



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107090471 A

(43)申请公布日 2017. 08. 25

(21)申请号 201611201918.8

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2013.03.05

C12N 15/85(2006.01)

(30)优先权数据

A01K 67/027(2006.01)

13/412,936 2012.03.06 US

C07K 16/00(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

(62)分案原申请数据

201380012671.3 2013.03.05

(71)申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72)发明人 R·巴布 J·麦克沃特

L·麦克唐纳 S·史蒂文斯

S·戴维斯 D·R·巴克勒

K·A·马尔 A·J·莫菲

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

权利要求书1页 说明书66页

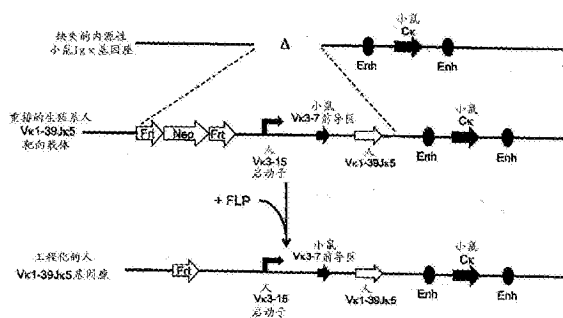
序列表12页 附图9页

(54)发明名称

共同轻链小鼠

(57)摘要

本发明提供遗传修饰的小鼠,其中所述小鼠表达特征为有限的轻链可变区的免疫球蛋白轻链群。本发明提供小鼠,其从它们生殖系中有限群表达只有一个或几个免疫球蛋白轻链可变区。本发明提供在小鼠中制备轻链可变区的方法,包括人轻链可变区。本发明提供制备适用于多特异性结合蛋白(例如双特异性抗体)的人可变区的方法。



1. 一种响应抗原挑战表达一群抗原特异性抗体的小鼠, 其中所述一群抗原特异性抗体的所有免疫球蛋白轻链包括源自相同的单一人V_L基因片段的人轻链可变(V_L)区以及免疫球蛋白重链包括源自人V_H基因片段的人重链可变(V_H)区, 所述人V_H基因片段选自V_H1-2、V_H1-3、V_H1-8、V_H1-18、V_H1-24、V_H1-46、V_H1-58、V_H1-69、V_H2-5、V_H2-26、V_H2-70、V_H3-7、V_H3-9、V_H3-11、V_H3-13、V_H3-15、V_H3-20、V_H3-21、V_H3-23、V_H3-30、V_H3-33、V_H3-43、V_H3-48、V_H3-53、V_H3-64、V_H3-72、V_H3-73、V_H4-31、V_H4-34、V_H4-39、V_H4-59、V_H5-51、V_H6-1。

共同轻链小鼠

[0001] 本申请是申请日为2013年3月5日、申请号为201380012671.3的同名申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供一种遗传修饰小鼠,其表达具有与不同的人可变/小鼠恒定重链缔合的共同人可变/小鼠恒定轻链的抗体。本发明提供一种从小鼠的B细胞的人可变区基因序列制备人双特异性抗体的方法。

背景技术

[0003] 抗体通常包括同源二聚化重链组分,其中每条重链单体与相同的轻链相缔合。期望具有异源二聚化组分的抗体(例如,双特异性抗体)作为治疗性抗体。但制备具有可以令人满意地与双特异性抗体的每条重链缔合的合适轻链组分已被证明是存在问题的。

[0004] 在一个方法中,轻链可以通过调查所有轻链可变区使用的统计数据、鉴定人抗体中最常用的轻链并在体外将轻链与具有不同特异性的两条重链配对来选择。

[0005] 在另一个方法中,轻链可以通过观察噬菌体展示文库(例如包括人轻链可变区序列的噬菌体展示文库,例如,人scFv文库)中的轻链序列并从所述文库中选择最常用的轻链可变区来选择。然后,所述轻链可以在所感兴趣的两条不同重链上测试。

[0006] 在另一个方法中,轻链可以通过采用感兴趣的两条重链的重链可变序列作为探针分析轻链可变序列的噬菌体展示文库来选择。与两条重链可变序列均相缔合的轻链可以选择所述重链的轻链。

[0007] 在另一个方法中,候选轻链可以与重链的关联(cognate)轻链比对,并且对轻链作出修饰以更加接近地匹配两条重链的关联轻链通用的序列特征。如果需要将免疫原性的机率最小化,所述修饰优选得到已知存在于人轻链序列中的序列,使得基于本领域已知用于评估免疫原性的可能性的参数和方法蛋白水解处理不太可能产生T细胞表位(即,计算机分析以及湿法分析(wet assays))。

[0008] 上述所有方法依赖于包含许多先验限制的体外方法,所述先验限制例如,序列同一性、与特定预先选择的轻链相缔合的能力,等等。本领域需要不依赖于操作体外条件而是采用更加生物学上可行的方法来制备包括共同轻链的人表位结合蛋白的组合物和方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供表达人免疫球蛋白重链和轻链可变区的遗传修饰小鼠,其中所述小鼠具有有限的轻链可变群(repertoire)。本发明提供一种产生人轻链可变区的生物系统,所述人轻链可变区与不同群的亲和力成熟的人重链可变区缔合并与其一起表达。本发明提供制备包括免疫球蛋白可变区的结合蛋白的方法,包括用感兴趣的抗原免疫具有有限的免疫球蛋白轻链群的小鼠,以及将小鼠的免疫球蛋白可变区基因序列应用于特异性结合感兴趣的抗原的结合蛋白中。方法包括用于制备适用于制备多特异性抗原结合蛋白的人免疫球蛋白重链可变区的方法。

[0011] 本发明提供遗传工程小鼠,其选择源自一群未重排的人重链可变区基因片段的合适的亲和力成熟的人免疫球蛋白重链可变区,其中所述亲和力成熟的人免疫球蛋白重链可变区缔合源自一种人轻链可变区基因片段的单一人轻链可变区(single human light chain variable domain)并与其一起表达。本发明还提供遗传工程小鼠,其提出了两种人轻链可变区基因片段的選擇。

[0012] 本发明提供遗传工程小鼠,其从有限群的人轻链可变区基因片段表达有限群的人轻链可变区,或单一人轻链可变区。所述小鼠遗传工程化以包括单一未重排的人轻链可变区基因片段(或两种人轻链可变区基因片段),其表达单一轻链(或表达两种轻链之一或二者)的重排以形成重排的人轻链可变区基因(或两种重排轻链可变区基因)。所述重排的人轻链可变区能够与由所述小鼠所选出的大量亲和力成熟的人重链配对,其中所述重链可变区特异性结合不同表位。

[0013] 本发明提供遗传工程小鼠,其从有限群的人轻链可变区序列表达有限群的人轻链可变区,或单一人轻链可变区。所述小鼠遗传工程化以包括单一的V/J人轻链序列(或两条V/J序列),其表达单一轻链可变区(或其表达两种可变区之一或二者)。包括所述可变序列的轻链能够与由所述小鼠所克隆选出的大量亲和力成熟的人重链配对,其中所述重链可变区特异性结合不同表位。

[0014] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其包括能够与人J基因片段(从一个或大量J_L片段选择)重排并编码免疫球蛋白轻链的人V_L区的单一人免疫球蛋白轻链可变(V_L)区基因片段。在另一个方面,所述小鼠包括不多于两种人V_L基因片段,其每一个能够与人J基因片段(从一个或大量J_L片段选择)重排并编码免疫球蛋白轻链的人V_L区。

[0015] 在一个实施方案中,所述单一人V_L基因片段可操作性连接选自J_K1、J_K2、J_K3、J_K4和J_K5的人J_L片段,其中所述单一人V_L基因片段能够与所述一种或多种人J_L片段的任何一个重排以形成编码轻链可变区基因的序列。

[0016] 在一个实施方案中,所述遗传修饰的小鼠包括免疫球蛋白轻链基因座(locus),其不包括能够重排以形成免疫球蛋白轻链基因的内源性小鼠V_L基因,其中所述V_L基因座包括能够重排以编码轻链基因的V_L区的单一人V_L基因片段。在一个具体的实施方案中,所述人V_L基因片段是人V_K1-39J_K5基因片段或人V_K3-20J_K1基因片段。在一个实施方案中,所述遗传修饰的小鼠包括V_L基因座,其不包括能够重排以形成免疫球蛋白轻链基因的内源性小鼠V_L基因,其中所述V_L基因座包括能够重排以编码轻链基因的V_L区的不多于两种人V_L基因片段。在一个具体的实施方案中,所述不多于两种人V_L基因片段是人V_K1-39J_K5基因片段和人V_K3-20J_K1基因片段。

[0017] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其包括编码人免疫球蛋白轻链的V_L区的单一重排(V/J)人免疫球蛋白轻链可变(V_L)区(即V_L/J_L区)。在另一个方面,所述小鼠包括能够编码人免疫球蛋白轻链的V_L区的不多于两种重排的人V_L区。

[0018] 在一个实施方案中,所述V_L区是重排的人V_K1-39/J序列或重排的人V_K3-20/J序列。在一个实施方案中,所述重排的人V_L/J_L序列的J_L片段选自J_K1、J_K2、J_K3、J_K4和J_K5。在一个具体的实施方案中,所述V_L区是人V_K1-39J_K5序列或人V_K3-20J_K1序列。在一个具体的实施方案中,所述小鼠具有人V_K1-39J_K5序列和人V_K3-20J_K1序列。

[0019] 在一个实施方案中,所述人V_L基因片段可操作性连接人或小鼠前导序列。在一个

实施方案中,所述前导序列是小鼠前导序列。在一个具体的实施方案中,所述小鼠前导序列是小鼠V_k3-7前导序列。在一个具体的实施方案中,所述前导序列可操作连接未重排的人V_L基因片段。在一个具体的实施方案中,所述前导序列可操作连接重排的人V_L/J_L序列。

[0020] 在一个实施方案中,所述V_L基因片段可操作连接免疫球蛋白启动子序列。在一个实施方案中,所述启动子序列是人启动子序列。在一个具体的实施方案中,所述人启动子序列是人V_k3-15启动子。在一个具体的实施方案中,所述启动子可操作连接未重排的人V_L基因片段。在一个具体的实施方案中,所述启动子可操作连接重排的人V_L/J_L序列。

[0021] 在一个实施方案中,所述轻链基因座包括5'侧接(相对于V_L基因片段的转录方向)人免疫球蛋白启动子并3'侧接人V_L基因片段的前导序列,所述人V_L基因片段与人J片段重排并编码包括内源性小鼠轻链恒定区(C_L)的反向嵌合轻链的V_L区。在一个具体的实施方案中,所述V_L基因片段位于小鼠V_k基因座,并且所述小鼠C_L是小鼠C_k。

[0022] 在一个实施方案中,所述轻链基因座包括5'侧接(相对于V_L基因片段的转录方向)人免疫球蛋白启动子并3'侧接重排的人V_L区(V_L/J_L序列)的前导序列,并且所述重排的人V_L区编码包括内源性小鼠轻链恒定区(C_L)的反向嵌合轻链的V_L区。在一个具体的实施方案中,所述重排的人V_L/J_L序列位于小鼠κ基因座,并且所述小鼠C_L是小鼠C_k。

[0023] 在一个实施方案中,所述修饰的小鼠的V_L基因座是κ轻链基因座,并且所述κ轻链基因座包括小鼠κ内含增强子、小鼠κ3'增强子或内含增强子和3'增强子。

[0024] 在一个实施方案中,所述小鼠包括非功能性免疫球蛋白λ轻链基因座。在一个具体的实施方案中,所述λ轻链基因座包括所述基因座的一个或多个序列的缺失,其中所述一个或多个缺失使得所述λ轻链基因座不能重排以形成轻链基因。在另一个实施方案中,所述λ轻链基因座的所有或基本上所有的V_L基因片段是被缺失的。

[0025] 在一个实施方案中,小鼠制备包括源自人V_L基因片段的体细胞突变的V_L区。在一个实施方案中,所述包括轻链源自人V_L基因片段和C_k区的小鼠的体细胞突变的V_L区。在一个实施方案中,所述小鼠不表达λ轻链。

[0026] 在一个实施方案中,所述遗传修饰的小鼠能够体细胞超变人V_L区序列。在一个具体的实施方案中,所述小鼠包括细胞,所述细胞包括源自能够重排并编码V_L区的人V_L基因片段的重排的免疫球蛋白轻链基因,并且所述重排的免疫球蛋白轻链基因包括体细胞突变的V_L区。

[0027] 在一个实施方案中,所述小鼠包括细胞,所述细胞表达包括连接小鼠C_k的体细胞突变的人V_L区的轻链,其中所述轻链与包括源自人V_H基因片段的体细胞突变的V_H区的重链相缔合,并且其中所述重链包括小鼠重链恒定区(C_H)。在一个具体的实施方案中,所述重链包括小鼠C_H1、小鼠铰链区、小鼠C_H2和小鼠C_H3。在一个具体的实施方案中,所述重链包括人C_H1、铰链区、小鼠C_H2和小鼠C_H3。

[0028] 在一个实施方案中,所述小鼠包括用一个或多个人V_H基因片段替换内源性小鼠V_H基因片段,其中所述人V_H基因片段可操作连接小鼠C_H区基因,使得所述小鼠重排所述人V_H基因片段并表达包括人V_H区和小鼠C_H的反向嵌合免疫球蛋白重链。在一个实施方案中,90-100%的未重排的小鼠V_H基因片段由至少一个未重排的人V_H基因片段替换。在一个具体的实施方案中,所有或基本上所有的内源性小鼠V_H基因片段由至少一个未重排的人V_H基因片段替换。在一个实施方案中,所述替换是用至少19、至少39、或至少80或81个未重排的人V_H基

因片段。在一个实施方案中,所述替换是用至少12个功能性未重排的人V_H基因片段、至少25个功能性未重排的人V_H基因片段或至少43个功能性未重排的人V_H基因片段。在一个实施方案中,所述小鼠包括用至少一个未重排的人D_H片段和至少一个未重排的人J_H片段替换所有小鼠D_H片段和J_H片段。在一个实施方案中,所述至少一个未重排的人D_H片段选自1-1、D1-7、1-26、2-8、2-15、3-3、3-10、3-16、3-22、5-5、5-12、6-6、6-13、7-27及其组合。在一个实施方案中,所述至少一个未重排的人J_H片段选自1、2、3、4、5、6及其组合。在一个具体的实施方案中,所述一个或多个人V_H基因片段选自1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1人V_H基因片段及其组合。

[0029] 在一个实施方案中,所述小鼠包括表达特异性结合感兴趣的抗原的结合蛋白的B细胞,其中所述结合蛋白包括源自人V_K1-39/J_K5重排或人V_K3-20/J_K1重排的轻链,并且其中所述细胞包括源自人V_H基因片段的重排的重排的免疫球蛋白重链基因,所述基因片段选自1-69、2-5、3-13、3-23、3-30、3-33、3-53、4-39、4-59和5-51基因片段。在一个实施方案中,所述一个或多个人V_H基因片段与选自1、2、3、4、5、6的人重链J_H基因片段重排。在一个实施方案中,所述一个或多个人V_H和J_H基因片段与选自1-1、1-7、1-26、2-8、2-15、3-3、3-10、3-16、3-22、5-5、5-12、6-6、6-13和7-27的人D_H基因片段重排。在一个具体的实施方案中,所述轻链基因具有1、2、3、4或5或多个体细胞超变。

[0030] 在一个实施方案中,所述小鼠包括B细胞,所述B细胞包括重排的免疫球蛋白重链可变区基因序列,其包括选自2-5/6-6/1、2-5/3-22/1、3-13/6-6/5、3-23/2-8/4、3-23/3-3/4、3-23/3-10/4、3-23/6-6/4、3-23/7-27/4、3-30/1-1/4、3-30/1-7/4、3-30/3-3/3、3-30/3-3/4、3-30/3-22/5、3-30/5-5/2、3-30/5-12/4、3-30/6-6/1、3-30/6-6/3、3-30/6-6/4、3-30/6-6/5、3-30/6-13/4、3-30/7-27/4、3-30/7-27/5、3-30/7-27/6、3-33/1-7/4、3-33/2-15/4、4-39/1-26/3、4-59/3-16/3、4-59/3-16/4、4-59/3-22/3、5-51/3-16/6、5-51/5-5/3、5-51/6-13/5、3-53/1-1/4、1-69/6-6/5和1-69/6-13/4的V_H/D_H/J_H区。在一个具体的实施方案中,所述B细胞表达包括人免疫球蛋白重链可变区融合小鼠重链恒定区以及人免疫球蛋白轻链可变区融合小鼠轻链恒定区的结合蛋白。

[0031] 在一个实施方案中,所述重排的人V_L区是人V_K1-39J_K5序列,并且所述小鼠表达包括(i)源自人V_L/J_L序列的V_L结构域和(ii)小鼠C_L的反向嵌合轻链;其中所述轻链与包括(i)小鼠C_H和(ii)体细胞突变的人V_H结构域的反向嵌合重链相关,所述体细胞突变的人V_H结构域源自人V_H基因片段,其选自1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1人V_H基因片段及其组合。在一个实施方案中,所述小鼠表达体细胞突变的轻链。在一个实施方案中,所述C_L是小鼠C_K。在一个具体的实施方案中,所述人V_H基因片段选自2-5、3-13、3-23、3-30、4-59、5-51和1-69基因片段。在一个具体的实施方案中,所述体细胞突变的人V_H结构域包括源自选自1-1、1-7、2-8、3-3、3-10、3-16、3-22、5-5、5-12、6-6、6-13和7-27的D_H片段的序列。在一个具体的实施方案中,所述体细胞突变的人V_H结构域包括源自选自1、2、3、4、5或6的J_H片段的序列。在一个具体的实施方案中,所述体细胞突变的人V_H结构域由重排的人V_H/D_H/J_H序列编码,所述序列选自2-5/6-6/1、2-5/3-22/1、3-13/6-6/5、3-23/2-8/4、3-23/3-3/4、3-23/3-10/4、3-23/6-6/4、3-23/7-27/4、3-30/1-1/4、3-30/1-7/4、3-30/3-3/4、3-30/3-22/5、3-30/5-5/2、3-30/5-12/4、3-30/6-6/1、3-30/6-6/3、3-30/6-6/4、3-30/6-6/5、3-30/6-13/4、3-30/7-27/4、3-

30/7-27/5、3-30/7-27/6、4-59/3-16/3、4-59/3-16/4、4-59/3-22/3、5-51/5-5/3、1-69/6-6/5和1-69/6-13/4。

[0032] 在一个实施方案中,所述重排的人 V_L 区是人 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 序列,并且所述小鼠表达包括(i)源自重排的人 V_L/J_L 序列的 V_L 结构域和(ii)小鼠 C_L 的反向嵌合轻链;其中所述轻链与包括(i)小鼠 C_H 和(ii)体细胞突变的人 V_H 结构域的反向嵌合重链相关,所述体细胞突变的人 V_H 结构域源自人 V_H 基因片段,其选自1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1人 V_H 基因片段及其组合。在一个实施方案中,所述小鼠表达体细胞突变的轻链。在一个实施方案中,所述 C_L 是小鼠 C_{κ} 。在一个具体的实施方案中,所述人 V_H 基因片段选自3-30、3-33、3-53、4-39和5-51基因片段。在一个具体的实施方案中,所述体细胞突变的人 V_H 结构域包括源自选自1-1、1-7、1-26、2-15、3-3、3-16和6-13的 D_H 片段的序列。在一个具体的实施方案中,所述体细胞突变的人 V_H 结构域包括源自选自3、4、5或6的 J_H 片段的序列。在一个具体的实施方案中,所述体细胞突变的人 V_H 结构域由重排的人 $V_H/D_H/J_H$ 序列编码,所述序列选自3-30/1-1/4、3-30/3-3/3、3-33/1-7/4、3-33/2-15/4、4-39/1-26/3、5-51/3-16/6、5-51/6-13/5和3-53/1-1/4。

[0033] 在一个实施方案中,所述小鼠包括重排的人 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 序列和重排的人 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 序列,并且所述小鼠表达包括(i)源自人 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 序列或人 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 序列的 V_L 结构域和(ii)小鼠 C_L 的反向嵌合轻链;其中所述轻链与包括(i)小鼠 C_H 和(ii)体细胞突变的人 V_H 结构域的反向嵌合重链相关,所述体细胞突变的人 V_H 结构域源自人 V_H 基因片段,其选自1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1人 V_H 基因片段及其组合。在一个实施方案中,所述小鼠表达体细胞突变的轻链。在一个实施方案中所述 C_L 是小鼠 C_{κ} 。

[0034] 在一个实施方案中,90-100%的内源性未重排的小鼠 V_H 基因片段由至少一个未重排的人 V_H 基因片段替换。在一个具体的实施方案中,所有或基本上所有的内源性未重排的小鼠 V_H 基因片段由至少一个未重排的人 V_H 基因片段替换。在一个实施方案中,所述替换是用至少18、至少39、或至少80或81个未重排的人 V_H 基因片段替换。在一个实施方案中,所述替换是用至少12个功能性未重排的人 V_H 基因片段、至少25个功能性未重排的人 V_H 基因片段或至少43个功能性未重排的人 V_H 基因片段替换。

[0035] 在一个实施方案中,所述遗传修饰的小鼠是C57BL品系,在一个具体的实施方案中选自C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/01a。在一个具体的实施方案中,所述遗传修饰的小鼠是前述129品系和前述C57BL/6品系的混合。在另一个实施方案中,所述小鼠是前述129株的混合,或前述BL/6品系的混合。在一个具体实施方案中,所述混合的所述129品系是129S6(129/SvEvTac)品系。

[0036] 在一个实施方案中,所述小鼠表达反向嵌合抗体,所述抗体包括轻链和重链,所述轻链包括小鼠 C_{κ} 和源自重排的人 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 序列或重排的人 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 序列的体细胞突变的人 V_L 结构域,所述重链包括小鼠 C_H 和体细胞突变的人 V_H 结构域,所述体细胞突变的人 V_H 结构域源自人 V_H 基因片段,其选自1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1人 V_H 基因片段及其组合,其中所述小鼠不表达完全(fully)小鼠抗体并且不表达完全人抗体。在一个实施方案中所述小鼠包

括 κ 轻链基因座,所述基因座包括用重排的人V κ 1-39/J κ 5序列或重排的人V κ 3-20/J κ 1序列替换内源性小鼠 κ 轻链基因片段,并且包括用完整或基本上完整群的人V H 基因片段替换所有或基本上所有内源性小鼠V H 基因片段。

[0037] 在一个方面,本发明提供源自本文所述小鼠的一群抗原特异性抗体,其中所述抗体包括源自人V κ 1-39/J κ 5重排或人V κ 3-20/J κ 1重排的轻链基因,并且其中所述抗体包括源自人V H 基因片段重排的重排的免疫球蛋白重链基因,所述人V H 基因片段选自1-2、1-3、1-8、1-18、1-24、1-46、1-58、1-69、2-5、2-26、2-70、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-16、3-20、3-21、3-23、3-30、3-33、3-43、3-48、3-53、3-64、3-72、3-73、4-31、4-34、4-39、4-59、5-51、6-1人V H 基因片段及其组合。在一个实施方案中,所述一个或多个人V H 基因片段与选自1、2、3、4、5和6的重链基因J H 片段重排。在一个具体的实施方案中,所述轻链具有1、2、3、4或5或更多个体细胞超变。

[0038] 在一个实施方案中,所述轻链具有1、2、3或4个体细胞超变。在一个实施方案中,所述轻链基因具有1或2个突变。在各种实施方案中,所述轻链基因能够沿着其序列发生多个突变。

[0039] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且所述轻链具有至少一个或不多于四个个体细胞超变。在一个实施方案中,所述轻链包括至少两个个体细胞超变。在一个实施方案中,所述轻链包括至少三个个体细胞超变。在一个实施方案中,所述轻链包括至少四个个体细胞超变。在一个具体的实施方案中,所述突变存在于所述轻链的一个或多个框架区(FW)。在一个具体的实施方案中,所述突变存在于所述轻链的一个或多个互补决定区(CDR)。在一个具体的实施方案中,所述突变存在于所述轻链的一个或多个FW和/或一个或多个CDR。在各种实施方案中,所述框架区选自框架1(FW1)、框架2(FW2)、框架3(FW3)和/或其组合。在各种实施方案中,所述CDR选自CDR1、CDR2、CDR3和/或其组合。

[0040] 在一个实施方案中,所述重链在一个或多个FW或一个或多个CDR中包括至少一个突变。在一个实施方案中,所述重链在一个或多个FW和一个或多个CDR中包括至少一个突变。在一个实施方案中,所述重链在一个或多个FW和一个或多个CDR中包括至少两个突变。在一个实施方案中,所述重链在一个或多个FW和一个或多个CDR中包括至少三个突变。在一个实施方案中,所述重链在一个或多个FW和一个或多个CDR中包括至少四个突变。在一个实施方案中,所述重链在一个或多个FW和一个或多个CDR中包括至少五个突变;在一个具体的实施方案中,所述重链在两个FW中包括至少五个或多于五个突变;在一个具体的实施方案中,所述重链在一个FW和一个CDR中包括至少五个或多于五个突变。

[0041] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约9%的V κ 1-39/J κ 5来源的轻链具有在FW1中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少9%的轻链包括在FW1中存在一个突变。在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约25%的V κ 1-39/J κ 5来源的轻链具有在CDR1中存在至少一个或不多于两个突变;在一个实施方案中,至少19%的轻链具有在CDR1中存在一个突变;在一个实施方案中,至少5%的轻链具有在CDR1中存在两个突变。

[0042] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约20%的V κ 1-39/J κ 5来源的轻链具有在FW2中存在至少一个或不多于三个突变;在一个实施方案中,至少17%的轻链具有在FW2中存在一个突变;在一个实施方案中,至少1%的轻链具有在FW2中存

在两个突变;在一个实施方案中,至少1%的轻链具有在FW2中存在三个突变。

[0043] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约10%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在CDR2中存在至少一个或不多于两个突变;在一个实施方案中,至少10%的轻链具有在CDR2中存在一个突变;在一个实施方案中,至少1%的轻链具有在CDR2中存在两个突变。

[0044] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约29%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在FW3中存在至少一个或不多于四个突变;在一个实施方案中,至少21%的轻链具有在FW3中存在一个突变;在一个实施方案中,至少5%的轻链具有在FW3中存在两个突变;在一个实施方案中,至少2%的轻链具有在FW3中存在三个突变;在一个实施方案中,至少2%的轻链具有在FW3中存在四个突变。

[0045] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约37%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在CDR3中存在至少一个或不多于四个突变;在一个实施方案中,至少27%的轻链具有在CDR3中存在一个突变;在一个实施方案中,至少8%的轻链具有在CDR3中存在两个突变;在一个实施方案中,至少1%的轻链具有在CDR3中存在三个突变;在一个实施方案中,至少1%的轻链具有在CDR3中存在四个突变。

