

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-209923

(P2014-209923A)

(43) 公開日 平成26年11月13日(2014.11.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1K 67/027 (2006.01)	AO1K 67/027 ZNA	2GO45
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4BO24
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2014-165102 (P2014-165102)
 (22) 出願日 平成26年8月14日 (2014. 8. 14)
 (62) 分割の表示 特願2014-87973 (P2014-87973) の分割
 原出願日 平成22年12月17日 (2010.12.17)
 (31) 優先権主張番号 61/288,562
 (32) 優先日 平成21年12月21日 (2009.12.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 597160510
 リジェネロン・ファーマシューティカルズ
 ・インコーポレイテッド
 REGENERON PHARMACEU
 TICALS, INC.
 アメリカ合衆国10591-6707ニュ
 ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
 ・ミル・リバー・ロード777番
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化FcγRマウス

(57) 【要約】

【課題】ヒト化FcγRマウスの提供。

【解決手段】遺伝子改変が内因性低親和性FcγR遺伝子座の欠失を含み、マウスが機能的FcγR鎖を発現することができる、遺伝子改変された非ヒト動物、ならびにそれらを作製および使用するための方法および組成物を提供する。内因性FcγR遺伝子座由来の低親和性ヒトFcγR遺伝子を発現するマウスを含めた、機能的FcγR鎖を含む、遺伝子改変されたマウスを記載する。宿主免疫系のアクセサリ細胞上に5つまでの低親和性ヒトFcγR遺伝子を発現する、遺伝子改変されたマウスを提供する。

【選択図】 図6

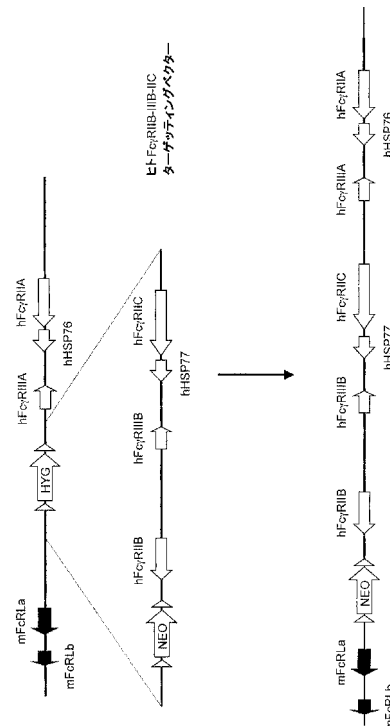


Figure 6

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明の分野は、内因性マウス Fc R 遺伝子を欠く遺伝子改変された非ヒト動物であり、これには、内因性 Fc R 遺伝子の、ヒト Fc R 遺伝子による置き換えを含む遺伝子改変された動物が含まれ、かつ少なくとも 2、3、4、または 5 つの機能的ヒト低親和性 Fc R 遺伝子を発現することができるマウスが含まれ、かつ内因性低親和性 Fc R 遺伝子を発現しない免疫細胞を含む遺伝子改変されたマウスが含まれる。

10

【背景技術】

【0002】

背景

Fc 受容体 (FcR) は、哺乳動物において免疫系の様々な機能を実行する、免疫系の細胞の表面上に見出されるタンパク質である。FcR は、様々な細胞上に、様々なタイプで存在し、たとえば、感染細胞または侵入している病原体に付いている抗体への結合、抗体媒介性食作用または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) によって微生物または感染細胞を破壊するために、食作用性細胞または細胞傷害性細胞の刺激などのような、様々な免疫機能を媒介する。

20

【0003】

ADCC は、それによって、抗体が結合した標的細胞を免疫系のエフェクター細胞が溶解するプロセスである。このプロセスは、外来抗原または外来細胞に対する事前の曝露に依存し、抗体応答をもたらす。ADCC は、それ自体が外来抗原または外来細胞に結合した抗体の Fc 部分への、エフェクター細胞の表面上に発現された FcR の結合によって、たとえばナチュラルキラー (NK) 細胞などのようなエフェクター細胞を通して媒介することができる。FcR が免疫応答において果たす中心的な役割のために、複数のヒト低親和性 FcR を同時発現する非ヒト動物を含む、複数のヒト FcR を同時発現する有用な非ヒト動物が必要とされる。ヒト疾患療法、特に、抗腫瘍療法および自己免疫疾患を治療するための療法に関する研究および解明ならびに特に、ヒト抗体医薬品の開発、設計、および試験における医薬開発のための、ヒト FcR 機能および ADCC のヒトプロセスの非ヒト動物モデルの必要性が存在する。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

遺伝子改変された細胞、非ヒト胚、非ヒト動物、ならびにそれらを作製し、使用するための方法および組成物が提供される。様々な態様では、非ヒト動物は、ヒト Fc R 受容体、内因性低親和性 Fc R 受容体の欠失、および / または内因性マウス低親和性 Fc R の遺伝子座での、内因性 Fc R 受容体の、ヒト Fc R 受容体による置き換えを含む。

40

【0005】

一態様では、機能的 Fc R 鎖を含む、遺伝子改変された細胞、非ヒト胚、および非ヒト動物が提供され、細胞、胚、および動物は、低親和性内因性非ヒト Fc R 遺伝子配列 (たとえば Fc R I I B、Fc R I V、および Fc R I I I) の、1 つまたは複数の低親和性ヒト Fc R 遺伝子配列 (たとえば、Fc R I I A、Fc R I I B、Fc R I I C、Fc R I I I A、Fc R I I I B、およびその組合せから選択される) による置き換えを含む、さらなる改変を含む。

【0006】

一実施形態では、細胞、非ヒト胚、および非ヒト動物は、マウスである。一実施形態で

50

は、機能的 FcR 鎖は、マウス FcR 鎖である。一実施形態では、マウス FcR 鎖は、マウス、細胞、または胚に対して内因性の FcR 鎖である。

【0007】

一実施形態では、細胞、胚、および動物は、マウスであり、マウスは、ヒト低親和性 FcR 受容体の機能的鎖および機能的内因性マウス鎖を発現する。

【0008】

一態様では、遺伝子改変されたマウスが提供され、マウスは、FcRIIB 鎖、FcRIV 鎖、FcRIII 鎖、およびその組合せから選択される内因性鎖を発現せず、マウスは、機能的内因性マウス鎖を発現する。

【0009】

特定の実施形態では、マウスは、機能的 FcRIIB 鎖を発現せず、機能的 FcRIV 鎖を発現せず、かつ機能的 FcRIII 鎖を発現しない。

【0010】

一実施形態では、マウスゲノムは、内因性 FcRIIB 鎖の欠失、内因性 FcRIV 鎖の欠失、および内因性 FcRIII 鎖の欠失を含む。

【0011】

一実施形態では、マウスは、内因性 FcRIIB 鎖の欠失、内因性 FcRIV 鎖の欠失、および内因性 FcRIII 鎖の欠失を含み、さらに、同じ抗原に関して、野生型マウスの能力と比較して、抗原に対する免疫応答を行う能力が低下している。一実施形態では、免疫応答の低下は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) の減少を含む。一実施形態では、免疫応答の低下は、抗体依存性 NK 細胞殺傷を達成するための細胞殺傷アッセイにおける能力の低下を含む。特定の実施形態では、ADCC または抗体依存性 NK 細胞殺傷における低下は、少なくとも 50% であり、一実施形態では少なくとも 75%、一実施形態では少なくとも 90% である。

【0012】

一実施形態では、マウスは、内因性 FcRIIB 鎖の欠失、内因性 FcRIV 鎖の欠失、および内因性 FcRIII 鎖の欠失を含み、野生型マウス、たとえば、欠失を含まない同じまたは類似する系統のマウスと比較して、抗原を用いる免疫に際しての体液性抗体応答の増加をさらに含む。一実施形態では、体液性抗体応答の増加は、野生型マウスと比較して、2 倍である。一実施形態では、体液性抗体応答の増加は、野生型マウスと比較して、3 倍である。一実施形態では、体液性抗体応答の増加は、野生型マウスと比較して、5 倍である。一実施形態では、体液性抗体応答の増加は、野生型マウスと比較して、7 倍である。一実施形態では、体液性抗体応答の増加は、野生型マウスと比較して、10 倍である。特定の実施形態では、体液性抗体応答は、マウス由来の血清タンパク質の 1 マイクログラム当たりの、(マウスが免疫された) 抗原に特異的に結合する抗体のマイクログラムによって測定される。一実施形態では、体液性抗体応答の増加は、野生型マウスが耐性を示す抗原または野生型マウスにおいて弱いもしくは最小限の体液性免疫反応を示す抗原に関してのものである。特定の実施形態では、抗原は、マウス抗原である。特定の実施形態では、抗原は、マウスタンパク質との少なくとも約 95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を示すヒト抗原である。

【0013】

一態様では、低親和性マウス FcR 鎖遺伝子の、低親和性ヒト FcR 鎖遺伝子による置き換えを含む、遺伝子改変されたマウスが提供され、置き換えは、内因性マウス FcR 鎖遺伝子の遺伝子座でのものである。一実施形態では、低親和性マウス FcR 鎖遺伝子は、FcRIIB、FcRIV、および FcRIII 鎖遺伝子から選択される。特定の実施形態では、遺伝子改変されたマウスが提供され、マウスは、内因性 FcR 鎖を発現し、低親和性ヒト FcR 鎖遺伝子は、FcRIIIA 鎖である。他の特定の実施形態では、遺伝子改変されたマウスは、NK 細胞上に、内因性 FcR 鎖および機能的ヒト FcRIIIA 鎖を発現する。特定の実施形態では、NK 細胞上の FcRIIIA 鎖の機能性は、ヒト抗体媒介性 NK 殺傷

10

20

30

40

50

(たとえばヒト抗体によって媒介されるA D C C)によって反映される。

【0014】

一態様では、遺伝子改変された細胞、非ヒト胚、または非ヒト動物が提供され、遺伝子改変は、少なくとも1つの内因性低親和性Fc R 鎖遺伝子の、ヒトFc R 鎖遺伝子による置き換えを含み、細胞、胚、または動物は、機能的Fc R 鎖を発現する。一実施形態では、機能的Fc R 鎖は、内因性Fc R 鎖である。一実施形態では、低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子は、Fc R I I A 鎖遺伝子、Fc R I I I A 鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。特定の実施形態では、ヒトFc R I I A 鎖遺伝子は、多型を含み、多型は、131His低応答動物多型および131Arg高応答動物多型から選択される。特定の実施形態では、Fc R I I A 多型は、131His低応答動物多型である。一実施形態では、Fc R I I I A 鎖遺伝子は、特異的な対立遺伝子変異体(allelic variant)であり、対立遺伝子変異体は、158Val変異体および158Phe変異体から選択される。特定の実施形態では、Fc R I I I A 対立遺伝子変異体は、158Val変異体である。

10

【0015】

一実施形態では、低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子は、Fc R I I B、Fc R I I C、Fc R I I I B 鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。特定の実施形態では、ヒトFc R I I B 鎖遺伝子は、アミノ酸置換を含み、置換は、232Ileまたは232Thr置換から選択される。他の特定の実施形態では、アミノ酸置換は、232Ile置換である。特定の実施形態では、Fc R I I I B 鎖遺伝子は、特異的な対立遺伝子変異体であり、対立遺伝子変異体は、NA1変異体およびNA2変異体から選択される。他の特定の実施形態では、Fc R I I I B 対立遺伝子変異体は、NA2変異体である。

20

【0016】

一実施形態では、低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子は、Fc R I I A、Fc R I I B、Fc R I I C、Fc R I I I A、Fc R I I I B 鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。

【0017】

一実施形態では、低親和性マウスFc R I V 鎖遺伝子およびFc R I I I 鎖遺伝子は、少なくとも1つの低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子によって置き換えられる。一実施形態では、低親和性マウスFc R I V 鎖遺伝子およびFc R I I B 鎖遺伝子は、少なくとも1つの低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子によって置き換えられる。一実施形態では、低親和性マウスFc R I I B 鎖遺伝子およびFc R I I I 鎖遺伝子は、少なくとも1つの低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子によって置き換えられる。特定の実施形態では、少なくとも1つの低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子は、Fc R I I A、Fc R I I B、Fc R I I C、Fc R I I I A、Fc R I I I B 鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。他の特定の実施形態では、少なくとも1つの低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子は、Fc R I I A 鎖遺伝子、Fc R I I I A 鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。他の特定の実施形態では、少なくとも1つの低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子は、Fc R I I B、Fc R I I C、Fc R I I I B 鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。他の特定の実施形態では、低親和性マウスFc R 鎖遺伝子は、ヒトFc R I I A 鎖遺伝子およびヒトFc R I I I A 鎖遺伝子によって置き換えられる。他の特定の実施形態では、低親和性ヒトFc R I I A 鎖遺伝子およびFc R I I I A 鎖遺伝子は、変異体を含み、Fc R I I A 鎖遺伝子は、131His変異体を含み、Fc R I I I A 鎖遺伝子は、158Val変異体を含む。他の特定の実施形態では、低親和性マウスFc R 鎖遺伝子は、以下の低親和性ヒトFc R 鎖遺伝子：Fc R I I B、Fc R I I C、およびFc R I I I Bによって置き換えられる。他の特定の実施形態では、低親和性ヒトFc R I I B 鎖遺伝子およびFc R I I I B 鎖遺伝子は、変異体を含み、Fc R I I B 鎖遺伝子は、232Ile変異体を含み、Fc R I I I B 鎖遺伝子は、NA2変異体を含む。

30

40

50

【0018】

一実施形態では、遺伝子改変は、マウスおよびヒト染色体1のシンテニックゲノム配列の置き換えを含む。特定の実施形態では、遺伝子改変は、内因性低親和性マウスFcR遺伝子を含むゲノム断片の、低親和性ヒトFcR遺伝子を含むゲノム断片による置き換えを含む。他の特定の実施形態では、染色体1:172, 889, 983~染色体1:172, 989, 911のマウスゲノムは、ヒト染色体1:161, 474, 729~染色体1:161, 620, 458を含むヒトゲノム断片によって置き換えられる。

【0019】

一態様では、遺伝子改変された細胞、非ヒト胚、または非ヒト動物が提供され、遺伝子改変は、1つまたは複数の内因性低親和性受容体鎖遺伝子のノックアウトおよび1つまたは複数のヒトFcR鎖遺伝子を含むエピソームの存在を含む。特定の実施形態では、細胞、胚、または動物は、機能的FcR鎖を発現する。特定の実施形態では、エピソームは、ミニ染色体である。一実施形態では、機能的FcR鎖は、細胞、胚、または動物に対して内因性である。

10

【0020】

一態様では、低親和性マウスFcR鎖遺伝子の、低親和性ヒトFcR鎖遺伝子による置き換えを含む、遺伝子改変されたマウスが提供され、マウスは、マウスFcR鎖遺伝子を含み、マウスは、機能的ヒト低親和性FcR受容体を発現する。一実施形態では、機能的低親和性FcR受容体は、ヒトにおいて低親和性FcR受容体が発現される細胞型上に発現される。特定の実施形態では、機能的ヒト低親和性FcR受容体は、FcRIIIAであり、FcRIIIAは、NK細胞上に発現される。

