

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6636498号
(P6636498)

(45) 発行日 令和2年1月29日 (2020.1.29)

(24) 登録日 令和1年12月27日 (2019.12.27)

(51) Int. Cl.

F I

A O 1 K 67/027 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C O 7 K 16/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

A O 1 K 67/027 Z N A

C 1 2 N 15/13

C O 7 K 16/00

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/10

請求項の数 51 (全 64 頁)

(21) 出願番号 特願2017-501140 (P2017-501140)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月20日 (2015.3.20)
 (65) 公表番号 特表2017-509355 (P2017-509355A)
 (43) 公表日 平成29年4月6日 (2017.4.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/021892
 (87) 国際公開番号 W02015/143414
 (87) 国際公開日 平成27年9月24日 (2015.9.24)
 審査請求日 平成30年3月19日 (2018.3.19)
 (31) 優先権主張番号 61/968,986
 (32) 優先日 平成26年3月21日 (2014.3.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/968,905
 (32) 優先日 平成26年3月21日 (2014.3.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単一ドメイン結合タンパク質を作る非ヒト動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生殖系列に以下：

(a) 内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座における少なくとも1つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子の C_H1 ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異であって、前記少なくとも1つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子が、IgG、IgA、IgE、IgD、またはそれらの組み合わせである前記欠失または不活性化変異、及び

(b) 以下の(i)または(ii)のいずれか、または両方：

(i) 少なくとも1つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)遺伝子セグメント及び少なくとも1つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結(J_L)遺伝子セグメントを含む核酸配列であって、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 C_H1 ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列において前記欠失または不活性化変異を含む前記免疫グロブリン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免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L/J_L)ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能である、前記核酸配列、及び/または

(ii) 生殖系列 V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L/J_L 遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座であって、前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、前記免疫グロブリン軽鎖遺伝子

10

20

座

を含む遺伝子改変された非ヒト動物であって、前記動物が、前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に機能的 C_H1 ドメインを含んでいる I g M 重鎖遺伝子を更に含む、前記遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの再構成されていない V_L 遺伝子セグメント、前記少なくとも 1 つの再構成されていない J_L 遺伝子セグメント、及び / または前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列が各々、ヒトカッパ遺伝子セグメント配列を含むか、またはヒト 遺伝子セグメント配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

10

【請求項 3】

前記免疫グロブリン軽鎖定常領域及び / または前記免疫グロブリン重鎖定常領域が、非ヒト型である、請求項 2 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 4】

前記遺伝子改変された非ヒト動物が、(b)(i) を含まず、(b)(ii) を含み、且つ、前記内在性免疫グロブリン重鎖における 1 つ以上の内在性 V_H、D_H、J_H 遺伝子セグメントは、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の発現が、ヒトイデオタイプを含みかつ機能的 C_H1 ドメインを欠く免疫グロブリン重鎖定常領域に連結されている重鎖可変ドメインを含む V_H 単ドメイン結合タンパク質を生じさせるようにヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントで置き換えられているか、または

20

前記遺伝子改変された非ヒト動物が、(b)(i) を含み、且つ、前記内在性免疫グロブリン重鎖における 1 つ以上の内在性 V_H、D_H、J_H 遺伝子セグメントは、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の発現が、ヒトイデオタイプを含みかつ機能的 C_H1 ドメインを欠く免疫グロブリン重鎖定常領域に連結されている免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む V_L 単ドメイン結合タンパク質を生じさせるように前記少なくとも 1 つの再構成されていない V_L 遺伝子セグメント及び前記少なくとも 1 つの再構成されていない J_L 遺伝子セグメントで置き換えられている、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 5】

全てのまたは実質的に全ての内在性重鎖可変領域遺伝子セグメント及び / または全てのまたは実質的に全ての内在性軽鎖可変領域遺伝子セグメントが、欠失されているか、または機能的に不活性化されている、請求項 4 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

30

【請求項 6】

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列が、ヒト V₁ - 39 / J 遺伝子配列、またはヒト V₃ - 20 / J 遺伝子配列である、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 7】

前記ヒト V₁ - 39 / J 遺伝子配列が、ヒト J₅ 遺伝子セグメントとともに再構成されたヒト V₁ - 39 遺伝子セグメントを含む、請求項 6 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 8】

ヒト V₃ - 20 / J 遺伝子配列が、ヒト J₁ 遺伝子セグメントとともに再構成されたヒト V₃ - 20 遺伝子セグメントを含む、請求項 6 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

40

【請求項 9】

前記免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列が、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列である、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 10】

前記単一の再構成された軽鎖 V_L / J_L 遺伝子配列が、前記非ヒト動物の全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

50

【請求項 1 1】

前記単一の再構成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列が、ヒト生殖系列 V_L 及びヒト生殖系列 J_L 遺伝子セグメント配列を含む、請求項 1 0 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 1 2】

前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、不活性化されたヒンジ領域を更に含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 1 3】

$C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異が、 $I g G 1$ 配列におけるものであり、前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、 $I g D$ 、 $I g G 3$ 、 $I g G 2 a$ 、 $I g G 2 b$ 、 $I g G 2 c$ 、 $I g E$ 、 $I g A$ 、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される免疫グロブリン遺伝子の欠失または不活性化変異を更に含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

10

【請求項 1 4】

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、前記 $I g G 2 a$ 及び $I g G 2 b$ 免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を更に含む、請求項 1 3 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 1 5】

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、前記 $I g G 2 b$ 及び $I g G 2 c$ 免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を更に含む、請求項 1 3 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

20

【請求項 1 6】

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、前記 $I g G 3$ 、 $I g D$ 、 $I g A$ 、及び $I g E$ 免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を更に含む、請求項 1 3 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 1 7】

前記非ヒト動物が、雄非ヒト動物において機能的な $A d a m 6$ 遺伝子またはその一部を更に含み、前記 $A d a m 6$ 遺伝子が、 $A d a m 6 a$ 遺伝子、 $A d a m 6 b$ 遺伝子、またはその両方である、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 1 8】

前記動物が、更にその血清中に、機能的 $C_H 1$ ドメインを欠いている抗原特異的単一ドメイン抗原結合タンパク質を含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

30

【請求項 1 9】

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、前記 $C_H 1$ ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含む前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される前記再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列によってコードされる V_L 単一ドメイン結合タンパク質である、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 0】

V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含む前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列と、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列とを含む軽鎖遺伝子座によってコードされる遺伝子操作されたユニバーサル軽鎖を更に含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

40

【請求項 2 1】

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、前記 $C_H 1$ ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含んでいる前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される前記再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列によってコードされる V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質であり、且つ、前記非ヒト動物が、 V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列と、免疫グロブリン軽鎖定常

50

領域遺伝子配列とを含む軽鎖遺伝子座によってコードされる遺伝子操作されたユニバーサル軽鎖を更に含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 2】

前記単ドメイン抗原結合タンパク質の少なくとも 1 つの重鎖が、機能的ヒンジ領域を更に欠いている、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 3】

前記単ドメイン抗原結合タンパク質が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c、及び I g G 3 からなる群より選択される I g G アイソタイプを有する、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 4】

前記単ドメイン抗原結合タンパク質が、ヒト可変ドメイン及び非ヒト定常ドメインを含む、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 5】

前記単ドメイン抗原結合タンパク質が、単量体である、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 6】

I g M 重鎖が軽鎖と会合する、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 7】

前記軽鎖は、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列を含む軽鎖遺伝子座によってコードされるユニバーサル軽鎖である、請求項 2 6 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 8】

前記動物が、げっ歯類である、請求項 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 2 9】

前記げっ歯類が、ラットである、請求項 2 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 3 0】

前記動物が、マウスである、請求項 2 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

【請求項 3 1】

遺伝子改変されたマウスであって、

(a) マウス重鎖遺伝子座における、全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン重鎖 V、D、及び J 遺伝子セグメントの、

(i) 1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 V_H 遺伝子セグメント、1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 D_H 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 J_H 遺伝子セグメントであって、前記 1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 V_H、D_H、及び J_H 遺伝子セグメントが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、前記遺伝子セグメント、または、

(ii) 1 つ以上の再構成されていないヒト軽鎖 V_L 遺伝子セグメント及び 1 つ以上の再構成されていないヒト軽鎖 J_L 遺伝子セグメントであって、前記 1 つ以上の再構成されていないヒト軽鎖 V_L、及び J_L 遺伝子セグメントが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、前記遺伝子セグメント、のいずれかによる置き換えであって、

前記マウス重鎖定常領域遺伝子配列が、完全長 I g M 遺伝子と、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c、I g G 3、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、C_H 1 ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異を含む I g G 遺伝子とを含む、前記置き換え、

(b) 全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントの、単一の再構成されたヒト可変 V / J 遺伝子配列による置き換えを含み、

10

20

30

40

50

前記マウスが、同族軽鎖と会合する I g M 重鎖を含む B 細胞受容体を発現し、前記同族軽鎖は、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列を含む軽鎖遺伝子座によってコードされるユニバーサル軽鎖である、前記遺伝子改変されたマウス。

【請求項 3 2】

遺伝子改変された非ヒト動物の作製方法であって、以下：

(a) 前記非ヒト動物の内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において少なくとも 1 つの非ヒト重鎖定常領域を改変して、前記重鎖定常領域が I g G、I g A、I g E、I g D、またはそれらの組み合わせの C_H 1 ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含むようにすること、及び、

10

(b) (i) 前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を改変して、少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメントを含む核酸配列を含むようにすることであって、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 C_H 1 ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含んでいる前記免疫グロブリン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免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能である、こと、及び / または

(i i) ゲノムを改変して、生殖系列 V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含むようにすることであって、前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、こと

20

を含み、前記動物が、機能的 C_H 1 ドメインを含んでいる I g M 重鎖を含む、前記方法。

【請求項 3 3】

ステップ (a) が、前記改変された C_H 1 ドメインを含んでいる、前記 I g G、I g A、I g E、I g D、またはその組み合わせのヒンジ領域を欠失または不活性化させることを更に含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

30

前記遺伝子改変された非ヒト動物が、(b) (i) を含まず、(b) (i i) を含み、且つ、前記内在性免疫グロブリン重鎖における 1 つ以上の内在性 V_H、D_H、J_H 遺伝子セグメントは、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の発現が、ヒトイディオタイプを含みかつ機能的 C_H 1 ドメインを欠く免疫グロブリン重鎖定常領域に連結されている重鎖可変ドメインを含む V_H 単一ドメイン結合タンパク質を生じさせるようにヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントにより置き換えられているか、または

前記遺伝子改変された非ヒト動物が、(b) (i) を含み、且つ、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の 1 つ以上の内在性免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の発現がヒトイディオタイプを含み且つ機能的 C_H 1 ドメインを欠いている免疫グロブリン重鎖定常領域に連結されている免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含んでいる V_L 単一ドメイン結合タンパク質を生じるように、再構成されていないヒト軽鎖 V_L 及び J_L 遺伝子セグメントにより置き換えられている、請求項 3 2 または請求項 3 3 に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

前記免疫グロブリン重鎖及び / または軽鎖の定常領域遺伝子配列が、非ヒトである、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記再構成されていない軽鎖 V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、全てのまたは実質的に全ての機能的内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える、請求項 3 2 ~ 3 5 のいずれか一

50

項に記載の方法。

【請求項 37】

C_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列の前記欠失または不活性化変異が、IgG遺伝子においてである、請求項32～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記ヒトV_L/J_L遺伝子配列が、ヒトV_H1-39/J遺伝子配列、またはヒトV_H3-20/J遺伝子配列である、請求項32～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記ヒトV_H1-39/J遺伝子配列が、ヒトJ_H5遺伝子セグメントとともに再構成されたヒトV_H1-39遺伝子セグメントを含み、

前記ヒトV_H3-20/J遺伝子配列が、ヒトJ_H1遺伝子セグメントとともに再構成されたヒトV_H3-20遺伝子セグメントを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項 40】

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、及び/または

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域が、前記非ヒト動物の全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖V_L及びJ_L遺伝子セグメントを置き換える、請求項32に記載の方法。

【請求項 41】

前記核酸配列及び/または単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域配列が、前記非ヒト動物の生殖系列にある、請求項32～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記C_H1の欠失または不活性化変異が、IgG1におけるものであり、前記方法が、(c)IgD、IgG3、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgE、IgA、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される免疫グロブリン遺伝子を欠失または不活性化させることを更に含む、請求項32～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記非ヒト動物が、げっ歯類である、請求項40に記載の方法。

【請求項 44】

前記げっ歯類が、ラットである、請求項43に記載の方法。

【請求項 45】

前記げっ歯類が、マウスである、請求項43に記載の方法。

【請求項 46】

C_H1ドメインを欠いている抗原特異的IgG単ドメイン結合タンパク質の生成方法であって、全部または一部において、前記方法が、以下のステップ：

(a)請求項1～31のいずれか一項に記載の遺伝子改変された非ヒト動物に前記抗原で免疫することと、

(b)前記非ヒト動物が：

(i)2つの同族軽鎖と会合された2つのIgM重鎖を含んでいるIgM抗体であって、前記同族軽鎖は、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されるV_L及びJ_L遺伝子セグメント配列を含んでいる前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列を含む軽鎖遺伝子座によってコードされるユニバーサル軽鎖である、前記IgM抗体；及び

(ii)機能的C_H1ドメインを欠いている少なくとも1つの重鎖を含んでいる単ドメイン抗原結合タンパク質を発現するように、前記非ヒト動物を維持することと、を含む、前記方法。

【請求項 47】

(c)前記非ヒト動物から前記抗原と特異的に結合する細胞またはタンパク質を単離することであって、前記細胞またはタンパク質が、前記単ドメイン抗原結合タンパク質を

10

20

30

40

50

含むこと、

(c) 前記単一ドメイン抗原結合タンパク質の可変ドメインをコードする核酸を単離すること、

(c) ベクターを発現させるのに十分な条件で、前記ベクターをトランスフェクトした宿主細胞を培養することであって、前記ベクターが、ヒト重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される核酸を含み、前記核酸が、前記単一ドメイン抗原結合タンパク質の可変ドメインをコードすること、または

(c) ハイブリドーマ培養物から上清を採取することであって、前記ハイブリドーマが、前記単一ドメイン抗原結合タンパク質を含んでいる細胞から生成されることを更に含む、請求項 46 に記載の方法。

10

【請求項 48】

前記重鎖定常領域遺伝子が、IgG1、IgG2a、IgG2b、及びIgG3からなる群より選択されるヒトIgG定常領域遺伝子である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

請求項 47 に記載の方法に従って単離された前記細胞から生成されるハイブリドーマ。

【請求項 50】

そのゲノム内に

(a) 内在性免疫グロブリン重鎖における、IgG、IgA、IgE、IgDまたはそれらの組合せのC_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活化変異、及び

20

(b) (i) 内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座における、少なくとも1つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)遺伝子セグメント及び少なくとも1つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結(J_L)遺伝子セグメントを含む核酸配列であって、前記再構成されていないV_L遺伝子セグメント及びJ_L遺伝子セグメントは、前記C_H1ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列において前記欠失または不活化変異を含んでいる前記免疫グロブリン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免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L/J_L)ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能である、核酸配列、及び/または

(ii) 生殖系列V_L遺伝子セグメント配列及びJ_L遺伝子セグメント配列を含んでいる単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域V_L/J_L遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座であって、前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列は、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されている、免疫グロブリン軽鎖遺伝子座

30

を含む細胞であって、前記細胞が、前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に機能的C_H1ドメインを含んでいるIgM重鎖遺伝子を更に含む、前記細胞。

【請求項 51】

前記細胞が、胚性幹(ES)細胞またはB細胞である、請求項 50 に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

関連出願の相互参照

本願は、米国特許法第119条(e)の下で、2014年3月21日出願の米国仮出願シリアル番号第61/968,986号及び2014年3月21日出願の米国仮出願シリアル番号第61/968,905号の利益を主張し、当該出願の双方は、参照によりその全体が本明細書に共に援用される。

【0002】

発明の分野

免疫グロブリン重鎖遺伝子座の高い多様性を示し、且つ好適には免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の低い多様性を示し、V_H単一ドメイン結合タンパク質及びV_L単一ドメイン結合タンパク質を含む抗原と結合する単一ドメイン抗原結合タンパク質の選択を可能にする非

50

ヒト動物を提供する。

【背景技術】

【0003】

動物の大半では、正常な免疫グロブリン重鎖が十分に発現するのは、その同族軽鎖と結合した場合に限られる。ヒトでは、可変重鎖、 C_H1 、または可変重鎖及び C_H1 ドメインの配列を欠いている機能不全の重鎖が認められる重鎖病に孤立重鎖が見られる。軽鎖が欠如している重鎖は、ある特定の種の魚類及びラクダに見られる。係る重鎖は、機能的 C_H1 ドメインを欠いており、重鎖可変ドメインにおいて非ヒト特徴を有する。ラクダまたはある特定の種の魚類に見られる V_{HH} ドメインを模倣するラクダ化遺伝子を発現するようにマウスを改変することにより（部分的に、 IgM 及び IgG C_H1 ドメインを除去し、重鎖可変領域をラクダ及び/またはある特定の種の魚類のものと類似するように適合させることにより）、ラクダ化抗体を作製する試みがなされている。残念なことに、ラクダ化抗体は、非ラクダ動物において免疫応答を誘導することが予測される。不活性化された C_H1 ドメインを含むように遺伝子改変された非ヒト動物の以前のバージョンに関する別の問題は、抗原特異的単ドメイン抗原結合タンパク質の発現レベルが従来の抗体よりも低いということにある。そのような発現レベルの低さは、重鎖可変領域に V_L ドメインの欠如を補わせることを可能にする、非ラクダ科重鎖可変領域が利用できる機構が欠落していることに起因すると考えられる。例えば、重鎖のみの結合タンパク質に見られるラクダ V_{HH} ドメインは、平均して、非ラクダ科抗体に見られるドメインよりも長く、全体的な抗原親和性及び抗原特異性に大きな影響を及ぼすと考えられ、且つラクダ科の重鎖のみの抗体における V_L ドメインの欠如を補うものと考えられる $CDRH3$ を含んでいる。

【0004】

したがって、当該分野では非ラクダ科 V_H ドメインを有する多様な単ドメイン結合タンパク質を作る遺伝子改変された非ヒト動物が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書に開示するように、軽鎖可変領域及び重鎖定常領域を含む免疫グロブリンポリペプチド鎖は、非ヒト動物によって発現することができ、 V_L 単ドメイン抗原結合タンパク質（例えば、重鎖定常ドメインに作動可能に連結される軽鎖可変ドメインを含む単ドメイン抗原結合タンパク質）を形成することができ、ここで、重鎖定常ドメイン（複数可）は、例えば IgG 、 IgA 、 IgE 、 IgD 、またはそれらの組み合わせから選択される免疫グロブリン重鎖定常領域の機能的 C_H1 ドメインを欠いている。該 V_L 単ドメイン抗原結合タンパク質は、機能的 C_H1 ドメインを欠いている重鎖定常ドメインに作動可能に連結される重鎖可変ドメインを含む V_H 単ドメイン抗原結合タンパク質に比して、高い安定性を呈し得る。したがって、本明細書では、軽鎖可変ドメイン及び重鎖定常領域を含む V_L 単ドメイン抗原結合タンパク質（ここで重鎖定常領域は機能的 C_H1 ドメインを欠いており、場合によっては、機能的ヒンジ領域を欠いていてもよい）を発現することができる非ヒト動物、及び V_L 単ドメイン抗原結合タンパク質を発現する非ヒト動物の作製及び使用方法を提供する。また、 V_L 単ドメイン抗原結合タンパク質を発現する非ヒト動物由来の細胞、タンパク質及び核酸、ならびに単離された細胞、タンパク質及び核酸の使用も提供する。

【0006】

本明細書において開示するように、単ドメイン抗原結合タンパク質（例えば、 V_L または V_H 単ドメイン抗原結合タンパク質）を産生することができる非ヒト動物による単一の再構成された軽鎖の発現は、単一の再構成された軽鎖を発現しない単ドメイン抗原結合タンパク質を発現することができる同様の非ヒト動物に比して、抗原刺激に応答して抗原特異的単ドメイン抗原結合タンパク質の力価を増大させる。図5。このデータから、非ヒト動物による単一の再構成された軽鎖が存在することが、抗原特異的単ドメイン抗原結合タンパク質を発生させる可能性を高めることが示唆される。したがって、本明細

書では、単一ドメイン抗原結合タンパク質（例えば、 V_H 及び/または V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質）及び単一の再構成された軽鎖を発現することができる非ヒト動物、及び V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質を発現する非ヒト動物の作製及び使用方法を提供する。単一ドメイン抗原結合タンパク質及び単一の再構成された軽鎖を発現する非ヒト動物由来の細胞、タンパク質及び核酸、ならびに単離された細胞、タンパク質及び核酸の使用も提供する。

【0007】

本明細書では、 V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質及び単一の再構成された軽鎖を含む非ヒト動物、高力価の単一ドメイン抗原結合タンパク質を産生することができる非ヒト動物の作製方法及び/または係る結合タンパク質を産生することができる非ヒト動物によって単一ドメイン結合タンパク質の産生を増大させる方法、該非ヒト動物を用いて抗原特異的単一ドメイン抗原結合タンパク質を作製する方法、ならびにそのように作製された単一ドメイン抗原結合タンパク質も提供する。

10

【0008】

遺伝子改変された細胞、非ヒト胚、非ヒト動物及びそれらを作製及び使用するのための方法ならびに組成物が提供され、ここで、該動物は、単一ドメイン抗原結合タンパク質（例えば、機能的 C_H1 配列を欠いており、場合によっては機能的ヒンジ領域配列を欠いている重鎖定常領域を含む結合タンパク質）を産生するように遺伝子改変され、ここで、該動物は、 V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質（例えば、 C_H1 ドメインをコードする配列を不活性化または欠失させるように改変された重鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結される再構成された軽鎖可変領域ヌクレオチド配列からコードされる）及び/または単一の再構成された軽鎖（例えば、該動物の生殖系列の軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された $V_L : J_L$ 配列からコードされる）として、単一ドメイン抗原結合タンパク質を発現するように更に遺伝子改変される。

20

【0009】

本明細書に開示する動物は、一態様では、IgGアイソタイプ（例えば、IgG1アイソタイプなど）を含む単一ドメイン結合タンパク質を産生し得る。一部の実施形態では、該単一ドメイン抗原結合タンパク質は V_H 単一ドメイン抗原結合タンパク質であり、例えば、機能的 C_H1 を欠いている重鎖定常領域に作動可能に連結される重鎖可変領域を含む。他の実施形態では、該単一ドメイン抗原結合タンパク質は V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質であり、例えば、機能的 C_H1 を欠いている重鎖定常領域（例えば、ヒンジ、 C_H2 、 C_H3 、 C_H4 、またはそれらの組み合わせを含む重鎖定常領域）に作動可能に連結される軽鎖可変ドメインを含む。

30

【0010】

したがって、一部の態様では、本明細書に記載の単一ドメイン抗原結合タンパク質は、重鎖定常領域（例えば、 C_H1 、ヒンジ、 C_H2 、 C_H3 、 C_H4 、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される重鎖定常領域ドメイン）に作動可能に連結される1つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖Vセグメント及び1つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖Jセグメントに由来する核酸配列によってコードされ、ここで、重鎖定常領域は、 C_H1 領域配列において欠失または不活性化変異を含む。一実施形態では、該再構成されていない軽鎖V及びJセグメントは、内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の1つ以上の、実質的に全ての、または全ての機能的内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える。一部の実施形態では、本明細書に開示するような C_H1 領域配列における欠失または不活性化変異を含む重鎖定常領域に作動可能に連結される軽鎖可変領域遺伝子セグメントを含むように改変された重鎖遺伝子座は、該非ヒト動物の生殖系列に見出され得る。そのような改変された遺伝子座は、内在性重鎖遺伝子座にあるか、または該内在性重鎖遺伝子座以外の遺伝子座の導入遺伝子に（例えば、ゲノムのランダムな位置に挿入されて）存在し得る。

40

【0011】

一態様では、 V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質をコードする核酸配列（例えば、C

50

H 1 領域配列において欠失または不活性化変異を含む重鎖定常領域に作動可能に連結される 1 つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖 V セグメント及び 1 つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖 J セグメント由来の核酸配列)を含む本明細書に記載の動物は、(軽鎖定常領域に作動可能に連結されるヒト軽鎖 V セグメント及びヒト軽鎖 J セグメントを含む第 2 の核酸配列によってコードされてもよい)軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含んでいる第 2 の免疫グロブリンポリペプチド鎖を更に含んでいてもよい。係る第 2 の核酸配列は、該非ヒト動物の生殖系列にも見出されてもよい。係る核酸配列は、内在性軽鎖遺伝子座に存在していてもよいし、内在性軽鎖遺伝子座以外の遺伝子座における導入遺伝子に(例えば、ゲノムのランダムな位置に挿入されて)存在していてもよい。

【0012】

10

別の態様では、 C_H 1 領域配列において欠失または不活性化変異を含む重鎖定常領域に作動可能に連結される 1 つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖 V セグメント及び 1 つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖 J セグメント由来の核酸配列を含むように改変された動物を、単一の再構成された軽鎖(例えば、共通軽鎖(U_LC))を発現するように更に改変してもよい。

【0013】

一部の実施形態では、該単一ドメイン抗原結合タンパク質(例えば、限定するものではないが、 V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質)及び/または単一の再構成された軽鎖は、ヒトイディオタイプを含む。例えば、本明細書に開示する単一ドメイン抗原結合タンパク質及び/または遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖は、ヒト可変ドメインを含んでいてもよく、一実施形態では、非ヒト定常ドメインを含んでいてもよい。一実施形態では、該非ヒト定常ドメインは内在性非ヒト定常ドメインである。一実施形態では、該非ヒト定常ドメインは、げっ歯類定常ドメイン(例えば、ネズミ定常ドメイン、例えば、マウス定常ドメイン)である。別の実施形態では、該定常ドメインはヒト定常ドメインである。一態様では、該単一ドメイン抗原結合タンパク質は、ヒト軽鎖可変ドメイン及び非ヒト重鎖定常ドメインを含む V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質である。一実施形態では、本明細書に開示するような V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質をコードする再構成されていない軽鎖 V 及び/または J セグメントは、ヒトセグメントである。

20

【0014】

本明細書に開示するような単一ドメイン抗原結合タンパク質を産生するように遺伝子改変された動物は、1 つ以上のまたは全ての内在性免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの、1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメント、または 1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖 V セグメント及び 1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖 J セグメントによる置き換えを有する重鎖遺伝子座を含んでいてもよい。一部の態様では、内在性 V_H 、 D_H 、及び J_H 遺伝子セグメントは全て、1 つ以上の再構成されていないヒト V_H 、1 つ以上の再構成されていないヒト D_H 、及び 1 つ以上の再構成されていないヒト J_H の遺伝子セグメントにより置き換えられている。他の態様では、内在性 V_H 、 D_H 、及び J_H 遺伝子セグメントは全て、1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖 V_L 遺伝子セグメント及び 1 つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖 J_L 遺伝子セグメント(例えば、ヒト κ () V 及び/及び J 遺伝子セグメント及び/またはヒト λ () V 及び/及び J 遺伝子セグメント)により置き換えられている。

