



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102711449 B

(45) 授权公告日 2015.01.07

(21) 申请号 201080061812.7

(22) 申请日 2010.12.10

(30) 优先权数据

61/285,250 2009.12.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.07.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/059845 2010.12.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/072204 EN 2011.06.16

(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 L·麦克唐纳 S·史蒂文斯

A·J·莫菲

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51) Int. Cl.

A01K 67/027(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1518559 A, 2004.08.04,

CN 1199422 A, 1998.11.18,

CN 101016543 A, 2007.08.15,

US 2006024302 A1, 2006.02.02,

刘恭植. 免疫球蛋白.《现代医学免疫

学》.2000,(第1版),

Zou X et al.Heavy chain-only
antibodies are spontaneously produced in
light chain-deficient mice.《JOURNAL OF
EXPERIMENTAL MEDICINE》.2007,第204卷(第13
期),第3271-3283页.HENDERSHOT L et al.ASSEMBLY AND
SECRETION OF HEAVY-CHAINS THAT DO
NOT ASSOCIATE POSTTRANSLATIONALLY
WITH IMMUNOGLOBULIN HEAVY-CHAIN
BINDING-PROTEIN.《JOURNAL OF CELL BIOLOGY
》.1987,第104卷(第3期),Liu Y.Isolation and characterization of
human anti-VEGF(165) monoclonal antibody
with anti-tumor efficacy from transgenic
mice expressing human immunoglobulin loci.
《CANCER LETTERS》.2009,第273卷(第1期),Riechmann L et al.Single domain
antibodies: comparison of camel VH and
camelised human VH domains.《JOURNAL OF
IMMUNOLOGICAL METHODS》.1999,第231卷Rick Janssens et al.Generation of
heavy-chain-only antibodies in mice.
《PNAS》.2006,第103卷(第41期),

Rick Janssens et al.Generation of

(续)

审查员 吴丹

权利要求书2页 说明书26页 附图12页

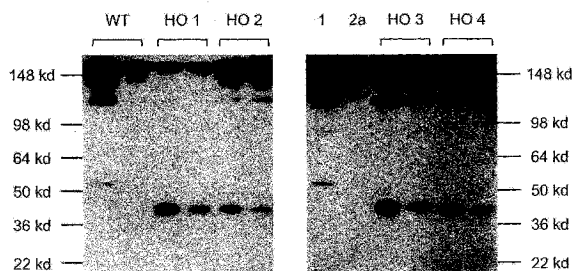
(54) 发明名称

生产重链抗体的小鼠

(57) 摘要

提供了遗传修饰的非人动物及用于产生和使用其的方法和组合物,其中的遗传修饰包括在IgG、IgA、IgD和/或IgE的免疫球蛋白恒定区CH1基因内的删除(可选的在铰链区内的删除),其中小鼠能够表达功能性IgM。描述了经遗传修饰的小鼠,包括具有功能性IgM基因并修饰为在不是IgM的重链恒定结构域(例如,在IgG重链恒定结构域中)中具有CH1结构域及铰链区的删除的小

鼠。提供了经遗传修饰的小鼠,其产生人可变区/小鼠恒定区嵌合重链抗体(缺少轻链的抗体)、完全小鼠重链抗体或完全人重链抗体。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

《PNAS》.2006, 第 103 卷 (第 41 期),

heavy-chain-only antibodies in mice.

1. 制备包含种系遗传修饰的小鼠的方法,所述方法包括删除编码 IgG 恒定区基因的 CH1 结构域的核苷酸序列,其中该小鼠包括完整的 IgM 恒定区基因,并且该小鼠在其血清中表达缺少 CH1 结构域以及缺少同源轻链的 IgG 抗体,其中该小鼠不能表达包含编码 CH1 结构域的序列的 IgG mRNA。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 IgG 恒定区基因是 IgG1 恒定区基因。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述小鼠包含功能性的免疫球蛋白轻链基因基因座。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中缺少同源轻链的 IgG 抗体包含人可变结构域和缺少 CH1 结构域的小鼠恒定结构域。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中缺少同源轻链的 IgG 抗体包含小鼠可变结构域和缺少 CH1 结构域的小鼠恒定结构域。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括删除 IgG2a 基因。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括删除 IgG2b 基因。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括删除 IgG2a 基因和 IgG2b 基因。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括用一种或多种人重链可变区基因片段取代一种或多种内源小鼠重链可变区基因片段。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述一种或多种人重链可变区基因片段是人 VH1 家族基因片段。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中 VH1 家族基因片段包括 FR1、FR2 及 FR3 区域,其与人 VH 基因片段 1-8、1-18 及 1-69 的 FR1、FR2 及 FR3 基因片段有至少 90% 的同源性。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述小鼠进一步包含人 D 基因片段 及人 J 基因片段。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其中该小鼠包含编码 FR4 的重排的免疫球蛋白基因,并且 FR4 与由人至少 D1-7/J4、D3-16/J6、D4-4/J4、D6-6/J4、D6-6/J2、D6-7/J4 或 D6-19/J6 编码的 FR4 有至少 90% 的同源性。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其中包括用一种或多种骆驼化的人重链可变区基因片段取代一种或多种内源小鼠重链可变区基因片段。

15. 用于在小鼠中产生体细胞突变的重链抗体的方法,包括以下步骤:

a. 用抗原免疫小鼠,其中该小鼠包含非重排的人或小鼠重链免疫球蛋白可变区基因片段,且其中该小鼠缺少编码功能性 IgG CH1 结构域的至少一个等位基因的核苷酸,并且其中该小鼠表达包含完整的 IgM 恒定区基因;

b. 将小鼠维持于足以引发针对所述抗原的免疫应答的条件下;以及

c. 从小鼠中分离体细胞突变的重链抗体,其包含衍生自人或小鼠重链免疫球蛋白可变区基因片段的可变结构域,其中体细胞突变重链抗体特异性结合所述抗原。

16. 制备经遗传修饰的小鼠的方法,其包括用一种或多种人 V、人 D 和人 J 基因片段取代所有或几乎所有 V、D 和 J 基因片段,其中所述一种或多种人 V、D 和 J 基因片段可操作地在内源小鼠基因座处连接至小鼠重链恒定区基因基因座,其中小鼠重链恒定区基因基因座包含完整的 IgM 恒定区基因,在编码选自 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 及其组合的 IgG 基因中 CH1 结构域的核苷酸序列中包含删除的 IgG 基因;其中该小鼠表达 B 细胞受体,其包含具有

CH1 结构域的 IgM, 其中 IgM 包含与同源 λ 或 κ 轻链相连的重链。

17. 如权利要求 16 中所述的方法, 其中所述一种或多种人 V、D 和 J 基因片段包含的人基因片段来自选自 VH1、VH3、VH4 及其组合的可变区家族。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中所述一种或多种人基因片段选自 1-2、1-8、1-18、1-46、1-69、3-21、3-72、4-59 及其组合。

19. 如权利要求 17 所述的方法, 其中所述一种或多种人 V、D 和 J 基因片段包含 D1-7、D3-16、D4-4、D6-6、D6-7、D6-19、J2、J3、J4 及其组合。

生产重链抗体的小鼠

发明领域

[0001] 本发明的领域为生产重链抗体的遗传修饰的非人动物,尤其是在其编码免疫球蛋白 γ (IgG) 基因的 CH1 结构域(或 CH1 结构域及铰链区)的序列内包含核苷酸序列删除却能够表达不缺少功能性 CH1 结构域的 IgM 的遗传修饰的非人动物,具体而言为能够产生野生型 IgM 分子(即,具有 CH1 结构域)但产生不含功能性 CH1 结构域(或 CH1 结构域以及铰链区)的重链 IgG 抗体的小鼠。

[0002] 发明背景

[0003] 在大多数动物中,正常的免疫球蛋白重链只在与其同源轻链相偶联时会有很好的表达。在人类中,单独的重链发现于重链疾病中,这些疾病的表征为重链功能失调,其缺少可变重链、CH1 或可变重链及 CH1 结构域的序列。不含轻链的重链可见于鱼的特定物种以及骆驼中。这些重链缺少功能性 CH1 结构域并且在其重链可变结构域中具有非人的特征。已有人尝试通过修饰小鼠以表达模拟骆驼或鱼的特定物种中发现的 VHH 结构域的骆驼化基因而产生骆驼化抗体,部分地通过移除 IgM 和 IgG 的 CH1 结构域并使重链可变区的构象变为与骆驼和 / 或特定鱼物种类似。然而,预期骆驼化抗体可诱导非骆驼动物中产生免疫应答。

[0004] 本领域有对遗传修饰的非人动物的需要,其可用于产生具有非骆驼 VH 结构域的重链抗体。

[0005] 附图简述

[0006] 图 1 示例说明了小鼠中的野生型 IgG1 基因座(locus)(IgG1, 上图),显示了 JH 区域基因片段,其融合至 CH1 基因片段,其后为铰链区域、CH2 基因片段及 CH3 基因片段;由删除 CH1 结构域的构建体靶向的 IgG1 位点(IgG1 Δ CH1, 中图);由删除 CH1 结构域及铰链区域的构建体靶向的 IgG1 位点(IgG1 Δ CH1- Δ hinge, 下图)。

[0007] 图 2 示例说明了靶向小鼠 IgG1 基因以产生表达缺少 CH1 结构域的 IgG1 的经遗传修饰的基因座。

[0008] 图 3 示例说明了靶向小鼠 IgG1 基因以产生表达缺少 CH1 结构域并缺少铰链区域的 IgG1 的经遗传修饰的基因座。

[0009] 图 4 示例说明了靶向小鼠重链恒定区基因座以产生表达缺少 CH1 结构域的 IgG1 而不表达 IgG2b 或 IgG2a 的经遗传修饰的基因座。

[0010] 图 5 示例说明了由删除 CH1 结构域并删除铰链区且删除 IgG2b 基因及 IgG2a 基因的构建体靶向的小鼠重链恒定区。

[0011] 图 6 示例说明了经遗传修饰的小鼠的重链恒定区,其具有缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域和铰链区的 IgG1 (上图),以及经遗传修饰的小鼠的重链恒定区,其具有缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域和铰链区的 IgG1,且其缺少 IgG2a 基因并缺少 IgG2b 基因(下图)。

[0012] 图 7 显示了对不同 CHO 细胞上清进行的 Western 印迹,其中 CHO 细胞分别经工程改造为独立地表达:对照(与小鼠 Fc 融合的细胞因子胞外域)、缺少 CH1 结构域的嵌合(人 VR) / (小鼠 Fc) 重链抗体(hVR-mFc Δ CH1)、缺少 CH1 结构域的骆驼化嵌合(人 VR) / (小鼠

Fc) 重链抗体(hVR*-mFc Δ CH1)、嵌合(人 VR)/(小鼠 Fc)重链抗体(hVR-mFc)、骆驼化嵌合(人 VR)/(小鼠 Fc)重链抗体(hVR*-mFc)、具有或不具有 CH1 结构域的 mFc (分别为 mFc 和 mFc Δ CH1)。

[0013] 图 8 显示了用抗小鼠 IgG 对来自野生型小鼠(左)及来自 IgG1 缺少 CH1 结构域且缺少铰链区的经遗传修饰的小鼠(杂合,右)的小鼠血清进行的还原性 SDS-PAGE 的 Western 印迹图像;提供了重链以及分子量标志物位置的示意图。

[0014] 图 9 显示了来自野生型小鼠(WT)及来自四只 IgG1 缺少 CH1 结构域且缺少铰链区的经遗传修饰的小鼠(纯合;分别标记为 H0 1、H0 2、H0 3、H0 4)的小鼠血清进行的非还原性 SDS-PAGE 的 Western 印迹图像,用抗小鼠 IgG 进行印迹;每只小鼠(WT 或 H0)都有两条泳道,泳道以上方的括号表示对应着每只动物血清的 1:5 及 1:10 稀释样品(对每只动物为从左到右的连续泳道)。

[0015] 图 10 提供了正常 IgG1 抗体(左)及缺少 CH1 结构域并缺少铰链区的重链抗体的示意图。

[0016] 图 11 显示了对野生型小鼠(WT)及包含缺少 CH1 结构域并缺少铰链区的 IgG1 的经遗传修饰的小鼠(H0;表达缺少 CH1 结构域并缺少铰链区的重链抗体的纯合小鼠)分别进行 IgG1 和 IgG2b 血清免疫球蛋白测定。对照为混合的人血清。

[0017] 图 12 显示了扩增自小鼠(其在经修饰的内源小鼠重链基因座具有不含 IgG1CH1 及铰链区序列的小鼠重链基因序列)的脾 RNA 的 11 个独立 RT-PCR 克隆的蛋白质序列。B1=SEQ ID NO:19;B2=SEQ ID NO:21;B3=SEQ ID NO:23;B5=SEQ ID NO:25;D2=SEQ ID NO:27;D5=SEQ ID NO:29;D6=SEQ ID NO:31;E2=SEQ ID NO:33;E8=SEQ ID NO:35;E10=SEQ ID NO:37;F6=SEQ ID NO:39。小写字体的碱基表示由于重组过程中的突变和/或 N 添加产生的非种系碱基。点表示在序列中的人为缺口以使骨架区(FR)及互补决定区(CDR)之间能进行合适的比对,在序列上对骨架区和互补决定区有所标注。对每个克隆显示了内源 IgG1 (CH2)恒定区的 CH2 区域中的前九个氨基酸。

[0018] 图 13 显示了扩增自小鼠(其在修饰的内源小鼠重链基因座具有不含 IgG1 CH1 区域序列的人重链基因序列)的脾 RNA 的 7 个独立 RT-PCR 克隆的蛋白质序列。A8=SEQ ID NO:51;C2=SEQ ID NO:53;D9=SEQ ID NO:55;C4=SEQ ID NO:57;H8=SEQ ID NO:59;A5=SEQ ID NO:61;A2=SEQ ID NO:63。小写字体的碱基表示由于重组过程中的突变和/或 N 添加产生的非种系碱基。点表示在序列中的人为缺口以使骨架区(FR)及互补决定区(CDR)之间能进行合适的比对,在序列上对骨架区和互补决定区有所标注。对每个克隆显示了内源 IgG1 (HINGE) 恒定区的 13 个氨基酸铰链区的前七个氨基酸。

[0019] 发明概述

[0020] 提供了经遗传修饰的细胞、非人胚胎、非人动物及产生和使用其的方法,其中所述动物经遗传修饰为缺少免疫球蛋白 G (IgG) 的功能性 CH1 序列,任选的修饰为在经修饰的 IgG 上缺少功能性 IgG 铰链区,其中所述细胞、胚胎以及动物包含有功能性 IgM CH1 序列。在一些方面,所述小鼠包含一种或多种人免疫球蛋白重链可变区基因片段对一种或多种或全部内源小鼠免疫球蛋白重链可变区基因片段的取代。在一些方面,一种或多种人 V、一种或多种人 D 以及一种或多种人 J 基因片段对所有内源小鼠 V、D 和 J 基因片段进行取代。

[0021] 在一方面,提供了经遗传修饰的小鼠,其中遗传修饰包括对编码 IgG 恒定区的核

核苷酸序列的修饰,其中修饰引起 IgG 恒定区的 CH1 结构域的功能丢失。在一个实施方式中,引起功能丢失的修饰为编码 CH1 结构域的核苷酸序列的删除,或编码 CH1 结构域的核苷酸序列之内的删除。

[0022] 在一个实施方式中,所述 IgG 选自 IgG1、IgG2a、IgG2b 及其组合。在一个实施方式中,所述 IgG 为 IgG1。在一个实施方式中,所述 IgG 为 IgG1、IgG2a 以及 IgG2b。

[0023] 在一个实施方式中,所述修饰进一步包含编码含有所述 CH1 修饰的 IgG 的铰链区的核苷酸序列的删除。

[0024] 在一个实施方式中,所述经遗传修饰的小鼠选自 129 种系、C57BL/6 种系以及 129xC57BL/6 杂交系。在一个特定实施方式中,所述小鼠为 50% 的 129 及 50%C57BL/6。

[0025] 在一个实施方式中,经遗传修饰的小鼠为 129 种系,选自 129P1、129P2、129P3、129X1、129S1 (如,129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6 (129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2 (见,例如 Festing 等人(1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836)。在一个实施方式中,经遗传修饰的小鼠为 C57BL 种系,在一个特定实施方式中选自 C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、C57BL/Ola。在一个特定实施方式中,所述经遗传修饰的小鼠为前述 129 种系及前述 C57BL/6 种系的杂交系。在另一个特定实施方式中,所述小鼠为前述 129 种系间的杂交系或前述 BL/6 种系之间的杂交系。在一个特定实施方式中,所述杂交的 129 种系为 129S6 (129/SvEvTac) 种系。

[0026] 在一个实施方式中,小鼠包含一个或多个未重排的内源小鼠重链免疫球蛋白可变区(mVR)基因片段、其可操作地地连接于经修饰的 IgG 恒定区序列。在一个实施方式中,所述一个或多个 mVR 基因片段来自小鼠 VH 基因家族、选自 VH1、VH3、VH5、VH7、VH14 及其组合。在一个实施方式中,所述一个或多个 mVR 基因片段选自 mVH1-26、1-42、1-50、1-58、1-72、3-6、5-6、7-1、14-2 及其组合。

[0027] 在一个实施方式中,所述小鼠包含重排的基因,其编码缺少功能性 CH1 区域的 IgG 重链中的 FR1、FR2 及 FR3,其中 FR1、FR2 及 FR3 各自独立地与衍生自选自 VH1、VH3、VH5、VH7 及 VH14 基因家族的 mVH 种系序列的 FR1、FR2 和 FR3 有至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。在一个实施方式中,所述 mVH 种系序列选自 1-26、1-42、1-50、1-58、1-72、3-6、5-6、7-1 及 14-2 序列。

[0028] 在一个实施方式中,小鼠包含衍生自选自 DH 1-1、2-14、3-1、3-2、3-3、4-1 及其组合的 DH 基因片段的 CDR3。在一个实施方式中,小鼠 CDR3 包含由 JH (即 JH1、JH2、JH3 或 JH4) 编码的序列。