20

【0021】

一実施形態では、マウスは、2つのマウスFcR鎖遺伝子の欠失を含む。他の実施形態では、マウスは、3つのマウスFcR鎖遺伝子の欠失を含む。

【0022】

一実施形態では、マウスは、3つのマウスFcR鎖遺伝子の、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子による置き換えを含む。他の実施形態では、マウスは、2つのマウスFcR鎖遺伝子の、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子による置き換えを含む。特定の実施形態では、マウスは、3つのマウスFcR鎖遺伝子の、少なくとも2つのヒトFcR鎖遺伝子による置き換えを含む。他の特定の実施形態では、3つのマウスFcR鎖遺伝子は、3つのヒトFcR鎖遺伝子によって置き換えられる。他の特定の実施形態では、マウスは、2つのマウスFcR鎖遺伝子の、少なくとも2つのヒトFcR鎖遺伝子による置き換えを含む。他の特定の実施形態では、2つのマウスFcR鎖遺伝子は、少なくとも3つのヒトFcR鎖遺伝子によって置き換えられる。

30

【0023】

一実施形態では、低親和性マウスFcR鎖遺伝子は、FcRIIB、FcRIV、FcRIII鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。

【0024】

一実施形態では、低親和性ヒトFcR鎖遺伝子は、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIC、FcRIIIA、FcRIIIB鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。一実施形態では、低親和性ヒトFcR鎖遺伝子は、FcRIIA、FcRIIIA鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。一実施形態では、低親和性ヒトFcR鎖遺伝子は、FcRIIB、FcRIIC、FcRIIIB鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。

40

【0025】

一実施形態では、低親和性マウスFcRIV鎖遺伝子およびFcRIII鎖遺伝子は、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子によって置き換えられる。一実施形態では、低親和性マウスFcRIV鎖遺伝子およびFcRIIB鎖遺伝子は、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子によって置き換えられる。一実施形態

50

では、低親和性マウスFcRIIB鎖遺伝子およびFcRIIB鎖遺伝子は、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子によって置き換えられる。特定の実施形態では、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子は、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIC、FcRIIAA、FcRIIB鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。他の特定の実施形態では、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子は、FcRIIA、FcRIIA鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。他の特定の実施形態では、少なくとも1つのヒトFcR鎖遺伝子は、FcRIIB、FcRIIC、FcRIIB鎖遺伝子、およびその組合せから選択される。他の特定の実施形態では、マウス鎖遺伝子は、以下のヒトFcR鎖遺伝子：FcRIIAおよびFcRIIAAによって置き換えられる。他の特定の実施形態では、マウス鎖遺伝子は、以下のヒトFcR鎖遺伝子：FcRIIB、FcRIIC、およびFcRIIBによって置き換えられる。

10

【0026】

一態様では、低親和性ヒトFcR鎖およびマウスFcR鎖サブユニットを含む遺伝子改変されたマウスが提供され、マウスは、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、血小板、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、NK細胞、肥満細胞、B細胞、T細胞、およびその組合せから選択される細胞上にヒトFcR鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、好中球、マクロファージ、好酸球、血小板、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、およびその組合せから選択される細胞上にヒトFcRIIA鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、発現されたヒトFcRIIA鎖を通して開始または媒介される食作用、ADCC、および細胞性の活性化が可能である。一実施形態では、マウスは、マクロファージ、NK細胞、単球、肥満細胞、好酸球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、少なくとも1つのT細胞型、およびその組合せから選択される細胞上にヒトFcRIIA鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、NK細胞上に発現されるヒトFcRIIA鎖を通して媒介されるADCCが可能である。特定の実施形態では、マウスは、ヒトFcを含む抗体に応じて、hFcRIIA媒介性のADCCを示す。

20

【0027】

一実施形態では、マウスは、ヒトFcRIIA鎖およびヒトFcRIIA鎖の両方を発現する。一実施形態では、ヒトFcRIIA鎖は、血小板上に発現され、ヒトFcRIIA鎖は、NK細胞上に発現される。一実施形態では、マウスは、ヒトFcを含む抗体によって媒介されるADCCが可能であり、媒介は、アクセサリー細胞の表面上に発現されるヒトFcRIIA鎖を通してのまたはヒトFcRIIA鎖を通してのものである。一実施形態では、ヒトFcRIIA鎖は、血小板上に発現されない。ヒトFcRIIA鎖が血小板上に発現されない特定の実施形態では、マウスは、ヒトゲノムにおいてヒトFcRIIA鎖に作動可能に連結されるヒトプロモーター配列を欠くまたは実質的に欠く。

30

【0028】

一実施形態では、マウスは、B細胞、肥満細胞、好塩基球、マクロファージ、好酸球、好中球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、およびその組合せから選択される細胞上にFcRIIB鎖を発現する。特定の実施形態では、マウスは、B細胞および肥満細胞上にヒトFcRIIB鎖を発現する。他の特定の実施形態では、マウスは、発現されたヒトFcRIIB鎖を通して媒介される免疫複合体のエンドサイトーシスが可能である。一実施形態では、マウスは、好中球、マクロファージ、好酸球、血小板、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、およびその組合せから選択される細胞上にヒトFcRIIC鎖を発現する。特定の実施形態では、マウスは、発現されたヒトFcRIIC鎖を通して開始される食作用、ADCC、および細胞の活性化が可能である。

40

【0029】

一実施形態では、マウスは、好中球および好酸球上にヒトFcRIIB鎖を発現する。特定の実施形態では、マウスは、細胞の活性化、食作用、ADCC、および脱顆

50

粒が可能であり、活性化、食作用、A D C C、および脱顆粒は、発現されたヒト F c R I I I B 鎖を通して媒介される。

【0030】

一態様では、内因性 F c R I I B、F c R I V、および F c R I I I 遺伝子の欠失ならびにヒト F c R I I A、F c R I I B、F c R I I C、F c R I I I A、および F c R I I I B 遺伝子の挿入を含むマウスが提供され、マウスは、機能的マウス F c R 鎖遺伝子を含む。

【0031】

一実施形態では、マウスは、内因性 F c R I I B、F c R I V、および F c R I I I 遺伝子によってコードされる鎖の欠失ならびにヒト F c R I I A、F c R I I B、F c R I I C、F c R I I I A、および F c R I I I B 遺伝子によってコードされる鎖の挿入を含む。

10

【0032】

一実施形態では、ヒト F c R I I A、F c R I I B、F c R I I C、F c R I I I A、および F c R I I I B 鎖遺伝子の挿入は、マウスゲノム内のランダムな位置にある。

【0033】

一実施形態では、ヒト F c R I I A、F c R I I B、F c R I I C、F c R I I I A、および F c R I I I B 鎖遺伝子の挿入は、内因性マウス低親和性 F c R 鎖の遺伝子座にある。

20

【0034】

一実施形態では、マウスは、NK細胞およびマクロファージ上にヒト F c R I I I A を発現する。特定の実施形態では、マウスの脾細胞試料由来のすべてまたは実質的にすべてのNK細胞は、ヒト F c R I I I A を発現する。特定の実施形態では、マウスの脾細胞試料由来のすべてまたは実質的にすべてのマクロファージは、ヒト F c R I I I A を発現する。

【0035】

一実施形態では、マウスは、好中球、マクロファージ、およびその組合せから選択される細胞型上に、ヒト F c R I I A、ヒト F c R I I I A、およびその組合せから選択されるヒト F c R を発現する。特定の実施形態では、マウスは、マウス由来の脾細胞試料のすべてまたは実質的にすべての好中球およびマクロファージ上にヒト F c R I I A およびヒト F c R I I I A を発現する。

30

【0036】

一実施形態では、マウスは、このマウスからのB細胞ゲーティングされた脾細胞試料からのB細胞のうち、B細胞および好中球上にヒト F c R I I B およびヒト F c R I I I B を発現する。特定の実施形態では、マウスは、このマウスからB細胞ゲーティングされた脾細胞試料からのすべてまたは実質的にすべてのB細胞および好中球上に F c R I I I B および F c R I I B を発現する。

【0037】

一実施形態では、マウスは、ヒト化 C D 2 0 遺伝子をさらに含む。一実施形態では、ヒト化 C D 2 0 遺伝子をさらに含むマウスは、F c を含む抗 C D 2 0 結合タンパク質を用いる処理に続いて、B細胞の枯渇 (i n v i v o において) を示す。一実施形態では、枯渇は、骨髄、血液、リンパ節、脾臓、およびその組合せから選択されるコンパートメントにおけるものとする。一実施形態では、F c は、ヒト F c である。一実施形態では、F c は、マウス F c である。一実施形態では、抗 C D 2 0 結合タンパク質は、抗 C D 2 0 抗体である。

40

【0038】

一態様では、本明細書において記載される遺伝子改変を含む細胞が提供される。一実施形態では、細胞は、胚性幹 (E S) 細胞、多能性細胞、誘導多能性細胞、および全能性細胞から選択される。一実施形態では、細胞は、マウス細胞およびラット細胞から選択され

50

る。特定の実施形態では、細胞は、E S細胞である。特定の実施形態では、細胞は、マウスE S細胞である。

【0039】

一態様では、本明細書において記載される遺伝子改変を含む非ヒト胚が提供される。一実施形態では、非ヒト胚は、マウス胚およびラット胚から選択される。

【0040】

一態様では、治療薬の効能を決定するための方法が提供される。一実施形態では、治療薬は、ヒトFcを含む抗体（たとえば単一特異性、二重特異性、三重特異性、多重特異性）である。一実施形態では、治療薬は、ヒト抗体である。一実施形態では、効能は、治療薬媒介性の細胞殺傷（たとえばADCC）の効能である。特定の実施形態では、ヒト治療薬は、ヒト免疫グロブリン重鎖のFcを含む融合タンパク質である。一実施形態では、治療薬は、本明細書において記載されるように、マウスに投与され、治療薬依存性のADCCのレベルが測定される。一実施形態では、マウスは、治療薬をマウスに投与し、次いで、Fc R発現細胞上のヒト低親和性Fc Rへの治療薬の結合を検出することによって（たとえば、動物から採取された試料（たとえば血液）から*in vitro*において）、治療薬のADCC活性を評価するために使用される。特定の実施形態では、マウスのアクセサリ細胞は、マウスから単離され、治療薬依存性のADCCを媒介するための、治療薬の存在下または非存在下における能力について試験される。

10

【0041】

一態様では、低親和性Fc Rがヒト疾患または障害と関連するかどうかを決定するための方法であって、本発明に従って、マウスにおいて、ヒト疾患または障害と関連する形質を決定するステップを含む、方法が提供される。一実施形態では、形質は、1つまたは複数の低親和性Fc Rの機能の不在または損失と関連する表現型である。特定の実施形態では、疾患または障害は、自己免疫疾患または障害である。特定の実施形態では、自己免疫疾患または障害は、関節リウマチ（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、I型糖尿病、ギラン・バレー症候群、硬化症、多発性硬化症、グッドパスチャー症候群、ウェゲナー肉芽腫症、および実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）から選択される。特定の実施形態では、マウスは、低親和性Fc Rにおいて多型を含み、形質は、多型を有しない大多数のヒト集団と比較した、ADCCを媒介するための能力の増強および多型を有しない大多数のヒト集団と比較した、ADCCを媒介するための能力の低下から選択される。

20

30

【0042】

一態様では、マウスにおいて抗ヒトFc R鎖抗体を作製するための方法であって、本明細書において記載されるヒトFc Rに対して本発明によるマウスを曝露するステップを含む、方法が提供される。一実施形態では、ヒトFc Rを認識する抗体は、マウスから単離される。他の実施形態では、ヒトFc Rを認識する抗体の可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列は、同定され、クローニングされる。

【0043】

一態様では、分子をFc R発現細胞の標的とし、標的分子を食作用する抗ヒトFc R抗体の能力を決定するための方法であって、抗ヒトFc R抗体を含む作用物質に対して本明細書において記載されるマウスを曝露するステップおよび標的分子の食作用を測定するステップを含む、方法が提供される。

40

【0044】

一態様では、1つまたは複数のFc Rに関して野生型であるマウスにおいて低免疫原性の抗原に対して、マウスにおいて抗体を作製するための方法であって、1つまたは複数のFc Rに関して野生型であるマウスにおいて低免疫原性の抗原に対して、マウス低親和性Fc Rを欠くが、Fc R鎖を発現する、本明細書において記載されるマウスを曝露するステップおよび低抗原性の抗原を認識する抗体を同定するステップを含む、方法が提供される。一実施形態では、方法は、マウスから抗体を単離するステップを含む。他の実施形態では、抗体の可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列は、同定され

50

、クローニングされる。

【0045】

一態様では、ヒト可変領域を含む抗体を作ることができるマウスを作製するための方法であって、本明細書において記載される第1のマウスを、(a)1つもしくは複数のヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントおよび1つまたは複数のヒト定常領域遺伝子または(b)マウス定常領域遺伝子に作動可能に連結された1つもしくは複数のヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントを含む第2のマウスと交配するステップを含み、ヒト遺伝子セグメントは、マウス可変領域遺伝子セグメントの遺伝子座で可変領域遺伝子セグメントに取って代わる、方法が提供される。

【0046】

一実施形態では、第2のマウスは、(a)1つまたは複数のヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよびヒト軽鎖定常遺伝子を含む導入遺伝子ならびに1つまたは複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントおよび1つまたは複数のヒト重鎖定常遺伝子を含む導入遺伝子を含む。一実施形態では、1つまたは複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを含む導入遺伝子は、2つ以上の重鎖定常遺伝子を含み、クラススイッチが可能である。特定の実施形態では、マウスは、不活性化された内因性軽鎖遺伝子座および/または不活性化された内因性重鎖遺伝子座を含む。特定の実施形態では、マウスは、内因性軽鎖遺伝子座の欠失および/または内因性重鎖遺伝子座の欠失を含む。

【0047】

一実施形態では、第2のマウスは、(b)それぞれ、重鎖および軽鎖のマウス遺伝子座に、ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントおよびヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントを含む。

【0048】

一態様では、抗腫瘍抗体を選択するための方法であって、ADCCを媒介するための抗体の能力を決定するステップを含み、ADCCを媒介するための抗体の能力は、本明細書において記載されるマウスの細胞によって媒介されるADCCを決定することによって試験され、抗体は、それが本明細書において記載される遺伝子改変されたマウスの細胞を用いるADCCを媒介する場合、選択される、方法が提供される。特定の実施形態では、遺伝子改変されたマウスの細胞への抗体の結合が決定され、抗腫瘍抗体が、細胞上のヒトFcRに結合するその能力について選択される。特定の実施形態では、ヒトFcRは、低親和性FcRである。

【0049】

一実施形態では、抗腫瘍抗体は、野生型マウスの細胞を通してADCCを媒介するための抗腫瘍抗体の能力と比較した、マウスの細胞を通してADCCを媒介する能力の増強によって同定される。特定の実施形態では、抗腫瘍抗体は、NK細胞を通してADCCを媒介するその能力によって同定される。特定の実施形態では、NK細胞は、ヒトFcRIIAを発現する。

【0050】

一実施形態では、抗腫瘍作用物質を選択するための方法であって、ヒトFcまたは改変ヒトFcを含む作用物質を第1の非ヒト動物に投与するステップであって、第1の非ヒト動物は、本発明に従って遺伝子改変され、ヒト腫瘍を含む、ステップ、腫瘍を含む第2の非ヒト動物に作用物質を投与するステップ、および作用物質の投与に続いて、ヒト腫瘍の成長を遅延させるための、第1の非ヒト動物および第2の非ヒト動物の能力を決定するステップを含み、作用物質は、それが、第2の非ヒト動物においてではなく、第1の非ヒト動物においてヒト腫瘍の成長を遅延させる能力の増強を示す場合、抗腫瘍作用物質として選択される、方法が提供される。

