(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120035673 A
(43)申请公布日 2025.05.23

(21)申请号 202380066136.X

(22)申请日 2023.09.15

(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/119188 2022.09.16 CN
PCT/CN2022/136246 2022.12.02 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/118958 2023.09.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/056044 EN 2024.03.21

(71)申请人 百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司
地址 102600 北京市大兴区大兴生物医药产业基地宝参南街12号院

(72)发明人 胡益清 张琦 张丽君 张雅博 赵会珍 姚佳维 沈月雷

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 杨琴

(51)Int.Cl.
C12N 15/85(2006.01)
A01K 67/0275(2024.01)

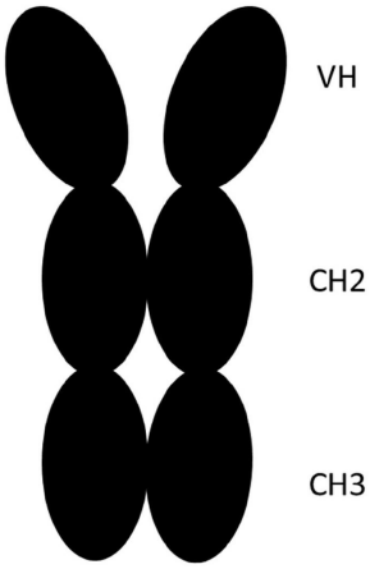
权利要求书6页 说明书65页
序列表（电子公布） 附图69页

(54)发明名称

经遗传修饰的非人动物和用于产生重链抗体的方法

(57)摘要

本发明涉及经遗传修饰的动物和用于产生重链抗体的方法。在一方面,所述经遗传修饰的非人动物包含经修饰的免疫球蛋白重链基因座,其中所述经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含IgG恒定区基因,其中所述IgG恒定区基因编码缺失CH1结构域的IgG重链恒定区,其中所述经遗传修饰的非人动物表达重链抗体。本文还公开了抗TFR1抗体、抗原结合片段及其用途。



CN 120035673 A

1.一种经遗传修饰的非人动物,其包含经修饰的免疫球蛋白重链基因座,其中所述经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含IgG恒定区基因,其中所述IgG恒定区基因编码缺失CH1结构域的IgG重链恒定区,其中所述经遗传修饰的非人动物表达重链抗体。

2.根据权利要求1所述的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含仅一个IgG恒定区基因。

3.权利要求1或2的经遗传修饰的非人动物,其中所述IgG重链恒定区基因是IGHG1。

4.权利要求1-3中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述IgG重链恒定区包含CH2结构域和CH3结构域以及任选的铰链区,或者由CH2结构域和CH3结构域以及任选的铰链区组成。

5.一种经遗传修饰的非人动物,其基因组包含种系遗传修饰,所述种系遗传修饰包含IGHG3、IGHG2b和IGHG2c基因的缺失以及内源免疫球蛋白重链基因座处IGHG1基因的CH1外显子的缺失。

6.根据权利要求5所述的动物,其中所述种系遗传修饰进一步包括在所述内源免疫球蛋白重链基因座的内源IGHE基因的缺失。

7.根据权利要求5或6所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在所述内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ2b、Sγ2C和Sε转换区的缺失。

8.根据权利要求5-7中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰的免疫球蛋白重链基因座包含缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因,其中所述经修饰的IGHG1基因包含与SEQ ID NO:1具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。

9.根据权利要求5-8中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在所述内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ3转换区的缺失。

10.根据权利要求5-9中任一项的动物,其中所述动物的基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的啮齿动物IGHG1基因和内源IGHM、IGHδ、IGHA基因。

11.根据权利要求5-9中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在所述内源免疫球蛋白重链基因座的内源IGHM和IGHδ基因的缺失。

12.权利要求5-9和11中任一项的动物,其中所述动物基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺少编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHA基因。

13.根据权利要求12所述的动物,其中所述Sμ和Sγ1转换区和与SEQ ID NO:8具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。

14.根据权利要求5-9中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座处IGHM基因的CH1编码序列的缺失。

15.根据权利要求5-9和14中任一项所述的动物,其中所述动物的基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的内源IGHM基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHδ、IGHA基因。

16.根据权利要求15所述的动物,其中所述Sμ转换区和所述经修饰的IGHM基因和与SEQ ID NO:10具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。

17.根据权利要求5-9中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰还包括在内源免疫球蛋白重链基因座处IGHM基因的CH1外显子的缺失和IGHδ基因的缺失。

18.根据权利要求5-9和17中任一项所述的动物,其中所述动物的基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHM基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHA基因。

19.根据权利要求5-9中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座处IGHM基因的CH1外显子的缺失和IGHδ基因的CH1编码序列的缺失。

20.根据权利要求5-9和19中任一项所述的动物,其中所述动物的基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHM基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHδ基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHA基因。

21.根据权利要求19或20所述的动物,其中所述经修饰的IGHM基因和与SEQ ID NO:10具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接,并且所述经修饰的IGHδ基因包含与SEQ ID NO:41具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。

22.权利要求14-21中任一项的动物,其中所述经修饰的IGHM基因包含与SEQ ID NO:13至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。

23.根据权利要求5-8中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在所述内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ1转换区的缺失。

24.据权利要求5-8和23中任一项所述的动物,其中所述动物的基因组包含内源Sμ、Sγ3、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHM、IGHδ、IGHA基因。

25.根据权利要求5-8和23中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在所述内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ3转换区的缺失。

26.根据权利要求5-8、23和25中任一项所述的动物,其中所述遗传修饰进一步包括在所述内源免疫球蛋白重链基因座的内源IGHM和IGHδ基因的缺失。

27.权利要求5-8、23、25或26中任一项的动物,其中所述动物的基因组包含内源Sμ、Sα转换区、缺少编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHA基因。

28.根据权利要求27所述的动物,其中所述Sμ转换区和所述经修饰的IGHG1基因和与SEQ ID NO:9具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。

29.根据权利要求5-10、23和24中任一项的动物,其中所述经修饰的基因组包含功能性IGHM基因。

30.经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座上以5'至3'的顺序包含下列元件:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因;其中所述元件可操作地连接。

31.权利要求30的动物,其中所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺失编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

32.经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ3转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因;其中所述元件可操作地连接。

33.权利要求32的动物,其中所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因

和转换区组成:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ3转换区、缺失编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

34.经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座上以5'至3'的顺序包含下列元件:Sμ转换区、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因;其中所述元件可操作地连接。

35.权利要求34的动物,其中所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

36.遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座上以5'至3'的顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和

IGHA基因;其中所述元件可操作地连接。

37.权利要求36的动物,其中所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和

IGHA基因。

38.遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'的顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因;其中所述元件可操作地连接。

39.权利要求38的动物,其中所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺失编码CH1结构域的序列的IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺失编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

40.经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'的顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因;其中所述元件可操作地连接。

41.权利要求40的动物,其中所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、Sγ1转换区、缺失编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

42.遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'的顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、缺少编码CH1结构域的序列的IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因;其中所述元件可操作地连接。

43.权利要求42的动物,其中所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺失编码CH1结构域的序列的IGHM基因、缺失编码CH1结构域的序列的IGHδ基因、Sγ1转换区、缺失编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

44.权利要求1-43中任一项的动物,其中所述动物表达包含缺失CH1结构域的IgG重链恒定区的重链抗体。

45.权利要求44的动物,其中所述重链抗体以小于10^{-7}M、小于10^{-8}M或小于10^{-9}M的KD与其靶抗原结合。

46.权利要求44或45的动物,其中所述重链抗体包含可变区、CH2结构域和CH3结构域或

由可变区、CH2结构域和CH3结构域组成。

47.根据权利要求44到46中任一权利要求所述的动物,其中所述重链抗体进一步包含跨膜结构域和/或胞质结构域。

48.权利要求1-47中任一项的动物,其中所述经遗传修饰的非人动物不表达包含轻链的IgG抗体。

49.权利要求1-48中任一项的动物,其中所述动物表达IgM、IgD和/或IgA(例如,功能性IgM、IgD和/或IgA)。

50.权利要求1-49中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物在内源免疫球蛋白重链基因座上包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因,其中所述人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因可操作地连接并可经历VDJ重排。

51.权利要求50的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含选自表1的至少150个人IGHV基因、选自表2的至少20个人IGHD基因和选自表3的至少5个人IGHJ基因。

52.权利要求50的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含在人受试者的人14号染色体的内源免疫球蛋白重链基因座处的所有人IGHV基因、所有人IGHD基因和所有人IGHJ基因。

53.权利要求50的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含在人细胞的人14号染色体的内源免疫球蛋白重链基因座处的所有人IGHV基因、所有人IGHD基因和所有人IGHJ基因。

54.根据权利要求50所述的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物是小鼠,并且所述动物的内源免疫球蛋白重链基因座中的所述遗传修饰包含表4中的一个或多个小鼠IGHV

基因、表5中的一个或多个小鼠IGHD基因和/或表6中的一个或多个小鼠IGHJ基因的缺失。

55.权利要求54的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物是小鼠,并且所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的遗传修饰包含从小鼠IGHV1-85基因开始到小鼠IGHJ4基因的连续序列的缺失。

56.根据权利要求50所述的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的未经修饰的人序列,其中所述未经修饰的人序列为至少800kb。

57.根据权利要求50所述的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHV1-2的人重链免疫球蛋白基因座的未经修饰的人序列。

58.根据权利要求50所述的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHV6-1的人重链免疫球蛋白基因座的未经修饰的人序列。

59.权利要求50的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含源自从人IGHD1-1开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座的未经修饰的人序列。

60.权利要求50的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含源自从人IGHV(III)-82

开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座的未经修饰的人序列。

61.权利要求1-49中任一项的经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座上包含:用一个或多个人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因替换一个或多个内源IGHV、内源IGHD和内源IGHJ基因,其中人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因与内源IGHM、IGHδ、缺失编码CH1结构域的序列的IGHG1和IGHA基因中的一个或多个可操作地连接。

62.权利要求61的经遗传修饰的非人动物,其中一个或多个内源IGHV、内源IGHD和内源IGHJ基因被表1中至少150个人IGHV基因、表2中至少20个人IGHD基因和表3中至少5个人IGHJ基因所替换。

63.权利要求61或62的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物是小鼠,并且表4中的至少180个小鼠IGHV基因、表5中的所有小鼠IGHD基因和表6中的所有小鼠IGHJ基因被替换。

64.权利要求1-63中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物对于就免疫球蛋白重链基因座是纯合的。

65.权利要求1-63中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物对于免疫球蛋白重链基因是杂合的。

66.权利要求1-65中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含内源轻链免疫球蛋白基因座。

67.权利要求1-65中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物包含内源免疫球蛋白轻链基因座中的破坏。

68.根据权利要求1-67中任一项所述的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物缺失能够重排并形成编码内源重链可变结构域的核酸序列的内源免疫球蛋白重链可变区基因座。

69.权利要求1-68中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物可产生人源化抗体。

70.权利要求1-53、56-62和64-69中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物是哺乳动物。

71.权利要求11-53、56-62和64-70的经基因修饰的非人动物,其中所述动物是啮齿动物。

72.权利要求1-53、56-62和64-71的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物是小鼠。

73.权利要求1-72中任一项的经遗传修饰的非人动物,其中所述动物具有基本正常的B细胞发育和成熟。

74.从权利要求1-73中任一项的经遗传修饰的非人动物获得的细胞。

75.权利要求74的细胞,其中所述细胞是表达嵌合免疫球蛋白重链的B细胞,所述嵌合免疫球蛋白重链包含源自一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因的重排的免疫球蛋白重链可变结构域,其中所述免疫球蛋白重链可变结构域与非人重链恒定区可操作地连接。

76.权利要求74或75的细胞,其中所述细胞是胚胎干(ES)细胞。

77.一种制备特异性结合抗原的抗体的方法,所述方法包括:

a)将权利要求1-73中任一项的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;

b)从动物采集的细胞产生杂交瘤;和

C)收集由所述杂交瘤产生的重链抗体。

78.权利要求77的方法,其中所述方法还包括对所述杂交瘤的基因组进行测序。

79.一种制备特异性结合抗原的抗体的方法,所述方法包括:

a)将权利要求1-73中任一项的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;

b)在表达特异性结合抗原的重链抗体的细胞中的编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸测序;和

c)在细胞中编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸与编码人免疫球蛋白重链恒定区的核酸可操作地连接。

80.一种制备特异性结合抗原的抗体的方法,所述方法包括:

a)在表达特异性结合抗原的重链抗体的细胞中获得编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸序列,其中所述细胞通过将权利要求1-73中任一项的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原而获得;

b)将编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸与编码人免疫球蛋白重链恒定区的核酸可操作地连接;和

c)在细胞中表达所述核酸,从而获得所述抗体。

81.一种获得编码特异性结合抗原的抗体结合域的核酸的方法,所述方法包括:

a)将权利要求1-73中任一项的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;和

b)对细胞中编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸进行测序,所述细胞表达特异性结合所述抗原的重链抗体。

82.一种制备特异性结合抗原的抗体的方法,所述方法包括:

a)将权利要求1-73中任一项的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;

b)使用从动物的免疫细胞(例如脾细胞)制备的RNA构建噬菌体质粒文库;

c)筛选噬菌体质粒文库,和

d)对来自噬菌体质粒的编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸进行测序,所述噬菌体质粒编码特异性结合所述抗原的重链抗体。

83.权利要求82所述的方法,其中筛选包括基于与所述抗原的结合亲和力来分离表达免疫球蛋白重链可变区的噬菌体。

84.一种获得样品的方法,所述方法包括:

a)将权利要求1-73中任一项的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;和

b)从动物身上采集样本。

85.权利要求84的方法,其中所述样品是免疫细胞、淋巴组织、脾组织、脾细胞或B细胞。

经遗传修饰的非人动物和用于产生重链抗体的方法

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2022年9月16日提交的PCT/CN2022/119188和2022年12月2日提交的PCT/CN2022/136246的优先权。上述所有内容均以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及经遗传修饰的动物和用于产生重链抗体的方法。本发明还涉及抗TFR1抗体、抗原结合片段及其用途。

[0004] 发明背景

[0005] 治疗性抗体是增长最快的一类治疗性化合物,其增长速度超过了小分子药物。例如,单克隆抗体使癌症治疗发生了革命性变化。然而,常规抗体的大尺寸阻碍了体内向肿瘤细胞的递送。常规抗体的最小靶识别模块由两个非共价结合的可变结构域(VH和VL)组成。VH和VL结构域的固有疏水相互作用限制了工程化抗体的稳定性和溶解性,常常引起V-结构域的聚集和/或错配。

[0006] 重链抗体的发现为影响癌症治疗带来了前所未有的机遇。这些独特形式的骆驼类衍生抗体缺失完整的轻链和CH1结构域,并且仅由称为VHH的单个可变结构域组成。重组VHH是小的(15-20kDa)和严格的单体;它们以纳米亲和力结合它们的靶标,并且在宽的pH和温度范围内稳定。用VHH进行分子操作也更容易;与常规重组抗体及其片段相比,这促进了多价形式的单克隆抗体的产生,而常规重组抗体及其片段由于聚集和亲和力降低而存在问题。此外,VHH通常与常规抗体的免疫原性较低的表位结合。

[0007] 通常,治疗性抗体是人或人源化抗体。人或人源化抗体可以通过啮齿动物抗体(例如小鼠抗体)的人源化或通过使用噬菌体文库产生。然而,这些动物或噬菌体文库通常不能产生重链抗体。相反,重链抗体通常从骆驼科动物的重链抗体获得。这些骆驼科动物的重链抗体需要人源化。人源化过程可能对结合亲和力产生不利影响,并将免疫原性表位引入抗体。通常需要反复且耗时的实验来改进这些抗体的性质。在某些情况下,这些抗体在患者体内也可能具有免疫原性,导致其疗效随着时间的推移而减弱。因此,需要一种高效可靠的平台来产生人或人源化重链抗体和纳米抗体。

发明内容

[0008] 本发明涉及经遗传修饰的动物和细胞,所述动物和细胞具有人源化的免疫球蛋白重链可变区基因座和截短的免疫球蛋白重链恒定区基因座。例如,可以敲除IGHG1基因中的CH1编码区,使得所表达的IgG不包含CH1结构域。在一些实施方案中,免疫球蛋白轻链(例如,κ链和λ链)基因座也被敲除。在免疫接种后,这些动物能够产生具有高亲和力/多样性的重链抗体。在一些实施方案中,所述重链抗体可以进一步加工生成纳米抗体。

[0009] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其包含经修饰的免疫球蛋白重链基因座,在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含IgG恒定区基因,在一些实施方案中,IgG恒定区基因编码缺失CH1结构域的IgG重链恒定区,在一些实施方案中,经

遗传修饰的非人动物表达重链抗体。在一些实施方案中,所述动物包含仅一个IgG恒定区基因。在一些实施方案中,IgG重链恒定区基因是IGHG1。在一些实施方案中,IgG重链恒定区包含CH2结构域和CH3结构域以及任选的铰链区,或由CH2结构域和CH3结构域以及任选的铰链区组成。

[0010] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组包含种系遗传修饰,所述种系遗传修饰包含IGHG3、IGHG2b和IGHG2c基因的缺失以及内源免疫球蛋白重链基因座处IGHG1基因的CH1外显子的缺失。在一些实施方案中,所述种系遗传修饰还包括在内源免疫球蛋白重链基因座的内源IGHE基因的缺失。在一些实施方案中,所述遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ2b、Sγ2c和Sε转换区的缺失。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因,在一些实施方案中,经修饰的IGHG1基因包含与SEQ ID NO:1具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,所述遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ3转换区的缺失。在一些实施方案中,动物的基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHM、IGHδ、IGHA基因。在一些实施方案中,遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座的内源IGHM和IGHδ基因的缺失。在一些实施方案中,动物基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区,缺少编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源

[0011] IGHA基因。在一些实施方案中,Sμ和Sγ1转换区和与SEQ ID NO:8具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。在一些实施方案中,遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座的IGHM基因的CH1编码序列的缺失。在一些实施方案中,动物的基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHM基因,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHδ、IGHA基因。在一些实施方案中,所述Sμ转换区和经修饰的IGHM基因和与SEQ ID NO:10具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。在一些实施方案中,遗传修饰还包括在内源免疫球蛋白重链基因座的IGHM基因的CH1外显子的缺失和IGHδ基因的缺失。在一些实施方案中,动物的基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHM基因,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHA基因。在一些实施方案中,所述遗传修饰还包括在内源免疫球蛋白重链基因座的IGHM基因的CH1外显子的缺失和IGHδ基因的CH1编码序列的缺失。在一些实施方案中,动物基因组包含内源Sμ、Sγ1、Sα转换区,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHM基因,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHδ基因,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHA基因。在一些实施方案中,经修饰的IGHM基因和与SEQ ID NO:10具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接,并且经修饰的IGHδ基因包含与SEQ ID NO:41具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,经修饰的IGHM基因包含与SEQ ID NO:13具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,所述遗传修饰进一步包含在内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ1转换区的缺失。在一些实施方案中,动物的基因组包含内源Sμ、Sγ3、Sα转换区,缺少编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHM、IGHδ、IGHA基因。在一些实施方案中,所述遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座的内源Sγ3转换区的缺失。在一些实施方案中,所述遗传修饰进一步包括在内源免疫球蛋白重链基因座的内源IGHM和IGHδ基因的缺

失。在一些实施方案中,动物的基因组包含内源Sμ、Sα转换区,缺少编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和内源IGHA基因。在一些实施方案中,Sμ转换区和经修饰的IGHG1基因和与SEQ ID NO:9具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。在一些实施方案中,经修饰的基因组包含功能性IGHM基因。

[0012] 在一些实施方案中,当基因组中的序列被相同序列或来自相同动物的序列替换时,动物仍可具有内源序列。

[0013] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。在一些实施方案中,所述元件可操作地连接。在一些实施方案中,所述内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

[0014] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ3转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。在一些实施方案中,元件可操作地连接。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、IGHM基因、IGHδ基因、Sγ3转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IgHA基因。

[0015] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座上以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。在一些实施方案中,所述元件可操作地连接。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

[0016] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座上以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。在一些实施方案中,所述元件可操作地连接。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

[0017] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。在一些实施方案中,所述元件可操作地连接。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

[0018] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。在一些实施方案中,所述元件可操作地连接。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、Sγ1转换区、缺

少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

[0019] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其基因组在内源免疫球蛋白重链基因座以5'至3'顺序包含下列元件:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、缺少编码CH1结构域的序列的IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。在一些实施方案中,所述元件可操作地连接。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链恒定区基因座由下列功能基因和转换区组成:Sμ转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHM基因、缺少编码CH1结构域的序列的IGHδ基因、Sγ1转换区、缺少编码CH1结构域的序列的IGHG1基因、Sα转换区和IGHA基因。

[0020] 在一些实施方案中,动物表达包含缺失CH1结构域的IgG重链恒定区的重链抗体。在一些实施方案中,重链抗体以小于10^{-7}M、小于10^{-8}M或小于10^{-9}M的KD与其靶抗原结合。在一些实施方案中,重链抗体包含可变区、CH2结构域和CH3结构域或由可变区、CH2结构域和CH3结构域组成。在一些实施方案中,重链抗体还包含跨膜结构域和/或胞质结构域。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物不表达包含轻链的IgG抗体。在一些实施方案中,动物表达IgM、IgD和/或IgA(例如,功能性IgM、IgD和/或IgA)。

[0021] 在一些实施方案中,动物在内源免疫球蛋白重链基因座上包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因,在一些实施方案中,人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因可操作地连接并可经历VDJ重排。在一些实施方案中,所述动物包含选自表1的至少150个人IGHV基因、选自表2的至少20个人IGHD基因和选自表3的至少5个人IGHJ基因。在一些实施方案中,所述动物包含在人受试者的人14号染色体的内源免疫球蛋白重链基因座处所有人IGHV基因、所有人IGHD基因和所有人IGHJ基因。在一些实施方案中,动物包含在人细胞的人14号染色体的内源免疫球蛋白重链基因座处所有人IGHV基因、所有人IGHD基因和所有人IGHJ基因。在一些实施方案中,所述动物是小鼠,并且所述动物的内源免疫球蛋白重链基因座中的遗传修饰包括表4中的一个或多个小鼠IGHV基因、表5中的一个或多个小鼠IGHD基因和/或表6中的一个或多个小鼠IGHJ基因的缺失。在一些实施方案中,动物是小鼠,并且动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的遗传修饰包括从小鼠IGHV1-85基因开始到小鼠IGHJ4基因的连续序列的缺失。在一些实施方案中,所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的未经修饰的人序列,在一些实施方案中,所述未经修饰的人序列为至少800kb。在一些实施方案中,动物包含源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHV1-2的人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的人序列。在一些实施方案中,动物包含源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHV6-1的人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的人序列。在一些实施方案中,动物包含源自从人IGHD1-1开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的人序列。在一些实施方案中,动物包含源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座的未经修饰的人序列。

[0022] 在一些实施方案中,本文所述经遗传修饰的非人动物的基因组在内源免疫球蛋白重链基因座上包含:用一个或多个人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因替换一个或多个内源IGHV、内源IGHD和内源IGHJ基因,在一些实施方案中,人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因与内源IGHM、IGHδ、缺失编码CH1结构域的序列的IGHG1和IGHA基因中的一个或多个可操作地连接。在一些实施方案中,一个或多个内源IGHV、内源IGHD和内源IGHJ基因被表1中的至少150个人IGHV基因、表2中的至少20个人IGHD基因和表3中的至少5个人IGHJ基因替换。在一些实施方

案中,所述动物是小鼠,并且表4中的至少180个小鼠IGHV基因、表5中的所有小鼠IGHD基因和表6中的所有小鼠IGHJ基因被替换。在一些实施方案中,动物对于免疫球蛋白重链基因座是纯合的。在一些实施方案中,动物对于免疫球蛋白重链基因座是杂合的。在一些实施方案中,动物包含内源轻链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,动物包含内源免疫球蛋白轻链基因座中的破坏。在一些实施方案中,动物缺失能够重排并形成编码内源重链可变结构域的核酸序列的内源免疫球蛋白重链可变区基因座。在一些实施方案中,动物可产生人源化抗体。在一些实施方案中,动物是哺乳动物。在一些实施方案中,动物是啮齿动物。在一些实施方案中,动物是小鼠。在一些实施方案中,动物具有基本正常的B细胞发育和成熟。

[0023] 在一方面,本公开涉及从本文所述的经遗传修饰的非人动物获得的细胞。在一些实施方案中,所述细胞是表达嵌合免疫球蛋白重链的B细胞,所述嵌合免疫球蛋白重链包含源自一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因的重排的免疫球蛋白重链可变结构域,在一些实施方案中,免疫球蛋白重链可变结构域与非人重链恒定区可操作地连接。在一些实施方案中,细胞是胚胎干(ES)细胞。

[0024] 在一方面,本公开涉及制备特异性结合抗原的抗体的方法,该方法包括a)将所述的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;b)从动物采集的细胞产生杂交瘤;和c)收集由所述杂交瘤产生的重链抗体。在一些实施方案中,所述方法还包括对杂交瘤的基因组进行测序。

[0025] 在一方面,本公开涉及制备特异性结合抗原的抗体的方法,该方法包括a)将所述的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;b)对表达特异性结合抗原的重链抗体的细胞中的编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸测序;和c)在细胞中编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸与编码人免疫球蛋白重链恒定区的核酸可操作地连接。

[0026] 在一方面,本公开涉及制备特异性结合抗原的抗体的方法,该方法包括a)在表达特异性结合抗原的重链抗体的细胞中获得编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸序列,在一些实施方案中,该细胞通过将本文所述的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原而获得;b)编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸与编码人免疫球蛋白重链恒定区的核酸可操作地连接;和c)在细胞中表达所述核酸,从而获得所述抗体。

[0027] 在一方面,本公开涉及获得编码特异性结合抗原的抗体结合结构域的核酸的方法,该方法包括a)将如本文所述的经遗传修饰的非人动物暴露于该抗原;和b)对表达特异性结合抗原的重链抗体的细胞中的编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸测序。

[0028] 在一方面,本公开涉及制备特异性结合抗原的抗体的方法,该方法包括a)将如本文所述的经遗传修饰的非人动物暴露于该抗原;b)使用从动物的免疫细胞(例如脾细胞)制备的RNA构建噬菌体质粒文库;c)筛选噬菌体质粒文库和d)对来自噬菌体质粒的编码人免疫球蛋白重链可变区的核酸进行测序,所述噬菌体质粒编码特异性结合所述抗原的重链抗体。在一些实施方案中,筛选包括基于与抗原的结合亲和力分离表达免疫球蛋白重链可变区的噬菌体。

[0029] 在一方面,本公开涉及获得样品的方法,该方法包括a)将如本文所述的经遗传修饰的非人动物暴露于抗原;和b)从动物收集样品。在一些实施方案中,样品是免疫细胞、淋巴组织、脾组织、脾细胞或B细胞。

[0030] 在一方面,本发明涉及与转铁蛋白受体1(TFR1)结合的抗体或其抗原结合片段,包括:包括互补决定区(CDRs)1、2和3的重链单可变结构域(VHH),在一些实施方案中,VHH

CDR1区包括与选定的VHH CDR1氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列,VHH CDR2区包括与选定的VHH CDR2氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列,以及VHH CDR3区包括与选定的VHH CDR3氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列;在一些实施方案中,所选定的VHH CDRs 1、2和3氨基酸序列为以下之一:

[0031] (1)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:42、43和44所示;

[0032] (2)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:45、46和47所示;

[0033] (3)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:48、49和50所示;

[0034] (4)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:51、52和53所示;

[0035] (5)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:54、55和56所示;

[0036] (6)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:57、58和59所示;

[0037] (7)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:60、61和62所示;和

[0038] (8)所选定的VHH CDRs 1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:63、64和65所示。

[0039] 在一些实施方案中,VHH包含分别如SEQ ID NO:42、43和44所示氨基酸序列的CDR 1、2、3。在一些实施方案中,VHH包含分别如SEQ ID NO:45、46和47所示氨基酸序列的CDR 1、2、3。在一些实施方案中,VHH包含分别如SEQ ID NO:48、49和50所示氨基酸序列的CDR 1、2、3。在一些实施方案中,VHH包含分别如SEQ ID NO:51、52和53所示氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0040] 在一方面,本发明涉及结合TFR1的抗体或其抗原结合片段,其包含重链单一可变区(VHH),所述VHH包含与选定的VHH序列具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列,在一些实施方案中,所选VHH序列选自SEQ ID NO:66、67、68和69。在一些实施方案中,所述VHH包含SEQ ID NO:66的序列。在一些实施方案中,所述VHH包含SEQ ID NO:67的序列。在一些实施方案中,所述VHH包含SEQ ID NO:68的序列。在一些实施方案中,VHH包含SEQ ID NO:69的序列。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段特异性结合人TFR1、猴TFR1、小鼠TFR1或嵌合TFR1。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是人或人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。

[0041] 在一方面,本公开涉及抗体或其抗原结合片段,其包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段的VHH CDR 1、2、3。

[0042] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括人IgG Fc(例如,人IgG1 Fc)。在一些实施方案中,根据EU编号,人IgG Fc在297位包含非天冬酰胺残基(例如丙氨酸)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含两个或多个重链单可变结构域。

[0043] 在一方面,本公开涉及包含编码如本文所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的核酸。在一些实施方案中,核酸是cDNA。

[0044] 在一方面,本发明涉及包含一种或多种本文所述核酸的载体。

[0045] 在一方面,本公开涉及包含如本文所述的载体的细胞。在一些实施方案中,细胞是CHO细胞。在一方面,本公开涉及包含一种或多种本文所述核酸的细胞。

[0046] 在一方面,本公开涉及产生抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括(a)在足以使细胞产生抗体或其抗原结合片段的条件下培养如本文所述的细胞;和(b)收集由所述细胞产生的抗体或其抗原结合片段。

[0047] 在一方面,本公开涉及抗体-药物缀合物,其包含与治疗剂共价结合的如本文所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,治疗剂是细胞毒性或细胞生长抑制剂。

[0048] 在一方面,本公开涉及治疗患有脑部疾病(例如,脑癌)的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含本文所述的抗体或其抗原结合片段,或抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段,或抗体-药物缀合物可以穿过受试者的血脑屏障(BBB)。

[0049] 在一方面,本公开涉及治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段,或抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,癌症是脑癌、肺癌、胃癌、结肠直肠癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病或乳腺癌。在一方面,本公开涉及鉴定患有脑疾病(例如,脑癌)的受试者的方法,该方法包括通过本文所述的抗体或其抗原结合片段检测从患有脑疾病的受试者收集的样品,从而鉴定患有脑疾病的受试者。在一些实施方案中,样品是来自受试者的脑实质样品。在一些实施方案中,本文所述的受试者是人受试者。

[0050] 在一方面,本公开涉及递送药剂以穿过血脑屏障的方法,该方法包括给受试者施用与本文所述抗体或其抗原结合片段共价连接的药剂。在一些实施方案中,所述试剂是抗体或抗体药物缀合物。在一些实施方案中,所述试剂是抗淀粉样蛋白抗体。

[0051] 在一方面,本公开涉及包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体的药物组合物。在一方面,本公开涉及包含如本文所述的抗体药物缀合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0052] 在一方面,本发明涉及与本文所述抗体或其抗原结合片段交叉竞争的抗体或其抗原结合片段。

[0053] 在一方面,本公开提供了制备特异性结合抗原的抗体的方法。该方法包括将本文所述的动物暴露于抗原;在表达特异性结合抗原的嵌合重链抗体的细胞中获得编码人重链免疫球蛋白可变区的核酸序列(例如通过测序);和在细胞中编码人重链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人重链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接。

[0054] 本发明还涉及非人哺乳动物的后代。在一些实施方案中,非人哺乳动物是啮齿类动物。在一些实施方案中,非人哺乳动物是小鼠。

[0055] 本公开还提供了包括如本文所述的靶向载体的细胞。本公开还涉及来自非人哺乳动物或其后代的细胞(例如,干细胞、胚胎干细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞或杂交瘤)或细胞系或其原代细胞培养物。本发明还涉及来自非人哺乳动物或其后代的组织、器官或其培养物。

[0056] 本发明还涉及非人哺乳动物或其后代、通过本文所述方法产生的动物模型在开发与免疫过程相关的产品、制造人抗体或用于药理学、免疫学、微生物学和医学研究的模型系统中的用途。

[0057] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;也可以使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅是说明性的,而不是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献均全文均以引用方式并入本文。在冲突的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。

[0058] 从下面的详细描述和附图以及权利要求中,本发明的其它特征和优点将是显而易见的。

附图说明

[0059] 图1是重链抗体示意图。

[0060] 图2显示了IgM、IgD、IgG、IgE和IgA免疫球蛋白同种型的结构示意图。对小鼠和人免疫球蛋白重链基因座基因进行比对,并用相应的名称进行标记。

[0061] 图3显示小鼠免疫球蛋白重链基因座的恒定区基因的示意图。显示了包括外显子CH1、H、CH2、CH3、M1和M2的Cγ1基因结构。

[0062] 图4A-4B显示了在小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因座进行遗传修饰后的突变等位基因。

[0063] 图5显示了Cγ1ΔCH1的基因结构。CH1编码区缺失(左)或被NEO盒替换(右)。

[0064] 图6显示了使用打靶载体V1进行遗传修饰的流程(实施例3)。将小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因座上从Sγ3到Cε的100883bp序列在一个步骤中替换为包括小鼠Sγ1和Cγ1ΔCH1敲入序列的16076bp序列,以产生突变等位基因1。

[0065] 图7显示了使用打靶载体V2进行遗传修饰的流程(实施例3)。用包括Cγ1ΔCH1敲入序列的序列在单个步骤中替换小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因座上从Cγ3到Cε的92859bp序列,以产生突变等位基因1'。

[0066] 图8显示了使用打靶载体V3进行遗传修饰的流程(实施例3)。从突变等位基因1中敲除16434bp的Cμ和Cδ序列,产生突变等位基因2。

[0067] 图9显示了使用打靶载体V4进行遗传修饰的流程(实施例3)。从突变等位基因1中敲除包括Cμ、Cδ和Sγ1的序列,使得Sμ和Cγ1ΔCH1'直接连接,产生突变等位基因2'。

[0068] 图10显示了使用打靶载体V5进行遗传修饰的流程(实施例3)。从突变等位基因1中敲除Cμ中的CH1编码序列以产生突变等位基因3。

[0069] 图11显示了使用打靶载体V6进行遗传修饰的流程(实施例3)。从突变等位基因1中敲除Cμ中的CH1编码序列和整个Cδ,产生突变等位基因4。

[0070] 图12显示了使用打靶载体V7进行遗传修饰的流程(实施例3)。从突变等位基因1中敲除Cμ中的CH1编码序列和Cδ中的CH1编码序列以产生突变等位基因5。

[0071] 图13A-13B分别显示了使用引物对L-GT-F1/L-GT-R1和R-GT-F2/R-GT-R2的PCR检测结果,以验证突变等位基因1的基因型。WT是野生型对照。H_2O为空白对照。M为marker。

[0072] 图14A显示用BclI消化并与LR探针杂交的突变等位基因1阳性克隆的Southern印迹结果。M为marker。WT是野生型。

[0073] 图14B显示用ScaI消化并与3'探针杂交的突变等位基因1阳性克隆的Southern印迹结果。M为marker。WT是野生型。

[0074] 图14C显示用XmnI消化并与A探针杂交的突变等位基因1阳性克隆的Southern印迹结果。M为marke。WT是野生型。

[0075] 图14D显示用BglII消化并与5'探针杂交的突变等位基因1阳性克隆的Southern印迹结果。M为marke。WT是野生型。

[0076] 图15显示了使用引物DE-F1和DE-R1验证敲除突变等位基因2中从Cμ到Cδ的序列的

PCR检测结果。

[0077] 图16显示了使用引物GT-Mut-F、GT-Mut-R和GT-WT-R验证敲除突变等位基因2'中从Cμ到Sγ1的序列的PCR检测结果。

[0078] 图17显示了使用引物GT-3F和GT-3R验证敲除突变等位基因3中Cμ的CH1编码序列的PCR检测结果。

[0079] 图18A显示了使用引物Mut-F和Mut-R验证突变等位基因4中CμΔCH1序列的PCR检测结果。WT为野生型对照。H_2O为空白对照。

[0080] 图18B显示了使用引物F4和R4验证突变等位基因4中不存在Cδ的PCR检测结果。

[0081] 图19A-19B显示了使用引物对Mut-F/Mut-R和F3/R3分别验证突变等位基因5中CμΔCH1和CδΔCH1序列的PCR检测结果。WT是野生型对照。H_2O为空白对照。

[0082] 图20是将人免疫球蛋白基因导入小鼠基因组的方法的示例性流程图。

[0083] 图21是用人免疫球蛋白重链可变区基因座序列替换小鼠免疫球蛋白重链可变区基因座序列的概述。

[0084] 图22显示了通过用抗原A免疫杂合Mut3小鼠产生的抗体的重链可变区中CDR3的长度分布。

[0085] 图23显示了杂合小鼠中重链突变等位基因3基因型可变区基因的种系基因使用。

[0086] 图24显示了在杂合Mut3小鼠(H/-)中产生的针对抗原A的抗体的KD值分布。

[0087] 图25显示了纯合Mut2小鼠中产生的抗抗原A的抗体的KD值分布。

[0088] 图26显示了纯合Mut2小鼠中可变区基因的种系基因使用。

[0089] 图27是显示14号染色体(14q32.33)上的人免疫球蛋白重链(IGH)基因座的示意图。

[0090] 图28是显示小鼠(Mus musculus)12号染色体(12F2)(品系C57BL/6)上的IGH基因座的示意图。

[0091] 图29列出了人重链免疫球蛋白基因座(IGH)的IMGT谱系。

[0092] 图30列出了小鼠IGH的IMGT谱系。

[0093] 图31列出了本公开中讨论的序列。

[0094] 图32显示了分别具有突变等位基因2'、突变等位基因3和突变等位基因4基因型的小鼠的血清IgG水平的蛋白质印迹结果。Biot.Ladder是一种蛋白质marker。WT代表野生型小鼠。

[0095] 图33显示了通过用人4-1BB免疫杂合Mut3小鼠产生的抗体的重链可变区中CDR3的长度分布。

[0096] 图34显示了重链突变等位基因3基因型纯合小鼠中可变区基因的种系基因使用。

[0097] 图35显示了通过用人CD3ED和食蟹猴CD3ED免疫杂合Mut3小鼠产生的抗体的重链可变区中CDR3的长度分布。

[0098] 图36显示了重链突变等位基因3基因型纯合小鼠中可变区基因的种系基因使用。

[0099] 图37根据Kabat编号列出了抗TFR1抗体的重链可变区的CDR序列。

[0100] 图38根据IMGT编号列出了抗TFR1抗体的重链可变区的CDR序列。

[0101] 图39列出了抗TFR1抗体的重链可变区的氨基酸序列。

[0102] 图40A显示了通过静脉内(i.v.)施用hIgG1(G1)、JR141-N(G2)、23B8-N(G3)、24A1-

N(G4)、24G5-N(G5)或24C9-N(G6)后72小时内hTFR1小鼠的总脑蛋白中的抗体浓度。

[0103] 图40B显示在静脉内(i.v.)施用hIgG1(G1)、JR141-N(G2)、23B8-N(G3)、24A1-N(G4)、24G5-N(G5)或24C9-N(G6)的72小时内,hTFR1小鼠的脑总蛋白中的抗体浓度与血清抗体浓度的比率。

[0104] 图40C显示静脉内(i.v.)施用hIgG1(G1)、JR141-N(G2)、23B8-N(G3)、24A1-N(G4)、24G5-N(G5)或24C9-N(G6)后72小时内hTFR1小鼠脑实质中的抗体浓度。

[0105] 图40D显示在静脉内(i.v.)施用hIgG1(G1)、JR141-N(G2)、23B8-N(G3)、24A1-N(G4)、24G5-N(G5)或24C9-N(G6)的72小时内,hTFR1小鼠的脑实质中的抗体浓度与血清抗体浓度的比率。

[0106] 图41A显示静脉内(i.v.)施用hIgG1(G1)、JR141-N(G2)、23B8-N(G3)、24A1-N(G4)或24G5-N(G5)24小时后脑实质中的抗体浓度检测结果。

[0107] 图41B表示静脉内(i.v.)施用hIgG1(G1)、JR141-N(G2)、23B8-N(G3)、24A1-N(G4)或24G5-N(G5)24小时后的脑总蛋白(全脑)的抗体浓度检测结果。

[0108] 图42表示静脉内(i.v.)施用JR141-N(G2-G4)或24G5-N(G5-G7)6小时或24小时后的抗体浓度结果。将hIgG1用作阴性对照;

[0109] 图43显示了重链突变等位基因3基因型纯合的小鼠中可变区基因的种系基因使用;

[0110] 图44表示杂合Mut2'小鼠(H/-)中可变区基因的种系基因使用;

[0111] 图45表示杂合Mut2'小鼠(H/-)中产生的抗人血清白蛋白抗体的KD值分布;

[0112] 图46显示了重链突变等位基因4基因型纯合小鼠中可变区基因的种系基因使用;

[0113] 图47显示了重链突变等位基因5基因型纯合小鼠中可变区基因的种系基因使用。

[0114] 详细说明

[0115] 本发明涉及经遗传修饰的动物和用于产生重链抗体的方法。

[0116] 重链抗体(或仅有重链的抗体)是仅具有重链(通常为两条重链)而缺少通常在抗体中发现的两条轻链的抗体。在软骨鱼(如鲨鱼)和驼科动物(如美洲驼)中发现了天然存在的重链抗体。例如,在软骨鱼类中,免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR)是一种重链抗体。IgNAR显示出与其他抗体的显著结构差异。它每条链有五个恒定区(CH),而不是通常的三个,在不寻常的位置有几个二硫键,并且互补决定区3(CDR3)形成一个延伸的环,覆盖与其他抗体中的轻链结合的位点。这些差异,结合软骨鱼类的系统发育年龄,导致了IgNAR可能比哺乳动物免疫球蛋白更接近原始抗原结合蛋白的假说。

[0117] 唯一具有重链(IgG样)抗体的哺乳动物是驼科动物,如单峰骆驼、骆驼、美洲驼和羊驼。像所有哺乳动物一样,驼科动物(例如,美洲驼)可以产生由两条重链和两条轻链以Y形二硫键结合在一起构成的常规抗体(例如,IgG1)。然而,它们也产生两种独特的IgG亚类:IgG2和IgG3,也称为重链IgG。这些抗体仅由两条重链组成,其缺少CH1区,但在其N-末端仍具有抗原结合结构域(例如VHH)。常规Ig需要来自重链和轻链的可变区的结合,以允许抗原-抗体相互作用的高度多样性。尽管分离的重链和轻链仍然表现出这种能力,但与成对的重链和轻链相比,它们表现出非常低的亲和力。重链IgG的独特特征是其单体抗原结合区结合抗原的能力,其特异性、亲和力和特别是多样性与常规抗体相当,而不需要与另一区域配对。该特征主要是由于两条重链的可变区的氨基酸序列内的一对主要变异,当与常规Ig相

比时,其诱导深度构象变化。可变区中的主要替换阻止轻链与重链结合,但也阻止未结合的重链被免疫球蛋白结合蛋白再循环。

[0118] 这些重链抗体的单一可变结构域(命名为VHH、sdAb或纳米抗体)是由适应性免疫系统产生的最小抗原结合结构域。通常发现这些抗体的可变区的互补决定区3(CDR3)是常规抗体的两倍长。这导致与抗原的相互作用表面增加以及抗原-抗体相互作用的多样性增加,这补偿了轻链的缺失。具有长的互补决定区3(CDR3),VHH可以延伸到常规抗体不能接近的蛋白质上的缝隙中,包括功能上感兴趣的位点,如酶的活性位点或病毒表面上的受体结合峡谷。此外,额外的半胱氨酸残基使得结构更加稳定,从而增加了相互作用的强度。

[0119] 与携带常规抗体的可变结构域(VH和VL)的常规抗体相比,VHH提供许多其它优点,包括更高的稳定性、溶解性、表达产量和重折叠能力,以及更好的体内组织穿透性。此外,与常规抗体的VH结构域相反,VHH不显示与轻链结合的内在倾向。这有助于在存在功能性轻链基因座的情况下诱导重链抗体。此外,由于VHH不与VL结构域结合,因此与含有常规VH-VL对或基于VH结构域的单一结构域的构建体相比,更容易将VHH重组为双特异性抗体构建体。

[0120] 骆驼VHH和人VH结构域之间的显著差异是CDR3环的长度和方向。CDR3对应于抗体分子的独特区域,该区域由B细胞发育过程中新产生的DNA元件编码。基因重组导致D-元件与侧翼V-和J-元件的融合。在重组过程中,通过在连接处添加和/或缺失核苷酸产生进一步的遗传多样性。因此,CDR3环为抗体多样性和特异性提供了主要贡献。在一些早期转基因重链抗体动物中,有限数量的可变区基因(IGHV、IGHD和IGHJ)导致一些抗原不能被这些动物识别,尽管野生型动物能产生有效的抗原应答(Janssens,Rick等人"Generation of heavy-chain-only antibodies in mice."Proceedings of the National Academy of Sciences 103.41(2006):15130-15135)。本公开提供了具有完整的人重链抗体库的经遗传修饰的动物。因此,由这些动物产生的可变结构域可具有人重链可变结构域的最大可能多样性,从而使获得完全人源化重链抗体的机会最大化。

[0121] 此外,因为将人免疫球蛋白基因座的整个序列引入动物基因组(没有修饰或仅有有限的修饰),这些基因可以以与在人中发生的非常相似的方式经历V(D)J重排,降低了产生可在人免疫系统中识别的新的免疫原性表位的风险,从而降低了免疫原性。免疫原性可以导致抗药抗体的产生,并且可以包括功效。在这里,内源IGHV、IGHD和IGHJ基因已被有效删除。由抗体库产生的抗体在人中具有免疫原性的可能性较小。此外,由于有效的V(D)J重组,抗体生产可以非常有效,并且具有与正常生产速率相似的生产速率。

[0122] 因此,所述抗体更适合作为人的治疗剂。因此,经遗传修饰的动物为生产人源化重链抗体提供了有利的平台。

[0123] 此外,IgG1是血清中最丰富的抗体亚型,具有血清半衰期长、Fcγ R亲和力强、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)活性等。IgG1在抗体药物开发领域具有独特优势。因此,在一方面,本发明尤其涉及可产生IgG1亚型重链抗体的人源化小鼠的制备。同时,可以删除所有其它IgG亚型的编码序列。这为在动物体内产生重链抗体创造了一个高效可靠的平台。

[0124] 如本文所用,术语"抗体"是指含有至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补决定区(CDR)(例如,来自免疫球蛋白轻链的三个CDR中的任一个或来自免疫球蛋白重链的三个CDR中的任一个)且能够特异性结合表位的任何抗原结合分子。抗体的非限制

性实例包括:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单链抗体、重链抗体、嵌合抗体、人抗体和人源化抗体。在一些实施方案中,抗体可含有人抗体的Fc区。术语抗体还包括衍生物,例如双特异性抗体、单链抗体、双抗体、线性抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0125] 如本文所用,术语"抗原结合片段"是指全长抗体的一部分,其中该部分能够特异性结合抗原。在一些实施方案中,抗原结合片段含有至少一个可变结构域(例如,重链的可变结构域或轻链的可变结构域)。抗体片段的非限制性实例包括例如Fab、Fab'、F(ab')2和Fv片段。

[0126] 如本文所用,术语"人抗体"是指由存在于人中的核酸(例如,重排的人免疫球蛋白重链或轻链基因座)编码的抗体。在一些实施方案中,人抗体收集自人或在人细胞培养物(例如人杂交瘤细胞)中产生。在一些实施方案中,人抗体在非人细胞(例如小鼠或仓鼠细胞系)中产生。在一些实施方案中,人抗体在细菌或酵母细胞中产生。在一些实施方案中,人抗体在含有未重排或重排的人免疫球蛋白基因座(例如,重链或轻链人免疫球蛋白基因座)的转基因非人动物(例如,小鼠)中产生。

[0127] 如本文所用,术语"嵌合抗体"是指含有存在于至少两种不同抗体(例如,来自两种不同哺乳动物物种的抗体,例如人和小鼠抗体)中的序列的抗体。嵌合抗体的非限制性实例是含有人抗体的可变结构域序列(例如,轻链和/或重链可变结构域序列的全部或部分)和非人抗体的恒定结构域的抗体。嵌合抗体的其它实例在本文中描述并且是本领域已知的。

[0128] 如本文所用,术语"人源化抗体"是指含有源自非人(例如小鼠)免疫球蛋白的序列并含有源自人免疫球蛋白的序列的非人抗体。

[0129] 如本文所用,术语"单链抗体"是指含有至少两个能够特异性结合抗原的免疫球蛋白可变结构域(例如,哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域)的单一多肽。

[0130] 如本文所用,术语"重链抗体"是指仅由重链(通常为两条)组成且不具有任何轻链的抗体分子。

[0131] 如本文所用,术语"VHH"是指衍生自重链抗体的可变结构域。VHH可以特异性地识别抗原,而不需要与VL配对。在一些实施方案中,本文所述的VHH(也称为sdAb或纳米抗体)衍生自本文所述的任何人源化重链抗体。在一些实施方案中,本文所述的VHH、sdAb或纳米抗体衍生自由本文所述的任何经遗传修饰的非人动物产生的重链抗体。

[0132] 如本文所用,术语"受试者"和"患者"在整个说明书中可互换使用,并描述动物、人或非人。兽医和非兽医应用是本发明所预期的。人患者可以是成年人或青少年(例如,18岁以下的人)。除人外,患者包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔子、雪貂、猫、狗和灵长类动物。包括例如非人灵长类动物(例如,猴子、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿类动物(例如,大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔子)、兔形目动物、猪(例如,猪、小型猪)、马、犬、猫、牛和其它家养、农场和动物园动物。

[0133] 如本文所用,当提及抗体时,短语"特异性结合"和"特异性结合"是指相比于其他分子,抗体与其靶分子相互作用,因为该相互作用取决于靶分子上特定结构(即抗原决定簇或表位)的存在;换句话说,试剂识别并结合包括特定结构的分子,而非通常情况下的所有分子。特异性结合靶分子的抗体可称为靶特异性抗体。

[0134] 如本文所用,术语"多肽"、"肽"和"蛋白"可互换使用,是指任何长度的至少两个氨

基酸的氨基酸聚合物。

[0135] 如本文所用,术语“多核苷酸”、“核酸分子”和“核酸序列”在本文中可互换使用,是指至少两个核苷酸的任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括但不限于DNA、RNA、DNA/RNA杂合体及其修饰。

[0136] 如本文所用,术语“未修饰的人序列”是指来源于人受试者、人细胞、培养的人细胞或人细胞系的序列,其中所述序列与人受试者、人细胞、培养的人细胞或人细胞系的遗传序列相同。

[0137] 免疫球蛋白重链恒定区域基因座

[0138] 重链免疫球蛋白基因座也称为IGH或免疫球蛋白重基因座是染色体(例如,小鼠染色体12)上的一个区域,其中包含抗体(或免疫球蛋白)重链的基因。它包括编码重链可变区和重链恒定区的序列。

[0139] 如图2所示,小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因包括(如以下顺序所示):免疫球蛋白重链恒定区μ(IGHM,或Cμ)、免疫球蛋白重链恒定区δ(IGHδ,或Cδ)、免疫球蛋白重链恒定区γ3(IGHG3,或Cγ3)、免疫球蛋白重链恒定区γ1(IGHG1,或Cγ1)、免疫球蛋白重链恒定区γ2b(IGHG2b,或Cγ2b)、免疫球蛋白重链恒定区γ2c(IGHG2c,或Cγ2c)、免疫球蛋白重链恒定区ε(IGHE,或Cε)和免疫球蛋白重链恒定区α(IGHA,或Cα)基因。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区γ2a(IGHG2a)位于IGHG2c的位置。相反,人免疫球蛋白恒定区基因包括(如以下顺序所示):免疫球蛋白重链恒定区μ(IGHM,或Cμ),免疫球蛋白重链恒定区δ(IGHδ,Cδ),免疫球蛋白重链恒定区γ3(IGHG3,或Cγ3),免疫球蛋白重链恒定区γ1(IGHG1,或Cγ1),免疫球蛋白重链恒定区εP1(假基因)(IGHEP1,或ψCε),免疫球蛋白重链恒定区α1(IGHA1,或Cα1)、免疫球蛋白重链恒定区γP(非功能性)(IGHGP,或CγP;未显示)、免疫球蛋白重链恒定区γ2(IGHG2或Cγ2)、免疫球蛋白重链恒定区γ4

[0140] (IGHG4,Cγ4)、免疫球蛋白重链恒定区ε(IGHE或Cε)和免疫球蛋白重链恒定区α2(IGHA2或Cα2)基因。

[0141] 免疫球蛋白同类别转换(或同种型转换,或同型转换,或类别转换重组(CSR))是一种将B细胞产生的抗体从一个类型改变为另一个类型的生物学机制;例如,从同型IgM到同型IgG。在此过程中,抗体-重链的恒定区部分发生变化,但重链的可变区保持不变。由于可变区不改变,类别转换不影响抗原特异性。相反,抗体保留对相同抗原的亲和力,但可以与不同的效应分子相互作用。这允许来自同一激活B细胞的不同子细胞产生不同同型或亚型的抗体(例如IgG1、IgG2等)。类别转换通过一种称为类别转换重组(CSR)绑定的机制发生。类别转换重组是一种生物学机制,它允许激活的B细胞产生的抗体类别在称为同种型或类别转换的过程中发生变化。在CSR期间,抗体-重链基因座的部分从染色体上去除,并且围绕缺失部分的基因片段重新连接以保留产生不同同种型抗体的功能性抗体基因。双链断裂在DNA中的保守核苷酸基序(称为开关(S)区)处产生,该基序位于编码抗体重链恒定区的基因片段的上游;这些发生在除Cδ外的所有重链恒定区基因附近。通过一系列酶的活性,包括激活诱导的(胞苷)脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-内切核酸酶,DNA在两个选定的转换区被切口和断裂。随后从染色体中删除转换区之间的插入DNA,例如,去除不需要的Cμ或Cδ重链恒定区序列,并允许替换Cγ、Cα或Cε恒定区基因片段。DNA的自由末端通过称为非同源末端连接(NHEJ)的过程重新连接,以将可变结构域外显子连接到抗体重

链的所需下游恒定结构域外显子。在没有非同源末端连接的情况下,DNA的自由末端可以通过偏向于微同源连接的替代途径重新连接。除Cμ和Cδ基因外,B细胞在任何时间点仅表达一类抗体。图3显示了小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因座中每个转换区(例如Sμ、Sγ3、Sγ1、Sγ2b、Sγ2c、Sε和Sα)的位置。具体而言,Cγ1基因包含编码CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域和两个跨膜结构域的外显子。外显子分别用CH1、H、CH2、CH3、M1和M2标记。

[0142] 五类主要的免疫球蛋白是IgM、IgD、IgG、IgE和IgA,每一类都可以作为跨膜抗原受体或分泌抗体出现。在人中,IgG被发现为四个亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4),按其在血清中的丰度降序命名,IgA抗体被发现为两个亚类(IgA1和IgA2)。定义这些类别的不同重链称为同种型,分别用小写希腊字母μ(IgM)、δ(IgD)、γ(IgG)、ε(IgE)和α(IgA)表示。

[0143] 尽管IgG1-IgG4之间二硫键的位置和数量不同,但四种IgG亚型的结构非常相似。事实上,作为血浆中最丰富的IgG亚型,IgG1被广泛用于制备重组治疗性抗体。相比之下,IgG3很少用于抗体药物开发,因为它与FcRn的结合亲和力较弱,半衰期较短(约9天)。因此,基于IgG3的抗体药物由于药代动力学原因必须更频繁地给药。此外,不同亚型的抗体水平可以在身体发育期间改变,这在例如Elena Blanco等人"Age-Associated Distribution of Normal B-Cell and Plasma Cell Subsets in Peripheral Blood,"Journal of Allergy and Clinical Immunology,Volume 141,Issue 6(2018)中进行了描述,该文献通过引用整体并入本文。IgG1是血清中最丰富的抗体亚型,具有较长的血清半衰期、较强的FcγR亲和力、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)活性等。IgG1在抗体药物开发领域具有独特优势。因此,在一方面,本公开涉及可产生IgG1亚型的重链抗体的人源化小鼠的制备。一方面,本发明尤其涉及制备可产生IgG1亚型重链抗体的人源化小鼠。在一些实施方案中,可进一步加工重链抗体以产生纳米抗体。

[0144] 在一方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其包含经修饰的免疫球蛋白重链基因座,其中所述经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含IgG恒定区基因,其中所述IgG恒定区基因编码缺失CH1结构域的IgG重链恒定区,其中所述经遗传修饰的非人动物表达重链抗体。