[0046] 在一个实施方案中,本发明提供一群源自如本文所述小鼠的抗原特异性抗体,其中所述抗体包括源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约9%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在FW1中存在一个或多个突变,大约25%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在CDR1中存在一个或多个突变,大约20%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在FW2中存在一个或多个突变,大约10%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在CDR2中存在一个或多个突变,大约29%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在FW3中存在一个或多个突变,并且大约37%的V κ 1-39/J κ 5-来源的轻链具有在CDR3中存在一个或多个突变。

[0047] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约35%的重链具有在FW1中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少25%的重链具有在FW1中存在一个突变;在一个实施方案中,至少9%的重链具有在FW1中存在两个突变;在一个实施方案中,至少1%的重链具有在FW1中存在三个突变;在一个实施方案中,至少1%的重链具有在FW1中存在多于五个突变。

[0048] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约92%的重链具有在CDR1中存在至少一个或不多于四个突变;在一个实施方案中,至少92%的重链具有在CDR1中存在至少一个、至少两个、至少三个或四个突变;在一个实施方案中,至少26%的重链具有在CDR1中存在一个突变;在一个实施方案中,至少44%的重链具有在CDR1中存在两个突变;在一个实施方案中,至少19%的重链具有在CDR1中存在三个突变;在一个实施方案中,至少3%的重链具有在CDR1中存在四个突变。

[0049] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约66%的重链具有在FW2中存在至少一个或不多于三个突变;在一个实施方案中,至少66%的重链具有在FW2中存在至少一个、至少两个、至少三个突变;在一个实施方案中,至少35%的重链具有在FW2中存在一个突变;在一个实施方案中,至少23%的重链具有在FW2中存在两个突变;在一个实施方案中,至少8%的重链具有在FW2中存在三个突变。

[0050] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约70%的重链具有

在CDR2中存在至少一个或不多于四个突变；在一个实施方案中，至少70%的重链具有在CDR2中存在至少一个、至少两个、至少三个或至少四个突变；在一个实施方案中，至少34%的重链具有在CDR2中存在一个突变；在一个实施方案中，至少20%的重链具有在CDR2中存在两个突变；在一个实施方案中，至少12%的重链具有在CDR2中存在三个突变；在一个实施方案中，至少5%的重链具有在CDR2中存在四个突变。

[0051] 在一个实施方案中，所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约91%的重链具有在FW3中存在至少一个或多至五个或更多个突变；在一个实施方案中，至少91%的重链具有在FW3中存在至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或至少五个或更多个突变；在一个实施方案中，至少19%的重链具有在FW3中存在一个突变；在一个实施方案中，至少33%的重链具有在FW3中存在两个突变；在一个实施方案中，至少22%的重链具有在FW3中存在三个突变；在一个实施方案中，至少11%的重链具有在FW3中存在四个突变；在一个实施方案中，至少7%的重链具有在FW3中存在五个突变。

[0052] 在一个实施方案中，所述轻链是源自人V κ 1-39/J κ 5重排并且大约63%的重链具有在CDR3中存在至少一个或不多于两个突变；在一个实施方案中，至少63%的重链具有在CDR3中存在一个突变；在一个实施方案中，至少54%的重链具有在CDR3中存在一个突变；在一个实施方案中，至少9%的重链具有在CDR3中存在两个突变。

[0053] 在一个实施方案中，本发明提供一群源自如本文所述小鼠的抗原特异性抗体，其中所述抗体包括源自人V κ 1-39/J κ 5重排的轻链并且大约35%的重链具有在FW1中存在一个或多个突变，大约92%的重链具有在CDR1中存在一个或多个突变，大约66%的重链具有在FW2中存在一个或多个突变，大约70%的重链具有在CDR2中存在一个或多个突变，大约91%的重链具有在FW3中存在一个或多个突变，并且大约63%的重链具有在CDR3中存在一个或多个突变。

[0054] 在一个实施方案中，所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且所述轻链基因具有至少一个或不多于两个体细胞超变；在一个实施方案中，所述轻链基因具有至少两个、至少三个、至少四个或更多个体细胞超变。在一个具体的实施方案中，所述突变存在于所述轻链的一个或多个框架区。在一个具体的实施方案中，所述突变存在于所述轻链的一个或多个互补决定区。在一个具体的实施方案中，所述突变存在于所述轻链的一个或多个FW和/或一个或多个CDR。在各种实施方案中，所述框架区选自框架1 (FW1)、框架2 (FW2)、框架3 (FW3) 和/或其组合。

[0055] 在一个实施方案中，所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约10%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在FW1中存在至少一个突变；在一个实施方案中，至少10%的轻链具有在FW1中的一个突变。

[0056] 在一个实施方案中，所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约53%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在CDR1中存在至少一个或不多于两个突变；在一个实施方案中，至少27%的轻链具有在CDR1中存在一个或多个突变；在一个实施方案中，至少54%的轻链具有在CDR1中存在一个或两个突变。

[0057] 在一个实施方案中，所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约6%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在FW2中存在至少一个或不多于两个突变；在一个实施方案中，至少6%的轻链具有在FW2中存在至少一个突变；在一个实施方案中，至少3%的轻链具有在FW2中存

在一个突变;在一个实施方案中,至少3%的轻链具有在FW2中存在两个突变。

[0058] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约3%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在CDR2中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少3%的轻链具有在CDR2中存在一个突变。

[0059] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约17%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在FW3中存在至少一个或不多于两个突变;在一个实施方案中,至少20%的轻链具有在FW3中存在一个突变;在一个实施方案中,至少17%的轻链具有在FW3中存在两个突变。

[0060] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约43%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在CDR3中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少43%的轻链具有在CDR3中存在一个突变。

[0061] 在一个实施方案中,本发明提供一群源自如本文所述小鼠的抗原特异性抗体,其中所述抗体包括源自人V κ 3-20/J κ 1重排的轻链并且大约10%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有至少一个或多个突变,大约53%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在CDR1中存在一个或多个突变,大约6%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在FW2中存在一个或多个突变,大约3%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在CDR2中存在一个或多个突变,大约37%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在FW3中存在一个或多个突变,并且大约43%的V κ 3-20/J κ 1来源的轻链具有在CDR3中存在一个或多个突变。

[0062] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约43%的重链具有在FW1中存在至少一个或不多于两个突变;在一个实施方案中,至少41%的重链包括在FW1中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少41%的重链包括在FW1中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少2%的重链包括在FW1中存在两个突变。

[0063] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约92%的重链具有在CDR1中存在至少一个或不多于四个突变;在一个实施方案中,至少43%的重链具有在CDR1中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少25%的重链具有在CDR1中存在两个突变;在一个实施方案中,至少15%的重链具有在CDR1中存在至少3个突变;在一个实施方案中,至少10%的重链具有在CDR1中存在4个或更多个突变。

[0064] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约46%的重链具有在FW2中存在至少一个或不多于三个突变;在一个实施方案中,至少34%的重链具有在FW2中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少10%的重链具有在FW2中存在两个或更多个突变;在一个实施方案中,至少2%的重链具有在FW2中存在三个突变。

[0065] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约84%的重链具有在CDR2中存在至少一个或多至五个或多于五个突变;在一个实施方案中,至少39%的重链具有在CDR2中存在至少一个或更多个突变;在一个实施方案中,至少18%的重链具有在CDR2中存在两个或更多个突变;在一个实施方案中,至少21%的重链具有在CDR2中存在三个或更多个突变;在一个实施方案中,至少3%的重链具有在CDR2中存在四个或更多个突变;在一个实施方案中,至少2%的重链具有在CDR2中存在五个或更多个突变。

[0066] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人V κ 3-20/J κ 1重排并且大约92%的重链具有在FW3中存在至少一个或多至五个或多于五个突变;在一个实施方案中,至少21%的轻链具

有在FW3中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少20%的重链具有在FW3中存在至少两个突变;在一个实施方案中,至少13%的重链具有在FW3中存在至少三个突变;在一个实施方案中,至少20%的重链具有在FW3中存在至少四个突变;在一个实施方案中,至少18%的重链具有在FW3中存在至少5个突变。

[0067] 在一个实施方案中,所述轻链是源自人Vk3-20/Jk1重排并且大约7%的重链具有在CDR3中存在至少一个突变;在一个实施方案中,至少7%的重链具有在CDR3中存在一个突变。

[0068] 在一个实施方案中,本发明提供一群源自小鼠的如本发明所述的抗原特异性抗体,其中所述抗体包括源自人Vk3-20/Jk1重排的轻链并且大约43%的重链具有在FW1中存在一个或多个突变,大约92%的重链具有在CDR1中存在一个或多个突变,大约46%的重链具有在FW2中存在一个或多个突变,大约84%的重链具有在CDR2中存在一个或多个突变,大约92%的重链具有在FW3中存在一个或多个突变,并且大约7%的重链具有在CDR3中存在一个或多个突变。

[0069] 在一个方面,本发明提供一种表达来自重排的免疫球蛋白轻链序列的免疫球蛋白轻链的小鼠,其中所述重排的免疫球蛋白轻链序列存在于所述小鼠的生殖系(germline)中,其中所述免疫球蛋白轻链包括人可变序列。在一个实施方案中,所述小鼠的生殖系包括重排的免疫球蛋白轻链序列,其源自与包括重排的轻链序列的小鼠的每一个B细胞中存在的所有非替代(non-surrogate)轻链序列相同的V片段和相同的J片段。

[0070] 在一个实施方案中,所述小鼠的生殖系缺乏功能性未重排的免疫球蛋白轻链V基因片段。在一个实施方案中,所述小鼠的生殖系缺乏功能性未重排的免疫球蛋白轻链J基因片段。

[0071] 在一个实施方案中,所述小鼠的生殖系包括不多于一个、不多于两个或不多于三个重排的(V/J)轻链序列。

[0072] 在一个实施方案中,所述重排的V/J序列包括κ轻链序列。在一个具体的实施方案中,所述κ轻链序列是人κ轻链序列。在一个具体的实施方案中,所述κ轻链序列选自人Vk1-39/J序列、人Vk3-20/J序列及其组合。在一个具体的实施方案中,所述κ轻链序列是人Vk1-39/Jk5序列。在一个具体的实施方案中,所述κ轻链序列是人Vk3-20/Jk1序列。

[0073] 在一个实施方案中,所述小鼠进一步在其生殖系中包括序列,所述序列选自相对于所述重排的免疫球蛋白轻链序列的小鼠κ内含增强子5'、小鼠κ3'增强子以及组合。

[0074] 在一个实施方案中,所述小鼠包括未重排的人V_H基因片段、未重排的人D_H基因片段以及未重排的人J_H基因片段,其中所述V_H、D_H和J_H基因片段能够重排以形成免疫球蛋白重链可变基因序列,其可操作性连接重链恒定基因序列。在一个实施方案中,所述小鼠包括多种人V_H、D_H和J_H基因片段。在一个具体的实施方案中,所述人V_H、D_H和J_H基因片段在内源性小鼠免疫球蛋白重链基因座处替换内源性小鼠V_H、D_H和J_H基因片段。在一个具体的实施方案中,所述小鼠包括用全部或基本上全部功能性人V_H、D_H和J_H基因片段替换全部或基本上全部功能性小鼠V_H、D_H和J_H基因片段。

[0075] 在一个实施方案中,所述小鼠表达包括小鼠恒定序列的免疫球蛋白轻链。在一个实施方案中,所述小鼠表达包括人恒定序列的免疫球蛋白轻链。

[0076] 在一个实施方案中,所述小鼠表达包括小鼠序列的免疫球蛋白重链,所述序列选

自C_H1序列、铰链区序列、C_H2序列、C_H3序列及其组合。

[0077] 在一个实施方案中,所述小鼠表达包括人序列的免疫球蛋白重链,所述序列选自C_H1序列、铰链区序列、C_H2序列、C_H3序列及其组合。

[0078] 在一个实施方案中,所述小鼠的生殖系中的重排的免疫球蛋白轻链序列是位于内源性小鼠免疫球蛋白轻链基因座。在一个具体的实施方案中,所述小鼠的生殖系中的重排的免疫球蛋白轻链序列于内源性小鼠免疫球蛋白轻链基因座处替换所有或基本上所有小鼠轻链V和J序列。

[0079] 在一个方面,本发明提供一种包括B细胞群的小鼠,特征是,包括非替代轻链序列的每个B细胞包括源自单一人V片段和单一人J片段的重排的轻链基因,其中小鼠的生殖系中唯一的轻链可变序列是源自单一人V片段和单一人J片段的重排序列,并且其中包括所述重排的轻链基因的每个B细胞进一步包括编码关联人重链可变区的基因,并且其中所述重排的轻链基因包括至少一个、至少二个、至少三个或至少四个体细胞超变。

[0080] 在一个方面,本发明提供源自如本文所述的小鼠的多能、诱导多能或全能细胞。在一个具体的实施方案中,所述细胞是小鼠胚胎干(ES)细胞。

[0081] 在一个方面,本发明提供源自如本发明所述的小鼠的组织。在一个实施方案中,所述组织源自本文所述的小鼠的脾、淋巴结或骨髓

[0082] 在一个方面,本发明提供源自如本发明所述的小鼠的细胞核。在一个实施方案中,所述细胞核来自不是B细胞的二倍体细胞。

[0083] 在一个方面,本发明提供一种小鼠细胞,其分离自如本文所述的小鼠。在一个实施方案中,所述细胞是ES细胞。在一个实施方案中,所述细胞是淋巴细胞。在一个实施方案中,所述淋巴细胞是B细胞。在一个实施方案中,所述B细胞表达包括源自人基因片段的可变区的嵌合重链;和源自重排的人V_K1-39/J序列、重排的人V_K3-20/J序列或其组合的轻链;其中所述重链可变区融合至小鼠恒定区并且所述轻链可变区融合至小鼠或人恒定区。

[0084] 在一个方面,本发明提供一种杂交瘤细胞,其中所述杂交瘤细胞由如本文所述的小鼠的B细胞制备。在一个具体的实施方案中,所述B细胞来自如本发明所述的小鼠,其已经用包括感兴趣的表位的免疫原免疫过,并且所述B细胞表达结合感兴趣的表位的结合蛋白,所述结合蛋白具有体细胞突变的人V_H结构域和小鼠C_H,并且具有源自重排的人V_K1-39J_K5或重排的人V_K3-20J_K1的人V_L结构域和小鼠C_L。

[0085] 在一个方面,本发明提供一种小鼠胚胎,其中所述胚胎包括源自如本文所述的小鼠的供体ES细胞。

[0086] 在一个方面,本发明提供一种靶向载体,其参照载体的5'和3'小鼠同源臂的序列从5'到3'的转录方向,包括5'小鼠同源臂、人或小鼠免疫球蛋白启动子、人或小鼠前导序列和选自重排的人V_K1-39J_K5或重排的人V_K3-20J_K1的人V_L区、以及3'小鼠同源臂。在一个实施方案中,所述5'和3'同源臂将载体靶向增强子序列5'侧的序列,所述增强子序列存在于小鼠C_K基因5'侧并靠近小鼠C_K基因。在一个实施方案中,所述启动子是人免疫球蛋白可变区基因片段启动子。在一个具体的实施方案中,所述启动子是人V_K3-15启动子。在一个实施方案中,所述前导序列是小鼠前导序列。在一个具体的实施方案中,所述小鼠前导序列是小鼠V_K3-7前导序列。

[0087] 在一个方面,本发明提供如上所述的靶向载体,但是,代替5'小鼠同源臂,位点特

异性重组酶识别位点 (site-specific recombinase recognition site, SRRS) 侧接于人或小鼠启动子5'端, 并且代替3'小鼠同源臂, SRRS侧接于人V_L区3'端。

[0088] 在一个方面, 由本文所描述的小鼠制备的反向嵌合抗体, 其中所述反向嵌合抗体包括轻链, 所述轻链包括人V_L和小鼠C_L, 以及重链, 所述重链包括人V_H和小鼠C_H。

[0089] 在一个方面, 本发明提供一种制备抗体的方法, 包括在单个细胞中表达 (a) 与人C_H基因序列融合的如本文所述的经免疫的小鼠的第一V_H基因序列; (b) 与人C_L基因序列融合的如本文所述的经免疫的小鼠的V_L基因序列; 以及, (c) 在足以表达全人抗体的条件下维持细胞, 并且分离所述抗体。在一个实施方案中, 所述细胞包括与人C_H基因序列融合的如本文所述的第二经免疫的小鼠的第二V_H基因序列, 所述第一V_H基因序列编码识别第一表位的V_H结构域, 以及所述第二V_H基因序列编码识别第二表位的V_H结构域, 其中所述第一表位和所述第二表位不相同。

[0090] 在一个方面, 本发明提供制备表位结合蛋白的方法, 包括将如本文所述的小鼠暴露给免疫原, 所述免疫原包括感兴趣的表位, 在足以使得小鼠产生特异性结合感兴趣的表位的免疫球蛋白分子的条件下维持所述小鼠, 并且分离特异性结合感兴趣的表位的免疫球蛋白分子; 其中所述表位结合蛋白包括重链, 所述重链包括经体细胞突变的人V_H和小鼠C_H, 所述重链与轻链结合, 所述轻链包括小鼠C_L和源自重排的人V_K1-39J_K5或重排的人V_K3-20J_K1的人V_L。

[0091] 在一个方面, 本发明提供一种表达表位结合蛋白的细胞, 其中所述细胞包括: (a) 编码源自重排的人V_K1-39J_K5或重排的人V_K3-20J_K1的人V_L结构域的人核苷酸序列, 其中所述人核苷酸序列融合 (直接或通过接头) 至人免疫球蛋白轻链恒定区cDNA序列 (例如, 人 κ 恒定区DNA序列); 以及, (b) 编码源自第一人V_H核苷酸序列的人V_H结构域的第一人V_H核苷酸序列, 其中所述第一人V_H核苷酸序列融合 (直接或通过接头) 至人免疫球蛋白重链恒定区cDNA序列; 其中所述表位结合蛋白识别第一表位。在一个实施方案中, 所述表位结合蛋白以低于 10^{-6} M、低于 10^{-8} M、低于 10^{-9} M、低于 10^{-10} M、低于 10^{-11} M或低于 10^{-12} M的解离常数结合所述第一表位。

[0092] 在一个实施方案中, 所述细胞包括编码第二人V_H结构域的第二人核苷酸序列, 其中所述第二人序列融合 (直接或通过接头) 至人免疫球蛋白重链恒定区cDNA序列, 并且其中所述第二人V_H结构域不特异性识别所述第一表位 (例如, 显示如 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M或更高的解离常数), 并且其中所述表位结合蛋白识别所述第一表位和所述第二表位, 并且其中所述第一和所述第二免疫球蛋白重链各结合 (a) 的相同的轻链。

[0093] 在一个实施方案中, 所述第二V_H结构域以低于 10^{-6} M、低于 10^{-7} M、低于 10^{-8} M、低于 10^{-9} M、低于 10^{-10} M、低于 10^{-11} M或低于 10^{-12} M的解离常数结合所述第二表位。

[0094] 在一个实施方案中, 所述表位结合蛋白包括第一免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白重链, 每个结合源自重排的选自人V_K1-39J_K5或人V_K3-20J_K1的人V_L区相同的轻链, 其中所述第一免疫球蛋白重链以纳摩尔至皮摩尔范围的解离常数结合第一表位, 所述第二免疫球蛋白以纳摩尔至皮摩尔范围的解离常数结合第二表位, 所述第一表位和所述第二表位不相同, 所述第一免疫球蛋白重链不结合第二表位或以弱于微摩尔范围 (例如毫摩尔范围) 的解离常数结合第二表位, 所述第二免疫球蛋白重链不结合第一表位或以弱于微摩尔范围 (例如毫摩尔范围) 的解离常数结合第一表位, 并且所述第一免疫球蛋白重链的所述V_L、所

述V_H、以及所述第二免疫球蛋白重链的V_H中的一个或多个,是体细胞突变的。

[0095] 在一个实施方案中,所述第一免疫球蛋白重链包括蛋白A结合残基,并且所述第二免疫球蛋白重链缺乏所述蛋白A结合残基。

[0096] 在一个实施方案中,所述细胞选自CHO、COS、293、HeLa和表达病毒核酸序列的视网膜细胞(例如PERC.6TM细胞)。

[0097] 在一个方面,本发明提供一种反向嵌合抗体,包括人V_H和小鼠重链恒定区,人V_L和小鼠轻链恒定区,其中所述抗体通过包括用包含表位的免疫原免疫如本文所述的小鼠的方法制备,并且所述抗体特异性结合用来免疫小鼠的所述免疫原的表位。在一个实施方案中,所述V_L结构域是体细胞突变的。在一个实施方案中所述V_H结构域是体细胞突变的。在一个实施方案中,所述V_L结构域和所述V_H结构域均是体细胞突变的。在一个实施方案中,所述V_L连接小鼠C_k结构域。

[0098] 在一个方面,本发明提供一种小鼠,包括人V_H基因片段,其在内源性小鼠重链基因座替换所有或基本上所有小鼠V_H基因片段;不多于一个或两个重排的人轻链V_L/J_L序列,其选自重排的V_k1-39/J和重排的V_k3-20/J或其组合,替换所有小鼠轻链基因片段;其中所述人重链可变基因片段连接小鼠恒定基因,并且所述重排的人轻链序列连接人或小鼠恒定基因。

[0099] 在一个方面,小鼠ES细胞包括用人重链可变基因片段替换所有或基本上所有小鼠重链可变基因片段,并且包括不多于一个或两个重排的人轻链V_L/J_L序列,其中所述人重链可变基因片段连接小鼠免疫球蛋白重链恒定基因,并且所述重排的人轻链V_L/J_L序列连接小鼠或人免疫球蛋白轻链恒定基因。在一个具体的实施方案中,所述轻链恒定基因是小鼠恒定基因。

[0100] 在一个方面,本发明提供一种由如本文所述的小鼠制得的抗原结合蛋白。在一个具体的实施方案中,所述抗原结合蛋白包括与小鼠恒定区融合的人免疫球蛋白重链可变区,以及源自V_k1-39基因片段或V_k3-20基因片段的人免疫球蛋白轻链可变区,其中所述轻链恒定区是小鼠恒定区。

[0101] 在一个方面,本发明提供来自如本文所述的小鼠的免疫球蛋白可变区基因序列制成的全人抗原结合蛋白(fully human antigen-binding protein),其中所述抗原结合蛋白包括全人重链和全人轻链,所述全人重链包括源自如本文所述小鼠的序列的人可变区,所述全人轻链包括V_k1-39或V_k3-20。在一个实施方案中,所述轻链可变区包括一至五个体细胞突变。在一个实施方案中,所述轻链可变区是小鼠的B细胞中与所述重链可变区配对的关联轻链可变区。

[0102] 在一个实施方案中,所述全人抗原结合蛋白包括第一重链和第二重链,其中所述第一重链和所述第二重链包括独立源自如本文所述的小鼠的不相同的可变区,并且其中所述第一和第二重链的每一个在与源自V_k1-39基因片段或V_k3-20基因片段的人轻链缔合的情况下从宿主细胞表达。在一个实施方案中,所述第一重链包括特异性结合第一抗原的第一表位的第一重链可变区,并且所述第二重链包括特异性结合第二抗原的第二表位的第二重链可变区。在一个具体的实施方案中,所述第一抗原和所述第二抗原不同。在一个具体的实施方案中,所述第一抗原和所述第二抗原相同,并且所述第一表位和所述第二表位不同;在一个具体的实施方案中,由所述结合蛋白的第一分子结合所述第一表位并不阻断由所述

结合蛋白的第二分子结合所述第二表位。

[0103] 在一个方面,源自如本文所述的小鼠的人免疫球蛋白的序列的全人结合蛋白包括第一免疫球蛋白重链和第二免疫球蛋白重链,其中所述第一免疫球蛋白重链包括与所述第二免疫球蛋白重链的可变区不同的第一可变区,并且其中所述第一免疫球蛋白重链包括野生型蛋白A结合决定簇,并且所述第二重链缺乏野生型蛋白A结合决定簇。在一个实施方案中,所述第一免疫球蛋白重链在分离条件下结合蛋白A,并且所述第二免疫球蛋白重链不结合蛋白A或者比所述第一免疫球蛋白重链在分离条件下结合蛋白A弱至少10倍、100倍或一千倍结合蛋白A。在一个具体的实施方案中,所述第一和所述第二重链是IgG1同种型,其中所述第二重链包括选自95R (EU 435R)、96F (EU 436F) 及其组合的修饰,并且其中所述第一重链缺乏该修饰。

[0104] 在一个方面,本发明提供制备双特异性抗原结合蛋白的方法,包括暴露如本文所述的第一小鼠于包括第一表位的感兴趣的第一抗原,暴露如本文所述的第二小鼠于包括第二表位的感兴趣的第二抗原,允许所述第一和第二小鼠发生对感兴趣的抗原产生免疫反应,鉴定所述第一小鼠中结合感兴趣的第一抗原的第一表位的第一人重链可变区,鉴定所述第二小鼠中结合感兴趣的第二抗原的第二表位的第二人重链可变区,制备编码结合感兴趣的所述第一抗原的第一表位的第一重链的第一全人重链基因,制备编码结合感兴趣的所述第二抗原的第二表位的第二重链的第二全人重链基因,在表达源自人V κ 1-39或人V κ 3-20基因片段的单一全人轻链的细胞中表达所述第一重链和所述第二重链以形成双特异性抗原结合蛋白,并分离所述双特异性抗原结合蛋白。

[0105] 在一个实施方案中,所述第一抗原和所述第二抗原不同。

[0106] 在一个实施方案中,所述第一抗原和所述第二抗原相同,并且所述第一表位和所述第二表位不同。在一个实施方案中,所述第一重链可变区结合至所述第一表位并不阻断所述第二重链可变区结合至所述第二表位。

[0107] 在一个实施方案中,所述第一抗原选自可溶性抗原和细胞表面抗原(例如,肿瘤抗原),并且所述第二抗原包括细胞表面受体。在一个具体的实施方案中,所述细胞表面受体是免疫球蛋白受体。在一个具体的实施方案中,所述免疫球蛋白受体是Fc受体。在一个实施方案中,所述第一抗原和所述第二抗原是相同的细胞表面受体,并且所述第一重链结合至所述第一表位并不阻断所述第二重链结合至所述第二表位。

[0108] 在一个实施方案中,所述轻链的轻链可变区包括2-5个体细胞突变。在一个实施方案中,所述轻链可变区是表达于带有所述第一或所述第二重链可变区的所述第一或所述第二经免疫的小鼠的B细胞中的体细胞突变的关联轻链。