[0029] 在一个实施方式中,小鼠包含编码 CDR3 的重排的抗体序列,其衍生自 DH 1-1、2-14、3-1、3-2、3-3、4-1 及 JH1、JH2、JH3、或 JH4 的重排。

[0030] 在一个实施方式中,小鼠包含编码缺少功能性 CH1 区域的 IgG 重链的 FR4 的重排基因、其中 FR4 与通过 DH1-1、2-14、3-1、3-2、3-3 或 4-1 和 JH1、JH2、JH3 或 JH4 重排而编码的 FR4 有至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。

[0031] 在一个实施方式中,小鼠在内源小鼠重链可变区基因座包含非重排的人重链免疫球蛋白可变区(hVR)基因片段。在一个实施方式中,小鼠在内源小鼠重链可变区基因座包

含可操作地连接于经修饰的 IgG 恒定区序列的非重排 hVR 基因片段。在一个实施方式中, hVR 基因片段来自人 VH 基因家族, 选自 VH1、VH3、VH4 及其组合。在一个实施方式中, 所述一种或多种 hVR 基因片段选自 1-2、1-8、1-18、1-46、1-69、3-21、3-72、及 4-59。在一个具体的实施方式中, 所述一种或多种 hVR 基因片段选自 1-8、1-18 和 1-69。

[0032] 在一个实施方式中, 所有或几乎所有小鼠重链 V 基因片段由一种或多种人重链 V 基因片段所取代。在一个实施方式中, 所有小鼠重链 V 和 D 基因片段都由一种或多种人重链 V 和 D 基因片段所取代。在一个实施方式中, 所有小鼠重链 V、D 和 J 基因片段都由一种或多种人重链 V、一种或多种人重链 D 及一种或多种重链 J 基因片段所取代。在这些实施方式中, 人重链 V 和 / 或 D 和 / 或 J 基因片段处于小鼠内源重链基因座并可操作地连接于小鼠恒定区基因或经修饰的小鼠恒定区基因。

[0033] 在一个实施方式中, 小鼠包含编码缺少功能性 CH1 区域的 IgG 重链的 FR1、FR2 和 FR3 序列的核苷酸序列, 其与来自 1-8、1-18 或 1-69 的人免疫球蛋白重链可变区基因片段的人种系核苷酸序列的 FR1、FR2、和 FR3 有至少 80% 的同一性; 其中不考虑小鼠和人序列的 CDR 序列将经修饰的小鼠的 FR1+FR2+FR3 序列与所引用的人种系序列进行优化对比(即, 对 FR 进行优化对比, 而不在比较中考虑任何 CDR 的氨基酸的同一性)。在特定的实施方式中, FR1、FR2 和 FR3 与重链可变区基因片段为 1-8、1-18 或 1-69 基因片段的人种系核苷酸序列 FR1+FR2+FR3 有大约 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。

[0034] 在一个实施方式中, 小鼠进一步包含 FR4, 其与由人 D6-19/J6 重排、D6-7/J4 重排、D4-4/J4 重排、D6-6/J2 重排、D3-16/J6 重排、D6-6/J4 重排及 D1-7/J4 重排形成的 FR4 有至少 80% 的同一性。在特定的实施方式中, 所述 FR4 与由上述 D/J 重排形成的 FR4 有大约 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性。

[0035] 在一个实施方式中, 小鼠包含编码 FR1 的核苷酸序列, 所述 FR1 的氨基酸序列与由选自 V1-8、V1-18 和 V1-69 的人重链可变区基因片段的种系序列编码的 FR1 相差不超过 1 个、不超过 2 个、不超过 3 个、不超过 4 个或不超过 5 个氨基酸。在一个具体的实施方式中, 编码所述 FR1 的核苷酸序列为重排序列, 其可操作地连接于编码缺少功能性 CH1 序列的 IgG 恒定区的序列。

[0036] 在一个实施方式中, 小鼠包含编码 FR2 的核苷酸序列, 所述 FR1 的氨基酸序列与由选自 V1-8、V1-18 和 V1-69 的人重链可变区基因片段的种系序列编码的 FR2 相差不超过 1 个、不超过 2 个、不超过 3 个、不超过 4 个或不超过 5 个氨基酸。在一个具体的实施方式中, 编码所述 FR2 的核苷酸序列为重排序列, 其可操作地连接于编码缺少功能性 CH1 序列的 IgG 恒定区的序列。

[0037] 在一个实施方式中, 小鼠包含编码 FR3 的核苷酸序列, 所述 FR1 的氨基酸序列与由选自 V1-8、V1-18 和 V1-69 的人重链可变区基因片段的种系序列编码的 FR3 相差不超过 1 个、不超过 2 个、不超过 3 个、不超过 4 个、不超过 5 个、不超过 6 个、不超过 7 个、不超过 8 个、不超过 9 个、不超过 10 个或不超过 11 个氨基酸。在一个具体的实施方式中, 编码所述 FR3 的核苷酸序列为重排序列, 其可操作地连接于编码缺少功能性 CH1 序列的 IgG 恒定区的序列。

[0038] 在一个实施方式中, 小鼠包含编码 FR4 的核苷酸序列, 所述 FR4 的氨基酸序列与由选自人 D6-19/J6、D6-7/J4、D4-4/J4、D6-6/J2、D3-16/J6、D6-6/J4 和 D1-7/J4 的重排编码

的 FR4 氨基酸序列相差不超过 1 个、不超过 2 个、不超过 3 个氨基酸。在一个具体的实施方式中,编码所述 FR4 的核苷酸序列为重排序列,其可操作地连接于编码缺少功能性 CH1 序列的 IgG 恒定区的序列。

[0039] 在一个实施方式中,小鼠包含编码衍生自人重链 D 区域基因片段(hDH)的重链 CDR3 的核苷酸序列。在一个实施方式中,所述 hDH 选自 D1-7、D3-16、D4-4、D6-6、D6-7 和 D6-19。

[0040] 在一个实施方式中,小鼠包含编码衍生自人重链连接基因片段(JH)的重链 CDR3 的核苷酸序列。在一个特定的实施方式中,所述 JH 选自 J2、J4 及 J6。

[0041] 在一个实施方式中,小鼠包含由衍生自人 DH 和人 JH 重排的核苷酸序列编码的重链 CDR3。在一个具体的实施方式中,所述 CDR3 衍生自 D1-7/J4、D3-16/J6、D4-4/J4、D6-6/J2、D6-6/J4、D6-7/J4 或 D6-19/J6 重排。

[0042] 在一个实施方式中,小鼠包含 hVR 基因片段对内源 mVR 基因片段的取代。在一个具体的实施方式中,hVR 基因片段对内源 mVR 基因片段的取代与经修饰的重链恒定区在同一个等位基因上。在另一个具体的实施方式中,hVR 基因片段对 mVR 基因片段的取代与经修饰的重链恒定区在不同的等位基因上。

[0043] 在一个实施方式中,90-100%的 mVR 基因片段由至少一种 hVR 基因片段所取代。在一个具体的实施方式中,所有或几乎所有内源 mVR 基因片段被至少一种 hVR 基因片段所取代。在一个实施方式中,取代为用至少 18、至少 39 或至少 80 或 81 个 hVR 基因片段进行取代。在一个实施方式中,取代是用至少 12 个功能性 hVR 基因片段、至少 25 个功能性 hVR 基因片段或 43 个功能性 hVR 基因片段进行取代。

[0044] 在一个实施方式中,经遗传修饰的小鼠包含转基因,其包含至少一个非重排 hVR 基因片段、至少一个非重排人 D 片段、至少一个非重排人 J 片段以及至少一种人重链恒定序列。在一个实施方式中,内源小鼠重链可变区和 κ 轻链可变区基因座发生功能性沉默。在一个具体的实施方式中,小鼠能够反式转换而产生嵌合人/小鼠抗体,其包含与小鼠 IgG 序列相邻的人重链可变结构域,所述小鼠 IgG 序列缺少功能性 CH1 结构域并且任选的缺少所述缺少功能性 CH1 结构域的 IgG 的铰链区。在一个具体的实施方式中,转基因进一步包含缺少 CH1 结构域的 IgG 序列,且任选的包含具有功能性 CH1 结构域的 IgM。在一个进一步的具体的实施方式中,IgG 序列缺少铰链区。

[0045] 在一个实施方式中,小鼠包含第一个重链可变区等位基因和第二个重链可变区等位基因,其中第一个等位基因和第二个等位基因都源自相同的小鼠种系。在一个实施方式中,第一个等位基因来自第一种小鼠种系,第二个等位基因来自第二种小鼠种系。在一个实施方式中,第一和第二个等位基因的其中一个等位基因包含至少一个 hVR 对 mVR 的取代。在另一个实施方式中,两个等位基因都包含至少一个 hVR 对 mVR 的取代。

[0046] 在一方面,提供了经遗传修饰的小鼠,其中小鼠表达包含 CH1 结构域的 IgM,且此小鼠表达缺少功能性 CH1 结构域的 IgG 或表达缺少功能性 CH1 结构域并缺少功能性铰链区的 IgG。

[0047] 在一个实施方式中,所述 IgG 为 IgG1。

[0048] 在一个实施方式中,小鼠表达四种 IgG,为:经修饰的 IgG1 及野生型 IgG3、IgG2a 和 IgG2b。在另一个实施方式中,小鼠表达不超过两种 IgG,为:经修饰的 IgG1 和野生型

IgG3。在一个具体的实施方式中,小鼠表达的重链同种型为:野生型 IgM、野生型 IgD、野生型 IgG3、修饰的 IgG1、野生型 IgG2a、野生型 IgG2b、野生型 IgA 以及野生型 IgE。在另一个具体的实施方式中,小鼠表达的重链同种型为:野生型 IgM、野生型 IgD、野生型 IgG3、修饰的 IgG1、野生型 IgA 及野生型 IgE。在多个实施方式中,IgG1 的修饰包含 CH1 结构域的删除,以及任选的,含有铰链区的删除。

[0049] 在一个实施方式中,小鼠来自选自 129、C56BL/6、129xC57BL/6 杂交系的种系。

[0050] 在一个方面,提供了表达重链抗体的小鼠,其中重链抗体主要由二聚重链构成,其中重链缺少功能性 CH1 结构域或缺少功能性 CH1 结构域和功能性铰链区,所述重链包含哺乳动物重链可变结构域(其包含与种系可变区基因编码的哺乳动物重链可变结构域不相同的序列),且所述重链包含人或小鼠的 CH2 结构域及人或小鼠的 CH3 结构域,其中小鼠表达野生型人或小鼠 IgM。

[0051] 在一个实施方式中,小鼠包含功能性免疫球蛋白轻链基因基因座。

[0052] 在一个实施方式中,其中哺乳动物重链可变结构域为人或小鼠重链可变结构域。

[0053] 在一个实施方式中,重链抗体主要由缺少功能性 CH1 结构域并缺少功能性铰链区的二聚体重链构成,其中重链包含人可变结构域(其包含至少一个体细胞突变并包含 CH2 结构域和 CH3 结构域)。在一个具体的实施方式中,CH2 结构域和 CH3 结构域独立地选自小鼠和人结构域。在一个具体的实施方式中,CH2 和 CH3 结构域都来自人;在另一个实施方式中,CH2 和 CH3 结构域都是小鼠。

[0054] 在一个方面,提供了重链抗体,其中重链抗体包含的重链含有非骆驼可变结构域和缺少 CH1 结构域的重链恒定区。

[0055] 在一个实施方式中,重链抗体还缺少铰链区。

[0056] 在一个实施方式中,重链抗体包含主要由铰链区、CH2 结构域以及 CH3 结构域构成的恒定区。在另一个实施方式中,重链抗体包含主要由 CH2 结构域以及 CH3 结构域构成的恒定区。

[0057] 在一个实施方式中,非骆驼的可变结构域为体细胞突变的人或小鼠重链可变结构域,获自来自小鼠或包含人重链可变区基因片段的经遗传修饰的小鼠的 B 细胞的编码 IgM 或 IgG 的核苷酸序列。在一个特定的实施方式中,小鼠包含人源化的重链可变区基因片段。在另一个实施方式中,小鼠包含至少一种人可变区基因片段对内源小鼠重链可变区基因片段基因座的取代。在另一个实施方式中,小鼠包含至少一种人可变区基因片段、至少一种人 D 基因片段及至少一种人 J 基因片段对内源小鼠重链片段基因座的取代。在一个具体的实施方式中,内源小鼠免疫球蛋白可变区基因座全部地或几乎全部由包含多个人 V、D 和 J 基因片段的人重链可变区基因座取代。

[0058] 在一个实施方式中,非骆驼的可变结构域为人或小鼠可变结构域。在另一个实施方式中,非骆驼的可变结构域为包含一种或多种骆驼化修饰的人或小鼠可变结构域。在一个具体的实施方式中,骆驼化修饰选自 L11S、V37F、G44E、L45C、L45R 和 W47G (Kabat 编号)。在一个具体的实施方式中,骆驼化修饰选自 V37F、G44E 和 L45C。在一个具体的实施方式中,重链可变结构域包含互补决定区 3 (CDR3),其包含两个半胱氨酸。

[0059] 在一个实施方式中,重链抗体包含第一种重链(包含第一种重链可变结构域)和第二种重链(包含第二种重链可变结构域)的二聚体,其中第一种和第二种重链每种都缺少

CH1 结构域(或缺少 CH1 结构域和铰链区)。在一个实施方式中,二聚体的第一种重链的人可变结构域结合第一个表位,而二聚体的第二种重链的人可变结构域结合第二种表位,其中第一个和第二个表位不相同。在一个具体的实施方式中,第一种和第二种重链的重链可变结构域包含如本文所描述的人重链可变结构域及 / 或人重链 FR 区。

[0060] 在一方面,提供了经遗传修饰的非人细胞,其中遗传修饰包括删除 IgG CH1 结构域,且细胞表达功能性 IgM。在一个具体的实施方式中,细胞包含的 IgM 基因包含编码 CH1 结构域的序列。

[0061] 在一个实施方式中,细胞选自非人 ES 细胞、多能细胞及全能细胞。在一个具体的实施方式中,非人 ES 细胞选自小鼠 ES 细胞及大鼠 ES 细胞。

[0062] 在一方面,提供了经遗传修饰的非人胚胎,其中遗传修饰包括如本文所描述的修饰。在一个实施方式中,遗传修饰包括删除 IgG CH1 结构域,且非人胚胎表达功能性 IgM。在一个具体的实施方式中,非人胚胎包含的 IgM 基因包含 CH1 结构域。

[0063] 在一个实施方式中,非人胚胎为小鼠胚胎或大鼠胚胎。

[0064] 在一方面,提供了包含供体细胞的非人胚胎,其中供体细胞是经遗传修饰的,且其中遗传修饰为本文描述的修饰。在一个实施方式中,遗传修饰包括删除 IgG CH1 结构域,且细胞包含的 IgM 基因包含 CH1 结构域。

[0065] 在一个实施方式中,非人胚胎为小鼠胚胎或大鼠胚胎,供体细胞分别为小鼠 ES 细胞或大鼠 ES 细胞。

[0066] 在一方面,提供了 DNA 构建体。其中 DNA 构建体包含(a)同源于第一条序列 5' 并紧紧邻近于 IgG CH1 区域起始处的小鼠同源臂;(b)标记物或药物选择盒;以及(c)同源于第二条序列 3' 并紧紧邻近于 IgGCH1 区末端的小鼠同源臂或备选地,同源于第二条序列 3' 并紧紧邻近于 IgG 铰链区域末端的同源臂。

[0067] 在一方面,提供了用于产生缺少 CH1 结构域的抗体的方法,包括(a)对如本文所描述的非人动物进行免疫,所述动物在 IgG 中缺少功能性 CH1 结构域或在 IgG 中缺少功能性 CH1 结构域且缺少功能性铰链区,其中小鼠表达包含功能性 CH1 结构域的 IgM;(b)将所述非人动物维持在足以使非人动物产生抗体的条件下;(c)鉴定由缺少功能性 CH1 结构域或缺少功能性铰链区的小鼠产生的抗体;以及(d)从小鼠中分离抗体、产生抗体的细胞或编码抗体序列的核苷酸序列。

[0068] 在一个实施方式中,非人动物包含功能性的免疫球蛋白轻链基因基因座。

[0069] 在一个方面,提供了用于对小鼠重链抗体进行人源化的方法,包括用目的抗原免疫产生重链抗体的经遗传修饰的小鼠,使得小鼠不断产生(mount)免疫应答,鉴定小鼠 B 细胞中编码的小鼠 VH 区域(其中 B 细胞特异性结合目的抗原)以及对 VH 区域进行人源化。

[0070] 在一个实施方式中,产生重链抗体的经遗传修饰的小鼠为如本文描述的小鼠。在一个实施方式中,小鼠包含可操作地连接于重链恒定基因座的至少一种 mVR 基因片段,该重链恒定区基因座包含完整的 IgM 基因并包含缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域并缺少铰链结构域的 IgG 基因。在一个实施方式中,IgG 基因为 IgG1 基因。在一个实施方式中,IgG 基因选自 IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3 及其组合。

[0071] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括将编码人源化 VH 区域的核苷酸序列克隆至人免疫球蛋白恒定区的核苷酸序列上。

[0072] 在一个实施方式中,小鼠 mVR 基因片段来自小鼠 VH 基因家族,其选自 VH1 和 VH14,并且人源化过程包括用来自人 VH1 基因的骨架取代小鼠骨架 VH1 或 VH14。在一个实施方式中,人 VH1 基因选自 1-2、1-3、1-8、1-17、1-18、1-24、1-45、1-46、1-58 和 1-69。在特定的实施方式中,所述 mVR 基因为 1-58 基因且所述人基因为 1-18 基因;mVR 基因为 1-26 基因且人基因为 1-2 基因;mVR 基因为 1-50 基因且人基因为 1-46 基因;mVR 基因为 1-17 基因且人基因为 1-2 基因;mVR 基因为 1-42 基因且人基因为 1-2 基因;mVR 基因为 14-1 基因且人基因为 1-2 基因;或 mVR 基因为 14-2 基因且人基因为 1-2 基因。