[0145] 在一些实施方案中,IgG恒定区基因是下列之一:IGHG3、IGHG1、IGHG2a、IGHG2b和IGHG2c。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座具有一个、两个、三个、四个或五个IgG恒定区基因,其中它们都不编码CH1结构域。在一些实施方案中,仅一个、两个或三个IGHG基因不编码CH1结构域,而至少一个、两个或三个剩余的IGHG基因可编码CH1结构域。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座仅具有一个(例如,恰好一个)IgG恒定区基因,例如,IGHG1。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座不包括IGHG3、IGHG2a、IGHG2b和/或IGHG2c基因。

[0146] 在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座仅具有一个IGHG基因(例如,IGHG3、IGHG1、IGHG2a、IGHG2b或IGHG2c),并且编码IGHG中的CH1结构域的序列缺失。在一些实施方案中,IgHG基因与Sγ3、Sγ1、Sγ2a、Sγ2b或Sγ2c(例如Sγ3或Sγ1)可操作地连接。

[0147] 在一些实施方案中,IGHM是完整的功能性内源IGHM基因。在一些实施方案中,编码IGHM中CH1结构域的序列被删除。在一些实施方案中,IGHM被删除。在一些实施方案中,IGHδ是完整的功能性内源IGHδ基因。在一些实施方案中,编码IGHδ中的CH1结构域的序列被删

除。在一些实施方案中,IGHδ被删除。在一些实施方案中,IGHM和IGHδ都被删除。

[0148] 在一些实施方案中,IGHE是完整的功能性内源IGHE基因。在一些实施方案中,缺失编码IGHE中CH1结构域的序列。在一些实施方案中,删除了IGHE。

[0149] 在一些实施方案中,IGHA是完整的功能性内源IGHA基因。在一些实施方案中,编码IGHA中CH1结构域的序列被删除。在一些实施方案中,IGHA被删除。

[0150] 在各种实施例中,人源化重链抗体包括唯一的免疫球蛋白恒定区(Fc),该免疫球蛋白恒定区至少缺少CH1结构域。在一些实施例中,它还缺少人Fc的铰链区域。在一些实施方案中,重链抗体包括免疫球蛋白G(IgG)重链恒定区的CH2和CH3区。在一些实施方案中,重链抗体的恒定区包括IgG重链Fc的铰链、CH2和CH3区。

[0151] 在一些实施方案中,需要合适数量的重排重链可变区,当在B细胞发育过程中存在时,所述重排重链可变区能够有效地存活选择。在一方面,本公开提供了包含种系遗传修饰的转基因动物,所述种系遗传修饰包含编码IgG的CH1结构域的核苷酸序列的缺失,其中所述动物表达功能性IgM并且所述动物在其血清中表达IgG重链抗体(例如,具有IgG1重链CH2和CH3结构域)。在一些实施方案中,IgM包含两条重链,并且它们与两条λ或κ轻链结合以识别抗原。在一些实施方案中,功能性IgM包括CH1结构域。在一些实施方案中,功能性IgM不包括CH1结构域。不受任何理论的束缚,认为从内源IGHM基因中删除编码CH1结构域的序列基本上不改变IgM的功能。

[0152] 在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链恒定区基因座包括缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHδ基因。在一些实施方案中,修饰的IGHδ表达功能性IgD。不受任何理论的束缚,认为从内源IGHδ基因中删除编码CH1结构域的序列基本上不改变IgD的功能。

[0153] 免疫球蛋白重链可变区基因座

[0154] 为了生产人源化重链抗体(HCAb),可以将动物中的重链免疫球蛋白可变区基因座人源化。该重链免疫球蛋白可变区代表重链基因座的种系组织。基因座包括V(可变)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)区域。V区的基因形成V基因簇(也称为IGHV基因簇)。D区域的基因形成D基因簇(也称为IGHD基因簇)。J区的基因形成J基因簇(也称为IGHJ基因簇)。

[0155] 在B细胞发育过程中,DNA水平的重组事件将单个D区段(也称为IGHD基因)与J区段(也称为IGHJ基因)连接;然后将该部分重排的D-J区的融合D-J外显子连接到V区段(也称为IGHV基因)。然后将含有融合的V-D-J外显子的重排的V-D-J区转录并在RNA水平上融合到IGHM恒定区;该转录物编码μ重链。在发育后期,B细胞产生V-D-J-Cμ-Cδ前信使RNA,其被选择性剪接以编码μ或δ重链。淋巴结中的成熟B细胞经历转换重组,使得融合的V-D-J基因片段靠近IGHG、IGHA或IGHE基因片段之一,并且每个细胞表达γ、α或ε重链。许多不同IGHV基因与几个IGHJ基因的潜在重组提供了广泛的抗原识别。通过末端脱氧核苷酸转移酶随机添加核苷酸所产生的连接多样性,以及在脾脏和淋巴结中的B细胞成熟过程中发生的体细胞高突变,可以获得额外的多样性。已知一些V、D、J和C区段不能编码蛋白,并且被认为是假基因区段(通常简称为假基因)。

[0156] 人重链免疫球蛋白基因座位于人14号染色体上(图27和图29)。表1列出了IGHV基因及其在该基因座中的相对顺序。

[0157] 表1人14号染色体上的IGHV基因列表

[0158]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHV(III)-82	1	IGHV3-57	42	IGHV3-36	83	IGHV3-23	124
IGHV7-81	2	IGHV7-56	43	IGHV3-35	84	IGHV(III)-22-2	125
IGHV4-80	3	IGHV4-55	44	IGHV7-34-1	85	IGHV(II)-22-1	126
IGHV3-79	4	IGHV3-54	45	IGHV4-34	86	IGHV3-22	127
IGHV(II)-78-1	5	IGHV(II)-53-1	46	IGHV3-33-2	87	IGHV3-21	128
IGHV5-78	6	IGHV3-53	47	IGHV(II)-33-1	88	IGHV(II)-20-1	129
IGHV7-77	7	IGHV3-52	48	IGHV3-33	89	IGHV3-20	130
IGHV(III)-76-1	8	IGHV(II)-51-2	49	GOLGA4P1 (Golgin)	90	IGHV3-19	131
IGHV3-76	9	IGHV(III)-51-1	50	IGHV3-32	91	IGHV1-18	132
IGHV3-75	10	IGHV5-51	51	IGHV(II)-31-1	92	SLC20A1P2	133
IGHV(II)-74-1	11	IGHV3-50	52	IGHV4-31	93	IGHV1-17	134
IGHV3-74	12	IGHV(II)-49-1	53	IGHV3-30-52	94	IGHV(III)-16-1	135
IGHV3-73	13	IGHV3-49	54	IGHV(II)-30-51	95	IGHV3-16	136
IGHV3-72	14	IGHV3-48	55	IGHV3-30-5	96	IGHV(II)-15-1	137
IGHV3-71	15	IGHV(III)-47-1	56	IGHV3-30-42	97	IGHV3-15	138
IGHV2-70	16	IGHV3-47	57	IGHV(II)-30-41	98	IGHV1-14	139
IGHV1-69D	17	IGHV(II)-46-1	58	IGHV4-30-4	99	IGHV(III)-13-1	140
IGHV1-69-2	18	IGHV1-46	59	IGHV3-30-33	100	IGHV3-13	141
IGHV3-69-1	19	IGHV1-45	60	IGHV(II)-30-32	101	IGHV1-12	142
IGHV2-70D	20	IGHV(II)-44-2	61	IGHV3-30-3	102	IGHV(III)-11-1	143
IGHV1-69	21	IGHV(IV)-44-1	62	IGHV3-30-22	103	IGHV3-11	144
IGHV1-68	22	IGHV(III)-44	63	IGHV(II)-30-21	104	IGHV2-10	145
IGHV(III)-67-4	23	IGHV(II)-43-1	64	IGHV4-30-2	105	IGHV3-9	146
IGHV(III)-67-3	24	IGHV3-43	65	IGHV4-30-1	106	IGHV1-8	147
IGHV(III)-67-2	25	IGHV3-42	66	IGHV3-30-2	107	IGHV5-10-1	148
IGHV(II)-67-1	26	IGHV3-41	67	IGHV(II)-30-1	108	IGHV3-64D	149
SLC20A1P1 (GLVR1)	27	IGHV(II)-40-1	68	IGHV3-30	109	IGHV3-7	150
IGHV1-67	28	IGHV7-40	69	GOLGA4P2 (Golgin)	110	IGHV3-6	151
IGHV3-66	29	IGHV4-39	70	IGHV3-29	111	IGHV(III)-5-2	152
IGHV(II)-65-1	30	IGHV1-38-4	71	IGHV(II)-28-1	112	IGHV(III)-5-1	153
IGHV3-65	31	IGHV(III)-38-1D	72	IGHV4-28	113	IGHV2-5	154

[0159]

IGHV3-64	32	IGHV3-38-3	73	IGHV7-27	114	IGHV7-4-1	155
GOLGA4P3 (Golgin)	33	IGHV(III)-44D	74	IGHV(II)-26-2	115	IGHV4-4	156
IGHV3-63	34	IGHV(II)-43-1D	75	IGHV(III)-26-1	116	IGHV1-3	157
IGHV(II)-62-1	35	IGHV3-43D	76	IGHV2-26	117	IGHV(III)-2-1	158
IGHV3-62	36	IGHV3-42D	77	IGHV(III)-25-1	118	IGHV1-2	159
IGHV4-61	37	IGHV7-40D	78	IGHV3-25	119		*
IGHV(II)-60-1	38	IGHV4-38-2	79	IGHV1-24	120		*
IGHV3-60	39	IGHV(III)-38-1	80	IGHV3-23D	121	IGHV(II)-1-1	162
IGHV4-59	40	IGHV3-38	81	IGHV(III)-22-2D	122	IGHV6-1	163
IGHV1-58	41	IGHV3-37	82	IGHV(II)-22-1D	123		*

[0160] RPS8P1、ADAM6和KIAA0125也位于该基因座中。RPS8P1的相对顺序为160，ADAM6的

相对顺序为161,KIAA0125的相对顺序为164。表2列出了人14号染色体上的所有IGHD基因及其相对顺序。表3列出了人14号染色体上的所有IGHJ基因及其相对顺序。免疫球蛋白恒定区的基因位于IGHV、IGHD和IGHJ基因之后。这些基因包括(如以下顺序所示):免疫球蛋白重链恒定区μ(IGHM)、免疫球蛋白重链恒定区δ(IGHδ)、免疫球蛋白重链恒定区γ3(IGHG3)、免疫球蛋白重链恒定区γ1

[0161] (IGHG1)、免疫球蛋白重链恒定区εp1(假基因)(IGHEP1)、免疫球蛋白重链恒定区α1(IGHA1)、免疫球蛋白重链恒定区γP(非功能性)(IGHGP)、免疫球蛋白重链恒定区γ2(IGHG2)、免疫球蛋白重链区γ4(IGHG4)、免疫球蛋白重链恒定区ε(IGHE)和免疫球蛋白重链恒定区α2(IGHA2)。这些基因和这些基因的顺序也显示在图27和图29中。

[0162] 表2人14号染色体上的IGHD基因列表

[0163]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHD1-1	165	IGHD2-8	172	IGHD2-15	179	IGHD3-22	186
IGHD2-2	166	IGHD3-9	173	IGHD3-16	180	IGHD4-23	187
IGHD3-3	167	IGHD3-10	174	IGHD4-17	181	IGHD5-24	188
IGHD4-4	168	IGHD4-11	175	IGHD5-18	182	IGHD6-25	189
IGHD5-5	169	IGHD5-12	176	IGHD6-19	183	IGHD1-26	190
IGHD6-6	170	IGHD6-13	177	IGHD1-20	184		*
IGHD1-7	171	IGHD1-14	178	IGHD2-21	185	IGHD7-27	192

[0164] 表3人14号染色体上的IGHJ基因列表

[0165]

基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHJ1P	191	IGHJ4	197
IGHJ1	193	IGHJ5	198
IGHJ2	194	IGHJ3P	199
IGHJ2P	195	IGHJ6	200

[0166]

IGHJ3	196		

[0167] 小鼠重链免疫球蛋白基因座位于小鼠12号染色体上(图28和图30)。表4列出了IGHV基因及其在该基因座中的相对顺序。

[0168] 表4小鼠12号染色体上的IGHV基因列表

[0169]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHV1-86	1	IGHV1-51	50	IGHV15-2	99	IGHV4-1	148
IGHV1-85	2	IGHV1-50	51	IGHV1-8	100	IGHV14-1	149
IGHV1-84	3	IGHV8-5	52	IGHV10-4	101	IGHV7-2	150
IGHV1-83	4	IGHV1-49	53	IGHV1-7	102	IGHV7-1	151
IGHV1-82	5	IGHV1-48	54	IGHV1-6	103	IGHV5-19	152
IGHV1-81	6	IGHV8-4	55	IGHV10-3	104	IGHV2-9	153
IGHV1-80	7	IGHV8-3	56	IGHV1-5	105	IGHV2-8	154
IGHV1-79	8	IGHV1-47	57	IGHV10-2	106	IGHV5-18	155
IGHV1-78	9	IGHV1-46	58	IGHV1-4	107	IGHV5-17	156
IGHV1-77	10	IGHV1-45	59	IGHV1-3	108	IGHV5-16	157
IGHV8-16	11	IGHV1-44	60	IGHV10-1	109	IGHV5-15	158
IGHV1-76	12	IGHV1-43	61	IGHV1-2	110	IGHV2-7	159
IGHV8-15	13	IGHV1-42	62	IGHV8-2	111	IGHV2-6-8	160
IGHV1-75	14	IGHV1-41	63	IGHV6-7	112	IGHV2-9-1	161
IGHV8-14	15	IGHV1-40	64	IGHV6-6	113	IGHV5-12-4	162
IGHV1-74	16	IGHV1-39	65	IGHV6-5	114	IGHV5-9-1	163
IGHV1-73	17	IGHV1-38	66	IGHV6-4	115	IGHV2-6	164
IGHV8-13	18	IGHV1-37	67	IGHV6-3	116	IGHV5-12	165
IGHV1-72	19	IGHV1-36	68	IGHV12-3	117	IGHV5-11	166
IGHV1-71	20	IGHV1-35	69	IGHV13-2	118	IGHV2-5	167
IGHV1-70	21	IGHV1-34	70	IGHV1-1	119	IGHV5-10	168
IGHV8-12	22	IGHV1-33	71	IGHV8-1	120	IGHV5-9	169
IGHV1-69	23	IGHV1-32	72	IGHV3-8	121	IGHV5-8	170
IGHV1-68	24	IGHV1-31	73	IGHV5-21	122	IGHV2-4	171
IGHV1-67	25	IGHV1-30	74	IGHV3-7	123	IGHV5-7	172
IGHV1-66	26	IGHV1-29	75	IGHV9-4	124	IGHV5-6	173
IGHV8-11	27	IGHV1-28	76	IGHV3-6	125	IGHV5-5	174
IGHV1-65	28	IGHV1-27	77	IGHV13-1	126	IGHV2-3	175
IGHV8-10	29	IGHV1-26	78	IGHV3-5	127	IGHV6-1	176
IGHV1-64	30	IGHV1-25	79	IGHV3-4	128	IGHV5-4	177
IGHV1-63	31	IGHV1-24	80	IGHV7-4	129	IGHV5-3	178
IGHV8-9	32	IGHV1-23	81	IGHV3-3	130	IGHV2-2	179
IGHV1-62-3	33	IGHV1-22	82	IGHV14-4	131	IGHV5-2	180
IGHV1-62-2	34	IGHV1-21	83	IGHV15-1	132	IGHV2-1	181
IGHV1-62-1	35	IGHV1-21-1	84	IGHV7-3	133	IGHV5-1	182
IGHV1-62	36	IGHV1-20	85	IGHV9-3	134		
IGHV1-61	37	IGHV1-19	86	IGHV12-2	135		
IGHV1-60	38	IGHV1-19-1	87	IGHV9-2	136		
IGHV1-59	39	IGHV1-18	88	IGHV12-1	137		

[0170]

IGHV1-58	40	IGHV1-17	89	IGHV9-1	138		
IGHV8-8	41	IGHV1-17-1	90	IGHV6-2	139		
IGHV1-57	42	IGHV1-16	91	IGHV16-1	140		
IGHV8-7	43	IGHV1-15	92	IGHV14-3	141		
IGHV1-56	44	IGHV1-14	93	IGHV11-2	142		
IGHV1-55	45	IGHV1-13	94	IGHV3-2	143		
IGHV1-54	46	IGHV1-12	95	IGHV4-2	144		
IGHV8-6	47	IGHV1-11	96	IGHV14-2	145		
IGHV1-53	48	IGHV1-10	97	IGHV11-1	146		
IGHV1-52	49	IGHV1-9	98	IGHV3-1	147		

[0171] 表5列出了小鼠12号染色体上的所有IGHD基因及其相对顺序。表6列出了小鼠12号染色体上的所有IGHJ基因及其相对顺序。免疫球蛋白恒定区的基因位于IGHV、IGHD和IGHJ基因之后。这些基因包括(如以下顺序所示):免疫球蛋白重链恒定区μ(IGHM)、免疫球蛋白重链恒定区δ(IGHδ)、免疫球蛋白重链恒定区γ3(IGHG3)、免疫球蛋白重链恒定区γ1(IGHG1)、免疫球蛋白重链恒定区γ2b(IGHG2b)、免疫球蛋白重链恒定区γ2c(IGHG2c)、免疫球蛋白重链恒定区ε(IGHE)和免疫球蛋白重链恒定区α(IGHA)基因。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区γ2a(IGHG2a)位于IGHG2c的位置。这些基因和这些基因的顺序也显示在图28和图30。

[0172] 表5小鼠12号染色体上的IGHD基因列表

[0173]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHD5-1	183	IGHD2-5	191	IGHD5-5	198
IGHD3-1	184	IGHD5-3	192	IGHD2-8	199
IGHD1-1	185	IGHD5-7	193	IGHD5-6	200
IGHD6-1	186	IGHD2-6	194	IGHD3-2	201
IGHD2-3	187	IGHD5-4	195	IGHD4-1	202
IGHD6-2	188	IGHD5-8	196		
IGHD2-4	189	IGHD2-7	197		

[0174] 表6小鼠12号染色体上的IGHJ基因列表

[0175]

基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHJ1	203	IGHJ3	205
IGHJ2	204	IGHJ4	206

[0176] 本公开提供了经遗传修饰的非人动物,其包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和/或一个或多个人IGHJ基因。在一些实施方案中,人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因可操作地连接在一起,并且可以经历VDJ重排。在一些实施方案中,人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因位于内源重链免疫球蛋白基因座。

[0177] 在一些实施方案中,动物包括约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160或161个人IGHV基因(例如,如表1所示的基因)。

[0178] 在一些实施方案中,所述动物包含约或至少150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160或161个选自表1的人IGHV基因,约或至少20、21、22、23、24、25、26或27个选自

表2的人IGHD基因,和约或至少5、6、7、8、或9个选自表3的人IGHJ基因。在一些实施方案中,动物包含表1中除IGHV2-10、IGHV3-9和IGHV1-8之外的所有人IGHV基因、表2中的所有人IGHD基因和表3中的所有人IGHJ基因。在一些实施方案中,动物包含表1中除IGHV5-10-1和IGHV3-64D之外的所有人IGHV基因、表2中的所有人IGHD基因和表3中的所有人IGHJ基因。在一些实施方案中,所述动物在人受试者的人14号染色体的内源重链免疫球蛋白基因座上包含所有人IGHV基因、所有人IGHD基因和所有人IGHJ基因。在一些实施方案中,动物在人细胞(例如,体细胞、培养细胞、非免疫细胞、没有任何V(D)J重排的细胞)的人14号染色体的内源重链免疫球蛋白基因座处包含所有人IGHV基因、所有人IGHD基因和所有人IGHJ基因。

[0179] 在一些实施方案中,动物包含选自IGHV(III)-82、IGHV7-81、IGHV4-80、IGHV3-79、IGHV(II)-78-1、IGHV5-78、IGHV7-77、IGHV(III)-76-1、IGHV3-76和IGHV3-75的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个基因。

[0180] 在一些实施方案中,动物包含选自IGHV(III)-5-2、IGHV(III)-5-1、IGHV2-5、IGHV7-4-1、IGHV4-4、IGHV1-3、IGHV(III)-2-1、IGHV1-2、IGHV(II)-1-1和IGHV6-1的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个基因。

[0181] 在一些实施方案中,所述动物包括未修饰的人序列,所述人序列包含起始于选自IGHV(III)-82、IGHV7-81、IGHV4-80、IGHV3-79、IGHV(II)-78-1、IGHV5-78、IGHV7-77、IGHV(III)-76-1、IGHV3-76和IGHV3-75的基因并终止于选自IGHV(III)-5-2、IGHV(III)-5-1、IGHV2-5、IGHV7-4-1、IGHV4-4、IGHV1-3、IGHV(III)-2-1、IGHV1-2、IGHV(II)-1-1和IGHV6-1。在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHV1-2的人重链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHV(II)-1-1的人重链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHV-6-1的人重链免疫球蛋白基因座。

[0182] 在一些实施方案中,动物包括约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27个人IGHD基因(例如,如表2中所示的基因)。在一些实施方案中,所述动物包含选自IGHD1-1、IGHD2-2、IGHD3-3、IGHD4-4、IGHD5-5、IGHD4-23、IGHD5-24、IGHD6-25、IGHD1-26和IGHD7-27的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个基因。

[0183] 在一些实施方案中,动物包含约或至少1、2、3、4、5、6、7、8或9个人IGHJ基因(例如,如表3所示的基因)。在一些实施方案中,所述动物包含选自IGHJ1P、IGHJ1、IGHJ2、IGHJ2P、IGHJ3、IGHJ4、IGHJ5、IGHJ3P和IGHJ6的1、2、3、4、5、6、7、8或9个人IGHJ基因。

[0184] 在一些实施方案中,所述动物包括未修饰的人序列,所述未修饰的人序列包含起始于选自IGHD1-1、IGHD2-2、IGHD3-3、IGHD4-4、IGHD5-5、IGHD4-23、IGHD5-24、IGHD6-25、IGHD1-26和IGHD7-27的基因并终止于选自IGHJ1P、IGHJ1、IGHJ2、IGHJ2P、IGHJ3、IGHJ4、IGHJ5、IGHJ3P和IGHJ6。在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHD1-1开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座。

[0185] 在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHD1-1开始至人IGHD7-27的人重链免疫球蛋白基因座。

[0186] 在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHJ1P开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHJ1开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座。

[0187] 在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHV(III)-82开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座。

[0188] 在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHV1-2开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHV(II)-1-1开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,未修饰的人序列源自从人IGHV6-1开始至人IGHJ6的人重链免疫球蛋白基因座。

[0189] 在一些实施方案中,动物可具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个未修饰的人序列。在一些实施方案中,未修饰的人序列具有约或至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、

[0190] 900或1000kb的长度。

[0191] 在一些方面,本公开涉及经遗传修饰的动物,其在内源重链免疫球蛋白基因座上包含第一序列,所述第一序列包含一个或多个人IGHV基因;包含内源序列的第二序列;和包含一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因的第三序列,其中所述第一序列、第二序列和第三序列可操作地连接。

[0192] 在一些实施方案中,第一序列包含约或至少150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160或161个选自表1的人IGHV基因。在一些实施方案中,第一序列包含约或至少20、21、22、23、24、25、26或27个选自表2的人IGHD基因。

[0193] 在一些实施方案中,第一序列是源自人重链免疫球蛋白基因座的未修饰序列。在一些实施方案中,第一序列约或至少为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000kb。

[0194] 在一些实施方案中,第二序列包含约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20kb的内源序列。

[0195] 在一些实施方案中,第三序列包含约或至少20、21、22、23、24、25、26或27个选自表2的人IGHD基因。在一些实施方案中,第三序列包含约或至少5、6、7、8或9个选自表3的人IGHJ基因。在一些实施方案中,第三序列包含表2中的所有人IGHD基因,和表3中的所有人IGHJ基因。

[0196] 在一些实施方案中,所述动物包含一种或多种内源基因,所述内源基因选自免疫球蛋白重链恒定区μ(IGHM)、免疫球蛋白重链恒定区δ(IGHδ)、免疫球蛋白重链恒定区γ3(IGHG3)、免疫球蛋白重链恒定区γ1(IGHG1)、免疫球蛋白重链恒定区γ2b(IGHG2b)、免疫球蛋白重链恒定区γ2c(IGHG2c)、免疫球蛋白重链恒定区ε(IGHE)、和免疫球蛋白重链恒定区α(IGHA)基因。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链恒定区γ2a(IGHG2a)位于IGHG2c的位置。在一些实施方案中,这些内源基因可操作地连接在一起。在一些实施方案中,这些内源基因具有与野生型动物相同的顺序。在一些实施方案中,同种型转换(免疫球蛋白类别转换)可在动物中发生。

[0197] 在一些实施方案中,IGHV基因、IGHD基因和/或IGHJ基因可操作地连接在一起。VDJ重组可以在这些基因之间发生并产生功能性抗体。在一些实施方案中,这些基因以与人重链免疫球蛋白基因座中的顺序相似的顺序排列。这种排列提供了各种优点,例如,这些基因的排列允许产生具有多样性的重链可变结构域,该多样性非常类似于人重链可变结构域的多样性。由于一些随机序列可在VDJ重组期间插入到序列中,在一些实施方案中,没有修饰

或修饰最少的完整人抗体库可降低在VDJ重组期间插入非人序列的可能性。

[0198] 在一些实施方案中,IGHV基因、IGHD基因和/或IGHJ基因与选自IGHM、IGHδ、IGHG3、IGHG1、IGHG2a、IGHG2b、IGHG2c、IGHE和IGHA基因的一个或多个基因(例如,所有基因)可操作地连接在一起。

[0199] 在一些实施方案中,动物包含在动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中,动物内源重链免疫球蛋白基因座的破坏包括一个或多个内源IGHV基因、一个或多个内源IGHD基因和一个或多个内源IGHJ基因的缺失。

[0200] 在一些实施方案中,动物是小鼠。动物内源重链免疫球蛋白基因座的破坏包括缺失至少或约1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,160,170,171,172,173,174,175,176,177、178、

[0201] 179、180、181或182个小鼠IGHV基因(例如,如表4所示的基因)。在一些实施方案中,破坏包括缺失约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGHV1-86、IGHV1-85、IGHV1-84、IGHV1-83、IGHV1-82、IGHV1-81、IGHV1-80、IGHV1-79、IGHV1-78和IGHV1-77的小鼠IGHV基因。在一些实施方案中,小鼠仍然包括选自IGHV1-86、IGHV1-85、IGHV1-84、IGHV1-83、IGHV1-82、IGHV1-81、IGHV1-80、IGHV1-79、IGHV1-78和IGHV1-77(例如,IGHV1-86)的约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个小鼠IGHV基因。

[0202] 在一些实施方案中,破坏包括缺失约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGHV5-6、IGHV5-5、IGHV2-3、IGHV6-1、IGHV5-4、IGHV5-3、IGHV2-2、IGHV5-2、IGHV2-1和IGHV5-1的小鼠IGHV基因。在一些实施方案中,小鼠仍然包含缺失约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGHV5-6、IGHV5-5、IGHV2-3、IGHV6-1、IGHV5-4、IGHV5-3、IGHV2-2、IGHV5-2、IGHV2-1和IGHV5-1的小鼠IGHV基因。

[0203] 在一些实施方案中,动物内源重链免疫球蛋白基因座的破坏包括缺失至少或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个小鼠IGHD基因(例如,如表5所示的基因)。在一些实施方案中,破坏包括缺失约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGHD5-1、IGHD3-1、IGHD1-1、IGHD6-1、IGHD2-3、IGHD2-7、IGHD2-8、IGHD5-6、IGHD3-2和IGHD4-1的小鼠IGHD基因。在一些实施方案中,所述小鼠仍然包括选自IGHD5-1、IGHD3-1、IGHD1-1、IGHD6-1、IGHD2-3、IGHD2-7、IGHD2-8、IGHD5-6、IGHD3-2和IGHD4-1的约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个小鼠IGHD基因。

[0204] 在一些实施方案中,破坏包括约或至少1、2、3或4个选自IGHJ1、IGHJ2、IGHJ3和IGHJ4的小鼠IGHJ基因的缺失。在一些实施方案中,小鼠仍然包括选自IGHJ1、IGHJ2、IGHJ3和IGHJ4的约或至少1、2、3或4个小鼠IGHJ基因。

[0205] 在一些实施方案中,动物的内源重链免疫球蛋白基因座的破坏包括内源序列的约或至少500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1000kb、1500kb、2000kb、2500kb或3000kb的缺失。

[0206] 在一些实施方案中,缺失序列从IGHV1-86到IGHJ4,从IGHV1-85到IGHJ4,从IGHV1-84到IGHJ4,从IGHV1-83到IGHJ4,或从IGHV1-82到IGHJ4(例如,从IGHV1-85到IGHJ4)。

[0207] 在一些实施方案中,所述动物包含约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个序列,所述序列与人重链免疫球蛋白基因座中的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%

同一性。在一些实施方案中,所述序列具有约或至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000或3500kb的长度。在一些实施方案中,所述序列从人IGHV(III)-82开始至IGHV1-2。在一些实施方案中,所述序列从人IGHV7-81开始至IGHV1-2。在一些实施方案中,所述序列从人IGHV(II)-1-1开始至IGHJ6。在一些实施方案中,所述序列从人IGHV6-1开始至IGHJ6。

[0208] 人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因可操作地连接在一起,并且可以经历VDJ重排。在一些实施方案中,经修饰的小鼠具有完整的人IGHV、IGHD和IGHJ基因库(例如,包括所有非假人IGHV、IGHD和IGHJ基因)。因此,经修饰的小鼠可以产生完整的人抗体库。在一些实施方案中,在VDJ重组后,一个IGHV基因(例如,IGHV3-21或IGHV3-74)构成了编码抗体重链可变区的序列。一个IGHD基因构成了编码抗体重链可变区的序列。并且一个IGHJ基因构成了编码抗体重链可变区的序列。在一些实施方案中,IGHV基因是IGHV3-21或IGHV3-74。

[0209] 在一些实施方案中,一个IGHV基因(例如,IGHV3-30、IGHV3-33、IGHV4-39或IGHV4-34)构成了编码抗体重链可变区的序列。一个IGHD基因(例如,IGHD6-19)构成了编码抗体重链可变区的序列。一个IGHJ基因(例如IGHJ4或IGHJ6)构成了编码抗体重链可变区的序列。

[0210] 此外,在一些情况下,敲除完整的小鼠IGHV基因、IGHD基因和IGHJ基因(例如,包括所有非假基因),并且重链可变区将不具有由来自小鼠的序列编码的任何序列,从而使人的免疫原性最小化。

[0211] 在一些实施方案中,所述基因座可具有约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30或40个非人外源IGHV基因(例如,来自骆驼科动物)。在一些实施方案中,所述基因座可具有约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30或40个非人外源IGHD基因(例如来自骆驼科动物)。在一些实施方案中,所述基因座可具有约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30或40个非人外源IGHJ基因(例如,来自骆驼科动物)。这些非人外源基因有助于提高VHH结构域的多样性。

[0212] 例如,在WO2020169022A1中描述了重链免疫球蛋白基因座上的各种修饰,其通过引用整体并入本文。

[0213] 免疫球蛋白轻链基因座

[0214] 在一些实施方案中,动物具有完整的κ和/或λ链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,动物具有被破坏的κ和/或λ链免疫球蛋白基因座。

[0215] κ链免疫球蛋白基因座(也称为IGK或免疫球蛋白κ基因座)是染色体(例如,6号染色体)上含有人抗体(或免疫球蛋白)轻链基因的区域。类似地,免疫球蛋白轻链基因也可以经历一系列重排,导致产生成熟的免疫球蛋白轻链核酸(例如κ链)。

[0216] V片段(也称为IGKV基因)和J片段(也称为IGKJ基因)的连接产生编码整个轻链可变结构域的连续外显子。在未重排的DNA中,V基因片段(或IGKV基因簇)位于相对远离C区的位置。J基因片段(或IGKJ基因簇)位于C区附近。V片段与J基因片段的连接也使V基因接近C区序列。重排的V区的J基因片段仅通过内含子与C区序列分开。为了制备完整的免疫球蛋白轻链信使RNA,在转录后通过RNA剪接将V区外显子连接到C区序列。

[0217] 在一些实施方案中,所述动物包含在所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中,动物内源轻链免疫球蛋白基因座的破坏包括一个或多个内源IGKV基因和一个或多个内源IGKJ基因的缺失。

[0218] 在一些实施方案中,动物是小鼠。动物内源κ链免疫球蛋白基因座的破坏包括缺失至少或约1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159、160、161、162或163个小鼠IGKV基因。在一些实施方案中,破坏包括缺失约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGKV2-137、IGKV1-136、IGKV1-135、IGKV14-134-1、IGKV17-134、IGKV1-133、IGKV1-132、IGKV1-131、IGKV14-130和IGKV9-129的小鼠IGKV基因。在一些实施方案中,小鼠仍然包括约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGKV2-137、IGKV1-136、IGKV1-135、IGKV14-134-1、IGKV17-134、IGKV1-133、IGKV1-132、IGKV1-131、IGKV14-130和IGKV9-129的小鼠IGKV基因。

[0219] 在一些实施方案中,破坏包括缺失约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGKV3-10、IGKV3-9、IGKV3-8、IGKV3-7、IGKV3-6、IGKV3-5、IGKV3-4、IGKV3-3、IGKV3-2和IGKV3-1的小鼠IGKV基因。在一些实施方案中,小鼠仍然包括约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个选自IGKV3-10、IGKV3-9、IGKV3-8、IGKV3-7、IGKV3-6、IGKV3-5、IGKV3-4、IGKV3-3、IGKV3-2和IGKV3-1的小鼠IGKV基因。

[0220] 在一些实施方案中,破坏包括缺失约或至少1、2、3、4或5个选自IGKJ1、IGKJ2、IGKJ3、IGKJ4和IGKJ5的小鼠IGKJ基因。在一些实施方案中,小鼠仍然包括约或至少1、2、3、4或5个选自IGKJ1、IGKJ2、IGKJ3、IGKJ4和IGKJ5(例如IGKJ5)的小鼠IGKJ基因。

[0221] 在一些实施方案中,动物的内源κ轻链免疫球蛋白基因座的破坏包括内源序列的约或至少500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1000kb、1500kb、2000kb、2500kb、3000kb或3500kb的缺失。

[0222] 在一些实施方案中,缺失序列从IGKV2-137开始到IGKJ4,从IGKV1-136开始到IGKJ4,从IGKV1-135开始到IGKJ4,从IGKV2-137开始到IGKJ5,从IGKV1-136开始到IGKJ5,或从IGKV1-135开始到IGKJ5(例如,从IGKV2-137开始到IGKJ5)。

[0223] 在一些实施方案中,所述动物包含在所述动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中,动物的内源轻链免疫球蛋白基因座的破坏包括缺失一个或多个内源IGLV基因、一个或多个内源IGLJ基因和/或一个或多个免疫球蛋白λ恒定(IGLC)基因(例如,IGLC1、IGLC2、IGLC3和IGLC4)。

[0224] 动物内源λ轻链免疫球蛋白基因座的破坏包括至少或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个小鼠IGLV、IGLJ和IGLC基因的缺失。在一些实施方案中,所述缺失包括约或至少1、2、3或4个选自IGLC1、IGLC2、IGLC3和IGLC4的小鼠IGLC基因。在一些实施方案中,所述破坏包括约或至少1个、2个或3个选自IGLV1、IGLV2和IGLV3的小鼠IGLV基因的缺失。在一些实施方案中,所述破坏包括缺失约或至少1、2、3、4或5个选自IGLJ1、IGLJ2、IGLJ3、IGLJ3P和IGLJ4的小鼠IGLJ基因。

[0225] 在一些实施方案中,动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座的破坏包括约或至少10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kb、150kb、160kb、170kb、180kb、190kb、200kb、210kb、220kb、230kb、240kb、250kb、260kb、270kb、280kb、290kb、300kb、350kb、400kb、450kb、500kb或1000kb的核苷酸。在一些实施方案中,在动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因中没有破坏。

[0226] 在一些实施方案中,缺失序列从IGLV2开始至IGLC1,从IGLV3开始至IGLC1,或从IGLJ2开始至IGLC1。

[0227] 例如,在WO2020169022A1中描述了轻链免疫球蛋白基因座上的各种修饰,其全部内容通过引用并入本文。

[0228] 经遗传修饰动物

[0229] 本申请提供了经遗传修饰的非人动物,其产生仅有重链的抗体,即缺失轻链的抗体。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物不产生包含轻链的IgG(例如IgG1)分子。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物不产生任何常规IgG分子,即具有两条重链和两条轻链的IgG抗体。

[0230] 在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物具有全功能内源轻链基因座。在一些实施方案中,动物的免疫球蛋白重链基因座包含全功能的IGHM、IGHδ和/或IGHA基因。在一些实施方案中,动物的基因组在内源免疫球蛋白重链恒定区基因座中不包含外源序列(例如,人免疫球蛋白重链恒定区基因)。

[0231] 在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座缺少内源IGHG基因(例如,IGHG1基因)的CH1外显子。在一些实施方案中,动物的免疫球蛋白重链基因座包含IGHG1基因的全功能H、CH2、CH3、M1和/或M2外显子。

[0232] 在一些实施方案中,动物的免疫球蛋白重链基因座仅具有对内源IGHG1基因的CH1外显子的修饰。在一些实施方案中,所述修饰不包括编码IgG1铰链区的基因的突变,例如缺失或功能缺失突变。在一些实施方案中,修饰不包括突变,例如对IGHG1基因的CH2或CH3外显子的缺失或功能缺失突变。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链基因座不具有对IGHM基因的CH1外显子的突变或修饰。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物在内源IGHM基因座具有编码IgM的CH1结构域的功能基因片段。

[0233] 在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物具有编码其它重链恒定同种型(例如IgM、IgD和/或IgA)的完全功能性基因。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物具有完全功能性的IGHM、IGHδ和/或IGHA基因。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座具有野生型IGHM、IGHδ和/或IGHA基因。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座不包含对内源IGHM、IGHδ和/或IGHA基因的任何突变。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链基因座具有完整的内源IGHM、IGHδ或IGHA基因。

[0234] 在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物表达野生型IgM、IgD和/或IgA蛋白。

[0235] 在一些实施方案中,免疫球蛋白重链基因座包括对IGHM和/或IGHδ基因的CH1外显子的突变(例如缺失)或修饰。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链基因座具有经修饰的IGHM基因和/或经修饰的IGHδ基因。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物不表达野生型IgM和/或IgD。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物表达缺失CH1结构域的IgM和/或缺失CH1结构域的IgD。

[0236] 在一些实施方案中,在经遗传修饰的非人动物中引入对内源免疫球蛋白重链基因座的修饰可维持动物的健康,包括基本正常的B细胞发育和成熟。在一些实施方案中,在经遗传修饰的非人动物中引入对内源免疫球蛋白重链基因座的修饰降低或避免了外源序列的免疫原性。在一些实施方案中,在经遗传修饰的非人动物中引入内源免疫球蛋白重链基因座的最小改变保留了内源免疫球蛋白重链基因座的正常功能,包括V-D-J重排、经典转换重组和体细胞超突变。

[0237] 在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物具有一个或多个全功能轻链基因座,

例如λ轻链基因座和/或κ轻链基因座。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物具有未改变的内源轻链基因座。在一些实施方案中,没有将突变引入经遗传修饰的非人动物的内源轻链基因座。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物的λ和/或κ轻链可变区基因座是功能性的,而不是沉默的。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物表达野生型λ轻链和/或野生型κ轻链。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物表达包含轻链的功能性IgM分子。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物表达包含轻链的功能性IgA、IgD和/或IgM分子。在一些实施方案中,经遗传修饰的非人动物不具有外源轻链基因或基因簇。例如,可以敲除经遗传修饰的非人动物的λ和/或κ轻链可变区基因座。

[0238] 在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座不包含重排的基因(例如,重排的IGHV、IGHD和/或IGHJ基因)。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含全部未重排的人IGHV、IGHD和IGHJ基因。

[0239] 在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含紧接在内源IGHG1基因的CH1外显子之后的功能性剪接位点。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含紧接在内源IGHG1基因的CH1外显子之后的野生型剪接位点

[0240] 在一些实施方案中,本文所述的动物表达缺失CH1结构域的膜结合IgG1。在一些实施方案中,本文所述的动物表达缺失CH1结构域的可溶性IgG1。

[0241] 在一方面,本公开提供了包含人源化重链免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的非人动物。在一些实施方案中,动物包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和/或一个或多个人IGHJ基因。在一些实施方案中,这些基因位于内源免疫球蛋白基因座。

[0242] 在一些实施方案中,所述动物包含内源κ或λ链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,动物不包含内源κ或λ链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,所述动物包含在所述动物的内源κ或λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中,动物在动物的内源κ或λ轻链免疫球蛋白基因座中没有破坏。

[0243] 经遗传修饰的非人动物可以是各种动物,例如小鼠、大鼠、兔、猪、牛(例如奶牛、公牛、水牛)、鹿、绵羊、山羊、鸡、猫、狗、雪貂、灵长类(例如绒猴、恒河猴)。对于不容易获得合适的可遗传修饰的胚胎干(ES)细胞的非人动物,使用其它方法来制备包含遗传修饰的非人动物。此类的方法包括,例如,修饰非ES细胞基因组(例如,成纤维细胞或诱导多能细胞)和采用核移植将修饰的基因组转移到合适的细胞,例如卵母细胞,并在合适的条件下在非人动物中孕育修饰的细胞(例如,经修饰的卵母细胞)以形成胚胎。这些方法是本领域已知的,并且描述于例如A.Nagy等人“Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual (Third Edition)”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2003中,其全部内容通过引用并入本文。因此,在各种实施方案中,人V、D和/或J区段可与非人动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、仓鼠)恒定区基因序列可操作地连接。在B细胞发育过程中,这些重排的人V、D和/或J区段与非人动物免疫球蛋白恒定区连接。

[0244] 在一个方面,该动物是哺乳动物,例如,双足总科或鼠总科(Muroidea)的哺乳动物。在一些实施方案中,所述转基因动物是啮齿动物。啮齿动物可选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的动物来自选自丽仓鼠科(Calomyscidae)(例如,鼠样仓鼠)、仓鼠科(Cricetidae)(例如,仓鼠、新世界大鼠和小鼠、田鼠)、鼠科(小鼠和大鼠、沙鼠、多刺小鼠(spiny mice)、鬚毛大鼠(crested rats))、马岛鼠科(Nesomyidae)(攀爬小鼠

(climbing mice),岩石小鼠(rock mice)、白尾大鼠、马达加斯加大鼠和小鼠)、刺山鼠科(Platacanthomyidae)(例如多刺睡鼠(spiny dormice)),和齧鼠科(Spalacidae)(例如,鼹鼠、竹鼠和鼢鼠)的科。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的啮齿动物选自小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、多刺小鼠和鬚毛大鼠。在一些实施方案中,所述非人动物是小鼠。

[0245] 在一些实施方案中,所述动物是选自C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr和C57BL/Ola的C57BL品系的小鼠。在一些实施方案中,小鼠是选自129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例如,129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2的品系的129品系。这些小鼠描述于例如Festing等人Revised Nomenclature for Strain 129Mouse,Mammalian Genome 10:836(1999);Auerbach等人Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines(2000),这两篇文献在此全文引入作为参考。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的小鼠是129品系与C57BL/6品系的杂交品系。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的小鼠是129品系的杂交品系或BL/6品系的杂交品系。在一些实施方案中,所述小鼠是BALB品系,例如BALB/c品系。在一些实施方案中,所述小鼠是BALB品系和另一种品系的杂交品系。在一些实施方案中,小鼠来自杂交品系(例如,50%BALB/c-50%12954/Sv;或50%C57BL/6-50%129)。在一些实施方案中,非人动物是啮齿动物。在一些实施方案中,非人动物是具有BALB/c、A、A/He、A/J、A/WySN、AKR、AKR/A、AKR/J、AKR/N、TA1、TA2、RF、SWR、C3H、C57BR、SJL、C57L、DBA/2、KM、NIH、ICR、CFW、FACA、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL(C57BL/10Cr和C57BL/Ola)、C58、CBA/Br、CBA/Ca、CBA/J、CBA/st或CBA/H背景的小鼠。

[0246] 不同的动物在其内源免疫球蛋白重链(IgH)基因座上具有不同的种系组织和基因。许多物种的IgH基因座已被测序。小鼠、大鼠和兔中IgH基因座的基因位置和外显子/内含子组织可以在例如IMGT库和NCBI数据库中找到,其全部内容通过引用并入本文。

[0247] 在一些实施方案中,动物是大鼠。大鼠可选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和Dark Agouti。在一些实施方案中,大鼠品系是选自Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6和Dark Agouti的两种或多种品系的杂交品系。

[0248] 所述动物可以具有一种或多种其它遗传修饰和/或其它修饰,所述修饰适合于制备人源化动物的特定目的。

[0249] 包含内源非人免疫球蛋白基因座的修饰的经遗传修饰的非人动物。在一些实施方案中,所述修饰可包含编码人蛋白质的至少一部分(例如,与人重链可变结构域或轻链可变结构域序列具有至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性)的人核酸序列。尽管还提供了可包含本文所述修饰的经遗传修饰的细胞(例如,ES细胞、体细胞),但在许多实施方案中,所述经遗传修饰的非人动物包含在动物种系中的内源基因座的修饰。

[0250] 经遗传修饰的动物可表达来自内源小鼠基因座的人源化抗体和/或嵌合抗体,其中一个或多个内源小鼠免疫球蛋白基因已经被人免疫球蛋白基因和/或核苷酸序列替换,

所述核苷酸序列与人免疫球蛋白基因序列(例如,IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和/或IGKJ基因)具有至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在各种实施方案中,内源非人免疫球蛋白基因座被完整地或部分地修饰以包含人核酸序列。

[0251] 可对上述非人哺乳动物进行遗传、分子和行为分析。本公开还涉及由本公开提供的非人哺乳动物与相同基因型或其它基因型交配产生的后代。非人哺乳动物可以是本领域已知的任何非人动物,并且可用于本文所述的方法中。优选的非人哺乳动物是哺乳动物(例如,啮齿动物)。在一些实施方案中,非人哺乳动物是小鼠。

[0252] 本公开还提供了源自非人哺乳动物或其后代的细胞系或原代细胞培养物。基于细胞培养的模型可以通过例如以下方法制备。细胞培养物可通过从非人哺乳动物中分离而获得,或者细胞可从使用相同构建体和标准细胞转染技术建立的细胞培养物中获得。包含编码人或人源化免疫球蛋白的DNA序列的遗传构建体的整合情况可通过多种方法检测。

[0253] 有许多分析方法可用于检测外源DNA或基因组DNA上的修饰,包括核酸水平的方法(包括使用逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)或Southern印迹的mRNA定量方法,以及原位杂交)和蛋白质水平的方法(包括组织化学、免疫印迹分析和体外结合研究)。此外,可以通过本领域技术人员熟知的ELISA技术来定量目的基因的表达水平。可以使用许多标准分析方法来完成定量测量。例如,可以使用RT-PCR和杂交方法(包括RNA酶保护、Southern印迹分析、RNA点分析(RNAdot)分析)来测量转录水平。免疫组织化学染色、流式细胞术、蛋白质印迹分析也可用于评估人或人源化蛋白的存在。

[0254] 抗体和抗原结合片段

[0255] 本发明提供通过本文所述方法产生的抗体及其抗原结合片段(例如,重链抗体、人源化重链抗体或多特异性抗体)。

[0256] 通常,常规抗体由两类多肽链组成,即轻链和重链。本发明的非限制性抗体可以是包含两条重链和两条轻链的完整的四链免疫球蛋白抗体。抗体的重链可以是任何同种型,包括IgM、IgG、IgE、IgA或IgD或亚类,包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等。轻链可以是κ轻链或λ轻链。抗体可包含两个相同的轻链拷贝和两个相同的重链拷贝。每个含有一个可变区(或可变区,VH)和多个恒定区(或恒定区)的重链在其恒定区内通过二硫键彼此结合,形成抗体的"茎"。每条轻链含有一个可变结构域(或可变区,VL)和一个恒定结构域(或恒定区),每条轻链通过二硫键结合与一条重链结合。每个轻链的可变区与其结合的重链的可变区对齐。轻链和重链的可变区都包含三个夹在更保守的框架区(FR)之间的高变区。

[0257] 这些称为互补决定区(CDR)的高变区形成环,所述环包括抗体的主要抗原结合表面。四个框架区主要采用β-折叠构象,并且CDR形成连接β-折叠结构的环,并且在某些情况下形成β-折叠结构的一部分。每条链中的CDR被框架区保持在非常接近的位置,并且与来自另一条链的CDR一起,促成抗原结合区的形成。

[0258] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定抗体的CDR区的方法是众所周知的,并且通常使用许多CDR的定义方式。Kabat定义基于序列变异性,而Chothia定义基于结构环区域的位置。这些方法和定义描述于例如Martin等人"Protein sequence and structure analysis of antibody variabledomains,"Antibody engineering,Springer Berlin Heidelberg,

2001.422-439;Abhinandan等人"Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variabledomains,"Molecular immunology 45.14(2008):3832-3839;Wu,T.T.和Kabat,E.A.(1970)J.Exp.Med.132:211-250;Martin等人,Methods Enzymol.203:121-53(1991);Morea等人,Biophys Chem.68(1-3):9-16(Oct.1997);Morea等人,J Mol Biol.275(2):269-94(Jan.1998);Chothia等人,Nature 342(6252):877-83(Dec.1989);Ponomarenko and Bourne,BMC Structural Biology 7:64(2007);其中每一篇都通过引用整体并入本文。

[0259] CDR对识别抗原的表位很重要。如本文中所用,"表位"是能够被抗体的抗原结合结构域特异性结合的靶分子的最小部分。表位的最小尺寸可以是约三个、四个、五个、六个或七个氨基酸,但这些氨基酸不需要在抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可能取决于基于抗原的二级和三级结构的抗原三维构型。

[0260] 在一些实施方案中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,相异在于它们的恒定区,特别是它们的铰链和上部CH2结构域。IgG亚类的序列和差异在本领域中是已知的,并且描述于,例如,Vidarsson等人"IgG subclasses and allotypes:from structure to effector functions."Frontiers in immunology 5(2014);Irani等人"Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases."Molecular immunology 67.2(2015):171-182;Shakib,Farouk等人The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation.Elsevier,2016;其中每一篇都通过引用整体并入本文。重链抗体中的重链恒定区可来自本文所述的任何免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgM、IgD、IgE、IgA)。

[0261] 抗体还可以是源自任何物种(例如,人、啮齿动物、小鼠、大鼠、骆驼)的免疫球蛋白分子。本文公开的抗体还包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体以及包含与另一种多肽融合的免疫球蛋白结合结构域的嵌合抗体。术语"抗原结合结构域"或"抗原结合片段"是保留完整抗体的特异性结合活性的抗体的一部分,即,能够与完整抗体的靶分子上的表位特异性结合的抗体的任何部分。其包括例如Fab、Fab'、F(ab')2和这些片段的变体。因此,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以是,例如,scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、由抗体片段形成的多特异性抗体,以及包括为抗体结合结构域或与抗体结合结构域同源的结合结构域的任何多肽。抗原结合结构域的非限制性实例包括,例如,完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链、或来自完整抗体的重链或轻链的单个CDR。

[0262] 在一些实施方案中,抗原结合片段可形成嵌合抗原受体(CAR)的一部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体是如本文所述的VHH融合体,其与CD3-ζ跨膜结构域和内结构域融合。

[0263] 通过本文所述方法产生的抗体及其抗原结合片段(例如,人源化抗体或嵌合抗体)具有各种有利方面。在一些实施方案中,不需要进一步优化来获得期望的性质(例如,结合亲和力、热稳定性和/或有限聚集)。

[0264] 在一些实施方式中,所述抗体(或其抗原结合片段)以小于0.1s^{-1}、小于0.01s^{-1}、小于0.001s^{-1}、小于0.0001s^{-1}或小于0.00001s^{-1}的解离速率(koff)与靶特异性结合。在一些实施方案中,解离速率(koff)大于0.01s^{-1}、大于0.001s^{-1}、大于0.0001s^{-1}、大于0.00001s^{-1}或大于0.000001s^{-1}。

[0265] 在一些实施方案中,动力学缔合速率(kon)大于1x 10^2/Ms、大于1x 10^3/Ms、大于1x10^4/Ms、大于1x 10^5/Ms或大于1x 10^6/Ms。在一些实施方案中,动力学缔合速率(kon)小于1x 10^5/Ms、小于1x 10^6/Ms或小于1x 10^7/Ms。

[0266] 亲和力可从动力学速率常数的商(KD=koff/kon)中推导出来。在一些实施方案中,KD小于1x 10^{-6}M、小于1x 10^{-7}M、小于1x 10^{-8}M、小于1x 10^{-9}M或小于1x 10^{-10}M。在一些实施方案中,KD小于50nM、40nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM。在一些实施方案中,KD大于1x 10^{-7}M、大于1x 10^{-8}M、大于1x 10^{-9}M、大于1x 10^{-10}M、大于1x 10^{-11}M或大于1x 10^{-12}M。在一些实施方案中,所述抗体以小于或等于约0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM的KD与靶标结合。

[0267] 在一些实施方案中,测定了热稳定性。本文所述的抗体或抗原结合片段的Tm可高于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。

[0268] 在各种实施方案中,对亲本重链抗体序列进行替换以制备变体重链抗体。通常,亲本重链抗体的重链抗体变体具有至少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%或高达至少10000%)的亲代重链抗体对特定抗原的结合亲和力。在一些实施方案中,与亲本重链抗体相比,变体重链抗体将包含单替换。然而,在其它实施方案中,与源自在给定位置共享同一性的其它人重链序列的亲本重链抗体序列相比,几个氨基酸(例如多达约5个或10个或更多个氨基酸)被替换。在各种实施方案中,测试所得的变体重链抗体以证实所需的结合亲和力和/或特异性没有被替换残基显著降低。在一些实施方案中,通过替换来自不同人重链序列的氨基酸来产生改进的变体重链抗体。在各种实施方案中,VHH与亲本VHH具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。

[0269] 本文所述的VHH可用于制备多特异性(例如,双特异性抗体)。在一方面,本发明提供了多特异性抗体,其包含:第一抗原结合部分和第二抗原结合部分。在一些实施方案中,第一抗原结合部分包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),其中VH和VL一起形成特异性结合第一表位的抗原结合位点。在一些实施方案中,第一抗原结合部分包含特异性结合第一表位的VHH。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含特异性结合第二表位的VHH。在一些实施方案中,第一表位和第二表位来自相同的抗原。在一些实施方案中,第一表位和第二表位来自不同的抗原。

[0270] 在一些实施方案中,第一抗原结合部分是由两条重链和两条轻链组成的全长抗体。在一些实施方案中,第一抗原结合部分是包含重链和轻链的抗体片段,所述重链包含VH,所述轻链包含VL。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含单一多肽链。在一些实施方案中,第二抗原结合部分的C末端与第一抗原结合部分的至少一条重链的N末端融合。在

一些实施方案中,第二抗原结合部分的C末端与第一抗原结合部分的至少一条轻链的N末端融合。在一些实施方案中,第二抗原结合部分的N末端与第一抗原结合部分的至少一条重链的C末端融合。在一些实施方案中,第二抗原结合部分的N末端与第一抗原结合部分的至少一条轻链的C末端融合。在一些实施方案中,第二抗原结合部分是包含第一多肽链和第二多肽链的Fab样结构域,所述第一多肽链包含与CH1结构域融合的第一VHH,所述第二多肽链包含与CL结构域融合的第二VHH。

[0271] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是三特异性抗体。在一些实施方案中,三特异性抗体是三特异性VHH-Fc。在一些实施方案中,三特异性抗体包含相同的VHH。在一些实施方案中,三特异性抗体包括不同的VHH。在一些实施方案中,VHH结合相同的表位。在一些实施方案中,VHH结合不同的表位。

[0272] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有四个或多于四个VHH。在一些实施方案中,为了增加可开发性,在不添加IgG Fc结构域的情况下组合至少四个VHH以构建四特异性VHH。与双特异性和三特异性VHH-Fc相比,尽管缺失Fc效应子功能,但这些分子对抗原具有增加的亲和力和亲合力的额外优势。

[0273] 在一些实施方案中,这些抗体或其抗原结合片段(例如,包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或10个以上)具有功能性Fc。

[0274] 在一些实施方案中,由本文所述经遗传修饰的非人动物产生的重链抗体具有包括CDR1、CDR2和CDR3的VHH结构域。在一些实施方案中,CDR3长度在6-23之间,例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23。在一些实施方案中,CDR3长度为至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22或至少23。