30

40

【0015】

C_H 1 領域及び/またはヒンジ領域の欠失を含む重鎖定常領域の関連で重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含む単一ドメイン結合タンパク質を産生するように遺伝子改変された動物は、内在性重鎖遺伝子座に改変(及び/または本明細書に記載の定常遺伝子の遺伝子座の他の改変)を有しても、導入遺伝子上に改変を有してもよく、ここで、該導入遺伝子はゲノムのどこかに位置づけられ、例えば、ランダム挿入によってゲノムに挿入される。一部の実施形態では、本明細書に記載の改変された重鎖遺伝子座は該動物の生殖系列に見出され得る。単一の再構成された軽鎖を発現するようにも改変されている動物では、単一

50

の再構成された軽鎖可変領域は、内在性軽鎖遺伝子座の軽鎖定常領域に作動可能に連結され得るか、あるいは同族（例えば、該非ヒト動物に対して自家性）または異種軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された軽鎖可変領域を含み、且つ内在性軽鎖遺伝子座以外の遺伝子座に存在する（例えば、ゲノムにランダムに挿入された）導入遺伝子に存在し得る。

【 0 0 1 6 】

更なる実施形態では、本明細書に開示の動物の重鎖遺伝子座は、ヒンジ領域（複数可）において欠失または不活性化変異を含んでいてもよい。

【 0 0 1 7 】

更に、本明細書に開示の動物は、単一の再構成された $V_L : J_L$ 遺伝子配列を含んでい
る軽鎖遺伝子座によってコードされてもよい、共通またはユニバーサル軽鎖（ ULC ）と
も呼ばれる軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された軽鎖可変遺伝子配列
を含む及び／または発現するように改変されてもよい。一部の実施形態では、軽鎖遺伝子
座は、 V_L 配列が V 遺伝子配列である単一の再構成された $V_L : J_L$ 遺伝子配列を含む
。一部の態様では、該 V 配列は V_{1-39} または V_{3-20} から選択される。一部の
態様では、該 J_L 配列は J 遺伝子配列（例えば、 J_1 配列、 J_2 配列、 J_3 配
列、 J_4 配列、または J_5 配列等）である。一部の実施形態では、軽鎖遺伝子座は、
 $V_{1-39} J_5$ 及び $V_{3-20} J_1$ からなる群より選択される単一の再構成され
た $V : J$ 配列を含む。一実施形態では、軽鎖遺伝子座は $V_{1-39} J_5$ の単一の
再構成された $V : J$ 配列を含む。別の実施形態では、軽鎖遺伝子座は $V_{3-20} J_1$
の単一の再構成された $V : J$ 配列を含む。一部の実施形態では、該単一の再構成
された可変遺伝子配列は、非ヒト軽鎖定常領域遺伝子（例えば、内在性非ヒト軽鎖定常領域
遺伝子）に作動可能に連結される。別の実施形態では、該単一の再構成された可変遺伝子
配列はヒト軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される。一部の態様では、該単一の再構
成された可変遺伝子配列は、内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に挿入されたヒト $V : J$
配列であるので、得られる非ヒト動物は、1つ以上の軽鎖遺伝子座において、機能的な再
構成されていない V 及び／または J 遺伝子セグメントを含んでいない。

【 0 0 1 8 】

したがって、本明細書では、 C_H1 をコードする領域における欠失または不活性化変異
を含む重鎖定常領域、ならびに（a） C_H1 領域における欠失または不活性化変異を含む
重鎖定常領域に関連する軽鎖可変領域及び（b）該単一の再構成された軽鎖の一方または
両方を含む非ヒト動物を提供する。例えば、本明細書に開示する非ヒト動物は、本明細書
に記載の C_H1 領域配列において欠失または不活性化変異を含む重鎖定常領域に作動可能
に連結される1つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖 V セグメント及び1つ以
上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖 J セグメントに由来する核酸配列を含み得る
。一態様では、本明細書に開示する非ヒト動物は、免疫グロブリン C_H1 ドメインをコー
ドする核酸配列における欠失または不活性化変異、及び本明細書に開示する軽鎖定常領域
に作動可能に連結される単一の再構成された軽鎖可変遺伝子配列を含む。別の態様では、
本明細書に開示する非ヒト動物は、 C_H1 領域配列において欠失または不活性化変異を含
む重鎖定常領域に作動可能に連結される1つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽
鎖 V セグメント及び1つ以上の再構成されていない免疫グロブリン軽鎖 J セグメントに由
来する核酸配列、及び軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された軽鎖可変
遺伝子配列を含む。一部の実施形態では、重鎖定常領域は、非ヒト定常領域（例えば、内
在性非ヒト定常領域）である。他の実施形態では、重鎖定常領域はヒト定常領域である。

【 0 0 1 9 】

一部の態様では、非ヒト動物は、本明細書に開示する改変された重鎖遺伝子座及び／ま
たは遺伝子操作された再構成された軽鎖遺伝子座をその生殖系列に含む。該非ヒト動物は
、次の免疫グロブリン遺伝子： IgD 、 $IgG3$ 、 $IgG2a$ 、 $IgG2b$ 、 $IgG2c$
、 IgE 、 IgA 、及びそれらの組み合わせのうちの1つ以上において欠失または不活性
化変異を含んでいてもよい。一実施形態では、該非ヒト動物は $IgG2a$ 免疫グロブリン

遺伝子及び I g G 2 b 免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を含む。別の実施形態では、該非ヒト動物は、I g G 3、I g D、I g A、及び I g E 免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を含む。別の実施形態では、該非ヒト動物は、I g G 3、I g D、I g G 2 a、I g G 2 b、I g A、及び I g E 免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を含む。

【0020】

一部の態様では、本明細書に開示する非ヒト動物は、雄非ヒト動物の生殖能力を保持することのできる A d a m 6 a 遺伝子（またはその断片）及び/または A d a m 6 b 遺伝子（またはその断片）を更に含んでもよい。該 A d a m 6 a 遺伝子、A d a m 6 b 遺伝子、あるいはその両方は、該非ヒト動物において、異所的に置かれてもよいし、該 A d a m 6 遺伝子（複数可）の位置近傍の位置に置かれてもよい。該 A d a m 6 a 遺伝子、A d a m 6 b 遺伝子、またはその両方は、雄非ヒト動物において機能的である。例えば、該非ヒト動物はげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）であり、該 A d a m 6 a 遺伝子、A d a m 6 b 遺伝子、またはその両方は、それぞれマウス遺伝子またはラット遺伝子である。種々の実施形態では、該 A d a m 6 遺伝子（複数可）の維持または挿入は、生殖能力を維持するか、または雄非ヒト動物に（例えば、雄のマウスまたはラットに）生殖能力を与える。

10

【0021】

一態様では、本明細書に開示する非ヒト動物は、同族軽鎖（例えば、遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖）と会合してよい、機能的 C_H1 ドメインをコードする配列を含んでいる I g M 遺伝子配列によってコードされた I g M 免疫グロブリンを含む。別の実施形態では、該非ヒト動物は、I g M 及び I g G 1 アイソタイプを有する重鎖のみを産生し、ここで、該 I g M 重鎖は機能的 C_H1 ドメインを含むが、該 I g G 1 重鎖は機能的 C_H1 ドメインを欠いている。一態様では、I g M 重鎖と会合する同族軽鎖は、軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された軽鎖可変遺伝子配列によってコードされているか、それに由来するものである。

20

【0022】

本明細書に開示する遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖が発現することにより、該非ヒト動物により抗原免疫化後に、高力価の抗原特異的単一ドメイン抗原結合タンパク質が産生される。例えば E L I S A によって測定した場合の、少なくとも $1 \times 10^2 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、少なくとも $1 \times 10^3 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、少なくとも $1 \times 10^4 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、または少なくとも $1 \times 10^5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の力価（例えば、抗体または結合タンパク質の濃度）は、高力価であるとみなされてもよい。あるいは、該結合タンパク質の濃度が遺伝子操作された再構成された軽鎖を含んでいない対応する対照動物の濃度の少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、または少なくとも 100 倍である場合、非ヒト動物は高力価の結合タンパク質を産生する。

30

【0023】

本明細書に開示する非ヒト動物の作製方法も提供する。係る方法は、該非ヒト動物の非ヒト重鎖定常領域を改変して、重鎖定常領域が C_H1 ドメイン（例えば、I g G 1 C_H1 ドメイン）をコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含むようにすることを含む。

40

【0024】

本明細書に開示する非ヒト動物の作製方法は、内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、1つ以上の、全ての、または実質的に全ての内在性非ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを1つ以上の再構成されていない軽鎖 V 及び/または1つ以上の再構成されていない軽鎖 J 遺伝子セグメントにより置き換えて、軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントが C_H1 ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含む重鎖定常領域に作動可能に連結されるようにすることを更に含んでもよい。一実施形態では、該再構成されていない軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントは、生産的な再構成を受けることができ、例えば、改変された非ヒト動物が重鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結される再構成され

50

た免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L)ヌクレオチド配列を含むように該再構成されていない軽鎖V及びJ遺伝子セグメントが組み換えを起こすことを可能にする組換えシグナル配列 (RSS) を含み、ここで、重鎖定常領域核酸配列は $C_H 1$ ドメインをコードする配列において不活性化変異または欠失を含む。一実施形態では、該再構成されていない軽鎖V及びJ遺伝子セグメントは、改変された非ヒト動物が1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多いN付加を含み、且つ重鎖定常領域核酸配列に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L)ヌクレオチド配列を含むように組み換えを起こし、ここで、該重鎖定常領域核酸配列は $C_H 1$ ドメインをコードする配列において不活性化変異または欠失を含む。一実施形態では、該再構成されていない軽鎖V及びJ遺伝子セグメントはヒトV及びJセグメントである。本方法は、再構成されていない軽鎖V遺伝子セグメント、再構成されていない軽鎖J遺伝子セグメント、及び不活性化されているか欠失している $C_H 1$ ドメインを有する重鎖定常領域に由来する V_L 単ドメイン結合タンパク質を該動物に発現させることも含んでいてもよい。

【0025】

別の実施形態では、本明細書に開示する非ヒト動物を作製する本方法は、単一の再構成された軽鎖 (例えば、ユニバーサル軽鎖 (ULC)) をコードする核酸を含んだ遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖遺伝子座を導入すること、及び場合によっては、不活性化された $C_H 1$ ドメインを有する重鎖免疫グロブリン遺伝子座及び単一の再構成された軽鎖遺伝子座を該動物に発現させることを更に含んでいてもよい。

【0026】

一態様では、本明細書に開示する非ヒト動物を作製する本方法は、(a) 該非ヒト動物の非ヒト重鎖定常領域を改変して、重鎖定常領域が $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含むようにすることと、(b) 内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、内在性非ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの1つ以上、全て、または実質的に全てを1つ以上の再構成されていない軽鎖V及び/または1つ以上の再構成されていない軽鎖J遺伝子セグメントにより置き換えて、軽鎖V及びJ遺伝子セグメントが $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含む非ヒト重鎖定常領域に作動可能に連結されるようにすること及び/または(c) 遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖遺伝子座をコードする核酸を導入することの一方または両方とを含む。本明細書に開示する各方法のステップは、任意の順序で、順次に、あるいは同時に行われてもよい。

【0027】

例えば、本明細書に開示する方法は、(a) 該非ヒト動物の非ヒト重鎖定常領域を改変して、該重鎖定常領域が $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含むようにすること、及び(b) 内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、1つ以上の、全ての、または実質的に全ての内在性非ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを1つ以上の再構成されていない軽鎖V及び/または1つ以上の再構成されていない軽鎖J遺伝子セグメントで置き換えて、軽鎖V及びJ遺伝子セグメントが、 $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含んでいる非ヒト重鎖定常領域に作動可能に連結されるようにすることを含んでいてもよい。一態様では、本明細書に開示する方法は、(a) 該非ヒト動物の非ヒト重鎖定常領域を改変して、該重鎖定常領域が $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含むようにすること、及び(b) 遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖遺伝子座をコードする核酸を導入することを含む。別の態様では、本明細書に開示する非ヒト動物の作製方法は、(a) 該非ヒト動物の非ヒト重鎖定常領域を改変して、該重鎖定常領域が $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含むようにすること、(b) 内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、1つ以上の、全ての、または実質的に全ての内在性非ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを1つ以上の再構成されていない軽鎖V及び/または1つ以上の再構成されていない軽鎖J遺伝子セグメントにより置き換えて、軽鎖V及びJ遺伝子セグメントが、 $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失ま

たは不活性化変異を含んでいる非ヒト重鎖定常領域に作動可能に連結されるようにすること、及び(c)遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖遺伝子座をコードする核酸を導入することを含む。本明細書に開示する非ヒト動物の作製方法は、Adam6a遺伝子、Adam6b遺伝子、またはその両方を該非ヒト動物のゲノムに(例えば該動物の生殖系列に)導入することを更に含んでいてもよい。一態様では、本方法は、例えば該動物に免疫することによって、不活性化されたC_H1ドメインを有する重鎖免疫グロブリン遺伝子座及び/または遺伝子的に再構成された軽鎖遺伝子座(単一の再構成された軽鎖遺伝子座)を該動物に発現させることを更に含む。

【0028】

一態様では、重鎖免疫グロブリン遺伝子座の、C_H1ドメイン(複数可)及び場合によってはヒンジ領域(複数可)を不活性化させるステップは、該非ヒト動物が本明細書に開示する単一ドメイン抗原結合タンパク質を産生することを可能にする。一実施形態では、重鎖免疫グロブリン遺伝子座の、C_H1ドメイン(複数可)及び場合によってはヒンジ領域(複数可)を不活性化させることは、重鎖遺伝子座の(例えばIgG重鎖遺伝子座の)C_H1ドメイン(複数可)及び場合によってはヒンジ領域を欠失させるかまたはC_H1ドメイン(複数可)及び場合によってはヒンジ領域に不活性化変異を導入するターゲティングベクターを用いて、内在性重鎖免疫グロブリン遺伝子座を標的とすることを含む。一実施形態では、重鎖免疫グロブリン遺伝子座の、C_H1ドメイン(複数可)及び場合によってはヒンジ領域(複数可)を不活性化させることは、相同組換えを含む。別の実施形態では、該不活性化ステップは、重鎖遺伝子座の内在性可変領域遺伝子セグメントの1つ以上、実質的に全て、または全てを、1つ以上の重鎖可変領域遺伝子セグメント、1つ以上の軽鎖可変領域遺伝子セグメント、1つ以上のヒト可変領域遺伝子セグメント及び1つ以上の再構成されていない可変領域遺伝子セグメントのうちの任意の1つ以上によって置き換えることを更に含んでいてもよい。重鎖遺伝子座のC_H1ドメイン(複数可)及び場合によってはヒンジ領域(複数可)を不活性化するステップは、該非ヒト動物の生殖系列において行われてもよい。

【0029】

一態様において、本方法は、遺伝子操作された再構成された軽鎖遺伝子座(例えば、本明細書に記載する遺伝子操作されたユニバーサル軽鎖)をコードする核酸を導入することを含む。一態様では、遺伝子操作された再構成された軽鎖遺伝子座をコードする核酸を導入するステップは、該非ヒト動物の全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を置き換えることを更に含む。一態様では、遺伝子操作された再構成された軽鎖遺伝子座をコードする核酸を導入するステップは、該非ヒト動物の全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を機能的に不活性化することを更に含む。別の態様では、遺伝子操作された再構成された軽鎖をコードする核酸は、該動物の生殖系列に導入される。

【0030】

一実施形態では、本明細書に開示する非ヒト動物の作製方法は、(a)第1の非ヒト動物であって、欠失または不活性化されたC_H1ドメイン(及び場合によっては欠失または不活性化されたC_H1ドメインを有する重鎖定常領域配列に作動可能に連結される軽鎖可変領域ヌクレオチド配列)を、場合によっては欠失または不活性化されたヒンジ領域を有する重鎖遺伝子座を含み、本明細書に開示する単一ドメイン抗原結合タンパク質(V_L単一ドメイン結合タンパク質など)を産生するようにされている、第1の非ヒト動物を得ること、及び(b)一態様では第1の非ヒト動物とは異なる系統であり得る第2の非ヒト動物と(a)の第1の非ヒト動物を交配させることを含み、ここで、該第2の非ヒト動物はユニバーサル軽鎖を発現し、ここで、該交配により、単一ドメイン抗原結合タンパク質及び遺伝子操作された再構成された軽鎖(単一の再構成された軽鎖;ULC)を産生する(例えば、それらを含む)子孫が得られる。

【0031】

一部の態様では、本明細書に開示する非ヒト動物の作製方法は、IgD、IgG3、I

g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c、I g E、及びI g A からなる群より選択される1つ以上の免疫グロブリン遺伝子を不活性化または欠失させることを更に含む。一実施形態では、該I g G 2 b 及びI g G 2 a / I g G 2 c 免疫グロブリン遺伝子を欠失させる。別の実施形態では、該I g D、I g G 3、I g G 2 b、I g G 2 a / I g G 2 c、I g E、及びI g A 遺伝子を欠失させられ、該非ヒト動物がI g MまたはI g G 1 アイソタイプを有する免疫グロブリン重鎖を産生するようになり、ここで、該I g G 1 アイソタイプはC_H1 ドメインにおいて、場合によってはヒンジ領域において欠失または不活性化変異を有する。

【0032】

一態様では、非ヒト動物は単一ドメイン抗原結合タンパク質を産生することが既に可能であり、本明細書では、該非ヒト動物による単一ドメイン抗原結合タンパク質産生の増大方法を提供する。係る方法は、該非ヒト動物のB細胞に遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖（例えば、本明細書に記載の遺伝子操作されたユニバーサル軽鎖）をコードする核酸を発現させることを含む。該B細胞にそのような核酸を発現させることには、該B細胞による内在性軽鎖遺伝子の発現を不活化または阻止するステップも含んでいてもよい。

【0033】

一態様において、本明細書に開示する非ヒト動物はラットまたはマウスである。別の実施形態では、本明細書に開示する非ヒト動物はマウスである。したがって、本明細書では、（a）マウス重鎖遺伝子座における全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン重鎖V、D、及びJ 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト重鎖V、D、及びJ 遺伝子セグメントによる置き換えであり、ここで、該1つ以上のヒト重鎖V、D、及びJ 遺伝子セグメントはマウス重鎖定常領域（例えば、内在性マウス重鎖定常領域）に作動可能に連結され、ここで、該マウス重鎖定常領域は、完全長I g M 遺伝子と、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 c、I g G 2 b、及びそれらの組み合わせからなる群より選択されるI g G 遺伝子においてC_H1 領域をコードするヌクレオチド配列において欠失または不活性化変異を含んでいるI g G 遺伝子とを含み、ここで、該マウスはC_H1 領域を有するI g Mを含むB細胞受容体を発現し、該I g Mは同族軽鎖と会合する重鎖を含むものと、（b）全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖V及びJ 遺伝子セグメント、単一の再構成された可変V : J 遺伝子配列による置き換えとを含む、遺伝子改変されたマウスを提供する。一部の実施形態では、該同族軽鎖は該単一の再構成された可変V : J 遺伝子配列由来のものである。一部の実施形態では、該単一の再構成された可変V : J 遺伝子配列は、マウス軽鎖定常配列（例えば、内在性マウス軽鎖定常配列）に作動可能に連結される。

【0034】

別の態様では、本明細書では、（a）全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン重鎖V、D、及びJ 遺伝子セグメントのマウス重鎖遺伝子座における欠失または機能的不活性化、及び1つ以上のヒト重鎖V、D、及びJ 遺伝子セグメントの導入であり、（ここで、該1つ以上のヒト重鎖V、D、及びJ 遺伝子セグメントはマウス重鎖定常領域（例えば、内在性マウス重鎖定常領域）に作動可能に連結され、ここで、該マウス重鎖定常領域は、完全長I g M 遺伝子と、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 c、I g G 2 b、及びそれらの組み合わせからなる群より選択されるI g G 遺伝子においてC_H1 領域をコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異を含んでいるI g G 遺伝子とを含み、ここで、該マウスはC_H1 領域を有するI g Mを含むB細胞受容体を発現し、ここで該I g Mは同族軽鎖と会合する重鎖を含む）、及び/または（b）全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖V及びJ 遺伝子セグメントの欠失または機能的不活性化及び単一の再構成された可変V : J 遺伝子配列の導入を含む、非ヒト動物（例えば、ラットまたはマウス）を提供する。

【0035】

本明細書では、（a）マウス重鎖遺伝子座における全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン重鎖V、D、及びJ 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト軽鎖V及びJ 遺

10

20

30

40

50

伝子セグメントによる置き換えであり、ここで、該1つ以上のヒト軽鎖V及びJ遺伝子セグメントはマウス重鎖定常領域に作動可能に連結され、ここで、該マウス重鎖定常領域は、完全長IgM遺伝子と、IgG1、IgG2a、IgG2c、IgG2b、IgG3、及びそれらの組み合わせからなる群より選択されるIgG遺伝子においてC_H1領域をコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異を含んでいるIgG遺伝子とを含み、ここで、該マウスはC_H1領域を有するIgMを含むB細胞受容体を発現し、ここで該IgMは同族軽鎖と会合する重鎖を含むものと、(b)全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖V及びJ遺伝子セグメントの、単一可変V : J 遺伝子配列による置き換えを含む、遺伝子改変されたマウスも提供する。一部の実施形態では、該同族軽鎖は単一の再構成された可変V : J 遺伝子配列由来である。

10

【0036】

一態様では、(a)結合タンパク質、該結合タンパク質を作る細胞、または該結合タンパク質の配列をコードするヌクレオチド配列を本明細書に記載の非ヒト動物から単離することを含む、C_H1ドメインを欠いている該結合タンパク質の作製方法を提供する。一態様では、該単離ステップは、(a)抗原を用いて本明細書に記載の非ヒト動物に免疫するステップ、(b)該非ヒト動物が結合タンパク質を作るのに十分な条件下に該非ヒト動物を維持するステップ、及び/または(c)機能的C_H1ドメインを欠いている及び/または機能的ヒンジ領域を欠いている該非ヒト動物によって作られた結合タンパク質を特定するステップのうちの1つ以上を含んでもよい。一部の態様では、そのように単離された結合タンパク質は、単一ドメイン抗原結合タンパク質である。一態様において、単一ドメイン抗原結合タンパク質は単量体である。

20

【0037】

一態様では、(a)抗原を用いて本明細書に記載の非ヒト動物に免疫すること、(b)抗原結合タンパク質を作るのに十分な条件下に該非ヒト動物を維持すること、(c)該非ヒト動物によって作られた抗原結合タンパク質を特定することであり、該抗原結合タンパク質は機能的C_H1ドメインを欠いているか、または機能的C_H1ドメインを欠き、且つヒンジ領域を欠いている、特定すること、(d)C_H1ドメインを欠いているか、またはヒンジ領域及びC_H1ドメインを欠いている免疫グロブリンポリペプチド上の可変ドメインをコードする可変領域配列を特定することであり、該可変ドメインが該抗原と特異的に結合する、特定すること、(e)適した発現系において、(d)の可変領域配列と同一または実質的に同一の配列によってコードされたタンパク質を発現させることであり、(d)の可変領域配列がC_H1領域を欠いているか、またはC_H1領域及びヒンジを欠いている重鎖可変配列の核酸配列に連結される、発現させること、及び/または(f)(e)の発現されたタンパク質を単離することを含む、抗原結合タンパク質の作製方法を提供する。一部の実施形態では、該可変領域配列によってコードされたタンパク質を発現させるステップ及び/または(f)該発現されたタンパク質を単離するステップは、細胞(例えば、該可変領域配列をトランスフェクトした細胞)、本明細書に開示する動物から単離した細胞から形成されたハイブリドーマを培養すること及び/または培養細胞から上清を採取することを含む。

30

【0038】

一態様では、抗原を用いて本明細書に記載の非ヒト動物に免疫すること、該抗原と特異的に結合する可変ドメインをコードする可変領域核酸配列を特定すること、及び適した発現系において該可変領域核酸配列を利用することを含む、抗原結合タンパク質の作製方法を提供し、ここで、該可変領域核酸配列はC_H1を欠いているか、またはC_H1及びヒンジを欠いている重鎖定常遺伝子に作動可能に連結され、ここで、該発現系は該抗原と特異的に結合する抗原結合タンパク質を発現する。

40

【0039】

したがって、本明細書では、係る単離された結合タンパク質、細胞、及び核酸配列も提供する。

【0040】

50

他の実施形態は、記載され、以下の詳細な説明を検討することによって当業者には明らかになるう。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

生殖系列に以下を含む、遺伝子改変された非ヒト動物：

(a) 内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座における少なくとも 1 つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子の C_H1 ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異であって、前記少なくとも 1 つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子が、 IgG 、 IgA 、 IgE 、 IgD 、またはそれらの組み合わせである前記欠失または不活性化変異、及び

(b) 以下の (i) または (ii) のいずれか、または両方：

(i) 少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメントを含む核酸配列であって、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 C_H1 ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列において前記欠失または不活性化変異を含む前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能である、前記核酸配列、

(ii) V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座であって、前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、前記免疫グロブリン軽鎖遺伝子座。

(項目 2)

前記少なくとも 1 つの再構成されていない V_L 遺伝子セグメント、前記少なくとも 1 つの再構成されていない J_L 遺伝子セグメント、及び / または前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列が、ヒト型である、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 3)

前記免疫グロブリン軽鎖定常領域及び / または前記免疫グロブリン重鎖定常領域が、非ヒト型である、項目 2 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 4)

前記少なくとも 1 つの再構成されていない V_L 遺伝子セグメント及び前記少なくとも 1 つの再構成されていない J_L 遺伝子セグメントが、ヒトカッパセグメントである、項目 2 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 5)

前記少なくとも 1 つの再構成されていない V_L 遺伝子セグメント及び前記少なくとも 1 つの再構成されていない J_L 遺伝子セグメントが、前記内在性免疫グロブリン重鎖における 1 つ以上の内在性 V_H 、 D_H 、 J_H 遺伝子セグメントを置き換える、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 6)

前記少なくとも 1 つの再構成されていない V_L 遺伝子セグメント及び前記少なくとも 1 つの再構成されていない J_L 遺伝子セグメントが、前記内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座における全てのまたは実質的に全ての内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える、項目 5 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 7)

全てのまたは実質的に全ての内在性重鎖可変領域遺伝子セグメント及び / または全てのまたは実質的に全ての内在性軽鎖可変領域遺伝子セグメントが、欠失されているか、または機能的に不活性化されている、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 8)

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列が、ヒト V

10

20

30

40

50

1 - 39 / J 遺伝子配列、またはヒト V 3 - 20 / J 遺伝子配列である、項目 2 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 9)

前記ヒト V 1 - 39 / J 遺伝子配列が、ヒト J 5 遺伝子セグメントとともに再構成されたヒト V 1 - 39 遺伝子セグメントを含む、項目 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 10)

ヒト V 3 - 20 / J 遺伝子配列が、ヒト J 1 遺伝子セグメントとともに再構成されたヒト V 3 - 20 遺伝子セグメントを含む、項目 8 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

