

(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2019-62906

(P2019-62906A)

(43) 公開日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B O 6 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/0781 (2010.01)	C 1 2 N 5/0781	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 121 頁)

(21) 出願番号	特願2018-244118 (P2018-244118)	(71) 出願人	597160510
(22) 出願日	平成30年12月27日 (2018.12.27)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(62) 分割の表示	特願2014-524126 (P2014-524126)		・インコーポレイテッド
原出願日	平成24年8月3日 (2012.8.3)		REGENERON PHARMACEU
(31) 優先権主張番号	61/515,374		TICALS, INC.
(32) 優先日	平成23年8月5日 (2011.8.5)		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100078282
1. T W E E N			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】 ヒト化ユニバーサル軽鎖マウス

(57) 【要約】

【課題】 ヒト化ユニバーサル軽鎖マウスを提供すること。

【解決手段】 ヒト化重鎖免疫グロブリン遺伝子座、ユニバーサル軽鎖を発現するヒト化軽鎖遺伝子座、およびA D A M 6をコードする遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含むマウス、組織、細胞、および遺伝子材料を提供する。ヒト可変ドメインを含むヒト化重鎖を発現し、且つヒト可変ドメインを含むヒト化軽鎖を発現するマウスであって、該軽鎖が1つ以下または2つ以下の軽鎖VおよびJまたは再構成されたV/J配列に由来する、マウスを提供する。ユニバーサル軽鎖およびヒト化重鎖を有する抗体を発現する繁殖力のある雄マウスを提供する。二重特異性結合性タンパク質を作製するための方法および組成物を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

図面に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする配列および抗体（二重特異性抗体（ユニバーサル軽鎖（universal light chain）を含む二重特異性抗体が含まれる）が含まれる）の作製のための遺伝子改変されたマウス、細胞、胚、組織、および単離核酸。組成物および方法は、内因性マウス重鎖可変遺伝子座に生殖系列置換を有する遺伝子改変マウスであって、生殖系列置換が1つまたは2つ以下の異なる軽鎖V遺伝子セグメントに由来する軽鎖を発現する改変軽鎖遺伝子座を含み、マウスはこれらの改変を有する雄マウスが繁殖性を示すようにその生殖系列においてさらに遺伝子改変されている、遺伝子改変マウスを含む。ユニバーサル軽鎖およびヒト化重鎖可変ドメインを発現する遺伝子改変マウスであって、該マウスが雄マウスにおいて機能するADAM6活性を含む、遺伝子改変マウスを提供する。

10

【背景技術】

【0002】

背景

20

ヒトへの治療薬（therapeutic）として用いるための抗体の開発には長く且つ複雑な歴史がある。1つの重要な進展は、免疫原性の可能性が軽減された有効なヒト治療薬のデザインで使用するための本質的に完全ヒト抗体配列を作製することができたことである。現在、その生殖系列において内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座での導入遺伝子として置換物として、再構成されていない遺伝子セグメント（重鎖および軽鎖）に由来するヒト抗体配列が生成するように改変されたマウスが存在する。VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスのようなマウス内の内因性遺伝子座でのマウス可変配列のヒト可変配列への置換により、マウス免疫系が本質的に正常に機能することが可能である。結果として、これらのマウスの最適な抗原への曝露により、最適な抗原に指向する完全ヒト抗体の作製において使用することができる高親和性体細胞変異ヒト可変ドメインを発現する非常に多様で豊富なクローン選択されたB細胞集団が生成される。

30

【0003】

ヒト化マウス内で作製されたヒト可変ドメインを使用して、完全ヒト二重特異性抗体（すなわち、重鎖可変ドメインの同一性および結合特異性が異なる重鎖のヘテロ二量体である結合性タンパク質）をデザインすることができる。しかし、重鎖ヘテロ二量体と有効に会合して発現することができる軽鎖の選択に関して解決は容易ではない。ヒト治療薬で用いるヒト軽鎖可変ドメインの開発はヒト化マウスにおいて確かに可能であるが、所望の結合特性を有する重鎖と有効に会合して発現し、両方の重鎖の発現または結合の挙動に有害でない軽鎖を選択するための容易な解決法は存在しない。

【0004】

40

したがって、ヒト治療薬で用いるヒト免疫グロブリン可変領域（内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座での核酸配列から生成されるヒト免疫グロブリン可変領域が含まれる）を開発するための組成物および方法が当該分野で依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

概要

二重特異性結合性タンパク質（二重特異性抗体が含まれる）での使用に適切なヒト免疫グロブリン可変ドメインを発現するマウスであって、該マウスが内因性マウス重鎖可変遺伝子座のヒト化を含み、ヒト化を含む雄マウスが繁殖性を示し、マウスが1つ以下または

50

2つ以下の λ および／または κ V遺伝子セグメントに由来する免疫グロブリン軽鎖レパートリーを発現するマウスが得られる内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座のヒト化をさらに含む、マウスを記載する。

【0006】

再構成されていないヒト重鎖V、D、およびJセグメントのレパートリーに由来する適切な親和性成熟ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを選択する遺伝子操作マウスをであって、親和性成熟ヒト重鎖可変ドメインがヒト化ユニバーサル軽鎖と会合して発現する遺伝子操作マウスを提供する。ヒト化ユニバーサル軽鎖は、軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される1つ以下または2つ以下のヒト軽鎖VセグメントおよびヒトJセグメントまたは軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される軽鎖可変ドメインをコードする1つ以下または2つ以下の再構成された（V λ ／J λ 、V κ ／J κ 、V λ ／J κ 、またはV κ ／J λ ）ヒト核酸配列のいずれかを含む遺伝子座から発現される。様々な実施形態において、ユニバーサルヒト化軽鎖ドメインは複数の親和性成熟ヒト重鎖可変ドメインと対合し、複数の重鎖可変ドメインは異なるエピトープまたは抗原と特異的に結合する。

10

【0007】

一態様では、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座およびヒト化軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子座を含むマウスであって、該マウスが2つ以下のユニバーサル軽鎖のうちの1つを発現し、雄であるマウスが野生型妊性を示す、マウスを作製するための核酸構築物、細胞、胚、マウス、および方法を提供する。

20

【0008】

一態様では、その生殖系列内において内因性マウス重鎖遺伝子座にヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座を含み、且つヒト化軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子座を含む改変マウスであって、該マウスがユニバーサル軽鎖を発現し、マウスがマウスADAM6をコードする核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む、改変マウスを提供する。様々な実施形態において、ヒト化軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子座は内因性マウス軽鎖遺伝子座に存在する。

【0009】

一実施形態では、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座は、内因性マウス重鎖可変遺伝子座での、全てまたは実質的に全ての機能的マウス免疫グロブリン重鎖V、D、およびJ遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒトV、ヒトD、およびヒトJ遺伝子セグメントでの置換を含み、1つもしくは複数のヒトV、D、およびJセグメントが作動可能に連結されて重鎖定常配列に作動可能に連結される再構成されたV／D／J遺伝子を形成するように再構成することができる。

30

【0010】

一実施形態では、マウスは、ユニバーサル軽鎖が作製されるように操作された軽鎖遺伝子座を含み、ユニバーサル軽鎖は1つ以下の軽鎖Vセグメントおよび1つ以下の軽鎖Jセグメントを含む軽鎖遺伝子座または単一の再構成された軽鎖V／J配列を含む軽鎖遺伝子座に由来する軽鎖である。一実施形態では、マウスは、ヒト軽鎖J遺伝子セグメント（1つまたは複数のJセグメントから選択される）を用いて再構成してヒト軽鎖可変ドメインをコードすることができる単一のヒト免疫グロブリン軽鎖Vセグメントを含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含む。別の実施形態では、マウスは、軽鎖遺伝子座に2つ以下のヒト軽鎖Vセグメントを含み、その各VセグメントはヒトJ遺伝子セグメント（1つまたは複数の軽鎖Jセグメントから選択される）を用いて再構成して再構成されたヒト軽鎖可変ドメインをコードすることができる。

40

【0011】

一実施形態では、単一のヒト軽鎖VセグメントはJ κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4、およびJ κ 5から選択されるヒト軽鎖Jセグメントに作動可能に連結されており、単一のヒト軽鎖Vセグメントは1つもしくは複数のヒト軽鎖Jセグメントのうちのいずれかを有する軽鎖可変領域遺伝子をコードする配列が形成されるように再構成することができる。

【0012】

50

一実施形態では、マウスは、全てまたは実質的に全てのマウスVおよびJ遺伝子セグメントの、1つ以下または2つ以下の再構成された(V/J)核酸配列での置換を含む内因性軽鎖遺伝子座を含む。一実施形態では、1つ以下または2つ以下の再構成された(V/J)核酸配列は、ヒトV κ 1-39J κ 5、V κ 3-20J κ 1、およびその組み合わせから選択される。

【0013】

一実施形態では、マウスは、マウス軽鎖可変ドメインを発現することができる機能的内因性軽鎖遺伝子座を欠く。一実施形態では、マウスは、 κ 遺伝子座でユニバーサル軽鎖の可変ドメインをコードする核酸配列を含む。一実施形態では、マウスは、 λ 遺伝子座でユニバーサル軽鎖の可変ドメインをコードする核酸配列を含む。

10

【0014】

一実施形態では、ヒトVセグメント(または再構成されたV/J配列)は、ヒトまたはマウスリーダー配列に作動可能に連結されている。一実施形態では、リーダー配列はマウスリーダー配列である。特定の実施形態では、マウスリーダー配列はマウスV κ 3-7リーダー配列である。

【0015】

一実施形態では、ヒトVセグメント(または再構成されたV/J配列)は免疫グロブリンプロモーター配列に作動可能に連結されている。一実施形態では、プロモーター配列はヒトプロモーター配列である。特定の実施形態では、ヒト免疫グロブリンプロモーターはヒトV κ 3-15プロモーターである。

20

【0016】

一実施形態では、再構成されていないVおよびJセグメントまたは再構成された(V/J)配列は、軽鎖免疫グロブリン定常領域遺伝子に作動可能に連結されている。特定の実施形態では、定常領域遺伝子はマウスC κ 遺伝子である。

【0017】

一実施形態では、再構成されていないVおよびJセグメントまたは再構成された(V/J)配列は κ 軽鎖遺伝子座に存在し、 κ 軽鎖遺伝子座はマウス κ イントロンエンハンサー、マウス κ 3'エンハンサー、またはイントロンエンハンサーおよび3'エンハンサーの両方を含む。特定の実施形態では、 κ 遺伝子座は内因性 κ 遺伝子座である。

【0018】

一実施形態では、マウスはユニバーサル軽鎖の可変ドメインをコードする配列を含む κ 遺伝子座を含み、マウスは非機能的免疫グロブリンラムダ(λ)軽鎖遺伝子座を含む。特定の実施形態では、 λ 軽鎖遺伝子座は遺伝子座の1つもしくは複数の配列の欠失を含み、1つもしくは複数の欠失は λ 軽鎖遺伝子座が再構成されて軽鎖遺伝子を形成することを不可能にする。別の実施形態では、 λ 軽鎖遺伝子座の全てまたは実質的に全てのVセグメントを欠失する。1つの別の実施形態では、マウスは、全てまたは実質的に全ての内因性軽鎖可変遺伝子座の欠失を含む。

30

【0019】

一実施形態では、マウスは、その生殖系列内に再構成された免疫グロブリン軽鎖配列または再構成されていない遺伝子セグメントに関して5'側のマウス κ イントロンエンハンサー、マウス κ 3'エンハンサー、およびその組み合わせから選択される配列をさらに含む。

40

【0020】

一実施形態では、マウスのユニバーサル軽鎖可変ドメイン配列は1つもしくは複数の体細胞超変異を含み、1つの実施形態では、可変ドメイン配列は複数の体細胞超変異を含む。

【0021】

一実施形態では、マウスは体細胞変異ヒト可変ドメインを含むユニバーサル軽鎖を作製する。一実施形態では、該軽鎖は、ヒトVセグメント、ヒトJセグメント、およびマウスC κ 遺伝子に由来する体細胞変異ヒト可変ドメインを含む。一実施形態では、マウスは λ

50

軽鎖を発現しない。

【0022】

一実施形態では、ヒト可変配列は再構成されたヒト $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 配列であり、マウスは (i) $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ に由来する可変ドメインおよび (ii) マウス C_L を含むリバースキメラ軽鎖を発現し、該軽鎖は (i) マウス C_H および (ii) 体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含むリバースキメラ重鎖と会合している。一実施形態では、マウスは体細胞変異した軽鎖を発現する。一実施形態では、 C_L はマウス C_{κ} である。

【0023】

一実施形態では、ヒト可変配列は再構成されたヒト $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 配列であり、マウスは (i) $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ に由来する可変ドメイン、および (ii) マウス C_L を含むリバースキメラ軽鎖を発現し、該軽鎖は、(i) マウス C_H 、および (ii) 体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含むリバースキメラ重鎖と会合している。

【0024】

一実施形態では、マウスは再構成されたヒト $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 配列および再構成されたヒト $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 配列の両方を含み、マウスは (i) $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 配列または $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 配列に由来する可変ドメインを含む軽鎖、および (ii) マウス C_L を含むリバースキメラ軽鎖を発現し、該軽鎖は (i) マウス C_H 、および (ii) 体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含むリバースキメラ重鎖と会合している。一実施形態では、マウスは体細胞変異された軽鎖を発現する。一実施形態では、 C_L はマウス C_{κ} である。

【0025】

一実施形態では、マウスはマウス C_{κ} および再構成されたヒト $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 配列または再構成されたヒト $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 配列に由来する体細胞変異ヒト可変ドメインを含む軽鎖ならびにマウス C_H および体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含む重鎖を含むリバースキメラ抗体を発現し、マウスは完全マウス抗体を発現せず、完全ヒト抗体を発現しない。一実施形態では、マウスは、内因性マウス κ 軽鎖遺伝子セグメントの、再構成されたヒト $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 配列または再構成されたヒト $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 配列での置換を含み、且つ全てまたは実質的に全ての内因性マウス重鎖 V 、 D 、および J 遺伝子セグメントの、ヒト重鎖 V 、 D 、および J 遺伝子セグメントの完全または実質的に完全なレパートリーでの置換を含む κ 軽鎖遺伝子座を含む。

【0026】

一態様では、1つ以下または2つ以下の再構成された κ 軽鎖配列に由来する単一の κ 軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、該マウスが抗原で免疫されると同じ抗原で免疫された野生型マウスに匹敵する血清力価を示す、遺伝子改変マウスを提供する。特定の実施形態では、マウスは単一の κ 軽鎖配列を発現し、単一の κ 軽鎖配列は1つ以下の再構成された κ 軽鎖配列に由来する。一実施形態では、血清力価は総免疫グロブリンと特徴付けられる。特定の実施形態では、血清力価は IgM 特異的力価と特徴付けられる。特定の実施形態では、血清力価は IgG 特異的力価と特徴付けられる。さらに特定の実施形態では、再構成された κ 軽鎖配列は、 $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 配列および $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 配列から選択される。一実施形態では、再構成された κ 軽鎖配列は $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 配列である。一実施形態では、再構成された κ 軽鎖配列は $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 配列である。

【0027】

一態様では、単一の軽鎖配列と会合した複数の免疫グロブリン重鎖を発現する遺伝子改変マウスを提供する。一実施形態では、重鎖はヒト配列を含む。種々の実施形態では、ヒト配列は、可変配列、 $CH1$ 、ヒンジ、 $CH2$ 、 $CH3$ 、およびその組み合わせから選択される。一実施形態では、単一の軽鎖はヒト配列を含む。種々の実施形態では、ヒト配列は、可変配列、定常配列、およびその組み合わせから選択される。一実施形態では、マウスは無能化された内因性免疫グロブリン遺伝子座を含み、導入遺伝子または染色体外エピソード由来の重鎖および／または軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは、内因性マウス遺伝子座での、いくつかまたは全ての内因性マウス重鎖遺伝子セグメント（すなわち

10

20

30

40

50

、V、D、J）、および／またはいくつかまたは全ての内因性マウス重鎖定常配列（例えば、CH₁、ヒンジ、CH₂、CH₃、またはその組み合わせ）、および／またはいくつかまたは全ての内因性マウス軽鎖配列（例えば、V、J、定常、またはその組み合わせ）の、1つもしくは複数のヒト免疫グロブリン配列での置換を含む。

【0028】

1つの実施形態において、前記マウスは、前記1つもしくは複数のV、DおよびJ遺伝子セグメント、または1つもしくは複数のVおよびJ遺伝子セグメントの再構成後、前記マウスは、マウスADAM6遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードする少なくとも1つの核酸配列をそのゲノム内に含む。1つの実施形態において、再構成後、前記マウスは、マウスADAM6遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードする少なくとも2つの核酸配列をそのゲノム内に含む。1つの実施形態において、再構成後、前記マウスは、マウスADAM6遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードする少なくとも1つの核酸配列をそのゲノム内に含む。1つの実施形態において、前記マウスは、前記ADAM6遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をB細胞内に含む。

【0029】

1つの実施形態において、前記雄マウスは、単一の未変内因性ADAM6対立遺伝子またはそのオルソログもしくは（of）ホモログもしくは機能的断片を内因性ADAM6遺伝子座に含む。

【0030】

1つの実施形態において、前記雄マウスは、内因性マウスADAM6対立遺伝子の場所、例えば、最後のV遺伝子セグメント配列の3'および最初のD遺伝子セグメントの5'に近いマウスゲノム内の場所にADAM6配列またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を含む。

【0031】

1つの実施形態において、前記雄マウスは、免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントをコードする核酸配列の（ADAM6配列の転写方向を基準にして）上流、下流、または上流および下流に隣接するADAM6配列またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を含む。特定の実施形態において、前記免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントは、ヒト遺伝子セグメントである。1つの実施形態において、前記免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントは、ヒト遺伝子セグメントであり、マウスにおいて機能的なマウスADAM6またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする配列は、ヒトV遺伝子セグメント間にある；1つの実施形態において、前記マウスは、2つ以上のV遺伝子セグメントを含み、前記配列は、前記最後のV遺伝子セグメントと最後から二番目のV遺伝子セグメントの間の位置にある。1つの実施形態において、前記配列は、前記最後のV遺伝子セグメントおよび前記最初のD遺伝子セグメントの次に来る位置にある。

【0032】

一実施形態では、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座は内因性マウスADAM6遺伝子を欠く。一実施形態では、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座は、雄マウスにおいて機能するADAM6遺伝子を含む。特定の実施形態では、雄マウスにおいて機能するADAM6遺伝子はマウスADAM6遺伝子であり、マウスADAM6遺伝子はヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座内またはそのすぐ隣に存在する。

【0033】

一実施形態では、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座は内因性マウスADAM6遺伝子を欠き、マウスは雄マウスにおいて機能する異所性ADAM6配列を含む。一実施形態では、雄マウスにおいて機能する異所性ADAM6遺伝子はマウスADAM6遺伝子である。一実施形態では、マウスADAM6遺伝子は、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座と同一の染色体上に存在する。一実施形態では、マウスADAM6遺伝子は、ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座と異なる染色体上に存在する。一実施形態では、マウス

10

20

30

40

50

A D A M 6 遺伝子はエピソーム上に存在する。

【0034】

一実施形態では、マウスは第一の内因性重鎖対立遺伝子および第二の内因性重鎖対立遺伝子を含み、第一の内因性重鎖対立遺伝子はマウス A D A M 6 遺伝子座の欠失を含み、第一の内因性重鎖対立遺伝子は全てまたは実質的に全ての機能的マウス V、D、および J セグメントの、1 つもしくは複数のヒト V、D、および J セグメントでの置換を含む。一実施形態では、第一および第二の内因性重鎖対立遺伝子は、各々、内因性マウス A D A M 6 遺伝子座の欠失を含み、第一および第二の内因性重鎖対立遺伝子は全てまたは実質的に全ての機能的マウス V、D、および J セグメントの、1 つもしくは複数のヒト V、D、および J セグメントでの置換を含む。一実施形態では、第一および／または第二の対立遺伝子は、マウス A D A M 6 をコードする異所性核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む。1 つの実施形態において、異所性の核酸配列は、前記第二の改変は、最後のマウス V 遺伝子セグメントの（重鎖可変遺伝子座（locust）の転写方向性を基準にして）3' にあり、およびマウス（またはキメラヒト／マウス）重鎖定常遺伝子またはその断片（例えば、ヒトおよび／またはマウス：C_H 1 および／またはヒンジおよび／または C_H 2 および／または C_H 3 をコードする核酸配列）の（定常配列の転写方向性を基準にして）5' にある。一実施形態では、異所性核酸配列は、V セグメントの下流（V セグメント遺伝子座の転写方向に関して）且つ D セグメントの上流に存在する。一実施形態では、異所性核酸配列は、最も 3' 側から 2 番目の V セグメントと最も 3' 側の V セグメントとの間に存在する。特定の実施形態では、異所性核酸配列はヒト V セグメント V_H 1-2 とヒト V セグメント V_H 6-1 との間に存在する。一実施形態では、2 つのヒト V 遺伝子セグメントの間のヌクレオチド配列は、ヒト V 遺伝子セグメントに関して逆の転写方向に存在する。特定の実施形態では、ヌクレオチド配列は、A D A M 6 遺伝子の転写方向に関して 5' から 3' に A D A M 6 a 配列をコードし、その後 A D A M 6 b 配列をコードする。特定の実施形態では、A D A M 6 遺伝子（複数可）は、隣接する V セグメントの上流および下流と比較して逆の転写方向に配向している。

【0035】

1 つの実施形態において、前記核酸配列は、マウス A D A M 6 a もしくはその機能的断片をコードする配列、および／またはマウス A D A M 6 b もしくはその機能的断片をコードする配列を含み、該 A D A M 6 a および／もしくは A D A M 6 b またはその機能的断片（単数もしくは複数）は、プロモーターに作動可能に連結されている。1 つの実施形態において、前記プロモーターは、ヒトプロモーターである。1 つの実施形態において、前記プロモーターは、マウス A D A M 6 プロモーターである。特定の実施形態において、前記 A D A M 6 プロモーターは、最も 5' 側のマウス D_H 遺伝子セグメントに最も近い第一の A D A M 6 遺伝子の第一コドンと、最も 5' 側の D_H 遺伝子セグメントの組換えシグナル配列との間にある配列を含み、この場合の 5' は、マウス免疫グロブリン遺伝子の転写方向を基準にして示される。1 つの実施形態において、前記プロモーターは、ウイルスプロモーターである。特定の実施形態において、前記ウイルスプロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターである。1 つの実施形態において、前記プロモーターは、ユビキチンプロモーターである。

【0036】

1 つの実施形態において、前記マウス A D A M 6 a および／または A D A M 6 b は、配列番号 1 の A D A M 6 a および／または配列番号 2 の配列（sequence SEQ ID NO: 2）の A D A M 6 b から選択される。1 つの実施形態において、前記マウス A D A M 6 プロモーターは、配列番号 3 のプロモーターである。特定の実施形態において、前記 A D A M 6 プロモーターは、A D A M 6 a の第一コドンの（A D A M 6 a の転写方向を基準にして）直ぐ上流の配列番号 3 の核酸配列であって、A D A M 6 コーディング領域の上流の配列番号 3 の端にわたる（extending）核酸配列を含む。もう 1 つの特定の実施形態において、前記 A D A M 6 プロモーターは、A D A M 6 a の開始コドンの上流約 5 から約 20 ヌクレオチド以内から A D A M 6 a の開始コドンの約 0.5 kb、1

k b、2 k bまたは3 k b以上上流にわたる断片である。

【0037】

1つの実施形態において、前記核酸配列は、ADAM6欠如のため不妊性であるまたは妊性が低いマウスの体内に配置されたとき、妊性を向上させるまたは妊性をほぼ野生型の妊性に回復させる、配列番号3またはその断片を含む。1つの実施形態において、配列番号3またはその断片は、雌マウス卵管を通り抜けてマウス卵子を受精させることができる精子細胞を産生する能力を雄マウスに付与する。

【0038】

一実施形態では、マウスは、雄マウスにおいて機能するADAM6タンパク質をコードする核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含む。特定の実施形態では、核酸配列は、1つもしくは複数の免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントを含むヒト核酸配列内に存在するかこれに隣接する。一実施形態では、1つもしくは複数の免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントは改変内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座に存在する。一実施形態では、改変は、全てまたは実質的に全ての機能的マウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメントの、内因性マウス定常領域遺伝子に作動可能に連結される複数の再構成されていないヒト重鎖遺伝子セグメントでの置換を含む。特定の実施形態では、核酸配列は2つのヒトVセグメントの間に存在する。特定の実施形態では、核酸配列はヒトVセグメントとヒトDセグメントとの間に存在する。特定の実施形態では、核酸配列はヒトDセグメントとヒトJセグメントとの間に存在する。特定の実施形態では、核酸配列は、最も5'側の（Vセグメントの転写方向に関して）ヒトVセグメントの上流に存在する。特定の実施形態では、核酸配列は、ヒトJセグメントと内因性マウス重鎖定常領域遺伝子配列との間に存在する。

【0039】

一実施形態では、雄マウスは、野生型マウスとほぼ同一の頻度の交配によって子孫をもたらすことができる。一実施形態では、雄マウスは、マウス卵管を介してマウス子宮から移行してマウス卵を受精させることができる精液を産生し、特定の実施形態では、マウス精子は卵管を介して野生型マウス由来の精子ほどの効率で移行する。一実施形態では、マウスで産生された約50%以上の精子が卵管に侵入および／または移行してマウス卵を受精させる能力を示す。

【0040】

一実施形態では、マウスは機能的内因性ADAM6遺伝子座を欠き、マウスは、雄マウスにおけるマウスADAM6機能の喪失を補完する異所性ヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、異所性ヌクレオチド配列は、雄マウスに、機能的内因性ADAM6遺伝子を含む対応する野生型雄マウスに匹敵する子孫産生能を付与する。一実施形態では、配列は、マウスに、マウスの精子細胞表面上にADAM2および／またはADAM3および／またはADAM6の複合体を形成する能力を付与する。一実施形態では、配列は、マウスに、マウス卵管を介してマウス子宮からマウス卵に移動して卵を受精させる能力を付与する。

【0041】

一実施形態では、マウスは機能的内因性ADAM6遺伝子座を欠き、雄マウスにおいて機能するADAM6をコードする異所性ヌクレオチド配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含み、雄マウスは、同年齢および系統の野生型マウスが6ヶ月の期間にもたらす同腹仔数の少なくとも約50%、60%、70%、80%、または90%をもたらす。

【0042】

一実施形態では、機能的内因性ADAM6遺伝子座を欠き且つ異所性ヌクレオチド配列を含むマウスは、6ヶ月間にわたって交配した場合、実質的に同期間にわたり、且つ実質的に同一条件下で交配した機能的内因性ADAM6遺伝子座を欠き、且つ異所性ヌクレオチド配列を欠く同年齢で同一または類似の系統のマウスよりも少なくとも約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約4倍、約6倍、約7倍、約8倍、または約10倍またはそれを

超える子孫をもたらす。

【0043】

一実施形態では、機能的内因性ADAM6遺伝子を欠き、且つ異所性ヌクレオチド配列を含むマウスは、4または6ヶ月間の交配期間における同腹仔あたりの子の数を、同一期間交配した機能的内因性ADAM6遺伝子を欠き、且つ異所性ヌクレオチド配列を欠くマウスよりも平均して少なくとも約2倍、3倍、または4倍多くもたらす。

【0044】

一実施形態では、機能的内因性ADAM6遺伝子を欠き且つ異所性ヌクレオチド配列を含むマウスは雄マウスであり、雄マウスは、交尾約5～6時間後に卵管から回収した場合に、機能的内因性ADAM6遺伝子を欠き且つ異所性ヌクレオチド配列を欠くマウスの精子よりも少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、100倍、110倍、または120倍またはそれを超える卵管移動をもたらす精子を産生する。

【0045】

一実施形態では、機能的内因性ADAM6遺伝子を欠き且つ異所性ヌクレオチド配列を含むマウスは、雌マウスと交尾した場合に、野生型マウス由来の精子とほぼ同等の効率で約6時間以内に子宮を通り抜け、卵管に侵入して通り抜けることができる精子を生成する。

【0046】

一実施形態では、機能的内因性ADAM6遺伝子を欠き且つ異所性ヌクレオチド配列を含むマウスは、匹敵する期間に、機能的ADAM6遺伝子を欠き且つ異所性ヌクレオチド配列を欠くマウスよりも約1.5倍、約2倍、約3倍、または約4倍またはそれを超える同腹仔をもたらす。

【0047】

一態様では、ヒト化内因性マウス重鎖可変免疫グロブリン遺伝子座およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の改変を含むマウスであって、該マウスは、ヒトまたはマウス重鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される再構成されたヒト重鎖免疫グロブリン配列を含むB細胞を発現し、B細胞はそのゲノム内に（例えば、B細胞染色体上に）雄マウスにおいて機能するADAM6をコードする遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片（例えば、マウスADAM6遺伝子（例えば、マウスADAM6aおよび／またはマウスADAM6b））を含み、マウスの免疫グロブリンλまたはκ軽鎖の可変ドメインは1つ以下または2つ以下の軽鎖V遺伝子セグメントに由来するマウスを提供する。

【0048】

1つの実施形態において、前記重鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されている再構成免疫グロブリン配列は、ヒト重鎖V、Dおよび／またはJ配列；マウス重鎖V、Dおよび／またはJ配列；ヒトまたはマウス軽鎖Vおよび／またはJ配列を含む。1つの実施形態において、前記重鎖定常領域遺伝子配列は、C_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3およびその組み合わせからなる群より選択されるヒトまたはマウス重鎖配列を含む。

【0049】

一態様では、同一の軽鎖を有する抗体の作製に適切なマウスであって、該マウス内で作製された全てまたは実質的に全ての抗体は同一の軽鎖と共に発現され、軽鎖はヒト可変ドメインを含み、抗体はヒト可変ドメインを含む重鎖を含む、マウスを提供する。

【0050】

一態様では、マウスがヒトVκ1-39Jκ5でもヒトVκ3-20Jκ1配列でもない再構成された軽鎖配列に由来する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを発現するB細胞を作製する能力がないことによって特徴付けられるマウスを提供する。

【0051】

一実施形態では、マウスは、免疫グロブリン軽鎖VおよびJ遺伝子セグメントの野生型相補物を含むマウスとほぼ同一であるκ：λ軽鎖比を示す。

10

20

30

40

50

【0052】

一態様では、ヒトV κ 1-39J κ 5またはヒトV κ 3-20J κ 1配列に由来する免疫グロブリン軽鎖を発現する本明細書に記載のマウスであって、該マウスは、全てまたは実質的に全ての内因性マウス重鎖可変領域遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントでの置換を含み、マウスは約1～約20の(a) λ 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19⁺B細胞の(b) κ 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19⁺B細胞に対する比を示す、マウスを提供する。

【0053】

一実施形態では、マウスは単一の κ 軽鎖を発現し、単一の κ 軽鎖はヒトV κ 1-39J κ 5配列に由来し、 λ 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19⁺B細胞の、 κ 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19⁺B細胞に対する比は約1～約20であり、1つの実施形態では、比は約1～少なくとも約66であり、特定の実施形態では、比は約1～66である。

10

【0054】

一実施形態では、マウスは単一の κ 軽鎖を発現し、単一の κ 軽鎖はヒトV κ 3-20J κ 5配列に由来し、 λ 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19⁺B細胞の、 κ 軽鎖を有する免疫グロブリンを発現するCD19⁺B細胞に対する比は約1～約20であり、1つの実施形態では、比は約1～約21である。特定の実施形態では、比は1～20または1～21である。

【0055】

一実施形態では、マウスにおけるIg κ ⁺Ig λ ⁺B細胞のパーセントは野生型マウスとほぼ同一である。特定の実施形態では、マウスにおけるIg κ ⁺Ig λ ⁺B細胞のパーセントは約2～約6パーセントである。特定の実施形態では、単一の再構成された κ 軽鎖がV κ 1-39J κ 5配列に由来するマウスにおけるIg κ ⁺Ig λ ⁺B細胞のパーセントは約2～約3、特定の実施形態では、約2.6である。特定の実施形態では、単一の再構成された κ 軽鎖がV κ 3-20J κ 1配列に由来するマウスにおけるIg κ ⁺Ig λ ⁺B細胞のパーセントは約4～約8、特定の実施形態では、約6である。

20

【0056】

一実施形態では、マウスは、該マウスが該マウスの任意の機能的軽鎖遺伝子座を体細胞変異させる能力を低減または消失させる改変を含まない。一実施形態では、マウス内の唯一の機能的軽鎖遺伝子座は、ヒトV κ 1-39J κ 5配列、ヒトV κ 3-20J κ 1配列、およびその組み合わせから選択される再構成された配列に由来するヒト可変ドメインを含む軽鎖を発現する。

30

【0057】

一態様では、1つ以下または2つ以下の再構成された κ 軽鎖配列に由来する単一の κ 軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、該マウスは、完全または実質的に完全なヒト κ 軽鎖遺伝子座を保有するマウスによって示される同一の κ 軽鎖(すなわち、同一のVセグメントおよび同一のJセグメントに由来するか、同一の再構成されたV/Jセグメントに由来する)の使用量よりも約100倍以上、少なくとも約200倍以上、少なくとも約300倍以上、少なくとも約400倍以上、少なくとも約500倍以上、少なくとも約600倍以上、少なくとも約700倍以上、少なくとも約800倍以上、少なくとも約900倍以上、少なくとも約1000倍以上多い κ 軽鎖の使用量を示す遺伝子改変マウスを提供する。特定の実施形態では、完全または実質的に完全なヒト κ 軽鎖遺伝子座を保有するマウスは、機能的な再構成されていないマウス κ 軽鎖配列を欠く。特定の実施形態では、マウスは、1つ以下の再構成された κ 軽鎖配列由来の単一の κ 軽鎖を発現する。一実施形態では、マウスは再構成された κ 軽鎖配列の1つのコピーを含む(例えば、ヘテロ接合体)。一実施形態では、マウスは再構成された κ 軽鎖配列の2つのコピーを含む(例えば、ホモ接合体)。1つのより特定の実施形態では、再構成された κ 軽鎖配列はV κ 1-39J κ 5およびV κ 3-20J κ 1配列から選択される。一実施形態では、再構成された κ 軽鎖配列はV κ 1-39J κ 5配列である。一実施形態では、再構成された κ 軽鎖配列はV

40

50

κ 3-20 J κ 1 配列である。

【0058】

一態様では、1つ以下または2つ以下の再構成されたκ軽鎖配列に由来する単一の軽鎖を発現する遺伝子改変マウスであって、該遺伝子改変マウス内の軽鎖は、完全または実質的に完全なヒトκ軽鎖可変遺伝子座を保有するマウスによって示される同一の再構成された軽鎖の発現よりも少なくとも10倍～約1,000倍、100倍～約1,000倍、200倍～約1,000倍、300倍～約1,000倍、400倍～約1,000倍、500倍～約1,000倍、600倍～約1,000倍、700倍～約1,000倍、800倍～約1,000倍、または900倍～約1,000倍多い発現レベルを示す、遺伝子改変マウスを提供する。一実施形態では、軽鎖はヒト配列を含む。一実施形態では、単一の軽鎖は、ヒトVκ1-39 Jκ5、ヒトVκ3-20 Jκ1、およびその組み合わせから選択される再構成されたκ軽鎖配列に由来する。

10

【0059】

一実施形態では、軽鎖の発現を、実質的に完全なヒト化軽鎖可変遺伝子座を含むマウスにおける発現と比較するための、軽鎖の発現レベルは、転写された軽鎖配列（1つまたは2つの再構成された配列由来）のmRNAを定量することおよび、それを、完全または実質的に完全な軽鎖遺伝子座を保有するマウスの転写された軽鎖配列と比較することによって特徴付けられる。

【0060】

一態様では、抗体の作製方法であって、細胞で、(a)ヒトC_H遺伝子配列と融合される本明細書に記載の免疫マウスの第一のヒト重鎖可変ドメイン核酸配列、(b)ヒトC_L遺伝子配列と融合される本明細書に記載の免疫マウスのヒト軽鎖可変ドメイン核酸配列を発現させること、および(c)完全なヒトの抗体を発現させるのに十分な条件の下で細胞を維持し、抗体を単離することを含む方法が提供される。一実施形態では、細胞は、ヒトC_H遺伝子配列と融合される本明細書に記載の第二の免疫マウスの第二のヒト重鎖可変ドメイン核酸配列を含み、第一の重鎖核酸配列は第一のエピトープを認識する第一の重鎖可変ドメインをコードし、第二の重鎖核酸配列は第二のエピトープを認識する第二の重鎖可変ドメインをコードし、ここで、第一のエピトープおよび第二のエピトープは同一でない。

20

【0061】

一態様では、エピトープ結合性タンパク質の作製方法であって、目的のエピトープを含む抗原に本明細書に記載のマウスを曝露させること、目的のエピトープに特異的に結合する免疫グロブリン分子をマウスが生成するのに十分な条件の下でマウスを維持すること、および目的のエピトープに特異的に結合する免疫グロブリン分子を単離することを含み、エピトープ結合性タンパク質は、マウスC_Lおよび再構成されたヒトVκ1-39 Jκ5または再構成されたヒトVκ3-20 Jκ1に由来するヒト可変ドメインを含む軽鎖に会合している、体細胞変異ヒト可変ドメインおよびマウスC_Hを含む重鎖を含む方法が提供される。

30

【0062】

一態様では、二重特異性抗原結合性タンパク質の作製方法であって、本明細書に記載される第一のマウスを、第一のエピトープを含む目的の第一の抗原に曝露させること、本明細書に記載される第二のマウスを、第二のエピトープを含む目的の第二の抗原に曝露させること、第一および第二のマウスに目的の抗原への免疫応答を各々開始させること、目的の第一の抗原の第一のエピトープに結合する第一のヒト重鎖可変領域を第一のマウスで同定すること、目的の第二の抗原の第二のエピトープに結合する第二のヒト重鎖可変領域を第二のマウスで同定すること、目的の第一の抗原の第一のエピトープに結合する第一の重鎖をコードする第一の完全なヒトの重鎖遺伝子を作製すること、目的の第二の抗原の第二のエピトープに結合する第二の重鎖をコードする第二の完全なヒトの重鎖遺伝子を作製すること、ヒトVκ1-39またはヒトVκ3-20遺伝子セグメントに由来する単一の完全なヒトの軽鎖を発現する細胞で第一の重鎖および第二の重鎖を発現させて二重特異性抗

40

50

原結合性タンパク質を形成すること、ならびに二重特異性抗原結合性タンパク質を単離することを含む方法が提供される。

【0063】

一実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は同一でない。

【0064】

一実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は同じであり、第一のエピトープおよび第二のエピトープは同一でない。一実施形態では、第一のエピトープへの第一の重鎖可変領域の結合は、第二のエピトープへの第二の重鎖可変領域の結合をブロックしない。

【0065】

一実施形態では、第一の抗原は可溶性抗原および細胞表面抗原（例えば、腫瘍抗原）から選択され、第二の抗原は細胞表面受容体を含む。具体的な実施形態では、細胞表面受容体は免疫グロブリン受容体である。具体的な実施形態では、免疫グロブリン受容体はFc受容体である。一実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は同じ細胞表面受容体であり、第一のエピトープへの第一の重鎖の結合は第二のエピトープへの第二の重鎖の結合をブロックしない。

【0066】

一実施形態では、軽鎖の軽鎖可変ドメインは、2から5個の体細胞変異を含む。一実施形態では、軽鎖可変ドメインは、第一または第二の重鎖可変ドメインを有する第一または第二の免疫マウスのB細胞で発現される体細胞変異関連軽鎖である。

【0067】

一態様では、エピトープ結合性タンパク質を発現する細胞であって、該細胞は、(a)再構成されたヒトVκ1-39Jκ5または再構成されたヒトVκ3-20Jκ1に由来するヒト軽鎖可変ドメインをコードするヒトヌクレオチド配列（ヒト核酸配列は（直接またはリンカーを介して）ヒト免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン核酸配列（例えば、ヒトκ定常ドメインDNA配列）に融合されている）；および(b)第一のヒト重鎖可変ドメインヌクレオチド配列に由来するヒト重鎖可変ドメインをコードする第一のヒト重鎖可変ドメイン核酸配列（第一のヒト重鎖可変ドメインヌクレオチド配列は（直接またはリンカーを介して）ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメイン核酸配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、またはIgE配列）に融合されている）を含み、エピトープ結合性タンパク質は第一のエピトープを認識する、細胞を提供する。一実施形態では、エピトープ結合性タンパク質は、第一のエピトープと 10^{-6} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、 10^{-11} M未満、または 10^{-12} M未満の解離定数で結合する。一実施形態では、細胞は第二のヒト重鎖可変ドメインをコードする第二のヒトヌクレオチド配列を含み、第二のヒト配列は（直接またはリンカーを介して）ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメイン核酸配列と融合されており、第二のヒト重鎖可変ドメインは第一のエピトープを特異的に認識せず（例えば、 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M、またはそれを超える解離定数を示す）、エピトープ結合性タンパク質は第一のエピトープおよび第二のエピトープの両方と結合し、第一および第二の免疫グロブリン重鎖は、各々、(a)にしたがって軽鎖と会合している。一実施形態では、第二のV_Hドメインは、 10^{-6} M未満、 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満、 10^{-11} M未満、または 10^{-12} M未満である解離定数で第二のエピトープに結合する。

【0068】

一実施形態では、エピトープ結合性タンパク質は、各々がユニバーサル軽鎖（例えば、ヒトVκ1-39Jκ5またはヒトVκ3-20Jκ1から選択される再構成されたヒト軽鎖可変配列に由来する軽鎖）と会合される第一の免疫グロブリン重鎖および第二の免疫グロブリン重鎖を含み、第一の免疫グロブリン重鎖はナノモル濃度範囲（例えば、1 nM～100 nM）からピコモル濃度範囲（例えば、1 pM～100 pM）の解離定数で第一のエピトープと結合し、第二の免疫グロブリン重鎖はナノモル濃度範囲からピコモル濃度範囲（例えば、1 pM～100 nM）の解離定数で第二のエピトープと結合し、第一のエ

10

20

30

40

50

ピトープおよび第二のエピトープは同一ではなく、第一の免疫グロブリン重鎖は第二のエピトープと結合しないかマイクロモル濃度範囲より弱い（例えば、ミリモル濃度範囲）解離定数で第二のエピトープと結合し、第二の免疫グロブリン重鎖は第一のエピトープと結合しないかマイクロモル濃度範囲より弱い（例えば、ミリモル濃度範囲）解離定数で第一のエピトープと結合し、第二の免疫グロブリン重鎖の可変ドメインのうちの1つもしくは複数（すなわち、軽鎖可変ドメイン、第一の免疫グロブリン重鎖の重鎖可変ドメイン、および重鎖可変ドメインのうちの1つもしくは複数）が体細胞変異される。一実施形態では、エピトープ結合性タンパク質の、第一のエピトープへの結合はエピトープ結合性タンパク質の第二のエピトープへの結合を遮断しない。

【0069】

一実施形態では、第一の免疫グロブリン重鎖は野生型プロテインA結合決定基を含み、第二の重鎖は野生型プロテインA結合決定基を欠く。一実施形態では、第一の免疫グロブリン重鎖は単離条件の下でプロテインAに結合し、第二の免疫グロブリン重鎖はプロテインAに結合しないか、第一の免疫グロブリン重鎖が単離条件の下でプロテインAに結合するよりも少なくとも10倍、100倍または1000倍弱くプロテインAに結合する。具体的な実施形態では、第一および第二の重鎖はIgG1アイソタイプであり、第二の重鎖は95R（EU 435R）、96F（EU 436F）およびその組合せから選択される改変を含み、第一の重鎖はそのような改変を欠く。

【0070】

一態様では、本明細書に記載されるとおりのマウス、胚または細胞は、内因性の調節または制御エレメント、例えばマウスκイントロンエンハンサー、マウスκ3'エンハンサーまたはイントロンエンハンサーと3'エンハンサーの両方を保持するκ軽鎖遺伝子座を含み、ここで、調節または制御エレメントは、κ軽鎖遺伝子座の発現される配列の体細胞変異および親和性成熟を促進する。