[0073] 在一个实施方式中, mVR 基因片段来自小鼠 VH 基因,其选自 VH4、VH5、VH6、VH7、VH10、VH11 以及 VH13 基因,并且人源化过程包括用来自人 VH3 基因的骨架取代小鼠骨架。在一个实施方式中,人 VH3 基因选自 3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-16、3-20、3-21、3-23、3-30、3-33、3-35、3-38、3-43、3-48、3-49、3-53、3-64、3-66、3-72、3-73 和 3-74。在一个特定的实施方式中,mVR 基因为 7-1 基因且人基因为 3-72 基因;mVR 基因为 3-6 基因且人基因为 4-59 基因;mVR 基因为 5-6 基因且人基因为 3-21 基因。

[0074] 在一个实施方式中,mVR 基因片段来自小鼠 VH 基因家族,其选自 VH3 和 VH12,并且人源化过程包括用来自人 VH4 基因的骨架取代小鼠骨架。在一个实施方式中,人 VH4 基因选自 4-4、4-28、4-31、4-34、4-39、4-59 和 4-61。

[0075] 在一个实施方式中,mVR 基因片段来自小鼠 VH4 基因家族,并且人源化过程包括用来自人 VH6 基因的骨架取代小鼠 VH4 骨架。在一个实施方式中,人 VH 基因为 6-1。

[0076] 在一个实施方式中,mVR 基因片段来自小鼠 VH9 基因家族,并且人源化过程包括用来自人 VH7 家族的人 VH 基因的骨架取代小鼠 VH9 骨架。在一个实施方式中,人 VH6 基因选自 7-4-1 和 7-81。

[0077] 在一个实施方式中,人源化过程进一步包括产生小鼠 CDR 中的一个或多个保守性或非保守性置换、一个或多个删除、和 / 或一个或多个插入,以使小鼠 CDR 能更密切地对应于人的 CDR。

[0078] 在一个实施方式中,人源化过程进一步包括产生人骨架区中的一个或多个保守性或非保守性置换、一个或多个删除、和 / 或一个或多个插入,以使人骨架区能更密切地对应于小鼠骨架区。

[0079] 在一个方面,提供了经遗传修饰的小鼠,其包含功能性免疫球蛋白轻链基因,其中小鼠表达缺少轻链并缺少 CH1 区域或缺少 CH1 区域和铰链区的重链抗体。

[0080] 在一个实施方式中,小鼠包含缺少编码 CH1 区域的序列或缺少编码铰链和 CH1 区域的序列的免疫球蛋白基因。在一个实施方式中,缺少序列的免疫球蛋白是一种或多种重链恒定区基因。在一个具体的实施方式中,缺少序列的免疫球蛋白基因选自 IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG3 基因。在一个具体的实施方式中,小鼠包含具有 CH1 区域,和 / 或铰链区,和 / 或 CH1 区域和铰链区的 IgM。

[0081] 在一个实施方式中,抗体在对抗原进行应答时得到表达,且抗体特异性结合所述抗原。

[0082] 在一个实施方式中,抗体包含小鼠 VH 结构域。在一个具体的实施方式中,小鼠 VH 结构域包含小鼠 VH 基因片段,其选自 1-26、1-42、1-50、1-58、1-72、3-6、5-6、7-1、14-1 和 14-2。

[0083] 在一个实施方式中,抗体包含人 VH 结构域。在一个具体的实施方式中,人 VH 结构域包含衍生于选自 1-2、1-18、1-46、3-21、3-72 和 4-59 的人 VH 基因的序列。

[0084] 在一个方面,提供了经遗传修饰的小鼠,其表达主要由各自缺少 CH1 结构域的两条 IgG1 重链构成的结合性蛋白质,其中小鼠表达的 IgM 包含由 CH1 区域,且其中小鼠不能够由其自身的基因组表达包含编码 IgG1 的 CH1 结构域的核苷酸序列的 mRNA。

[0085] 在一个实施方式中,各自缺少 CH1 结构域的免疫球蛋白重链从 N 端到 C 端主要由人或小鼠重链免疫球蛋白可变区、任选的铰链区、小鼠 CH2 区域及小鼠 CH3 区域构成。在一个具体的实施方式中,重链免疫球蛋白可变区为人可变区,存在有铰链区,并且小鼠包含功能性轻链基因基因座。

[0086] 在一方面,提供了小鼠,其表达完全或部分缺少轻链及缺少 CH1 区域的重链抗体,其中小鼠在 B 细胞上表达 B 细胞受体,其表面上的 B 细胞受体展示了包含直接融合至免疫球蛋白铰链区或直接融合至 CH2 区域的免疫球蛋白重链可变结构域的结合分子,其中结合分子缺少 CH1 区域。在一个实施方式中,结合分子包含 IgG1CH2 和 CH3 区域。

[0087] 在一个方面,提供了用于产生重链抗体的方法,包括用目的抗原免疫小鼠,其中小鼠包含缺少编码 CH1 区域的序列的 IgG 基因,其中小鼠包含完好的 IgM 恒定区基因,使得小鼠不断产生针对目的抗原的免疫应答,还包括从小鼠中分离特异性识别目的抗原的细胞或蛋白质,其中的细胞或蛋白质包含缺少 CH1 结构域并缺少同源轻链及特异性结合目的抗原的重链抗体。

[0088] 在一个实施方式中,小鼠包含功能性轻链基因。在一个实施方式中,小鼠包含的功能性轻链基因,选自 λ 、 κ 及其组合。

[0089] 在一个实施方式中,小鼠包含一种或多种人 V、D、J 基因片段对所有或几乎所有小鼠重链 V、D、J 基因片段的取代。

[0090] 在一个实施方式中,缺少编码 CH1 的序列的 IgG 基因选自 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 及其组合。

[0091] 在一个实施方式中,缺少 CH1 序列的 IgG 基因为 IgG1,且小鼠缺少编码 IgG2a、IgG2b、IgG3 或其组合的基因。在一个实施方式中,缺少 CH1 序列的 IgG 基因为 IgG2a,且小鼠缺少编码 IgG1、IgG2b、IgG3 或其组合的基因。在一个实施方式中,缺少 CH1 序列的 IgG 基因为 IgG2b,且小鼠缺少编码 IgG1、IgG2a、IgG3 或其组合的基因。在一个实施方式中,缺少 CH1 序列的 IgG 基因为 IgG3,且小鼠缺少编码 IgG1、IgG2a、IgG3 或其组合的基因。

[0092] 在一个实施方式中,小鼠包含了在其表面有 B 细胞受体的 B 细胞,其中 B 细胞受体包含结合目的抗原的重排重链 VDJ,其中 B 细胞受体包含的 IgM 包含 CH1 区域,且其中 IgM 包含轻链。在一个实施方式中,轻链是 VJ 重排的。在一个具体的实施方式中,轻链为与结合目的抗原的重排重链 VDJ 同源的 κ 或 λ 轻链。

[0093] 在一个方面,提供了在根据本发明的小鼠中产生的小鼠重链抗体、人重链抗体或嵌合的人 / 小鼠重链抗体。

[0094] 在一个方面,提供了使用根据本发明的小鼠中产生的重链可变区核苷酸序列或其片段产生的小鼠重链抗体、人重链抗体、嵌合的人 / 小鼠重链抗体或人源化重链抗体。

[0095] 其他实施方式有所描述,并在本领域技术人员总览了接下来的详细描述后对其变得清楚。

[0096] 发明详述

[0097] 本发明不限于所描述的具体的方法和实验条件,这些方法和条件可以变化。本文所使用的术语只是用于描述特定的实施方式的目的,不意欲为限制性的,本发明的范围只会受到权利要求的限制。

[0098] 除非另有限定,本文使用的所有技术的和科学的术语与使用本发明的本领域普通技术人员一般理解的意义相同。尽管可在本发明的实践或测试中使用任何类似于或等价于本文所描述的那些的方法和材料,然而现在描述的是具体的方法和材料。本文提到的所有出版物都以其全部并入本文作为参考。

[0099] CH1 结构域及抗体产生

[0100] 提供了经遗传修饰的非人动物,其生产缺少一个 CH1 结构域的抗体,包括重链抗体,即,缺少轻链的抗体。经遗传修饰的非人动物包含的遗传修饰包括缺少功能性免疫球蛋白重链结构域(CH1 结构域),例如,IgG1 CH1 结构域,并且在一些实施方式中,有进一步的修饰,其包括缺少功能性 CH1 结构域的免疫球蛋白重链中铰链区的删除,其中所述非人动物表达功能性 IgM。其他修饰包括使得除 IgG1 和 IgM 之外的同种型变得无功能,例如,在 IgD、IgG3、IgG2a、IgG2b、IgA 和 IgE 的基因中制造删除或删除这些基因。还提供了经遗传修饰的非人胚胎、细胞及靶向构建体,用于产生所述非人动物、非人胚胎及细胞。

[0101] 在产生能生产重链抗体(即缺少轻链的抗体)的经遗传修饰的细胞上的工作集中在模拟其他物种中的重链抗体上,例如,骆驼和特定的鱼类。此方法已经用于将小鼠 ES 细胞遗传修饰为删除 IgM 和 IgG 基因中免疫球蛋白恒定区的 CH1 结构域,并向此 ES 细胞中引入骆驼或骆驼化的(即,VHH 或 VHH 样的)重链可变区。进行 IgM 和 IgG CH1 结构域的删除可能阻止内源、天然抗体的形成,其与形成于经遗传修饰的基因座的骆驼化抗体产生竞争。进行 VHH 基因片段的加入可能模拟与 CH1 删除相组合时重链抗体的形成。来自这些动物的重链抗体会包含 VHH 基因片段。VHH 基因片段被认为可能对重链抗体合适的表达是必须的,因为体外研究显示非骆驼 VH 结构域存在于缺少 CH1 结构域的重链中时,不能理想地形成可表达的重链抗体。

[0102] 然而,在骆驼中(以及在一些软骨鱼类中),存在包括 CH1 结构域或 CH1 样结构域的基因。认为包含 VHH 而缺少 CH1 结构域的抗体产生自 RNA 剪接或能够编码 CH1 区域的 DNA 序列的重排。因此,甚至骆驼都保留了编码 CH1 区域的 DNA 序列。因为(在一些情况下)人能够产生完全或部分缺少 CH1 区域的重链抗体(例如,在人的重链疾病中),可能可以驱使非骆驼动物如小鼠在特定的一组条件下形成缺少 CH1 区域的重链。此方法取决于不打乱 CH 的种系结构,但相反地使得此动物的轻链基因座无活性。这种方法的先决条件是带有无功能的轻链基因座时,那些需要同源轻链而表达的重链(例如,具有 CH1 区域的全长重链)由于缺少 κ 或 λ 轻链而不产生,这样只有那些能够在没有轻链时进行表达和分泌的重链(即,缺少 CH1 区域的重链)得到表达和分泌。该方法依赖于功能性 κ 或 λ 基因片段的缺失(其能重排形成功能性轻链基因),并取决于任何功能性重排的轻链基因的缺失,因此其需要进行遗传操作(例如,敲除)以破坏两个种系轻链基因座的功能性。该方法取决于导致内源 CH1 核苷酸序列不可用的“天然”过程,且所述 CH1 沉默的“天然”过程发生于类别转换中。似乎没有任何可能能在包含功能性轻链基因的动物中使用这样的过程。进一步地,似乎“天然”过程包括合成大量的正常 RNA,即,包括编码 CH1 区域的区域的 RNA。

[0103] 提供了组合物和方法,用于产生小鼠,以生产缺少免疫球蛋白 CH1 结构域(及任选的铰链区),其包括重链抗体并包括含有 VH 结构域的抗体(例如,小鼠或人 VH 结构域)。这些方法包括选择性地使内源的非 IgM CH1 区域变得无功能(例如,通过删除 CH1 结构域的序列)以及在内源小鼠可变区基因座采用非重排的内源小鼠可变区(mVR)基因片段或非重排的人可变区(hVR)基因片段以在小鼠中产生嵌合的人/小鼠抗体。对 CH1 结构域的删除是在一种或多种 IgG 基因中而不是在 IgM 基因中进行的。此方法选择性地使得一个或多个 IgG CH1 结构域变得无功能,而同时保留功能性 IgM。除了删除所述一个或多个 IgGCH1 结构域之外,提供了进一步的实施方式,用于删除其中的 CH1 结构域已经是删除或变得无功能的 IgG 的铰链区或使其无功能。

[0104] IgG CH1 删除方法采用了对动物中天然 B 细胞发育的相对保守性的破坏,因为不是经遗传修饰的非人动物的所有 Ig 同种型会显示出无功能的 CH1 (以及任选的铰链区)或 CH1 (以及任选的铰链区)结构域的删除。因此,CH1 修饰不发生于 IgM 分子中,并因此不会影响 B 细胞早期发育中依赖于具有功能性 CH1 的 IgM 的那些步骤。因为 IgM 没有经过修饰,因此具有 IgG 的 CH1 结构域(以及任选的 IgG 的铰链区)的一种或多种删除但不具有 IgM 的 CH1 结构域的删除的动物应当能够在就 IgG 而言可变结构域展示之前的克隆选择步骤中加工令人满意的大量可变区的库。因此,在多种实施方式中,对用于重链抗体的可变区的多样性上的遗传修饰的任何有害影响不会对用于就 IgG 进行选择的可变区的库有负面影响。进一步地,当种系中变得无功能(例如,删除)的 CH1 序列为 IgG1 时,小鼠会缺少产生任何编码 CH1 结构域的 RNA 的能力。

[0105] 对非人动物进行遗传修饰以使一种或多种 IgG 同种型的 CH1 结构域或 CH1 结构域及铰链区变得无功能,可以产生小鼠,其能够从 VH 结构域的完全或几乎完全的库中选择合适的 VH 区以在重链抗体中表达。对 IgG 同种型(而非 IgM)进行选择性地修饰避免了由于缺少 CH1 结构域或 IgM 中缺少 CH1 结构域,在选择中存活的 VH 区的数量的潜在的减少。因此,有可用于在(缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域及缺少铰链区的) IgG 情况下进行选择的更 VH 区的完全的库。因此,根据本发明,在经遗传修饰的小鼠中选择 VH 结构域不是根据例如哪种 VH 结构域可以帮助克服由于 IgM 结构修饰造成的早期 IgM 依赖的 B 细胞发育的障碍。相反地,早期 IgM 依赖的步骤应当如正常般发生,产生大的重链库,可用于根据其在缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域及缺少铰链区的 IgG 的情况下表达的合适度进行选择。

[0106] 因此,在多种实施方式中,根据本发明,经遗传修饰的小鼠应当维持功能性 IgM 表达,其应当提供进行更天然的克隆选择过程的机会。例如,替代的轻链以及同源轻链二者在有功能性 IgM (例如,不缺少 CH1 结构域的 IgM) 的情况下能够通过 IgM 的 CH1 结构域相联系并参与早期 B 细胞发育的选择过程。在根据本发明的经遗传修饰的小鼠中,认为发生向 IgG 同种型的类别转换是第一个选择步骤,其中发生了对能够在缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域及缺少铰链区的恒定结构域的情况下表达的重链可变结构域的任何选择。

[0107] B 细胞发育中的 IgM

[0108] 尽管在骆驼、特定鱼类以及病理条件下的观察显示了在一定环境下,缺少其重链恒定的 CH1 结构域的抗体可在缺少同源轻链的情况下表达,然而生产抗体的 B 细胞的正常发育一般需要 CH1 结构域的存在。所有重链同种型,包括 IgM,都包含 CH1 结构域。人们认为在 IgM 的情况下,替代的轻链和同源轻链都通过重链的 CH1 结构域与给定的重链相互作用

用。由于重链抗体的发育取决于 IgM 同种型重链的结构完整性或功能性,因此破坏 IgM 的结构完整性或功能是不可取的。

[0109] 抗体的正常发育要求抗体在多重复杂的选择方案中存活,这些选择方案导致功能性的有用的抗体的存活及最终表达。抗体结构的破坏对抗体的存活或最终表达不利,破坏的程度达到抗体不能有效地竞争和进化以满足一种或多种天然抗体选择方案。

[0110] 在抗体发育早期,抗体重链经历了一个选择过程,其中通过多种选择方案天然选择了合适的重链以进行进一步选择而最终形成功能性及亲和力成熟的抗体。始祖 B 细胞(或原 B 细胞)中表达自重组的抗体重链基因片段的重链正常地与替代轻链配对以在原 B 细胞表面上展示 IgM 同种型而形成称为前 B 细胞受体或前 BCR 的结构(其包括其他共受体)。一旦前 BCR 呈递在细胞表面上,认为前 BCR 将其复合体合适的形成的信号传递至细胞,有效地向细胞说明重链已经通过此早期选择步骤。因此,细胞了解到重链可进行进一步的选择。如果在 IgM 及替代轻链的情况下呈递时重链包含对前 BCR 形成有害的缺陷,细胞将经历凋亡。如果细胞经历凋亡,则重链的重链可变区的用途及对多样性的帮助会失去。因此,抗体选择的一个非常早期步骤要求在 IgM 同种型的情况下呈递重链和替代的轻链。替代轻链被认为至少部分地通过 IgM 的 CH1 结构域与 IgM 相互作用。在此早期时机的抗体结构的错误或破坏(例如,无功能的 CH1 结构域)可导致克隆选择失败、表达重链的原 B 细胞丧失以及丧失在可用抗体中采用特定重链可变结构域的可能。