[0109] 在一个实施方案中,所述第一全人重链携带减弱其对蛋白A亲和力的氨基酸修饰,并且所述第二全人重链不包括减弱其对蛋白A亲和力的修饰。

[0110] 在一个方面,本发明提供包括根据本发明制备的人重链可变区的抗体或双特异性抗体。在另一个方面,本发明提供如本文所述的小鼠用于制备全人抗体或全人双特异性抗体的用途。

[0111] 在一个方面,本文所述的遗传修饰的小鼠、胚胎或细胞包括 κ 轻链基因座,其保留内源性调控或控制元件,例如小鼠 κ 内含增强子、小鼠 κ 3' 增强子,或同时具有内含增强子和3' 增强子,其中所述调控或控制元件促进所述 κ 轻链基因座的表达序列的体细胞突变和亲

和力成熟。

[0112] 在一个方面,本发明提供一种小鼠,其包括B细胞群,特征是,具有源自不多于一个或不多于两个重排的或未重排的免疫球蛋白轻链V和J基因片段的免疫球蛋白轻链,其中所述小鼠显示出与包括免疫球蛋白轻链V和J基因片段的野生型补体的小鼠大致相同的 κ : λ 轻链比。

[0113] 在一个实施方案中,所述免疫球蛋白轻链源自不多于一个或不多于两个重排的免疫球蛋白轻链V和J基因片段。在一个具体的实施方案中,所述轻链源自不多于一个重排的免疫球蛋白轻链V和J基因片段。

[0114] 在一个方面,本发明提供本文所述的小鼠,其表达源自不多于一个或不多于两个人V κ /J κ 序列的免疫球蛋白轻链,其中所述小鼠包括以一个或多个人重链可变区基因片段替换所有或基本上所有内源性小鼠重链可变区基因片段,并且所述小鼠显示出(a)表达具有 λ 轻链的免疫球蛋白的CD19⁺B细胞与(b)表达具有 κ 轻链的免疫球蛋白的CD19⁺B细胞之比为大约1至大约20。

[0115] 在一个实施方案中,所述小鼠表达源自人V κ 1-39J κ 5序列的单一 κ 轻链,并且表达具有 λ 轻链的免疫球蛋白的CD19⁺B细胞与表达具有 κ 轻链的免疫球蛋白的CD19⁺B细胞之比为大约1至大约20;在一个实施方案中,所述比为大约1至至少大约66;在一个具体的实施方案中,所述比为大约1至66。

[0116] 在一个实施方案中,所述小鼠表达源自人V κ 3-20J κ 5序列的单一 κ 轻链,并且表达具有 λ 轻链的免疫球蛋白的CD19⁺B细胞与表达具有 κ 轻链的免疫球蛋白的CD19⁺B细胞之比为大约1至大约20;在一个实施方案中,所述比为大约1至大约21。在具体的实施方案中,所述比为1至20或1至21。

[0117] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其表达单一重排的 κ 轻链,其中所述小鼠包括功能性 λ 轻链基因座,并且其中所述小鼠表达B细胞群,其包括表达源自相同的单一重排 κ 轻链的 κ 轻链的Ig κ ⁺B细胞。在一个实施方案中,所述小鼠中Ig κ ⁺B细胞的百分比与野生型小鼠大致相同。在一个具体的实施方案中,所述小鼠中Ig κ ⁺B细胞的百分比为大约百分之2至大约百分之6。在一个具体的实施方案中,其中所述单一重排的 κ 轻链是源自V κ 1-39J κ 5序列的小鼠中Ig κ ⁺B细胞的百分比为大约2至大约3;在一个具体的实施方案中,百分比为大约2.6。在一个具体的实施方案中,其中所述单一重排的 κ 轻链是源自V κ 3-20J κ 1序列的小鼠中Ig κ ⁺B细胞的百分比为大约4至大约8;在一个具体的实施方案中,大约6。

[0118] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其中所述小鼠表达源自人V κ 和J κ 基因片段的单一重排的 κ 轻链,其中所述小鼠表达包括源自所述单一重排的 κ 轻链序列的单一 κ 轻链的B细胞群,其中所述遗传修饰的小鼠尚未呈现对体细胞超变的抗性。在一个实施方案中,表达于所述小鼠B细胞上的至少90%的 κ 轻链显示从至少一个至大约五个的体细胞超变。

[0119] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其被修饰以表达源自不多于一个或不多于两个重排的 κ 轻链序列的单一 κ 轻链,其中所述小鼠显示 κ 轻链使用比由野生型小鼠显示的 κ 轻链使用或者比包括 κ 轻链基因片段的野生群的相同品系的小鼠显示的 κ 轻链使用高大约两倍或更多、至少大约三倍或更多或至少大约四倍或更多。在一个具体的实施方

案中,所述小鼠表达来自不多于一个重排的 κ 轻链序列的所述单一 κ 轻链。在一个更具体的实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列选自V κ 1-39J κ 5和V κ 3-20J κ 1序列。在一个实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列是V κ 1-39J κ 5序列。在一个实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列是V κ 3-20J κ 1序列。

[0120] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其表达源自不多于一个或不多于两个重排的 κ 轻链序列的单一 κ 轻链,其中所述小鼠与由携带完整或基本上完整的人 κ 轻链基因座的小鼠显示的同一 κ 轻链使用率相比展示出高大约100倍或更多、至少大约200倍或更多、至少大约300倍或更多、至少大约400倍或更多、至少大约500倍或更多、至少大约600倍或更多、至少大约700倍或更多、至少大约800倍或更多、至少大约900倍或更多、至少大约1000倍或更多。在一个具体的实施方案中,携带完整或基本上完整的人 κ 轻链基因座的所述小鼠缺乏功能性未重排的小鼠 κ 轻链序列。在一个具体的实施方案中,所述小鼠表达来自不多于一个重排的 κ 轻链序列的单一 κ 轻链。在一个实施方案中,所述小鼠包括一个拷贝的重排的 κ 轻链序列(例如,杂合体)。在一个实施方案中,所述小鼠包括两个拷贝的重排的 κ 轻链序列(例如,纯合体)。在一个更具体的实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列选自V κ 1-39J κ 5和V κ 3-20J κ 1序列。在一个实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列是V κ 1-39J κ 5序列。在一个实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列是V κ 3-20J κ 1序列。

[0121] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其表达源自不多于一个或不多于两个重排的轻链序列的单一轻链,其中所述遗传修饰的小鼠中的轻链显示的表达水平比由携带完整或基本上完整轻链基因座的小鼠显示的同一重排的轻链的表达高至少10倍至大约1000倍、100倍至大约1000倍、200倍至大约1000倍、300倍至大约1000倍、400倍至大约1000倍、500倍至大约1000倍、600倍至大约1000倍、700倍至大约1000倍、800倍至大约1000倍或900倍至大约1000倍。在一个实施方案中,所述轻链包括人序列。在一个具体的实施方案中,所述人序列是 κ 序列。在一个实施方案中,所述人序列是 λ 序列。在一个实施方案中,所述轻链是全人轻链。

[0122] 在一个实施方案中,所述表达水平通过定量转录的轻链序列的mRNA来表征,并将其与携带完整或基本上完整轻链基因座的小鼠的转录的轻链序列进行比较。

[0123] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其表达源自不多于一个或不多于两个重排的 κ 轻链序列的单一 κ 轻链,其中所述小鼠,用抗原免疫后,显示与用同一抗原免疫的野生型小鼠相当的血清滴度。在一个具体的实施方案中,所述小鼠表达来自不多于一个重排的 κ 轻链序列的单一 κ 轻链。在一个实施方案中,所述血清滴度表征为总免疫球蛋白。在一个具体的实施方案中,所述血清滴度表征为IgM特异性滴度。在一个具体的实施方案中,所述血清滴度表征为IgG特异性滴度。在一个更加具体的实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列选自V κ 1-39J κ 5和V κ 3-20J κ 1序列。在一个实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列是V κ 1-39J κ 5序列。在一个实施方案中,所述重排的 κ 轻链序列是V κ 3-20J κ 1序列。

[0124] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其表达一群抗原特异性抗体,其中这群抗原特异性抗体的所有免疫球蛋白轻链包括源自相同的人V_L基因片段的人轻链可变(V_L)区并且免疫球蛋白重链包括源自多个人V_H基因片段之一的人重链可变(V_H)区。

[0125] 在各种实施方案中,所述人V_H基因片段选自V_H1-2、V_H1-3、V_H1-8、V_H1-18、V_H1-24、V_H1-46、V_H1-58、V_H1-69、V_H2-5、V_H2-26、V_H2-70、V_H3-7、V_H3-9、V_H3-11、V_H3-13、V_H3-15、V_H3-20、

V_H3-21、V_H3-23、V_H3-30、V_H3-33、V_H3-43、V_H3-48、V_H3-53、V_H3-64、V_H3-72、V_H3-73、V_H4-31、V_H4-34、V_H4-39、V_H4-59、V_H5-51和V_H6-1。

[0126] 在各种实施方案中,相同的单一人V_L基因片段选自人V_κ1-39基因片段和人V_κ3-20基因片段。在各种实施方案中,所有免疫球蛋白轻链包括选自J_κ和J_λ基因片段的人轻链J(J_L)基因片段。在一个具体的实施方案中,所述人J_L基因片段选自人J_κ1和J_κ5基因片段。在各种实施方案中,所述小鼠缺乏选自小鼠免疫球蛋白V_L基因片段、小鼠免疫球蛋白J_L基因片段及其组合的序列。在各种实施方案中,所述人V_L区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白轻链恒定(C_L)区。在一个具体的实施方案中,所述人V_L区可操作性连接小鼠C_κ区。在一个具体的实施方案中,所述人V_L区可操作性连接大鼠C_κ区。

[0127] 在各种实施方案中,所述人V_L区表达自内源性免疫球蛋白轻链基因座。在各种实施方案中,所述人V_H区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白重链恒定(C_H)区。在各种实施方案中所述(C_H)区包括选自C_H1、铰链区、C_H2、C_H3、C_H4和/或其组合的人序列。在各种实施方案中,所述人V_H区表达自内源性免疫球蛋白重链基因座。

[0128] 在一个方面,本发明提供一种遗传修饰的小鼠,其表达多个与单一轻链相缔合的免疫球蛋白重链。在一个实施方案中,所述重链包括人序列。在各种实施方案中,所述人序列选自可变序列、C_H1、铰链区、C_H2、C_H3及其组合。在一个实施方案中,所述单一轻链包括人序列。在各种实施方案中,所述人序列选自可变序列、恒定序列及其组合。在一个实施方案中,所述小鼠包括失效的(disabled)内源性免疫球蛋白基因座并通过转基因或染色体外游离体表达所述重链和/或所述轻链。在一个实施方案中,所述小鼠包括用一个或多个免疫球蛋白序列于内源小鼠基因座替换一些或全部内源性小鼠重链基因片段(即V、D、J),和/或一些或全部内源性小鼠重链恒定序列(例如C_H1、铰链区、C_H2、C_H3或其组合),和/或一些或全部内源性小鼠轻链序列(例如V、J、恒定或其组合)。

[0129] 在一个方面,本发明提供适于制备具有相同轻链的抗体的小鼠,其中在所述小鼠中制得的所有或基本上所有抗体以相同的轻链表达。在一个实施方案中,所述轻链表达自内源性轻链基因座。

[0130] 在一个方面,本发明提供制备用于人抗体的轻链的方法,包括从本文所述的小鼠获得轻链序列和重链序列,并且将所述轻链序列和所述重链序列应用于制备人抗体。在一个实施方案中,所述人抗体是双特异性抗体。

[0131] 在一个方面,本发明提供一种鉴定人重链可变区的方法,所述人重链可变区能够用本发明所述的工程化的轻链结合感兴趣的抗原,其中所述方法包括提供源自能够结合所述抗原的第一抗体的重链可变区,用生殖系轻链序列修复所述重链可变区并转染细胞使得每个表达以形成第二抗体,暴露所述第二抗体于所述抗原,以及检测所述第二抗体与所述抗原的结合。

[0132] 在一个实施方案中,所述第一抗体的轻链包括人V_κ1-39序列。在一个实施方案中,所述第一抗体的轻链包括人V_κ3-20序列。在一个实施方案中,所述生殖系轻链序列包括人V_κ1-39或V_κ3-20序列。在各种实施方案中,所述第二抗体与所述抗原的结合通过比较所述第一抗体与所示抗原的结合来确定。

[0133] 本发明所述的任何实施方案和方面可以彼此结合使用,除非另有说明或明显可以从上下文看出。其它实施方案对于本领域技术人员在查阅接下来的说明书后将会变得明

显。

附图说明

[0134] 图1示例说明用人V κ 1-39J κ 5基因区替换内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因片段的靶向策略。

[0135] 图2示例说明用人V κ 3-20J κ 1基因区替换内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因片段的靶向策略。

[0136] 图3示例说明用人VpreB/J λ 5基因区替换内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因片段的靶向策略。

[0137] 图4显示来自野生型小鼠 (WT)、工程化人重排的V κ 1-39J κ 5轻链区纯合的小鼠 (V κ 1-39J κ 5H0) 和工程化人重排的V κ 3-20J κ 1轻链区纯合的小鼠 (V κ 3-20J κ 1H0) 的外周血的CD19⁺B细胞的百分比 (y轴)。

[0138] 图5A显示在定量PCR分析中采用特异性针对工程化人重排的V κ 1-39J κ 5轻链区连接 (junction) 的探针 (V κ 1-39J κ 5Junction探针) 和特异性针对在对于用人V κ 和J κ 基因片段替换内源性V κ 和J κ 基因片段纯合的小鼠 (H κ)、野生型小鼠 (WT) 和对于工程化人重排的V κ 1-39J κ 5轻链区杂合的小鼠 (V κ 1-39J κ 5HET) 中的人V κ 1-39基因片段的探针 (V κ 1-39探针) 获得的V κ 1-39-来源的轻链的相对mRNA表达 (y轴)。信号相对小鼠C κ 的表达进行标准化。N.D.: 未检测到。

[0139] 图5B显示在定量PCR分析中采用特异性针对工程化人重排的V κ 1-39J κ 5轻链区连接的探针 (V κ 1-39J κ 5Junction探针) 和特异性针对在对于用人V κ 和J κ 基因片段替换内源性V κ 和J κ 基因片段纯合的小鼠 (H κ)、野生型小鼠 (WT) 和对于工程化人重排的V κ 1-39J κ 5轻链区纯合的小鼠 (V κ 1-39J κ 5H0) 中的人V κ 1-39基因片段的探针 (V κ 1-39探针) 获得的V κ 1-39-来源的轻链的相对mRNA表达 (y轴)。信号相对小鼠C κ 的表达进行归一化。

[0140] 图5C显示在定量PCR分析中采用特异性针对工程化人重排的V κ 3-20J κ 1轻链区连接的探针 (V κ 3-20Junction探针) 和特异性针对在对于用人V κ 和J κ 基因片段替换内源性V κ 和J κ 基因片段纯合的小鼠 (H κ)、野生型小鼠 (WT) 和对于工程化人重排的V κ 3-20J κ 1轻链区杂合 (HET) 和纯合 (H0) 的小鼠中的人V κ 3-20基因片段的探针 (V κ 3-20探针) 获得的V κ 3-20-来源的轻链的相对mRNA表达 (y轴)。信号相对小鼠C κ 的表达进行归一化。

[0141] 图6A显示用 β -半乳糖苷酶 (galactosidase) 免疫的野生型 (WT; N=2) 和工程化人重排的V κ 1-39J κ 5轻链区纯合的小鼠 (V κ 1-39J κ 5H0; N=2) 中IgM (左) 和IgG (右) 滴度。

[0142] 图6B显示用 β -半乳糖苷酶 (galactosidase) 免疫的野生型 (WT; N=5) 和工程化人重排的V κ 3-20J κ 1轻链区纯合的小鼠 (V κ 3-20J κ 1H0; N=5) 中总免疫球蛋白 (IgM、IgG、IgA) 滴度。

[0143] 发明详述

[0144] 本发明并不限于具体的方法, 以及所描述的实验条件, 因为这些方法和条件可变化。还应当理解的是本文所使用的术语是仅用于描述具体的实施方案, 并不意图是限制性的, 因为本发明的保护范围是由权利要求定义的。

[0145] 除非另有定义, 本文所用的所有术语和的短语包括所述术语和短语在本领域中已获得的含义, 除非有相反的明确指示, 或者从其中术语或短语被使用的上下文中显而易见

具有相反的含义。尽管类似或等同于本文描述的方法和材料的任何方法和材料可用来实施或测试本发明,现在描述具体的方法和材料。

[0146] 本发明所使用的术语“抗体”包括免疫球蛋白分子,其包括四条多肽链,由二硫键互相连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包括重链可变(V_H)区和重链恒定区(C_H)。所述重链恒定区包括三个结构域, C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包括轻链可变(V_L)区和轻链恒定区(C_L)。所述 V_H 和 V_L 区可进一步细分为超可变区,称为互补决定区(complementarity determining regions,CDR),散布于称为构架区(framework regions,FR)的更保守的区域之间。每个 V_H 和 V_L 包括三个CDR和四个FR,按照从氨基端到羧基端的顺序安排如下:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重链CDR可简写为HCDR1、HCDR2和HCDR3;轻链CDR可简写为LCDR1、LCDR2和LCDR3)。术语“高亲和力”抗体是指具有相对于其靶表位的 K_D 为大约 10^{-9} M或更低(例如,大约 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M或大约 1×10^{-12} M)的抗体。在一个实施方案中,通过表面等离子共振(例如,BIACORETM)测量 K_D ;在另一个实施方案中,通过ELISA测量 K_D 。

[0147] 短语“双特异性抗体”包括能够选择性结合两个或更多个表位的抗体。双特异性抗体通常包括两条不同的重链,每条重链特异性结合不同表位——或者在两个不同的分子上(例如,两个不同的免疫原上的不同表位)或者在同一分子上(例如,同一免疫原的不同表位)。如果双特异性抗体能够选择性结合两个不同表位(第一表位和第二表位),第一表位对第一重链的亲合力通常会比第二表位对第一重链的亲合力弱至少一至二或三或四或更多个数量级,反之亦然。由双特异性抗体特异性结合的表位可以在相同或不同的靶标上(例如,在相同或不同的蛋白上)。例如,双特异性抗体可通过识别同一免疫原的不同表位的重链组合而得。例如,编码识别同一免疫原的不同表位的重链可变区序列可融合至编码相同或不同重链恒定区的核酸序列,并且该序列可以在表达免疫球蛋白轻链的细胞中表达。典型的双特异性抗体具有两条重链,每条具有三个重链CDR,接着(N-末端至C-末端) C_{H1} 结构域、铰链区、 C_{H2} 结构域和 C_{H3} 结构域,以及免疫球蛋白轻链,所述轻链可以是不赋予表位结合特异性但可以与每条重链相连,也可以是可以与每条重链相连并可以结合由重链表位结合区结合的一个或多个表位,或者是可以与每条重链相连并使得重链的一条或两条能够与一个或两个表位结合。

[0148] 术语“细胞”包括适于表达重组核酸序列的任何细胞。细胞包括原核和真核细胞(单细胞或多细胞)、细菌细胞(例如,大肠杆菌、芽孢杆菌、链霉菌属等菌株)、分枝杆菌细胞、真菌细胞、酵母细胞(例如,酿酒酵母、裂殖酵母、巴斯德毕赤酵母、甲醇毕赤酵母等)、植物细胞、昆虫细胞(例如,SF-9、SF-21、杆状病毒感染的昆虫细胞、粉纹夜蛾等)、非人动物细胞、人细胞、或细胞融合例如杂交瘤细胞或四源杂交瘤细胞(quadromas)。在一些实施方案中,所述细胞是人、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在一些实施方案中,所述细胞是真核细胞并选自以下细胞:CHO(例如,CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO)、COS(例如,COS-7)、视网膜细胞、Vero、CV1、肾细胞(例如,HEK293、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、Hela、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60、(例如,BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、支持细胞(Sertoli cell)、BRL 3A细胞、HT1080细胞、黑色素瘤细胞、肿瘤细胞和前述细胞衍生的细胞系。在一些实施方案中,所述细胞包括一个或多个病毒基因,例如,表达病毒基因的视网膜细胞(例如,PER.C6TM细胞)。

[0149] 短语“互补决定区”或术语“CDR”包括由有机体的免疫球蛋白基因编码的氨基酸序

列,其通常(即,在野生型动物中)在免疫球蛋白分子(例如抗体或T细胞受体)的轻链或重链的可变区中的两个框架区之间出现。例如,CDR可以由生殖系序列或重排或未重排的序列,并且例如由幼稚或成熟B细胞或T细胞编码。CDR可以是体细胞突变的(例如从动物生殖系中编码的序列变化而来)、人源化的和/或由氨基酸取代、增加或缺失所修饰的。在某些情况下(例如对CDR3),CDR可以有两条或更多条序列(例如,生殖系序列)编码,所述序列不相邻(例如在未重排的核酸序列中)但是在B细胞核酸序列中相邻,例如作为剪切或连接所述序列的结果(例如,V-D-J重组以形成重链CDR3)。

[0150] 当用于描述保守氨基酸取代,术语“保守”包括通过另一个具有相似化学性质(例如,电荷或疏水性)侧链R基团的氨基酸残基取代氨基酸残基。通常,保守氨基酸取代不会实质性改变蛋白的感兴趣的功能特性,例如,可变区以期望的亲和力特异性结合靶表位的能力。具有相似化学性质的侧链的氨基酸组的例子包括脂肪族侧链,如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;脂肪族-羟基侧链如丝氨酸和苏氨酸;含酰胺侧链如天冬酰胺和谷氨酰胺;芳香族侧链,如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;碱性侧链的氨基酸如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;酸性侧链的氨基酸如天冬氨酸和谷氨酸;以及,含硫侧链的氨基酸如半胱氨酸和甲硫氨酸。例如,保守氨基酸取代组包括:缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸、苯丙氨酸/酪氨酸、赖氨酸/精氨酸、丙氨酸/缬氨酸、谷氨酸/天门冬氨酸、天冬酰胺和/谷氨酰胺。在一些实施方案中,保守氨基酸取代可以是以丙氨酸取代蛋白质中的任何天然残基,如在例如丙氨酸扫描诱变中所使用。在一些实施方案中,保守取代是通过获得在PAM250对数似然矩阵(log-likelihood matrix)中具有正值,所述矩阵公开于Gonnet et al. (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45。在一些实施方案中,所述取代是中度保守的取代,其中所述取代在PAM250对数似然矩阵中具有非负值。

[0151] 在一些实施方案中,在免疫球蛋白轻链或重链的残基位置相差一个或多个保守的氨基酸取代。在一些实施方案中,在免疫球蛋白轻链或其功能片段(例如,允许例如B细胞表达和分泌的片段)中的残基位置与其氨基酸序列在本文列出的轻链不同,但相差一个或多个保守的氨基酸取代。

[0152] 短语“表位结合蛋白”包括具有至少一个CDR的蛋白并且其能够选择性识别表位,例如,能够以大约微摩尔或更低的 K_D (例如,大约 $1 \times 10^{-6}M$ 、 $1 \times 10^{-7}M$ 、 $1 \times 10^{-8}M$ 、 $1 \times 10^{-9}M$ 、 $1 \times 10^{-10}M$ 、 $1 \times 10^{-11}M$ 或大约 $1 \times 10^{-12}M$ 的 K_D)结合表位。治疗性表位结合蛋白(例如,治疗性抗体)通常要求纳摩尔或者皮摩尔范围的 K_D 。

[0153] 短语“功能片段”包括表位结合蛋白的片段,其表达、分泌并以微摩尔、纳摩尔或皮摩尔范围的 K_D 特异性结合表位。特异性识别包括具有至少在微摩尔范围、纳摩尔范围或皮摩尔范围的 K_D 。

[0154] 术语“生殖系”包括提及非体细胞突变的细胞中的免疫球蛋白核酸序列,例如非体细胞成熟的B细胞或前B细胞或造血细胞。

[0155] 短语“重链”或“免疫球蛋白重链”包括来自任何有机体的免疫球蛋白重链恒定区序列。除非另有规定,重链可变区包括三个重链CDR和四个FR区。重链的片段包括CDR、CDR和FR、及其组合。典型的重链在可变区之后(从N-末端到C-末端)具有 CH_1 结构域、铰链区、 CH_2 结构域和 CH_3 结构域。重链的功能性片段包括能够特异性识别表位(例如,以微摩尔、纳摩尔或

皮摩尔的范围的K_D识别表位)的片段,所述片段能够从细胞表达并分泌,以及所述片段包括至少一个CDR。

[0156] 当针对序列使用时,术语“同一性”包括由本领域中已知的许多可用于测量核苷酸和/或氨基酸序列同一性的不同算法来确定的同一性。在本文所描述的一些实施方案中,采用ClustalW v.1.83 (慢)比对,使用开放空位罚分10.0、延伸空位罚分0.1,以及采用Gonnet相似性矩阵 (MACVECTOR™10.0.2, MacVector Inc., 2008) 来确定同一性。对于序列同一性而言所比较的序列的长度将取决于特定序列,但是在轻链恒定区的情况下,所述长度应当包含足够长度的序列以折叠成轻链恒定区,其能够自缔合以形成典型 (canonical) 的轻链恒定区,例如,能够形成两个包括β链的β折叠并能够与人或小鼠的至少一个Ch1结构域相互作用。在Ch1结构域的情况下,所述序列的长度应当包含足够长度的序列以折叠成Ch1结构域,其能够形成两个包括β链的β折叠并能够与人或小鼠的至少一个轻链恒定区相互作用。

[0157] 短语“免疫球蛋白分子”包括两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链。所述重链可以相同或不同,并且所述轻链可以相同或不同。

[0158] 短语“轻链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白轻链序列,并且除非另有说明包括人κ和λ轻链和VpreB,以及替代轻链。除非另有说明,轻链可变 (V_L) 区通常包括三个轻链CDR和四个框架 (FR) 区。通常,全长轻链包括,从氨基端到羧基端,包括FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的V_L结构域,以及轻链恒定区。轻链包括例如不选择性结合第一或第二表位的轻链,所述第一或第二表位被所述轻链在其中出现的表位结合蛋白选择性结合。轻链还包括那些结合并识别,或协助重链结合和识别,一个或多个表位的轻链,所述一个或多个表位被所述轻链在其中出现的表位结合蛋白选择性结合。共同轻链是源自重排的人Vκ1-39Jκ5序列或重排的人Vκ3-20Jκ1序列的那些,并且包括体细胞突变 (例如,亲和力成熟的) 的版本。