【0071】

一態様では、本明細書に記載のマウスから単離されたマウス細胞を提供する。一実施形態では、細胞はES細胞である。一実施形態では、細胞はリンパ球である。一実施形態では、リンパ球はB細胞である。一実施形態では、B細胞はヒトV遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含むキメラ重鎖；および（a）再構成されたヒトVκ1-39/J配列、（b）再構成されたヒトVκ3-20/J配列、または（c）その組み合わせに由来する軽鎖を発現し、重鎖可変ドメインはマウス定常領域と融合されており、軽鎖可変ドメインはマウスまたはヒト定常領域と融合されている。一実施形態では、マウス細胞は、少なくとも1つの、マウスADAM6をコードする遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む。一実施形態では、細胞はB細胞であり、B細胞は再構成されたヒト重鎖免疫グロブリン可変ドメインをコードする配列およびユニバーサル軽鎖可変ドメインをコードする配列を含み、B細胞は染色体上に雄マウスにおいて機能するADAM6タンパク質をコードする核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含み、一実施形態では、マウスB細胞は核酸配列の2つの対立遺伝子を含む。

【0072】

一態様では、再構成されていないヒトV、D、およびJセグメントを含むヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む第一の染色体；軽鎖をコードするか軽鎖コードするように再構成することができるヒト化免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含む第二の染色体（軽鎖遺伝子座は軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される1つ以下のVセグメント（または2つ以下のVセグメント）および1つ以下のJセグメント（または2つ以下のJセグメント）、または軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される1つ以下または2つ以下の再構成された軽鎖V/J配列を含む）；および雄マウスにおいて機能するマウスADAM6をコードする核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含む第三の染色体を含むマウス細胞を提供する。一実施形態では、第一および第三の染色体は同一である。一実施形態では、第二および第三の染色体は同一である。一実施形態では、第一、第二、および第三の染色体は各々異なる。一実施形態では、マウスADAM6をコードする核酸配列

10

20

30

40

50

またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片は2コピー中に存在する。一実施形態では、細胞は体細胞である。特定の実施形態では、体細胞はB細胞である。一実施形態では、細胞は生殖細胞である。

【0073】

一態様では、ハイブリドーマであって、該ハイブリドーマを本明細書に記載のマウスのB細胞を使用して作製する、ハイブリドーマを提供する。特定の実施形態では、B細胞は目的のエピトープを含む抗原で免疫されている本明細書に記載のマウスに由来し、B細胞は目的のエピトープと結合する結合性タンパク質を発現し、結合性タンパク質は体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインおよびマウス重鎖定常領域を有し、且つ再構成されたヒトV κ 1-39J κ 5または再構成されたヒトV κ 3-20J κ 1に由来するヒト軽鎖可変ドメインおよびマウスC_Lを有する。

10

【0074】

一態様では、本明細書に記載のマウスの第一の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列を含む完全ヒト重鎖遺伝子および本明細書に記載のユニバーサル軽鎖配列をコードする核酸配列を含む完全ヒト軽鎖遺伝子を含む細胞を提供する。一実施形態では、細胞は本明細書に記載のマウスの第二の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列をさらに含み、第一および第二の重鎖可変ドメインは異なる。一実施形態では、細胞は、CHO、COS、293、HeLa、およびウイルス核酸配列を発現する網膜細胞（例えば、PERC.6（商標）細胞）から選択される。

【0075】

一態様では、マウス胚であって、該胚は本明細書に記載のマウスに由来するドナーES細胞を含む、マウス胚を提供する。

20

【0076】

一態様では、本明細書に記載の遺伝子改変を含むマウス胚の使用であって、該使用は本明細書に記載の遺伝子改変マウスの作製を含む、使用を提供する。

【0077】

一態様では、本明細書に記載のマウスで作製された抗体のヒト重鎖可変ドメインおよびヒト軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を提供する。

【0078】

一態様では、本明細書に記載のマウスで作製された抗体のヒト重鎖可変ドメインのヌクレオチド配列およびヒト軽鎖可変ドメインのヌクレオチド配列を提供する。

30

【0079】

一態様では、本明細書に記載のマウスで作製された抗体またはその抗原結合性タンパク質もしくは抗原結合性断片（例えば、Fab、F(ab)₂、scFv）を提供する。

【0080】

1つの態様では、本明細書に記載のとおりターゲットングベクター、ヌクレオチド構築物または細胞を使用して作製されるマウスを提供する。

【0081】

1つの態様では、本明細書に記載の第一のマウスと、野生型マウスであるまたは遺伝子改変されている第二のマウスとの交配の後代を提供する。

40

【0082】

一態様では、完全ヒト抗体または免疫グロブリン可変ドメインもしくはその機能的断片を含む完全ヒト抗原結合性タンパク質を作製するための本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

【0083】

一態様では、完全ヒト二重特異性抗体を作製するための本明細書に記載のマウスまたは組織または細胞の使用を提供する。

【0084】

一態様では、本明細書に記載のマウスによって作製された核酸配列の使用であって、該使用はヒトへの治療薬の製造における核酸配列の発現を含む、使用を提供する。

50

【0085】

1つの態様では、不死化細胞系を作製するための、本明細書に記載のとおりマウスの使用を提供する。

【0086】

1つの態様では、ハイブリドーマまたはクアドローマを作製するための、本明細書に記載のとおりマウスの使用を提供する。

【0087】

1つの態様では、免疫グロブリン可変領域またはその断片をコードする核酸配列を作製するための、本明細書に記載のとおりマウスの使用を提供する。1つの実施形態では、前記核酸配列を使用して、ヒト抗体またはその抗原結合断片を作製する。1つの実施形態では、前記マウスを使用して、抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、s c F v、二重特異性 s c F v、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディー、V-N A R、V_HH、V_L、F(a b)、F(a b)₂、DVD（すなわち、二重可変ドメイン抗原結合タンパク質）、SVD（すなわち、単一可変ドメイン抗原結合タンパク質）または二重特異性T細胞エンゲージャー（b i s p e c i f i c T-c e l l e n g a g e r : B i T E）から選択される抗原結合タンパク質を作製する。

10

【0088】

1つの態様では、ヒト疾患または障害の処置のために、薬物（例えば、抗原結合タンパク質）を製造するための、または薬物（例えば、抗原結合タンパク質）の可変配列をコードする配列を製造するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

20

【0089】

本明細書に記載される実施形態および態様のいずれも、特に明記しない限り、または文脈から明らかでない限り、互いに一緒に用いることができる。他の実施形態は、後に続く記載の概観から当業者にとって明らかになる。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目1）

マウスであって、該マウスの生殖系列において：

（a）重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される少なくとも1つの再構成されていないヒトV、少なくとも1つの再構成されていないヒトD、および少なくとも1つの再構成されていないヒトJセグメントを含むヒト化免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座；

30

（b）軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される1つ以下または2つ以下の再構成されたヒト軽鎖V/J配列を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座；および

（c）雄マウスにおいて機能する、マウスA D A M 6タンパク質をコードする異所性核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含むマウス。

（項目2）

前記雄マウスにおいて機能する、マウスA D A M 6タンパク質をコードする核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片が前記免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座以外の遺伝子座に存在する、項目1に記載のマウス。

（項目3）

前記重鎖定常領域遺伝子がマウス遺伝子である、項目1に記載のマウス。

40

（項目4）

前記軽鎖定常領域遺伝子がマウス遺伝子である、項目1に記載のマウス。

（項目5）

ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座およびヒト化軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子座を含むマウスであって、該マウスが単一の軽鎖を発現し、該マウスが雄マウスにおいて機能するA D A M 6遺伝子をコードする異所性核酸配列を含む、マウス。

（項目6）

前記ヒト化重鎖免疫グロブリン遺伝子座が内因性マウス重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結されている、項目5に記載のマウス。

50

(項目 7)

前記単一の軽鎖が、軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下の軽鎖 V 遺伝子セグメントおよび軽鎖 J 遺伝子セグメントをコードする免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子遺伝子座からコードされる、項目 5 に記載のマウス。

(項目 8)

前記単一の軽鎖が、前記マウスの前記生殖系列における免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子遺伝子座に由来し、該遺伝子座が軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される、該生殖系列中の 1 つ以下の再構成された軽鎖 V/J 遺伝子セグメントをコードする、項目 5 に記載のマウス。

(項目 9)

前記異所性核酸配列が雄マウスにおいて機能するマウス A D A M 6 タンパク質をコードするか、マウス A D A M 6 タンパク質の断片をコードする、項目 5 に記載のマウス。

(項目 10)

前記異所性核酸配列が内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座内ではない位置に存在する、項目 5 に記載のマウス。

(項目 11)

遺伝子改変マウスであって、複数の異なる I g G 重鎖を発現し、該複数の異なる I g G 重鎖の各々がヒト可変ドメインを含み、前記複数の異なる I g G 重鎖の各々が単一のヒト免疫グロブリン V 遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする軽鎖配列と会合しており、該マウスが雄マウスにおいて機能する A D A M 6 タンパク質をコードする異所性核酸配列を含む、遺伝子改変マウス。

(項目 12)

前記マウスが、雄マウスにおいて機能する A D A M 6 タンパク質またはその断片を発現し、該 A D A M 6 タンパク質またはその断片が前記異所性核酸配列から発現される、項目 11 に記載のマウス。

(項目 13)

マウス細胞であって、以下：

重鎖定常遺伝子に作動可能に連結されるヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子遺伝子座；

軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下または 2 つ以下の軽鎖 V 遺伝子セグメントを含むヒト化軽鎖免疫グロブリン遺伝子座；および

A D A M 6 タンパク質またはその断片をコードする異所性核酸配列であって、該 A D A M 6 タンパク質またはその断片が雄マウスにおいて機能する、異所性核酸配列を含む、マウス細胞。

(項目 14)

前記異所性核酸配列がマウス A D A M 6 タンパク質をコードする、項目 13 に記載のマウス細胞。

(項目 15)

前記重鎖定常遺伝子が非ヒト重鎖定常遺伝子である、項目 13 に記載のマウス。

(項目 16)

前記軽鎖定常遺伝子が非ヒト軽鎖定常遺伝子である、項目 13 に記載のマウス。

(項目 17)

前記 1 つ以下または 2 つ以下 (no more than two) の軽鎖 V 遺伝子セグメントが再構成された V/J 遺伝子セグメントに存在する、項目 13 に記載のマウス。

(項目 18)

ヒト重鎖 V 遺伝子セグメントに由来する免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含むキメラ免疫グロブリン重鎖；ならびに

(a) 再構成されたヒト V κ 1-39/J 配列、

(b) 再構成されたヒト V κ 3-20/J 配列、または

(c) その組み合わせ；

10

20

30

40

50

に由来する軽鎖を発現するマウスB細胞であって、
該重鎖可変ドメインが定常領域と融合されており、該軽鎖可変ドメインが定常領域と融合
されており、該B細胞が異所性A D A M 6 核酸配列を含む、マウスB細胞。

(項目19)

前記重鎖可変ドメインと融合される前記定常ドメインがマウス定常領域を含む、項目18
に記載のマウスB細胞。

(項目20)

前記軽鎖可変ドメインと融合される前記定常領域がマウス定常領域およびヒト定常領域か
ら選択される、項目18に記載のマウスB細胞。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1A】図1Aは、約1メガ塩基(Mb)のヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座(白抜きの記号)での約3メガ塩基(Mb)のマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座(黒塗りの記号)の直接ゲノム置換の一般説明図(縮尺不定)を示すものである。

【図1B】図1Bは、ヒト免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座の2つのほぼ同一のリ
ピートのうちの約0.5メガ塩基(Mb)の第一のリピート、すなわち近位リピート(白抜きの記号)での約3メガ塩基(Mb)のマウス免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座(黒塗りの記号)の直接ゲノム置換の一般説明図(縮尺不定)を示すものである。

【図2A】図2Aは、すべてのマウスV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントの欠失なら
びに3つのヒトV_H、すべてのヒトD_HおよびJ_H遺伝子セグメントでの置換を生じさせ
る結果となるマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座の直接ゲノム置換についての
最初の3工程(A~C)の詳細な説明図(縮尺不定)を示すものである。ヒト免疫グロブ
リン重鎖遺伝子セグメントの第一の挿入のためのターゲティングベクター(3hV_HBA
C v e c)が示されており、このターゲティングベクターは、67kb 5'マウスホモ
ロジーアーム、選択カセット(白抜きの長方形)、部位特異的組換え部位(白抜きの三角
形)、145kbヒトゲノム断片および8kb 3'マウスホモロジーアームを有する。
後続のターゲティングベクターから挿入されるヒト(白抜きの記号)およびマウス(黒塗
りの記号)免疫グロブリン遺伝子セグメント、追加の選択カセット(白抜きの長方形)お
よび部位特異的組換え部位(白抜きの三角形)が示されている。

【図2B】図2Bは、77の追加のヒトV_H遺伝子セグメントの挿入および最後の選択カ
セットの除去を生じさせる結果となるマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座の直
接ゲノム置換についての追加の6工程(D~I)の詳細な説明図(縮尺不定)を示すもの
である。最初のヒト重鎖遺伝子セグメント挿入物(3hV_H-CREハイブリッド対立遺
伝子)への追加のヒトV_H遺伝子セグメントの挿入のためのターゲティングベクター(1
8hV_HBA C v e c)が示されており、このターゲティングベクターは、20kb 5'
マウスホモロジーアーム、選択カセット(白抜きの長方形)、196kbヒトゲノム断
片および62kbヒトホモロジーアームを有し、該ヒトホモロジーアームは、示されてい
る最初のヒト重鎖遺伝子セグメント挿入物の5'端とオーバーラップしており、該ヒト遺
伝子セグメントに対して5'に部位特異的組換え部位(白抜きの三角形)がある。後続の
ターゲティングベクターによって挿入されるヒト(白抜きの記号)およびマウス(黒塗
りの記号)免疫グロブリン遺伝子セグメントならびに追加の選択カセット(白抜きの長
方形)が示されている。

【図2C】図2Cは、すべてのマウスV_κおよびJ_κ遺伝子セグメントの欠失(Igκ-
CREハイブリッド対立遺伝子)を生じさせる結果となるマウス免疫グロブリンκ軽鎖可
変遺伝子遺伝子座の直接ゲノム置換についての最初の3工程(A~C)の詳細な説明図(縮
尺不定)を示すものである。前記ターゲティングベクターから挿入される選択カセット
(白抜きの長方形)および部位特異的組換え部位(白抜きの三角形)が示されている。

【図2D】図2Dは、前記近位リピートのすべてのヒトV_κおよびJ_κ遺伝子セグメント
の挿入および最後の選択カセットの欠失(40hV_κdHygハイブリッド対立遺伝子)
を生じさせる結果となるマウス免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座の直接ゲノム置

10

20

30

40

50

換についての追加の5工程（D～H）の詳細な説明図（縮尺不定）を示すものである。後続のターゲティングベクターによって挿入されるヒト（白抜きの記号）およびマウス（黒塗りの記号）免疫グロブリン遺伝子セグメントならびに追加の選択カセット（白抜きの長方形）が示されている。

【図3A】図3Aは、ヒト重鎖遺伝子配列の挿入およびマウス重鎖遺伝子配列の喪失についてES細胞を検出するための定量的PCR（qPCR）プライマー／プローブセットの場所の一般説明図を示すものである。未改変マウス染色体（上部）および正しくターゲティングされた染色体（下部）上の欠失領域（「喪失」プローブCおよびD）、挿入された領域（「hIgH」プローブGおよびH）および隣接領域（「保持」プローブA、B、EおよびF）のためのqPCRプライマー／プローブセットを用いた、ES細胞およびマウスにおける第一のヒト重鎖遺伝子挿入についてのスクリーニング戦略が示されている。

【図3B】図3Bは、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントの第一の挿入についての、親ES細胞および改変ES細胞における実測プローブコピー数の代表的算定を示すものである。プローブAからFについての実測プローブコピー数は、 $2 / 2 \Delta \Delta C t$ と算定された。 $\Delta \Delta C t$ は、 $ave[\Delta C t(\text{試料}) - med \Delta C t(\text{対照})]$ として算定され、この式中の $\Delta C t$ は、被験プローブと基準プローブ（アッセイに依存して4と6の間の基準プローブ）の間のCtの差である。用語 $med \Delta C t$ （対照）は、親ES細胞からの多数（ > 60 ）の非標的DNA試料の中央値 $\Delta C t$ である。各改変ES細胞クローンを6つひと組（sexuplicate）でアッセイした。親ES細胞におけるIgHプローブGおよびHのコピー数を算定するために、これらのプローブが改変ES細胞では1のコピー数を有すると仮定し、増幅が観察されなかったとしても35の最大Ctを用いた。

【図3C】図3Cは、プローブDおよびHのみを使用して同様に算定した各遺伝子型の4匹のマウスについてのコピー数の代表算定を示すものである。野生型マウス：WTマウス；ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントの最初の挿入物に関してヘテロ接合性のマウス：HETマウス；ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントの最初の挿入物に関してホモ接合性のマウス：Homoマウス。

【図4A】図4Aは、細菌相同組換え（BHR）による3hV_HBACvecの構築に用いた3工程についての説明図を示すものである。ターゲティングベクターから挿入されたヒト（白抜きの記号）およびマウス（黒塗りの記号）免疫グロブリン遺伝子セグメント、選択カセット（白抜きの長方形）および部位特異的組換え部位（白抜きの三角形）が示されている。

【図4B】図4Bは、NotI消化後の3つのBACクローン（B1、B2およびB3）のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を示すものである。マーカーM1、M2およびM3は、それぞれ、ローレンジ、ミドルレンジおよびラムダラダーPFGEマーカー（New England BioLabs、マサチューセッツ州イプスウィッチ）である。

【図5A】図5Aは、漸増量のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントでのマウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の逐次的改変の概略説明図（縮尺不定）を示すものである。重鎖ヒト化の3つの異なる段階それぞれからホモ接合型マウスを作製した。白抜きの記号はヒト配列を反映し、黒塗りの記号はマウス配列を反映する。

【図5B】図5Bは、漸増量のヒト免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子セグメントでのマウス免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子座の逐次的改変の概略説明図（縮尺不定）を示すものである。κ軽鎖ヒト化の3つの異なる段階それぞれからホモ接合型マウスを作製した。白抜きの記号はヒト配列を反映し、黒塗りの記号はマウス配列を反映する。

【図6】図6は、野生型およびVELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおけるB細胞集団のFACSドットプロットを示すものである。野生型（wt）、またはVELOCIIMMUNE（登録商標）1（V1）、VELOCIIMMUNE（登録商標）2（V2）またはVELOCIIMMUNE（登録商標）3（V3）マウスの脾臓（最上段、上から三段目および最下段）または鼠蹊リンパ節（上から二段目）からの細胞を、表面IgMを発現するB細胞（最上段、および上から二段目）、κもしくはλ軽鎖のいずれかを含

10

20

30

40

50

有する表面免疫グロブリン（上から三段目）または特定のハプロタイプの表面 I g M（最下段）について染色し、集団を F A C S によって分離した。

【図 7 A】図 7 A は、接合部の多様性およびヌクレオチド付加の証拠となる、 $V_H - D_H - J_H$ （C D R 3）接合部周辺のランダムに選択した V E L O C I M M U N E（登録商標）抗体の代表重鎖 C D R 3 配列を示すものである。重鎖 C D R 3 配列を D_H 遺伝子セグメント使用量（u s a g e）に従ってグループ分けし、その生殖細胞系を各グループの上に太字で提供する。各重鎖 C D R 3 配列についての V_H 遺伝子セグメントを各配列の 5' 端のカッコ内に記入する（例えば、3-72 は、ヒト V_H 3-72 である）。各重鎖 C D R 3 についての J_H 遺伝子セグメントを各配列の 3' 端のカッコ内に記入する（例えば、3 は、ヒト J_H 3 である）。示されている各配列についての配列番号は、上から下に進んで、次のとおりである：配列番号 21；配列番号 22；配列番号 23；配列番号 24；配列番号 25；配列番号 26；配列番号 27；配列番号 28；配列番号 29；配列番号 30；配列番号 31；配列番号 32；配列番号 33；配列番号 34；配列番号 35；配列番号 36；配列番号 37；配列番号 38；配列番号 39。

【図 7 B】図 7 B は、接合部の多様性およびヌクレオチド付加の証拠となる、 $V_K - J_K$ （C D R 3）接合部周辺のランダムに選択した V E L O C I M M U N E（登録商標）抗体の代表軽鎖 C D R 3 配列を示すものである。各軽鎖 C D R 3 配列についての V_K 遺伝子セグメントを各配列の 5' 端のカッコ内に記入する（例えば、1-6 は、ヒト V_K 1-6 である）。各軽鎖 C D R 3 についての J_K 遺伝子セグメントを各配列の 3' 端のカッコ内に記入する（例えば、1 は、ヒト J_K 1 である）。示されている各配列についての配列番号は、上から下に進んで、次のとおりである：配列番号 40；配列番号 41；配列番号 42；配列番号 43；配列番号 44；配列番号 45；配列番号 46；配列番号 47；配列番号 48；配列番号 49；配列番号 50；配列番号 51；配列番号 52；配列番号 53；配列番号 54；配列番号 55；配列番号 56；配列番号 57；配列番号 58。

【図 8】図 8 は、38（非免疫 I g M）、28（非免疫 I g G）、32（I g G からの非免疫 I g K）、36（免疫 I g G）または 36（I g G からの免疫 I g K）配列セットの中の各ヌクレオチド（N T；左縦列）およびアミノ酸（A A；右縦列）位置で変化した配列のパーセントとして（マッチする生殖細胞系配列へのアラインメント後に）スコアを付けた V E L O C I M M U N E（登録商標）抗体の重鎖および軽鎖の体細胞超変異頻度を示すものである。陰影のあるバーは、C D R の場所を示す。

【図 9 A】図 9 A は、野生型マウス（白抜きのバー）または V E L O C I M M U N E（登録商標）マウス（黒塗りのバー）における I g M および I g G アイソタイプについての血清免疫グロブリンのレベルを示すものである。

【図 9 B】図 9 B は、野生型マウス（白抜きのバー）または V E L O C I M M U N E（登録商標）マウス（黒塗りのバー）における I g A アイソタイプについての血清免疫グロブリンのレベルを示すものである。

【図 9 C】図 9 C は、野生型マウス（白抜きのバー）または V E L O C I M M U N E（登録商標）マウス（黒塗りのバー）における I g E アイソタイプについての血清免疫グロブリンのレベルを示すものである。

【図 10 A】図 10 A は、インターロイキン-6 受容体エクトドメインでの 2 ラウンドの免疫後（採血試料（b l e e d）1）または 3 ラウンドの免疫後（採血試料 2）の 7 匹の V E L O C I M M U N E（登録商標）（V I）および 5 匹の野生型（W T）マウスからの血清のインターロイキン-6 受容体に対する抗原特異的 I g G 力価を示すものである。

【図 10 B】図 10 B は、7 匹の V E L O C I M M U N E（登録商標）（V I）マウスおよび 5 匹の野生型（W T）マウスからの抗インターロイキン-6 受容体特異的 I g G アイソタイプ特異的力価を示すものである。

【図 11 A】図 11 A は、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスにおいて産生された抗インターロイキン-6 受容体モノクローナル抗体の親和性分布を示すものである。

【図 11 B】図 11 B は、V E L O C I M M U N E（登録商標）（V I）マウスおよび野生型（W T）マウスにおいて産生された抗インターロイキン-6 受容体モノクローナル抗

10

20

30

40

50

体の抗原特異的遮断を示すものである。

【図12】図12は、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座におけるマウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子の概略説明図（縮尺不定）を示すものである。ヒト化内因性重鎖遺伝子座へのマウスADAM6aおよびADAM6bの挿入のために使用したターゲティングベクター（mADAM6ターゲティングベクター）が示されており、このターゲティングベクターは、5'および3'端に操作されて作製された制限酵素認識部位を含む部位特異的組換え部位（Frt）が隣接する選択カセット（HYG：ハイグロマイシン）を有する。

【図13】図13は、ヒト重鎖可変遺伝子セグメント1-2（V_H1-2）と6-1（V_H6-1）の間にあるヒトADAM6偽遺伝子（hADAM6Ψ）の概略説明図（縮尺不定）を示すものである。ヒトADAM6偽遺伝子を欠失させ、ヒト重鎖遺伝子座にユニークな制限酵素認識部位を挿入する細菌相同組換えのためのターゲティングベクター（hADAM6Ψターゲティングベクター）が示されており、このターゲティングベクターは、5'および3'端に操作されて作製された制限酵素認識部位を含む部位特異的組換え部位（loxP）が隣接する選択カセット（NEO：ネオマイシン）を有する。部位特異的組換え部位が隣接する選択カセットを含む、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子をコードするゲノム断片を含有する、結果として得られる標的ヒト化重鎖遺伝子座の説明図（縮尺不定）が示されている。

【図14A】図14Aは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ）ならびにマウスADAM6遺伝子を含む挿入されたマウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ-A6）の骨髓中のIgMおよびB220の表面発現についてのシングルレット（singlet）でゲートしたリンパ球のFACS等高線図を示すものである。未熟（B220^{int} IgM⁺）および成熟（B220^{high} IgM⁺）B細胞の百分率を各等高線図に記入する。

【図14B】図14Bは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ-A6）の大腿骨から単離した骨髓中の未熟（B220^{int} IgM⁺）および成熟（B220^{high} IgM⁺）B細胞の総数を示すものである。

【図15A】図15Aは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ-A6）の骨髓中のc-KitおよびCD43の表面発現についてのCD19⁺ゲートB細胞のFACS等高線図を示すものである。プロB（CD19⁺CD43⁺c-Kit⁺）細胞およびプレB（CD19⁺CD43⁻c-Kit⁻）細胞の百分率を各等高線図のそれぞれ右上および左下象限（quadrant）に記入する。

【図15B】図15Bは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ）ならびにマウスADAM6遺伝子を含む異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ-A6）の大腿骨から単離した骨髓中のプロB（CD19⁺CD43⁺c-Kit⁺）細胞およびプレB（CD19⁺CD43⁻c-Kit⁻）細胞の総数を示すものである。

【図16A】図16Aは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（H/κ-A6）の骨髓中のCD19およびCD43の表面発現についてのシングルレットでゲートしたリンパ球のFACS等高線図を示すものである。未熟B（CD19⁺CD43⁻）細胞、プレB（CD19⁺CD43^{int}）細胞およびプロB（CD19⁺CD43⁺）細胞の百分率を各等高線図に記入する。

【図16B】図16Bは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接

合性のマウス (H/κ) ならびにマウス A D A M 6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H/\kappa - A 6$) の骨髓中の未熟 B ($CD 19^+ CD 43^-$) 細胞およびプレ B ($CD 19^+ CD 43^{int}$) 細胞のヒストグラムを示すものである。

【図 17 A】図 17 A は、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス (H/κ) ならびにマウス A D A M 6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H/\kappa - A 6$) の脾細胞における $CD 19$ および $CD 3$ の表面発現についてのシングレットでゲートしたリンパ球の F A C S 等高線図を示すものである。B ($CD 19^+ CD 3^-$) 細胞および T ($CD 19^- CD 3^+$) 細胞の百分率を各等高線図に記入する。

【図 17 B】図 17 B は、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス (H/κ) ならびにマウス A D A M 6 遺伝子を含む異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H/\kappa - A 6$) の脾臓における $I g \lambda$ および $I g \kappa$ 軽鎖の表面発現についての $CD 19^+$ ゲート B 細胞の F A C S 等高線図を示すものである。 $I g \lambda^+$ (左上象限) B 細胞および $I g \kappa^+$ (右下象限) B 細胞の百分率を各等高線図に記入する。

【図 17 C】図 17 C は、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス (H/κ) ならびにマウス A D A M 6 遺伝子を含む異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H/\kappa - A 6$) の脾臓における $CD 19^+$ B 細胞の総数を示すものである。

【図 18 A】図 18 A は、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス (H/κ) ならびにマウス A D A M 6 遺伝子を含む異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H/\kappa - A 6$) の脾臓における $I g D$ および $I g M$ の表面発現についての $CD 19^+$ ゲート B 細胞の F A C S 等高線図を示すものである。成熟 B 細胞 ($CD 19^+ I g D^{high} I g M^{int}$) の百分率を各等高線図に記入する。右の等高線図上の矢印は、 $I g M$ および $I g D$ 表面発現に関連した B 細胞の成熟過程を図示するものである。

【図 18 B】図 18 B は、 $CD 19^+ I g M^{high} I g D^{int}$ から $CD 19^+ I g M^{int} I g D^{high}$ に成熟する間の、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス (H/κ) ならびにマウス A D A M 6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H/\kappa - A 6$) の脾臓における B 細胞の総数を示すものである。

【図 19】図 19 は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒト $V \kappa 1-39 J \kappa 5$ 遺伝子領域で置換するためのターゲティング戦略を説明する。

【図 20】図 20 は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒト $V \kappa 3-20 J \kappa 1$ 遺伝子領域で置換するためのターゲティング戦略を説明する。

【図 21】図 21 は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒト $V p r e B/J \lambda 5$ 遺伝子領域で置換するためのターゲティング戦略を説明する。

【図 22】図 22 は、野生型マウス (WT)、操作されたヒトの再構成された $V \kappa 1-39 J \kappa 5$ 軽鎖領域 ($V \kappa 1-39 J \kappa 5 H O$) についてホモ接合のマウス、および操作されたヒトの再構成された $V \kappa 3-20 J \kappa 1$ 軽鎖領域 ($V \kappa 3-20 J \kappa 1 H O$) についてホモ接合のマウスの末梢血からの $CD 19^+$ B 細胞 (y 軸) の百分率を示す。

【図 23 A】図 23 A は、ヒト $V \kappa$ および $J \kappa$ 遺伝子セグメントによる内因性 $V \kappa$ および $J \kappa$ 遺伝子セグメントの置換についてホモ接合のマウス ($H \kappa$)、野生型マウス (WT)、ならびに操作されたヒトの再構成された $V \kappa 1-39 J \kappa 5$ 軽鎖領域についてヘテロ接合のマウス ($V \kappa 1-39 J \kappa 5 H E T$) での、操作されたヒトの再構成された $V \kappa 1-39 J \kappa 5$ 軽鎖領域の接合部に特異的なプローブ ($V \kappa 1-39 J \kappa 5$ 接合部プローブ) およびヒト $V \kappa 1-39$ 遺伝子セグメントに特異的なプローブ ($V \kappa 1-39$ プローブ) を用いる定量的 PCR アッセイにおける、 $V \kappa 1-39$ 由来軽鎖の相対的 mRNA 発現 (y 軸) を示す。シグナルは、マウス $C \kappa$ の発現に標準化される。N. D. : 検出されず。

10

20

30

40

50

【図23B】図23Bは、ヒトV κ およびJ κ 遺伝子セグメントによる内因性V κ およびJ κ 遺伝子セグメントの置換についてホモ接合のマウス(H κ)、野生型マウス(WT)、ならびに操作されたヒトの再構成されたV κ 1-39J κ 5軽鎖領域についてホモ接合のマウス(V κ 1-39J κ 5HO)での、操作されたヒトの再構成されたV κ 1-39J κ 5軽鎖領域の接合部に特異的なプローブ(V κ 1-39J κ 5接合部プローブ)およびヒトV κ 1-39遺伝子セグメントに特異的なプローブ(V κ 1-39プローブ)を用いる定量的PCRアッセイにおける、V κ 1-39由来軽鎖の相対的mRNA発現(y軸)を示す。シグナルは、マウスC κ の発現に標準化される。

【図23C】図23Cは、ヒトV κ およびJ κ 遺伝子セグメントによる内因性V κ およびJ κ 遺伝子セグメントの置換についてホモ接合のマウス(H κ)、野生型マウス(WT)、ならびに操作されたヒトの再構成されたV κ 3-20J κ 1軽鎖領域についてヘテロ接合(HET)およびホモ接合(HO)のマウスでの、操作されたヒトの再構成されたV κ 3-20J κ 1軽鎖領域の接合部に特異的なプローブ(V κ 3-20J κ 1接合部プローブ)およびヒトV κ 3-20遺伝子セグメントに特異的なプローブ(V κ 3-20プローブ)を用いる定量的PCRアッセイにおける、V κ 3-20由来軽鎖の相対的mRNA発現(y軸)を示す。シグナルは、マウスC κ の発現に標準化される。

【図24A】図24Aは、 β ガラクトシダーゼで免疫した、野生型(WT; N=2)および操作されたヒトの再構成されたV κ 1-39J κ 5軽鎖領域についてホモ接合のマウス(V κ 1-39J κ 5HO; N=2)でのIgM(左)およびIgG(右)の力価を示す。

【図24B】図24Bは、 β ガラクトシダーゼで免疫した、野生型(WT; N=5)および操作されたヒトの再構成されたV κ 3-20J κ 1軽鎖領域についてホモ接合のマウス(V κ 3-20J κ 1HO; N=5)での総免疫グロブリン(IgM、IgG、IgA)の力価を示す。

【発明を実施するための形態】

【0091】

(詳細な説明)

本明細書で用いる用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続する4つのポリペプチド鎖、2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖可変(V_H)領域および重鎖定常領域(C_H)を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C_H1、C_H2およびC_H3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変(V_L)領域および軽鎖定常領域(C_L)を含む。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる保存されている領域の間に散在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化することができる。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置される3つのCDRおよび4つのFRを含む：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重鎖CDRは、HCDR1、HCDR2およびHCDR3と略すことができ；軽鎖CDRは、LCDR1、LCDR2およびLCDR3と略すことができる)。用語「高親和性」抗体は、その標的エпитープに関して約 10^{-9} M以下のK_D(例えば、約 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} Mまたは約 1×10^{-12} M)を有する抗体を指す。一実施形態では、K_Dは表面プラズモン共鳴、例えばBIACORETMによって測定され、別の実施形態では、K_DはELISAによって測定される。

【0092】

語句「二重特異性抗体」は、2つ以上のエпитープに選択的に結合することが可能な抗体を含む。二重特異性抗体は、2つの同一ではない重鎖を一般に含み、各重鎖は、2つの異なる分子上(例えば、2つの異なる免疫原上の異なるエпитープ)または同じ分子上(例えば、同じ免疫原上の異なるエпитープ)の異なるエпитープに特異的に結合する。二重特異性抗体が2つの異なるエпитープ(第一のエピトープおよび第二のエピトープ)に選択的に結合することが可能な場合、第一のエピトープに対する第一の重鎖の親和性は、第二のエピトープに対する第一の重鎖の親和性より少なくとも1桁から2桁、または3桁

または4桁またはそれよりも一般に低く、逆もまた同じである。二重特異性抗体が特異的に結合するエピトープは、同じか異なる標的の上（例えば、同じか異なるタンパク質の上）にあってよい。二重特異性抗体は、例えば、同じ免疫原の異なるエピトープを認識する重鎖を組み合わせることによって作ることができる。例えば、同じ免疫原の異なるエピトープを認識する重鎖可変配列をコードする核酸配列は、同じか異なる重鎖定常領域をコードする核酸配列に融合させることができ、そのような配列は免疫グロブリン軽鎖を発現する細胞で発現させることができる。一般的な二重特異性抗体は、各々3つの重鎖CDRと、続く（N末端からC末端にかけて）C_H1ドメイン、ヒンジ、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを有する2つの重鎖、ならびに、エピトープ結合特異性を付与しないが各重鎖と会合することができるか、または各重鎖と会合することができ、かつ重鎖エピトープ結合性領域が結合するエピトープの1つもしくは複数に結合することができるか、または各重鎖と会合することができ、かつ一方もしくは両方のエピトープへの重鎖の一方もしくは両方の結合を可能にすることができる免疫グロブリン軽鎖を有する。

10

【0093】

用語「細胞」には、組換え核酸配列を発現させるのに適する任意の細胞が含まれる。細胞には、原核生物および真核生物（単細胞または多細胞）のもの、細菌細胞（例えば、*E. coli*の株、*Bacillus* spp.、*Streptomyces* spp. など）、マイコプラズマ細胞、真菌細胞、酵母細胞（例えば、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、*P. pastoris*、*P. methanolicus*など）、植物細胞、昆虫細胞（例えば、SF-9、SF-21、バキュロウイルス感染昆虫細胞、*Trichoplusia ni*など）、ヒト以外の動物細胞、ヒト細胞、または細胞融合体、例えばハイブリドーマもしくはクアドローマが含まれる。一部の実施形態では、細胞はヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラットまたはマウスの細胞である。一部の実施形態では、細胞は真核細胞であり、以下の細胞から選択される：CHO（例えば、CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO）、COS（例えば、COS-7）、網膜細胞、Vero、CV1、腎臓（例えば、HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK）、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60（例えば、BHK21）、Jurkat、Daudi、A431（表皮性）、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、Sertoli細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髓腫細胞、腫瘍細胞および前記細胞に由来する細胞系。一部の実施形態では、細胞は、1つまたは複数のウイルス遺伝子を含む（例えばウイルス遺伝子を発現する網膜細胞（例えば、PER. C6TM細胞））。

20

30

【0094】

語句「相補性決定領域」または用語「CDR」には、通常（すなわち、野生型動物で）免疫グロブリン分子（例えば、抗体またはT細胞受容体）の軽鎖または重鎖の可変領域の2つのフレームワーク領域の間に現れる、生物体の免疫グロブリン遺伝子の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列が含まれる。CDRは、例えば、生殖系列配列または再構成されたかまたは再構成されていない配列がコードすることができ、例えば、ナイーブであるか成熟したB細胞またはT細胞がコードすることができる。CDRは体細胞変異してもよく（例えば、動物の生殖系列でコードされている配列と異なる）、ヒト化、および／またはアミノ酸の置換、付加もしくは欠失で改変されてもよい。一部の状況（例えば、CDR3に関して）では、CDRは、2つ以上の配列（例えば、生殖系列配列）であって、（例えば、再構成されていない核酸配列において）不連続であるが、例えば、配列のスプライシングまたは接続の結果として（例えば、V-D-J組換えによって重鎖CDR3を形成する）B細胞核酸配列において連続している、2つ以上の配列（例えば、生殖系列配列）によってコードされてもよい。

40

【0095】

保存的なアミノ酸置換を記載するために用いられる場合、用語「保存的」には、類似した化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖R基を有する別のアミノ酸残基

50

によるアミノ酸残基の置換が含まれる。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の目的の機能特性、例えば標的エピトープに所望の親和性で特異的に結合する可変領域の能力を実質的に変えない。類似した化学特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンなどの脂肪族側鎖；セリンおよびトレオニンなどの脂肪族ヒドロキシル側鎖；アスパラギンおよびグルタミンなどのアミドを含む側鎖；フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンなどの芳香族の側鎖；リシン、アルギニンおよびヒスチジンなどの塩基性側鎖；アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性側鎖；ならびにシステインおよびメチオニンなどの硫黄を含む側鎖が含まれる。保存的アミノ酸置換基には、例えば、バリン／ロイシン／イソロイシン、フェニルアラニン／チロシン、リシン／アルギニン、アラニン／バリン、グルタミン酸／アスパラギン酸、およびアスパラギン／グルタミンが含まれる。一部の実施形態では、例えばアラニンスキャニング変異生成で用いられるように、保存的アミノ酸置換は、アラニンによるタンパク質の任意の天然の残基の置換であってよい。一部の実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる G o n n e t r a (1 9 9 2 年) E x h a u s t i v e M a t c h i n g o f t h e E n t i r e P r o t e i n S e q u e n c e D a t a b a s e、S c i e n c e 2 5 6 巻：1 4 4 3～4 5 頁に開示される P A M 2 5 0 対数尤度マトリックスで正の値を有する保存的置換がもたらされる。一部の実施形態では、置換は、P A M 2 5 0 対数尤度マトリックスで置換が負ではない値を有するような適度に保存的な置換である。

10

【0096】

20

一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖または重鎖での残基位置は、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換によって異なる。一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖またはその機能的断片（例えば、B細胞などからの発現および分泌を可能にする断片）における残基位置は、アミノ酸配列が本明細書に記載されている軽鎖と同一ではなく、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換によって異なる。

【0097】

語句「エピトープ結合性タンパク質」には、少なくとも1つのC D Rを有し、エピトープを選択的に認識することが可能な、例えばエピトープに約1マイクロモル以下の K_D （例えば、約 $1 \times 10^{-6} M$ 、 $1 \times 10^{-7} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $1 \times 10^{-10} M$ 、 $1 \times 10^{-11} M$ または約 $1 \times 10^{-12} M$ の K_D ）で結合することが可能であるタンパク質が含まれる。治療的なエピトープ結合性タンパク質（例えば、治療的な抗体）は、ナノモルまたはピコモルの範囲の K_D をしばしば必要とする。

30

【0098】

語句「機能的断片」には、発現、分泌させることができ、マイクロモル、ナノモルまたはピコモルの範囲の K_D でエピトープに特異的に結合するエピトープ結合性タンパク質の断片が含まれる。特異的な認識には、少なくともマイクロモルの範囲、ナノモルの範囲またはピコモルの範囲の K_D を有することが含まれる。

【0099】

用語「生殖系列」には、非体細胞変異細胞、例えば非体細胞変異B細胞またはプレB細胞または造血細胞中の免疫グロブリン核酸配列への言及が含まれる。

40

【0100】

語句「重鎖」または「免疫グロブリン重鎖」には、任意の生物体からの免疫グロブリン重鎖定常領域配列が含まれる。特に明記しない限り、重鎖可変ドメインには3つの重鎖C D Rおよび4つのF R領域が含まれる。重鎖の断片には、C D R、C D RおよびF R、ならびにその組合せが含まれる。一般的な重鎖は、可変ドメインに続いて（N末端からC末端に向かって） C_H1 ドメイン、ヒンジ、 C_H2 ドメインおよび C_H3 ドメインを有する。重鎖の機能的断片には、エピトープを特異的に認識する（例えば、マイクロモル、ナノモルまたはピコモルの範囲の K_D でエピトープを認識する）ことが可能で、細胞から発現および分泌させることが可能で、少なくとも1つのC D Rを含む断片が含まれる。

【0101】

50

配列に関連して用いられる場合、用語「同一性」には、ヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列の同一性を測定するために用いることができる当技術分野で公知であるいくつかの異なるアルゴリズムで決定される同一性が含まれる。本明細書に記載される一部の実施形態では、同一性は、10.0のオープンギャップペナルティ、0.1のエクステンデッドギャップペナルティを使用するClustalW v. 1.83 (スロー) アラインメントを用い、およびGonnetの類似度マトリックス (MacVectorTM 10.0.2、MacVector Inc.、2008) を用いて決定される。配列の同一性に関して比較される配列の全長は特定の配列に依存するが、軽鎖定常ドメインの場合、全長は、自己会合して正規の軽鎖定常ドメインを形成することが可能な、例えばベータストランドを含む2つのβシートを形成することが可能であり、およびヒトまたはマウスの少なくとも1つのC_H1ドメインと相互作用することが可能な軽鎖定常ドメインに折り畳まれるのに十分な長さの配列を含むべきである。C_H1ドメインの場合、配列の全長は、ベータストランドを含む2つのβシートを形成することが可能であり、およびマウスまたはヒトの少なくとも1つの軽鎖定常ドメインと相互作用することが可能なC_H1ドメインに折り畳まれるのに十分な長さの配列を含むべきである。

10

【0102】

語句「免疫グロブリン分子」には、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖が含まれる。重鎖は同一であっても異なってもよく、軽鎖は同一であっても異なってもよい。

【0103】

語句「軽鎖」には、任意の生物体からの免疫グロブリン軽鎖配列が含まれ、特に明記しない限りヒトκおよびλ軽鎖およびVpreB、ならびに代わりの軽鎖が含まれる。特に明記しない限り、軽鎖可変 (V_L) ドメインには3つの軽鎖CDRおよび4つのフレームワーク (FR) 領域が一般に含まれる。一般に、完全長軽鎖には、アミノ末端からカルボキシル末端にかけて、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を含むV_Lドメインおよび軽鎖定常ドメインが含まれる。軽鎖には、例えば、軽鎖が現れるエピトープ結合性タンパク質が選択的に結合する第一または第二のエピトープのいずれにも選択的に結合しないものが含まれる。軽鎖には、軽鎖が現れるエピトープ結合性タンパク質が選択的に結合する1つまたは複数のエピトープに結合し認識するものか、重鎖による結合および認識を助けるものがさらに含まれる。