[0275] 转基因动物制备方法

[0276] 可以通过修饰免疫球蛋白基因座来制备经遗传修饰的动物。图6-12分别显示了使用打靶载体V1-V7的遗传修饰的流程。图20示出了制备人源化动物的方法。在一些实施方案中,所述方法首先涉及修饰人染色体上的人免疫球蛋白基因座。然后将经过修饰的人染色体导入小鼠受体细胞。然后通过直接替换将人免疫球蛋白可变区引入小鼠基因组的相应区域。然后,筛选受体细胞。在一些实施方案中,细胞不含人染色体。然后将细胞注射到囊胚中以制备嵌合小鼠。可以进行后续的繁育以获得含有完整的人源化免疫球蛋白基因座的小鼠。

[0277] 几种其它技术可用于产生经遗传修饰的动物,包括例如非同源末端接合(NHEJ)、同源重组(HR)、锌指核酸酶(ZFNs)、基于转录激活因子样效应子的核酸酶(TALEN)和规律成族间隔短回文重复序列(CRISPR)-Cas系统。在一些实施方案中,使用同源重组。在一些实施方式中,将CRISPR-Cas9基因组编辑用于产生经遗传修饰的动物。这些基因组编辑技术中的许多基因编辑技术在是本领域中是已知的,并且描述于例如Yin等人,"Delivery technologies for genome editing,"Nature Reviews Drug Discovery 16.6(2017):387-399,该文献通过引用整体并入本文。还提供了许多其它方法,所述方法可用于基因组编辑,例如,将经遗传修饰的细胞核微注射到去核卵母细胞中,并将去核卵母细胞与另一种经遗传修饰的细胞融合。

[0278] 遗传修饰过程可包括通过同源重组用人序列替换内源序列。在一些实施方案中,

在靶位点的上游和下游的切割(例如,例如,通过锌指核酸酶、TALEN或CRISPR)可导致DNA双链断裂,并且同源重组用于将人序列替换内源序列。

[0279] 在一些实施方案中,缺失IGHG基因中CH1序列的方法包括以下方法中的一种或其组合。这些修饰可以在各种细胞中进行。在一些实施方案中,细胞是干细胞、胚胎干细胞或受精卵细胞。

[0280] 在一些实施方案中,从Sγ3转换区开始到Cε的序列被敲除,然后插入包含Sγ1转换区和不含CH1的Cγ1序列(缩写为Cγ1ΔCH1)的序列。结果,Cγ1ΔCH1与Sγ1可操作地连接。

[0281] 在一些实施方案中,包含Sγ1转换区和不含CH1的Cγ1序列(缩写为Cγ1ΔCH1)的序列用于直接替换从Sγ3转换区开始到Cε的所有序列(图6)。结果,Cγ1ΔCH1与Sγ1可操作地连接。

[0282] 在一些实施方案中,首先敲除Sγ3转换区和Cγ3序列,然后使用不含CH1的Cγ1序列(缩写为Cγ1ΔCH1)替换从Cγ1到Cε的所有序列。结果,Cγ1ΔCH1与Sγ1可操作地连接。

[0283] 在一些实施方案中,不含CH1的Cγ1序列(缩写为Cγ1ΔCH1)用于直接替换从Cγ3开始到Cε的所有序列(图7)。结果,Cγ1ΔCH1与Sγ3可操作地连接。

[0284] 在一些实施方案中,基于图6所示的等位基因,敲除包括Cμ和Cδ的序列(图8)。结果,IGHM和IGHδ基因均被敲除,并且Cγ1ΔCH1与Sγ1可操作地连接。

[0285] 在一些实施方案中,基于图6所示的等位基因,敲除包括Cμ、Cδ和Sγ1的序列(图9)。结果,IGHM和IGHδ基因均被敲除,并且Cγ1ΔCH1’与Sμ可操作地连接。

[0286] 在一些实施方案中,基于图6所示的等位基因,Cμ的CH1编码区被敲除(图10)。结果,修饰的基因座包括编码缺失CH1结构域的IgM、IgD和缺失CH1结构域的IgG1的序列。此外,Cγ1ΔCH1与Sγ1可操作地连接。

[0287] 在一些实施方案中,基于图6所示的等位基因,不含CH1编码区的Cμ序列(缩写为CμΔCH1)用于定向替换包含Cμ和Cδ的序列(图11)。结果,修饰的基因座包括编码缺失CH1结构域的IgM和缺失CH1结构域的IgG1的序列。此外,Cγ1ΔCH1与Sγ1可操作地连接。

[0288] 在一些实施方案中,基于图6所示的等位基因,使用包括CμΔCH1和不含CH1编码区的Cδ的序列(缩写为CδΔCH1)来定向替换包括Cμ和Cδ的序列(图12)。结果,修饰的基因座包括编码缺少CH1结构域的IgM、缺少CH1结构域的IgD和缺少CH1结构域的IgG1的序列。此外,Cγ1ΔCH1与Sγ1可操作地连接。

[0289] 在一些实施方案中,本文提供了经遗传修饰的非人动物,其包含经修饰的免疫球蛋白重链恒定区基因座。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白重链恒定区基因座包含与Cγ1ΔCH1、Cγ1ΔCH1’、CμΔCH1或CδΔCH1的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的序列。在一些实施方案中,Cγ1ΔCH1’的序列包括在Cγ1ΔCH1(SEQ ID NO:1)序列的5’末端缺失至少1个、至少2个、至少3个或至少4个核苷酸。

[0290] 本发明还涉及包含核酸序列的经遗传修饰的非人动物,其中所述核酸序列可选自:

[0291] a)SEQ ID NO:1、8、9、10、13或41所示的核酸序列;

[0292] b)能够在低严谨条件或严格严谨条件下与如SEQ ID NO:1、8、9、10、13或41所示的

核苷酸序列杂交的核酸序列;

[0293] c)与SEQ ID NO:1、8、9、10、13或41所示的核苷酸具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的同源性,或具有至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的同一性的核酸序列;和

[0294] d)编码氨基酸序列的核酸序列,其中所述氨基酸序列与内源IgG、IgM、IgD或IgA的氨基酸序列具有至少90％的同源性或至少90％的同一性。

[0295] 该方法还包括将经遗传修饰的细胞移植到受体雌性非人哺乳动物的输卵管或子宫中,使细胞在雌性非人哺乳动物的子宫中发育。在一些实施方案中,进行实验以鉴定经遗传修饰的基因在后代中的种系传递。

[0296] 在一些实施方案中,制备经遗传修饰的人源化动物的方法还可包括在内源基因座(或位点)用人序列的相应区域替换核酸(例如,V、D、J区域或V、J区域)的步骤。所述序列可包括IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和/或IGKJ基因的区域(例如,部分或整体区域)。在一些实施方案中,替换是由同源重组介导的。在一些实施方案中,替换是由Cre重组酶介导。

[0297] 5'同源臂和/或3'同源臂可以具有期望的长度以促进同源重组。在一些实施方案中,同源臂为约或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50kb(例如,约3kb)。在一些实施方案中,同源臂小于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50kb。

[0298] 在一些实施方案中,载体还可以任选地包括报告蛋白,例如荧光素酶(例如Gluc)或荧光蛋白(例如,EGFP、BFP等)。

[0299] 这些修饰可以在各种细胞中进行。在一些实施方案中,细胞是干细胞、胚胎干细胞或受精卵细胞。

[0300] 本发明还提供了一种建立人源化动物模型的方法,其包括以下步骤:

[0301] (a)基于本文所述的方法提供细胞(例如受精卵细胞);

[0302] (b)在液体培养基中培养所述细胞;

[0303] (c)将培养的细胞移植到受者雌性非人哺乳动物的输卵管或子宫中,使细胞在雌性非人哺乳动物的子宫中发育;

[0304] (d)鉴定步骤(c)中怀孕雌性动物的经遗传修饰的人源化非人哺乳动物后代中的种系传递。

[0305] 在一些实施方案中,前述方法中的非人哺乳动物是小鼠(例如,C57小鼠、BALB/c小鼠或C57BL/6小鼠)。

[0306] 在一些实施方案中,步骤(c)中的非人哺乳动物是假怀孕(或假孕)的雌性动物。

[0307] 在一些实施方案中,用于上述方法的受精卵是C57BL/6受精卵。也可用于本文所述方法的其它受精卵包括但不限于FVB/N受精卵、BALB/c受精卵、DBA/1受精卵和DBA/2受精卵。

[0308] 受精卵可以来自任何非人动物,例如本文所述的任何非人动物。在一些实施方案中,受精卵细胞来源于啮齿动物。可以通过DNA显微注射将基因构建体导入受精卵。例如,通过在显微注射后培养受精卵,可以将培养的受精卵转移到假孕的非人动物中,然后所述非人动物生产非人哺乳动物,从而产生上述方法中提及的非人哺乳动物。

[0309] 还提供了包含本文所述核苷酸序列的细胞、组织和动物(例如,小鼠),以及表达来自内源非人基因座的人源化或嵌合抗体的细胞、组织和动物(例如,小鼠)。

[0310] 本公开还提供了各种靶向载体(例如,可用于制备经遗传修饰的动物的载体)。在一些实施方案中,所述载体可包含:a)与待改变区域的5'末端同源的DNA片段(5'同源臂);b)包含所需遗传元件(例如,loxP识别位点、药物抗性基因和/或报告基因等)的序列;和c)与待改变区域的3'末端同源的第二DNA片段(3'同源臂)。本公开还涉及包含如本文所述的靶向载体的细胞。

[0311] 在一些实施方案中,细胞中的基因是杂合的。在一些实施方案中,细胞中的基因是纯合的。

[0312] 在一些实施方案中,非人哺乳动物细胞是小鼠细胞。在一些实施方案中,细胞是受精卵细胞。

[0313] 本发明还提供了一种核酸序列,所述核酸序列与本文所述的任何核苷酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性,并且氨基酸序列与本文所述的任何氨基酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、

[0314] 30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

[0315] 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性。

[0316] 在一些实施方案中,本公开涉及编码本文所述的任何肽的核苷酸序列,或由本文所述的任何核苷酸序列编码的任何氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸序列少于10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500或600个核苷酸。在一些实施方案中,氨基酸序列少于5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350或400个氨基酸残基。

[0317] 在一些实施方案中,氨基酸序列(i)包括氨基酸序列;或(ii)由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列是本文所述序列中的任一种。

[0318] 在一些实施方案中,核酸序列(i)包括核酸序列;或(ii)由核酸序列组成,其中所述核酸序列是本文所述序列中的任一种。

[0319] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,为了最佳比较的目的,对序列进行比对(例如,为了最佳比对,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中引入缺口,并且为了比较的目的,可以忽略非同源序列)。出于比较目的而比对的参考序列的长度至少为参考序列长度的80%,在一些实施方案中至少为90%、95%或100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则该位置上的分子是相同的(如本文中所用,氨基酸或核酸的"同一性"相当于氨基酸或核酸的"同源性")。在考虑了为了两个序列的最佳比对而需要引入的缺口的数量和每个缺口的长度的情况下,两个序列之间的同一性百分比是所述序列共有的相同位置的数量的函数。为了本发明的目的,序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可使用Blossum 62评分矩阵,利用空位罚分为12、空位延伸罚分为4和移码空位罚分为5来完成。

[0320] 具有相似物理化学性质的保守残基(例如亮氨酸和异亮氨酸)的百分比(同源性百分比)也可用于测量序列相似性。本领域已经定义了具有相似物理化学性质的氨基酸残基家族。这些家族包括例如具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天

冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。在许多情况下,同源性百分比高于同一性百分比。因此,本公开还提供了与本文所述的任何氨基酸序列具有1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性百分比的氨基酸序列,或编码这些氨基酸序列的核酸。

[0321] 使用经遗传修饰的动物的方法

[0322] 经遗传修饰的动物可用于产生可与靶标特异性结合的重链抗体。在一些实施方案中,使用多克隆和单克隆抗体制备的标准技术,将靶标(例如蛋白质或蛋白质片段)用作免疫原以在这些动物中产生抗体。在一些实施方案中,在允许动物产生抗原特异性抗体的条件下,将遗传修饰的动物暴露于选定的抗原一段时间。

[0323] 可通过多次注射(例如,皮下或腹膜内注射)抗原肽或蛋白质在动物体内产生多克隆抗体。在一些实施方案中,将抗原性肽或蛋白质与至少一种佐剂一起注射。在一些实施方案中,可将抗原性肽或蛋白质与在待免疫的物种中具有免疫原性的试剂缀合。可用抗原性肽或蛋白质注射动物超过一次(例如,两次、三次或四次)。

[0324] 可使用全长多肽或蛋白质,或者,可选地可将其抗原性肽片段用作免疫原。蛋白质的抗原性肽包含氨基酸序列的至少8个(例如,至少10个、15个、20个或30个)氨基酸残基,并含有蛋白质的表位,使得针对所述肽产生的抗体与蛋白质形成特异性免疫复合物。

[0325] 免疫原通常用于通过免疫合适的受试者(例如,本文所述的经遗传修饰动物)来制备抗体。合适的免疫原性制剂可包含例如重组表达的或化学合成的多肽(例如,蛋白质的片段)。所述制剂还可包含佐剂,诸如完全或不完全弗氏佐剂,或类似的免疫刺激剂。

[0326] 经免疫的受试者中的抗体滴度可以通过标准技术随时间监测,例如使用固定的多肽或肽的酶联免疫吸附测定(ELISA)。如果需要,可从哺乳动物(例如,从血液)中分离抗体分子,并通过公知的技术(诸如蛋白G色谱的蛋白A)进一步纯化以获得IgG组分。在免疫后的适当时间,例如当特异性抗体滴度最高时,可从受试者获得产生抗体的细胞,并通过标准技术诸如最初由Kohler等人(Nature 256:495-497,1975)描述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,Immunol.Today 4:72,1983)、EBV-杂交瘤技术(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页,1985)或三源杂交瘤技术将其用于制备单克隆抗体。产生杂交瘤的技术是公知的(通常参见,Current Protocols in Immunology,1994,Coligan等人(编辑),John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY)。产生单克隆抗体的杂交瘤细胞通过例如使用标准ELISA测定法筛选杂交瘤培养上清液的结合目标多肽或表位的抗体的方式来检测。

[0327] 一方面,本公开提供了包含内源免疫球蛋白重链基因座的修饰的小鼠,其中该小鼠产生包含可操作地连接至重链恒定区基因序列的重排免疫球蛋白序列的B细胞。在一些实施方案中,可操作地连接至所述重链恒定区基因序列的所述重排免疫球蛋白序列包含人重链V、D和/或J序列。在一些实施方案中,所述重链恒定区基因序列包含选自CH1、铰链、CH2、CH3及其组合的人或小鼠重链序列。

[0328] 一方面,本发明涉及在动物中制备体细胞突变重链抗体的方法。该方法包括用抗原免疫动物,将动物维持在足以对抗原启动免疫应答的条件下;以及,从所述动物中分离体细胞突变的重链抗体,其包含源自所述人或内源重链免疫球蛋白可变区基因片段的可变区基因片段,并且其中所述体细胞突变的重链抗体特异性结合所述抗原。在一些实施方案中,所述动物包含未重排的人或内源重链免疫球蛋白可变区基因片段,并且其中所述动物缺失编码功能性IgG CH1结构域的至少一个等位基因的核苷酸序列,并且其中所述动物表达包含CH1结构域的IgM。

[0329] 所述小鼠B细胞或脾细胞可包含例如可操作地连接至小鼠免疫球蛋白恒定区基因的重排非小鼠免疫球蛋白可变基因序列。确定编码人重链可变区和人轻链可变区的序列。所述序列可通过例如对目标杂交瘤或B细胞进行测序来确定。在一些实施方案中,使用单个B细胞筛选。其可筛选天然抗体谱系而无需杂交瘤融合和组合展示。例如,可将B细胞与一小组DNA条形编码的抗原混合,使得能够通过单细胞测序方案回收单个B细胞的一个或多个抗原条形码和B细胞受体(BCR)序列。

[0330] 可以进一步修饰抗体以获得人源化抗体或人抗体,例如,通过将编码人重链可变区的序列与编码人重链恒定区的序列可操作地连接。

[0331] 在一些实施方案中,如果小鼠表达与目标抗原非常相似的蛋白质,则可能难以在小鼠中引发免疫反应。这是因为在免疫细胞发育过程中,识别与自身来源肽结合的MHC分子的B细胞和T细胞被从免疫细胞的谱系中删除。在这些情况下,可进一步修饰人源化小鼠。可敲除小鼠中相应的基因,然后将小鼠暴露于目标抗原。因为小鼠对基因产物不进行阴性选择,所以小鼠可以产生容易与靶标特异性结合的抗体。

[0332] 本公开还提供了制备抗体、核酸、细胞、组织(例如,脾组织)的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将本文所述的动物暴露于抗原。可从动物获得抗体(例如,嵌合抗体)、编码抗体的核酸、细胞和/或组织(例如,脾组织)。在一些实施方案中,编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸可以例如通过测序来确定。在一些实施方案中,可将编码人重链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人重链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接。在一些实施方案中,可将编码人轻链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人轻链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接。在一些实施方案中,培养含有本文所述的核酸的细胞并收集抗体。

[0333] 在一些实施方案中,没有小鼠免疫球蛋白V、D、J基因(例如,没有小鼠IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV或IGKJ基因)对重链可变区序列有贡献。在一些实施方案中,由动物产生的重链可变区序列完全是人的,并且完全由人免疫球蛋白V、D、J基因(例如,人IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和IGKJ基因)提供。在一些实施方案中,重排的VDJ序列可以进一步经历体细胞超突变。

[0334] 本文所述抗体或抗原结合片段的变体可通过将合适的核苷酸变化引入编码本文所述人、人源化或嵌合抗体或其抗原结合片段的DNA中,或通过肽合成来制备。这样的变体包括,例如,构成抗体的抗原结合位点或抗原结合结构域的氨基酸序列内的残基的缺失、插入或替换。在此类变体群中,一些抗体或抗原结合片段对靶蛋白的亲和力增加。可以进行缺失、插入和/或组合的任何组合,以获得对靶标具有增加的结合亲和力的抗体或其抗原结合片段。引入到抗体或抗原结合片段中的氨基酸改变也可以改变或引入新的翻译后修饰到抗体或抗原结合片段中,例如改变(例如,增加或减少)糖基化位点的数量,改变糖基化位点的类型(例如,使得在细胞内酶的作用下不同的糖被连接到糖基化位点),或引入新的糖基化

位点。

[0335] 这里发现的抗体可以来自任何动物物种,包括哺乳动物。天然抗体的非限制性实例包括来自人、灵长类动物(例如猴子和猿子)、牛、猪、马、羊、骆驼科动物(例如,骆驼和美洲驼)、鸡、山羊和啮齿动物(例如大鼠、小鼠、仓鼠和兔子)(包括转基因啮齿动物,这些啮齿动物被基因工程改造以产生人抗体)的抗体。

[0336] 人抗体和人源化抗体包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区或者具有与源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区相同的氨基酸序列的抗体。人抗体可以例如在CDR中包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变)。

[0337] 可对抗体或抗原结合片段进行另外的修饰。例如,可将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区,从而允许在该区域中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可在体外和/或体内具有任何延长的半衰期。还可使用异双功能交联剂制备在体外和/或体内具有延长的半衰期的同二聚体抗体,所述用异双功能交联剂制备抗体的方法描述于例如Wolff等人(Cancer Res.53:2560-2565,1993)中。或者,抗体可被工程化成具有双Fc区(参见,例如,Stevenson等人,Anti-CancerDrug Design 3:219-230,1989)。

[0338] 在一些实施方案中,可对抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可通过化学或酶促合成,或者通过酶促或化学裂解来产生。通过使抗体或抗体片段的目标氨基酸残基与能够与选定的侧链或N或C末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体或抗体片段的其它类型的共价修饰引入分子。

[0339] 转铁蛋白受体1(TFR1)

[0340] 转铁蛋白受体1(TFR1),又称分化簇71(CD71),其广泛表达,能与转铁蛋白(Tf)高亲和力结合。人TFR1是一种90kDa的II型跨膜蛋白,由760个氨基酸组成,在细胞表面以二聚体(180kDa)的形式通过二硫键连接。TFR1单体由包含Tf结合位点的671个氨基酸的大的胞外区C-末端结构域、跨膜区(28个氨基酸)和胞内区N-末端结构域(61个氨基酸)组成。C-末端胞外结构域在天冬酰胺残基251、317和727处含有三个N-连接的糖基化位点,在苏氨酸104处含有一个O-连接的糖基化位点,这些都是受体充分发挥功能所必需的。

[0341] 转铁蛋白(Tf)是一种80kDa的糖蛋白,由两个40kDa的亚基组成,称为N-和C-域,由一个短的接头序列分开。每个亚基能够与一个游离三价铁(Fe^{3+})结合,因此,Tf可以连接多达两个铁原子。Tf以其无铁形式apo-Tf在血液中高效结合Fe^{3+},并通过与TFR1的相互作用将其转运至细胞表面进行内化。作为调节铁输入的膜蛋白,TFR1是TFR家族的成员,其对与Fe^{3+}结合的转铁蛋白(Tf)表现出纳摩尔亲和力。Tf-TFR1复合物通过网格蛋白介导的内吞作用被内化,当pH降至5.5时,Fe^{3+}与Tf解离。在该pH下,Apo-Tf和TFR1仍然结合并再循环到具有生理pH的细胞表面,因此前者被释放。

[0342] 转铁蛋白受体对铁的摄取是肿瘤细胞摄取铁的重要途径,越来越多的证据表明TFR1参与了肿瘤的发生和发展,在许多肿瘤中其表达明显失调。TFR1和癌症之间的关系已经被揭示,使得TFR1成为干预癌症的有价值的药物靶点。

[0343] 在血脑屏障的内皮细胞上表达的TFR1也用于临床前研究,以允许将包括抗体在内的大分子递送到脑中。TFR1靶向抗体可以穿过血脑屏障,而不干扰铁的摄取。

[0344] TFR1、Tf及其功能的详细描述可以在例如Candelaria,P.V.等人,“Antibodies

targeting the transferrin receptor 1(TFR1)as direct anti-cancer agents",《免疫学前沿》12(2021):607692;和Shen,Y.等人,"Transferrin receptor 1in cancer:a new sight for cancer therapy."美国癌症研究杂志8.6(2018):916;这些专利中的每一个都以其全文引入作为参考。

[0345] 重链单可变结构域(VHH)抗体

[0346] 单克隆抗体和重组抗体是医学和生物技术中的重要工具。像所有哺乳动物一样,驼科动物(例如,美洲驼)可以产生由两条重链和两条轻链以二硫键结合在一起形成的Y型常规抗体(例如,IgG1)。然而,它们也产生两种独特的IgG亚类:IgG2和IgG3,也称为重链IgG。这些抗体仅由两条重链组成,这两条重链缺少CH1区域,其称为VHH(或纳米抗体),其N-末端仍具抗原结合结构域。常规Ig需要来自重链和轻链的可变区的结合,以允许抗原-抗体相互作用的高度多样性。尽管分离的重链和轻链仍然表现出这种能力,但与成对的重链和轻链相比,它们表现出非常低的亲和力。重链IgG的独特特征是其单体抗原结合区结合抗原的能力,其特异性、亲和力和特别是多样性与常规抗体相当,而不需要与另一区域配对。该特征主要是由于两条重链的可变区的氨基酸序列内的一组主要变化,当与常规Ig相比时,其诱导深度构象变化。可变区中的主要替换阻止了轻链与重链结合,但也阻止未结合的重链被免疫球蛋白结合蛋白再循环。

[0347] 这些抗体的单一可变结构域(命名为VHH、sdAb或纳米抗体)是由适应性免疫系统产生的最小抗原结合结构域。已发现这些抗体的可变区的第三互补决定区(CDR3)是常规抗体的两倍长。这导致与抗原的相互作用表面增加以及抗原-抗体相互作用的多样性增加,这补偿了轻链的缺失。具有长的互补决定区3(CDR3),VHH可以延伸到常规抗体不能接近的蛋白质上的缝隙中,包括功能上感兴趣的位点,如酶的活性位点或病毒表面上的受体结合峡谷。

[0348] 与携带常规抗体的可变结构域(VH和VL)的常规抗体相比,VHH提供了许多其它优点,包括更高的稳定性、溶解性、表达产量和重折叠能力,以及更好的体内组织穿透和内化。此外,与常规抗体的VH结构域相反,VHH不显示与轻链结合的内在倾向。由于VHH不与VL结构域结合,因此与含有常规VH-VL对或基于VH结构域的单一结构域的构建体相比,将VHH重新格式化为多特异性(例如,双特异性抗体)构建体要容易得多。

[0349] 本发明提供了例如抗TFR1抗体、其经修饰抗体、其嵌合抗体和其人源化抗体。

[0350] 23B8和23B8衍生抗体(例如人源化抗体)的CDR序列包括如Kabat编号所定义的VHH结构域的CDR,分别如SEQ ID NO:42、43和44所示。CDR也可以由IMGT系统定义。在IMGT编号下,VHH结构域的CDR分别如SEQ ID NO:54、55和56所示。

[0351] 24A1和24A1衍生抗体(例如人源化抗体)的CDR序列包括如Kabat编号所定义的VHH结构域的CDR,分别如SEQ ID NO:45、46和47所示。CDR也可以由IMGT系统定义。在IMGT编号下,VHH结构域的CDR分别如SEQ ID NO:57、58和59所示。

[0352] 24C9和24C9衍生抗体(例如人源化抗体)的CDR序列包括如Kabat编号所定义的VHH结构域的CDR,分别如SEQ ID NO:48、49和50所示。CDR也可以由IMGT系统定义。在IMGT编号下,VHH结构域的CDR分别如SEQ ID NO:60、61和62所示。

[0353] 24G5和24G5衍生抗体(例如人源化抗体)的CDR序列包括如Kabat编号所定义的VHH结构域的CDR,分别如SEQ ID NO:51、52和53所示。CDR也可以由IMGT系统定义。在IMGT编号

下,VHH结构域的CDR分别如SEQ ID NO:63、64和65所示。

[0354] 23B8抗体VHH结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:66所示。24A1抗体VHH结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示。24C9抗体VHH结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:68所示。24G5抗体VHH结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:69所示。

[0355] 还提供了各种修饰或人源化VHH的氨基酸序列。由于存在修饰或人源化重链抗体的不同方式(例如,可用不同的氨基酸替换修饰序列),重链抗体的VHH结构域可具有超过一种形式的人源化序列。在一些实施方案中,人源化VHH结构域与SEQ ID NO:66-69的任何序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0356] 此外,在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段还可含有一个、两个或三个选自SEQ ID NO:42-44、SEQ ID NO:45-47、SEQ ID NO:48-50、SEQ ID NO:51-53、SEQ ID NO:54-56、SEQ ID NO:57-59、SEQ ID NO:60-62和SEQ ID NO:63-65的VHH域CDR。

[0357] 在一些实施方案中,抗体可具有包含互补决定区(CDR)1、2、3的重链单可变结构域(VHH),其中CDR1区包含与选定的VHH CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成,CDR2区包含与选定的VHH CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成,且所述CDR3区包含与选定的VHH CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成。选定的VHH CDR 1、2、3氨基酸序列如图37和图38所示。

[0358] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个具有0、1或2氨基酸插入、缺失或替换的VHH CDR1;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的VHH CDR2;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的VHH CDR3,其中VHH CDR1、VHH CDR2和VHH CDR3选自图39。

[0359] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:42;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:43;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:44。

[0360] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:45;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:46;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:47。

[0361] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:48;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:49;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:50。

[0362] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:51;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:52;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:53。

[0363] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域

(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:54;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:55;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:56。

[0364] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:57;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:58;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:59。

[0365] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:60;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:61;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:62。

[0366] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可含有重链单可变结构域(VHH),其含有1、2或3个CDR:具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:63;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:64;具有0、1或2个氨基酸插入、缺失或替换的SEQ ID NO:65。

[0367] 插入、缺失和替换可以在CDR序列内,或者在CDR序列的一个或两个末端。在一些实施方案中,基于Kabat编号方案来确定CDR。在一些实施方案中,基于Chothia编号方案来确定CDR。在一些实施方案中,基于组合编号方案来确定CDR。在一些实施方案中,基于IMGT编号方案来确定CDR。

[0368] 本发明还提供了与TFR1(人TFR1)结合的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段含有重链单可变区(VHH),所述VHH包含与选定的VHH序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,选定的VHH序列为SEQ ID NO:66。在一些实施方案中,所选定的VHH序列为SEQ ID NO:67。在一些实施方案中,选定的VHH序列为SEQ ID NO:68。在一些实施方案中,选定的VHH序列为SEQ ID NO:69。

[0369] 为了确定两条氨基酸序列或两条核酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的将这些序列进行比对(例如,可为了最佳比对而在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一者或两者中引入空位,并且可为了比较目的而忽略非同源序列)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置处相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则这些分子在该位置处相同(如本文所用,氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。考虑到需要被引入以实现两个序列的最佳比对的空位的数量和每个空位的长度,两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数量的函数。例如,序列的比较和两条序列之间的同一性百分比的测定可使用Blossum 62评分矩阵来完成,其中空位罚分为12,空位延伸罚分为4,移码空位罚分为5。

[0370] 本公开还提供包含编码包含免疫球蛋白重链单可变结构域(VHH)的多肽的多核苷酸的核酸。VHH包括如图37和图38所示的CDR,或者具有如图39所示的序列。

[0371] 抗体和抗原结合片段也可以是抗体或抗体片段的抗体变体(包括衍生物和缀合物)以及多特异性(例如双特异性)抗体或抗体片段。本文提供的其它抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性(多聚体,例如双特异性)抗体、人抗体、嵌合抗体(例如人-鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内制备的抗体(即,内抗体)及其抗原结合片段。

[0372] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含Fc结构域,所述Fc结构域可以来源于各种类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施方案中,Fc结构域来源于IgG抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,Fc结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个重链恒定区。

[0373] 本发明还提供了与本文所述的任何抗体或抗原结合片段交叉竞争的抗体或其抗原结合片段。交叉竞争分析在本领域中是已知的,并且在例如Moore等人,“Antibody Cross-Competition Analysis of the Human Immunodeficiency Virus type 1gp120 exterior envelopeglycoprotein.”Journal of Virology 70.3(1996):1863-1872中进行了描述,在此全文引入作为参考。在一方面,本发明还提供了与本文所述的任何抗体或抗原结合片段结合相同表位或区域的抗体或其抗原结合片段。表位组合分析是本领域已知的,并且描述于例如Estep等人,“High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning”.MAbs.Vol.5.No.2.Taylor& Francis,2013,其全文并入本文作为参考。

[0374] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:42、45、48、51、54、57、60和63的重链单可变结构域(VHH)CDR1。

[0375] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:43、46、49、52、55、58、61和64的重链单可变结构域(VHH)CDR2。

[0376] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:44、47、50、53、56、59、62和65的重链单可变结构域(VHH)CDR3。

[0377] 抗体特征

[0378] TFR1通过与铁结合TF的相互作用在细胞铁摄取中发挥关键作用。铁是多种细胞过程所必需的,也是DNA合成和细胞增殖所必需的。由于其在癌细胞病理学中的核心作用,恶性细胞通常过度表达TFR1,并且这种表达增加可能与不同类型癌症的不良预后相关。TFR1在恶性细胞上表达水平的升高,加上其细胞外可及性、内化能力和在癌细胞病理学中的核心作用,使该受体成为抗体介导治疗的一个有吸引力的靶点。

[0379] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段不能阻断TFR1和TF之间的结合。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可阻断TFR1和TF之间的结合。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可与通过受体介导的内吞作用内化的抗癌剂缀合。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可破坏受体的功能。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段不能诱导Fc效应子功能,因此防止或改善它们对正常细胞的负面作用。

[0380] 本公开提供包含人Fc结构域的抗体或其抗原结合片段,与不存在本发明所述的抗体或其抗原结合片段时相比,所述抗体或抗原结合片段可诱导Fc依赖性效应功能增强至少或约1倍,至少或约2倍,至少或约3倍,至少或约4倍,至少或约5倍,至少或约6倍,至少或约7倍,至少或约8倍,至少或约9倍、至少或约10倍、至少或约20倍、至少或约30倍、至少或约40倍、至少或约50倍、或至少或约100倍。

[0381] 本公开提供了包含人Fc结构域的抗体或其抗原结合片段,与不存在本发明所述的抗体或其抗原结合片段时相比,其诱导宿主免疫应答增强至少或约1倍,至少或约2倍,至少或约3倍,至少或约4倍,至少或约5倍,至少或约6倍,至少或约7倍,至少或约8倍,至少或约9

倍、至少或约10倍、至少或约20倍、至少或约30倍、至少或约40倍、至少或约50倍、或至少或约100倍。

[0382] 本公开提供了可以内化到人脑细胞(例如,皮层微血管内皮细胞)中的抗体或其抗原结合片段,其内吞率为至少50%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%,至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。在一些实施方案中,与同种型对照抗体相比,本文所述抗体或其抗原结合片段的内吞率为至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、500倍或1000倍。

[0383] 在一些实施方案中,本文提供了包含单个重链的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,本文提供了包含一对重链的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,重链对通过二硫键连接。在一些实施方案中,重链对包括杵臼结构修饰。在一些实施方案中,重链包含人IgG的Fc结构域。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在每条重链中包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个VHH结构域。在一些实施方案中,每个重链中的VHH结构域特异性结合相同的表位。在一些实施方案中,每个重链中的VHH结构域特异性结合不同的表位。在一些实施方案中,每个重链中的VHH结构域与至少1、2、3、4或5个不同的表位结合。

[0384] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是双特异性抗体或三特异性抗体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可与至少4、5或6种抗原特异性结合。

[0385] 在一些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)以以小于$0.1s^{-1}$、小于$0.01s^{-1}$、小于$0.001s^{-1}$、小于$0.0001s^{-1}$或小于$0.00001s^{-1}$的解离速率(koff)特异性结合TFR1。在一些实施方案中,解离速率(koff)大于$0.01s^{-1}$、大于$0.001s^{-1}$、大于$0.0001s^{-1}$、大于$0.00001s^{-1}$或大于$0.000001s^{-1}$。

[0386] 在一些实施方案中,动力学结合速率(kon)大于1×10^{2}/Ms、大于1×10^{3}/Ms、大于1×10^{4}/Ms、大于1×10^{5}/Ms或大于1×10^{6}/Ms。在一些实施方案中,动力学结合速率(kon)小于1×10^{5}/Ms、小于1×10^{6}/Ms或小于1×10^{7}/Ms。

[0387] 亲和力可根据动力学速率常数的商(KD=koff/kon)推导。在一些实施方案中,KD小于1×10^{-6}M、小于1×10^{-7}M、小于1×10^{-8}M、小于1×10^{-9}M或小于1×10^{-10}M。在一些实施方案中,KD小于50nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM。在一些实施方案中,KD大于1×10^{-7}M、大于1×10^{-8}M、大于1×10^{-9}M、大于1×10^{-10}M、大于1×10^{-11}M或大于1×10^{-12}M。

[0388] 用于测量抗体对抗原的亲和力的技术包括例如ELISA、RIA和表面等离子体共振(SPR)。在一些实施方案中,抗体结合人TFR1、猴TFR1、小鼠TFR1或嵌合TFR1。

[0389] 在一些实施方案中,抗体不结合人TFR1、猴TFR1、小鼠TFR1或嵌合TFR1。

[0390] 在一些实施方案中,测定热稳定性。本文所述的抗体或抗原结合片段可以具有大于55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95℃的Tm,在一些实施方案中,Tm小于55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95℃。如本文所述的抗体或抗原结合片段可具有Tagg(聚集温度,例如,266nm处的Tagg(Tagg266)或473nm处的Tagg(Tagg473))大于55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、

79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95℃。在一些实施方案中,Tagg小于55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94或95℃。

[0391] 在一些实施方案中,Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。

[0392] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段具有功能性Fc区。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含人IgG1 Fc区。在一些实施方案中,人IgG1 Fc区包含与SEQ ID NO:75具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0393] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段不具有Fc区。例如,抗体(或其抗原结合片段)是包含一个或多个通过连接肽相互连接的VHH结构域的多肽。在一些实施方案中,抗体包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个VHH结构域。在一些实施方案中,VHH结构域特异性结合的相同表位。在一些实施方案中,VHH结构域与不同的表位结合。在一些实施方案中,VHH结构域与至少1、2、3、4或5个不同的表位结合。

[0394] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段不具有功能性Fc区。在一些实施方案中,Fc区具有LALA突变(在EU编号中的L234A和L235A突变),或LALA-PG突变(在EU编号中的L234A、L235A、P329G突变)。在一些实施方案中,根据EU编号,Fc区在位置297具有突变(例如,N297A)。在一些实施方案中,突变的人IgG1 Fc区包含与SEQ ID NO:76具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0395] 在一些实施方案中,给受试者施用药物后6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、60,本文所述的抗体或其抗原结合片段在脑(例如,全脑或脑实质)中的浓度可以大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或在给药后立即(例如0.5小时)为其浓度的80%。在一些实施方案中,给受试者施用药物后6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、60小时或72小时,本文所述的抗体或其抗原结合片段在脑(例如,全脑或脑实质)中的浓度可以是对照抗体(例如,hIgG1或JR141-N)的浓度或受试者血清中的浓度至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍或10000倍。

[0396] 制备抗TFR1抗体的方法

[0397] 本文所述抗体或抗原结合片段的变体可通过将合适的核苷酸变体引入编码人、人源化或嵌合抗体或其抗原结合片段的DNA中制备,或通过肽合成来制备。这样的变体包括,例如,构成抗体的抗原结合位点或抗原结合结构域的氨基酸序列内的残基的缺失、插入或替换。在这些变体的群体中,一些抗体或抗原结合片段增强了对靶蛋白(例如TFR1)的亲和力。可以进行缺失、插入和/或组合的任何组合,以获得对靶标具有更高的结合亲和力的抗体或其抗原结合片段。引入到抗体或抗原结合片段中的氨基酸改变也可以改变或引入新的翻译后修饰到抗体或抗原结合片段中,例如改变(例如,增加或减少)糖基化位点的数目,改变糖基化位点的类型(例如,改变氨基酸序列使得不同的糖通过细胞中存在的酶连接),或引入新的糖基化位点。在一些实施方案中,本文所述的重链抗体或其抗原结合片段通过免疫本文所述的任何经遗传修饰的动物(例如,重链突变等位基因3基因型纯合小鼠)而获得。

[0398] 人源化抗体包括具有衍生自人免疫球蛋白支架序列的人种系免疫球蛋白序列(或具有与衍生自其的序列相同的氨基酸序列)的可变区和恒定区的抗体。人源化抗体可包括

不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。因此,“人源化”抗体是嵌合抗体,其中来自非人物种的序列被相应的人序列替换。

[0399] 通常,人、人源化或嵌合抗TFR1抗体的氨基酸序列变体将含有与原始抗体的VHH结构域中存在的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0400] 与原始序列的同一性或同源性通常是在比对序列并在必要时引入缺口以获得最大百分比序列同一性,并且不考虑任何保守替换作为序列同一性的一部分后,与人、人源化或嵌合抗TFR1抗体或片段中存在的序列相同的候选序列中存在的氨基酸残基的百分比。

[0401] 可以对抗体或抗原结合片段进行另外的修饰。例如,可以将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区,从而允许在此区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可以具有任何增加的体外和/或体内半衰期。还可以使用如例如Wolff等人(Cancer Res.53:2560-2565,1993)描述的异双功能交联接头来制备具有增加的体外和/或体内半衰期的同二聚体抗体。或者,可以将具有两个Fc区的抗体进行工程改造。

[0402] 在一些实施方案中,可对抗TFR1抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可以通过化学合成或酶促合成或通过酶促裂解或化学切割来进行。抗体或抗体片段的其他类型的共价修饰通过使抗体或片段的靶向氨基酸残基与能够与选定侧链或N-末端或C-末端残基反应的有机衍生剂进行反应而引入分子中。

[0403] 在一些实施方案中,提供了抗体变体,其具有缺乏(直接或间接)连接至Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,此类抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量相对于连接至Asn297的所有糖结构(例如,复合型、杂合型和高甘露糖结构)的总和来确定岩藻糖量,如通过MALDI-TOF质谱法(例如WO 2008/077546中所述)所测量。Asn297是指位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号;或Kabat编号中的位置314);然而,由于抗体中微小的序列变异,Asn297也可位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处,即位置294与300之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。在一些实施方案中,为了降低聚糖异质性,抗体的Fc区可被进一步工程改造以用丙氨酸替换位置297处的天冬酰胺(N297A)。

[0404] 本公开还提供了包括本文公开的分离的多核苷酸(例如,编码本文公开的多肽的多核苷酸)的重组载体(例如,表达载体)、其中引入了所述重组载体的宿主细胞(即,使得所述宿主细胞含有所述多核苷酸和/或包含所述多核苷酸的载体),以及通过重组技术产生重组抗体多肽或其片段。

[0405] 如本文所用,“载体”是将载体引入宿主细胞时能够将一种或多种目的多核苷酸递送至该宿主细胞的任何构建体。“表达载体”能够在已经引入该表达载体的宿主细胞中递送一种或多种目的多核苷酸并将其表达为编码的多肽。因此,在表达载体中,通过与该载体内或宿主细胞的基因组中在目的多核苷酸的整合位点处或附近或两侧的调控元件(诸如启动子、增强子和/或poly-A尾)可操作地连接,将该目的多核苷酸定位在该载体用于表达,使得该目的多核苷酸将在引入该表达载体的宿主细胞中被翻译。

[0406] 可通过本领域已知的方法将载体导入宿主细胞,例如电穿孔、化学转染(例如DEAE-葡聚糖)、转化、转染和感染和/或转导(例如用重组病毒)。因此,载体的非限制性实例

包括病毒载体(其可用于产生重组病毒)、裸DNA或RNA、质粒、粘粒、噬菌体载体和与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0407] 在一些实施方案中,使用病毒表达系统(例如,牛痘或其他痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)引入本文公开的多核苷酸(例如,编码本文公开的多肽的多核苷酸),其可涉及使用非致病性(缺陷性)、有复制能力的病毒,或可使用复制缺陷性病毒。在后一种情况下,病毒繁殖通常仅在互补病毒包装细胞中发生。合适的系统公开于例如Fisher-Hoch等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:317-321;Flexner等人,1989,Ann.N.Y.Acad Sci.569:86-103;Flexner等人.,1990,Vaccine,8:17-21;美国专利号4,603,112、4,769,330和5,017,487;WO 89/01973;美国专利号4,777,127;GB 2,200,651;EP 0,345,242;WO 91/02805;Berkner-Biotechniques,6:616-627,1988;Rosenfeld等人,1991,Science,252:431-434;Kolls等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:215-219;Kass-Eisle等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:11498-11502;Guzman等人,1993,Circulation,88:2838-2848;和Guzman等人,1993,Cir.Res.,73:1202-1207。将DNA整合到此类表达系统中的技术是本领域普通技术人员所熟知的。DNA也可以是“裸露的”,如例如Ulmer等人.,1993,Science,259:1745-1749,和Cohen,1993,Science,259:1691-1692中所述的。可通过将DNA包被在高效转运到细胞中的可生物降解珠上增加裸DNA的摄取。

[0408] 为了表达,包含本文公开的编码抗体或编码多肽的多核苷酸的DNA插入物可以与合适的启动子(例如,异源启动子)可操作地连接,所述启动子例如噬菌体λPL启动子、大肠杆菌lac、trp和tac启动子、SV40早期和晚期启动子以及逆转录病毒LTR的启动子等。其它合适的启动子是技术人员已知的。在一些实施方案中,启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子。表达构建体可进一步含有转录起始、终止位点,并且在转录区中含有用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的成熟转录物的编码部分可包括起始于起始处的翻译和适当定位于待翻译多肽末端的终止密码子(UAA、UGA或UAG)。

[0409] 正如所指出的,表达载体可以包括至少一个选择标记。这样的标记包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性和用于在大肠杆菌和其它细菌中培养的四环素或氨苄青霉素抗性基因。合适宿主的代表性实例包括但不限于细菌细胞,例如大肠杆菌、链霉菌和鼠伤寒沙门氏菌细胞;真菌细胞,例如酵母细胞;昆虫细胞,例如果蝇S2和夜蛾Sf9细胞;动物细胞如CHO、COS、Bowes黑色素瘤和HK 293细胞;和植物细胞。用于本文所述宿主细胞的合适培养基和条件是本领域已知的。

[0410] 在细菌中使用的非限制性载体包括可从Qiagen获得的pQE70、pQE60和pQE-9;获自Stratagene的PBS载体、Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A;和获自Pharmacia的pTrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。非限制性真核载体包括可从Stratagene获得的pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG;和得自Pharmacia的pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其它合适的载体对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0411] 适用的非限制性细菌启动子包括大肠杆菌lacI和lacZ启动子、T3和T7启动子、gpt启动子、λPR和PL启动子以及trp启动子。合适的真核启动子包括CMV立即早期启动子,HSV胸苷激酶启动子,早期和晚期SV40启动子,逆转录病毒LTRs的启动子,如劳斯肉瘤病毒(RSV)的启动子,和金属硫蛋白启动子,如小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0412] 在酿酒酵母中,可以使用许多含有组成型或诱导型启动子载体,如α因子、醇氧化

酶和PGH的载体。

[0413] 可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它方法将构建体导入宿主细胞。这些方法在许多标准实验室手册中有描述,例如Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology(1986),该文献在此全文引入作为参考。

[0414] 通过将增强子序列插入到载体中,可以增加高等真核生物对编码本公开内容的抗体的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约10至300bp,其作用是增加给定宿主细胞类型中启动子的转录活性。增强子的实例包括SV40增强子,其位于复制起点的晚期侧,碱基对为100至270,巨细胞病毒早期启动子增强子,多瘤病毒增强子位于复制起点的晚期侧,以及腺病毒增强子。

[0415] 为了将翻译的蛋白质分泌到内质网腔中、周质空间中或细胞外环境中,可以将适当的分泌信号掺入表达的多肽中。信号可以是多肽的内源信号,也可以是异源信号。

[0416] 多肽(例如,抗体)可以以修饰的形式表达,例如融合蛋白(例如,GST融合)或具有组氨酸标签,并且可以不仅包括分泌信号,还包括额外的异源功能区。例如,在纯化过程中或在随后的处理和储存过程中,可以将额外的氨基酸,特别是带电氨基酸的区域添加到多肽的N-末端,以提高在宿主细胞中的稳定性和持久性。此外,可将肽部分添加到多肽中以促进纯化。这样的区域可以在多肽的最终制备之前除去。将肽部分添加到多肽中以产生分泌或排泄、提高稳定性和促进纯化等是本领域熟悉的常规技术。

[0417] 本发明还提供了一种核酸序列,所述核酸序列与本文所述的所述核酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%与本文所述的任何核苷酸序列同一性,并且氨基酸序列与本文所述的任何核苷酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%与本文所述的任何氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,本公开涉及编码本文所述的任何肽的核苷酸序列,或由本文所述的任何核苷酸序列编码的任何氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸序列少于10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、150、200、250、300、350、400、500或600个核苷酸。在一些实施方案中,氨基酸序列少于5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200个氨基酸残基。

[0418] 在一些实施方案中,氨基酸序列(I)包括氨基酸序列;或(II)由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列是本文所述序列中的任一种。

[0419] 在一些实施方案中,核酸序列(I)包括核酸序列;或(II)由核酸序列组成,其中所述核酸序列是本文所述序列中的任一种。

[0420] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞(例如CHO细胞)中表达。

[0421] 治疗和诊断方法

[0422] 本发明的抗TFR1抗体或其抗原结合片段可用于各种治疗目的。在一方面,本公开提供了用于治疗受试者的脑疾病(例如,脑癌、痴呆或阿尔茨海默病)的方法,鉴定受试者患

有脑疾病(例如,脑癌、痴呆或阿尔茨海默病)的方法,降低脑疾病发展风险的方法,或降低受试者发展其他症状的风险的方法。在一些实施方案中,治疗可以停止、减缓、延迟或抑制脑疾病(例如脑癌、痴呆或阿尔茨海默病)的进展。在一些实施方案中,治疗可导致受试者中脑疾病(例如脑癌、痴呆或阿尔茨海默病)的一种或多种症状的数量、严重程度和/或持续时间减少。

[0423] 在一方面,本公开的特征在于包括将治疗有效量的本文所公开的抗体或其抗原结合片段施用于有此需要的受试者(例如,患有或被鉴定或诊断为患有脑疾病的受试者)的方法。

[0424] 在一方面,本公开的特征在于携带治疗剂穿过血脑屏障的方法。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段与治疗剂连接。在一些实施方案中,治疗剂是抗体、其抗原结合片段、小分子或抗体药物缀合物。

[0425] 在一些实施方案中,本文公开的组合物和方法可用于治疗具有脑疾病(例如,脑癌、痴呆或阿尔茨海默病)风险的患者。患有脑疾病(例如,脑癌、痴呆或阿尔茨海默病)的患者可以用本领域已知的各种方法鉴定。

[0426] 在一些实施方案中,脑疾病是脑癌。

[0427] 在一方面,本公开涉及降低肿瘤生长速率的方法,包括使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包括本文所述的抗体或其抗原结合片段,或抗体-药物缀合物。在一方面,本公开涉及杀死肿瘤细胞的方法,包括使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包括本文所述的抗体或其抗原结合片段,或抗体-药物缀合物。

[0428] 如本文所用,“有效量”是指足以实现有益或期望结果的量或剂量,这些结果包括终止、减缓、延迟或抑制疾病(例如癌症)的进展。有效量将根据例如抗体、抗原结合片段、抗体药物缀合物、抗体编码多核苷酸、包括该多核苷酸的载体和/或其组合物待施用的受试者的年龄和体重,症状的严重性和给药途径而变化,因此可基于个体确定施用。

[0429] 有效量可在一次或多次给药中施用。例如,抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物的有效量是足以改善、终止、稳定、逆转、抑制、减缓和/或延迟患者中自身免疫性疾病或癌症的进展的量,或者是足以改善、终止、稳定、逆转、减缓和/或延迟细胞(例如,活检细胞、本文所述的癌细胞中的任一者或细胞系(例如,癌细胞系))在体外增殖的量。如本领域所理解的,抗体、抗原结合片段或抗体药物缀合物的有效量可根据,尤其是患者病史以及其他因素(诸如所用抗体的类型(和/或剂量))变化。

[0430] 本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗体药物缀合物和/或组合物的有效量和给药方案可以凭经验确定,并且做出此类确定在本领域的技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的剂量将根据例如将接受本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗体药物缀合物和/或组合物的哺乳动物,给药途径,所用的本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗原结合片段、抗体药物缀合物和/或组合物的具体类型以及施用于哺乳动物的其他药物而变化。选择抗体或抗原结合片段的合适剂量的指导可参见关于抗体和抗原结合片段的治疗用途的文献,例如Handbook of Monoclonal Antibodies,Ferrone et al.,eds.,Noges Publications,Park Ridge,N.J.,1985,ch.22and pp.303-357;Smith et al.,Antibodies in Human Diagnosis and Therapy,Haber et al.,eds.,Raven Press,New York,1977,pp.365-389。

[0431] 抗体有效量的典型日剂量为0.01mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以小于100mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg或0.1mg/kg。在一些实施方案中,剂量可大于10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg或0.01mg/kg。在一些实施方案中,剂量为约10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg或0.1mg/kg。

[0432] 在本文所述的任何方法中,至少一种抗体、其抗原结合片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合片段或药物组合物)和任选的至少一种另外的治疗剂可以每周至少一次(例如,每周一次,每周两次,每周三次,每周四次,每天一次,一天两次或一天三次)。在一些实施方案中,在同一组合物(例如液体组合物)中施用至少两种不同的抗体和/或抗原结合片段。在一些实施方案中,至少一种抗体或抗原结合片段和至少一种另外的治疗剂在同一组合物(例如液体组合物)中给药。在一些实施方案中,所述至少一种抗体或抗原结合片段和所述至少一种另外的治疗剂以两种不同的组合物(例如,含有至少一种抗体或抗原结合片段的液体组合物和含有至少一种另外的治疗剂的固体口服组合物)给药。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂作为丸剂、片剂或胶囊给药。在一些实施方案中,所述至少一种另外的治疗剂以缓释口服制剂的形式给药。

[0433] 在一些实施方案中,可在施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任一者)之前或之后向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。在一些实施方案中,向受试者施用一种或多种另外的治疗剂和至少一种抗体、抗原结合抗体片段、抗体药物缀合物或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任一者),使得受试者中一种或多种另外的治疗剂和至少一种抗体或抗原结合片段(例如,本文所述的抗体或抗原结合片段中的任一者)的生物活性期存在重叠。

[0434] 在一些实施方案中,可以在延长的时间段内(例如,在至少1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年或5年的时间段内)向受试者施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任一种)。熟练的医学专业人员可以使用本文所述的用于诊断或跟踪治疗有效性(例如,观察疾病的至少一种症状)的任何方法来确定治疗期的长度。如本文所述,熟练的医疗专业人员还可以改变给予受试者的抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种附加治疗剂)的种类和数量(例如,增加或减少),并且还可以根据对治疗有效性的评估(例如,增加或减少)调整给予受试者的至少一种抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种附加治疗剂)的剂量或给药频率。

[0435] 在一些实施方案中,可以向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。另外的治疗剂可以包含一种或多种选自B-Raf抑制剂、EGFR抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、PI3K/mTOR双重抑制剂、布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)抑制剂,以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂的抑制剂。

[0436] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可包括一种或多种抑制剂,该一种或多种抑制

剂选自由以下组成的组:HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、活化刺猬信号通路(hedgehog signaling pathway)抑制剂和选择性降解雌激素受体的药剂。

[0437] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可包括一种或多种治疗剂,该一种或多种治疗剂选自由以下组成的组:曲贝替定(trabectedin)、白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、曲巴尼布(trebananib)、帕唑帕尼(pazopanib)、西地尼布(cediranib)、帕博西尼(palbociclib)、依维莫司(everolimus)、氟嘧啶、IFL、瑞戈非尼(regorafenib)、Reolysin、爱宁达(Alimta)、色瑞替尼(zykadia)、舒尼替尼(sutent)、西罗莫司(temsirolimus)、阿昔替尼(axitinib)、索拉非尼(sorafenib)、Votrient、IMA-901、AGS-003、卡博替尼(cabozantinib)、长春氟宁(vinflunine)、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺(temazolomide)、IL-2、IFNa、长春碱、沙利度胺(Thalomid)、达卡巴嗪、环磷酰胺、来那度胺(lenalidomide)、氮胞苷(azacytidine)、硼替佐米(bortezomid)、氨柔比星(amrubicine)、卡非佐米(carfilzomib)、普拉曲沙(pralatrexate)和恩扎妥林(enzastaurin)。

[0438] 在一些实施方案中,附加治疗剂可包含一种或多种选自以下的治疗剂:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子(TNF)α、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择蛋白激动剂。

[0439] 在一些实施方案中,向受试者施用卡铂、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇、顺铂、培美曲塞、吉西他滨、FOLFOX或FOLFIRI。

[0440] 在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。

[0441] 药物组合物和给药途径

[0442] 本文还提供了含有至少一种(例如,一种、两种、三种或四种)本文所述抗体或抗原结合片段的药物组合物。两种或更多种(例如,两种、三种或四种)本文所述的任何抗体或抗原结合片段可以以任何组合存在于药物组合物中。药物组合物可以以本领域已知的任何方式配制。

[0443] 药物组合物被配制成与它们的预期给药途径(例如,静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹腔)相容。组合物可包括无菌稀释剂(例如,无菌水或盐水)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂、抗细菌剂或抗真菌剂(诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)、抗氧化剂(诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠)、螯合剂(诸如乙二胺四乙酸)、缓冲剂(诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐)和等渗剂(诸如糖(例如,葡萄糖)、多元醇(例如,甘露糖醇或山梨糖醇)或盐(例如,氯化钠)),或它们的任何组合。脂质体悬浮液也可用作药学上可接受的载体(参见例如,美国专利号4,522,811)。组合物的制剂可被配制并包封在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。当需要时(如,例如在可注射制剂中),可通过例如使用包衣(诸如卵磷脂)或表面活性剂来保持适当的流动性。可通过包括延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)延长抗体或其抗原结合片段的吸收。另选地,可通过植入物和微囊化递送系统实现控释,其可包括可生物降解的、生物相容的聚合物(例如,乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸;Alza公司和Nova制药公司)。

[0444] 含有一种或多种本文所述的任何抗体或抗原结合片段的组合物可配制成以剂量单位形式(即含有预定量活性化合物以便于给药和剂量均匀的物理离散单位)胃肠外(例如静脉内、动脉内、肌内、真皮内、皮下或腹膜内)给药。

[0445] 组合物的毒性和治疗功效可通过标准药学方法在细胞培养物或实验动物(例如猴子)中测定。例如,可以测定LD50(使50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的群体中治疗有效的剂量):治疗指数是LD50:ED50的比率。表现出高治疗指数的试剂是优选的。当药剂表现出不良副作用时,应注意将潜在损害降至最低(即减少不良副作用)。毒性和治疗效果可以通过其他标准制药程序来确定。