[0159] 短语“微摩尔范围”旨在指1-999微摩尔;短语“纳摩尔范围”旨在指1-999纳摩尔;短语“皮摩尔范围”旨在指1-999皮摩尔。

[0160] 短语“体细胞突变的”包括提及来自已经经过类别转换的B细胞的核酸序列,其中经过类别转换的B细胞中的免疫球蛋白可变区的核酸序列 (例如重链可变区或包括重链CDR或FR序列) 与类别转换之前的B细胞中的核酸序列不同,例如在没有经历类别转换的B细胞和经历类别转换的B细胞之间的CDR或框架核酸序列的不同。“体细胞突变的”包括提及与没有亲和力成熟的B细胞中的相应的免疫球蛋白可变区序列 (即生殖系细胞的基因组中的序列) 相比不同的来自亲和力成熟的B细胞的核酸序列。短语“体细胞突变的”还包括提及B细胞暴露给感兴趣的表位之后来自B细胞的免疫球蛋白可变区核酸序列,其中所述核酸序列与B细胞暴露给感兴趣的表位之前的相应核酸序列不同。短语“体细胞突变的”指已经在例如具有人免疫球蛋白可变区核酸序列的小鼠的动物中应答免疫原刺激 (challenge) 产生的并且由该动物的内在运行的选择过程产生的抗体的序列。

[0161] 术语“未重排的”在涉及序列时,包括存在于动物生殖系细胞中的核酸序列。

[0162] 短语“可变区 (variable domain)”包括免疫球蛋白轻链或重链的氨基酸序列 (修改为需要的),其包括以下氨基酸区,以从N-末端到C-末端的顺序 (除非另外指明): FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0163] 共同轻链

[0164] 之前制备有用的多特异性表位结合蛋白例如双特异性抗体的努力已经被各种问题阻碍,其共同的模式是:序列的体外选择或操作以合理地工程化,或通过试错法工程化,试错法是配对异源二聚化双特异性人免疫球蛋白的合适的形式。不幸的是,即便可行,大部分(如果不是全部的话)体外工程化方法也主要提供仅适于单个分子的措施。另一方面,采用复杂有机体以选择合适的能够获得人类治疗剂的配对的体内方法还没有实现。

[0165] 一般来说,天然小鼠序列往往不是人类治疗序列的很好的来源。至少这个原因,产生与人类共同轻链配对的小鼠免疫球蛋白重链可变区具有有限的实际效用。更多体外工程化努力将消耗在尝试人源化小鼠重链可变序列,同时希望保留表位特异性和亲和力以及同时保持结合共同人轻链的能力的试错过程中,具有不确定的结果。在该过程结束时,最终产物可能维持一些特异性和亲和力,并与共同轻链缔合,但最终人中的免疫原性可能会继续产生深远的风险。

[0166] 因此,用于制备人类治疗剂的合适的小鼠将会包括人重链可变区基因片段的适当大的群以替换内源性小鼠重链可变区基因片段。所述人重链可变区基因片段应当能够重排并与内源性小鼠重链恒定区重组以形成反向嵌合重链(即,包括人可变区和小鼠恒定区的重链)。所述重链应当能够进行类别转换和体细胞超变,使得可获得人重链可变区基因片段的适当大的群以便小鼠选择一个可以结合人轻链可变区的有限的群的重链。

[0167] 对于多条重链选择共同轻链的小鼠具有实际应用。在各种实施方案中,在仅可表达共同轻链的小鼠中表达的抗体会具有能够结合相同或基本上相同轻链并与其一起表达的重链。这对于制备双特异性抗体尤其有用。例如,这样的小鼠可以用第一免疫原免疫以产生表达特异性结合第一表位的抗体的B细胞。所述小鼠(或遗传相同的小鼠)可以用第二免疫原免疫以产生表达特异性结合第二表位的抗体的B细胞。可变重链区可以从B细胞克隆并以相同的重链恒定区以及相同的轻链表达,并且在细胞中表达以制备双特异性抗体,其中所述双特异性抗体的轻链组分已经由小鼠选择来结合所述轻链组分的小鼠并与所述轻链组分一起表达。

[0168] 发明人已经工程化小鼠用于产生免疫球蛋白轻链,其将适合与更多样家族的重链配对,包括其可变区与生殖系序列不同的重链,例如亲和力成熟或体细胞突变的可变区。在各种实施方案中,所述小鼠被设计用于将人轻链可变区与包括体细胞突变的人重链可变区配对,从而使得高亲和力结合蛋白适用做人治疗剂的途径成为可能。

[0169] 通过有机体内抗体选择的长而复杂的过程,遗传工程化的小鼠使得用有限种类的人轻链选择配对多样的人重链可变区集合成为生物学上合适的选择。为了达到该目标,小鼠工程化以呈现有限种类的人轻链可变区选择,其结合广泛多样的人重链可变区选择。在免疫原刺激后,所述小鼠在其群中最大化解决方案个数以开发免疫原的抗体,其主要或仅仅受限于在其群中轻链的选择个数。在各种实施方案中,这包括允许小鼠实现轻链可变区的合适的并且相容性的体细胞突变,但其将会与相对多种类的人重链可变区相容,尤其包括体细胞突变的人重链可变区。

[0170] 为了获得有限的轻链选择群,所述小鼠被工程化以使得其制备或重排天然的小鼠轻链可变区的能力变成非功能性或基本上非功能性。这可以通过例如缺失小鼠的轻链可变区基因片段实现。然后,内源性小鼠基因座可由选择的外源性合适的人轻链可变区基因片段修饰,所述外源性合适的人轻链可变区基因片段可操作性连接内源性小鼠轻链恒定区,

该连接以使得外源性人轻链可变区基因片段可以结合内源性小鼠轻链恒定区基因并形成重排的反向嵌合轻链基因(人可变、小鼠恒定)的方式进行。在各种实施方案中,所述轻链可变区能够被体细胞突变。在各种实施方案中,为了使得轻链可变区获得体细胞突变的能力最大化,合适的增强子被保留在小鼠中。例如,在修饰小鼠 κ 轻链基因座以用人 κ 轻链基因片段替换内源性小鼠 κ 轻链基因片段时,小鼠 κ 内含增强子和小鼠 $\kappa 3'$ 增强子被功能性维持,或未被破坏。

[0171] 本发明提供一种遗传工程化的小鼠,其表达有限群的反向嵌合(人可变、小鼠恒定)轻链,所述轻链结合各种反向嵌合(人可变、小鼠恒定)重链。在各种实施方案中,内源性小鼠 κ 轻链基因片段被缺失并用单一(或两个)重排的人轻链区替换,所述人轻链区可操作性连接内源性小鼠 $C\kappa$ 基因。在为了最大化重排的人轻链区的体细胞超变的实施方案中,小鼠 κ 内含增强子和小鼠 $\kappa 3'$ 增强子被维持。在各种实施方案中,所述小鼠还包括非功能性 λ 轻链基因座、或其缺失或使得基因座不能生产 λ 轻链的缺失。

[0172] 本发明提供一种遗传工程化的小鼠,在各种实施方案中,包括轻链可变区基因座,所述轻链可变区基因座缺乏内源性小鼠轻链 V_L 和 J_L 基因片段并包括重排的人轻链可变区,在一个实施方案中包括重排的人 V_L/J_L 序列,所述重排的人轻链可变区可操作性连接小鼠恒定区,其中所述基因座能够进行体细胞超变,并且其中所述基因座表达连接小鼠恒定区的包括所述人 V_L/J_L 序列的轻链。因此,在各种实施方案中,所述基因座包括小鼠 $\kappa 3'$ 增强子,其与正常或野生型的体细胞超变水平相关。

[0173] 在各种实施方案中所述遗传工程化的小鼠,当用感兴趣的抗原免疫时,产生显示各种人免疫球蛋白重链可变区的重排的B细胞,所述重链可变区与一种或与两种重排的轻链一起表达并行使功能,包括这样的实施方案,其中所述一种或者两种轻链包括人轻链可变区,其包括例如1至5个体细胞突变。在各种实施方案中,所表达的人轻链能够结合任何表达于小鼠的人免疫球蛋白重链可变区并与其一起表达。

[0174] 结合多于一个表位的表位结合蛋白

[0175] 本发明所述的组合物和方法可用于制备结合蛋白,其以高亲和性结合多于一个表位,例如双特异性抗体。本发明的优点包括能够选择合适高结合(例如,亲和力成熟)重链免疫球蛋白链,其每一个会结合单一轻链。

[0176] 双特异性结合蛋白的合成与表达已经存在问题,部分由于与鉴定合适的能够结合两种不同重链并与其一起表达的轻链的相关问题,并且部分由于分离的问题。本文所述的方法和组合物允许遗传修饰的小鼠(否则通过天然过程)选择合适的能结合多于一种重链并与其一起表达的轻链,所述重链包括体细胞突变的重链(例如,亲和力成熟)。来自本文所述的免疫的小鼠的合适的B细胞(其表达具有反向嵌合重链(即,人可变和小鼠恒定)的亲和力成熟的抗体)的人 V_L 和 V_H 序列,,可被鉴定并符合读框地克隆至带有合适的人恒定区基因序列(例如,人IgG1)的表达载体中。可以制备两种这样的构建体,其中每个构建体编码结合不同表位的人重链可变区。人 V_L 之一(例如人 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 或人 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$),在生殖系序列中或来自其中所述序列已经是体细胞突变的B细胞,可以被符合读框地融合至合适的人恒定区基因(例如人 κ 恒定基因)。这三种全人重链和轻链构建体可以置于合适的细胞中表达。所述细胞会表达两个主要种类:带有相同轻链的同源二聚化重链,以及带有相同轻链的异源二聚化重链。为了允许协助这些主要种类的分离,重链之一被修饰以省略蛋白A结合决定

簇,从异源二聚化结合蛋白得到不同亲和力的同源二聚化结合蛋白。阐述该组的组合和方法见于USSN 12/823,838,于2010年6月25日递交,名称为“Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format”,公开为US 2010/0331527A1。

[0177] 在一个方面,本发明提供本文所描述的表位结合蛋白,其中人 V_L 和 V_H 序列是源自本文所述的已经用包括感兴趣的表位的抗原免疫的小鼠。

[0178] 在一个实施方案中,本发明提供表位结合蛋白,其包括第一和第二多肽,所述第一多肽包括,从N-末端到C-末端,选择性结合第一表位的第一表位结合区,然后是包括人IgG的第一 CH_3 区的恒定区,所述IgG选自IgG1、IgG2、IgG4及其组合;以及,第二多肽包括,从N-末端到C-末端,选择性结合第二表位的第二表位结合区,然后是包括人IgG的第二 CH_3 区的恒定区,所述IgG选自IgG1、IgG2、IgG4及其组合,其中所述第二 CH_3 区包括降低或消除所述第二 CH_3 区对蛋白A的结合的修饰。

[0179] 在一个实施方案中,所述第二 CH_3 区包括H95R修饰(IMGT外显子编号;EU编号:H435R)。在另一个实施方案中,所述第二 CH_3 区还包括Y96F修饰(IMGT;EU编号为Y436F)。

[0180] 在一个实施方案中,所述第二 CH_3 区来自修饰的人IgG1,并且进一步包括选自由下列组成的组的修饰:D16E、L18M、N44S、K52N、V57M和V82I(IMGT;EU为D356E、L358M、N384S、K392N、V397M以及V422I)。

[0181] 在一个实施方案中,所述第二 CH_3 区来自修饰的人IgG2,并且进一步包括修饰选自下组:N44S、K52N和V82I(IMGT;EU为N384S、K392N和V422I)。

[0182] 在一个实施方案中,所述第二 CH_3 区来自修饰的人IgG4,并且进一步包括选自由下列组成的组的修饰:Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q和V82I(IMGT;EU编号为Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q和V422I)。

[0183] 制备结合多于一个表位的表位结合蛋白的一种方法是用包括感兴趣的第一表位的抗原免疫根据本发明的第一小鼠,其中所述小鼠包括内源性免疫球蛋白轻链可变区基因座,其不含有能够重排并形成轻链的内源性小鼠 V_L ,其中位于内源性小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因座的是单一重排的人 V_L 区,该重排的人 V_L 区可操作性连接小鼠内源性轻链恒定区基因,并且所述重排的人 V_L 区选自人 $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ 和人 $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$,并且所述内源性小鼠 V_H 基因片段已经全部或部分用人 V_H 基因片段替换,使得由小鼠制得的免疫球蛋白重链仅仅是或基本上是包括人可变区和小鼠恒定区的重链。当免疫后,该小鼠会生产反向嵌合抗体,仅包括两种人轻链可变区的一种(例如,人 $V_{\kappa 1-39J\kappa 5}$ 或人 $V_{\kappa 3-20J\kappa 1}$ 之一)。一旦鉴定编码结合感兴趣的表位的 V_H 的B细胞,所述 V_H (以及,任选地,所述 V_L)的核苷酸序列可以重新回收(retrieved)(例如,通过PCR)并克隆至符合读框地带有合适的人免疫球蛋白恒定区的表达构建体中。可以重复该方法以鉴定结合第二表位的第二 V_H 结构域,并且第二 V_H 基因序列可以重新回收并克隆至符合读框地带有第二合适的人免疫球蛋白恒定区的表达载体中。所述第一和所述第二免疫球蛋白恒定区可以为相同或不同的同种型,并且所述免疫球蛋白恒定区之一(但不是另一个)可以如本文或US2010/0331527A1中所述进行修饰,并且表位结合蛋白可以在合适的细胞中表达并基于其与同源二聚化表位结合蛋白相对蛋白A的不同亲和力分离,例如US 2010/0331527A1中所述。

[0184] 在一个实施方案中,本发明提供制备双特异性表位结合蛋白的方法,包括从本文

所述的小鼠鉴定第一亲和力成熟(例如,包括一个或多个体细胞超变)人 V_H 核苷酸序列(V_H1),从本文所述的小鼠鉴定第二亲和力成熟(例如,包括一个或多个体细胞超变)人 V_H 核苷酸序列(V_H2),与缺乏如US 2010/0331527A1中所述蛋白A决定簇修饰的人重链符合读框地克隆 V_H1 ,以形成重链1(HC1),与包括如US 2010/0331527A1中所述的蛋白A决定簇修饰的人重链框架符合读框地克隆 V_H2 ,以形成重链2(HC2),将包括HC1的表达载体和包括HC2的相同或不同的表达载体引入细胞,其中所述细胞也表达人免疫球蛋白轻链,所述轻链包括融合至人轻链恒定区的人 V_{K1-39}/J_{K5} 人或人 V_{K3-20}/J_{K1} ,使细胞表达包括由 V_H1 编码的 V_H 结构域和由 V_H2 编码的 V_H 结构域的双特异性表位结合蛋白,以及基于其与单特异性同源二聚化表位结合蛋白相比不同的结合蛋白A的能力分离所述双特异性表位结合蛋白。在一个具体的实施方案中,HC1是IgG1,并且HC2是包括H95R修饰(IMGTEU为H435R)并进一步包括Y96F修饰(IMGTEU为Y436F)的IgG1。在一个实施方案中,所述由 V_H1 编码的 V_H 结构域、由 V_H2 编码的 V_H 结构域、或二者,是体细胞突变的。

[0185] 与共同人 V_L 一起表达的人 V_H 基因

[0186] 来自针对四种不同抗原产生的亲和力成熟的抗体的各种人可变区与它们的关联轻链或者至少一种选自人 V_{K1-39}/J_{K5} 、人 V_{K3-20}/J_{K1} 或人 $V_{preBJ\lambda 5}$ 的人轻链一起表达(参见实施例1)。对每个抗原的抗体,来自不同基因家族的体细胞成熟的高亲和力重链成功与重排的人生殖系 V_{K1-39}/J_{K5} 和 V_{K3-20}/J_{K1} 区配对,并从表达所述重链和轻链的细胞分泌。对于 V_{K1-39}/J_{K5} 和 V_{K3-20}/J_{K1} ,源自以下人 V_H 基因家族的 V_H 结构域被优先表达:1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51和6-1。因此,工程化以表达来自 V_{K1-39}/J_{K5} 和 V_{K3-20}/J_{K1} 的一个或二者的人 V_L 结构域的有限群的小鼠会从 V_H 基因座修饰以用人 V_H 基因片段替换小鼠 V_H 基因片段产生多种群体的体细胞突变的人 V_H 结构域。

[0187] 遗传工程化以表达与单一重排轻链(例如, V_{K1-39}/J 或 V_{K3-20}/J)结合的反向嵌合(人可变、小鼠恒定)免疫球蛋白重链的小鼠,当用感兴趣的抗原免疫后,产生包括各种人 V_H 重排并表达各种高亲和力抗原特异性抗体的B细胞,所述特异性抗体具有在阻断抗原与其配体结合的能力和结合抗原的变体的能力方面的各种特性(参见实施例5-10)。

[0188] 因此,本发明所描述的小鼠和方法在制备和选择人免疫球蛋白重链可变区中是有用的,包括体细胞突变的人重链可变区,其是各种重排的结果,显示广泛的亲和力(包括显示大约纳摩尔或更低的 K_D)、广泛的特异性(包括结合相同抗原的不同表位),并且结合相同或基本上相同的人免疫球蛋白轻链可变区并与其一起表达。

[0189] 以下提供的实施例是使得本领域普通技术人员知晓如何制备和使用本发明的方法和组合物,并且不是旨在限制发明人在其发明中的保护范围。已经努力确保所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但某些实验错误和偏差应予以考虑。除非另外指明,份是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,以及压力是大气压或接近大气压。

实施例

[0190] 以下提供的实施例是使得本领域普通技术人员知晓如何制备和使用本发明的方法和组合物,并且不是旨在限制发明人在其发明中的保护范围。已经努力确保所使用的数字的准确性(例如,量、温度等),但某些实验错误和偏差应予以考虑。除非另外指明,温度是

摄氏度,压力是大气压或接近大气压,份是重量份,以及分子量是平均分子量。

[0191] 实施例1

[0192] 结合所选人轻链可变区的人重链可变区的鉴定

[0193] 构建体外表达系统以确定单一重排的人生殖系轻链能否与来自抗原特异性人抗体的人重链共表达。

[0194] 在遗传修饰的小鼠中产生人抗体的方法是已知的(参见例如,US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, **VELOCIMMUNE®**)。 **VELOCIMMUNE®** 技术涉及产生具有包括可操作性连接内源性小鼠恒定区基因座的人重链和轻链可变区的基因组的遗传修饰小鼠,这样所述小鼠响应抗原刺激生产包括人可变区和小鼠恒定区的抗体。编码由 **VELOCIMMUNE®** 小鼠生产的抗体的重链和轻链的可变区的DNA是全人的。最初,高亲和力的嵌合抗体是分离的具有人可变区和小鼠恒定区。如下所述,抗体被表征并因为期望的性质被选中,包括亲和力、选择性、表位等。小鼠恒定区被期望的人恒定区替换以产生含有非IgM同种型的全人抗体,例如,野生型或修饰的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。尽管所选择的恒定区可以根据具体的用途改变,但高亲和力抗原结合和靶特异性位于可变区中。

[0195] **VELOCIMMUNE®** 小鼠用促进血管生成的生长因子(抗原C)免疫,分离抗原特异性人抗体并且采用本领域已知标准技术测序V基因使用。选定的抗体克隆到人重链和轻链恒定区并且选择69个重链用于和三个人轻链之一配对:(1) 关联 κ 轻链连接人 κ 恒定区,(2) 重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5连接人 κ 恒定区,(3) 重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1连接人 κ 恒定区,每个重链和轻链对采用标准技术共转染入CHO-K1细胞。用抗人IgG在ELISA分析中检测上清中抗体的存在。对每个重链/轻链对确定抗体滴度(ng/ml)以及不同重排的人生殖系轻链的滴度与所获得的亲本抗体分子(即,与关联轻链配对的重链)的滴度比较并计算天然滴度(native titer)的百分比(表1)。V_H:重链可变基因。ND在当前实验条件下没有检测到表达。

[0196] 表1

[0197]

V _H	抗体滴度 (ng/mL)			天然滴度的百分比	
	关联 LC	V _κ 1-39J _κ 5	V _κ 3-20J _κ 1	V _κ 1-39J _κ 5	V _κ 3-20J _κ 1
3-15	63	23	11	36.2	17.5
1-2	103	53	ND	51.1	-
3-23	83	60	23	72.0	27.5
3-33	15	77	ND	499.4	-
4-31	22	69	17	309.4	76.7
3-7	53	35	28	65.2	53.1
-	22	32	19	148.8	89.3
1-24	3	13	ND	455.2	-
3-33	1	47	ND	5266.7	-
3-33	58	37	ND	63.1	-
-	110	67	18	60.6	16.5
3-23	127	123	21	96.5	16.3
3-33	28	16	2	57.7	7.1
3-23	32	50	38	157.1	119.4
-	18	45	18	254.3	101.7
3-9	1	30	23	2508.3	1900.0
3-11	12	26	6	225.9	48.3
1-8	16	ND	13	-	81.8
3-33	54	81	10	150.7	19.1

[0198]

-	34	9	ND	25.9	-
3-20	7	14	54	203.0	809.0
3-33	19	38	ND	200.5	-
3-11	48	ND	203	-	423.6
-	11	23	8	212.7	74.5
3-33	168	138	182	82.0	108.2
3-20	117	67	100	57.5	86.1
3-23	86	61	132	70.7	154.1
3-33	20	12	33	60.9	165.3
4-31	69	92	52	133.8	75.0
3-23	87	78	62	89.5	71.2
1-2	31	82	51	263.0	164.6
3-23	53	93	151	175.4	285.4
-	11	8	17	75.7	151.4
3-33	114	36	27	31.6	23.4
3-15	73	39	44	53.7	59.6
3-33	1	34	16	5600.0	2683.3
3-9	58	112	57	192.9	97.6
3-33	67	20	105	30.1	157.0
3-33	34	21	24	62.7	70.4
3-20	10	49	91	478.4	888.2
3-33	66	32	25	48.6	38.2
3-23	17	59	56	342.7	329.8
-	58	108	19	184.4	32.9
-	68	54	20	79.4	29.9
3-33	42	35	32	83.3	75.4
-	29	19	13	67.1	43.9
3-9	24	34	29	137.3	118.4
3-30/33	17	33	7	195.2	43.1
3-7	25	70	74	284.6	301.6
3-33	87	127	ND	145.1	-
6-1	28	56	ND	201.8	-
3-33	56	39	20	69.9	36.1
3-33	10	53	1	520.6	6.9
3-33	20	67	10	337.2	52.3
3-33	11	36	18	316.8	158.4
3-23	12	42	32	356.8	272.9
3-33	66	95	15	143.6	22.5

[0199]	3-15	55	68	ND	123.1	-
	-	32	68	3	210.9	10.6
	1-8	28	48	ND	170.9	-
	3-33	124	192	21	154.3	17.0
	3-33	0	113	ND	56550.0	-
	3-33	10	157	1	1505.8	12.5
	3-33	6	86	15	1385.5	243.5
	3-23	70	115	22	163.5	31.0
	3-7	71	117	21	164.6	29.6
	3-33	82	100	47	122.7	57.1
	3-7	124	161	41	130.0	33.5

[0200] 在相似的实验中,用几种不同抗原免疫**VELOCIMMUNE®**小鼠并选择抗原特异性人抗体的重链,测试其与不同重排的人生殖系轻链的配对能力(如上所述)。本实验中使用的抗原包括参与了胆固醇体内平衡的酶(抗原A)、参与调解葡萄糖体内平衡的血清激素(抗原B)、促进血管生成的生长因子(抗原C)和细胞表面受体(抗原D)。从每个免疫组的小鼠分离抗原特异性抗体并且克隆和测序重链和轻链可变区。从重链和轻链的序列,确定V基因使用率,选择的轻链或者与它们的关联重链或者重排的人生殖系Vk1-39Jk5区配对。每个重链/轻链对被共转染于CHO-K1细胞中并用抗人IgG在ELISA分析中检测上清中抗体的存在。对每个重链/轻链对确定抗体滴度($\mu\text{g}/\text{ml}$)以及不同重排的人生殖系轻链的滴度与所获得的亲本抗体分子(即,用关联轻链配对的重链)的滴度比较并计算天然滴度的百分比(表2)。V_H:重链可变基因。V_K: κ 轻链可变基因。ND在当前实验条件下没有检测到表达。

[0201] 表2

[0202]

抗原	抗体	V _H	V _K	滴度 (μg/ml)			天然滴度的百分比
				V _H 单独	V _H + V _K	V _H + V _K 1-39Jk5	
A	320	1-18	2-30	0.3	3.1	2.0	66
	321	2-5	2-28	0.4	0.4	1.9	448
	334	2-5	2-28	0.4	2.7	2.0	73
	313	3-13	3-15	0.5	0.7	4.5	670
	316	3-23	4-1	0.3	0.2	4.1	2174
	315	3-30	4-1	0.3	0.2	3.2	1327
	318	4-59	1-17	0.3	4.6	4.0	86
B	257	3-13	1-5	0.4	3.1	3.2	104
	283	3-13	1-5	0.4	5.4	3.7	69
	637	3-13	1-5	0.4	4.3	3.0	70
	638	3-13	1-5	0.4	4.1	3.3	82
	624	3-23	1-17	0.3	5.0	3.9	79
	284	3-30	1-17	0.3	4.6	3.4	75
	653	3-33	1-17	0.3	4.3	0.3	7
	268	4-34	1-27	0.3	5.5	3.8	69
	633	4-34	1-27	0.6	6.9	3.0	44
C	730	3-7	1-5	0.3	1.1	2.8	249
	728	3-7	1-5	0.3	2.0	3.2	157
	691	3-9	3-20	0.3	2.8	3.1	109
	749	3-33	3-15	0.3	3.8	2.3	62
	750	3-33	1-16	0.3	3.0	2.8	92
	724	3-33	1-17	0.3	2.3	3.4	151
	706	3-33	1-16	0.3	3.6	3.0	84
	744	1-18	1-12	0.4	5.1	3.0	59
	696	3-11	1-16	0.4	3.0	2.9	97
	685	3-13	3-20	0.3	0.5	3.4	734
	732	3-15	1-17	0.3	4.5	3.2	72
	694	3-15	1-5	0.4	5.2	2.9	55
	743	3-23	1-12	0.3	3.2	0.3	10
	742	3-23	2-28	0.4	4.2	3.1	74
	693	3-23	1-12	0.5	4.2	4.0	94
D	136	3-23	2-28	0.4	5.0	2.7	55
	155	3-30	1-16	0.4	1.0	2.2	221

[0203]	163	3-30	1-16	0.3	0.6	3.0	506
	171	3-30	1-16	0.3	1.0	2.8	295
	145	3-43	1-5	0.4	4.4	2.9	65
	49	3-48	3-11	0.3	1.7	2.6	155
	51	3-48	1-39	0.1	1.9	0.1	4
	159	3-7	6-21	0.4	3.9	3.6	92
	169	3-7	6-21	0.3	1.3	3.1	235
	134	3-9	1-5	0.4	5.0	2.9	58
	141	4-31	1-33	2.4	4.2	2.6	63
	142	4-31	1-33	0.4	4.2	2.8	67