【0051】

一実施形態では、第1の非ヒト動物は、内因性FcRサブユニットの欠失を含むように改変され、FcRIIAサブユニット、FcRIIBサブユニット、F

10

20

30

40

50

c R I I C サブユニット、F c R I I I A サブユニット、F c R I I I B サブユニット、およびその組合せから成る群から選択されるヒトF c R サブユニットを含むように改変される。一実施形態では、第2の動物は、野生型動物である。一実施形態では、第1の非ヒト動物は、内因性F c R 鎖を発現する。

【0052】

一実施形態では、第1の非ヒト動物は、機能的内因性F c R I を発現する。

【0053】

一態様では、低親和性マウスF c R を欠き、機能的F c R 鎖を発現し、ヒトF c R I I A、F c R I I B、F c R I I C、F c R I I I A、およびF c R I I I Bの鎖をコードする遺伝子を含む、マウスを作製するための方法であって、マウスF c R 鎖の遺伝子座で、低親和性マウスF c R 鎖をヒトF c R 鎖と置き換えるステップを含む、方法が提供される。

10

【0054】

一実施形態では、第1のステップは、内因性F c R I I B、F c R I V、およびF c R I I I 遺伝子の鎖を欠失させることならびにヒトF c R I I AおよびF c R I I I A 遺伝子の鎖を挿入することを含み、第2のステップは、第1のステップから結果として生じるマウスゲノムの中にヒトF c R I I B、F c R I I C、およびF c R I I I B 遺伝子の鎖を挿入することを含み、マウスは、機能的マウスF c R 鎖遺伝子を含む。特定の実施形態では、第2のステップのヒトF c R I I B、F c R I I C、およびF c R I I I B 遺伝子の鎖は、第1のステップのヒトF c R I I A およびF c R I I I A 遺伝子の鎖に対して5'側に挿入される。

20

【0055】

一態様では、非霊長動物においてヒト治療薬による細胞殺傷を決定するための方法であって、ヒトF cを含むヒト治療薬に、細胞、非ヒト胚、または非ヒト動物を曝露するステップであって、細胞、胚、または動物は、機能的F c R 鎖を含み、1つまたは複数の内因性低親和性F c R 鎖遺伝子の、1つまたは複数のヒトF c R 鎖による置き換えを含む、ステップおよび細胞、胚、または動物の低親和性ヒトF c R を通して細胞殺傷を媒介するためのヒト治療薬の能力を決定するステップを含む、方法が提供される。

【0056】

一実施形態では、非霊長動物は、マウスである。特定の実施形態では、内因性マウスF c R 鎖遺伝子F c R I I B、F c R I V、およびF c R I I I は、ヒトF c R 鎖遺伝子F c R I I A、F c R I I B、F c R I I C、F c R I I I A、およびF c R I I I Bで置き換えられる。

30

【0057】

一実施形態では、細胞は、B細胞、肥満細胞、好塩基球、マクロファージ、好酸球、好中球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、およびその組合せから選択される。特定の実施形態では、細胞は、NK細胞であり、ヒト抗体またはヒト化抗体によるNK細胞媒介性ADCCが、決定される。特定の実施形態では、低親和性ヒトF c Rは、ヒトF c R I I I Aである。

40

【0058】

一態様では、治療薬依存性の血栓形成を決定するための方法であって、治療薬に、血小板上にヒトF c R I I Aを発現する第1の非ヒト動物を曝露するステップ、当該治療薬に、血小板上にヒトF c R I I Aを発現しない第2の非ヒト動物を曝露するステップ、第1の非ヒト動物および第2の非ヒト動物において、治療薬依存性の血栓形成の量を測定するステップ、ならびに治療薬依存性の血栓形成における差異を決定するステップを含む、方法が提供される。

【0059】

一実施形態では、非ヒト動物は、マウスおよびラットから選択される。

【0060】

50

一実施形態では、治療薬依存性の血栓形成における決定された差異は、ヒトへの治療薬の投与と関連する危険性を同定するために用いられる。一実施形態では、決定された差異は、その必要性のあるヒト患者への治療薬の投与の変化をもたらす。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

遺伝子改変を含むマウスであって、該遺伝子改変が、内因性低親和性FcγR遺伝子の、該内因性マウス低親和性FcγR遺伝子の遺伝子座に配置される、少なくとも2つの低親和性ヒトFcγR遺伝子による置き換えを含み、該マウスが機能的FcγR鎖を含む、マウス。

(項目2)

前記少なくとも2つの低親和性ヒトFcγR遺伝子が、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIC、FcγRIIIA、およびFcγRIIIBから選択される、項目1に記載のマウス。

(項目3)

前記少なくとも2つの低親和性ヒトFcγR遺伝子が、FcγRIIAおよびFcγRIIIAである、項目1に記載のマウス。

(項目4)

前記ヒトFcγRIIIAが、前記マウスのNK細胞上に発現される、項目3に記載のマウス。

(項目5)

前記少なくとも2つの低親和性ヒトFcγR遺伝子が、FcγRIIB、FcγRIIC、およびFcγRIIIBである、項目1に記載のマウス。

(項目6)

前記FcγRIIAおよびFcγRIIIAの遺伝子が、対立遺伝子変異体または多型を含む、項目3に記載のマウス。

(項目7)

ヒト低親和性FcγR対立遺伝子変異体を含み、前記対立遺伝子変異体が、(a)FcγRIIA対立遺伝子変異体131H、(b)FcγRIIIA対立遺伝子変異体158V、(c)FcγRIIB対立遺伝子変異体232I、(d)好中球抗原2(NA2)対立遺伝子によって特徴付けられるFcγRIIIB対立遺伝子変異体、および(e)それらの組合せから成る群から選択される、項目5に記載のマウス。

(項目8)

遺伝子改変されたマウスであって、該遺伝子改変が、FcγRIIB、FcγRIII、およびFcγRIVのサブユニットをコードする内因性マウス遺伝子の、ヒトFcγRIIIAサブユニットをコードする遺伝子による置き換えを含み、該マウスが、内因性マウスFcγRサブユニットを伴うヒトFcγRIIIAタンパク質を発現し、該ヒトFcγRIIIAタンパク質がマウスNK細胞の表面上に発現される、マウス。

(項目9)

マウスNK細胞が、前記マウスの血中で循環するNK細胞であり、該マウスNK細胞の表面上に発現される該FcγRIIIAタンパク質が、ヒトFcγまたは改変ヒトFcγを含むイムノアドヘシンまたは抗体に結合し、該イムノアドヘシンまたは抗体が、該マウスにおける標的細胞に特異的に結合し、該NK細胞の該FcγRIIIAへの、該イムノアドヘシンまたは該抗体の結合が、該標的細胞のNK細胞殺傷を媒介する、項目8に記載の遺伝子改変されたマウス。

(項目10)

前記標的細胞にヒト病原体が感染しており、前記イムノアドヘシンまたは抗体が該ヒト病原体のエピトープに特異的に結合する、項目9に記載の遺伝子改変されたマウス。

(項目11)

前記標的細胞が腫瘍細胞であり、前記イムノアドヘシンまたは抗体が該腫瘍細胞のエピトープに特異的に結合する、項目9に記載の遺伝子改変されたマウス。

10

20

30

40

50

(項目12)

治療薬依存性の細胞殺傷を測定するための方法であって、

(a) 遺伝子改変されたマウスに、該マウスにおけるNK細胞でない標的細胞に特異的に結合する治療剤を投与するステップであって、該治療剤がヒトFcを含む、ステップと、

(b) 該マウスまたは該マウスの組織試料におけるNK媒介性の標的細胞殺傷のレベルを測定するステップと、

(c) 前記治療剤によって媒介される標的細胞殺傷の量を決定し、それによって、治療薬依存性の細胞殺傷を測定するステップと

を含み、該遺伝子改変が、マウスFcRIIBのサブユニットをコードする遺伝子の欠失、マウスFcRIIIのサブユニットをコードする遺伝子の欠失、およびマウスFcRIVのサブユニットをコードする遺伝子の欠失を含み、前記マウスが、ヒトFcRIIIAのサブユニットをコードする遺伝子を、内因性マウスサブユニットの遺伝子座に含み、該マウスが機能的FcR鎖サブユニットを発現する、方法。

10

(項目13)

前記マウスが、前記内因性マウスサブユニットの遺伝子座に、FcRIIAサブユニット、FcRIIBサブユニット、FcRIICサブユニット、FcRIIIBサブユニット、およびそれらの組合せから選択されるヒトFcRサブユニットをコードする遺伝子をさらに含む、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記標的細胞がヒト病原体であり、前記治療薬が、該ヒト病原体のエピトープに特異的に結合する、項目12に記載の方法。

20

(項目15)

前記標的細胞が、ヒト病原体が感染しているマウス細胞であり、前記治療薬が、該ヒト病原体のエピトープに特異的に結合する、項目12に記載の方法。

(項目16)

前記標的細胞が、ヒト病原体が感染しているヒト細胞であり、前記治療薬が、該ヒト病原体のエピトープに特異的に結合する、項目12に記載の方法。

(項目17)

前記標的細胞が、ヒト腫瘍細胞であり、前記治療薬が、該ヒト腫瘍細胞のエピトープに特異的に結合する、項目12に記載の方法。

30

(項目18)

前記組織試料が血液試料である、項目12に記載の方法。

(項目19)

前記治療薬が抗体である、項目12に記載の方法。

(項目20)

前記抗体がヒト抗体である、項目17に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、マウスFcRIIB、FcRIV、およびFcRIII遺伝子を示す、マウスにおける野生型低親和性FcR遺伝子座、ならびにこれらの遺伝子の標的欠失のために使用される、部位特異的組換え部位に挟まれたネオマイシンカセットを含むマウスFcRターゲティングベクターの略図である。

40

【図2】図2は、野生型FcRおよび低親和性FcR鎖遺伝子欠損マウス(mFcRKO)についての、内因性mFcRIIおよびmFcRIII遺伝子の発現を含む、B細胞(抗CD19)、NK細胞(抗NKp46)、およびマクロファージ(抗F4/80)についてゲーティングされた脾細胞のヒストグラムを示す。

【図3A】図3A~3Dは、いくつかのリンパ球コンパートメント：骨髄(図3A)、血液(図3B)、リンパ節(図3C)、および脾臓(図3D)における、ヒト化CD20マウス(hCD20)およびFcRノックアウトマウスに交配したヒト化CD20マウス(hCD20/FcRKO)における、マウスFc(Ab168)またはヒトFc

50

(A b 735) を有するヒト抗ヒトCD20抗体を用いたB細胞の*in vivo*枯渇を示す。それぞれのグラフについて、Y軸は、ゲーティングされたB細胞(B220⁺/IgM⁺またはB220⁺/CD19⁺)のパーセントを示し、X軸は、それぞれの動物グループについての抗体用量を示す：10mg/kg対照抗体(C)、2mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(2Ab)、および10mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(10Ab)。

【図3B】図3A~3Dは、いくつかのリンパ球コンパートメント：骨髄(図3A)、血液(図3B)、リンパ節(図3C)、および脾臓(図3D)における、ヒト化CD20マウス(hCD20)およびFcRノックアウトマウスに交配したヒト化CD20マウス(hCD20/FcR KO)における、マウスFc(Ab168)またはヒトFc(Ab735)を有するヒト抗ヒトCD20抗体を用いたB細胞の*in vivo*枯渇を示す。それぞれのグラフについて、Y軸は、ゲーティングされたB細胞(B220⁺/IgM⁺またはB220⁺/CD19⁺)のパーセントを示し、X軸は、それぞれの動物グループについての抗体用量を示す：10mg/kg対照抗体(C)、2mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(2Ab)、および10mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(10Ab)。

10

【図3C】図3A~3Dは、いくつかのリンパ球コンパートメント：骨髄(図3A)、血液(図3B)、リンパ節(図3C)、および脾臓(図3D)における、ヒト化CD20マウス(hCD20)およびFcRノックアウトマウスに交配したヒト化CD20マウス(hCD20/FcR KO)における、マウスFc(Ab168)またはヒトFc(Ab735)を有するヒト抗ヒトCD20抗体を用いたB細胞の*in vivo*枯渇を示す。それぞれのグラフについて、Y軸は、ゲーティングされたB細胞(B220⁺/IgM⁺またはB220⁺/CD19⁺)のパーセントを示し、X軸は、それぞれの動物グループについての抗体用量を示す：10mg/kg対照抗体(C)、2mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(2Ab)、および10mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(10Ab)。

20

【図3D】図3A~3Dは、いくつかのリンパ球コンパートメント：骨髄(図3A)、血液(図3B)、リンパ節(図3C)、および脾臓(図3D)における、ヒト化CD20マウス(hCD20)およびFcRノックアウトマウスに交配したヒト化CD20マウス(hCD20/FcR KO)における、マウスFc(Ab168)またはヒトFc(Ab735)を有するヒト抗ヒトCD20抗体を用いたB細胞の*in vivo*枯渇を示す。それぞれのグラフについて、Y軸は、ゲーティングされたB細胞(B220⁺/IgM⁺またはB220⁺/CD19⁺)のパーセントを示し、X軸は、それぞれの動物グループについての抗体用量を示す：10mg/kg対照抗体(C)、2mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(2Ab)、および10mg/kgヒト抗ヒトCD20抗体(10Ab)。

30

【図4】図4は、低親和性マウスFcR遺伝子座の、ネオマイシンを標的にした欠失、ならびに欠失させたマウス遺伝子座内に2つのヒト低親和性FcR遺伝子(hFcRIIIAおよびhFcRIIA)を挿入するための、部位特異的組換え部位に挟まれたヒグロマイシンカセットを含む第2のターゲティングベクターの略図である。血小板上のhFcRIIIAの発現のために、ヒトFcRIIIA-IIIATターゲティングベクターのhFcRIIIA遺伝子に作動可能に連結した伸長プロモーター領域を用いる；血小板上のhFcRIIIAの発現を防止するために、プロモーター領域が取り除かれているか、実質的に取り除かれている。

40

【図5A】図5Aは、野生型およびヒトFcRIIIA-IIIAホモ接合体マウス(ヒトFcRIIIA/FcRIIIA HO)についての、ヒトFcRIIIAの発現を含む、NK細胞(抗Nkp46)およびマクロファージ(抗F4/80)についてゲーティングされた脾細胞のヒストグラムを示す。

【図5B】図5Bは、野生型およびヒトFcRIIIA-IIIAホモ接合体マウス(ヒトFcRIIIA/FcRIIIA HO)についての、ヒトFcRIIIAの発現を

50

含む、好中球（抗Ly6G）およびマクロファージ（抗F4/80）についてゲーティングされた脾細胞のヒストグラムを示す。

【図6】図6は、2つの低親和性ヒトFcR遺伝子（hFcRIIIAおよびhFcRIIA）の挿入を含む低親和性マウスFcR遺伝子座の、ヒグロマイシンを標的にした欠失、ならびに3つのさらなる低親和性ヒトFcR遺伝子（hFcRIIB、hFcRIIB、およびhFcRIIC）、および部位特異的組換え部位に挟まれたネオマイシンカセットを挿入するための第3のターゲティングベクターの略図である。