[0446] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制用于受试者(例如人)的任何给定药剂的适当剂量。一种或多种(例如,一种、两种、三种或四种)抗体或其抗原结合片段(例如,本文所述的任何抗体或抗体片段)的治疗有效量将是治疗受试者中的疾病,降低受试者或被鉴定为处于发展疾病的风险中的受试者的严重程度、频率和/或受试者(例如人)中疾病的一种或多种症状的持续时间。本文所述的任何抗体或抗原结合片段的有效性和剂量可以由卫生保健专业人员或兽医专业人员使用本领域已知的方法以及通过观察受试者(例如人)的一种或多种疾病症状来确定。某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间(例如,疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的总体健康状况和/或年龄,以及其他疾病的存在)。

[0447] 示例性剂量包括每千克受试者体重中所述的任何抗体或抗原结合片段的毫克量或微克量(例如,约1μg/kg至约500mg/kg;约100μg/kg至约500mg/kg;约100μg/kg至约50mg/kg;约10μg/kg至约5mg/kg;约10μg/kg至约0.5mg/kg;或约1μg/kg至约50μg/kg)。尽管这些剂量覆盖了很宽的范围,但本领域普通技术人员将理解,包括抗体及其抗原结合片段在内的治疗剂的效力各不相同,并且可以通过本领域已知的方法确定有效量。通常,首先给予相对较低的剂量,然后主治健康护理专业人员或兽医专业人员(在治疗应用的情况下)或研究人员(当仍在开发阶段工作时)可以随后逐渐增加剂量,直到获得适当的反应。此外,应当理解,任何特定受试者的特定剂量水平将取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性、受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、给药时间、给药途径、排泄速率和抗体或抗体片段的体内半衰期。

[0448] 药物组合物可以与给药说明书一起包含在容器、包装或分配器中。本发明还提供了制备用于本文所述各种用途的抗体或其抗原结合片段的方法。

[0449] 另外的实施方案

[0450] 应当理解,虽然结合本发明的详细描述对本发明进行了描述,但是该描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由权利要求的范围限定。其它方面、优点和修改在权利要求的范围内。还提供了另外的实施方案。

[0451] 实施方案1是经遗传修饰的啮齿动物,其包含经修饰的免疫球蛋白重链基因座,其中所述经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含IgG恒定区基因,其中所述IgG恒定区基因编码缺失CH1结构域的IgG重链恒定区,其中所述经遗传修饰的啮齿动物表达重链抗体。

[0452] 实施方案2是实施方案1的经遗传修饰的啮齿动物,其中所述啮齿动物包含恰好一个IgG恒定区基因。

[0453] 实施方式3为实施方式1或2所述的经遗传修饰啮齿类动物,其中,IgG重链恒定区

基因为IGHG1。

[0454] 实施方案4是实施方案1-3中任一项所述的经遗传修饰的啮齿动物,其中所述IgG重链恒定区包含CH2结构域和CH3结构域以及任选的铰链区,或者由CH2结构域和CH3结构域以及任选的铰链区组成。

[0455] 实施方案5是经遗传修饰的啮齿动物,其基因组包含种系遗传修饰,所述种系遗传修饰包含在啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处IGHG3、IGHG2b和IGHG2c基因的缺失和IGHG1基因的CH1外显子的缺失。

[0456] 实施方案6是实施方案5的啮齿动物,其中所述种系遗传修饰进一步包含在啮齿动物免疫球蛋白重链基因座的IGHE基因的缺失。

[0457] 实施方案7是实施方案5或6的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处Sγ2b、Sγ2c和Sε转换区的缺失。

[0458] 实施方案8是实施方案5-7中任一个的啮齿动物,其中所述经修饰的免疫球蛋白重链基因座包含缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因,其中所述经修饰的IGHG1基因包含与SEQ ID NO:1具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。

[0459] 实施方案9为实施方案5-8中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处啮齿动物Sγ3转换区的缺失。

[0460] 实施方案10是实施方案5-9中任一项的啮齿动物,其中啮齿动物的基因组包含啮齿动物Sμ、Sγ1、Sα转换区,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的啮齿动物IGHG1基因,和啮齿动物IGHM、IGHδ、IGHA基因。

[0461] 实施方案11是实施方案5-9中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处啮齿IGHM和IGHδ基因的缺失。

[0462] 实施方案12是实施方案5-9和11中任一项的啮齿动物,其中啮齿动物基因组包含啮齿动物Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺少编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和啮齿动物IGHA基因。

[0463] 实施方案13是实施方案12的啮齿动物,其中Sμ和Sγ1转换区与和SEQ ID NO:8具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。

[0464] 实施方案14为实施方案5-9中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含在啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处IGHM基因的CH1编码序列的缺失。

[0465] 实施方案15是实施方案5-9和14中任一项的啮齿动物,其中所述啮齿动物的基因组包含啮齿动物Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的啮齿动物IGHM基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和啮齿动物IGHδ、IGHA基因。

[0466] 实施方案16是实施方案15的啮齿动物,其中Sμ转换区和修饰的IGHM基因与至少80%、90%、95%或99%与SEQ ID NO:10同一性的序列连接。

[0467] 实施方案17是实施方案5-9中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含IGHM基因的CH1外显子的缺失和啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处IGHδ基因的缺失。

[0468] 实施方案18是实施方案5-9和17中任一项的啮齿动物,其中啮齿动物的基因组包含啮齿动物Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHM基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和啮齿动物IgHA基因。

[0469] 实施方案19是实施方案5-9中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含

在啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处IGHM基因的CH1外显子的缺失和IGHδ基因的CH1编码序列的缺失。

[0470] 实施方案20是实施方案5-9和19中任一项的啮齿动物,其中所述啮齿动物的基因组包含啮齿动物Sμ、Sγ1、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHM基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHδ基因、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和啮齿动物IGHA基因。

[0471] 实施方案21是实施方案19或20的啮齿动物,其中修饰的IGHM基因与至少80%、90%、95%或99%与SEQ ID NO:10同一性的序列连接,并且修饰的IGHδ基因包含至少80%、90%、95%或99%与SEQ ID NO:41同一性的序列。

[0472] 实施方案22为实施方案14-21中任一项的啮齿动物,其中经修饰的IGHM基因包含与SEQ ID NO:13具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列。

[0473] 实施方案23是实施方案5-8中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处啮齿动物Sγ1转换区的缺失。

[0474] 实施方案24是实施方案5-8和23中任一项的啮齿动物,其中啮齿动物的基因组包含啮齿动物Sμ、Sγ3、Sα转换区,缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因,和啮齿动物IGHM、IGHδ、IGHA基因。

[0475] 实施方案25是实施方案5-8和23中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处啮齿动物Sγ3转换区的缺失。

[0476] 实施方案26是实施方案5-8、23和25中任一项的啮齿动物,其中所述遗传修饰进一步包含啮齿动物免疫球蛋白重链基因座处啮齿动物IGHM和IGHδ基因的缺失。

[0477] 实施方案27是实施方案5-8、23、25或26中任一项的啮齿动物,其中啮齿动物的基因组包含啮齿动物Sμ、Sα转换区、缺失编码CH1结构域的序列的经修饰的IGHG1基因和啮齿动物IGHA基因。

[0478] 实施方案28是实施方案27的啮齿动物,其中Sμ转换区和经修饰的IGHG1基因通过与SEQ ID NO:9具有至少80%、90%、95%或99%同一性的序列连接。

[0479] 实施方案29是实施方案5-10、23和24中任一项的啮齿动物,其中所述经修饰的基因组包含功能性IGHM基因。

实施例

[0480] 在下面的实施例中进一步描述了本发明,这些实施例并不限制权利要求中所述的本发明的范围。

[0481] 实施例1:概述

[0482] 通过基因编辑对非人动物免疫球蛋白重链位点进行修饰。例如,为了获得能够表达重链抗体的小鼠,对小鼠12号染色体内的免疫球蛋白重链恒定区基因座进行了修饰。经基因修饰的小鼠可表达如图1所示的重链抗体。此外,12号染色体上的重链可变区基因座中的所有内源VDJ序列被人VDJ序列替换,使得小鼠表达的重链抗体中的可变区具有完全人源化的序列。在一些实施方案中,对具有人VDJ序列的小鼠进行了免疫球蛋白重链恒定区基因座的遗传修饰。

[0483] 实施例2:小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因座的修饰

[0484] 如图2所示,小鼠(C57BL/6)免疫球蛋白恒定区基因包括(如以下顺序所示):免疫球蛋白重链恒定区μ(IGHM,或Cμ)、免疫球蛋白重链恒定区δ(IGHδ,或Cδ)、免疫球蛋白重链恒定区γ3(IGHG3,或Cγ3)、免疫球蛋白重链恒定区γ1(IGHG1,或Cγ1)、免疫球蛋白重链恒定区γ2b(IGHG2b,或Cγ2b)、免疫球蛋白重链恒定区γ2c(IGHG2c,或Cγ2c)、免疫球蛋白重链恒定区ε(IGHE,或Cε)和免疫球蛋白重链恒定α(IGHA,或Cα)基因。如图3所示,转换区(如Sμ、Sγ3、Sγ1、Sγ2b、Sγ2c、Sε和Sα)及其各自的启动子位于相应恒定区基因的上游。特别地,Cγ1基因包括从N-末端到C-末端编码IgG1的CH1、H(铰链)、CH2、CH3、M1和M2区域的序列。通过如下讨论的各种方法修饰小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因座。实验在具有完全人源化VDJ序列的小鼠中进行。VDJ区域人源化小鼠的细节可以在例如WO2020169022A1和US20200390073A1中找到;每个专利所有内容均为引用方式并入本文。

[0485] 为了获得仅表达重链抗体的小鼠,对Cγ3、Cγ1、Cγ2b、Cγ2c和Cε基因座进行修饰获得仅保留没有CH1编码区的截短的Cγ1序列(Cγ1ΔCH1),以获得图4A中显示为突变等位基因1或突变等位基因1'的突变等位基因。在突变等位基因1的基础上,对转换区(例如Sμ和Sγ1)、Cμ和/或Cδ序列进行了不同的修饰。例如,敲除整个Cμ和Cδ序列,得到的等位基因显示为突变等位基因2和突变等位基因2'(进一步缺失Sγ1)。或者,被敲除的区域选自:Cμ的CH1编码区(所得等位基因显示为突变等位基因3);Cμ的CH1编码区和整个Cδ(产生的等位基因显示为突变等位基因4);以及Cμ的CH1编码区和Cδ的CH1编码区(产生的等位基因显示为突变等位基因5)。

[0486] 实施例3:靶向载体的构建

[0487] 在修饰中使用靶向载体,例如V1、V2、V3、V4、V5、V6和V7。

[0488] 载体V1

[0489] 如图5所示,载体V1包括Cγ1ΔCH1敲入序列(SEQ ID NO:1)。Cγ1ΔCH1序列不具有CH1编码序列。CH1编码区被删除或被Neo盒替换。Neo盒包括侧翼为两个Frt(或LoxP)序列的Neo基因序列。将Flp转基因小鼠与携带Neo盒的小鼠一交配去除盒。

[0490] 靶向载体V1包括5'至3'顺序的以下特征序列:上游同源臂(5'同源臂)、小鼠Sγ1启动子序列、小鼠Sγ1、Cγ1ΔCH1序列和下游同源臂(3'同源臂)。靶向载体可以进一步包括用于阳性克隆筛选的抗生素抗性基因(例如,新霉素磷酸转移酶基因,或Neo),以及抗生素抗性基因侧翼的两个Frt重组位点。此外,具有阴性选择标记的编码基因(编码白喉毒素A亚基(DTA)的基因)也可以插入到靶向载体中。

[0491] 从小鼠细菌人工染色体(RP23-38K22或RP23-265p18)克隆包含小鼠Sγ1启动子、小鼠Sγ1和Cγ1ΔCH1敲入序列(SEQ ID NO:1)的16076bp序列。以下两组引物对用于获得包含小鼠Sγ1启动子、小鼠Sγ1和Cγ1ΔCH1敲入序列的序列,用于构建V1载体。然后连接从V1-F1和V1-R1扩增的序列和从V1-F2和V1-R2扩增的序列。

[0492] V1-F1(SEQ ID NO:2):5'-GTGGTTCTGGCTACAAGATAGAGCTCTGTCAATGATGTTTGCAGAGACTACA-3'

[0493] V1-R1(SEQ ID NO:3):5'-CTCCCTATACGTCCTCTCACCTACAAGAAAAAGTATATGTGATTACACTGTCAGACAG-3'

[0494] V1-F2(SEQ ID NO:4):5'-GTGTAATCACATATACTTTTTCTTGTAGGTGAGAGGACGTATAGGGAGGAGGGGTTC-3'

[0495] V1-R2(SEQ ID NO:5):5'-CGTCTAGTCCTTGCCCACGTGTCGACCCCATAGGGAGGACAGACTGAGG-3'

[0496] 如图6所示,V1载体用于在单个步骤中替换小鼠重链恒定区基因座(从Sγ3至Cε)的100883bp序列(NCBI参考序列NC_000078 7的113232142至113333024的核酸)。

[0497] 载体V2

[0498] 如图7所示,V2载体用于在单个步骤中替换小鼠重链恒定区(跨越Cγ3至Cε)的92859bp序列(NCBI参考序列NC_000078 7的113232142至113325000的核酸)。

[0499] 该方法还包括使用一对引物从小鼠细菌人工染色体(BAC)克隆以获得包含

[0500] Cγ1ΔCH1基因敲入序列(SEQ ID NO:1)的基因敲入序列。使用以下引物:

[0501] V2-F1(SEQ ID NO:6):

[0502] 5'-TCTGAACTACTTCGTCGACGTGAGAGGACGTATAGGGAGGAGGG-3'

[0503] V2-R1(SEQ ID NO:7):

[0504] 5'-CACGTGGATCCGCGGCCGCCCATAGGGAGGACAGACTGAGGAC-3'

[0505] 载体V3

[0506] 如图8所示,用V3载体从染色体上敲除包括Cμ和Cδ的16434bp核苷酸。重组突变等位基因2中Sμ和Sγ1之间的连接序列如SEQ ID NO:8所示。

[0507] 载体V4

[0508] 如图9所示,靶向载体V4以5'至3'的顺序包括以下特征序列:上游同源臂(5'同源臂)、小鼠Sμ的部分和下游同源臂(3'同源臂)。靶向载体还包括用于阳性克隆筛选的抗生素抗性基因(新霉素磷酸转移酶基因,或Neo),以及抗生素抗性基因侧翼的两个Frt重组位点。此外,还将具有阴性选择标记的编码基因(编码白喉毒素A亚基(DTA)的基因)插入靶向载体。具体而言,在重组突变等位基因2'中,Sμ与Cγ1ΔCH1'直接相连(即没有其他转换区或免疫球蛋白基因序列)。连接序列如SEQ ID NO:9所示。

[0509] 载体V5

[0510] 如图10所示,使用V5载体敲除Cμ中的CH1编码序列。敲除Cμ中的CH1编码序列后,连接序列如SEQ ID NO:10所示。

[0511] 载体V6

[0512] 如图11所示,靶向载体V6以5'到3'的顺序包括以下特征序列:上游同源臂(5'同源臂)、小鼠Sμ区域的部分、小鼠CμΔCH1序列和下游同源臂(3'同源臂)。打靶载体还包括用于阳性克隆筛选的抗生素抗性基因(新霉素磷酸转移酶基因,或Neo),以及抗生素抗性基因侧翼的两个Frt重组位点。此外,还将具有阴性选择标记的编码基因(编码白喉毒素A亚基(DTA)的基因)插入靶向载体中。

[0513] 从小鼠体细胞中克隆了包括小鼠CμΔCH1序列在内的序列。以下引物对用于获得包括小鼠CμΔCH1(或CμΔCH1敲入序列;SEQ ID NO:13)的序列,用于构建V6载体。

[0514] V6-F1(SEQ ID NO:11):

[0515] 5'-ATCCCTCTCTGGTCCTAACCAAACCCTCCCAGCAGGGGTG-3'

[0516] V6-R1(SEQ ID NO:12):

[0517] 5'-TTGACCCATCTCAGTTTACATGGTGAATGACTACAATATATCTGGAATTTGG-3'

[0518] 载体V7

[0519] 如图12所示,靶向载体V7从5’到3’依次包括以下特征序列:上游同源臂(5’同源臂)、CμΔCH1序列、CδΔCH1序列(或CδΔCH1敲入序列;SEQ ID NO:41)和下游同源臂(3’同源臂)。靶向载体还包括用于阳性克隆筛选的抗生素抗性基因(新霉素磷酸转移酶基因,或Neo),以及抗生素抗性基因侧翼的两个Frt重组位点。此外,还将具有阴性选择标记的编码基因(编码白喉毒素A亚基(DTA)的基因)插入靶向载体。

[0520] 从小鼠基因组中克隆了小鼠Sμ转换区序列、CμΔCH1序列和CδΔCH1序列。以下引物对用于获得包括小鼠CμΔCH1和CδΔCH1上游核苷酸的敲入序列,用于构建V7载体。

[0521] V7-F1(SEQ ID NO:14):

[0522] 5’-ATCCCTCTCTGGTCCTAACCAAACCCTCCCAGCAGGGGTG-3’

[0523] V7-R1(SEQ ID NO:15):

[0524] 5’-TTCTGCATGGTCCAGGGATTGATCAGACAGATAGTGAAGTTCTGAGGACA-3’

[0525] 实施例4:基因修饰的验证

[0526] 突变等位基因1

[0527] 使用PCR和Southern Blot检测突变等位基因1的基因型。首先,用两组引物对L-GT-F1/L-GT-R1和R-GT-F2/R-GT-R2对阳性克隆细胞进行PCR鉴定。示例性结果如图13A-13B所示。引物的序列如下表所示。

[0528] 表7

[0529]

引物	序列 (5’ 到 3’)	片段大小 (bp)
L-GT-F1	TAGGAAGTGGCTCAGAAGTCTGCCT (SEQ ID NO: 16)	Mut: 10653 bp
L-GT-R1	TCTCCAGCCCCATTTATCCCAGCTA (SEQ ID NO: 17)	
R-GT-F2	TGGGATAGCTATGTGGGGAGACCAG (SEQ ID NO: 18)	Mut: 10526 bp
R-GT-R2	AGTTCTGTCATCAGGCCAACTACGC (SEQ ID NO: 19)	

[0530] 接下来,通过Southern Blot(分别用BclI、ScaI、XmnI和BglII消化,然后用4个相应的探针杂交)验证阳性克隆,以筛选出正确的阳性克隆细胞。Southern Blot检测策略(包括限制性酶、探针和靶片段大小)和探针引物如下表所示。

[0531] 表8

[0532]

限制酶	探针	WT大小	目标大小
BclI	LR Probe	6.1kb	18.4kb
ScaI	3’Probe	9.7kb	12.8kb
XmnI	A Probe	9.7kb	16.6kb
BglII	5’Probe	7.2kb	4.3kb

[0533] 表9

[0534]

探针	序列 (5’-3’)
LR Probe	TCCTTGCCCCTCAGTCAGTCTTGA (SEQ ID NO: 20)
	TCCTCCATGGCTTGGTGCCTTCT (SEQ ID NO: 21)
3’Probe	GCCAGCTCTTGAGGACCTGCTCC (SEQ ID NO: 22)
	TGGCTCAGACAAGGAGAGCAAGACC (SEQ ID NO: 23)
A Probe	ATTAGCCTGCCTAAACCAACCAGGC (SEQ ID NO: 24)
	TCAATACCTGGGCCACCCTCTAACA (SEQ ID NO: 25)
5’Probe	GAAGTCTGCCTGACCCTCTACATG (SEQ ID NO: 26)
	CACAGATGTGTAATACATGTACTTGC (SEQ ID NO: 27)

[0535] 示例性检测结果如图14A-14D所示。根据PCR和Southern Blot结果,编号为F1-012、F1-017、F1-018和F1-019的小鼠被鉴定为突变等位基因1阳性杂合子小鼠。突变等位基因1中无随机插入被检测到。

[0536] 突变等位基因2

[0537] 引物DE-F1和DE-R1用于确认敲除突变等位基因2中的Cμ至Cδ序列。检测结果如图15所示。编号为F1-1、F1-2、F1-3、F1-4、F1-5、F1-6、F1-7和F1-8的小鼠被鉴定为阳性杂合子小鼠。引物的序列如下表所示。

[0538] 表10

[0539]

引物	序列 (5’ 到 3’)	片段大小 (bp)
DE-F1	TGTGTGCTGATACAGAAGCCTGAGC (SEQ ID NO: 28)	Mut: ~792 bp
DE-R1	TCCCATCACCCTGTGTTATCATCTGT (SEQ ID NO: 29)	

[0540] 突变等位基因2’

[0541] 引物GT-Mut-F、GT-Mut-R和GT-WT-R被用于确认敲除突变等位基因2’中从Cμ到Sγ1的序列。检测结果如图16所示。编号为F1-2和F1-4的小鼠被鉴定为阳性杂合子小鼠。引物的序列如下表所示。

[0542] 表11

[0543]

引物	序列 (5’ 到 3’)	片段大小 (bp)
GT-Mut-F	ACCATATCTAGCCCTGCCTGCCTTA (SEQ ID NO: 30)	WT: 330 bp Mut: 590 bp
GT-Mut-R	TCAATACCTGGGCCACCCTCTAACA (SEQ ID NO: 31)	
GT-WT-R	ACTTGCCCCCTGTCCTCAGTG (SEQ ID NO: 32)	

[0544] 突变等位基因3

[0545] 引物GT-3F和GT-3R用于确认敲除突变等位基因3中Cμ的CH1编码序列。检测结果如图17所示。编号为F1-2、F1-3和F1-6的小鼠被鉴定为阳性杂合子小鼠。引物的序列如下表所示。

[0546] 表12

[0547]

引物	序列 (5’ 到 3’)	片段大小 (bp)
GT-3F	GTGGCTAGAAGGCAGCTCCA (SEQ ID NO: 33)	Mut: 361 bp WT: 684 bp
GT-3R	CAGAGAAGCCATCCCGTGGT (SEQ ID NO: 34)	

[0548] 突变等位基因4

[0549] 引物Mut-F和Mut-R用于确认突变等位基因4中CμΔCH1的序列,引物F4和R4用于证实突变等位基因4中Cδ的缺失。检测结果分别如图18A-18B所示。编号为F1-1、F1-2、F1-3、F1-4、F1-5、F1-6、F1-7、F1-8、F1-9和F1-10的小鼠被鉴定为阳性杂合子小鼠。引物的序列如下表所示。

[0550] 表13

[0551]

引物	序列 (5’ 到 3’)	片段大小 (bp)
Mut-F	TACCATATCTAGCCCTGCCTGCCTT (SEQ ID NO: 35)	Mut: 342 bp WT: 665 bp
Mut-R	TTCGTGGCCTCGCAGATGAGTTTAG (SEQ ID NO: 36)	
F4	GCCTCTTTGGGCTCATATCCTGGAC (SEQ ID NO: 39)	Mut: 5594 bp
R4	GAGTGTGTCACATGACTCCACTGGG (SEQ ID NO: 40)	

[0552] 突变等位基因5

[0553] 引物Mut-F和Mut-R用于确定突变等位基因5中CμΔCH1的序列,引物F3和R3用于确定突变等位基因5中CδΔCH1的序列。检测结果分别如图19A-19B所示。编号为F1-1、F1-2、F1-3、F1-4、F1-5、F1-6、F1-7和F1-8的小鼠被鉴定为阳性杂合子小鼠。引物的序列如下表所示。

[0554] 表14

[0555]

引物	序列 (5’ 到 3’)	片段大小 (bp)
Mut-F	TACCATATCTAGCCCTGCCTGCCTT (SEQ ID NO: 35)	Mut: 342 bp WT: 665 bp
Mut-R	TTCGTGGCCTCGCAGATGAGTTTAG (SEQ ID NO: 36)	
F3	CAGACCTCACCTTTGTCCCCAGTTC (SEQ ID NO: 37)	Mut: 323 bp WT: 611 bp
R3	GGTACTGCTATGGAAGGGACCATGC (SEQ ID NO: 38)	

[0556] 实施例5:小鼠免疫球蛋白重链可变区基因座的修饰

[0557] 进行将人免疫球蛋白基因引入小鼠基因组以产生表达人源化抗体的小鼠的实验。图20显示了制备人源化小鼠的方法。该方法首先涉及修饰人染色体上的人免疫球蛋白区域。然后将经过修饰的人染色体导入小鼠受体细胞。

[0558] 通过直接取代(例如,同源性重组或Cre介导的重组)用人免疫球蛋白可变区取代了小鼠免疫球蛋白可变区。在一些情况下,可通过逐步的方法将人免疫球蛋白可变区引入小鼠基因组。然后,筛选正确取代的受体细胞。然后将细胞注射到囊胚中以制备嵌合小鼠。随后进行育种以获得含有人或人源化免疫球蛋白可变区的小鼠。

[0559] 免疫球蛋白重链基因座位于小鼠12号染色体上,在免疫球蛋白重链可变区基因座两侧引入了两个重组位点。

[0560] 还进行了实验以产生经修饰的人染色体。在重链免疫球蛋白基因座的可变区两侧引入了两个重组位点。然后将经修饰的人染色体引入小鼠细胞,然后筛选细胞,只选择仅含有一条人染色体的细胞。然后Cre重组酶介导用人染色体上的V、D、J区对小鼠染色体上的V、D、J区的取代(图21)。

[0561] 将阳性克隆细胞显微注射到BALB/c小鼠的囊胚中。胚胎显微注射按照A.Nagy等人,“Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual(Third Edition),”Cold

Spring Harbor Laboratory Press,2003中描述的方法进行。然后将注射的受精卵转移到培养基中进行短期培养,然后移植到受体小鼠的输卵管中,以产生基因修饰的人源化小鼠(F0代)。然后将小鼠与具有C57BL/6背景的小鼠进行繁殖。对从小鼠尾部获得的DNA进行PCR分析。将小鼠与具有BALB/c背景的小鼠进一步繁殖数次(例如,至少5次),以获得具有BALB/c背景的重链免疫球蛋白基因座人源化杂合小鼠。

[0562] 然后将杂合的小鼠相互交配以获得纯合的小鼠。如何制备人源化重链免疫球蛋白纯合的小鼠详细描述见WO2020169022A1和US20200390073A1;每个专利所有内容均以引用方式并入本文。

[0563] 实施例6:小鼠免疫球蛋白轻链基因座的修饰

[0564] Kappa(κ)轻链基因敲除小鼠

[0565] 免疫球蛋白κ轻链(κ)基因座位于小鼠6号染色体上。通过敲除免疫球蛋白κ轻链可变区基因座的整个序列,对小鼠6号染色体进行了修饰。详细的敲除方法可以在例如WO2020169022A1和US20200390073A1中找到;Zou,X.等人"Subtledifferences in antibody responses and hypermutation ofλlight chains in mice with a disrupted χconstant region."European Journal of Immunology 25.8(1995):2154-2162。Zou,Y.R.等人"Gene targeting in the Ig kappa locus:efficient generation of lambda chain-expressing B cells,independent of gene rearrangements in Ig kappa."The EMBO Journal 12.3(1993):811-820;Takeda,S等人"Deletion of the immunoglobulin kappa chain intron enhancer abolishes kappa chain gene rearrangement in cis but not lambda chain gene rearrangement in trans."The EMBO Journal 12.6(1993):2329-2336;;这些专利都通过引用方式并入本文。

[0566] Lambda(λ)轻链基因敲除小鼠

[0567] 免疫球蛋白λ轻链(λ)位于小鼠16号染色体上。通过敲除免疫球蛋白λ轻链可变区基因座的整个序列,对小鼠16号染色体进行修饰。详细的敲除方法可以在例如Zou,X.等人,“Block in development at the pre-B-II to immature B cell stage in mice without Igκand IgλLight Chain.”The Journal of Immunology 170.3(2003):1354-1361中找到,将其全文通过引用方式并入本文。

[0568] 本文所述的小鼠可以相互交配以获得具有人免疫球蛋白重链VDJ区、修饰的小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因座(缺少Cγ1的CH1编码区)和缺少全部或部分小鼠免疫球蛋白轻链基因座的小鼠。

[0569] 实施例7:来自携带修饰的IgG1基因的小鼠的重链抗体

[0570] 将上述鉴定的缺失Cγ1的CH1编码区的小鼠(分别具有突变等位基因2’、突变等位基因3和突变等位基因4基因型的小鼠)和野生型(WT)小鼠放血以获得血清样品。制备血清样品用于Western印迹分析,以使用抗mIgG1抗体(货号:ab190481,Abcam)鉴定血清中任何表达的IgG。如图32所示,结果显示混合条带:一条约75kD的条带(缺少CH1结构域的二聚体IgG1的预期大小),和一条约150kD的条带(野生型IgG的预期大小)。结果表明,使用本文所述方法产生的小鼠可以在外周血中表达缺失CH1结构域的IgG1。

[0571] 可以通过注射免疫原来免疫小鼠,然后通过各种方法(例如,杂交瘤、噬菌体展示筛选、10x Genomics单细胞技术或Beacon®光流控系统)筛选具有特异性结合的抗体。初步

结果显示,通过本文所述方法制备的小鼠可用于获得具有高亲和力、高多样性、良好功能(例如,高内吞活性)和良好可开发性(例如,高亲水性和良好热稳定性)的抗体。具有突变等位基因3(Mut3)的小鼠

[0572] 用抗原A免疫人源化小鼠(杂合重链突变等位基因3基因型,κ轻链基因座敲除,λ轻链基因座未敲除)(5只小鼠)。3次免疫后,通过FACS检测到血清滴度增加了10^4倍。然后使用Beacon®光流控系统分离可产生抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。构建每种抗体的表达载体并转移到宿主细胞中。经FACS证实的阳性细胞数为63。进一步分析抗体序列发现,重链可变区(由IMGT定义)的CDR3长度在6-23之间(图22)。此外,94%的克隆(59/63)的CDR3长度大于或等于12,共有35个独特的CDR3序列。图23显示了可变区基因的种系基因使用。此外,还测试了一些抗体的亲和力。如图24所示,这些抗体对抗原A的KD达到10^{-9}M,表明良好的结合亲和力。

[0573] 在另一个实验中,人源化小鼠(4只小鼠是纯合重链突变等位基因3基因型、纯合κ轻链基因座缺失和纯合λ轻链基因座缺失;3只小鼠是纯合重链突变等位基因3基因型、纯合κ轻链基因座缺失和纯合λ轻链基因座缺失)用人4-1BB(货号:41B-H5258,ACROBiosystems)进行免疫。4次免疫后,FACS检测的血清效价增加了10^4倍。经FACS证实的抗原特异性克隆数为67个。进一步分析抗体序列发现,重链可变区(由IMGT定义)的CDR3长度在7-19之间(图33)。图34显示了可变区基因的种系基因使用。此外,还测试了一些抗体的亲和力。

[0574] 在另一个实验中,用抗原人CD3ED和食蟹猴CD3ED免疫人源化小鼠(19只小鼠是纯合重链突变等位基因3基因型、纯合κ轻链基因座缺失和纯合λ轻链基因座缺失)。4次免疫后,FACS检测的血清效价增加了10^5倍。经FACS证实的抗原特异性克隆数量为273个。进一步分析抗体序列发现,重链可变区(由IMGT定义)的CDR3长度在6-25之间(图35)。图36显示了可变区基因的种系基因使用。此外,还测试了一些抗体的亲和力。

[0575] 人源化小鼠(纯合重链突变等位基因3基因型,κ轻链基因座和λ轻链基因座敲除)用抗原人血清白蛋白免疫(10只小鼠)。然后使用Beacon®光流控系统分离可产生抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。经FACS证实的阳性细胞数为84个。进一步分析抗体序列发现,重链可变区(由IMGT定义)的CDR3长度在12-17之间。图43显示了可变区基因的种系基因使用。

[0576] 具有突变等位基因2(Mut2)的小鼠

[0577] 用抗原A免疫人源化小鼠(纯合重链突变等位基因2基因型,κ轻链基因座敲除,λ轻链基因座未敲除)(10只小鼠)。然后使用Beacon®光流控系统分离可产生抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。经FACS证实的阳性细胞数为40。对抗体序列的进一步分析显示,共有14个独特的CDR3序列。此外,还对部分抗体的亲和力进行了测试。如图25所示,这些抗体对抗原A的KD达到10^{-8}M,表明具有良好的结合亲和力。

[0578] 此外,收集免疫的Mut2小鼠的脾组织以从脾细胞中提取总RNA。可通过PCR克隆免疫球蛋白可变区基因座,然后将其插入噬菌体质粒以构建噬菌体重组质粒文库。在一个实验中,对构建的文库进行2轮淘选和筛选,共获得202个ELISA阳性克隆。去除冗余序列后,经FACS证实的阳性细胞数为94个。对这些抗体的序列进一步分析表明,其重链可变区的CDR3长度在8-18之间(由IMGT定义)。图26显示了可变区基因的种系基因使用。

[0579] 具有突变等位基因2'(Mut2')的小鼠

[0580] 人源化小鼠(杂合重链突变等位基因2'基因型,κ轻链和λ轻链基因座敲除)用抗原

人血清白蛋白免疫(12只小鼠)。然后使用Beacon®光流控系统分离可产生抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。经FACS证实的阳性细胞数为96个。进一步分析抗体序列发现,重链可变区(以IMGT定义)的CDR3长度在5-22之间。此外,78.1%的克隆(75/96)的CDR3长度大于或等于12。图44显示了可变区基因的种系基因使用。此外,还测试了一些抗体的亲和力。如图45所示,部分抗体的KD达到10^{-9}M,显示出良好的亲和力。具有突变等位基因4(Mut4)的小鼠

[0581] 人源化小鼠(纯合重链突变等位基因4基因型,κ轻链和λ轻链基因座敲除)用抗原人血清白蛋白免疫(10只小鼠)。然后使用Beacon®光流控系统分离可产生抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。经FACS证实的阳性细胞数为41。对抗体序列的进一步分析表明,重链可变区(由IMGT定义)的CDR3长度在8-23之间,65.9%的克隆(27/41)的CDR3长度大于或等于12。图46显示了可变区基因的种系基因使用。

[0582] 具有突变等位基因5(Mut5)的小鼠

[0583] 用抗原A免疫人源化小鼠(纯合重链突变等位基因5基因型,κ轻链和λ轻链基因座敲除)。然后使用Beacon®光流控系统分离可产生抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。经FACS证实的阳性细胞数为20。进一步序列分析表明,重链可变区(由IMGT定义)的CDR3长度在10-18之间。图47显示了可变区基因的种系基因使用。此外,还对部分抗体的亲和力进行了测试。这些抗体对抗原A的KD达到10^{-9}M,表明具有良好的结合亲和力。

[0584] B细胞发育

[0585] 进行实验以比较修饰的IgG1小鼠和野生型小鼠的免疫系统。选择6-8周龄的RenMab小鼠(人源化重链免疫球蛋白基因座)和修饰的IgG1小鼠。其中,与RenMab小鼠相比,修饰的IgG1小鼠具有相似的体重、外观和活力。取小鼠外周血、脾脏、淋巴结和骨髓组织,未见明显解剖变化。

[0586] 实施例8产生人抗TFR1抗体

[0587] 用His标记的人TFR1(转铁蛋白受体1)蛋白(hTFR1-His,ACROBiosystems,货号:CD1-H5243)免疫小鼠(5只小鼠为纯合重链突变等位基因3基因型、纯合κ轻链基因座缺失和纯合λ轻链基因座缺失)以获得抗TFR1抗体。免疫前,采集眼眶后血液作为阴性对照。第一次免疫使用完全弗氏佐剂(CFA),第二次和第三次免疫使用不完全弗氏佐剂(IFA)。共进行了三次免疫接种(每两周一次)。第3次免疫后1周,眼眶采血,用流式细胞仪检测血清抗体效价。

[0588] 在前一次免疫接种后至少14天,还进行了增强免疫接种的程序。通过腹腔注射TFR1蛋白,通过尾静脉注射表达人TFR1抗原的CHO-S细胞。

[0589] 从免疫的小鼠中分离抗原特异性免疫细胞以进一步获得抗TFR1抗体或获得抗TFR1抗体的重链可变区序列。例如,使用单细胞技术(例如,使用Beacon®光流控系统,数字细胞生物学公司)来筛选和发现分泌抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。通过逆转录和PCR测序获得抗体可变区序列。将获得的可变区序列用于抗体表达,以使用FACS验证与TFR1的结合亲和力。因为缺少CH1结构域,所获得的抗体的重链可变区(VH)也被称为重链单可变结构域(VHH)。

[0590] 具体而言,将获得的VHH序列分别连接到人IgG1恒定区(例如,铰链区、CH2结构域和CH3结构域)。通过该方法获得的示例性抗体包括:23B8、24A1、24C9和24G5。重链CDR1-3序列如图37和图38所示。23B8、24A1、24C9和24G5的VHH区序列如图39所示。

[0591] 可以进一步改造抗体的恒定区使用用丙氨酸替换297位的天冬酰胺(N297A)。例如,当将N297A突变引入24G5的恒定区时,产生的抗体被命名为24G5-N。

[0592] 实施例9抗TFR1抗体的跨物种结合

[0593] 将CHO-S-hTFR1细胞或CHO-S-fasTFR1细胞分别以10^5个细胞/孔的密度转置于96孔板。将连续稀释的样品抗TFR1抗体加入到96孔板中,并在4℃下孵育30分钟。PBS用作阴性对照(NC)。然后,将细胞与第二抗体anti-hIgG-Fc-Alex Flour™ 647(杰克逊免疫研究实验室,货号:109-606-170)在4℃黑暗中孵育15分钟,然后进行流式细胞术分析。

[0594] CHO-S-hTFR1细胞或CHO-S-fasTFR1细胞通过分别用表达人TFR1(hTFR1,SEQ ID NO:70)或食蟹猴(Macaca fascicularis)TFR1氨基酸序列(fasTFR1,SEQ ID NO:71)的载体转染CHO-S细胞而获得。测试结果如下表所示。

[0595] JR141是一种与人艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶偶联的靶向人TFR1的人源化IgG1抗体,于2021年3月在日本首次获得批准,用于II型粘多糖贮积症的静脉注射治疗。JR141的VH和VL序列分别如SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73所示。对于阳性对照(JR141-N),将JR141的VH和VL连接到具有N297A突变的人IgG1恒定区。

[0596] 表15

[0597]

抗体	细胞	阳性细胞百分比	评价
NC	CHO-S-hTFR1	0.1%	不结合
	CHO-S-fasTFR1	0.2%	不结合
JR141-N	CHO-S-hTFR1	45.0%	结合
	CHO-S-fasTFR1	37.2%	结合
23B8	CHO-S-hTFR1	38.8%	结合
	CHO-S-fasTFR1	39.6%	结合
24A1	CHO-S-hTFR1	56.4%	结合
	CHO-S-fasTFR1	50.9%	结合
24C9	CHO-S-hTFR1	45.8%	结合
	CHO-S-fasTFR1	0.35%	不结合
24G5	CHO-S-hTFR1	54.3%	结合
	CHO-S-fasTFR1	51.2%	结合

[0598] 实施例10.抗TFR1抗体的结合亲和力

[0599] 在配备有预固定的蛋白A传感器芯片的Biacore™(Biacore公司,新泽西州皮斯卡特韦)8K生物传感器上,使用表面等离子体共振(SPR)来测定抗TFR1抗体对人(hTFR1-His,ACROBiosystems,货号:CD1-H5243)或猴(fasTFR1-His,ACROBiosystems,货号:TFR-C524a)的His标记的TFR1蛋白的结合亲和力。

[0600] 将纯化的抗TFR1抗体捕获在Protein A芯片(Series S Sensor Chip Protein A)上用于检测。以10μL/min的速度上样1μg/mL纯化的抗TFR1抗体,以结合hTFR1-His和fasTFR1-His(200nM)。流速为30μL/min。结合和解离时间分别设定为180秒和600秒。在每轮滴定的最后一次注射后,用甘氨酸溶液(pH2.0)以30μL/min的速度持续30秒,再生芯片。

[0601] 数据分析在Biacore™8K评估软件3.0中整体拟合到1:1Langmuir结合模型进行(Karlsson,R.Roos,H.Fagerstam,L.Petersson,B.,1994,Methods Enzymology 6,99-110),同时获得动力学结合速率(kon)和解离速率(koff)。亲和力值由动力学速率常数的商(KD=koff/kon)推导。

[0602] 如本领域普通技术人员所理解的,对各受试抗TFR1抗体采用都采用相同的方法,并对参数(如抗体浓度)进行适当调整。测试抗体的结果总结在下表中。结果表明,4种抗TFR1抗体均能与人和猴TFR1高亲和力结合。

[0603] 表16

[0604]

抗体	分析物 1 溶液	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
23B8	hTFR1-His	1.51E+04	1.32E-04	8.73E-09
	fasTFR1-His	4.10E+05	7.99E-03	1.95E-08
24A1	hTFR1-His	2.62E+04	7.68E-05	2.93E-09
	fasTFR1-His	4.36E+04	1.01E-04	2.32E-09
24C9	hTFR1-His	2.68E+04	3.83E-04	1.43E-08
	fasTFR1-His	2.78E+04	3.68E-04	1.32E-08
24G5	hTFR1-His	4.24E+04	8.68E-05	2.05E-09
	fasTFR1-His	6.33E+04	8.79E-05	1.39E-09

[0605] 实施例11抗TFR1抗体的表位分析

[0606] 使用ForteBio Octet系统在30℃通过生物层干涉法(BLI)分析一对纯化的抗TFR1抗体之间的靶蛋白表位的相对位置。从HBS-EP+缓冲液(10×)稀释的1×HBS-EP+缓冲液(10mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、150mM NaCl、3mM乙二胺四乙酸(EDTA)和0.05% P20,pH7.4)用作整个实验的运行缓冲液。约10μg/mL的hTFR1-His蛋白被HIS1K(Anti-Penta-HIS)捕获200秒,并以30μL/min的流速注射200nM的抗体(分析物1)以结合配体。在相同条件下注射另一种抗体(分析物2),以确定不同抗体的结合是否相互干扰。每种抗体的结合时间为300秒。

[0607] 使用Data Analysis HT 12.0获得每种抗体的结合值。为了量化一种抗体与另一种抗体结合的干扰,计算结合比率,以比较每对抗体。结合率定义为第二抗体(分析物2)的结合值除以第一抗体(分析物1)的结合率。每个抗体对的结合率总结在下表中。具体而言,如果分析物1对分析物2表现出阻断作用,则结合率在0.0至0.5之间;如果分析物1对分析物2没有表现出阻断效应,则结合比在0.5-1.1之间。通常,相互干扰的抗体对具有相同或重叠的表位。

[0608] 表位结合实验表明,24A1和24G5识别相同的表位,23B8、24C9和JR141-N识别不同的表位。

[0609] 表17

[0610]

分析物 2 \ 分析物 1	23B8	24A1	24G5	24C9	JR141-N
23B8	0.1	0.2	0.3	1.4	1.1
24A1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.3
24G5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
24C9	0.6	0.1	0.2	0.0	0.8
JR141-N	0.7	0.0	0.0	1.1	0.0

[0611] 实施例12抗TFR1抗体的内化

[0612] 将抗TFR1抗体与pHAb-山羊抗人IgG第二抗体一起加入到人皮层微血管内皮细胞(hCMEC/D细胞)中,并孵育3小时。孵育后,离心细胞并用FACS缓冲液洗涤。使用流式细胞仪测量平均荧光强度(MFI)。计算抗体的内吞率。人IgG1蛋白(CrownBio,货号:C0001)用作同种型对照(ISO)。结果如下表所示,表明所有四种抗体在人皮层微血管内皮细胞中均表现出良好的内吞活性。

[0613] 表18

[0614]

抗体	MFI	阳性群体
ISO	4288	0.9%
23B8	11392	67.0%
24A1	26972	96.6%
24C9	37086	96.0%
24G5	26406	96.0%

[0615] 实施例13.抗TFR1抗体的稳定性分析

[0616] 抗TFR1抗体23B8、24A1、24C9和24G5的稳定性被评估。具体地,进行以下测试:(1)观察溶液外观和可见不溶物的存在;(2)通过体积排阻超高效液相色谱(SEC-UPLC)检测抗体的纯度变化(表示为主峰面积占所有峰面积总和的百分比(纯度,%));(3)使用疏水相互作用色谱-高效液相色谱(HIC-HPLC)法检测抗体的表观疏水性的变化(表示为主峰的保留时间(HIC,min));(4)通过毛细管等电聚焦(cIEF)检测抗体中的电荷变量(表位为主要组分、酸性组分和碱性组分的百分比);以及(5)通过UNcle系统检测抗体的热稳定性(表示为解链温度(Tm)和聚集温度(Tagg))。

[0617] 在SEC-UPLC实验中,使用Agilent 1290色谱系统(与XBridge™蛋白质BEH SEC柱(200Å,Waters Corporation)连接)。用纯化水将抗体样品稀释至1mg/mL。使用以下参数:流动相:25mM磷酸盐缓冲液(PB)(pH6.8)+0.3M NaCl;流速:1.8mL/min;柱温:25℃;检测波长:280nm;进样量:10μL;样品盘温度:6℃;运行时间:7分钟。

[0618] 在HIC-HPLC实验中,使用Agilent 1260色谱系统(与ProPac™HIC-10柱(4.6×100mm,Thermo Scientific)连接),并使用流动相A将样品稀释至0.5mg/mL。使用以下参数:流动相A:0.9M硫酸铵,0.1M PB,10%乙腈pH6.5;流动相B:0.1M PB,10%乙腈pH6.5;流速:0.8mL/min;梯度:0分钟100%A、2分钟100%A、32分钟100%B、34分钟100%B、35分钟100%A和45分钟100%A;柱温:30℃;检测波长:280nm;进样量:10μg;样品盘温度:约6℃;运行时间:45分钟。

[0619] 在cIEF实验中,使用Maurice cIEF方法开发试剂盒(Protein Simple,货号:PS-MDK01-C)用于样品制备。具体地,将40μg蛋白质样品与试剂盒中的下列试剂混合:1μL Maurice cIEF pI标记物-4.05,1μL Maurice cIEF pI标记物-9.99,35μL 1%甲基纤维素溶液,2μLMaurice cIEF 500mM精氨酸,4μL两性电解质(Pharmalyte pH范围3-10)和水(加入以使终体积为100μL)。在Maurice分析仪(Protein Simple,Santa Clara,CA)上,使用Maurice cIEF盒(PS-MC02-C)产生成像毛细管等电聚焦光谱。将样品聚焦总共10分钟。安装在仪器上的分析软件用于分析280nm聚焦的蛋白质的吸光度。

[0620] 在热稳定性实验中,将60mg/mL的抗体溶液以1℃的增量从25℃加热至95℃,每次测量前平衡时间为1分钟。

[0621] 详细结果如下表所示。结果表明,4种抗体均具有良好的稳定性和理化性质。

[0622] 表19

[0623]

抗体	SEC 纯度 (%)	HIC (min)	PI	Tm			Tagg (℃)
				Tm1 (℃)	Tm2 (℃)	Tm3(℃)	
23B8	92.82	19.909	7.376	58.87	67.80	84.13	56.48
24A1	98.74	2.486	6.795	64.80	73.80	82.20	52.73
24C9	98.20	3.740	8.595	65.38	69.90	78.20	33.63
24G5	98.86	3.829	6.495	60.86	77.66	85.30	76.03

[0624] 实施例14.药代动力学(PK)分析

[0625] 改造人源化TFR1小鼠模型(hTFR1小鼠)以表达嵌合TFR1蛋白(SEQ ID NO:74),其中小鼠TFR1蛋白胞外区被相应的人TFR1胞外区替换。关于人源化TFR1小鼠模型的详细描述可见于PCT申请PCT/CN2022/105924,其全文通过引用方式并入本文。

[0626] 在hTFR1小鼠中测定抗-TFR1抗体的浓度。具体而言,将小鼠分成不同的组(每组8只小鼠),并通过静脉内(i.v.)注射给予约等摩尔剂量的JR141-N(G2)、23B8-N(G3)、24A1-N(G4)、24G5-N(G5)或24C9-N(G6)。对照组(G1)小鼠给予人IgG1(hIgG1)。详细给药方案见下表。

[0627] 表20

[0628]

组别	小鼠数量	抗体	剂量	给药方式	频率
G1	8	hIgG1	18.4 mg/kg	i.v.	单次量
G2	8	JR141-N	18.4 mg/kg	i.v.	单次量
G3	8	23B8-N	10.0 mg/kg	i.v.	单次量
G4	8	24A1-N	10.0 mg/kg	i.v.	单次量
G5	8	24G5-N	10.0 mg/kg	i.v.	单次量
G6	8	24C9-N	10.0 mg/kg	i.v.	单次量

[0629] 在给药后0.5、6、24和72小时收集血样和脑样本。每个时间点取样2只小鼠,在眼眶后采血后将小鼠麻醉。为了避免脑内残留血液的干扰,在室温下用生理盐水灌注小鼠10分钟。具体而言,通过从左心室到右心室的体循环灌注盐水。切除大脑样本,并通过矢状面将其分为两个半脑。对左半脑进行注射抗体的定量,而右半脑用福尔马林固定并用石蜡包埋以进行连续切片。将脑样品切成小块并用含有1×混合蛋白酶抑制剂的DPBS(Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水)匀浆。将脑匀浆等分以提取蛋白质,然后通过电化学发光进行抗体定量。对于剩余的匀浆,通过使用15%葡聚糖在5400g下梯度密度离心15分钟来去除毛细管。离心后,将离心管顶部的部分保存为薄壁组织,并进行蛋白质提取和抗体定量。图40A-40D显示了总脑蛋白中的抗体浓度(图40A),脑总蛋白中的抗体浓度与血清抗体浓度的比率(图40B)、脑实质中的抗体浓度(图40C)、以及各时间点脑实质中的抗体浓度与血清中的抗体浓度的比率(图40D)。这些结果表明,24G5-N(G5组)无论在脑实质中还是在全脑中都是最丰富的。

[0630] 在类似的实验中,将hTFR1小鼠分为5组(每组3只小鼠),并通过静脉注射给予18.4mg/kg JR141-N(G2)、10mg/kg 23B8-N(G3)、10mg/kg 24A1-N(G4)或10mg/kg24G5-N(G5)(共1次给药)。对照组(G1)小鼠给予hIgG1(G1)。给药后24小时,收集脑样品以测定抗TFR1抗体的浓度。图41A-41B分别显示了脑实质和脑总蛋白中的抗体浓度检测结果。所有测

试的抗体在脑中的浓度均高于hIgG1(G1),表明与阳性对照JR141-N(G2)相比,23B8-N(G3)和24G5-N(G5)能更好地穿过血脑屏障进入脑实质。。

[0631] 在另一个类似的实验中,将hTFR1小鼠分为7组(每组6只小鼠),并通过静脉(i.v.)注射给予JR141-N(G2-G4)或24G5-N(G5-G7))。对照组(G1)小鼠给予hIgG1。详细给药方案见下表。

[0632] 表21

[0633]

组别	小鼠数量	抗体	剂量(mg/kg)	给药方式	频率
G1	6	hIgG1	5.52mg/kg	i.v.	单次量
G2	6	JR141-N	1.84mg/kg	i.v.	单次量
G3	6	JR141-N	5.52mg/kg	i.v.	单次量
G4	6	JR141-N	18.4mg/kg	i.v.	单次量
G5	6	24G5-N	1mg/kg	i.v.	单次量
G6	6	24G5-N	3mg/kg	i.v.	单次量
G7	6	24G5-N	10mg/kg	i.v.	单次量

[0634] 给药后6小时和24小时,使用上述方法收集血液和脑样品。每个时间点取样3只小鼠。组织的处理和抗体的定量也如上所述进行。脑实质中的人源化抗TFR1抗体浓度的测定结果如图42所示。结果显示,在各剂量条件下,24G5-N在脑实质中积累的抗体浓度均显著高于hIgG1。此外,JR141-N和24G5-N在脑实质中的浓度均表现出剂量依赖性趋势。

[0635] 为了检测人源化抗TFR1抗体24G5-N在小鼠脑中的分布,通过在上述实验中使用的小鼠的右半脑切片上分别染色hIgG、hTFR1和mCD31来进行免疫荧光测定。结果显示,mCD31在微血管中标记良好。在微血管上也检测到hTFR1,其与mCD31共定位。此外,在脑实质中的一些神经元上也检测到hTFR1的表达。特别是,抗TFR1抗体24G5-N通过与Dylight®488偶联的第二抗IgG抗体染色。与hTFR1类似,24G5-N在微血管和实质中检测到,其信号与hTFR1信号重叠。因此,对于24G5-N在全脑或脑实质中的定量,或者24G5-N在脑实质中的免疫荧光的视觉证据,结果表明人源化抗TFR1抗体24G5-N可以有效地穿过血脑屏障(BBB)。

[0636] 实施例15阻断试验

[0637] 用生物层干涉技术(BLI),使用ForteBio Octet®系统,在30℃下检测抗TFR1抗体23B8、24A1、24C9和24G5对TFR1与TF(转铁蛋白)结合的阻断作用。具体而言,将从HBS-EP+缓冲液(10×)稀释的1×HBS-EP+缓冲液(10mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表面活性剂P20,pH 7.4)用作整个实验的运行缓冲液。约10μg/mL的抗体被AHC(抗人IgG FC捕获)捕获200秒,800nM的hTFR1-His(ACROBiosystems公司,货号:CD1-H5243)和HTF-His(人转铁蛋白,Kactus Biosystems,货号:TFN-HM101)注射以结合配体。每种抗体的结合时间为300秒。使用Data Analysis HT 12.0获得每种抗体的结合值。结果表明,这4种抗体均不能阻断TFR1与TF的结合。因此,这种非封闭抗体不太可能干扰正常细胞中的TFR1-TF相互作用。