[0111] 一旦具有前 BCR 的细胞通过了此选择步骤,下一步的选择步骤要求重链与同源轻链(例如,小鼠和人的 κ 或 λ) 配对。配对的重链 / 同源轻链结构在 IgM 同种型的情况下通过 IgM 的 CH1 结构域再次呈递在细胞(现在为初始 (**naïve**) 前 B 细胞)表面上。细胞表面的此复合体产生功能性的膜结合的 B 细胞受体(BCR)。认为此 BCR 将通知细胞重链适合于进行进一步选择以及细胞现在可以确定表达此具体的轻链并进行进一步的 B 细胞成熟步骤,包括亲和成熟及类别转换。如果在 IgM 及其同源轻链的情况下呈递时,重链包含对 BCR 形成有害的缺陷,细胞将经历凋亡。如果细胞经历凋亡,则重链的重链可变区的用途及对多样性的帮助会失去。因此,抗体选择一个的非常早期步骤要求在 IgM 同种型的情况下呈递重链和替代的轻链。再次地,在此早期的时机抗体结构的错误或破坏(例如,无功能的 CH1 结构域)可导致克隆选择失败、同时丧失表达重链的前 B 细胞。

[0112] 迄今已经在筛选中存活的前 B 细胞在 IgM 的情况下呈递与同源轻链配对的重链,然后经历成熟过程,最终导致类别转换以及进一步的选择机制,其中重链和同源轻链在 IgG 同种型的情况下呈递在 B 细胞表面上。在此步骤中可发生对缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域及缺少铰链区的 IgG 重链的任何选择。在根据本发明的动物中,认为重链可变区的正常库可用于基于可变结构域是否存活而被表达于缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域及缺少铰链区的 IgG 重链中而进行选择。相反地,具有受损的 IgM 的小鼠可能不能呈递重链可变区的完全库,因为只有能够在受损 IgM 的情况下在筛选中存活的可变区可用于类别转换。

[0113] 因此,缺少功能性 IgM 的动物在其他合适的重链可变基因片段发生重排之后其产生 B 细胞群体的能力可能有极大的减弱。在这样的情况下,甚至有丰富的重链可变区供应可用时(例如,动物具有合适数量的能够重排的重链可变区基因片段),展示有可取的多样化程度的令人满意的 B 细胞群体可能不能形成,因为 IgM 受到损害减少了选择过程中重链的存活。

[0114] 用功能性 IgM 基因生产重链抗体

[0115] 可取的是要维持在 IgM 环境下的 B 细胞发育中呈递时能够有效地在筛选中存活的重排重链可变区的合适数量以产生足够的多样性而通过用目的免疫原免疫非人动物产生抗体。因此,在免疫球蛋白重链中包含非功能性 CH1 结构域或非功能性 CH1 结构域及非功能性铰链区的经遗传修饰的非人动物应当不在 IgM 两个等位基因上都包含 CH1 删除。

[0116] 在一些实施方式中,不可取的是删除所有 Ig 同种型的 CH1 结构域以在经遗传修饰的动物中产生重链抗体。因此,提供了方法和组合物,用于通过失活、删除或使得编码 IgG 的 CH1 结构域或其片段的核苷酸序列无功能(在一些实施方式中还有失活、删除或使得所述 IgG 的铰链区无功能)同时使得其他同种型(例如, IgM)保留功能性 CH1 结构域,而在经遗传修饰的非人动物中产生重链抗体。人们相信其他同种型的 CH1 结构域(除了一种或多种所选的 IgG CH1 结构域)的功能性引起 B 细胞发育的过程,其不会破坏或基本上不破坏重链可变区在非 IgG 同种型如 IgM 同种型的情况下呈递的发育步骤。因此例如 B 细胞发育中 IgM 依赖的步骤的破坏相对得到最小化。不受本发明的限制(其由权利要求描述),本发明者提出与重链可变结构域在 IgM 情况下呈递相关的早期选择步骤的最小破坏会产生更多具有重链可变区细胞,其存活下来进行类别转换成为 IgG 同种型,并在缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域及缺少铰链区的 IgG 的情况下进行选择。

[0117] 因此,提供了经遗传修饰的非人动物,以及用于所述产生所述动物的方法和组合物,其中遗传修饰致使 Ig 结构域而不是 IgM 中功能性 CH1 结构域的缺失(在进一步的实施方式中缺失了功能性铰链区)。在多种实施方式中,在经遗传修饰的动物的基因组中删除了编码 CH1 或 CH1 及铰链区的序列(或其基本上的功能部分)。经遗传修饰的非人动物可用于产生重链抗体(即,缺少轻链的抗体),包括完全人抗体(经遗传修饰而包含人免疫球蛋白基因的小鼠中)以及嵌合的人/小鼠抗体(例如,在经遗传修饰而包含人可变区基因片段、D 区域和 J 区域的小鼠中,或在具有能够反式转换为缺少 CH1 结构域或缺少 CH1 结构域及缺少铰链区的经遗传修饰的 IgG 同种型的人转基因的小鼠中)。

[0118] 重链抗体

[0119] 抗体可用作人治疗剂。重链抗体即缺少轻链的抗体也可用作人治疗剂。因为重链抗体缺少轻链,所以其更小并因此预期会比包含轻链的抗体显示更好的组织穿透性,然而其含有类似或更有利的药物动力学谱,并仍然保留与常规抗体相比的类似效应子功能。因为其较小,所以重链抗体还能够在给定体积中以更高的剂量进行施用。常用的施用抗体的方法是通过皮下注射,对于给定抗体剂量,施用体积减小能够对患者提供益处并避免了皮下注射大体积造成的并发症及痛楚。

[0120] 重链抗体的另一个优势在于通过将对两个不同表位有特异性的重链异源二聚化于单一治疗剂中产生双特异性抗体。因为重链抗体缺少轻链,所以其尤其适合于产生双特异性抗体,因为不需要工程改造不干预任何一条重链的结合亲和力或特异性的普通轻链但还能够使得双特异性抗体得到合适的表达。

[0121] 本发明的经遗传修饰的动物可用于产生广泛多样的重链抗体。本文所描述的遗传修饰可在例如任何合适的小鼠种系中产生。小鼠种系可具有任何适合于产生所选的重链抗体的遗传背景。下文提供了包括了特定实施方式的一些遗传背景。

[0122] 所述经遗传修饰的动物可以为小鼠,其包含根据本发明的遗传修饰以及取代了内

源的小鼠重链可变区基因座的一种或多种非重排的人可变区基因片段、一种或多种非重排的 D 区基因片段以及一种或多种非重排的 J 区基因片段。在这样的小鼠中,人源化的可变区基因座能够重组以形成内源小鼠恒定结构域上游的重排可变区基因(其中一种或多种免疫球蛋白恒定区基因得到本文所描述的修饰)。因此小鼠能够产生嵌合的人可变区 / 小鼠恒定区重链抗体。在接触目的免疫原时,小鼠将能够生成根据本发明的重链抗体,其为亲和成熟的并能够特异性结合目的免疫原的表位。

[0123] 所述经遗传修饰的动物可以为小鼠,其包含的内源小鼠可变区包含非重排的内源小鼠可变区基因片段、非重排的内源小鼠 D 区基因片段以及非重排的内源小鼠 J 区基因片段,其中小鼠包含本文描述的小鼠重链恒定区的遗传修饰。小鼠因此能够产生小鼠重链抗体。在接触目的免疫原时,小鼠将能够生成根据本发明的重链抗体,其为亲和成熟的并能够特异性结合目的免疫原的表位。

[0124] 所述经遗传修饰的动物可以为小鼠,其包含的人转基因含有非重排的人可变区基因片段、非重排的人 D 区基因片段以及非重排的人 J 区基因片段, μ 基因及允许进行反式转换的序列。小鼠会进一步包含如本文所描述的小鼠重链恒定区的修饰。小鼠因此能够产生完全的人 IgM 抗体,并通过反式转换产生嵌合的人可变区 / 小鼠恒定区抗体,其中恒定区包含如本文所描述的遗传修饰。在接触目的免疫原时,小鼠将能够生成根据本发明的重链抗体,其为亲和成熟的并能够特异性结合目的免疫原的表位。

[0125] 体外表达重链抗体

[0126] 本发明者已经确认正常的人或小鼠重链可变区(hVR 或 mVR)可在缺少功能性 CH1 结构域的 IgG 的条件下在体外系统中表达。本发明者在具有野生型小鼠 IgM 的小鼠中从非重排的 hVR 微基因座表达 hVR。将所表达的 hVR 克隆至缺少 CH1 结构域的 IgG2b 上,用 hVR-IgG2b Δ CH1 瞬时转染 CHO 细胞,从而表达并分泌所产生的 hVR-IgG2b Δ CH1,这有效地确认了具有野生型 IgM 的小鼠中所选择的 hVR 在转换为缺少功能性 CH1 结构域的 IgG(即,为重链抗体)时可由细胞表达并分泌。

[0127] 本发明者构建了体外系统以在 CHO 细胞中表达缺少 CH1 结构域并具有 hVR 或人的骆驼化 VR(hVR*)的重链。VR 获自 RAG 小鼠,其包含用人重链可变区微基因座(有三个人 V 区基因片段,6-1、1-2 及 1-3,所有人 DH 基因片段,所有人 JH 基因片段)对内源小鼠重链基因座的取代。内源小鼠免疫球蛋白 κ 和 λ 轻链基因座是完好的并有功能的。

[0128] 产生嵌合重链(hVR-mFc)及骆驼化重链(hVR*-mFc)构建体用于在 CHO 细胞中进行表达,使用了获自具有上文描述的微基因座的小鼠的 VR 序列。嵌合重链为小鼠中 B 细胞发育过程中正常的 V-D-J 重组的产物,以形成包含嵌合重链(hVR-mFc)和小鼠轻链的功能性抗体。所产生的 hVR-mFc 和 hVR*-mFc 构建体都具有 CH1 结构域并缺少 CH1 结构域。

[0129] hVR-mFc 和 hcVR-mFc 构建体在 CHO 细胞中的瞬时转染显示没有 CH1 结构域时,具有 hVR 和 hVR* 的重链表达并保持溶于上清中。在存在有 CH1 结构域时,含有 hVR 或 hVR* 的重链不在上清中表达。此发现表明这些重链抗体可不采用骆驼 VHH 结构域而采用如人或小鼠 VH 结构域,在缺少 CH1 结构域的重链抗体中产生。

[0130] 人源化的重链抗体

[0131] 为产生本发明的重链抗体的人源化形式,用抗原免疫有纯合修饰的动物,一旦动物产生特异性免疫应答,则将来经免疫的动物脾脏的细胞与合适的永生化细胞相融合(例

如,骨髓瘤细胞)以产生杂交瘤细胞。备选地,抗体可直接获自经免疫动物的 B 细胞。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)筛选来自杂交瘤细胞的上清(或例如来自分离的 B 细胞)确定抗体的存在并根据需要的特征选择特异性针对所述免疫原的抗体。

[0132] 重链可变区(VH)核酸可使用本领域已知的标准分子生物学技术分离自杂交瘤和/或 B 细胞而获得(Sambrook, 等人 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y.; Ausubel, et al. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed., Wiley & Sons)。一旦确定了 VH 核酸序列,则可获得推导的氨基酸序列并与其他人 VH 序列相比较以鉴定一组具有类似序列的相关 VH 序列。相关 VH 序列可使用本领域技术人员可得到的抗体数据库获得,例如, The International ImMuNoGeneTics Information **System® (IMGT®)**。这种比较可通过用肉眼或备选地采用比对程序(如 CLUSTAL)用电子方法比对所完成的序列而进行比对。在此比较中,鉴定出互补决定区(CDR)及骨架区(FR)。CDR 和 FR 的残基根据标准序列定义而确定(例如, Kabat 等人 1987, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda Md.; Chothia and Lesk, 1987. *J. Mol Biol.* 196:901-917)。本领域技术人员会清楚可能偶尔存在对免疫球蛋白重链序列的 CDR 和 FR 区域的编号或确定方法上的分歧。在这些情况下,优选的是结构限定,然而,由序列限定方法鉴定出的残基被认为是用于确定基于重链序列比较可以置换哪些骨架区残基的重要 FR 残基。

[0133] 一旦进行了比对,就能鉴定出 VH 序列中可置换的位置。如果与其他人 VH 序列相比,分离的 VH 序列的某一位置的氨基酸的同一性发生变化,则评估所述位置在分离的 VH 序列的所述位置进行置换的合适度。因此,分离的 VH 序列中与相比的其他相关人 VH 序列有不同的任何位置可潜在地作为能够用其他一种或任何相关人 VH 序列中相应位置的氨基酸所置换的位置。将与其他相关人 VH 序列有同一性的位置(即,未表现出变化性的位置)确定为不可置换位置。在多种实施方式中,采用上文的方法以提供保守的人重链抗体序列。

[0134] 用于本文所描述的目的的人源化的重链抗体为免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段,其能够结合预先确定的抗原并包含具有与人 FR 氨基酸相比几乎类似或相同的氨基酸序列的 FR 区域以及具有与非人的 CDR 氨基酸相比几乎类似或相同的氨基酸序列的 CDR。一般地,人源化的重链抗体具有一个或多个衍生自非人来源的氨基酸残基。这些残基通常衍生自重链可变结构域。进一步地,这些残基可能有相关的特征例如亲和力和/或特异性以及其他想要的与抗体功能相关的生物学活性。

[0135] 在多种实施方式中,人源化的重链抗体基本上包含至少一个,在其他实施方式中至少两个这样的 VH 结构域,其中所有或几乎所有的 CDR 区域对应着非人 VH 结构域的 CDR 区域且所有或几乎所有的 FR 区域为人 VH 结构域序列的 FR 区域。人源化的重链抗体会包含唯一的免疫球蛋白恒定区(Fc),其在一个实施方式中缺少至少 CH1 结构域,在一个实施方式中还缺少人 Fc 的铰链区。在一个实施方式中,重链抗体不包含轻链并包含免疫球蛋白 G(IgG)重链恒定区的 CH2 和 CH3 区域。在一个实施方式中,重链抗体的恒定区包括 IgG 重链 Fc 的铰链、CH2 和 CH3 区域。在一个实施方式中,重链抗体的恒定区包括 IgM 的 CH1 区域。

[0136] 人源化的重链抗体可选自任何类型的 IgG,包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在多种实施方式中,恒定区可包含来自超过一种类型 IgG 的序列,选择特定的恒定区以优化想要的效应子功能,这一点本领域技术人员能力范围内。

[0137] 一般地,人源化重链抗体的重链 FR 和重链 CDR 区域不需要精确对应于亲本序列,例如,非人的重链 CDR 或人重链 FR 可通过置换、插入或删除至少一个残基而改变以使重链 CDR 或重链 FR 残基在给定的位点不对应于人重链 FR 序列或非人重链 CDR 区域。然而这些突变不会很剧烈。在一个实施方式中,至少 75% 的人源化的重链抗体残基对应亲本重链 FR 和重链 CDR 序列中的残基,在另一个实施方式中为 90%,在另一个实施方式中超过 95%。

[0138] 如本文所公开的人源化的重链抗体在一个实施方式中是通过计算机分析亲本序列及多种概念化人源化合成物序列而制备的,使用本领域技术人员可得及已知的计算机程序。产生人源化形式及 / 或用于改变如免疫原性、亲和力等等的特征的序列修饰是采用本领域已知方法产生的(例如 US 5,565,332 Hoogenboom 等人;US 5,639,641 Pedersen 等人;US 5,766,886 Studnicka 等人;US 5,859,205 Adair 等人;US 6,054,297 Carter 等人;US 6,407,213 Carter 等人;US 6,639,055 Carter 等人;US 6,849,425 Huse 等人;US 6,881,557 Foote;US 7,098,006 Gorman 等人;US 7,175,996 Watkins 等人;US 7,235,643 Nicolaides 等人;US 7,393,648 Rother 等人;US 7,462,697 Couto 等人)。

[0139] 在多种实施方式中,对亲本重链抗体序列做出的产生亲本重链抗体变体的所需置换为在一个实施方式中维持了或在另一个实施方式中增加了亲本重链抗体的抗原结合活性的置换。一般地,亲本重链抗体的重链抗体变体对具体抗原的抗原结合亲和力为亲本重链抗体的结合亲和力的至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 100%(例如,至少 150%、至少 200%、至少 500%、至少 1000% 或多至至少 10,000%)。在一些实施方式中,变体重链抗体与亲本重链抗体相比包含单一置换。然而,在其他实施方式中,与亲本重链抗体序列相比,数个衍生自在特定位置具有同一性的其他人重链抗体序列的氨基酸如多至大约 5 或 10 个或更多的氨基酸得到置换。在一个实施方式中,置换为保守性的(即,氨基酸与要取代的残基具有类似的特性),在另一个实施方式中为非保守性的(即,氨基酸与要取代的残基具有不同的特性)。在多个实施方式中,测试所得的变体重链抗体以确认取代残基没有显著降低所需的结合亲和力及 / 或特异性。在一些实施方式中,通过用来自不同的人重链序列的氨基酸进行置换产生了改善的变体重链抗体。

[0140] 已经表明天然发生的重链抗体(如,骆驼中发现的)在对应于传统抗体分子(即,两条重链和两条轻链的抗体)的重链轻链可变区交界处的位置上包含独特的氨基酸残基。已知传统抗体中这些交界处的残基影响这两条链相互之间的位置和方向。尽管已知这些天然重链抗体包含与缺少轻链可变区相关的残基的取代,然而与传统抗体相比其在序列的其他位置上保留了这些残基以保留特征性的免疫球蛋白折叠。发现于天然重链抗体中的置换为 L11S、V37F、G44E、L45R 或 L45C、W47G 以及添加的半胱氨酸残基,其有助于重链可变区的 CDR1 和 CDR3 之间二硫键的形成。在一些实施方式中,本发明的重链抗体可在这些位置保留亲本抗体的残基。在其他实施方式中,亲本抗体在这些位置有与天然重链抗体中残基相关联的突变。在一些实施方式中,可取的是在至少这些位置之一保留亲本重链抗体中发现的相同残基或,在一个实施方式中要产生衍生自来自如本文描述的经遗传修饰的小鼠的分离的 VH 序列的人源化重链抗体时保留这些位置的全部残基。在多种实施方式中,本领域技术人员会理解的是,合理地,不预期这些交界处残基参与由本文描述的经遗传修饰的小鼠产生的重链抗体中的链间相互作用。

[0141] 产生经遗传修饰的动物

[0142] 用于产生表达重链抗体的动物的遗传修饰通过使用小鼠作为说明方便地得到描述。根据本发明的经遗传修饰的小鼠可以多种方式产生,尤其是根据下文讨论的实施方式产生。