【図7】図7は、野生型およびヒトFcRIIIA-RIIB-RIIA-RIIB-RIICホモ接合体マウス（ヒトFcRIIIA/FcRIIB/FcRIIA/FcRIIB/FcRIICHO）についての、ヒトFcRIIBおよびヒトFcRIIBの発現を含む、B細胞（抗CD19）および好中球（抗Ly6G）についてゲーティングされた脾細胞のヒストグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

【0062】

詳細な説明

本発明は、方法および条件が変更されてもよいので、記載される特定の方法および実験条件に限定されない。本明細書において使用される術語は、特定の実施形態を説明する目的のためのものであるにすぎず、本発明の範囲が請求項によってのみ限定されるので、限定を意図するものではない。

【0063】

その他に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する当技術分野の当業者らによって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものに類似するまたはそれと等価であるいかなる方法および材料も、本発明の実施または試験において使用することができるが、ここでは、特定の方法及び材料が記載される。本明細書において言及される刊行物はすべて、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる。

【0064】

語句「標的構築物」は、標的領域を含むポリヌクレオチド分子を含む。標的領域は、標的細胞、組織、または動物における配列に実質的に相同な配列を含み、細胞、組織、または動物のゲノム内の位置への標的構築物の組み込みをもたらす。特定の実施形態では、標的構築物は、さらに特定の対象の核酸配列または遺伝子、選択マーカー、制御配列または調節配列、およびそのような配列を含む組換えを支援するまたは促進するタンパク質の外因性の追加を通して媒介される組換えを可能にする他の核酸配列を含む。他の特定の実施形態では、標的構築物は、対象の遺伝子をさらに含み、対象の遺伝子は、内因性配列によってコードされるタンパク質と類似する機能を有するタンパク質をコードする異種遺伝子である。

【0065】

用語「置き換え」は、その他に示されない限り、DNA配列が、ゲノム内の配列をそのゲノム配列の遺伝子座で異種配列（たとえばマウスにおけるヒト配列）によって置き換えるような方法で細胞のゲノムの中に配置されることを含む。そのように配置されたDNA配列は、そのように配置された配列を得るために使用される供給源のDNAの一部である1つまたは複数の調節配列を含んでいてもよい（たとえばプロモーター、エンハンサー、5'または3'非翻訳領域など）。たとえば、様々な実施形態では、置き換えは、内因性配列の発現ではなく、そのように配置されたDNA配列（異種配列を含む）由来の遺伝子産物の生産をもたらす、内因性配列の異種配列との置換であり、置き換えは、内因性ゲノム配列の、内因性ゲノム配列によってコードされるタンパク質に類似する機能を有するタンパク質をコードするDNA配列とのものである。（たとえば、内因性ゲノム配列は、低親和性マウスFcR受容体をコードし、DNA断片は、たとえばヒトFcRIICおよび/またはFcRIIBなどのような、1つまたは複数のヒト低親和性FcR受容体をコードする）。

10

20

30

40

50

【0066】

用語「Fc R」は、Fc、たとえばIgG免疫グロブリンのFc部分に対する受容体を含む。Fc R遺伝子は、細胞の表面上に発現される鎖を含み、リガンド結合ドメインとして働き、Fc R鎖のホモ二量体またはFc R鎖および鎖のヘテロ二量体を伴う。いくつかの異なるFc R遺伝子があり、それらは、免疫複合体におけるIgGへの優先的な結合に従って低親和性タイプおよび高親和性タイプに分類することができる。ヒトにおける低親和性Fc R遺伝子は、Fc R I I A、Fc R I I B、Fc R I I C、Fc R I I I A、およびFc R I I I Bを含み、ほとんどのこれらの遺伝子内に、天然に存在する遺伝子差異または多型が、自己免疫疾患を有するヒト被験体において記載されている。本開示を読むに際して当業者らは、ゲノムにおける1つまたは複数の内因性低親和性Fc R遺伝子（またはすべて）を、1つまたは複数の異種低親和性Fc R遺伝子（たとえば、対立遺伝子形態などのような変異体または多型、他の種由来の遺伝子、キメラ形態など）によって置き換えることができることを認識するであろう。

10

【0067】

語句「対立遺伝子変異体」は、同じ遺伝子の一連の異なる形態をもたらす、遺伝子の通常の配列の変異を含む。異なる形態は、たとえば遺伝子由来のタンパク質の配列において20までのアミノ酸の差異を含んでいてもよい。たとえば、対立遺伝子は、同じ物理的な遺伝子座での代替のDNA配列であることを理解することができ、対立遺伝子は、同じ遺伝子についての他の対立遺伝子において結果として生じないまたは他の対立遺伝子において様々な程度で結果として生じる、ある種の疾患または状態に対する感受性などのような異なる形質（たとえば遺伝的な表現型の特徴）をもたらしてもよいまたはもたらさなくてもよい。

20

【0068】

「アクセサリ細胞」は、免疫応答のエフェクター機能に関与する免疫細胞を含んでいてもよい。例示的な免疫細胞は、リンパまたは骨髄起源の細胞、たとえば、リンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、血小板、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、肥満細胞などを含む。アクセサリ細胞は、それらの表面上に発現される受容体、たとえばFc Rを通して免疫系の特異的な機能を実行する。特定の実施形態では、アクセサリ細胞は、細胞表面上に発現されるFc R、たとえば低親和性Fc Rを通して媒介されるADCCを引き起こすことができる。たとえば、Fc Rを発現するマクロファージは、抗体被覆細菌の食作用および破壊に関与する。アクセサリ細胞はまた、他の免疫プロセスを媒介する作用物質を放出することができるかもしれない。たとえば、肥満細胞は、Fc Rに結合した抗体によって活性化され、感染の部位で、顆粒、たとえば炎症性分子（たとえばサイトカイン）を放出することができる。様々な他の実施形態では、アクセサリ細胞上のFc Rの発現は、他の因子（たとえばサイトカイン）によって調節することができる。たとえば、Fc R I およびFc R I I I 発現は、インターフェロン-（IFN-）を用いる刺激によって誘導することができる。

30

【0069】

マウスおよびヒトFc R

免疫グロブリンのFc（つまり定常）領域に対する受容体（Fc R）は、免疫応答の調節において重要な役割を果たす。Fc Rは、抗体が結合した外来抗原を有効に処分するために、宿主の免疫系のアクセサリ細胞上に存在する。Fc Rはまた、免疫系のアクセサリ細胞の活性化および阻害性の応答の平衡を保つ際に重要な役割を果たす。Fc Rは、マクロファージによる食作用、肥満細胞の脱顆粒、抗体-抗原複合体の取り込み、および免疫応答の調節ならびに他の免疫系プロセスに関与する。

40

【0070】

マウスおよびヒトでは、発現された抗体レパートリーにおいて存在する免疫グロブリンアイソタイプにそれぞれ特異的である別個のFc Rが、異なるアクセサリ細胞の表面上に異なって発現される。たとえば、免疫グロブリンG（IgG）抗体は、IgG受容体（

50

FcR)を通してエフェクター機能を媒介する。FcRは、3つのグループに分類される：高親和性活性化FcRI(CD64)、低親和性阻害性FcRII(CD32)、および低親和性活性化FcRIII(CD16)。グループはそれぞれ、マウスおよびヒトの両方に存在するが、それらが存在する免疫細胞のアイソフォームおよびサブセットの数は異なる。たとえば、FcRIIAおよびFcRIIBは、ヒトにおいてアクセサリ細胞上に発現されるが、報告によれば、マウスでは不在である。さらに、それぞれのFcRに対する異なるIgGアイソタイプ(たとえばIgG1)の親和性は、マウスおよびヒトにおいて異なる。

【0071】

FcRを通しての細胞シグナル伝達の活性化または阻害およびFcRへの抗体結合と関連するエフェクター機能は、FcRの細胞内ドメインのまたは共受容体のサブユニットの特異的配列モチーフによって媒介されると考えられる。受容体の活性化は、最も一般には、免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含有する共通の鎖(FcR鎖)と関連する。ITAMは、FcRへの抗体結合に応じてリン酸化されるチロシン残基を含む、約9~12のアミノ酸の特異的配列を含有する。リン酸化は、シグナル伝達カスケードを導く。FcR鎖をコードする遺伝子を欠くマウス(FcR鎖KO)が報告された(たとえばTakaiら(1994年) FcR Chain Depletion Results in Pleiotropic Effector Cell Defects, Cell 76巻: 519~529頁; van Vugtら(1996年) FcR-Chain Is Essential for Both Surface Expression and Function of Human FcRI (CD64) In Vivo, Blood 87巻(9号): 3593~3599頁; およびParkら(1998年) Resistance of Fc Receptor-deficient Mice to Fatal Glomerulonephritis, J. Clin. Invest. 102巻(6号): 1229~1238頁を参照されたい)。FcR鎖は、報告によれば、ほとんどのFcRの適切な表面発現および機能(たとえばシグナル伝達、食作用など)にとって不可欠であり、FcR鎖KOMausは、いくつかの報告書によれば、FcRIを欠く。しかしながら、他の報告は、FcR鎖KOMausが、実際は、ある種のアクセサリ細胞の表面上にFcRIを発現し、発現されたFcRIは、報告によれば、それが、発現されるFcR鎖の非存在下において、マウスにおいて、IgGに結合するという点で機能的に見えるということを示す(Barnesら(2002年) FcRI-Deficient Mice Show Multiple Alterations to Inflammatory and Immune Responses, Immunity 16巻: 379~389頁)。

【0072】

対照的に、FcRIIBは、その細胞質ドメイン中に免疫受容抑制性チロシンモチーフ(ITIM)を含有する、阻害性の受容体である。ITAMと同様に、ITIMは、リン酸化することができるチロシン残基を含む配列モチーフである。しかしながら、ITIMのリン酸化に続く下流の事象は、免疫細胞機能の、活性化ではなく阻害を導く。報告によれば、FcRIIBが欠損したマウスは、野生型マウスと比較して、B細胞抗体応答のダウンレギュレーターとしてFcRIIBの役割を支持する観察である、抗体応答の増加を示す(Takaiら(1996年) Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice, Nature 379巻: 346~349頁)。

【0073】

ヒトでは、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIC、FcRIIIA、およびFcRIIIBは、古典的な低親和性FcR遺伝子と考えられ、同じ染色体上にも位置する(Suら(2002年) Genomic organization of classical human low-affinity Fc receptor genes, Genes and Immunity 3巻(補足1): S51~S56頁)。これらの遺伝子は、別個の表現型、たとえば、受容体のリガンド結合および機能の改変と関連するいくつかの多型を示す。いくつかの多型は、自己免疫疾患、たとえば全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ(RA)、および多発性硬化症(MS)と関連する。様々なヒトFcR(hFcR)についてのトランスジェニックマウスが開発されており、高親和性抗体を生成し、特異的細胞応答を誘発する能力につ

いて治療用抗体を試験し、異常な免疫応答を回復させる化合物をスクリーニングするなどの疾患モデルとして使用されている（たとえばHeijnenら（1996年）A Human FcγRI/CD64 Transgenic Model for In Vivo Analysis of (Bispecific) Antibody Therapeutics, J. Hematother. 4巻：351～356頁；Heijnenおよびvan de Winkel（1996年）Antigen Targeting to Myeloid-specific Human FcγRI/CD64 Triggers Enhanced Antibody Responses in Transgenic, J. Clin. Invest. 97巻（2号）：331～338頁；米国特許第6,111,166号、第6,676,927号、第7,351,875号、第7,402,728号、ならびに第7,416,726号を参照されたい）。

【0074】

免疫系の抗体およびアクセサリ細胞の間のブリッジを提供する際のFcRの重要な役割にもかかわらず、すべての低親和性hFcRが発現されるモデル系は、現在、存在しない。すべての低親和性hFcRが同時発現されるマウスは、内因性マウスFcRを欠くマウスを含めて、様々な実施形態において、ADC媒介性の効果を含むヒト抗体治療薬の効果を正確に反映するために使用することができる。そのようなマウスは、ヒトにおいて、特に、ヒト抗体治療薬の試験との関連において、免疫学的プロセスのより正確な評価を達成することができる動物モデルを提供することによって、たとえばRA、I型糖尿病、SLE、および自己免疫病などのようなヒト疾患の治療のために、治療用抗体のエンジニアリング、分析、および評価において、重大なツールとして役立つであろう。マウスはまた、低親和性受容体に結合する治療薬について、治療薬依存性の細胞殺傷を評価するために、したがって、有用なヒト治療薬を同定するために、*in vitro*アッセイにおいて使用することができる、低親和性受容体を有する細胞の有益な供給源となるであろう。

【0075】

内因性低親和性FcR遺伝子欠損マウス

内因性低親和性マウスFcR遺伝子を発現しないが、内因性マウスFcR鎖を発現する遺伝子改変された非ヒト動物が提供される。様々な実施形態では、FcR鎖は、野生型マウスと同じまたは実質的に同じである分布（つまり細胞型において）およびレベルでマウスにおいて発現される。内因性低親和性FcR遺伝子は、免疫細胞の表面上にまたは動物の末梢において可溶性で発現することができる。内因性低親和性マウスFcR遺伝子を発現しない非ヒト動物を作製するための遺伝子改変は、例証としてマウスを使用することによって好都合に説明される。本発明による遺伝子改変されたマウスは、様々な方法において作製することができ、これらの特定の実施形態は、本明細書において議論される。

【0076】

内因性の遺伝子座でのFcR遺伝子配置を示すために、低親和性マウスFcR遺伝子の遺伝子座の略図（正確な縮尺ではない）を図1（上）中に提供する。示されるように、低親和性マウスFcR遺伝子FcRIIB、FcRIV、およびFcRIIIは、1つの染色体上にすぐ近くにも存在する。これらの遺伝子のそれぞれは、抗体分子のFc部分への結合を担う鎖またはリガンド結合ドメインを含む。

【0077】

内因性低親和性FcR遺伝子の鎖をコードするヌクレオチド配列を欠く遺伝子改変されたマウスは、当技術分野において公知の任意の方法によって作製することができる。たとえば、選択マーカー遺伝子を用いて低親和性マウスFcR鎖遺伝子を欠失させるターゲティングベクターを作製することができる。図1は、内因性低親和性FcR鎖の遺伝子座の上流の配列を含有する5'相同性アーム、それに続く薬剤選択カセット（たとえばLoxP配列に挟まれたネオマイシン抵抗性遺伝子）、および内因性低親和性FcR鎖の遺伝子座の下流の配列を含有する3'相同性アームを有する標的構築物によってターゲティングされたマウスゲノム（下）を示す。この遺伝子座での相同組換えに際して、内因性低親和性FcR鎖の遺伝子座は、薬剤選択カセットによって

10

20

30

40

50

置き換えられる(図1の下)。内因性低親和性FcR鎖遺伝子の遺伝子座は、それによって欠失させられ、内因性低親和性マウスFcR鎖遺伝子を発現しない細胞または非ヒト動物がもたらされる。薬剤選択カセットは、レコンビナーゼの続く追加によって(たとえばCre処理によって)任意選択で除去されてもよい。