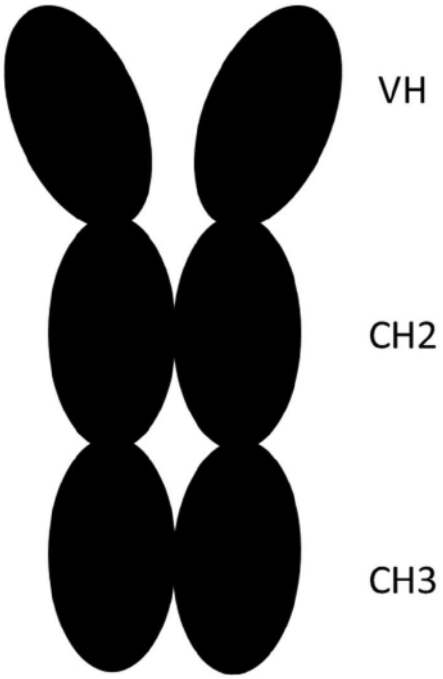


图1

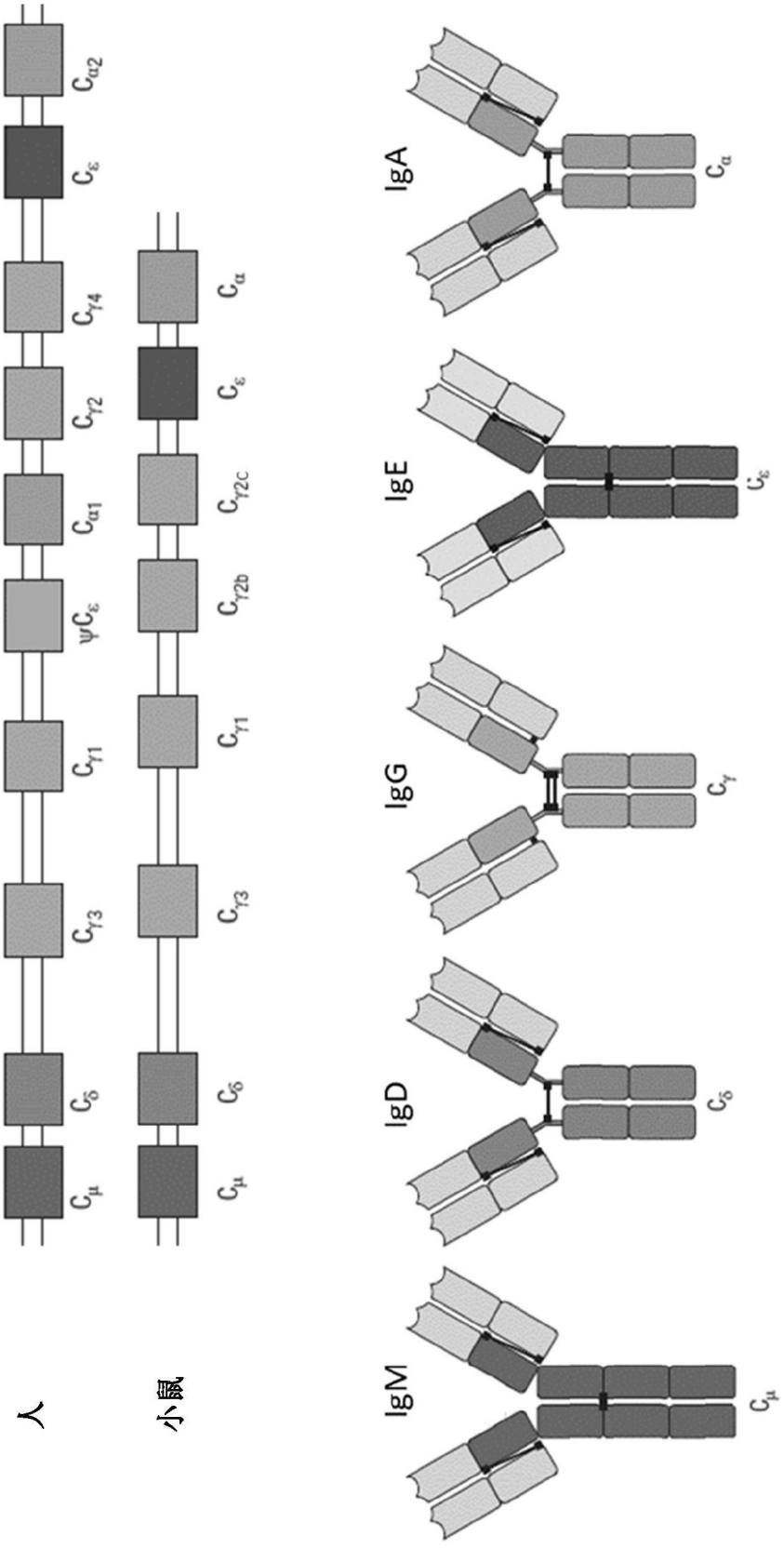


图2

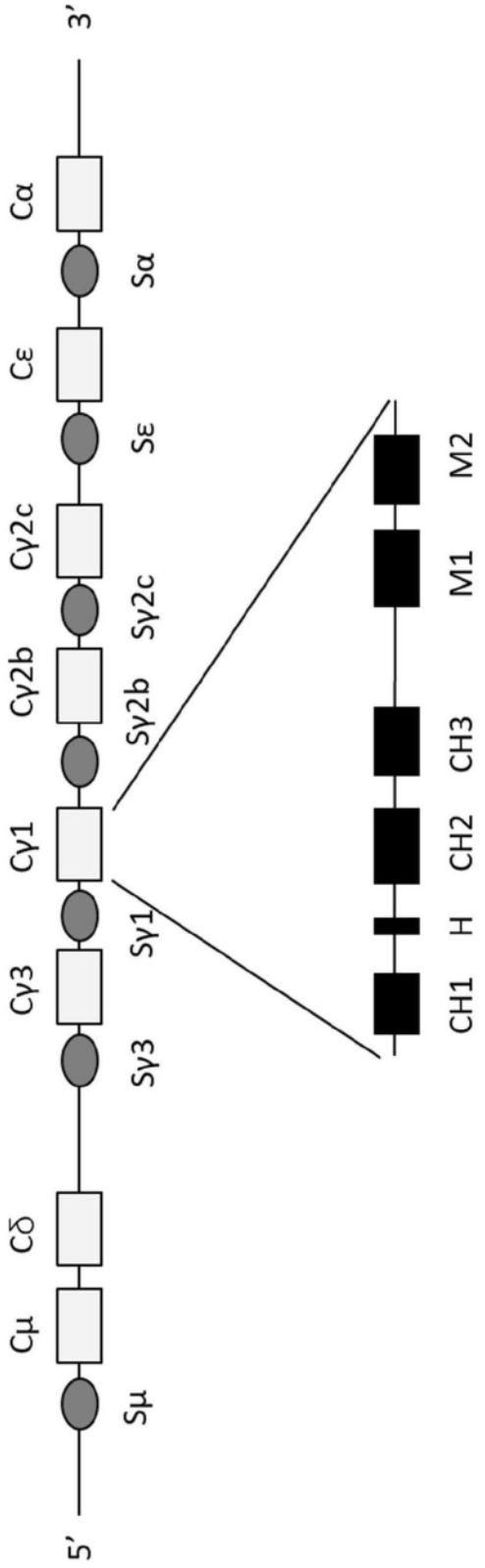

3'
Cα
Sα
Cε
Sε
Cγ2c
Sγ2c
Cγ2b
Sγ2b
Cγ1
Sγ1
Cγ3
Sγ3
Cδ
Cμ
Sμ
5'
M2
M1
CH3
CH2
H
CH1

图3

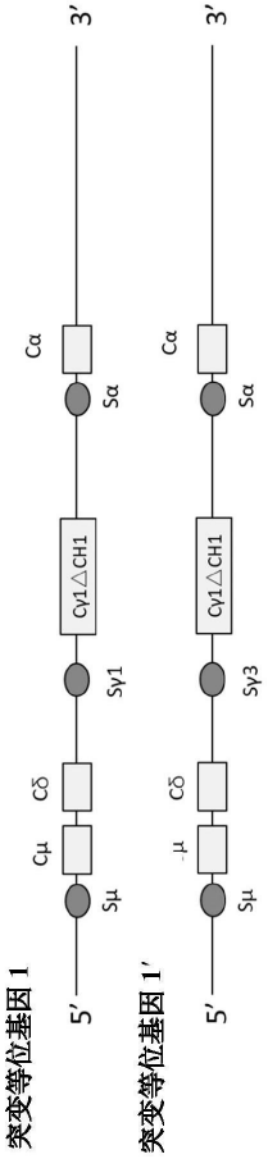

突变等位基因 1
5′
Sμ
Cμ
Cδ
Sγ1
Cγ1△CH1
Sα
Cα
3′
突变等位基因 1′
5′
Sμ
μ
Cδ
Sγ3
Cγ1△CH1
Sα
Cα
3′

图4A

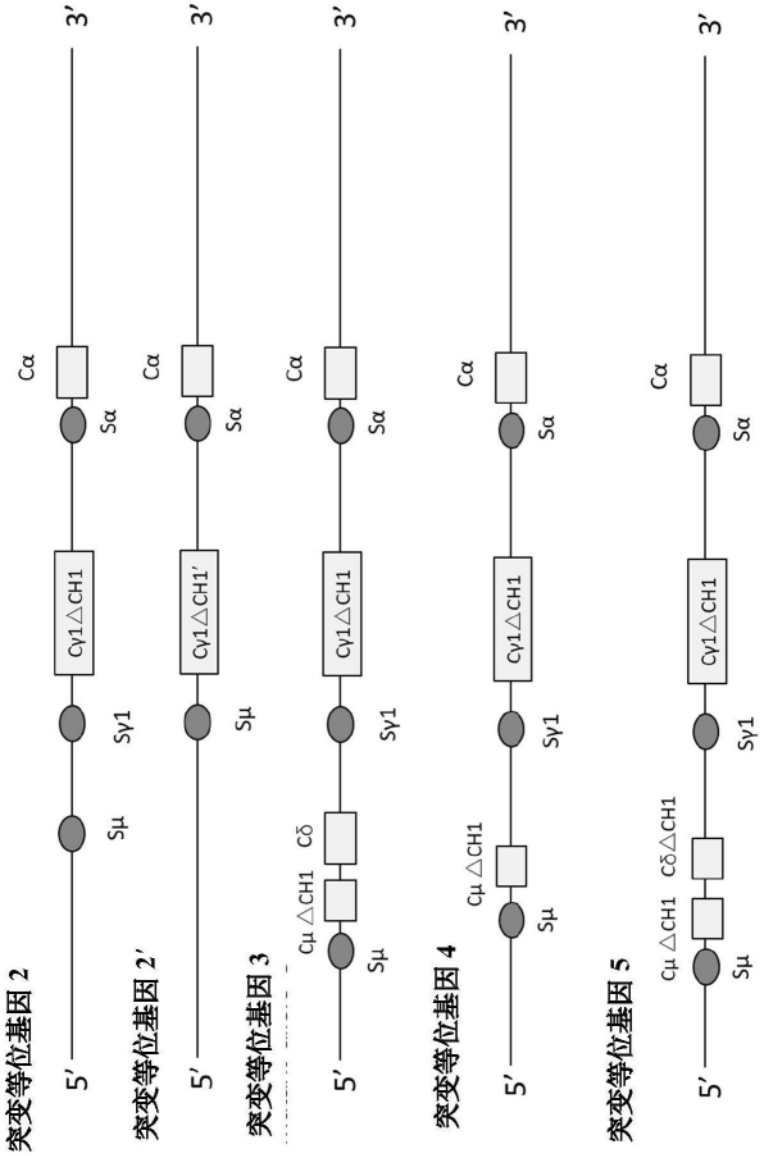

突变等位基因 2
突变等位基因 2′
突变等位基因 3
突变等位基因 4
突变等位基因 5
5′
3′
Cα
Sα
Cγ1△CH1
Cγ1△CH1′
Sγ1
Sμ
Cμ △CH1
Cδ
Cδ△CH1

图4B

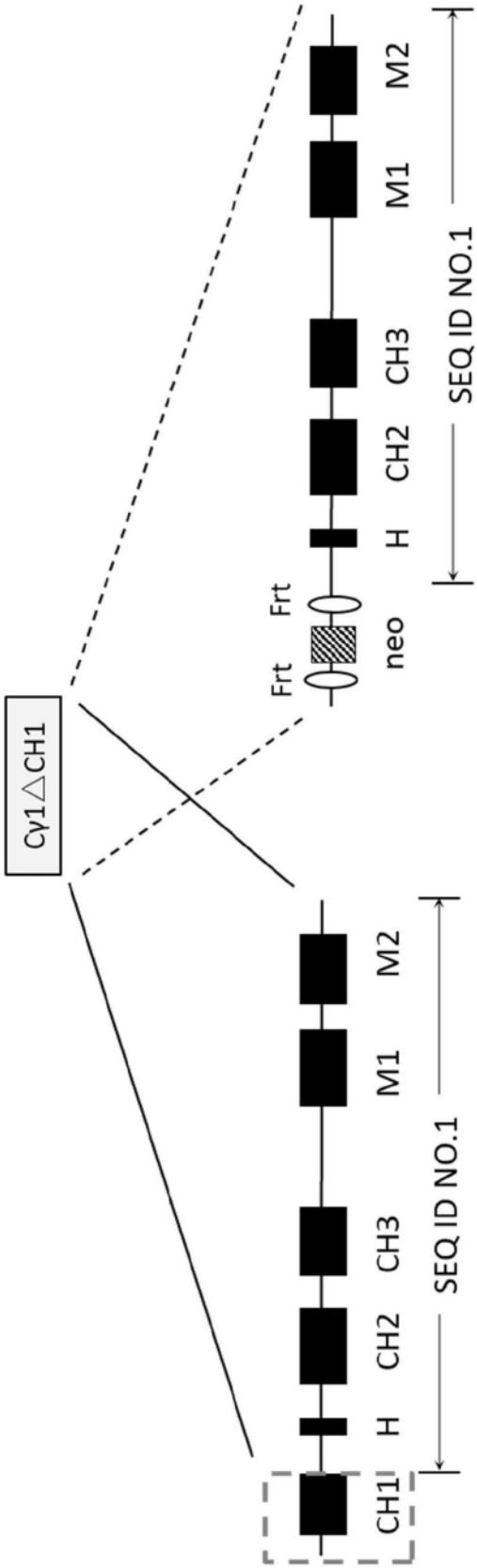

Cγ1△CH1
Frt
Frt
neo
H
CH2
CH3
M1
M2
SEQ ID NO.1
CH1
H
CH2
CH3
M1
M2
SEQ ID NO.1

图5

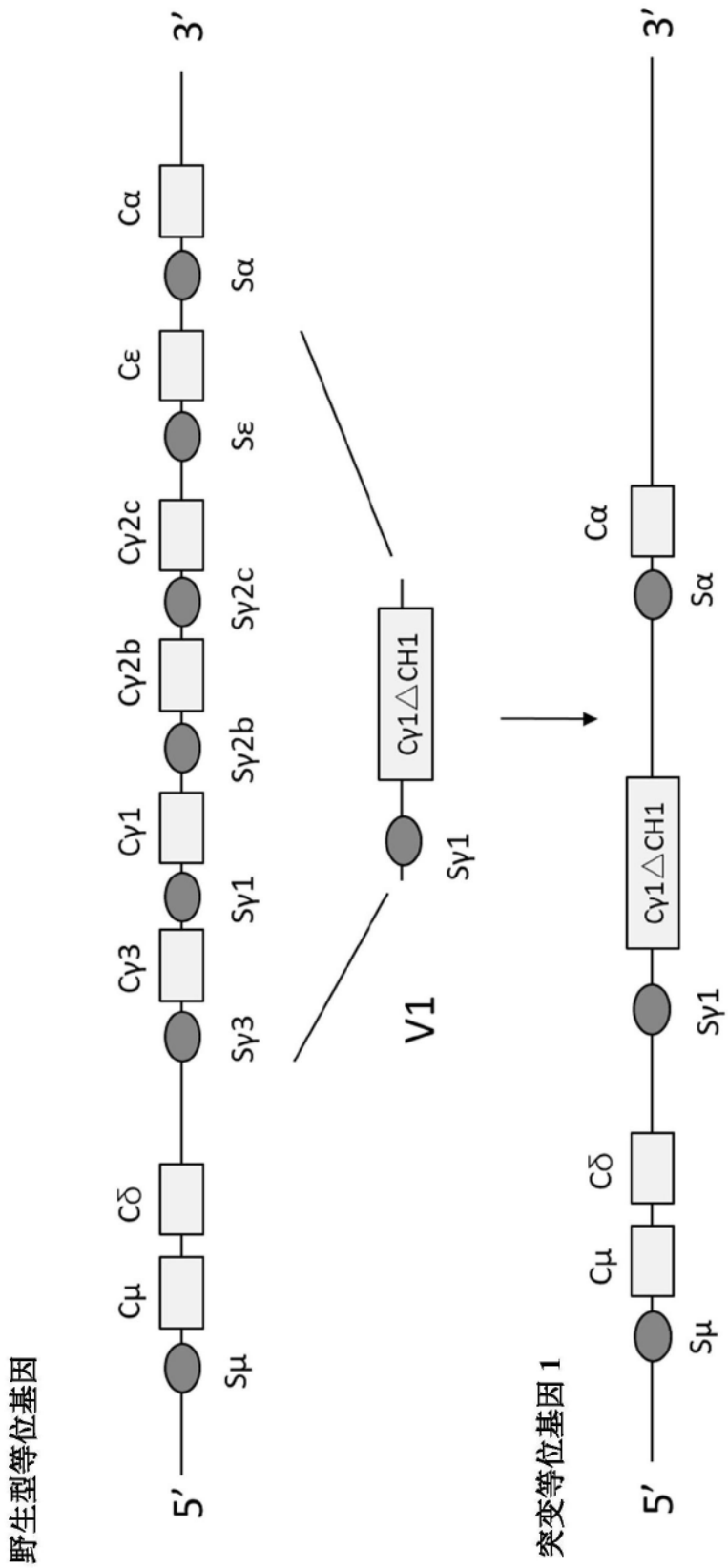

野生型等位基因
5′
3′
Cμ
Cδ
Cγ3
Cγ1
Cγ2b
Cγ2c
Cε
Cα
Sμ
Sγ3
Sγ1
Sγ2b
Sγ2c
Sε
Sα
V1
Cγ1△CH1
Sγ1
突变等位基因 1
5′
3′
Cμ
Cδ
Cγ1△CH1
Sγ1
Sμ
Cα
Sα

图6

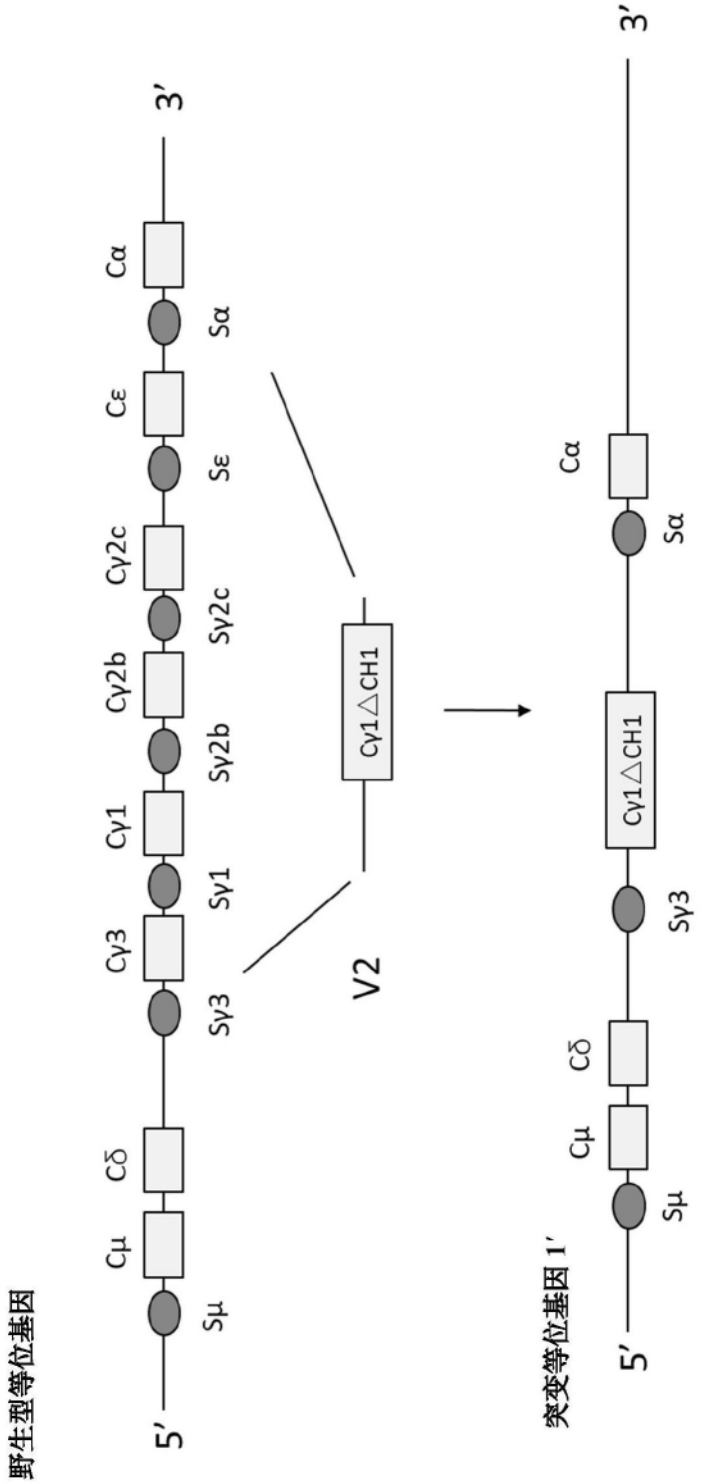

野生型等位基因
5′
Sμ
Cμ
Cδ
Sγ3
Cγ3
Sγ1
Cγ1
Sγ2b
Cγ2b
Sγ2c
Cγ2c
Sε
Cε
Sα
Cα
3′
V2
Cγ1△CH1
突变等位基因 1′
5′
Sμ
Cμ
Cδ
Sγ3
Cγ1△CH1
Sα
Cα
3′

图7

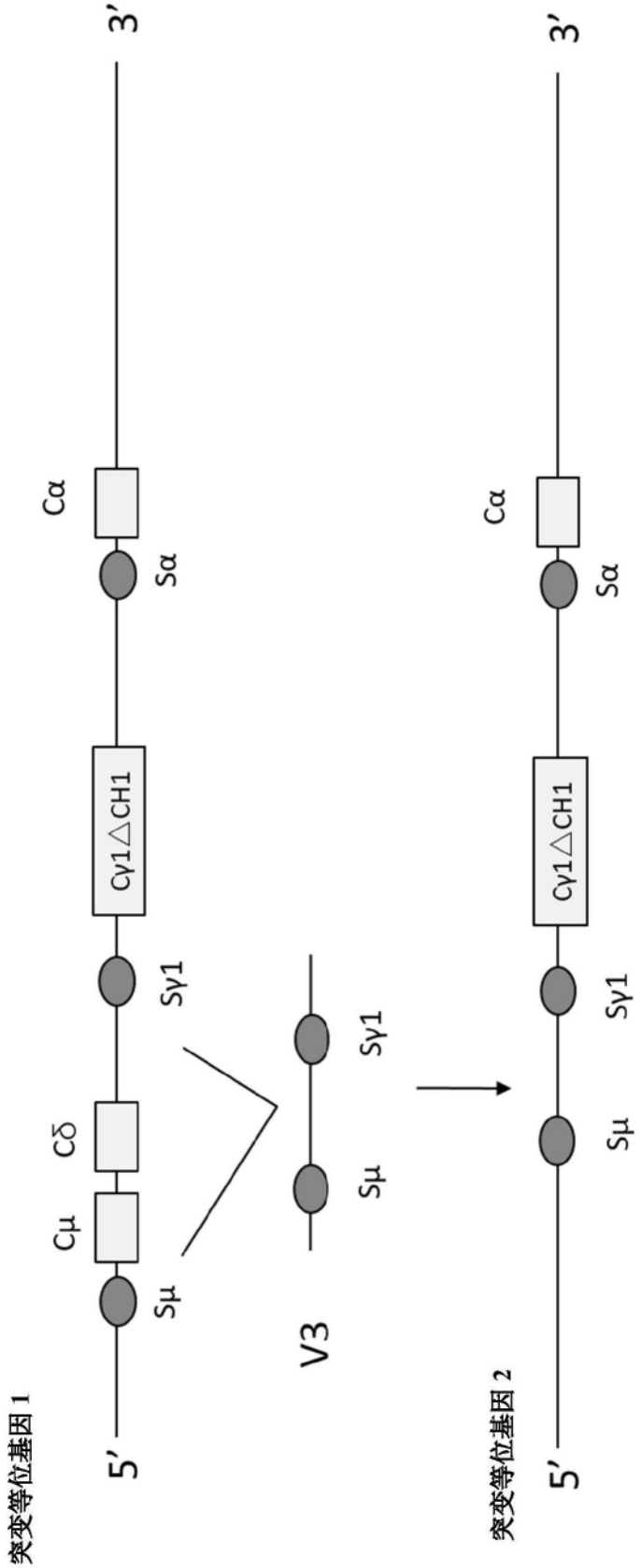

突变等位基因 1
5′
3′
Cμ
Cδ
Cγ1△CH1
Cα
Sμ
Sγ1
Sα
V3
突变等位基因 2
5′
3′
Sμ
Sγ1
Cγ1△CH1
Cα
Sα

图8

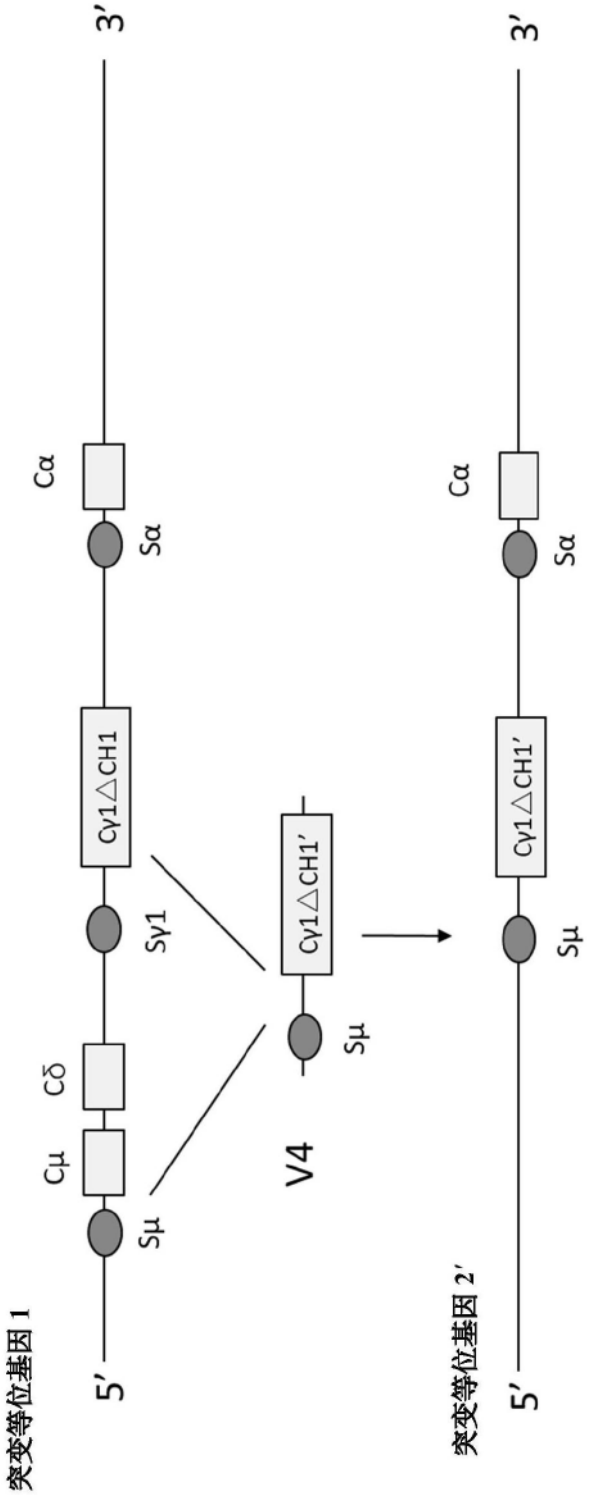

3′
Cα
Sα
Cγ1△CH1
Sγ1
Cδ
Cμ
Sμ
5′
突变等位基因 1
Cγ1△CH1′
Sμ
V4
3′
Cα
Sα
Cγ1△CH1′
Sμ
5′
突变等位基因 2′

图9

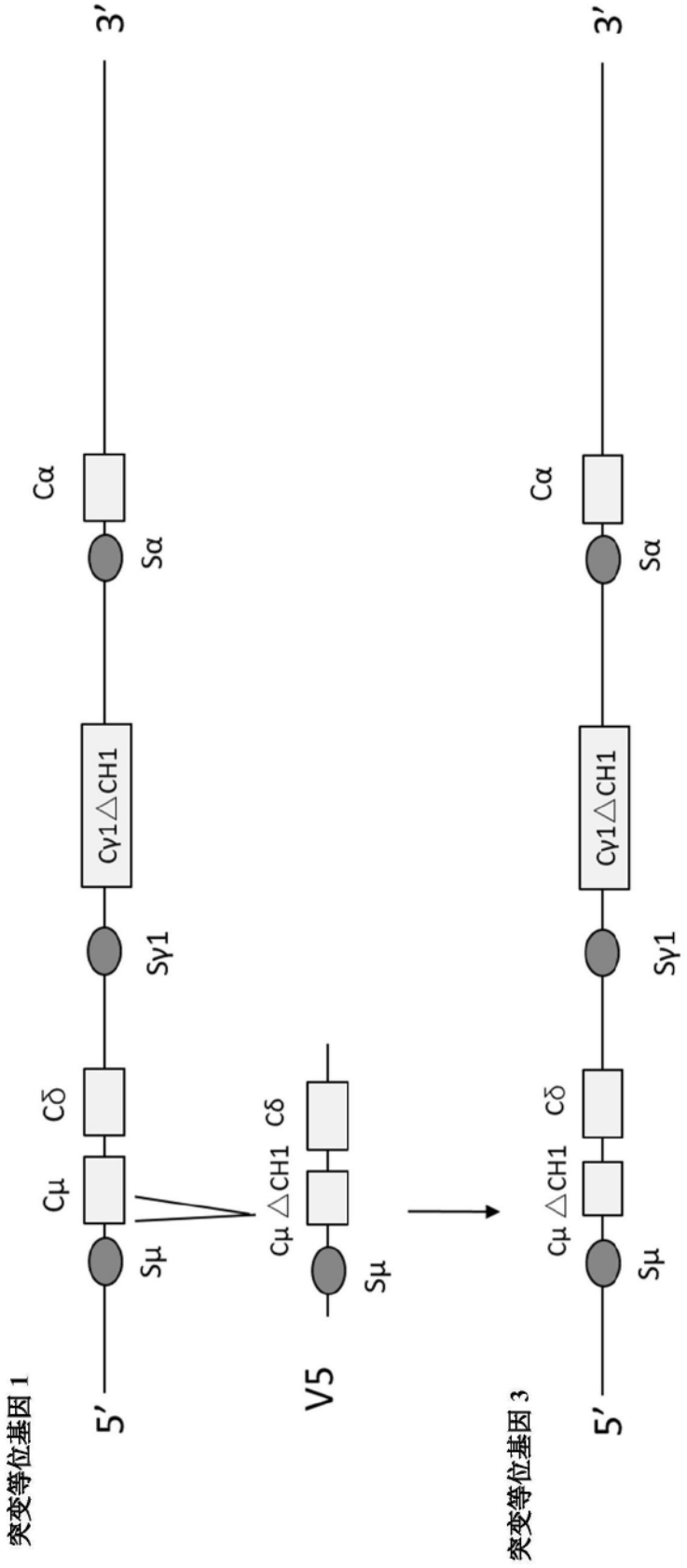

3′
Cα
Sα
Cγ1△CH1
Sγ1
Cδ
Cμ
Sμ
5′
突变等位基因 1
Cμ △CH1
Cδ
Sμ
V5
3′
Cα
Sα
Cγ1△CH1
Sγ1
Cδ
Cμ △CH1
Sμ
5′
突变等位基因 3

图10

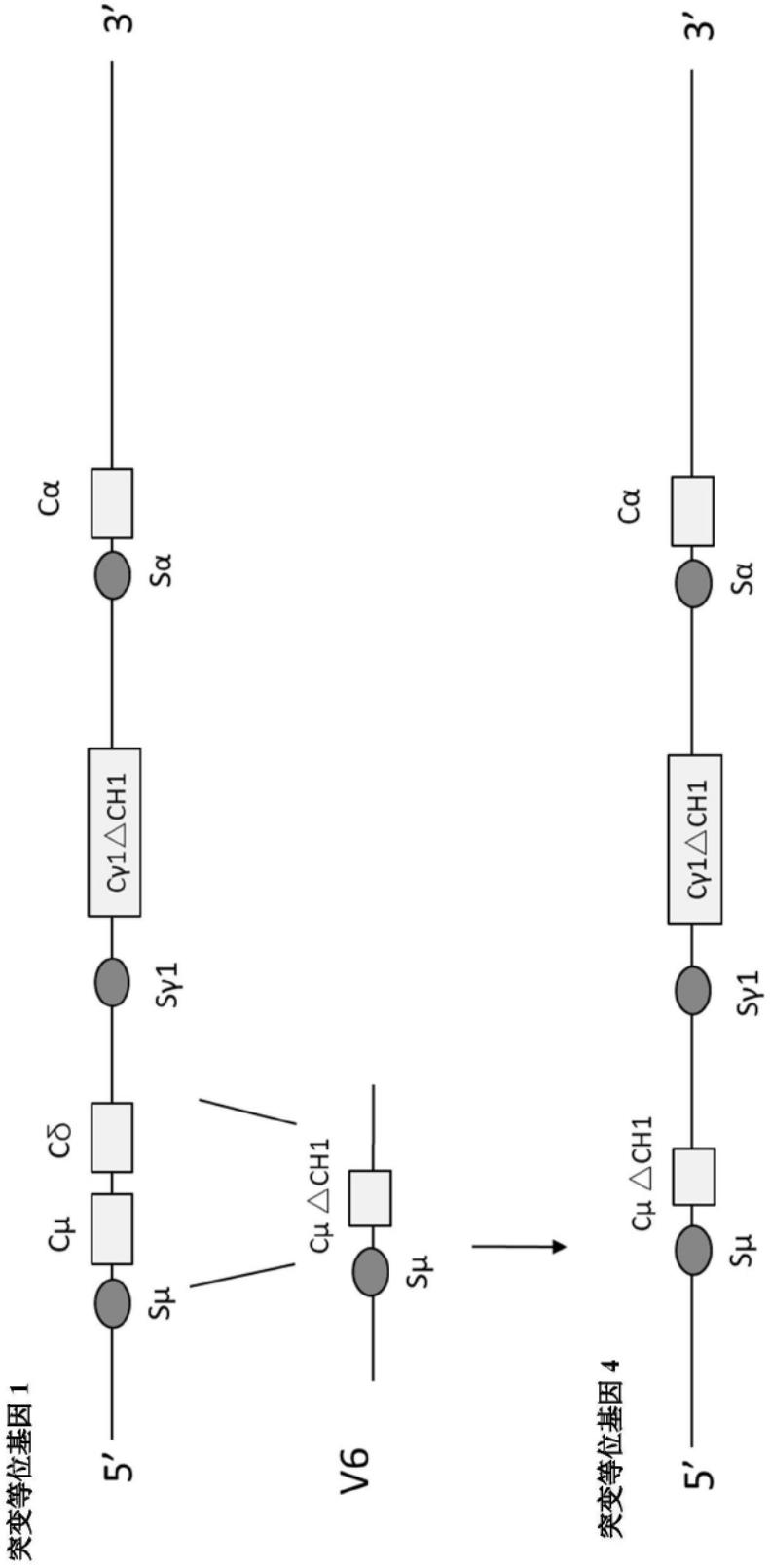

突变等位基因 1
5′
3′
Sμ
Cμ
Cδ
Sγ1
Cγ1△CH1
Sα
Cα
V6
Sμ
Cμ △CH1
突变等位基因 4
5′
3′
Sμ
Cμ △CH1
Sγ1
Cγ1△CH1
Sα
Cα

图11

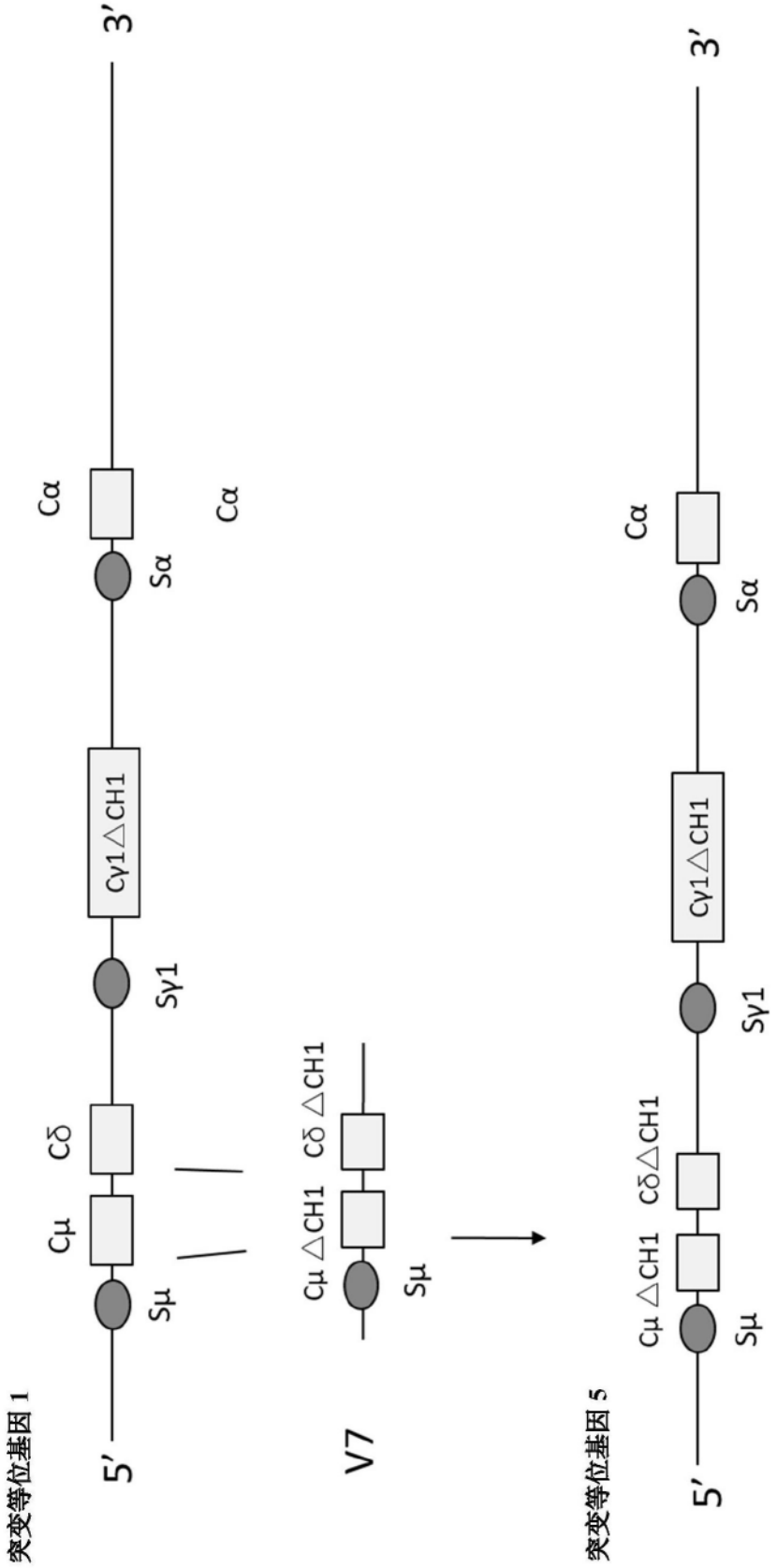


图12

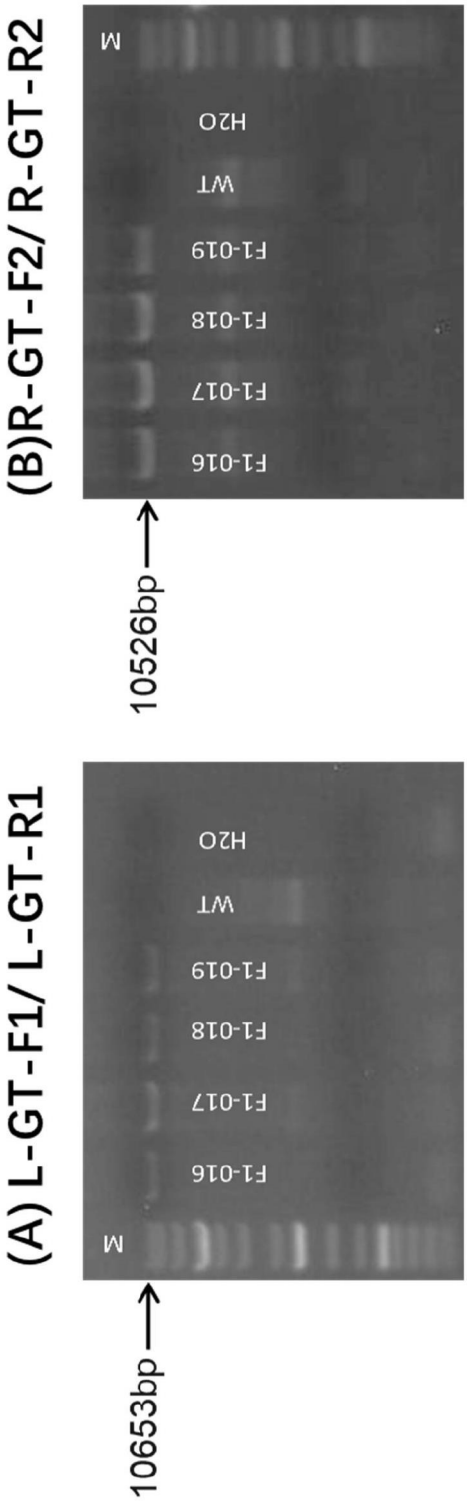

(B)R-GT-F2/ R-GT-R2
M
H2O
WT
F1-019
F1-018
F1-017
F1-016
10526bp
(A) L-GT-F1/ L-GT-R1
H2O
WT
F1-019
F1-018
F1-017
F1-016
M
10653bp

图13A-13B

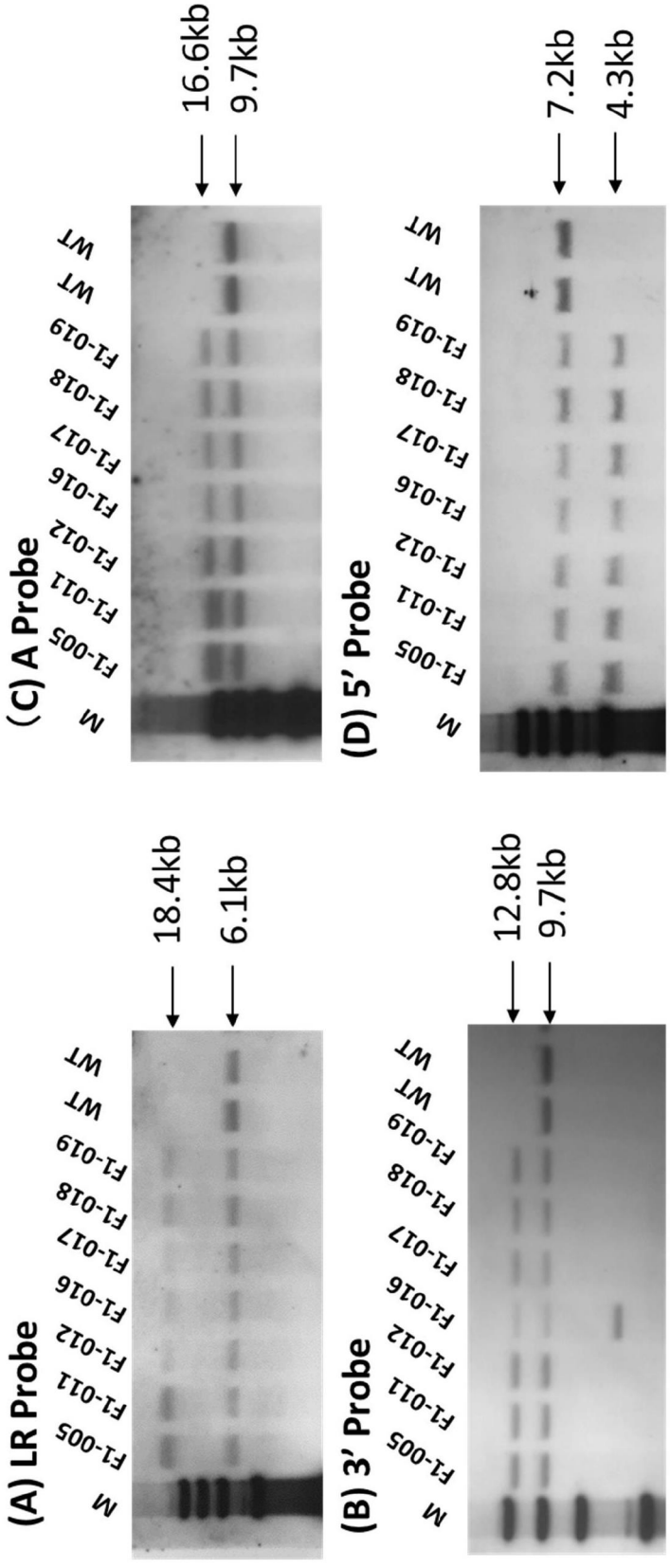

16.6kb
9.7kb
(C) A Probe
WT
WT
F1-019
F1-018
F1-017
F1-016
F1-012
F1-011
F1-005
M
7.2kb
4.3kb
(D) 5' Probe
18.4kb
6.1kb
(A) LR Probe
12.8kb
9.7kb
(B) 3' Probe

图14A-14D

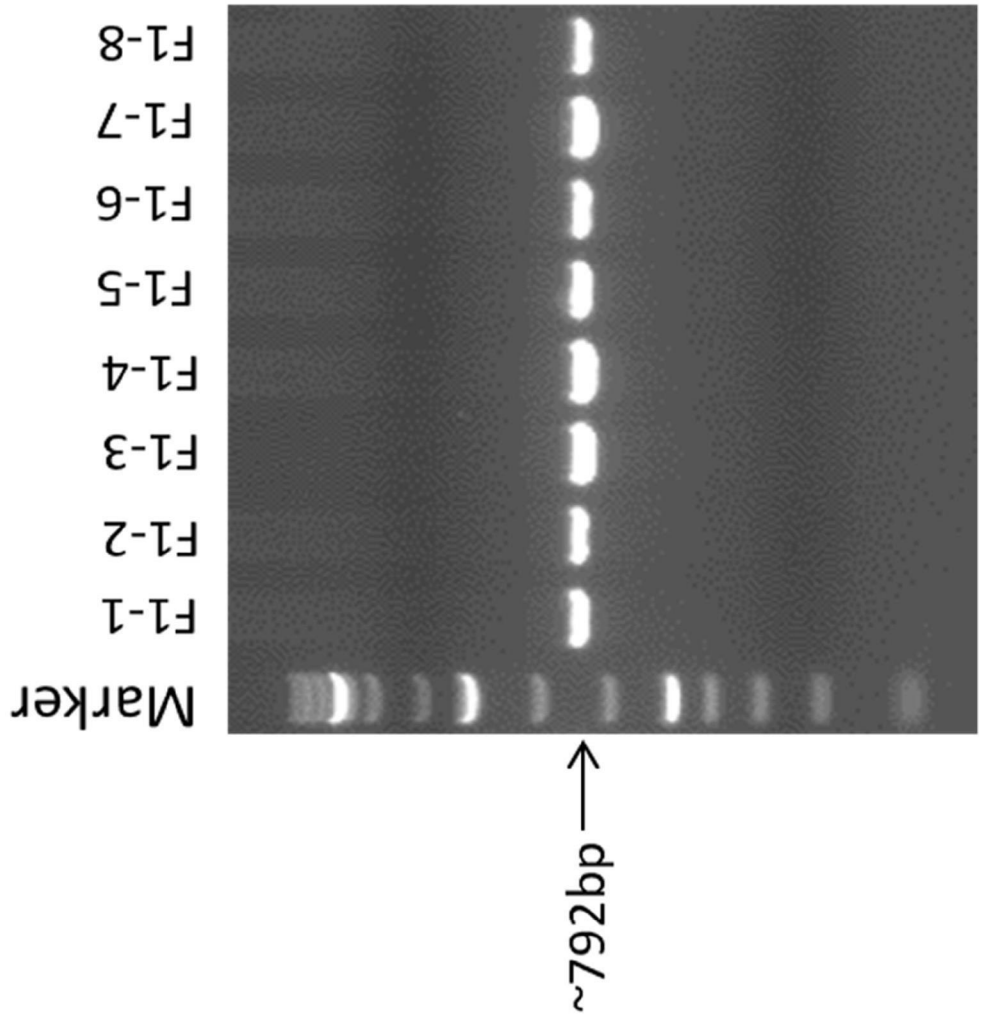


图15

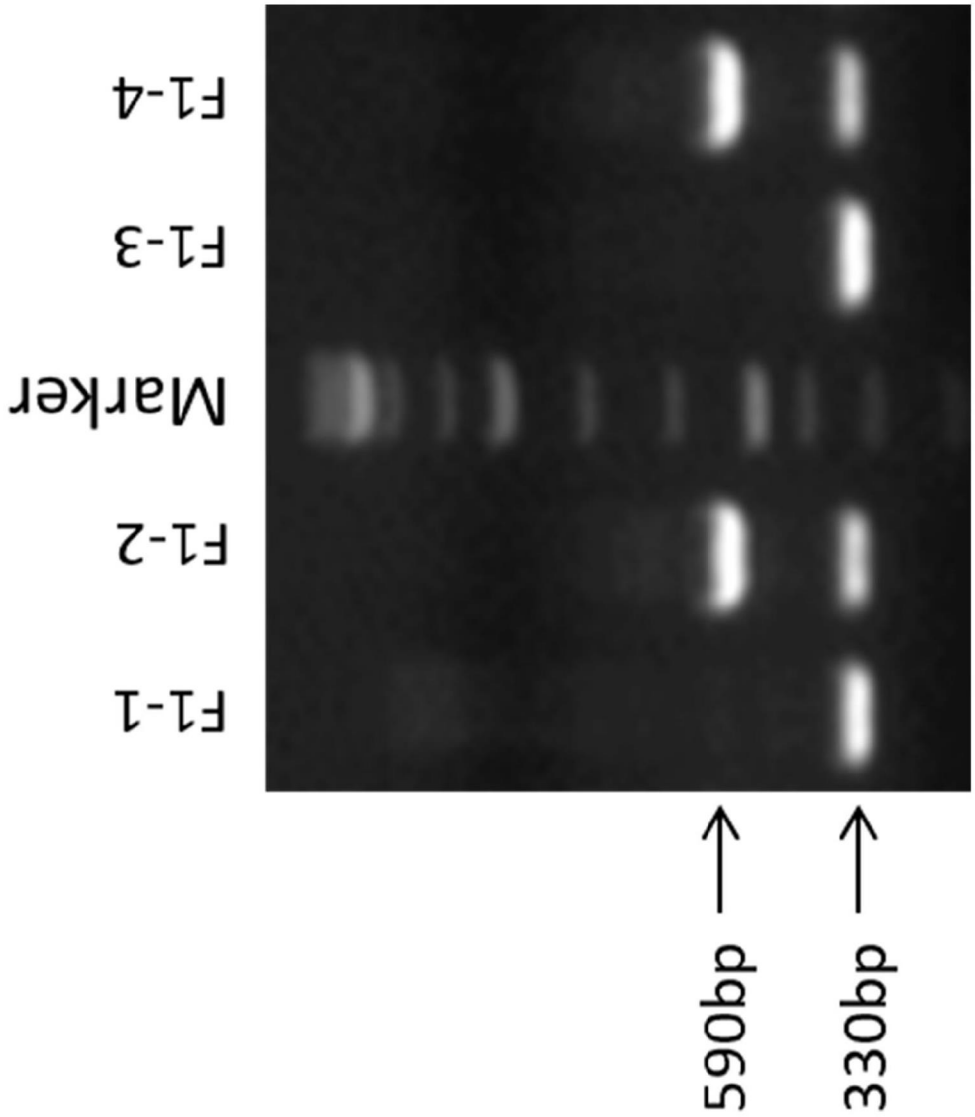


图16

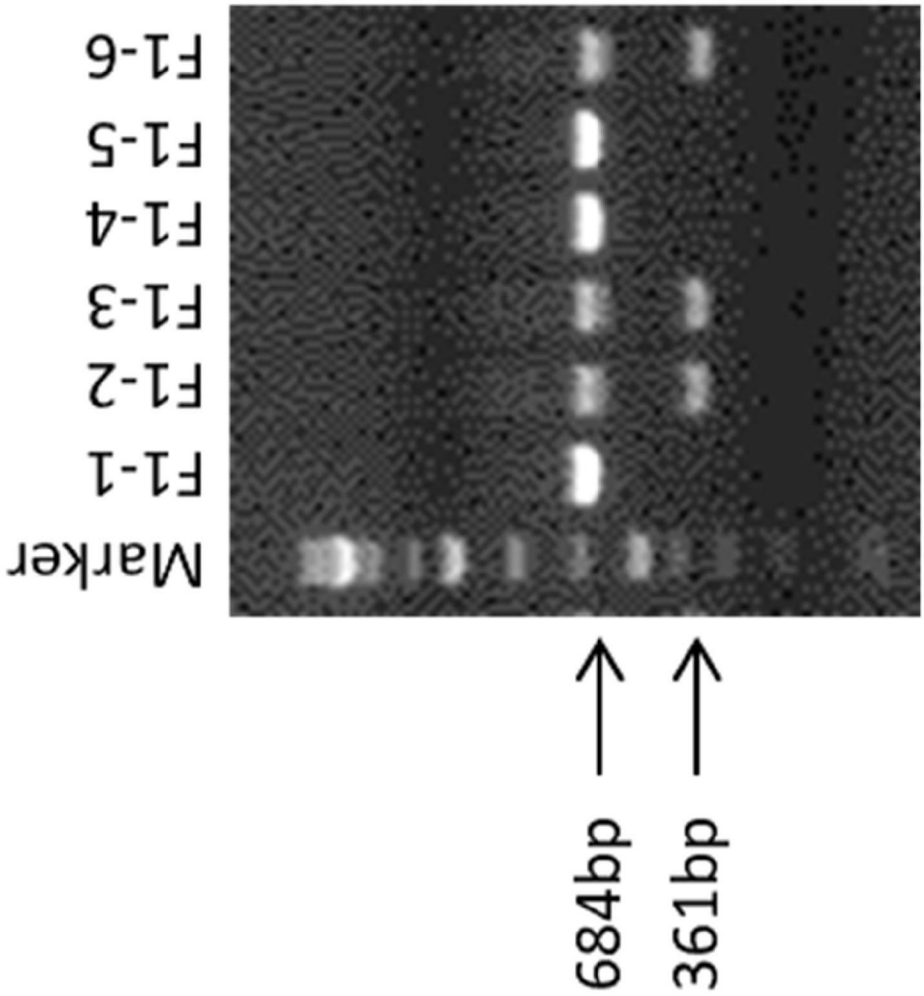


图17

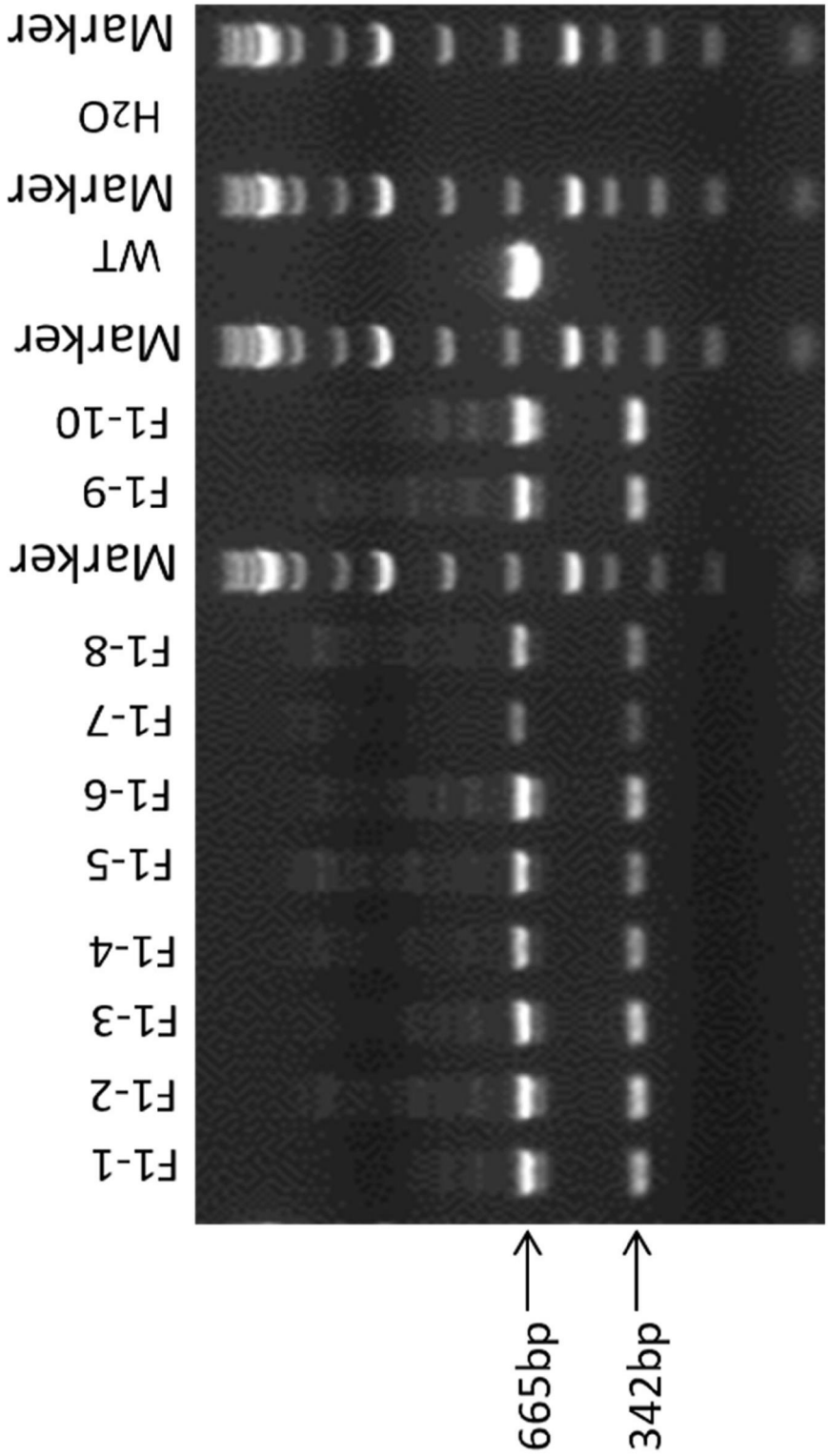

Marker
H2O
Marker
WT
Marker
F1-10
F1-9
Marker
F1-8
F1-7
F1-6
F1-5
F1-4
F1-3
F1-2
F1-1
665bp
342bp