10

(項目 11)

前記動物が、(i) 少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメントを含む核酸配列を含まず、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 C_H 1 ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含む前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能であり、前記重鎖遺伝子座が、非ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを含む、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 12)

前記動物が、(i) 少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメントを含む核酸配列を含まず、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 C_H 1 ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含む前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能であり、前記重鎖遺伝子座が、ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを含む、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

20

(項目 13)

前記ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントが、全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える、項目 12 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

30

(項目 14)

前記免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列が、非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列である、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 15)

前記免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列が、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列である、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 16)

前記単一の再構成された軽鎖 V_L / J_L 遺伝子配列が、前記非ヒト動物の全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

40

(項目 17)

前記単一の再構成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列が、ヒト生殖系列 V_L 及びヒト生殖系列 J_L 遺伝子セグメント配列を含む、項目 2 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 18)

前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、不活性化されたヒンジ領域を更に含む、項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 19)

50

C_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異が、I g G 1配列におけるものであり、前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、I g D、I g G 3、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c、I g E、I g A、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される免疫グロブリン遺伝子の欠失または不活性化変異を更に含む、項目1に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目20)

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、前記I g G 2 a及びI g G 2 b免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を更に含む、項目19に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目21)

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、前記I g G 2 b及びI g G 2 c免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を更に含む、項目19に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目22)

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、前記I g G 3、I g D、I g A、及びI g E免疫グロブリン遺伝子において欠失または不活性化変異を更に含む、項目19に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目23)

前記非ヒト動物が、雄非ヒト動物において機能的なA d a m 6遺伝子またはその一部を更に含み、前記A d a m 6遺伝子が、A d a m 6 a遺伝子、A d a m 6 b遺伝子、またはその両方である、項目1に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目24)

前記動物が、その血清中に、機能的C_H1ドメインを欠いている抗原特異的単一ドメイン抗原結合タンパク質を更に含む、項目1に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目25)

前記動物が、機能的C_H1ドメインを含んでいるI g M重鎖を更に含む、項目24に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目26)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、前記C_H1ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含む前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される前記再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L/J_L)ヌクレオチド配列によってコードされるV_L単一ドメイン結合タンパク質である、項目24に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目27)

免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されるV_L及びJ_L遺伝子セグメント配列を含む前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされる遺伝子操作されたユニバーサル軽鎖を更に含む、項目25に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目28)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、前記C_H1ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含んでいる前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される前記再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L/J_L)ヌクレオチド配列によってコードされるV_L単一ドメイン抗原結合タンパク質であり、且つ、前記非ヒト動物が、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されるV_L及びJ_L遺伝子セグメント配列を含んでいる前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされる遺伝子操作されたユニバーサル軽鎖を更に含む、項目25に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目29)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質の少なくとも1つの重鎖が、機能的ヒンジ領域を更に欠いている、項目24に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

10

20

30

40

50

(項目 3 0)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c、及びI g G 3 からなる群より選択されるI g G アイソタイプを有する、項目 2 4 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 3 1)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、ヒト可変ドメイン及び非ヒト定常ドメインを含む、項目 2 4 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 3 2)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、単量体である、項目 2 4 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

10

(項目 3 3)

I g M 重鎖が同族軽鎖と会合する、項目 2 5 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 3 4)

前記同族軽鎖は、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されるV_L及び/またはJ_L遺伝子セグメント配列を含んでいる前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされるユニバーサル軽鎖である、項目 3 3 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 3 5)

高力価の前記単一ドメイン抗原結合タンパク質を更に含む、項目 2 4 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

20

(項目 3 6)

前記抗原特異的単一ドメイン抗原結合タンパク質の前記力価が、少なくとも $1 \times 10^2 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、少なくとも $1 \times 10^3 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、少なくとも $1 \times 10^4 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、または少なくとも $1 \times 10^5 \mu\text{g} / \text{mL}$ である、項目 3 5 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 3 7)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質の前記力価が、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されるV_L及びJ_L遺伝子セグメント配列を含んでいる前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされる遺伝子操作されたユニバーサル軽鎖を発現しない対応する対照動物の、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍である、項目 3 5 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

30

(項目 3 8)

前記力価が、酵素結合免疫測定法によって決定される、項目 3 5 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

(項目 3 9)

前記動物が、げっ歯類である、項目 1 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 0)

前記げっ歯類が、ラットまたはマウスである、項目 3 9 に記載の遺伝子改変された動物。

(項目 4 1)

前記動物が、マウスである、項目 4 0 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物。

40

(項目 4 2)

遺伝子改変されたマウスであって、

(a) マウス重鎖遺伝子座における、全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン重鎖V、D、及びJ遺伝子セグメントの、

(i) 1つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖V_H遺伝子セグメント、1つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖D_H遺伝子セグメント、及び1つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖J_H遺伝子セグメントであって、前記1つ以上の再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖V_H、D_H、及びJ_H遺伝子セグメントが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、前記遺伝子セグメン

50

ト、または、

(i i) 1 つ以上の再構成されていないヒト軽鎖 V_L 遺伝子セグメント及び 1 つ以上の再構成されていないヒト軽鎖 J_L 遺伝子セグメントであって、前記 1 つ以上の再構成されていないヒト軽鎖 V_L 、及び J_L 遺伝子セグメントがマウス重鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結され、

前記マウス重鎖定常領域遺伝子配列が、完全長 $I g M$ 遺伝子、及び $I g G 1$ 、 $I g G 2 a$ 、 $I g G 2 b$ 、 $I g G 2 c$ 、 $I g G 3$ 、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される $I g G$ 遺伝子において $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異を含む、前記遺伝子セグメント、
のいずれかによる置き換え、

10

(b) 全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖 V 及び J 遺伝子セグメントの、単一の再構成されたヒト可変 V / J 遺伝子配列による置き換えを含み、前記マウスが、同族軽鎖と会合する $I g M$ 重鎖を含む B 細胞受容体を発現する、前記遺伝子改変されたマウス。

(項目 4 3)

以下を含む項目 1 に記載の遺伝子改変された非ヒト動物の作製方法：

(a) 前記非ヒト動物の内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座において少なくとも 1 つの非ヒト重鎖定常領域を改変して、前記重鎖定常領域が $I g G$ 、 $I g A$ 、 $I g E$ 、 $I g D$ 、またはそれらの組み合わせの $C_H 1$ ドメインをコードするヌクレオチド配列の欠失または不活性化変異を含むようにすること、及び、

20

(b) 以下の (i) または (i i) のいずれか、または両方：

(i) 前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に核酸配列を挿入することであって、前記核酸配列が、少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメントを含み、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 $C_H 1$ ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含んでいる前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能である、挿入すること、及び / または

(i i) V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を導入することであって、前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、導入すること。

30

(項目 4 4)

ステップ (a) が、前記改変された $C_H 1$ ドメインを含んでいる、前記 $I g G$ 、 $I g A$ 、 $I g E$ 、 $I g D$ 、またはその組み合わせのヒンジ領域を欠失または不活性化させることを更に含む、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

ステップ (a) が、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の 1 つ以上の内在性免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントをヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントによって置き換え、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の発現がヒトイディオタイプを含む重鎖可変ドメインを生じさせるようにすることを更に含み、前記方法が、(b) (i) 前記内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に核酸配列を挿入することを含まず、前記核酸配列が、少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメントを含み、ここで、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 $C_H 1$ ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含んでいる前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能である、項目 4 3 に記載の方法。

40

50

(項目 4 6)

前記挿入ステップが、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の1つ以上の内在性免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを前記再構成されていない軽鎖V_L及びJ_L遺伝子セグメントにより置き換えて、前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座の発現が、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと、C_H1ドメインを欠いている免疫グロブリン重鎖定常ドメインとを含んでいるV_L単ドメイン結合タンパク質を生じるようにすることを含む、項目43に記載の方法。

(項目 4 7)

前記免疫グロブリン定常領域遺伝子が、非ヒトである、項目46に記載の方法。

(項目 4 8)

前記再構成されていない軽鎖V_L及びJ_L遺伝子セグメントが、ヒトセグメントである、項目47に記載の方法。

(項目 4 9)

前記再構成されていない軽鎖V_L及びJ_L遺伝子セグメントが、ヒトカップセグメントである、項目48に記載の方法。

(項目 5 0)

前記再構成されていない軽鎖V_L及びJ_L遺伝子セグメントが、ヒトラムダセグメントである、項目48に記載の方法。

(項目 5 1)

前記再構成されていない軽鎖V_L及びJ_L遺伝子セグメントが、前記内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座において、全てのまたは実質的に全ての内在性非ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える、項目46に記載の方法。

(項目 5 2)

C_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列の前記欠失または不活性化変異が、IgG遺伝子においてである、項目43に記載の方法。

(項目 5 3)

C_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列の前記欠失または不活性化変異が、IgG1遺伝子においてである、項目52に記載の方法。

(項目 5 4)

前記重鎖免疫グロブリン遺伝子座が、ヒト可変ドメインをコードする可変領域遺伝子セグメント及び非ヒト定常ドメインをコードする定常領域遺伝子を含む、項目43に記載の方法。

(項目 5 5)

免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が、ユニバーサル軽鎖をコードする、項目43に記載の方法。

(項目 5 6)

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域V_L/J_L遺伝子配列が、ヒトV_L/J_L遺伝子配列である、項目55に記載の方法。

(項目 5 7)

前記ヒトV_L/J_L遺伝子配列が、ヒトV_L1-39/J_L遺伝子配列、またはヒトV_L3-20/J_L遺伝子配列である、項目56に記載の方法。

(項目 5 8)

前記ヒトV_L1-39/J_L遺伝子配列が、ヒトJ_L5遺伝子セグメントとともに再構成されたヒトV_L1-39遺伝子セグメントを含む、項目57に記載の方法。

(項目 5 9)

前記ヒトV_L3-20/J_L遺伝子配列が、ヒトJ_L1遺伝子セグメントとともに再構成されたヒトV_L3-20遺伝子セグメントを含む、項目57に記載の方法。

(項目 6 0)

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が、非ヒト免疫グロブ

10

20

30

40

50

リン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域が、前記非ヒト動物の全てのまたは実質的に全ての内在性免疫グロブリン軽鎖 V_L 及び J_L 遺伝子セグメントを置き換える、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記核酸配列及び / または単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域配列が、前記非ヒト動物の生殖系列にある、項目 4 3 に記載の方法。

10

(項目 6 4)

前記 C_H 1 の欠失または不活性化変異が、I g G 1 におけるものであり、前記方法が、(c) I g D、I g G 3、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 2 c、I g E、I g A、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される免疫グロブリン遺伝子を欠失または不活性化させることを更に含む、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

前記 I g G 2 a 及び I g G 2 b 免疫グロブリン遺伝子が、欠失または不活性化される、項目 6 4 に記載の方法。

(項目 6 6)

前記 I g G 2 b 及び I g G 2 c 免疫グロブリン遺伝子が、欠失または不活性化される、項目 6 4 に記載の方法。

20

(項目 6 7)

I g G 3、I g D、I g A、及び I g E 免疫グロブリン遺伝子が、欠失または不活性化される、項目 6 4 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記非ヒト動物が、げっ歯類である、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記げっ歯類が、ラットまたはマウスである、項目 6 8 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記げっ歯類が、マウスである、項目 6 9 に記載の方法。

30

(項目 7 1)

C_H 1 ドメインを欠いている抗原特異的 I g G 単一ドメイン結合タンパク質の生成方法であって、全部または一部において、前記方法が、以下のステップを含む方法：

(a) 遺伝子改変された非ヒト動物に前記抗原で免疫することであって、前記遺伝子改変された非ヒト動物が、

(i) 内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座における少なくとも 1 つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子の C_H 1 ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異であって、前記少なくとも 1 つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子が、I g G、I g A、I g E、I g D、またはそれらの組み合わせである前記欠失または不活性化変異、及び

40

(i i) 以下の 1 または 2 のいずれか、または両方：

1 . 少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) 遺伝子セグメント及び少なくとも 1 つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメントを含んでいる核酸配列であって、前記再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントが、前記 C_H 1 ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列における前記欠失または不活性化変異を含んでいる前記免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L / J_L) ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能である、前記核酸配列、及び / または

2 . V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる単一の再構成された免疫グロ

50

ブリン軽鎖可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座であって、前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列が免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される、前記免疫グロブリン軽鎖遺伝子座、を含む、前記免疫することと、

(b) 前記マウスが：

(i) 2つの同族軽鎖と会合された2つの I g M 重鎖を含んでいる I g M 抗体；及び

(ii) 機能的 C_H 1 ドメインを欠いている少なくとも1つの重鎖を含んでいる単一ドメイン抗原結合タンパク質を発現するように、前記マウスを維持すること。

(項目 7 2)

前記少なくとも1つの重鎖定常領域遺伝子が、I g G 1、I g G 2 b、I g G 2 a、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目 7 1 に記載の方法。

10

(項目 7 3)

前記重鎖定常領域遺伝子が、I g G 1 定常領域遺伝子である、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、前記 C_H 1 ドメインを全て欠いている、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 5)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、ヒト重鎖可変領域を含む、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 6)

前記単一ドメイン抗原結合タンパク質が、ヒト軽鎖可変領域を含む、項目 7 1 に記載の方法。

20

(項目 7 7)

前記同族軽鎖が、免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域配列によってコードされたユニバーサル軽鎖である、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記非ヒト動物が、内在性軽鎖を発現しない、項目 7 7 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域配列が、ヒト V_L 1 - 3 9 / J 遺伝子配列またはヒト V_L 3 - 2 0 / J 遺伝子である、項目 7 7 に記載の方法。

30

(項目 8 0)

前記ヒト V_L 1 - 3 9 / J 遺伝子配列が、ヒト J_L 5 遺伝子セグメントとともに再構成されたヒト V_L 1 - 3 9 遺伝子セグメントを含む、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 1)

前記ヒト V_L 3 - 2 0 / J 遺伝子配列が、ヒト J_L 1 遺伝子セグメントとともに再構成されたヒト V_L 3 - 2 0 遺伝子セグメントを含む、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 2)

(c) 前記ヒト動物から前記抗原と特異的に結合する細胞またはタンパク質を単離することを更に含み、前記細胞またはタンパク質が、体細胞変異された単一ドメイン抗原結合タンパク質を含む、項目 7 1 に記載の方法。

40

(項目 8 3)

(d) (c) で単離された前記細胞から、前記単一ドメイン抗原結合タンパク質の前記可変ドメインをコードする第 1 の核酸を単離することを更に含み、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 4)

最終ステップとして、(e) ベクターを発現させるのに十分な条件で、前記ベクターをトランスフェクトした細胞を培養することを更に含み、前記ベクターが、ヒト重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される第 2 の核酸を含み、前記第 2 の核酸が、ステップ (d) で単離した前記第 1 の核酸と同一または実質的に同一である、項目 8 3 に記載の方法。

50

(項目 8 5)

前記重鎖定常領域遺伝子が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、及びI g G 3 からの群より選択されるヒトI g G 定常領域遺伝子である、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

(d) ハイブリドーマ培養物から上清を採取するステップを更に含み、前記ハイブリドーマが、(c) で単離された前記細胞から生成される、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 7)

(e) (d) で生成された前記ハイブリドーマから、前記単ドメイン抗原結合タンパク質の前記可変ドメインをコードする第 1 の核酸を単離することを更に含む、項目 8 6 に記載の方法。

10

(項目 8 8)

(f) ベクターでトランスフェクトした細胞を、前記ベクターを発現させるのに十分な条件で培養することを更に含み、前記ベクターが、ヒト重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される第 2 の核酸を含み、前記第 2 の核酸が、ステップ (e) で単離した前記第 1 の核酸と同一または実質的に同一である、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記重鎖定常領域遺伝子が、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、及びI g G 3 からの群より選択されるヒトI g G 定常領域遺伝子である、項目 8 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

項目 8 2 に記載の方法に従って単離された前記細胞から生成されるハイブリドーマ。

20

(項目 9 1)

項目 8 3 に記載の方法に従って単離された核酸。

(項目 9 2)

項目 8 7 に記載の方法に従って単離された核酸。

(項目 9 3)

項目 8 3 に記載の核酸と同一または実質的に類似する核酸を含む細胞。

(項目 9 4)

項目 8 7 に記載の核酸と同一または実質的に類似する核酸を含む細胞。

(項目 9 5)

項目 1 に記載の非ヒト動物の単離された細胞。

30

(項目 9 6)

前記細胞が、胚性幹 (E S) 細胞または B 細胞である、項目 9 5 に記載の単離された細胞。

(項目 9 7)

機能的 C_H 1 ドメインを欠いている重鎖定常領域に作動可能に連結される軽鎖可変ドメインを含む、単ドメイン抗原結合タンパク質。

(項目 9 8)

項目 1 に記載の非ヒト動物から単離される、単ドメイン抗原結合タンパク質。

(項目 9 9)

項目 4 2 に記載のマウスから単離される、単ドメイン抗原結合タンパク質。

40

(項目 1 0 0)

項目 7 1 に記載の方法に従って生成される、単ドメイン抗原結合タンパク質。

【 図面の簡単な説明 】【 0 0 4 1 】

【 図 1 A - C 】 図 1 A は、C_H 1 ドメインを欠いている I g G 1 を発現する遺伝子改変されたマウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座を作製するためのマウスの I g G 1 遺伝子、I g G 2 b 及び I g G 2 a 遺伝子のターゲティングを示す図である (縮尺は正確ではない) 。ヒト免疫グロブリン重鎖 V_L、D 及び J セグメント (白抜きの三角で示す) をマウス定常遺伝子座に挿入する。ここで、I g G 1 C_H 1 エキソン * 及び I g G 2 a / 2 b * * は欠失しており、楕円はエンハンサーを表す。図 1 B は、単一の再構成されたヒト V_L / J_L

50

遺伝子配列 * * * を含むマウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を示す図である（縮尺は正確ではない）。図 1 C は、図 1 B 及び 1 C の I g 遺伝子座を有するマウスが発現した I g M を示す図であり、ここで、I g M はインタクトな C_H 1 ドメインを含んでいる。図 1 C は、クラススイッチされると、図 1 A 及び 1 C の I g 遺伝子座を有するマウスが発現した I g G 1 が、C_H 1 ドメインを欠いている単一ドメイン重鎖抗原結合タンパク質であることも示す。

【図 2】図 2 は、2 つのユニバーサル軽鎖のゲノム構造を示し、一方は V₁ - 39 J₅ を含む単一の再構成されたヒト可変領域を含み、他方は V₃ - 20 J₁ を含む単一の再構成されたヒト可変領域を含む（縮尺は正確ではない）。

【図 3】図 3 は、マウスの野生型 I g G 1 遺伝子座（I g G 1、上）の図であり、C_H 1 遺伝子セグメントに融合された J_H 領域遺伝子セグメント、続いてヒンジ領域、C_H 2 遺伝子セグメント及び C_H 3 遺伝子セグメント；C_H 1 ドメインを欠失させるコンストラクトによりターゲティングされた I g G 1 遺伝子座（I g G 1 C_H 1；I）；C_H 1 ドメイン及びヒンジ領域の両方を欠失させるコンストラクトによりターゲティングされた I g G 1 遺伝子座（I g G 1 C_H 1 - ヒンジ；I I）；I g G 1 C_H 1 ドメイン、I g G 2 b 及び I g G 2 a を欠失させるコンストラクトによりターゲティングされた定常領域遺伝子座（I g G 1 C_H 1 I g G 2 b / 2 a；I I I）；I g G 1 C_H 1 ドメイン、ヒンジ領域、I g G 2 b 及び I g G 2 a を欠失させるコンストラクトによりターゲティングされた定常領域遺伝子座（I g G 1 C_H 1 & ヒンジ I g G 2 b / 2 a；I V）；または I g G 1 C_H 1 ドメイン、I g G 2 b、I g G 2 a、I g G 3、I g D、I g A、I g E、及び場合によってはヒンジ領域を欠失させるコンストラクトによりターゲティングされた定常領域遺伝子座（I g G 1 C_H 1 I g G 2 b / 2 a I g G 3 I g D / A / E（場合によっては ヒンジ）；V）を示す。この遺伝子座の略図は正確な寸法ではない。マウスはその系統に応じて I g G 2 a 対立遺伝子または I g G 2 c 対立遺伝子のいずれかを有する場合があるので、I g G 2 a / c は、I g G 2 a 遺伝子座または I g G 2 c 遺伝子座のいずれかを指す。

【図 4 A - B】図 4 A は、ヒト重鎖可変遺伝子セグメント（白抜き三角）を含み、且つ機能的 I g G 1 C_H 1 ドメインを欠いており、更に I g G 2 a 及び I g G 2 b 遺伝子座を欠いている遺伝子改変された遺伝子座（一部の実施形態では、1673 と呼ぶ）を作製するためのマウス重鎖配列のターゲティングを示す図である（縮尺は正確ではない）。図 4 B は、C_H 1 ドメイン及びヒンジを欠いている I g G 1 を発現する遺伝子改変された遺伝子座（一部の実施形態では、1576 と呼ぶ）作製するためのマウス I g G 1 遺伝子（可変遺伝子セグメントは全てマウスであり、塗り潰しの三角で示す）のターゲティングを示す図である（縮尺は正確ではない）。

【図 4 C】図 4 C は、I g M、I g D、I g G 3、I g G 1、I g G 2 b、I g G 2 a、I g E 及び I g A 遺伝子セグメントを欠いている遺伝子改変された遺伝子座を作製するためのマウス重鎖定常領域のターゲティングを示す図である（I g G 1 C_H 1 I g G 2 b / I g G 2 a、I g G 3、I g D / A / E のクローニングの第一部であり、図 4 D に続く）（縮尺は正確ではない）。ヒト可変遺伝子セグメントを白抜き三角で示す。

【図 4 D】図 4 D は、ヒト重鎖可変遺伝子セグメント、完全な機能的ネズミ I g M 遺伝子領域、及び機能的 C_H 1 ドメインを欠いており、且つ場合によっては機能的ヒンジ領域を欠いている I g G 1 遺伝子領域を含む遺伝子改変された遺伝子座を作製するための図 4 C のマウス定常領域のターゲティングを示す図である（このマウスは、I g G 2 b / I g G 2 a、I g G 3、及び I g D / A / E も欠いている。一部の実施形態では 6180 と呼ぶ）（縮尺は正確ではない）。ヒト可変遺伝子セグメントを白抜き三角で示す。

【図 5 A】図 5 A は、ガラクトシダーゼ（gal）を用いた免疫化前後の種々の単一ドメイン I g G 1 マウス間の総血清 I g G 1 力価の比較を示す図である：マウスカッパ鎖を有する mV_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジについてホモ接合性のマウス（1576）；単一の再構成された軽鎖 V₃ - 20 J₁ ULC であるカッパ鎖を有する mV_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジについてホモ接合性のマウス（1576 / 1635）；または同じ遺

10

20

30

40

50

伝子的バックグラウンドを有する野生型 (WT) マウス。HO は遺伝子改変についてホモ接合性である。

【図5B】図5Bは、 $mV_H IgG1 C_H1$ & ヒンジホモ接合マウスヒンジホモ接合マウス (1576HO) または $mV_H IgG1 C_H1$ - ヒンジ $\times V_3 - 20J_1$ ULC1ホモ接合マウス (1576HO 1635HO) と比較した、免疫化WTマウスの抗原特異的 $IgG1$ 血清力価を示す。モデル抗原として ガラクトシダーゼ (gal) を用いてマウスに免疫し、ELISAによって抗原特異的 $IgG1$ 力価を測定した。

【図6】図6は、2匹の $hV_H IgG1 C_H1$ & ヒンジ $IgG2b/2a \times V_1 - 39J_5$ ULCホモ接合マウス (1859HO 1633HO)、3匹の $hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a \times V_3 - 20J_1$ ULCホモ接合マウス (1673HO 1635HO) 及びヒト可変領域 (V_H 及び V_L) を有する3匹の VELLLOCIMMUNE (登録商標) 対照マウス ($VI3 IgG1$) からのマウス血清の、非還元条件下で調製し、抗マウス IgG により可視化したウエスタンブロット画像を、二量体単ドメイン抗原結合タンパク質 (37-37ホモ二量体) または単量体 C_H1 単ドメイン結合タンパク質 (C_H1 ヒンジ欠失単鎖) のマウス定常領域を含んで示す。

【図7】図7は、 $hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a \times V_1 - 39J_5$ ホモ接合マウス (1673X1633) または $hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a \times V_3 - 20J_1$ ホモ接合マウス (1673X1635) の、細胞表面タンパク質である抗原Xを用いた腹腔内免疫化後の異なる時点 (x軸) における動物の血漿に見られる $IgG1$ 力価 (y軸) を示す。

【図8】図8は、3匹の $hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a IgG3 IgD/A/E \times V_1 - 39J_5$ ULCホモ接合マウス (6180HO 1634HO)、2匹の $hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a IgG3 IgD/A/E$ ホモ接合マウス (6180HO) 及びヒト可変領域 (V_H 及び V_L) を有する3匹の $VI3$ 対照マウスからのマウス血清の、非還元条件下で調製し、抗マウス IgG により可視化したウエスタンブロット画像を二量体単ドメイン抗原結合タンパク質 (37-37ホモ二量体) または単量体 C_H1 単ドメイン結合タンパク質 (C_H1 欠失単鎖) のマウス定常領域を含んで示す。

【図9】図9は、 $hV_H IgG1 C_H1 IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E \times V_1 - 39J_5$ (6180HO \times 1634HO) マウス及び $hV_H IgG1 C_H1 IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E$ (6180HO) 及び $VI3$ 対照動物の血漿中の定常状態の IgM 及び IgG の濃度を示す図である。

【図10】図10は、代表的なホモ接合性対照 $VI3$ 及び $hV_H IgG1 C_H1 IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E$ (6180HO) $\times V_1 - 39J_5$ (6180HO 1634HO) マウスからの $CD19$ 及び $CD3$ について染色したシングルレットにゲートした脾細胞の等高線図を示す (A)。また、代表的な対照の $VI3$ マウス及び代表的なホモ接合性 $hV_H IgG1 C_H1 IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E \times V_1 - 39J_5$ (6180HO \times 1634HO) マウスからの免疫グロブリンD (IgD) 及び免疫グロブリンM (IgM) について染色した $CD19 +$ B細胞にゲートした脾細胞の等高線図も示す (C)。特記すべきは、B細胞は IgD 定常ドメインが欠失しているため $IgD -$ であることである。したがって、この図の「成熟」という用語は IgD が存在しないことを示しているに過ぎず、他の非 IgM 免疫グロブリンが存在しないことを示すものではない。各群からの代表的な3匹のマウスの $CD19 +$ B細胞 (y軸線; 細胞/脾臓 $\times 10^7$) の総数を示すグラフも提供する (B)。等高線図に含まれた動物を丸で囲む。

【図11】図11は、(A) $CD93$ 及び $B220$ について染色した脾臓から単離した $CD19 +$ ゲートB細胞、(B) IgM 及び $CD23$ について染色した未成熟または成熟ゲートB細胞または (C) 代表的な対照の $VI3$ マウス及び代表的なホモ接合性 $hV_H IgG1 C_H1 IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E \times V_1 - 39J_5$ (6180HO \times 1634HO) マウスからの $CD21/35$ 及び IgM について染