[0204] 从这些实验获得的结果证实,来自不同基因家族的体细胞突变的、高亲和力重链能够与重排的人生殖系V_κ1-39J_κ5和V_κ3-20J_κ1区配对并且从细胞分泌为正常的抗体分子。如表1所示,与亲本抗体的关联轻链相比,大约61% (69个中的42个)的重链当其与其与重排的人V_κ1-39J_κ5轻链配对后并且大约29% (69个中的20个)重链当其与其与重排的人V_κ3-20J_κ1轻链配对后其抗体滴度提高。与亲本抗体的关联轻链相比,大约20% (69个中的14个)的重链,其重排的人生殖系轻链均赋予表达的提高。如表2所示,与亲本抗体的关联轻链相比,重排的人生殖系V_κ1-39J_κ5区赋予对于一系列不同类的抗原具有特异性若干的重链的表达提高。与亲本抗体的关联轻链相比,大约35% (15/43)的重链的抗体滴度提高了多于两倍。对于两种重链 (315和316),与亲本抗体相比,提高了大于十倍。在所有相对于亲本抗体的关联轻链显示表达提高的重链里,相较于其它重链可变区基因家族,家族三 (V_H3) 重链所占比例过高 (over represented)。这证实人V_H3重链与重排的人生殖系V_κ1-39J_κ5和V_κ3-20J_κ1轻链配对的有利关系。

[0205] 实施例2

[0206] 重排的人生殖系轻链基因座的产生

[0207] 采用**VELOCIGENE®**技术制备各种重排的人生殖系轻链靶向载体 (参见例如,US Pat.No.6,586,251和Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21 (6) :652-659) 以修饰小鼠基因组细菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) 克隆302g12和254m04 (Invitrogen)。采用这两个BAC克隆,基因组构建体被工程化以保护单一重排的人生殖系轻链区并插入内源性κ轻链基因座,所述基因座之前被修饰以缺失内源性κ可变和连接基因片段。

[0208] 重排的人生殖系轻链靶向载体的构建。采用已知标准分子生物学技术制备三个不同的重排的人生殖系轻链区。用于构建这三个区的人可变基因片段包括重排的人V_κ1-39J_κ5序列、重排的人V_κ3-20J_κ1序列和重排的人V_{pre}BJ_λ5序列。

[0209] 通过从头DNA合成 (de novo DNA synthesis) (Integrated DNA Technologies) 制备小鼠V_κ3-7基因的含有外显子1 (编码前导肽) 和内含子1的DNA片段。包括5' 非翻译区直到天然发生的B1pI限制性酶切位点的部分。人V_κ1-39和V_κ3-20基因的外显子由人基因组BAC文库PCR扩增获得。正向引物具有5' 延伸,其包含小鼠V_κ3-7基因的内含子1的剪接受位点。用于人V_κ1-39序列PCR的反向引物包括编码人J_κ5的延伸,而用于人V_κ3-20序列PCR的反

向引物包括编码人J κ 1的延伸。人VpreBJ λ 5序列由从头DNA合成(Integrated DNA Technologies)制备。包括剪接供体位点的人J κ -C κ 内含子的部分由质粒pBS-296-HA18-PI-SceI PCR扩增而得。正向PCR引物包括编码人J κ 5、J κ 1或J λ 5序列任一部分的延伸。反向引物包括PI-SceI位点,其之前被工程化入内含子。

[0210] 小鼠V κ 3-7外显子1/内含子1、人可变轻链外显子和人J κ -C κ 内含子片段通过重叠延伸PCR连接到一起,用B1pI和PI-SceI消化,并连入质粒pBS-296-HA18-PI-SceI,其含有来自人V κ 3-15可变基因片段的启动子。质粒pBS-296-HA18-PI-SceI中的loxed潮霉素盒被FRTed潮霉素盒替换并侧接NotI和AscI位点。该质粒的NotI/PI-SceI片段连入修饰的小鼠BAC 254m04,其包含部分的小鼠J κ -C κ 内含子、小鼠C κ 外显子和小鼠 κ 基因座的下游大约75kb的基因组序列,其为小鼠ES细胞中同源重组提供3'同源臂。然后该BAC的NotI/AscI片段连入修饰的小鼠BAC 302g12,其包含FRTed新霉素盒和内源性 κ 基因座的下游大约23kb的基因组序列用于小鼠ES细胞中同源重组。

[0211] 重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5靶向载体(图1)。限制性酶切位点引入工程化轻链插入物的5'和3'末端用于克隆入靶向载体:5'末端的AscI位点和3'末端的PI-SceI位点。在5'AscI位点和3'PI-SceI位点内靶向构建体从5'到3'包括含有获得自小鼠BAC克隆302g12的序列5'到内源性小鼠 κ 轻链基因座的5'同源臂、FRTed新霉素抗性基因,包括人V κ 3-15启动子的基因组序列、小鼠V κ 3-7可变基因片段的前导序列、小鼠V κ 3-7可变基因片段的内含子序列、重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5区的开放阅读框、包含人J κ -C κ 内含子部分的基因组序列和获取自小鼠BAC克隆254m04的内源性小鼠J κ 5基因片段的序列3'的3'同源臂(图1,中间)。内源性小鼠 κ 轻链基因座的上游以及大部分3'J κ 基因片段(即内源性3'增强子)的下游的基因和/或序列未被靶向构建体修饰(参见图1)。工程化的人V κ 1-39J κ 5基因座的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0212] 重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5区靶向插入BAC DNA采用位于重排的人生殖系轻链区内的序列的引物由聚合酶链式反应(PCR)确认。简而言之,内含子序列3'至小鼠V κ 3-7前导序列用引物ULC-m1F(AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG;SEQ ID NO:2)和ULC-m1R(TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA;SEQ ID NO:3)确认。重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5区的开放阅读框用引物1633-h2F(GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A;SEQ ID NO:4)和1633-h2R(TGCAAACTGG ATGCAGCATA G;SEQ ID NO:5)确认。新霉素盒用引物neoF(GGTGGAGAGG CTATTCGGC;SEQ ID NO:6)和neoR(GAACACGGCG GCATCAG;SEQ ID NO:7)确认。然后,靶向的BAC DNA用于电穿孔小鼠ES细胞以创建修饰的ES细胞用于产生嵌合小鼠,其表达重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5区。

[0213] 通过TaqmanTM筛选和核型分析采用特异性针对工程化的V κ 1-39J κ 5轻链区插入内源性基因座的探针确认阳性ES细胞克隆。简而言之,探针neoP(TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG;SEQ ID NO:8)在新霉素标志物基因内结合,探针ULC-m1P(CCATTATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC;SEQ ID NO:9)在内含子序列3'至小鼠V κ 3-7前导序列内结合,以及探针1633h2P(ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT;SEQ ID NO:10)在重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5开放阅读框内结合。然后,阳性ES细胞克隆用于植入雌性小鼠以生产一窝表达生殖系V κ 1-39J κ 5轻链区的幼鼠。

[0214] 替代地,携带重排的人生殖系V κ 1-39J κ 5轻链区的ES细胞用表达FLP的构建体转染

以去除靶向构建体引入的FRTed新霉素盒。可选地,所述新霉素盒通过与表达FLP重组酶的小鼠交配而去除(例如,US 6,774,279)。可选地,所述新霉素盒保留于小鼠中。

[0215] 重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1靶向载体(图2)。类似地,表达重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1区的工程化轻链基因座采用靶向构建体制备,所述靶向构建体包括,从5'到3',含有获得自小鼠BAC克隆302g12的序列5'至内源性小鼠 κ 轻链基因座的5'同源臂、FRTed新霉素抗性基因,包括人V κ 3-15启动子的基因组序列、小鼠V κ 3-7可变基因片段的前导序列、小鼠V κ 3-7可变基因片段的内含子序列、重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1区的开放阅读框、包含人J κ -C κ 内含子部分的基因组序列和获取自小鼠BAC克隆254m04的内源性小鼠J κ 5基因片段的序列3'的3'同源臂(图2,中间)。工程化的人V κ 3-20J κ 1基因座的序列如SEQ ID NO:11所示。

[0216] 重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1区靶向插入BAC DNA采用位于重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1轻链区内的序列的引物由聚合酶链式反应(PCR)确认。简而言之,内含子序列3'至小鼠V κ 3-7前导序列用引物ULC-m1F(SEQ ID NO:2)和ULC-m1R(SEQ ID NO:3)确认。重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1区的开放阅读框用引物1635-h2F(TCCAGGCACC CTGTCTTTG;SEQ ID NO:12)和1635-h2R(AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT;SEQ ID NO:13)确认。新霉素盒用引物neoF(SEQ ID NO:6)和neoR(SEQ ID NO:7)确认。然后,靶向的BAC DNA用于电穿孔小鼠ES细胞以创建修饰的ES细胞用于产生嵌合小鼠,其表达重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1区。

[0217] 通过TaqmanTM筛选和核型分析采用特异性针对插入内源性基因座的工程化V κ 3-20J κ 1轻链区的探针确认阳性ES细胞克隆。简而言之,探针neoP(SEQ ID NO:8)在新霉素标志物基因内结合,探针ULC-m1P(SEQ ID NO:9)在内含子序列3'至小鼠V κ 3-7前导序列内结合,以及探针1635h2P(AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG;SEQ ID NO:14)在重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1开放阅读框内结合。然后,阳性ES细胞克隆用于植入雌性小鼠。一窝幼鼠表达生殖系V κ 3-20J κ 1轻链区。

[0218] 替代地,携带重排的人生殖系V κ 3-20J κ 1轻链区的ES细胞用表达FLP的构建体转染以去除靶向构建体引入的FRTed新霉素盒。可选地,所述新霉素盒通过与表达FLP重组酶的小鼠交配而去除(例如,US 6,774,279)。可选地,所述新霉素盒保留于小鼠中。

[0219] 重排的人生殖系VpreBJ λ 5靶向载体(图3)。类似地,表达重排的人生殖系VpreBJ λ 5区的工程化轻链基因座采用靶向构建体制备,所述靶向构建体包括,从5'到3',含有获得自小鼠BAC克隆302g12的序列5'至内源性小鼠 κ 轻链基因座的5'同源臂、FRTed新霉素抗性基因,包括人V κ 3-15启动子的基因组序列、小鼠V κ 3-7可变基因片段的前导序列、小鼠V κ 3-7可变基因片段的内含子序列、重排的人生殖系VpreBJ λ 5区的开放阅读框、包含人J κ -C κ 内含子部分的基因组序列和获取自小鼠BAC克隆254m04的内源性小鼠J κ 5基因片段的序列3'的3'同源臂(图3,中间)。工程化的人VpreBJ λ 5基因座的序列如SEQ ID NO:15所示。

[0220] 重排的人生殖系VpreBJ λ 5区靶向插入BAC DNA采用位于重排的人生殖系VpreBJ λ 5轻链区内的序列的引物由聚合酶链式反应(PCR)确认。简而言之,内含子序列3'至小鼠V κ 3-7前导序列用引物ULC-m1F(SEQ ID NO:2)和ULC-m1R(SEQ ID NO:3)确认。重排的人生殖系VpreBJ λ 5区的开放阅读框用引物1616-h1F(TGTCCTCGGC CCTTGGA;SEQ ID NO:16)和1616-h1R(CCGATGTCAT GGTCGTTTCCT;SEQ ID NO:17)确认。新霉素盒用引物neoF(SEQ ID NO:6)和neoR(SEQ ID NO:7)确认。然后,靶向的BAC DNA用于电穿孔小鼠ES细胞以创建修饰的ES细胞用于产生嵌合小鼠,其表达重排的人生殖系VpreBJ λ 5区。

[0221] 通过Taqman™筛选和核型分析采用特异性针对插入内源性基因座的工程化VpreBJλ5轻链区的探针确认阳性ES细胞克隆。简而言之,探针neoP (SEQ ID NO:8) 在新霉素标志物基因内结合,探针ULC-m1P (SEQ ID NO:9) 在小鼠Vk3-7前导序列内结合,以及探针1616h1P (ACAATCCGCC TCACCTGCAC CCT;SEQ ID NO:18) 在重排的人生殖系VpreBJλ5开放阅读框内结合。然后,阳性ES细胞克隆用于植入雌性小鼠以生产一窝表达生殖系轻链区的幼鼠。

[0222] 替代地,携带重排的人生殖系VpreBJλ5轻链区的ES细胞用表达FLP的构建体转染以去除靶向构建体引入的FRTed新霉素盒。可选地,所述新霉素盒通过与表达FLP重组酶的小鼠交配而去除(例如,US 6,774,279)。可选地,所述新霉素盒保留于小鼠中。

[0223] 实施例3

[0224] 表达单一重排的人轻链的小鼠的产生

[0225] 上述靶ES细胞用作供体ES细胞并通过**VELOCIMOUSE®**方法引入8细胞期小鼠胚胎(参见例如,US Pat.No.7,294,754和Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech.25(1):91-99.)。独立地携带工程化的人生殖系Vk1-39Jk5轻链区、Vk3-20Jk1轻链区或VpreBJλ5轻链区的**VELOCIMICE®**采用等位基因修饰分析通过基因分型鉴定 (Valenzuela et al., 同前) 检测独特重排的人生殖系轻链区的存在。

[0226] 幼鼠被基因分型并且重排的人生殖系轻链区杂合或纯合的幼鼠被选择来表征重排的人生殖系轻链区的表达。

[0227] 流式细胞术。在正常抗体群的共同轻链小鼠中的重排的人轻链区的表达由共同轻链小鼠的脾细胞和外周血中免疫球蛋白κ和λ的表达来验证。采用标准方法制备来自野生型 (n=5)、Vk1-39Jk5共同轻链杂合子 (n=3)、Vk1-39Jk5共同轻链纯合子 (n=3)、Vk3-20Jk1共同轻链杂合子 (n=2) 和Vk3-20Jk1共同轻链纯合子 (n=2) 小鼠的收获的脾脏和外周血的细胞悬液并用CD19⁺、Igλ⁺和Igκ⁺采用荧光标记抗体染色 (BD Pharmigen)。

[0228] 简而言之,1x10⁶个细胞冰上与抗小鼠CD16/CD32(克隆2.4G2,BD Pharmigen)孵育10分钟,随后用以下抗体化合物冰上标记30分钟:APC缀合的抗小鼠CD19(克隆1D3,BD Pharmigen)、PerCP-Cy5.5缀合的抗小鼠CD3(克隆17A2,BioLegend)、FITC缀合的抗小鼠Igκ(克隆187.1,BD Pharmigen)、PE缀合的抗小鼠Igλ(克隆RML-42,BioLegend)。染色后,洗涤细胞并用2%甲醛固定。在LSRII流式仪上进行数据收集并用FlowJo分析。门(gating):总B细胞(CD19⁺CD3⁻)、Igκ⁺B细胞(Igκ⁺Igλ⁻CD19⁺CD3⁻)、Igλ⁺B细胞(Igκ⁻Igλ⁺CD19⁺CD3⁻)。从血和脾细胞样品收集的数据证实了相似的结果。表3列出了来自每组的一只代表性的小鼠外周血阳性CD19⁺B细胞的百分比,所述组:Igλ⁺、Igκ⁺、或Igλ⁺Igκ⁺。来自野生型(WT)和对于Vk1-39Jk5或Vk3-20Jk1共同轻链纯合的小鼠的外周血中CD19⁺B细胞的百分比如图4所示。

[0229] 表3

小鼠	CD19 ⁺ B 细胞		
	Igλ ⁺	Igκ ⁺	Igλ ⁺ Igκ ⁺
[0230] 野生型	4.8	93	0.53
Vκ1-39Jκ5	1.4	93	2.6
Vκ3-20Jκ1	4.2	88	6

[0231] 共同轻链表达。每个共同轻链 (Vκ1-39Jκ5和Vκ3-20Jκ1) 的表达采用定量PCR分析 (例如,TAQMAN™) 在杂合和纯合小鼠中进行分析。

[0232] 简而言之,采用小鼠CD19微珠 (Miltenyi Biotec) 根据制造商的说明将CD19⁺B细胞纯化自野生型、用相应的人重链和κ轻链可变区基因座替换小鼠重链和κ轻链可变区基因座 (Hκ) 纯合小鼠以及对每个重排的人轻链区 (Vκ1-39Jκ5或Vκ3-20Jκ1) 纯合和杂合小鼠。采用RNeasy Mini试剂盒 (Qiagen) 根据制造商的说明纯化CD19⁺B细胞的总RNA并且采用无RNase的DNase在柱处理 (RNase-free DNase on-column treatment) (Qiagen) 去除基因组RNA。采用First Stand cDNA Synthesis试剂盒 (Invitrogen) 将200ng mRNA逆转录成cDNA并且所得cDNA用Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 扩增。所有反应采用ABI 7900Sequence Detection System (Applied Biosystems) 采用引物进行并且Taqman MGB探针跨 (1) 共同轻链的Vκ-Jκ连接, (2) 单独Vκ基因 (即Vκ1-39和Vκ3-20), 以及 (3) 小鼠Cκ区。表4列出了该试验采用的引物和探针序列。相关表达相对小鼠Cκ的表达进行标准化。数据如图5A、5B和5C所示。

[0233] 表4

[0234]

区	引物/探针说明 (5'-3')	SEQ ID NOs:
Vκ1-39Jκ5 连接	(有义) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	19
	(反义) GTTTAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	20
	(探针) CCTCCGATCA CCTTC	21
Vκ1-39	(有义) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	22
	(反义) ATGGGACCCC ACTTTGCA	23
	(探针) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	24
Vκ3-20Jκ1 连接	(有义) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	25
	(反义) TGATTTCCAC CTTGGTCCCT T	26
	(探针) TAGCTCACCT TGGACGTT	27
Vκ3-20	(有义) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	28
	(反义) GACCCACTGC CACTGAACCT	29
	(探针) CCACTGGCAT CCC	30
小鼠 Cκ	(有义) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	31

[0235]

	(反义) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	32
	(探针) ACCAAGGACG AGTATGAA	33

[0236] 抗原特异性共同轻链抗体。于内源性小鼠 κ 轻链基因座携带V κ 1-39J κ 5或V κ 3-20J κ 1共同轻链的共同轻链小鼠用 β -半乳糖苷酶免疫并测定抗体滴度。

[0237] 简而言之, β -半乳糖苷酶(Sigma)根据制造商的说明在Titermax佐剂(Sigma)中乳化。野生型($n=7$)、V κ 1-39J κ 5共同轻链纯合子($n=2$)和V κ 3-20J κ 1共同轻链纯合子($n=5$)通过皮下注射100 μ g β -半乳糖苷酶/Titermax免疫。小鼠用50 μ g β -半乳糖苷酶/Titermax皮下注射加强两次,隔3个星期。第二次加强之后,根据制造商的说明,采用燕窝后取血到血清分离管(BD Biosciences),收集处死小鼠的血液。为了检测抗 β -半乳糖苷酶IgM或IgG抗体,ELISA板(Nunc)用1 μ g/mL β -半乳糖苷酶4 $^{\circ}$ C包覆过夜。在用含有1%BSA的PBS于室温封闭一小时之前洗掉过量的抗原。血清的连续稀释液加入到该板并在洗涤之前室温孵育一小时。然后板用HRP缀合抗IgM(Southern Biotech)或抗IgG(Southern Biotech)室温孵育一小时。再一次洗涤之后,板用TMB底物(BD Biosciences)显影。反应用1N硫酸终止并用Victor X5Plate Reader(Perkin Elmer)读取OD₄₅₀。数据用GraphPad Prism分析并且信号计算为高于背景两倍的血清稀释度。结果如图6A和6B所示。

[0238] 如本实施例所示,V κ 1-39J κ 5和V κ 3-20J κ 1共同轻链小鼠的脾脏和外周部分中的 κ / λ B细胞的比表现出接近野生型模式(表3和图4)。但是,VpreBJ λ 5共同轻链小鼠表现出更少的外周B细胞,其中大约1-2%表达工程化的人轻链区(数据未显示)。来自内源性 κ 轻链基因座的V κ 1-39J κ 5和V κ 3-20J κ 1重排的人轻链区的表达水平与包含的小鼠V κ 和J κ 基因片段完全用人V κ 和J κ 基因片段替换的内源性 κ 轻链基因座相比被提升(图5A、5B和5C)。VpreBJ λ 5重排的人轻链区的表达水平在杂合和纯合小鼠中均证实相似高表达内源性 κ 轻链基因座(数据未显示)。这证实直接与小鼠 λ 、 κ 或两个内源性轻链基因座竞争,单一重排的人V κ /J κ 序列可以获得比野生型内源性 κ 轻链基因座更好的表达水平并提升至正常脾细胞和血液B细胞频率。此外,具有人V κ 1-39J κ 5或人V κ 3-20J κ 1序列的工程化内源性 κ 轻链基因座的存在被小鼠很好地耐受并且通过代表免疫反应的体液成分中轻链群的主要部分以野生型的形式起作用(图6A和6B)。

[0239] 实施例4

[0240] 培育表达单一重排的人生殖系轻链的小鼠

[0241] 该实施例描述几个其它遗传修饰的小鼠品系,其可以与本发明所述的任何一个共同轻链小鼠交配以产生携带多遗传修饰的免疫球蛋白基因座的多遗传修饰的小鼠品系。

[0242] 内源性Ig λ 敲除(knockout,KO)。为了优化工程化轻链基因座的使用,携带一个重排的人生殖系轻链区的小鼠与含有内源性 λ 轻链基因座的缺失的另一只小鼠交配。以这种方式,获得的子代将表达如实施例2中所述的重排的人生殖系轻链区作为它们唯一的轻链。交配是以本领域已知的标准技术进行并且,替代地,通过商业育种器(例如Jackson Laboratory)。筛选携带工程化轻链基因座和缺失内源性 λ 轻链基因座的小鼠存在独特轻链区和不存在内源性小鼠 λ 轻链。

[0243] 人源化内源性重链基因座。携带工程化人生殖系轻链基因座的小鼠与含有人重链可变基因座替换内源性小鼠重链可变基因座的小鼠交配(参见US 6,596,541;

VELOCIMMUNE®小鼠, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)。 **VELOCIMMUNE®**小鼠包括包含人重链可变区可操作连接内源性小鼠恒定区基因座的基因组, 使得小鼠响应抗原刺激生产包括人重链可变区和小鼠重链恒定区的抗体。分离编码所述抗体的重链可变区的DNA并可操作连接至编码人重链恒定区的DNA。然后, 所述DNA表达于能够表达全长人重链的抗体的细胞。

[0244] 获得携带用人V_H基因座替换内源性小鼠V_H基因座并在内源性κ轻链基因座携带单一的重排人生殖系V_L区的小鼠。以感兴趣的抗原免疫获得含有体细胞突变的重链(人V_H和小鼠C_H)带有单一人轻链(人V_L和小鼠C_L)的反向嵌合抗体。表达抗体的B细胞的V_H和V_L核苷酸序列被鉴定并且通过融合V_H和V_L核苷酸序列至人C_H和C_L核苷酸序列于合适的表达系统中制备全人抗体。

[0245] 实施例5

[0246] 来自表达人重链和重排的人生殖系轻链区的小鼠的抗体的产生

[0247] 将含有工程化人轻链区的小鼠与各种期望的含有其它内源性Ig基因座的修饰和缺失的品系交配后(如实施例4中所述), 所选择的小鼠可以用感兴趣的抗原免疫。

[0248] 通常, 含有一个单一重排的人生殖系轻链区的**VELOCIMMUNE®**小鼠用抗原刺激, 并且从动物的血清回收淋巴细胞(如B细胞)。淋巴细胞用骨髓瘤细胞系融合, 制备永生的杂交瘤细胞系, 并筛选这种杂交瘤细胞系并选择鉴定生产抗体的杂交瘤细胞系, 所述抗体含有人重链可变和重排的人生殖系轻链, 其对用于免疫的抗原具有特异性。分离编码重链和轻链的可变区的DNA并连接期望的重链和轻链的同种型恒定区。由于内源性小鼠序列和存在于内源基因座的任何额外的顺式作用元件的存在, 每个抗体的单一轻链可以是体细胞突变的。这给包括单一轻链和多样重链序列的抗原特异性群加入了额外的多样性。所得到的克隆抗体序列随后表达于细胞, 如CHO细胞。替代地, 编码抗原特异性抗体或轻链和重链的可变区的DNA是直接来自抗原特异性淋巴细胞鉴定的。

[0249] 最初, 高亲和力的嵌合抗体是分离的, 具有人可变区和小鼠恒定区。如上所述, 所述抗体被表征并选择期望的性质, 包括亲和力、选择性、表位等。小鼠恒定区被期望的人恒定区替换以产生源自本发明的重排的人生殖系轻链区的含有体细胞突变的人重链和单一轻链的全人抗体。合适的人恒定区包括, 例如野生型或修饰的IgG1或IgG4。

[0250] 含有人V_H、D_H和J_H基因片段替换内源性小鼠重链基因座和用工程化生殖系V_κ1-39J_κ5人轻链区或工程化生殖系V_κ3-20J_κ1人轻链区替换内源性小鼠κ轻链基因座的**VELOCIMMUNE®**小鼠的单独群组(如上所述)用人细胞表面受体蛋白(抗原E)免疫。抗原E每3-4天以六次连续注射直接施用至小鼠的后肢足垫。在注射前, 两到三微克的抗原E与10μg的CpG寡核苷酸(Cat#tlrl-modn-ODN1826寡核苷酸; InVivogen, San Diego, CA)和25μg的Adju-Phos(磷酸铝凝胶佐剂, Cat#H-71639-250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark)混合。在最终抗原回忆之前给予总共六次注射, 处死之前3-5天给予。收集第4次和第6次注射后的采血并且通过标准化抗原特异性免疫分析监控抗体免疫反应。

[0251] 当获得期望的免疫反应时, 收获脾细胞并与小鼠骨髓瘤细胞融合以保存它们的活力并形成杂交瘤细胞系。筛选所述杂交瘤细胞系并选择鉴定生产抗原E特异性共同轻链抗体的细胞系。采用该技术, 获得了几种抗抗原E特异性共同轻链抗体(即具有人重链可变区、

相同的人轻链可变区和小鼠恒定区的抗体)。

[0252] 替代地,抗抗原E共同轻链抗体直接从抗原阳性B细胞分离而不用融合至骨髓瘤细胞,如U.S.2007/0280945A1所述。采用该方法,获得了几种全人抗抗原E共同轻链抗体(即具有人重链可变区、工程化人V_K1-39J_K5轻链区或工程化人V_K3-20J_K1轻链区和人恒定区的抗体)。