20

30

【0104】

ユニバーサル軽鎖 (すなわち、共通軽鎖) は本明細書に記載のマウスで作製された軽鎖をいい、該マウスは軽鎖可変ドメインの作製に利用可能な遺伝子セグメントの選択において高度に制限されている。結果として、かかるマウスは、1つの実施形態では、1つまたは2つ以下の再構成されていない軽鎖Vセグメントおよび1つまたは2つ以下の再構成されていない軽鎖Jセグメント (例えば、1つのVおよび1つのJ、2つのVおよび1つのJ、1つのVおよび2つのJ、2つのVおよび2つのJ) に由来する軽鎖を作製する。一実施形態では、1つまたは2つ以下の再構成された軽鎖V/J配列 (例えば、再構成されたヒトVκ1-39Jκ5配列または再構成されたヒトVκ3-20Jκ1配列)。様々な実施形態において、ユニバーサル軽鎖には、体細胞変異 (例えば、親和性成熟) バージョンが含まれる。

40

【0105】

語句「体細胞変異」には、クラススイッチングを経たB細胞からの核酸配列への言及が含まれ、ここで、クラススイッチングされたB細胞での免疫グロブリン可変領域の核酸配列 (例えば、重鎖可変ドメインまたは重鎖CDRもしくはFR配列を含む) は、クラススイッチングの前のB細胞の核酸配列に同一でなく、例えば、クラススイッチングを経ないB細胞とクラススイッチングを経たB細胞との間のCDRまたはフレームワーク核酸配列において差がある。「体細胞変異」には、親和性成熟していないB細胞での対応する免疫グロブリン可変領域配列 (すなわち、生殖系列細胞のゲノム中の配列) に同一ではない親和性成熟B細胞からの核酸配列への言及が含まれる。語句「体細胞変異」には、目的

50

のエピトープへのB細胞の曝露の後のB細胞からの免疫グロブリン可変領域核酸配列への言及も含まれ、ここで、核酸配列は、目的のエピトープへのB細胞の曝露の前の対応する核酸配列と異なる。語句「体細胞変異」は、免疫原チャレンジに応じて動物で、例えばヒト免疫グロブリン可変領域核酸配列を有するマウスで生成される、そのような動物で生得的に作動する選択プロセスから生じる抗体からの配列を指す。

【0106】

核酸配列に関して用語「再構成されていない」には、動物細胞の生殖系列に存在する核酸配列が含まれる。

【0107】

語句「可変ドメイン」には、N末端からC末端（特に明記しない限り）の順序での以下のアミノ酸領域を含む免疫グロブリン軽鎖または重鎖（所望により改変される）のアミノ酸配列が含まれる：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0108】

ヒト化された免疫グロブリン遺伝子座を有するマウス

遺伝モデルとしてのマウスは、トランスジェニックおよびノックアウト技術によって大きく向上され、これらの技術により特定の遺伝子の指向性過発現または欠失の効果の研究が可能になった。あらゆるその利点にもかかわらず、前記マウスは、マウスをヒト疾患についての不完全なモデルにならしめるおよびヒト治療薬を試験するまたはそれらを作製するための不完全なプラットフォームにならしめる遺伝的障害をやはり提示する。第一に、ヒト遺伝子の約99%はマウスホモログを有する（Waterston, R. H. ら（2002）Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, Nature. 420, 520-562）が、可能性のある治療薬は、多くの場合、所期のヒト標的のマウスオルソログと交叉反応することができない、または不適切に交叉反応する。この問題を未然に防ぐために、選択標的遺伝子を「ヒト化」することができる、すなわち、マウス遺伝子を消去して、対応するオルソログヒト遺伝子配列により置換することができる（例えば、米国特許第6,586,251号、同第6,596,541号および同第7,105,348号明細書；これらは参照により本明細書に援用されている）。最初、「ノックアウト・プラス・トランスジェニックヒト化（knockout-plus-transgenic humanization）」戦略によりマウス遺伝子をヒト化する努力は、前記内因性遺伝子の欠失（すなわち、ノックアウト）を保有するマウスとランダムに組み込まれたヒト導入遺伝子を保有するマウスとの交配を必要とした（例えば、Bril, W. S. ら（2006）Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution, Thromb Haemost 95, 341-347；Homani, G. E. ら（2006）Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease. BMC Med Genet 7, 33；Jamsai, D. ら（2006）A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/beta-thalassemia. Genomics 88(3): 309-15；Pan, Q. ら（2006）Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gammadelta-deficient mice. Mol Immunol 43, 1741-1750参照）。しかし、これらの努力は、サイズ制限によって妨げられた；従来のノックアウト技術は、大きなマウス遺伝子を

10

20

30

40

50

該遺伝子の大きなヒトゲノムカウンターパートで直接置換するのに十分なものではなかった。該マウス遺伝子の同じまさにその遺伝子の場所で（すなわち内因性マウス遺伝子座で）ヒトカウンターパート遺伝子により内因性マウス遺伝子を直接置換する直接相同置換の直接的なアプローチは、技術的な難しさのため、滅多に試みられない。今まで、直接置換に対する努力は手の込んだ厄介な手順を必要とし、それ故、取り扱うことができる遺伝子材料の長さおよび操作することができる精度が限定された。

【0109】

外因的に導入されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、マウスの前駆体B細胞内で再構成する (Alt, ら、F. W., Blackwell, T. K., および Yancopoulos, G. D. (1985). Immunoglobulin genes in transgenic mice, Trends Genet 1:231-236)。この発見は、ヒト抗体を発現させるためにノックアウト・プラス・トランスジェニックアプローチを用いるマウスの工学的作製に活用された (Green, L. L. ら (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. Nat Genet 7, 13-21; Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. Nat Biotechnol 23, 1117-1125; Lonberg, N. ら (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. Nature 368, 856-859; Jakobovits, A. ら (2007). From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. Nat Biotechnol 25, 1134-1143。内因性のマウス免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座は、これらのマウスにおいて、各内因性遺伝子座の小さいが重大な部分の標的欠失、続いて、上に記載したようなランダムに組み込まれた大きな導入遺伝子としての、またはミニ染色体としてのヒト免疫グロブリン遺伝子遺伝子座の導入により不活性化された (Tomizuka, K. ら (2000) Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies, Proc Natl Acad Sci U S A 97, 722-727)。かかるマウスは、遺伝子工学の重要な前進を象徴した；それらから単離された完全ヒトモノクローナル抗体は、様々なヒト疾患の処置に有望な治療的可能性をもたらした (Gibson, T. B. ら (2006) Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer 6, 29-31; Jakobovits ら、2007; Kim, Y. H. ら (2007) Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two Phase II studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma, Blood 109 (11):4655-62; Lonberg, 2005; Maker, A. V. ら (2005) Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phas

e I/I II study. *Ann Surg Oncol* 12:1005-1016; McClung, M. R. ら (2006) Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density, *N Engl J Med* 354、821-831)。しかし、上で論じたように、これらのマウスは、野生型マウスと比較して、損なわれたB細胞発生および免疫不全を示す。かかる問題は、活発な体液性応答を維持するおよびしたがって一部の抗原に対する完全ヒト抗体を産生するマウスの能力を潜在的に制限する。前記不全は、(1)ヒト免疫グロブリン導入遺伝子のランダムな導入に起因する不十分な機能性、ならびに上流および下流制御要素の欠如に起因する結果としての不正確な発現 (Garrett, F. E. ら (2005) Chromatin architecture near a potential 3' end of the IgH locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25、1511-1525; Manis, J. P. ら (2003) Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region. *Mol Immunol* 39、753-760; Pawlitzky, I. ら (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse IgH locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU. 1, Pax5, and E2A. *J Immunol* 176、6839-6851) ; (2) B細胞の正常な成熟、増殖および生存に要求されるシグナル伝達過程を害し得る、ヒト定常ドメインと細胞表面のB細胞受容体シグナル伝達複体のマウス要素の間の非効率的種間相互作用 (Hombach, J. ら (1990) Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature*, 343:760-762) ; および (3) 親和性選択 (Rao, S. P. ら (2002). Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells. *J Immunol* 169、1859-1868) および免疫グロブリン血清濃度 (Brambell, F. W. ら (1964). A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature*, 203:1352-1354; Junghans, R. P. and Anderson, C. L. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the β2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93、5512-5516; Rao ら、2002; Hjelm, F. ら (2006). Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand J Immunol* 64、177-184; Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity, *Adv Immunol* 96、179-204) を低減させ得る、可溶性ヒト免疫グロブリンとマウスFc受容体の間の非効率的種間相互作用に起因し得る。これらの不全は、内因性重および軽鎖遺伝子座におけるその天然の場所の中のマウス免疫グロブリン遺伝子座の可変領域のみの *in situ* ヒト化によって修正することができる。これは、マウス定常領域の保持に基づきマウス環境で正常な相互作用および選択が可能

であろう「逆キメラ」（すなわち、ヒトV：マウスC）抗体を作製するマウスを有効に生じさせる結果となるであろう。さらに、かかる逆キメラ抗体は、治療のために完全ヒト抗体に容易に再構成される。

【0110】

子孫をもたらすマウスの能力を維持しながら、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン可変遺伝子でマウス生殖細胞系免疫グロブリン可変遺伝子の大規模に *in situ* 遺伝子置換するための方法を記載する。具体的には、前記マウス定常領域をインタクトで残しながら、6メガ塩基のマウス重鎖およびκ軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子遺伝子座両方を該遺伝子のヒトカウンターパートでの正確に置換することを記載する。結果として、マウス定常領域を維持しながら、マウスの生殖細胞系免疫グロブリン可変レパートリーすべてが等価のヒト生殖細胞系免疫グロブリン可変配列で正確に置換されたマウスを生み出した。前記ヒト可変領域をマウス定常領域に連結させて、再構成して生理的に適切なレベルで発現するキメラヒト-マウス免疫グロブリン遺伝子座を形成する。発現する抗体は、「逆キメラ」である。すなわち、それらはヒト可変領域配列およびマウス定常領域配列を含む。ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する抗体を発現するヒト化免疫グロブリン可変領域を有するこれらのマウスは、VELCOIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスと呼ばれる。

【0111】

VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、野生型マウスのものと本質的に区別できない完全機能的体液性免疫系を示す。前記ヒト化マウスは、B細胞発生の全ての段階で正常な細胞集団を提示する。前記ヒト化マウスは、正常なリンパ器官形態を示す。VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスの抗体配列は、正常な可変セグメント再構成および正常な体細胞超変異を示す。これらのマウスにおける抗体集団は、正常なクラススイッチ（例えば、正常なアイソタイプスイッチ）の結果として生ずるアイソタイプ分布を表わす。VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスを免疫することにより、治療候補として好適なヒト免疫グロブリン可変ドメインを有する抗体の大きな多様性を産生する頑強な体液性応答が得られる。このプラットフォームは、薬学的に許容され得る抗体および他の抗原結合タンパク質を作製するための豊富な親和性成熟ヒト免疫グロブリン可変領域配列源を提供する。

【0112】

マウス免疫グロブリン可変配列の、ヒト免疫グロブリン可変配列での正確な置換により、VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスを作製することができる。とはいえ、非常に大きな長さのヒト免疫グロブリン配列の逐次的リコンビニアリング（*sequential recombineering*）による、重および軽鎖遺伝子座における内因性マウス免疫グロブリン配列の、等価ヒト免疫グロブリン配列での正確な置換は、マウスとヒトの間の免疫グロブリン遺伝子座の分岐進化のため、一定の課題を提起し得る。例えば、免疫グロブリン遺伝子座内に散在する遺伝子間配列は、マウスとヒトの間で同一ではなく、一部の状況では、機能的に等価でないこともある。マウスとヒトの間の免疫グロブリン遺伝子座におけるその相違は、特に内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の一定の部分をヒト化または操作するとき、やはりヒト化マウスに異常を生じさせる結果となる場合がある。マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座における一部の改変は有害である。有害な改変としては、例えば、改変されたマウスの交配および子孫産生能力の喪失を挙げることができる。

【0113】

すべてのマウス定常鎖遺伝子および遺伝子座転写制御領域を含むハイブリッド遺伝子座内の隣接マウス配列をインタクトなままおよび機能的なまま、マウス重および軽鎖免疫グロブリン遺伝子座（ $V_H-D_H-J_H$ および $V_\kappa-J_\kappa$ ）の6メガ塩基可変領域の、対応する1.4メガ塩基ヒトゲノム配列での正確な大規模 *in situ* 置換を行った（図1）。具体的には、VELOCI GENE（登録商標）遺伝子工学技術（例えば、米国特許第6,586,251号明細書およびValenzuela, D. M. ら（2003）. *High-throughput engineering of the mouse*

genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat Biotechnol 21、652-659 参照)を用いて、ヒト V_H 、 D_H 、 J_H 、 V_K および J_K 遺伝子配列を、ヒト生殖細胞系可変遺伝子座のオーバーラップ断片を担持する13のキメラBACターゲティングベクターの段階的挿入により、マウスES細胞に導入した。

【0114】

マウス免疫グロブリン遺伝子のヒト化は、今日までのマウスゲノムへの最大の遺伝子改変を代表する。ランダムに組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子での以前の努力は、(上で論じた)ある程度の成果を上げたが、前記マウス免疫グロブリン遺伝子の、該遺伝子のヒトカウンターパートでの直接置換は、ほかの点では正常なマウスにおいて完全ヒト抗体を効率的に産生することができる効率を劇的に増加させる。さらに、かかるマウスは、無能化された内因性遺伝子座および完全ヒト抗体導入遺伝子を保有するマウスと比較して、実質的に任意の抗原での免疫後に得ることができる完全ヒト抗体の多様性の劇的増大を示す。様々な分化段階で有意に低減されたB細胞集団を示すランダムに組み込まれたヒト導入遺伝子を有するマウスとは対照的に、置換されヒト化された遺伝子座の多彩なバージョンが完全に正常な成熟および未熟B細胞レベルを示す。ヒト遺伝子導入マウスにおけるヒト遺伝子セグメント数を増加させる努力は、かかる欠陥を低減させたが、拡張されたそれらの免疫グロブリンレパートリーは、野生型マウスと比較してB細胞集団の低減を全部は修正しなかった。

【0115】

免疫グロブリン遺伝子座が置換されたマウスにおいて観察される野生型に近い体液性免疫機能にもかかわらず、ランダムに組み込まれた導入遺伝子を利用する一部のアプローチでは遭遇しない、免疫グロブリンの直接置換を利用すると遭遇する他の課題がある。マウスとヒトの間の免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子組成の相違は、免疫グロブリン遺伝子セグメントが置換されたマウスの繁殖にとって有益な配列の発見をもたらした。具体的には、前記内因性免疫グロブリン遺伝子座内にあるマウスADAM遺伝子は、妊性におけるその役割のため、免疫グロブリン遺伝子座が置換されたマウスに最適に存在する。

【0116】

マウスADAM6のゲノムの場所および機能

いずれかの機能的ADAM6タンパク質を発現する能力が無い雄マウスは、交配して子孫をもたらす該マウスの能力の重大な欠陥を示す。これらのマウスには、すべてのまたは実質的にすべてのマウス免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントをヒト可変領域遺伝子セグメントで置換することによって機能的ADAM6タンパク質を発現する能力が無い。ADAM6遺伝子座が、 D_H 遺伝子セグメントの上流にある V_H 遺伝子セグメント遺伝子座の3'端の近位の、前記内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子遺伝子座の領域内にあるため、このADAM6機能の喪失が生ずる結果となる。すべてのまたは実質的にすべての内因性マウス重鎖可変遺伝子セグメントの、ヒト重鎖可変遺伝子セグメントでの置換に関してホモ接合性であるマウスを交配させるために、それぞれが該置換に関してホモ接合性であり、生産的交配を待つ雄と雌を供給することは、一般に厄介なアプローチである。好結果の同腹子は、比較的まれであり、同腹仔の平均サイズが非常に小さい。その代り、前記置換に関してヘテロ接合性の雄を用いて、前記置換に関してホモ接合性の雌と交配させて、前記置換に対してヘテロ接合性の後代をもたらし、その後、それらからホモ接合型マウスを繁殖させた。前記雄マウスの妊性の喪失についての可能性のある原因は、ホモ接合型雄マウスにおける機能的ADAM6タンパク質の不在であると本発明者らは決定した。

【0117】

前記ADAM6タンパク質は、タンパク質のADAMファミリーのメンバーであり、ADAMは、A Disintegrin And Metalloprotease (ディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ)の頭文字である。タンパク質のADAMファミリーは、大きく、多様であり、多様な機能を有する。ADAMファミリーの一部のメ

ンバーは、精子形成および受精に関与する。例えば、A D A M 2 は、精子－卵子相互作用に関与するタンパク質ファーターリンのサブユニットをコードする。A D A M 3、すなわちシリテスティンは、透明帯への精子の結合に必要であるようである。A D A M 2 または A D A M 3 いずれかの不在は不妊性を生じさせる結果となる。A D A M 2、A D A M 3 および A D A M 6 は、マウス精子細胞の表面で複合体を形成すると仮定されている。

【0118】

ヒト V_H 遺伝子セグメント $V_H 1-2$ と $V_H 6-1$ の間で通常見出されるヒト A D A M 6 遺伝子は、偽遺伝子であるようである（図 12）。マウスには 2 つの A D A M 6 遺伝子－A D A M 6 a および A D A M 6 b－があり、これらは、マウス V_H 遺伝子セグメントと D_H 遺伝子セグメントの間の遺伝子間領域において見つけられ、前記マウスにおいて、a 10 遺伝子および b 遺伝子は、周囲の免疫グロブリン遺伝子セグメントの転写配向とは反対の転写配向に配向する（図 11）。マウスの場合、正常な受精には機能的 A D A M 6 遺伝子座が明らかに要求される。そこで、機能的 A D A M 6 遺伝子座または配列は、内因性 A D A M 6 遺伝子座が欠けているまたは損傷を受けた内因性 A D A M 6 遺伝子座を有する雄マウスにおいて示される受精の徹底的低減を補うまたはレスキューすることができる、A D A M 6 遺伝子座または配列を指す。

【0119】

A D A M 6 a および A D A M 6 b をコードする、マウスにおける前記遺伝子間配列の位置が、内因性マウス重鎖を改変するとき該遺伝子間配列に改変を受けやすくさせる。 V_H 10 遺伝子セグメントを欠失させるもしくは置換するとき、または D_H 遺伝子セグメントを欠失させるもしくは置換するとき、結果として得られるマウスは重度の妊性欠損を示す確率が高い。この欠損を補償するために、内因性マウス A D A M 6 遺伝子座の改変に起因する A D A M 6 活性の喪失を補うタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むようにマウスを改変する。様々な実施形態において、補足性ヌクレオチド配列は、妊性欠損をレスキューするマウス A D A M 6 a、マウス A D A M 6 b、またはそのホモログもしくはオルソ 20 ログもしくは機能的断片をコードするものである。

【0120】

妊性をレスキューする前記ヌクレオチド配列を任意の好適な位置に配置することができる。前記配列を前記遺伝子間領域に配置することができ、またはゲノム内の任意の好適な位置に（すなわち、異所的に）配置することができる。1 つの実施形態では、前記ヌクレ 30 オチド配列を、マウスゲノムにランダムに組み込む導入遺伝子に導入することができる。1 つの実施形態では、前記配列をエピソームで、すなわちマウス染色体上ではなく別々の核酸上で、維持することができる。好適な位置としては、転写許容性または活性である位置、例えば、R O S A 2 6 遺伝子座が挙げられる。

【0121】

用語「異所性」は、自然界で通常は遭遇しない位置への転位または配置（例えば、核酸配列の、該核酸配列が野生型マウスにおいて見出されるのと同じ位置でない位置への配置）を含むことを意図したものである。様々な実施形態において、この用語は、その対象がその正常なまたは正しい位置外にあるという意味で用いられる。例えば、「... をコードする異所性ヌクレオチド配列」という句は、マウスでは通常遭遇しない位置に出現する 40 ヌクレオチド配列を指す。例えば、マウス A D A M 6 タンパク質（または雄マウスに対して同じまたは同様の妊性の恩恵をもたらすそのオルソログもしくはホモログもしくは断片）をコードする異所性ヌクレオチド配列の場合、該配列は、野生型マウスにおいて通常見出される位置とは異なるマウスのゲノム内の位置に配置されることがある。マウス A D A M 6 の機能的ホモログまたはオルソログは、A D A M 6 - / - マウスにおいて観察される妊性喪失（例えば、交配により子孫をもたらす雄マウスの能力の喪失）のレスキューをもたらす配列である。機能的ホモログまたはオルソログは、A D A M 6 a のアミノ酸配列に対しておよび / または A D A M 6 b のアミノ酸配列に対して少なくとも約 89 % 以上の同一性、例えば 99 % 以下の同一性を有するタンパク質、ならびに A D A M 6 a および / または A D A M 6 b の欠失またはノックアウトを含む遺伝子型を有するマウスの首尾よく交 50

配する能力を補うまたはレスキューすることができるタンパク質を含む。

【0122】

前記異所位置は、（例えば、マウスADAM6配列を含有する導入遺伝子のランダム挿入の場合のように）どこでもよく、または例えば、野生型マウスにおける（例えば、改変内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座内だがその天然の位置の上流または下流のいずれか、例えば、改変免疫グロブリン遺伝子座内だが、異なる遺伝子セグメント間、またはマウスV-D遺伝子間配列内の異なる位置における）その場所に近い（しかし、正確に同じではない）位置であってもよい。異所性配置の一例は、ヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座内への配置である。例えば、1つもしくは複数の内因性V_H遺伝子セグメントの、ヒトV_H遺伝子セグメントでの置換であって、内因性ADAM6配列を除去する置換を含むマウスを、マウスADAM6配列がヒトV_H遺伝子セグメントを含有する配列内に配置されるように操作して作製することができる。結果として得られる改変は、ヒト遺伝子配列内に（異所性）マウスADAM6配列を生じさせることとなり、このヒト遺伝子配列内へのマウスADAM6配列の（異所性）配置は、ヒトADAM6偽遺伝子の位置（すなわち、2つのVセグメント間）に近い場合もあり、またはマウスADAM6配列の位置（すなわち、V-D遺伝子間領域内）に近い場合もある。

10

【0123】

様々な態様において、マウスADAM6（例えば、雄マウスにおいて機能するそのオルソログまたはホモログまたは断片）に同様の妊性の恩恵をもたらすタンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列を含有する、内因性重鎖可変領域遺伝子座またはその部分の欠失または置換を含むマウスを作製することができる。前記異所性ヌクレオチド配列としては、異なるマウス系統または異なる種、例えば異なる齧歯動物種、のADAM6ホモログまたはオルソログ（またはその断片）であるタンパク質をコードするヌクレオチド配列であって、妊性の恩恵、例えば、指定された期間にわたっての同腹子数の増加、および／または同腹子あたりの子の数の増加、および／またはマウス卵管を通り抜けてマウス卵子を受精させる雄マウスの精子細胞の能力、を付与するヌクレオチド配列が挙げられる。

20

【0124】

1つの実施形態において、前記ADAM6は、マウスADAM6タンパク質と少なくとも89%から99%同一である（例えば、マウスADAM6aまたはマウスADAM6bと少なくとも89%から99%同一である）ホモログまたはオルソログである。1つの実施形態において、前記異所性ヌクレオチド配列は、マウスADAM6aと少なくとも89%同一のタンパク質、マウスADAM6bと少なくとも89%同一のタンパク質、およびその組み合わせから独立して選択される1つもしくは複数のタンパク質をコードする。1つの実施形態において、前記ホモログまたはオルソログは、マウスADAM6aおよび／またはマウスADAM6bと同一であるまたはマウスADAM6aおよび／またはマウスADAM6bと約89%以上同一であるように改変されているラット、ハムスター、マウス、またはモルモットのタンパク質である。1つの実施形態において、前記ホモログまたはオルソログは、マウスADAM6aおよび／またはマウスADAM6bと90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

30

40

【0125】

ヒト化重鎖マウスにおける異所性ADAM6

ヒト抗体を作るマウスは、ここしばらくの間に利用可能になった。これらのマウスは、ヒト治療用抗体の開発の重要な前進の代表であるが、その有用性を制限する多数の重大な異常を提示する。例えば、これらのマウスは、損なわれたB細胞発生を提示する。この損なわれた発生は、トランスジェニックマウスと野生型マウスの間の様々な相違に起因し得る。

【0126】

ヒト抗体は、成熟、増殖、またはクローン選択中の生存についてのシグナルを伝達するマウス細胞の表面のマウスプレB細胞受容体またはB細胞受容体と最適に相互作用しない

50

可能性がある。完全ヒト抗体は、マウス F c 受容体系と最適に相互作用しない可能性があるし、マウスは、ヒト F c 受容体との 1 対 1 の対応を提示しない F c 受容体を発現する。結局、完全ヒト抗体を作る様々なマウスは、野生型 B 細胞発生に要求され得るすべての真正マウス配列を含まない、例えば、下流エンハンサー要素および他の遺伝子座制御要素を含まない。

【0127】

完全ヒト抗体を作製するマウスは、何らかの形で無能化されている内因性免疫グロブリン遺伝子座を一般に含み、可変および定常免疫グロブリン遺伝子セグメントを含むヒト導入遺伝子が、そのマウスゲノム内のランダムな場所に導入される。内因性遺伝子座が、機能的免疫グロブリン遺伝子を形成するように遺伝子セグメントを再構成できないほど無能化されている限り、たとえば B 細胞発生が損なわれていたとしても、かかるマウスにおいて完全ヒト抗体を作製するという目的を達成することができる。

【0128】

ヒト導入遺伝子遺伝子座から完全ヒト抗体を作製せざるを得ないのだが、マウスにおけるヒト抗体の産生は、好ましくない過程であるようである。一部のマウスでは、この過程は、トランススイッチの機序によりキメラヒト可変／マウス定常重鎖（軽鎖ではなく）が形成される結果をもたらすには好ましいものではない。この機序により、完全ヒト抗体をコードする転写産物は、ヒトアイソタイプからマウスアイソタイプへとトランスでアイソタイプスイッチされる。完全ヒト導入遺伝子は、マウス重鎖定常領域遺伝子の非損傷コピーを保持する内因性遺伝子座から離れた場所にあるため、この過程はトランスでの過程となる。かかるマウスではトランススイッチが容易に分かるが、この現象は B 細胞発生のレスキューにやはり不十分であり、B 細胞発生は明らかに害されたままである。いずれにせよ、トランススイッチ現象は軽鎖に関して起こらないので、かかるマウスにおいてトランススイッチされた抗体は、完全ヒト軽鎖を保持する；おそらく、トランススイッチは、シスでの正常なアイソタイプスイッチに（それとは異なるにせよ）用いられる内因性遺伝子座におけるスイッチ配列に依存する。したがって、完全ヒト抗体を作製するように操作されて作製されたマウスが、マウス定常領域を有する抗体を作製するためにトランススイッチ機序を選択する場合であっても、その戦略は、正常 B 細胞発生のレスキューにやはり不十分である。

【0129】

抗体ベースのヒト治療薬の作製における主な関心事は、特定のエピトープを特異的に認識し、望ましい親和性で、通常は一常にはないが一高い親和性で、そのエピトープを結合する有用な可変ドメインを同定するために十分多様なヒト免疫グロブリン可変領域配列を作製することである。VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスの開発前は、マウス定常領域と共にヒト可変領域を発現するマウスが、導入遺伝子からヒト抗体を作製するマウスとの何らかの有意差を示すことになるという指摘はなかった。しかし、その仮定は間違っていた。

【0130】

内因性マウス遺伝子座におけるヒト免疫グロブリン可変領域でのマウス免疫グロブリン可変領域の正確な置換を含有するVELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、B 細胞発生に関して野生型マウスとの驚くべき、また注目すべき類似性を提示する。驚くべき、また実にすばらしい発生の点で、VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、免疫に応答して産生される可変領域が完全ヒトのものであるという 1 つの重要な点のみが野生型マウスと異なる、本質的に正常な野生型応答を免疫に対して提示した。

【0131】

VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、内因性遺伝子座におけるマウス免疫グロブリン重鎖（IgH）および免疫グロブリン軽鎖（例えば、κ 軽鎖、Igκ）の生殖細胞系可変領域の、対応するヒト免疫グロブリン可変領域での正確な大規模置換を含有する。合計で約 6 メガ塩基のマウス遺伝子座が約 1.4 メガ塩基のヒトゲノム配列で置換される。この正確な置換により、結果として、ヒト可変領域とマウス定常領域を有する

重および軽鎖を作製するハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスが得られる。マウス $V_H - D_H - J_H$ および $V_K - J_K$ セグメントの正確な置換は、隣接するマウス配列をインタクトなままおよび機能的なままハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座に残す。前記マウスの体液性免疫系は、野生型マウスのものと同様に機能する。B細胞発生はいずれの重要な点でも妨害されず、抗原チャレンジすると前記マウスにおいて多様性に富んだヒト可変領域が産生される。

【0132】

VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、重およびκ軽鎖についての免疫グロブリン遺伝子セグメントがヒトおよびマウスにおいて同様に再構成するので実現可能であるのだが、その遺伝子座は同じまたはほぼ同じであるというわけではない——明らかにそれらはそうではない。しかし、その遺伝子座は、すべての V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントを含有する約300万塩基対の連続するマウス配列を、ヒト免疫グロブリン遺伝子座からの等価の配列を基本的にかバーする約100万塩基の連続するヒトゲノム配列で置換することによって重鎖可変遺伝子座のヒト化を達成することができるほどに類似する。

【0133】

一部の実施形態では、一定のマウス定常領域遺伝子配列の、ヒト遺伝子配列でのさらなる置換（例えば、マウス $C_H 1$ 配列の、ヒト $C_H 1$ での置換、およびマウス C_L 配列の、ヒト C_L 配列での置換）により、結果として、例えば完全ヒト抗体断片、例えば完全ヒト Fab の作製に好適な、ヒト可変領域および部分ヒト定常領域を有する抗体を作製するハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスが得られる。ハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスは、正常な可変遺伝子セグメント再構成、正常な体細胞超変異および正常なクラススイッチを示す。これらのマウスは、野生型マウスと区別できない体液性免疫系を示し、および、マウスにヒト可変領域遺伝子セグメントの完全レパートリーが無い場合でさえ、正常な細胞集団をすべてのB細胞発生段階で提示し、正常なリンパ器官構造を提示する。これらのマウスの免疫は、可変遺伝子セグメント使用量の広範な多様性を提示する頑強な体液性応答を生じさせる結果となる。

【0134】

マウス生殖細胞系可変領域遺伝子セグメントの正確な置換により、部分ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスの作製が可能になる。部分ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再構成し、超変異し、正常にクラススイッチするため、ヒト可変領域を含むマウスでは部分ヒト免疫グロブリン遺伝子座により抗体が産生される。その可変領域をコードするヌクレオチド配列を同定し、クローニングして、選ばれた任意の配列、例えば、特定の用途に好適な任意の免疫グロブリンアイソタイプと（例えば *in vitro* 系において）融合させ、その結果、全部がヒト配列に由来する抗体または抗原結合タンパク質を得ることができる。

【0135】

リコンビニアリング法による大規模ヒト化を用いてマウス胚性幹（ES）細胞を改変して、マウス V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントの本質的にすべてを含む3メガ塩基以下のマウス重鎖免疫グロブリン遺伝子座を、いくつかのまたは本質的にすべてのヒト V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントを含有する1メガ塩基以下のヒトゲノム配列を有する等価のヒト遺伝子セグメントで正確に置換した。本質的にすべてのヒト V_K および J_K 遺伝子セグメントをコードする2つのリピートの一方を含むヒトゲノムの0.5メガ塩基以下のセグメントを使用して、マウス V_K および J_K 遺伝子セグメントの本質的にすべてを含有するマウス免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子座の3メガ塩基セグメントを置換した。

【0136】

かかる置換免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスは、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の最も3'側の V_H 遺伝子セグメントと最も5'側の D_H 遺伝子セグメントの間で通常は見出される内因性マウス ADAM6 遺伝子座の破壊または欠失を含み得る。この領域の破壊は、内因性マウス ADAM6 遺伝子座の機能性の低減または消去をもたらし得る。

ヒト重鎖レパートリーの最も3'側の V_H 遺伝子セグメントを置換に使用すると、ヒトADAM6偽遺伝子であるように見える偽遺伝子を含有する遺伝子間領域がこれらの V_H 遺伝子セグメント間、すなわち、ヒト V_H 1-2と V_H 1-6の間に存在する。しかし、このヒト遺伝子間配列を含む雄マウスは、妊性をほとんど示さないかまたは妊性がない。

【0137】

上記の置換遺伝子座を含み、マウスADAM6をコードする異所性核酸配列も含むマウスであって、本質的に正常な妊性を示すマウスを記載する。1つの実施形態において、前記異所性核酸配列は、改変内因性マウス重鎖遺伝子座のヒト V_H 1-2と V_H 6-1との間に配置された配列番号3である。配列番号3のADAM6遺伝子の転写方向は、周囲のヒト V_H 遺伝子セグメントの転写の方向に対して逆である。本明細書における例は、示されるヒト V_H 遺伝子セグメント間に異所性配列を配置することによる妊性のレスキューを示すが、マウスゲノム内の任意の好適な転写許容遺伝子座への（またはさらには染色体外への）異所性配列の配置が雄マウスの妊性を同様にレスキューすると予想されることは、当業者であれば認める。

【0138】

マウスADAM6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む異所性配列を有する機能的ADAM6遺伝子座を欠いているマウスを補足する現象は、非機能的なまたは最小機能的な内因性ADAM6遺伝子座を有する任意のマウスのレスキューに適用できる一般的な方法である。それ故、免疫グロブリン重鎖遺伝子座のADAM6破壊改変を含む非常に多数のマウスを本発明の組成物および方法でレスキューすることができる。したがって、本発明は、内因性ADAM6機能を含む免疫グロブリン重鎖遺伝子座の多種多様な改変を有するマウスを含む。一部の（非限定的）例を本明細書に提供する。記載するVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスに加えて、ADAM6に関する組成物および方法を非常に多くの用途に、例えば、重鎖遺伝子座を多種多様な方法で改変するとき用いることができる。

【0139】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片）をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス D_H 遺伝子セグメントおよび J_H 遺伝子セグメントの、ヒト D_H 遺伝子セグメントおよびヒト J_H 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスであって、 C_H 1領域および／またはヒンジ領域が無いマウスを提供する。1つの実施形態において、前記マウスは、（a）ヒト V_H -マウス C_H 1-マウス C_H 2-マウス C_H 3；（b）ヒト V_H -マウスヒンジ-マウス C_H 2-マウス C_H 3；および（c）ヒト V_H -マウス C_H 2-マウス C_H 3から選択される免疫グロブリン鎖の二量体である単一可変ドメイン結合タンパク質を作製する。

【0140】

1つの態様では、全てまたは実質的に全てのマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメント（ mV_H 、 mD_H および mJ_H ）の、1つもしくは複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメント（ hV_H 、 hD_H および hJ_H ）での置換を有するマウスであって、全てまたは実質的に全てのマウス免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメント（ mV_κ 、 mJ_κ ）の、1つもしくは複数のヒト免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメント（ hV_κ および hJ_κ ）での置換をさらに含むマウスにおいて、妊性をレスキューするヌクレオチド配列をヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列内（例えば、ヒト V_H 1-2遺伝子セグメントと V_H 1-6遺伝子セグメントの間）に配置する。一実施形態では、ヌクレオチド配列を、VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおいてヒト V_H 1-2遺伝子セグメントとヒト V_H 1-6遺伝子セグメントとの間に配置する（US6,596,541号およびUS7,105,348号（参照により本明細書に援用されている））。一実施形態では、このようにして改変されたVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、全てまたは実質的に全てのヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメント（全

ての hV_H 、 hD_H 、および hJ_H ）および全てまたは実質的に全てのヒト免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメント（ hV_κ および hJ_κ ）での置換を含む。

【0141】

一態様では、機能的マウス $ADAM6$ 遺伝子座（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片）を、ヒト V_H 遺伝子セグメントの中へ配置し、内因性マウス V_H 遺伝子セグメントを置き換えることができる。一実施形態では、全てまたは実質的に全てのマウス V_H 遺伝子セグメントを除去し、1つもしくは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントで置き換え、マウス $ADAM6$ 遺伝子座をヒト V_H 遺伝子セグメントの3'末端のすぐ隣または2つのヒト V_H 遺伝子セグメントの間に配置する。特定の実施形態では、マウス $ADAM6$ 遺伝子座を、挿入されたヒト V_H 遺伝子セグメントの3'末端付近の2つの V_H 遺伝子セグメントの間に配置する。特定の実施形態では、置換はヒト V_H 遺伝子セグメント V_H1-2 および V_H6-1 を含み、マウス $ADAM6$ 遺伝子座を V_H1-2 遺伝子セグメントの下流および V_H6-1 遺伝子セグメントの上流に配置する。そこで、特定の実施形態において、ヒト V_H 遺伝子セグメントの構成は、以下のものである（ヒト V_H 遺伝子セグメントの転写方向に関して上流から下流に）：ヒト V_H1-2 - マウス $ADAM6$ 遺伝子座 - ヒト V_H6-1 。特定の実施形態では、ヒト V_H1-2 とヒト V_H6-1 間の $ADAM6$ 偽遺伝子をマウス $ADAM6$ 遺伝子座で置換する。1つの実施形態において、転写方向に関して、マウス $ADAM6$ 遺伝子座のマウス $ADAM6a$ およびマウス $ADAM6b$ のうちの1つもしくは複数の配向は、ヒト V_H 遺伝子セグメントについての配向と比較して逆である。あるいは、マウス $ADAM6$ 遺伝子座は、最も3'側のヒト V_H 遺伝子セグメントと最も5'側の D_H 遺伝子セグメントの間の遺伝子間領域に配置され得る。最も5'側の D_H セグメントがマウスであろうと、ヒトであろうと、このとおりであるはずである。

【0142】

同様に、すべてのまたは実質的にすべての内因性マウス V_H 遺伝子セグメントを置換する、前記1つもしくは複数のヒト V_L 遺伝子セグメント（例えば、 V_κ または V_λ セグメント）で改変されるマウスは、上に記載したように、例えばマウス $ADAM6$ 遺伝子座もしくはその機能的断片を含む下流ホモロジーアームを有するターゲティングベクターを利用することにより、内因性マウス $ADAM6$ 遺伝子座を維持するように改変することができる、あるいは2つのヒト V_L 遺伝子セグメント間に、またはヒト V_L 遺伝子セグメントと D_H 遺伝子セグメントとの間（ヒトであろうとマウスであろうと、例えば、 $V_\lambda + m/hD_H$ ）もしくは J 遺伝子セグメントとの間（ヒトであろうとマウスであろうと、例えば、 $V_\kappa + J_H$ ）に位置する異所配列で損傷マウス $ADAM6$ 遺伝子座を置換するように改変することができる。1つの実施形態において、前記置換は、2つ以上のヒト V_L 遺伝子セグメントを含み、および前記マウス $ADAM6$ 遺伝子座またはその機能的断片は、2つの最も3'側の V_L 遺伝子セグメント間に配置される。そこで、特定の実施形態において、ヒト V_L 遺伝子セグメントの構成は、以下のものである（ヒト遺伝子セグメントの転写方向に関して上流から下流に）：ヒト $V_L3'-1$ - マウス $ADAM6$ 遺伝子座 - ヒト V_L3' 。1つの実施形態において、転写方向に関して、マウス $ADAM6$ 遺伝子座のマウス $ADAM6a$ およびマウス $ADAM6b$ のうちの1つもしくは複数の配向は、ヒト V_L 遺伝子セグメントの配向と比較して逆である。あるいは、マウス $ADAM6$ 遺伝子座は、最も3'側のヒト V_L 遺伝子セグメントと最も5'側の D_H 遺伝子セグメントの間の遺伝子間領域に配置され得る。最も5'側の D_H セグメントがマウスであろうと、ヒトであろうとこのとおりであるはずである。

【0143】

1つの態様では、1つもしくは複数の内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの置換を有する、および少なくとも1つの内因性マウス D_H 遺伝子セグメントを含むマウスを提供する。かかるマウスにおいて、前記内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの改変は、最も5'側の D_H 遺伝子セグメントではなく、最も3'側の V_H 遺伝子セグメントの1つもしくは複数についての改変を含み得、この場合、前記1つもしくは複数の最も3'側の V_H 遺伝子

セグメントの改変が、前記内因性マウス A D A M 6 遺伝子座を破壊しないようにまたは非機能的にしないように注意する。例えば、1つの実施形態において、前記マウスは、すべてのまたは実質的にすべての内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換を含み、および前記マウスは、1つもしくは複数の内因性 D_H 遺伝子セグメントおよび機能的内因性マウス A D A M 6 遺伝子座を含む。

【0144】

もう1つの実施形態において、前記マウスは、最も3'側の内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの改変、および1つもしくは複数の内因性マウス D_H 遺伝子セグメントの改変を含み、該改変は、内因性 A D A M 6 遺伝子座が機能的なままである程度まで該内因性マウス A D A M 6 遺伝子座の完全性が維持されるように行う。一例では、かかる改変を二工程で行う：(1) 上流ホモロジーアームと、機能的マウス A D A M 6 遺伝子座のすべてまたは部分を含む下流ホモロジーアームとを有するターゲティングベクターを利用して、最も3'側の内因性マウス V_H 遺伝子セグメントを1つもしくは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントで置換する工程；(2) 次に、マウス A D A M 6 遺伝子座のすべてまたは機能的部分を含む上流ホモロジーアームを有するターゲティングベクターで内因性マウス D_H 遺伝子セグメントを置換する工程。

【0145】

様々な態様において、改変が内因性マウス A D A M 6 の機能を破壊する場合、マウス A D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的ホモログをコードする異所性配列を含有するマウスの利用は有用である。内因性マウス A D A M 6 機能を破壊する確率は、マウス免疫グロブリン遺伝子座への改変を行うとき、特に、マウス免疫グロブリン重鎖可変領域および周囲の配列を改変するときが高い。したがって、かかるマウスは、全部もしくは一部が欠失している、全部もしくは一部がヒト化されている、または全部もしくは一部が（例えば、V_KもしくはV_λ配列で）置換されている免疫グロブリン重鎖遺伝子座を有するマウスを作製するときに特に有益である。下に記載するマウスに対して記載の遺伝子改変を行うための方法は当業者に公知である。

【0146】

マウス A D A M 6 タンパク質をコードする異所性配列またはマウス A D A M 6 タンパク質の妊性の恩恵をもたらす実質的に同一もしくは同様のタンパク質をコードする異所性配列を含有するマウスは、内因性マウス A D A M 6 配列を破壊するかまたは欠失させるマウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座への改変に関連して特に有用である。ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する抗体を発現するマウスに関連して主として記載したが、かかるマウスは、内因性マウス A D A M 6 遺伝子を破壊する任意の遺伝子改変に関連して有用である。これが、マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座の改変を含有する多種多様な遺伝子改変マウスを包含することは、当業者であれば認める。これらには、例えば、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントのすべてまたは一部分の欠失または置換を、他の改変にかかわらず有するマウスが含まれる。非限定的な例を下に記載する。

【0147】

一部の態様では、マウスにおいて機能的な異所性マウス、齧歯動物または他の A D A M 6 遺伝子（またはオルソログもしくはホモログもしくは断片）と1つもしくは複数のヒト免疫グロブリン可変および／または定常領域遺伝子セグメントとを含む遺伝子改変マウスを提供する。

【0148】

1つの態様では、機能的 A D A M 6 タンパク質をコードする異所性 A D A M 6 配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス D_H 遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒト D_H 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス J_H 遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒト J_H 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスを提供する。

【0149】

1つの実施形態において、前記マウスは、マウスC_H1ヌクレオチド配列の、ヒトC_H1ヌクレオチド配列での置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、マウスヒンジヌクレオチド配列の、ヒトヒンジヌクレオチド配列での置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座(V_LおよびJ_L)の、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座での置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域ヌクレオチド配列の、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域ヌクレオチド配列での置換をさらに含む。特定の実施形態において、前記V_L、J_LおよびC_Lは、免疫グロブリンκ軽鎖配列である。特定の実施形態において、前記マウスは、ヒトヒンジおよびヒトC_H1配列と融合したマウスC_H2およびマウスC_H3免疫グロブリン定常領域配列を含むので、該マウス免疫グロブリン遺伝子座が再構成して、(a)ヒト可変領域、ヒトC_H1領域、ヒトヒンジ領域ならびにマウスC_H2およびマウスC_H3領域を有する重鎖と、(b)ヒト可変ドメインおよびヒト定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖をコードする遺伝子とを含む結合タンパク質をコードする遺伝子を形成する。