10

20

30

40

50

色した未成熟または成熟ゲートB細胞の各等高線を示す。

【図12】図12は、CD19及びCD3で染色した代表的な対照のV_H3マウス及び代表的なホモ接合性hV_HIgG1 C_H1 & IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E x V₁-39J₅(6180HO x 1634HO)マウス的大腿骨から単離した骨髓の等高線を示す。各群からの代表的な3匹のマウス的大腿骨1本当たりの細胞またはCD19⁺B細胞の総数も示す(y軸線; 細胞数/大腿骨×10⁷)。等高線図に含まれた動物を丸で囲む。

【図13】図13は、IgM及びB220で染色した代表的な対照のV_H3マウス及び代表的なホモ接合性hV_HIgG1 C_H1 IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E x V₁-39J₅(6180HO x 1634HO)マウス的大腿骨から単離した骨髓の等高線を示す。各群からの代表的な3匹のマウス的大腿骨1本当たりの成熟(IgM⁺B220^{hi})及び未成熟(IgM⁺B220^{int})B細胞の総数も示す(y軸線; 細胞数/大腿骨×10⁷)。等高線図に含まれた動物を丸で囲む。

【図14A-B】図14Aは、マウス重鎖遺伝子座を示す略図である(縮尺は正確ではない)。このマウス重鎖遺伝子座は長さが約3Mbであり、約200個の重鎖可変(V_H)遺伝子セグメント、13個の重鎖多様性(D_H)遺伝子セグメント及び4個の重鎖連結(J_H)遺伝子セグメント、ならびに、エンハンサー(Enh)及び重鎖定常(CH)領域を含んでいる。図14Bは、ヒト軽鎖遺伝子座の略図を示す(縮尺は正確ではない)。ヒト軽鎖遺伝子座は、それぞれ約440kb及び600kbに亘る反対の極性の遠位コンテグ及び近位コンテグに複製されている。この2つのコンテグ間には、V遺伝子セグメントがないと考えられる約800kbのDNAがある。このヒト軽鎖遺伝子座は、約76個のV遺伝子セグメント、5個のJ遺伝子セグメント、1個のイントロンエンハンサー(Enh)及び1個の単一定常領域(C)を含んでいる。

【図15】図15は、内在性重鎖可変領域遺伝子セグメントが欠失されているマウス重鎖遺伝子座に40個のヒトV_H及び5個のヒトJ_H遺伝子セグメントを順に挿入するためのターゲティング戦略を示す図である(縮尺は正確ではない)。ハイグロマイシン(HYG)選択カセット及びネオマイシン(NEO)選択カセットをリコンビナーゼ認識部位(FRT)と共に示す。Adam6a遺伝子、Adam6b遺伝子及びIGCR1遺伝子の挿入のためのターゲティング戦略も示す(縮尺は正確ではない)。白抜きの三角でヒト可変遺伝子セグメントを示している。

【図16】図16は、図15の改変されたマウス重鎖遺伝子座(hJ_H、40hV_H、Adam6; 上); 図15の改変されたマウス重鎖遺伝子座からIgG1遺伝子配列、IgG2b遺伝子配列、及びIgG2a遺伝子配列のC_H1ドメインの欠失及び/または不活性化(hJ_H、40hV_H、Adam6、C_H1、IgG2b、IgG2a; 中)を生じさせるターゲティング戦略、及び再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメント及び40個のヒトV_H遺伝子セグメントを含んでいる改変されたマウス重鎖遺伝子座から、選択カセットの欠失を生じさせるターゲティング戦略を示し、改変されたマウス重鎖遺伝子座はIgG1遺伝子において機能的C_H1ドメインを欠いており、機能的IgG2b及びIgG2a遺伝子も欠いている(hJ_H、40hV_H、Adam6、C_H1、IgG2b、IgG2a選択カセットの欠失; 6082とも呼ぶ、下)。白抜きの三角でヒト可変遺伝子セグメントを示している。

【図17A】図17Aは、異なる3群の動物(x軸線)、すなわち野生型(WT)マウス、図16の改変された重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウス(hJ_H、40hV_H、Adam6、C_H1 IgG2b IgG2a選択カセット欠失; KoH C_H1 del)、及びヒト重鎖V、D及びJセグメントを発現し、IgG1遺伝子において機能的C_H1ドメインを欠き、更に機能的IgG2b遺伝子及びIgG2a遺伝子も欠き、且つ単一の再構成された軽鎖遺伝子座を含む、改変されたマウス重鎖遺伝子座について双方ホモ接合性のマウス(C_H1 del x ULC)の脾臓及び骨髓から単離したB細胞による相対的mRNA発現(HPR1 mRNAに正規化; y軸線)を示す。プローブは生産的な再構成を検出するために設計され、ヒトJ_HセグメントとネズミIgG1ヒンジと

10

20

30

40

50

の間の組み換えを検出したプローブ (h J k / m I g G 1 ヒンジプローブ ; 左パネル) あるいはヒト J_H セグメントとネズミ I g G 1 ヒンジの間の組み換えを検出したプローブ (h J_H / m I g G 1 ヒンジプローブ ; 右パネル) から構成された。ND = 検出せず (C t 3 5)。WT について n = 2、K o H C_H 1 d e l について n = 2 及び C_H 1 d e l x U L C について n = 3。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、異なる 3 群の動物 (x 軸線)、すなわち野生型 (W T) マウス、図 1 6 の改変された重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウス (h J、4 0 h V、A d a m 6、C_H 1 I g G 2 b I g G 2 a 選択カセット欠失 ; K o H C_H 1 d e l)、及びヒト重鎖 V、D 及び J セグメントを発現し、I g G 1 遺伝子配列において機能的 C_H 1 ドメインを欠き、更に機能的 I g G 2 b 遺伝子配列及び I g G 2 a 遺伝子配列も欠き、且つ単一の再構成された軽鎖遺伝子座を含む、改変されたマウス重鎖遺伝子座について双方ホモ接合性のマウス (C_H 1 d e l x U L C) の脾臓及び骨髓から単離した B 細胞による相対的 m R N A 発現 (m カッパ C m R N A に正規化 ; y 軸線) を示す。プローブは生産的な再構成を検出するために設計され、ヒト J セグメントとネズミ I g G 1 ヒンジとの組み換えを検出したプローブ (h J / m I g G 1 ヒンジプローブ ; 左パネル) あるいはヒト J_H セグメントとネズミ I g G 1 ヒンジの組み換えを検出したプローブ (h J_H / m I g G 1 ヒンジプローブ ; 右パネル) から構成された。ND = 検出せず (C t 3 5)。WT について n = 2、K o H C_H 1 d e l について n = 2、及び C_H 1 d e l x U L C について n = 3。

【図 1 8】図 1 8 は、3 匹の h V I g G 1 C_H 1 I g G 2 a / 2 b x V 3 - 2 0 J 1 U L C ホモ接合マウス (6 0 8 2 H O 1 6 3 5 H O)、マウス定常領域 (W T) とともにヒト可変領域 (V_H 及び V_L) を有する 3 匹の V E L O C I M M U N E (登録商標) マウス (V I 3 I g G 1)、及び 2 匹の h V_H I g G 1 C_H 1 I g G 2 a / 2 b I g G 3 I g D / A / E マウス (6 1 8 0 H O) からのマウス血清の、非還元条件下で調製し、抗マウス I g G により可視化したウエスタンブロット画像を示し、二量体単ドメイン抗原結合タンパク質 (3 7 - 3 7 ホモ二量体) または単量体 C_H 1 単ドメイン結合タンパク質 (C_H 1 欠失単鎖) の存在または非存在を表す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 2】

詳細な説明

本発明は記載する特定の方法及び実験条件に限定されるものではなく、したがって、方法及び条件は変化し得る。本明細書で用いる専門用語は、特定の実施形態を説明する目的のために過ぎず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるので、限定を意図するものでない。

【0 0 4 3】

別段に定義していない限り、本明細書で用いる科学技術用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似するか、または等価な任意の方法及び材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、特定の方法及び材料を以下に記載する。本明細書において挙げた刊行物及び特許文書は全て、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 4 4】

本発明は、遺伝子改変された非ヒト動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター等) であって、そのゲノム (例えば、その生殖系列) に、単ドメイン抗原結合タンパク質 (V_H 単ドメイン抗原結合タンパク質及び V_L 単ドメイン抗原結合タンパク質を含む) をコードしているヌクレオチド配列 (複数可) 及び / または単一の再構成された軽鎖を含む、遺伝子改変された非ヒト動物、同非ヒト動物の作製方法、ならびに同非ヒト動物を用いる方法を提供する。別途定義されない限り、本明細書に使用される用語及び表現は全て、反対が明確に示されるか、または用語または表現が使用される文脈から明らかでない限り、その用語及び表現が当該技術分野において得ている意味を含む。

【0 0 4 5】

「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互に接続される4つのポリペプチド鎖、すなわち2つの重(H)鎖、及び2つの軽(L)鎖を含んだ、典型的な免疫グロブリン分子を含む。この用語はまた、抗原またはその断片と反応性を有する免疫グロブリンも含む。適した抗体には、限定するものではないが、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体、非特異的抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、合成抗体、組換え抗体、ハイブリッド抗体、変異抗体、移植された複合抗体(すなわち、他のタンパク質、放射性標識、細胞毒素に結合または融合された抗体)及びインビトロで生成した抗体が挙げられる。当業者であれば、一般的な抗原アイソタイプ、例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、及びIgE、ならびにそれらの任意のサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4)からなる群より選択される重鎖定常領域を有する抗体を容易に認識できよう。

【0046】

「重鎖」、または「免疫グロブリン重鎖」という表現は、任意の生物からの、免疫グロブリン重鎖定常領域配列を含む、免疫グロブリン重鎖配列を含む。重鎖可変ドメインは、別段に特定されない限り、3つの重鎖CDR及び4つのFR領域を含む。重鎖の断片としては、CDR、CDR及びFR、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。典型的な重鎖は、可変ドメインの次に、(N末端からC末端へ)C_H1ドメイン、ヒンジ、C_H2ドメイン、C_H3ドメイン及びC_H4ドメイン(IgMまたはIgEに関し)を有する。重鎖の機能的断片は、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、またはピコモル範囲内のKDでエピトープを認識する)ことができ、細胞から発現及び分泌することができ、少なくとも1つのCDRを含む、断片を含む。重鎖可変ドメインは、概して、生殖系列中に存在するV_H、D_H、及びJ_Hセグメントのレパートリーに由来するV_H、D_H、及びJ_Hセグメントを含む、可変領域遺伝子配列によってコードされる。種々の生物に関するV、D、及びJ重鎖セグメントに関する配列、位置、及び命名法は、www.imgt.orgにあるInternational Immunogenetics Information System(IMG T)のウェブサイトで見ることができる。

【0047】

「軽鎖」という表現には、任意の生物からの免疫グロブリン軽鎖配列を含み、また別途特定されない限り、ヒトカッパ及びラムダ軽鎖ならびにVpreB、ならびにサロゲート軽鎖を含む。軽鎖可変ドメインは、別途に特定されない限り、典型的には3つの軽鎖CDR及び4つのフレームワーク(FR)領域を含む。概して、完全長軽鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端へ、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を含む可変ドメイン、及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖可変ドメインは、概して、生殖系列中に存在するV_L及びJ_L遺伝子セグメントのレパートリーに由来するV_L及びJ_L遺伝子セグメントを含む軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされる。種々の生物に関するV及びJ軽鎖セグメントに関する配列、位置、及び命名法は、www.imgt.orgにあるInternational Immunogenetics Information System(IMG T)のウェブサイトで見ることができる。軽鎖には、例えば、中にそれらが出現するエピトープ結合タンパク質によって選択的に結合される第1または第2のいずれのエピトープとも選択的に結合しないものが含まれる。軽鎖にはまた、中にそれらが出現するエピトープ結合タンパク質によって選択的に結合される1つ以上のエピトープと結合及びそれを認識するか、または重鎖がそのエピトープと結合及びそれを認識するのを助けるものが含まれる。軽鎖という表現は、「ユニバーサル軽鎖」(ULC)とも呼ばれる「共通軽鎖」を含む。

【0048】

共通軽鎖またはユニバーサル軽鎖(ULC)には、軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする配列を含んでいる免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に由来するものが含まれ、ここで、該免疫グロブリン軽鎖遺伝子座

10

20

30

40

50

の発現は、該免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に他の核酸配列（例えば、他の軽鎖遺伝子セグメント）を包含しているかに関係なく、軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域由来の軽鎖のみを産生する。ユニバーサル軽鎖には、ヒトV₁₋₃₉J 遺伝子（例えば、V₁₋₃₉J₅ 遺伝子）またはヒトV₃₋₂₀J 遺伝子（例えば、V₃₋₂₀J₁ 遺伝子）が含まれ、それらが体細胞変異（例えば、親和性成熟）したものを含む。

【0049】

「遺伝子セグメント」または「セグメント」という表現は、V（軽鎖または重鎖）またはDもしくはJ（軽鎖または重鎖）免疫グロブリン遺伝子セグメントの言及を含み、再構成されたV/J（軽）またはV/D/J配列（重）を形成する再構成（例えば、内因性リコンビナーゼにより媒介される）に関与することができる免疫グロブリン遺伝子座（例えば、ヒト及びマウス）での再構成していない配列を含む。別段の指示がない限り、該V、D、及びJセグメントは、12/23ルールに従ったV/J組換えまたはV/D/J組換えを可能にする組換えシグナル配列（RSS）を含む。別段の指示がない限り、該セグメントは更に、天然の、またはその機能的等価物に関連する配列（例えば、Vセグメントについてはプロモーター（複数可）及びリーダー（複数可））を含む。

【0050】

核酸配列に関する「再構成されていない」という用語には、動物細胞の、好適には、遺伝子改変されておらず、例えば野生型ゲノムを含む動物由来の細胞の生殖系列に存在する核酸配列が含まれる。概して、天然の生殖系列構成では、重鎖可変領域は再構成されていないV_H 遺伝子セグメント、再構成されていないD_H 遺伝子セグメント及び再構成されていないJ_H 遺伝子セグメントを含み、他方、軽鎖可変領域は再構成されていないV_L 遺伝子セグメント及び再構成されていないJ_L 遺伝子セグメントを含む。B細胞の成熟過程中、これらの遺伝子セグメントは再構成して再構成された可変領域遺伝子を産生する。

【0051】

免疫グロブリン核酸配列に関する「生殖系列」という用語には、後代に引き継がれ得る核酸配列を含む。

【0052】

「相補性決定領域」という表現または「CDR」という用語は、通常（すなわち、野生型動物において）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内の2つのフレームワーク領域間に出現する生物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を含む。CDRは、例えば、生殖系列配列、または再構成されたもしくは再構成されていない配列によって、例えば、未感作もしくは成熟したB細胞もしくはT細胞によって、コードされることができる。CDRは、体細胞変異され得る（例えば、動物の生殖系列でコードされる配列と異なる）、ヒト化され得る、及び/またはアミノ酸置換、付加、もしくは欠失で改変され得る。ある環境では（例えば、CDR3に関して）、CDRは、例えば、連続していない（例えば、再構成されていない核酸配列内で）が、配列のスプライシングまたは接続（例えば、重鎖CDR3を形成するようなV-D-J組換え）の結果、B細胞核酸配列内で連続している2つ以上の配列（例えば、生殖系列配列）によって、コードされることができる。

【0053】

「体細胞変異された」という表現は、クラススイッチされたB細胞中の免疫グロブリン可変領域の核酸配列（例えば、重鎖可変ドメインをコードするか、または重鎖CDRまたはFR配列を含むヌクレオチド配列）が、例えば、クラススイッチを受けていないB細胞とクラススイッチを受けたB細胞との間でのCDRまたはフレームワーク核酸配列の差異など、クラススイッチ以前のB細胞中の核酸配列と同一ではない、クラススイッチを受けたB細胞からの核酸配列への言及を含む。「体細胞変異された」は、親和性成熟されていないB細胞中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）と同一ではない親和性成熟されたB細胞からの核酸配列への言及を含む。「体細胞変異された」という表現はまた、核酸配列が、関心のエピトープへのB細胞の曝露以

10

20

30

40

50

前の対応する核酸配列と異なる、関心のエピトープへのB細胞の曝露後の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む。「体細胞変異された」という表現は、免疫原攻撃に応答して、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などの動物において生成され、また係る動物において本来作動する選択プロセスから得られる結合タンパク質からの配列を指す。

【0054】

「と同族」の意味、例えば、第2の V_L ドメイン「と同族」である第1の V_L ドメインの意味で用いられる場合の「同族」という用語は、本発明に係るマウスにより作製される同じ結合タンパク質に由来する2つの V_L ドメイン間の関係に対する言及を包含することを意図する。例えば、本発明の実施形態に従い遺伝子改変されているマウス、例えば、 V_H 、 D_H 、及び J_H 領域が、 V_L 領域及び J_L 領域によって置き換えられた重鎖遺伝子座を有するマウスにより、第1のヒト V_L ドメインと融合している同じマウス C_H 領域（例えば、IgMアイソタイプ）で作製されている2つの同一のポリペプチド鎖、ならびに第2のヒト V_L ドメインと融合している同じマウス C_L 領域で作製されている2つの同一のポリペプチド鎖を有する抗体様結合タンパク質が作製される。マウスにおけるクローン選択の間、単一の抗体様結合タンパク質との関係で共に現れるように、第1及び第2のヒト V_L ドメインを、クローン選択プロセスにより選択した。したがって、クローン選択プロセスの結果として、単一の抗体様分子において共に現れる第1及び第2の V_L ドメインを、「同族」と呼ぶ。これに対し、第1及び第2の抗体様分子が同一の重鎖を有するのではない限り（すなわち、第1のヒト重鎖領域に融合している V_L ドメインと第2のヒト重鎖領域に融合している V_L ドメインとが同一でない限り）、第1の抗体様分子において現れる V_L ドメインと第2の抗体様分子において現れる V_L ドメインとは同族ではない。

【0055】

抗体発生の初期には、抗体重鎖は、種々の選択スキームを経て自然選択により適した重鎖が更なる選択を受けて最終的に機能的親和性成熟抗体が形成される選択プロセスを受ける。重鎖及び軽鎖可変遺伝子再構成から生じる多様性は骨髄で発生し、クラススイッチに先行する。前駆B細胞（すなわち、プロB細胞）の組換えられた重鎖遺伝子セグメントから発現した抗体重鎖は、通常はIgMアイソタイプにおいて、プロB細胞の表面上への提示のためにサロゲート軽鎖と対を成し、プレB細胞受容体、すなわち、プレBCRと呼ばれる構造（これは他の共受容体を含む）を形成する。プレBCRが該細胞表面上に提示されると、プレBCRは、その複合体の適切な形成を該細胞にシグナル伝達し、該細胞に対して、重鎖がこの初期の選択段階を通過したことを有効に指示すると考えられる。したがって、該細胞には、重鎖が更なる選択を受けるかもしれないことが伝達される。IgM及びサロゲート軽鎖に関して提示された場合に重鎖がプレBCRの形成に有害な欠陥を含む場合、該細胞はアポトーシスを受ける。該細胞がアポトーシスを受けると、重鎖の重鎖可変領域の有用性、または多様性への寄与が失われる。したがって、抗体選択の非常に初期の段階では、IgMアイソタイプに関して重鎖とともにサロゲート軽鎖の提示が必要となる。抗体を産生するB細胞の正常な発達には、概して、 C_H1 ドメインが存在していることが必要である。IgMなど、重鎖アイソタイプは全て C_H1 ドメインを含む。サロゲート軽鎖及び同族軽鎖は共に、IgMに関して重鎖の C_H1 ドメインを介して所与の重鎖と相互作用すると考えられる。

【0056】

B細胞が骨髄から出た後、抗原との会合（細胞表面IgMとして発現した再構成された抗体間で低親和性の相互作用を必要とする）は、体細胞超変異とクラススイッチの協調的誘導を刺激する。クラススイッチ後、表面B細胞受容体による差別的な抗原認識によって、元のIgMの超変異誘導体のプールから親和性が増大された抗体を選択することが可能となる。

【0057】

「重鎖のみの抗体」、「重鎖のみの抗原結合タンパク質」、「単ドメイン抗原結合タンパク質」、「単ドメイン結合タンパク質」等の用語は、重鎖定常領域は通常は機能的

10

20

30

40

50

C_H1ドメインを欠いているために軽鎖と会合することができない重鎖定常領域に作動可能に連結される可変ドメインを含んでいる免疫グロブリン様鎖を含んだ単量体またはホモ二量体免疫グロブリン分子を指す。したがって、「重鎖のみの抗体」、「重鎖のみの抗原結合タンパク質」、「単ドメイン抗原結合タンパク質」、「単ドメイン結合タンパク質」等の用語は、(i)機能的C_H1ドメインを欠いている重鎖定常領域に作動可能に連結される可変ドメインを含んでいる免疫グロブリン様鎖の1つを含んだ単量体単ドメイン抗原結合タンパク質または(ii)機能的C_H1ドメインを欠いている重鎖定常領域に作動可能に連結される可変ドメインを各々含んでいる2つの免疫グロブリン様鎖を含んだホモ二量体単ドメイン抗原結合タンパク質の両方を包含する。種々の態様では、ホモ二量体単ドメイン抗原結合タンパク質は、機能的C_H1ドメインを欠いている同一の重鎖定常領域に作動可能に連結される同一の可変ドメインを各々含んでいる2つの同一の免疫グロブリン様鎖を含む。更に、単ドメイン抗原結合タンパク質の免疫グロブリン様鎖の各々は、重鎖定常領域遺伝子(例えば、IgG、IgA、IgE、IgD、またはそれらの組み合わせ)のC_H1コード配列(及び、場合によっては、ヒンジ領域)において欠失または不活性化変異を含んでいる重鎖定常領域(C_H)遺伝子配列に連結され、重鎖可変領域遺伝子セグメント(例えば、V_H、D_H、J_H)、軽鎖遺伝子セグメント(例えば、V_L、J_L)、またはそれらの組み合わせに由来し得る、可変ドメインを含む。重鎖遺伝子セグメント由来の可変ドメインを含んでいる単ドメイン抗原結合タンパク質は、「V_H単ドメイン抗体」または「V_H単ドメイン抗原結合タンパク質」と呼ばれることもある。軽鎖遺伝子セグメント由来の可変ドメインを含んでいる単ドメイン抗原結合タンパク質は、または「V_L単ドメイン抗原結合タンパク質」と呼ばれることもある。

【0058】

上に開示されたように、単ドメイン抗原結合タンパク質を産生するように操作された非ヒト動物がそれを産生することによって、従来の抗体に比して、抗原に応答する抗原特異的な単ドメイン抗原結合タンパク質の発現は比較的低くなる。当該技術からは、再構成された軽鎖の発現がほぼない場合に限り、高力価が可能となることが示唆される。具体的には、再構成された軽鎖を発現しない動物は、抗原と特異的に結合するより高いレベルの単ドメイン抗原結合タンパク質を産生することができることが明らかとなっている(Janssens et al. (2006) PNAS 103:15130-15135; Zou et al. (2004) J. Exp. Med. 204:3271-3277)。当該技術とは反対に、本明細書に記載のデータは、遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖を発現する動物は、攻撃後に高力価の抗原特異的な単ドメイン抗原結合タンパク質を生成することを示している。軽鎖可変領域遺伝子セグメントが再構成されて、C_H1配列における欠失または不活性化変異を含んでいる重鎖定常領域遺伝子と組み換えられて、抗原と特異的に結合することが可能なV_L単ドメイン抗原結合タンパク質をコードすることができることも本明細書に示す。係るV_L単ドメイン抗原結合タンパク質の軽鎖可変ドメインは、再構成された軽鎖可変領域遺伝子配列に例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以上のNを付加することにより同族軽鎖の欠損を補うことが可能であり、これは内在性及び修飾されていない免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から再構成された軽鎖可変領域遺伝子配列には通常は見られない。

【0059】

したがって、一態様では、単ドメイン抗原結合タンパク質及び遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖(例えば、共通軽鎖)を含む非ヒト動物が提供され、ここで、該単ドメイン抗原結合タンパク質の少なくとも1つの重鎖は、機能的C_H1ドメインを欠いている。別の態様では、軽鎖可変領域、及び機能的C_H1ドメインを欠いている重鎖定常領域を含むV_L単ドメイン抗原結合タンパク質を含む非ヒト動物が提供される。別の態様では、軽鎖可変領域、及び機能的C_H1ドメインを欠いている重鎖定常領域を含むV_L単ドメイン抗原結合タンパク質及び遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖(例えば、共通軽鎖)を含む非ヒト動物が提供される。遺伝子改変された非ヒト動物の作製方法、該遺伝子改変された非ヒト動物から単離したタンパク質(例えば、単ドメイン抗原結合タ

ンパク質)細胞、及び該遺伝子改変された動物からのタンパク質及び細胞の単離方法も提供する。

【0060】

「高親和性」抗体という用語は、その標的エピトープに対して、約 10^{-9} M以下(例えば、約 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、または約 1×10^{-12} M)の K_D を有する抗体を指す。一実施形態では、 K_D は、例えば、B I A C O R E (商標)などの表面プラズモン共鳴によって測定され、別の実施形態では、 K_D はE L I S Aによって測定される。

【0061】

「細胞」という用語は、組換え核酸配列を発現するために好適な任意の細胞を含む。細胞には、原核生物及び真核生物(単細胞または多細胞)の細胞、細菌細胞(例えば、大腸菌、バチルス属種、ストレプトマイセス属種の株など)、マイコバクテリウム細胞、真菌細胞、酵母細胞(例えば、出芽酵母、分裂酵母、P. パストリス、P. メタノリカなど)、植物細胞、昆虫細胞(例えば、S F - 9、S F - 21、バキュロウイルス感染昆虫細胞、キンウワバなど)、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または、例えば、ハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合物が挙げられる。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、またはマウス細胞である。一部の実施形態では、細胞は、真核性であり、以下の細胞から選択される: C H O (例えば、C H O K 1、D X B - 11 C H O、V e g g i e - C H O)、C O S (例えば、C O S - 7)、網膜細胞、V e r o、C V 1、腎臓(例えば、H E K 293、293 E B N A、M S R 293、M D C K、H a K、B H K)、H e L a、H e p G 2、W I 38、M R C 5、C o l o 205、H B 8065、H L - 60、(例えば、B H K 21)、J u r k a t、D a u d i、A 431(表皮性)、C V - 1、U 937、3 T 3、L細胞、C 127細胞、S P 2 / 0、N S - 0、M M T 060562、S e r t o l i細胞、B R L 3 A細胞、H T 1080細胞、骨髓腫細胞、腫瘍細胞、及び前述の細胞に由来する細胞株。一部の実施形態では、細胞は、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞(例えば、P E R . C 6(商標)細胞)など、1つ以上のウイルス遺伝子を含む。