[0253] 按照本实施例的方法产生的示例性抗抗原E共同轻链抗体的生物学性质在下面的章节中进行了详细描述。

[0254] 实施例6

[0255] 抗原特异性共同轻链抗体中重链基因片段使用

[0256] 为了分析所生产的人抗抗原E共同轻链抗体的结构,编码重链抗体可变区的核酸被克隆并测序。从抗体的核酸序列和预测的氨基酸序列,鉴定了对选定的共同轻链抗体的重链可变区(HCVR)的基因使用,所述抗体获取自免疫的含有工程化人V_K1-39J_K5轻链或工程化人V_K3-20J_K1轻链区的**VELOCIMMUNE®**小鼠。结果如表5和6所示,由于各种重排,当采用表达来自仅人V_K1-39-或人V_K3-20-来源的轻链的小鼠时,所示结果证实根据本发明的小鼠产生来自多种人重链基因片段的抗原特异性共同轻链抗体。2、3、4和5家族的人V_H基因片段与多种人D_H片段和人J_H片段重排以获得抗原特异性抗体。

[0257] 表5

Vk1-39Jk5
共同轻链抗体

[0258]

抗体	HCVR			抗体	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
2952	2-5	6-6	1	6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1	6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1	2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5	2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4	3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4	3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4	5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4	6002	3-30	6-13	4
6011	3-23	7-27	4	6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4	6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4	6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4	6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4	6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4	6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4	6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4	6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4	6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4	2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4	2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5	2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5	3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5	3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2	3020	3-30	7-27	4
3013	3-30	5-12	4	3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4	3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1	3030	3-30	7-27	4
3043	3-30	6-6	3	3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4	5997	3-30	7-27	4
2949	3-30	6-6	5	6033	3-30	7-27	4

[0259]

2950	3-30	6-6	5	3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5	6028	3-30	7-27	6
2978	3-30	6-6	5	3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5	3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5	6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5	6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5	6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5	6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5	6037	4-59	3-16	3
6004	3-30	6-6	5	2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5	3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5	3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5	6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5	6006	1-69	6-6	5
6023	3-30	6-6	5	6008	1-69	6-13	4

[0260] 表6

V_K3-20J_K1
共同轻链抗体

[0261]

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

[0262] 实施例7

[0263] 通过LUMINEX™分析对抗原特异性共同轻链抗体的阻断能力的确定

[0264] 在基于珠的分析中检测所得到的抗抗原E的98个人共同轻链抗体阻断抗原E的天然配体(配体Y)对抗原E的结合的能力。

[0265] 抗原E的胞外结构域(ECD)在浓度20μg/mL的MES缓冲液中连接至两个myc表位标签和6X组氨酸标签(抗原E-mmH)并且胺偶联到羧基化微球。混合物室温孵育两个小时,随后用1M Tris pH 8.0珠灭活,然后用含0.05% (v/v)吐温20的PBS洗涤。然后珠用含有2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) 的PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 封

闭。在96孔过滤板中,含有抗原E特异性共同轻链抗体的上清在缓冲液中1:15稀释。制备与对于抗体上清而言具有相同介质成分的含有Mock上清的阴性对照。抗原E标记的珠加入到上清中,4℃孵育过夜。加入生物素化的配体Y蛋白至终浓度0.06nM并室温孵育两小时。用缀合于链霉素的R-藻红蛋白(Moss Inc,Pasadena,MD)确定生物素化配体Y结合抗原E-myc-myc-6His标记的珠的检测,然后在LUMINEX™流式细胞术分析仪中测量。从所有样品中减去没有配体Y的样品的背景平均荧光强度(Mean Fluorescence Intensity,MFI)。阻断百分比通过每个样品的减去背景的MFI除以调整后的阴性对照值计算,乘以100并从100减去所得的值。

[0266] 在相似的实验中,检测所得到的抗抗原E的相同的98个人共同轻链抗体的阻断抗原E对配体Y标记的珠的结合的能力。

[0267] 简而言之,配体Y以稀释于MES缓冲液中的浓度20μg/mL胺偶联到羧基化微球。混合物室温孵育两个小时,随后用1M Tris pH 8.0珠灭活,然后用含0.05% (v/v) 吐温20的PBS洗涤。然后珠用含有2% (w/v) BSA(Sigma-Aldrich Corp.,St.Louis,MO)的PBS(Irvine Scientific,Santa Ana,CA)封闭。在96孔过滤板中,含有抗原E特异性共同轻链抗体的上清在缓冲液中1:15稀释。制备与对于抗体上清而言具有相同介质成分的含有Mock上清的阴性对照。加入生物素化的抗原E-mmH至终浓度0.42nM并4℃孵育过夜。然后配体Y标记的珠加入到抗体/抗原E混合物并室温孵育两小时。用缀合链霉素的R-藻红蛋白(Moss Inc,Pasadena,MD)确定生物素化抗原E-mmH结合配体Y珠的检测,然后在基于LUMINEX™流式细胞术分析仪中测量。从所有样品中减去没有抗原E的样品的背景平均荧光强度(MFI)。阻断百分比通过每个样品的减去背景的MFI除以调整后的阴性对照值计算,乘以100并从100减去所得的值。

[0268] 表7和8显示对所测试的所有98个抗抗原E共同轻链抗体在两个LUMINEX™分析中的阻断百分比。ND:在当前实验条件下未检测到。

[0269] 表7

Vk1-39Jk5
共同轻链抗体

[0270]

抗体	抗原 E 标记的珠的阻断%	溶液中抗原 E 的阻断%
2948	81.1	47.8
2948G	38.6	ND
2949	97.6	78.8
2949G	97.1	73.7
2950	96.2	81.9
2950G	89.8	31.4
2952	96.1	74.3
2952G	93.5	39.9
2954	93.7	70.1
2954G	91.7	30.1
2955	75.8	30.0
2955G	71.8	ND
2964	92.1	31.4
2964G	94.6	43.0
2978	98.0	95.1
2978G	13.9	94.1
2982	92.8	78.5
2982G	41.9	52.4
2985	39.5	31.2
2985G	2.0	5.0
2987	81.7	67.8
2987G	26.6	29.3
2996	87.3	55.3
2996G	95.9	38.4

[0271]

2997	93.4	70.6
2997G	9.7	7.5
3004	79.0	48.4
3004G	60.3	40.7
3005	97.4	93.5
3005G	77.5	75.6
3010	98.0	82.6
3010G	97.9	81.0
3011	87.4	42.8
3011G	83.5	41.7
3012	91.0	60.8
3012G	52.4	16.8
3013	80.3	65.8
3013G	17.5	15.4
3014	63.4	20.7
3014G	74.4	28.5
3015	89.1	55.7
3015G	58.8	17.3
3016	97.1	81.6
3016G	93.1	66.4
3017	94.8	70.2
3017G	87.9	40.8
3018	85.4	54.0
3018G	26.1	12.7
3019	99.3	92.4
3019G	99.3	88.1
3020	96.7	90.3
3020G	85.2	41.5
3021	74.5	26.1
3021G	81.1	27.4
3022	65.2	17.6
3022G	67.2	9.1
3023	71.4	28.5
3023G	73.8	29.7
3024	73.9	32.6
3024G	89.0	10.0
3025	70.7	15.6
3025G	76.7	24.3
3027	96.2	61.6

[0272]

3027G	98.6	75.3
3028	92.4	29.0
3028G	87.3	28.8
3030	6.0	10.6
3030G	41.3	14.2
3032	76.5	31.4
3032G	17.7	11.0
3033	98.2	86.1
3033G	93.6	64.0
3036	74.7	32.7
3036G	90.1	51.2
3041	95.3	75.9
3041G	92.4	51.6
3042	88.1	73.3
3042G	60.9	25.2
3043	90.8	65.8
3043G	92.8	60.3

[0273]

表8

Vκ3-20Jκ1
共同轻链抗体

[0274]

抗体	抗原 E 标记的珠的阻断%	溶液中抗原 E 的阻断%
2968	97.1	73.3
2968G	67.1	14.6
2969	51.7	20.3
2969G	37.2	16.5
2970	92.2	34.2
2970G	92.7	27.2
2971	23.4	11.6
2971G	18.8	18.9
2972	67.1	38.8
2972G	64.5	39.2
2973	77.7	27.0
2973G	51.1	20.7
2974	57.8	12.4
2974G	69.9	17.6
2975	49.4	18.2

[0275]	2975G	32.0	19.5
	2976	1.0	1.0
	2976G	50.4	20.4

[0276] 在上述第一个LUMINEX™实验中,检测了包含Vκ1-39Jκ5工程化轻链的80个共同轻链抗体的阻断配体Y结合抗原E标记的珠的能力。这80个共同轻链抗体中,68个表现出>50%阻断,而12个表现出<50%阻断(6个处于25-50%阻断并且6个处于<25%阻断)。对于含有Vκ3-20Jκ1工程化轻链的18个共同轻链抗体,12个表现出>50%阻断而6个表现出<50%阻断(3个处于25-50%阻断并且3个处于<25%阻断)配体Y结合抗原E标记的珠。

[0277] 在上述第二个LUMINEX™实验中,检测了包含Vκ1-39Jκ5工程化轻链的相同的80个共同轻链抗体的阻断抗原E对配体Y标记的珠的结合的能力。这80个共同轻链抗体中,36个表现出>50%阻断,而44个表现出<50%阻断(27个处于25-50%阻断并且17个处于<25%阻断)。对于含有Vκ3-20Jκ1工程化轻链的18个共同轻链抗体,1个表现出>50%阻断而17个表现出<50%阻断(5个处于25-50%阻断并且12个处于<25%阻断)抗原E结合配体Y标记的珠。

[0278] 表7和表8的数据证明表5和6中所述的重排产生的抗抗原E特异性共同轻链抗体阻断配体Y对其关联受体抗原E的结合具有不同程度的功效,其与包括相对抗原E具有重叠和非重叠表位特异性的表5和6的抗抗原E共同轻链抗体一致。

[0279] 实施例8

[0280] 通过ELISA对抗原特异性共同轻链抗体的阻断能力的确定

[0281] 在ELISA分析中检测所得到的抗抗原E的人共同轻链抗体的阻断抗原E结合配体Y包覆的表面的能力。

[0282] 配体Y以稀释于PBS的2μg/mL的浓度包覆96孔板并孵育过夜,随后用含0.05%吐温20的PBS洗涤四次。然后,板用含有0.5% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) 的PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) 室温封闭一小时。在一个单独的板中,含有抗抗原E共同轻链抗体的上清在缓冲液中1:10稀释。具有相同抗体成分的Mock上清用作阴性对照。加入抗原E-mmH(上述)至终浓度0.150nM并室温孵育一小时。然后,抗体/抗原E-mmH混合物加到含有配体Y的板中并室温孵育一小时。用缀合抗Penta-His抗体的辣根过氧化物酶(HRP) (Qiagen, Valencia, CA) 确定抗原E-mmH结合配体Y的检测并采用四甲基联苯胺(TMB)底物(BD Biosciences, San Jose, CA)用标准的生色反应显影并由硫酸中和。吸光度在OD450读取0.1秒。从所有样品中减去没有抗原E的样品的背景吸光度。阻断百分比通过每个样品的减去背景的背景MFI除以调整后的阴性对照值计算,乘以100并从100减去所得的值。

[0283] 表9和10显示所测试的所有98个抗抗原E共同轻链抗体在ELISA分析中的阻断百分比。ND:在当前实验条件下未检测到。

[0284] 表9

Vk1-39Jk5
共同轻链抗体

[0285]

抗体	溶液中抗原 E 的阻 断%	抗体	溶液中抗原 E 的阻 断%
2948	21.8	3015	23.7
2948G	22.9	3015G	10.2
2949	79.5	3016	78.1
2949G	71.5	3016G	37.4
2950	80.4	3017	61.6
2950G	30.9	3017G	25.2
2952	66.9	3018	40.6
2952G	47.3	3018G	14.5
2954	55.9	3019	94.6
2954G	44.7	3019G	92.3
2955	12.1	3020	80.8
2955G	25.6	3020G	ND
2964	34.8	3021	7.6
2964G	47.7	3021G	20.7

[0286]

2978	90.0	3022	2.4
2978G	90.2	3022G	15.0
2982	59.0	3023	9.1
2982G	20.4	3023G	19.2
2985	10.5	3024	7.5
2985G	ND	3024G	15.2
2987	31.4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13.9
2996	29.3	3027	61.4
2996G	ND	3027G	82.7
2997	48.7	3028	40.3
2997G	ND	3028G	12.3
3004	16.7	3030	ND
3004G	3.5	3030G	9.5
3005	87.2	3032	ND
3005G	54.3	3032G	13.1
3010	74.5	3033	77.1
3010G	84.6	3033G	32.9
3011	19.4	3036	17.6
3011G	ND	3036G	24.6
3012	45.0	3041	59.3
3012G	12.6	3041G	30.7
3013	39.0	3042	39.9
3013G	9.6	3042G	16.1
3014	5.2	3043	57.4
3014G	17.1	3043G	46.1

[0287] 表10

Vk3-20Jk1
共同轻链抗体

	抗体	溶液中抗原 E 的阻断%	抗体	溶液中抗原 E 的阻断%
[0288]	2968	68.9	2972G	35.7
	2968G	15.2	2973	20.7
	2969	10.1	2973G	23.1
	2969G	23.6	2974	ND
	2970	34.3	2974G	22.0
	2970G	41.3	2975	8.7
[0289]	2971	6.3	2975G	19.2
	2971G	27.1	2976	4.6
	2972	9.6	2976G	26.7

[0290] 如该实施例所述,检测了包含Vk1-39Jk5工程化轻链的80个共同轻链抗体的阻断抗原E结合配体Y包覆的表面的能力,22个表现出>50%阻断,而58个表现出<50%阻断(20个处于25-50%阻断并且38个处于<25%阻断)。对于含有Vk3-20Jk1工程化轻链的18个共同轻链抗体,一个表现出>50%阻断而17个表现出<50%阻断(5个处于25-50%阻断并且12个处于<25%阻断)抗原E结合配体Y包覆的表面。

[0291] 这些结果还仍是与包括相对抗原E具有重叠或非重叠表位特异性的抗原E特异性共同轻链抗体池相一致。

[0292] 实施例9

[0293] 抗原特异性共同轻链抗体的BIAcore™亲和力的确定

[0294] 所选抗体上清的平衡解离常数(K_D)通过SPR(表面等离子体共振)采用BIAcore™T100仪器(GE Healthcare)确定。所有数据采用HBS-EP(10mM Hepes,150mM NaCl,0.3mM EDTA,0.05%Surfactant P20,pH 7.4)作为运行缓冲液和样品缓冲液于25℃获得。在CM5传感器芯片表面从粗上清样品捕获抗体,所述表面先前采用标准按偶联化学用高密度抗人Fc抗体衍生化。在捕获过程中,上清以流速3μL/min注射通过抗人Fc表面总共3分钟。捕获步骤之后接着运行缓冲液或分析物以100nM浓度流速35μL/min注射2分钟。监测抗原从所捕获的抗体的解离6分钟。通过简单注射10mM甘氨酸,pH 1.5,去除所捕获的抗体。所有传感图通过从分析物传感图减去来自缓冲液注射的传感图进行双重参考,从而去除由抗体从捕获表面的解离导致的伪像(artifact)。每个抗体的结合数据通过BIAcore T100评估软件v2.1拟合至1:1传质结合模型。结果如表11和12所示。

[0295] 表11

Vκ1-39Jκ5
共同轻链抗体

[0296]

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

[0297]	3011G	41.7	5	3036G	18.2	10
	3012	9.71	20	3041	6.90	12
	3012G	89.9	2	3041G	22.9	2
	3013	20.2	20	3042	9.46	34
	3013G	13.2	4	3042G	85.5	3
	3014	213	4	3043	9.26	29
	3014G	36.8	3	3043G	13.1	22

[0298] 表12

Vk3-20Jk1
共同轻链抗体

[0299]

抗体	100 nM 抗原 E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2968	5.50	8
2968G	305	0
2969	34.9	2
2969G	181	1
2970G	12.3	3
2971G	32.8	22
2972	6.02	13
2972G	74.6	26

抗体	100 nM 抗原 E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (min)
2973	5.35	39
2973G	11.0	44
2974	256	0
2974G	138	0
2975	38.0	2
2975G	134	1
2976	6.73	10
2976G	656	8

[0300] 包括表5和6所示的重排的共同轻链抗体的结合亲和力存在差异,几乎全部显示出处于纳摩尔范围的K_D。亲和力数据与表5和6所示的由重排的可变区的组合结合得到的共同轻链抗体是一致的,所述共同轻链抗体是高亲和力、克隆选择的和体细胞突变的。结合之前显示的数据,表5和6中所述的重排的共同轻链抗体包括一批各种各样、高亲和力抗体,其显示对抗原E上的一个或多个表位的特异性。

[0301] 实施例10

[0302] 通过LUMINEX™分析对抗原特异性共同轻链抗体的结合特异性的确定

[0303] 检测选定的抗抗原E共同轻链抗体结合抗原E的ECD和抗原EECD变体的能力,包括食蟹猴同源物(Mf抗原E),其与人蛋白大约相差10%的氨基酸残基;缺乏ECD的C-末端最后10个氨基酸的抗原E的缺失突变体(抗原E-ΔCT);以及在与配体Y相互作用的疑似位置的含有丙氨酸取代的两个突变体(抗原E-Ala1和抗原E-Ala2)。所述抗原E蛋白在CHO细胞中产生并且每个含有myc-myc-His C-末端标签。

[0304] 对于结合研究,来自1mL培养基的抗原E ECD蛋白或变体蛋白(上述)通过与1x10⁶微球(LUMINEX™)珠室温孵育2小时捕获,所述珠共价包覆有抗myc单克隆抗体(MAb 9E10,杂交瘤细胞系CRL-1729™;ATCC,Manassas,VA)。然后,珠在使用前用PBS洗涤。含有抗抗原E共同轻链抗体的上清在缓冲液中1:4稀释并加入96孔过滤板。没有抗体的Mock上清用作阴性

对照。然后,含有捕获的抗原E蛋白的珠加到抗体样品(每孔3000珠)并4℃孵育过夜。下一日,洗涤样品珠并且结合的共同轻链抗体用缀合R-藻红蛋白的抗人IgG抗体检测。用LUMINEX™流式细胞术分析仪测定珠的荧光强度(对于结合每个抗原E蛋白的每个抗体样品计数大约100个珠),并且记录每珠/抗体相互作用至少100个计数珠的中位荧光强度(median fluorescence intensity,MFI)。结果如表13和14所示。

[0305] 表13

Vk1-39Jk5 共同轻链抗体					
平均荧光强度 (MFI)					
抗体	抗原 E-ECD	抗原 E-ΔCT	抗原 E-Ala1	抗原 E-Ala2	Mf 抗原 E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244

[0306]

[0307]

2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293

[0308]

3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

[0309] 表14

[0310]

Vk3-20Jκ1 共同轻链抗体					
抗体	平均荧光强度 (MFI)				
	抗原 E-ECD	抗原 E-ΔCT	抗原 E-Ala1	抗原 E-Ala2	Mf 抗原 E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

[0311] 抗抗原E共同轻链抗体上清显示对连接于抗原E-ECD的珠的高特异性结合。对这些珠,阴性对照Mock上清与抗原E-ECD珠样品结合时造成微弱的信号(<10MFI),而含有抗抗原E共同轻链抗体的上清显示强结合信号(对于98个抗体上清,平均MFI为2627;对于98个抗体样品中的91个,MFI>500)。

[0312] 作为所选的抗抗原E共同轻链抗体鉴定抗原E的ECD上不同表位的能力的量度,测定抗体对变体的相对结合。所有四个抗原E变体被捕获到如上所述的一抗myc LUMINEX™珠用于天然抗原E-ECD结合研究,并且测定了相对结合比($MFI_{\text{变体}}/MFI_{\text{抗原E-ECD}}$)。对于表12和13所示的98个所测共同轻链抗体上清,平均比($MFI_{\text{变体}}/MFI_{\text{抗原E-ECD}}$)对于每个变体都不同,可能反映了珠上蛋白的不同的捕获量(抗原E-ΔCT、抗原E-Ala1、抗原E-Ala2和Mf抗原E平均比分别为0.61、2.9、2.0以及1.0)。对于每个蛋白变体,98个所测的共同轻链抗体的子集的结合显示大大减小的结合,意味着对所表征的给定变体的突变的敏感性。例如,19个共同轻链抗体样品结合Mf抗原E的 $MFI_{\text{变体}}/MFI_{\text{抗原E-ECD}} < 8\%$ 。由于该组中的许多包括高或适度高亲和力的抗体(5个 $K_D < 5nM$, 15个 $K_D < 50nM$),可能该组较低的信号是对于天然抗原E-ECD和给定的变体之间序列(表位)差异敏感的结果而不是较低亲和力的结果。

[0313] 这些数据证明表5和6所述的共同轻链抗体代表了多种组的抗原E特异性共同轻链

抗体,其特异性识别抗原E上多于一个表位。

[0314] 实施例11

[0315] 共同轻链抗体中的轻链改组

[0316] 选定抗原特异性共同轻链抗体的重链被测试其在用生殖系V_κ1-39J_κ5或生殖系V_κ3-20J_κ1工程化轻链(如实施例1中所述)修复重链之后结合抗原E的情况。

[0317] 简而言之,抗原E特异性共同轻链抗体(V_κ1-39J_κ5和V_κ3-20J_κ1)的247个重链用生殖系V_κ1-39或生殖系V_κ3-20工程化轻链转染并通过LUMINEX™分析(如实施例7和实施例10中所述)重新筛选结合抗原E。结合抗原E通过BIAcore™确认(如实施例9中所述)。结果如表15所示。

[0318] 如本实施例所示,当用生殖系形式的轻链修复时,对抗原E特异性的28个共同轻链抗体能够结合抗原E。

[0319] 表15

[0320]	原始轻链	修复的轻链	所测数目	确认结合物的数目
	1-39	1-39	198	23
	3-20	3-20	49	5

[0321] 实施例12

[0322] 共同轻链抗体中重链基因使用和体细胞超变频率

[0323] 以通过多抗原免疫方案、采用工程化轻链小鼠(上述)获得的共同轻链抗体的重链和轻链序列对**VELCOIMMUNE®**小鼠(例如,US 6,596,541和US 7,105,348)所产生的抗体的重链和轻链序列(>6000)进行了编译以比较抗体链的重链基因片段使用和体细胞超变频率。

[0324] 重链基因使用。对获取自**VELCOIMMUNE®**小鼠的重链和轻链序列进行重链基因片段使用分析,并记录V_H和J_H基因片段,所述小鼠包含用人V_H、D_H和J_H基因片段替换内源性小鼠重链基因座以及用工程化生殖系V_κ1-39J_κ5人轻链区或工程化生殖系V_κ3-20J_κ1人轻链区(如实施例2中所述)替换内源性小鼠κ轻链基因座,并且所述小鼠用人细胞表面受体(抗原E)、两种人细胞表面糖蛋白的异源二聚体(抗原F)、人细胞因子受体(抗原G)和人肿瘤分化抗原(抗原H)进行免疫。结果如表16-18所示。表16-18中的百分比代表舍入值,在某些情况下当其相加在一起时可能不等于100%。

[0325] 表16列出了来自**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体(VI)、来自具有关联V_κ1-39轻链**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体(VI-V_κ1-39)、来自V_κ1-39工程化轻链小鼠的抗体(V_κ1-39)、来自具有关联V_κ3-20轻链的**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体(VI-V_κ3-20)以及来自V_κ3-20工程化轻链小鼠的抗体(V_κ3-20)的重链家族使用百分比。表17列出了来自**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体(VI)、来自具有关联V_κ1-39轻链**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体(VI-V_κ1-39)、来自V_κ1-39工程化轻链小鼠的抗体(V_κ1-39)、来自具有关联V_κ3-20轻链的**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体(VI-V_κ3-20)以及来自V_κ3-20工程化轻链小鼠的抗体(V_κ3-20)的V_H和J_H基因使用百分比。表18列出了来自每个免疫组(抗原E、F、G和H)的V_κ1-39工程化轻链小鼠(V_κ1-39小鼠)的抗体的V_H基因使用

百分比以及来自选定免疫组 (抗原E和G) 的V κ 3-20工程化轻链小鼠 (V κ 3-20小鼠) 的抗体的V H 基因使用百分比。

[0326] 如该实施例所述,对于V κ 1-39J κ 5工程化轻链小鼠中所测抗原的重链基因使用被表征为在V H 家族III亚群 (V H 3-7、V H 3-9、V H 3-11、V H 3-13、V H 3-20、V H 3-23、V H 3-30、V H 3-33和V H 3-48) 的优势。其它V H 家族亚群的显著使用表征为V H 1-18、V H 1-69、V H 2-5、V H 3-59和V H 6-1的使用。对于在V κ 3-20J κ 1工程化轻链小鼠中所测抗原,重链基因使用表征为V H 家族III、V H 家族IV和V H 家族V亚群 (V H 3-11、V H 3-30、V H 3-33、V H 4-39、V H 4-59和V H 5-51) 的优势。其它V H 家族亚群的显著使用表征为V H 1-18、V H 1-69、V H 2-70和V H 6-1的使用。

[0327] 体细胞超变频率。

[0328] 根据对每个重链和/或轻链所显示的重链和轻链基因使用,将**VELCOIMMUNE®**小鼠和工程化轻链小鼠 (上述) 所产生的抗体的重链和轻链与生殖系序列比对。计算每个序列的重链和轻链的每个框架区 (FW) 和互补决定区 (CDR) 的氨基酸改变。结果如表19-22所示。表21-24中的百分比代表舍入值,在某些情况下当其相加在一起时可能不等于100%。

[0329] 表19列出了在来自**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体的重链、来自V κ 1-39工程化轻链小鼠 (V κ 1-39小鼠) 的抗体的重链和来自V κ 3-20工程化轻链小鼠 (V κ 3-20小鼠) 的抗体的重链的每个FW和CDR区中观察到的氨基酸 (AA) 改变的数目。表20列出了来自**VELCOIMMUNE®**小鼠的抗体的轻链、来自V κ 1-39工程化轻链小鼠 (V κ 1-39小鼠) 的抗体的轻链和来自V κ 3-20工程化轻链小鼠 (V κ 3-20小鼠) 的抗体的轻链的每个FW和CDR区中观察到的氨基酸 (AA) 改变的数目。表21列出了对于选定的免疫组 (抗原E、F和H) 来自V κ 1-39工程化轻链小鼠 (V κ 1-39小鼠) 的抗体的重链的每个FW和CDR区中观察到的氨基酸 (AA) 改变的数目。表22列出了对于选定的免疫组 (抗原E和G) 来自V κ 3-20工程化轻链小鼠 (V κ 3-20小鼠) 的抗体的重链的每个FW和CDR区中观察到的氨基酸 (AA) 改变的数目。