10

【0150】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウスV_H遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒトV_L遺伝子セグメントでの置換と、必要に応じて、すべてのもしくは実質的にすべてのD_H遺伝子セグメントおよび/もしくはJ_H遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒトD_H遺伝子セグメントおよび/もしくはヒトJ_H遺伝子セグメントでの置換と、または必要に応じて、すべてのもしくは実質的にすべてのD_H遺伝子セグメントおよびJ_H遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒトJ_L遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスを提供する。

20

【0151】

1つの実施形態において、前記マウスは、すべてのまたは実質的にすべてのマウスV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のV_L、1つもしくは複数のD_H、および1つもしくは複数のJ遺伝子セグメント(例えば、JκまたはJλ)での置換を含み、これらの遺伝子セグメントは、内因性マウスヒンジ領域に作動可能に連結されており、該マウスは、転写方向に5'から3'へと、ヒトV_LーヒトまたはマウスD_HーヒトまたはマウスJーマウスヒンジーマウスC_H2ーマウスC_H3を含有する再構成免疫グロブリン鎖遺伝子を形成する。1つの実施形態において、前記J領域は、ヒトJκ領域である。1つの実施形態において、前記J領域は、ヒトJ_H領域である。1つの実施形態において、前記J領域は、ヒトJλ領域である。1つの実施形態において、前記ヒトV_L領域は、ヒトVλ領域およびヒトVκ領域から選択される。

30

【0152】

特定の実施形態において、前記マウスは、マウスまたはヒト定常領域と、ヒトVκ、ヒトD_HおよびヒトJκ；ヒトVκ、ヒトD_HおよびヒトJ_H；ヒトVλ、ヒトD_HおよびヒトJλ；ヒトVλ、ヒトD_HおよびヒトJ_H；ヒトVκ、ヒトD_HおよびヒトJλ；ヒトVλ、ヒトD_HおよびヒトJκに由来する可変領域とを有する、単一可変ドメイン抗体を発現する。特定の実施形態では、列挙したV、DおよびJ遺伝子セグメント間でのまたは列挙したVおよびJ遺伝子セグメント間での生産的再構成の発生が可能になるように、組換え認識配列を改変する。

40

【0153】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質(またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片)をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウスV_H遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒトV_L遺伝子セグメントでの置換と、すべてのもしくは実質的にすべてのD_H遺伝子セグメントおよびJ_H遺伝子セグメントの、ヒトJ_L遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスであって、C_H1および/またはヒンジ領域が無いマウスを提供する。

50

【0154】

1つの実施形態において、前記マウスには C_H1 ドメインをコードする配列が無い。1つの実施形態において、前記マウスにはヒンジ領域をコードする配列が無い。1つの実施形態において、前記マウスには C_H1 ドメインおよびヒンジ領域をコードする配列が無い。

【0155】

特定の実施形態において、前記マウスは、マウス C_H3 ドメインに結合しているマウス C_H2 ドメインに融合しているヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン (λ または κ) を含む結合タンパク質を発現する。

【0156】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片）をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つもしくは複数のヒト V_L 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのもしくは実質的にすべてのマウス D_H および J_H 遺伝子セグメントの、ヒト J_L 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスを提供する。

【0157】

1つの実施形態において、前記マウスは、 C_H1 領域、ヒンジ領域、 C_H1 およびヒンジ領域、または C_H1 領域およびヒンジ領域および C_H2 領域をコードする免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子配列の欠失を含む。

【0158】

1つの実施形態において、前記マウスは、以下のものから選択されるホモ二量体を含む単一可変ドメイン結合タンパク質を作製する：(a) ヒト V_L —マウス C_H1 —マウス C_H2 —マウス C_H3 ；(b) ヒト V_L —マウスヒンジ—マウス C_H2 —マウス C_H3 ；(c) ヒト V_L —マウス C_H2 —マウス C_H3 。

【0159】

1つの態様では、無能化または欠失された内因性マウスADAM6遺伝子座を含む、無能化された内因性重鎖免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスであって、ヒトまたはマウスまたはヒト／マウスもしくは他のキメラ抗体を発現する核酸配列を含むマウスを提供する。1つの実施形態において、前記核酸配列は、組み込まれた導入遺伝子上に存在し、該導入遺伝子は、マウスゲノムにランダムに組み込まれている。1つの実施形態において、前記核酸配列は、野生型マウスでは見出さないエピソーム（例えば、染色体）上にある。

【0160】

共通の、またはユニバーサル、軽鎖

有用な多重特異性エピトープ結合性タンパク質、例えば二重特異性抗体を作製するこれまでの努力は、共通のパラダイムをしばしば共有する様々な問題によって妨害された：ヘテロダイマー二重特異性ヒト免疫グロブリンを対合させるのに適するフォーマットを、合理的に操作するか、試行錯誤を通して遺伝子操作するための配列の*in vitro*選択または操作。残念ながら、*in vitro*操作手法の全てではないにしてもそのほとんどは、個々の分子に適する（あるとしても）主にその場しのぎの修正を提供する。他方、ヒト治療法へと導くことが可能である適当な対合を選択するために複雑な生物体を使用するための*in vivo*方法は、実現されていない。

【0161】

一般に、天然のマウス配列は、しばしば、ヒトの治療的な配列のための良い供給源ではない。少なくともその理由から、共通のヒト軽鎖と対合するマウス重鎖免疫グロブリン可変領域を生成することは、実用性において限定される。共通のヒト軽鎖と結合する能力を維持し、かつエピトープの特異性および親和性を保持することを望みながら、不確定な結果を伴ってマウス重鎖可変配列をヒト化しようと試みるための試行錯誤のプロセスにおいて、より多くの*in vitro*操作努力が費やされる。そのようなプロセスの終わりに、最終生成物は特異性および親和性の一部を維持し、かつ共通の軽鎖と会合することができる場合があるが、最終的にはヒトでの免疫原性が根深いリスクとして残るだろう。

【0162】

したがって、ヒト治療薬を作るのに適するマウスは、内因性のマウス重鎖可変領域遺伝子セグメントの代わりに、ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの好適に大きなレパートリーを含むであろう。ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは、リバースキメラ重鎖（すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常領域を含む重鎖）を形成するために、再構成して、内因性マウス重鎖定常ドメインと再結合することができるべきである。重鎖は、クラススイッチングおよび体細胞超変異が可能であるべきであり、これにより、重鎖可変ドメインの好適に大きなレパートリーを、マウスがヒト軽鎖可変領域の限られたレパートリーと会合することができるものを選択するために、利用可能である。

【0163】

複数の重鎖について共通の軽鎖を選択するマウスは、実際的な有用性を有する。様々な実施形態では、共通の軽鎖だけを発現することができるマウスで発現する抗体は、同一であるか実質的に同一の軽鎖と会合して発現することができる重鎖を有する。これは、二重特異性抗体の作製で特に有益である。例えば、そのようなマウスは第一の免疫原で免疫して、第一のエピトープに特異的に結合する抗体を発現するB細胞を生成することができる。マウス（または、遺伝的に同じマウス）は、第二の免疫原で免疫して、第二のエピトープに特異的に結合する抗体を発現するB細胞を生成することができる。重鎖可変領域はB細胞からクローニングすることができ、同じ重鎖定常領域および同じ軽鎖と共に発現し、かつ細胞で発現されて二重特異性抗体を作製することができ、ここで、二重特異性抗体の軽鎖成分は、軽鎖成分と会合して発現するようにマウスによって選択される。

【0164】

可変領域が生殖系列配列から逸脱する重鎖、例えば親和性成熟または体細胞変異可変領域を含む、重鎖のかなり多様なファミリーと好適に対合する免疫グロブリン軽鎖を生成するために、発明者らはマウスを操作した。様々な実施形態では、マウスは、ヒト軽鎖可変ドメインが、体細胞変異を含むヒト重鎖可変ドメインと対合するように工夫され、このようにして、ヒト治療薬として使用するのに適する高親和性結合性タンパク質への経路を可能にする。

【0165】

生物体における抗体選択の長く複雑なプロセスを介して、遺伝子操作マウスは、ヒト重鎖可変ドメインの多様なコレクションを限定された数のヒト軽鎖選択肢と対合させることにおいて、生物学的に適当な選択をする。これを達成するために、多様なヒト重鎖可変ドメイン選択肢と一緒に限定された数のヒト軽鎖可変ドメイン選択肢を提示するようにマウスは操作される。抗原チャレンジに際して、マウスは抗原に対する抗体を発生させるためにそのレパートリーにおける解法の数を超えて、これは、そのレパートリーでの軽鎖選択肢の数によって大きく、またはそれ単独で制限される。様々な実施形態では、これは、軽鎖可変ドメインの好適で適合性の体細胞変異をマウスに達成させることを含み、該変異は、それにもかかわらず、特に体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含む、比較的多様なヒト重鎖可変ドメインに適合する。

【0166】

限られたレパートリーの軽鎖選択肢を達成するために、天然のマウス軽鎖可変ドメインを作製または再構成する能力を、非機能的または実質的に非機能的にするようにマウスを操作する。これは、例えば、マウスの軽鎖可変領域遺伝子セグメントを欠失させることによって達成することができる。内因性マウス遺伝子座は、次に、外来性のヒト可変領域遺伝子セグメントが内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子と結合でき、再構成されたりリバースキメラ軽鎖遺伝子（ヒト可変、マウス定常）を形成することができる方法で、選択された外来性の好適なヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント（これは、内因性のマウス軽鎖定常ドメインに作動可能に連結される）によって改変され得る。様々な実施形態では、軽鎖可変領域は、体細胞変異させることが可能である。様々な実施形態では、体細胞変異を得る軽鎖可変領域の能力を最大にするために、適当なエンハンサー（複数可）がマウスで保持される。例えば、ヒトκ軽鎖遺伝子セグメントで内因性マウスκ軽鎖遺伝子セグメントを置換

するためにマウスκ軽鎖遺伝子座を改変することにおいて、マウスのκイントロンエンハンサーおよびマウスκ3'エンハンサーは機能的に維持されるか、破壊されない。

【0167】

多様なリバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）重鎖と会合する限られたレパートリーのリバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）軽鎖を発現する遺伝子操作マウスが提供される。様々な実施形態では、内因性マウスκ軽鎖遺伝子セグメントが欠失し、内因性マウスCκ遺伝子に作動可能に連結される単一の（または2つの）再構成されたヒト軽鎖領域遺伝子セグメントで置換される。再構成されたヒト軽鎖領域の体細胞超変異を最大にするための実施形態では、マウスκイントロンエンハンサーおよびマウスκ3'エンハンサーが維持される。様々な実施形態では、マウスは非機能的なλ軽鎖遺伝子座、またはその欠失、またはその遺伝子座がλ軽鎖を作製できないようにする欠失をさらに含む。

10

【0168】

様々な実施形態では、内因性マウス軽鎖V_LおよびJ_L遺伝子セグメントを欠き、マウス定常領域に作動可能に連結される再構成されたヒト軽鎖可変領域（一実施形態では再構成されたヒトV_L/J_L配列）を含む、軽鎖可変領域遺伝子座を含む遺伝子操作マウスが提供され、ここで、遺伝子座は体細胞超変異を経ることが可能であり、および遺伝子座は、マウス定常領域に連結されたヒトV_L/J_L配列を含む軽鎖を発現する。したがって、様々な実施形態では、遺伝子座はマウスκ3'エンハンサーを含み、それは正常または野生型のレベルの体細胞超変異と関連している。

【0169】

20

目的の抗原で免疫されるとき、様々な実施形態での遺伝子操作マウスは、1つまたは2つの再構成された軽鎖を発現し、軽鎖と共に機能するヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の多様な再構成を示すB細胞を生成し、これには、1つまたは2つの軽鎖が、例えば1から5個の体細胞変異を含むヒト軽鎖可変領域を含む実施形態が含まれる。様々な実施形態では、そのように発現されるヒト軽鎖は、マウスで発現される任意のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域と会合して発現することが可能である。

【0170】

複数のエピトープに結合するエピトープ結合性タンパク質

本明細書に記載される組成物および方法は、複数のエピトープに高親和性で結合する結合性タンパク質、例えば二重特異性抗体を作製するために用いることができる。本発明の利点には、その各々が単一の軽鎖と会合する好適に高い結合性の（例えば、親和性成熟した）重鎖免疫グロブリン鎖を選択する能力が含まれる。

30

【0171】

二重特異性結合性タンパク質の合成および発現は、一部は、2つの異なる重鎖と会合して発現することができる好適な軽鎖を同定することに関連する問題のため、および一部は、単離の問題のために厄介であった。本明細書に記載される方法および組成物は、遺伝子改変マウスが、他の点では天然であるプロセスを介して、体細胞変異された（例えば、親和性成熟した）重鎖を含む複数の重鎖と会合して発現することができる好適な軽鎖を選択することを可能にする。リバースキメラ重鎖（すなわち、ヒト可変およびマウス定常）を有する親和性成熟抗体を発現する、本明細書に記載される免疫マウスの適するB細胞からのヒトV_LおよびV_H配列を同定して、適するヒト定常領域遺伝子配列（例えば、ヒトIgG1）を有する発現ベクターにインフレイムでクローニングすることができる。2つのそのような構築物を調製することができ、ここで、各構築物は異なるエピトープに結合するヒト重鎖可変ドメインをコードする。生殖系列配列における、またはB細胞（ここで、配列は体細胞変異されている）からのヒトV_Lの1つ（例えば、ヒトVκ1-39Jκ5またはヒトVκ3-20Jκ1）は、適するヒト定常領域遺伝子（例えば、ヒトκ定常遺伝子）にインフレイムで融合させることができる。これら3つの完全なヒトの重鎖および軽鎖構築物は、発現のために適する細胞に入れることができる。細胞は、2つの主要な種を発現する：同一の軽鎖を有するホモダイマー重鎖、および同一の軽鎖を有するヘテロダイマー重鎖。これらの主要な種の容易な分離を可能にするために、重鎖の1つはプロテ

40

50

ンA結合決定基が削除されるように改変され、これにより、ヘテロダイマー結合性タンパク質とは異なるホモダイマー結合性タンパク質の親和性がもたらされる。この問題に対処する組成物および方法は、参照により本明細書に組み込まれる、US 2010/0331527 A1として公開された、2010年6月25日に出願された「Readily Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format」という名称のUS 2012/0832,838に記載される。

【0172】

一態様では、本明細書に記載されるエピトープ結合性タンパク質が提供され、ここで、ヒトV_LおよびV_H配列は、目的のエピトープを含む抗原で免疫されている本明細書に記載されるマウスに由来する。

10

【0173】

一実施形態では、第一および第二のポリペプチドを含むエピトープ結合性タンパク質が提供され、第一のポリペプチドは、N末端からC末端にかけて、第一のエピトープに選択的に結合する第一のエピトープ結合性領域、続いてIgG1、IgG2、IgG4およびその組合せから選択されるヒトIgGの第一のC_H3領域を含む定常領域を含み；第二のポリペプチドは、N末端からC末端にかけて、第二のエピトープに選択的に結合する第二のエピトープ結合性領域、続いてIgG1、IgG2、IgG4およびその組合せから選択されるヒトIgGの第二のC_H3領域を含む定常領域を含み、第二のC_H3領域は、プロテインAへの第二のC_H3ドメインの結合を低減または除去する改変を含む。

20

【0174】

一実施形態では、第二のC_H3領域はH95R改変を含む（IMGTエクソンナンバリングによる；EUナンバリングによりH435R）。別の実施形態では、第二のC_H3領域はY96F改変をさらに含む（IMGT；EUによりY436F）。

【0175】

一実施形態では、第二のC_H3領域は改変ヒトIgG1に由来し、D16E、L18M、N44S、K52N、V57MおよびV82I（IMGT；EUによりD356E、L358M、N384S、K392N、V397MおよびV422I）からなる群より選択される改変をさらに含む。

【0176】

一実施形態では、第二のC_H3領域は改変ヒトIgG2に由来し、N44S、K52NおよびV82I（IMGT；EUによりN384S、K392NおよびV422I）からなる群より選択される改変をさらに含む。

30

【0177】

一実施形態では、第二のC_H3領域は改変ヒトIgG4に由来し、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79QおよびV82I（IMGT；EUによりQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419QおよびV422I）からなる群より選択される改変をさらに含む。

【0178】

複数のエピトープに結合するエピトープ結合性タンパク質を作製するための1つの方法は、目的の第一のエピトープを含む抗原で本発明による第一のマウスを免疫することであり、ここで、マウスは、軽鎖を再構成して形成することが可能な内因性マウスV_Lを含まない内因性免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を含み、ここで、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座はマウス内因性軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される単一の再構成されたヒトV_L領域であり、再構成されたヒトV_L領域は、ヒトVκ1-39 Jκ5およびヒトVκ3-20 Jκ1から選択され、内因性マウスV_H遺伝子セグメントは、ヒトV_H遺伝子セグメントによって全部または一部が置換され、したがって、マウスによって作製される免疫グロブリン重鎖は、もっぱらまたは実質的に、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを含む重鎖である。免疫されるとき、そのようなマウスは、2つのヒト軽鎖可変ドメインの1つだけ（例えば、ヒトVκ1-39 Jκ5またはヒトV

40

50

κ 3-20 J κ 1 の 1 つ) を含むリバースキメラ抗体を作る。目的のエピトープに結合する V_H をコードする B 細胞が同定されると、V_H (および、任意選択で V_L) のヌクレオチド配列を引き出して (例えば、PCR によって)、適するヒト免疫グロブリン定常ドメインとインフレームで発現構築物にクローニングすることができる。第二のエピトープに結合する第二の V_H ドメインを同定するためにこのプロセスを繰り返すことができ、第二の V_H 遺伝子配列を引き出して、第二の適する免疫グロブリン定常ドメインとインフレームで発現ベクターにクローニングすることができる。第一および第二の免疫グロブリン定常ドメインは、同じか異なるアイソタイプであってよく、免疫グロブリン定常ドメインの 1 つ (他のものではない) を、本明細書または US 2010/0331527 A1 に記載されるように改変することができ、エピトープ結合性タンパク質を適する細胞で発現させ、例えば US 2010/0331527 A1 に記載されるように、ホモダイマーエピトープ結合性タンパク質と比較してプロテイン A に対するその異なった親和性に基づいて単離することができる。

10

【0179】

一実施形態では、二重特異性エピトープ結合性タンパク質の作製方法であって、本明細書に記載されるマウスから第一の親和性成熟 (例えば、1 つまたは複数の体細胞超変異を含む) ヒト V_H ヌクレオチド配列 (V_H 1) を同定すること、本明細書に記載されるマウスから第二の親和性成熟 (例えば、1 つまたは複数の体細胞超変異を含む) ヒト V_H ヌクレオチド配列 (V_H 2) を同定すること、V_H 1 を US 2010/0331527 A1 に記載されるプロテイン A 決定基改変を欠くヒト重鎖とインフレームでクローニングして重鎖 1 (HC 1) を形成すること、V_H 2 を US 2010/0331527 A1 に記載されるプロテイン A 決定基を含むヒト重鎖とインフレームでクローニングして重鎖 2 (HC 2) を形成すること、HC 1 を含む発現ベクターおよび HC 2 を含む同じか異なる発現ベクターを細胞に導入することであって、ここで、細胞はヒト軽鎖定常ドメインに融合したヒト V_κ 1-39/ヒト J_κ 5 またはヒト V_κ 3-20/ヒト J_κ 1 を含むヒト免疫グロブリン軽鎖をさらに発現する、導入すること、V_H 1 によってコードされる V_H ドメインおよび V_H 2 によってコードされる V_H ドメインを含む二重特異性エピトープ結合性タンパク質を細胞に発現させること、ならびに単一特異的なホモダイマーエピトープ結合性タンパク質と比較して、プロテイン A に結合するその異なった能力に基づいて二重特異性エピトープ結合性タンパク質を単離すること、を含む方法が提供される。具体的な実施形態では、HC 1 は IgG 1 であり、HC 2 は、改変 H95R (IMGT; EU により H435R) を含み、改変 Y96F (IMGT; EU により Y436F) をさらに含む IgG 1 である。一実施形態では、V_H 1 によってコードされる V_H ドメイン、V_H 2 によってコードされる V_H ドメイン、またはその両方は、体細胞変異される。

20

30

【0180】

共通のヒト V_L と共に発現するヒト V_H 遺伝子

4 つの異なる抗原に対して形成された親和性成熟抗体からの様々なヒト可変領域は、それらの関連軽鎖、またはヒト V_κ 1-39 J_κ 5、ヒト V_κ 3-20 J_κ 1 もしくはヒト VpreBJλ 5 から選択される少なくとも 1 つのヒト軽鎖と共に発現された (実施例 10 を参照)。抗原の各々に対する抗体について、異なる遺伝子ファミリーからの体細胞変異高親和性重鎖は、再構成されたヒト生殖系列 V_κ 1-39 J_κ 5 および V_κ 3-20 J_κ 1 領域と上手く対合し、重鎖および軽鎖を発現する細胞から分泌された。V_κ 1-39 J_κ 5 および V_κ 3-20 J_κ 1 について、以下のヒト V_H 遺伝子ファミリーに由来する V_H ドメインが有利に発現した: 1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51 および 6-1。したがって、V_κ 1-39 J_κ 5 および V_κ 3-20 J_κ 1 の片方または両方からヒト V_L ドメインの限られたレパートリーを発現するように遺伝子操作されているマウスは、ヒト V_H 遺伝子セグメントでマウス V_H 遺伝子セグメントを置換するように改変された V_H 遺伝子座から、体細胞変異ヒト V_H ドメインの多様な集団を生成する。

40

50

【0181】

単一の再構成された軽鎖（例えば、 $V\kappa 1-39/J$ または $V\kappa 3-20/J$ ）と会合しているリバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）免疫グロブリン重鎖を発現するように遺伝子操作されたマウスは、目的の抗原で免疫される場合、多様なヒト V_H 再構成を含み、かつ多様な特性（リガンドへの抗原の結合をブロックする能力に関して、および抗原のバリエーションに結合する能力に関して）を有する多様な高親和性抗原特異的抗体を発現するB細胞を生成した（実施例14から15を参照）。

【0182】

したがって、本明細書に記載されるマウスおよび方法は、多様な再構成から生じ、多種多様な親和性を示し（約ナノモルまたはそれ以下の K_D を示すことを含む）、多種多様な特異性を示し（同じ抗原の異なるエピトープへの結合を含む）、同じか実質的に同じヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域と会合して発現する、体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含む、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの作製および選択で有用である。

【0183】

一態様では、ヒト化重鎖可変領域遺伝子座を含む第一のマウスを、本明細書に記載の共通の（すなわち、ユニバーサル）軽鎖遺伝子座をコードする核酸配列を含む第二のマウスと交配する。一実施形態では、第一または第二のマウスは、マウスADAM6をコードする異所性核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む。子孫を交配して、ヒト化重鎖遺伝子座についてホモ接合性およびユニバーサル軽鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスを得る。一実施形態では、第一のマウスまたは第二のマウスは、内因性マウス軽鎖遺伝子座を非機能的にする内因性マウス軽鎖遺伝子座の改変（例えば、例えば、 λ および κ 内因性遺伝子座の欠失またはノックアウト）を含む。一実施形態では、第一のマウスは、全てまたは実質的に全ての機能的内因性マウスV、D、およびJ遺伝子セグメントの、1つもしくは複数の再構成されていないヒトV、D、およびJ遺伝子セグメント（例えば、全てまたは実質的に全ての機能的ヒトV、D、およびJ遺伝子セグメント）での置換を含み、マウスは、全てまたは実質的に全ての機能的軽鎖VおよびJ遺伝子セグメントの、1つ以下または2つ以下の再構成された軽鎖V/J配列での置換を含む。一実施形態では、第一のマウスは、マウスADAM6をコードする異所性核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片をさらに含む。一実施形態では、異所性核酸配列はヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座に存在する。

【0184】

一実施形態では、異所性配列を含み、且つユニバーサル軽鎖遺伝子座について、およびヒト化重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスを目的の抗原で免疫して、ユニバーサル軽鎖と会合して発現する複数の体細胞変異したヒト可変ドメインを含む抗体を生成する。一実施形態では、マウスにおいて同定されたヒト重鎖可変ドメイン核酸配列を発現系で使用して、ヒト重鎖可変ドメインおよびマウスのユニバーサル軽鎖配列を含む軽鎖を含む完全ヒト抗体を作製する。

【0185】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物を作製、使用方法を当業者に説明するために提供され、発明者が彼らの発明とみなすものの範囲を限定するものではない。用いる数（例えば、量、温度など）に関して正確性を保証するように努めたが、多少の実験誤差および逸脱があることが考慮されるべきである。特に明記しない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏で示され、気圧は大気圧またはその近くである。

【実施例】

【0186】

実施例I

マウス免疫グロブリン遺伝子のヒト化

【0187】

ヒトおよびマウス細菌人工染色体（BAC）を使用して、マウス免疫グロブリン重鎖お

10

20

30

40

50

よびκ軽鎖遺伝子座のヒト化のための13の異なるBACターゲティングベクター（BACvec）を操作して作製した。表1および2は、マウス免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座のヒト化にそれぞれ利用したすべてのBACvecを構築するために行った工程の詳細な説明を示すものである。

【0188】

ヒトおよびマウスのBACの同定。

【0189】

BACライブラリーを用いてスポットしたフィルターのハイブリダイゼーションにより、またはマウスBACライブラリーDNAプールのPCRスクリーニングにより、免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座の5'および3'端にわたるマウスBACを同定した。対象となる領域に対応するプローブを使用して、標準条件下でフィルターをハイブリダイズした。対象となる標的領域に隣接するユニークなプライマーペアを使用してPCRによりライブラリープールをスクリーニングした。同じプライマーを使用する追加のPCRを行って、所与のウェルをデコンボリュートし、対象となる対応するBACを単離した。BACフィルターとライブラリープールの両方を129SvJマウスES細胞（Incyte Genomics/Invitrogen）から生成した。全免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座をカバーするヒトBACを、BACライブラリー（Caltech B、CもしくはDライブラリーおよびRPCI-11ライブラリー、Research Genetics/Invitrogen）を用いてスポットしたフィルターのハイブリダイゼーションとPCRベースの方法によるヒトBACライブラリープール（Caltechライブラリー、Invitrogen）のスクリーニングによるか、またはBAC末端配列データベース（Caltech Library、TIGR）の使用によるかの、いずれかによって同定した。

【0190】

BACvecの構築（表1および2）。

【0191】

細菌相同組換え（BHR）を記載されている（Valenzuelaら、2003；Zhang, Y. ら（1998）A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*, Nat Genet 20、123-128）とおりに行った。殆どの場合、PCR由来ホモロジーボックスのクローン化カセットへのライゲーション、続いてライゲーション産物のゲル単離、そして標的BACを保有するBHRコンピテント細菌へのエレクトロポレーションによって線状断片を生成した。適切な抗生物質ペトリ皿での選択の後、正しく組換えられたBACを、両方の新規接合部にわたってのPCR、続いてパルスフィールドゲルでの制限酵素分析（Schwartz, D. C. and Cantor, C. R. （1984）Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37、67-75）、そしてヒト配列全域にわたって分布するプライマーを使用するPCRによるスポットチェックによって同定した。

【0192】

3工程の逐次的BHR工程を用いて、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の最初のヒト化工程のための3hV_H BACvecを構築した（図4Aおよび表1）。第一工程（工程1）では、ヒト親BACのヒトV_H1-3遺伝子セグメントから上流に、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と相同性の領域（HB1）と細菌にカナマイシン耐性をおよび動物細胞にG418耐性を付与する遺伝子（kanR）と部位特異的組換え部位（例えば、loxP）とを含有するカセットを導入した。第二工程（工程2）では、最後のJ_Hセグメントから直ぐ下流に、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と相同性の第二の領域（HB2）と細菌にスペクチノマイシンに対する耐性を付与する遺伝子（specR）とを含有する第二のカセットを導入した。この第二工程は、J_H6から下流のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝

子座配列とBACベクタークロラムフェニコール耐性遺伝子(cmr)とを欠失させることを含んだ。次に、第三工程(工程3)では、最初の2工程の間に付加されたI-CeuI部位を使用して二重改変ヒトBAC(B1)を線形化し、2つの相同性領域(HB1およびHB2)によるBHRによってマウスBAC(B2)に組み込んだ。第一(cmr/kan)、第二(spec/kan)および第三(cmr/kan)工程のための薬剤選択は、所望の産物に特異的であるように設計した。制限酵素での消化後にパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)により改変BACクローンを分析して、適切な構築物を決定した(図4B)。

【0193】

同様に、重鎖およびκ軽鎖遺伝子座のヒト化のために12の追加のBACvecを操作して作製した。場合によっては、選択マーカーの注意深い配置と共に、BHRによる両方の親BACvecへの稀な制限酵素認識部位導入による、BHRの代わりにBACライゲーションを行って、2つの大きなBACを結合した。これにより、特定の薬剤マーカーの組み合わせでの選択の際に、所望のライゲーション産物の生残が可能になった。稀な制限酵素での消化後のライゲーションによって得た組換えBACを、BHRによって得たものと同様に(上に記載したように)同定し、スクリーニングした。

【0194】

【表1-1】

表1

BACvec	工程	説明	プロセス
3hV _H	1	ヒト近位BAC CTD-2572o2の上流にマウスホモロジーボックスを挿入する	BHR
	2	ヒト近位BAC CTD-2572o2の下流にマウスホモロジーボックスを挿入する	BHR
	3	3hV _H /27hD _H /9hJ _H をマウス近位BAC CT7-302a07に挿入して3hV _H BACvecを作製する	BHR
DC	1	マウスBAC CT7-253i20を使用してマウスIgH遺伝子座の遠位端にカセットを挿入する	BHR
18hV _H	1	ヒトBAC CTD-2572o2を使用して3hV _H 挿入物の下流端にspecRマーカーを挿入する	BHR
	2	I-CeuIおよびNot部位を3hV _H 挿入物の上流端にpuroRに隣接して挿入する	BHR
	3	Rel2-408p02 BACの下流端(V _H 2-5の約10kb下流)にNot部位を挿入する	BHR
	4	Rel2-408p02 BACの上流端(V _H 1-18の約23kb上流)にI-CeuI部位を挿入する	BHR

【表 1 - 2】

	5	工程4からの184kb断片を工程2からの153kbベクターにライゲートする	ライゲーション
	6	3hV _H との相同領域(homology)約85kbを欠失させ65kbを残して、CTD-2572o2 BACからのヒト相同領域のトリミングする	BHR
	7	カセットおよびNot部位をCT7-253i20 BAC内のマウスIgH遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	8	ヒトBACから上流に挿入するためのマウス遠位ホモロジーアームをサブクローニングする	ライゲーション
	9	20kbマウスアームをRel2-408p02の上流に挿入する	BHR
	10	hygRからneoRに選択カセットを交換して18hV _H BACvecを作製する	BHR
39hV _H	1	I-CeuIおよびPI-SceI部位をヒトBAC CTD-2534n10の遠位端にhygRに隣接して挿入する	BHR
	2	CTD-2534n10 BACの近位端にCmRを挿入して、RP11-72n10 BACへのライゲーションのための選択を可能にする	BHR
	3	CTD-2534n10 BACへのライゲーションのためにRP11-72n10 BACにPI-SceI部位を挿入する	BHR
	4	I-CeuIおよびAscI部位をRP11-72n10 BACの遠位端にpuroRに隣接して挿入する	BHR
	5	工程4の構築物からの161kb断片を工程2の構築物にライゲートし、hygRを置換する	ライゲーション
	6	CT7-253i20 BACを使用してマウス遠位ホモロジーアームの近位端にneoRおよびAscI部位を挿入する	BHR
	7	マウス遠位ホモロジーアームの遠位端にspecRおよびI-CeuI部位を挿入する	BHR
	8	工程5からのヒト挿入物にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートする	ライゲーション
	9	UbCpおよびpAをホモロジーボックスとして使用してneoからhygに選択カセットを交換して39hV _H BACvecを作製する	BHR

10

20

30

40

【表 1 - 3】

53hV _H	1	ヒトCTD-3074b5 BACの近位端にspecRを挿入する	BHR
	2	ヒトCTD-3074b5 BACの遠位端にAscI部位を挿入する	BHR
	3	CT7-253i20 BACを使用してマウス遠位ホモロジーアームの近位端にhygRおよびAscI部位を挿入する	BHR
	4	工程2からの構築物上にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートする	ライゲーション
	5	UbCpおよびpAをホモロジーボックスとして使用してhygからneoに選択カセットを交換して53hV _H BACvecを作製する	BHR
70hV _H	1	PI-SceIおよびI-CeuI部位をヒトCTD-2195p5 BACの遠位端にspecに隣接して挿入する	BHR
	2	CTD-2195p5 BACへのライゲーションのためにRP11-926p12 BACの近位端にI-CeuI部位を挿入する	BHR
	3	マウスアームのライゲーションのためにRP11-926p12 BACの遠位端にPI-SceIおよびAscI部位を挿入する	BHR
	4	工程3からの構築物上にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートする	ライゲーション
	5	マウス遠位ホモロジーアームとRP11-926p12 BACからのhIgH断片とをCTD-2195p5 BAC上にライゲートして70hV _H BACvecを作製する	ライゲーション
80hV _H	1	I-CeuIおよびAscI部位をCTD-2313e3 BACの遠位端にhygRに隣接して挿入する	BHR
	2	工程1からのヒトCTD-2313e3 BAC上にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートして80hV _H BACvecを作製する	ライゲーション

10

20

30

【0195】

【表 2】
表2

BACvec	工程	説明	プロセス
Ig κ -PC	1	CT7-254m04 BACを使用してloxP部位をマウスJ-Cイントロン内に挿入する	BHR
Ig κ -DC	1	CT7-302g12 BACを使用してloxP部位をマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
6hV κ	1	PI-SceI部位をCTD-2366j12 BAC内のhJ κ 5から約400bp下流に挿入する	BHR
	2	I-CeuIおよびAscI部位をCTD-2366j12 BACの遠位端にhygRに隣接して挿入する	BHR
	3	CT7-254m04 BACを使用してI-CeuIおよびPI-SceI部位をmJ κ から下流にpuroRに隣接して挿入する	BHR
	4	工程3からの構築物を使用してhIgV κ /J κ をマウスEnh κ /C κ から上流に挿入する	ライゲーション
	5	工程4の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	6	CT7-302g12 BACを使用してNeo選択カセットをマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	7	マウス遠位ホモロジーアームを工程6からの構築物中のヒト挿入物の上流にライゲートして6hV κ BACvecを作製する	ライゲーション
16hV κ	1	RP11-1061b13 BACの遠位端にNeoRを挿入する	BHR
	2	工程1の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	3	CT7-302g12 BACを使用してHyg選択カセットをマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	4	マウス遠位ホモロジーアームを工程2の構築物からのヒト挿入物の上流にライゲートして16hV κ BACvecを作製する	ライゲーション
30hV κ	1	HygRをRP11-99g6 BACの遠位端に挿入する	BHR
	2	工程1の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	3	CT7-302g12 BACを使用してNeo選択カセットをマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	4	マウス遠位ホモロジーアームを工程2の構築物からのヒト挿入物の上流にライゲートして30hV κ BACvecを作製する	ライゲーション
40hV κ	1	NeoRをCTD-2559d6 BAC内のhIgH遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	2	工程1の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	3	マウス遠位ホモロジーアームを工程2の構築物中のヒト挿入物の上流にライゲートして40hV κ BACvecを作製する	ライゲーション

【0196】

胚性幹（ES）細胞の改変およびマウスの産生。

【0197】

記載されている（Valenzuelaら、2003）ようなVELOCIGENE（登録商標）遺伝子工学法を用いて、ES細胞（F1H4）ターゲティングを行った。胚盤

10

20

30

40

50

胞 (Valenzuelaら、2003) または8細胞注入 (Poueymirouら、2007) のいずれかによる改変ES細胞からのマウスの誘導は、記載されているとおりであった。PCRベースのアッセイでプローブとプライマーのユニークなセットを用いてES細胞またはマウスからのDNAをスクリーニングすることにより、標的ES細胞およびマウスを確認した (例えば、図3A、3Bおよび3C)。すべてのマウス研究は、Regeneronの施設内動物管理使用委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC) によって監督され、承認された。

【0198】

核型分析および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)。

10

【0199】

核型分析は、Coriell Cell Repositories (Coriell Institute for Medical Research、ニュージャージー州カムデン) によって行われた。FISHは、標的ES細胞を用いて、記載されている (Valenzuelaら、2003) とおりに行った。マウスBAC DNAまたはヒトBAC DNAのいずれかに対応するプローブを、ニック翻訳 (Invitrogen) により蛍光標識dUTPヌクレオチドスペクトルオレンジまたはスペクトルグリーン (Vysis) で標識した。

【0200】

免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座。

20

【0201】

重鎖遺伝子座の可変領域のヒト化は、VELOCI GENE (登録商標) 遺伝子工学技術 (例えば、米国特許第6, 586, 251号明細書およびValenzuelaら、2003参照) を用いて、9工程の逐次的工程で、すべての V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントを含有する約3百万塩基対 (Mb) の連続するマウスゲノム配列を、等価ヒト遺伝子セグメントを含有する約1Mbの連続するヒトゲノム配列で直接置換することによって達成した (図1Aおよび表1)。

【0202】

J_H 遺伝子セグメントと定常領域遺伝子の間のイントロン ($J-C$ イントロン) は、転写エンハンサー (Neuberger, M. S. (1983) Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. EMBO J 2, 1373-1378)、その後アイソタイプスイッチ中の組換えに必要な単純リピート領域 (Kataoka, T. ら (1980) Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch, Proc Natl Acad Sci U S A 77, 919-923) を含有する。マウス内でのヒト化重鎖遺伝子座の効率的発現およびクラススイッチ両方を保存するために、マウス重鎖イントロンエンハンサーおよびスイッチドメインを維持するようにヒト $V_H-D_H-J_H$ 領域とマウス C_H 領域の間の接合部 (近位接合部) を選択した。合成オリゴヌクレオチドによって駆動される細菌相同組換えを用いるVELOCI GENE (登録商標) 遺伝子工学法 (上記) の使用により、すべての置換においてこのおよび後続の接合部の正確なヌクレオチド位置が実現可能であった。このようにして、近位接合部を最後の J_H 遺伝子セグメントから約200bp下流に配置し、遠位接合部を、ヒト遺伝子座の最も5'側の V_H 遺伝子セグメントの数百上流、かつJ558.55としても公知のマウス V_H1-86 遺伝子セグメントから約9kb下流に配置した。前記マウス V_H1-86 ($J558.55$) 遺伝子セグメントは最遠位重鎖可変遺伝子セグメントであり、このセグメントは、C57BL/6マウスでは偽遺伝子であるが、標的129対立遺伝子において不十分なRSS配列であるにもかかわらず潜在的に活性であると報告されている。前記マウス重鎖遺伝子座の遠位端は、報告によれば、遺伝子座発現および/または

30

40

50

再構成を調節する制御要素を含有し得る (Pawlitzyら、2006)。

【0203】

ヒト免疫グロブリンDNA配列のマウスへの第一の挿入は、約75kbのマウスホモロジーアームを使用して、3つのV_H、27すべてのD_Hおよび9つのJ_Hヒト遺伝子セグメントを含有するヒト重鎖遺伝子座の144kbの近位端をマウスIgH遺伝子座の近位端に挿入し、相伴って16.6kbのマウスゲノムを欠失させることによって達成した (工程A、図2A；表1および3、3hV_H)。この大きな144kb挿入および随伴する16.6kb欠失を単一の工程 (工程A) で行い、この工程は0.2%の頻度で行われた (表3)。欠失マウス配列内のおよび欠失マウス配列に隣接するプローブならびに挿入ヒト配列内のプローブを使用する天然対立遺伝子の喪失 (loss-of-native-allele: LONA) アッセイ (Valenzuelaら、2003) により、正しくターゲティングされたES細胞にスコアを付けし、全挿入にわたって複数のプローブを使用して大きなヒト挿入物の完全性を検証した (図3A、3Bおよび3C)。多ラウンドの逐次的ES細胞ターゲティングが予想されたので、この工程およびすべての後続の工程で標的ES細胞クローンを核型分析 (上記) に付し、20のうち少なくとも17のスプレッドにおいて正常な核型を示すクローンのみを後続の工程に用いた。

【0204】

工程Aからの標的ES細胞をBACvecで再ターゲティングし、それにより、重鎖遺伝子座の遠位端に19kb欠失を生じさせた (工程B、図2A)。工程BのBACvecは、工程AのBACvecに含有されているネオマイシン耐性遺伝子 (neo) とは対照的にハイグロマイシン耐性遺伝子 (hyg) を含有した。これら2つのBACvecからの耐性遺伝子は、同じ染色体へのターゲティング成功により、該2つの耐性遺伝子ばかりでなくV_H1-86以外のすべてのマウスV_H遺伝子セグメントおよびDQ52以外のすべてのD_H遺伝子セグメントを含有するおよそ3Mbのマウス重鎖可変遺伝子遺伝子座をloxP部位に隣接させるように、ならびにDQ52およびすべてのマウスJ_H鎖遺伝子セグメントが工程Aにおいて欠失されるように設計した。同じ染色体上に二重にターゲティングされたES細胞クローンを、3hV_H近位カセットを高G418においてホモ接合性にさせること (Mortensen, R. M. ら (1992) Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. Mol Cell Biol 12: 2391-2395) および遠位hygカセットの運命を追跡することによって同定した。loxP部位が隣接するような手法で改変された4Mb以下のサイズのマウスセグメントは、薬剤選択不在の場合でさえ、高効率 (約11%以下) でのCREリコンビナーゼの一過的発現によりES細胞において首尾よく欠失した (Zheng, B. ら (2000) Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. Mol Cell Biol 20: 648-655)。同様の手法で、本発明者らは、一過的CRE発現後に8%のES細胞クローンにおいて3Mb欠失を実現した (工程C、図2A、表3)。欠失マウス配列のいずれかの末端におけるプローブ、ならびにneoおよびhygの喪失、および唯一残存するloxP部位を含有する欠失点にわたるPCR産物の出現を用いるLONAアッセイによって欠失にスコアを付けた。さらに、蛍光in situハイブリダイゼーションによって欠失を確認した (データを示さない)。

【0205】

各工程が210kb以下のヒト遺伝子配列の正確な挿入を含む、VELOCIGENE (登録商標) 遺伝子工学法を用いる一連の5工程 (工程E~H、図2B) で、ヒト重鎖可変領域の残部を3hV_H対立遺伝子に付加させた。各工程について、各新たなBACvecの近位端を前の工程の最遠位ヒト配列とオーバーラップするように設計し、各新たなBACvecの遠位端は、工程Aにおいて使用したのと同じ遠位マウス相同領域を含有した。工程D、FおよびHのBACvecはneo選択カセットを含有したが、工程Eおよび

Gのものは、h y g 選択カセットを含有し、したがって、G 4 1 8 とハイグロマイシンの間で交互に選択した。工程Dにおけるターゲティングを、3 h V_H ハイブリッド対立遺伝子の遠位 l o x P 部位にわたるユニークな P C R 産物の喪失によってアッセイした。工程EからIについてのターゲティングは、前の選択カセットの喪失によってアッセイした。最後の工程（工程I、図2B）では、F r t 部位（M c L e o d, M. ら（1986）I d e n t i f i c a t i o n o f t h e c r o s s o v e r s i t e d u r i n g F L P - m e d i a t e d r e c o m b i n a t i o n i n t h e S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e p l a s m i d 2 m i c r o n s c i r c l e. M o l C e l l B i o l 6、3357-3367）が隣接する n e o 選択カセットを、一過的 F L P e 発現（B u c h h o l z, F. ら（1998）I m p r o v e d p r o p e r t i e s o f F L P r e c o m b i n a s e e v o l v e d b y c y c l i n g m u t a g e n e s i s. N a t B i o t e c h n o l 16、657-662）によって除去した。工程D、EおよびGについての B A C v e c のヒト配列は、2つの親ヒト B A C 各々に由来したが、工程FおよびHからのヒト配列は、単一の B A C からのものであった。挿入ヒト配列にわたって複数のプローブを使用して、ヒト配列の保持を工程ごとに確認した（上記したとおり、例えば図3A、3Bおよび3C）。各工程で、正常な核型および生殖細胞系の潜在力を有するクローンのみを次の工程に進めた。最後の工程からの E S 細胞は、9種の逐次的操作（表3）の後、依然として生殖細胞系に寄与することができた。重鎖対立遺伝子の各々についてホモ接合性のマウスは、生育可能であり、健常であるように見え、および本質的に野生型の体液性免疫系を実証した（実施例3参照）。

