K 3'UTR

【配列表】

2021536478000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/073767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01K67/027 C07K16/00 C07K16/46 C12N15/85 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/089814 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 5 July 2012 (2012-07-05)	1,2,4,5, 8,10,16, 17,21-24
Y	claims 1-5,11-16; figure 1	3,6,7,9, 11-15, 18-20, 29-35
Y	----- WO 2009/068649 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; ASHMAN CLAIRE [GB] ET AL.) 4 June 2009 (2009-06-04) figures 1-8, 42, 51,60 ----- -/--	3,6,7,9, 11-15, 18-20, 29-35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 December 2019		Date of mailing of the international search report 17/12/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lonnoy, Olivier

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/073767

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/095338 A2 (IMCLONE SYSTEMS INC [US]; ZHU ZHENPING [US]) 23 August 2007 (2007-08-23) figures 1,2,4,7, 10 -----	3,6,7,9, 11-15, 18-20, 29-35
Y	WO 2007/085837 A1 (UNIV ERASMUS MEDICAL CT [NL]; GROSVELD FRANKLIN GERARDUS [NL] ET AL.) 2 August 2007 (2007-08-02) figures 1,2,5; example 1 -----	3,6,7,9, 11-15, 18-20, 29-35
X	WO 2018/038469 A1 (IBENTRUS INC [KR]) 1 March 2018 (2018-03-01) figures 2,4-6; example 2 -----	1,2,10 25-35
X	MARY E. DONOHOE ET AL: "Transgenic Human [lambda]5 Rescues the Murine [lambda]5 Nullizygous Phenotype", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 164, no. 10, 15 May 2000 (2000-05-15) , pages 5269-5276, XP055651642, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.164.10.5269 abstract -----	27,32
X,P	WO 2019/018770 A1 (TRIANNI INC [US]) 24 January 2019 (2019-01-24) the whole document -----	1,4,7,8, 21-30, 32-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/073767

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012089814 A1	05-07-2012	EP 2658869 A1	06-11-2013
		US 2014037631 A1	06-02-2014
		US 2017152324 A1	01-06-2017
		WO 2012089814 A1	05-07-2012
WO 2009068649 A2	04-06-2009	AR 069495 A1	27-01-2010
		AU 2008328726 A1	04-06-2009
		AU 2014224077 A1	02-10-2014
		CA 2706419 A1	04-06-2009
		CL 2008003561 A1	05-02-2010
		CN 101932608 A	29-12-2010
		CN 104650235 A	27-05-2015
		CO 6280497 A2	20-05-2011
		DE 112008003232 T5	24-02-2011
		EA 201000704 A1	30-12-2010
		EP 2222709 A2	01-09-2010
		EP 2615115 A2	17-07-2013
		EP 2641919 A2	25-09-2013
		ES 2614284 T3	30-05-2017
		GB 2468232 A	01-09-2010
		IL 205906 A	30-11-2014
		JP 5791898 B2	07-10-2015
		JP 2011504742 A	17-02-2011
		KR 20100097720 A	03-09-2010
		MA 31940 B1	01-12-2010
		PE 20091234 A1	07-09-2009
		TW 200944231 A	01-11-2009
		US 2009148905 A1	11-06-2009
		US 2011008345 A1	13-01-2011
		US 2016207993 A1	21-07-2016
		UY 31504 A1	17-07-2009
		WO 2009068649 A2	04-06-2009
ZA 201003850 B	26-10-2011		
WO 2007095338 A2	23-08-2007	AU 2007215013 A1	23-08-2007
		BR P10707824 A2	10-05-2011
		CA 2638794 A1	23-08-2007
		CN 101432015 A	13-05-2009
		EA 200870265 A1	27-02-2009
		EP 1986684 A2	05-11-2008
		JP 2009526857 A	23-07-2009
		KR 20080106245 A	04-12-2008
		WO 2007095338 A2	23-08-2007
WO 2007085837 A1	02-08-2007	AU 2007209130 A1	02-08-2007
		BR P10706737 A2	05-04-2011
		CA 2637945 A1	02-08-2007
		CN 101472946 A	01-07-2009
		EP 1989229 A1	12-11-2008
		JP 2009524422 A	02-07-2009
		KR 20080106201 A	04-12-2008
		TW 200808824 A	16-02-2008
		US 2009169548 A1	02-07-2009
		WO 2007085837 A1	02-08-2007
		ZA 200806492 B	30-12-2009
WO 2018038469 A1	01-03-2018	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/073767

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019018770	A1	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	C 1 2 N 15/12	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (72) 発明者 スティーヴン・ダウド
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2 ・ 3 A T ・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ザ・ベネット・ビルディング・(ビー930)・カイマブ・リミテッド内
- (72) 発明者 アンドリュー・リンゼー・ウッド
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2 ・ 3 A T ・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ザ・ベネット・ビルディング・(ビー930)・カイマブ・リミテッド内
- (72) 発明者 イー・チアン・リー
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2 ・ 3 A T ・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ザ・ベネット・ビルディング・(ビー930)・カイマブ・リミテッド内
- (72) 発明者 ハンナ・リントン・クレイグ
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2 ・ 3 A T ・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ザ・ベネット・ビルディング・(ビー930)・カイマブ・リミテッド内
- (72) 発明者 アラン・ブラッドリー
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2 ・ 3 A T ・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ザ・ベネット・ビルディング・(ビー930)・カイマブ・リミテッド内

F ターム(参考) 4B065 AA92X AA94Y AB01 AC14 BA02 BA04 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB36 BB37 CC04 CC22 CC23 DD62
4H045 AA11 AA20 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74