【0078】

内因性低親和性マウスFcR鎖遺伝子(複数可)を非機能性にするためのマウスの遺伝子改変は、様々な実施形態において、免疫応答において欠損を示すマウスをもたらす、正常および病気の免疫機能、IgG媒介性のプロセス、ならびに自己免疫疾患における、内因性低親和性マウスFcR鎖遺伝子の協動的なならびに個々の役割を評価するのに有用なマウスを作製する。様々な実施形態では、FcR鎖ではなく、内因性低親和性マウスFcR鎖遺伝子の鎖の改変は、表面発現および機能にFcR鎖を必要とする他の内因性FcR鎖遺伝子(たとえば高親和性FcRI)の潜在的な低下を回避し、したがって、鎖依存性のプロセスを通して媒介される様々な他の免疫学的機能およびプロセスを維持する。

10

【0079】

いくつかの報告によれば、FcRI鎖欠損マウスは、FcRIIIおよびFcRIの表面発現を欠く。しかしながら、FcRIは、報告によれば、FcRI鎖欠損マウスにおいて細胞表面上に検出されており、報告によれば、少なくとも部分的に機能的である。対照的に、本発明によるマウスは、非改変内因性FcRI鎖を含有し、これは、FcRI鎖を必要とする他のFcRI鎖遺伝子の天然細胞表面発現パターンおよび細胞機能を維持する。

20

【0080】

様々な実施形態では、本発明のマウスは、それらが有する遺伝子改変が、低親和性FcRI鎖遺伝子に全体的に充てられるのではなく、他の免疫学的機能に必要な他の遺伝子の維持をもたらすという点で、他のFcRI鎖欠損マウスに対して利点を示す。たとえば、機能的FcRI鎖があれば、他の鎖依存性のタンパク質(たとえばFcRI)は、このFcRI鎖と会合することができ、免疫応答におけるエフェクター細胞機能に参加するであろう。本発明に従う様々な遺伝子改変されたマウスでは、内因性低親和性FcRI鎖遺伝子(1つまたは複数のサブユニット)を欠失させながら、そのような機能の維持(機能的FcRI鎖の存在による)は、自己免疫病におけるFcRI鎖の役割のより正確な解明を可能にすると考えられる。

30

【0081】

低親和性FcRIヒト化マウス

低親和性ヒトFcRI鎖遺伝子を発現する遺伝子改変された非ヒト動物が提供される。低親和性ヒトFcRI鎖遺伝子は、動物の免疫系のアクセサリ細胞の表面上にまたは動物の末梢において可溶性で発現することができる。

【0082】

遺伝子改変は、様々な実施形態において、1つまたは複数の低親和性マウスFcRI鎖遺伝子の機能的鎖の欠失を含み、いくつかの実施形態において、2つ以上の、3つ以上の、4つ以上の、または5つの低親和性ヒトFcRIサブユニット遺伝子による置き換えを含むさらなる改変を含み、非ヒト動物は、機能的マウスFcRI鎖遺伝子を発現する。非ヒト動物、非ヒト胚、および細胞を作製するための遺伝子改変された非ヒト胚、細胞、および標的構築物もまた、提供される。

40

【0083】

特異的多型形態または対立遺伝子変異体(たとえば単一アミノ酸差異)を含むヒトFcRI鎖遺伝子を発現するマウスを作製するための組成物および方法が提供され、ヒトプロモーターおよびヒト調節配列からそのような遺伝子を発現するマウスを作製するための組成物および方法を含む。方法は、内因性低親和性マウスFcRI鎖遺伝子を選択的に非機能性にするステップ(たとえばその鎖の欠失によって)およびマウスにおいて、低親和性ヒトFcRIサブユニット遺伝子を発現させるために、内因性低親和性マウスFcRI

50

遺伝子の遺伝子座に低親和性ヒトFcR遺伝子の鎖を用いるステップを含む。低親和性マウスFcR遺伝子の欠失は、FcR鎖遺伝子ではなく、1つまたは複数の鎖遺伝子の欠失によって成される。このアプローチは、機能的内因性FcR鎖遺伝子を保持しながら、1つまたは複数の内因性低親和性FcR鎖遺伝子を選択的に非機能性にする。

【0084】

内因性FcR鎖置き換えアプローチは、FcR鎖のゲノム配列が単一の断片によって置き換えられ、そのため、必要な調節配列を含むことによって正常な機能性を保持するので、様々な実施形態において、動物における天然FcR媒介性のシグナル伝達の比較的最小限の破壊を用いる。したがって、そのような実施形態では、FcR鎖改変は、機能的FcR鎖分子に依存する他の内因性FcRに影響しない。さらに、様々な実施形態では、改変は、細胞表面上の、いくつかのFcR鎖の適切な発現におよび活性化された受容体から結果として生じる下流のシグナル伝達に必要なとされたと考えられるFcR鎖および内因性FcR鎖を含む機能的受容体複合体の構築に影響しない。FcR鎖が欠失していないので、様々な実施形態では、内因性FcR鎖遺伝子の、ヒトFcR鎖遺伝子による置き換えを含有する動物は、アクセサリ細胞の表面上に存在するヒトFcR鎖へのIgG免疫グロブリンのFc部分の結合を通しての、抗体からの正常なエフェクター機能进行处理することができるはずである。

【0085】

欠失させた内因性低親和性マウスFcR遺伝子の略図（正確な縮尺ではない）を、図4（上）中に提供する。示されるように、低親和性ヒトFcR遺伝子FcRIIAおよびFcRIIIAは、ヒト低親和性ヒトFcRIIAおよびFcRIIIA遺伝子を含有するゲノム断片を有する標的構築物（ヒトFcRIIIA-IIIATargetingベクター）によって、欠失させた内因性低親和性マウスFcR遺伝子の遺伝子座内に挿入される。これらの遺伝子のそれぞれは、抗体分子のFc部分への結合を担う、ヒトFcR鎖またはリガンド結合ドメインを含む。

【0086】

内因性低親和性マウスFcRの遺伝子座で低親和性ヒトFcR遺伝子を発現する遺伝子改変されたマウスは、当技術分野において公知の任意の方法によって作製することができる。たとえば、選択マーカー遺伝子と共に低親和性ヒトFcR遺伝子（たとえばFcRIIAおよびFcRIIIA）を導入するターゲティングベクターを作製することができる。図4は、内因性低親和性FcRの遺伝子座の欠失を含むマウスゲノムを示す（上）。示されるように、標的構築物は、内因性低親和性マウスFcRの遺伝子座の上流の配列を含有する5'相同性アーム、それに続く薬剤選択カセット（たとえば、LoxP配列に両側で挟まれたヒグロマイシン抵抗性遺伝子）、ヒトFcRIIA遺伝子、ヒトHSP76遺伝子、およびヒトFcRIIIA遺伝子を含有するゲノム断片、ならびに内因性低親和性マウスFcRの遺伝子座の下流の配列を含有する3'相同性アームを含有する。欠失させた遺伝子座での相同組換えに際して、薬剤選択カセットは、ターゲティングベクター中に含有される配列によって置き換えられる（図4の下）。したがって、内因性低親和性FcR遺伝子の遺伝子座は、低親和性ヒトFcR遺伝子によって置き換えられ、低親和性ヒトFcR遺伝子を発現する細胞または動物がもたらされる。薬剤選択カセットは、レコンビナーゼの続く追加によって（たとえばCre処理によって）任意選択で除去されてもよい。

【0087】

血小板上のhFcRIIAの発現については、標的構築物であるヒトhFcRIIA-IIIATargetingベクターは、たとえば、ヒトゲノムにおいてhFcgRIIA遺伝子に作動可能に連結されたすべてまたは実質的にすべてのヒトプロモーター領域を含む伸長配列を含む。血小板上のhFcRIIAの発現を防止するために、標的構築物は、ヒトにおいてhFcRIIA遺伝子に作動可能に連結された、すべてまたは実質的にすべてのヒトプロモーター領域を欠く。

10

20

30

40

50

【0088】

キメラの遺伝子座へのさらなる改変(図4の下)は、2つのヒトFc R遺伝子による置き換えについて記載される類似する技術を使用して達成することができる。内因性低親和性Fc R遺伝子の遺伝子座を2つのヒトFc R遺伝子によって置き換えるための改変は、他の低親和性ヒトFc R遺伝子の組み込みのための出発点をさらに提供することができる。たとえば、2つのヒト低親和性Fc R遺伝子によって置き換える内因性低親和性Fc Rの遺伝子座の略図(正確な縮尺ではない)を、図6(上)において提供する。示されるように、低親和性ヒトFc R遺伝子Fc RIIB、Fc RIIC、およびFc RIIIBは、低親和性ヒトFc RIIB、Fc RIIC、およびFc RIIIB遺伝子を含むゲノム断片を有する他の標的構築物(ヒトFc RIIB - I 10
IIIB - IICターゲティングベクター)によって、改変内因性低親和性マウスFc R遺伝子の遺伝子座内に挿入される。これらの遺伝子のそれぞれは、抗体分子のFc部分への結合を担う、ヒトFc R遺伝子の鎖またはリガンド結合ドメインを含む。

【0089】

内因性低親和性マウスFc Rの遺伝子座に5つの低親和性ヒトFc R遺伝子を発現する遺伝子改変されたマウスは、当技術分野において公知の任意の方法によって作製することができる。たとえば、選択マーカー遺伝子と共に低親和性ヒトFc R遺伝子(たとえばFc RIIB、Fc RIIC、およびFc RIIIB)を導入するターゲティングベクターを作製することができる。図6は、内因性低親和性Fc Rの遺伝子座の2つの低親和性ヒトFc R遺伝子による置き換えを含むマウスゲノムを示す(上)。示 20
されるように、標的構築物は、内因性低親和性マウスFc Rの遺伝子座の上流の配列を含有する5'相同性アーム、それに続く薬剤選択カセット(たとえば、LoxP配列に両側で挟まれたネオマイシン抵抗性遺伝子)、ヒトFc RIIB遺伝子、ヒトFc RIIIB、ヒトHSP77遺伝子、ヒトFc RIIC遺伝子を含有するゲノム断片、それに続く内因性の遺伝子座に存在する低親和性ヒトFc RIIIA遺伝子の上流の配列を含有する3'相同性アームを含有する。改変の遺伝子座での相同組換えに際して、ヒトFc RIIB、Fc RIIIB、およびFc RIIC遺伝子は、ターゲティングベクター中に含有される配列によって、内因性低親和性Fc R遺伝子の遺伝子座に先に存在するヒトFc RIIIAおよびFc RIIA遺伝子の5'に挿入される(図6の下)。したがって、改変内因性低親和性Fc R遺伝子の遺伝子座は、3つのさらなる低親 30
和性ヒトFc R遺伝子を組み込むためにさらに改変され、5つの低親和性ヒトFc R遺伝子を発現する細胞または動物がもたらされる。薬剤選択カセットは、レコンビナーゼの続く追加によって(たとえばCre処理によって)任意選択で除去されてもよい。図6(下)は、結果として生じる遺伝子座の構造を示し、これは、動物の免疫系のアクセサリ細胞の表面上に検出することができる5つの低親和性ヒトFc R遺伝子を発現し、適切に、内因性Fc R鎖と独立して会合するであろう。

【0090】

Fc R欠損マウスおよびFc Rヒト化マウスの実験モデル

内因性低親和性マウスFc R遺伝子を発現しない遺伝子改変された非ヒト動物は、たとえば、免疫応答における個々の低親和性Fc R遺伝子の様々な機能を解明するのに、細胞性免疫(たとえばADCC)を介してのヒト治療用抗体の効能を測定するのに、免疫疾患または障害におけるFc Rの役割を決定するのに、免疫疾患または障害のモデルとして役立つのに、1つまたは複数のFc Rタンパク質に対する抗体を生成するのに、および対象の他の遺伝子改変されたマウスを生成するために交配仲間として役立つのに有用である。 40

【0091】

一実施形態では、本発明によるマウスは、そのようなマウスに作用物質を投与することによって、低親和性Fc R遺伝子を発現しないマウスによって、失われた細胞傷害性効果(野生型マウスと比較して)を決定するために使用することができ、作用物質は、野生型マウスにおいてFc R依存性の細胞傷害性効果を引き起こすことが公知である。一実 50

施形態では、本発明のマウスに腫瘍細胞が移植され、続く期間の後に、腫瘍細胞の表面上に発現される抗原に特異的な抗体が注射される。抗体のアイソタイプは、注射前に既知であり、動物は、野生型動物において観察されるADCCとの比較によってFcR依存性のADCCの欠陥について分析される。

【0092】

他の態様では、内因性低親和性受容体が欠損したマウスは、自己免疫疾患の*in vivo*モデルを開発するために、他の免疫欠損マウスと組み合わせることができる（たとえば交配によって）。たとえば、重症複合免疫不全症（SCID）マウスは、免疫系を研究するためのモデル生物として当技術分野においてルーチン的に使用される。SCIDマウスは、TもしくはBリンパ球を作るまたは補体系のいくつかの成分を活性化する能力が損なわれており、効率的に感染と戦うことができず、腫瘍を拒絶することができず、移植を拒絶することができない。本発明の低親和性FcRサブユニット遺伝子欠損マウスは、抗体治療薬（たとえば抗腫瘍抗体）の投与に応じた宿主動物における細胞の枯渇を確認するためにSCIDマウスに交配されてもよく、これにより、*in vivo*において腫瘍細胞の枯渇におけるADCCおよび補体依存性細胞障害作用（CDC）の役割が決定されるであろう。

10

【0093】

他の態様では、内因性低親和性FcR遺伝子の、低親和性ヒトFcR遺伝子による置き換えを含む遺伝子改変された非ヒト動物が提供される。そのような動物は、完全ヒト抗体およびhFcR媒介性のADCCの薬物動態を研究するのに有用である。さらに、ヒトFcR遺伝子は、疾患（たとえばSLE、RA、ウェゲナー肉芽腫症、ギラン-バレー症候群、および多発性硬化症）と関連する多型または対立遺伝子変異体を示すことが示された。したがって、内因性低親和性FcR遺伝子の、ヒトFcR遺伝子の特異的対立遺伝子形態または多型形態による置き換えを含む遺伝子改変された非ヒト動物は、動物において、ヒト自己免疫疾患および多型と関連する形質を研究するために使用することができる。特定の実施形態では、ヒトFcR遺伝子の対立遺伝子形態は、ヒトIgGに対する効能の増強と関連する。

20

【0094】

他の特定の実施形態では、ヒト抗体治療薬の効能に対するヒト低親和性FcR多型の影響が、決定される。特定の実施形態では、抗腫瘍抗体は、ヒトFcRの第1の多型を含む第1のヒト化マウスに投与され、また、ヒトFcRの第2の多型を含む第2のヒト化マウスにも投与され、第1および第2のマウスはそれぞれ、ヒト腫瘍細胞を含み、抗腫瘍抗体の抗腫瘍活性は、第1のマウスおよび第2のマウスにおいて評価される。特定の実施形態では、治療オプションは、第1のマウスおよび第2のマウスにおける抗腫瘍抗体の効能の評価に基づいて、ヒト腫瘍細胞に対応する腫瘍を有する第1のまたは第2の多型を有するヒトの治療に関して医師によって選択される。

30

【0095】

ヒトFcR遺伝子の適した多型は、当技術分野において公知のすべてのものを含む。ヒトFcRIIA遺伝子については、多型は、たとえば、T細胞がIgGに応じて増殖する能力によって報告される高応答動物表現型および低応答動物表現型を含む。高応答動物多型は、131位のアルギニン残基（131Arg）によって特徴付けられるが、低応答動物は、131位のヒスチジン残基（131His）によって特徴付けられる。特定の実施形態では、ヒトFcRIIA配列は、131His多型を含む。ヒトFcRIIA鎖の代表的なタンパク質配列は、配列番号32において示される。