10

20

【0206】

【表 3】

表3

ハイブリッド 対立遺伝子	ヒト 配列	ターゲティング 構築物	ターゲティング 効率	% 使用 量	総 V _H	機能的 V _H
3hV _H	144 kb	240 kb	0.2%	5	3	3
3hV _H /DC	144 kb	110 kb	0.1%	5	3	3
3hV _H -CRE	144 kb	—	8%	5	3	3
18hV _H	340 kb	272 kb	0.1%	25	18	12
39hV _H	550 kb	282 kb	0.2%	60	39	25
53hV _H	655 kb	186 kb	0.4%	65	53	29
70hV _H	850 kb	238 kb	0.5%	90	70	39
80hV _H	940 kb	124 kb	0.2%	100	80	43
80hV _H dNeo	940 kb	—	2.6%	100	80	43

【0207】

免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座。

【0208】

重鎖のものに類似した手法で、すべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントを含有する約3 Mbのマウス配列を、近位ヒトVκおよびJκ遺伝子セグメントを含有する約0.5 Mbのヒト配列で直接置換することにより、8工程の逐次的工程でκ軽鎖可変領域をヒト化した（図1B；表2および4）。

【0209】

ヒトκ軽鎖遺伝子座の可変領域は、800 kbスペーサーによって隔てられた2つのほぼ同一の400 kbリピートを含有する（Weichhold, G. M. ら（1993）
The human immunoglobulin kappa locus con

sists of two copies that are organized in opposite polarity、Genomics 16:503-511)。これらのリピートは非常に類似しているので、近位リピートを使用することによりマウスにおいてほぼすべての遺伝子座多様性を再現することができる。さらに、遠位リピートを欠くκ軽鎖遺伝子座の天然ヒト対立遺伝子が報告されている (SchaiBLE, G. ら (1993) The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals、Hum Genet 91:261-267)。約3Mbのマウスκ軽鎖可変遺伝子配列は、約0.5Mbのヒトκ軽鎖可変遺伝子配列で置換されて、すべてのマウスVκおよびJκ遺伝子セグメントが、近位ヒトVκおよびすべてのヒトJκ遺伝子セグメントで有効に置き換えられた (図2Cおよび2D; 表2および4)。重鎖遺伝子座について実施例1において記載する方法とは対照的に、任意のヒト配列を付加する前に3工程のプロセスですべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントを含有する全マウスVκ遺伝子領域を欠失させた。最初、neoカセットを可変領域の近位端に導入した (工程A、図2C)。次に、hygカセットをκ遺伝子座の遠位端に挿入した (工程B、図2C)。残存する3MbのマウスVκ領域と共に両方の耐性遺伝子の欠失がCRE処理により誘導されるように、loxP部位を各選択カセットの中に再び置いた (工程C、図2C)。

【0210】

重鎖について用いた方法 (実施例1参照) に類似した方法を用いて、150kb以下のヒト免疫グロブリンκ軽鎖配列を1工程で挿入して、免疫グロブリンκ軽鎖可変領域を含有する約480kbサイズのヒトゲノム断片を4工程の逐次的工程 (図2D; 表2および4) で挿入した。最後のハイグロマイシン耐性遺伝子を一過的FLPe発現によって除去した。重鎖と同様に、いずれの工程後にも、標的ES細胞クローンを全ヒト挿入物の完全性、正常な核型および生殖細胞系の潜在性について評価した。κ軽鎖鎖対立遺伝子の各々についてホモ接合性のマウスが産生され、健常であることおよび正常な外観のものであることが判明した。

【0211】

【表4】

表4

ハイブリッド 対立遺伝子	ヒト 配列	ターゲティング 構築物	ターゲティング 効率	% 使 用 量	総 Vκ	機能的 Vκ
Igκ-PC	0	132 kb	1.1%	-	-	-
Igκ-PC/DC	0	90 kb	0.4%	-	-	-
Igκ-CRE	0	-	1%	-	-	-
6hVκ	110 kb	122 kb	0.3%	14	6	4
16hVκ	240 kb	203 kb	0.4%	47	16	11
30hVκ	390 kb	193 kb	0.1%	70	30	18
40hVκ	480 kb	185 kb	0.2%	100	40	25
40hVκdHyg	480 kb	-	0.7%	100	40	25

【0212】

実施例 I I

複数のヒト化免疫グロブリン対立遺伝子の組み合わせによる完全ヒト化マウスの産生

【0213】

幾つかの箇所に、実施例 1 に記載したようなヒト免疫グロブリン重鎖または κ 軽鎖可変レパートリーの一部分を保有する ES 細胞を微量注射し、得られたマウスを交配させて、ヒト生殖細胞系免疫グロブリンレパートリーの徐々に大きな断片 (fraction) を有する VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスの複数のバージョンを生み出した (表 5 ; 図 5 A および 5 B)。VELOCIMMUNE (登録商標) 1 (V1) ヒト化マウスは、18 のヒト V_H 遺伝子セグメントおよびすべてのヒト D_H および J_H 遺伝子セグメントを、16 のヒト V_K 遺伝子セグメントおよびすべてのヒト κ 遺伝子セグメントと併せて有する。VELOCIMMUNE (登録商標) 2 (V2) ヒト化マウスおよび VELOCIMMUNE (登録商標) (V3) ヒト化マウスは、合計 39 の V_H および 30 の V_K および 80 の V_H および 40 の V_K をそれぞれ保有する増加した可変レパートリーを有する。マウス V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメント、ならびに V_K および J_K 遺伝子セグメントをコードするゲノム領域は完全に置換されたので、VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスにより産生される抗体が、マウス定常領域に連結されたヒト可変領域を含有する。マウス λ 軽鎖遺伝子座は、全てのバージョンの VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスにおいてインタクトなままであり、様々な VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化 κ 軽鎖遺伝子座の発現効率についてのコンパレータとして役立つ。

10

20

【0214】

免疫グロブリン重鎖および κ 軽鎖両方のヒト化について二重にホモ接合性のマウスを、実施例 1 で記載した対立遺伝子のサブセットから産生させた。二重ホモ接合型マウスを産生するための交配コースの間に観察されたすべての遺伝子型は、大体メンデル比で発生した。ヒト重鎖対立遺伝子の各々についてホモ接合性の雄後代は、妊性低減を示した。妊性低減はマウス ADAM6 活性の喪失に起因した。マウス重鎖可変遺伝子遺伝子座は、2 つのはめ込んだ機能的 ADAM6 遺伝子 (ADAM6 a および ADAM6 b) を含有する。マウス重鎖可変遺伝子遺伝子座のヒト化の間、挿入されたヒトゲノム配列は、ADAM6 偽遺伝子を含有した。マウス ADAM6 は、妊性に要求され得、それ故、ヒト偽遺伝子の存在にもかかわらず、ヒト化重鎖可変遺伝子遺伝子座におけるマウス ADAM6 遺伝子の欠如が、これらのマウスにおける妊性の低減をもたらした可能性がある。実施例 7 ~ 9 は、欠失したマウス ADAM6 遺伝子がヒト化重鎖可変遺伝子遺伝子座へと正確な配置で戻されること、およびヒト化重鎖免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスにおける野生型レベルの妊性の回復を記載する。

30

【0215】

【表 5】

表5

VELOCIMMUNE(登録商標) マウスのバージョン	重鎖			κ 軽鎖		
	ヒト	対立遺伝子	5' V _H	ヒト	対立遺伝子	5' V _κ
	V _H	伝子	遺伝子	V _κ	伝子	遺伝子
V1	18	18hV _H	V _H 1-18	16	16hV _κ	V _κ 1-16
V2	39	39hV _H	V _H 4-39	30	30hV _κ	V _κ 2-29
V3	80	80hV _H	V _H 3-74	40	40hV _κ	V _κ 2-40

【0216】

実施例 I I I

ヒト化免疫グロブリン遺伝子を有するマウスにおけるリンパ球集団

【0217】

3つの異なるバージョンの V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスにおける成熟 B 細胞集団をフローサイトメトリーによって評価した。

【0218】

簡単に言うと、標準的な方法を用いて、骨髄、脾臓および胸腺からの細胞懸濁液を作製した。BD Pharmingen FACS 染色緩衝液中 5×10^5 細胞/mL で細胞を再懸濁させ、抗マウス CD16/32 (BD Pharmingen) でブロッキングし、適切な抗体カクテルで染色し、BD C Y T O F I X (商標) で固定し、これらの作業はすべて製造業者の指示に従って行った。最終細胞ペレットを 0.5 mL 染色緩衝液に再懸濁させ、BD F A C S C A L I B U R (商標) および BD C E L L Q U E S T P R O (商標) ソフトウェアを使用して分析した。すべての抗体 (BD Pharmingen) を質量希釈/カクテルで調製し、 $0.5 \text{ mg} / 10^5$ 細胞の最終濃度まで添加した。骨髄 (A~D) 染色用の抗体カクテルは、次のとおりであった：A：抗マウス IgM^b-F I T C、抗マウス IgM^a-P E、抗マウス CD45R (B220)-A P C；B：抗マウス CD43 (S7)-P E、抗マウス CD45R (B220)-A P C；C：抗マウス CD24 (HSA)-P E；抗マウス CD45R (B220)-A P C；D：抗マウス B P-1-P E、抗マウス CD45R (B220)-A P C。脾臓および鼠蹊リンパ節 (E~H) 染色用の抗体カクテルは、次のとおりであった：E：抗マウス IgM^b-F I T C、抗マウス IgM^a-P E、抗マウス CD45R (B220)-A P C；F：抗マウス Ig、λ1、λ2、λ3 軽鎖-F I T C、抗マウス Ig κ 軽鎖-P E、抗マウス CD45R (B220)-A P C；G：抗マウス Ly6G/C-F I T C、抗マウス CD49b (DX5)-P E、抗マウス CD11b-A P C；H：抗マウス CD4 (L3T4)-F I T C、抗マウス CD45R (B220)-P E、抗マウス CD8a-A P C。結果を図 6 に示す。

【0219】

ホモ接合型 V E L O C I M M U N E (登録商標) ヒト化マウスの脾臓またはリンパ節から単離したリンパ球をマーカー B220 および IgM の表面発現について染色し、フロー

サイトメトリーを用いて分析した（図6）。試験したすべてのバージョンのVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおける $B220^{+}IgM^{+}$ 成熟B細胞集団のサイズは、それらが含有する V_H 遺伝子セグメントの数にかかわらず、実質的に野生型マウスのものと同一であった。加えて、ホモ接合性ハイブリッドヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有するマウスも、正常マウス免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座を有するが3つしか V_H 遺伝子セグメントを有さないマウス、またはホモ接合性ハイブリッドヒト化 κ 軽鎖と正常マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有するマウスでさえも、その末梢区画に正常な数の $B220^{+}IgM^{+}$ 細胞を有した（示さず）。これらの結果は、ヒト可変遺伝子セグメントおよびマウス定常領域を有するキメラ遺伝子座が、成熟B細胞区画に十分に集合できることを示している。さらに、重鎖または κ 軽鎖遺伝子座のいずれかにおける可変遺伝子セグメントの数、およびしたがって抗体レパトリーの理論的多様性は、成熟B細胞の野生型集団を産生する能力と相関しない。対照的に、ランダムに組み込まれた完全ヒト免疫グロブリン導入遺伝子および不活性化マウス免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスは、これらの区画に低減数のB細胞を有し、その欠損の重度は、導入遺伝子に含まれている可変遺伝子セグメントの数に依存する（Green, L. L. および Jakobovits, A. (1998) Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes, J Exp Med 188: 483-495）。これは、「in situ 遺伝子ヒト化」戦略が、「ノックアウト・プラス・トランスジェニック」アプローチで実現されるランダムに組み込まれる導入遺伝子とは基本的に異なる機能的帰結をもたらす結果となることの証拠となる。

【0220】

対立遺伝子排除および遺伝子座選択

【0221】

対立遺伝子排除（maintain allelic exclusion）を維持する能力を、異なるバージョンのヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性のマウスで調査した。

【0222】

129S6/SvEvTacおよびC57BL/6NTacヘテロ接合胚に由来するF1 ES系列（F1H4（Valenzuelaら、2003））で免疫グロブリン遺伝子座のヒト化を行った。ヒト重鎖生殖細胞系可変遺伝子配列を129S6対立遺伝子にターゲティングする。この対立遺伝子は IgM^a ハプロタイプを保有するが、未改変マウスC57BL/6N対立遺伝子は IgM^b ハプロタイプを有する。 IgM のこれらの対立遺伝子形態は、 IgM^a または IgM^b 対立遺伝子において見出される多型に特異的な抗体を使用してフローサイトメトリーにより区別することができる。図6（最下段）に示されているように、各バージョンのヒト化重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性のマウスにおいて同定されたB細胞は、単一の対立遺伝子、 IgM^a （ヒト化対立遺伝子）または IgM^b （野生型対立遺伝子）のいずれか、しか発現しない。これは、対立遺伝子排除に関与する機序が、VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおいてインタクトであることの証拠となる。加えて、ヒト化対立遺伝子（ IgM^a ）について陽性のB細胞の相対数は、存在する V_H 遺伝子セグメントの数に大体比例する。ヒト化免疫グロブリン遺伝子座は、18のヒト V_H 遺伝子セグメントを有するVELOCIMMUNE（登録商標）1ヒト化ヘテロ接合体マウスではB細胞のおおよそ30%において発現し、ならびに39および80のヒト V_H 遺伝子セグメントをそれぞれ有するVELOCIMMUNE（登録商標）2および3（示さず）ヒト化ヘテロ接合体マウスではB細胞の50%において発現する。注目に値することとして、ヒト化マウス対立遺伝子を発現する細胞の、野生型マウス対立遺伝子を発現する細胞に対する比（VELOCIMMUNE（登録商標）1ヒト化マウスについては0.5およびVELOCIMMUNE（登録商標）2ヒト化マウスについては0.9）は、ヒト化遺伝子座に含有される可変遺伝子セグメント数の、野生型遺伝

子座に含有される可変遺伝子セグメントの数に対する比 (VELOCIMMUNE (登録商標) 1 ヒト化マウスについては 0.2 および VELOCIMMUNE (登録商標) 2 ヒト化マウスについては 0.4) より大きい。これは、対立遺伝子選択の確率が、1 つもしくは他の染色体のランダム選択と任意の特定の V セグメント RSS のランダム選択の間の中間であることを示している。さらに、一方の対立遺伝子が組み換えに利用できるようになり、その過程を完了し、組換えを遮断し、その後、他方の対立遺伝子が利用能になる B 細胞が、すべてではないが、一部存在し得る。加えて、ハイブリッドヒト化重鎖遺伝子座または野生型マウス重鎖遺伝子座のいずれかに由来する表面 IgM (sIgM) を有する細胞の様な分布は、該ハイブリッド遺伝子座が正常レベルで動作している証拠である。対照的に、ランダムに組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、野生型マウス免疫グロブリン遺伝子座との競合が不十分である (Bruggemann, M. ら (1989) A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. PNAS 86, 6709-6713; Green ら (1994); Tuailon, N. ら (1993) Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in mu and gamma transcripts, Proc Natl Acad Sci USA 90: 3720-3724)。これは、さらに、VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスによって産生される免疫グロブリンが、「ノックアウト・プラス・トランスジェニック」アプローチによって作製されるマウスにおけるランダムに組み込まれた導入遺伝子によって産生されるものとは機能的に異なることの証拠となる。

【0223】

129S6 または C57BL/6N では、非ヒト化 κ 軽鎖遺伝子座に対するヒト化 κ 軽鎖遺伝子座の対立遺伝子排除の調査に C κ 領域の多型を利用できない。しかし、VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスすべてが野生型マウス λ 軽鎖遺伝子座を有するので、ヒト化 κ 軽鎖遺伝子座の再構成および発現がマウス λ 軽鎖発現を防止できるかどうかを観察することが可能である。マウス λ 軽鎖を発現する細胞の数に対するヒト化 κ 軽鎖を発現する細胞の数の比は、 κ 軽鎖遺伝子座に挿入されたヒト V κ 遺伝子セグメントの数にかかわらず、VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスでは野生型マウスと比べて比較的不变であった (図 6、上から三段目)。加えて、二重陽性 ($\kappa + \lambda$) 細胞数の増加は無く、このことから、ハイブリッド κ 軽鎖遺伝子座での生産的組換えが、マウス λ 軽鎖遺伝子座の組換えの適切な抑制をもたらす結果となることが示された。対照的に、ランダムに組み込まれた κ 軽鎖導入遺伝子と一野生型マウス λ 軽鎖遺伝子座ではなく一不活性化されたマウス κ 軽鎖遺伝子座を含有するマウスは、 λ / κ 比の劇的増大を示す (Jakobovits, 1998)。これは、導入された κ 軽鎖導入遺伝子が、かかるマウスでは十分に機能しないことを意味する。これは、さらに、「ノックアウト・プラス・トランスジェニック」マウスによって作製されるものと比較して VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスによって作製される免疫グロブリンにおいて観察される異なる機能的帰結の証拠となる。

【0224】

B 細胞発生。

【0225】

VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスにおける成熟 B 細胞集団は、(上に記載したように) 野生型マウスのものと似ているため、早期 B 細胞分化の欠陥を成熟 B 細胞集団の増殖によって補償することが可能である。フローサイトメトリーを用いて B 細胞集団を分析することによって、様々な B 細胞分化段階を調査した。表 6 は、特定の細胞表面マーカーを使用して、野生型同腹子と比較した VELOCIMMUNE (登録商標) ヒト化マウスにおける、FACS により定義した各 B 細胞系列の細胞の画分の比を示すものである。

【0226】

早期B細胞発生は骨髄で起こり、異なるB細胞分化段階は、細胞表面マーカー発現のタイプおよび量の変化によって特徴づけられる。これらの表面発現における差異は、細胞内部の免疫グロブリン遺伝子座で起こる分子の変化と相関する。プロB細胞からプレB細胞への移行には機能的重鎖タンパク質の再構成および発現の成功が必要であるが、プレBから成熟B期への移行は、κまたはλ軽鎖の正しい再構成および発現によって支配される。したがって、B細胞分化段階間の非効率的移行は、所与の段階のB細胞の関連集団の変化によって検出することができる。

【0227】

【表6】

10

表6

VELOCIMMUNE (登録商標)マウスのバージョン	骨髄				脾臓	
	プロB	プレB	未熟	成熟	出現	成熟
					B220 ^{hi}	
	CD43 ^{hi}	CD24 ^{hi}	B220 ^{lo}	B220 ^{hi}		B220 ^{hi}
					IgM ⁺	
	B220 ^{lo}	B220 ^{lo}	IgM ⁺	IgM ⁺		IgM ⁺
					IgD ⁺	
V1	1.1	1.0	0.9	1.0	1.1	1.0
V2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
V3	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1

20

【0228】

いずれのVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおいてもB細胞分化に大きな欠陥は認められなかった。VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおいて、ヒト重鎖遺伝子セグメントの導入はプロBからプレBへの移行に影響を及ぼすようには見えず、またヒトκ軽鎖遺伝子セグメントの導入はプレBからBへの移行に影響を及ぼさない。これは、ヒト可変領域およびマウス定常領域（constant）を保有する「逆キメラ」免疫グロブリン分子が、B細胞シグナル伝達および共受容体分子に関連して正常に機能して、マウス環境で適切なB細胞分化をもたらすことを実証している。対照的に、ランダムに組み込まれた免疫グロブリン導入遺伝子および不活性化された内因性重鎖またはκ軽鎖遺伝子座を含有するマウスでは、B細胞分化中の異なる集団間のバランスが様々な程度に摂動される（GreenおよびJakobovits（1998））。

30

【0229】

40

実施例IV

ヒト化免疫グロブリンマウスにおける可変遺伝子レパートリー

【0230】

脾細胞およびハイブリドーマ細胞を含む複数の源からのヒト可変領域の逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により、VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスのヒト化抗体レパートリーにおけるヒト可変遺伝子セグメントの使用量を分析した。可変領域配列、遺伝子セグメント使用量、体細胞超変異、および再構成可変領域遺伝子セグメントの接合部多様性を決定した。

【0231】

簡単に言うと、TRIZOL（商標）（Invitrogen）またはQiagen

50

RNEASY (商標) Mini Kit (Qiagen) を使用して $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 脾細胞または約 $10^4 \sim 10^5$ ハイブリドーマ細胞から全 RNA を抽出し、SUPERSCRIPT (商標) III One-Step RT-PCR システム (Invitrogen) を使用してマウス定常領域特異的プライマーでプライミングした。重鎖と κ 軽鎖の両方についてのヒト可変領域の各ファミリーのためのプールされたリーダープライマーとペアで上述の 3' 定常特異的プライマーを個々に使用して、各試料からの 2~5 μ L の RNA を用いて反応を行った。試薬およびプライマーの容量、および RT-PCR/PCR 条件は、製造業者の指示に従って行った。プライマー配列は、複数の源の基づいた (Wang, X. および Stollar, B. D. (2000) Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR, J Immunol Methods 244:217-225; Ig-primer sets, Novagen)。適宜、プールされたファミリー特異的フレームワークプライマーと第一の反応で使ったのと同じマウス 3' 免疫グロブリン定常特異的プライマーとを用いて第二のネステッド PCR 反応を行った。各反応からのアリコート (5 μ L) をアガロース電気泳動によって分析し、MONTAGE (商標) Gel Extraction Kit (Millipore) を使用してアガロースから反応生成物を精製した。TOPO (商標) TA Cloning System (Invitrogen) を使用して精製生成物をクローニングし、エレクトロポレーションにより DH10 β 大腸菌 (E. coli) 細胞に形質転換した。各形質転換反応から個々のクローンを選択し、2 mL の LB ブロス培養液 (LB broth culture) 中で抗生物質選択しながら一晩 37 $^{\circ}$ C で成長させた。キットベースアプローチ (Qiagen) により細菌培養物からプラスミド DNA を精製した。

【0232】

免疫グロブリン可変遺伝子の使用量。

【0233】

ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、重鎖クローンと κ 軽鎖クローン両方のプラスミド DNA を T7 リバースプライマーまたは M13 リバースプライマーのいずれかで配列決定した。生配列データを SEQUENCHER (商標) (v4.5, Gene Codes) にインポートした。各配列をコンティグに組み立て、IMGT V-Quest (Brochet, X. ら (2008) IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. Nucleic Acids Res 36:W503-508) 検索機能を用いてヒト免疫グロブリン配列にアラインして、ヒト V_H、D_H、J_H および V _{κ} 、J _{κ} セグメント使用量を同定した。体細胞超変異および組換え接合部分析のために配列を生殖細胞系配列と比較した。

【0234】

RAG 相補性 (Chen, J. ら (1993) RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development, Proc Natl Acad Sci USA 90:4528-4532) による最初の重鎖改変 (3h V_H-CRE ハイブリッド対立遺伝子、図 2A の最下部) を含有する ES 細胞からマウスを産生させ、脾細胞 RNA から cDNA を調製した。挿入されたヒト遺伝子セグメント内での V (D) J 組換えおよびその後のマウス IgM 定常ドメインまたは IgG 定常ドメインのいずれかへのスプライシングによって生ずることになる予測キメラ重鎖 mRNA に特異的なプライマーセット (上記) 使用して、その cDNA を増幅させた。これらの cDNA クローンに由来する配列 (示さず) は、正しい V (D) J 組換えがヒト可変遺伝子配列内で発生したこと、再構成されたヒト V (D) J 遺伝子セグメントがインフレームでマウス定常ドメインへと正しくスプライシングしたこと、およびクラススイッ

チ組換えが発生したことを実証した。後続のハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座のmRNA産物のさらなる配列分析を行った。

【0235】

同様の実験で、免疫していない野生型およびVELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスからのB細胞をフローサイトメトリーによりB220およびIgMまたはIgGの表面発現に基づいて分離した。B220⁺IgM⁺または表面IgG⁺（sIgG⁺）細胞をプールし、RT-PCR増幅およびクローニング（上記）の後にV_HおよびV_κ配列を得た。非免疫VELOCIIMMUNE（登録商標）1ヒト化マウス（表7）およびVELOCIIMMUNE（登録商標）3ヒト化マウス（表8）からの1セットのRT-PCR増幅cDNAにおける代表的な遺伝子使用量を記録した（*不完全RSS（defective RSS）；†欠けているか偽遺伝子）。

【0236】

【表7-1】

表7

V _H	実測	D _H	実測	V _κ	実測
1-18	3	1-1	1	1-16	2
1-17P	0	2-2	2	3-15	1
3-16*	0	3-3	4	1-12	5
3-15	13	4-4	0	3-11	1
3-13	9	5-5	0	1-9	5
3-11	6	5-18	4	1-8	2
3-9	8	6-6	5	3-7*	0
1-8	6	1-7	7	1-6	5
3-7	2	2-8	0	1-5	8
2-5	2	3-9	4	5-2	6
1-3	0	3-10	2	4-1	8
1-2	11	4-11	1		
6-1	5	5-12	1	J _κ	実測

【0237】

【表 7－2】

J _H 実測		6-13	3	1	12
1	2	1-14	0	2	10
2	1	2-15	0	3	5
3	8	3-16	1	4	10
4	33	4-17	0	5	0
5	5	6-19	2		
6	16	1-20	2		
		2-21	1		
		3-22	0		
		4-23	2		
		5-24	1		
		6-25	1		
		1-26	6		
		7-27	10		

10

20

【 0 2 3 8 】

【表 8 - 1】

表8

V _H 実測		D _H 実測		V _K 実測	
7-81†	0	1-1	7	2-40	1
3-74†	0	2-2	8	1-39	34
3-73	1	3-3	9	1-37	2
3-72	2	4-4	4	1-33	35
2-70	2	5-5	6	2-30	8
1-69	3	5-18	6	2-29	2
3-66	1	6-6	29	2-28	7
3-64	1	1-7	30	1-27	5
4-61	1	2-8	4	2-24	7
4-59	10	3-9	8	6-21*	3
1-58	0	3-10	10	3-20	10
3-53	0	4-11	4	1-17	13
5-51	5	5-12	5	1-16	10
3-49	2	6-13	17	3-15	13
3-48	7	1-14	2	1-12	13
1-46	1	2-15	3	3-11	13
1-45	0	3-16	4	1-9	11
3-43	10	4-17	3	1-8	1
4-39	4	6-19	8	3-7*	0
3-38*	0	1-20	3	1-6	6
3-35*	0	2-21	1	1-5	7
4-34	8	3-22	5	5-2	0
3-33	14	4-23	2	4-1	21
4-31	4	5-24	2		
3-30	13	6-25	2	J _K 実測	

10

20

30

40

【 0 2 3 9】

【表 8 - 2】

4-28	0	1-26	17	1	50
2-26	0	7-27	7	2	37
1-24	3	J _H 実測			
3-23	18				
3-21	0				
3-20	0				
1-18	4				
1-17P	1	1	2	3	28
3-16*	0	2	8	4	64
3-15	13	3	26	5	22
3-13	6	4	95	6	
3-11	5	5	11		
3-9	31	6	58		
1-8	7				
3-7	11				
2-5	1				
1-3	0				
1-2	6				
6-1	9				

10

20

30

【0240】

表7および8に示したように、機能的ヒトV_H、D_H、J_H、V_κおよびJ_κ遺伝子セグメントのほぼすべてが利用される。この実験のVELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスでは検出されなかったが記載した機能的可変遺伝子セグメントのうちの幾つかは、不完全組換えシグナル配列（RSS）を保有すると報告されており、それ故、発現することは期待されないことになる（Feeney, A. J. (2000) Factors that influence formation of B cell repertoire, Immunol Res 21:195-202）。ナイーブレパートリーと免疫レパートリーの両方から単離された、様々なVELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスからの免疫グロブリン配列の幾つかの他のセットの分析は、これらの遺伝子セグメントの使用量を、より低い頻度においてではあるが示した（データを示さない）。集合体遺伝子使用量データは、VELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスが含有するすべての機能的ヒトV_H、D_H、J_H、V_κおよびJ_κ遺伝子セグメントが、様々なナイーブおよび免疫レパートリーにおいて観察されることを示した（データを示さない）。ヒトV_H7-81遺伝子セグメントは、ヒト重鎖遺伝子座配列の分析で同定されている（Matsuda, F. ら(1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, J Exp

40

50

Med 188:2151-2162)が、全VELOCIIMMUNE(登録商標)3ヒト化マウスゲノムの再配列決定により確認したところ、VELOCIIMMUNE(登録商標)ヒト化マウスには存在しない。

【0241】

抗体の重および軽鎖の配列が、特に再構成可変ドメイン内の短鎖ポリペプチドセグメントにおいて、例外的な可変性を示すことは公知である。これらの領域は、超可変領域または相補性決定領域(CDR)として公知であり、抗体分子の構造内に抗原の結合部位を作る。介在ポリペプチド配列は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。重鎖と軽鎖の両方に3つのCDR(CDR1、CDR2、CDR3)および4つのFR(FR1、FR2、FR3、FR4)がある。1つのCDR(CDR3)は、このCDRがV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントとV_κおよびJ_κ遺伝子セグメントの両方の組換えによって作られ、抗原と遭遇する前に相当量のレパートリー多様性を生じさせる点でユニークである。この接合は、エキソヌクレアーゼ活性によるヌクレオチド欠失と末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(TdT)による非テンプレートコード付加(non-template encoded addition)の両方のため正確ではなく、それ故、組換え過程の結果として新規配列を可能とする。FRは、全体としては可変領域の高い変異性のため実質的な体細胞変異を示すことができるが、しかし、可変性は、可変領域全域に均等に分布されない。CDRは、抗原結合を可能にする、抗体分子の表面に集中および局在する高可変領域である。接合部多様性を実証する、VELOCIIMMUNE(登録商標)ヒト化マウスからの選択された抗体のCDR3接合部周囲の重鎖および軽鎖配列を、図7Aおよび7Bにそれぞれ示す。

【0242】

図7Aに示すように、非テンプレートコードヌクレオチド付加(N-付加)が、VELOCIIMMUNE(登録商標)ヒト化マウスからの抗体におけるV_H-D_H接合とD_H-J_H接合の両方において認められ、これは、ヒトセグメントに関するTdTの正しい機能を示している。V_H、D_HおよびJ_Hセグメントの、該セグメントの生殖細胞系カウンターパートと比較しての終点は、エンドヌクレアーゼ活性も発生したことを示している。重鎖遺伝子座とは異なり、ヒトκ軽鎖再構成は、V_κおよびJ_κセグメントの組換えによって形成されるCDR3でのTdT付加が殆どまたは全く示さない(図7B)。これは、プレB細胞からB細胞への移行のときの軽鎖再構成中にマウスにおけるTdT発現の欠如に起因すると予想される。再構成ヒトV_κ領域のCDR3で観察される多様性は、主として、組換え事象中にエキソヌクレアーゼ活性によって導入される。

【0243】

体細胞超変異。

【0244】

体細胞超変異と呼ばれるプロセスにより、胚中心反応中に再構成免疫グロブリン遺伝子の可変領域にさらなる多様性が加えられる。体細胞変異可変領域を発現するB細胞は、濾胞樹状細胞によって提示される抗原への接近について他のB細胞と競合する。抗原に対してより高い親和性を有するこれらのB細胞は、末梢へと出ていく前にさらに増殖し、クラススイッチされる。それ故、スイッチされたアイソタイプを発現するB細胞は、典型的に抗原に遭遇し、胚中心反応を経たものであり、ナイーブB細胞に比べて増加した変異数を有する。さらに、主としてナイーブsIgM⁺B細胞からの可変領域配列は、抗原選択を受けたsIgG⁺B細胞からの可変配列より相対的に少ない変異を有すると予想されよう。

【0245】

免疫していないVELOCIIMMUNE(登録商標)ヒト化マウスからのsIgM⁺もしくはsIgG⁺B細胞または免疫したマウスからのsIgG⁺B細胞からの、ランダムV_HまたはV_κクローンからの配列を、その生殖細胞系可変遺伝子セグメントと比較し、生殖細胞系配列に対する変化に注釈を付けた。得られたヌクレオチド配列をコンピュータで翻訳し、アミノ酸変化をもたらす変異にも注釈を付けた。すべての可変領域からデータ

を照合し、所与の位置での変化率を算定した（図8）。

【0246】

図8に示すように、免疫していないVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスからのsIgG⁺B細胞に由来するヒト重鎖可変領域は、同じ脾細胞プールからのsIgM⁺B細胞に比べてより多くのヌクレオチドを示し、免疫したマウスに由来する重鎖可変領域は、さらに多くの変化を示す。変化の数は、フレームワーク領域に比べて相補性決定領域（CDR）において増えており、これは抗原選択を示す。ヒト重鎖可変領域からの対応するアミノ酸配列も、IgMに比べてIgGのほうが有意に多い変異の数、および免疫したIgGのほうがさらにいっそう多い数を示す。これらの変異もまた、フレームワーク配列と比較してCDR内においてのほうが頻度が高いようであり、これは、抗体がin vivoで抗原選択されたことを示唆している。ヌクレオチド変異数とアミノ酸変異数の同様の増加が、免疫したマウスからのIgG⁺B細胞に由来するVκ配列に見出される。

10

【0247】

VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおいて観察された遺伝子使用量および体細胞超変異は、これらのマウスにおいて、存在する本質的にすべての遺伝子セグメントが、完全機能性逆キメラ抗体を形成するように再構成できることを実証している。さらに、VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウス由来抗体は、マウス免疫系内で、親和性選択および成熟に至るよう充分に関与して、その標的抗原を効果的に中和できる完全成熟ヒト抗体を作製する。VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、複数のクラスの抗原への頑強な免疫応答を開始することができ、その結果、高親和性でもあり治療使用に好適でもある広範なヒト抗体の利用がもたらされる（データを示さない）。

20

【0248】

実施例V

リンパ系構造および血清アイソタイプの分析

【0249】

H&Eで染色した野生型またはVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスからの組織試料の脾臓、鼠蹊リンパ節、バイエル板および胸腺の全体構造を光学顕微鏡法によって調査した。野生型およびVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスから採集した血清中の免疫グロブリンアイソタイプのレベルを、LUMINEX（商標）技術を用いて分析した。

30

【0250】

リンパ系器官構造。

【0251】

リンパ系組織の構造および機能は、造血細胞の正しい発生に一部依存する。B細胞発生または機能の欠陥は、リンパ系組織の構造の変化として示され得る。染色組織切片の分析により、野生型マウスとVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスの間に二次リンパ系器官の外観の有意差は特定されなかった（データを示さない）。

【0252】

血清免疫グロブリンレベル。

【0253】

各アイソタイプの発現レベルは、野生型マウスとVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスで類似している（図9A、9Bおよび9C）。これは、可変遺伝子セグメントのヒト化が、クラススイッチまたは免疫グロブリン発現および分泌に明白な有害作用を及ぼさず、したがって、これらの機能に必要なすべての内因性マウス配列を明白に維持することを実証している。

40

【0254】

実施例VI

ヒト化免疫グロブリンマウスにおける免疫および抗体産生

異なるバージョンのVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスを抗原で免疫して、外来抗原攻撃に対する体液性応答を調査した。

50

【0255】

免疫およびハイブリドーマ開発。

【0256】

VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスおよび野生型マウスをタンパク質、DNA、DNAとタンパク質の組み合わせ、または抗原を発現する細胞の形態の抗原で免疫することができる。典型的には、動物に3週間ごとに合計2から3回、追加免疫する。各抗原を追加免疫後、各動物から血清試料を採集し、血清力価決定により抗原特異的抗体応答について分析する。融合前に、必要に応じて5 μ gのタンパク質またはDNAの融合前最終追加免疫を、腹腔内注射および／または静脈内注射によってマウスに施した。脾細胞を回収し、電気融合チャンバ内で製造業者の提案プロトコル（Cyt o Pulse Sciences Inc.、メリーランド州グレンバーニー）に従ってAg 8. 653 骨髓腫細胞に融合させる。培養の10日後、ELISAアッセイ（Harlow, E. および Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York）を用いてハイブリドーマを抗原特異性についてスクリーニングする。あるいは、免疫したVELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスから抗原特異的B細胞を直接単離し、本明細書に記載のものを含む標準的な技術を用いてスクリーニングして、対象となる抗原に特異的なヒト抗体を得る。

10

【0257】

血清力価決定。

20

【0258】

動物抗抗原血清応答をモニターするために、各追加免疫の約10日後に血清試料を採集し、抗原特異的ELISAを用いてその力価を決定する。簡単に言うと、Nunc MAXISORP（商標）96ウェルプレートに2 μ g/mLの抗原で一晩、4℃で被覆し、それをウシ血清アルブミン（Sigma、ミズーリ州セントルイス）でブロッキングする。3倍希釈系列の血清試料を1時間、室温でプレートに結合させる。その後、0.05% Tween-20を含有するPBSでそのプレートを洗浄し、全IgG力価についてはHRP結合体化ヤギ抗マウスFc（Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州ウエストグローヴ）をまたはアイソタイプ特異的力価についてはビオチン標識アイソタイプ特異的ポリクローナル抗体もしくは軽鎖特異的ポリクローナル抗体（Southern Biotech Inc.）をそれぞれ使用して結合IgGを検出する。ビオチン標識抗体については、プレート洗浄後、HRP結合体化ストレプトアビジン（Pierce、イリノイ州ロックフォード）を添加する。BD OPTEDIA（商標）（BD Biosciences Pharmingen、カリフォルニア州サンディエゴ）などの比色基質を使用してすべてのプレートを顕色させる。1Mリン酸で反応を停止させた後、450nmでの光吸収を記録し、Graph PadからのPRISM（商標）ソフトウェアを使用してデータを分析する。バックグラウンドシグナルの2倍のシグナルを得るために必要な希釈度を力価と定義する。

30

【0259】

1つの実験では、VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスをヒトインターロイキン-6受容体（hIL-6R）で免疫した。hIL-6Rで免疫したVELOC IMMUNE（登録商標）および野生型マウスについての血清力価の代表セットを図10Aおよび10Bに示す。

40

【0260】

VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスおよび野生型マウスは、同様の力価範囲でIL-6Rに対する強い応答を開始した（図10A）。VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化コホートおよび野生型コホートからの数匹のマウスは、単回抗原追加免疫後に最大応答に達した。これらの結果は、この抗原に対する免疫応答強度および動態は、VELOC IMMUNE（登録商標）ヒト化マウスおよび野生型マウスにおいて同様であったことを示す。これらの抗原特異的抗体応答をさらに分析して、血清中で見出される

50

抗原特異的抗体の特定のアイソタイプを調査した。V E L O C I M M U N E（登録商標）ヒト化群と野生型群の両方が主として I g G 1 応答を惹起した（図 1 0 B）。これは、体液性応答中のクラススイッチが各タイプのマウスにおいて同様であることを示唆している。

【0261】

溶液中の抗原への抗体結合の親和性決定。

【0262】

抗原に対する抗体結合親和性を決定するために、E L I S A ベースの溶液競合アッセイが典型的に設計される。

【0263】

簡単に言うと、順化培地中の抗体を、0 から 1 0 m g / m L の範囲の抗原タンパク質の希釈系列とプレミックスする。次に、その抗体と抗原の混合物の溶液を 2 から 4 時間、室温で、結合平衡に達するまでインキュベートする。次に、その混合物中の遊離抗体の量を、定量的サンドイッチ E L I S A を用いて測定する。P B S 溶液中の 1 μ g / m L の抗原タンパク質で一晩、4 $^{\circ}$ C で 9 6 ウェル M A X I S O R B（商標）プレート（V W R、ペンシルバニア州ウエストチェスター）を被覆し、その後、B S A での非特異的ブロッキングを行う。次に、その抗体-抗原混合物溶液をこれらのプレートに移し、その後、1 時間インキュベートする。次に、そのプレートを洗浄緩衝液で洗浄し、プレートに結合した抗体を H R P 結合体化ヤギ抗マウス I g G ポリクローナル抗体試薬（J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b）で検出し、B D O P T E I A（商標）（B D B i o s c i e n c e s P h a r m i n g e n、カリフォルニア州サンディエゴ）などの比色基質を使用して顕色させた。1 M リン酸で反応を停止させた後、4 5 0 n m での光吸収を記録し、G r a p h P a d からの P R I S M（商標）ソフトウェアを使用してデータを分析する。溶液中の抗原の濃度に対するシグナルの依存度を 4 パラメータフィット分析で分析し、I C ₅₀（溶液中に抗原が存在しない抗体試料からのシグナルの 5 0 % 低減を達成するために必要な抗原濃度）として報告する。

【0264】

1 つの実験では、V E L O C I M M U N E（登録商標）ヒト化マウスを h I L - 6 R で免疫した（上記のとおり）。図 1 1 A および 1 1 B は、V E L O C I M M U N E（登録商標）ヒト化マウスおよび野生型マウスからの抗 h I L 6 R 抗体についての親和性測定値の代表セットを示すものである。

【0265】

免疫したマウスに 3 回目の抗原追加免疫を施した後、E L I S A により血清力価を決定する。選択した野生型マウスコホートおよび V E L O C I M M U N E（登録商標）ヒト化マウスコホートから脾細胞を単離し、A g 8 . 6 5 3 骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを形成し、選択下で成長させた（上記のとおり）。産生された合計 6 7 1 の抗 I L - 6 R ハイブリドーマのうち、2 3 6 は、抗原特異的抗体を発現することが判明した。抗原陽性ウェルから回収した培地を使用して、溶液競合 E L I S A を用いて抗原への結合の抗体親和性を決定した。V E L O C I M M U N E（登録商標）ヒト化マウス由来の抗体は、溶液中の抗原への結合に関して広範な親和性を示す（図 1 1 A）。さらに、2 3 6 の抗 I L - 6 R ハイブリドーマのうちの 4 9 は、i n v i t r o バイオアッセイにおいて I L - 6 の受容体への結合を遮断することが判明した（データを示さない）。さらに、これらの 4 9 の抗 I L - 6 R 遮断抗体は、野生型マウスの並行免疫に由来する遮断抗体のものと同様の範囲の高い溶液親和性を示した（図 1 1 B）。

【0266】

実施例 V I I

マウス A D A M 6 ターゲティングベクターの構築

V E L O C I G E N E（登録商標）遺伝子工学技術（上記）を用いて、マウス A D A M 6 a および A D A M 6 b 遺伝子のヒト化重鎖遺伝子座への挿入のためのターゲティングベクターを構築して、D r . F r e d A l t（H a v a r d U n i v e r s i t y）か

ら入手した細菌人工染色体 (BAC) 929d24 を改変した。マウス ADAM6 a および ADAM6 b 遺伝子を含むゲノム断片と、ヒト化重鎖遺伝子座のヒト V_H 1-2 遺伝子セグメントとヒト V_H 6-1 遺伝子セグメントの間にあるヒト ADAM6 偽遺伝子 (hADAM6Ψ) の標的欠失のためのハイグロマイシンカセットとを含むように、929d24 BAC DNA を操作して作製した (図 12)。

【0267】

まず、マウス ADAM6 b 遺伝子と約 800 bp の上流 (5') 配列と約 4800 bp の下流 (3') 配列とを含むゲノム断片を 929d24 BAC クローンからサブクロニングした。マウス ADAM6 a 遺伝子と約 300 bp の上流 (5') 配列と約 3400 bp の下流 (3') 配列とを含む第二のゲノム断片を、別途、929d24 BAC クローンからサブクロニングした。マウス ADAM6 b 遺伝子および ADAM6 a 遺伝子を含む 2 つのゲノム断片を、Frt 組換え部位が隣接するハイグロマイシンカセットにライゲートして、ターゲティングベクター (マウス ADAM6 ターゲティングベクター、図 20; 配列番号 3) を作製した。ヒト化重鎖遺伝子座へのライゲーションのためにマウス ADAM6 b 遺伝子に続いてそのターゲティングベクターの 5' 末端上およびマウス ADAM6 a 遺伝子に続いてその 3' 末端上に異なる制限酵素認識部位を操作して作製した (図 12 の下部)。

【0268】

マウス重鎖遺伝子座の、ヒト重鎖遺伝子座での置換を含む BAC クローンは、マウス ADAM6 ターゲティングベクターの後続のライゲーションのために、ヒト化遺伝子座のヒト V_H 1-2 遺伝子セグメントとヒト V_H 6-1 遺伝子セグメントの間にあるヒト ADAM6 偽遺伝子を含む別の改変を施した (図 13)。