[0143] 图 1 中提供了 IgG1 基因座的示意图(非等比例,上图)以显示 IgG1 基因座处的 CH 结构域排列。如图示的,结构域 CH1、CH2 和 CH3 及铰链区存在于转换区域下游,形成可容易鉴别的核苷酸范围。

[0144] 缺少编码 IgG1 的 CH1 结构域的核苷酸序列但包含铰链区的经遗传修饰的小鼠可通过任何本领域已知方法产生。例如,可产生靶向载体,用缺少编码 CH1 结构域序列但包含铰链区序列的截短的 IgG1 取代 IgG1 基因。图 2 显示了由具有 5' (相对于基因组 IgG1 基因转录方向)同源臂的靶向构建体所靶向的小鼠基因组(上图),所述 5' 同源臂包含内源 CH1 结构域上游的序列,接着为编码 IgG1 铰链、IgG1 CH2 结构域、IgG1 CH3 结构域、药物选择性盒(例如,lox 抗性基因)和 IgG1 跨膜结构域的核苷酸序列以及含有相对跨膜结构域位于 3' 端的 3' 同源臂。在此基因座发生同源重组及移除药物选择性盒(例如通过 Cre 处理)时,内源 IgG1 由缺少 CH1 结构域的 IgG1 取代(图 2 的下图;lox 位点未显示)。图 1 (IgG1 Δ CH1, 中图)显示了所产生的基因座的结构,其可表达具有融合至铰链序列的 J 区序列的 IgG1。

[0145] 缺少编码 IgG1 的 CH1 结构域的核苷酸序列并缺少编码铰链区的核苷酸序列的经遗传修饰的小鼠可通过本领域已知的任何方法产生。例如,可产生靶向载体,用缺少编码 CH1 结构域的序列并缺少编码铰链区的序列的截短的 IgG1 取代 IgG1 基因。图 3 显示了具有 5' (相对于基因组 IgG1 基因转录方向)同源臂的靶向构建体所靶向的小鼠基因组(上图),所述 5' 同源臂包含内源 CH1 结构域上游的序列,接着为编码 IgG1 CH2 结构域、IgG1 CH3 结构域、药物选择性盒(例如,lox 抗性基因)和 IgG1 跨膜结构域的核苷酸序列以及含有相对跨膜结构域位于 3' 端的 3' 同源臂。在此基因座发生同源重组及移除药物选择性盒(例如通过 Cre 处理)时,内源 IgG1 由缺少 CH1 结构域的 IgG1 取代(图 3 的下图;lox 位点未显示)。图 1 (IgG1 Δ CH1- Δ hinge, 下图)显示了所产生的基因座的结构,其可表达具有融合至 CH2 结构域的 J 区序列的 IgG1。

[0146] 可通过删除一种或多种其他 IgG 同种型如删除或使编码 IgG2b 和 IgG2a 的序列失活,而对缺少 IgG1 CH1 序列(IgG1 Δ CH1),或缺少 IgG1 CH1 序列并缺少铰链(IgG1 Δ CH1- Δ hinge)的经遗传修饰的小鼠进行进一步的修饰以增强经修饰的 IgG1 同种型的用途。例如,产生具有的靶向构建体,所述 5' 同源臂包含内源铰链区序列上游的序列(或内源 CH1 结构域序列上游的序列),编码 IgG1 CH2 和 CH3 结构域、药物选择性盒的序列,随后为编码 IgG1 跨膜结构域的序列,如果需要,后面还有另一个药物选择性盒。在此基因座发生同源重组及移除药物选择性盒(例如通过 Cre 处理)时,内源重链恒定区基因座只包含两种 IgG 基因:内源 IgG3 及 IgG1 Δ CH1(见图 4, 下图;重组酶位点未显示;见图 6, 下图)或 IgG1 Δ CH1- Δ hinge (见图 5, 下图;重组酶位点未显示;见图 6, 下图)。

[0147] 具有 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 或 IgG1 Δ CH1 Δ IgG2a Δ IgG2b 等位基因的经遗传修饰的小鼠中表达的 IgG1 将具有如图 10 右区所显示的结构,即 VH 结构域会融合至 CH2 结构域。作为比较,图 10 的左区提供了野生型 IgG1 抗体,显示其 CH1 结构域通过铰链区连接于 CH2 结构域,并通过二硫键连接于轻链恒定结构与 CL。相反,所述经遗传修饰的小鼠产生的抗体

缺少铰链和 CH1 结构域并因此缺少 CL 结构域。

[0148] 如上文描述的以及其他的经遗传修饰的小鼠是通过如下方法产生：将合适的靶向构建体引入合适的小鼠 ES 细胞（产生一个或多个独立的靶向），鉴别出包含靶向构建体的标记物或选择性盒的阳性克隆并进行培养。然后在适合产生嵌合小鼠或完全的 ES 细胞衍生小鼠的条件下采用这些克隆作为供体 ES 细胞进入宿主胚胎。任选的，在 ES 细胞阶段或者在嵌合或 ES 细胞衍生小鼠阶段移除标记物或选择盒，例如通过使用 lox 盒并与包含 Cre 的种系杂交，或通过对 ES 细胞进行电穿孔引入 Cre 表达载体。

[0149] 根据本发明一个实施方式产生具有 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 等位基因（杂合）的经遗传修饰的小鼠。从小鼠分离血清并在使用抗小鼠 IgG1 抗体的 Western（还原条件）中进行印迹以检测重链。野生型小鼠显示有对应于野生型 IgG1 重链大小的条带，与此相反，被修饰为含有 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 等位基因的经遗传修饰的小鼠还表达与抗小鼠 IgG1 抗体反应的重链，其具有的大小为由一个 VH、CH2 和 CH3 结构域构成的重链抗体大小（见图 8）。

实施例

[0150] 实施例 1：重链抗体的体外表达

[0151] 嵌合重链构建体通过分子生物学技术产生（例如，见 Maniatis 等人 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory），将人可变区与小鼠 IgG2b（mIgG2b）的恒定区相融合。每种构建体的人可变基因片段都为全长人可变基因片段，包含两个外显子（即，前导序列加成熟序列），其鉴定来自分离自初始 RAG 小鼠的 IgM 的 hVR，所述小鼠包含用三个 hVR 基因片段、所有的 hDH 基因片段以及所有 hJH 基因片段对源小鼠免疫球蛋白重链基因座的取代。IgM 抗体的轻链为小鼠轻链。

[0152] 使用了 mIgG2b 序列的两种形式；一种具有另一种不具有 CH1 结构域。还构建了数种其他的构建体以作为转染及表达的对照。第一种对照构建体是使用融合至小鼠 IgG2a（mIgG2a）恒定区的 CH2 和 CH3 结构域的细胞因子受体构建的（I 号对照）。两种另外的对照是通过将小鼠 ROR 信号序列融合至具有及不具有 CH1 结构域的小鼠 IgG2a 序列而构建的（分别为 II 号和 III 号对照）。

[0153] 还使用了 PCR 定点诱变技术构建了每种人可变区的骆驼化形式（例如，见 Hutchinson 等人 1978. *Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence*. *J. Biol. Chem.* 253 (18):6551-60）。对每种可变区使用了两个特异性引物组在人可变区序列内产生特异性区域，产生包含骆驼样特征的人可变区序列。引物 L1（SEQ ID NO:1）和 HH1.2 mut BOT（SEQ ID NO:2）用于扩增包含可变区 5' 半区的一个产物而引物 HH1.2 mut TOP（SEQ ID NO:3）和 m18.3.1（SEQ ID NO:4）用于扩增包含可变区的 3' 半区。这些产物得到纯化并相混合作为第三次 PCR 反应的模板，其中使用引物 L1 和 m18.3.1。对产生的骆驼化人可变区 PCR 产物进行克隆、纯化并通过测序进行确认。

[0154] 通过用包含限制性酶切位点的引物扩增人可变区（骆驼化及非骆驼化）及恒定区，随后可通过粘性末端而连接，产生全长重链构建体（可变区及恒定区）。将全长重链构建体克隆入表达载体，对其进行纯化并通过测序再次确认。表 1 列出了各个重链构建体，其 SEQ ID NO 及对各个构建体的简短描述。

[0155]

表 1

构建体	描述	SEQ ID NO (DNA/蛋白质)
hVR-mFc	融合至小鼠 IgG2b 的非骆驼化的人可变区	5/6
hVR*-mFc	融合至小鼠 IgG2b 的骆驼化的人可变区	7/8
hVR-mFc Δ CH1	融合至缺少 CH1 结构域的小鼠 IgG2b 的非骆驼化的人可变区	9/10
hVR*-mFc Δ CH1	融合至缺少 CH1 结构域的小鼠 IgG2b 的骆驼化的人可变区	11/12

[0156] 将嵌合重链构建体瞬时转染中国仓鼠卵巢细胞(CHO-K1)中,分析不存在免疫球蛋白轻链时的表达情况。通过 Western 印迹检查上清及细胞裂解物,使用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗小鼠 IgG 抗体(Promega)通过化学发光以检测重链的存在情况。对所有的嵌合重链构建体进行六(6)次独立的瞬时转染。转染产物代表性的 Western 印迹显示于图 7。

[0157] 所有嵌合重链构建体,具有和不具有 CH1 结构域,以及对照构建体都在细胞裂解物中检测到。只有缺少 CH1 结构域的构建体能在上清中观察到(图 7,左)。I 号和 III 号对照(缺少 CH1 结构域的小鼠 Fc 蛋白质)也检测到(图 7),但是包含 CH1 结构域的小鼠 Fc 蛋白质没有检测到。包含 CH1 结构域的非骆驼化及骆驼化的重链构建体在任何转染的上清中都没有检测到(图 7,右)。然而,缺少 CH1 结构域的非骆驼化及骆驼化的人重链构建体在所有转染的上清中都检测到。综上,结果确认了在没有免疫球蛋白轻链时,瞬时转染的 CHO 细胞可表达和分泌缺少 CH1 结构域的(正常或骆驼化的)hVR,而在没有轻链时,不分泌包含 CH1 结构域的(正常或骆驼化的)hVR。

[0158] 实施例 2:小鼠重链 IgG1 恒定区的修饰

[0159] A. 小鼠 IgG1-CH1-Hinge 靶向载体的制备(图 3)

[0160] 构建了靶向构建体,用于对来自**VELOCIMMUNE®**小鼠(描述于下文)的 ES 细胞的 C57BL/6 等位基因引入小鼠 IgG1 恒定结构域的 CH1 和铰链区的删除。

[0161] 靶向构建体是使用**VELOCIGENE®**技术产生的(见,例如美国专利号 6,586,251 及 Valenzuela 等人(2003)High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis,Nature Biotech. 21(6):652-659),以修饰细菌人工染色体(BAC)BMQ 70p08。修饰 BMQ 70p08 BAC DNA 以删除 IgG1 恒定结构域的 CH1 及铰链区同时使得剩余的 IgG1 基因保持完好(例如,CH2、CH3 及转膜外显子)。

[0162] 简言之,分别使用引物 m102 (SEQ ID NO:13)和 m104 (SEQ ID NO:14)和 m100 (SEQ ID NO:15)和 m99 (SEQ ID NO:16)产生上游和下游的同源臂。这些同源臂用于产生删除了 IgG1 恒定结构域的 CH1 及铰链区而保留 IgG1 恒定结构域的 CH2、CH3 及跨膜区的盒(见,例如图 3)。靶向构建体包括位于 IgG1 基因的 CH3 和跨膜结构域外显子之间的 lox 潮霉素抗性基因。CH1 及铰链外显子上游(例如, IgG3、IgD、IgM)的基因及 IgG1 转膜外显子下游的基因(例如, gG2b、IgG21、IgE、IgA 等等)不受靶向构建体的修饰。所有恒定结构域的转

化区域不受靶向构建体的修饰。穿过删除部分的核苷酸序列如下所示,其表示存在于删除点的剪接受体序列: TGACAGTGTAAATCACATATA CTTTTTCTTG T (AG)TCCCAGA AGTATCATC (SEQ ID NO:17)。删除序列包含剪接受体(上文括号中包含的 AG)及剪接受体 5' 端的前-CH1 序列以及剪接受体 3' 端的前-CH2 外显子序列。

[0163] B. 小鼠 IgG1-CH1 靶向载体的制备(图 2)

[0164] 用于对来自 **VELOCIMMUNE®** 小鼠(描述于下文)的 ES 细胞的 129/SvEvTac 等位基因引入小鼠 IgG1 恒定结构域的 CH1 的删除的第二种靶向构建体是通过与本实施例的 A 部分中描述类似方式构建的。

[0165] 靶向构建体是使用 **VELOCIGENE®** 技术产生的(见,例如美国专利号 6,586,251 及 Valenzuela 等人(2003)High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21 (6):652-659)以修饰细菌人工染色体(BAC)BMQ 70p08。修饰 BMQ 70p08 BAC DNA 以删除 IgG1 恒定结构域的 CH1 区域同时使得剩余的 IgG1 基因保持完好(例如,铰链、CH2、CH3 及转膜外显子,见图 2)。

[0166] 第二种靶构建体的同源臂与 CH1-Hinge 靶向载体的相同(如上文实施例的 A 部分所描述)。这些同源臂用于产生删除了 IgG1 恒定结构域的 CH1 区域而保留 IgG1 恒定结构域的铰链、CH2、CH3 及跨膜区的盒(见,例如图 2)。靶向构建体包括位于 IgG1 基因的 CH3 和跨膜结构域外显子之间的 lox 潮霉素抗性基因。CH1 外显子上游的基因(例如, IgG3、IgD、IgM)及 IgG1 转膜外显子下游的基因(例如, IgG2b、IgG21、IgE、IgA 等等)不受靶向构建体的修饰。所有恒定结构域的转化区域不受靶向构建体的修饰。穿过删除部分的核苷酸序列如下所示,其表示存在于删除点的剪接受体序列: TGACAGTGTAAATCACATATA CTTTTTCTTG T (AG)TGCCCAG GGATTGTGGTTGTAAGCCTT GCATATGTAC AGGTAAGTCA GTAGGCCTTTCACCCTGACC C (SEQ ID NO:64)。删除序列包含剪接受体(上文括号中包含的 AG)及剪接受体 5' 端的前-CH1 序列以及剪接受体 3' 端的铰链外显子序列。

[0167] 实施例 3:ES 细胞中小鼠重链恒定区的修饰

[0168] A. 用 IgG1-CH1-Hinge 靶向载体靶向小鼠 ES 细胞

[0169] 用上文描述的靶向构建体靶向小鼠 ES 细胞(即,引入 IgG1 基因的 CH1 及铰链区的删除的靶向构建体)。ES 细胞来自 **VELOCIMMUNE®** 小鼠,其为 129 种系和 C57BL/6 种系的 50/50 杂交种系,具有遗传修饰而包含用非重排的人重链和轻链可变区基因片段对小鼠重链和轻链可变区基因片段的取代。用来与 C57BL/6 杂交的 129 种系为包含用非重排的人重链和轻链可变区基因片段对小鼠重链和轻链可变区基因片段的取代的种系。

[0170] 杂合的 **VELOCIMMUNE®** 小鼠在一个等位基因上有来自 129 种系的一组内源小鼠重链恒定区基因,在另一个等位基因上有来自 C57BL/6 种系的一组内源小鼠重链恒定区基因。129 重链等位基因邻近重链可变区基因片段(为人重链可变区基因片段,取代了内源小鼠重链可变区基因片段(即,在内源小鼠基因座))的基因座。BL/6 重链等位基因邻近野生型小鼠重链可变区基因片段。**VELOCIMMUNE®** 小鼠还可具有野生型内源小鼠轻链恒定区基因。因此,通过用包含 IgG、D、E 或 A 的 CH1 删除的构建体靶向 129 等位基因可产生嵌合的人/小鼠重链抗体,而以类似的构建体靶向 C57BL/6 等位基因,可产生缺少 CH1 结构域并缺少铰链区的完全的小鼠重链抗体。

[0171] 用实施例 2 的 A 部分的线性化靶向载体电穿孔来自上文描述的 **VELOCIMMUNE®** 小鼠的 ES 细胞并根据潮霉素抗性基因的存在情况进行选择。

[0172] B. 用 IgG1-CH1 靶向载体靶向小鼠 ES 细胞

[0173] 以相似的方式,用描述于实施例 2 的 B 部分的 CH1 靶向构建体靶向小鼠 ES 细胞(又见图 2)。ES 细胞来自 **VELOCIMMUNE®** 小鼠,其为 129/SvEvTac 种系和 C57BL/6 种系的 50/50 杂交种系,具有遗传修饰而包含非重排的人重链和轻链可变区基因片段对小鼠重链和轻链可变区基因片段的取代。用来与 C57BL/6 杂交的 129/SvEvTac 种系为包含用人重链和轻链可变区基因片段对小鼠重链和轻链可变区基因片段的取代的种系。

[0174] 杂合的 **VELOCIMMUNE®** 小鼠在一个等位基因上有来自 129/SvEvTac 种系的一组内源小鼠重链恒定区基因,在另一个等位基因上有来自 C57BL/6 种系的一组内源小鼠重链恒定区基因。129/SvEvTac 重链等位基因邻近重链可变区基因片段(为人的重链可变区基因片段,取代了内源小鼠重链可变区基因片段(即,在内源小鼠基因座))的基因座。BL/6 重链等位基因邻近野生型小鼠重链可变区基因片段。**VELOCIMMUNE®** 小鼠还可具有野生型内源小鼠轻链恒定区基因。因此,通过用包含 IgG、D、E 或 A CH1 删除的构建体靶向 129/SvEvTac 等位基因可产生嵌合的人 / 小鼠重链抗体,而用类似的构建体靶向 C57BL/6 等位基因,可产生缺少 CH1 结构域并缺少铰链区的完全的小鼠重链抗体。

[0175] 用实施例 2 的 B 部分的线性化靶向载体电穿孔来自上文描述的 **VELOCIMMUNE®** 小鼠的 ES 细胞并根据潮霉素抗性基因的存在情况进行选择。