40

【0096】

ヒトFcRIIB遺伝子の単一ヌクレオチド置換は、リガンド結合ドメイン（鎖）においてミスセンス置換をもたらし、推定上、IgGのFc部分が、細胞表面上のFcRIIBの鎖に結合する結合能力に影響する。たとえば、マウスにおけるFcRIIB遺伝子の膜貫通ドメイン内の232位のイソロイシンのトレオニン残基置換（Ile232Thr）は、受容体のシグナル伝達能力を損なうことが示された。特定の実施形態で

50

【化 1】

プライマー mFcR 5-up-1 (5'-ACCAGGATAT GACCTGTAGA G; 配列番号 :1) および
mFcR 3-up-1a (GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A; 配列番号 :2), および mFcR 5-DN
(ATGCGAGCTC ATGCATCTATG TCGGGTGCGG AGAAAGAGGT AATGCATTCT
TGCCCAATAC TTAC; 配列番号 3) および mFcR 3-DN (ACTCATGGAG
CCTCAACAGG A; 配列番号 4),

【 0 1 0 4】

を用いて作製した。これらの相同性アームは、内因性低親和性 Fc RIIB、Fc RIV、および Fc RIII 遺伝子の鎖を欠失したカセットを作製するために使用した。標的構築物は、内因性の遺伝子座に関しての 5' および 3' 領域に対して相同な配列を含む相同性アームを含む lox 付加 (loxed) ネオマイシン抵抗性遺伝子を含んだ。内因性 Fc RIIB 遺伝子の上流のおよび内因性 Fc RIII 遺伝子の下流の遺伝子および / または配列 (図 1 を参照されたい) は、標的構築物によって改変しなかった。

【 0 1 0 5】

標的欠失は、欠失させた領域の外側のおよび標的構築物内のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって確認した。欠失させた遺伝子座の上流領域は、

【 0 1 0 6】

【化 2】

mFcR-up-detect に対するプライマー (ATCCTGAGTA TACTATGACA AGA; 配列番号
5) および PGK-up-detect に対するプライマー (ACTAGTGAGA CGTGCTACTT C;
配列番号 6),

【 0 1 0 7】

を使用し、PCR によって確認し、欠失させた遺伝子座の下流領域は、

【 0 1 0 8】

【化 3】

プライマー pA-DN-detect (CTCCCACTCA
TGATCTATAG A; 配列番号 7) および mFcR-DN-detect (TGGAGCCTCA
ACAGGACTCC A; 配列番号 8)

【 0 1 0 9】

を使用して確認した。上流の欠失ポイントの両端のヌクレオチド配列は、以下を含み、これは、欠失ポイントに存在するカセット配列に隣接して連結された Fc RIIB 遺伝子の下流の内因性マウス配列 (下記の括弧内に含有される) を示す :

【 0 1 1 0】

【化 4】

(GTCCATGGGTAAGTAGAAAC A)TTCGCTACC TTAGGACCGT TA (配列番号 9)

【 0 1 1 1】

下流の欠失ポイントの両端のヌクレオチド配列は、以下を含み、これは、Fc RIII 遺伝子の下流の内因性マウス配列 (下記の括弧内に含有される) と隣接しているカセット配列を示す :

【 0 1 1 2】

【化 5】

CGGGTGCGGA GAAAGAGGTA AT(GCATTCTT GCCCAACT TA) (配列番号
10)

【 0 1 1 3】

10

20

30

40

50

FcRIIB、FcRIII、およびFcRIVが欠損したマウスは、マウスES細胞への標的BAC DNA（上記に記載）のエレクトロポレーションを通して生成した。ポジティブES細胞クローンは、Taqman（商標）スクリーニングおよび核型分析によって確認する。次いで、ポジティブES細胞クローンをメスマウスに移植するために使用し、低親和性FcR遺伝子が欠損した同腹子の子を生じさせた。

【0114】

（実施例2）

低親和性FcR遺伝子欠損マウスの特徴付け

脾臓を、FcR欠損マウスおよび野生型マウスから採取し、無菌の使い捨てのバッグ中で10mLコラゲナーゼDを用いて灌流した。次いで、ただ1つの脾臓を含有するそれぞれのバッグを、Stomacher（登録商標）（Seward）の中に配置し、30秒間、中程度の設定でホモジナイズした。ホモジナイズした脾臓は、10cmペトリ皿に移し、37℃で25分間インキュベートした。細胞は、0.5M EDTAの1:50希釈液を使用して、ピペットを用いて分離し、37℃で5分間、さらにインキュベーションを続けた。次いで、細胞は、遠心分離機（10分間、1000rpm）を用いてペレットにし、赤血球は、3分間、4mL ACKバッファー（Invitrogen）中で溶解した。脾細胞は、RPMI-1640（Sigma）を用いて希釈し、再び遠心分離した。ペレットにした細胞は、10mL RPMI-1640中で再懸濁し、0.2μm細胞ストレーナーを用いてろ過した。

10

【0115】

フローサイトメリー。リンパ球細胞集団は、以下の蛍光色素コンジュゲート細胞表面マーカーを用いてBD LSR II System（BD Bioscience）でFACSによって同定した：抗CD19（B細胞）、抗CD3（T細胞）、抗NKp46（NK細胞）、および抗F4/80（マクロファージ）。リンパ球は、特定の細胞系列についてゲーティングされ、ラット抗マウスFcRIII/I抗体（クローン2.4G2、BD Biosciences）を用い、内因性FcRIIIおよびFcRIIBの発現について分析した。クローン2.4G2は、マウスFcRIIIおよびFcRIの細胞外ドメイン上の共通の多型エピトープを認識する。結果は、検出可能なマウス低親和性FcRIIIおよびFcRIが、mFcR KOマウスにおけるB細胞、NK細胞、およびマクロファージ上になかったことを示す（図2）。

20

30

【0116】

ADCCアッセイ。FcR遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスから単離した脾細胞は、細胞殺傷アッセイにおいて、ADCCを実行するそれらの能力について分析した。細胞集団は、単離し、MACS（登録商標）技術（Miltenyi Biotec）を使用して分離した。手短かに言えば、T細胞は、磁気標識抗マウスCD3ビーズを使用して、脾細胞から枯渇させた。次いで、T細胞を枯渇させた脾細胞は、磁気標識抗マウスCD49Bビーズを使用して、NK細胞について濃縮した。これとは別に、ラーゲ細胞（ヒトCD20を発現する）は、4℃で、30分間、様々な濃度（0.1~10μg/mLの範囲）のマウス抗ヒトCD20抗体（クローンB1；Beckman Coulter）を用いて被覆した。抗体被覆ラーゲ細胞は、37℃で4時間、100:1および50:1の比（NK:ラーゲ）で、濃縮したNK細胞と共にインキュベートした。細胞死は、Cytotox-Glo（商標）細胞傷害性アッセイ（Promega）を使用して測定した。発光シグナルは、溶解した細胞に由来し、死細胞の数に比例する。対照（抗CD20抗体なし）からの発光を、それぞれの比についてのバックグラウンド死細胞数について決定し、野生型マウスおよびKOマウスについての測定値から引いた。平均細胞死を計算し、細胞殺傷の減少パーセント（ADCC%）を、野生型に対する比較によって決定した。結果を表1に示す。

40

【0117】

【表 1】

表 1

	mFcγR KO	% ADCC		
		10 μg/mL B1 抗体	1 μg/mL B1 抗体	0.1 μg/mL B1 抗体
NK 細胞:ラージ細胞	100:1	42	53	35
	50:1	15	0	0

【 0 1 1 8 】

10

(実施例 3)

低親和性 Fc R 遺伝子欠損マウスにおける B 細胞の *in vivo* 枯渇

ADCC 経路を通しての B 細胞枯渇に対するヒトまたはマウス Fc アイソタイプの効果は、ヒト抗ヒト CD 20 抗体を使用して、ヒト CD 20 を発現するように遺伝子操作した低親和性 Fc R 遺伝子欠損マウスにおける様々な B 細胞コンパートメントについて決定した。ヒト CD 20 を発現するマウスは、当技術分野において公知の技術を使用して、これとは別に遺伝子操作した。B 細胞上にヒト CD 20 を発現し、低親和性 Fc R 遺伝子が欠損した (実施例 1 において記載) マウスは、2 つの遺伝子操作系統の標準的な交配技術によって作製した。

【 0 1 1 9 】

20

ヒト CD 20 を発現し、内因性低親和性 Fc R 遺伝子の完全な相補物を有するマウスの別々のグループに、それぞれ、以下のうちの 1 つを投与した：(1) 10 mg / kg 対照抗体 (N = 4 ; マウス Ig G 2 a を有する、ヒト CD 20 に特異的でないヒト抗体) ; (2) 2 mg / kg Ab 168 (N = 3 ; マウス Ig G 2 a を有するヒト抗 h CD 20 抗体 ; 米国特許出願公開第 2009 / 0035322 号の、それぞれ配列番号 339 および 347 において見つけられる重配可変領域配列および軽鎖可変領域配列) ; (3) 10 mg / kg Ab 168 ; (4) 2 mg / kg Ab 735 (N = 3 ; ヒト Ig G 1 を有する Ab 168) ; (5) 10 mg / kg Ab 735。実験の類似するセットにおいて、ヒト CD 20 を発現し、内因性低親和性 Fc R 遺伝子の欠失を有するグループのマウスに、対照抗体およびヒト抗 h CD 20 抗体 (上記に記載) を投与した。

30

【 0 1 2 0 】

それぞれのグループにおけるマウスに、腹腔内注射によって抗体を投与した。注射の 7 日後に、動物を安楽死させ、骨髄 (B 2 2 0 ⁺ / Ig M ⁺)、末梢血 (B 2 2 0 ⁺ / CD 1 9 ⁺)、リンパ節 (B 2 2 0 ⁺ / CD 1 9 ⁺)、および脾臓 (B 2 2 0 ⁺ / CD 1 9 ⁺) の残りの B 細胞含有率を、LSR - IIFローサイトメーターで実行したマルチカラー FACS によって同定し、Flow - Jo ソフトウェアを使用して分析した (上記に記載)。B 細胞枯渇実験の結果を、図 3 A ~ 3 D に示す。

【 0 1 2 1 】

図 3 A ~ 3 D に示されるように、Ab 735 は、低親和性 Fc R 遺伝子の完全な相補物を含有するマウスにおいて Ab 168 よりも低い効率で B 細胞を枯渇させた。さらに、両方の抗体 (マウスおよびヒト Fc) について、B 細胞の枯渇は、低親和性 Fc R 遺伝子の完全な相補物を欠くマウスにおいて有意に低下した。本実施例は、ADCC 経路を通して B 細胞を枯渇させる能力が、低親和性 Fc R を必要とすることを示し、マウスにおける、ヒト定常領域を含有する抗体についての ADCC 効率の測定が、ヒト低親和性 Fc R 遺伝子の完全な相補物を含有する、遺伝子的に操作されたマウスの使用によってより適したものとなることを実証する。

40

【 0 1 2 2 】

(実施例 4)

Fc R I I I A / Fc R I I A ヒト化マウスの生成

欠失させた内因性低親和性マウス Fc R 遺伝子座 (下記に記載) の中に 2 つの低親和

50

性ヒト Fc R 遺伝子を導入するための標的構築物を構築した (図 4)。

【0123】

ヒト Fc R I I A および Fc R I I I A 遺伝子を含む標的構築物は、BAC RP 23-395f6 および CTD-2514j12 (Invitrogen) の改変を通して、類似する方法 (実施例 1 を参照されたい) を使用して作製した。両方の BAC の BAC DNA は、低親和性ヒト Fc R I I A および Fc R I I I A 遺伝子の鎖の欠失を、欠失させた内因性低親和性 Fc R 遺伝子座の中に導入するために改変した。

【0124】

同様に、上流および下流の相同性アームは、それぞれ

【0125】

【化6】

プライマー h14 (GCCAGCCACA AAGGAGATAA TC; 配列番号 11)

および h15 (GCAACATTTA GGACAACCTCG GG; 配列番号 12), および h4

(GATTTCCCTAA CCACCTACCC C; 配列番号 13) および h5 (TCTTTTCCAA

TGGCAGTTG; 配列番号 14)

【0126】

を用いて作製した。これらの相同性アームは、内因性マウス低親和性 Fc R 遺伝子座の中に低親和性ヒト Fc R I I A および Fc R I I I A 遺伝子の鎖を導入するカセットを作製するために使用した。標的構築物は、欠失させた内因性低親和性 Fc R 遺伝子座に対して 5' の配列を含む 5' 相同性アーム、FRT 付加 (FRT'ed) ヒグロマイシン抵抗性遺伝子、それに続く、低親和性ヒト Fc R I I A および Fc R I I I A

鎖遺伝子を含む、BAC CTD-2514j12 由来のヒトゲノム断片、ならびに欠失させた内因性低親和性 Fc R 遺伝子座に対して 3' のマウス配列を含む 3' 相同性アームを含んでいた (図 4 の中央)。マウス血小板上に Fc R I I A を発現するマウスについては、標的構築物は、lox2372 部位が両側の側面に位置するヒグロマイシンカセットを使用して、構築物が、たとえば約 18 kb またはそれ以上までの、ヒトゲノムにおいてヒト Fc R I I A 遺伝子に作動可能に連結された伸長プロモーター配列を含むという点を除いて、類似する方法で作製し (同じ BAC を使用して)、プロモーター領域と第 1 の lox2372 部位との接合部は、

【0127】

【化7】

ATCGGGGATA GAGATGTTTG (CC)GCGATCGC GGTACCGGGC

(配列番号 37; カッコ内はヒト lox2372 接合部)

【0128】

であり、第 2 の lox2372 部位とマウス配列との接合部は、

【0129】

【化8】

TTATACGAAG TTATACCGG(TG)CATTCTTGC CCAATACTTA

(配列番号 38; カッコ内は lox2372/ マウス 接合部)

【0130】

である。適したプライマーは、プロモーター領域を含むヒト化の遺伝子型を同定するために使用した。

【0131】

ヒト Fc R I I A および Fc R I I I A 鎖遺伝子の標的挿入は、PCR によって確認した (上記に記載)。部分的にヒト化した遺伝子座の上流領域は、

【0132】

10

20

30

40

50

【化9】

プライマー h16 (CCCAGGTAAG

TCGTGATGAA ACAG; 配列番号 15) および pA-DN-detect (CTCCCACTCA

TGATCTATAG A; 配列番号 16)

【0133】

を使用して、PCRによって確認したのに対して、部分的にヒト化した遺伝子座の下流領域は、

【0134】

【化10】

10

プライマー mFcR DN-detect-9 (TGGAGCCTCA

ACAGGACTCC A; 配列番号 17) および h6 (CACACATCTC CTGGTACTT G; 配列番号

18)

【0135】

を使用して、確認した。下流の接合部にまたがるヌクレオチド配列は、以下を含み、これは、欠失させた低親和性 Fc R 遺伝子座の 3' の内因性マウス配列と隣接する hFc R I I A 遺伝子の上流の内因性ヒト配列の新規な挿入ポイントを示す（下記の括弧内に含有される）：

【0136】

【化11】

20

(CAACTGCCAT TGGAAAAGA)C TCGAGTGCCA TTTCATTACC TC (配列番号

19)