图18A

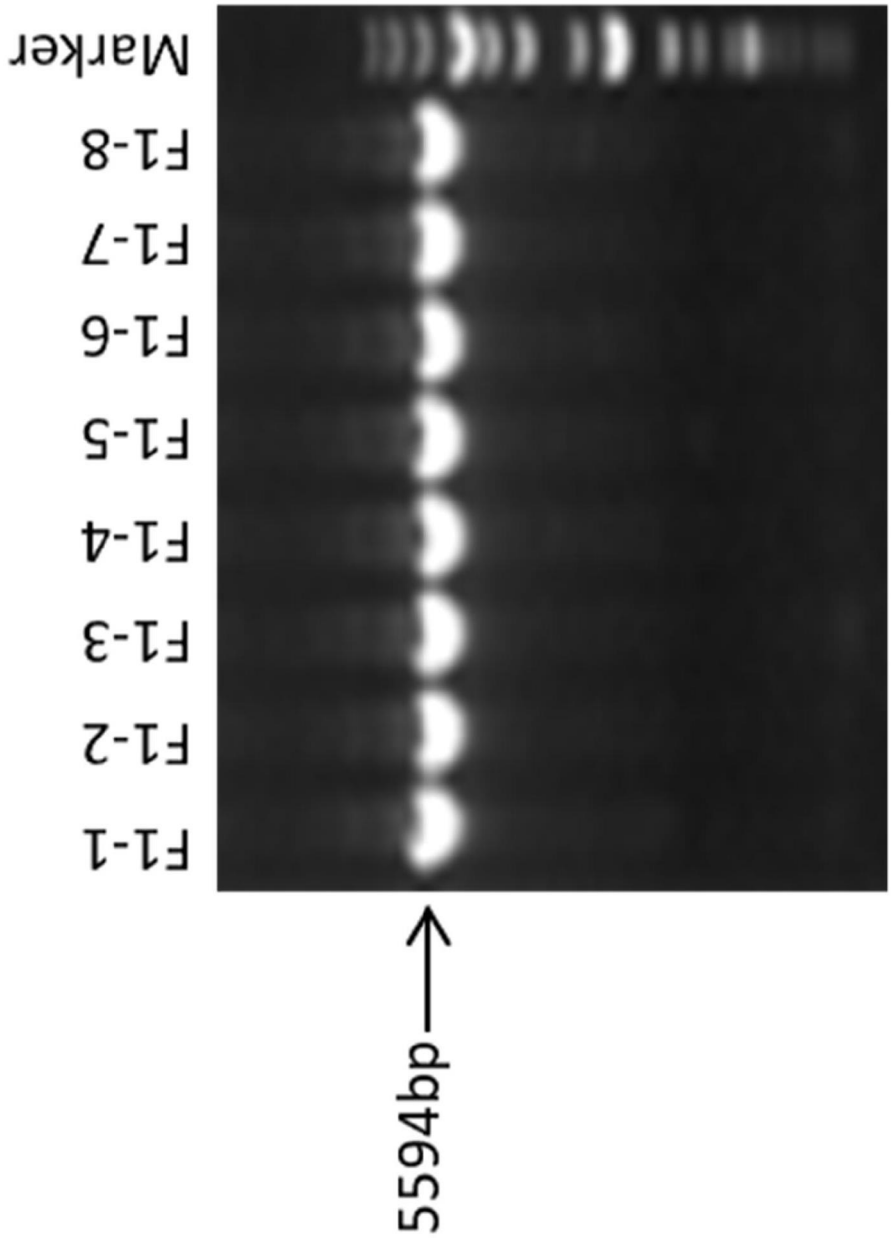


图18B

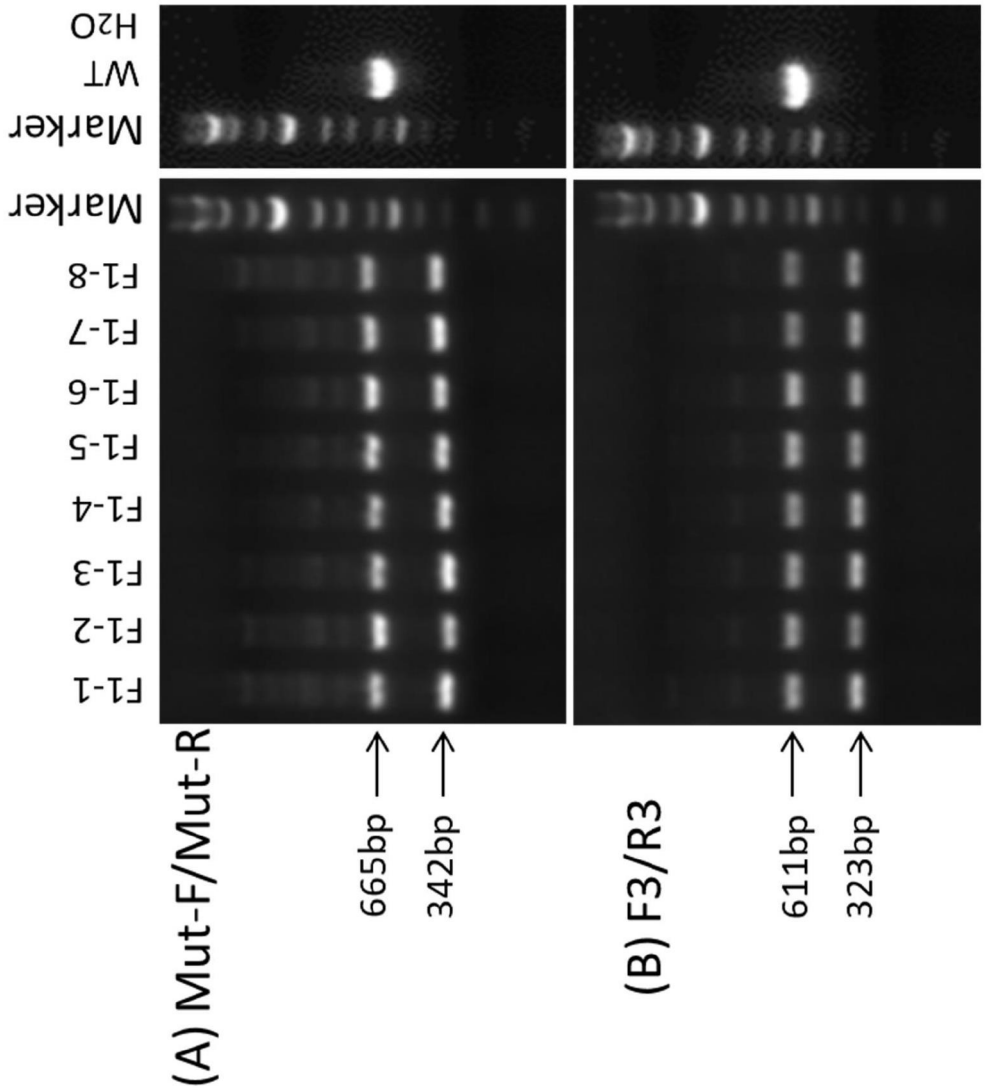

H2O
WT
Marker
Marker
F1-8
F1-7
F1-6
F1-5
F1-4
F1-3
F1-2
F1-1
(A) Mut-F/Mut-R
665bp
342bp
(B) F3/R3
611bp
323bp

图19A-19B

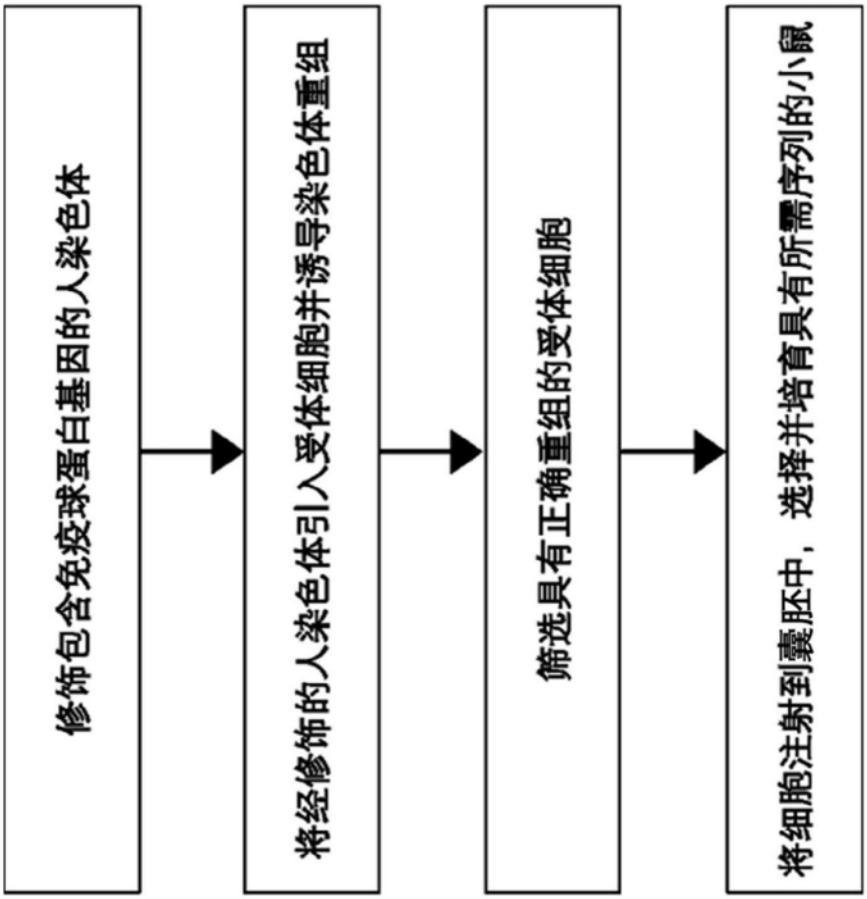

修饰包含免疫球蛋白基因的人染色体
将经修饰的人染色体引入受体细胞并诱导染色体重组
筛选具有正确重组的受体细胞
将细胞注射到囊胚中，选择并培育具有所需序列的小鼠

图20

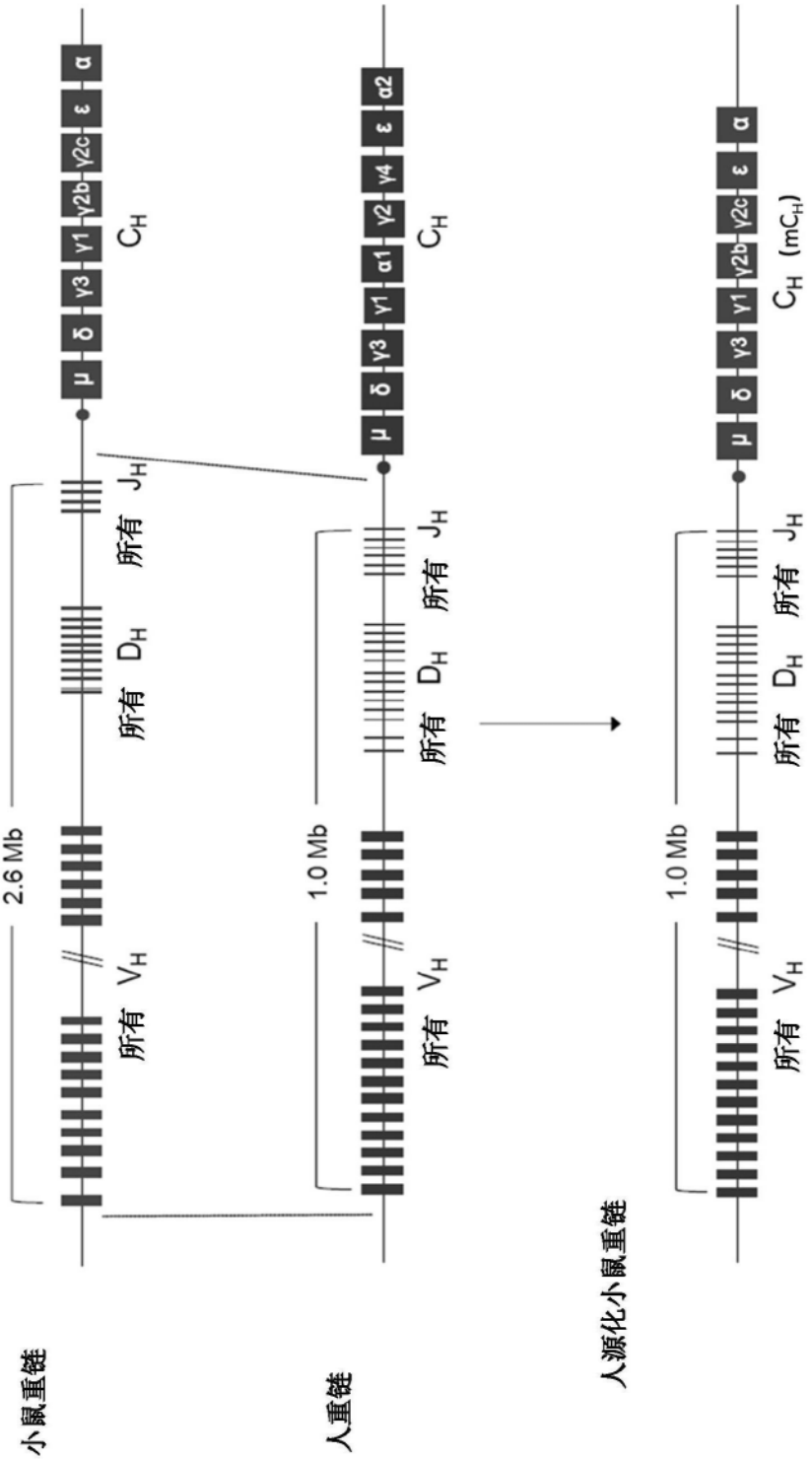

小鼠重链
人重链
人源化小鼠重链
2.6 Mb
1.0 Mb
1.0 Mb
所有 V_H
所有 D_H
所有 J_H
C_H
C_H (mC_H)
μ
δ
γ3
γ1
γ2b
γ2c
ε
α
α1
γ2
γ4
α2

图21

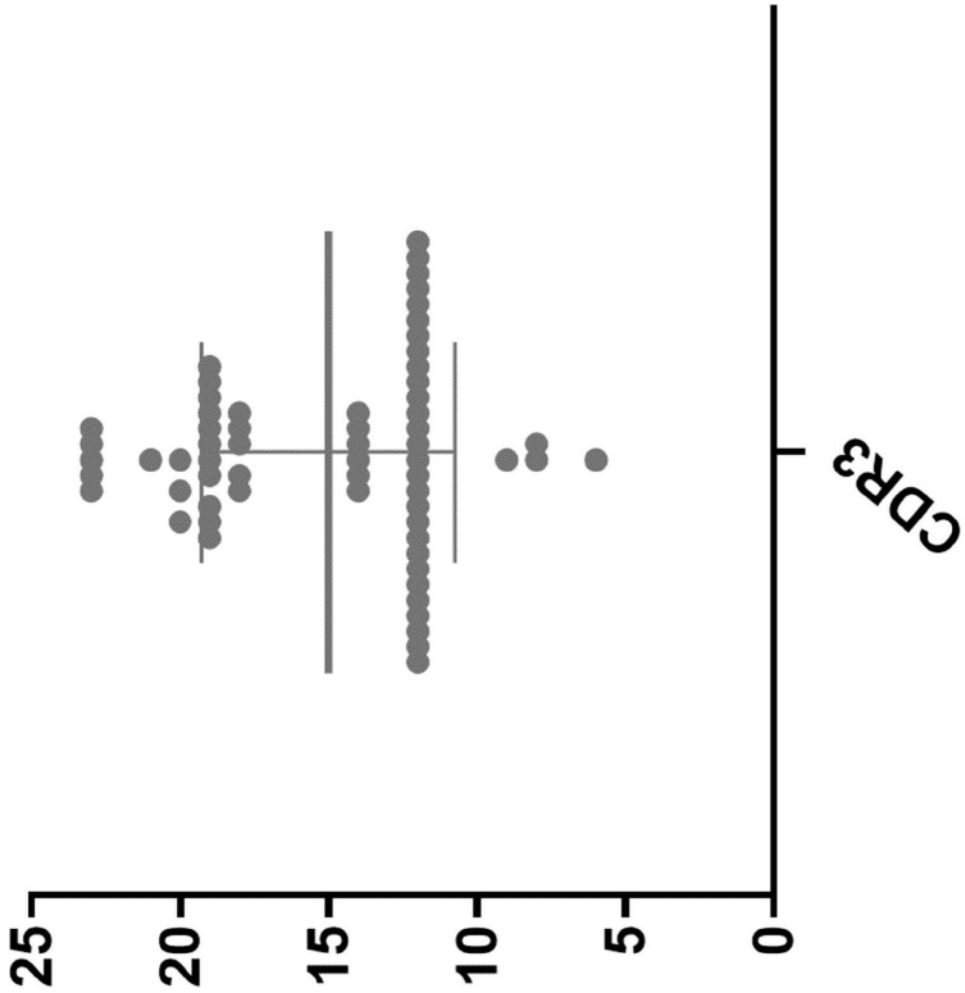


图22

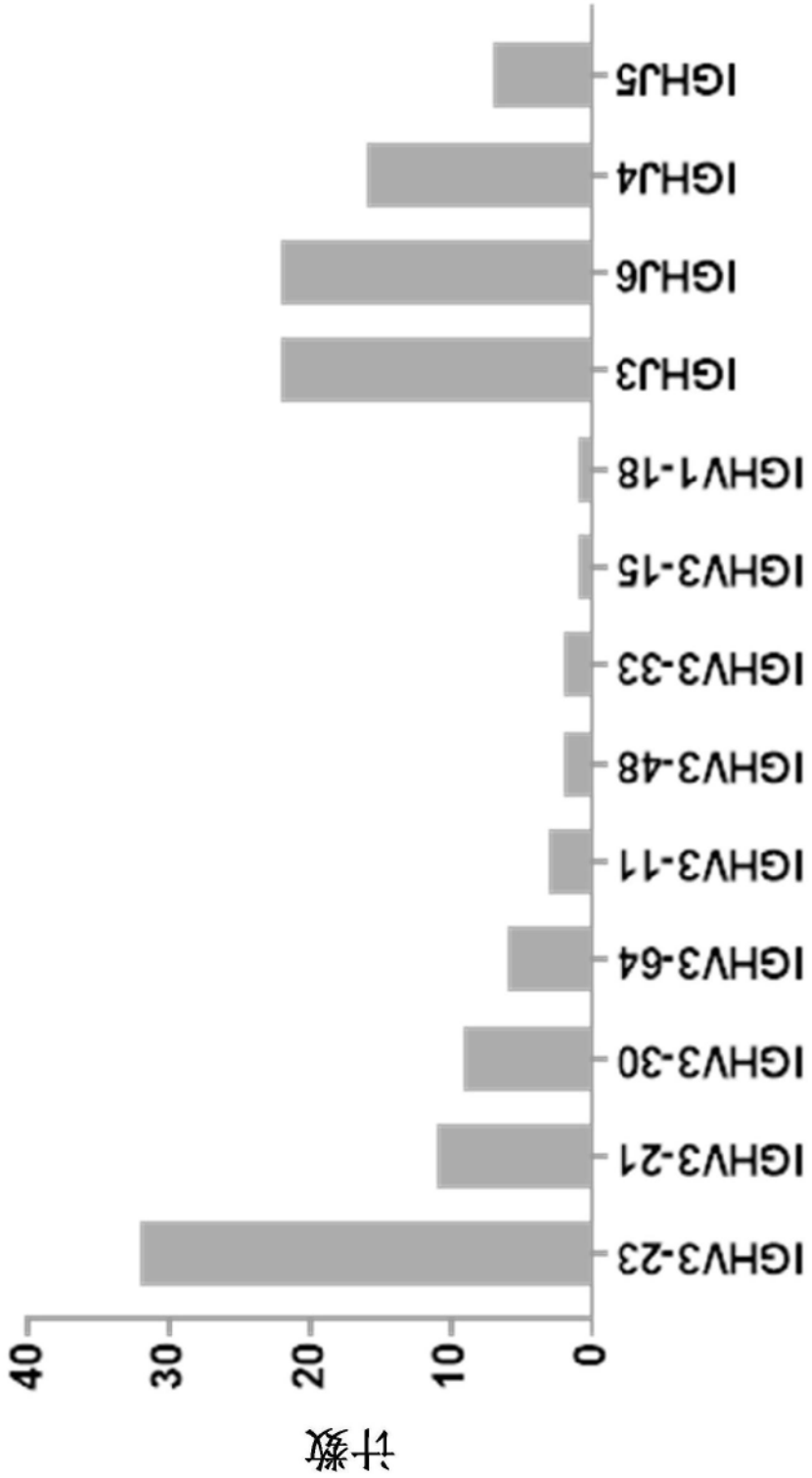

IGHV3-23
IGHV3-21
IGHV3-30
IGHV3-64
IGHV3-11
IGHV3-48
IGHV3-33
IGHV3-15
IGHV1-18
IGHJ3
IGHJ6
IGHJ4
IGHJ5
0
10
20
30
40
计数

图23

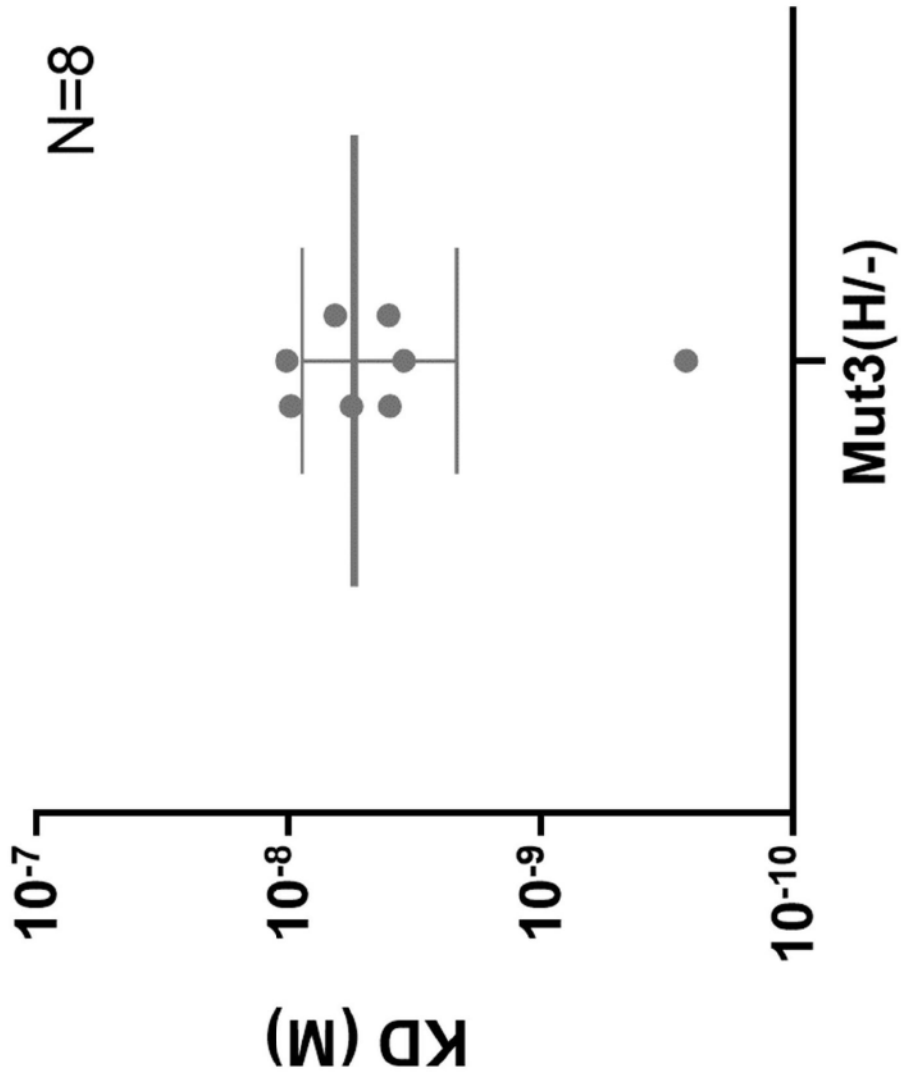


图24

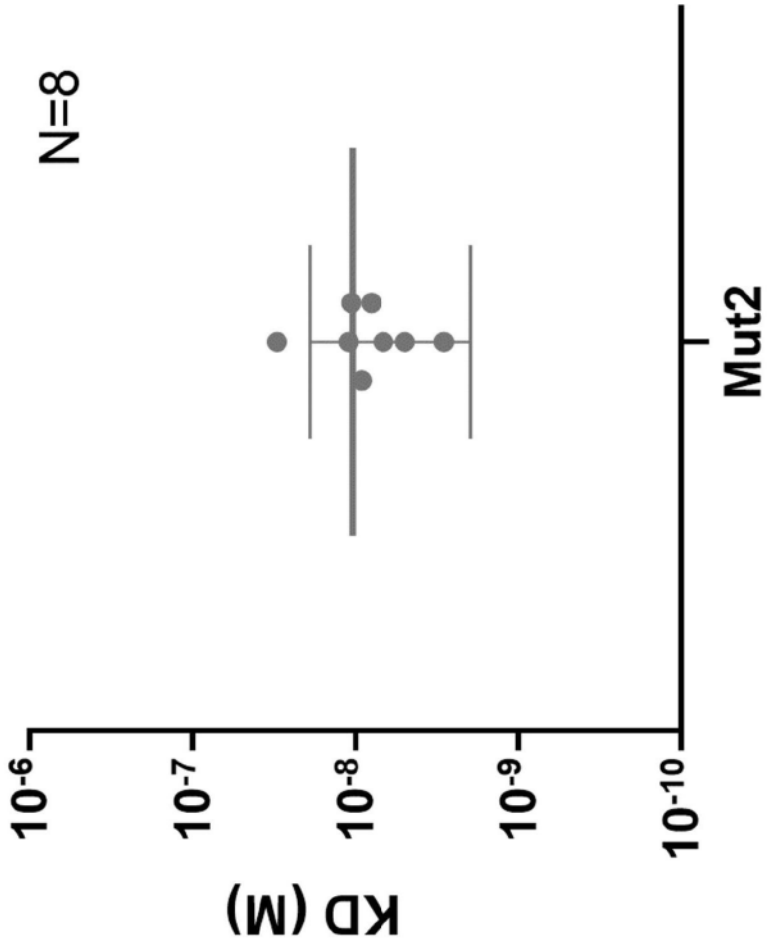


图25

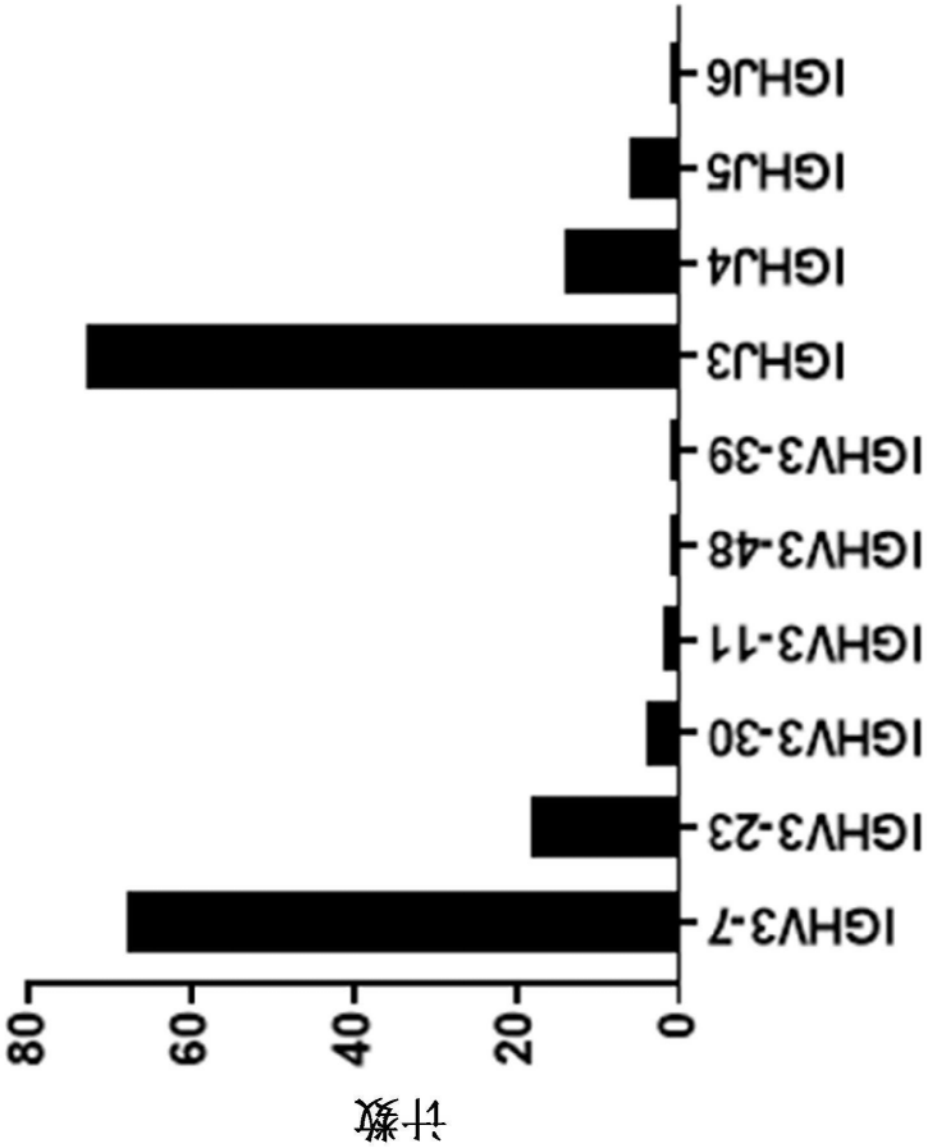

IGHV3-7
IGHV3-23
IGHV3-30
IGHV3-11
IGHV3-48
IGHV3-39
IGHJ3
IGHJ4
IGHJ5
IGHJ6
0
20
40
60
80
计数

图26

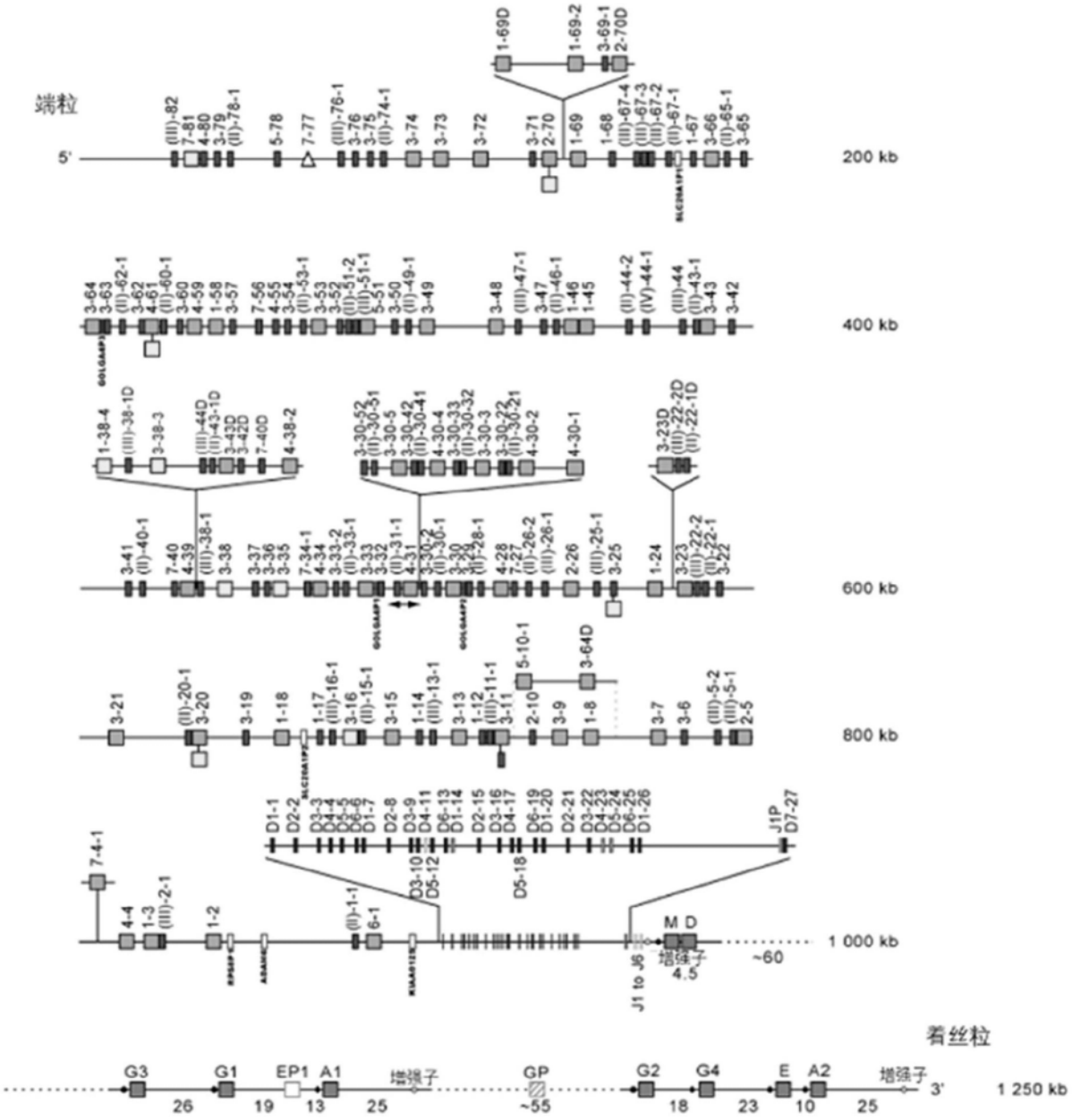

端粒
5'
200 kb
400 kb
600 kb
800 kb
1 000 kb
看丝粒
3'
1 250 kb
G3
G1
EP1
A1
增强子
GP
G2
G4
E
A2
增强子
26
19
13
25
~55
18
23
10
25
M D
增强子
4.5
~60
J1 to J6

图27

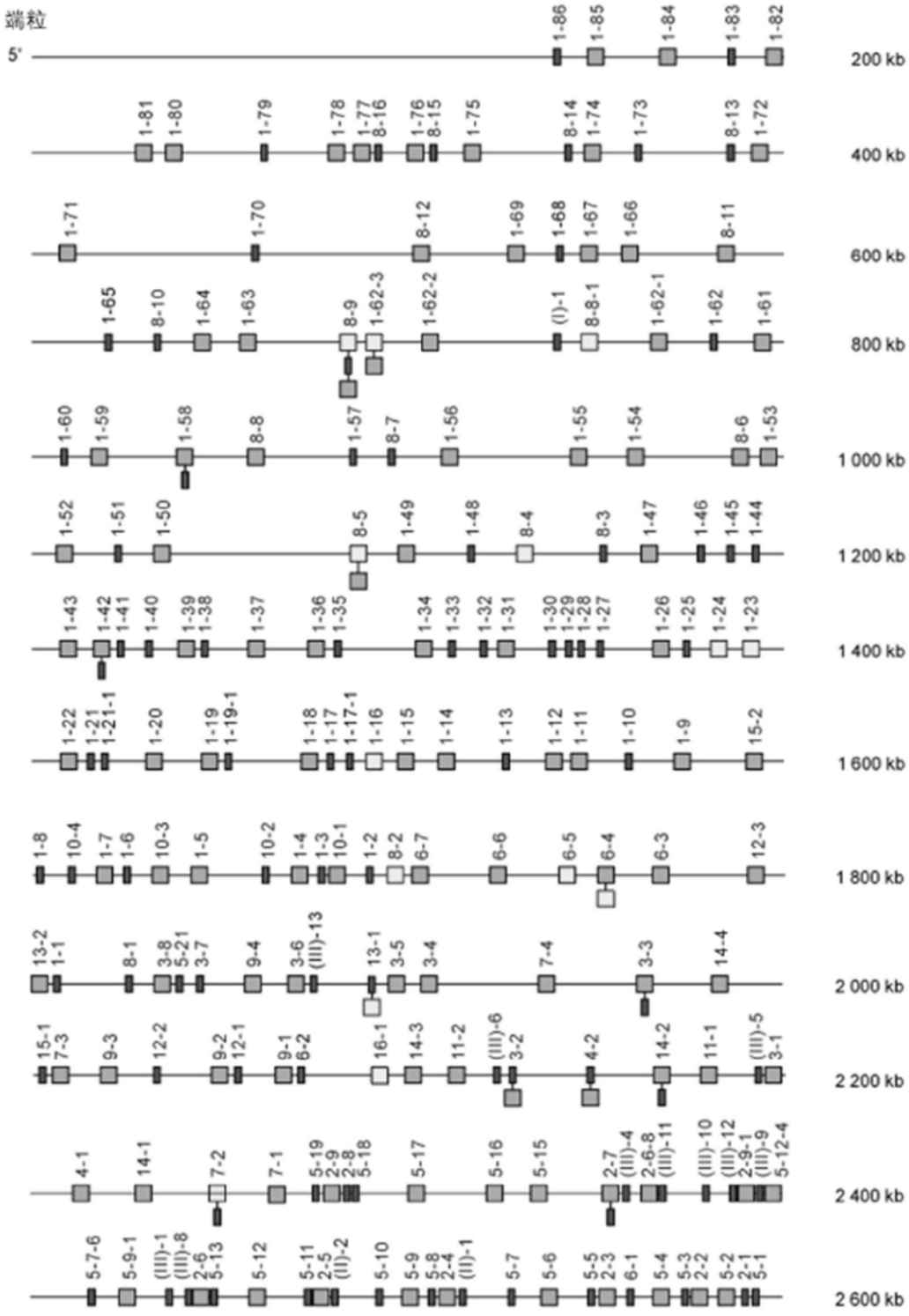

端粒
5'
200 kb
400 kb
600 kb
800 kb
1 000 kb
1 200 kb
1 400 kb
1 600 kb
1 800 kb
2 000 kb
2 200 kb
2 400 kb
2 600 kb

图28

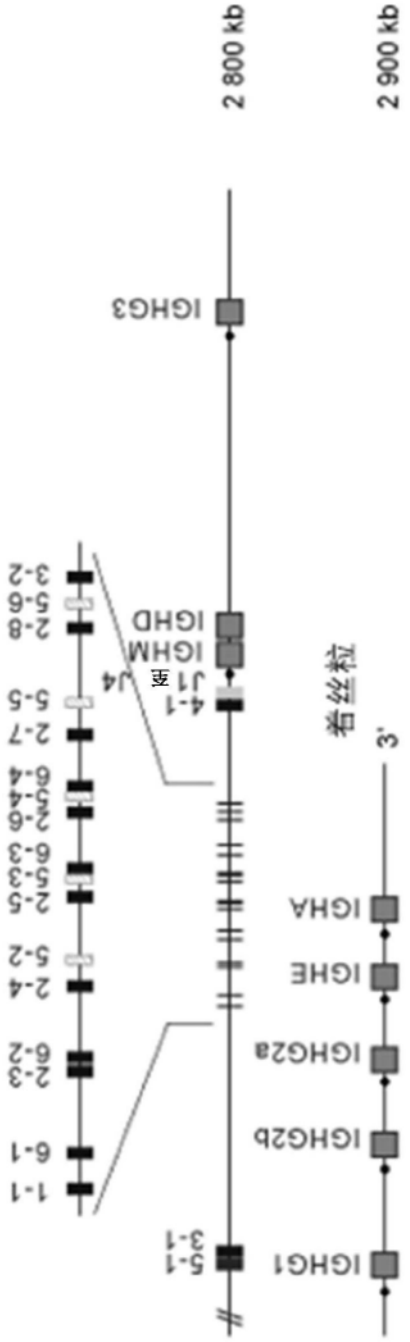

2 800 kb
2 900 kb
IGHG3
IGHD
IGHM
J1至J4
4-1
3'
卷丝卷
IGHA
IGHE
IGHG2a
IGHG2b
IGHG1
3-2
5-6
2-8
5-5
2-7
6-4
2-6
6-3
2-5
5-2
2-4
2-3
6-2
6-1
1-1
5-1
3-1

图28(续)

IMGT						NCBI		
基因	定位	方向	基因座	位置	Accession 编号	位置	Accession 编号	基因在染色体上位置
IGHA2	14q32.33	REV	IGH		J00221	1227..1618	105124322..105124713	NT_026437.11	87054322..87054713
IGHA2	14q32.33	REV	IGH		J00221	684..1004	105124936..105125256	NT_026437.11	87054936..87055256
IGHA2	14q32.33	REV	IGH		J00221	164..469	105125474..105125776	NT_026437.11	87055474..87055776
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	2540..2868	105137451..105137779	NT_026437.11	87067451..87067779
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	2133..2456	105137863..105138186	NT_026437.11	87067863..87068186
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	1726..2046	105138273..105138593	NT_026437.11	87068273..87068593
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	1210..1518	105138801..105139109	NT_026437.11	87068801..87069109
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	1481..1800	105161861..105162180	NT_026437.11	87091861..87092180
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	1054..1383	105162278..105162607	NT_026437.11	87092278..87092607
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	900..935	105162726..105162761	NT_026437.11	87092726..87092761
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	216..509	105163154..105163447	NT_026437.11	87093154..87093447
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	1480..1799	105180588..105180907	NT_026437.11	87110588..87110907
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	1056..1382	105181005..105181331	NT_026437.11	87111005..87111331
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	902..937	105181450..105181485	NT_026437.11	87111450..87111485
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	216..509	105181878..105182171	NT_026437.11	87111878..87112171
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	1474..1790	105205635..105205947	NT_026437.11	87135635..87135947
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	1047..1376	105206045..105206374	NT_026437.11	87136045..87136374
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	878..928	105206493..105206543	NT_026437.11	87136493..87136543
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	195..488	105206933..105207226	NT_026437.11	87136933..87137226
IGHA1	14q32.33	REV	IGH		J00220	1244..1635	105244553..105244944	NT_026437.11	87174553..87174944
IGHA1	14q32.33	REV	IGH		J00220	662..1021	105245167..105245526	NT_026437.11	87175167..87175526
IGHA1	14q32.33	REV	IGH		J00220	142..447	105245741..105246046	NT_026437.11	87175741..87176046
IGHEP1	14q32.33	REV	IGH		J00223	849..1177	105259179..105259507	NT_026437.11	87189179..87189507
IGHEP1	14q32.33	REV	IGH		J00223	447..765	105259591..105259909	NT_026437.11	87189591..87189909
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	1481..1800	105278858..105279177	NT_026437.11	87208858..87209177
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	1055..1384	105279275..105279604	NT_026437.11	87209275..87209604
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	892..936	105279723..105279767	NT_026437.11	87209723..87209767
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	210..503	105280159..105280452	NT_026437.11	87210159..87210452
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	2061..2380	105306622..105306941	NT_026437.11	87236622..87236941
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1634..1963	105307039..105307368	NT_026437.11	87237039..87237368
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1471..1515	105307487..105307531	NT_026437.11	87237487..87237531
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1283..1327	105307675..105307719	NT_026437.11	87237675..87237719
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1095..1139	105307863..105307907	NT_026437.11	87237863..87237907
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	901..951	105308051..105308101	NT_026437.11	87238051..87238101
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	216..509	105308494..105308787	NT_026437.11	87238494..87238787
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02880	25..50	105375785..105375810	NT_026437.11	87305785..87305810
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02879	101..424	105377748..105378071	NT_026437.11	87307748..87308071
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02878	101..424	105378282..105378605	NT_026437.11	87308282..87308605
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02877	101..172	105379342..105379413	NT_026437.11	87309342..87309413
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02876	101..202	105382203..105382304	NT_026437.11	87312203..87312304

IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02875	101..403	105382753..105383055	NT_026437.11	87312753..87313055
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	1708..2096	105391496..105391887	NT_026437.11	87321496..87321887
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	1212..1529	105392067..105392384	NT_026437.11	87322067..87322384
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	631..966	105392630..105392965	NT_026437.11	87322630..87322965
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	233..544	105393056..105393367	NT_026437.11	87323056..87323367
IGHJ6	14q32.33	REV	IGH	960175..960275	J00256	2909..3009	105400453..105400553	NT_026437.11	87330453..87330553
IGHJ3P	14q32.33	REV	IGH	959970..960057	J00256	2709..2797	105400671..105400758	NT_026437.11	87330671..87330758
IGHJ5	14q32.33	REV	IGH	959571..959659	J00256	2317..2404	105401084..105401156	NT_026437.11	87331069..87331141
IGHJ4	14q32.33	REV	IGH	959172..959258	J00256	1873..1959	105401470..105401556	NT_026437.11	87331470..87331556
IGHJ3	14q32.33	REV	IGH	958789..958886	J00256	1498..1586	105401865..105401930	NT_026437.11	87331842..87331907
IGHJ2P	14q32.33	REV	IGH	958583..958682	J00256	1284..1380	105402046..105402145	NT_026437.11	87332046..87332145
IGHJ2	14q32.33	REV	IGH	958184..958274	J00256	893..984	105402454..105402544	NT_026437.11	87332454..87332544
IGHJ1	14q32.33	REV	IGH	957977..958066	J00256	686..774	105402662..105402751	NT_026437.11	87332662..87332751
IGHD7-27	14q32.33	REV	IGH	957884..957950	J00256	592..659	105402781..105402845	NT_026437.11	87332778..87332842
IGHJ1P	14q32.33	REV	IGH	957759..957849	J00256	467..557	105402879..105402969	NT_026437.11	87332879..87332969
IGHD1-26	14q32.33	REV	IGH	942598..942673	X97051	72141..72216	105417909..105417984	NT_026437.11	87347909..87347984
IGHD6-25	14q32.33	REV	IGH	942095..942168	X97051	71638..71711	105418414..105418487	NT_026437.11	87348414..87348487
IGHD5-24	14q32.33	REV	IGH	939730..939805	X97051	69272..69347	105420778..105420853	NT_026437.11	87350778..87350853
IGHD4-23	14q32.33	REV	IGH	938765..938839	X97051	68306..68380	105421745..105421819	NT_026437.11	87351745..87351819
IGHD3-22	14q32.33	REV	IGH	937592..937678	X93616	2..88	105422906..105422992	NT_026437.11	87352906..87352992
IGHD2-21	14q32.33	REV	IGH	935075..935158	J00235	1..63	105425447..105425509	NT_026437.11	87355447..87355509
IGHD1-20	14q32.33	REV	IGH	932446..932518	X97051	61987..62059	105428066..105428138	NT_026437.11	87358066..87358138
IGHD6-19	14q32.33	REV	IGH	931934..932010	X97051	61475..61551	105428574..105428650	NT_026437.11	87358574..87358650
IGHD5-18	14q32.33	REV	IGH	930093..930168	X13972	2885..2960	105430417..105430492	NT_026437.11	87360417..87360492
IGHD4-17	14q32.33	REV	IGH	929131..929202	X97051	58671..58742	105431383..105431454	NT_026437.11	87361383..87361454
IGHD3-16	14q32.33	REV	IGH	927984..928076	X93614	2..94	105432511..105432601	NT_026437.11	87362511..87362601
IGHD2-15	14q32.33	REV	IGH	925668..925753	J00234	1..66	105434853..105434918	NT_026437.11	87364853..87364918
IGHD1-14	14q32.33	REV	IGH	923001..923073	X13972	14490..14562	105437513..105437585	NT_026437.11	87367513..87367585
IGHD6-13	14q32.33	REV	IGH	922493..922569	X13972	13983..14059	105438017..105438093	NT_026437.11	87368017..87368093
IGHD5-12	14q32.33	REV	IGH	920984..921062	X13972	12478..12556	105439524..105439602	NT_026437.11	87369524..87369602
IGHD4-11	14q32.33	REV	IGH	920024..920095	X13972	11522..11593	105440491..105440562	NT_026437.11	87370491..87370562
IGHD3-10	14q32.33	REV	IGH	919128..919214	X13972	10631..10717	105441372..105441458	NT_026437.11	87371372..87371458
IGHD3-9	14q32.33	REV	IGH	918944..919030	X13972	10447..10533	105441556..105441642	NT_026437.11	87371556..87371642
IGHD2-8	14q32.33	REV	IGH	916414..916500	X13972	7921..8007	105444086..105444172	NT_026437.11	87374086..87374172
IGHD1-7	14q32.33	REV	IGH	913731..913803	X13972	5238..5310	105446783..105446855	NT_026437.11	87376783..87376855
IGHD6-6	14q32.33	REV	IGH	913227..913300	X13972	4734..4807	105447287..105447359	NT_026437.11	87377286..87377358
IGHD5-5	14q32.33	REV	IGH	911378..911453	X97051	59633..59708	105449133..105449208	NT_026437.11	87379133..87379208
IGHD4-4	14q32.33	REV	IGH	910417..910488	X13972	1924..1995	105450098..105450169	NT_026437.11	87380098..87380169
IGHD3-3	14q32.33	REV	IGH	909265..909351	X13972	776..862	105451235..105451321	NT_026437.11	87381235..87381321
IGHD2-2	14q32.33	REV	IGH	906798..906884	J00232	1..66	105453723..105453788	NT_026437.11	87383723..87383788
IGHD1-1	14q32.33	REV	IGH	904136..904208	X97051	33686..33758	105456378..105456450	NT_026437.11	87386378..87386450
IGHV4-30-2	14q32.33	REV	IGH		L10089	1..297	105476885..105476952	NT_026437.11	87406660..87406727
IGHV4-4	14q32.33	REV	IGH	811002..811472	L10098	1..325	105476906..105476984	NT_026437.11	87406894..87406972
IGHV(II)-1-1	14q32.33	REV	IGH	878294..878475	AB019441	78294..78475	105482111..105482292	NT_026437.11	87412111..87412292
IGHV3-21	14q32.33	REV	IGH	597417..597909	AB019439	197417..197909	106282330..106282428	NT_026437.11	88211936..88212034

IGHV1-2	14q32.33	REV	IGH	836435..836911	X07448	126..603	105523675..105524151	NT_026437.11	87453675..87454151
IGHV3-41	14q32.33	REV	IGH	390047..390538	M99670	189..680	106119868..106120165	NT_026437.11	88049868..88050165
IGHV1-3	14q32.33	REV	IGH	817860..818336	X62109	21..497	105542250..105542726	NT_026437.11	87472250..87472726
IGHV4-59	14q32.33	REV	IGH	205856..206326	AB019438	1..291	106154301..106154591	NT_026437.11	88084301..88084591
IGHV2-5	14q32.33	REV	IGH	794964..795446	X62111	71..553	105565140..105565622	NT_026437.11	87495140..87495622
IGHV(III)-5-1	14q32.33	REV	IGH	793545..793643	AB019440	193545..193643	105566943..105567041	NT_026437.11	87496943..87497041
IGHV(III)-5-2	14q32.33	REV	IGH	787450..787749	AB019440	187450..187749	105572837..105573136	NT_026437.11	87502837..87503136
IGHV3-6	14q32.33	REV	IGH	777310..777803	M99650	13..506	105582783..105583276	NT_026437.11	87512783..87513276
IGHV3-7	14q32.33	REV	IGH	770688..771182	M99649	184..678	105589404..105589898	NT_026437.11	87519404..87519898
IGHV6-1	14q32.33	REV	IGH	883485..883971	J04097	337..823	105763091..105763163	NT_026437.11	87692677..87692749
IGHV3-9	14q32.33	REV	IGH	736812..737296	M99651	132..616	105623290..105623774	NT_026437.11	87553290..87553774
IGHV2-10	14q32.33	REV	IGH	729561..730040	M99647	71..550	105630549..105631025	NT_026437.11	87560549..87561025
IGHV3-11	14q32.33	REV	IGH	715861..716349	M99652	48..536	105644237..105644725	NT_026437.11	87574237..87574725
IGHV(III)-11-1	14q32.33	REV	IGH	712240..712656	AB019440	112240..112656	105647930..105648346	NT_026437.11	87577930..87578346
IGHV1-12	14q32.33	REV	IGH	710238..710527	X92210	191..628	105649911..105650348	NT_026437.11	87579911..87580348
IGHV3-13	14q32.33	REV	IGH	702954..703445	X92217	2..493	105657141..105657632	NT_026437.11	87587141..87587632
IGHV(III)-13-1	14q32.33	REV	IGH	690249..690586	AB019440	90249..90586	105670000..105670337	NT_026437.11	87600000..87600337
IGHV1-14	14q32.33	REV	IGH	686675..687009	AB019440	86675..87009	105673577..105673911	NT_026437.11	87603577..87603911
IGHV3-15	14q32.33	REV	IGH	678769..679269	X92216	2..502	105681317..105681817	NT_026437.11	87611317..87611817
IGHV(II)-15-1	14q32.33	REV	IGH	669050..669320	AB019440	69050..69320	105691266..105691536	NT_026437.11	87621266..87621536
IGHV3-16	14q32.33	REV	IGH	667196..667688	M99655	30..522	105692898..105693390	NT_026437.11	87622898..87623390
IGHV(III)-16-1	14q32.33	REV	IGH	661801..662105	AB019440	61801..62105	105698481..105698785	NT_026437.11	87628481..87628785
IGHV1-17	14q32.33	REV	IGH	658074..658549	M99640	45..521	105702037..105702512	NT_026437.11	87632037..87632512
IGHV1-18	14q32.33	REV	IGH	647544..648019	M99641	47..522	105712567..105713042	NT_026437.11	87642567..87643042
IGHV3-19	14q32.33	REV	IGH	635792..636211	M99656	211..630	105724375..105724794	NT_026437.11	87654375..87654794
IGHV3-20	14q32.33	REV	IGH	621508..622001	M99657	10..504	105738585..105739078	NT_026437.11	87668585..87669078
IGHV(II)-20-1	14q32.33	REV	IGH	619576..620076	AB019440	19576..20076	105740510..105741010	NT_026437.11	87670510..87671010
IGHV1-58	14q32.33	REV	IGH	210733..211209	M29809	151..627	106149377..106149853	NT_026437.11	88079377..88079853
IGHV3-22	14q32.33	REV	IGH	574720..575220	M99659	85..585	105785366..105785866	NT_026437.11	87715366..87715866
IGHV(II)-22-1	14q32.33	REV	IGH	569320..569588	AB019439	169320..169588	105790998..105791266	NT_026437.11	87720998..87721266
IGHV(III)-22-2	14q32.33	REV	IGH	568065..568262	AB019439	168065..168262	105792324..105792521	NT_026437.11	87722324..87722521
IGHV3-23	14q32.33	REV	IGH	563887..564381	M99660	10..504	105796205..105796699	NT_026437.11	87726205..87726699
IGHV1-24	14q32.33	REV	IGH	555962..556438	M99642	68..544	105804148..105804624	NT_026437.11	87734148..87734624
IGHV3-25	14q32.33	REV	IGH	543468..543960	M99661	78..570	105816626..105817118	NT_026437.11	87746626..87747118
IGHV(III)-25-1	14q32.33	REV	IGH	539140..539381	AB019439	139140..139381	105821205..105821446	NT_026437.11	87751205..87751446
IGHV2-26	14q32.33	REV	IGH	531449..531931	M99648	21..503	105828655..105829137	NT_026437.11	87758655..87759137
IGHV(III)-26-1	14q32.33	REV	IGH	523568..523874	AB019439	123568..123874	105836712..105837018	NT_026437.11	87766712..87767018
IGHV(II)-26-2	14q32.33	REV	IGH	518318..518630	AB019439	118318..118630	105841956..105842268	NT_026437.11	87771956..87772268
IGHV7-27	14q32.33	REV	IGH	515042..515455	M99643	65..526	105845083..105845544	NT_026437.11	87775083..87775544
IGHV4-31	14q32.33	REV	IGH	483897..484373	X05713	153..626	105851517..105851990	NT_026437.11	87781517..87781990
IGHV(II)-28-1	14q32.33	REV	IGH	503603..503855	AB019439	103603..103855	105856731..105856983	NT_026437.11	87786731..87786983
IGHV3-29	14q32.33	REV	IGH	501726..502222	AB019439	101726..102222	105858364..105858860	NT_026437.11	87788364..87788860
IGHV3-30	14q32.33	REV	IGH	498085..498577	M83134	1782..2274	105862009..105862501	NT_026437.11	87792009..87792501
IGHV(II)-30-1	14q32.33	REV	IGH	490666..490939	AB019439	90666..90939	105869647..105869920	NT_026437.11	87799647..87799920
IGHV3-30-2	14q32.33	REV	IGH	488784..489232	AB019439	88784..89232	105871354..105871802	NT_026437.11	87801354..87801802