[0176] 实施例 4:携带经修饰的 IgG1 恒定区的小鼠的产生

[0177] A. 携带 IgG1-CH1-Hinge 删除的小鼠

[0178] 将上文描述的所靶向的 ES 用作供体 ES 细胞并通过 **VELOCIMOUSE®** 方法引入 8- 细胞期小鼠胚胎中(见例如美国专利号 7,294,754 及 Poueymirou 等人(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.)。通过使用可检测出位于删除的铰链及 CH1 区上游及下游的序列的修饰的等位基因测定法(Valenzuela 等人,见上文)进行基因分型鉴定出具有所靶向的 C57BL/6 IgG1 等位基因的 **VELOCIMICE®**(完全衍生自供体 ES 细胞的 F0 小鼠)。

[0179] 进行了 IgG1 CH1 和铰链区删除(在 C57BL/6 等位基因,即小鼠等位基因上)的基因分型的小鼠与 Cre 删除子的小鼠种系杂交(见例如,国际专利申请公开号 WO 2009/114400)以移除 IgG1 CH3 外显子下游及 IgG1 跨膜外显子上游由靶向构建体引入的 lox hyg 盒(见例如图 3)。对幼鼠进行基因分型,并选择 IgG1 CH1 及铰链区删除杂合的幼鼠检查该幼鼠血清中表达自 C57BL/6 等位基因的 IgG1 重链。

[0180] B. 携带 IgG1-CH1 删除的小鼠

[0181] 以类似的方式,将携带 IgG1 CH1 区域删除的靶标 ES 细胞用作供体 ES 细胞并通过 **VELOCIMOUSE®** 方法引入 8- 细胞期小鼠胚胎中(见例如美国专利号 7,294,754 及 Poueymirou 等人(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)。通过使用可检测出位于删除的 CH1 区上游及下游的序列的修饰的等位基因测定法(Valenzuela 等人,见上文)进行基因分型鉴定出具有靶标 129SvEv/Tac

等位基因的**VELOCIMICE®** (完全衍生自供体 ES 细胞的 F0 小鼠)。

[0182] 进行了 IgG1 CH1 区删除(在 129/SvEvTac 等位基因,即人等位基因上)的基因分型的小鼠与 Cre 删除子的小鼠种系杂交(见例如,国际专利申请出版物号 WO 2009/114400)以移除 IgG1 CH3 外显子下游及 IgG1 转膜外显子上游由靶向构建体引入的 lox hyg 盒(见例如如图 2)。对幼鼠进行基因分型,并选择 IgG1 CH1 区删除纯合的幼鼠检查修饰的 IgG1 重链的表达。

[0183] 实施例 5:来自携带经修饰的 IgG1 基因的小鼠的重链抗体

[0184] A. IgG1- Δ CH1- Δ hinge 小鼠

[0185] 对如上文鉴定为包含 CH1 和铰链区删除的小鼠幼鼠与野生型幼鼠进行放血,制备来自放血的小鼠的血清用于 Western 印迹以使用抗 μ IgG1 抗体鉴定血清中任何表达的 IgG。简言之,取 10 μ L 的小鼠血清 1:100 稀释液用于还原性 SDS-PAGE,将凝胶转移至 PVDF 膜。以溶于含 0.05% Tween-20 (TBST;Sigma)的 Tris 缓冲盐溶液中的 5% 脱脂牛奶封闭杂交膜过夜,以 TBST 洗涤 4 次,每次 5 分钟,然后孵育一抗(缀合 HRP 的羊抗 μ IgG1, Southern Biotech, 1:1,000 稀释于溶于 TBST 的 1% 脱脂牛奶),室温下孵育两个小时。杂交膜洗涤 6 次,每次 5 分钟。用 SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)对杂交膜进行 5 分钟的显色并用胶片曝光 1 分钟。

[0186] 来自衍生于所靶向的供体 ES 的**VELOCIMOUSE®**(50% 野生型 BL/6;50% Δ CH1- Δ hinge BL/6)的血清显示混合的条带:一条大约 57.5kD,为野生型 IgG 的预期大小,还有一条带为大约 45kD,为缺少 CH1 结构域及铰链区的 IgG 预期大小(图 8)。这些结果与**VELOCIMOUSE®**表达来自野生型 BL/6 等位基因的正常小鼠重链及来自其 Δ CH1- Δ hinge BL/6 等位基因的 Δ CH1/ Δ hinge 小鼠重链的情况相一致。此结果确认了具有功能性 IgM 基因及缺少 CH1 结构域及铰链结构域的 IgG 基因的经遗传修饰的小鼠能够在血清中表达重链抗体。

[0187] B. IgG1- Δ CH1 小鼠

[0188] 以类似的方式,对 CH1 删除纯合小鼠幼鼠与野生型幼鼠进行放血。由放血的小鼠制备血浆和血清(5 个纯合子;2 个野生型)用于 Western 印迹以使用抗 μ IgG1 抗体(如上文描述的)鉴定血清中任何表达的 IgG。来自纯合 IgG1- Δ CH1 删除的小鼠的血清和血浆其 Western 印迹显示混合的条带:一条带为大约 45kD,为缺少 CH1 结构域的单链 IgG1 的预期大小,还有一条带为大约 75kD,为缺少 CH1 结构域的二聚体 IgG 预期大小(数据未显示)。这些结果符合纯合**VELOCIMICE®**从其一个或两个重链基因座表达 IgG1- Δ CH1 重链的情况。此结果确认了具有功能性 IgM 基因及缺少 CH1 结构域的 IgG 基因的经遗传修饰的小鼠能够在动物免疫系统的外周血淋巴细胞区室表达重链抗体。

[0189] 实施例 6:对 IgG1-CH1-Hinge 删除纯合的小鼠的鉴定

[0190] 将对 CH1-hinge 删除杂合的**VELOCIMICE®**进行杂交以获得对该删除纯合的小鼠。鉴定出四个小鼠幼鼠为 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 纯合子。将这四只小鼠及野生型小鼠放血并从放血的小鼠制备血清进行 Western 印迹,以抗 μ IgG1 抗体鉴定血清中任何表达的 IgG (如上文所描述)。图 9 显示了此实验中 PVDF 膜曝光的胶片结果。血清以 1:5 和 1:10 稀释,对每只小鼠取 10 μ L 的每种稀释物挨个地加样至凝胶中。在凝胶图像的上部,标记了每只小鼠及 IgG1 (1) 和 IgG2a (2a) 对照的泳道。

[0191] 来自野生型小鼠的血清显示表达包含两条重链和两条轻链的正常抗体(大约 150kD)的野生型小鼠的预期形式。所有四只(对 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 纯合)小鼠各自显示出混合条带:一条带大约 150kD,为野生型 IgG 而不是 IgG1 (例如 IgG2a、IgG2b 或 IgG3)的预期大小,还有一条带为大约 45kD,为缺少 CH1 结构域和铰链区的 IgG 的预期大小(图 9)。这些结果符合小鼠表达缺少 CH1 结构域和铰链区并缺少轻链的 IgG1 重链抗体的情况。此结果进一步确认了具有功能性 IgM 基因及缺少 CH1 结构域及铰链结构域的 IgG 基因的经遗传修饰的小鼠能够在血清中表达重链抗体。

[0192] 在另一个实施方式中,使用 ELISA 测定法测试来自对 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 纯合的小鼠的 IgG 的血清表达。简言之,对特异于 mIgG1 或 mIgG2b (Pharmingen) 的抗体分别进行稀释并取 100 μ l/well 包被平板,浓度为 2 μ g/mL 溶于 1x PBS (Irvine Scientific),在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第二天,将平板用含有 0.05%Tween-20 的 PBS (PBST;Sigma) 洗涤四次。第四次洗涤之后,以 250 μ L/ 孔的含 5%BSA (Sigma)的 PBST 封闭平板,并在室温孵育一小时。在平板上(从上至下)对血清及标准品以含 0.5%BSA (Sigma)的 PBST 进行梯度稀释(稀释系数为 0.316),起始浓度为 400ng/mL (mIgG1) 或 600ng/mL (mIgG2b)。封闭后,将平板 PBST 洗涤四次。第四次洗涤之后,将 100 μ L 的血清或标准品加至平板并在室温下孵育一小时。平板再次 PBST 洗涤四次。洗涤之后,将 100 μ L 的生物素化的检测抗体(10ng/mL 的大鼠抗-mIgG1 或 250ng/mL 的抗-mIgG2b;Pharmingen)加入平板,并在室温孵育一小时。然后再次如上文描述的洗涤平板。洗涤之后,将溶于 PBST 的 1:20,000 稀释的缀合至链霉亲和素的辣根过氧化物酶(HRP-SA)以 100 μ L/ 孔加入平板,并将平板在室温孵育 30 分钟。然后将平板用 PBST 洗涤六次,此后以 100 μ L/ 孔加入底物 A 和 B (BD OptEIATM;BD Biosciences) 的 1:1 稀释液,并将平板置于黑暗中。反应在黑暗中进行,在需要的时候以 1N 的磷酸终止(大约 15 分钟)。在 Wallac 1420 Work StationVictorTM Plate Reader 上读出终止的反应物在 450nm 处的吸收波长(每次读数 1.0 秒),对结果进行作图(图 11)。

[0193] 来自野生型小鼠的血清显示了正常水平的 IgG1 和 IgG2b。对 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 纯合的小鼠能够在外周血中表达缺少 CH1 结构域和铰链区的 IgG1 (血清;图 11 左侧)。进一步地,其他 IgG 同种型(例如, IgG2b) 的血清水平与野生型水平相比没有显著降低(图 11 右侧)。此结果进一步确认了具有功能性 IgM 基因及缺少 CH1 结构域和铰链区的 IgG 基因的经遗传修饰的小鼠能够在血清中表达可检测到的经修饰的 IgG1 同种型(即,缺少 CH1 结构域和铰链区)。

[0194] 实施例 7:分析 IgG1 修饰的小鼠中的 V-D-J 重排

[0195] A. 对 IgG1-CH1-Hinge 删除纯合的小鼠

[0196] 通过使用分离自脾细胞的 RNA 进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR),而分析对 IgG1 Δ CH1- Δ hinge 修饰纯合小鼠的 V-D-J 重组及重链基因的使用。

[0197] 简言之,收获脾脏并在灭菌一次性袋子中以 10mL 含有 5%HI-FBS 的 RPMI-1640 (Sigma) 进行灌流。然后将每个装有一个脾脏的袋子置于 STOMACHERTM (Seward) 中并在培养基中进行 30 秒的处理而均质化。使用 0.7 μ m 细胞滤器过滤均质化的脾脏,然后通过离心(1000rpm 10 分钟)进行沉淀,将红细胞(RBC)于 BD PHARM LYSETM (BD Biosciences) 中裂解三分钟。以 RPMI-1640 稀释脾细胞并再次离心,随后重悬于 1mL 的 PBS (Irvine Scientific)。使用本领域已知的标准技术从沉淀下的脾细胞中分离 RNA。

[0198] 使用一组特异性针对小鼠重链可变区(VH) 基因片段的简并引物(Novagen) 以及小鼠 IgG1 CH2 引物(CGATGGGGGCAGGGAAGCT GCAC;SEQ ID NO:40) 对脾细胞 RNA 进行 RT-PCR。凝胶纯化 PCR 产物并克隆入 pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen), 用位于载体序列内克隆位点两侧的 M13 正向(GTAAAACGAC GGCCAG;SEQ ID NO:41) 及 M13 反向(CAGGAAACAG CTATGAC;SEQ ID NO:42) 引物测序。对 19 个克隆进行测序以确定重链基因的使用及重排的 VH 和 IgG1 恒定区的 CH2 之间连接处的序列(表 2)。

表 2			
重链基因的用途			
克隆	V _H	D _H	J _H
B1	1-58	3-2	2
B2	1-26	4-1	1
B3	1-50	2-14	2
B4	1-58	3-2	2
B5	14-2	4-1	4
D2	3-6	1-1	4
D5	14-1	3-3	2
D6	14-2	4-1	3
D7	3-6	1-1	4
E2	7-1	3-1	4
E3	1-50	2-14	2
E4	1-50	2-14	2
E7	1-50	2-14	2
E8	1-72	1-1	4
E10	1-42	1-1	1
F6	5-6	1-1	1
F7	5-6	1-1	1
F8	5-6	1-1	1
F10	5-6	1-1	1

[0199]

[0200] 图 12 显示了 19 个 RT-PCR 克隆中 11 个的重排的 VH 结构域与 IgG1 恒定区的 CH2 的序列比对情况。图 12 中显示的序列说明了涉及不同小鼠重链 V、D 和 J 基因片段以及不含 CH1 及铰链区的小鼠 IgG1 的独特的重排情况。对内源 IgG1 恒定区基因的 CH1 和铰链区删除纯合的小鼠能够产生重链, 其包含可操作地连接于来自不含 CH1 和铰链区的小鼠 IgG1 恒定区的 CH2-CH3 区域的小鼠 VH 结构域, 并能产生 B 细胞, 其表达不含 CH1 和铰链区的小鼠 IgG1 重链并缺少轻链(图 8、9)。这些重排表明经修饰的基因座能够在这些小鼠中多个、独立的 B 细胞内独立地重排小鼠重链基因片段, 以产生重链抗体, 其类似于正常见于骆驼中的那些抗体。进一步地, 此实施例表明删除内源 IgG1 的 CH1 和铰链区不会使基因座不可操作或阻止涉及经修饰的 IgG1 恒定区的重组。这些小鼠产生功能性的重链抗体(其包含不具有 CH1 和铰链区的 IgG1) 为内源抗体库的一部分, 并在 B 细胞发育上没有任何可检测到

的缺陷。

[0201] B. 对 IgG1-CH1 删除纯合的小鼠

[0202] 以类似的方式,通过使用分离自脾细胞的 RNA 进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCT),而分析对 IgG1 Δ CH1 修饰纯合的小鼠的 V-D-J 重组及人重链基因的使用。

[0203] 简言之,从两只如上文实施例 A 部分描述的纯合 IgG1- Δ CH1 小鼠中分离脾脏。使用磁珠细胞分选术(MACS, Miltenyi Biotec)从脾细胞集合中分离出 CD19⁺B 细胞。使用 Qiagen ALLPREPTM DNA/RNA 小提试剂盒(Qiagen)从分选出的 CD19⁺B 细胞中提取 RNA。使用 SUPERSRIPTTM III Reverse Transcriptase and Oligo(dT)20 引物(Invitrogen)合成第一链 cDNA。然后使用此 cDNA 作为 PCR 模板,其中使用了 3' 小鼠 IgG1 铰链区特异性引物及设计为结合人可变区前导序列的 5' 简并引物(表 3)。将 PCR 产物克隆入 pCR2.1 TOPOTMTA 载体(Invitrogen)并以 M13 正向和 M13 反向引物测序(如上文此实施例 A 部分中所描述)。

[0204]

表 3		
引物	序列 (5' -3')	SEQ ID NO:
hVHL-1	TCACCATGGA CTGSACCTGG A	43
hVHL-2	CCATGGACAC ACTTIGYTCC AC	44
hVHL-3	TCACCATGGA GTTTGGGCTG AGC	45
hVHL-4	AGAACATGAA ACAYCTGTGG TTCTT	46
hVHL-5	ATGGGGTCAA CCGCCATCCT	47
hVHL-6	ACAATGTCTG TCTCCTTCCT CAT	48
3' mIgG1 Hinge	GCAAGGCTTA CAACCACAAT C	49

[0205] 为确定对 IgG1 Δ CH1 纯合的小鼠中重链基因的使用,对 28 个 RT-PCR 克隆进行测序。这些克隆中,观察到人 V、D 和 J 基因片段的 7 个独特重排形式(表 4)。

表 4			
重链基因用途			
克隆	V _H	D _H	J _H
A2	1-69	6-19	6
A5	1-69	6-7	4
A8	1-8	4-4	4
C2	1-18	6-6	2
C4	1-18	3-16	6
D9	1-18	6-6	4
H8	1-18	1-7	4

[0206]

[0207] 图 13 显示了表 4 中 7 种重排形式的重排的 VH 结构域与 IgG1 恒定区的铰链 -CH2-CH3 的序列比对情况。图 13 中显示的序列说明了涉及不同人重链 V、D 和 J 基因片段以及不含 CH1 区域的小鼠 IgG1 的独特的重排情况。对内源 IgG1 恒定区基因的 CH1 区域删除纯合的小鼠能够产生重链,其包含可操作地连接于来自不含 CH1 区域的小鼠 IgG1 恒定区的铰链 -CH2-CH3 区域的人 VH 结构域,并能产生 B 细胞,其表达不含 CH1 区的小鼠

IgG1 重链并缺少轻链(数据未显示)。这些重排表明修饰的基因座(IgG1 Δ CH1- Δ hinge 及 IgG1 Δ CH1) 中的一个或两个能够在这些小鼠中多个、独立的 B 细胞内独立地重排(人和小鼠)重链基因片段,以产生重链抗体,其类似于正常见于骆驼中的那些抗体。进一步地,此实施例表明删除内源 IgG1 的 CH1 不会使基因座不可操作或阻止涉及人重链 V、D 和 J 基因片段和经修饰的小鼠 IgG1 恒定区的重组。这些小鼠产生功能性的重链抗体(其包含人重链 V 结构域及不具有 CH1 的小鼠 IgG1) 为内源抗体库的一部分,并在 B 细胞发育上没有任何可检测到的缺陷。