【0137】

上流の接合部は、2つの新規な配列を含む。上流の接合部の一方のポイントは、以下を含み、これは、挿入された hFc R I I I A 遺伝子の上流領域を含むヒトゲノム配列（下記の括弧内に含有される）と隣接するヒグロマイシンカセットのヌクレオチド配列を示す：

【0138】

【化12】

30

TAAACCCGCG GTGGAGCTC(G CCAGCCACAA AGGAGATAAT CA) (配列番号 20)

【0139】

上流の接合部の第2のポイントは、以下を含み、これは、ヒグロマイシンカセット内のヌクレオチド配列と隣接する、欠失させた低親和性 Fc R 遺伝子座の上流領域由来の内因性マウス配列のヌクレオチド配列を示す（下記の括弧内に含有される）：

【0140】

【化13】

40

(CCATGGGTAA GTAGAAAC)TC TAGACCCCG GGCTCGATAA CT (配列番号 21)

【0141】

内因性低親和性マウス Fc R 遺伝子座の代わりに2つの低親和性ヒト Fc R 遺伝子（伸長プロモーター領域を欠く hFc R I I A および hFc R I I I A）を含有するマウスは、マウス ES 細胞への標的 BAC DNA（上記に記載）のエレクトロポレーションを通して生成した。ポジティブ ES 細胞クローンは、Taqman（商標）スクリーニングおよび核型分析によって確認した。次いで、ポジティブ ES 細胞クローンは、VELLOCI MOUSE（登録商標）法（下記に記載）を使用してメスマウスに移植するために使用し、2つのヒト低親和性 Fc R 遺伝子での内因性低親和性 Fc R 遺伝子の置き換えを含有する同腹子の子を生成した。

50

【0142】

上記に記載される標的ES細胞は、ドナーES細胞として使用し、VELOCI MOUS E (登録商標)法によって8細胞段階のマウス胚の中に導入した(たとえば米国特許第7,294,754号およびPoueymirouら(2007年)F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25巻(1号):91~99頁を参照されたい。hFcRIIAおよびhFcRIIAを有するVELOCI MICE (登録商標)(ドナーES細胞に完全に由来するF0マウス)は、hFcR遺伝子の存在を検出した対立遺伝子アッセイの改良法を使用して遺伝子型を同定することによって同定した(Valenzuelaら、前掲)。

10

【0143】

hFcR遺伝子を有するマウスは、たとえばES細胞段階でまたは胚中で除去されていない、標的構築物によって導入された、あらゆるlox付加neoカセットを除去するために、Cre deleterマウス系統に交配することができる(たとえば、国際特許出願公開WO 2009/114400を参照されたい)。任意選択で、ネオマイシンカセットは、マウス中に保持される。

【0144】

子は、遺伝子型を同定し、hFcR遺伝子についてヘテロ接合性の子は、FcRIIAおよびFcRIIAのヒト化を特徴付けるために選択する。

20

【0145】

(実施例5)

FcRIIA/FcRIIAヒト化マウスの特徴付け

脾臓は、ヒト化FcRIIA/FcRIIA(伸長FcRIIAプロモーター領域を欠くヘテロ接合体)および野生型マウスから採取し、FACのために調製した(上記に記載の通りに)。

【0146】

フローサイトメトリー。リンパ球は、特定の細胞系列についてゲーティングされ、それぞれ、マウス抗ヒトFcRII抗体(クローンFLI8.26;BD Biosciences)およびマウス抗ヒトFcRII抗体(クローン3G8;BD Biosciences)を使用して、hFcRIIおよびhFcRIIの発現について分析した。それぞれのリンパ球亜集団について観察された相対的な発現(++、+)または発現なし(-)を、表2に示す。

30

【0147】

【表2】

表2

リンパ球系列	hFcγRIII	hFcγRII
B細胞	-	-
NK細胞	++	-
マクロファージ	+	+
好中球	-	+

40

【0148】

類似する実験において、脾臓は、ヒト化FcRIIA/FcRIIA(伸長FcRIIAプロモーター領域を欠くホモ接合体)および野生型マウスから採取し、FACのために調製した(上記に記載の通りに)。結果を図5Aおよび5Bに示す。FcRIIA/FcRIIAホモ接合体マウスにおいてヒトFcRIIA、FcRIIA、またはその両方を発現する別々のリンパ球細胞集団のパーセントを、表3に示す。

50

【 0 1 4 9 】

【 表 3 】

表 3

リンパ球系列	hFcγRIII	hFcγRII	hFcγRII/hFcγRIII
NK 細胞	97	-	-
マクロファージ	26	14	39
好中球	-	94	-

10

【 0 1 5 0 】

本実施例において示されるように、実施例 3 に従って生成した遺伝子改変されたマウス（ヘテロ接合体およびホモ接合体遺伝子型の両方）は、NK 細胞およびマクロファージ上にヒト Fc R I I I A を発現し、血小板ではなく好中球およびマクロファージ上にヒト Fc R I I A を発現した。ヒト Fc R I I I A は、NK 細胞上に高度に発現された。本実施例において示されるヒト Fc R 遺伝子の発現パターンは、ヒトアクセサリー細胞におけるこれらの遺伝子の発現パターンと一致している。

【 0 1 5 1 】

(実施例 6)

低親和性 Fc R ヒト化マウスの生成

部分的にヒト化された内因性低親和性 Fc R 遺伝子座（下記に記載）の中に 3 つのさらなる低親和性ヒト Fc R 遺伝子を導入するために標的構築物を構築した（図 6）。

20

【 0 1 5 2 】

ヒト Fc R I I B、Fc R I I I B、および Fc R I I C 遺伝子を含む標的構築物は、BAC RP - 23 395 f 6 および RP - 11 697 e 5 (Invitrogen) の改変を通して、類似する方法（実施例 1 を参照されたい）を使用して作製した。両方の BAC の BAC DNA は、低親和性ヒト Fc R I I B、Fc R I I I B、および Fc R I I C 遺伝子の鎖を、2 つのヒト低親和性 Fc R 遺伝子を含有する部分的にヒト化された内因性低親和性 Fc R 遺伝子座の中に導入するために改変した。

30

【 0 1 5 3 】

同様に、上流および下流の相同性アームは、それぞれ、

【 0 1 5 4 】

【 化 1 4 】

プライマー mFcR up-1 (ACCAGGATAT GACCTGTAGA G; 配列番号 22)

および mFcR2b NheI-2 (GTTTCTACTT ACCCATGGAC; 配列番号 23) および

h10 (AAATACACAC TGCCACAGAC AG; 配列番号 24) および h11 (CCTCTTTTGT

GAGTTTCCTG TG; 配列番号 25)

40

【 0 1 5 5 】

を用いて作製した。これらの相同性アームは、低親和性ヒト Fc R I I B、Fc R I I I B、および Fc R I I C の鎖をコードする DNA 配列を導入したカセットを作製するために使用した。標的構築物は、欠失させた内因性低親和性 Fc R 遺伝子座に対して 5' のマウス配列を含む 5' 相同性アーム、lox 付加ネオマイシン抵抗性遺伝子、それに続く、低親和性ヒト Fc R I I B、Fc R I I I B、および Fc R I I C 鎖遺伝子を含む、BAC RP - 11 697 e 5 由来のヒトゲノム断片、ならびに低親和性ヒト Fc R I I I A 鎖遺伝子に対して 5' のヒト配列を含む 3' 相同性アームを含んだ（図 6 の中央）。

【 0 1 5 6 】

50

3つのさらなる低親和性ヒト Fc R 遺伝子の標的挿入を、PCRによって確認した（上記に記載の通り）。完全にヒト化した遺伝子座の上流領域は、

【0157】
【化15】

プライマー mFcR up-detect-3

(GAGTATACTA TGACAAGAGC ATC; 配列番号 26) および PGK up-detect

(ACTAGTGAGA CGTGCTACTT C; 配列番号 27)

【0158】

を使用して、PCRによって確認したのに対して、完全にヒト化した遺伝子座の下流領域は、

【0159】
【化16】

プライマー neo detect

(CTCCCACTCA TGATCTATAG A; 配列番号 28) および h12 (CTTTTTATGG

TCCCACAATC AG; 配列番号 29)

【0160】

を使用して確認した。下流の接合部にまたがるヌクレオチド配列は、hFc R I I A 鎖遺伝子の上流の同じヒトゲノム配列を含んだ（実施例3を参照されたい；配列番号19）。上流の接合部にまたがるヌクレオチド配列は、以下を含んだが、これは、挿入ポイントの Maus 配列およびカセット配列ならびにカセット配列およびヒトゲノム配列の2つの新規な接合部を示す。ゲノム Maus 配列（下記の括弧内に含有される）と neoカセット配列の上流領域との接合部は、

【0161】
【化17】

(GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A)TTCGCTACC TTAGGACCGT TA (配列番号 30)

【0162】

である。第2の新規な接合部は、neoカセットの3'末端（下記の括弧内に含有される）と hFc g R I I B 鎖遺伝子の下流のヒトゲノム配列との連結部を含む：

【0163】
【化18】

(GCTTATCGAT ACCGTCGAC)A AATACACACT GCCACAGACA GG; 配列番号 31)

【0164】

これらの接合部は、標的構築物内に、図6（中央）において示す。完全にヒト化した低親和性 Fc R 遺伝子座の結果として生じる改変ゲノムを、図6（下）に示す。

【0165】

内因性低親和性 Maus Fc R 遺伝子座の代わりに5つの低親和性ヒト Fc R 遺伝子含有する Maus は、Maus ES細胞への標的 BAC DNA（上記に記載）のエレクトロポレーションを通して生成した。ポジティブ ES細胞クローンは、Taqman（商標）スクリーニングおよび核型分析によって確認した。次いで、ポジティブ ES細胞クローンをメスマウスに移植するために使用し（上記に記載の通りに）、内因性低親和性 Fc R 遺伝子の、5つのヒト低親和性 Fc R 遺伝子による置き換えを含有する同腹子の子を生じさせた。

【0166】

（実施例7）

低親和性 Fc R ヒト化 Maus の特徴付け

脾臓を、完全にヒト化した Fc R（ヘテロ接合体）および野生型 Maus から採取し、

10

20

30

40

50

FACSのために調製した（上記に記載の通りに）。

【0167】

フローサイトメトリー。リンパ球は、特定の細胞系列についてゲーティングされ、それぞれ、マウス抗ヒトFcRII抗体（クローンFLI8.26；BD Biosciences）およびマウス抗ヒトFcRIII抗体（クローン3G8；BD Biosciences）を使用して、ヒトFcRIIAおよびFcRIIIAの発現について分析した。それぞれのリンパ球亜集団について観察された相対的な発現（++、+）または発現なし（-）を、表4に示す。

【0168】

【表4】

表 4

リンパ球系列	hFcγRIII	hFcγRII
B細胞	-	+
NK細胞	+	+
マクロファージ	+	+
好中球	+	+

10

20

【0169】

類似する実験において、脾臓を、完全にヒト化したFcR（ホモ接合体）および野生型マウスから採取し、FACSのために調製した（上記に記載の通りに）。結果を図7に示す。完全にヒト化したFcRホモ接合体マウスにおける、ヒトFcRIIIA、ヒトFcRIIIB、ヒトFcRIIA、ヒトFcRIIB、ヒトFcRIIC、またはその組合せを発現する別々のリンパ球細胞集団のパーセントを、表5に示す。

【0170】

【表5】

表 5

リンパ球系列	hFcγRIII	hFcγRII	hFcγRII/hFcγRIII
B細胞		100	
NK細胞	30	-	-
マクロファージ	<1	55	26
好中球	-		100

30

【0171】

本実施例において示されるように、実施例5に従って生成した遺伝子改変マウス（ヘテロ接合体およびホモ接合体遺伝子型の両方）は、NK細胞およびマクロファージ上にヒトFcRIIIA、好中球上にヒトFcRIIIB、好中球およびマクロファージ上にヒトFcRIIA、B細胞上にヒトFcRIIB、ならびにNK細胞上にヒトFcRIICを発現した。本実施例において示されるヒトFcR遺伝子の発現パターンは、ヒトアクセサリ細胞におけるこれらの遺伝子の発現パターンと一致している。

40

【0172】

（実施例8）

ヒト化FcRマウスにおけるADCC

FcR遺伝子欠損（つまりノックアウト）マウス、FcRIIIA/FcRIIA（ホモ接合体）マウス、FcRIIIA/FcRIIIB/FcRIIA/Fc

50

R I I B / F c R I I C (ホモ接合体) マウス、および野生型マウスから単離した脾細胞を、細胞殺傷アッセイにおいて、A D C Cを実行するそれらの能力について分析した(実施例2において上記に記載の通りに)。

【0173】

手短かに言えば、細胞集団を単離し、M A C S (登録商標) 技術 (M i l t e n y i B i o t e c) を使用して分離した。手短かに言えば、T細胞およびB細胞を枯渇させた脾細胞を、マウス I L - 2 (500 U / m L) の存在下において2週間、培養した。結果として生じる増殖させたNK細胞を、50 : 1 (NK : ラージ) の比でA D C Cアッセイにおいてエフェクター細胞として使用した。ラージ細胞は、10 μ g / m L の A b 168 または A b 735 を用いて被覆した(実施例3において上記に記載の通りに)。結果を表6に示す。

10

【0174】

【表6】

表6

NK 細胞遺伝子型	% ADCC	
	10 μg/mL Ab 168	10 μg/mL Ab 735
野生型	89	72
マウス FcγR KO	13	14
ヒト FcγRIIIA-IIA HO	78	85
ヒト FcγRIIIA-IIIB-IIA-IIIB-IIIC HO	81	59

20

【0175】

本発明は、本明細書において記載される特定の実施形態による範囲に限定されない。実際、本明細書において記載されるものに加えての本発明の様々な改変は、先の記載および添付の図から当業者らに明白になるであろう。そのような改変は、添付した請求項の範囲内にあるように意図される。

【数 1】

SEQUENCE LISTING

<110> MACDONALD, Lynn
 TU, Naxin
 GURER, Cagan
 STEVENS, Sean
 MURPHY, Andrew J.