IGHV4-28	14q32.33	REV	IGH	508596..509069	X05714	151..624	105549114..105549584	NT_026437.11	87479114..87479584
IGHV(II)-31-1	14q32.33	REV	IGH	478924..479232	AB019439	78924..79232	105881354..105881662	NT_026437.11	87811354..87811662
IGHV3-32	14q32.33	REV	IGH	477013..477509	AB019439	77013..77509	105883077..105883573	NT_026437.11	87813077..87813573
IGHV3-33	14q32.33	REV	IGH	473368..473860	AB019439	73368..73860	105886726..105887218	NT_026437.11	87816726..87817218
IGHV(II)-33-1	14q32.33	REV	IGH	465947..466220	AB019439	65947..66220	105894366..105894639	NT_026437.11	87824366..87824639
IGHV3-33-2	14q32.33	REV	IGH	464064..464512	AB019439	64064..64512	105896074..105896522	NT_026437.11	87826074..87826522
IGHV4-34	14q32.33	REV	IGH	459517..459988	AB019439	1..343	105900598..105900940	NT_026437.11	87830598..87830940
IGHV7-34-1	14q32.33	REV	IGH	455877..456349	AB019439	55877..56349	105904237..105904709	NT_026437.11	87834237..87834709
IGHV3-35	14q32.33	REV	IGH	443767..444259	M99666	140..632	105916327..105916819	NT_026437.11	87846327..87846819
IGHV3-36	14q32.33	REV	IGH	440399..440861	M99667	218..681	105919724..105920187	NT_026437.11	87849724..87850187
IGHV3-37	14q32.33	REV	IGH	436515..437003	M99668	10..489	105923586..105924071	NT_026437.11	87853586..87854071
IGHV3-38	14q32.33	REV	IGH	422685..423175	M99669	10..497	105937413..105937901	NT_026437.11	87867413..87867901
IGHV(III)-38-1	14q32.33	REV	IGH	415315..415645	AB019439	15315..15645	105944941..105945271	NT_026437.11	87874941..87875271
IGHV4-30-4	14q32.33	REV	IGH		Z14238	1..438	105876252..105876689	NT_026437.11	87806252..87806689
IGHV7-40	14q32.33	REV	IGH	408075..408316	M99644	164..497	105952270..105952592	NT_026437.11	87882270..87882592
IGHV(II)-40-1	14q32.33	REV	IGH	392620..392696	AB019438	192620..192696	105967890..105967966	NT_026437.11	87897890..87897966
IGHV3-30-3	14q32.33	REV	IGH		X92283	1..294	105970093..105970379	NT_026437.11	87900093..87900378
IGHV3-42	14q32.33	REV	IGH	369925..370362	M99671	1..461	105762906..105763129	NT_026437.11	87692869..87693089
IGHV3-43	14q32.33	REV	IGH	362897..363393	M99672	170..666	105997193..105997689	NT_026437.11	87927193..87927689
IGHV(II)-43-1	14q32.33	REV	IGH	360618..360826	AB019438	160618..160826	105999760..105999968	NT_026437.11	87929760..87929968
IGHV(III)-44	14q32.33	REV	IGH	355142..355318	M99673	62..511	106005056..106005444	NT_026437.11	87935056..87935444
IGHV(IV)-44-1	14q32.33	REV	IGH	343764..344231	AB019438	143764..144231	106016355..106016822	NT_026437.11	87946355..87946822
IGHV(II)-44-2	14q32.33	REV	IGH	339146..339382	AB019438	136146..139382	106021204..106024440	NT_026437.11	87951204..87954440
IGHV1-45	14q32.33	REV	IGH	326175..326651	X92209	2..478	106033935..106034411	NT_026437.11	87963935..87964411
IGHV1-46	14q32.33	REV	IGH	322057..322533	X92343	153..629	106038053..106038529	NT_026437.11	87968053..87968529
IGHV(II)-46-1	14q32.33	REV	IGH	317614..317771	AB019438	117614..117771	106042815..106042972	NT_026437.11	87972815..87972972
IGHV3-47	14q32.33	REV	IGH	314580..315074	Z18900	1..291	106045553..106045843	NT_026437.11	87975553..87975843
IGHV(III)-47-1	14q32.33	REV	IGH	302103..302406	AB019438	102103..102406	106058180..106058483	NT_026437.11	87988180..87988483
IGHV3-48	14q32.33	REV	IGH	295274..295768	M99675	174..668	106064818..106065312	NT_026437.11	87994818..87995312
IGHV3-49	14q32.33	REV	IGH	276144..276644	M99676	224..724	106083946..106084442	NT_026437.11	88013946..88014442
IGHV(II)-49-1	14q32.33	REV	IGH	268955..269225	AB019438	68955..69225	106091361..106091631	NT_026437.11	88021361..88021631
IGHV3-50	14q32.33	REV	IGH	266998..267453	M99677	10..283	106093318..106093588	NT_026437.11	88023316..88023585
IGHV5-51	14q32.33	REV	IGH	254379..254853	M99686	168..641	106105734..106106207	NT_026437.11	88035734..88036207
IGHV(III)-51-1	14q32.33	REV	IGH	249747..250053	AB019438	49747..50053	106110533..106110839	NT_026437.11	88040533..88040839
IGHV(II)-51-2	14q32.33	REV	IGH	248581..248843	AB019438	48581..48843	106111743..106112005	NT_026437.11	88041743..88042005
IGHV3-52	14q32.33	REV	IGH	246731..247220	M99678	212..701	106113366..106113855	NT_026437.11	88043366..88043855
IGHV3-53	14q32.33	REV	IGH	240421..240910	M99679	38..527	106282134..106282436	NT_026437.11	88212134..88212436
IGHV(II)-53-1	14q32.33	REV	IGH	233605..233874	AB019438	33605..33874	106126712..106126981	NT_026437.11	88056712..88056981
IGHV3-54	14q32.33	REV	IGH	231746..232232	M99680	147..631	106128356..106128840	NT_026437.11	88058356..88058840
IGHV4-55	14q32.33	REV	IGH	226980..227454	M99685	230..704	106133132..106133606	NT_026437.11	88063132..88063606
IGHV7-56	14q32.33	REV	IGH	223335..223808	M29810	136..429	106136958..106137251	NT_026437.11	88066958..88067251
IGHV3-57	14q32.33	REV	IGH	214314..214658	M29815	7..568	106146106..106146421	NT_026437.11	88076062..88076381
IGHV1-8	14q32.33	REV	IGH	750026..750503	M99637	58..535	105610083..105610560	NT_026437.11	87540083..87540560
IGHV4-39	14q32.33	REV	IGH	411486..411963	AB019439	1..328	105948662..105948989	NT_026437.11	87878662..87878989
IGHV3-60	14q32.33	REV	IGH	201883..202375	AB019438	1883..2375	106158211..106158703	NT_026437.11	88088211..88088703

IGHV(II)-60-1	14q32.33	REV	IGH	195563..195869	AB019437	195563..195831	106164755..106165023	NT_026437.11	88094755..88095023
IGHV4-61	14q32.33	REV	IGH	193980..194456	M29811	151..628	106166130..106166606	NT_026437.11	88096130..88096606
IGHV3-62	14q32.33	REV	IGH	189953..190447	AB019437	189953..190447	106170139..106170633	NT_026437.11	88100139..88100633
IGHV(II)-62-1	14q32.33	REV	IGH	182749..183060	AB019437	182749..183060	106177526..106177837	NT_026437.11	88107526..88107837
IGHV3-63	14q32.33	REV	IGH	180846..181313	M99681	10..506	106179251..106179740	NT_026437.11	88109251..88109740
IGHV3-64	14q32.33	REV	IGH	175347..175841	M99682	78..575	106184745..106185242	NT_026437.11	88114745..88115242
IGHV3-65	14q32.33	REV	IGH	166993..167487	Z27503	1..301	106193140..106193440	NT_026437.11	88123140..88123440
IGHV(III)-2-1	14q32.33	REV	IGH	821563..821903	AB019441	21563..21903	105538683..105539023	NT_026437.11	87468683..87469023
IGHV(II)-65-1	14q32.33	REV	IGH	161481..161753	AB019437	161481..161753	106198833..106199105	NT_026437.11	88128833..88129105
IGHV3-66	14q32.33	REV	IGH	158060..158549	X92218	2..491	106202037..106202526	NT_026437.11	88132037..88132526
IGHV1-67	14q32.33	REV	IGH	152482..152960	AB019437	1..434	106207626..106208059	NT_026437.11	88137626..88138059
IGHV(II)-67-1	14q32.33	REV	IGH	146982..147131	AB019437	146982..147131	106213455..106213604	NT_026437.11	88143455..88143604
IGHV(III)-67-2	14q32.33	REV	IGH	146324..146422	AB019437	146324..146422	106214164..106214262	NT_026437.11	88144164..88144262
IGHV(III)-67-3	14q32.33	REV	IGH	140636..140910	AB019437	140636..140910	106219676..106219950	NT_026437.11	88149676..88149950
IGHV(III)-67-4	14q32.33	REV	IGH	138127..138432	AB019437	138127..138432	106222154..106222459	NT_026437.11	88152154..88152459
IGHV1-68	14q32.33	REV	IGH	129238..129717	AB019437	129238..129717	106230869..106231348	NT_026437.11	88160869..88161348
IGHV1-69	14q32.33	REV	IGH	119174..119651	L22582	233..710	106240935..106241412	NT_026437.11	88170935..88171412
IGHV2-70	14q32.33	REV	IGH	110279..110761	L21969	1..444	106249864..106250307	NT_026437.11	88179864..88180307
IGHV3-71	14q32.33	REV	IGH	105684..106184	AB019437	105684..106184	106254402..106254902	NT_026437.11	88184402..88184902
IGHV3-72	14q32.33	REV	IGH	90150..90650	X92206	87..587	106269936..106270436	NT_026437.11	88199936..88200436
IGHV3-73	14q32.33	REV	IGH	78150..78650	X70197	1..300	105990226..105990526	NT_026437.11	87920226..87920526
IGHV3-74	14q32.33	REV	IGH	70412..70906	L33851	23..476	106289721..106290174	NT_026437.11	88219721..88220174
IGHV(II)-74-1	14q32.33	REV	IGH	59900..60068	AB019437	59900..60068	106300518..106300686	NT_026437.11	88230518..88230686
IGHV3-75	14q32.33	REV	IGH	57164..57672	Z27510	4..308	106302955..106303259	NT_026437.11	88232955..88233259
IGHV3-76	14q32.33	REV	IGH	53003..53492	AB019437	1..292	106307134..106307425	NT_026437.11	88237134..88237425
IGHV(III)-76-1	14q32.33	REV	IGH	49245..49551	AB019437	49245..49551	106311035..106311341	NT_026437.11	88241035..88241341
IGHV5-78	14q32.33	REV	IGH	29780..30228	X92213	592..1027	106330373..106330806	NT_026437.11	88260373..88260806
IGHV(II)-78-1	14q32.33	REV	IGH	15431..15744	AB019437	15431..15744	106344842..106345155	NT_026437.11	88274842..88275155
IGHV3-79	14q32.33	REV	IGH	13237..13688	AB019437	13237..13688	106346898..106347349	NT_026437.11	88276898..88277349
IGHV4-80	14q32.33	REV	IGH	8147..8547	AB019437	8147..8547	106352039..106352439	NT_026437.11	88282039..88282439
IGHV7-81	14q32.33	REV	IGH	6315..6790	AB019437	6315..6790	106353796..106354271	NT_026437.11	88283796..88284271
IGHV(III)-82	14q32.33	REV	IGH	1490..1781	AB019437	1490..1781	106358805..106359096	NT_026437.11	88288805..88289096

图29

IMGT 基因	染色体定位	方向	NCBI 基因 ID	参照 GRCm38.p3 C57BL/6J	NCBI 基因位置	序列方向	MGI ID	MGI 代号
IGHV1-86	12F2 (62.59 cM)	REV	668599	NC_000078.6	116009659..116009954	-1	MGI:3645729	Ighv1-86
IGHV1-85	12F2 (62.59 cM)	REV	668597	NC_000078.6	116000028..116000321	-1	MGI:3645723	Ighv1-85
IGHV1-84	12F2 (62.59 cM)	REV	434609	NC_000078.6	115980702..115981134	-1	MGI:3644235	Ighv1-84
IGHV1-83	12F2 (62.59 cM)	REV	620140	NC_000078.6	115963817..115964109	-1	MGI:3648939	Ighv1-83
IGHV1-82	12F2 (62.59 cM)	REV	100775175	NC_000078.6	115952538..115952831	-1	MGI:4439671	Ighv1-82
IGHV1-81	12F2 (62.59 cM)	REV	668591	NC_000078.6	115920279..115920572	-1	MGI:4439635	Ighv1-81
IGHV1-80	12F2 (62.59 cM)	REV	668589	NC_000078.6	115912344..115912637	-1	MGI:4439738	Ighv1-80
IGHV1-79	12F2 (62.59 cM)	REV	435331	NC_000078.6	115888096..115888389	-1	MGI:3648258	Ighv1-79
IGHV1-78	12F2 (62.59 cM)	REV	213570	NC_000078.6	115868773..115869066	-1	MGI:4439736	Ighv1-78
IGHV1-77	12F2 (62.59 cM)	REV	619994	NC_000078.6	115861867..115862160	-1	MGI:4439670	Ighv1-77
IGHV8-16	12F2 (62.59 cM)	REV	100775177	NC_000078.6	115858008..115858301	-1	MGI:5434409	Ighv8-16
IGHV1-76	12F2 (62.59 cM)	REV	100775174	NC_000078.6	115847881..115848174	-1	MGI:4439737	Ighv1-76
IGHV8-15	12F2 (62.59 cM)	REV	100775176	NC_000078.6	115844016..115844309	-1	MGI:5434408	Ighv8-15
IGHV1-75	12F2 (62.59 cM)	REV	622728	NC_000078.6	115833950..115834243	-1	MGI:4439735	Ighv1-75
IGHV8-14	12F2 (62.59 cM)	REV	668582	NC_000078.6	115808427..115808727	-1	MGI:3648977	Ighv8-14
IGHV1-74	12F2 (62.59 cM)	REV	100775173	NC_000078.6	115802690..115803080	-1	MGI:4439634	Ighv1-74
IGHV1-73	12F2 (62.59 cM)	REV	668577	NC_000078.6	115790593..115790887	-1	MGI:3645131	Ighv1-73
IGHV8-13	12F2 (62.59 cM)	REV	100775172	NC_000078.6	115765335..115765635	-1	MGI:4439734	Ighv8-13
IGHV1-72	12F2 (62.59 cM)	REV	619916	NC_000078.6	115757984..115758277	-1	MGI:4439633	Ighv1-72
IGHV1-71	12F2 (62.59 cM)	REV	619886	NC_000078.6	115742205..115742506	-1	MGI:3643033	Ighv1-71
IGHV1-70	12F2 (62.59 cM)	REV	638634	NC_000078.6	115691889..115692182	-1	MGI:3644620	Ighv1-70
IGHV8-12	12F2 (62.59 cM)	REV	780960	NC_000078.6	115647945..115648245	-1	MGI:3642873	Ighv8-12
IGHV1-69	12F2 (62.59 cM)	REV	619833	NC_000078.6	115623203..115623595	-1	MGI:4439632	Ighv1-69
IGHV1-68	12F2 (62.59 cM)	REV	780959	NC_000078.6	115611340..115611633	-1	MGI:5009923	Ighv1-68

IGHV1-67	12F2 (62.59 cM)	REV	435328	NC_000078.6	115603940..115604233	-1	MGI:3645228	Ighv1-67
IGHV1-66	12F2 (62.59 cM)	REV	380824	NC_000078.6	115593110..115593403	-1	MGI:4439825	Ighv1-66
IGHV8-11	12F2 (62.59 cM)	REV	636462	NC_000078.6	115567149..115567449	-1	MGI:3644925	Ighv8-11
IGHV1-65	12F2 (62.58 cM)	REV	780958	NC_000078.6	115532055..115532347	-1	MGI:5009922	Ighv1-65
IGHV8-10	12F2 (62.58 cM)	REV	780957	NC_000078.6	115519340..115519640	-1	MGI:5009921	Ighv8-10
IGHV1-64	12F2 (62.58 cM)	REV	380823	NC_000078.6	115507587..115507977	-1	MGI:4439789	Ighv1-64
IGHV1-63	12F2 (62.58 cM)	REV	780956	NC_000078.6	115495625..115496058	-1	MGI:3642755	Ighv1-63
IGHV8-9	12F2 (62.57 cM)	REV	432709	NC_000078.6	115468331..115468632	-1	MGI:3644475	Ighv8-9
IGHV1-62-3	12F2 (62.57 cM)	REV	668549	NC_000078.6	115460999..115461431	-1	MGI:3648544	Ighv1-62-3
IGHV1-62-2	12F2 (62.57 cM)	REV	238448	NC_000078.6	115446417..115446710	-1	MGI:3644968	Ighv1-62-2
IGHV1-62-1	12F2 (62.55 cM)	REV	668544	NC_000078.6	115386707..115386988	-1	MGI:3704125	Ighv1-62-1
IGHV1-62	12F2 (62.55 cM)	REV	668542	NC_000078.6	115371986..115372278	-1	MGI:5009844	Ighv1-62
IGHV1-61	12F2 (62.55 cM)	REV	674018	NC_000078.6	115359140..115359433	-1	MGI:4439824	Ighv1-61
IGHV1-60	12F2 (62.55 cM)	REV	780940	NC_000078.6	115344537..115344830	-1	MGI:5009920	Ighv1-60
IGHV1-59	12F2 (62.54 cM)	REV	432708	NC_000078.6	115335057..115335513	-1	MGI:3644474	Ighv1-59
IGHV1-58	12F2 (62.54 cM)	REV	780939	NC_000078.6	115312166..115312597	-1	MGI:4439557	Ighv1-58
IGHV8-8	12F2 (62.54 cM)	REV	780938	NC_000078.6	115294066..115294362	-1	MGI:3815333	Ighv8-8
IGHV1-57	12F2 (62.53 cM)	REV	780937	NC_000078.6	115268424..115268715	-1	MGI:5009919	Ighv1-57
IGHV8-7	12F2 (62.53 cM)	REV	780936	NC_000078.6	115258139..115258432	-1	MGI:5009918	Ighv8-7
IGHV1-56	12F2 (62.53 cM)	REV	382695	NC_000078.6	115242802..115243095	-1	MGI:4439715	Ighv1-56
IGHV1-55	12F2 (62.52 cM)	REV	780932	NC_000078.6	115208137..115208527	-1	MGI:4439716	Ighv1-55
IGHV1-54	12F2 (62.52 cM)	REV	211331	NC_000078.6	115193675..115193968	-1	MGI:3647133	Ighv1-54
IGHV8-6	12F2 (62.51 cM)	REV	629930	NC_000078.6	115165777..115166077	-1	MGI:3645823	Ighv8-6
IGHV1-53	12F2 (62.51 cM)	REV	780931	NC_000078.6	115158445..115158835	-1	MGI:3576502	Ighv1-53
IGHV1-52	12F2 (62.51 cM)	REV	382696	NC_000078.6	115145487..115145780	-1	MGI:4439752	Ighv1-52
IGHV1-51	12F2 (62.51 cM)	REV	780930	NC_000078.6	115131375..115131668	-1	MGI:5009917	Ighv1-51
IGHV1-50	12F2 (62.5 cM)	REV	780929	NC_000078.6	115119748..115120041	-1	MGI:4439753	Ighv1-50
IGHV8-5	12F2 (62.49 cM)	REV	640506	NC_000078.6	115067560..115067860	-1	MGI:3645478	Ighv8-5
IGHV1-49	12F2 (62.49 cM)	REV	629925	NC_000078.6	115055223..115055516	-1	MGI:4439754	Ighv1-49
IGHV1-48	12F2 (62.49 cM)	REV	780928	NC_000078.6	115038227..115038520	-1	MGI:5009916	Ighv1-48

IGHV8-4	12F2 (62.48 cM)	REV	629919	NC_000078.6	115024026..115024318	-1	MGI:3646040	Ighv8-4
IGHV8-3	12F2 (62.48 cM)	REV	780927	NC_000078.6	115003418..115003712	-1	MGI:5009915	Ighv8-3
IGHV1-47	12F2 (62.48 cM)	REV	629915	NC_000078.6	114991108..114991401	-1	MGI:4439890	Ighv1-47
IGHV1-46	12F2 (62.48 cM)	REV	668522	NC_000078.6	114977693..114977986	-1	MGI:5009843	Ighv1-46
IGHV1-45	12F2 (62.47 cM)	REV	780894	NC_000078.6	114970055..114970348	-1	MGI:5009913	Ighv1-45
IGHV1-44	12F2 (62.47 cM)	REV	668521	NC_000078.6	114963380..114963674	-1	MGI:5009842	Ighv1-44
IGHV1-43	12F2 (62.47 cM)	REV	629908	NC_000078.6	114945950..114946243	-1	MGI:3704124	Ighv1-43
IGHV1-42	12F2 (62.47 cM)	REV	629906	NC_000078.6	114937154..114937544	-1	MGI:3704123	Ighv1-42
IGHV1-41	12F2 (62.47 cM)	REV	629904	NC_000078.6	114932371..114932664	-1	MGI:3649084	Ighv1-41
IGHV1-40	12F2 (62.47 cM)	REV	780892	NC_000078.6	114924941..114925233	-1	MGI:5009912	Ighv1-40
IGHV1-39	12F2 (62.46 cM)	REV	780891	NC_000078.6	114914599..114914892	-1	MGI:4439888	Ighv1-39
IGHV1-38	12F2 (62.46 cM)	REV	780890	NC_000078.6	114910011..114910303	-1	MGI:5009911	Ighv1-38
IGHV1-37	12F2 (62.46 cM)	REV	668517	NC_000078.6	114896238..114896531	-1	MGI:4439640	Ighv1-37
IGHV1-36	12F2 (62.46 cM)	REV	629897	NC_000078.6	114879888..114880181	-1	MGI:4439639	Ighv1-36
IGHV1-35	12F2 (62.46 cM)	REV	668515	NC_000078.6	114875302..114875597	-1	MGI:3644935	Ighv1-35
IGHV1-34	12F2 (62.45 cM)	REV	628614	NC_000078.6	114851190..114851483	-1	MGI:4439659	Ighv1-34
IGHV1-33	12F2 (62.45 cM)	REV	641247	NC_000078.6	114843693..114844083	-1	MGI:4439617	Ighv1-33
IGHV1-32	12F2 (62.45 cM)	REV	780888	NC_000078.6	114835223..114835516	-1	MGI:5009910	Ighv1-32
IGHV1-31	12F2 (62.45 cM)	REV	629893	NC_000078.6	114829264..114829557	-1	MGI:4439889	Ighv1-31
IGHV1-30	12F2 (62.44 cM)	REV	668511	NC_000078.6	114817099..114817390	-1	MGI:4937173	Ighv1-30
IGHV1-29	12F2 (62.44 cM)	REV	780887	NC_000078.6	114812321..114812605	-1	MGI:5009909	Ighv1-29
IGHV1-28	12F2 (62.44 cM)	REV	668510	NC_000078.6	114809421..114809714	-1	MGI:3644938	Ighv1-28
IGHV1-27	12F2 (62.44 cM)	REV	780886	NC_000078.6	114804616..114804909	-1	MGI:5009908	Ighv1-27
IGHV1-26	12F2 (62.44 cM)	REV	629884	NC_000078.6	114788372..114788665	-1	MGI:4439641	Ighv1-26
IGHV1-25	12F2 (62.44 cM)	REV	640497	NC_000078.6	114781409..114781702	-1	MGI:3648295	Ighv1-25
IGHV1-24	12F2 (62.44 cM)	REV	780885	NC_000078.6	114772928..114773221	-1	MGI:3815052	Ighv1-24
IGHV1-23	12F2 (62.43 cM)	REV	780884	NC_000078.6	114764450..114764743	-1	MGI:3815050	Ighv1-23
IGHV1-22	12F2 (62.43 cM)	REV	780883	NC_000078.6	114746273..114746566	-1	MGI:4439784	Ighv1-22
IGHV1-21	12F2 (62.43 cM)	REV	668499	NC_000078.6	114740383..114740840	-1	MGI:5009841	Ighv1-21
IGHV1-21-1	12F2 (62.43 cM)	REV	631595	NC_000078.6	114736245..114736538	-1	MGI:3645737	Ighv1-21-1

IGHV1-20	12F2 (62.43 cM)	REV	668497	NC_000078.6	114723772..114724065	-1	MGI:3644607	Ighv1-20
IGHV1-19	12F2 (62.42 cM)	REV	382692	NC_000078.6	114708648..114708941	-1	MGI:4439779	Ighv1-19
IGHV1-19-1	12F2 (62.42 cM)	REV	668493	NC_000078.6	114704147..114704440	-1	MGI:3644603	Ighv1-19-1
IGHV1-18	12F2 (62.42 cM)	REV	629871	NC_000078.6	114682632..114682925	-1	MGI:4439780	Ighv1-18
IGHV1-17	12F2 (62.42 cM)	REV	629869	NC_000078.6	114676749..114677042	-1	MGI:3647700	Ighv1-17
IGHV1-17-1	12F2 (62.42 cM)	REV	780926	NC_000078.6	114671968..114672262	-1	MGI:5009914	Ighv1-17-1
IGHV1-16	12F2 (62.42 cM)	REV	629866	NC_000078.6	114665872..114666165	-1	MGI:3647704	Ighv1-16
IGHV1-15	12F2 (62.41 cM)	REV	629865	NC_000078.6	114657353..114657646	-1	MGI:4439782	Ighv1-15
IGHV1-14	12F2 (62.41 cM)	REV	629863	NC_000078.6	114646572..114646865	-1	MGI:4439781	Ighv1-14
IGHV1-13	12F2 (62.41 cM)	REV	780865	NC_000078.6	114630680..114630973	-1	MGI:5009907	Ighv1-13
IGHV1-12	12F2 (62.41 cM)	REV	629860	NC_000078.6	114615850..114616143	-1	MGI:3646284	Ighv1-12
IGHV1-11	12F2 (62.41 cM)	REV	629859	NC_000078.6	114612244..114612536	-1	MGI:5009835	Ighv1-11
IGHV1-10	12F2 (62.40 cM)	REV	637050	NC_000078.6	114597878..114598175	-1	MGI:5009837	Ighv1-10
IGHV1-9	12F2 (62.40 cM)	REV	668478	NC_000078.6	114583569..114583862	-1	MGI:4439621	Ighv1-9
IGHV15-2	12F2 (62.40 cM)	REV	780864	NC_000078.6	114564578..114564874	-1	MGI:4947963	Ighv15-2
IGHV1-8	12F2 (62.39 cM)	REV	780863	NC_000078.6	114555610..114555902	-1	MGI:5009906	Ighv1-8
IGHV10-4	12F2 (62.39 cM)	REV	780862	NC_000078.6	114547258..114547556	-1	MGI:5009905	Ighv10-4
IGHV1-7	12F2 (62.39 cM)	REV	668474	NC_000078.6	114538495..114538788	-1	MGI:3704122	Ighv1-7
IGHV1-6	12F2 (62.39 cM)	REV	780861	NC_000078.6	114532972..114533264	-1	MGI:5009904	Ighv1-6
IGHV10-3	12F2 (62.39 cM)	REV	380809	NC_000078.6	114523441..114523887	-1	MGI:3648785	Ighv10-3
IGHV1-5	12F2 (62.39 cM)	REV	668469	NC_000078.6	114513330..114513623	-1	MGI:3704121	Ighv1-5
IGHV10-2	12F2 (62.38 cM)	REV	780860	NC_000078.6	114496003..114496300	-1	MGI:5009903	Ighv10-2
IGHV1-4	12F2 (62.38 cM)	REV	432702	NC_000078.6	114487136..114487429	-1	MGI:4439618	Ighv1-4
IGHV1-3	12F2 (62.38 cM)	REV	780859	NC_000078.6	114481615..114481916	-1	MGI:5009902	Ighv1-3
IGHV10-1	12F2 (62.38 cM)	REV	380808	NC_000078.6	114479007..114479451	-1	MGI:4439620	Ighv10-1
IGHV1-2	12F2 (62.38 cM)	REV	238428	NC_000078.6	114469075..114469371	-1	MGI:4439924	Ighv1-2
IGHV8-2	12F2 (62.38 cM)	REV	629849	NC_000078.6	114462290..114462589	-1	MGI:3647474	Ighv8-2
IGHV6-7	12F2 (62.38 cM)	REV	432701	NC_000078.6	114455626..114455925	-1	MGI:3644477	Ighv6-7
IGHV6-6	12F2 (62.37 cM)	REV	238427	NC_000078.6	114434788..114435087	-1	MGI:4439619	Ighv6-6
IGHV6-5	12F2 (62.37 cM)	REV	639510	NC_000078.6	114416596..114416895	-1	MGI:3647134	Ighv6-5

IGHV6-4	12F2 (62.37 cM)	REV	628398	NC_000078.6	114406474..114406773	-1	MGI:3704120	Ighv6-4
IGHV6-3	12F2 (62.36 cM)	REV	629845	NC_000078.6	114391712..114392010	-1	MGI:4439854	Ighv6-3
IGHV12-3	12F2 (62.36 cM)	REV	435321	NC_000078.6	114366526..114366819	-1	MGI:3646760	Ighv12-3
IGHV13-2	12F2 (62.36 cM)	REV	629842	NC_000078.6	114357761..114358060	-1	MGI:3705861	Ighv13-2
IGHV1-1	12F2 (62.36 cM)	REV	780834	NC_000078.6	114351705..114351995	-1	MGI:5009901	Ighv1-1
IGHV8-1	12F2 (62.35 cM)	REV	780833	NC_000078.6	114332796..114333086	-1	MGI:5009900	Ighv8-1
IGHV3-8	12F2 (62.35 cM)	REV	780831	NC_000078.6	114322376..114322666	-1	MGI:3645298	Ighv3-8
IGHV5-21	12F2 (62.35 cM)	REV	780832	NC_000078.6	114320030..114320324	-1	MGI:5009899	Ighv5-21
IGHV3-7	12F2 (62.35 cM)	REV	780830	NC_000078.6	114314186..114314479	-1	MGI:5009898	Ighv3-7
IGHV9-4	12F2 (62.34 cM)	REV	636260	NC_000078.6	114299961..114300254	-1	MGI:3646379	Ighv9-4
IGHV3-6	12F2 (62.34 cM)	REV	780829	NC_000078.6	114288152..114288447	-1	MGI:4439856	Ighv3-6
IGHV13-1	12F2 (62.33 cM)	REV	780828	NC_000078.6	114267607..114267906	-1	MGI:4439855	Ighv13-1
IGHV3-5	12F2 (62.33 cM)	REV	633457	NC_000078.6	114262652..114262950	-1	MGI:3648045	Ighv3-5
IGHV3-4	12F2 (62.33 cM)	REV	629833	NC_000078.6	114253617..114253915	-1	MGI:3644034	Ighv3-4
IGHV7-4	12F2 (62.32 cM)	REV	632654	NC_000078.6	114222788..114223254	-1	MGI:4439763	Ighv7-4
IGHV3-3	12F2 (62.31 cM)	REV	668438	NC_000078.6	114196439..114196875	-1	MGI:3643949	Ighv3-3
IGHV14-4	12F2 (62.30 cM)	REV	629826	NC_000078.6	114176438..114176867	-1	MGI:4439765	Ighv14-4
IGHV15-1	12F2 (62.30 cM)	REV	780827	NC_000078.6	114158025..114158315	-1	MGI:5009897	Ighv15-1
IGHV7-3	12F2 (62.30 cM)	REV	629822	NC_000078.6	114153180..114153644	-1	MGI:4439766	Ighv7-3
IGHV9-3	12F2 (62.29 cM)	REV	780825	NC_000078.6	114140692..114141122	-1	MGI:3642720	Ighv9-3
IGHV12-2	12F2 (62.29 cM)	REV	780824	NC_000078.6	114127533..114127984	-1	MGI:5009896	Ighv12-2
IGHV9-2	12F2 (62.28 cM)	REV	629818	NC_000078.6	114109001..114109430	-1	MGI:3643816	Ighv9-2
IGHV12-1	12F2 (62.28 cM)	REV	780823	NC_000078.6	114107259..114107563	-1	MGI:5295669	Ighv12-1
IGHV9-1	12F2 (62.28 cM)	REV	195180	NC_000078.6	114093928..114094221	-1	MGI:4439911	Ighv9-1
IGHV6-2	12F2 (62.28 cM)	REV	780822	NC_000078.6	114089387..114089681	-1	MGI:5009895	Ighv6-2
IGHV16-1	12F2 (62.27 cM)	REV	629812	NC_000078.6	114068828..114069126	-1	MGI:3643819	Ighv16-1
IGHV14-3	12F2 (62.27 cM)	REV	238418	NC_000078.6	114059845..114060273	-1	MGI:4439764	Ighv14-3
IGHV11-2	12F2 (62.27 cM)	REV	780818	NC_000078.6	114048241..114048704	-1	MGI:4947968	Ighv11-2
IGHV3-2	12F2 (62.26 cM)	REV	780817	NC_000078.6	114033803..114034097	-1	MGI:4439923	Ighv3-2
IGHV4-2	12F2 (62.26 cM)	REV	668423	NC_000078.6	114013144..114013439	-1	MGI:5009840	Ighv4-2

IGHV14-2	12F2 (62.25 cM)	REV	668421	NC_000078.6	113994469..113994898	-1	MGI:4439607	Ighv14-2
IGHV11-1	12F2 (62.25 cM)	REV	780804	NC_000078.6	113981879..113982174	-1	MGI:4439535	Ighv11-1
IGHV3-1	12F2 (62.24 cM)	REV	780803	NC_000078.6	113964390..113964683	-1	MGI:4439534	Ighv3-1
IGHV4-1	12F2 (62.24 cM)	REV	780802	NC_000078.6	113948284..113948577	-1	MGI:4439536	Ighv4-1
IGHV14-1	12F2 (62.23 cM)	REV	780801	NC_000078.6	113931953..113932246	-1	MGI:4439920	Ighv14-1
IGHV7-2	12F2 (62.23 cM)	REV	780800	NC_000078.6	113912025..113912483	-1	MGI:4439623	Ighv7-2
IGHV7-1	12F2 (62.22 cM)	REV	780799	NC_000078.6	113896408..113896946	-1	MGI:4439622	Ighv7-1
IGHV5-19	12F2 (62.22 cM)	REV	780798	NC_000078.6	113884761..113885342	-1	MGI:5009894	Ighv5-19
IGHV2-9	12F2 (62.22 cM)	REV	640046	NC_000078.6	113879097..113879388	-1	MGI:4439624	Ighv2-9
IGHV2-8	12F2 (62.22 cM)	REV	780797	NC_000078.6	113877361..113877659	-1	MGI:5009893	Ighv2-8
IGHV5-18	12F2 (62.22 cM)	REV	780796	NC_000078.6	113875772..113876239	-1	MGI:5009892	Ighv5-18
IGHV5-17	12F2 (62.21 cM)	REV	780794	NC_000078.6	113859149..113859442	-1	MGI:4439533	Ighv5-17
IGHV5-16	12F2 (62.21 cM)	REV	633568	NC_000078.6	113838528..113838821	-1	MGI:4439556	Ighv5-16
IGHV5-15	12F2 (62.20 cM)	REV	780792	NC_000078.6	113826648..113826941	-1	MGI:4439812	Ighv5-15
IGHV2-7	12F2 (62.20 cM)	REV	780793	NC_000078.6	113807314..113807747	-1	MGI:4439521	Ighv2-7
IGHV2-6-8	12F2 (62.19 cM)	REV	791090	NC_000078.6	113796138..113796430	-1	MGI:4439811	Ighv2-6-8
IGHV2-9-1	12F2 (62.18 cM)	REV	791089	NC_000078.6	113769857..113770142	-1	MGI:4439519	Ighv2-9-1
IGHV5-12-4	12F2 (62.18 cM)	REV	628098	NC_000078.6	113762251..113762544	-1	MGI:3645977	Ighv5-12-4
IGHV5-9-1	12F2 (62.17 cM)	REV	641178	NC_000078.6	113736113..113736406	-1	MGI:4439810	Ighv5-9-1
IGHV2-6	12F2 (62.17 cM)	REV	630486	NC_000078.6	113716672..113716962	-1	MGI:4439518	Ighv2-6
IGHV5-12	12F2 (62.16 cM)	REV	668395	NC_000078.6	113702126..113702419	-1	MGI:4439516	Ighv5-12
IGHV5-11	12F2 (62.16 cM)	REV	777784	NC_000078.6	113687229..113687505	-1	MGI:5009891	Ighv5-11
IGHV2-5	12F2 (62.16 cM)	REV	638605	NC_000078.6	113685482..113685774	-1	MGI:4439517	Ighv2-5
IGHV5-10	12F2 (62.16 cM)	REV	777783	NC_000078.6	113669673..113669968	-1	MGI:3642589	Ighv5-10
IGHV5-9	12F2 (62.15 cM)	REV	544896	NC_000078.6	113661771..113662228	-1	MGI:4439873	Ighv5-9
IGHV5-8	12F2 (62.15 cM)	REV	777782	NC_000078.6	113654967..113655245	-1	MGI:5009890	Ighv5-8
IGHV2-4	12F2 (62.15 cM)	REV	668389	NC_000078.6	113653291..113653583	-1	MGI:3643263	Ighv2-4
IGHV5-7	12F2 (62.14 cM)	REV	777781	NC_000078.6	113634686..113634981	-1	MGI:3642590	Ighv5-7
IGHV5-6	12F2 (62.14 cM)	REV	777780	NC_000078.6	113625508..113625801	-1	MGI:4439815	Ighv5-6
IGHV5-5	12F2 (62.14 cM)	REV	777779	NC_000078.6	113612965..113613442	-1	MGI:5009889	Ighv5-5

IGHV2-3	12F2 (62.14 cM)	REV	238412	NC_000078.6	113611184..113611476	-1	MGI:4439872	Ighv2-3
IGHV6-1	12F2 (62.14 cM)	REV	777689	NC_000078.6	113603460..113603928	-1	MGI:5009888	Ighv6-1
IGHV5-4	12F2 (62.13 cM)	REV	777688	NC_000078.6	113597448..113597741	-1	MGI:4439895	Ighv5-4
IGHV5-3	12F2 (62.13 cM)	REV	777687	NC_000078.6	113589967..113590243	-1	MGI:5009887	Ighv5-3
IGHV2-2	12F2 (62.13 cM)	REV	777686	NC_000078.6	113588267..113588700	-1	MGI:4439894	Ighv2-2
IGHV5-2	12F2 (62.13 cM)	REV	777685	NC_000078.6	113578504..113578990	-1	MGI:4439893	Ighv5-2
IGHV2-1	12F2 (62.13 cM)	REV	777684	NC_000078.6	113574247..113574540	-1	MGI:4936981	Ighv2-1
IGHV5-1	12F2 (62.13 cM)	REV	777683	NC_000078.6	113572929..113573222	-1	MGI:5009886	Ighv5-1
IGHD5-1	12F2 (62.11 cM)	REV	777682	NC_000078.6	113526800..113526809	-1	MGI:4937117	Ighd5-1
IGHD3-1	12F2 (62.11 cM)	REV	777681	NC_000078.6	113525313..113525329	-1	MGI:4439891	Ighd3-1
IGHD1-1	12F2 (62.10 cM)	REV	777657	NC_000078.6	113482170..113482192	-1	MGI:4439871	Ighd1-1
IGHD6-1	12F2 (62.10 cM)	REV	777680	NC_000078.6	113480143..113480171	-1	MGI:4937254	Ighd6-1
IGHD2-3	12F2 (62.10 cM)	REV	777679	NC_000078.6	113475400..113475416	-1	MGI:4439708	Ighd2-3
IGHD6-2	12F2 (62.10 cM)	REV	777678	NC_000078.6	113474875..113474903	-1	MGI:4937120	Ighd6-2
IGHD2-4	12F2 (62.10 cM)	REV	777677	NC_000078.6	113470694..113470710	-1	MGI:4439709	Ighd2-4
IGHD5-2	12F2 (62.10 cM)	REV	777676	NC_000078.6	113469426..113469435	-1	MGI:4936898	Ighd5-2
IGHD2-5	12F2 (62.10 cM)	REV	777675	NC_000078.6	113466027..113466043	-1	MGI:4439705	Ighd2-5
IGHD5-3	12F2 (62.10 cM)	REV	777674	NC_000078.6	113464761..113464770	-1	MGI:4937297	Ighd5-3
IGHD5-7	12F2 (62.10 cM)	REV	777673	NC_000078.6	113464524..113464552	-1	MGI:4936973	Ighd5-7
IGHD2-6	12F2 (62.10 cM)	REV	777672	NC_000078.6	113461369..113461385	-1	MGI:4439865	Ighd2-6
IGHD5-4	12F2 (62.10 cM)	REV	777670	NC_000078.6	113460101..113460110	-1	MGI:4937058	Ighd5-4
IGHD5-8	12F2 (62.10 cM)	REV	777669	NC_000078.6	113459864..113459892	-1	MGI:4937171	Ighd5-8
IGHD2-7	12F2 (62.10 cM)	REV	777667	NC_000078.6	113456720..113456736	-1	MGI:4439866	Ighd2-7
IGHD5-5	12F2 (62.10 cM)	REV	777665	NC_000078.6	113454942..113454951	-1	MGI:4937334	Ighd5-5
IGHD2-8	12F2 (62.10 cM)	REV	777664	NC_000078.6	113450851..113450867	-1	MGI:4439706	Ighd2-8
IGHD5-6	12F2 (62.10 cM)	REV	777663	NC_000078.6	113449588..113449597	-1	MGI:4937234	Ighd5-6
IGHD3-2	12F2 (62.10 cM)	REV	777662	NC_000078.6	113448214..113448229	-1	MGI:4439707	Ighd3-2
IGHD4-1	12F2 (62.10 cM)	REV	777661	NC_000078.6	113430528..113430538	-1	MGI:4439801	Ighd4-1
IGHJ1	12F2 (62.10 cM)	REV	777648	NC_000078.6	113429781..113429833	-1	MGI:4439802	Ighj1
IGHJ2	12F2 (62.10 cM)	REV	777654	NC_000078.6	113429468..113429515	-1	MGI:4439803	Ighj2

IGHJ3	12F2 (62.10 cM)	REV	777655	NC_000078.6	113429085..113429132	-1	MGI:4439767	Ighj3
IGHJ4	12F2 (62.10 cM)	REV	777656	NC_000078.6	113428514..113428567	-1	MGI:4439658	Ighj4
IGHM	12F2 (62.10 cM)	REV	16019	NC_000078.6	113418826..113422730	-1	MGI:96448	Ighm
IGHD	12F2 (62.10 cM)	REV	380797	NC_000078.6	113407535..113416324	-1	MGI:96447	Ighd
IGHG3	12F2 (62.10 cM)	REV	380795	NC_000078.6	113357442..113361232	-1	MGI:2144790	Ighg3
IGHG1	12F2 (62.10 cM)	REV	16017	NC_000078.6	113326544..113330523	-1	MGI:96446	Ighg1
IGHG2B	12F2 (62.10 cM)	REV	16016	NC_000078.6	113304314..113307933	-1	MGI:96445	Ighg2b
IGHG2C	12F2 (62.10 cM)	REV	404711	NC_000078.6	113287389..113288932	-1	MGI:2686979	Ighg2c
IGHE	12F2 (62.10 cM)	REV	380792	NC_000078.6	113269263..113273248	-1	MGI:2685746	Ighe
IGHA	12F2 (62.09 cM)	REV	238447	NC_000078.6	113256204..113260236	-1	MGI:96444	Igha

图30

SEQ ID NO.1 Cγ1ΔCH1 敲进序列 5193bp （人工合成序列）

```
gtgagaggacgtatagggaggagggttcactagaggtgaggctcaagccattagcctgcctaaaccaaccaggctggacagccatcaccaggaaatggatctcagc
ccagaagatcgaaagttgttctttcctgagatttctatgtccttacactcattggttggattcccacacatcttgacaaacagagac
aattgagtatcaccagccaaaagtcatacccaaaaacagcctggcatgacctcacacagactcaaacttacctacctttatcctggtggcttctcatctccagac
cccagtaacacatagctttctctccacagtgcccagggattgtggttgtaagccttgcatatgtacaggtaagtcagtaggccttcacccctgaccccagatgcaac
aagtggccatgttagagggtggcccaggtattgacctatttccacctttctttcttcatcctagtcccagaagtatcatcatctgtctttcatctcccccaaagcccac
ggatgtgctcaccattactctgactcctaaggtcacgtgtgttgtggtagacatcagcaaggatgatcccgaggttccagttcagctggtttgtagatgatgtggag
tgcacacagctcagacgaaacccgggaggagcagatcaacagcacttcccgttcagtcagtgaacttcccatcatgcaccaggactggctcaatggcaaggagttc
aaatgcagggtcaacagtgcagctttccctgccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaaggtgagaagctgcagtgtgtgacatagaagctgcaatagtcagt
catagacagagcttggcataacagaccctgccttgtccatgacctctgtgctaaccaatctctctttacccacccacaggcagaccgaaggctccacaggtgtacac
attccacctcccaaggagcagatggccaaggataaagtcagtctgacctgcatgataacaaaacttctttccctgaagacattactgtggagtggccagtggaatgggc
gccagcggagaactacaagaacactcagcccatcatggacacagatggctcttactttcgtctacagcaagctcaatgtgcagaaagagcaactgggaggcaggaaata
ctttcacctgctctgtgttacatgagggcctgcacaaccaccatactgagaagagcctctcccactctcctggtaaatgatcccagtgtcttggagccctctggtc
ctacaggactctgacacctacctcccaccctccctgtgtaaataaagcacccagcactgccttgggaccctgcaatgtcctggtgatttctgagatgtgagatgt
tagctaggtcatggaatgagggtctccatggtttgaggcctgagttgtgactaaggaaaaacccatagcctacactgccacacccagcactttgaatttgcctc
acatgaaaagaatttacctctccctggaaagtggagccttatcccctagcagttcccttactagcttgcacttttgttctgggcacagaatgtgtc
taacccccaaagcaaggaagacacaacctctacctccctcactctgtccttaccccttttcctggctaagcatctcactgagtgcgctgaataggatgcatgtggcc
acagtcttgcagacagaccctgccatctctccactcagctttccagaggctaagtctagccgtatggtgataatgcagggagctctatgctatctcagtgctatc
agactcccaagtggaggatgaacatggacccattaaaaccaacctgcgcagcaacacccctgccaataaggcccgtatgtgaaaatgtgcacacatctacacatgca
aggcacacacacacacatgcatgggcacacacatacagagagagaatcacagaaactcccatgagcatcctatacagtactcaaagatacaaaaggtaccac
gtctacccacatgatcatcctcggcatttacaagtgggccaactgatacagataaaacttttctatgccaaggacgccaacatatacacaagtccgctcatgacaaa
tctgtccctgaacctcagactggcgcccgtgactcatacagtggacactcctccaaagctgtatagcttcctttactcctgtgtgtactttctctgaagtacact
catcacacagaagaggccctgtgattactctggccctctgttcttggtcatcagagaatagacagaagatcagggcaaactacacagacactcccacaatcatcac
ggccctgactctgctctccagtctcaaaactgaaggctggagcacacagaataagctcctgcacaggccagtatgtgtctgactgagcccac
ggacaaaatggcagcactttgggaactgaggtttctggtccaagaaggagagatggaggcccagggaggtctgctgtcccagcccagctgcagct
ttctcctgggcctccatacagcctcctgccacacagggaatggccctagcccctcctcctgtccagggctgcaactggacc
agacctgtgctgaggcccaggacgggagctggacggctctggacgaccatcaccatcttcctcagctgtgtgctacagcgctgctgtcac
ctcttcaaggtcagccatactgtccccacagtgtctacaatgtcctcatactcttccccatactgtccctgtggtgacctatacccacactgtcccatgctaatg
ccacagtcttacatgctatgtaatgctgtctacccttctgtatgcacagtctcacaatgtccatgcagtctccacgatgctccccattccaacccat
gctgccccttgttcccggctatgctgtcccatgctatttgtctgtatttcatgctcctagtgtcacattctgcccatgttgtccaccacatttc
tccccactctgtacacagcctcacactgtaccctgctacccgataatgttccctgttgtccccaactctctccctgcaccatttgtcaactgtcccctgaattccca
tgttgttcccacactgttagtgtgctctgtcccaggtgtacctttgttccgtgctgtctcacttcatcgcccattctgtcctttgtactaacccccactctat
caccacactgtccctatgcactgcccacatattgtcctcatactgtccccatttgtatctcatccctgtcccatagtgtccaatgatctacccacactattcccact
tcatgcccctacaatttccctattccatctctctggtcaccatgccatcctttcccactcctgcacagctggagagggactcccgggatgagtccttgcccagat
agctacctatctagaggagtctcaggtggaagggaatgcagtcttgatcttggtctattcaccctgtctcacaggtaaagtggatcttctcctcggtggtggtgga
ctgaagcagacactggttcctgaatacaagaacatgatgggcaagcaccctaggccaccctcctgtaatggcatttcccaggccccgaaggaccctgtccaatatgc
caagcagcacaactgagatcacactgtctgctcatctcgcttttcctccgaccccgagactcagctactctcaaatttttccctctctgaaggaccatgtggacattac
attgctccaggccacagccaccaggacctaaaacaccatcacagcagcaccaaagacactggatagacccacaagggcaatagtttcctcaacagtatatcccaaact
```

gttgggacaaacgagcaatcactgaagaagtgacaagttcccacaatgtcagtgtccagctgagaagggacaaaaagtggtaccagccctgtccacaccaccttcta
attcacaggaatacgtgatagaagaggcaggttgtagatccgaaagatgagacagattttatcaactccagaaagagctgggtccaactgaattattctagcgacct
tggcattgtcatgacctgccatgaccttcctccttaacacttcgataaaccctgggatatggaaaatgcctgtgtttctcagggtttgggaaagaaccatccatgtt
gggattcttgtgtagatcctccttctggtcacagatgcaatacactggattttcaggcaaaggagcaaattcacagacaactctggccctacagccctaagacctag
acaccaccatctccttggaattatcaaatttaacacccggcacacaacaaagaaggactgggactttgaggcctttgtgtagccctagagggggcagaggccactga
gcagggattgggtgatcacaaggacctcctggagagggacctgaggagcaggttccaattgggccaaagaaagaagaacaacaatagagatgaaggatgctggaaag
agccatggtacagcagtcttgtccttcagacatgactcttacagcccaggactcttacagtagctagctggagcagaagtccaagggattaccatgccctagggcca
caggctactggagggtggagtgagtctactacacaggtccaatgcctgtttctccattgcttctcagccaatgagaaatcagagtctccacctccaagaaaaaggaa
ggtggaaatgaaaggtgagcacctgccttcccgtgactggcagaaagatctccacggactcaaggctttgacttcaaacttcccgtagatccctgatgtctttaagg
actctgtctgctttgttggttttgtttgtttgttttgtactttgtcaataaaacatttttcaaatattctacaattgctgtgctcttcctatgcaaactggccctgg
cacttcaaaacatggcacagttaagttgaccagtgggccatgcagagcatactacccctcctggtcctgtgtcctaccagatatcctctaagtgtcccttcactgct
gggctccagttctgctgccctgaaccacacaggtcctcagtctgtcctccctatggg

SEQ ID NO: 8: Sμ 和 Sγ1 之间的连接序列

ttcctgtggctagaaggcagctccatagccctgctgcagtttcgtcctgtataccaggttcacctactaccatatctagccctgcctgcctaaactgagatggg

SEQ ID NO: 9: Sμ 和 Cγ1ΔCH1′之间的连接序列

aggcaagaagacagattcttacccctccatttctcttttatccctctctggtcctgaggacgtatagggaggaggggttcactagaggtgaggctcaagccat

SEQ ID NO: 10: 连接序列

ctgacaggaggcaagaagacagattcttacccctccatttctcttttatccctctctggtcctaaccaaaccctcccagcaggggtgcccaggcccaggcatggccc
agagggagcagc

SEQ ID NO: 13: CμΔCH1 敲进序列 4959 bp

aaccaaaccctcccagcaggggtgcccaggcccaggcatggcccagagggagcagcggggtggggcttaggccaagctgagctcacaccttgacctttcattccagc
tgtcgcagagatgaaccccaatgtaaatgtgttcgtcccaccacgggatggcttctctggccctgcaccacgcaagtctaaactcatctgcgaggccacgaacttca
ctccaaaaccgatcacagtatcctggctaaaggatgggaagctcgtggaatctggcttcaccacagatccggtgaccatcgagaacaaaggatccacaccccaaacc
tacaaggtcataagcacacttaccatctctgaaatcgactggctgaacctgaatgtgtacacctgccgtgtggatcacaggggtctcaccttcttgaagaacgtgtc
ctccacatgtgctgccagtgagtggcctgggctaagcccaatgcctagccctcccagattagggaagtcctcctacaattatggccaatgccacccagacatggtca
tttgctccttgaactttggctccccagagtggccaaggacaagaatgagcaataggcagtagaggggtgagaatcagctggaaggaccagcatcttcccttaagtag
gtttgggggatggagactaagcttttttccaacttcacaactagatatgtcataacctgacacagtgttctcttgactgcaggtccctccacagacatcctaacctt
caccatccccccctcctttgccgacatcttcctcagcaagtccgctaacctgacctgtctggtctcaaacctggcaacctatgaaaccctgaatatctcctgggctt
ctcaaagtggtgaaccactggaaaccaaaattaaaatcatggaaagccatcccaatggcaccttcagtgctaagggtgtggctagtgtttgtgtggaagactggaat
aacaggaaggaatttgtgtgtactgtgactcacagggatctgccttcaccacagaagaaattcatctcaaaacccaatggtaggtatccccccttcccttcccctcc
aattgcaggacccttcctgtacctcatagggagggcaggtcctcttccaccctatcctcactactgtcttcatttacagaggtgcacaaacatccacctgctgtgta
cctgctgccaccagctcgtgagcaactgaacctgagggagtcagccacagtcacctgcctggtgaagggcttctctcctgcagacatcagtgtgcagtggcttcaga
gagggcaactcttgccccaagagaagtatgtgaccagtgccccgatgccagagcctggggccccaggcttctactttacccacagcatcctgactgtgacagaggag
gaatggaactccggagagacctatacctgtgttgtaggccacgaggccctgccacacctggtgaccgagaggaccgtggacaagtccactggtaaacccacactgta
caatgtctccctgatcatgtctgacacaggcggcacctgctattgaccatgctagcgctcaaccaggcaggccctgggtgtccagttgctctgtgtatgcaaactaa
ccatgtcagagtgagatgttgcattttataaaaattagaaataaaaaaaatccattcaaacgtcactggttttgattatacaatgctcatgcctgctgagacagttg

tgtttgcttgctctgcacacacctgcatacttgcctccacctggccttcctcctacttgccagtttcctcttgtgtgaactcagtcaggcttacaacaga
cagagtatgaacatgcgatttcctccagctacttctagatatatggctgaaagcttgcctaacctggtgcaggcagcattcaggcacatatagacacacatgcatt
tatacatagatatataggtacacatgtgtagacacatacatgaatgtgtattcatggacacacagacaaaggtacacatatatacacatgagttcatgcgcacacac
atgcatggacacttacaaacgccttcagagacaaatagccatagacacacaacccactcacagaaacgatacccatgctcctgtgtacacagaaacagact
ataggcaaatatacacaaataaactatatagatacaaagatatgcatatacacacatgtacagaaacatcttcacatgtgtacactaacatgtgaacaggtatagca
cacagatacacctggactctgaccagggctgtaatctccaaggctcacggctcagagagcctacactaggctgggtcactgatactcctcaggagcccactctatga
ttgggagagataacccccaggtacaaagtatgcctatctgtctcaacaccatgggcagaagatactccactaaccacccatgacagaaagttagccttggctgtgtc
tccattaatagaacacctcagaagaccaatgtgaaattgcctaacccactcacaccctgatctccagttcaaaatgcagaaaacatataatgcagttgtccaaaa
gatgcccaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacatcaaggagcctctgtaaggagtcaccacccaat
aacactgcctctttgggctcatatcctgacattcttcatattcatatccattgggcctaggctttagatatcccccaagggctcatctttacagggatcagagat
cccaataaatgcccctggtcccacagcctccctcaggtatctgtctgtttatctcttggtaccaagacccaacattgctggcagggtaggacaagcaacgcacgggga
actctgatcaaagaaagtcatgagatgcctgagtcctcaggaagtaaggagggacaacctctggtatcccctgttcttattgctaaagcccaagagacagggagacc
tgctctaaaattctcagtctaaacagcaccgatggcaccacctgctcaggaaagtccagagcacaccaatatcatttgccacagttcctgagtctgccttaccca
ggtccatacattgcatcttgtcttgctgccccagggctcctggaacaaaggctccaaattagtgtgtcctacagcttggcctgttctgtgcctccgtct
agcttgagctattagggggaccagtcaatactccgctaagattctccagaaccatcagggcacccccaacccttatgcaatggctcagttgccttgtgcttgac
cctccctctctgtgtccctccttcatagagggggaggtgaatgctgagaggaaggctttgagaacctgtggaccactgctcctcttcctcagtccttctcctgag
cctcttctacagcaccaccgtcaccctgttcaaggtagtgtggggctgaggacacagggctgggacagggagtcaccagtcctcactgcctctagcctctctac
tccctacaagtggacagcaattcacactgtctctgtcacctgcaggtgaaatgactctcagcatggaagacagagacaagaccaggaatcctcccacagggacacta
cctctgggcctgggataccctgactgtatgactagtaaacttattcttacgtctttcctgtgttgccctccagctttttatctctgagatggtctttctttctagactga
ggagagggagagggagagagagagagagagagagagagagagagagcatgcactctaacagcaaagtacacaacacaggcagccaatggatagcact
ctggttatctaccctgatggaagaagtagggcagagaaaattccaggcctaatctcccaaaagcaacagaacctggaaactagcctctagcctttaggtctct
gctctgtcccagcccaccatcttgggctggtgttgcttcaagctagtaatttaggtctttatcccaaagctttgtggtatgtgcctttgggagttggctg
agatttgaagatgtttgtacctctcccacaacatgacaagccctagggttagtcaataactcaaattctctgtctatgactatatgaagaa
atgggataaagatgctatagtcactcgaggacagataaggcctgctcacagagcaagaatggaaaggagaggcaggttcatgggcttcagttcagagaaggaa
gcacagcaaatacaaggtgagggccatgctagttactcccttgttcatcatgtggacagctagagaagcccactgacatgggaagtctgggctaactgactacattg
agaggaggaccaggaagcagggcatgagagagaacatcagaccatgggagggatctgtgtagatgccagggtcctaaagagagtctttaaataaatgtgtgggtag
cacttggtgatgtccctttctgagttgggattctagtgggtagctgcaggatacagagagcagaaatcatctaatgggaaaccactgtagagatgataggactccg
tcaccaaattccagatatattgtagtcattcaccatg