【0269】

簡単に言うと、loxP 組換え部位が隣接するネオマイシンカセットを、ヒト V_H 1-2 遺伝子セグメントの 3' (hADAM6Ψ に対して 5') およびヒト V_H 6-1 遺伝子セグメントの 5' (hADAM6Ψ に対して 3'; 図 13 の中央参照) の位置に、ヒトゲノム配列を含むホモロジーアームを含むように、操作して作製した。このターゲティング構築物の挿入部位の場所は、ヒト ADAM6 偽遺伝子の約 1.3 kb 5' 側かつ約 350 bp 3' 側であった。このターゲティング構築物にマウス ADAM6 ターゲティングベクターと同じ制限酵素認識部位も含めて、ヒト ADAM6 偽遺伝子の欠失を含む改変 BAC クローンとマウス ADAM6 ターゲティングベクターの間での後続の BAC ライゲーションを可能にした。

【0270】

両方の構築物に由来する BAC DNA の消化後、そのゲノム断片を互いにライゲートして、マウス ADAM6 a および ADAM6 b スクレオチド配列を含む、異所に配置されたゲノム配列を含むヒト化重鎖遺伝子座を含む、操作して作製した BAC クローンを構築した。ヒト化重鎖遺伝子座内のヒト ADAM6 遺伝子の欠失と、ES 細胞へのマウス ADAM6 a および ADAM6 b 配列の挿入のための最終のターゲティング構築物は、5' から 3' へ、ヒト V_H 1-2 遺伝子セグメントの 3' の約 1.3 kb のヒトゲノム配列を含む 5' ゲノム断片; マウス ADAM6 b 遺伝子の下流の約 800 bp のマウスゲノム配列; マウス ADAM6 b 遺伝子; マウス ADAM6 b 遺伝子の上流の約 4800 bp のゲノム配列; 5' Frt 部位; ハイグロマイシンカセット; 3' Frt 部位; マウス ADAM6 a 遺伝子の下流の約 300 bp のマウスゲノム配列; マウス ADAM6 a 遺伝子; マウス ADAM6 a 遺伝子の上流の約 3400 bp のマウスゲノム配列; そしてヒト V_H 6-1 遺伝子セグメントの 5' の約 30 kb のヒトゲノム配列を含む 3' ゲノム断片を含む (図 13 の下部)。

【0271】

操作して作製した BAC クローン (上記) を使用して、ヒト化重鎖遺伝子座を含むマウス ES 細胞をエレクトロポレートして、ヒト化重鎖遺伝子座内にマウス ADAM6 a および ADAM6 b 配列を含む、異所に配置されたマウスゲノム配列を含む改変 ES 細胞

を作製した。ヒト化重鎖遺伝子座内に異所性マウスゲノム断片を含有する陽性ES細胞を、TAQMAN（商標）プローブを使用する定量的PCRアッセイ（Lie, Y. S. および Petropoulos, C. J. (1998) *Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays*. *Curr Opin Biotechnol* 9 (1): 43-48) によって同定した。ヒト化重鎖遺伝子座の改変部分の外側の上流および下流領域を、該改変領域内に配置したプライマーおよびプローブを使用してPCRにより確認して、ヒト化重鎖遺伝子座内の異所性マウスゲノム配列の存在およびハイグロマイシンカセットの存在を確認した。上流挿入点にわたるヌクレオチド配列には、次のものが含まれ、これは、該挿入点の上流のヒト重鎖ゲノム配列と、該挿入点に存在するマウスゲノム配列に隣接して連結されている（下のカッコ内に入っている）I-Ceu I制限酵素認識部位とを示すものである：（CCAGCTTCAT TAGTAATCGT TCATCTGTGG TAAAAAGGCA GGATTTTGAAG CGATGGGAAGA TGGGAGTACG GGGCGTTTGA AGACAAAGTG CCACACAGCG CAGCCTTCTGT CTAGACCCCC GGGCTAACTA TAACGGTCTCT AAGGTAGCGA G)GGGATGACAG ATTCTCTGTT CAGTGCACCTC AGGGTCTGCC TCCACGAGAA TCACCATGCC CTTTCTCAAG ACTGTGTCTT GTGCAGTGCC CTGTCTAGTTGG（配列番号4）。標的領域の3'端の下流挿入点にわたるヌクレオチド配列には、次のものが含まれ、これは、マウスゲノム配列と、該挿入点の下流のヒト重鎖ゲノム配列に隣接して連結されている（下のカッコ内に入っている）P-I-Sce I制限酵素認識部位とを示すものである：（AGGGGTCTGAG GGGGAATTTT ACAAAGAACAAAGAAGCGGG CATCTGCTGA CATGAGGGCC GAAGTCAAGC TCCAGGCAGC GGGAGCTCCA CCGCGGGTGGC GC CATTTTCAT TACCTCTTTT TCCGCACCCG ACATAGATAAAGCTT)ATCCCCCACCC AAGCAAATCC CCCTACCTGG GGCCGAGCTT CCGGTATGTG GGAAAATGAA TCCCTGAGGT CGATTGCTGC ATGCAAATGAA ATTCAACTAG（配列番号5）。

【0272】

上に記載した標的ES細胞をドナーES細胞として使用し、VELOCIMOUSE（登録商標）マウスの工学的作製方法（例えば、米国特許第7,6598,442号、同第7,576,259号および同第7,294,754号参照）により8細胞期マウス胚に導入した。マウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む異所性マウスゲノム配列を含有するヒト化重鎖遺伝子座を保有するマウスを、該ヒト化重鎖遺伝子座内のマウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子の存在を検出する対立遺伝子アッセイ（Valenzuelaら、2003）の改良法を用いる遺伝子型解析によって同定した。

【0273】

マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子を含有するヒト化重鎖遺伝子座を保有するマウスをFLPeドナーマウス系統（例えば、Rodriguez, C. I. ら（2000）*High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP*. *Nature Genetics* 25: 139-140参照）と交配させて、例えばES細胞期でまたは胚で除去されないターゲティングベクターによって導入された一切のFRT化（FRTed）ハイグロマイシンカットを除去した。必要に応じて、ハイグロマイシンカセットをマウス内に保持した。

【0274】

子を遺伝子型解析し、マウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む異所性マウスゲノム断片を含有するヒト化重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性の子を、マウスADAM6遺伝子発現および妊性の特徴づけのために選択した。

【0275】

実施例 V I I I

A D A M 6 レスキューマウスの特徴づけ
フローサイトメトリー。

【0276】

ヒト重およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性 (H/κ) の25週齢の3匹のマウスと、ヒト重鎖遺伝子座の両方の対立遺伝子内にマウスA D A M 6 aおよびA D A M 6 b遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重およびヒトκ軽鎖についてホモ接合性 (H/κ-A 6) の18~20週齢の3匹のマウスを、B D L S R I I S y s t e m (B D B i o s c i e n c e) でのF A C sによるリンパ球細胞集団の同定および分析のために屠殺した。リンパ球を特定の細胞系列についてゲートし、B細胞発生の様々な段階を経る発達について分析した。動物から採集した組織としては、血液、脾臓および骨髄が挙げられる。E D T Aが入っているB D マイクロテイナチューブ (B D B i o s c i e n c e s) に血液を採集した。ウシ胎仔血清とビルビン酸ナトリウムとH E P E Sと2-メルカプトエタノールと非必須アミノ酸とゲンタマイシンとを補充した完全R P M I培地でフラッシュすることにより大腿骨から骨髄を採集した。血液、脾臓および骨髄調製物からの赤血球を塩化アンモニウム系溶解緩衝液 (例えば、A C K 溶解緩衝液) で溶解し、その後、完全R P M I培地で洗浄した。

【0277】

細胞集団を染色するために、様々な組織源からの 1×10^6 細胞を氷上で10分間、抗マウスC D 1 6 / C D 3 2 (2. 4 G 2、B D B i o s c i e n c e s) と共にインキュベートし、その後、下記の抗体カクテルの1つまたは組み合わせで30分間、氷上で標識した。

【0278】

骨髄：抗マウスF I T C - C D 4 3 (1 B 1 1、B i o L e g e n d)、P E - c k i t (2 B 8、B i o L e g e n d)、P e C y 7 - I g M (I I / 4 1、e B i o s c i e n c e)、P e r C P - C y 5. 5 - I g D (1 1 - 2 6 c. 2 a、B i o L e g e n d)、A P C - e F l u o r 7 8 0 - B 2 2 0 (R A 3 - 6 B 2、e B i o s c i e n c e)、A 7 0 0 - C D 1 9 (1 D 3、B D B i o s c i e n c e s)。

【0279】

末梢血および脾臓：抗マウスF I T C - κ (1 8 7. 1、B D B i o s c i e n c e s)、P E - λ (R M L - 4 2、B i o L e g e n d)、P e C y 7 - I g M (I I / 4 1、e B i o s c i e n c e)、P e r C P - C y 5. 5 - I g D (1 1 - 2 6 c. 2 a、B i o L e g e n d)、A P C - C D 3 (1 4 5 - 2 C 1 1、B D)、A 7 0 0 - C D 1 9 (1 D 3、B D)、A P C - e F l u o r 7 8 0 - B 2 2 0 (R A 3 - 6 B 2、e B i o s c i e n c e)。標識された抗体と共にインキュベートした後、細胞を洗浄し2%ホルムアルデヒドで固定した。データ収集をL S R I I フローサイトメーターで行い、F l o w J oで分析した。代表H/κおよびH/κ-A 6マウスからの結果を図14~18に示す。

【0280】

結果は、H/κ-A 6マウスのB細胞が、骨髄および末梢区画においてH/κマウスと同様の様式でB細胞発生段階を経て発達すること、それらが末梢に入ると正常な成熟パターンを示すことを実証している。H/κ-A 6マウスは、H/κマウスと比較して増大したC D 4 3^{int} C D 1 9⁺細胞集団を明示した (図16B)。これにより、H/κ-A 6マウスにおける、マウスA D A M 6 aおよびA D A M 6 b配列を含む異所性マウスゲノム断片を含有するヒト化重鎖遺伝子座からI g M発現の促進を示すことができる。末梢では、H/κ-A 6マウスのBおよびT細胞集団は、正常であり、H/κマウスと同様である。

【0281】

精巣の形態および精子の特徴づけ。

10

20

30

40

50

【0282】

ヒト化免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座を有するマウスにおける不妊性が、精巣および／または精子産生の欠陥に起因するかどうかを決定するために、精巣の形態および精巣上体の精子含有量を調査した。

【0283】

簡単に言うと、1群につき5匹のマウスの2つの群（群1：ヒト重鎖およびκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス、mADAM6^{-/-}；群2：ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてヘテロ接合性およびκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス、mADAM6^{+/-}）から精巣をインタクトな精巣上体と共に切開し、計量した。次に、その検体を固定し、パラフィンに包埋し、切片にし、ヘマトキシリンおよびエオシン（HE）染色剤で染色した。精巣切片（マウス1匹につき2つの精巣、合計20）を形態の欠陥および精子産生の証拠について調査し、一方、精巣上体切片を精子の存在について調査した。

10

【0284】

この実験では、mADAM6^{-/-}マウスとmADAM6^{+/-}マウスとの間で精巣重量の差も形態の差も観察されなかった。すべての遺伝子型において、精巣および精巣上体の両方において、精子が観察された。これらの結果は、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子の不在が、精巣形態の検出可能な変化をもたらさないこと、ならびにマウスにおいてこれら2つの遺伝子の存在下および不在下で精子が産生されることを確認する。したがって、雄ADAM6^{-/-}マウスの妊性の欠陥が低い精子産生量に起因する可能性は低い。

20

【0285】

精子の運動能および移動。

【0286】

他のADAM遺伝子ファミリーメンバーが無いマウスは、精子の運動能または移動の欠陥に起因して不妊性である。精子の移動は、子宮から卵管に進む精子の能力と定義され、通常、マウスの受精に必要である。マウスADAM6aおよびADAM6bの欠失がこのプロセスに影響を及ぼすかどうかを決定するために、mADAM6^{-/-}マウスにおける精子の移動を評価した。精子の運動能もまた検査した。

【0287】

簡単に言うと、（1）ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてヘテロ接合性およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ADAM6^{+/-}）；（2）ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ADAM6^{-/-}）；（3）ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性および野生型κ軽鎖についてホモ接合性のマウス（ADAM6^{-/-}mκ）；および（4）野生型C57BL/6マウス（WT）の精巣から精子を得た。検査により精子数または総合的精子運動能に重大な異常は認められなかった。すべてのマウスについて、卵丘細胞分散（cumulus dispersal）が観察された。これは、各精子試料がin vitroで卵丘細胞に侵入して透明帯を結合できることを示していた。これらの結果は、ADAM6^{-/-}マウスが、卵丘に侵入して透明帯を結合し得る精子を有することを確認する。

30

40

【0288】

in vitroでのマウス卵子の受精（IVF）を、上記のマウスからの精子を使用して行った。IVFの翌日にADAM6^{-/-}についてやや少ない数の卵割胚が存在し、卵子に結合した精子の低減数も観察された。これらの結果は、ADAM6^{-/-}マウスからの精子が、卵子に曝露されると、卵丘に侵入して透明帯を結合し得ることを確認する。

【0289】

もう1つの実験では、子宮から卵管を通して移動するADAM6^{-/-}マウスからの精子の能力を精子移動アッセイで決定した。

【0290】

50

簡単に言うと、5匹の過排卵雌マウスの第一の群を5匹のADAM6^{-/-}雄とともに用意した。5匹の過排卵雌マウスの第二の群を5匹のADAM6^{+/-}雄とともに用意した。これらの交配ペアを交配について観察し、交配の5から6時間後、分析のためにすべての雌から子宮および付属の卵管を除去し、フラッシュした。フラッシュ溶液を卵子について点検して排卵を検証し、精子数を得た。精子移動を2つの異なる方法で評価した。第一に、両方の卵管を子宮から除去し、食塩水でフラッシュし、確認された一切の精子を計数した。卵子の存在も排卵の証拠として書き留めた。第二に、卵管を子宮に付属したまま残し、両方の組織を固定し、パラフィンに包埋し、切片にして染色した（上記のとおり）。切片を子宮内の精子の存在についても、両方の卵管における精子の存在についても調査した。

10

【0291】

5匹のADAM6^{-/-}雄と交配させた雌については、卵管からのフラッシュ溶液中に精子が殆ど見つからなかった。5匹のADAM6^{+/-}雄と交配させた5匹の雌の卵管からのフラッシュ溶液は、5匹のADAM6^{-/-}雄と交配させた5匹の雌の卵管からのフラッシュ溶液中に存在するものより約25から30倍多い精子レベル（平均、n = 10卵管）を示した。

【0292】

子宮および卵管の組織学的切片を調製した。その切片を子宮および卵管（colliculus tubarius）においての精子の存在について調査した。卵管および子宮の組織学的切片の検査により、ADAM6^{-/-}マウスと交配させた雌マウスについては子宮では精子を認めるが卵管では認められないことが明らかにされた。さらに、ADAM6^{-/-}マウスと交配させた雌からの切片により、精子が子宮卵管境界（UTJ）で認められないことが明らかになった。ADAM6^{+/-}マウスと交配させた雌からの切片では、UTJおよび卵管において精子が同定された。

20

【0293】

これらの結果は、ADAM6aおよびADAM6b遺伝子を欠いているマウスがin vivo移動欠陥を示す精子を作ることを確認する。すべての場合、精子が子宮内に観察された。これは、交配および精子放出は正常に行われたようであるが、精子数または組織学的観察のいずれかによって測定すると、交配後に卵管内で精子は殆どまたは全く観察されなかったことを示していた。これらの結果は、ADAM6aおよびADAM6b遺伝子を欠いているマウスが、子宮から卵管への移動不能を示す精子を産生することを確認する。精子が子宮卵管境界（uterine-tubule junction）を越えて、卵子が受精する卵管へと移動することができないため、この欠陥は不妊性をもたらすようである。纏めると、これらの結果のすべてが、マウスADAM6遺伝子は、正常移動能を有する精子を子宮から出て子宮卵管境界および卵管を通して移動するように方向づけ、そして卵子に近づいて受精事象を実現するという仮説の支持に向けられる。ADAM6がこれを実現する機序は、前記ADAM6タンパク質の作用によって方向づけられる（directly）こともあり、または下に記載するような、精子細胞における他のタンパク質、例えば他のADAMタンパク質、との協調発現により方向づけられることもある。

30

【0294】

ADAM遺伝子ファミリー発現。

40

【0295】

ADAMタンパク質の複合体が、成熟中の精子の表面に複合体として存在することは公知である。他のADAM遺伝子ファミリーメンバーが無いマウスは、精子が成熟するにつれてこの複合体を喪失し、成熟精子において複数のADAMタンパク質の低減を示す。ADAM6aおよびADAM6b遺伝子の欠如が、他のADAMタンパク質に対して同様に影響を及ぼすかどうかを決定するために、精巢（未熟精子）および精巢上体（成熟中の精子）からのタンパク質抽出物のウェスタンブロットを分析して、他のADAM遺伝子ファミリーメンバーの発現レベルを決定した。

【0296】

50

この実験では、4匹のADAM6^{-/-}マウスおよび4匹のADAM6^{+/-}マウスからのタンパク質抽出物を分析した。その結果は、ADAM2およびADAM3の発現が影響を受けないことを精巣抽出物中で示した。しかし、ADAM2とADAM3の両方が、精巣上体抽出物中では劇的に低減していた。これは、ADAM6^{-/-}マウスの精液中のADAM6aおよびADAM6bの不在が、精子が成熟するにつれて他のADAMタンパク質（例えば、ADAM2およびADAM3）の発現およびおそらく機能に対して直接影響を及ぼし得ることを明示する。これは、ADAM6aおよびADAM6bが、精子の表面にADAMタンパク質複合体の部分として存在し、そのことが正しい精子移動にとって極めて重要であり得ることを示唆している。

【0297】

10

実施例IX

ADAM6レスキューマウスにおけるヒト重鎖可変遺伝子使用法

【0298】

TAQMAN（商標）プローブを使用する定量的PCRアッセイ（上記のとおり）によりマウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子を欠いている（mADAM6^{-/-}）か、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子をコードする異所性ゲノム断片を含有する（ADAM6^{+/-}、実施例1を参照のこと）かのいずれかの、ヒト重およびκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウスについて、選択ヒト重鎖可変遺伝子使用量を決定した。

【0299】

20

簡単に言うと、マウスCD19⁺ Microbeads (Miltenyi Biotec) を使用してmADAM6^{-/-}マウスおよびADAM6^{+/-}マウスの脾臓からのCD19⁺B細胞を精製し、RNEASY（商標）Mini kit (Qiagen) を使用して全RNAを精製した。RNase 不含DNase オンカラム処理剤 (Qiagen) を使用してゲノムRNAを除去した。First Stand cDNA Synthesis キット (Invitrogen) を使用して約200ngのmRNAをcDNAに逆転写し、その後、ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用してTAQMAN（商標）Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) で増幅した。各遺伝子の相対発現をマウスκ定常 (mCκ) に正規化した。表9は、この実験に使用したセンス/アンチセンス/TAQMAN（商標）MGBプローブの組み合わせを示すものである。

30

【0300】

【表 9】

表 9

ヒト V _H	配列 (5'-3')	配列番号
V _H 6-1	センス: CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA	6
	アンチセンス: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA	7
	プローブ: TCCAGGACTGGTGAAGC	8
V _H 1-2	センス: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT	9
	アンチセンス: GAGAACACAGAAAGTGGATGAGATC	10
	プローブ: TGAGTCCAGTCCAGGGA	11
V _H 3-23	センス: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG	12
	アンチセンス: AACCTGGTCAGAACTGCCA	13
	プローブ: AGAGAAACAGTGGATACGT	14
V _H 1-69	センス: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG	15
	アンチセンス: GCTCGTGGATTTGTCCGC	16
	プローブ: CAGAGTCACGATTACC	17
mC _K	センス: TGAGCAGCACCTCACGTT	18
	アンチセンス: GTGGCCTCACAGGTATAGCTGTT	19
	プローブ: ACCAAGGACGAGTATGAA	20

【0301】

この実験では、分析した試料において4つすべてのヒト V_H 遺伝子の発現が観察された。さらに、発現レベルは、mADAM6^{-/-}マウスとADAM6^{+/+}マウスの間で類似するものであった。これらの結果は、改変部位に対して遠位にあるヒト V_H 遺伝子（V_H3-23およびV_H1-69）および改変部位に対して近位にあるヒト V_H 遺伝子（V_H1-2およびV_H6-1）の両方ともすべてが、機能的に発現するヒト重鎖を形成するように組み換えることができた。これらの結果は、ヒト重鎖ゲノム配列に挿入されたマウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む異所性ゲノム断片が、その遺伝子座内でのヒト重鎖遺伝子セグメントのV(D)J組換えに影響を及ぼさなかったこと、およびこれらのマウスが、通常の様式でヒト重鎖遺伝子セグメントを組換えて、機能的な重鎖免疫グロブリンタンパク質を産生することができることを明示している。

【0302】

実施例 X

選択されたヒト軽鎖可変領域と会合するヒト重鎖可変領域の同定

【0303】

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖を抗原特異的ヒト抗体からのヒト重鎖と共発現させることができるか否かを判定するために、*in vitro*発現系を構築した。

【0304】

遺伝子改変マウスでヒト抗体を生成する方法は、公知である（例えば、US6,596,541を参照、Regeneron Pharmaceuticals、VELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウス）。VELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウス技術は、マウスが抗原刺激に応じてヒト可変領域およびマウス定常領域を含む抗体を生成するように、内因性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結されたヒト重鎖および軽鎖可変領域を含むゲノムを有する遺伝子改変マウスの生成を含む。VELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスから生成される抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNAは、完全にヒトである。最初に、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する高親和性キメラ抗体が単離される。下記のように、抗体は、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特徴付けられ、選択される。マウス定常領域は所望のヒト定常領域で置換され、非IgMアイソタイプ、例えば野生型または改変されたIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含む完全にヒトの抗体が生成される。選択される定常領域は具体的な用途によって異なることができるが、高親和性抗原結合および標的

異性特性は可変領域に存在する。

【0305】

VELOCIMUNE（登録商標）ヒト化マウスを、血管形成を促進する増殖因子（抗原C）で免疫し、当技術分野で認められる標準技術を用いて抗原特異的ヒト抗体を単離し、V遺伝子の使用について配列決定をした。選択された抗体をヒト重鎖および軽鎖定常領域にクローニングし、69個の重鎖を以下の3つのヒト軽鎖の1つとの対合のために選択した：（1）ヒトκ定常領域に連結された関連κ軽鎖、（2）ヒトκ定常領域に連結された再構成されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5、または（3）ヒトκ定常領域に連結された再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1。重鎖および軽鎖の各対を、標準技術を用いてCHO-K1細胞に共トランスフェクトした。上清中の抗体の存在は、ELISAアッセイで抗ヒトIgGによって検出された。各重鎖／軽鎖対について抗体力価（ng/ml）を決定し、様々な再構成された生殖系列軽鎖による力価を、親の抗体分子（すなわち、関連軽鎖と対になった重鎖）で得られた力価と比較し、天然の力価の百分率を計算した（表10）。V_H：重鎖可変遺伝子。ND：現在の実験条件下で発現は検出されない。

【0306】

【表 10 - 1】

表 10

V _H	抗体力価 (ng/mL)			天然の力価の百分率	
	関連 LC	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-15	63	23	11	36.2	17.5
1-2	103	53	ND	51.1	-
3-23	83	60	23	72.0	27.5
3-33	15	77	ND	499.4	-
4-31	22	69	17	309.4	76.7
3-7	53	35	28	65.2	53.1
-	22	32	19	148.8	89.3
1-24	3	13	ND	455.2	-
3-33	1	47	ND	5266.7	-
3-33	58	37	ND	63.1	-
-	110	67	18	60.6	16.5
3-23	127	123	21	96.5	16.3
3-33	28	16	2	57.7	7.1
3-23	32	50	38	157.1	119.4
-	18	45	18	254.3	101.7
3-9	1	30	23	2508.3	1900.0
3-11	12	26	6	225.9	48.3
1-8	16	ND	13	-	81.8
3-33	54	81	10	150.7	19.1
-	34	9	ND	25.9	-
3-20	7	14	54	203.0	809.0
3-33	19	38	ND	200.5	-
3-11	48	ND	203	-	423.6
-	11	23	8	212.7	74.5
3-33	168	138	182	82.0	108.2
3-20	117	67	100	57.5	86.1
3-23	86	61	132	70.7	154.1
3-33	20	12	33	60.9	165.3
4-31	69	92	52	133.8	75.0
3-23	87	78	62	89.5	71.2
1-2	31	82	51	263.0	164.6
3-23	53	93	151	175.4	285.4
-	11	8	17	75.7	151.4
3-33	114	36	27	31.6	23.4
3-15	73	39	44	53.7	59.6

【0307】

【表 10-2】

3-33	1	34	16	5600.0	2683.3
3-9	58	112	57	192.9	97.6
3-33	67	20	105	30.1	157.0
3-33	34	21	24	62.7	70.4
3-20	10	49	91	478.4	888.2
3-33	66	32	25	48.6	38.2
3-23	17	59	56	342.7	329.8
-	58	108	19	184.4	32.9
-	68	54	20	79.4	29.9
3-33	42	35	32	83.3	75.4
-	29	19	13	67.1	43.9
3-9	24	34	29	137.3	118.4
3-30/33	17	33	7	195.2	43.1
3-7	25	70	74	284.6	301.6
3-33	87	127	ND	145.1	-
6-1	28	56	ND	201.8	-
3-33	56	39	20	69.9	36.1
3-33	10	53	1	520.6	6.9
3-33	20	67	10	337.2	52.3
3-33	11	36	18	316.8	158.4
3-23	12	42	32	356.8	272.9
3-33	66	95	15	143.6	22.5
3-15	55	68	ND	123.1	-
-	32	68	3	210.9	10.6
1-8	28	48	ND	170.9	-
3-33	124	192	21	154.3	17.0
3-33	0	113	ND	56550.0	-
3-33	10	157	1	1505.8	12.5
3-33	6	86	15	1385.5	243.5
3-23	70	115	22	163.5	31.0
3-7	71	117	21	164.6	29.6
3-33	82	100	47	122.7	57.1
3-7	124	161	41	130.0	33.5

【0308】

類似した実験では、VELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスをいくつかの異なる抗原で免疫し、抗原特異的ヒト抗体の選択された重鎖を、様々な再構成されたヒト生殖系列軽鎖と対合するそれらの能力について試験した（前記の通り）。この実験で用いた抗原には、コレステロールホメオスタシスに関与する酵素（抗原A）、グルコースホメオスタシスの調節に関与する血清ホルモン（抗原B）、血管形成を促進する増殖因子（抗原C）および細胞表面レセプター（抗原D）が含まれた。抗原特異的抗体は各免疫群のマウスから単離され、重鎖および軽鎖可変領域がクローニングされ、配列決定された。重鎖および軽鎖の配列から、V遺伝子の使用が決定され、選択された重鎖はそれらの関連軽鎖ま

たは再構成されたヒト生殖系列V κ 1-39J κ 5領域と対にさせられた。各重鎖／軽鎖対を、CHO-K1細胞に共トランスフェクトし、上清中の抗体の存在はELISAアッセイで抗ヒトIgGによって検出した。各重鎖／軽鎖対について抗体力価($\mu\text{g/ml}$)を決定し、様々な再構成されたヒト生殖系列軽鎖による力価を、親の抗体分子(すなわち、関連軽鎖と対になった重鎖)で得られた力価と比較し、天然の力価の百分率を計算した(表11)。V_H:重鎖可変遺伝子。V κ : κ 軽鎖可変遺伝子。ND:現在の実験条件下で発現は検出されない。

【0309】

【表11-1】

表 11

抗原	抗体	V _H	V κ	力価 ($\mu\text{g/ml}$)			天然の力価 の百分率
				V _H のみ	V _H + V κ	V _H + V κ 1-39J κ 5	
A	320	1-18	2-30	0.3	3.1	2.0	66
	321	2-5	2-28	0.4	0.4	1.9	448
	334	2-5	2-28	0.4	2.7	2.0	73
	313	3-13	3-15	0.5	0.7	4.5	670
	316	3-23	4-1	0.3	0.2	4.1	2174
	315	3-30	4-1	0.3	0.2	3.2	1327
	318	4-59	1-17	0.3	4.6	4.0	86
B	257	3-13	1-5	0.4	3.1	3.2	104
	283	3-13	1-5	0.4	5.4	3.7	69
	637	3-13	1-5	0.4	4.3	3.0	70
	638	3-13	1-5	0.4	4.1	3.3	82
	624	3-23	1-17	0.3	5.0	3.9	79
	284	3-30	1-17	0.3	4.6	3.4	75
	653	3-33	1-17	0.3	4.3	0.3	7
	268	4-34	1-27	0.3	5.5	3.8	69
	633	4-34	1-27	0.6	6.9	3.0	44
C	730	3-7	1-5	0.3	1.1	2.8	249
	728	3-7	1-5	0.3	2.0	3.2	157
	691	3-9	3-20	0.3	2.8	3.1	109
	749	3-33	3-15	0.3	3.8	2.3	62
	750	3-33	1-16	0.3	3.0	2.8	92

【0310】

【表 1 1 - 2】

	724	3-33	1-17	0.3	2.3	3.4	151
	706	3-33	1-16	0.3	3.6	3.0	84
	744	1-18	1-12	0.4	5.1	3.0	59
	696	3-11	1-16	0.4	3.0	2.9	97
	685	3-13	3-20	0.3	0.5	3.4	734
	732	3-15	1-17	0.3	4.5	3.2	72
	694	3-15	1-5	0.4	5.2	2.9	55
	743	3-23	1-12	0.3	3.2	0.3	10
	742	3-23	2-28	0.4	4.2	3.1	74
	693	3-23	1-12	0.5	4.2	4.0	94
D	136	3-23	2-28	0.4	5.0	2.7	55
	155	3-30	1-16	0.4	1.0	2.2	221
	163	3-30	1-16	0.3	0.6	3.0	506
	171	3-30	1-16	0.3	1.0	2.8	295
	145	3-43	1-5	0.4	4.4	2.9	65
	49	3-48	3-11	0.3	1.7	2.6	155
	51	3-48	1-39	0.1	1.9	0.1	4
	159	3-7	6-21	0.4	3.9	3.6	92
	169	3-7	6-21	0.3	1.3	3.1	235
	134	3-9	1-5	0.4	5.0	2.9	58
	141	4-31	1-33	2.4	4.2	2.6	63
	142	4-31	1-33	0.4	4.2	2.8	67

【0 3 1 1】

これらの実験から得られた結果は、様々な遺伝子ファミリーからの体細胞変異高親和性重鎖は、再構成されたヒト生殖系列V κ 1-3 9 J κ 5およびV κ 3-2 0 J κ 1領域と対合することができ、細胞から正常な抗体分子として分泌させることができることを示す。表 1 0 に示すように、親の抗体の関連軽鎖と比較して、抗体力価は、再構成されたヒトV κ 1-3 9 J κ 5軽鎖と対にした場合、約 6 1 % (6 9 中 4 2 個) の重鎖で増加し、再構成されたヒトV κ 3-2 0 J κ 1軽鎖と対にした場合、約 2 9 % (6 9 中 2 0 個) の重鎖で増加した。重鎖の約 2 0 % (6 9 中 1 4 個) について、親の抗体の関連軽鎖と比較して、再構成されたヒト生殖系列軽鎖の両方が発現の増加を付与した。表 1 1 に示すように、再構成されたヒト生殖系列V κ 1-3 9 J κ 5領域は、親の抗体の関連軽鎖と比較して、様々な異なるクラスの抗原に特異的ないくつかの重鎖の発現の増加を付与した。親の抗体の関連軽鎖と比較して、重鎖の約 3 5 % (1 5 / 4 3) で抗体力価は 2 倍を超えて増加した。2 つの重鎖 (3 1 5 および 3 1 6) では、増加は親の抗体と比較して 1 0 倍を超えていた。親の抗体の関連軽鎖と比較して発現の増加を示した全ての重鎖の中で、ファミリー 3 (V $_H$ 3) の重鎖は、他の重鎖可変領域遺伝子ファミリーと比較してより多く提示されている。これは、再構成されたヒト生殖系列V κ 1-3 9 J κ 5およびV κ 3-2 0 J κ 1軽鎖と対合するヒトV $_H$ 3重鎖の好ましい関係を示す。

【0 3 1 2】

実施例 X I

再構成されたヒト生殖系列軽鎖遺伝子座の生成

【0 3 1 3】

マウスゲノム細菌人工染色体 (BAC) クローン 3 0 2 g 1 2 および 2 5 4 m 0 4 (I n v i t r o g e n) を改変するために、V E L O C I G E N E (登録商標) 遺伝子操作

技術（例えば、米国特許第 6, 586, 251 号および Valenzuela ら（2003 年）High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis、Nature Biotech. 21 巻（6 号）：652～659 頁を参照）を用いて、様々な再構成されたヒト生殖系列軽鎖ターゲットベクターが作製された。これらの 2 つの BAC クローンを用いて、ゲノム構築物を単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を含むように操作し、内因性 κ 可変および連結遺伝子セグメントを欠失させるために事前に改変しておいた内因性 κ 軽鎖遺伝子座に挿入した。

【0314】

再構成されたヒト生殖系列軽鎖ターゲットベクターの構築

【0315】

当技術分野で認められる標準の分子生物学技術を用いて、3 つの異なる再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を作製した。これらの 3 つの領域を構築するために用いたヒト可変遺伝子セグメントには、再構成されたヒト $V\kappa 1-39 J\kappa 5$ 配列、再構成されたヒト $V\kappa 3-20 J\kappa 1$ 配列および再構成されたヒト $VpreBJ\lambda 5$ 配列が含まれた。

【0316】

マウス $V\kappa 3-7$ 遺伝子のエクソン 1（リーダーペプチドをコードする）およびイントロン 1 を含む DNA セグメントを、新規 DNA 合成（Integrated DNA Technologies）によって作製した。天然に存在する B1pI 制限酵素部位までの 5' 非翻訳領域の一部が含まれた。ヒト $V\kappa 1-39$ および $V\kappa 3-20$ 遺伝子のエクソンを、ヒトゲノム BAC ライブラリーから PCR 増幅した。フォワードプライマーは、マウス $V\kappa 3-7$ 遺伝子のイントロン 1 のスプライス受容部位を含む 5' 伸長部を有した。ヒト $V\kappa 1-39$ 配列の PCR のために用いられたリバースプライマーは、ヒト $J\kappa 5$ をコードする伸長部を含んでいたが、ヒト $V\kappa 3-20$ 配列の PCR のために用いられたリバースプライマーはヒト $J\kappa 1$ をコードする伸長部を含んでいた。ヒト $VpreBJ\lambda 5$ 配列は、新規 DNA 合成（Integrated DNA Technologies）によって作製した。スプライスドナー部位を含むヒト $J\kappa-C\kappa$ イントロンの一部を、プラスミド pBS-296-HA18-PI-SceI から PCR 増幅した。フォワード PCR プライマーは、ヒト $J\kappa 5$ 、 $J\kappa 1$ または $J\lambda 5$ 配列のいずれかの一部をコードする伸長部を含んでいた。リバースプライマーは、イントロンにおいて事前に操作された PI-SceI 部位を含んでいた。

【0317】

マウス $V\kappa 3-7$ エクソン 1 / イントロン 1、ヒト可変軽鎖エクソンおよびヒト $J\kappa-C\kappa$ イントロン断片を重複伸長 PCR によって一つにまとめ（sew）、B1pI および PI-SceI で消化し、ヒト $V\kappa 3-15$ 可変遺伝子セグメントからのプロモーターを含むプラスミド pBS-296-HA18-PI-SceI にライゲーションした。プラスミド pBS-296-HA18-PI-SceI 内の loxed ハイグロマイシンカセットを、NotI および AscI 部位が隣接する FRTed ハイグロマイシンカセットで置換した。このプラスミドの NotI / PI-SceI 断片を、マウス $J\kappa-C\kappa$ イントロンの一部、マウス $C\kappa$ エクソン、およびマウス ES 細胞での相同組み換えのために 3' 相同性アームを提供したマウス κ 遺伝子座の下流のゲノム配列の約 75 kb を含んでいた改変マウス BAC 254m04 にライゲーションした。次にこの BAC の NotI / AscI 断片を、FRTed ネオマイシンカセットおよびマウス ES 細胞での相同組み換えのための内因性 κ 遺伝子座の上流のゲノム配列の約 23 kb を含んでいた改変マウス BAC 302g12 にライゲーションした。

【0318】

再構成されたヒト生殖系列 $V\kappa 1-39 J\kappa 5$ ターゲットベクター（図 19）

【0319】

ターゲットベクターへのクローニングのために、操作軽鎖挿入物の 5' 末端およ

10

20

30

40

50

び3'末端に制限酵素部位を導入した：5'末端にA s c I部位、3'末端にP I - S c e I部位。5' A s c I部位および3' P I - S c e I部位の中で、5'から3'までのターゲッティング構築物は、マウスB A Cクローン3 0 2 g 1 2から得られた内因性マウスκ軽鎖遺伝子座の5'側配列を含む5'相同性アーム、F R T e dネオマイシン耐性遺伝子、ヒトVκ3-15プロモーターを含むゲノム配列、マウスVκ3-7可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスVκ3-7可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJκ-Cκイントロンの一部を含むゲノム配列、ならびにマウスB A Cクローン2 5 4 m 0 4から得られた内因性マウスJκ5遺伝子セグメントの3'側配列を含む3'相同性アームを含んでいた(図19、中央)。内因性マウスκ軽鎖遺伝子座の上流および最も3'側のJκ遺伝子セグメントの下流(例えば、内因性3'エンハンサー)の遺伝子および/または配列は、ターゲッティング構築物によって改変されていなかった(図19を参照)。操作されたヒトVκ1-39Jκ5遺伝子座の配列を、配列番号59に示す。

【0320】

再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域中の配列に位置するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、B A C DNAへの再構成されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5領域のターゲッティング挿入を確認した。簡潔には、マウスVκ3-7リーダー配列の3'側イントロン配列は、プライマーU L C - m 1 F (A G G T G A G G G T A C A G A T A A G T G T T A T G A G ; 配列番号60)およびU L C - m 1 R (T G A C A A A T G C C C T A A T T A T A G T G A T C A ; 配列番号61)で確認した。再構成されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5領域のオープンリーディングフレームは、プライマー1 6 3 3 - h 2 F (G G G C A A G T C A G A G C A T T A G C A ; 配列番号62)および1 6 3 3 - h 2 R (T G C A A A C T G G A T G C A G C A T A G ; 配列番号63)で確認した。ネオマイシンカセットは、プライマーn e o F (G G T G G A G A G G C T A T T C G G C ; 配列番号64)およびn e o R (G A A C A C G G C G G C A T C A G ; 配列番号65)で確認した。再構成されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5領域を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を形成するために、マウスES細胞をエレクトロポレーションするために、次にターゲッティングB A C DNAを用いた。

【0321】

内因性遺伝子座に挿入された操作されたVκ1-39Jκ5軽鎖領域に特異的なプローブを用いるT A Q M A N^{T M}スクリーニングおよび核型分析によって、陽性のES細胞クローンを確認した。簡潔には、ネオマイシンマーカー遺伝子の中で結合するプローブn e o P (T G G G C A C A A C A G A C A A T C G G C T G ; 配列番号66)、マウスVκ3-7リーダー配列の3'側のイントロン配列中で結合するプローブU L C - m 1 P (C C A T T A T G A T G C T C C A T G C C T C T C T G T T C ; 配列番号67)、および再構成されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5オープンリーディングフレーム中で結合するプローブ1 6 3 3 h 2 P (A T C A G C A G A A A C C A G G G A A A G C C C C T ; 配列番号68)。生殖系列Vκ1-39Jκ5軽鎖領域を発現する同腹仔を生ませるために、雌性マウスに移植するために、次に陽性のES細胞クローンを用いた。

【0322】

あるいは、再構成されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5軽鎖領域を有するES細胞は、ターゲッティング構築物によって導入されたF R T e dネオマイシンカセットを除去するために、F L Pを発現する構築物でトランスフェクトされる。任意選択で、ネオマイシンカセットは、F L Pリコンビナーゼを発現するマウスを繁殖させることによって除去される(例えば、U S 6, 7 7 4, 2 7 9)。任意選択で、ネオマイシンカセットは、マウスで保持される。

【0323】

再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1ターゲッティングベクター(図20)

【0324】

同じように、再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1領域を発現する操作軽鎖遺伝子座を、5'から3'にかけて、マウスBACクローン302g12から得られた内因性マウスκ軽鎖遺伝子座の5'側配列を含む5'相同性アーム、FRTedネオマイシン耐性遺伝子、ヒトVκ3-15プロモーターを含むゲノム配列、マウスVκ3-7可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスVκ3-7可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJκ-Cκイントロンの一部を含むゲノム配列、ならびにマウスBACクローン254m04から得られた内因性マウスJκ5遺伝子セグメントの3'側配列を含む3'相同性アームを含むターゲッティング構築物を用いて作製した(図20、中央)。操作されたヒトVκ3-20Jκ1遺伝子座の配列を、配列番号69に示す。

10

【0325】

再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1軽鎖領域中の配列に位置するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、BAC DNAへの再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1領域のターゲッティング挿入を確認した。簡潔には、マウスVκ3-7リーダー配列の3'側イントロン配列は、プライマーULC-m1F(配列番号60)およびULC-m1R(配列番号61)で確認した。再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1領域のオープンリーディングフレームは、プライマー1635-h2F(TCCAGGCACCTGTCTTTTG;配列番号70)および1635-h2R(AAGTAGCTGCTGCTAACACTCTGACT;配列番号71)で確認した。ネオマイシンカセットは、プライマーneoF(配列番号64)およびneoR(配列番号65)で確認した。再構成されたヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1軽鎖を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を形成するために、マウスES細胞をエレクトロポレーションするために、次にターゲッティングBAC DNAを用いた。

20

【0326】

内因性κ軽鎖遺伝子座に挿入された操作されたVκ3-20Jκ1軽鎖領域に特異的なプローブを用いるTaqmanTMスクリーニングおよび核型分析によって、陽性のES細胞クローンを確認した。簡潔には、ネオマイシンマーカー遺伝子の中で結合するプローブneoP(配列番号66)、マウスVκ3-7リーダー配列の中で結合するプローブULC-m1P(配列番号67)、およびヒトVκ3-20Jκ1オープンリーディングフレームの中で結合するプローブ1635h2P(AAAGAGCCACCTCTCTCCCTGCAGGG;配列番号72)。雌性マウスに移植するために、陽性のES細胞クローンを次に用いた。ヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1軽鎖領域を発現する同腹仔。

30

【0327】

あるいは、ヒト生殖系列Vκ3-20Jκ1軽鎖領域を有するES細胞は、ターゲッティング構築物によって導入されたFRTedネオマイシンカセットを除去するために、FLPを発現する構築物でトランスフェクトされてもよい。任意選択で、ネオマイシンカセットは、FLPリコンビナーゼを発現するマウスを繁殖させることによって除去されてもよい(例えば、US6,774,279)。任意選択で、ネオマイシンカセットは、マウスで保持される。

40

【0328】

再構成されたヒト生殖系列VpreBJ15ターゲッティングベクター(図21)

【0329】

同じようにして、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ15領域を発現する操作軽鎖遺伝子座を、5'から3'にかけて、マウスBACクローン302g12から得られた内因性マウスκ軽鎖遺伝子座の5'側配列を含む5'相同性アーム、FRTedネオマイシン耐性遺伝子、ヒトVκ3-15プロモーターを含むゲノム配列、マウスVκ3-7可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスVκ3-7可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列VpreBJλ5領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJκ-Cκイントロンの一部を含むゲノム配列、ならびにマウスBACクローン254m04から得られた内因性マウスJκ5遺伝子セグメントの3'側配列を含む3'相

50

同性アームを含むターゲッティング構築物を用いて作製した（図21、中央）。操作されたヒトVpreBJλ5遺伝子座の配列を、配列番号73に示す。

【0330】

再構成されたヒト生殖系列VpreBJλ5領域軽鎖領域中の配列に位置するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、BAC DNAへの再構成されたヒト生殖系列VpreBJλ5領域のターゲッティング挿入を確認した。簡潔には、マウスVκ3-7リーダー配列の3'側イントロン配列は、プライマーULC-m1F（配列番号60）およびULC-m1R（配列番号61）で確認した。再構成されたヒト生殖系列VpreBJλ5領域のオープンリーディングフレームは、プライマー1616-h1F（TGTCCTCGGC CCTTGGA；配列番号74）および1616-h1R（CCGATGTCAT GGTCGTTCTT；配列番号75）で確認した。ネオマイシンカセットは、プライマーneoF（配列番号64）およびneoR（配列番号65）で確認した。再構成されたヒト生殖系列VpreBJλ5軽鎖を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を形成するために、マウスES細胞をエレクトロポレーションするために、次にターゲッティングBAC DNAを用いた。