<120> HUMANIZED FCγR MICE

<130> 3070A-WO 10

<140> To be assigned
 <141>

<150> 61/288,562
 <151> 2009-12-21

<160> 38

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 21 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 1
 accaggatat gacctgtaga g 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

<220>
 <223> synthetic

<400> 2
 gtccatgggt aagtagaaac a 21

<210> 3
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic 40

<400> 3
 atgcgagctc atgcatctat gtcgggtgcg gagaaagagg taatgcattc ttgcccaata 60
 cttac 65

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA

【数 2】

<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 4		
actcatggag cctcaacagg a	21	
<210> 5		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> synthetic		
<400> 5		
atcctgagta tactatgaca aga	23	
<210> 6		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		20
<400> 6		
actagtgaga cgtgctactt c	21	
<210> 7		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 7		
ctcccactca tgatctatag a	21	30
<210> 8		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 8		
tgagacctca acaggactcc a	21	
<210> 9		
<211> 42		40
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 9		

【数 3】

gtccatgggt aagtagaaac attcgctacc ttaggaccgt ta	42	
<210> 10		
<211> 42		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 10		
cggggtgcgga gaaagaggta atgcattctt gcccaatact ta	42	10
<210> 11		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 11		
gccagccaca aaggagataa tc	22	
<210> 12		
<211> 22		20
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		
<400> 12		
gcaacattta ggacaactcg gg	22	
<210> 13		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> synthetic		
<400> 13		
gatttcctaa ccacctaccc c	21	
<210> 14		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> synthetic		40
<400> 14		
tcttttccaa tggcagttg	19	
<210> 15		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		

【数4】

<220>
 <223> synthetic

<400> 15
 cccaggtaag tcgtgatgaa acag 24

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 10
 <223> synthetic

<400> 16
 ctcccactca tgatctatag a 21

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 17 20
 tggagcctca acaggactcc a 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 18
 cacacatctc ctggtgactt g 21

<210> 19 30
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 19
 caactgccat tggaaaagac tcgagtgcca tttcattacc tc 42

<210> 20
 <211> 42
 <212> DNA 40
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 20
 taaacccgcg gtggagctcg ccagccacaa aggagataat ca 42

【数5】

<210> 21
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 21
 ccatgggtaa gtagaaactc tagacccccg ggctcgataa ct 42

 <210> 22 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 22
 accaggatat gacctgtaga g 21

 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 23
 gtttctactt acccatggac 20

 <210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220> 30
 <223> synthetic

 <400> 24
 aaatacacac tgccacagac ag 22

 <210> 25
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 25 40
 cctcttttgt gagtttcctg tg 22

 <210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

【数 6】

<220>
 <223> synthetic

 <400> 26
 gagtatacta tgacaagagc atc 23

 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220> 10
 <223> synthetic

 <400> 27
 actagtgaga cgtgctactt c 21

 <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 28 20
 ctcccactca tgatctatag a 21

 <210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 29
 ctttttatgg tcccacaatc ag 22

 <210> 30 30
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 30
 gtccatgggt aagtagaaac attcgctacc ttaggaccgt ta 42

 <210> 31
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 40

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 31
 gcttatcgat accgctgaca aatacacact gccacagaca gg 42

【数 7】

<210> 32

<211> 317

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 32

Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp 10
 20 25 30
 Ser Gln Ala Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro
 35 40 45
 Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly
 50 55 60
 Ala Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn
 85 90 95
 Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser
 100 105 110
 Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr
 115 120 125
 Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His 20
 130 135 140
 Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln
 165 170 175
 Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly
 180 185 190
 Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro
 195 200 205
 Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile Val Ala Val Val Ile
 210 215 220
 Ala Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr
 225 230 235 240
 Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala 30
 245 250 255
 Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg
 260 265 270
 Gln Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr
 275 280 285
 Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr
 290 295 300
 Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn
 305 310 315

<210> 33

<211> 303

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 33

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp

【数 1 0】

Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp
 165 170 175
 180 185 190
 Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys
 195 200 205
 Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile
 210 215 220
 Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala
 245 250 255
 Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser
 260 265 270
 Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln
 275 280 285
 Asp Lys
 290

10

<210> 36
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

20

<400> 36
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Asn Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
 225 230

30

40

<210> 37

【数 1 1】

<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 37
atcgggggata gagatgtttg ccgcatcgc ggtaccgggc 40

<210> 38
<211> 40 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 38
ttatacgaag ttataccggt gcattcttgc ccaatactta 40

20

30

40

【 図 1 】

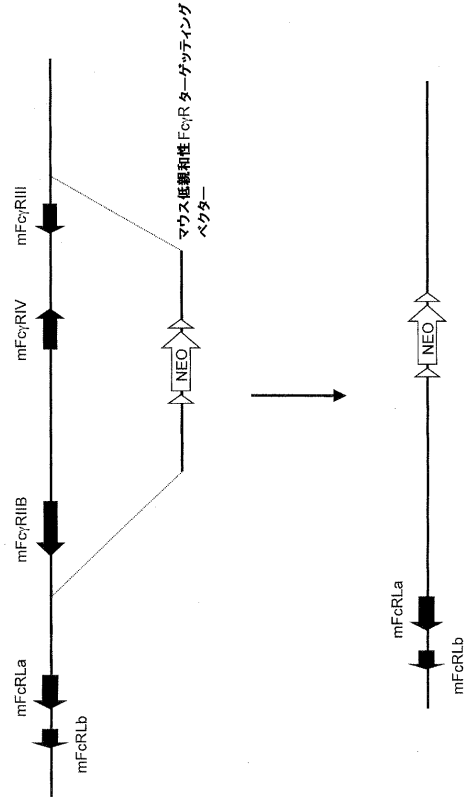


Figure 1

【 図 2 】

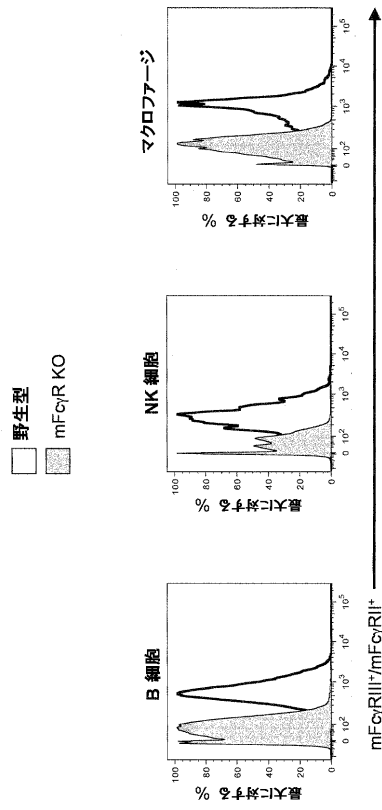


Figure 2

【 図 3 A 】

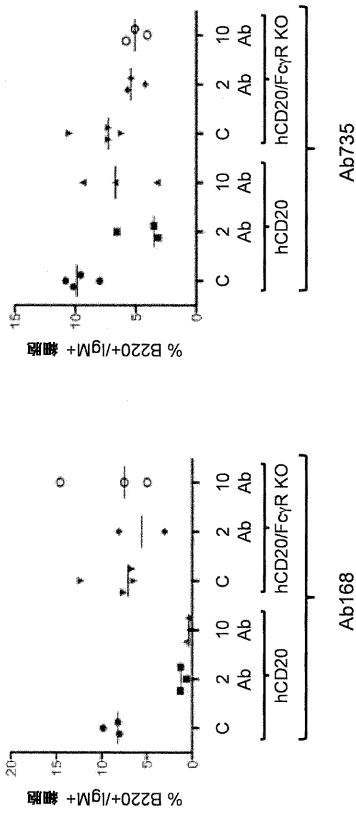


Figure 3A

【 図 3 B 】

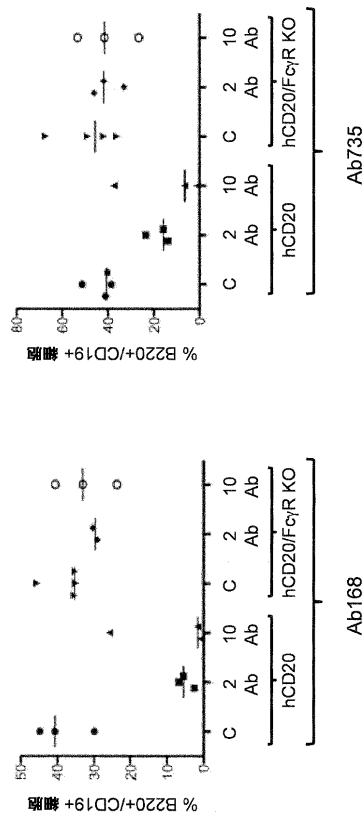


Figure 3B

【図 3 C】

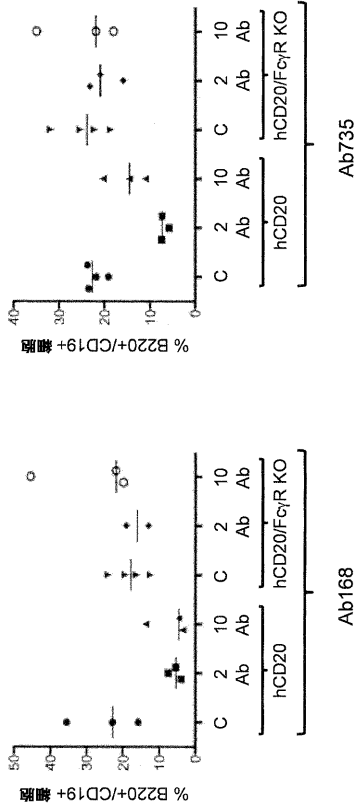


Figure 3C

【図 3 D】

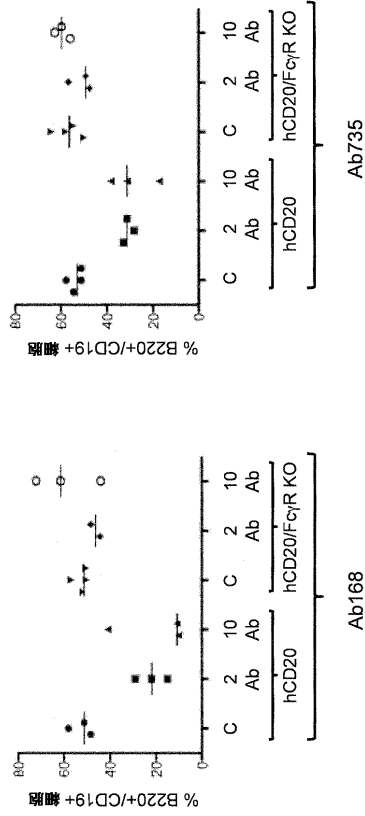


Figure 3D

【図 4】

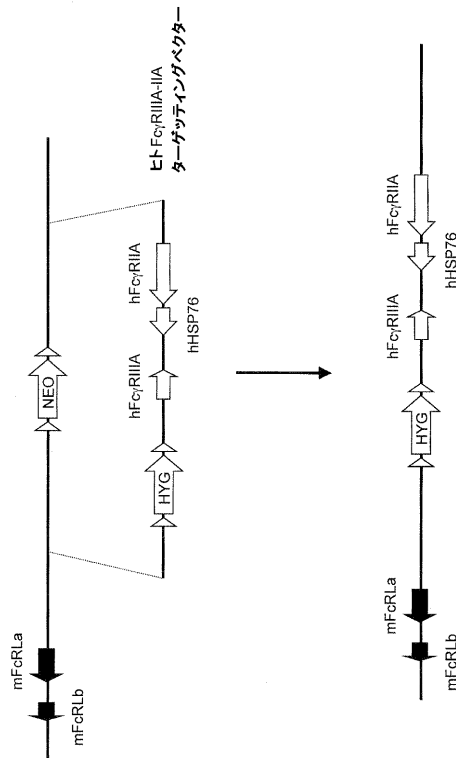


Figure 4

【図 5 A】

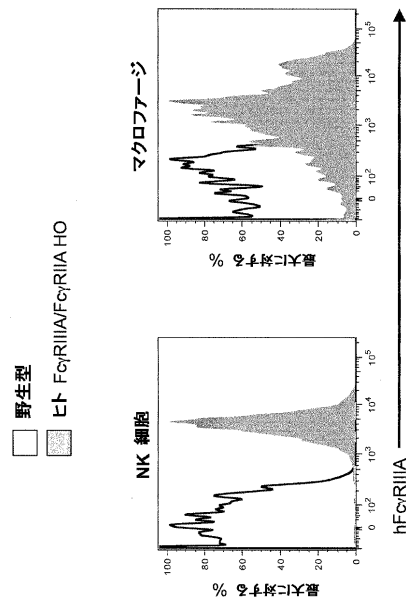


Figure 5A

【 図 5 B 】

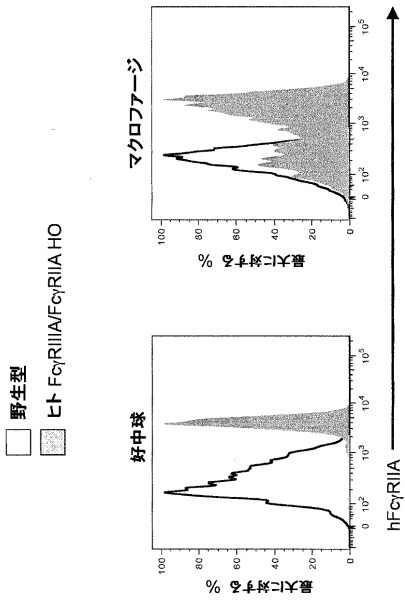


Figure 5B

【 図 6 】

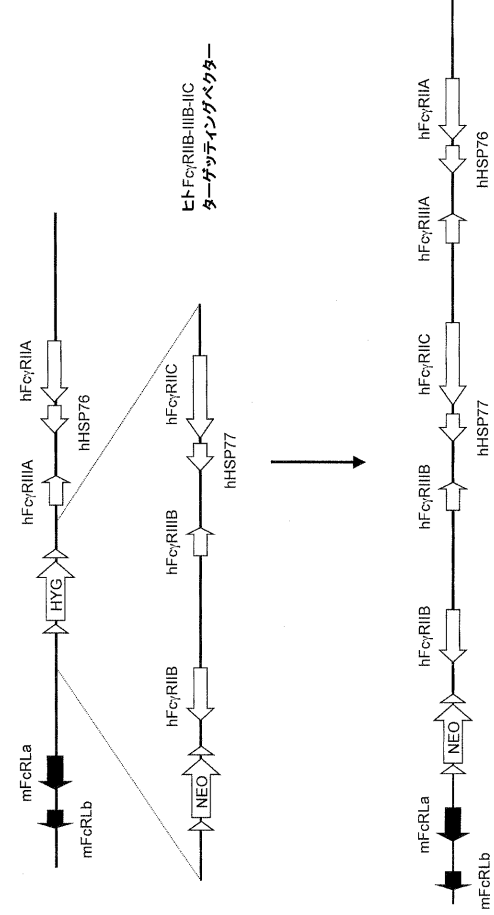


Figure 6

【 図 7 】

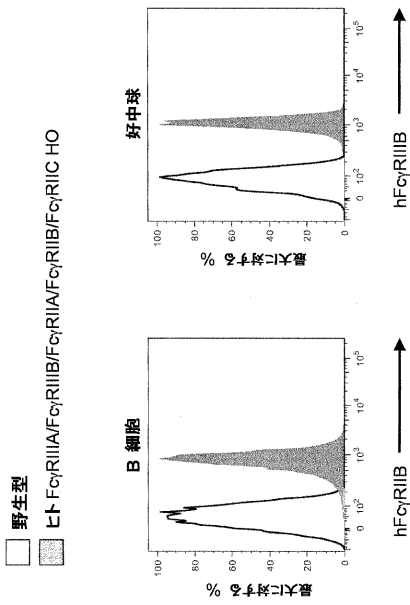


Figure 7

【配列表】

2014209923000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 リン マクドナルド
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10605, ホワイト プレインズ, ゲッドニー ウェイ
16
- (72)発明者 ツー ナクシン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10570, プレザントビル, ワシントン アベニュー 5
14
- (72)発明者 ケーガン グーラー
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10595, バルハラ, パメラ レーン 8
- (72)発明者 ショーン スティーブンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94158, サンフランシスコ, ベリー ストリート 3
55 ナンバー413
- (72)発明者 アンドリュー ジェイ. マーフィー
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10520, クロトン-オン-ハドソン, ニュートン コー
ト 10

Fターム(参考) 2G045 AA40 CB01

4B024 AA01 AA11 BA63 CA01 CA02 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04
GA14 GA30 HA01

【外国語明細書】

2014209923000001.pdf