SEQ ID NO: 41　　CδΔCH1 截进序列　　8505bp

tcaatccctggaccatgcagaagggccttgtgggacttcctcataccacactcagctaatcccccaaagattgactgaagcaagacatcccccccaactttgatccctc
ccctccttgctcttcccccattcattccctccctttttctcagctgcttcatcaacacacacttgacatccacacctcagaaaccctgtactaacagtgcaaggat
gcagctgggtgagcaaaggcactagctatgcatggtccctccttcatagcagtaccattcctgtggccctcctctcactgcgttccatcacccctgggctccac
ggaatactctgatctctcaccatcacttttgtcacatcttctttaacccagagtcatgggattcccagtcctctaagagagtcactccaacttctccaagcaaagaa
tcactccacagaagccacccaaagctattaccacccaaaaaggacatagaaggtaagaagttccaatgtgccaactcatcttctcaacctttacacctcttgctcctggaa
accctccatgactctttctctgagctgtcaatgtacatcctaggtagaacaggttactaaaatgactttctgtactactgcaagccaggccttatatccaggcacaac
aaataccaccacctaaccctgagaagccatcatccctttttgagctaatgctaaacagaggaaggacaaggacctacttagcccatagggacctctgtgtatc
tgatccaaactgtgaggtcctcatggattctgtagccatgtgaccagacaaacaacaagacatttctgaggtgcataaagaatctcattaaagggctagagaccatta

cacctagattggaagacttattgtaccccacatgttgtcttcacctcttcctaactattctctctctctctctctctctctctct
ctctctctctctctcacacacacacacacacacacagagcctaactagtgttggaagatagggaagcctaggattagcctggccttcagaatacagaat
agggacatagagaatagctgggggcaccaaagaaacctacaaaaaagtcacacagaagcaagcatgggtctgttcaggcagcactgggcatctctaggagctagacagt
gaccaggagaagcaatgtctccaacatagggcctttcctttaccaagccttgggcccccaaggcaggcagcctatttttctagatgaaacctatcccacccacccca
aggctgtccaatgcccccacctaaccatatgtcctcccccaacattgttcaagccataactgtaatcagataaagaggggatttcctctgtcctctcacacatttc
tagatacctccatcccaaacatgacaagattagcctcttgccacttcttcctttgcagggggccatggcacccagcaacctcactgtgaacatcctgacacatccaccc
atcctgagatgtcatctttggctcctgtgtgaagtatctggcttcttcccccgaaaatatccacctcatgtggctgagtgtccacagtaaaatgaagtctacaaacttt
gtcactgcaaacccccacccccagcctgggggcacattccagacctggagtgtcctgagactaccagtcgctctgagctcatcacttgacacttacacatgtgtggt
ggaacatgaggccctcaaagacaaagcttaatgccagcaagagcctagcaattagtggtaagtcacaactgggtaagagtgtcaagcaaggacagcacttggtaccta
tgatagacaaaatactcctgtttgggaagaggaggtctgcattgtctagataaggaggaacactgtgctttcagtttaaaagacagaaactacataacacttc
accctttctacaacacttagatttttcagccctcctctatggtgttcctgaaccctgaagaaagtgatatagatgtttattatttctagggccactgttcca
aagaaacaatcacgtattattagcagcttgaccaggtgtgaatttcccccagtatccacttctgctccctgtgggatgaagtccctcccataagtaaagttgaaggct
gtgggcataaatgccaaatgcctgtaatccaatttacaaatccatgacatacatttaacaaacaatagcagttacttctctactgagacctgcccagcta
taggttttttccctctgcagagcagagcttaaatccaatagggaagaagttggttgtacccataactgccatacccattaagcacatcttacatagc
aagacaattagtgtagcactcaaagtccatgttcaagagagaatgttggcaacagcctatataacatctcccagcacagaaaagaaaggaaaggaaa
aggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaggaaaag
aaaagaaaagaaaagaaaagaaaagaaaagaaaagaaaagaaaggaaaagaaaggaaaagaaaggaaaagacagcccagaaggcagcttccacttcagctccta
tatgtcttacagccaaggttagtgaagtctctagcagtaggaatttatcatctactcttggcatgcaagtaaaatcaatggtgataacttttgtggtttgtggctcc
ttgggagcctccctgaacaatatttatgcagaggtagcccagctttgccactgggcttccattaacaaactttggattgagggagtgtctttttctacctgcac
acagtgattcctatgtttttaactcttaatgagtcactgttgtttgttgtgttgttattgttgttgtttctatcaacccagacact
atagggctataaggcaggtggaagcatcactggctccagctgttctcagtcatgctcttcctatcaatgtttgtgtaatgactgcccctttttactgtcggttttcta
tgggtgcctatggataacgctgggttgggcgaaaccctgatggcagctttcccactgcttgcttatccatgtaggtgagagcacattcactctcacttgagaggc
ttaggccttttatgaagtctgcctgacatatgggataggtaggcttatatgcttacccatcatgcacccatgtgctggtaccataagatcagacctcacctgtt
catgtagcatgcagaggatcagaatatttcacaagaatgccagaagctctcattactctgggccttctcttaaagatcacatcctctaacaaagcttaccaaagcc
actaacatctgagttagtcctactcaggtacacatttcttaatgctccagcaaaagcatctctacccacttcattgggcactaaacaccacttctcacatgtttaga
gttttttgttaagacttttaaattatctttcagtcatgtctgatgttcatgggcacctcagccagtaataactgagtgtttctggtgtgtgcaggttttttgtctgttt
tgtgttgtttatatgccaggaaaaagctgtttagtacagatctaattggcattcccctccttcttcatggtgtggtgtttctacttctgttgtttctccacttt
gcaggggagagggctagaggtcaatggaatgatttcccgagtttccttggataaatgaaaccttttgtctcagggaaggaagaatggttctactttctgtttctccacctt
catgatgctgactctagcctcttccatgcccgtgtctccaggctatgaaggaatccagcatgctttctcttcctttcttatctttcttcatgggttccaagtgg
gttcctgtggtttccacaggaaaggctttttagcacaaatctgatctgtactgtctttccttttatcccctgccagctctgagacaggaaagccagcatctctatcaga
atctctctttttgccttcagaatcagagaccactgtgaaaggcagcatccgtgcatctttttttccattgtactccttcattacgtgagcaagatttttctaagcaga
tagcttagccttcatcgcacatcttagcacacactgcaaatgtcacacagacagacttgctatgccatcccatgtatactatttcaaggattgcaatacctttctctg
atctgaaatccattcaagtaaaacaacatgttgcaggtccaattcaagaggcatgccacctcataccatataaaagaagatggtcagcaaaaattcctgctctctca
gacaactcagacttgggagcagaaattcctatcacctctagcagggagtaaacaactactacagctggaagcatactatctcctaccataaagatgctagctt
ctctgacacacttagacctgaggcaaggaatcctctgcctcatttctttcgtctgctggaaagcctacaggactaaggcttgtaagcttgacacaaagcttgaggt
tgaaaggtgtcagacaggcttcacctgagggccctatatatgagtgtagtgaggatggaacaggctacgtgggcatcctccgcatcttgtcctcagagtggcct
tcagagcccaggctcaagtcagccatactccttgaactctggaaatgccacagtatgtccacacacctccacacaaattgagagaggacct
agtgggactgcagcaatcacatgaggccatacctggaccaagccaagctgccagtataacagtcgtggctctgagatttgaaagcttggtctgttgtctatgcctcg
ggatctttgggatgccttaggatccatcgagaaagttctagagatcatgcctgtttctggctgcactgtactgactgtgagaacagggctacagcaccactgtttctc
atggcctacttcctgccaggtggtgcctcattagtactgaaaggagcctgacctacacttgccccaaattggccttttcttttccctgtggcattggttcctcaaa
ggacactaaggtttttctcttacttgactcccctcaggatctctctacagatttcacaggtcactcctcagagctagagtcataccagcatgactatcctctgcccac

attcacacagcatgcttaggaagtctgggcatgctctgtagtcatcttcattaggttgttcccacctgcctctctatctgcccctgcccccacttcccctttgttctgc
ctgttggtctctccctactctgtgcttcacatgtcttgaggtagatacatctgcctgagtctcccacataacacttctttcatcacaccaaccccctgagaacaataatgt
tcttagttcttgtcgactagcacctcctgacttgtctctatgatgccattcttccctcctacccatccatcaccctgttgccaaggcactctctgagacatcttgtt
tctacatagatacagaagaacatttgattaggccatgtggtgaaagaaaaacaccaagtaaactttttaacatcacaatttttattttaaaactactagagagg
actcagcaatgctcaaagagactaaattcccaggtgaaaggagatgggatgttgtattctaggcacagacagacagagcagtgggacatatgtaatcaccaagaaat
cagccaaatttttaataaacaccttagctgccgagagggatgagaacacagaagaatcccaaattctgagccaatcaccactcacttaacctcccacccaggacact
gctaagcaagaaacacctcgagcacagtgtgggcagaatatccatcttgtaccagctccaaggcctgctgaatataaggttatcccaaagcacctagagccagaa
gtcaactatgataccccagctccagcacagctcagttcccagttccaaaaaacaggtcttccatgcctggtggataagatgatatgcacttgtatctcacccccaga
ctctacaatccatgtatatacaatgcctagcatgcaatcagtaattacaaagatacaaatgattgataaccaagacagagacagtacatgggattagacctgaggtac
gggaaaggttgggaaagcattcatagtgtcccttgctacaagaagtcccagagcttgcagggtgtgagcagattctaacctcccccattggcaagtcttctcaaag
ctgcttctgctactagagaaccctctttcccagccacctgccactatttatcactgattctaggatgctacaccacctcctgcctgagtca
gacggtcctccaggagacctgatggtcctgccttgcctgagacctttctaggctgaatggtcatcatgtctctggttagcttggttgcctctgtgttaag
ttgcttcatactacatgtagcaaggaaagttacctttccacttctcaggacactgtaaagaagcacttctgtaaattatagtgagaaacgatcaataataaatgaaa
tgaacaaacataaacctctcttatctctatgggacctgccctaaggcctcttgtggatgcctgaaaccttgagtgttcttaagccatgtgtcacttcagtcattaac
ctgtggctgaggtggatcctgactgacaaacagacaggcatgtagacagcttgaagcctggacaaagagaagttgacgttccaggcaaagcaagagcctatcacat
tgttccaaagtgtgtgatttagaatcagaagatttcttgtttaaaatatactcaaaaagttataaaatatcagccaggactagtcataaagcttaaatctgagagag
agagagagagagagagagagagagagtgttcatgtatatacatatgtgtgtgtgtatatatatgtatatgtatatgtgtttggg
tgtcagattccctggaatttaaagttatataaacagttatgagctgcaaagtaggctttccaatgtcttgttctccaaccatagggtaattgaaactggaaactacaggta
aaggaggctgccaagtgtttcttattatgctaagattcagtgttctacaatattcacatgatttcactttgatatggtgaaatgcctttaggccaacgcatccacag
acttcacagtgaccccagctgagcttacatataatgtcaaacagcacttgttgaatagatacccaggcagccctgtgaccatggtgtttttcttaattctctcccat
ctgccttggacttttcacaccttgagttgagatgtgctttctgtagaaatgtatttcccctaggtctgtacatcagccaccaccacccttttctgatcttggaccatacttcca
gtctccagctgggatattcatatgcttagatatggcataaccatcgttaacgtcttctgttacctttaggattaagttaccgtagctaggatgctttccaatc
tctccctccattgcaaaggctcagggttccttctgactctggagtagtactcttcccaatgagtgcaccatgaccatattctcttccttaattactcccctt
tctctgcctttttcatggcacatctttctgagaaaacctacctggtctagctgctctttctgggtctcttcttaagtagtaacctaactcctgcaccatccgtgtggca
gtgacatagatccacatcaggtttggattcagatattccaatcccatgcagaccaatctatgtgtgagattccaggatccagcaggctgggtgagtggt
aggattctttgggcaaagtggttagtaggcacttgggactggaagtgataagtattagcgggaggagggcatatgatcaaaacattgctgctggatgtgaaagctg
tacttcaggttcagtgttcaggagaccaggttaataagaaatgatctttctgtagggtggagacctctcatgagcatagtcaacacc
atccaacactcgtgtatcatggatgagcaaagtgacagctacatggactagaggaggagaacgggcctgtggcccacaatgtgcaccttcgtggcccctcttcctgct
cacactgctctacagtggcttcgtcacctttcatcaaggtaggcctcctaccacctccttctgaacccttcctgggcacatgtaagatacccttccagggggcatttg
aaacccatcggtacttctggagtggctagggaatgcacaagtaattgggaggccatggtcactgttcagcttctgggccctatgtagctcccacggacttttccctgtt
tctcagacaacagcctctgtatgacttcacgggctctctggcaggtgaagtag

hTFR1 (SEQ ID NO: 70):

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESP
VREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVE
NPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQF
PPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTALLLK
LAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKL
TLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWL
YSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANAL
SGDVWDIDNEF

FasTFR1 VH (SEQ ID NO: 71):
MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSALGGGGSCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDF
TSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLD
SPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCP
SDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSSVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSV
GATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGT
TMDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLN
DRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLSALLESLKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF

JR141 VH (SEQ ID NO: 72): EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWLGWVRQMPGKGLEWMGDIYPGGDYPTYSEKFKVQVTISADKSISTAYL
QWSSLKASDTAMYYCARSGNYDEVAYWGQGTLVTVSS

JR141 VL (SEQ ID NO: 73): DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS
RVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGTKVEIK

嵌合 TFR1 蛋白 (SEQ ID NO: 74)
MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAADEENADNNMKASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESP
VREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVE
NPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQF
PPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTALLLK
LAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKL
TLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWL
YSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANAL
SGDVWDIDNEF

人 IgG1 Fc 区 (SEQ ID NO: 75)
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

具有 N297A 突变 Fc 区的人 IgG1 (SEQ ID NO: 76)
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

图31

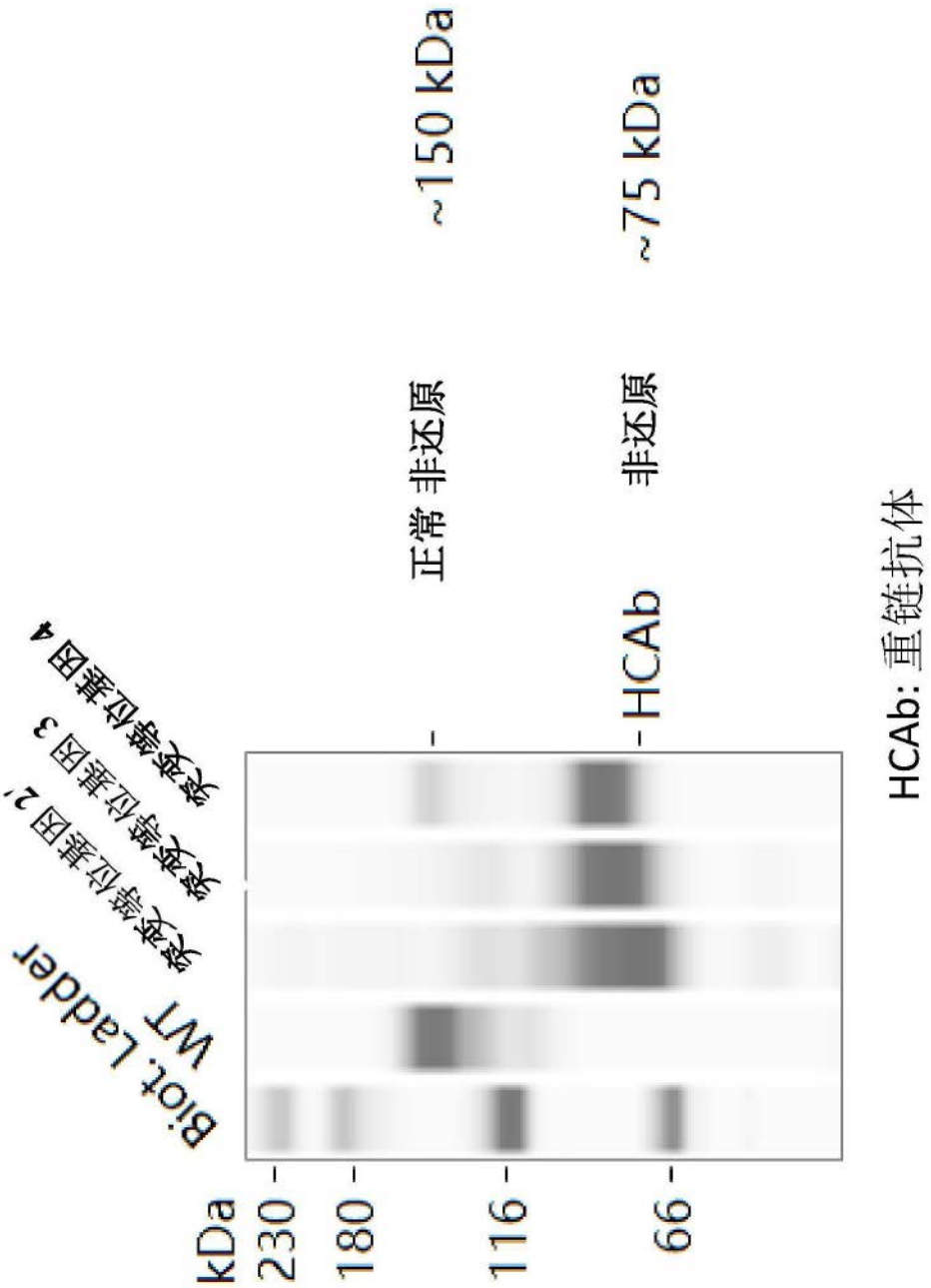

kDa
230
180
116
66
Biot. Ladder
WT
突变体位置图 2
突变体位置图 3
突变体位置图 4
-
HCAb
正常 非还原
非还原
~150 kDa
~75 kDa
HCAb: 重链抗体

图32

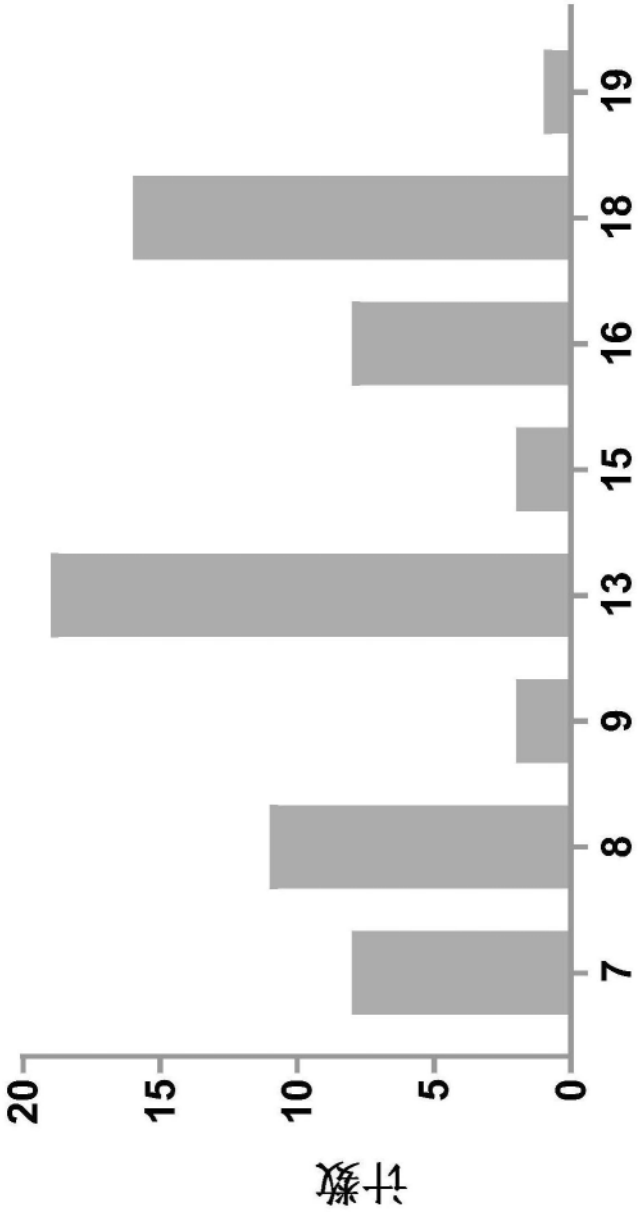


图33

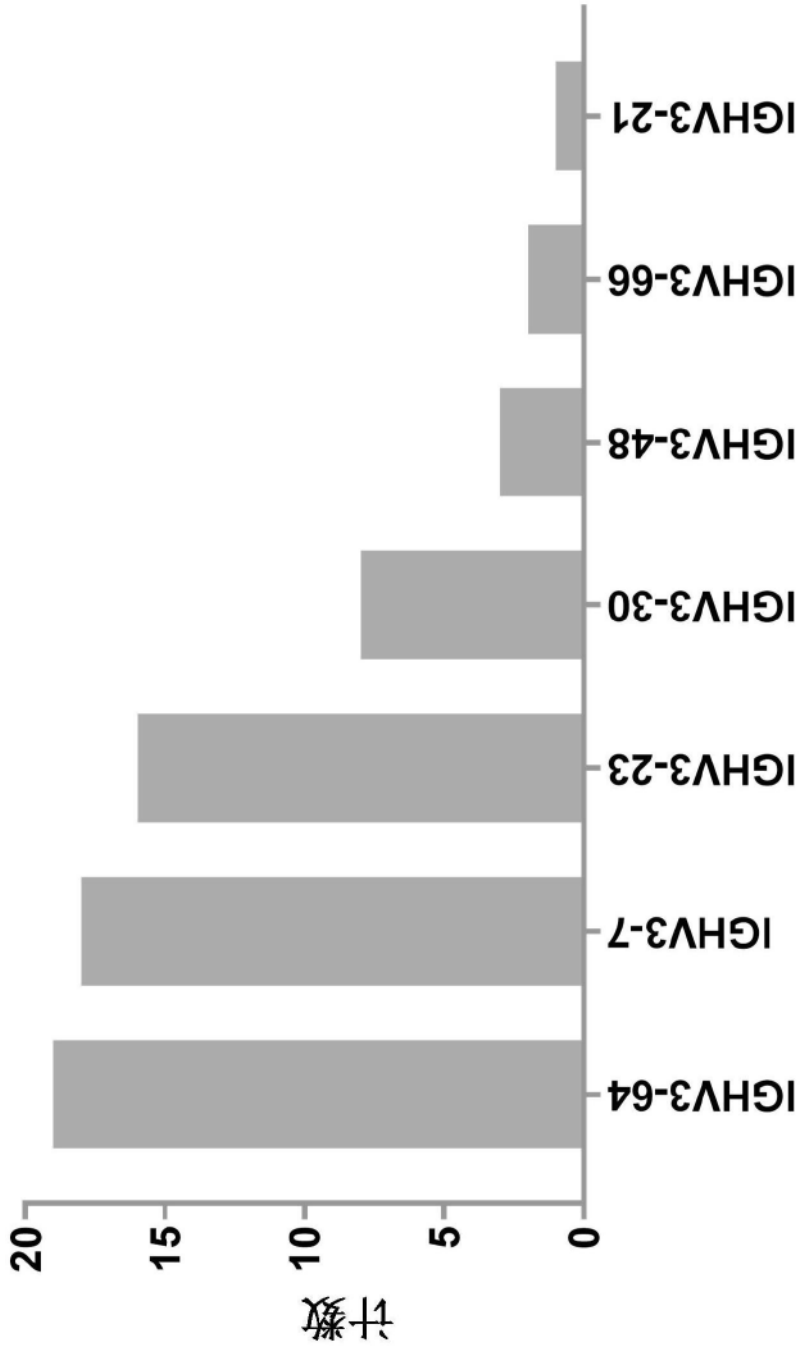

IGHV3-64
IGHV3-7
IGHV3-23
IGHV3-30
IGHV3-48
IGHV3-66
IGHV3-21
0
5
10
15
20
计数

图34

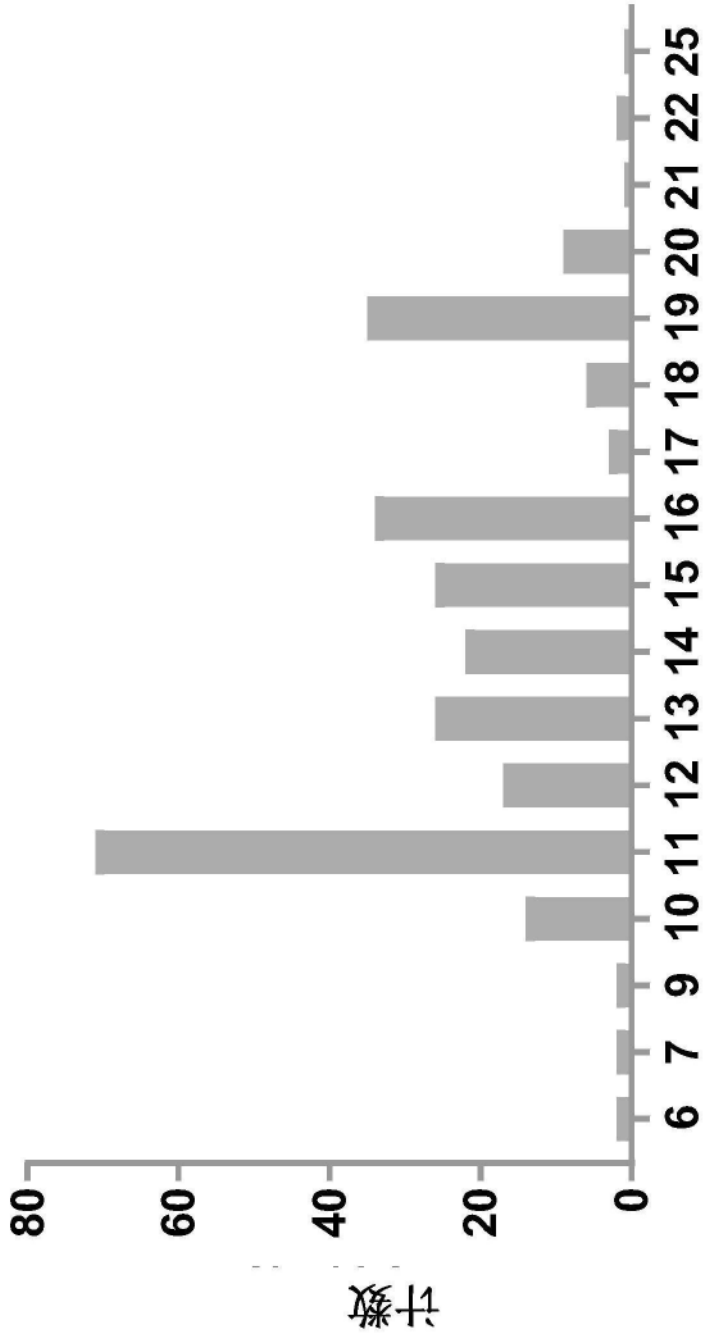


图35

IGHV3-23
IGHV3-48
IGHV3-7
IGHV5-51
IGHV4-39
IGHV3-30
IGHV3-21
IGHV3-33
IGHV3-20
IGHV3-74
IGHV4-34
IGHV3-30-3
IGHV3-66
IGHV3-15
IGHV5-10-1
IGHV4-59
IGHV1-18
IGHV4-30-4
IGHV3-43
IGHV4-4
0
20
40
60
80
计数

图36

抗 TFR1 抗体的 Kabat CDR

抗体	VHH CDR1	SEQ ID NO	VHH CDR2	SEQ ID NO	VHH CDR3	SEQ ID NO
23B8	NAWMN	42	HIKSKTDGGTTDYAAPVKG	43	DRAYCGGDCSHYYYHDLDV	44
24A1	SYAMS	45	EISGSGSSTNYADSVKG	46	DDSSGWAFNI	47
24C9	SYGMY	48	FIRFDESKKYYADSVKG	49	DGEGGYCTNGVCHGLDV	50
24G5	SFAMS	51	EISDSGGNTYYADSVKG	52	DDSSGWAFNI	53

图37

抗 TFR1 抗体的 IMGT CDR

抗体	VHH CDR1	SEQ ID NO	VHH CDR2	SEQ ID NO	VHH CDR3	SEQ ID NO
23B8	GFPFSNAW	54	IKSKTDGGTT	55	TTDRAYCGGDCSHYYHDLDV	56
24A1	GFTFSSYA	57	ISGSGSST	58	AKDDSSGWAFNI	59
24C9	GFTLSSYG	60	IRFDESKK	61	ARDGEGGYCTNGVCHGLDV	62
24G5	GFTFSSFA	63	ISDSGGNT	64	AKDDSSGWAFNI	65

图38

抗体	VHH 氨基酸序列
23B8	QVTLKESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTI SRDDSKNMVFLQMNSLKTEDTAVYYCTTDRAYCGGDCSHYYYHDLDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 66)**
24A1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLERVSEISGSGGSSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDSSGWAFNIWDQGTVVTVSS **(SEQ ID NO: 67)**
24C9	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMYWVRQAPGKGREWVAFIRFDESKKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGEGGYCTNGVCHGLDVWGQGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 68)**
24G5	QLQLQESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLERVSEISDSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDSSGWAFNIWDQGTVVTVSS **(SEQ ID NO: 69)**

图39

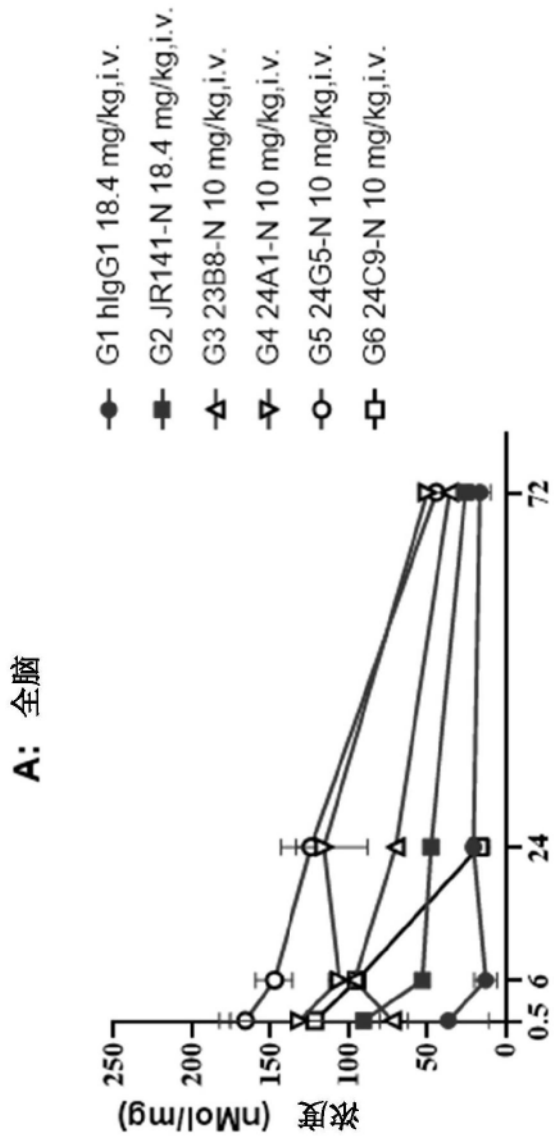

A: 全脑
G1 hIgG1 18.4 mg/kg,i.v.
G2 JR141-N 18.4 mg/kg,i.v.
G3 23B8-N 10 mg/kg,i.v.
G4 24A1-N 10 mg/kg,i.v.
G5 24G5-N 10 mg/kg,i.v.
G6 24C9-N 10 mg/kg,i.v.
浓度 (nMol/mg)
250
200
150
100
50
0
0.5
6
24
72

图40A

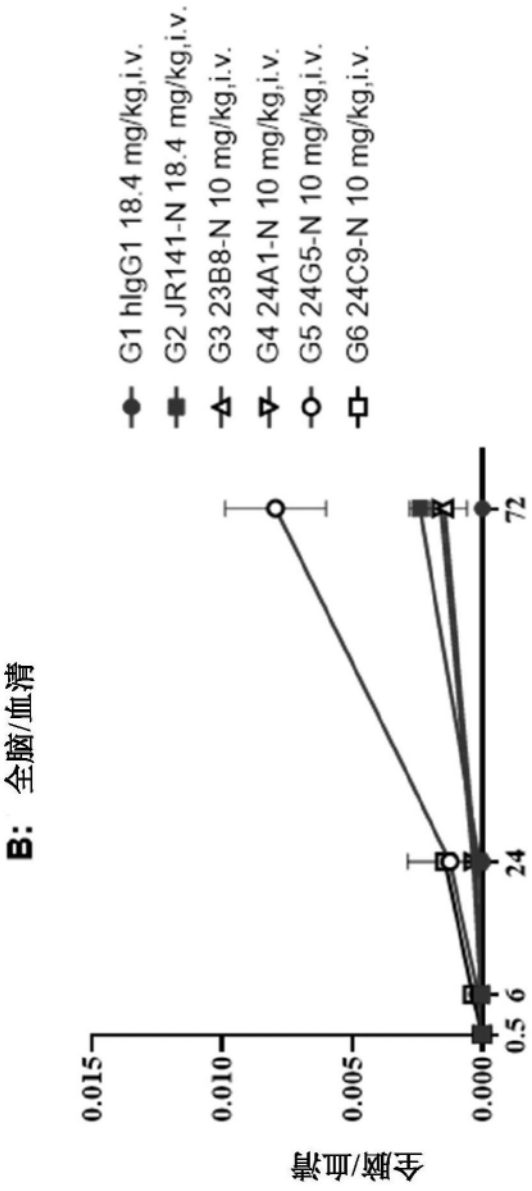

B: 全脑/血清
G1 hIgG1 18.4 mg/kg,i.v.
G2 JR141-N 18.4 mg/kg,i.v.
G3 23B8-N 10 mg/kg,i.v.
G4 24A1-N 10 mg/kg,i.v.
G5 24G5-N 10 mg/kg,i.v.
G6 24C9-N 10 mg/kg,i.v.
全脑/血清
0.015
0.010
0.005
0.000
0.5
6
24
72

图40B

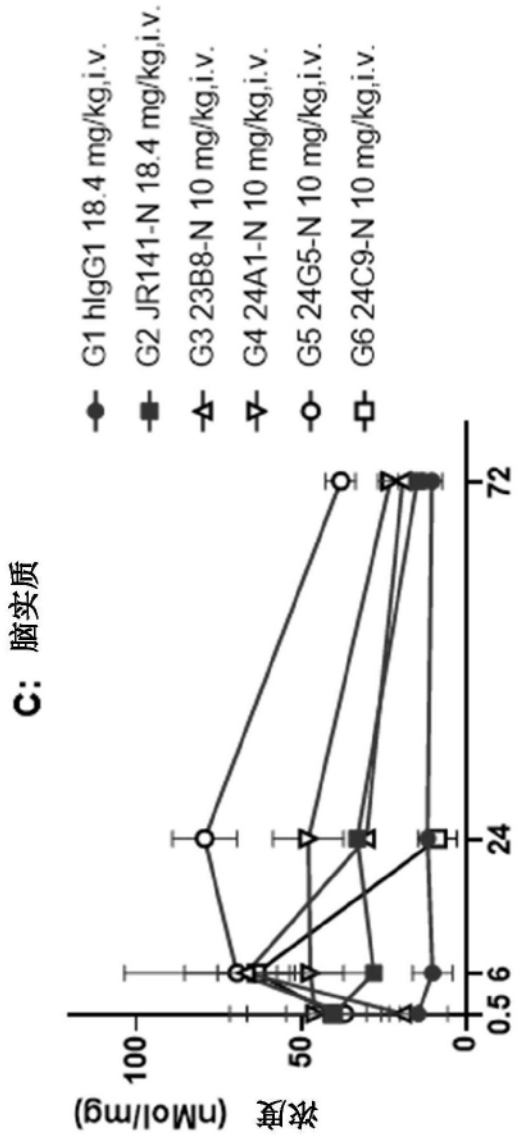

C: 脑实质
G1 hIgG1 18.4 mg/kg,i.v.
G2 JR141-N 18.4 mg/kg,i.v.
G3 23B8-N 10 mg/kg,i.v.
G4 24A1-N 10 mg/kg,i.v.
G5 24G5-N 10 mg/kg,i.v.
G6 24C9-N 10 mg/kg,i.v.
浓度 (nMol/mg)
100
50
0
0.5
6
24
72

图40C

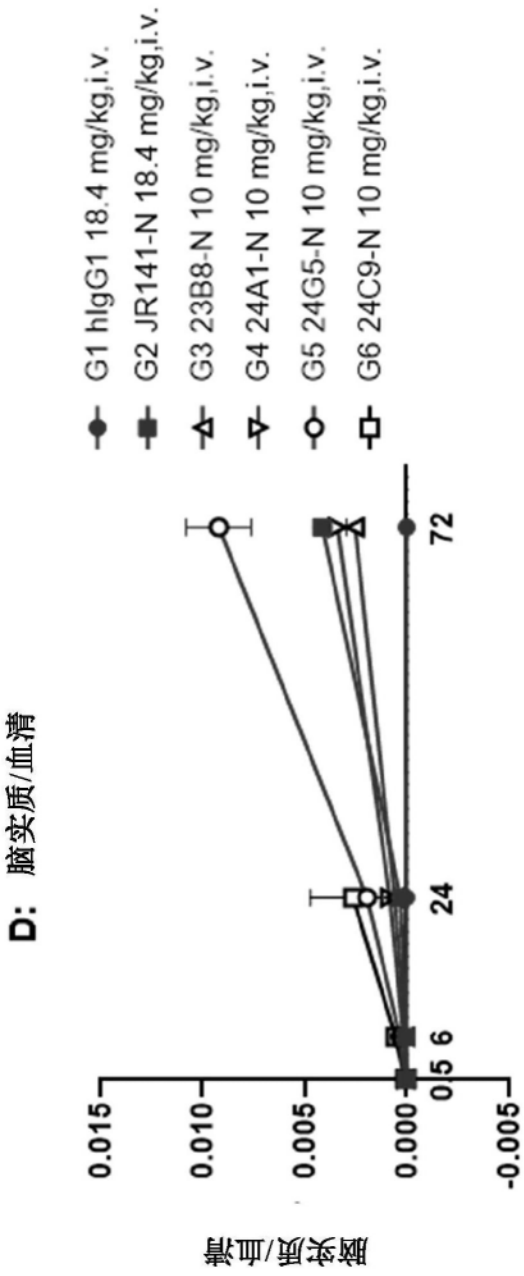

D: 脑实质/血清
G1 hIgG1 18.4 mg/kg,i.v.
G2 JR141-N 18.4 mg/kg,i.v.
G3 23B8-N 10 mg/kg,i.v.
G4 24A1-N 10 mg/kg,i.v.
G5 24G5-N 10 mg/kg,i.v.
G6 24C9-N 10 mg/kg,i.v.
0.015
0.010
0.005
0.000
-0.005
0
5
6
24
72
脑实质/血清

图40D

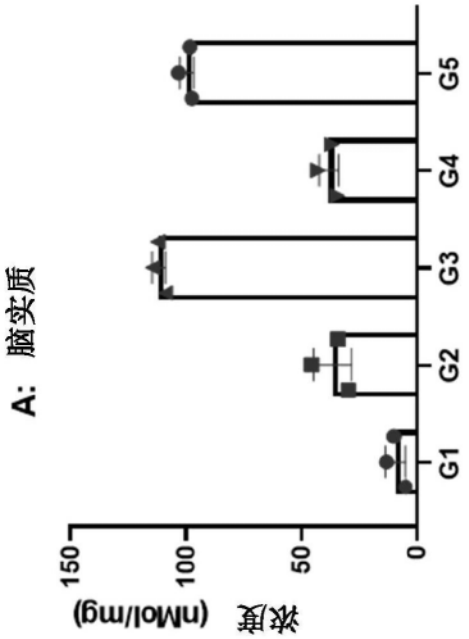

A: 脑实质
浓度 (nMol/mg)
150
100
50
0
G1
G2
G3
G4
G5

图41A

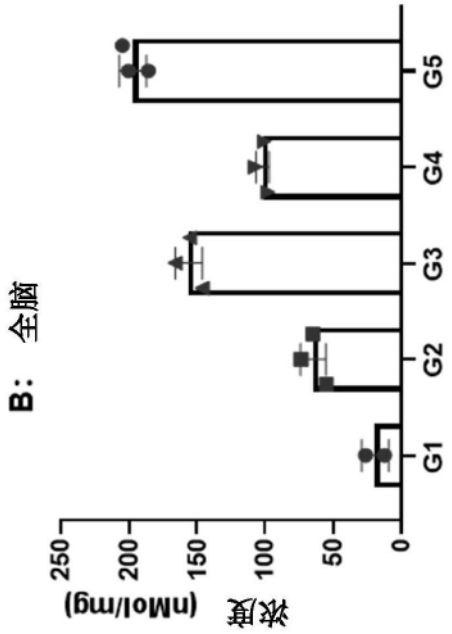

B: 全脑
浓度 (nMol/mg)
250
200
150
100
50
0
G1
G2
G3
G4
G5

图41B

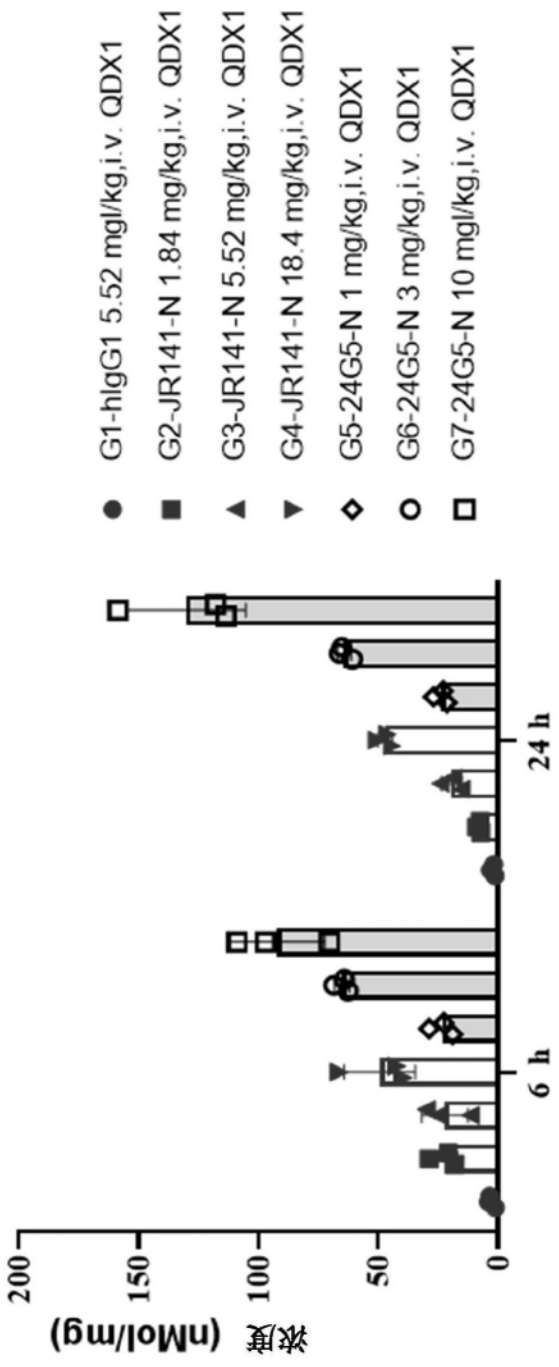

G1-hIgG1 5.52 mg/kg,i.v. QDX1
G2-JR141-N 1.84 mg/kg,i.v. QDX1
G3-JR141-N 5.52 mg/kg,i.v. QDX1
G4-JR141-N 18.4 mg/kg,i.v. QDX1
G5-24G5-N 1 mg/kg,i.v. QDX1
G6-24G5-N 3 mg/kg,i.v. QDX1
G7-24G5-N 10 mg/kg,i.v. QDX1
浓度 (nMol/mg)
200
150
100
50
0
6 h
24 h

图42

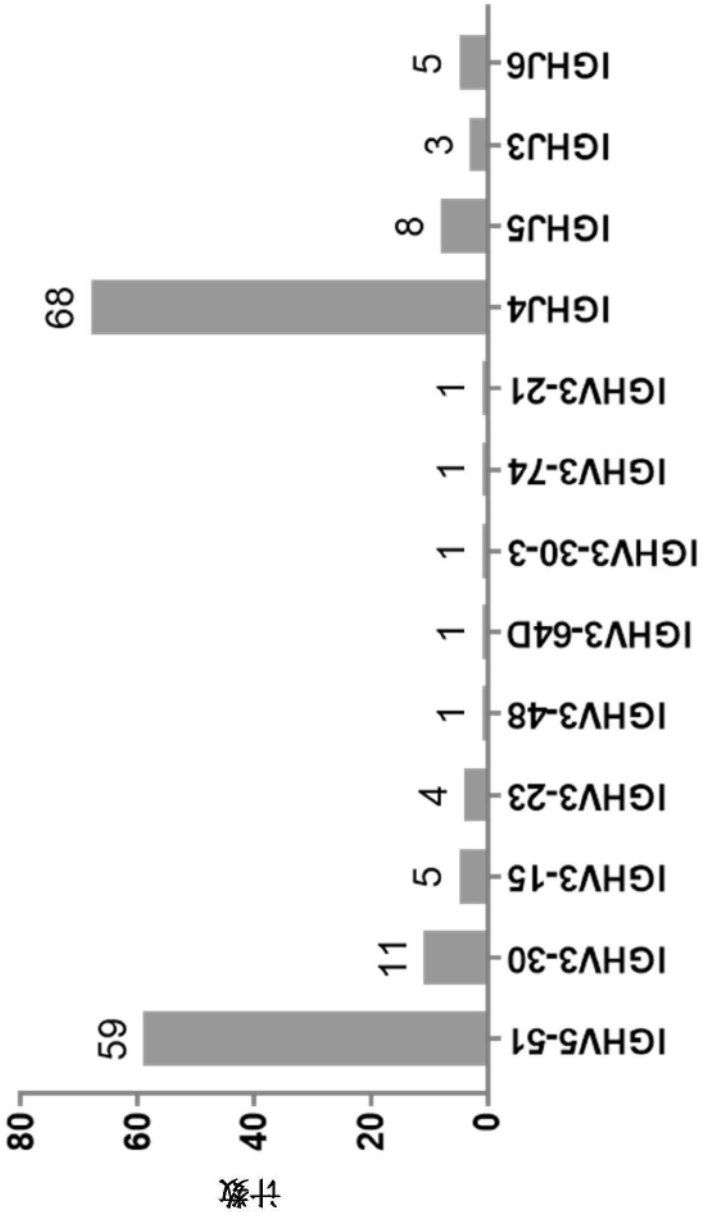

IGHV5-51
59
IGHV3-30
11
IGHV3-15
5
IGHV3-23
4
IGHV3-48
1
IGHV3-64D
1
IGHV3-30-3
1
IGHV3-74
1
IGHV3-21
1
IGHJ4
68
IGHJ5
8
IGHJ3
3
IGHJ6
5
0
20
40
60
80
计数

图43


IGHV4-39
IGHV3-66
IGHV3-48
IGHV3-23
IGHV3-49
IGHV4-34
IGHV3-30
IGHV3-7
IGHV3-21
IGHV4-4
IGHV3-15
IGHV3-53
IGHV3-33
IGHV4-59
IGHV3-74
IGHV3-43
IGHJ4
IGHJ3
IGHJ6
IGHJ5
26
16
12
9
6
5
4
4
4
3
2
1
1
1
1
1
55
17
14
10
0
20
40
60
计数

图44

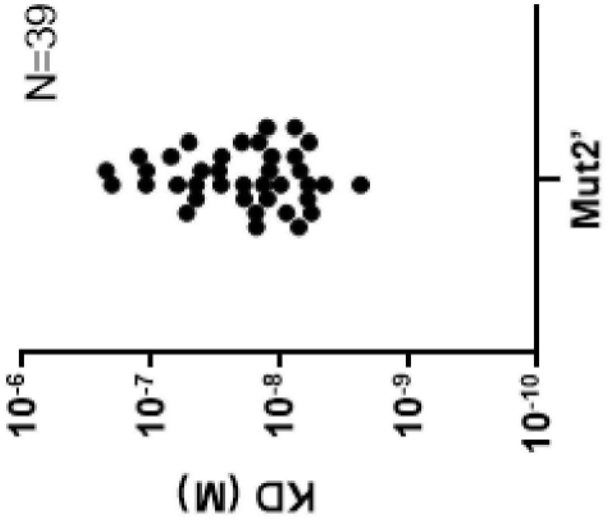


图45

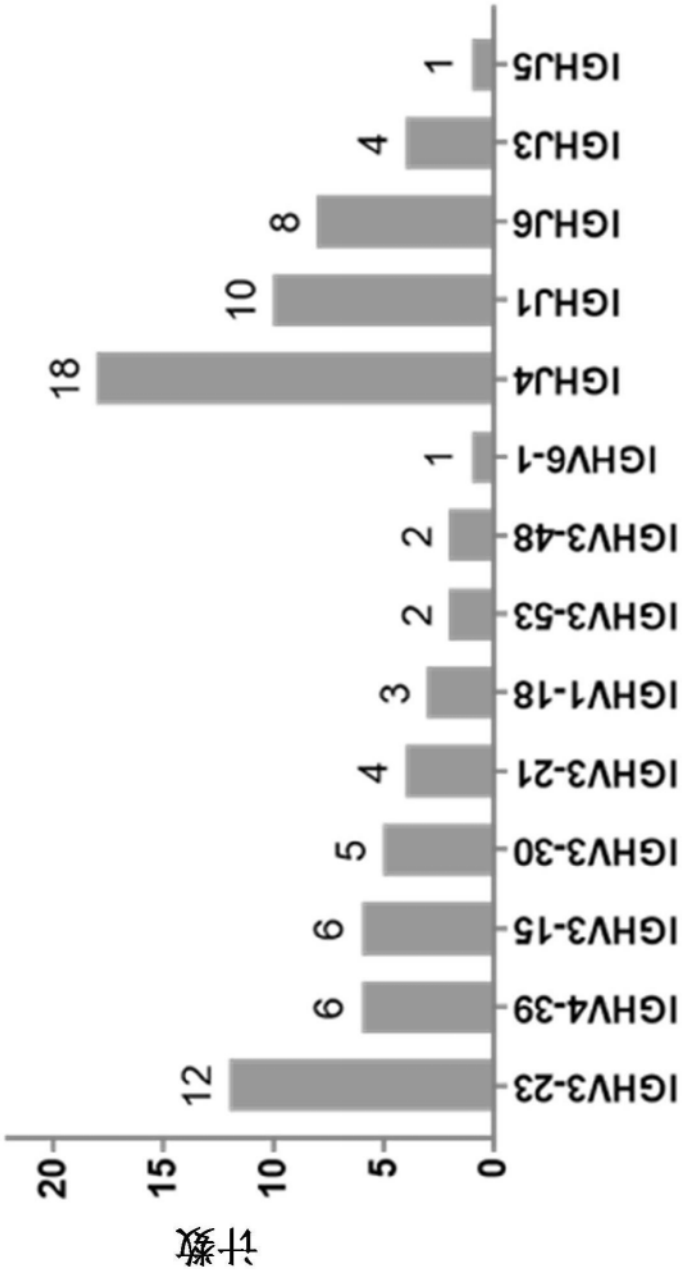

计数
0
5
10
15
20
IGHV3-23
12
IGHV4-39
6
IGHV3-15
6
IGHV3-30
5
IGHV3-21
4
IGHV1-18
3
IGHV3-53
2
IGHV3-48
2
IGHV6-1
1
IGHJ4
18
IGHJ1
10
IGHJ6
8
IGHJ3
4
IGHJ5
1

图46

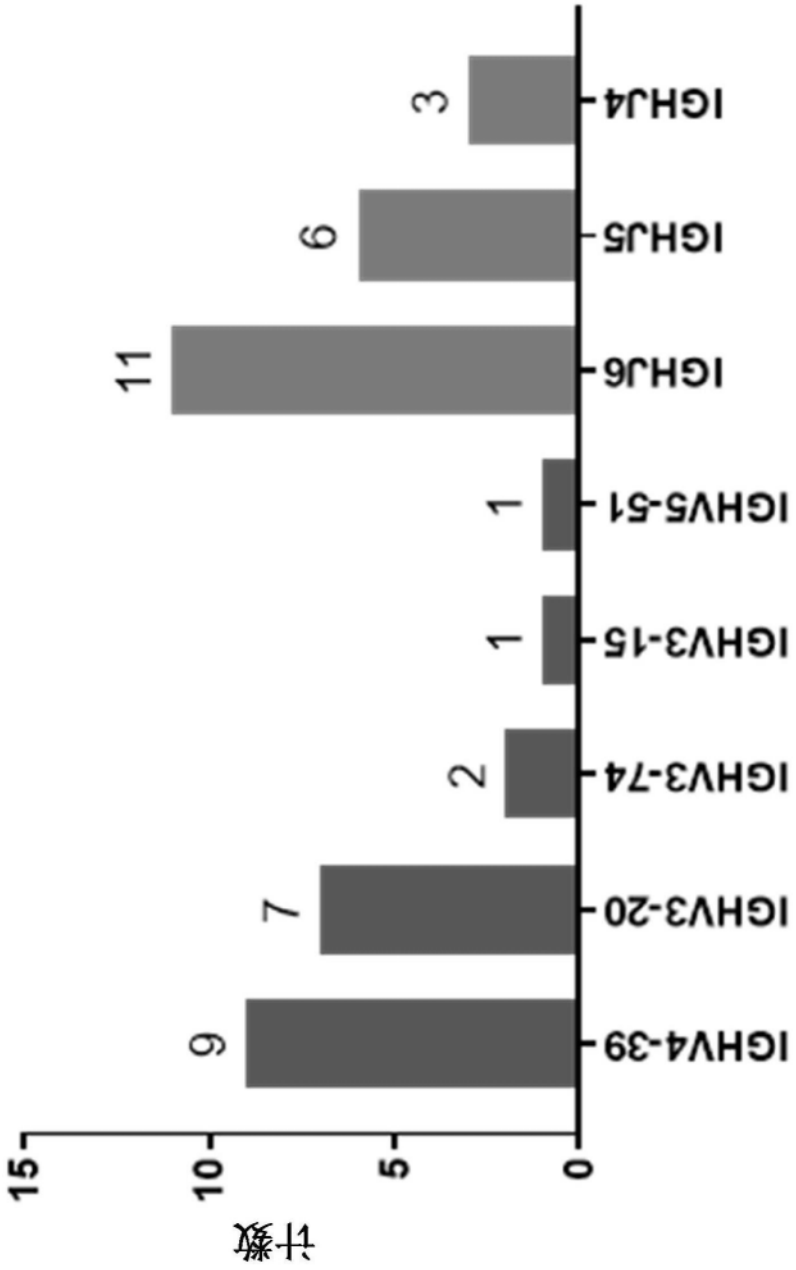

IGHV4-39
IGHV3-20
IGHV3-74
IGHV3-15
IGHV5-51
IGHJ6
IGHJ5
IGHJ4
9
7
2
1
1
11
6
3
0
5
10
15
计数

图47