【0331】

内因性κ軽鎖遺伝子座に挿入された操作されたVpreBJλ5軽鎖領域に特異的なプローブを用いるTAQMANTMスクリーニングおよび核型分析によって、陽性のES細胞クローンを確認する。簡潔には、ネオマイシンマーカ遺伝子の中で結合するプローブneoP（配列番号66）、マウスIgVκ3-7リーダー配列の中で結合するプローブULC-m1P（配列番号67）、およびヒトVpreBJλ5オープンリーディングフレーム中で結合するプローブ1616h1P（ACAAATCCGCC TCACCTGCAAC CCT；配列番号76）。生殖系列軽鎖領域を発現する同腹仔を生ませるために、雌性マウスに移植するために、次に陽性のES細胞クローンを用いる。

【0332】

あるいは、再構成されたヒト生殖系列VpreBJλ5軽鎖領域を有するES細胞は、ターゲッティング構築物によって導入されたFRTedネオマイシンカセットを除去するために、FLPを発現する構築物でトランスフェクトされる。任意選択で、ネオマイシンカセットは、FLPリコンビナーゼを発現するマウスを繁殖させることによって除去される（例えば、US6,774,279）。任意選択で、ネオマイシンカセットは、マウスで保持される。

【0333】

実施例XII

単一の再構成されたヒト軽鎖を発現するマウスの生成

【0334】

上記のターゲッティングES細胞をドナーES細胞として用い、VELOCIMOUS E（登録商標）法によって8細胞期マウス胚に導入した（例えば、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 following immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25巻（1号）：91～99頁を参照）。特有な再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の存在を検出する対立遺伝子アッセイ（Valenzuelaら、上記）の改変型を用いる遺伝子タイピングによって、操作されたヒト生殖系列Vκ1-39Jκ5軽鎖領域、Vκ3-20Jκ1軽鎖領域またはVpreBJλ5軽鎖領域を独立して有するVELOCIMICE（登録商標）を同定する。

【0335】

再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の発現を特徴付けするために、仔を遺伝子タイピングし、特有な再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域についてヘテロ接合またはホモ接合である仔を選択する。

【0336】

フローサイトメトリー。

【0337】

共通軽鎖マウスの正常抗体レパートリーでの再構成されたヒト軽鎖領域の発現は、共通軽鎖マウスの脾細胞および末梢血での免疫グロブリン κ および λ の発現の分析によって検証した。野生型 ($n=5$)、 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 共通軽鎖ヘテロ接合体 ($n=3$)、 $V\kappa 1-39J\kappa 5$ 共通軽鎖ホモ接合体 ($n=3$)、 $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 共通軽鎖ヘテロ接合体 ($n=2$)、および $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 共通軽鎖ホモ接合体 ($n=2$) マウスの収集された脾臓および末梢血からの細胞懸濁液を標準の方法によって作製し、蛍光標識抗体 (BD Pharmingen) を用いて $CD19^+$ 、 $Ig1^+$ および $Ig\kappa^+$ で染色した。

10

【0338】

簡潔には、抗マウス $CD16/CD32$ (クローン 2.4G2、BD Pharmingen) と共に 1×10^6 個の細胞を氷上で 10 分間インキュベートし、続いて氷上で 30 分間に以下の抗体カクテルで標識した: APC コンジュゲート抗マウス $CD19$ (クローン 1D3、BD Pharmingen)、PerCP-Cy5.5 コンジュゲート抗マウス $CD3$ (クローン 17A2、BioLegend)、FITC コンジュゲート抗マウス $Ig\kappa$ (クローン 187.1、BD Pharmingen)、PE コンジュゲート抗マウス $Ig\lambda$ (クローン RML-42、BioLegend)。染色の後、細胞を洗浄し、2%ホルムアルデヒドで固定した。LSRIIFローサイトメーターでデータ取得を実施し、FlowJoTM で分析した。ゲーティング: 総 B 細胞 ($CD19^+CD3^-$)、 $Ig\kappa^+$ B 細胞 ($Ig\kappa^+Ig1^-CD19^+CD3^-$)、 $Ig1^+$ B 細胞 ($Ig\kappa^-Ig1^+CD19^+CD3^-$)。血液および脾細胞試料から集めたデータは、類似した結果を示した。表 12 は、 $Ig1^+$ 、 $Ig\kappa^+$ または $Ig1^+Ig\kappa^+$ である各群からの 1 匹の代表的なマウスの末梢血からの陽性 $CD19^+$ B 細胞百分率を示す。野生型 (WT)、および $V\kappa 1-39J\kappa 5$ または $V\kappa 3-20J\kappa 1$ 共通軽鎖についてホモ接合のマウスからの末梢血中の $CD19^+$ B 細胞の百分率は、図 22 に示す。

20

【0339】

【表 12】

表 12

30

マウス遺伝子型	CD19 ⁺ B 細胞		
	Ig1 ⁺	Igk ⁺	Ig1 ⁺ Igk ⁺
野生型	4.8	93	0.53
Vk1-39Jk5	1.4	93	2.6
Vk3-20Jk1	4.2	88	6

【0340】

共通軽鎖発現。

【0341】

定量的 PCR アッセイ (例えば TACMANTM) を用いて、ヘテロ接合およびホモ接合のマウスで、各共通軽鎖 ($V\kappa 1-39J\kappa 5$ および $V\kappa 3-20J\kappa 1$) の発現を分析した。

40

【0342】

簡潔には、製造業者の仕様に従ってマウス $CD19$ ミクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、野生型、対応するヒト重鎖および κ 軽鎖可変領域遺伝子座によるマウス重鎖および κ 軽鎖可変領域遺伝子座の置換についてホモ接合のマウス ($H\kappa$)、ならびに各再構成されたヒト軽鎖領域についてホモ接合およびヘテロ接合のマウス ($V\kappa 1-39J\kappa 5$ または $V\kappa 3-20J\kappa 1$) の脾臓から $CD19^+$ B 細胞を精製した。製造業者の仕様に従って RNeasyTM Mini キット (Qiagen) を用いて CD

50

19⁺B細胞から全RNAを精製し、RNAアーゼを含まないDNaseオンカラム処理 (Qiagen) を用いてゲノムRNAを除去した。First Stand cDNA Synthesisキット (Invitrogen) を用いて200ngのmRNAを逆転写してcDNAにし、生じたcDNAをTaqmanTM Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) で増幅した。(1) 両共通軽鎖についてのVκ-Jκ接合部、(2) Vκ遺伝子単独 (すなわちVκ1-39およびVκ3-20)、および(3) マウスCκ領域にわたるプライマーおよびTaqmanTM MGBプローブを用いるABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて、全ての反応を実施した。表13は、このアッセイのために使用されたプライマーおよびプローブの配列を示す。相対的発現は、マウスCκ領域の発現に対して標準化した。結果を、図23A、23Bおよび23Cに示す。

【0343】

【表13】

表 13

領域	プライマー/プローブ記述 (5'-3')	配列番号
Vκ1-39Jκ5 接合部	(センス) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	77
	(アンチセンス) GTTTAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	78
	(プローブ) CCTCCGATCA CCTTC	79
Vκ1-39	(センス) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	80
	(アンチセンス) ATGGGACCCC ACTTTGCA	81
	(プローブ) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	82
Vκ3-20Jκ1 接合部	(センス) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	83
	(アンチセンス) TGATTTCCAC CTTGGTCCCT T	84
	(プローブ) TAGCTCACCT TGGACGTT	85
Vκ3-20	(センス) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	86
	(アンチセンス) GACCCACTGC CACTGAACCT	87
	(プローブ) CCACTGGCAT CCC	88
マウス Cκ	(センス) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	89
	(アンチセンス) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	90
	(プローブ) ACCAAGGACG AGTATGAA	91

【0344】

抗原特異的共通軽鎖抗体。

【0345】

内因性マウスκ軽鎖遺伝子座にVκ1-39Jκ5またはVκ3-20Jκ1共通軽鎖のいずれかを有する共通軽鎖マウスをβガラクトシダーゼで免疫して、抗体価を測定した。

【0346】

簡潔には、製造業者の指示に従って、βガラクトシダーゼ (Sigma) をTITER MAXTM アジュバント (Sigma) 中で乳化した。野生型 (n=7)、Vκ1-39Jκ5共通軽鎖ホモ接合体 (n=2) およびVκ3-20Jκ1共通軽鎖ホモ接合体 (n=5) を、100μgのβガラクトシダーゼ/TITER MAXTM による皮下注射で免疫した。50μgのβガラクトシダーゼ/TITER MAXTM による3週間隔で2回の皮下注射によってマウスを追加免疫した。第2の追加免疫の後、製造業者の指示に従って後眼窩放血を用いて麻酔下マウスから血清分離管 (BD Biosciences) に血液を収集した。抗βガラクトシダーゼのIgM抗体またはIgG抗体を測定するために、4℃で一晩、ELISAプレート (Nunc) を1μg/mLのβガラクトシダーゼでコ

ーティングした。過剰な抗原を洗い流した後に、室温で1時間、1% BSAを有するPBSでブロックした。血清の系列希釈物をプレートに加え、室温で1時間インキュベートしてから洗浄した。次に、室温で1時間、プレートをHRPコンジュゲート抗IgM (Southern Biotech) または抗IgG (Southern Biotech) と一緒にインキュベートした。さらなる洗浄の後、プレートをTMB基質 (BD Biosciences) で発色させた。反応を1N硫酸で停止させ、Victor X5プレートリーダー (Perkin Elmer) を用いてOD₄₅₀を読み取った。GRAPH PADTM Prismでデータを分析し、バックグラウンドより2倍高い血清の希釈としてシグナルを計算した。結果を図24Aおよび24Bに示す。

【0347】

この実施例に示すように、Vκ1-39 Jκ5およびVκ3-20 Jκ1 共通軽鎖マウスの脾臓および末梢の両方のコンパートメントでのκ/λ B細胞の比は、野生型に近いパターンを示した (表12および図22)。しかし、VpreBJλ5 共通軽鎖マウスはより少ない末梢B細胞を示した (その約1~2%が操作されたヒト軽鎖領域を発現する (データは示さず))。内因性κ軽鎖遺伝子座からのVκ1-39 Jκ5およびVκ3-20 Jκ1の再構成されたヒト軽鎖領域の発現レベルは、ヒトVκおよびJκ遺伝子セグメントによるマウスVκおよびJκ遺伝子セグメントの完全な置換を有する内因性κ軽鎖遺伝子座と比較して上昇した (図23A、23Bおよび23C)。VpreBJλ5の再構成されたヒト軽鎖領域の発現レベルは、ヘテロ接合マウスおよびホモ接合マウスの両方で内因性κ軽鎖遺伝子座からの類似した高い発現を示した (データは示さず)。このことは、マウスのλ、κまたは両方の内因性軽鎖遺伝子座との直接的競合で、単一の再構成されたヒトV_L/J_L配列が、内因性κ軽鎖遺伝子座から野生型に勝るレベルの発現を生じさせ、正常な脾臓および血液のB細胞頻度をもたらすことができることを示す。さらに、ヒトVκ1-39 Jκ5またはヒトVκ3-20 Jκ1配列のいずれかを有する操作されたκ軽鎖遺伝子座の存在は、マウスによってよく許容された。そしてこれは、免疫応答の体液性構成要素の軽鎖レパートリーのかかなりの部分を占めることによって、野生型のように機能するようである (図24Aおよび24B)。

【0348】

実施例XIII

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖を発現するマウスの繁殖

【0349】

この実施例は、複数の遺伝子改変免疫グロブリン遺伝子座を有する複数の遺伝子改変マウス系統を作製するために、本明細書に記載される共通軽鎖マウスのいずれか1つと繁殖させることができる他のいくつかの遺伝子改変マウス系統を記載する。

【0350】

内因性Igλノックアウト (KO)。

【0351】

操作された軽鎖遺伝子座の使用を最適化するために、再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の1つを有するマウスを、内因性λ軽鎖遺伝子座に欠失を含む別のマウスと繁殖させる。この様式において、得られる子孫は、それらの唯一の軽鎖として、実施例11に記載される再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を発現する。繁殖は、当技術分野で認められる標準技術によって、あるいは商業的な繁殖家 (例えば、Jackson Laboratory) によって実施される。操作された軽鎖遺伝子座、および内因性λ軽鎖遺伝子座の欠失を有するマウス系統は、特有な軽鎖領域の存在および内因性マウスλ軽鎖の非存在についてスクリーニングされる。

【0352】

ヒト化内因性重鎖遺伝子座。

【0353】

操作されたヒト生殖系列軽鎖遺伝子座を有するマウスは、ヒト重鎖可変遺伝子の遺伝子座による内因性マウス重鎖可変遺伝子の遺伝子座の置換を含むマウスと繁殖させられる (

US 6, 596, 541を参照；VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウス、Regeneron Pharmaceuticals, Inc.）。VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、マウスが抗原刺激に応じてヒト重鎖可変領域およびマウス重鎖定常領域を含む抗体を生成するように、内因性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結されたヒト重鎖可変領域を含むゲノムを含む。抗体の重鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、ヒト重鎖定常領域をコードするDNAに作動可能に連結させる。DNAは次に、抗体の完全なヒトの重鎖を発現することが可能な細胞で発現される。

【0354】

ヒトV_H遺伝子座による内因性マウスV_H遺伝子座の置換、および内因性κ軽鎖遺伝子座に単一の再構成されたヒト生殖系列V_L領域を有するマウスが得られる。目的の抗原による免疫に際して、単一のヒト軽鎖（ヒトV_LおよびマウスC_L）と体細胞変異重鎖（ヒトV_HおよびマウスC_H）を含むリバースキメラ抗体が得られる。抗体を発現するB細胞のV_HおよびV_Lヌクレオチド配列を同定し、完全にヒトの抗体を、適する発現系でV_HおよびV_Lヌクレオチド配列をヒトC_HおよびC_Lヌクレオチド配列と融合させることによって作製する。

【0355】

実施例XIV

ヒト重鎖および再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を発現するマウスからの抗体の生成

【0356】

操作されたヒト軽鎖領域を含むマウスを、他の内因性Ig遺伝子座（実施例12に記載の）の改変および欠失を含む様々な所望の系統へ繁殖させた後、選択されたマウスを目的の抗原で免疫することができる。

【0357】

一般に、単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の1つを含むVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは抗原でチャレンジされ、リンパ細胞（B細胞など）が動物の血清から収集される。不死のハイブリドーマ細胞系を調製するためにリンパ細胞を骨髓腫細胞系と融合させ、そのようなハイブリドーマ細胞系は、ヒト可変重鎖および再構成されたヒト生殖系列軽鎖を含む抗体（これは、免疫のために用いる抗原に特異的である）を生成するハイブリドーマ細胞系を同定するためにスクリーニングおよび選択される。重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、重鎖および軽鎖の望ましいアイソタイプ定常領域に連結させる。内因性マウス配列の存在および内因性遺伝子座に存在するあらゆるさらなるシス活性エレメントのために、各抗体の単一の軽鎖は体細胞変異することがある。これは、単一の軽鎖および多様な重鎖配列を含む抗原特異的レパートリーにさらなる多様性を加える。生じるクローニングされた抗体配列は、CHO細胞などの細胞でその後発現される。あるいは、抗原特異的キメラ抗体または軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードするDNAは、抗原特異的リンパ球から直接的に同定される。

【0358】

最初に、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する高親和性キメラ抗体が単離される。上記のように、抗体は、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特徴付けされ、選択される。体細胞変異したヒト重鎖および本発明の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域に由来する単一の軽鎖を含む完全なヒトの抗体を生成するために、マウス定常領域は所望のヒト定常領域で置換される。適するヒト定常領域には、例えば野生型または改変型のIgG1またはIgG4が含まれる。

【0359】

ヒトV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントによる内因性マウス重鎖遺伝子座の置換、ならびに操作された生殖系列V_κ1-39J_κ5ヒト軽鎖領域または操作された生殖系列V_κ3-20J_κ1ヒト軽鎖領域（上記）による内因性マウスκ軽鎖遺伝子座の置換を含むVELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスの別々のコホートを、ヒト細胞表面レセプタータンパク質（抗原E）で免疫した。抗原Eは、3～4日おきの6回の連続的な注射でマウスの後ろの足蹠に直接投与する。注射の前に、2から3マイクログラムの抗原

Eを10 μ gのCpGオリゴヌクレオチド（カタログ#tlrl-modn-ODN1826オリゴヌクレオチド；Invivogen、San Diego、CA）および25 μ gのAdju-Phos（リン酸アルミニウムゲルアジュバント、カタログ#H-71639-250；Brenntag Biosector、Frederiksund、Denmark）と混合する。屠殺の3～5日前に与えられる最終抗原リコールの前に、合計6回の注射を与える。4回目および6回目の注射の後に血液を収集し、抗体免疫応答を標準の抗原特異的イムノアッセイによってモニタリングする。

【0360】

所望の免疫応答が達成されるとき、脾細胞を収集し、それらの生存能力を保存し、ハイブリドーマ細胞系を形成するためにマウス骨髄腫細胞と融合させる。抗原E特異的な共通軽鎖抗体を生成する細胞系を同定するために、ハイブリドーマ細胞系をスクリーニングし、選択する。この技術を用いて、いくつかの抗抗原E特異的な共通軽鎖抗体（すなわち、ヒト重鎖可変ドメイン、同じヒト軽鎖可変ドメインおよびマウス定常ドメインを有する抗体）が得られる。

10

【0361】

あるいは、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれるU. S. 2007/0280945A1に記載されるように、抗抗原E共通軽鎖抗体は、骨髄腫細胞との融合なしに抗原陽性B細胞から直接的に単離される。この方法を用いて、いくつかの完全なヒトの抗抗原E共通軽鎖抗体（すなわち、ヒト重鎖可変ドメイン、操作されたヒトV κ 1-39J κ 5軽鎖か操作されたヒトV κ 3-20J κ 1軽鎖領域のいずれか、およびヒト定常ドメインを有する抗体）が得られた。

20

【0362】

この実施例の方法に従って生成された例示的な抗抗原E共通軽鎖抗体の生物学的特性は、以下に詳細に記載される。

【0363】

実施例XV

抗原特異的な共通軽鎖抗体での重鎖遺伝子セグメントの使用

【0364】

生成されたヒト抗抗原E共通軽鎖抗体の構造を分析するために、重鎖抗体可変領域をコードする核酸をクローニングし、配列決定をした。抗体の核酸配列および予測されたアミノ酸配列から、操作されたヒトV κ 1-39J κ 5軽鎖か操作されたヒトV κ 3-20J κ 1軽鎖領域のいずれかを含む免疫VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスから得られた、選択された共通軽鎖抗体の重鎖可変領域（HCVR）について、遺伝子使用を特定した。結果を表14および15に示す。それらは、ヒトV κ 1-39またはヒトV κ 3-20に由来する軽鎖だけから軽鎖を発現するマウスを使用するとき、様々な再構成のために、本発明によるマウスが様々なヒト重鎖遺伝子セグメントから抗原特異的な共通軽鎖抗体を生成することを示す。2、3、4および5ファミリーのヒトV_H遺伝子セグメントは、様々なヒトD_HセグメントおよびヒトJ_Hセグメントと再構成されて、抗原特異的な抗体を与えた。

30

【0365】

40

【表 1 4 - 1】

表 14

Vk1-39Jk5 共通輕鎖抗体							
抗体	HCVR			抗体	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
2952	2-5	6-6	1	6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1	6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1	2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5	2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4	3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4	3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4	5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4	6002	3-30	6-13	4
6011	3-23	7-27	4	6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4	6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4	6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4	6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4	6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4	6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4	6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4	6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4	6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4	2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4	2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5	2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5	3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5	3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2	3020	3-30	7-27	4
3013	3-30	5-12	4	3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4	3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1	3030	3-30	7-27	4
3043	3-30	6-6	3	3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4	5997	3-30	7-27	4

【0 3 6 6】

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

2949	3-30	6-6	5	6033	3-30	7-27	4
2950	3-30	6-6	5	3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5	6028	3-30	7-27	6
2978	3-30	6-6	5	3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5	3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5	6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5	6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5	6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5	6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5	6037	4-59	3-16	3
6004	3-30	6-6	5	2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5	3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5	3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5	6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5	6006	1-69	6-6	5
6023	3-30	6-6	5	6008	1-69	6-13	4

10

20

【 0 3 6 7 】

【表 1 5】

表 15

Vκ3-20Jκ1
共通軽鎖抗体

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

30

40

【 0 3 6 8 】

実施例 X V I

LuminoxTM アッセイによる抗原特異的共通軽鎖抗体のブロック能力の判定

ビーズベースのアッセイで、抗原 E に対する 98 個のヒト共通軽鎖抗体を、抗原 E への抗原 E の天然のリガンド（リガンド Y）の結合をブロックするそれらの能力について試験した。

【 0 3 6 9 】

抗原 E の細胞外ドメイン（ECD）を 2 つの myc エピトープタグおよび 6 × ヒスチジンタグとコンジュゲートさせ（抗原 E - mmH）、MES 緩衝液中の 20 μg/mL の濃度でカルボキシル化マイクロスフェアにアミンカップリングさせた。混合液を室温で 2 時

50

間インキュベートし、続いて1 M トリス pH 8.0 でビーズ非活性化を行い、続いて0.05% (v/v) の Tween-20 を含む PBS で洗浄した。次にビーズを2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) を含む PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) でブロックした。96穴フィルタープレート中で、抗原E特異的共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で1:15に希釈した。抗体上清と同じ媒質成分による模擬上清を含む陰性対照を調製した。抗原E標識ビーズを上清に加え、4℃で一晩インキュベートした。ビオチン化リガンドYタンパク質を0.06 nMの最終濃度まで加え、室温で2時間インキュベートした。抗原E-myc-myc-6His標識ビーズに結合したビオチン化リガンドYの検出を、ストレプトアビジンとコンジュゲートされたR-フィコエリトリン (Moss Inc, Pasadena, MD) で判定し、続いてLuminexTM フローサイトメトリーベースのアナライザーで測定した。リガンドYのない試料のバックグラウンド平均蛍光強度 (MFI) を、全ての試料から引いた。ブロック百分率は、各試料のバックグラウンドを引いたMFIを調整された陰性対照値で割り、100を掛け、生じた値を100から引くことによって計算された。

10

【0370】

同様の実験において、抗原Eに対する同じ98個のヒト共通軽鎖抗体を、リガンドY標識ビーズへの抗原Eの結合をブロックするそれらの能力について試験した。

【0371】

簡潔には、MES緩衝液に希釈した20 µg/mLの濃度で、リガンドYをカルボキシル化マイクロスフェアにアミンカップリングさせた。混合液を室温で2時間インキュベートし、続いて1 M トリス pH 8でビーズの非活性化を行い、続いて0.05% (v/v) の Tween-20 を含む PBS で洗浄した。次にビーズを2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) を含む PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) でブロックした。96穴フィルタープレート中で、抗原E特異的共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で1:15に希釈した。抗体上清と同じ媒質成分による模擬上清を含む陰性対照を調製した。ビオチン化抗原E-mmHを0.42 nMの最終濃度まで加え、4℃で一晩インキュベートした。リガンドY標識ビーズを次に抗体/抗原E混合物に加え、室温で2時間インキュベートした。リガンドYビーズに結合したビオチン化抗原E-mmHの検出は、ストレプトアビジンとコンジュゲートされたR-フィコエリトリン (Moss Inc, Pasadena, MD) で判定し、続いてLuminexTM フローサイトメトリーベースのアナライザーで測定した。抗原Eのない試料のバックグラウンド平均蛍光強度 (MFI) を、全ての試料から引いた。ブロック百分率は、各試料のバックグラウンドを引いたMFIを調整された陰性対照値で割り、100を掛け、生じた値を100から引くことによって計算された。

20

30

【0372】

表16および17は、両方のLuminexTM アッセイで試験された全98個の抗抗原E共通軽鎖抗体のブロック百分率を示す。ND: 現在の実験条件下で判定されない。

【0373】

【表 16 - 1】

表 16

Vκ1-39Jκ5 共通軽鎖抗体		
抗体	抗原E標識ビーズの ブロック%	溶液中での抗原Eの ブロック%
2948	81.1	47.8
2948G	38.6	ND
2949	97.6	78.8
2949G	97.1	73.7
2950	96.2	81.9
2950G	89.8	31.4
2952	96.1	74.3
2952G	93.5	39.9
2954	93.7	70.1
2954G	91.7	30.1
2955	75.8	30.0
2955G	71.8	ND
2964	92.1	31.4
2964G	94.6	43.0
2978	98.0	95.1
2978G	13.9	94.1
2982	92.8	78.5
2982G	41.9	52.4
2985	39.5	31.2
2985G	2.0	5.0
2987	81.7	67.8
2987G	26.6	29.3
2996	87.3	55.3
2996G	95.9	38.4
2997	93.4	70.6
2997G	9.7	7.5
3004	79.0	48.4
3004G	60.3	40.7

【 0 3 7 4 】

10

20

30

40

【表 1 6 - 2】

3005	97.4	93.5
3005G	77.5	75.6
3010	98.0	82.6
3010G	97.9	81.0
3011	87.4	42.8
3011G	83.5	41.7
3012	91.0	60.8
3012G	52.4	16.8
3013	80.3	65.8
3013G	17.5	15.4
3014	63.4	20.7
3014G	74.4	28.5
3015	89.1	55.7
3015G	58.8	17.3
3016	97.1	81.6
3016G	93.1	66.4
3017	94.8	70.2
3017G	87.9	40.8
3018	85.4	54.0
3018G	26.1	12.7
3019	99.3	92.4
3019G	99.3	88.1
3020	96.7	90.3
3020G	85.2	41.5
3021	74.5	26.1
3021G	81.1	27.4
3022	65.2	17.6
3022G	67.2	9.1
3023	71.4	28.5
3023G	73.8	29.7
3024	73.9	32.6
3024G	89.0	10.0
3025	70.7	15.6
3025G	76.7	24.3
3027	96.2	61.6
3027G	98.6	75.3
3028	92.4	29.0
3028G	87.3	28.8
3030	6.0	10.6
3030G	41.3	14.2

【表 16-3】

3032	76.5	31.4
3032G	17.7	11.0
3033	98.2	86.1
3033G	93.6	64.0
3036	74.7	32.7
3036G	90.1	51.2
3041	95.3	75.9
3041G	92.4	51.6
3042	88.1	73.3
3042G	60.9	25.2
3043	90.8	65.8
3043G	92.8	60.3

【0376】

【表 17-1】

表 17

Vκ3-20Jκ1
共通軽鎖抗体

抗体	抗原E標識ビーズの ブロック%	溶液中での抗原Eの ブロック%
2968	97.1	73.3
2968G	67.1	14.6
2969	51.7	20.3
2969G	37.2	16.5
2970	92.2	34.2
2970G	92.7	27.2
2971	23.4	11.6
2971G	18.8	18.9
2972	67.1	38.8
2972G	64.5	39.2
2973	77.7	27.0
2973G	51.1	20.7
2974	57.8	12.4
2974G	69.9	17.6
2975	49.4	18.2
2975G	32.0	19.5
2976	1.0	1.0
2976G	50.4	20.4

【0377】

上記の第一の Lumine xTM 実験では、Vκ1-39Jκ5 操作軽鎖を含む 80 個の共通軽鎖抗体を、抗原 E 標識ビーズへのリガンド Y 結合をブロックするそれらの能力に

ついて試験した。これらの80個の共通軽鎖抗体のうち、68個は>50%のブロックを示し、12個は<50%のブロック（6個は25~50%のブロック、6個は<25%のブロック）を示した。V κ 3-20 J κ 1 操作軽鎖を含む18個の共通軽鎖抗体については、12個は抗原E標識ビーズへのリガンドY結合の>50%のブロックを示し、6個は<50%のブロック（3個は25~50%のブロック、3個は<25%のブロック）を示した。

【0378】

上記の第二のLumindexTM実験では、V κ 1-39 J κ 5 操作軽鎖を含む同じ80個の共通軽鎖抗体を、リガンドY標識ビーズへの抗原Eの結合をブロックするそれらの能力について試験した。これらの80個の共通軽鎖抗体のうち、36個は>50%のブ
10
ロックを示し、44個は<50%のブロック（27個は25~50%のブロック、17個は<25%のブロック）を示した。V κ 3-20 J κ 1 操作軽鎖を含む18個の共通軽鎖抗体については、1個はリガンドY標識ビーズへの抗原Eの結合の>50%のブロックを示し、17個は<50%のブロック（5個は25~50%のブロック、12個は<25%のブロック）を示した。

【0379】

表16および17のデータは、表14および15に記載される再構成が、その関連受容体抗原EへのリガンドYの結合を様々な程度の効力でブロックした抗抗原E特異的共通軽鎖抗体を生成したことを証明し、このことは、抗原Eに関して重複するおよび重複しない
20
エピトープ特異性を有する抗体を含む表14および15の抗抗原E共通軽鎖抗体と矛盾しない。

【0380】

実施例XVII

ELISAによる抗原特異的共通軽鎖抗体のブロック能力の判定

【0381】

ELISAアッセイにおいて、抗原Eに対するヒト共通軽鎖抗体を、リガンドYコーティング表面への抗原Eの結合をブロックするそれらの能力について試験した。

【0382】

リガンドYをPBSに希釈した2 μ g/mLの濃度で96穴プレートにコーティングし、一晩インキュベートし、続いて0.05% Tween-20を含むPBSで4回洗浄した。次にプレートを0.5% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) を含むPBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) によって室温で1時間ブロックした。別々のプレート中で、抗抗原E共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で1:10に希釈した。抗体の同じ成分を有する模擬上清を、陰性対照として用いた。抗原E-mmH（上記）を0.150 nMの最終濃度まで加え、室温で1時間インキュベートした。次に、リガンドYを含むプレートに抗体/抗原E-mmH混合物を加え、室温で1時間インキュベートした。リガンドYに結合した抗原E-mmHの検出は、抗ペンターHis抗体とコンジュゲートさせた西洋ワサビペ
30
ルオキシダーゼ (HRP) (Qiagen, Valencia, CA) で判定し、硫酸によって中和されるテトラメチルベンジジン (TMB) 基質 (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いる標準の比色応答によって発色させた (develop)。吸光度をOD450で0.1秒間読み取った。抗原Eのない試料のバックグラウンド吸光度を、全ての試料から引いた。ブロック百分率は、各試料のバックグラウンドを引いたMFIを調整された陰性対照値で割り、100を掛け、生じた値を100から引くことによって計算された。

【0383】

表18および19は、ELISAアッセイで試験された全98個の抗抗原E共通軽鎖抗体のブロック百分率を示す。ND：現在の実験条件下で判定されない。

【0384】

10

20

30

40

【表 18 - 1】

表 18

Vκ1-39Jκ5
共通軽鎖抗体

抗体	溶液中での抗原Eの ブロック%	抗体	溶液中での抗原Eの ブロック%
2948	21.8	3015	23.7
2948G	22.9	3015G	10.2
2949	79.5	3016	78.1
2949G	71.5	3016G	37.4
2950	80.4	3017	61.6
2950G	30.9	3017G	25.2
2952	66.9	3018	40.6
2952G	47.3	3018G	14.5
2954	55.9	3019	94.6
2954G	44.7	3019G	92.3
2955	12.1	3020	80.8
2955G	25.6	3020G	ND
2964	34.8	3021	7.6
2964G	47.7	3021G	20.7
2978	90.0	3022	2.4
2978G	90.2	3022G	15.0
2982	59.0	3023	9.1
2982G	20.4	3023G	19.2
2985	10.5	3024	7.5
2985G	ND	3024G	15.2
2987	31.4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13.9
2996	29.3	3027	61.4
2996G	ND	3027G	82.7
2997	48.7	3028	40.3
2997G	ND	3028G	12.3
3004	16.7	3030	ND
3004G	3.5	3030G	9.5
3005	87.2	3032	ND
3005G	54.3	3032G	13.1
3010	74.5	3033	77.1
3010G	84.6	3033G	32.9
3011	19.4	3036	17.6
3011G	ND	3036G	24.6
3012	45.0	3041	59.3

【 0 3 8 5 】

【表 18-2】

3012G	12.6	3041G	30.7
3013	39.0	3042	39.9
3013G	9.6	3042G	16.1
3014	5.2	3043	57.4
3014G	17.1	3043G	46.1

【0386】

【表 19】

10

表 19

Vκ3-20Jκ1
共通軽鎖抗体

抗体	溶液中での抗原Eの ブロック%	抗体	溶液中での抗原Eの ブロック%
2968	68.9	2972G	35.7
2968G	15.2	2973	20.7
2969	10.1	2973G	23.1
2969G	23.6	2974	ND
2970	34.3	2974G	22.0
2970G	41.3	2975	8.7
2971	6.3	2975G	19.2
2971G	27.1	2976	4.6
2972	9.6	2976G	26.7

20

【0387】

この実施例に記載されているように、リガンドYコーティング表面への抗原Eの結合をブロックするそれらの能力を試験された、Vκ1-39Jκ5操作軽鎖を含む80個の共通軽鎖抗体のうち、22個は>50%のブロックを示し、58個は<50%のブロック（20個は25~50%のブロック、38個は<25%のブロック）を示した。Vκ3-20Jκ1操作軽鎖を含む18個の共通軽鎖抗体については、1個はリガンドYコーティング表面への抗原Eの結合の>50%のブロックを示し、17個は<50%のブロック（5個は25~50%のブロック、12個は<25%のブロック）を示した。

30

【0388】

これらの結果はまた、抗原Eに関して重複するおよび重複しないエピトープ特異性を有する抗体を含む抗原E特異的共通軽鎖抗体プールと矛盾しない。

【0389】

40

実施例XVII

抗原特異的共通軽鎖抗体についてのBIACORETM親和性判定

【0390】

BIACORETMT100機器（GE Healthcare）を用いるSPR（表面プラズモン共鳴）によって、選択された抗体上清の平衡解離定数（K_D）を判定した。全てのデータは、ランニング緩衝液および試料緩衝液の両方としてHBS-EP（10mM Hepes、150mM NaCl、0.3mM EDTA、0.05%界面活性剤P20、pH7.4）を用いて25℃で得られた。標準のアミンカップリング化学を用いて高密度の抗ヒトFc抗体で事前に誘導体化させたCM5センサーチップ表面で、抗体を粗製上清試料から捕捉した。捕捉工程中、合計3分間、上清を3μL/分の流速で抗ヒト

50

Fc 表面全域に注入した。捕捉工程の後に、 $35\ \mu\text{L}/\text{分}$ の流速で2分間の、ランニング緩衝液または $100\ \text{nM}$ の濃度の分析物の注入が続いた。捕捉された抗体からの抗原の解離を、6分間モニタリングした。捕捉された抗体は、 $10\ \text{mM}$ グリシン、 $\text{pH}1.5$ の短時間注入によって除去した。緩衝液注入からのセンサーグラムを分析物センサーグラムから引き、それによって捕捉表面からの抗体の解離に起因するアーチファクトを除くことによって、全てのセンサーグラムをダブルリファレンス (double reference) とした。BIAcoreTM T100 評価ソフトウェア v2.1 を用いて、各抗体の結合データを、マストランスポートを有する 1 : 1 結合モデルにあてはめた。結果を表 20 および 21 に示す。

【0391】

【表 20 - 1】

表 20

Vκ1-39Jκ5
共通輕鎖抗体

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

【0392】

【表 20-2】

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

【0393】

【表 21】

表 21

Vκ3-20Jκ1
共通軽鎖抗体

抗体	100 nM 抗原 E		抗体	100 nM 抗原 E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (分)		K _D (nM)	T _{1/2} (分)
2968	5.50	8	2973	5.35	39
2968G	305	0	2973G	11.0	44
2969	34.9	2	2974	256	0
2969G	181	1	2974G	138	0
2970G	12.3	3	2975	38.0	2
2971G	32.8	22	2975G	134	1
2972	6.02	13	2976	6.73	10
2972G	74.6	26	2976G	656	8

【0394】

表 14 および 15 に示す再構成を含む共通軽鎖抗体の結合親和性は様々であり、ほとんど全てはナノモル濃度範囲の K_D を示す。親和性データは、高親和性で、クローン選択され、体細胞変異している表 14 および 15 に記載の再構成された可変ドメインの組合せ会合から生じる共通軽鎖抗体と矛盾しない。前に示すデータと合わせると、表 14 および 15 に記載される共通軽鎖抗体は、抗原 E の上の 1 つまたは複数のエピトープに特異性を示す、多様な高親和性抗体の集合を含む。

【0395】

実施例 X I X

LumindexTM アッセイによる抗原特異的共通軽鎖抗体の結合特異性の判定

選択された抗抗原 E 共通軽鎖抗体を、抗原 E の ECD および抗原 E ECD バリエーションに結合するそれらの能力について試験した（例えば、そのアミノ酸残基の約 10 % がヒトタンパク質と異なる、カニクイザルオルソログ（Mf 抗原 E）；ECD の C 末端から最後の 10 アミノ酸を欠く抗原 E の欠失変異体（抗原 E-ΔCT）；ならびにリガンド Y との相互作用が疑われる位置にアラニン置換を含む 2 つの変異体（抗原 E-Ala1 および抗原 E-Ala2））。抗原 E タンパク質は CHO 細胞で生成され、各々は myc-myc-His C 末端タグを含んでいた。

【0396】

結合試験のために、抗 myc モノクローナル抗体（MAb 9E10、ハイブリドーマ細胞系 CRL-1729TM；ATCC、Manassas、VA）で共有結合コーティ

10

20

30

40

50

ングされた 1×10^6 個のマイクロスフェア (LuminesTM) ビーズと一緒に室温で 2 時間のインキュベーションによって、1 mL の培養培地からの抗原 E ECD タンパク質またはバリエーションタンパク質 (上記) を捕捉した。次に、ビーズを使用前に PBS で洗浄した。抗抗原 E 共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で 1 : 4 に希釈し、96 穴フィルタープレートに加えた。抗体のない模擬上清を、陰性対照として用いた。捕捉された抗原 E タンパク質を含むビーズを次に抗体試料に加え (ウェルにつき 3000 個のビーズ)、4 °C で一晩インキュベートした。次の日、試料ビーズを洗浄し、結合した共通軽鎖抗体を R-フィコエリトリンとコンジュゲートさせた抗ヒト IgG 抗体で検出した。ビーズの蛍光強度 (約 100 個のビーズを各抗原 E タンパク質への各抗体試料の結合について計数した) は、LuminesTM フローサイトメトリーベースのアナライザーで測定し、ビーズ/抗体相互作用につき少なくとも 100 個の計数されたビーズの中央蛍光強度 (MFI) を記録した。結果を表 22 および 23 に示す。

【0397】

【表 2 2 - 1】

表 22

Vk1-39Jk5 共通輕鎖抗体					
平均蛍光強度 (MFI)					
抗体	抗原 E - ECD	抗原 E - ΔCT	抗原 E - Ala1	抗原 E-Ala2	Mf 抗原 E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181

【0 3 9 8】

【表 2 2 - 2】

3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173

【表 2 2 - 3】

3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

【0 4 0 0】

【表 2 3】

表 23

Vk3-20Jk1 共通軽鎖抗体					
平均蛍光強度 (MFI)					
抗体	抗原 E- ECD	抗原 E- ΔCT	抗原 E- Ala1	抗原 E- Ala2	Mf 抗原 E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

【0 4 0 1】

抗抗原 E 共通軽鎖抗体上清は、抗原 E-ECD に連結されたビーズへの高特異的結合を示した。これらのビーズについては、陰性対照模擬上清は、抗原 E-ECD ビーズ試料と組み合わせたときは無視できるシグナル ($< 10 \text{ MFI}$) をもたらしたが、抗抗原 E 共通軽鎖抗体を含む上清は、強い結合シグナルを示した (98 個の抗体上清については 2627 の平均 MFI ; $91/98$ の抗体試料については $\text{MFI} > 500$) 。

【0 4 0 2】

抗原 E の ECD の上の異なるエピトープを同定する選択された抗抗原 E 共通軽鎖抗体の能力の測定手段として、バリエーションに対する抗体の相対的結合を判定した。天然の抗原 E-ECD 結合試験について上で記載したように、全 4 つの抗原 E バリエーションを抗 myc

LumindexTM ビーズに捕捉し、相対的な結合比 (MFI バリエーション / MFI 抗原 E - ECD) を判定した。表 21 および 22 に示す 98 個の試験された共通軽鎖抗体上清について、平均比 (MFI バリエーション / MFI 抗原 E - ECD) は各バリエーションで異なり、ビーズ上でのタンパク質の様々な捕捉量を反映しているようである (抗原 E-ΔCT、抗原 E-Ala1、抗原 E-Ala2 および Mf 抗原 E についてそれぞれ 0.61、2.9、2.0 および 1.0 の平均比)。各タンパク質バリエーションについて、98 個の試験された共通軽鎖抗体のサブセットの結合は、大きく低減された結合を示し、このことは、所与のバリエーションを特徴付けた変異への感度を示した。例えば、共通軽鎖抗体試料の 19 個は、 $< 8\%$ の MFI バリエーション / MFI 抗原 E - ECD で Mf 抗原 E に結合した。この群の多くは高いか適度に高い親和性の抗体 (5 個は $K_D < 5 \text{ nM}$ 、15 個は $K_D < 50 \text{ nM}$) を含むので、この群の低いシグナルは、低い親和性からではなく、天然の抗原 E-ECD と所与のバリエーションとの間の配列 (エピトープ) の差への感度から生じるようである。

【0403】

表 14 および 15 に記載される共通軽鎖抗体が、抗原 E の上の複数のエピトープを特異的に認識する抗原 E 特異的共通軽鎖抗体の多様な群を表すことを、これらのデータは証明する。

(項目 1) マウスであって、該マウスの生殖系列において：

(a) 重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される少なくとも 1 つの再構成されていないヒト V、少なくとも 1 つの再構成されていないヒト D、および少なくとも 1 つの再構成されていないヒト J セグメントを含むヒト化免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座；

(b) 軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下または 2 つ以下の再構成されたヒト軽鎖 V/J 配列を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座；および

(c) マウス ADAM6 タンパク質をコードする異所性核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含むマウス。

(項目 2) 前記マウス ADAM6 タンパク質をコードする核酸配列またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片が前記免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座以外の遺伝子座に存在する、項目 1 に記載のマウス。

(項目 3) 前記重鎖定常領域遺伝子がマウス遺伝子である、項目 1 に記載のマウス。

(項目 4) 前記軽鎖定常領域遺伝子がマウス遺伝子である、項目 1 に記載のマウス。

(項目 5) ヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子座およびヒト化軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子座を含むマウスであって、該マウスが単一の軽鎖を発現し、該マウスが雄マウスにおいて機能する ADAM6 遺伝子をコードする異所性核酸配列を含む、マウス。

(項目 6) 前記ヒト化重鎖免疫グロブリン遺伝子座が内因性マウス重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結されている、項目 5 に記載のマウス。

(項目 7) 前記単一の軽鎖が、軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下の軽鎖 V 遺伝子セグメントおよび軽鎖 J 遺伝子セグメントをコードする免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座からコードされる、項目 5 に記載のマウス。

(項目 8) 前記単一の軽鎖が、前記マウスの前記生殖系列における免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座に由来し、該遺伝子座が軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される、該生殖系列中の 1 つ以下の再構成された軽鎖 V/J 遺伝子セグメントをコードする、項目 5 に記載のマウス。

(項目 9) 前記異所性核酸配列が雄マウスにおいて機能するマウス ADAM6 タンパク質をコードするか、マウス ADAM6 タンパク質の断片をコードする、項目 5 に記載のマウス。

(項目 10) 前記異所性核酸配列が内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座内ではない位置に存在する、項目 5 に記載のマウス。

(項目 11) 遺伝子改変マウスであって、複数の異なる IgG 重鎖を発現し、該複数の異なる IgG 重鎖の各々がヒト可変ドメインを含み、前記複数の異なる IgG 重鎖の各々が単一のヒト免疫グロブリン V 遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変