[0330] 表16

	V H 家族	VI	VI - V κ 1-39	V κ 1-39	VI - V κ 3-20	V κ 3-20
[0331]	1	9.0	14.8	3.3	7.1	4.9
	2	2.2	1.8	4.6	0	1.6
	3	77.8	69.8	77.3	61.4	29.5
	4	8.4	8.3	11.2	27.1	39.3
	5	0.9	0	0.7	4.3	23.0
	6	1.7	5.3	3.0	0	1.6

[0332] 表17

[0333]

V _H 基因	VI	VI – V _K 1-39	V _K 1-39	VI – V _K 3-20	V _K 3-20
1-2	3.9	8.3	0	2.9	0
1-3	0	0	0	0	0
1-8	1.3	0.6	0	1.4	0
1-18	3.0	0.6	1.3	2.1	1.6
1-24	0.4	3.6	0	0.7	0
1-46	0.1	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0
1-69	0.3	1.8	2.0	0	3.3
2-5	1.9	0	4.6	0	0
2-26	0.2	1.8	0.0	0	0
2-70	0.1	0	0	0	1.6
3-7	3.0	14.8	0	1.4	0
3-9	8.5	3.6	29.6	16.4	0
3-11	5.4	10.7	0	7.1	1.6
3-13	3.2	1.8	0.7	2.1	0
3-15	4.0	4.7	0.3	0.7	0
3-20	1.0	0.6	0.3	5.0	0

[0334]

3-21	0.8	0.6	0	2.1	0
3-23	20.4	8.9	3.3	8.6	0
3-30	17.6	4.1	35.2	12.9	1.6
3-33	12.6	14.8	0	5.0	26.2
3-43	0.2	0.6	0	0	0
3-48	0.8	1.2	7.2	0	0
3-53	0.3	3.6	0.3	0	0
3-64	0	0	0.3	0	0
3-72	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0
4-31	2.7	0	0.7	8.6	0
4-34	1.8	0.6	0.3	14.3	0
4-39	1.6	0.6	3.0	2.1	14.8
4-59	2.3	7.1	7.2	2.1	24.6
5-51	0.9	0	0.7	4.3	23.0
6-1	1.7	5.3	3.0	0	1.6

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

[0335] 表18

[0336]

V _H 基因	Vκ1-39 小鼠				Vκ3-20 小鼠	
	抗原 E	抗原 F	抗原 G	抗原 H	抗原 E	抗原 G
1-2	0	0	0	0	0	0
1-3	0	0	0	0	0	0
1-8	0	0	0	0	0	0
1-18	0	0	0	8.3	0	3.1
1-24	0	0	0	0	0	0
1-46	0	0	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0	0
1-69	2.9	0	25.0	0	0	6.3
2-5	8.2	0	0	0	0	0

[0337]

2-26	0	0	0	0	0	0
2-70	0	0	0	0	0	3.1
3-7	0	0	0	0	0	0
3-9	1.2	98.8	0	14.6	0	0
3-11	0	0	0	0	0	3.1
3-13	0.6	0	25.0	0	0	0
3-15	0	1.2	0	0	0	0
3-20	0	0	25.0	0	0	0
3-21	0	0	0	0	0	0
3-23	4.1	0	25.0	4.2	0	0
3-30	62.9	0	0	0	3.4	0
3-33	0	0	0	0	13.8	37.5
3-43	0	0	0	0	0	0
3-48	0.6	0	0	43.8	0	0
3-53	1.6	0	0	0	0	0
3-64	1.6	0	0	0	0	0
3-72	0	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0	0
4-31	0	0	0	4.2	0	0
4-34	0	0	0	2.1	0	0
4-39	5.3	0	0	0	31.0	0
4-59	11.8	0	0	4.2	3.4	43.8
5-51	1.2	0	0	0	48.3	0
6-1	0	0	0	18.8	0	3.1

[0338] 表19

# AA 改变	来自 VELCOIMMUNE®小鼠的抗体的重链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	63	32	36	26	12	82
1	23	32	41	31	22	17
2	9	25	17	23	27	1
3	4	10	5	16	13	0
4	0	1	1	3	12	0
>5	1	0	0	1	14	0

# AA 改变	来自 Vκ1-39 小鼠的抗体的重链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	8	34	30	9	37
1	25	26	35	34	19	54
2	9	44	23	20	33	9
3	1	19	8	12	22	0
4	0	3	0	5	11	0
>5	1	0	0	0	7	0

# AA 改变	来自 Vκ3-20 小鼠的抗体的重链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	57	8	54	16	8	93
1	41	43	34	39	21	7
2	2	25	10	18	20	0
3	0	15	2	21	13	0
4	0	10	0	3	20	0
>5	0	0	0	2	18	0

[0341] 表20

# AA 改变	来自 VELCOIMMUNE®小鼠的抗体的轻链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	24	49	60	33	23
1	24	20	34	31	27	38
2	9	27	16	9	18	28
3	1	20	1	0	14	7
4	0	7	0	0	4	3
>5	1	1	0	0	3	0

[0342]

# AA 改变	来自 Vκ1-39 小鼠的抗体的轻链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	91	75	80	90	71	63
1	9	19	17	10	21	27
2	0	5	1	1	5	8
3	0	0	1	0	2	1
4	0	0	0	0	2	1
>5	0	0	0	0	0	0

[0343]

# AA 改变	来自 Vκ3-20 小鼠的抗体的轻链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	90	47	93	97	63	57
1	10	27	3	3	20	43
2	0	27	3	0	17	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
>5	0	0	0	0	0	0

[0344] 表21

AA 改变 来自 Vκ1-39 小鼠的抗抗原 E 抗体的重链

# AA 改变	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	75	8	49	41	14	36
1	21	25	33	35	25	52
2	4	43	14	18	28	12
3	0	20	4	5	16	0
4	0	5	0	1	12	0
>5	1	0	0	0	5	0

AA 改变 来自 Vκ1-39 小鼠的抗抗原 F 抗体的重链

[0345]

# AA 改变	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	52	0	6	6	2	15
1	35	24	32	35	15	78
2	11	59	46	22	49	7
3	0	17	16	24	29	0
4	0	0	0	12	4	0
>5	1	0	0	0	1	0

AA 改变 来自 Vκ1-39 小鼠的抗抗原 H 抗体的重链

# AA 改变	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	54	21	29	33	4	77
1	17	35	50	27	6	23
2	23	21	15	21	25	0
3	6	21	4	15	27	0
4	0	2	2	2	15	0
>5	0	0	0	2	23	0

[0346] 表22

# AA 改变	来自 Vκ3-20 小鼠的抗抗原 E 抗体的重链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	79	17	62	24	17	90
1	21	28	34	55	31	10
2	0	28	3	21	24	0
3	0	14	0	0	10	0
4	0	14	0	0	3	0
>5	0	0	0	0	14	0

[0347]

# AA 改变	来自 Vκ3-20 小鼠的抗抗原 G 抗体的重链					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	38	0	47	9	0	97
1	59	56	34	25	13	3
2	3	22	16	16	16	0
3	0	16	3	41	16	0
4	0	6	0	6	34	0
>5	0	0	0	3	22	0

[0348] 本公开内容的实施方案还包括：

[0349] 1. 一种响应抗原挑战表达一群抗原特异性抗体的小鼠，其中所述一群抗原特异性抗体的所有免疫球蛋白轻链包括源自相同的单一人V_L基因片段的人轻链可变(V_L)区以及免疫球蛋白重链包括源自人V_H基因片段的人重链可变(V_H)区，所述人V_H基因片段选自V_H1-2、V_H1-3、V_H1-8、V_H1-18、V_H1-24、V_H1-46、V_H1-58、V_H1-69、V_H2-5、V_H2-26、V_H2-70、V_H3-7、V_H3-9、V_H3-11、V_H3-13、V_H3-15、V_H3-20、V_H3-21、V_H3-23、V_H3-30、V_H3-33、V_H3-43、V_H3-48、V_H3-53、V_H3-64、V_H3-72、V_H3-73、V_H4-31、V_H4-34、V_H4-39、V_H4-59、V_H5-51、V_H6-1。

[0350] 2. 实施方案1所述的小鼠，其中相同的单一人V_L基因片段是人Vκ1-39基因片段。

[0351] 3. 实施方案1所述的小鼠，其中相同的单一人V_L基因片段是人Vκ3-20基因片段。

[0352] 4. 实施方案1所述的小鼠，其中所有免疫球蛋白轻链包括人轻链J(J_L)基因片段。

[0353] 5. 实施方案4所述的小鼠，其中所述人J_L基因片段选自人Jκ1和Jκ5基因片段。

[0354] 6. 实施方案1所述的小鼠，其中所述小鼠缺少选自小鼠免疫球蛋白V_L基因片段、小鼠免疫球蛋白J_L基因片段及其组合的序列。

[0355] 7. 实施方案1所述的小鼠，其中所述人V_L区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白轻链恒定(C_L)区。

[0356] 8. 实施方案1所述的小鼠，其中所述人V_L区由内源性免疫球蛋白轻链基因座表达。

[0357] 9. 实施方案1所述的小鼠，其中所述人V_H区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白重链恒定(C_H)区。

[0358] 10. 实施方案1所述的小鼠，其中所述人V_H区由内源性免疫球蛋白重链基因座表达。

[0359] 11. 一种响应抗原挑战表达一群抗原特异性抗体的小鼠, 其中所述一群抗原特异性抗体的所有免疫球蛋白轻链包括源自人V_K1-39基因片段的人V_L区以及免疫球蛋白重链包括源自人V_H基因片段的人重链可变(V_H)区, 所述人V_H基因片段选自V_H1-18、V_H1-69、V_H2-5、V_H3-9、V_H3-13、V_H3-15、V_H3-20、V_H3-23、V_H3-30、V_H3-48、V_H3-53、V_H3-64、V_H4-31、V_H4-34、V_H4-39、V_H4-59、V_H5-51和V_H6-1。

[0360] 12. 实施方案11所述的小鼠, 其中所述人V_L区包括J_K5序列。

[0361] 13. 实施方案11所述的小鼠, 其中所述小鼠缺乏小鼠免疫球蛋白V_L和/或J_L基因片段。

[0362] 14. 实施方案11所述的小鼠, 其中所述人V_L区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白轻链恒定(C_L)区。

[0363] 15. 实施方案11所述的小鼠, 其中所述人V_L区由内源性免疫球蛋白轻链基因座表达。

[0364] 16. 实施方案11所述的小鼠, 其中所述人V_H区包括编码人J_H区的序列, 所述人J_H区选自人J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5和J_H6基因片段。

[0365] 17. 实施方案11所述的小鼠, 其中所述人V_H区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白重链恒定(C_H)区。

[0366] 18. 实施方案11所述的小鼠, 其中所述人V_L区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白轻链恒定(C_L)区。

[0367] 19. 一种响应抗原挑战表达一群抗原特异性抗体的小鼠, 其中所述一群抗原特异性抗体的所有免疫球蛋白轻链包括源自人V_K3-20基因片段的人V_L区以及免疫球蛋白重链包括源自人V_H基因片段的人重链可变(V_H)区, 所述人V_H基因片段选自V_H1-18、V_H1-69、V_H2-70、V_H3-11、V_H3-30、V_H3-33、V_H3-53、V_H4-39、V_H4-59、V_H5-51和V_H6-1。

[0368] 20. 实施方案19所述的小鼠, 其中所述人V_L区包括J_K5序列。

[0369] 21. 实施方案19所述的小鼠, 其中所述小鼠缺乏小鼠免疫球蛋白V_L和/或J_L基因片段。

[0370] 22. 实施方案19所述的小鼠, 其中所述小鼠缺乏小鼠免疫球蛋白V_L和/或J_L基因片段。

[0371] 23. 实施方案19所述的小鼠, 其中所述人V_L区由内源性免疫球蛋白轻链基因座表达。

[0372] 24. 实施方案19所述的小鼠, 其中所述人V_H区包括编码人J_H区的序列, 所述人J_H区选自人J_H2、J_H3、J_H4、J_H5和J_H6基因片段。

[0373] 25. 实施方案19所述的小鼠, 其中所述人V_H区可操作性连接人、小鼠或大鼠免疫球蛋白重链恒定(C_H)区。

[0374] 26. 实施方案19所述的小鼠, 其中所述人V_H区由内源性免疫球蛋白重链基因座表达。

[0375] 27. 提供一种制备遗传修饰的小鼠的方法, 包括用人V_H基因片段替换所有或基本上所有位于内源性小鼠重链基因座的小鼠V_H基因片段; 其中所述小鼠被遗传修饰以包括不多于一个或两个重排的人轻链V_L/J_L序列替换所有小鼠轻链基因片段; 其中所述人重链可变基因片段连接小鼠恒定基因, 并且所述重排的人轻链序列连接人或小鼠恒定基因; 其中所

述人V_H基因片段选自V_H1-2、V_H1-3、V_H1-8、V_H1-18、V_H1-24、V_H1-46、V_H1-58、V_H1-69、V_H2-5、V_H2-26、V_H2-70、V_H3-7、V_H3-9、V_H3-11、V_H3-13、V_H3-15、V_H3-20、V_H3-21、V_H3-23、V_H3-30、V_H3-33、V_H3-43、V_H3-48、V_H3-53、V_H3-64、V_H3-72、V_H3-73、V_H4-31、V_H4-34、V_H4-39、V_H4-59、V_H5-51、V_H6-1及其组合。

[0376] 28. 实施方案27所述的方法, 其中所述两个重排的人轻链V_L/J_L基因片段包括重排的V_K1-39/J、重排的V_K3-20/J及其组合。

序列表

<110> 瑞泽恩制药公司

<120> 共同轻链小鼠

<130> 802C-W0

<140> To be assigned

<141> Filed herewith

<150> 13/412,936

<151> 2012-03-06

<160> 33

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

```

ggcgcgccgt agctttgaat tttaaaccatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60
tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggt ttgatgcctc tctccccaac 120
atgatagaag ttagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgcct acaacaacta 180
cctgggattg aaaacttctt cccttgcctt agtcctttct tctacaccta ctccacatc 240
atctgtgact caaaacaata ctgttcagga aagatcccg aaagagcaaa aaagacttcc 300
ttagaggtgt cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360
gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420
acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480
tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540
aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600
gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tatacccagc 660
atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720
attgtattgt attttctctt tatatcatct tcttcttctg tcattaaaaa aaaaccgttc 780
aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840
ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtcttc atttccaagg taacaagcct 900
gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttctt tattgtctctg 960
gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020
gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaaggtgtga gtacttttagc acagattaag 1140
accaaatacat taggatttaa agagtttgtt agagtttagt aaggaaaagc cttagaatta 1200
aatttggtctg cggataaaac attcttggtt tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260

```

```

agtatatatta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata tttataaat aaaaacaaaa 1320
ttaattgccg catacataat gtcctgaata ctattgtaaa tgttttatct tatttccttt 1380
aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
accgagacac aggggaagta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500
catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560
caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620
caagcaaatg aaagggtgat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680
tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaag 1740
acacagcttt ttatatgtt cttaacaggc ttgtgcaaaa catcttctgg gtggatttag 1800
gtgattgagg agaagaaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctta 1860
cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
gtgcagagag gaagaagcag gtggtctttg cagctgaaag ctcagctgat ttgcatatgg 1980
agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100
gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatget 2160
ccatgcctct ctgttcttga tcactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtttcc 2220
ccagtcccct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340
atcattccag gtgccagatg tgacatccag atgaccagct ctccatcctc cctgtctgca 2400
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta 2460
aattgggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcattcagc 2520
ttgcaaagtg ggggtccatc aaggttcagt ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc 2580
accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt 2640
acccctccga tcaccttcgg ccaagggaca cgactggaga ttaaacgtaa gtaatttttc 2700
actattgtct tctgaaattt gggctctgat gccagtattg acttttagag gcttaaatag 2760
gagtttggtg aagattggta aatgagggca ttttaagatt gccatgggtt gcaaaagtta 2820
aactcagctt caaaaatgga ttggagaaa aaaagattaa attgctctaa actgaatgac 2880
acaaagtaaa aaaaaaaagt gtaactaaaa aggaaccctt gtatttctaa ggagcaaaag 2940
taaatttatt tttgttact ctggccaaat attgtattgg ttgttgctga ttatgcatga 3000
tacagaaaag tggaaaaata ctttttttag ttttctccc tttgtttga taaattattt 3060
tgtcagacaa caataaaaaat caatagcacg ccctaagatc tagatgcatg ctcgagtgcc 3120
atttcattac ctctttctcc gcacccgaca tagat                                     3155

```

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

aggtgagggt acagataagt gttatgag 28

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

tgacaaatgc cctaattata gtgatca 27

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

gggcaagtca gagcattagc a 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 5

tgcaaactgg atgcagcata g 21

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 6

ggtggagagg ctattcggc 19

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 7
gaacacggcg gcatcag 17
<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 8
tgggcacaaac agacaatcgg ctg 23
<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 9
ccattatgat gctccatgcc tctctgttc 29
<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 10
atcagcagaa accagggaaa gcccct 26
<210> 11
<211> 3166
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 11
ggcgcgccgt agctttgaat tttaaaccatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60
tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggt ttgatgcctc tctccccaac 120
atgatagaag ttagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgcct acaacaacta 180
cctgggattg aaaacttctt cccttgetct agtcctttct tctacaccta cttccacatc 240
atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatcccg aaagagcaaa aaagacttcc 300
ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360

gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420
 acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480
 tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540
 aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600
 gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tatacccagc 660
 atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720
 attgtattgt attttctctt tatatcatct tcttcttctg tcattaaaaa aaaaccgttc 780
 aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840
 ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtcttc atttccaagg taacaagcct 900
 gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggt agcttttcct tattgtcctg 960
 gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020
 gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
 tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtacttttagc acagattaag 1140
 accaaatcat taggatttaa agagttgtgt agagtttagt aaggaaaagc cttagaatta 1200
 aatttggtct cggataaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260
 agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata ttaataaat aaaaacaaaa 1320
 ttaattgccg catacataat gtcctgaata ctattgtaaa tgttttatct tatttccttt 1380
 aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
 accgagacac agggaggtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500
 catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560
 caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620
 caagcaaagt aaagggtgat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680
 tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaag 1740
 acacagcttt ttatatgtt cttaacaggc ttgtgccaaa catcttctgg gtggatttag 1800
 gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctta 1860
 cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
 gtgcagagag gaagaagcag gtggctcttg cagctgaaag ctcagctgat ttgcatatgg 1980
 agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
 ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100
 gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160
 ccatgcctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactgggt ttaagtttcc 2220
 ccagtccctt gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
 aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggtttt taaagatata taaaataat ctttgtgttt 2340
 atcattccag gtgccagatg tataaccacc gagaaattgt gttgacgcag tctccaggca 2400
 ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctctg cagggccagt cagagtgtta 2460
 gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct 2520
 atggtgcac cagcagggcc actggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggctctggga 2580
 cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttgagtg tattactgtc 2640
 agcagtatgg tagctcacct tggacgttcg gccaaaggac caagtggaag atcaaacgta 2700

agtaattttt cactattgtc ttctgaaatt tgggtctgat ggccagtatt gactttttaga 2760
ggcttaaata ggagtttggg aaagattggg aaatgagggc atttaagatt tgccatgggt 2820
tgcaaaagtt aaactcagct tcaaaaatgg atttggagaa aaaaagatta aattgctcta 2880
aactgaatga cacaaagtaa aaaaaaaaaag tgtaactaaa aaggaaccct tgtatttcta 2940
aggagcaaaa gtaaatttat ttttgttcac tcttgccaaa tattgtattg gttgttgctg 3000
attatgcatg atacagaaaa gtggaaaaat acatttttta gtctttctcc cttttgtttg 3060
ataaattatt ttgtcagaca acaataaaaa tcaatagcac gccctaagat ctagatgcat 3120
gctcgagtgc catttcatta cctctttctc cgcacccgac atagat 3166

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 12

tccaggcacc ctgtctttg 19

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 13

aagtagctgc tgctaacact ctgact 26

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 14

aaagagccac cctctcctgc aggg 24

<210> 15

<211> 3187

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 15

```

ggcgcgccgt agctttgaat tttaaaccatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60
tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120
atgatagaag tgtagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgcct acaacaacta 180
cctgggattg aaaacttctt ccttgcctc agtcctttct tctacaccta cttccacatc 240
atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatcccg aaagagcaaa aaagacttcc 300
ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360
gaggaagagc agagcttgta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420
acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480
tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540
aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600
gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tatacccagc 660
atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720
attgtattgt attttcctct tatatcatct tcttcttctg tcattaaaaa aaaaccgttc 780
aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840
ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtctc atttccaagg taacaagcct 900
gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttctt tattgtcctg 960
gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020
gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080
tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaaggtgtga gtacttttagc acagattaag 1140
accaaatcat taggatttaa agagtgtgt agagttagtg aaggaaaagc cttagaatta 1200
aatttggtg cggataaaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260
agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata ttaataaat aaaaacaaaa 1320
ttaattgccg catacataat gtcctgaata ctattgtaaa tgttttatct tatttccttt 1380
aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440
accgagacac agggaggtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500
catctatgtc agggctgccg ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560
caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620
caagcaaatg aaagggtgat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680
tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaaa 1740
acacagcttt ttatatgtt cttaacaggc ttgtgceaaa catcttctgg gtggatttag 1800
gtgattgagg agaagaaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctta 1860
cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920
gtgcagagag gaagaagcag gtggtctttg cagctgaaag ctcagctgat ttgcatatgg 1980
agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040
ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100
gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatget 2160
ccatgcctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactgggt ttaagtttcc 2220
ccagtccct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280
aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaataat ctttgtgttt 2340

```

atcattccag gtgccagatg tgttgtggc ctcagccggt gctgcatcag ccgccggcca 2400
 tgtcctcggc ccttggaacc acaatccgcc tcacctgcac cctgaggaaac gaccatgaca 2460
 tcggtgtgta cagcgtctac tggtagcagc agaggccggg ccaccctccc aggttcctgc 2520
 ttagatatatt ctcacaatca gacaagagcc agggcccccga ggtccccctt cgcttctctg 2580
 gatccaaaga tgtggccagg aacaggggggt atttgagcat ctctgagctg cagcctgagg 2640
 acgaggctat gtattactgt gctatgcata actcagtgcac gcatgtgttt ggcagcgga 2700
 cccagctcac cgttttaagt aagtaatttt tcactattgt cttctgaaat ttgggtctga 2760
 tggccagtat tgacttttag aggccttaaata aggagtttgg taaagattgg taaatgaggg 2820
 catttaagat ttgccatggg ttgcaaaagt taaactcagc ttcaaaaatg gatttgagga 2880
 aaaaaagatt aaattgctct aaactgaatg acacaaagta aaaaaaaaaa gtgtaactaa 2940
 aaaggaaccc ttgtatttct aaggagcaaa agtaaattta tttttgttca ctcttgccaa 3000
 atattgtatt ggttgttgcg gattatgcat gatacagaaa agtggaaaaa tacatttttt 3060
 agtctttctc ccttttgttt gataaattat tttgtcagac aacaataaaa atcaatagca 3120
 cgccctaaga tctagatgca tgcctcagtg ccatttcatt acctctttct ccgcaccgca 3180
 catagat 3187

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 16

tgtcctcggc ccttgga 17

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 17

ccgatgtcat ggtcgttcct 20

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 18

acaatccgcc tcacctgcac cct 23

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 19
agcagtctgc aacctgaaga ttt 23
<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 20
gtttaatctc cagtcgtgct cctt 24
<210> 21
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 21
cctccgatca ccttc 15
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 22
aaaccaggga aagcccctaa 20
<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 23

atgggacccc actttgca 18
<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 24
ctcctgatct atgctgcat 19
<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 25
cagcagactg gagcctgaag a 21
<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 26
tgatttccac cttggtcct t 21
<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 27
tagctcacct tggacgtt 18
<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic

<400> 28
ctcctcatct atggtgcatc ca 22
<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 29
gacccactgc cactgaacct 20
<210> 30
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 30
ccactggcat ccc 13
<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 31
tgagcagcac cctcacgtt 19
<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthetic
<400> 32
gtggcctcac aggtatagct gtt 23
<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> synthetic