【0062】

「保存」という用語は、保存的アミノ酸置換を説明するために使用されるとき、類似の化学的特性(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による、アミノ酸残基の置換を含む。概して、保存的アミノ酸置換は、例えば、所望の親和性で標的エピトープと特異的に結合する可変領域の能力など、タンパク質の関心の機能的特性を実質的に変化させないであろう。類似の化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例としては、脂肪族側鎖、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンなど、脂肪族ヒドロキシル側鎖、例えば、セリン及びトレオニンなど、アミド含有側鎖、例えば、アスパラギン及びグルタミンなど、芳香族側鎖、例えば、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンなど、塩基性側鎖、例えば、リジン、アルギニン、及びヒスチジンなど、酸性側鎖、例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸など、ならびに硫黄含有側鎖、例えば、システイン及びメチオニンなどが挙げられる。保存的アミノ酸置換基としては、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、リジン/アルギニン、アラニン/バリン、グルタメート/アスパルテート、及びアスパラギン/グルタミンが挙げられる。一部の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成において使用される、タンパク質内の任意の天然の残基のアラニンでの置換であることができる。一部の実施形態では、参照により本明細書に援用したG o n n e t e t a l . (1992) 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 256:1443-45に開示された、P A M 250対数尤度マトリクスにおいて正の値を有する保存的置換が作製される。一部の実施形態では、置換は、置換が、P A M 250対数尤度マトリクスにおいて非負の値を有する中程度の保存的置換である。

10

20

30

40

50

【0063】

一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖または重鎖中の残基位置は、1つ以上の保存的アミノ酸置換だけ異なる。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、例えば、B細胞からの、発現及び分泌を可能にする断片）中の残基位置は、そのアミノ酸配列が本明細書に記載されている軽鎖とは同一ではなく、1つ以上の保存的アミノ酸置換だけ異なる。

【0064】

「エピトープ結合タンパク質」または「抗原結合タンパク質」という表現は、少なくとも1つのCDRを有し、エピトープを選択的に認識することができる、例えば、約1マイクロモル以下の K_D （例えば、約 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、または約 1×10^{-12} Mの K_D ）でエピトープと結合することができるタンパク質を含む。治療用エピトープ結合タンパク質（例えば、治療用結合タンパク質）は、ナノモルまたはピコモル範囲内の K_D を必要とすることが多い。

【0065】

「機能的断片」という表現は、発現され、分泌されて、マイクロモル、ナノモル、またはピコモル範囲内の K_D でエピトープと特異的に結合することができる、エピトープ結合タンパク質の断片を含む。特定の認識としては、少なくともマイクロモル範囲、ナノモル範囲、またはピコモル範囲内の K_D を有することが挙げられる。

【0066】

配列の比較に関する「同一性」という用語は、当該技術分野において既知である、ヌクレオチド及び/またはアミノ酸配列同一性を測定するために使用することができる複数の異なるアルゴリズムのいずれかによって決定される同一性を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の同一性は、10.0の開放ギャップペナルティ、0.1の伸長ギャップペナルティを採用するClustalW v. 1.83（遅い）配列比較を使用して、且つGonnet類似性マトリクス（MACVECTOR（商標）10.0.2、MacVector Inc.、2008）を使用して決定される。「同一性」という用語には、高分子間の、例えば、核酸分子（例えば、DNA分子及び/またはRNA分子）間及び/またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を含む。一部の実施形態では、高分子は、それらの配列が少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一の場合に、相互に「実質的に同一」とであるとみなされる。当業者には理解されるように、異なる配列においてどの残基が互いに「対応する」かを検討する際に、もう1つの配列に比べた一方の配列における指定された長さのギャップを許容することによることを含む、配列の相同性の程度を決定するために配列の比較を可能にする種々のアルゴリズムを利用することができる。2つの核酸配列間の同一性パーセントの計算は、例えば、最適な比較の目的で2つの配列を整列させることによって行うことができる（例えば、最適な配列比較のために第1及び第2の核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較目的のために、対応していない配列を無視することができる）。ある特定の実施形態では、比較のために整列される配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または実質的に100%である。対応するヌクレオチドの位置にあるヌクレオチドを次に比較する。第1の配列の位置が、第2の配列にある対応する位置の同じヌクレオチドによって占められている場合、その分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップの数を考慮し、その2つの配列が共有している同一の位置の数と、2つの配列を最適に整列させるのに導入する必要がある各ギャップの長さとの関数である。2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントを決定するのに有用な代表的アルゴリズム及びコンピュータプログラムとしては、例えば、PAM120重み残基テーブル、ギャップ長ペナルティ12及びギャップペナルティ4を用いてALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているMeyers

とMillerのアルゴリズム(CABIOS、1989、4:11-17)が挙げられる。あるいは、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、例えば、NWsgapdna.CMPマトリクスを利用したGCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラムを用いて決定することができる。

【0067】

「マイクロモル範囲」という表現は、1~999マイクロモルを意味することを意図し、「ナノモル範囲」という表現は、1~999ナノモルを意味することを意図し、「ピコモル範囲」という表現は、1~999ピコモル範囲を意味することを意図する。

【0068】

「作動可能に連結される」という用語は、作動可能に連結される成分がその意図される様式で機能する関係を指す。一例では、タンパク質をコードする核酸配列は、適切な転写調節を保持するように、調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列など)に作動可能に連結されてもよい。一例では、免疫グロブリン可変領域(すなわち、V(D)Jセグメント)の核酸配列は、再構成された免疫グロブリン重鎖または軽鎖配列への配列間の適切な組換えを可能にするように、免疫グロブリン定常領域の核酸配列に作動可能に連結されてもよい。

【0069】

遺伝子置換に関する「置き換え」という用語は、内在性遺伝子遺伝子座に外来性遺伝子物質を置き、それにより内在性遺伝子の全部または一部をオルソロガスな核酸配列または相同性核酸配列により置き換えることを指す。

【0070】

「非ヒト動物」という用語は、任意の脊椎動物、例えば、円口類、硬骨魚、軟骨魚類、例えば、サメ及びエイ、両生類、爬虫類、哺乳類、及び鳥類を含むことを意図する。適した非ヒト動物は哺乳類を含む。適した哺乳類には、非ヒト霊長類、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウシ、及びげっ歯類が挙げられる。

【0071】

本発明の一部の態様では、該非ヒト動物には、小型の哺乳動物、例えば、トビネズミ上科またはネズミの上科のものが挙げられる。一実施形態では、該遺伝子改変された動物はげっ歯類である。一実施形態では、げっ歯類は、マウス、ラット、リス、ヤマアラシ、またはハムスターから選択される。一実施形態では、該げっ歯類はネズミ上科から選択される。一実施形態では、該遺伝子改変された動物は、カンガルーハムスター科(例えば、マウス様ハムスター)、キヌゲネズミ科(例えば、ハムスター、新世界ラット及びマウス、ハタネズミ)、ネズミ科(トゥルーマウス及びラット、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ)、アシナガマウス科(キノボリマウス、イワマウス、ホワイトテールドラット(white-tailed rat)、マダガスカルラット及びマウス)、トゲヤマネ科(例えば、トゲヤマネ)、及びメクラネズミ科(例えば、メクラネズミ(mole rate)、タケネズミ、及びモグラネズミ)から選択される科に由来する。具体的な実施形態では、該遺伝子改変されたげっ歯類は、トゥルーマウス及びラット(ネズミ科)、アレチネズミ、トゲマウス、及びタテガミネズミから選択される。一実施形態では、該遺伝子改変されたマウスは、ネズミ科の仲間由来する。一実施形態では、該動物はげっ歯類である。具体的な実施形態では、げっ歯類はマウス及びラットから選択される。一実施形態では、該非ヒト動物はマウスである。

【0072】

特定の実施形態では、該非ヒト動物は、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、及びC57BL/Olaから選択されるC57BL系のマウスであるげっ歯類である。別の実施形態では、該マウスは、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例えば、129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/S

10

20

30

40

50

vEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2である系統からなる群より選択される129系である(例えば、Festing et al. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836を参照。またAuerbach et al (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Linesも参照のこと)。特定の実施形態では、該遺伝子改変されたマウスは、前述の129系と前述のC57BL/6系との混合である。別の特定の実施形態では、該マウスは、前述の129系の混合、または前述のBL/6系の混合である。特定の実施形態では、混合の129系は、129S6 (129/SvEvTac)系である。別の実施形態では、該マウスは、BALB系、例えば、BALB/c系である。更に別の実施形態では、該マウスは、BALB系と前述の別の系との混合である。

10

【0073】

一実施形態では、該非ヒト動物は、ラットである。一実施形態では、該ラットは、Wistarラット、LEA系、Sprague Dawley系、Fischer系、F344、F6、及びDark Agoutiから選択される。一実施形態では、該ラット系は、Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6、及びDark Agoutiからなる群より選択される系統のうちの2つ以上の混合である。

20

【0074】

本明細書で用いる場合「遺伝子操作された」、「遺伝子改変された」等は、核酸配列を人工的に操作、改変及び/または組み換えて、例えば動物によって非天然のポリペプチドを産生させることを含む。

【0075】

単ドメイン抗原結合タンパク質を作製するための遺伝子操作動物

本明細書では、(a)インタクトなIgM C_H1定常領域を保持しながら機能的C_H1ドメインが不活性化及び/または除去された1つ以上の非IgM免疫グロブリン定常領域を含む改変された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の重鎖可変領域または軽鎖可変領域遺伝子配列によってそれぞれコードされてもよい、単ドメイン抗原結合タンパク質(例えば、V_HまたはV_L単ドメイン結合タンパク質)、及び/または(b)軽鎖遺伝子座の単一の再構成された可変遺伝子配列(例えば、免疫グロブリンカッパ遺伝子座に挿入された単一の再構成されたV_L:J_L遺伝子配列)によってコードされてもよい、遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖を含む遺伝子改変された非ヒト動物を提供する。

30

【0076】

抗体はヒト治療薬として有用である。単ドメイン結合タンパク質もヒト治療薬として有用である。単ドメイン結合タンパク質は軽鎖を欠いているのでより小型であり、したがって、軽鎖を含む抗体よりも良好な組織浸透を示すが、従来の抗体と比較すると類似するか、またはより有利な薬物動態プロファイルを有し、類似したエフェクター機能が保持されていることが予期される。また、単ドメイン結合タンパク質はより小型であるので、所与の体積でより高い用量での投与が可能になる。頻繁に使用される結合抗体投与方法は皮下注射であり、所与の投薬量の抗体に対して投与量を低減することにより、患者にとって有益であり、より多い量の皮下注射による合併症及び痛みが回避され得る。

40

【0077】

単ドメイン結合タンパク質の別の利点は、単一の治療薬において、2種類の異なるエピトープに対する特異性を有する免疫グロブリン鎖をヘテロ二量体化することにより二重特異性抗体を作製できることにある。単ドメイン結合タンパク質は軽鎖を欠いていることから、その他の鎖の結合親和性または特異性を妨げる軽鎖を作り出す軽鎖再構成がないため、二重特異性抗体の作製に特に適している。

【0078】

50

ラクダ科、ある特定の種の魚類、及び病理学的状態の観察から、ある環境下では、重鎖定常領域に機能的 C_H1 ドメインを欠いている結合タンパク質は、同族軽鎖が存在せずに発現され得ることが明らかとなっている。したがって、一実施形態では、結合タンパク質は「単ドメイン結合タンパク質」と呼ばれることもあり、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含む軽鎖がない抗体、すなわち重鎖定常領域を各々含んでいる1つまたは2つのみの免疫グロブリンポリペプチド鎖を含む「重鎖のみの抗体」として当該分野でも公知であり得、ここで、重鎖のみの抗体の免疫グロブリンポリペプチド鎖の少なくとも1つは機能的 C_H1 ドメインを欠いている。重鎖のみの抗体に関する教示は当該技術に見出され、例えば、PCT公報WO02085944、WO02085945、WO2006008548、及びWO2007096779を参照されたい。参照により本明細書に援用する米国特許第5,840,526号；米国特許第5,874,541号；米国特許第6,005,079号；米国特許第6,765,087号；米国特許第5,800,988号；EP1589107；WO9734103；及び米国特許第6,015,695号も参照されたい。

10

【0079】

重鎖のみの抗原結合タンパク質を産生するように遺伝子改変された非ヒト動物は当該分野では公知である。例えば、Janssens et al. (2006) PNAS 103:15130-15135；Zou et al. (2004) J. Exp. Med. 204:3271-32を参照されたい。例えば、例えば免疫グロブリンG (IgG) 遺伝子において機能的 C_H1 配列を欠いているように遺伝子改変されている動物、特にげっ歯類（例えば、マウス）は、次いで単ドメイン抗原結合タンパク質を発現した。

20

【0080】

ラクダ類、ある特定の種の魚類及び病理学的状態における観察結果により、ある状況下では、同族軽鎖の非存在下では、重鎖定常領域の C_H1 ドメインを欠いている結合タンパク質が発現され得ることが示されているが、抗体産生B細胞の正常な発生には、一般的に C_H1 ドメインの存在が必要とされる。IgMを含む重鎖アイソタイプには全て C_H1 ドメインが含まれている。サロゲート軽鎖及び同族軽鎖は共に、IgMの状況では重鎖の C_H1 ドメインを介して所与の重鎖と相互作用すると考えられている。単ドメイン結合タンパク質の発生がIgMアイソタイプ重鎖の構造の完全性または機能性に依存するという点で、IgMの構造の完全性または機能のかく乱は望ましくないであろう。

30

【0081】

抗体の正常な発生には、抗体が、機能的で有用な抗体の残存及び最終的な発現をもたらす数多くの複雑な選択スキームを経て残存することが必要になる。抗体構造のかく乱は、該構造のかく乱によって抗体が1つ以上の自然な抗体選択スキームの要求を満たして有効に競合して進化する能力の消失がもたらされるという点で、抗体の残存及び最終的な発現に有害であると示されることもあり得る。

【0082】

抗体発生の初期では、抗体重鎖は、様々な選択スキームを経て自然選択により適当な重鎖が更なる選択を受けて最終的に機能的の親和性成熟抗体が形成される選択プロセスを受ける。前駆B細胞（すなわち、プロB細胞）内で組換えを受けた重鎖遺伝子セグメントから発現された抗体重鎖は、通常、IgMアイソタイプにおいて、プロB細胞の表面上への提示のためにサロゲート軽鎖と対を形成し、プレB細胞受容体、すなわち、プレBCRと称される構造（これは、他の共受容体を含む）を形成する。プレBCRが該細胞表面上に提示されたら、プレBCRは、その複合体の適切な形成を該細胞にシグナル伝達し、該細胞に対して、重鎖がこの初期の選択段階を通過したことを有効に指示すると考えられている。したがって、該細胞には、重鎖が更なる選択を受けるかもしれないことが情報伝達される。重鎖が、IgM及びサロゲート軽鎖の状況において提示された場合にプレBCRの形成に有害な欠陥を含む場合、該細胞はアポトーシスを受ける。該細胞がアポトーシスを受けると、重鎖の重鎖可変領域の有用性、または多様性に対する寄与が失われる。したがって、抗体選択の非常に初期の段階では、IgMアイソタイプの状況で重鎖とともにサロ

40

50

ゲート軽鎖の提示が必要とされる。サロゲート軽鎖はI g Mと、少なくとも部分的にI g MのC_H1ドメインを介して相互作用すると考えられている。この初期の接合部（例えば、非機能的C_H1ドメイン）における抗体構造の機能不全またはかく乱により、クローン選択機能不全、重鎖を発現するプロB細胞の消失、及び有用な抗体において特定の重鎖可変ドメインが使用される可能性の消失がもたらされ得る。

【0083】

プレBCRを有する細胞がこの選択段階を経たら、次の選択段階で、重鎖は同族の軽鎖（例えば、マウス及びヒトの μ または δ のいずれか）と対合することが必要とされる。対合した重鎖/同族の軽鎖構造は、細胞、ここでは、I g MのC_H1ドメインを通してI g Mアイソタイプの状況において、ナイーブなプレB細胞の表面上に再度提示される。この表面上の複合体により、機能的な膜結合型B細胞受容体（BCR）がもたらされる。このBCRは、細胞に、該重鎖が更なる選択に適していること、及び該細胞は、今度は、この特定の軽鎖を発現するように確定され得、更なるB細胞成熟段階（例えば、親和性成熟及びクラススイッチを含む）に進み得ることをシグナル伝達すると考えられている。重鎖が、I g M及びその同族の軽鎖の状況で提示された場合にBCRの形成に対して有害な欠陥を含む場合、該細胞はアポトーシスを受ける。該細胞がアポトーシスを受けると、該重鎖の重鎖可変領域の有用性または多様性に対する寄与が失われる。したがって、抗体選択の非常に初期の段階では、重鎖とともにI g Mアイソタイプの状況の同族軽鎖の提示が必要とされる。この場合も、この初期の接合部の抗体構造（例えば、非機能的C_H1ドメイン）の欠損またはかく乱により、クローン選択の失敗及び該重鎖を発現するプレB細胞の付随的な消失がもたらされることがあり得る。

【0084】

ここまでの選択に残ったら、I g Mの状況において同族の軽鎖と対合している該重鎖を提示しているプレB細胞は、次いで成熟プロセスを受け、該プロセスにより、最終的にクラススイッチ、及び該重鎖と同族の軽鎖がI g Gアイソタイプの状況でB細胞表面上に提示される更なる選択機構がもたらされる。C_H1ドメインを欠いている、またはC_H1ドメインとヒンジ領域を欠いているI g G重鎖の選択が起こるのは、この段階となるであろう。本発明に係る動物では、重鎖遺伝子座の可変領域の増大したレパートリーが、可変ドメインが残って、C_H1ドメインを欠いているか、またはC_H1ドメインとヒンジ領域を欠いているI g G重鎖に発現され得るかどうかに基づいた選択に利用可能であり得ると考えられる。対照的に、機能が損なわれたI g Mを有するマウスは、機能が損なわれたI g Mの状況で選択に残り得る可変領域のみがクラススイッチに利用可能となり得るため、おそらく、重鎖可変領域の完全なレパートリーを提示しないであろう。

【0085】

したがって、機能的I g Mを欠いている動物では、そうでない場合には適した重鎖可変遺伝子セグメントの再構成後にB細胞集団を作製する能力の著しい低下が起こり得る。そのような場合、豊富な供給量の可変領域が利用可能である（すなわち、再構成可能であり、重鎖定常領域に（例えば、重鎖免疫グロブリン遺伝子座において）作動的に連結可能な適した数の可変領域遺伝子セグメントを有する場合であっても、選択プロセス中の該重鎖の残存を抑制するI g Mの欠陥のため、望ましい度合の多様性を示す十分なB細胞集団が形成されないことがある。

【0086】

対象免疫原で非ヒト動物に免疫することによる抗体の作製に十分な多様性をもたらすために、B細胞発生中に提示されたときにI g Mの状況で有効に選択に残り得る適当な数の再構成された重鎖免疫グロブリン遺伝子座の可変領域が維持されていることが望ましい。したがって、免疫グロブリン重鎖に非機能的C_H1ドメインまたは非機能的C_H1ドメイン及び場合によっては非機能的ヒンジ領域を含む遺伝子改変された非ヒト動物は、I g M対立遺伝子の一方または両方にC_H1欠失を含むべきではない。本明細書に参照により援用するUS2011/0145937に開示されている係る動物は、C_H1ドメインが欠失または不活性化されているI g G定常遺伝子領域へのクラススイッチを呈し、抗原によ

って刺激され選択されるために、1) 折り畳まれて、軽鎖パートナーなしに細胞表面に発現し、且つ2) 軽鎖のない場合にも抗原を認識する単ドメインの表面IgG (B細胞受容体) を発現する。

【0087】

本発明の種々の実施形態では、単ドメイン抗原結合タンパク質 (例えば、限定するものではないがV_H 及びV_L 単ドメイン結合タンパク質) を含む、C_H 1ドメインを欠いている結合タンパク質を作る遺伝子改変された非ヒト動物を提供する。該遺伝子改変された非ヒト動物は、機能的免疫グロブリン重鎖ドメイン (C_H 1ドメイン)、例えば、IgG 1 C_H 1ドメインの欠損を含む遺伝子改変を含んでもよく、一部の実施形態では、機能的C_H 1ドメインを欠いている該免疫グロブリン重鎖においてヒンジ領域の欠失を含む更なる改変を含むものであり、該非ヒト動物は機能的IgMを発現する。他の改変には、IgG 1 及びIgM以外のアイソタイプを非機能的にすること、例えば、IgD、IgG 3、IgG 2 a、IgG 2 c、IgG 2 b、IgA、及びIgE に対して遺伝子における欠失、または遺伝子の欠失、あるいは遺伝子における不活性化変異 (IgD、IgG 3、IgG 2 a、IgG 2 c、IgG 2 b、IgA、及びIgE のC_H 1ドメインまたはヒンジ領域の欠失または不活性化変異など) を行うことが挙げられる。該非ヒト動物、非ヒト胚、及び細胞を作成するための遺伝子改変された非ヒト胚、細胞、及びターゲティングコンストラクトも提供する。

【0088】

V_H ドメイン (例えば、内在性またはヒトV_H ドメイン) またはV_L ドメイン (例えば、ヒトV_L ドメイン) を含んでいてもよい、単ドメイン抗原結合タンパク質を含む、免疫グロブリンC_H 1ドメイン (及び場合によってはヒンジ領域) を欠いている結合タンパク質を作る動物を作製するための組成物及び方法も提供する。本方法には、選択的に、内在性非IgM C_H 1領域を (例えば、C_H 1ドメインの配列の欠失または不活性化によって) 非機能的にし、内在性可変領域遺伝子座において再構成されていない内在性重鎖可変領域 (H C V R) 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト可変領域 (h H C V R) 遺伝子セグメント、または再構成されていないヒト軽鎖可変領域 (h L C V R) のいずれかを利用して非ヒトにおいてキメラヒト結合タンパク質を作成することを含む。C_H 1ドメインの欠失は、1つ以上の免疫グロブリン定常領域遺伝子 (例えば、IgG 1、IgD、IgG 3、IgG 2 a、IgG 2 c、IgG 2 b、IgA、またはIgE 遺伝子) において行われるが、IgM遺伝子では行われない。欠失がIgGにある一実施形態では、このアプローチは、機能的IgMを保持したままで、1つ以上のIgG C_H 1ドメインを選択的に非機能的にする。1つ以上のIgG C_H 1ドメインの欠失に加え、更なる実施形態は、機能的C_H 1ドメインを欠いているIgG (複数可) のヒンジ領域 (複数可) を欠失させるか、または非機能的にする。

【0089】

この特定の実施形態では、IgG C_H 1欠失アプローチは、遺伝子改変された非ヒト動物のIgアイソタイプの全てが非機能的C_H 1またはC_H 1ドメイン (及び場合によってはヒンジ) の欠失を呈するというわけではないので、動物の天然のB細胞発生において比較的保存的なく乱を利用する。したがって、上記のように、C_H 1改変はIgM分子では生じず、したがって、機能的C_H 1を有するIgMに依存するB細胞発生の初期の段階に影響を及ぼさない。IgMは改変されないで、IgGのC_H 1ドメイン (及び任意選択でIgGのヒンジ領域) の1つ以上の欠失を有するが、IgMのC_H 1ドメインの欠失は有しない動物では、IgGの状況の可変ドメインの提示前に、クローン選択段階において、可変領域の満足できる大量のレパートリーがプロセッシングされ得るはずである。したがって、種々の実施形態において、単ドメイン結合タンパク質における使用に利用可能な可変領域の多様性に対する遺伝子改変 (複数可) のいずれの有害な影響によっても、IgGに関連する選択に利用可能な可変領域のプールは、マイナスの影響を受けないはずである。更に、生殖系列において非機能的にされる (例えば、欠失される) C_H 1配列がIgG 1である場合、該動物は、C_H 1ドメインをコードするRNAの作製能を欠くこ

となる。

【0090】

非ヒト動物を遺伝的に改変して、1つ以上の非IgM免疫グロブリンアイソタイプのC_H1ドメインまたはC_H1ドメイン及び場合によってはヒンジ領域を非機能的にすれば、V領域遺伝子セグメント（例えば、V_HまたはV_L領域）の完全または実質的に完全なレパートリーから、単ドメイン結合タンパク質において発現するのに適したV領域を選択することのできる動物が得られるかもしれない。IgGアイソタイプを選択的に改変する（しかしIgMは改変しない）ことで、IgMにおけるC_H1ドメインの欠落またはC_H1ドメインの欠落により選択を生き残る可変領域の数が減る可能性が回避される。したがって、IgG（C_H1ドメインを欠いているか、またはC_H1ドメインを欠き且つヒンジ領域を欠いている）に関する選択にV領域のより完全なレパートリーが利用できる。したがって、本発明に係る遺伝子改変された動物のVドメインの選択は、例えば、どのVドメインが改変されたIgM構造に起因する初期IgM依存性B細胞発生上の障害を克服するのに有用であり得るかには左右されない。それに代わって、初期IgM依存性の段階は正常に生じるはずであり、その結果、C_H1ドメインを欠いているか、またはC_H1ドメインを欠き且つヒンジ領域を欠いているIgGに関して発現するその適合性に関する選択に利用可能な重鎖の大きなレパートリーが得られる。

10

【0091】

したがって、種々の実施形態では、本発明による遺伝子改変動物では機能的IgMの発現が維持されるはずであり、これにより、より自然なクローン選択プロセスの機会がもたらされるはずである。例えば、機能的IgM（例えば、機能的C_H1ドメインを含むIgM）がある場合、サロゲート軽鎖と同族の軽鎖の両方がIgMのC_H1ドメインを介して結合することができ、初期のB細胞発生における選択プロセスに関与することができる。本発明による遺伝子改変動物では、IgGアイソタイプへのクラススイッチが最初の選択段階であり、ここでは、機能的C_H1ドメインを欠いているか、または機能的C_H1ドメインと機能的ヒンジを欠いている定常ドメインの状況で発現され得る重鎖可変ドメインの任意の選択がみられると考えられる。

20

【0092】

種々の実施形態では、C_H1ドメインにおける欠失または不活性化変異を含む該非ヒト動物の非IgM重鎖定常領域は、非ヒト、例えば、内在性非ヒト重鎖定常領域である。別の実施形態では、C_H1ドメインにおける欠失または不活性化変異を含む該非ヒト動物の非IgM重鎖定常領域は、ヒト重鎖定常領域である。該動物が軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成された軽鎖遺伝子配列を更に含む更に別の実施形態では、軽鎖定常領域は非ヒト、例えば内在性非ヒト軽鎖定常領域であるか、あるいは軽鎖はヒト軽鎖定常領域である。

30

【0093】

V_L単ドメイン結合タンパク質（例えば、軽鎖可変ドメインを有する単ドメイン抗原結合タンパク質）

本明細書では、2種類の単ドメイン抗原結合タンパク質すなわち（1）再構成された重鎖可変領域遺伝子配列によってコードされるV_H単ドメイン結合タンパク質及び（2）再構成された軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされるV_L単ドメイン結合タンパク質を含む遺伝子改変された非ヒト動物を提供し、単ドメイン抗原結合タンパク質の各々は、インタクトなIgM C_H1定常領域を保持しながら機能的C_H1ドメインが不活性化及び/または除去された1つ以上の非IgM免疫グロブリン定常領域を含む改変された免疫グロブリン重鎖遺伝子座によってもコードされている。