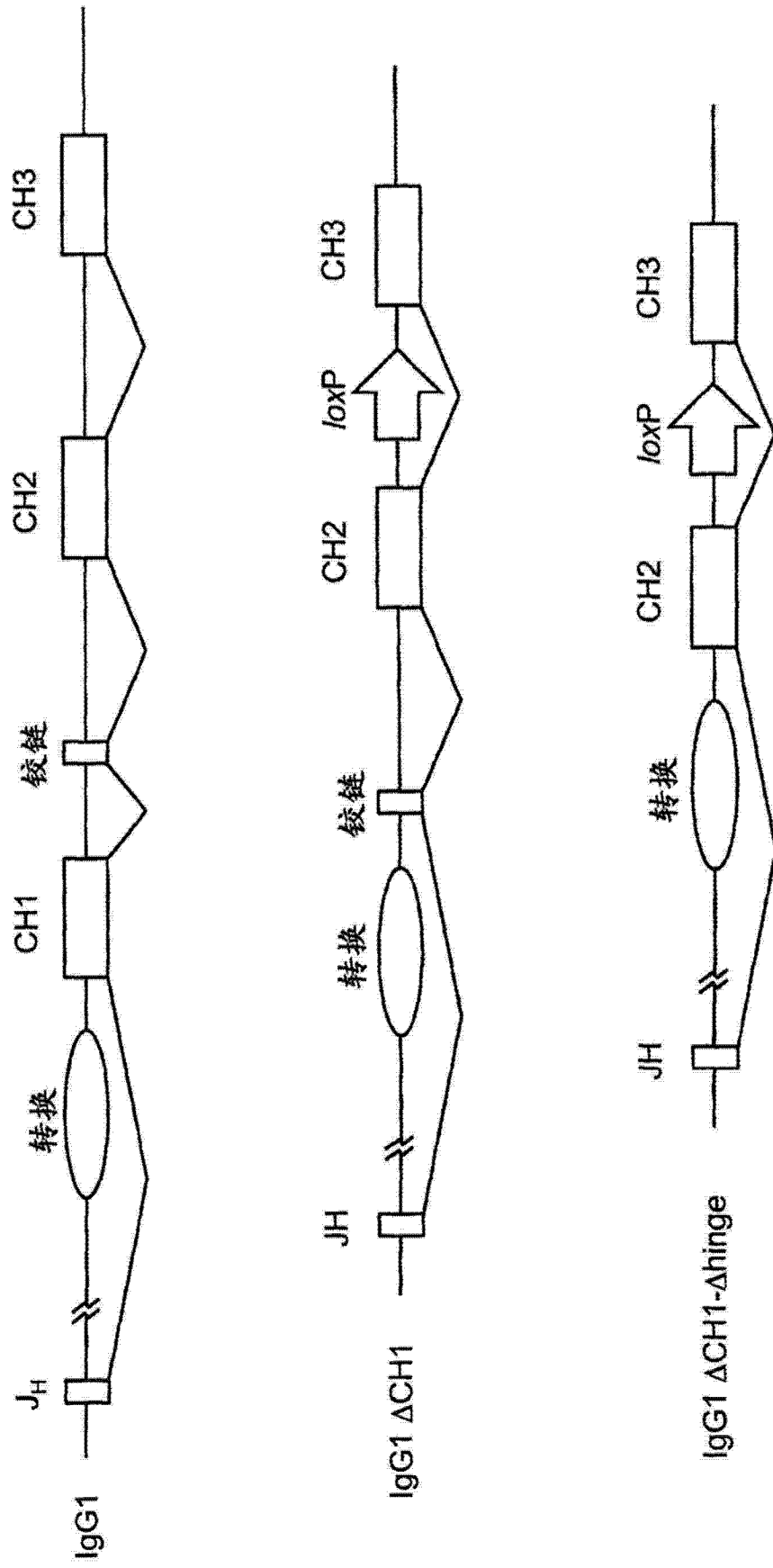


图 1

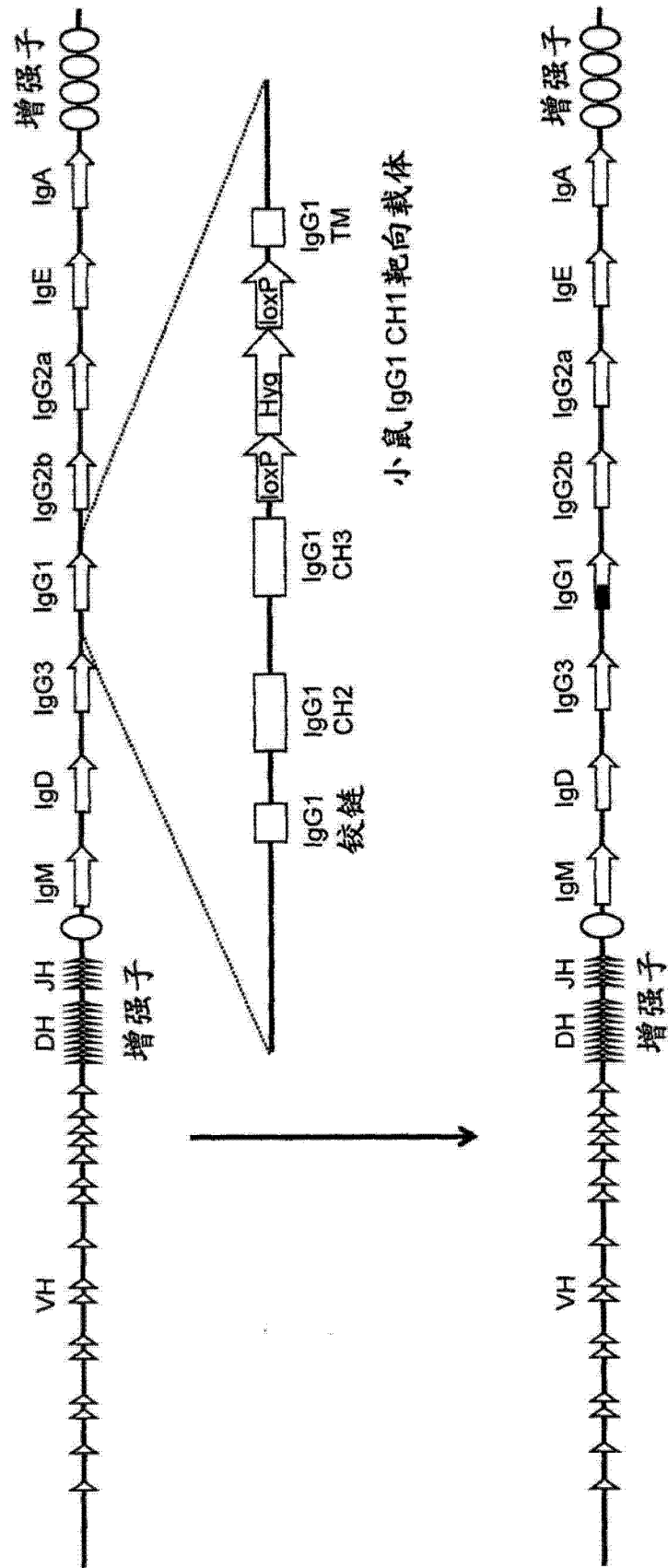


图 2

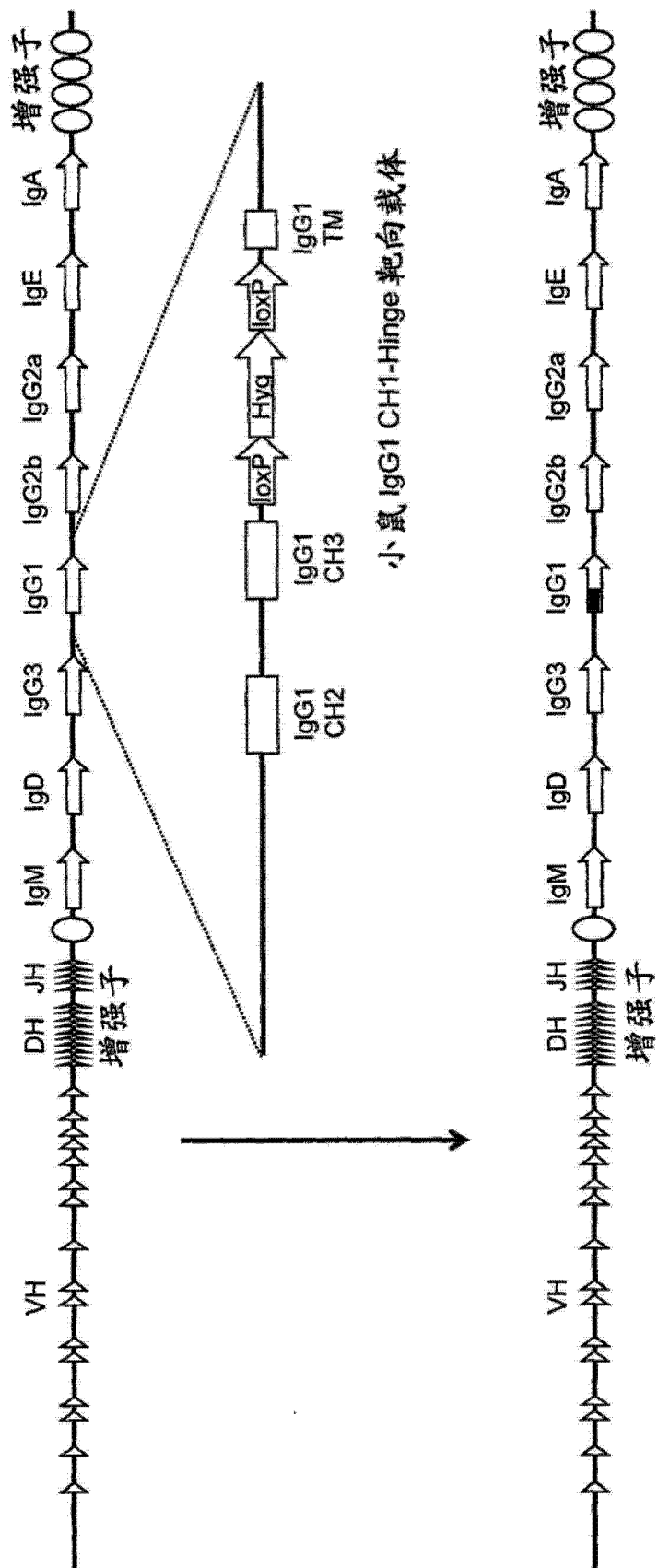


图 3

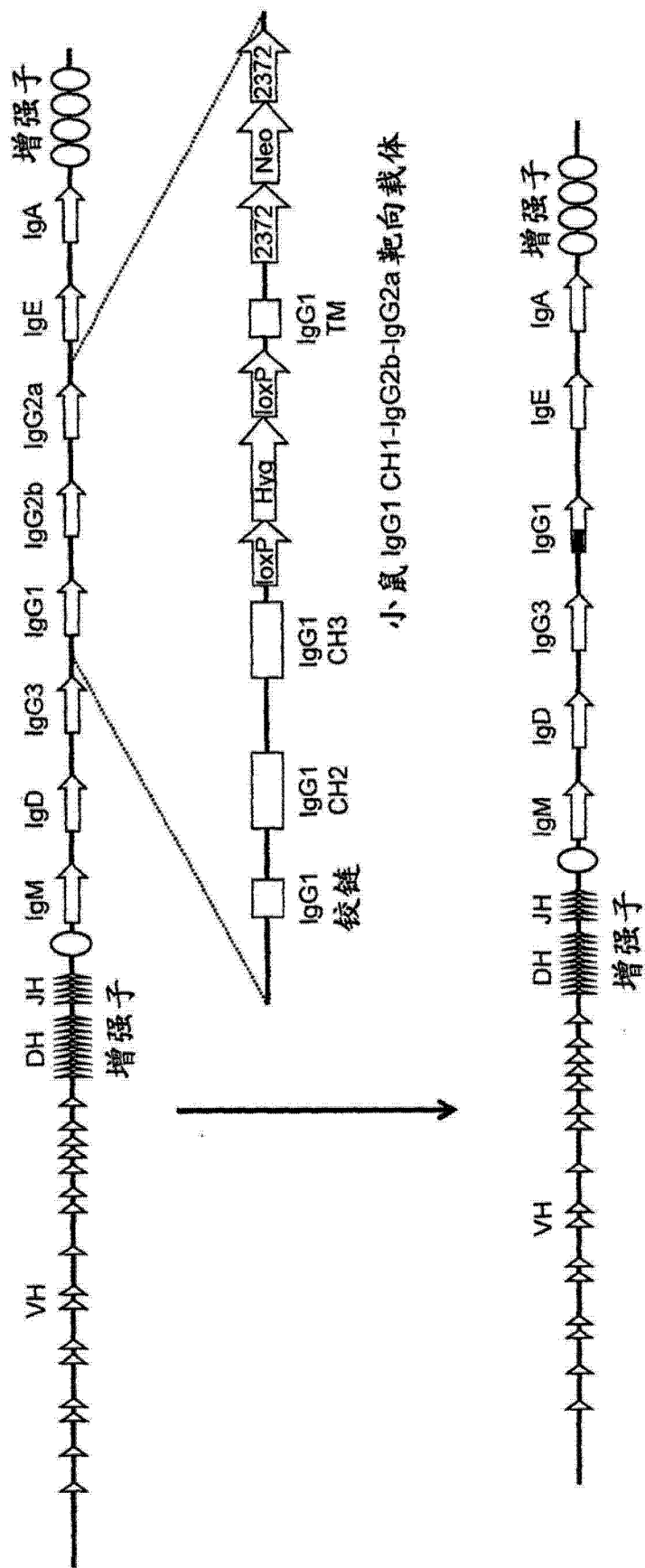


图 4

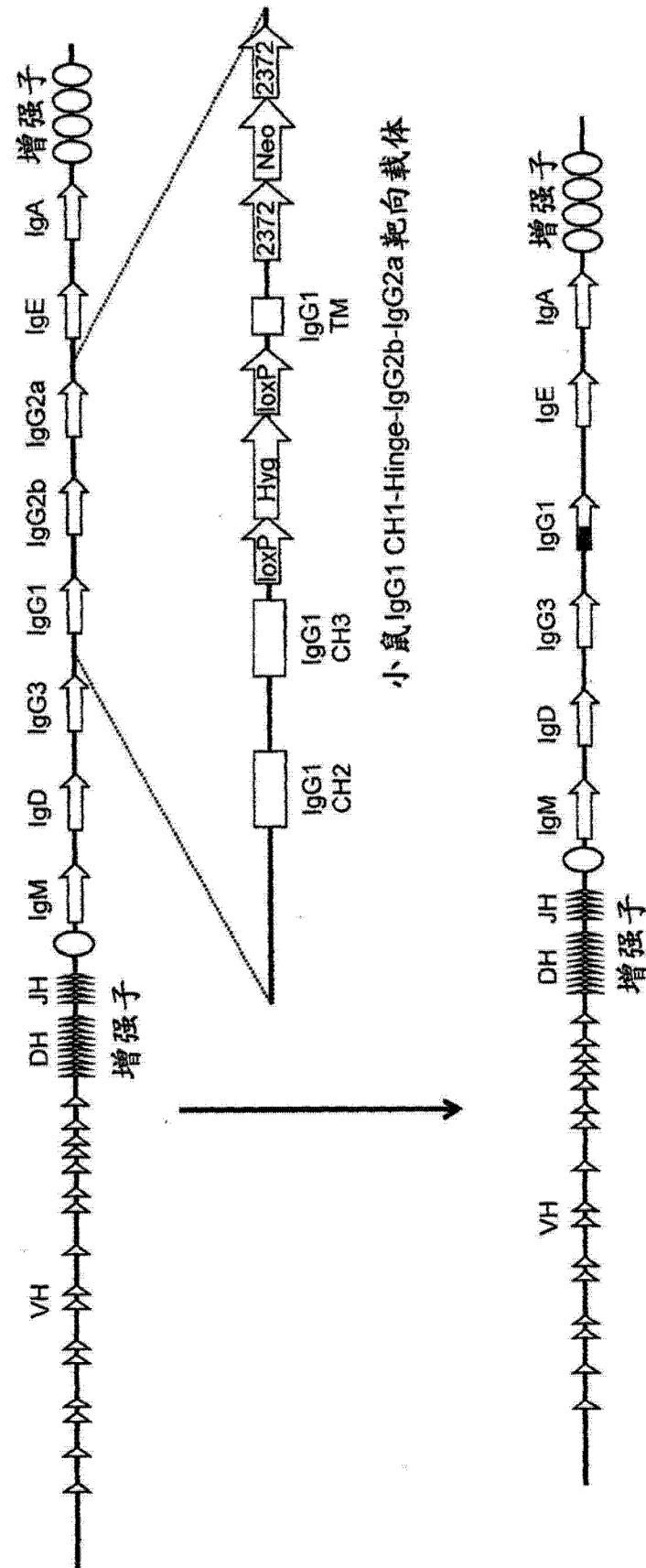


图 5

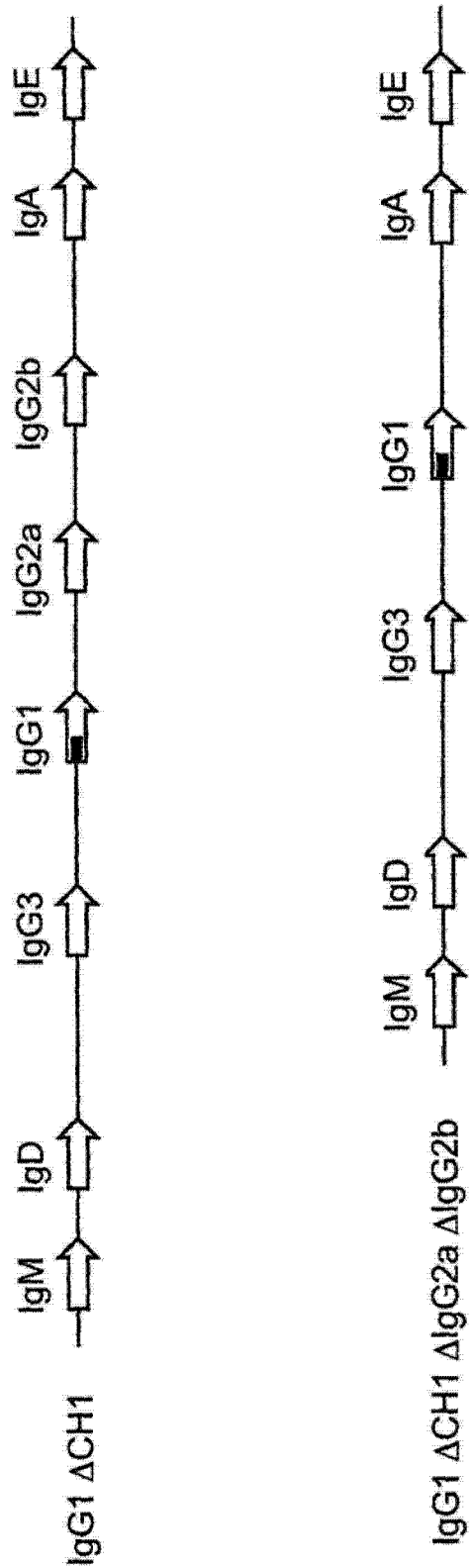


图 6

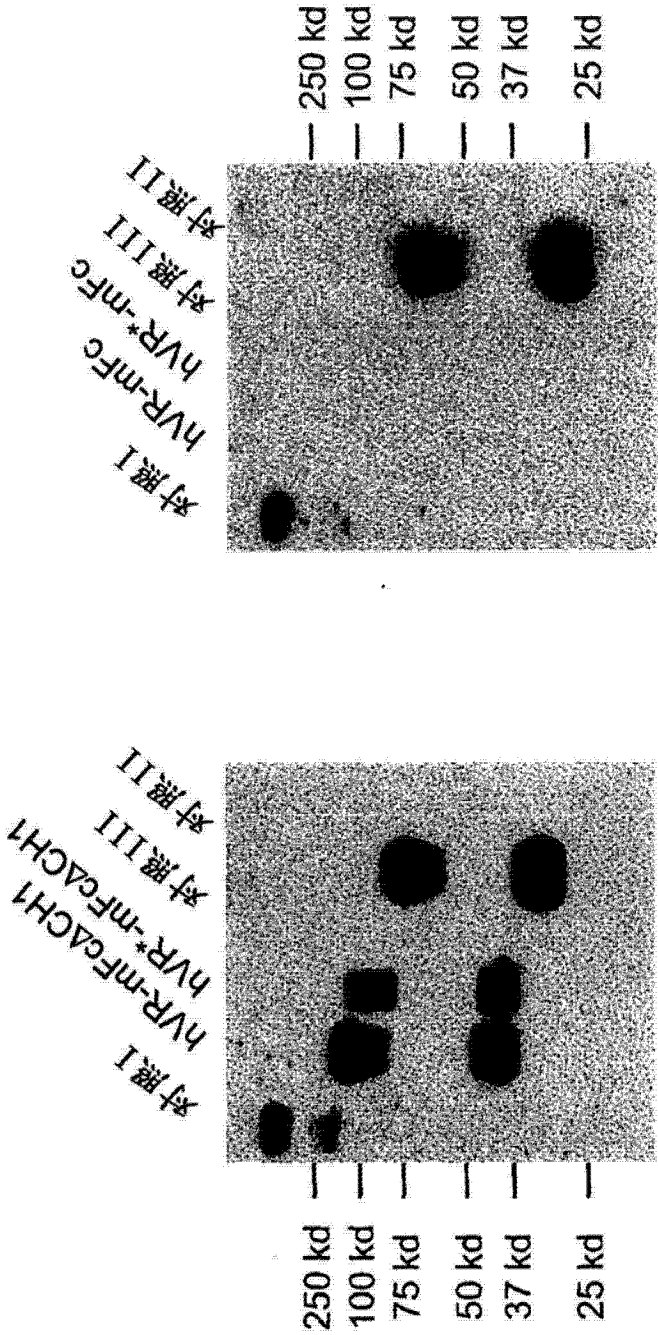


图 7

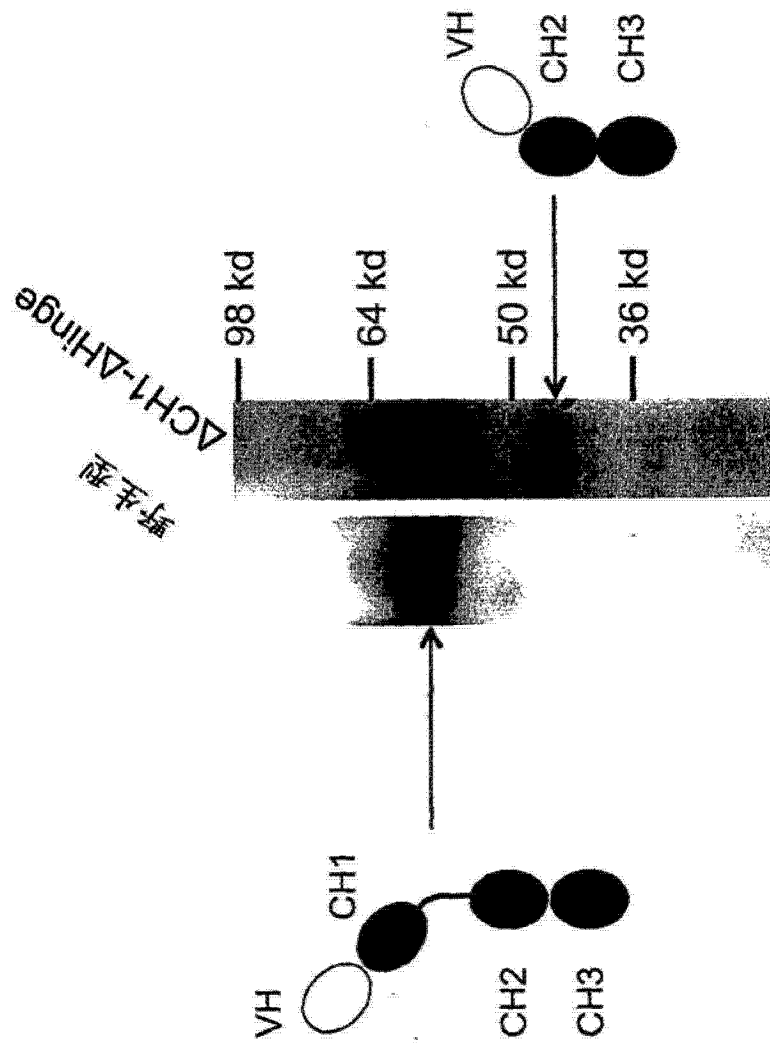


图 8

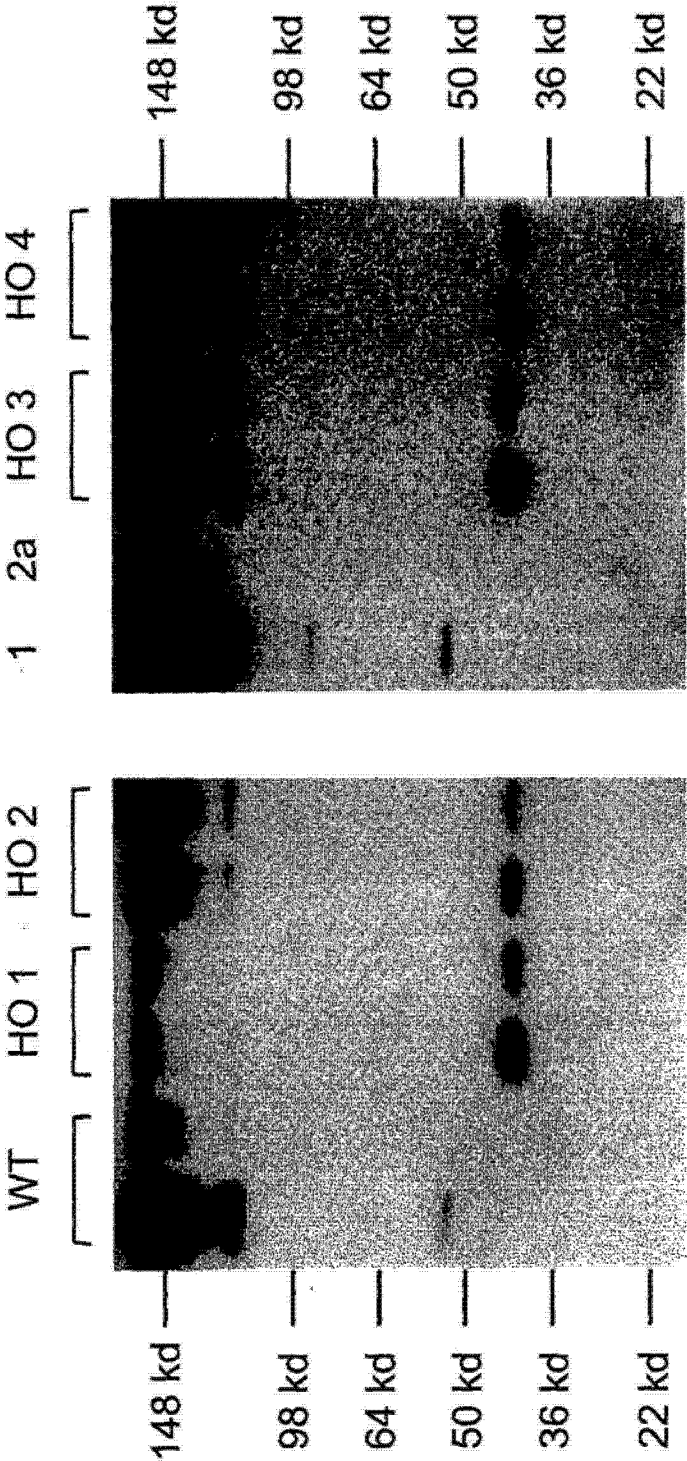


图 9

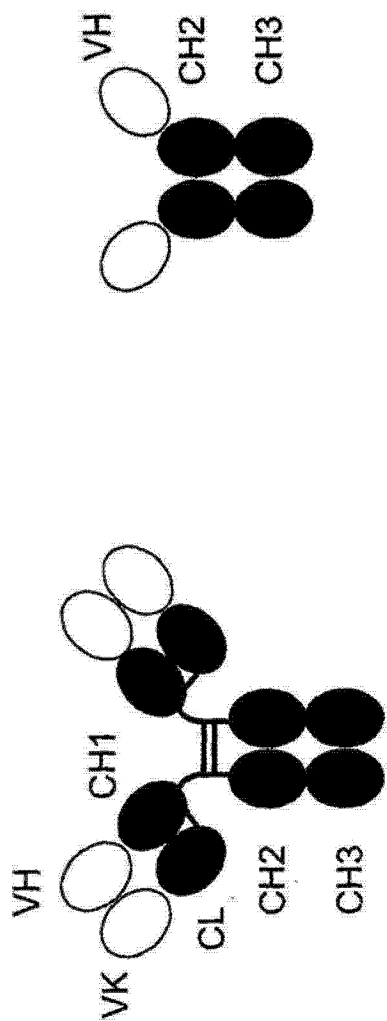


图 10

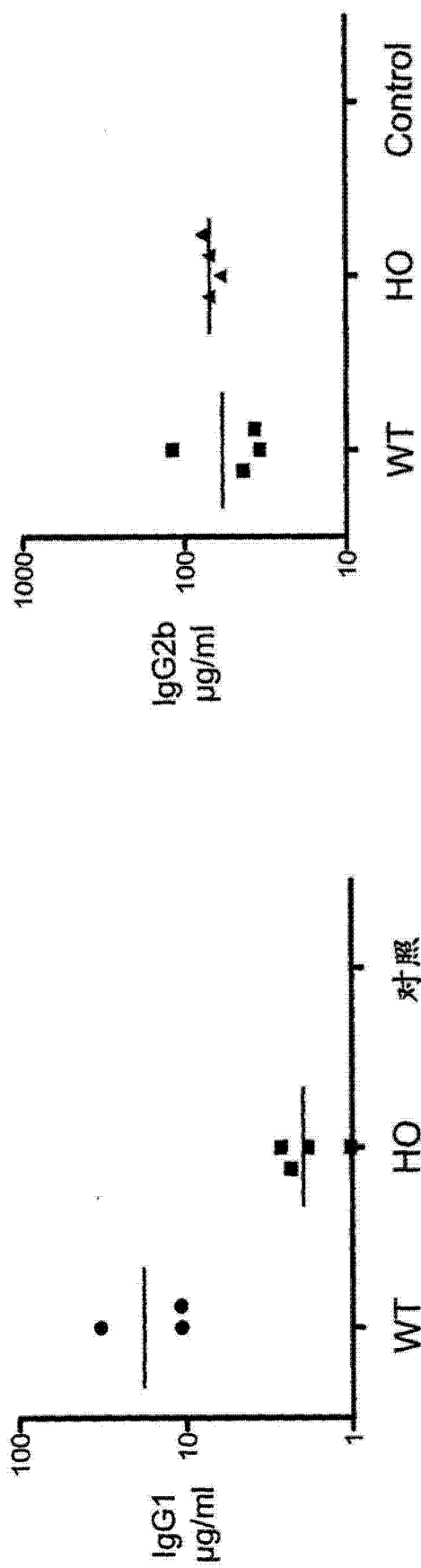


图 11

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
B1	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTS	GYTFTSYG.	INWVKQRPGQGLEWIGY	IYIGNGYT..	EYNEKFK
B2	EVQLQQSGRELVPKPGASVMISCTAS	GYTFIdYf.	iNwMkIrSHGqSLEWIGD	INPNNGGs..	nYNQKFK
B3	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS	GYTFTSYW.	MQWVKQRPGQGLEWIGE	IDPDSYt..	NYNQKFK
B5	EVQLQQSGAEiVKsGASVKLSCTAS	GfNmKDYf.	iHWVKQRTEQGLEWIGR	IDPEDGkt..	KYAPKfQ
D2	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVT	GYSITSGYY	WNWIRQFPCKLEWMGY	ISYDGrN...	NYNPSLK
D5	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTAS	GfNIkdYy.	iHWVkkRPEQGLEWIGR	IDPEDGDT..	EYAPKfQ
D6	EVQLQQSGTELVPKPGASaKLSCtAS	GfNvKDYf.	MHWVKQkTEQGLEWIGR	IVPEDGET..	KsAPKfQ
E2	EVKLVESGGGLVQSGRSLRLSCATS	GfTFSDfY.	MEWVRQAPGKGLEWIAt	SRNKINDYtp	EfsASVK
E8	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS	GYTFTSYW.	MHWVKQRPGRGLEWIGR	IDPNSGGT..	KYNEKlK
E10	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS	GYSFTGYy.	MNWVKQsPEKsLEWIGE	INPSTGGT..	TYNQKFK
F6	EVQLVESGGDLVpGGSLKLSCAAS	GfTFSSyG.	MSWVRQTPDKRLEWVAt	ISSGGSYt..	YYPDSVK

	FR3	CDR3	FR4	CH2
B1	GKATLTSDTSSSTAYMQLSLTSSEDSAIYfI	ARGrvGPY....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI
B2	GKATLTVDKSSSTAYMdlRLSLTSSEDSAVYyC	AKLGRD.....WYFDV	WGtGTTVTvSS	VPEVSSVFI
B3	GKATLTVDTSSTAYMQLSLTLpEDSAVYyC	ARCry.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI
B5	GKATITADTSSNTAYLhLSLTSSEDTAVYyC	ARGGLGReE..YYAVDY	WGQGTsvTVSS	VPEVSSVFI