<400> 33

accaaggacg agtatgaa 18

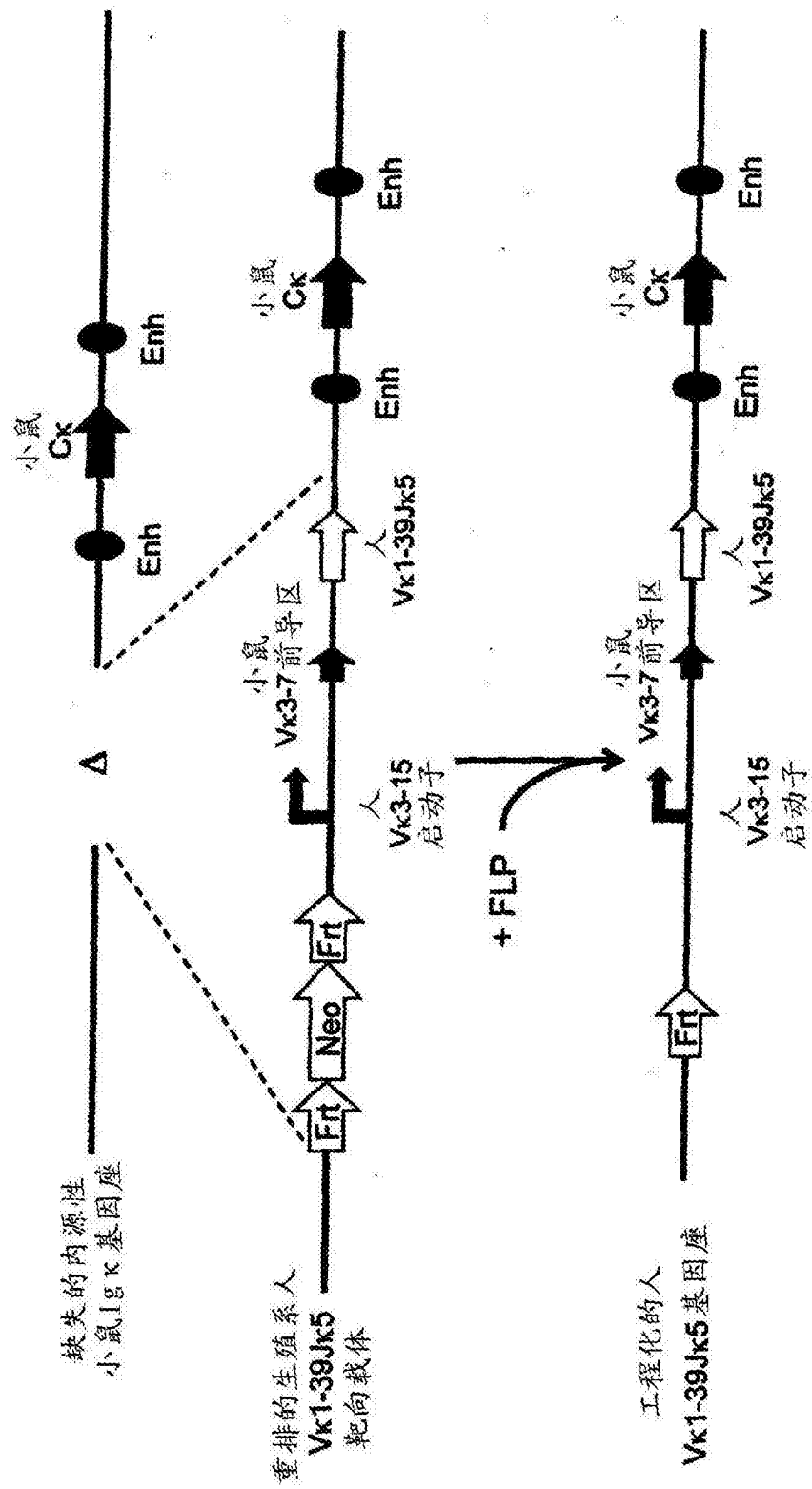


图1

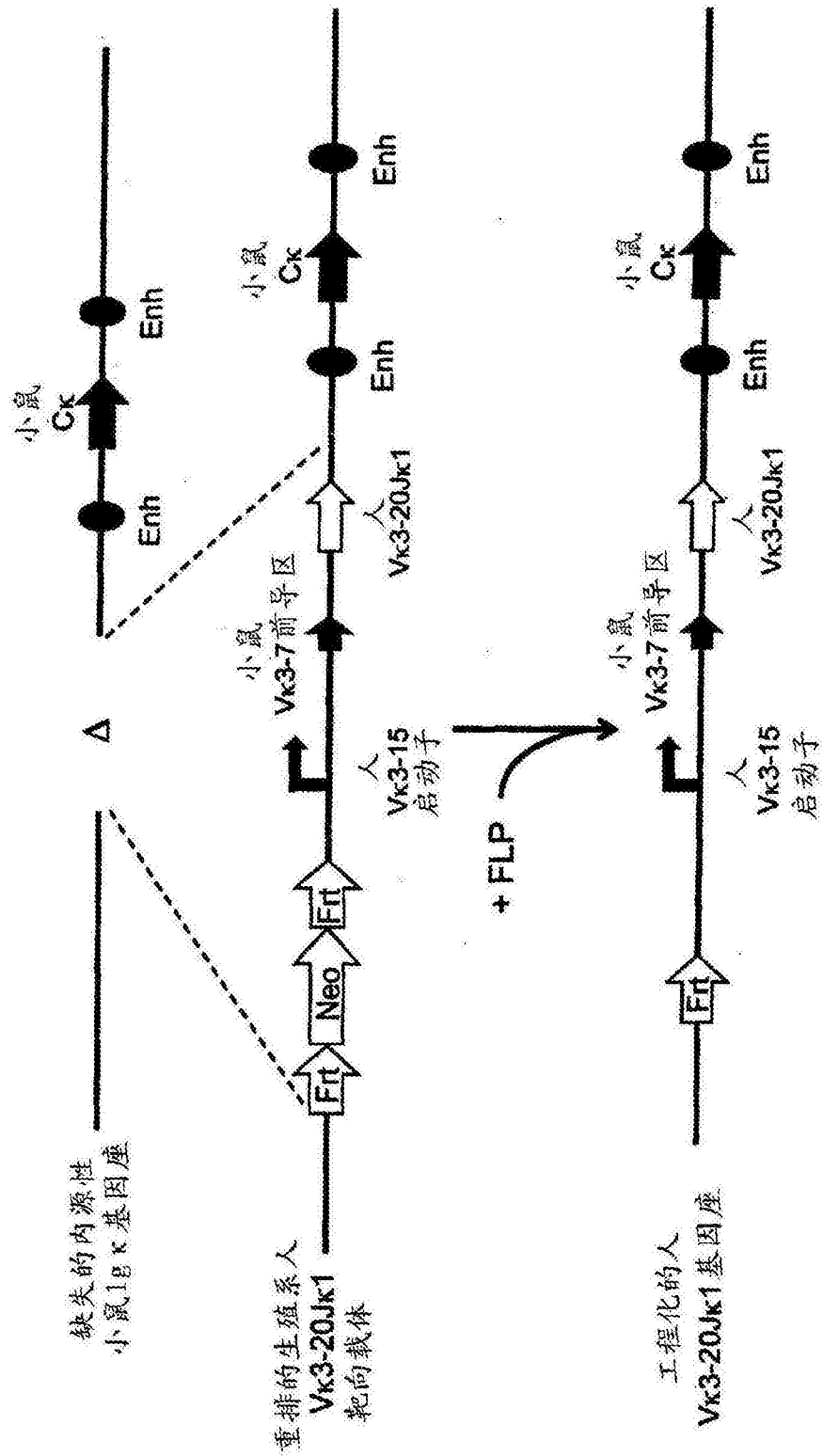


图2

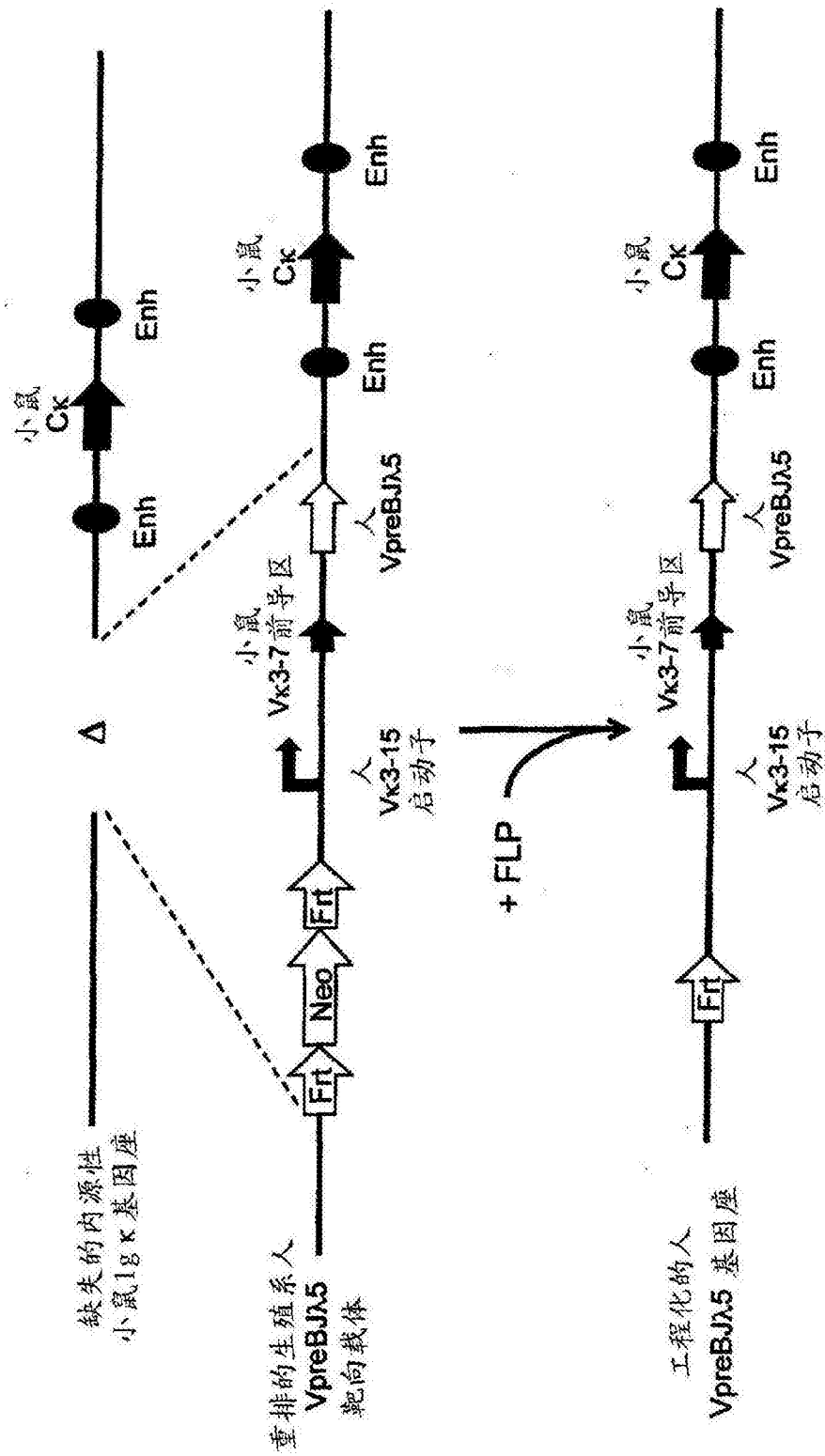


图3

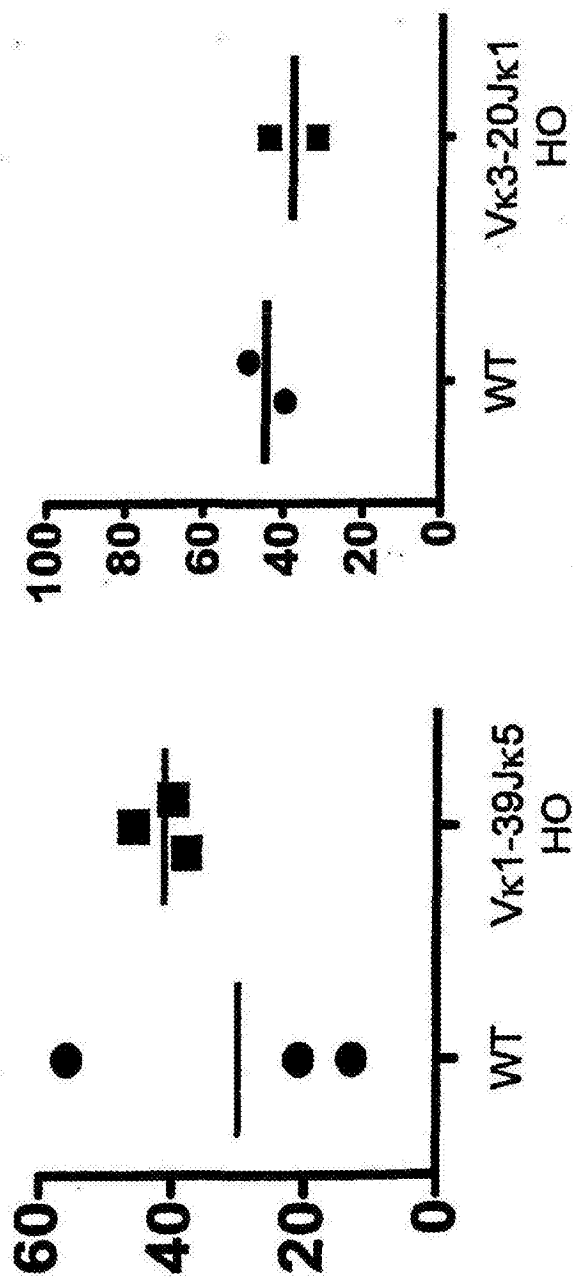


图4

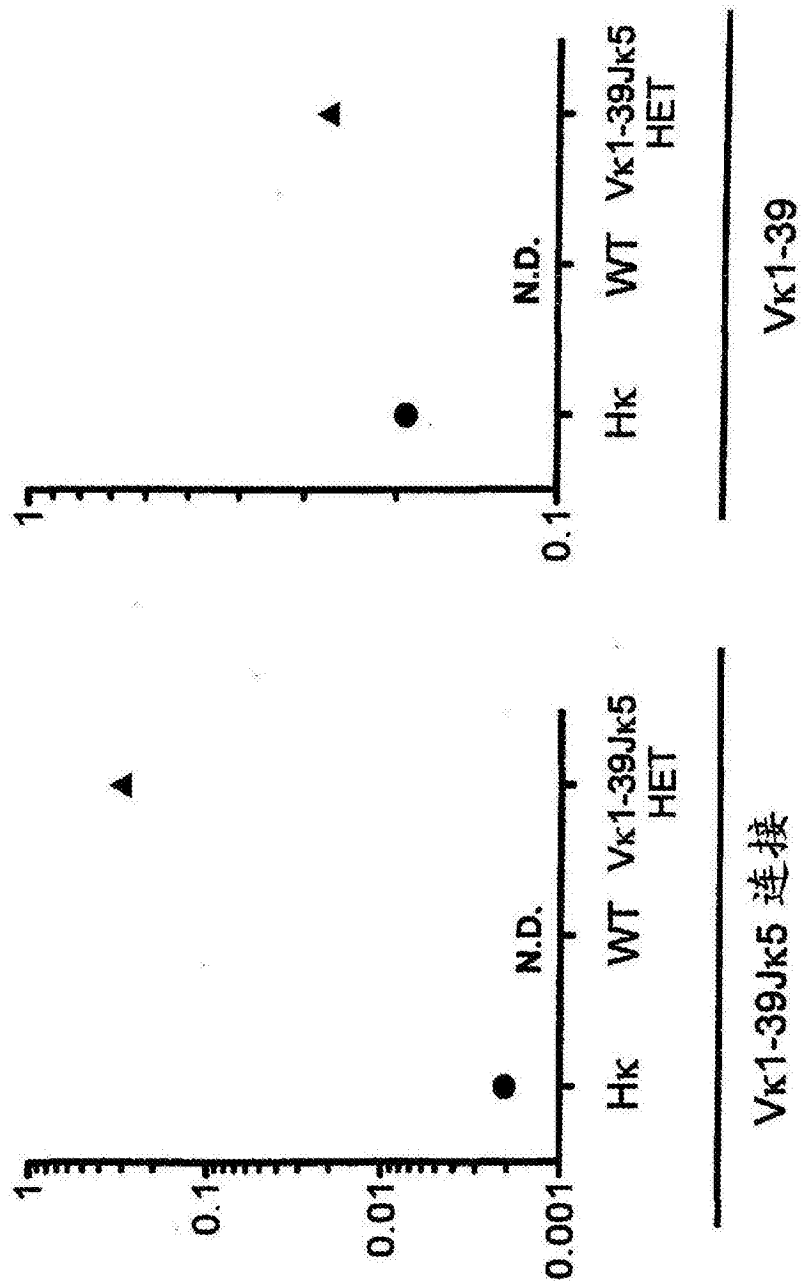


图5A

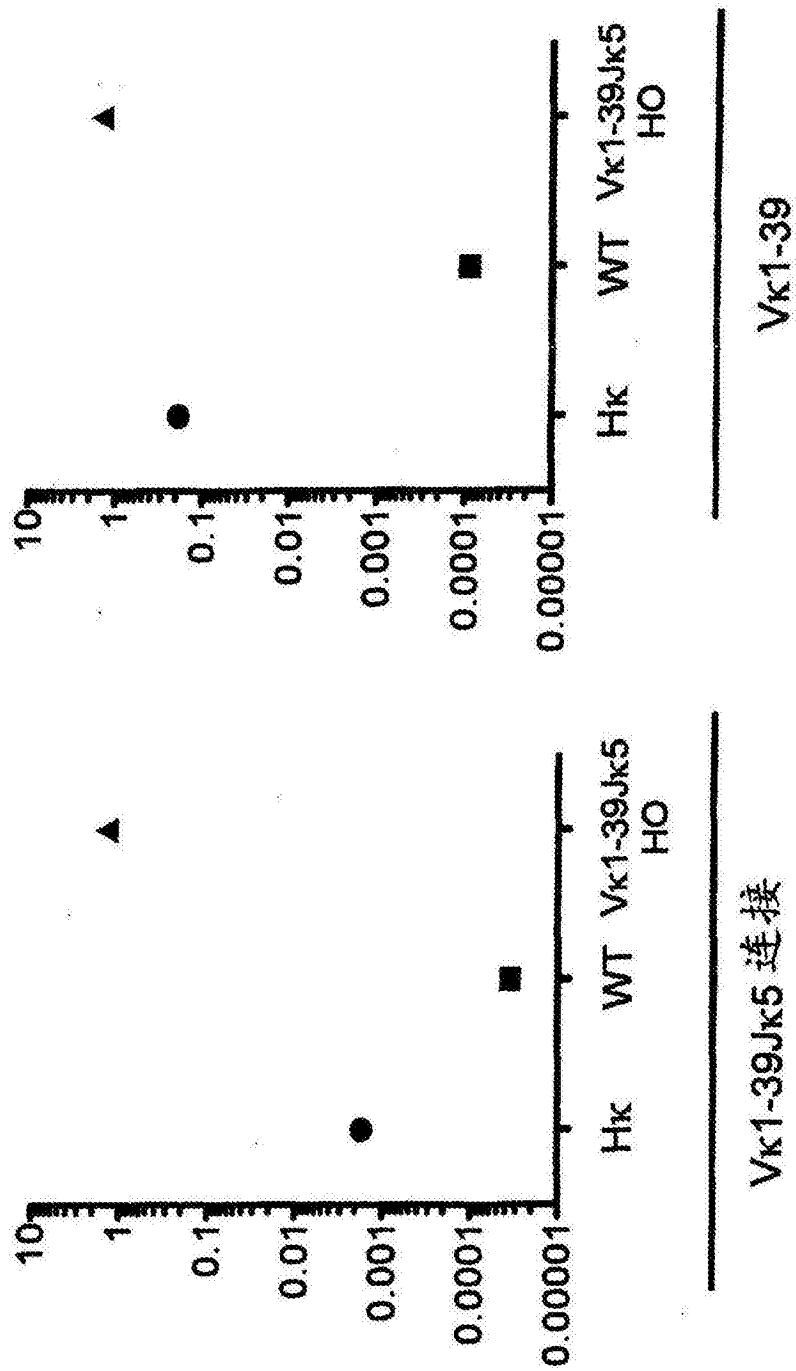


图5B

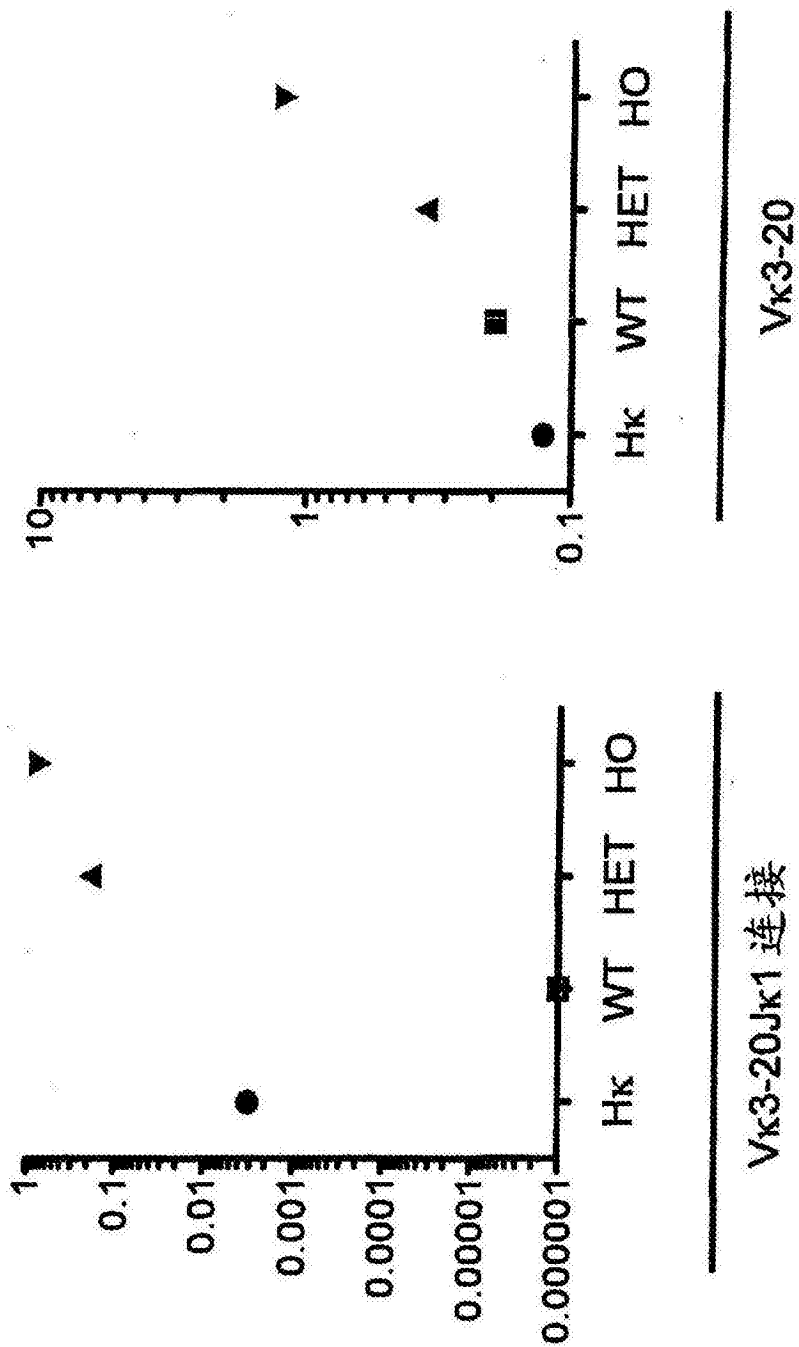


图5C

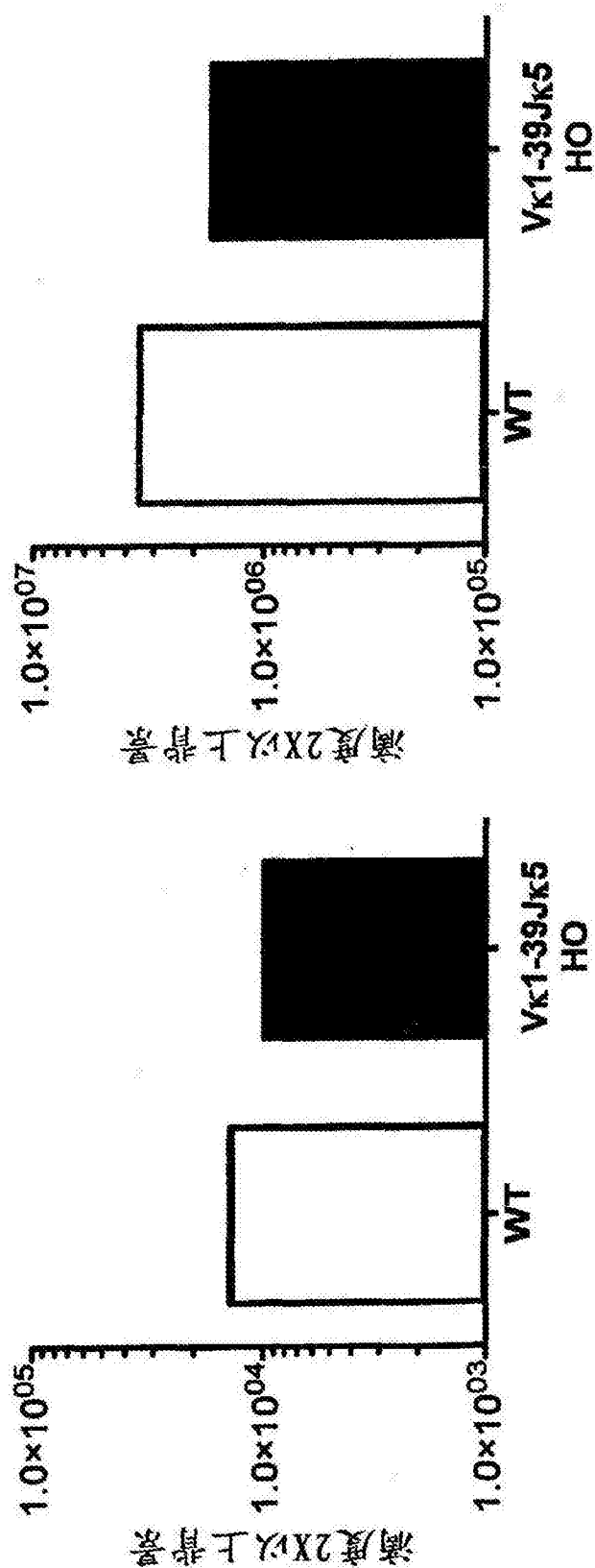


图6A

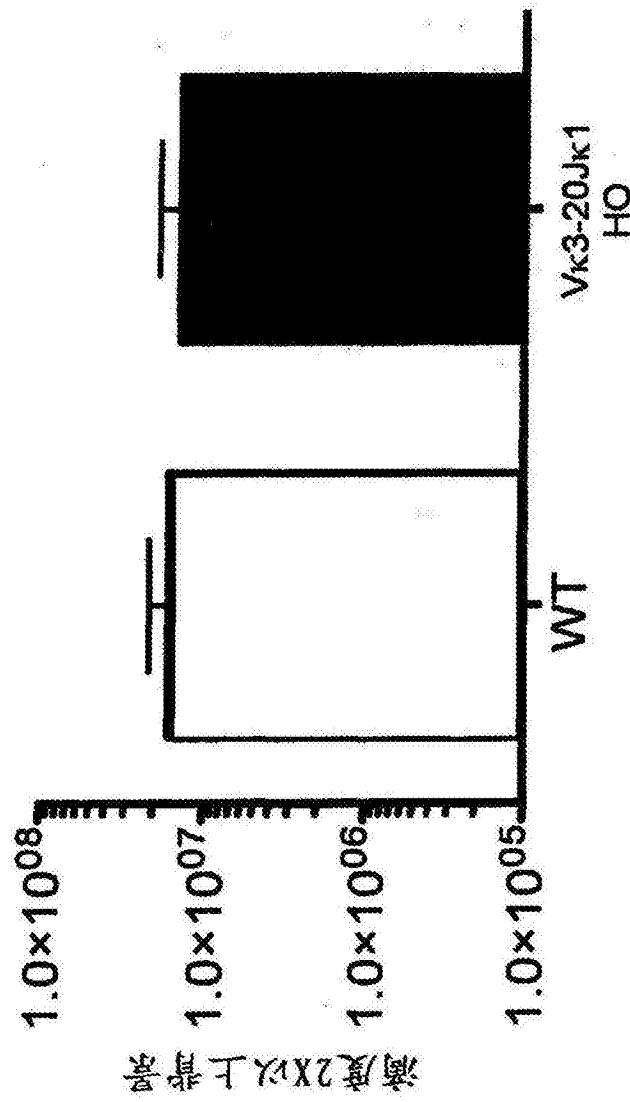


图6B