ドメインをコードする軽鎖配列と会合しており、該マウスが雄マウスにおいて機能する A D A M 6 タンパク質をコードする異所性核酸配列を含む、遺伝子改変マウス。

(項目 1 2) 前記マウスが、雄マウスにおいて機能する A D A M 6 タンパク質またはその断片を発現し、該 A D A M 6 タンパク質またはその断片が前記異所性核酸配列から発現される、項目 1 1 に記載のマウス。

(項目 1 3) マウス細胞であって、以下：

重鎖定常遺伝子に作動可能に連結されるヒト化重鎖免疫グロブリン可変遺伝子遺伝子座；

軽鎖定常遺伝子に作動可能に連結される 1 つ以下または 2 つ以下の軽鎖 V 遺伝子セグメントを含むヒト化軽鎖免疫グロブリン遺伝子座；および

10

A D A M 6 タンパク質またはその断片をコードする異所性核酸配列であって、該 A D A M 6 タンパク質またはその断片が雄マウスにおいて機能する、異所性核酸配列を含む、マウス細胞。

(項目 1 4) 前記異所性核酸配列がマウス A D A M 6 タンパク質をコードする、項目 1 3 に記載のマウス細胞。

(項目 1 5) 前記重鎖定常遺伝子が非ヒト重鎖定常遺伝子である、項目 1 3 に記載のマウス。

(項目 1 6) 前記軽鎖定常遺伝子が非ヒト軽鎖定常遺伝子である、項目 1 3 に記載のマウス。

(項目 1 7) 前記 1 つ以下または 2 つ以下 (no more than two) の軽鎖 V 遺伝子セグメントが再構成された V / J 遺伝子セグメントに存在する、項目 1 3 に記載のマウス。

20

(項目 1 8) ヒト重鎖 V 遺伝子セグメントに由来する免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含むキメラ免疫グロブリン重鎖；ならびに

(a) 再構成されたヒト V κ 1 - 3 9 / J 配列、

(b) 再構成されたヒト V κ 3 - 2 0 / J 配列、または

(c) その組み合わせ；

に由来する軽鎖を発現するマウス B 細胞であって、

該重鎖可変ドメインが定常領域と融合されており、該軽鎖可変ドメインが定常領域と融合されており、該 B 細胞が異所性 A D A M 6 核酸配列を含む、マウス B 細胞。

30

(項目 1 9) 前記重鎖可変ドメインと融合される前記定常ドメインがマウス定常領域を含む、項目 1 8 に記載のマウス B 細胞。

(項目 2 0) 前記軽鎖可変ドメインと融合される前記定常領域がマウス定常領域およびヒト定常領域から選択される、項目 1 8 に記載のマウス B 細胞。

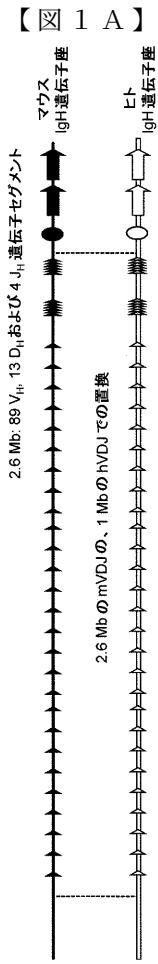


FIG. 1A

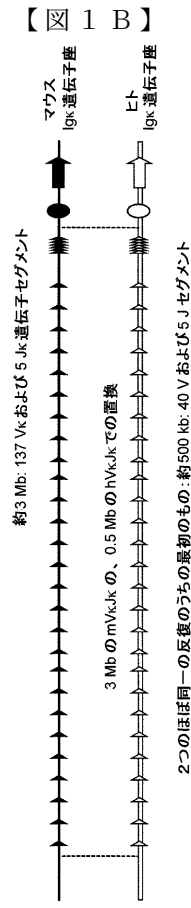


FIG. 1B

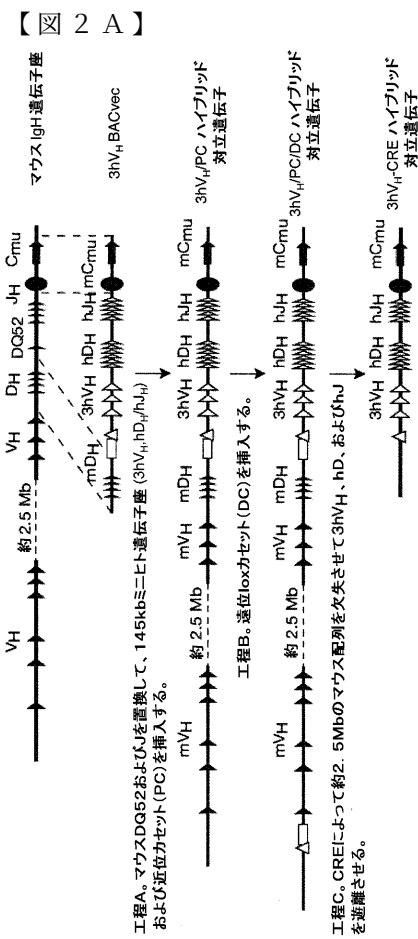


FIG. 2A

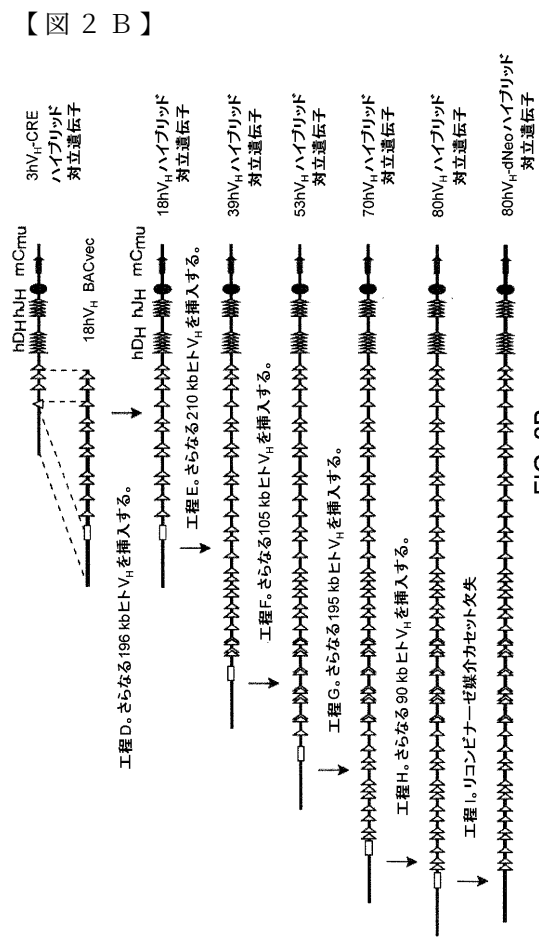


FIG. 2B

【図 3 C】

	コピー数	D	H
WT マウス	理論値	2	0
	実測値 1	1.71	< 0.01
	実測値 2	2.07	< 0.01
	実測値 3	2.16	< 0.01
	実測値 4	1.88	< 0.01
ヘテロマウス	理論値	1	1
	実測値 1	1.22	1.04
	実測値 2	0.94	1.02
	実測値 3	0.85	0.95
	実測値 4	1.02	1.00
ホモマウス	理論値	0	2
	実測値 1	< 0.01	2.37
	実測値 2	< 0.01	2.22
	実測値 3	< 0.01	2.43
	実測値 4	< 0.01	1.93

FIG. 3C

【図 4 A】

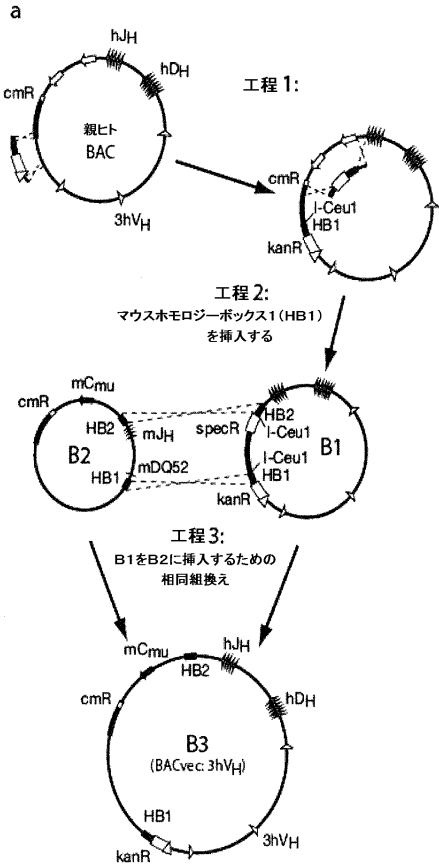


FIG. 4A

【図 4 B】

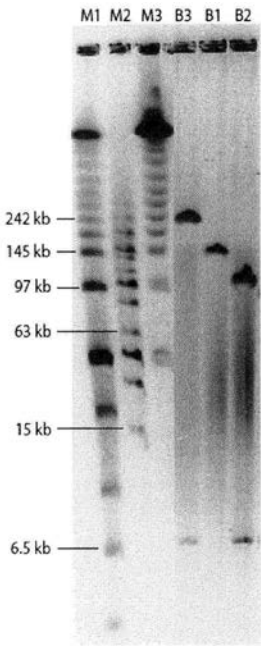


FIG. 4B

【図 5 A】

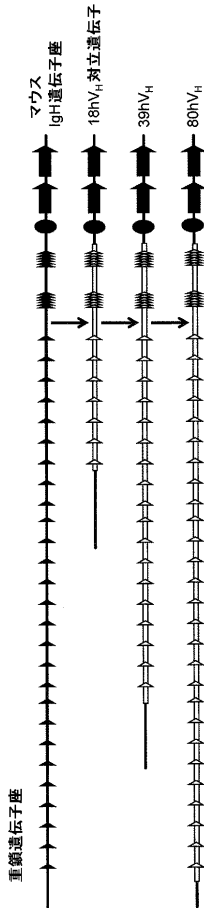


FIG. 5A

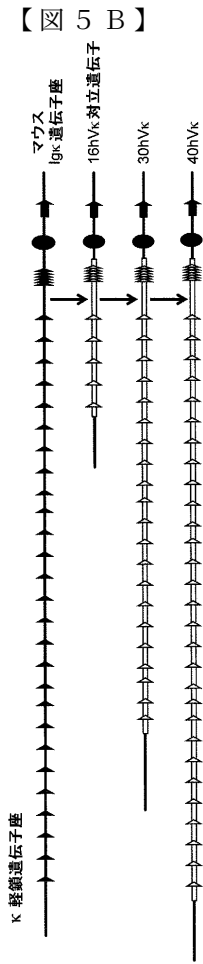


FIG. 5B

【図 7 A】

3'V _H	N	D _H	N	5'J _H
(3-72) GCTAG	(D _H 1-26)	GCTATAGTGGGAGCTACTAC	AGGC	CTTTGATATC (3)
(3-9) GCBAAG	CCCAGGG	TAGTGGGCGCTAC	ACCT	ATGCTTTTGATATC (3)
(3-7) GCGAGA	G	AGTGGGAGCTACTAC	GAGG	ACTTTGATATC (4)
(4-59) GCGAGG	GGAC	GGTATAGTGGGAGCTACT	CCT	CTTTGATATC (4)
(3-23) GCGAAA	CC	AGTGGGAGC	C	CTGGTTCGACCC (5)
(4-34) GCGAGG	AGGAG	TAGTGGGAGCTACT		
(1-2) GCGAGC	GA	GGTATAGTGGGAGCTACT	CGA	ATGCTTTTGATATC (3)
(3-23) GCGAAG	G	TATTAAGTGGGAGCTACT	TGG	ACTACTTTGATATC (4)
(3-7) GCGAGAGA	GGG	ATTAAGTGGGAGCTACT	CCC	CTTTGATATC (4)
(4-59) GCGAG	GG	TATTAAGTGGGAGCTACT	TTTCTTTT	CTTTGATATC (4)
(4-39) GCGAGA	GG	TAACTGGGAGCTACT	CTCTGGG	CTTTGATATC (4)
(3-30) GCGA	AAAGGC	GCTATAGTGGGAGCTACT	CTC	TTGATATC (4)
(1-2) GCGAGAGA	GA	TATTAAGTGGGAGCTACT	GAAGGT	CTACGGTATGAGCTC (6)
(1-2) GCGAGAGA	GA	GAGTATAGCTCTGCTCC		
(3-48) GCGAGA	GG	GAGTATAGCTCTGCTCC	TG	CTTTGATATC (4)
(3-13) GCGAGAGA	GG	ATAGGAGCTCTGCTCC	CTC	TTGATATC (4)
(3-7) GCGAGAGA	TCT	CTAACTGGGGA	AGG	CTAC (4)
(3-15) ACCAC	CCA	TAACTGGGGA	GGG	TTTGATATC (4)
(3-48) GCGAGA	GATA	GGGGA		CCG (5)

FIG. 7A

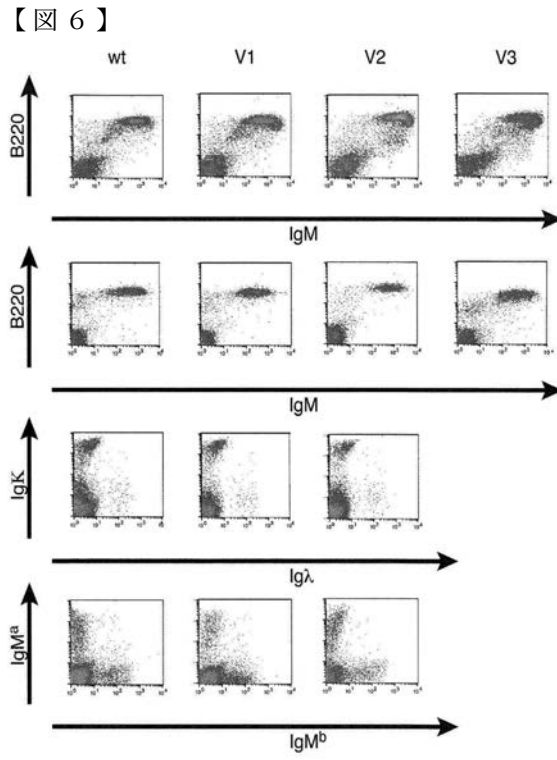


FIG. 6

【図 7 B】

3'V _K	N	5'J _K
(1-6) CAACAGAGTTAATAGTACCCCTCC	GGA	GACG (1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACCTC		GGAG (1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTTACCTC		ATTTACT (3)
(1-9) CAACATTTAATAGTTACCTC		GCTACT (4)
(3-15) CAGCAGTATAAATAGTACCTC		TCACT (4)
(1-17) CTACAGCATTAATAGTTACCTC		GTGGAG (1)
(1-17) CTACAGCATTAATAGTTACCTC		GGAG (1)
(3-20) CAGCAGTATGTTAGCTTACCTC		GGAG (1)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGAG (1)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTACT (2)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GCTACT (4)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCC		CACT (3)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCC		ATTTACT (3)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCC	CG	TCACT (4)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCC		GATCACC (5)
(1-37) CAACGGATTTACAAATGCC	GA	CACC (5)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCC	CA	TGTACT (2)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCC		TCACT (4)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCC		CACT (4)

FIG. 7B

【図 8】

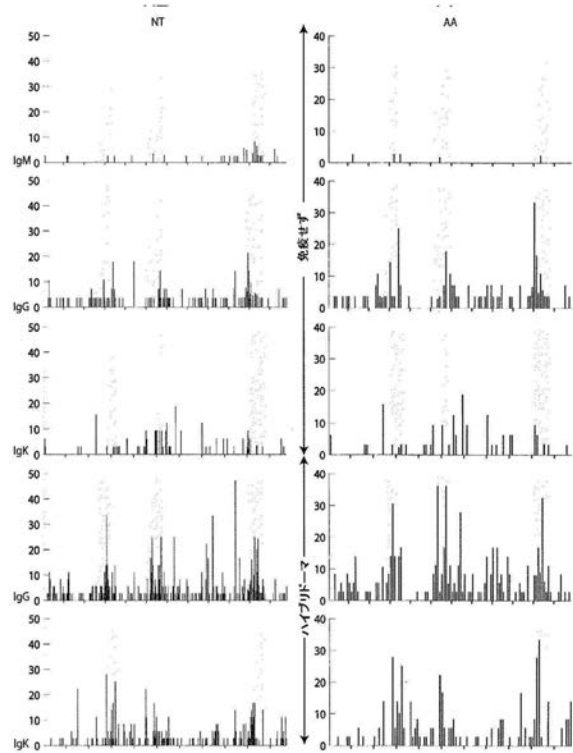


FIG. 8

【図 9 A】

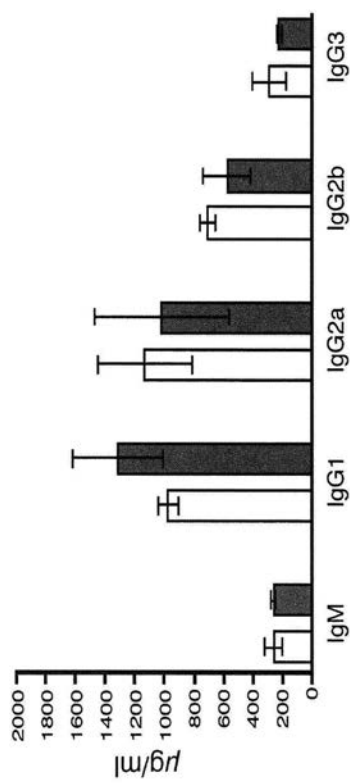


FIG. 9A

【図 9 B】

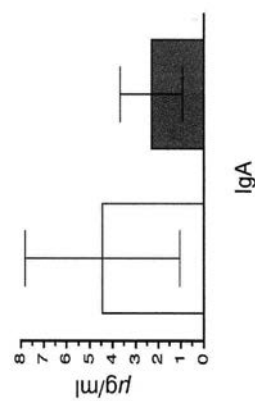


FIG. 9B

【図 9 C】

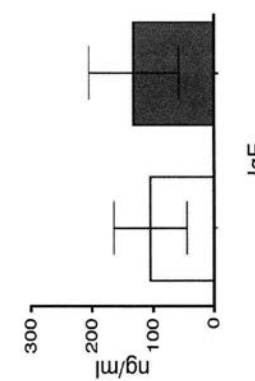


FIG. 9C

【図 10 A】

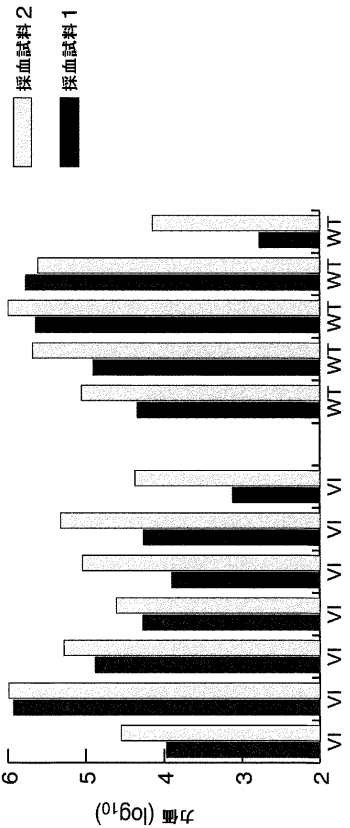


FIG. 10A

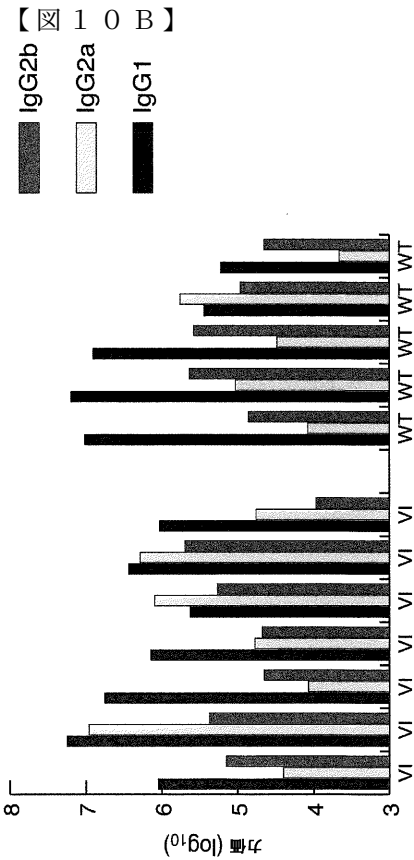


FIG. 10B

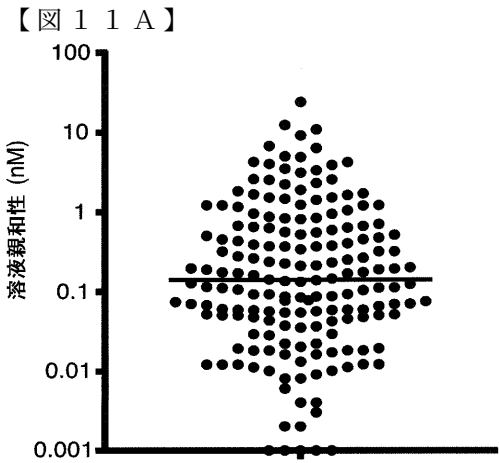


FIG. 11A

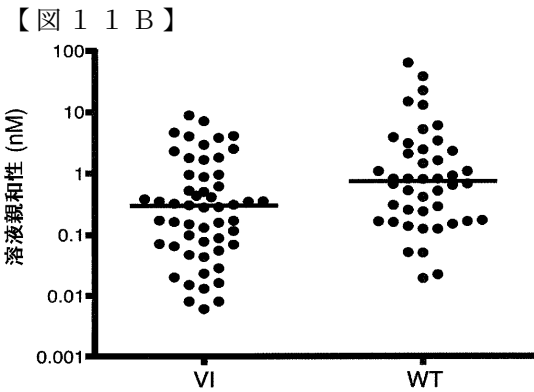


FIG. 11B

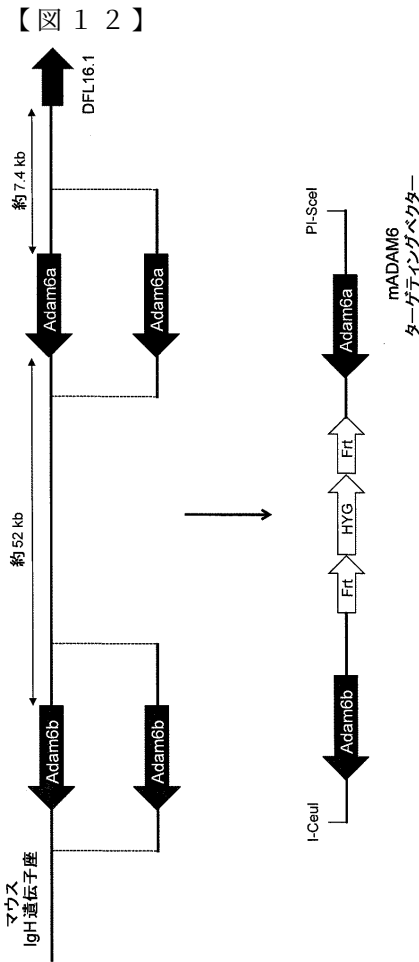


FIG. 12

【図 13】

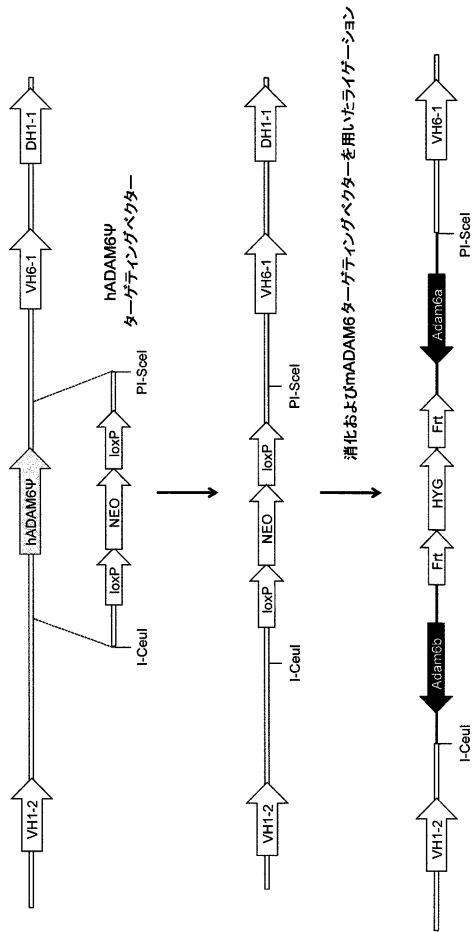


FIG. 13

【図 14 B】

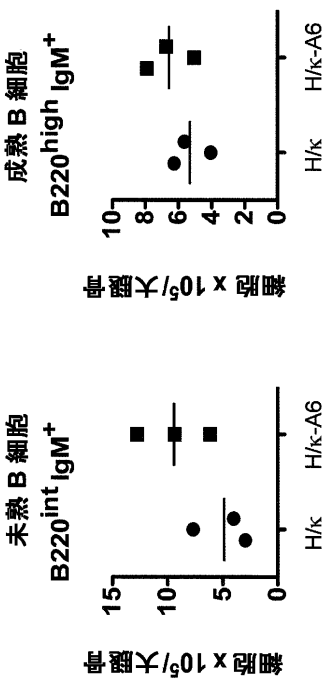


FIG. 14B

【図 14 A】

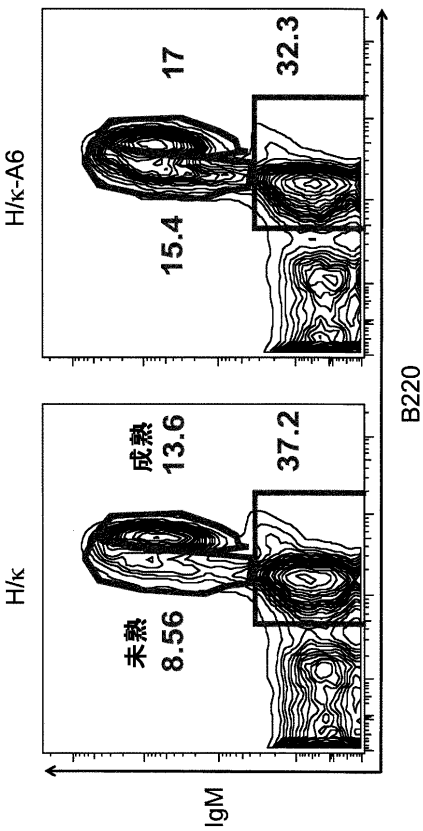


FIG. 14A

【図 15 A】

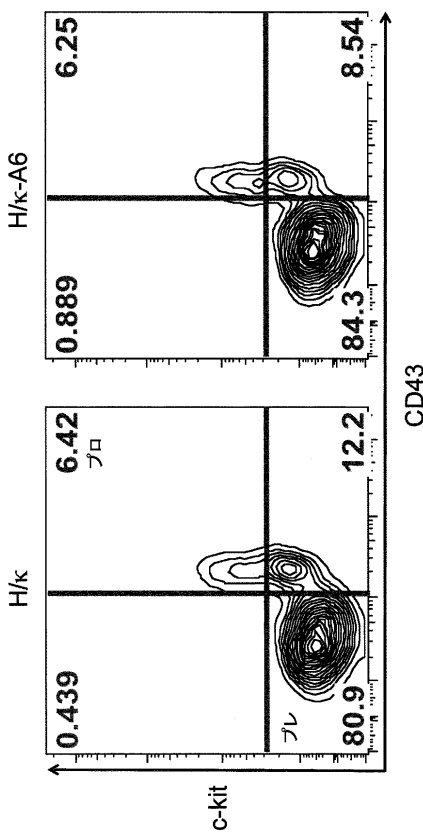


FIG. 15A

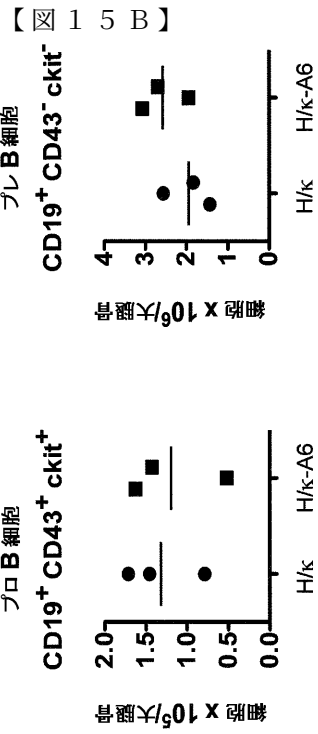


FIG. 15B

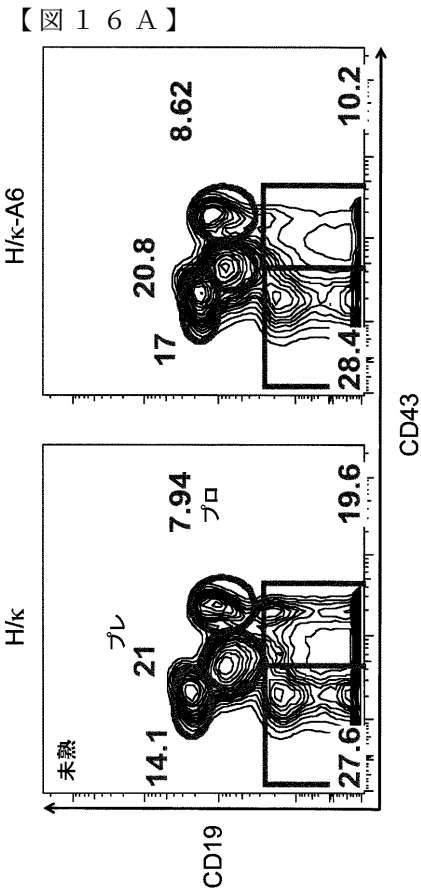


FIG. 16A

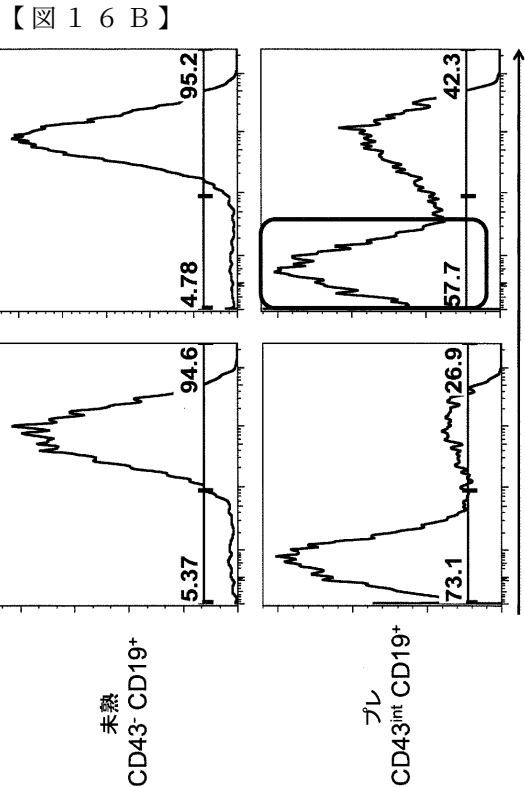


FIG. 16B

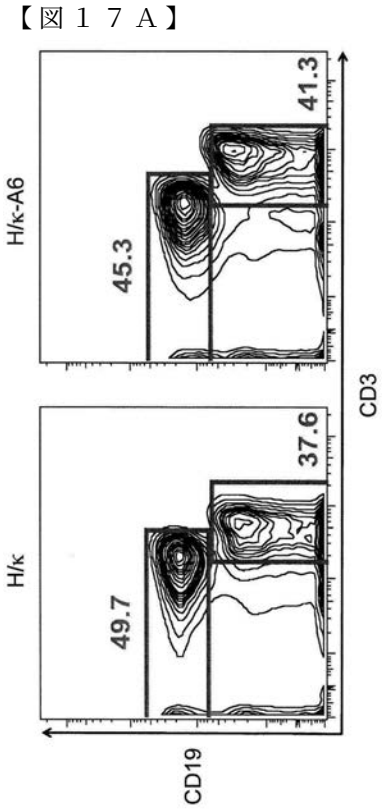


FIG. 17A

【図 17 B】

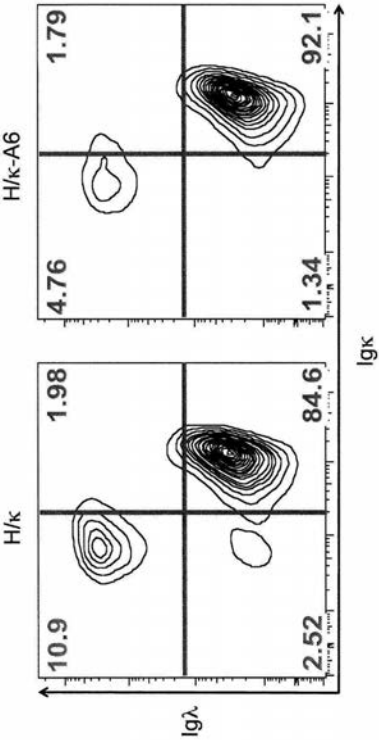


FIG. 17B

【図 17 C】

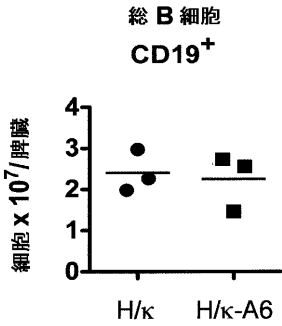


FIG. 17C

【図 18 A】

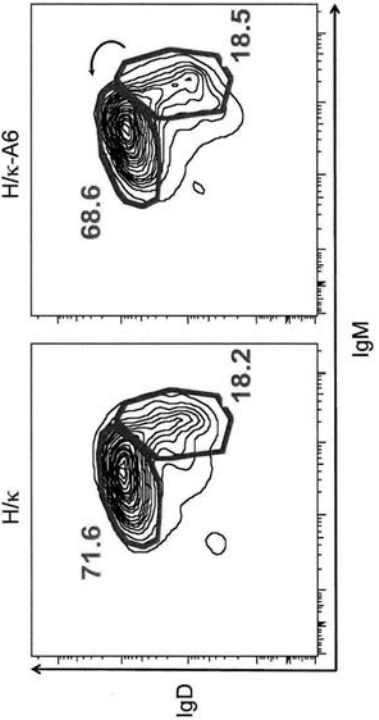


FIG. 18A

【図 18 B】

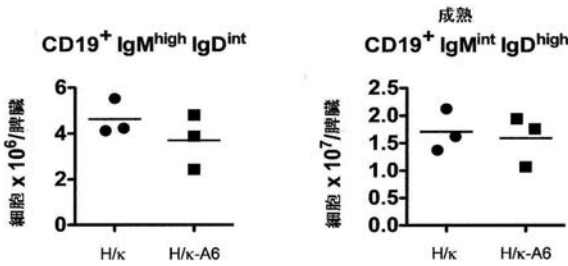


FIG. 18B

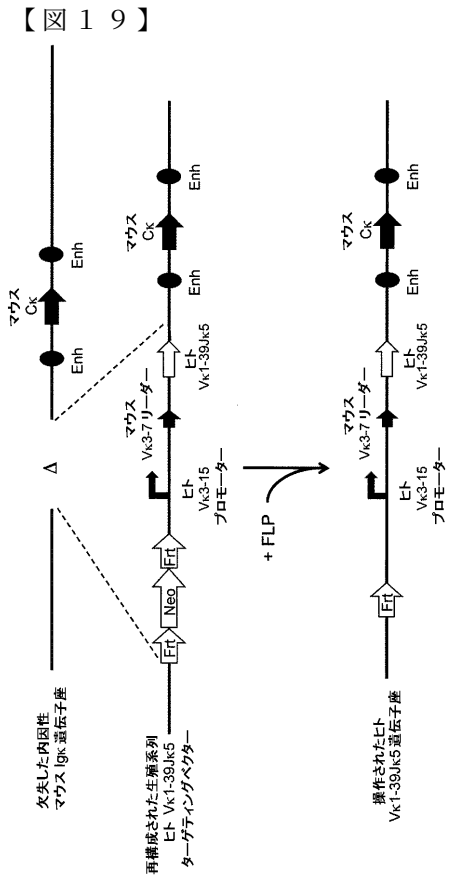


FIG. 19

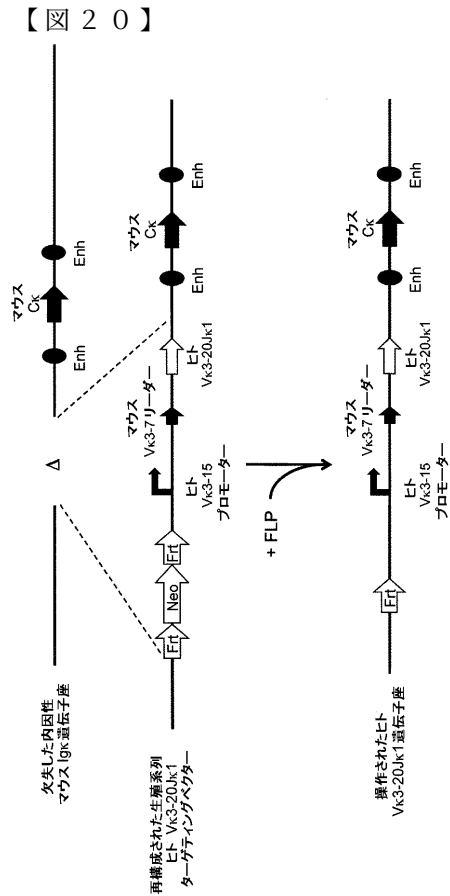


FIG. 20

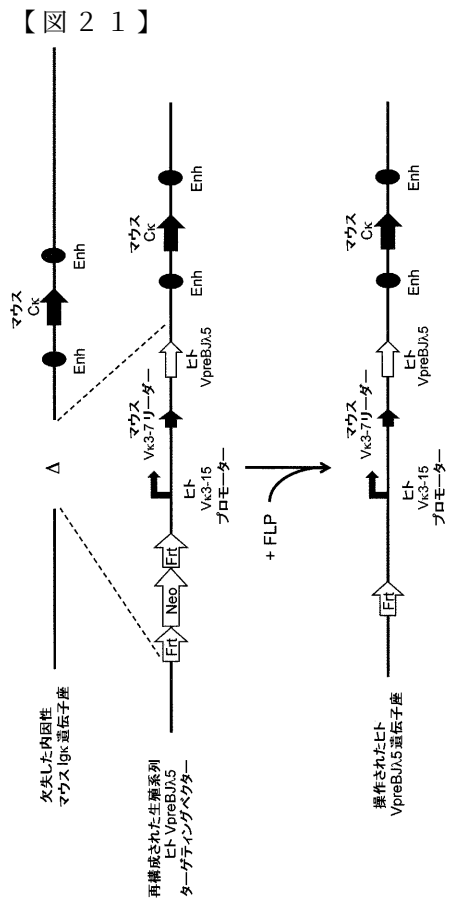


FIG. 21

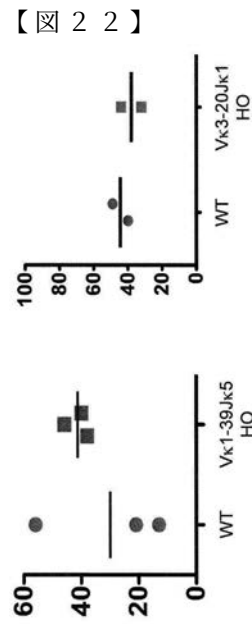


FIG. 22

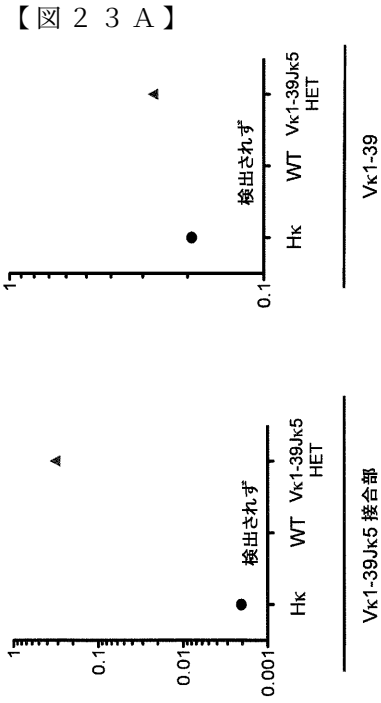


FIG. 23A

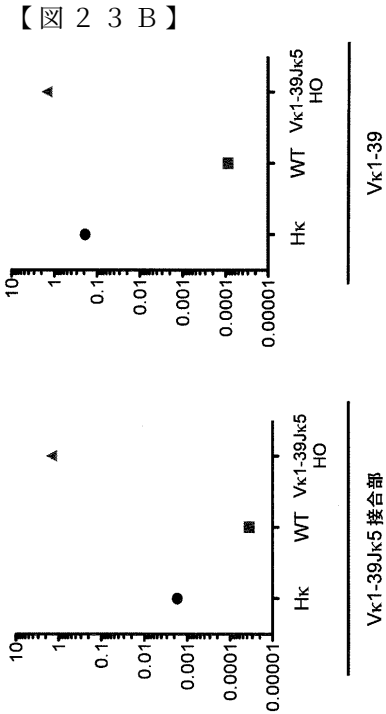


FIG. 23B

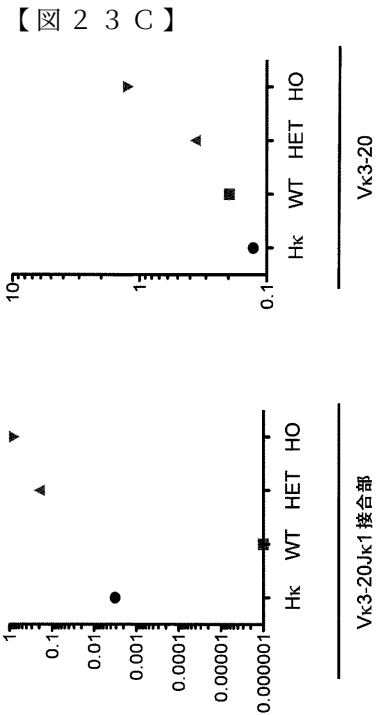


FIG. 23C

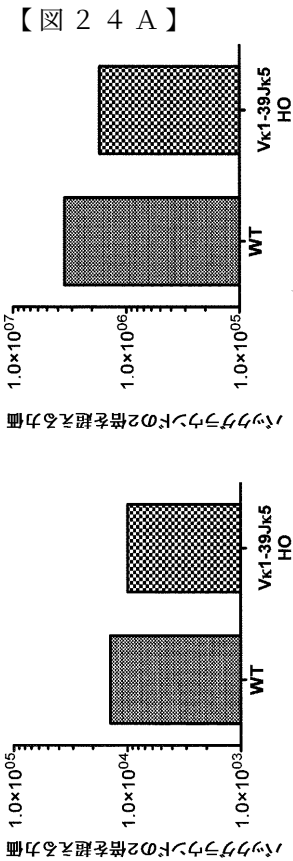


FIG. 24A

【図 2 4 B】

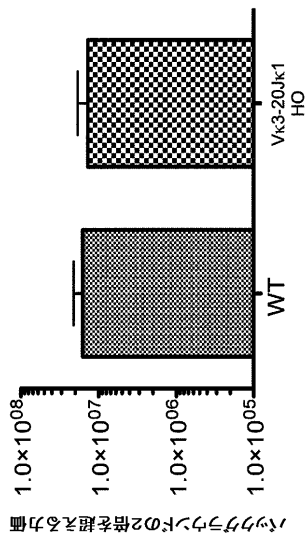


FIG. 24B

【配列表】

2019062906000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ジョン ミクウィルター
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, クレセント ドライブ 20
35
- (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 10591, ホワイト プレインズ, ゲッドニー ウェイ
16
- (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 サミュエル デイビス
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10024, ニューヨーク, ウエスト 88ティーエイチ
ストリート 332, アpartment ビー2
- (72)発明者 デイビッド アール. バックラー
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07930, チェスター, エリック コート 6
- (72)発明者 カロライナ エー. ホシアワ
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, チャーチ ストリート 14,
2エヌディー フロア
- (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, クロトニーオンーハドソン, ニュートン コー
ト 10

Fターム(参考) 4B065 AA91X AA91Y AA93Y BA02 BA12 CA24 CA25 CA44 CA46

【外国語明細書】
2019062906000001.pdf