D2	NRISITRDTSKNQFFLKLNSVTtEDTATYyC	AIHTVVGD...YvMDY	WGQGTsvTVSS	VPEVSSVFI
D5	GKATMTADTSSNTAYLQLSLTSSEDiAVYyC	TTSRpF.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI
D6	drTtIrtdTSSNTshLQLnSLTSSEDTAVYyC	ARPNPP.....Y	WGQGTTLTVsv	VPEVSSVFI
E2	GRFIVSRDTSQnILYLQMNALRpEDTAIYyC	ARAcSdyDR..YYAMDY	WGQGTsvTVSS	VPEVSSVFI
E8	nKATLTVDKPSSTAYMQLSLTSSEDSAVYyC	AREEINyGStYgAMDY	WGQGTsvTVSS	VPEVSSVFI
E10	AKATLTVDKSSSTAYMQLSLTSSEDSAVYyC	AGG.....YWYFDV	WGtGTTVTvSS	VPEVSSVFI
F6	GRFTISRDNakNTLYLQmSSLKSEDTAMYyC	ARHDYyGSSyG.WYFDV	WGtGTTVTvSS	VPEVSSVFI

图 12

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
A8	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCKAS	GYTFTSYD.	INWVRQATGQGLEWMGW	MNPNSGKT..	GYAQKFQ
C2	QVQLVQSGAEKKPKGASVKVCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	YQAQnLQ
D9	QVQLVQSGAEKKPKGASVKVCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	YQAQnLQ
C4	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	NYAQKLQ
H8	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCKAS	dYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	NYAQnLQ
A5	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVCKAS	GGTFSSYA.	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA..	NYAQKFQ
A2	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVCKAS	GGTFSSYA.	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA..	NYAQKFQ
	FR3		CDR3	FR4	HINGE
A8	GRVaMTRkTSIS	TAYMELSSLRSED	TAVYYC	ARedYSNYgd.....FDY	WGQGLTVTVSS VPRDCGC
C2	GRVTMTTDTSTSa	afmdLRLSLRSD	TAVYYC	ARdgYstSS1.....DY	WGQGLTVTVSS VPRDCGC
D9	GRVTMTTDTSTSa	afmdLRLSLRSD	TAVYYC	ARdgYstSS1.....DY	WGQGLTVTVSS VPRDCGC
C4	GRVTMTTDTST	TAYMELSLRSLRSD	TAVYYC	ARddMITFGGVianY	YYYGMDV WGQGLTVTVtS VPRDCGC
H8	GRVTMTTDTST	TAYMELSLRSLRSD	SaVYYC	AReeLE1.....FDY	WGQGLTVTVSS VPRDCGC
A5	GRVTITTDEST	TAYMELSSLRSED	TAVYYC	ARdgYstSS1.....DY	WGQGLTVTVSS VPRDCGC
A2	GRVTITTDEST	TAYMELSSLRSED	TAVYYC	AVIAVAGT.....YYYGMDV	WGQGLTVTVS1 VPRDCGC

图 13