40

【0094】

したがって、一実施形態では、本明細書では、重鎖定常領域に作動可能に連結される軽鎖可変領域遺伝子セグメント（例えば、V_L、J_L、V_H、及び/またはJ_H遺伝子セグメント）を含むように遺伝子操作された重鎖遺伝子座を提供する。軽鎖可変領域を含むような重鎖遺伝子座の遺伝子改変については記載がある。例えば、1つ以上の軽鎖可変領域

50

V_L 及び / または J_L 遺伝子セグメントによる 1 つ以上の、実質的に全ての、または全ての免疫グロブリン重鎖可変領域 V_H、D_H、及び / または J_H 遺伝子セグメントの置き換えを含んだ免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含んでいる非ヒト動物の生成については参照により本明細書にその全体を援用する米国特許出願第 2 0 1 2 0 0 9 6 5 7 2 号に記載されている。

【 0 0 9 5 】

当業者であれば、置き換え V_L 及び / または J_L 遺伝子セグメントは、生産的な再構成を受けることができる再構成されていない V_L 及び / または再構成されていない J_L 遺伝子セグメントを含んでいてもよいことが容易に理解されよう。さらに、V_L 及び / または J_L 遺伝子セグメントは V_L、J_L、V_L、J_L 遺伝子セグメントから選択される 1 つ以上のセグメントであってもよく、それらの組み合わせであってもよい。一実施形態では、1 つ以上の重鎖可変領域遺伝子セグメントは、1 つ以上のヒト軽鎖可変遺伝子セグメントにより置き換えられ、ヒトイデオタイプを有する可変ドメインの産生を可能にする。

【 0 0 9 6 】

本明細書に記載するように、重鎖定常領域に作動可能に連結される軽鎖可変領域遺伝子セグメント（例えば、V_L、J_L、V_L、及び / または J_L 遺伝子セグメント）を含むように遺伝子操作された重鎖遺伝子座は、重鎖定常領域の 1 つ以上のドメインまたは遺伝子セグメントが不活性化されているか、または欠失している場合であっても、生産的な遺伝子再構成を受けて免疫グロブリン鎖を形成し得る。本明細書に示すように、重鎖可変領域遺伝子セグメントを、C_H 1 ドメインの欠失（例えば、I g G 1 遺伝子における）を伴う軽鎖可変領域遺伝子セグメントによって置き換えることにより、軽鎖可変領域を有する単一ドメイン抗原結合タンパク質が得られる。具体的には、重鎖遺伝子座の内在性重鎖可変領域遺伝子セグメントをカップ（ ）V 及び J 遺伝子セグメント（V_L 及び J_L）によって置き換えることにより、重鎖定常領域（K o H）に作動可能に連結されるカップ可変領域が得られる。重鎖遺伝子座を更に改変して C_H 1 ドメイン（複数可）を欠失させると（C_H 1 d e l）、軽鎖可変領域、及び機能的 C_H 1 ドメインを欠いている重鎖定常領域を含む免疫グロブリンポリペプチド鎖をコードする免疫グロブリン遺伝子座（K o H C_H 1 d e l）が得られ、ここで、該免疫グロブリンポリペプチド鎖は、単一ドメイン抗原結合タンパク質（例えば、V_L 単一ドメイン抗原結合タンパク質）を形成し得る。

【 0 0 9 7 】

したがって、一部の実施形態では、機能的 C_H 1 ドメインを欠いている重鎖定常領域に作動可能に連結される軽鎖可変ドメインを含んでいる V_L 単一ドメイン結合タンパク質を含んだ遺伝子改変された非ヒト動物が提供され、ここで、該免疫グロブリンポリペプチド鎖は単一ドメイン抗原結合タンパク質を形成し、これはインタクトな I g M 定常領域を保持しながら機能的 C_H 1 ドメインが不活性化且つ / または除去されている 1 つ以上の非 I g M 免疫グロブリン定常領域を含む改変された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされ得る。

【 0 0 9 8 】

本明細書に記載する態様は、1 つ以上の重鎖定常領域遺伝子（例えば、I g M、I g D、I g G、I g A または I g E）をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結され、好適には再構成されておらず、またより好適にはヒトの J_L 遺伝子セグメント（またはその一部）により再構成された好適には再構成されておらず、またより好適にはヒトの V_L 遺伝子セグメント（またはその一部）を含むか、これに由来するハイブリッド免疫グロブリン遺伝子によってコードされるハイブリッド鎖を含んだ V_L 結合タンパク質を含み、ここで、該 I g D、I g G、I g A または I g E 遺伝子は C_H 1 コード配列における欠失または不活性化変異を含む。V_L 結合タンパク質、抗原結合 V_L タンパク質等は、2 つの軽鎖可変ドメインを含む抗原結合部位を含んでいる抗原結合タンパク質を含む。一実施形態では、V_L 結合タンパク質の少なくとも 2 つの軽鎖可変ドメインは同族である。一部の実施形態では、2 つの軽鎖可変ドメインの各々は、軽鎖可変領域（V_L）遺伝子セグメント及び / または軽鎖連結領域（J_L）遺伝子セグメントによってコードされているか、また

はこれらのセグメントに由来するものである。好適な実施形態では、2つの軽鎖可変ドメインの一方はハイブリッド免疫グロブリン鎖であってもよく、2つの軽鎖可変ドメインの他方は免疫グロブリン軽鎖 (L) の一部であってもよい。

【0099】

本明細書で用いる場合、「免疫グロブリンハイブリッド鎖」、「ハイブリッド鎖」、「ハイブリッド免疫グロブリン鎖」等の表現は、アミノ末端からカルボキシルに軽鎖可変ドメイン (体細胞変異されていても、体細胞変異されていなくてもよい) 及び重鎖定常領域を含む免疫グロブリンタンパク質を指す。一般に、ハイブリッド鎖は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軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされている。本明細書に開示するように、 V_L 単ドメイン結合タンパク質はハイブリッド鎖を含み、ここで、該ハイブリッド鎖は、 C_H1 コード配列において欠失または不活性化変異を有する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軽鎖可変領域遺伝子配列によってコードされている。

10

【0100】

ハイブリッド免疫グロブリン鎖の軽鎖可変領域遺伝子配列は、概して、軽鎖可変 (V_L) 遺伝子セグメント (またはその一部) 及び軽鎖連結 (J_L) 遺伝子セグメント (またはその一部) からの配列を含み得る。好適な実施形態では、該ハイブリッド鎖可変ドメインをコードしている軽鎖可変領域遺伝子配列 (例えば、再構成された $V_L - J_L$ 遺伝子配列) は、再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメント、好適には生殖系列の再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントのレパトリー由来のものであり、これらのセグメントは、(a) 生産的な遺伝子再構成 (例えば、インフレームの軽鎖可変領域遺伝子配列を形成するように再構成することができる) を受けることができ、且つ (b) 1つ以上の重鎖定常領域遺伝子セグメント (例えば、定常領域遺伝子セグメントの再構成されていないクラスまたは1つの定常領域遺伝子セグメント) に作動可能に連結される。

20

【0101】

軽鎖遺伝子セグメントが再構成されると、重鎖定常領域をコードする配列に融合された軽鎖可変領域をコードする配列を含む再構成されたヌクレオチド配列が得られる。この配列は重鎖定常ドメインに融合された軽鎖可変ドメインを有するハイブリッド免疫グロブリン鎖をコードする。したがって、一実施形態では、本明細書に開示のハイブリッド免疫グロブリンは、N末端からC末端まで V_L ドメイン及び C_H ドメインで実質的に構成されている。一実施形態では、該 C_H ドメインは、機能的 C_H1 領域 (IgM に関して)、ヒンジ、 C_H2 領域、 C_H3 領域を含み、場合によっては C_H4 領域を含む。別の実施形態では、該 C_H ドメインは、例えば、 IgG 、 IgA 、 IgE 及び/または IgD に関して、機能的 C_H1 領域を欠いており (例えば、全体的または部分的に C_H1 領域を欠いている)、更に、ヒンジ領域を欠いていてもよい。別の実施形態では、該 C_H ドメインは機能的 C_H1 領域を欠いており (例えば、全体的または部分的に C_H1 領域を欠いている)、更に、他の非 IgM アイソタイプ定常領域を欠いていてもよい。

30

【0102】

本明細書に記載の改変された非ヒト動物は、ハイブリッド鎖と対になって抗体様の V_L 結合タンパク質 (例えば四量体でもよい) を作る同族軽鎖も含んでいる IgM アイソタイプを有する V_L 結合タンパク質を生成し得るが、ここでは、重鎖 (または重鎖の対) の代わりに、該 V_L 結合タンパク質は、 IgM C_H ドメインに融合した V_L ドメイン (V_H ドメインではない) を含んでいるハイブリッド鎖 (またはハイブリッド鎖の対) を含む。

40

【0103】

本明細書に開示する非ヒト動物は好適には、機能的 C_H1 ドメインを有する IgM 定常領域遺伝子を含むので、本明細書に開示する非ヒト動物は、一部の従来の抗体の四量体構造に似ているが結合特性は異なる V_L 結合タンパク質の発現を生じさせ、且つ該非ヒト動物の細胞の膜表面上に前記 V_L 結合タンパク質を発現させる、免疫グロブリン遺伝子座のヒト化も包含する。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、 V_L 結合タンパク質のハイブリッド及び軽鎖の一方または両方で、抗原に結合するヒト V_L ドメインを産生する

50

ことができる。一部の実施形態では、係る非ヒト哺乳動物は、いかなる V_H 、 D_H 、及び / または J_H 遺伝子セグメント配列によってもコードされていないか、またはいかなる該セグメントにも由来しない可変ドメインを含んだ結合タンパク質を発現する B 細胞集団を発生する且つ / または有する。一部の実施形態では、係る非ヒト動物によって発現される V_L 結合タンパク質は、該抗原結合タンパク質がヒト V_L ドメインのみから構成されていることを特徴とする。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に非ヒト動物及び異種（例えば、ヒト）からの遺伝子物質を含み、内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に非ヒト動物及び異種（例えば、ヒト）からの遺伝子物質を含む。

【0104】

種々の実施形態では、改変された非ヒト動物は、 V_L 単ドメイン結合タンパク質を作り、ここで、ハイブリッド鎖の V_L ドメインは、軽鎖の V_L ドメインに勝って増強された程度の体細胞超変異を呈する。一部の実施形態では、ハイブリッド鎖の V_L 領域は、 C_L 領域に融合された V_L 領域よりも約 1.5 倍、約 2 倍、約 2.5 倍、約 3 倍、約 3.5 倍、約 4 倍、約 4.5 倍または約 5 倍、またはそれより多い体細胞超変異を呈する。一部の実施形態では、改変された非ヒト動物（例えばマウス）は抗原に应答して、ハイブリッド鎖の V_L ドメインを含む V_L 単ドメイン結合タンパク質の集団を呈し、ここで V_L 単ドメイン結合タンパク質の集団はハイブリッド鎖の V_L ドメインにおいて、同じ抗原に应答して野生型マウスが呈する軽鎖集団（例えば軽鎖の V_L ドメイン）に観察されるよりも、平均して約 1.5 倍、約 2 倍、約 2.5 倍、約 3 倍、約 3.5 倍、約 4 倍、約 4.5 倍または約 5 倍、またはそれより多い体細胞超変異を呈する。

【0105】

一実施形態では、ハイブリッド鎖の V_L ドメインの体細胞超変異は、 $CDR3$ に 1 つ以上または 2 つ以上の N 付加を含む。種々の実施形態では、該 V_L 結合タンパク質（例えば、 V_L 単ドメイン結合タンパク質）は、内在性軽鎖遺伝子座から再構成された軽鎖（例えば、重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された可変領域遺伝子を形成するように再構成された V_L 及び J_L 遺伝子セグメント）について天然に観察されるよりも多くの N 付加を含んだ免疫グロブリン軽鎖配列によってコードされる可変ドメインを含んでいるハイブリッド鎖を含み、ここで、再構成された軽鎖可変領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個以上の N 付加を含む。

【0106】

種々の実施形態では、 V_L 結合タンパク質（例えば、本明細書に開示するような V_L 単ドメイン結合タンパク質、例えば、遺伝子改変された非ヒト動物によって、例えば、本明細書に開示するマウスによって産生されるもの）は、平均すると、それぞれ、従来の抗体または重鎖のみ抗体よりも小さいものであり得、小さなサイズに伴う有益性を有し得る。サイズの小型化は、少なくとも一部には、通常は V_H ドメインに存在する D_H 領域によってコードされるアミノ酸配列が存在しないことにより達成される。サイズの小型化は、例えば V_L 領域及び J_L 領域に由来する $CDR3$ の形成により実現することもできる

【0107】

一態様では、免疫グロブリンハイブリッド鎖遺伝子座を含む非ヒト動物（例えば、マウス）が提供される。一実施形態では、該ハイブリッド鎖遺伝子座は内在性重鎖遺伝子座内に作られ、ここで、内在性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座にある 1 つ以上の免疫グロブリン重鎖可変領域（ V_H ）遺伝子セグメント、重鎖多様性（ D_H ）遺伝子セグメント、及び重鎖連結（ J_H ）遺伝子セグメントは、1 つ以上の軽鎖可変領域（ V_L ）遺伝子セグメント及び 1 つ以上の軽鎖連結領域（ J_L ）遺伝子セグメントにより置き換えられて、それらは再構成して、再構成された可変領域 V_L / J_L 遺伝子配列を形成し、これは内在性マウス C_H 遺伝子と組み換えて、 V_L 遺伝子セグメント、 J_L 遺伝子セグメント、及び内在性マウス C_H 遺伝子に由来する再構成された遺伝子を形成する、ここで、 C_H 遺伝子は IgM 、 IgD 、 IgG 、 IgA 、 IgE であり、ここで、該 IgD 、 IgG 、 IgA 、または IgE は機能的 C_H1 ドメインを欠いている。一態様では、内在性免疫グロブリン重

10

20

30

40

50

鎖遺伝子座を置き換えるハイブリッド鎖遺伝子座を含んでいる非ヒト動物を提供し、例えば、重鎖遺伝子座の一方または両方の全てのまたは実質的に全ての内在性 V_H 、 D_H 、及び J_H 遺伝子セグメントが、1つ以上の V_L 遺伝子セグメント及び1つ以上の J_L 遺伝子セグメントによって置き換えられ、それらは再構成された可変領域 V_L/J_L 遺伝子配列を形成し、これは内在性マウス C_H 遺伝子と組み換えて V_L 遺伝子セグメント、 J_L 遺伝子セグメント、及び内在性マウス C_H 遺伝子由来である再構成された遺伝子を形成する、ここで、 C_H 遺伝子は IgM 、 IgD 、 IgG 、 IgA 、 IgE であり、該 IgD 、 IgG 、 IgA 、または IgE は機能的 C_H1 ドメインを欠いている。

【0108】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、再構成されていないヒト V_L 遺伝子セグメント及び/またはヒト J_L 遺伝子セグメントを有する免疫グロブリンハイブリッド鎖遺伝子座と、再構成されていないヒト V_L 遺伝子セグメント及び/またはヒト J_L 遺伝子セグメントを有する免疫グロブリン軽鎖遺伝子座とを、含む。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、再構成されていないヒト V_L 遺伝子セグメント及び/またはヒト J_L 遺伝子セグメントを有する免疫グロブリンハイブリッド鎖遺伝子座と、好適には、軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される単一の再構成されたヒト V_L/J_L 可変領域遺伝子配列を有し、例えば共通軽鎖をコードする免疫グロブリン軽鎖遺伝子座と、を含む。

【0109】

単一ドメイン結合タンパク質及び再構成された軽鎖を発現する遺伝子操作された非ヒト動物

更なる実施形態では、本明細書では、(a)内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の少なくとも1つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子の C_H1 ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異であり、ここで、該少なくとも1つの内在性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子は、 IgG 、 IgA 、 IgE 、 IgD 、またはそれらの組み合わせであるものと、(b) V_L 及び J_L 遺伝子セグメント配列を含んでいる単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域 V_L/J_L 遺伝子配列を含む免疫グロブリン軽鎖遺伝子座であり、ここで、該単一の再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子配列は免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結され、例えば、単一軽鎖をコードするものと、場合によっては、更に(c)内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の内在性 V_H 、 D_H 、 J_H 遺伝子セグメントの、少なくとも1つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)遺伝子セグメント及び少なくとも1つの再構成されていない免疫グロブリン軽鎖連結(J_L)遺伝子セグメントを含む核酸配列による置き換えであり、該再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子セグメントの各々は、 C_H1 ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異を含む免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される再構成された免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L/J_L)ヌクレオチド配列を形成するように組換え可能であるものと、を含む非ヒト動物を提供する。

【0110】

単一の再構成された軽鎖(例えば、再構成された軽鎖可変領域を含む軽鎖)の遺伝子操作については記載がある。例えば、単一の再構成された可変遺伝子配列 $V_L:J_L$ を含むユニバーサル軽鎖マウス(ULC)の作製及びそれらのマウスにおける抗原特異的抗体の作製については、例えば、それぞれを参照により全体として本明細書に援用する米国特許出願第13/022,759号、第13/093,156号、第13/412,936号、第13/488,628号、第13/798,310号、及び第13/948,818号(それぞれ公開番号2011/0195454、2012/0021409、2012/0192300、2013/0045492、US20130185821、及びUS20130302836)に記載されている。遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖(例えば、ユニバーサル軽鎖)の発現により、初期 IgM 段階での抗体の増殖が生じ、この段階では、多様性の、ひいては抗原認識の大部分が重鎖で生じる。本発明に関して限定するものでないが、遺伝子改変された単一の再構成された軽鎖を用いた初期 IgM 段階で

の増殖は、生き延びて I g G アイソタイプへのクラススイッチを受け、機能的 C_H1 ドメインを欠いているか、または機能的 C_H1 ドメインを欠いており、且つ機能的ヒンジ領域を欠いている I g G の状況において選択を受けることが可能な重鎖または軽鎖可変領域を有する細胞がより多く得られることを提唱する。

【0111】

したがって、遺伝子改変された非ヒト動物を、該動物を作製するための方法及び組成物とともに提供し、ここでは、遺伝子改変によって I g M ドメインではない I g ドメインにおける機能的 C_H1 ドメインの欠落（更なる実施形態では、機能的ヒンジ領域の欠落）が生じ、ここで、該動物は更に、遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖、例えば改変された共通軽鎖（U L C）を発現し、これはインタクトな I g M に会合し得る。

10

【0112】

米国特許出願公開第 2011/0195454 号、第 2012/0021409 号、第 2012/0192300 号及び第 2013/0045492 号に記載されている改変された共通軽鎖マウスは、軽鎖選択枝の限られたレパートリー（例えば、2 を超えない V_L 遺伝子セグメントまたは単一の再構成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域配列を含んだ共通またはユニバーサル軽鎖「U L C」）をコードする核酸配列を含んだ。係る限られたレパートリーを達成するために、マウスを操作して、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した。一態様では、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された。前述のように、内在性マウス遺伝子座は、次に、内在性マウス軽鎖定常ドメインに作動可能に連結される、選択された外来性の適したヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント、好適にはヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントによって、外来性可変領域遺伝子セグメントが内在性マウス軽鎖定常領域遺伝子と結合して、再構成された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態様で、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できる。種々の実施形態では、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、適切なエンハンサー（複数可）がマウスに保持される。一態様では、マウス 軽鎖遺伝子座を改変して内在性マウス 軽鎖遺伝子セグメントをヒト 軽鎖遺伝子セグメントによって置き換える際に、マウスの イントロンエンハンサー及びマウス 3' エンハンサーは機能的に維持されるか、またはかく乱されない。

20

30

【0113】

したがって、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た。様々な実施形態では、内因性マウス 軽鎖遺伝子セグメントが欠失され、内因性マウス C 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によって置き換えられる。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 イントロンエンハンサー及びマウス 3' 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 軽鎖遺伝子座、またはその欠失、またはその遺伝子座が 軽鎖を作製できないようにする欠失を更に含む。

【0114】

40

したがって、一実施形態では、本明細書では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、マウスまたはラット）であって、そのゲノムに（例えば、その生殖系列に）、好適にはヒト軽鎖可変遺伝子セグメントの限られたレパートリーからの、好適にはヒト軽鎖可変領域の限られたレパートリー、または単一の再構成されたヒト軽鎖可変領域を含む非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、マウスまたはラット）を提供し、ここで、該非ヒト動物は、そのゲノム（例えば、その生殖系列）に、C_H1 ドメインをコードするヌクレオチド配列における欠失または不活性化変異も含む。

【0115】

ヒト軽鎖可変領域遺伝子配列の限られたレパートリーからの、ヒト軽鎖可変ドメインの限られたレパートリー、または単一ヒト軽鎖可変ドメインを発現する遺伝子操作動物を提

50

供する。一実施形態では、該単一の再構成されたV/Jヒト軽鎖配列は、V_{1-39J}及びV_{3-20J}（例えば、V_{1-39J5}及びV_{3-20J1}）から選択される。一部の実施形態では、本明細書に開示する非ヒト動物は、単一の再構成されたV/J軽鎖配列による全ての内在性V_L及び全ての内在性J_L遺伝子セグメントの置き換えを含んでいる改変された軽鎖遺伝子座を含み、ここで、単一の再構成されたV/J軽鎖配列は、内在性軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される。一部の実施形態では、該改変された軽鎖遺伝子座は、該非ヒト動物の生殖系列ゲノムに存在する。一実施形態では、該非ヒト動物は、その生殖系列ゲノムに、軽鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結される単一の再構成された軽鎖可変遺伝子配列を含み、ここで、該単一の再構成された軽鎖可変領域遺伝子配列は、ヒト生殖系列V_L及びヒト生殖系列J_L遺伝子セグメント（例えば、ヒト生殖系列V₁₋₃₉及びヒト生殖系列J₅またはヒト生殖系列V₃₋₂₀及びJ₁）を含む。一部の実施形態では、本明細書に開示する非ヒト動物は、内在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V/J軽鎖配列をそのゲノムに含んでいるB細胞（例えば、クラススイッチが行われなかったB細胞）を含み、ここで、該非ヒト動物の生殖系列ゲノムに見られる内在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V/J軽鎖配列と比較して、該単一の再構成されたV/J軽鎖は、体細胞変異を含まない。他の実施形態では、本明細書に開示する非ヒト動物は、内在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V/J軽鎖配列をそのゲノムに含んでいるB細胞（例えば、クラススイッチが行われたB細胞）を含み、ここで、該単一の再構成されたV/J軽鎖は、非ヒト動物の生殖系列ゲノムに見られる内在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V/J軽鎖配列と比較して体細胞変異を含んでいる。

【0116】

遺伝子改変された動物の作製

本明細書に開示する非ヒト動物の作製方法も提供する。係る方法は、(a)該非ヒト動物の重鎖免疫グロブリン遺伝子座（IgG1重鎖遺伝子座など）の、C_H1ドメイン、及び場合によってはヒンジ領域（複数可）を不活性化または欠失させること、遺伝子操作された再構成された軽鎖遺伝子座をコードする核酸を導入すること、及び該動物に、不活性化されたC_H1ドメインを有する重鎖免疫グロブリン遺伝子座と遺伝子的に再構成された軽鎖遺伝子座（ULC）とを発現させることを含む。

【0117】

単一ドメイン結合タンパク質を発現する動物を作製する遺伝子改変について、例示説明としてマウスを用いることにより本明細書に便宜上記載しているが、係る改変は他の動物に容易に適応且つ適用することができる。本発明に係る遺伝子改変された動物は種々の方法で作製することができ、その具体的な実施形態を以下で考察する。

【0118】

IgG1遺伝子座の例示の略図（縮尺は正確ではない）を図1（上）に示し、IgG1遺伝子座におけるC_Hドメインの配置を示す。図示のように、ドメインC_H1、C_H2及びC_H3ならびにヒンジ領域は、スイッチ領域の下流の容易に識別可能なヌクレオチド範囲に存在している。

【0119】

IgG1のC_H1ドメインをコードする機能的ヌクレオチド配列を欠いているがヒンジ領域を含んでいる遺伝子改変された非ヒト動物（例えばマウス）を、当該分野では公知の方法を用いて作製することができる。例えば、IgG1遺伝子を、C_H1ドメインを欠いているがヒンジを含む短縮型IgG1によって置き換えるターゲティングベクターが作製され得る。一例では、内在性C_H1ドメインの上流側の配列を含み、続いて、IgG1ヒンジ、IgG1C_H2ドメイン、IgG1C_H3ドメイン、薬剤選択カセット（例えば、lox⁺耐性遺伝子）、及びIgG1膜貫通ドメインをコードする核酸配列を含んだ5'（ゲノムIgG1遺伝子の転写方向に対して）相同性アームと、膜貫通ドメインに対して下流側の配列を含む3'相同性アームとを有するターゲティングコンストラクトに

よって、マウスゲノムを標的とする。該遺伝子座で相同組換えが起こり、(例えば、Cre処理によって)薬剤選択カセットが除去されると、内在性IgG1は、CH1ドメインを欠いているIgG1によって置き換えられる(図3)(IgG1-CH1;I)。一部の実施形態では、IgG1を発現する得られた遺伝子座の構造は、ヒンジ配列と融合されたJ領域配列を有する。

【0120】

IgG1のCH1ドメインをコードしているヌクレオチド配列を欠いており、ヒンジ領域をコードしているヌクレオチド配列を欠いている遺伝子改変された非ヒト動物(例えば、マウス)を、当該分野では公知の方法によって作製することができる。例えば、IgG1遺伝子を、CH1ドメインをコードしている配列を欠いており、ヒンジ領域をコードしている配列を欠いている短縮型IgG1によって置き換えるターゲティングベクターが作製され得る。別の実施形態では、マウスゲノムは、内在性CH1ドメインの上流側の配列を含み、続いて、IgG1-CH2ドメイン、IgG1-CH3ドメイン、薬剤選択カセット(例えば、lox耐性遺伝子)、及びIgG1膜貫通ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む5'(ゲノムIgG1遺伝子の転写方向に対して)相同性アームと、該膜貫通ドメインに対して下流側の配列を含む3'相同性アームとを有するターゲティングコンストラクトによってターゲティングされる。該遺伝子座で相同組換えが行われ、薬剤選択カセットが除去(例えば、Cre処理によって)されると、内在性IgG1遺伝子はCH1ドメインをコードしている配列を欠いているIgG1遺伝子によって置き換えられる(図3)(IgG1-CH1&ヒンジ;II)。一部の実施形態では、得られた遺伝子座の構造は、CH2ドメインに融合されたJ領域配列を有するIgG1を発現する。

【0121】

1つ以上の他のIgGアイソタイプ、例えば、IgG2b及びIgG2a/IgG2c、及びまたは1つ以上の他のIgアイソタイプ、例えば、IgD、IgA、及び/またはIgEを欠失させ、これらのアイソタイプをコードする配列を欠失させるか機能的に無効にすることによって、IgG1-CH1配列を欠いている(IgG1-CH1)か、またはIgG1-CH1配列を欠き且つヒンジを欠いている(IgG1-CH1&ヒンジ)遺伝子改変された非ヒト動物(例えば、マウス)を更に改変して、該改変されたIgG1アイソタイプを使用することに好都合であるようにすることができる。例えば、内因性ヒンジ領域配列の上流側(または内因性CH1ドメイン配列の上流側)の配列、IgG1-CH2及びCH3ドメインをコードする配列、薬剤選択カセット、続いてIgG1膜貫通ドメインをコードする配列、続いて所望であれば別の薬剤選択カセットを含む5'相同性アームと、IgG2a/c遺伝子に対して下流側の配列を含む3'相同性アームとを有するターゲティングコンストラクトを作製する。該遺伝子座で相同組換えが起こり、薬剤選択カセット(複数可)が除去(例えば、Cre処理によって)されると、内因性重鎖定常遺伝子座は、2つのみのIgG遺伝子を含む:内因性IgG3及びIgG1-CH1またはIgG1-CH1&ヒンジ(図3)(IgG1-CH1-IgG2b/2a;IIIまたはIgG1-CH1&ヒンジ-IgG2b/2a;IV)。

【0122】

上記のように操作した動物を、重鎖遺伝子座のIgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgD、IgA、及び/またはIgE遺伝子セグメントにおいて欠失または不活性化変異を含むように、更に改変してもよい。例えば、重鎖遺伝子座の定常領域遺伝子配列を欠失させるターゲティングベクターが作製され得る。一例では、内在性IgMドメインの上流側の配列、続いて薬剤選択カセット(例えば、lox耐性遺伝子)をコードするヌクレオチド配列を含む5'(ゲノム定常領域遺伝子配列の転写方向に対して)相同性アームと、IgA遺伝子セグメントの下流側の配列を含む3'相同性アームとを有するターゲティングコンストラクトによって、マウスゲノムを標的とする。該遺伝子座で相同組換えが起こり、薬剤選択カセットが除去(例えば、Cre処理によって)されると、内在性定常領域は欠失され且つ/または選択可能なマーカーによって置き換えられる(図4C)。ターゲティングベクターを用いて該動物を更に改変し、IgM遺伝子セグメント

及び機能的 C_H1 ドメイン配列を欠き且つ場合によっては機能的ヒンジ領域を欠いている $IgG1$ 遺伝子を再導入することができる。(図4D)。一例では、選択可能なマーカー遺伝子の上流側の配列、続いて完全な IgM 定常領域及び機能的 C_H1 ドメインを欠き且つ場合によっては機能的ヒンジを欠いている $IgG1$ 定常領域をコードするヌクレオチド配列、薬剤選択カセット(例えば、 $loxP$ 耐性遺伝子)を含む5' 相同性アームと、該選択可能なマーカー遺伝子に対して下流側の配列を含む3' 相同性アームを有するターゲットイングコンストラクトによって、動物のゲノムを標的とする。該遺伝子座で相同組換えが起こり、薬剤選択カセットが除去(例えば、 Cre 処理によって)されると、 IgM 遺伝子セグメント及び機能的 C_H1 ドメイン配列を欠き且つ場合によっては機能的ヒンジ領域を欠いている $IgG1$ 遺伝子を再導入する。(図3)($IgG1$ C_H1 $IgG2b/2a$ $IgG3$ $IgD/A/E$ (場合によっては ヒンジ); V)。内在性免疫グロブリン遺伝子座のその他の操作、例えば、種々の非 IgM 免疫グロブリンアイソタイプの C_H1 領域(複数可)の欠失または不活性化変異も提供する。

【0123】

適した定常領域コンストラクトを設計することによって、非 IgM 免疫グロブリン定常領域の C_H1 ドメインに、場合によってはヒンジに欠失または不活性化を導入し、上記のような相同性組換えにより遺伝子座に前記コンストラクトを導入する遺伝子操作に加え、非 IgM C_H1 における欠失または不活性化は、当該分野では公知の他の方法(例えば、抗原免疫化時のみにマウスにおいて誘導される条件付き非 IgM C_H1 欠失など)によって行うこともできる。遺伝子座の条件付き不活性化方法は当該分野では公知である。

【0124】

上記のような重鎖遺伝子座の遺伝子改変には、内在性重鎖可変遺伝子セグメント(例えば、 V_H 遺伝子セグメント、 D_H 遺伝子セグメント及び/または J_H 遺伝子セグメント)の1つ以上、実質的に全て、または全てを、(a)ヒトイディオタイプを有する結合タンパク質をコードするために再構成され得るか、または再構成を受けることができる、ヒト V_H 遺伝子セグメント、 D_H 遺伝子セグメント及び/または J_H 遺伝子セグメント、(b)機能的 C_H1 ドメインを欠いている重鎖定常領域に連結された軽鎖可変領域を有する免疫グロブリンポリペプチド鎖、例えば V_L 単ドメイン結合タンパク質(例えば軽鎖可変領域を含んでいる単ドメイン抗原結合タンパク質)をコードするように再構成されてもよい、または再構成を受けることができる軽鎖可変遺伝子セグメント、例えば、軽鎖 V 遺伝子セグメント及び/または軽鎖 J 遺伝子セグメント、または(c)機能的 C_H1 ドメインを欠いている重鎖定常領域に連結されたヒト軽鎖可変領域を有する免疫グロブリンポリペプチド鎖、例えば V_L 単ドメイン結合タンパク質(例えば、ヒトイディオタイプを有するヒト軽鎖可変領域を含んでいる単ドメイン抗原結合タンパク質)をコードするように再構成されてもよい、または再構成を受けることができるヒト軽鎖可変遺伝子セグメント(例えば、ヒト軽鎖 V 遺伝子セグメント及び/またはヒト軽鎖 J 遺伝子セグメント)によって置き換えることを更に含んでもよい。

【0125】

図14にはマウス重鎖及びヒト 軽鎖遺伝子座の略図(縮尺は正確ではない)を示し、マウス遺伝子座の約200個の重鎖可変(V_H)遺伝子セグメント、13個の重鎖多様性(D_H)遺伝子セグメント及び4個の重鎖連結(J_H)遺伝子セグメント、ならびにエンハンサー(Enh)及び重鎖定常(C_H)領域、ならびにヒト 遺伝子座の約76個の V 遺伝子セグメント、5個の J 遺伝子セグメント、イントロンエンハンサー(Enh)及び単一の定常領域(C)を示している。

【0126】

図15には、相同性組換えを行って mV_H 、 mD_H 及び mJ_H 遺伝子セグメントのターゲットイングされた欠失を通して内在性マウス重鎖遺伝子座を不活性化させることによって改変された、ヒト 遺伝子セグメントのネズミ重鎖遺伝子座への挿入の略図を示している(縮尺は正確ではない)。図15に示すように、当該分野では公知の標準的な分子技術を用いることにより、別個の4つのターゲットイングベクターを用いてヒト V 遺伝子セグメ

10

20

30

40

50

ント及びヒトJ 遺伝子セグメントを不活性化されたマウス重鎖遺伝子座に連続的に挿入することができる。該4つのターゲティングコンストラクトを操作するのに用いたヒト遺伝子セグメントは、生殖系列のヒト 軽鎖遺伝子座の近位コンティグに天然に見い出され得る。

【0127】

遺伝子操作により再構成された軽鎖を含む遺伝子的に改変されたマウスは、当該分野では公知の任意の方法によって作製することができる。例えば、内在性軽鎖遺伝子座の再構成されていない内在性軽鎖可変V及びJ遺伝子セグメントを単一の再構成されたV：J遺伝子によって置き換えるか、再構成されていない軽鎖遺伝子座全体を軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成されたV：J遺伝子を含む遺伝子操作された軽鎖遺伝子座によって置き換える、ターゲティングベクターを作製することができる。

10

【0128】

別の態様では、本明細書に記載の非ヒト動物は、ADAM6 (ADAM6 a及び/またはADAM6 b) をコードする異所性ヌクレオチド配列、その機能的断片、ホモログまたはオルソログを含むように更に操作される。一部の実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物の重鎖遺伝子座は、マウスADAM6 (ADAM6 a及び/またはADAM6 b) をコードする異所性ヌクレオチド配列、その機能的断片、ホモログまたはオルソログを含むように更に操作される。種々の実施形態では、該ADAM6タンパク質は非ヒト雄動物において機能的である。係る非ヒト動物を操作する方法及び組成物については、例えば、参照により本明細書に援用される、米国特許第8,642,835号に記載されている。

20

【0129】

一部の実施形態では、上記及び他の遺伝子改変動物は、適切なターゲティングコンストラクトを(1回以上の独立したターゲティングで)適切な動物ES細胞内に導入することにより作製され、該ターゲティングコンストラクトのマーカーまたは選択カセットを含む陽性クローンを確認し、増殖させる。次いで、該クローンを宿主胚において、キメラ動物または完全ES細胞由来動物の作製に適した条件下でドナーES細胞として使用する。該マーカーまたは選択カセットは、ES細胞の段階のまたはキメラもしくはES細胞由来マウスのいずれかにおいて、例えば、loxedカセットを用い、Cre含有系統と交配するか、またはES細胞をCre発現ベクターでエレクトロポレーションすることにより、場合によっては除去してもよい。したがって、一部の実施形態では、該遺伝子改変は該動物の生殖系列で行われる。

30

【0130】

一部の実施形態では、本明細書に記載の動物の作製方法は、単ドメイン抗原結合タンパク質を産生することのできる第1の動物(例えば、機能的C_H1ドメインを欠いているIgG重鎖遺伝子座をその生殖系列に含む第1の動物)を、遺伝子操作された再構成された軽鎖を産生することのできる第2の動物(例えば、軽鎖定常領域に作動可能に連結される単一の再構成されたV：J可変領域を有する遺伝子操作された軽鎖遺伝子座をその生殖系列に含む第2の動物)と交雑させてF1遺伝子操作動物を作製することを含み、ここで、該F1動物は、第1の動物のIgG重鎖遺伝子座及び第2の動物の軽鎖遺伝子座を含む。該交雑は、動物交配、あるいは、in vitro操作など、それ以外の配偶子の組み合わせによって行われてもよい。

40

【0131】

適切に遺伝子改変可能なES細胞が容易に入手できない非ヒト動物の場合、本明細書に記載の方法とは異なる方法を利用して、該遺伝子改変を含む非ヒト動物を作製する。係る方法には、例えば、非ES細胞ゲノム(例えば、線維芽細胞または誘導多能性細胞)を改変すること、及び核移植を利用して、改変ゲノムを適切な細胞(例えば、卵母細胞)へ移植し、胚を形成するのに好適な条件下で、改変細胞(例えば、改変された卵母細胞)を非ヒト動物内で懐胎させることが挙げられる。

【0132】

単ドメイン抗原結合タンパク質の作製

50

一旦、単ドメイン抗原結合タンパク質及び／または遺伝子操作された単一の再構成された軽鎖を産生することができる遺伝子操作された動物が得られると、ある抗原に対する免疫グロブリンと結合タンパク質調製物は、該動物にその抗原によって免疫することによって容易に得られる。本明細書で用いられる場合「ポリクローナル抗血清組成物」には、親和性精製されたポリクローナル結合タンパク質調製物を含む。

【0133】

一態様では、(a) 本明細書に記載の非ヒト動物にある抗原で免疫すること、(b) 非ヒト動物にとって結合タンパク質を作るのに十分な条件下に該非ヒト動物を維持すること、(c) 機能的C_H1ドメインを欠いている且つ／または機能的ヒンジ領域を欠いているマウスによって作られた結合タンパク質を特定すること、及び(d) 該結合タンパク質、該結合タンパク質を作る細胞、または該結合タンパク質の配列をコードするヌクレオチド配列を該非ヒト動物から単離することを含む、C_H1ドメインを欠いている結合タンパク質の作製方法を提供する。

10

【0134】

種々の抗原を用いてトランスジェニック動物に免疫することができる。係る抗原には、限定するものではないが、細胞タンパク質、微生物、例えば、ウイルス及び単細胞生物(細菌及び真菌類など)(生きている、弱っているまたは死滅した)、該微生物の断片あるいは該微生物から単離した抗原または分子が挙げられる。

【0135】

該抗原は、アジュバントとともに、またはアジュバントなしで、任意の便利な方法でトランスジェニック動物に投与することができ、所定のスケジュールに従って投与することができる。

20

【0136】

モノクローナル結合タンパク質を作製するために、免疫したトランスジェニック動物から脾細胞を単離し、ハイブリドーマ精製のために軽質転換細胞株との細胞融合に用いるか、あるいは、標準的な分子生物学的技術により、抗体をコードするcDNAをクローニングし、トランスフェクト細胞に発現させる。モノクローナル抗体の作製手順は当該分野で確立されている。例えば、欧州特許出願第0 583 980 A1号(「Method For Generating Monoclonal Antibodies From Rabbits」)、米国特許第4,977,081号(「Stable Rabbit-Mouse Hybridomas And Secretion Products Thereof」)、WO97/16537(「Stable Chicken B-cell Line And Method of Use Thereof」)、及びEP0 491 057 B1(「Hybridoma Which Produces Avian Specific Immunoglobulin G」)を参照されたく、その開示は参照により本明細書に援用されている。クローニングしたcDNA分子からのモノクローナル抗体のin vitro作製方法については、Andris-Widhopfらの「Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display」, J Immunol Methods 242:159(2000)、及びBurton, D. R. 「Phage display」, Immunotechnology 1:87(1995)に記載がある。

30

40

【0137】

一旦、モノクローナル単ドメイン抗原結合タンパク質が生成されると、所望であれば、標準的な分子生物学的技術を用いて係る結合タンパク質を完全ヒト結合タンパク質に容易に転換することができる。完全ヒトモノクローナル結合タンパク質は、ヒトでは免疫原性ではなく、ヒト対象の治療的処置用に適している。

【0138】

したがって、単ドメイン抗原結合タンパク質がヒトV_HまたはヒトV_L領域、及び非IgM C_H1ドメインにおいて欠失または不活性化変異を含んでいるマウス重鎖定常領

50

域を含む一実施形態では、単一ドメイン抗原結合タンパク質の V_H または V_L ドメインの配列は、場合によっては、適切な細胞（例えば、抗体発現に典型的な細胞、例えば、真核細胞、例えば、CHO細胞）に発現させられることができる完全ヒト単一ドメイン抗原結合タンパク質をコードする発現コンストラクトが得られる適切な発現ベクターに C_H1 ドメインを欠いているヒト定常領域の上流側にクローニングされ得る。

【0139】

したがって、本明細書では、本明細書に開示するように遺伝子改変された動物由来のモノクローナル結合タンパク質産生細胞、及び該細胞に由来する核酸も提供する。該細胞由来のハイブリドーマも提供する。完全ヒト単一ドメイン結合タンパク質、ならびにそれに由来するコード核酸も提供する。

10

【0140】

本明細書に記載した単一ドメイン抗原結合タンパク質を用いて、二重特異性抗体を作製してもよい。本明細書に記載の単一ドメイン抗原結合タンパク質の一利点は、単一の治療薬において、異なる2種のエピトープに対して特異性を有する重鎖をヘテロ二量体化することによって二重特異性抗体を作製することができることにある。

【実施例】

【0141】

以下の実施例は、本発明の方法及び組成物を作製、使用する方法を当業者に説明するために提供され、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定しようとするものではない。使用する数（例えば、量、温度等）に関して正確性を保証するように努めたが、多少の実験誤差及びずれがあることを考慮されたい。以下の実施例には当業者には公知であろう従来方法（分子クローニング法等）の詳細な説明は含まない。

20

【0142】

実施例1： V_H 単一ドメイン結合タンパク質をコードするマウス：重鎖可変領域、及び機能的 C_H1 ドメインを欠いている重鎖定常領域を有する免疫グロブリン鎖を含み、且つ単一の再構成された軽鎖（ U_LC ）を含むマウス

実施例1.1：動物の作製

参照により本明細書に援用されるMacdonaldらのUS2011/0145937に記載の方法に従って、完全で機能的なIgM遺伝子配列、及び機能的 C_H1 遺伝子配列を欠き、場合によっては機能的ヒンジ領域を欠いているIgG1遺伝子配列を含む重鎖遺伝子座を含むように遺伝子改変されたマウス（図1A）を作製した。種々の組み合わせの重鎖定常遺伝子配列を欠き、 C_H1 ドメイン（複数可）の欠失を含むが、完全で機能的なIgMを含んだマウスのいくつかのバージョンを作製した（図3）。例えば、マウス重鎖可変遺伝子セグメント、及び完全で機能的なIgM遺伝子配列、及び、機能的 C_H1 遺伝子配列及びヒンジ領域を欠いているIgG1遺伝子配列を含んだ重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ mV_H IgG1 C_H1 & ヒンジ；1576HO、図3及び4Bの「II」）を作製した。更に、ヒト重鎖可変遺伝子セグメント、及び完全で機能的なIgM遺伝子配列、機能的な C_H1 遺伝子配列及びヒンジ領域を欠いているIgG1遺伝子配列を含み、且つIgG2b及びIgG2a遺伝子配列を欠いている重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ hV_H IgG1 C_H1 & ヒンジ IgG2b/2a；1859HO、例えば、図3の「IV」を参照）を作製した。更に、ヒト重鎖可変遺伝子セグメント及び完全で機能的なIgM遺伝子配列、機能的な C_H1 遺伝子配列を欠いたIgG1遺伝子配列を含み、且つIgG2b及びIgG2a遺伝子配列を欠いている重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a；1673HO、例えば、図3及び4Aの「III」を参照）を作製した。更に、ヒト重鎖可変遺伝子セグメント及び完全で機能的なIgM遺伝子配列、機能的 C_H1 を欠いたIgG1遺伝子配列を含み、且つIgD、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgE、及びIgA遺伝子配列を欠いている重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a IgG3 IgD/A/E；6180HO、図3及び4C~Dの「V」を参照）を作製した。重鎖定常領域の改変の追加の例示のバージョンを図3に示す。 C_H

30

40

50

1 欠失 / 不活性化及び / または免疫グロブリン定常遺伝子欠失 / 不活性化の組み合わせの他の変形例を作成する。例えば、I g G 1 及び I g G 2 a の両方が C_H 1 ドメイン欠失を含んでいるマウスを作製し、該マウスはまた、I g D、I g E、I g G 3、及び I g G 2 b の欠失も含む。図 4 に示すように、重鎖遺伝子座は、ヒト可変領域（ヒト重鎖可変領域またはヒト軽鎖可変領域でもよい）を含むように改変することもできる（図 1 6、以下の実施例 2 及び 3 を参照）。重鎖遺伝子座は A d a m 6 a 遺伝子、A d a m 6 b 遺伝子、またはその両方、あるいは該遺伝子の断片を含むように改変することもでき、ここで、該遺伝子またはその断片は雄マウスにおいて機能的である（例えば、参照により本明細書に援用される U . S . 2 0 1 2 / 0 3 2 2 1 0 8 を参照）。

【 0 1 4 3 】

単一の再構成された可変遺伝子配列 V : J を含む共通軽鎖マウス（ユニバーサル軽鎖または U L C マウスとも呼ぶ）（例えば、V 1 - 3 9 J 5 または V 3 - 2 0 J 1 共通軽鎖マウス）の作製及び同マウスにおける抗原特異的抗体の作製については、例えば、米国特許出願第 1 3 / 0 2 2 , 7 5 9 号、第 1 3 / 0 9 3 , 1 5 6 号、第 1 3 / 4 1 2 , 9 3 6 号、第 1 3 / 4 8 8 , 6 2 8 号、第 1 3 / 7 9 8 , 3 1 0 号、及び第 1 3 / 9 4 8 , 8 1 8 号（それぞれ米国特許公開番号 2 0 1 1 / 0 1 9 5 4 5 4、2 0 1 2 / 0 0 2 1 4 0 9、2 0 1 2 / 0 1 9 2 3 0 0、2 0 1 3 / 0 0 4 5 4 9 2、U S 2 0 1 3 0 1 8 5 8 2 1、及び U S 2 0 1 3 0 3 0 2 8 3 6）に記載されており、その各々を参照により全体として本明細書に援用する。具体的には、遺伝子操作された V 1 - 3 9 J 5 カッパ軽鎖（1 6 3 3 H O または 1 6 3 4 H O）または遺伝子操作された V 3 - 2 0 J 1 カッパ軽鎖（1 6 3 5 H O または 1 6 3 6 H O）をその生殖系列に発現するマウスを作製した。

【 0 1 4 4 】

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域（U L C V 1 - 3 9 J 5 ; 1 6 3 3 または 1 6 3 4）または（U L C V 3 - 2 0 J 1 ; 1 6 3 5 または 1 6 3 6）を含む V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスを、改変された I g G 定常領域を担持するマウスと交配した。具体的には、係る U L C マウスを、I g G 1 C_H 1 及び I g G 1 ヒンジ領域が欠失または不活性化されたネズミ重鎖定常領域に作動可能に連結されるネズミ重鎖可変領域を有するマウス（m V_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジ 1 5 7 6）、I g G 1 C_H 1 及び I g G 1 ヒンジ領域ならびに I g G 2 a 及び I g G 2 b 遺伝子が欠失または不活性化されたネズミ重鎖定常領域に作動可能に連結されるヒト重鎖可変領域を有するマウス（h V_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジ I g G 2 b / 2 a ; 1 8 5 9）、I g G 1 C_H 1 領域ならびに I g G 2 a 及び I g G 2 b 遺伝子が欠失または不活性化されたネズミ重鎖定常領域に作動可能に連結されるヒト重鎖可変領域を有するマウス（h V_H I g G 1 C_H 1 I g G 2 b / 2 a ; 1 6 7 3）、または I g G C_H 1 領域ならびに I g G 2 a 及び I g G 2 b、I g D、I g G 3、I g A、及び I g E 遺伝子が欠失または不活性化されたマウス重鎖定常領域に作動可能に連結されるヒト重鎖可変領域を有するマウス（h V_H I g G 1 C_H 1 I g G 2 b / 2 a I g G 3 I g D / A / E ; 6 1 8 0）と交配して以下の後代マウスを得た。

【 0 1 4 5 】

m V_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジ x V 3 - 2 0 J 1 U L C または m V_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジ x V 1 - 3 9 J 5 U L C ホモ接合マウス（1 5 7 6 H O 1 6 3 5 H O または 1 5 7 6 H O 1 6 3 3 H O）、

【 0 1 4 6 】

h V_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジ I g G 2 b / 2 a x V 3 - 2 0 J 1 U L C または h V_H I g G 1 C_H 1 & ヒンジ I g G 2 b / 2 a x V 1 - 3 9 J 5 U L C ホモ接合マウス（1 8 5 9 H O 1 6 3 5 H O または 1 8 5 9 H O 1 6 3 3 H O）、

【 0 1 4 7 】

h V_H I g G 1 C_H 1 I g G 2 b / 2 a x V 3 - 2 0 J 1 U L C また

10

20

30

40

50

は hV_H IgG1 C_H1 IgG2b/2a $\times V_{1-39J5}$ ULCホモ接合マウス (1673HO 1635HO または 1673HO 1633HO)、及び
【0148】

hV_H IgG1 C_H1 & ヒンジ IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E $\times V_{3-20J1}$ ULC または hV_H IgG1 C_H1 & ヒンジ IgG2a/2b IgG3 IgD/A/E $\times V_{1-39J5}$ ULCホモ接合マウス (6180HO 1635HO または 6180HO 1634HO)。
【0149】

C_H1 ドメインにおける欠失または不活性化変異及び免疫グロブリン定常領域遺伝子における欠失または不活性化変異を含むマウスの他のバージョンを、上記の単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を含むマウスと交配した。

10

【0150】

実施例 1.2: 抗原によるマウスの免疫及び単ドメイン結合タンパク質の発現

異なる抗原を用いて改変についてホモ接合性のマウスに免疫し、種々のアジュバントを用い、様々な経路により追加免疫した。IgG1 特異的応答の力価を ELISA または ウエスタンブロットにより評価した。

【0151】

図 5A に示すように、IgG1 C_H1 / ヒンジ 及び ULC 改変の両方についてホモ接合性のマウスは、IgG1 C_H1 のみを有するマウスと比較して、免疫化の前後両方で、血清中の IgG1 の総量の増加した発現を示す。 C_H1 / ヒンジ \times ULC マウスでは力価が高いことから、ユニバーサル軽鎖が存在すると、抗原特異的単ドメイン抗原結合タンパク質を産生する可能性が高くなることが示唆される。図 5B。

20

【0152】

図 7 は、 C_H1 及び ULC 改変を含むように遺伝子操作された種々のバージョンのマウスを用いると、高い力価が得られる可能性があることを示す。

【0153】

更に、図 6 及び 8 は単ドメイン抗原結合タンパク質が存在し、 C_H1 領域において欠失を有するヒト重鎖可変領域及び単一の再構成された軽鎖 (ユニバーサル軽鎖) の両方を含んだマウスから単離され得ることを示している。

【0154】

30

実施例 1.3: 単ドメイン結合タンパク質及び単一の再構成された軽鎖 (ULC) を発現するマウスにおける B 細胞発生及び成熟

本明細書に示す種々の細胞表面マーカーのフローサイトメトリーを用いて、B 細胞発生及び B 細胞成熟の進行について、改変された C_H1 ドメイン及び単一の再構成された軽鎖 (ULC) (図 2 を参照) についてホモ接合性のマウスからの脾臓、血液及び骨髓コンパートメントの B 細胞含有物を分析した。

【0155】

要約すると、ULC マウス及び改変された C_H1 ドメイン及び再構成された軽鎖についてホモ接合性のマウスを殺処分し、血液、脾臓、及び骨髓を採取した。EDTA が入っているマイクロテイナーチューブ (BD Biosciences) に血液を採取した。完全 RPMI 培地 (ウシ胎仔血清、ピルビン酸ナトリウム、HEPES と 2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、及びゲンタマイシンを補充した RPMI 培地) フラッシュすることにより大腿骨から骨髓を採取した。脾臓及び骨髓調製物からの赤血球 (RBC) を ACK 溶解緩衝液 (Lonza Walkersville) で溶解し、その後、完全 RPMI 培地で洗浄した。

40

【0156】

細胞 (1×10^6 個) を抗マウス CD16 / CD32 (2.4G2、BD) と氷上で 10 分間培養し、次に、次の抗体を用いて氷上で 30 分間標識した: APC-H7 コンジュゲート抗マウス CD19 (クローン 1D3、BD)、Pacific Blue コンジュゲート抗マウス CD3 (クローン 17A2、BIOLEGEND (登録商標))、PeC

50

y7 - IgM (II/41、EBIOSCIENCE (登録商標))、PerCP - Cy5.5 - IgD (11 - 26c.2a、BIOLEGEND (登録商標))、APC - eFluor 780 - B220 (RA3 - 6B2、EBIOSCIENCE (登録商標))、APC - CD19 (MB19 - 1、EBIOSCIENCE (登録商標))、PE - CD93 (AA4.1、BIOLEGEND (登録商標))、FITC - CD23 (B3B4、BD)、APC - CD21 / CD35 (7G6、BD)。骨髄：未成熟B細胞 (B220^{int} IgM⁺)、成熟B細胞 (B220^{hi} IgM⁺)。血液及び脾臓：B細胞 (CD19⁺)、成熟B細胞 (CD19⁺ IgM^{int} IgD^{hi})、移行 / 未成熟B細胞 (CD19⁺ IgM^{hi} IgD^{int})。

【0157】

10

染色後、細胞を洗浄し、2%ホルムアルデヒド中に固定した。データ収集は、LSRI フローサイトメータ上で実施し、FLOWJO (商標) ソフトウェア (Tree Star, Inc.) で分析した。図9はそれらのマウスが正常な血清定常状態のIgMレベル及びIgGレベルを有していることを示している。図10及び11は脾臓コンパートメントの結果を示しており、脾臓にはほぼ正常なB細胞数及びほぼ正常なB細胞成熟化があることが分かる。図12及び13は、骨髄コンパートメントの結果を示しており、骨髄には正常なB細胞数及びほぼ正常なB細胞発達があることが分かる。

【0158】

実施例2：V_L 単ドメイン結合タンパク質をコードするマウス：軽鎖可変領域、及び機能的C_H1ドメインを欠いている重鎖定常領域を有する免疫グロブリン鎖を含むマウス

20

実施例2.1：動物の生成

軽鎖遺伝子セグメントを重鎖遺伝子座に導入したマウスは米国特許出願公開第2012/0096572号に記載のように生成した。具体的には、VELOCI GENE (登録商標) 遺伝子工学技術を用いてマウスゲノムのバクテリア人工染色体 (BAC) ライブラリーを改変して、種々のターゲティングコンストラクトを作製した (例えば、米国特許第6,586,251号及びValenzuela, D.M., Murphy, A.J., Friendewey, D., Gale, N.W., Economides, A.N., Auerbach, W., Poueymirou, W.T., Adams, N.C., Rojas, J., Yasenchak, J., Chernomorsky, R., Boucher, M., Elsassser, A.L., Esau, L., Zheng, J., Griffiths, J.A., Wang, X., Su, H., Xue, Y., Dominguez, M.G., Noguera, I., Torres, R., Macdonald, L.E., Stewart, A.F., DeChiara, T.M., Yancopoulos, G.D. (2003) "High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis", Nat Biotechnol 21, 652 - 659を参照)。相同組換えによりマウスBAC DNAを改変してV_H、D_H及びJ_H 遺伝子セグメントのターゲティングされた欠失を通して内在性マウス重鎖遺伝子座を不活性化し、続いて再構成されていないヒト生殖系列 軽鎖遺伝子配列を挿入した (図15の上)。

30

40

【0159】

要約すると、リコンビナーゼ媒介組換えを用いた2つの連続したターゲティングイベントによりマウス重鎖遺伝子座を欠失させた。第1のターゲティングイベントには、5'から3'にかけて5'マウス相同性アーム、リコンビナーゼ認識部位、ネオマイシンカセット及び3'相同性アームを含んでいるターゲティングベクターを用いたマウス重鎖遺伝子座の5'末端のターゲティングを含めた。5'及び3'相同性アームにはマウス重鎖遺伝子座の配列5'を含めた。第2のターゲティングイベントには、5'から3'にかけて5'マウス相同性アーム、5'リコンビナーゼ認識部位、第2のリコンビナーゼ認識部位、ハイグロマイシンカセット、第3のリコンビナーゼ認識部位、及び3'マウス相同性アームを含んだ第2のターゲティングベクターを用いたJ_H 遺伝子セグメント領域のマウス重

50

鎖遺伝子座の3'末端のターゲティングを含めた。5'及び3'相同性アームには、マウスJ_H遺伝子セグメントに隣接する配列、ならびにイントロンエンハンサー及び定常領域の5'を含めた。(上記のような)両ターゲティングベクターによりターゲティングされた改変重鎖遺伝子座を含む陽性ES細胞を核型分析によって確認した。次いで、二重にターゲティングされたES細胞からDNAを単離し、リコンビナーゼによる処理に供することにより、第1のターゲティングベクターの5'リコンビナーゼ認識部位と第2のターゲティングベクターの5'リコンビナーゼ認識部位との間のマウス重鎖遺伝子座のゲノムDNAの欠失を媒介し、2つのリコンビナーゼ認識部位により隣接される単一のリコンビナーゼ認識部位及びハイグロマイシンカセットを残した(図15の上を参照)。このようにしてインタクトなC_H遺伝子を含む改変されたマウス重鎖遺伝子座を作製し、図15に概説するようなターゲティングベクターを用いて正確な様式でヒト生殖系列遺伝子セグメントを順に挿入した。

10

【0160】

別個の4つのターゲティングベクターを操作して、40個のヒトV_H遺伝子セグメント及び5個のヒトJ_H遺伝子セグメントを(上記)不活性化されたマウス重鎖遺伝子座に順に挿入した(図15)。上記4つのターゲティングコンストラクトの操作に用いたヒト遺伝子セグメントは、生殖系列ヒト軽鎖遺伝子座の近位コンティグに天然に見出される(図14B)。

【0161】

係る改変された重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性のマウスを交配して上記重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスを得た。参照により本明細書に援用されるMacdonaldらの米国特許出願公開第US2011/0145937号に記載の方法を用い、図16に示したスキームに従って軽鎖可変領域遺伝子セグメントを有する係る改変された重鎖遺伝子座を含む胚性幹細胞をターゲティングして、軽鎖可変領域、及びIgG1遺伝子において機能的C_H1ドメインを欠き、更にIgG2b遺伝子及びIgG2a遺伝子を欠いている重鎖定常領域を含んでいる重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスを作製した

20

【0162】

このように、図16に記載のターゲティングベクターを用いて、例えばUS2012/0096572に記載の軽鎖可変領域遺伝子セグメントを含んでいる改変された重鎖遺伝子座マウスの生殖系列を更に改変して、重鎖遺伝子座を操作し、IgG1遺伝子セグメントが機能的C_H1ドメインを欠いているように、且つIgG2a遺伝子及びIgG2b遺伝子を欠失させてヒトカッパ可変ドメイン及びネズミIgG1定常領域を含んでいる単一ドメイン抗原結合タンパク質についてホモ接合性のマウスが得られるようにし、ここで、該IgG1定常ドメインは機能的C_H1領域を欠いている(hv IgG1 C_H1 IgG2a IgG2b; 6082HO)。C_H1欠失及び/または免疫グロブリン定常遺伝子欠失の組み合わせの追加の変形例を作製する。例えば、IgG1及びIgG2aの両方がC_H1ドメイン欠失を含むヒト軽鎖カッパ可変領域を含んでいる重鎖遺伝子座を含むマウスを作製し、該マウスはIgD、IgE、IgG3、及びIgG2bの欠失も含む。

30

【0163】

ウエスタンブロットにより軽鎖のみの単一ドメイン結合タンパク質が存在しており、ヒトカッパ可変ドメイン及びネズミIgG1定常領域を含むように遺伝子改変されたマウスから単離され得ることを確認し、ここで該IgG1定常ドメインは機能的C_H1領域を欠いている(6082HO、データは示さず)。

40

【0164】

実施例2.2: VL単一ドメイン結合タンパク質をコードする遺伝子配列の生産的な再構成の確認

(a)軽鎖可変領域と、IgG1遺伝子において機能的C_H1ドメインを欠き、且つ更にIgG2b遺伝子及びIgG2a遺伝子を欠いている重鎖定常遺伝子配列とを含んでいる重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウス、(b)対照野生型、及び(c)ヒト重鎖V、D及びJセグメントを発現し、IgG1遺伝子における機能的C_H1ドメインを欠き、

50

且つ機能的 I g G 2 b 及び I g G 2 a 遺伝子も欠き、且つ共通またはユニバーサル軽鎖とも呼ばれる単一の再構成された軽鎖遺伝子座（例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 9 5 4 5 4 号参照）を含む改変されたマウス重鎖遺伝子座について双方ホモ接合性の対照 C_H1 del x ULC マウスの脾臓及び骨髓から B 細胞の mRNA を単離した。T A Q M A N アッセイにおいて以下のプローブ及びプライマーを用いて、単離した mRNA の生産的な再構成を分析した：

h J k / m I g G 1 ヒンジ - セット 7 1 (B i o s e a r c h T e c h n o l o g i e s に注文)

(センス) 5' - G G A C C A A G C T G G A G A T C A A A C - 3' (配列番号 1)、

(アンチセンス) 5' - C T T C T G G G A C T G T A C A T A T G C A A - 3' (配列番号 2)、

(プローブ) 5' - F A M - C C C A G G G A T T G T G G T T G T A A G C C - B H Q 1 - 3' (配列番号 3)；

h J H / m I g G 1 ヒンジ - セット 7 2 (A p p l i e d B i o s y s t e m s に注文)

(センス) 5' - T G G T C A C C G T C T C C T C A G T G - 3' (配列番号 4)、

(アンチセンス) 5' - C A C A C G T G A C C T T A G G A G T C A G A G - 3' (配列番号 5)、

(プローブ) 5' - F A M - T G G T T G T A A G C C T T G C - M G B - 3' (配列番号 6)；

m H P R T 1 - セット 5 1 (B i o s e a r c h T e c h n o l o g i e s に注文)

(センス) 5' - C G A G T C T G A A G C T C T C G A T T T C C T - 3' (配列番号 7)、

(アンチセンス) 5' - C A G C C A A C A C T G C T G A A A C A T G - 3' (配列番号 8)、

(プローブ) 5' - F A M - C A G C A T C T A A G A G G T T T T G C T C A G T G G A - B H Q - 3 (配列番号 9)；

【 0 1 6 5 】

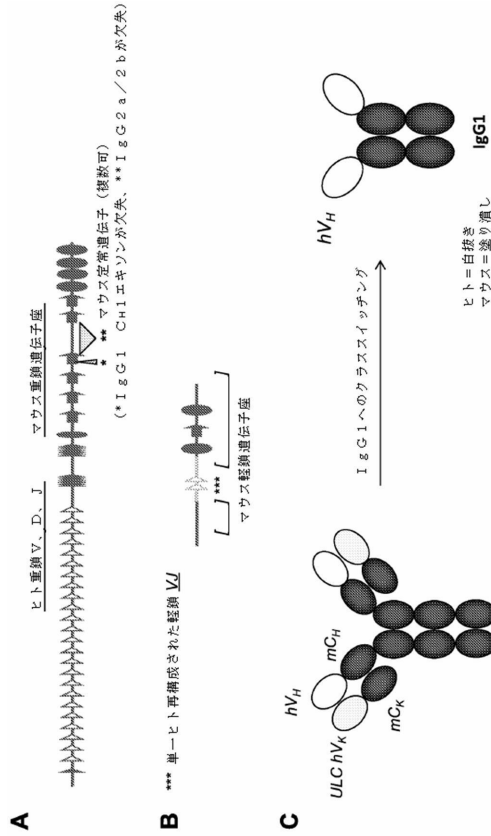
図 1 7 A 及び 1 7 B に示すように、内在性重鎖可変領域遺伝子セグメントを置き換える再構成されていない軽鎖可変領域遺伝子セグメントは、機能的 C_H1 ドメインを欠いている内在性重鎖定常 I g G 1 遺伝子による生産的な再構成を受けることができる。

【 0 1 6 6 】

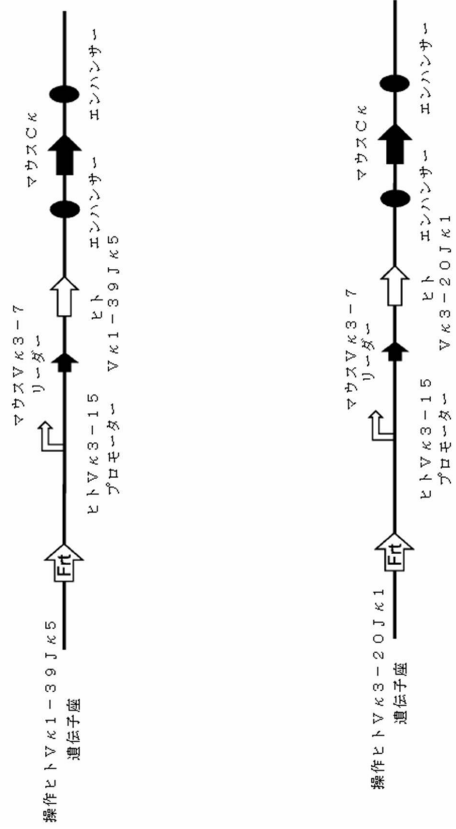
実施例 3：V_L 単一ドメイン結合タンパク質をコードするマウス：軽鎖可変領域、及び機能的 C_H1 ドメインを欠いている重鎖定常領域を有する免疫グロブリン鎖を含み且つ単一の再構成された軽鎖 (U_LC) を含むマウス

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を含んでいる V E L O C I M M U N E (登録商標) ヒト化マウス (U_LC V₃-20J₁；1635、あるいは、U_LC V₁-39J₅；1633 も使用する) を、I g G 1 C_H1 ドメイン、I g G 2 a 遺伝子及び I g G 2 b 遺伝子が欠失または不活性化されたネズミ定常領域に作動可能に連結されるヒト軽鎖カッパ可変領域を含んでいる改変された重鎖遺伝子座を担持するマウス (h V₁ I g G 1 C_H1 I g G 2 a / 2 b；6082) と交配して以下の後代マウスを得た：h V₁ I g G 1 C_H1 I g G 2 a / 2 b x V₃-20J₁ U_LC ホモ接合マウス (6082 H O 1635 H O)。これらのマウスは V_L 単一ドメイン結合タンパク質を発現した (図 1 8)。

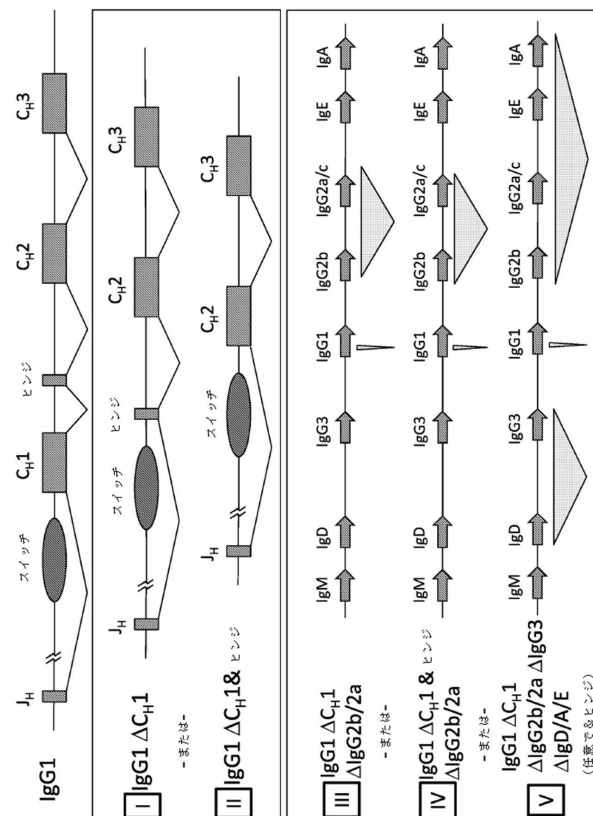
【図 1 A - C】



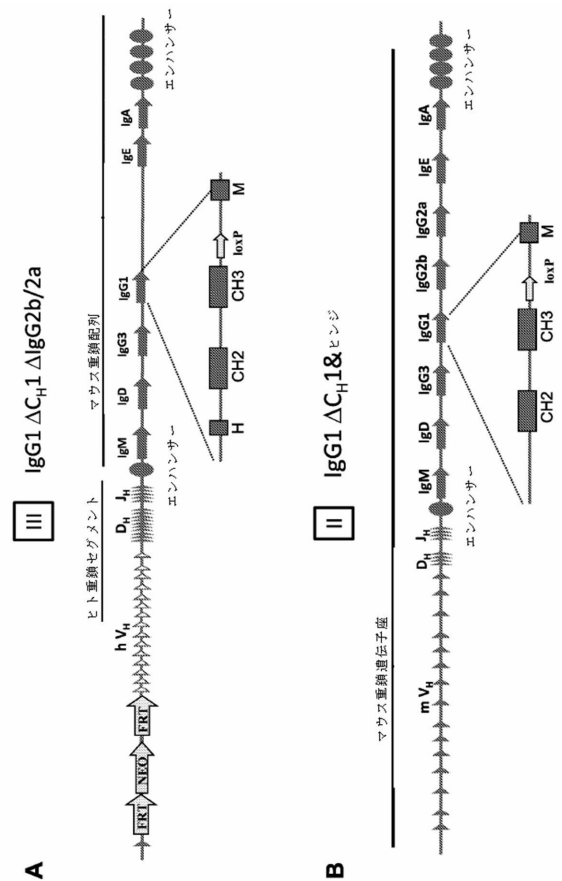
【図 2】



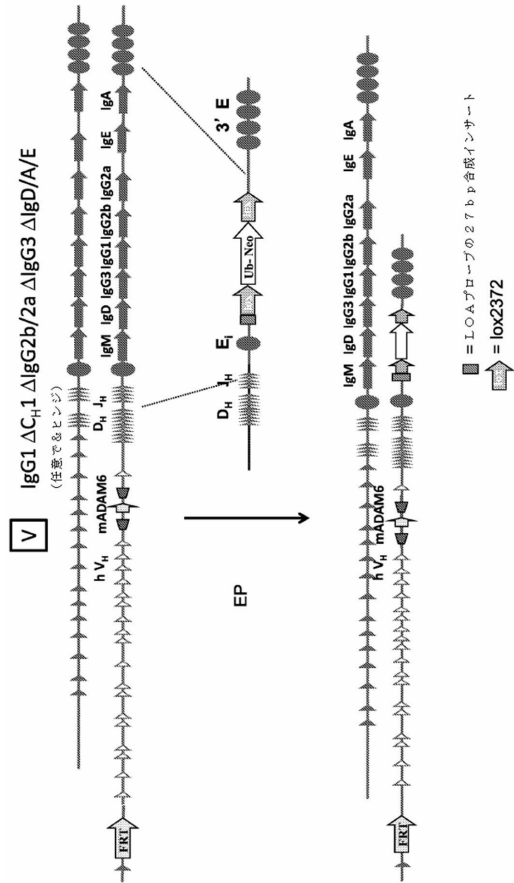
【図 3】



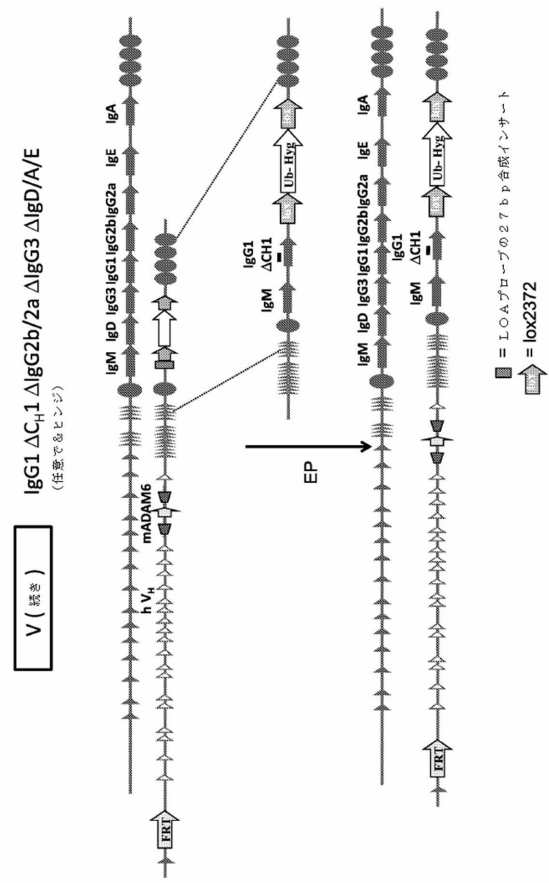
【図 4 A - B】



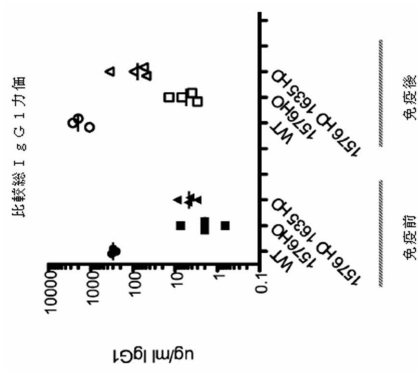
【図 4 C】



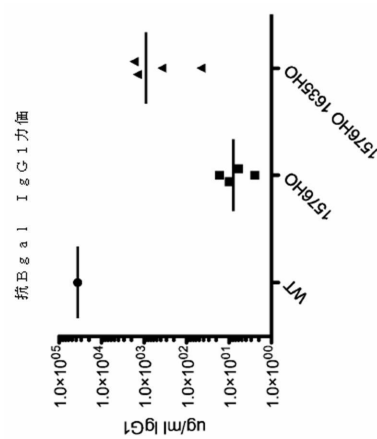
【図 4 D】



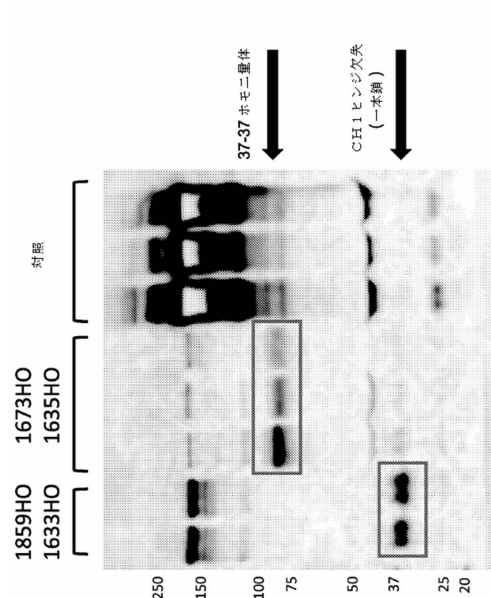
【図 5 A】



【図 5 B】

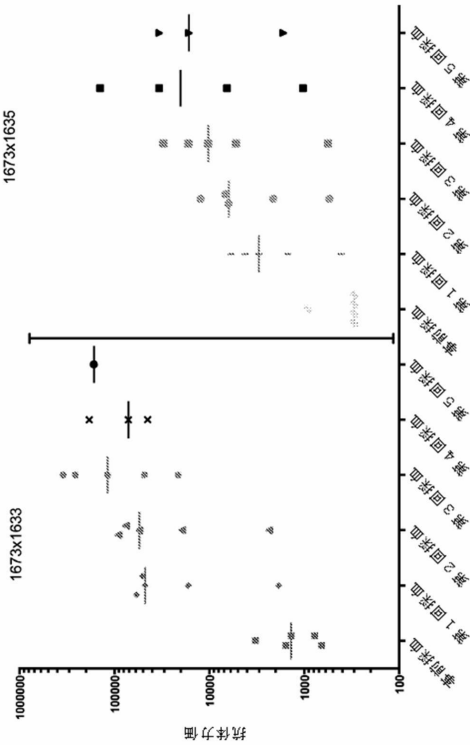


【図 6】

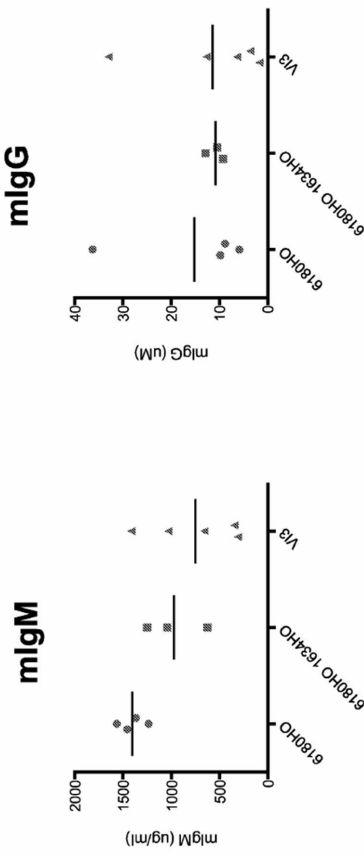


2 匹の 1859x1633 (IgG1 ΔC_H1 & Hinge $\Delta IgG2b/2a$ x ULC) HO マウス及び 3 匹の 1673x1635 (IgG1 ΔC_H1 $\Delta IgG2b/2a$ x ULC) HO マウスを用いた

【図 7】

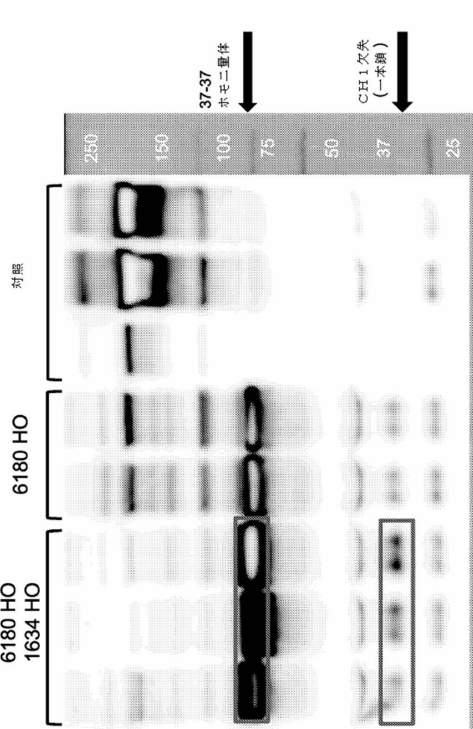


【図 9】



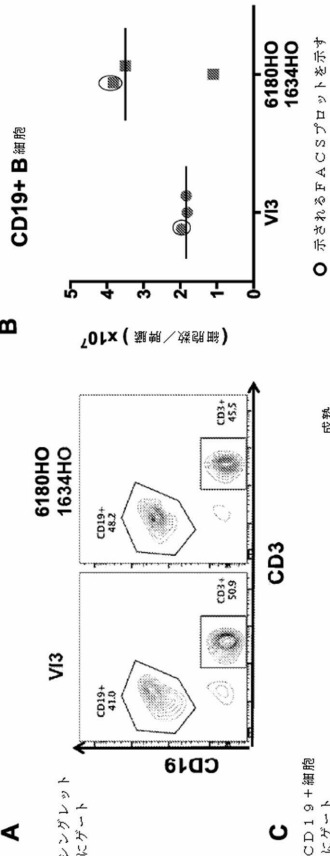
血清

【図 8】



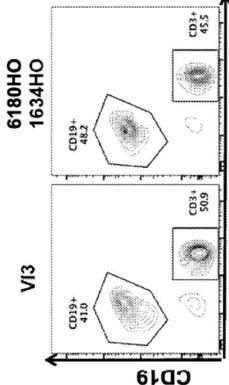
3匹の 6180x1634 (IgG1 ΔC_{H1}1 ΔIgG2b/2a ΔIgG3 ΔIgD/A/E x ULC) HO マウス及び2匹の 6180 (IgG1 ΔC_{H1}1 ΔIgG2b/2a ΔIgG3 ΔIgD/A/E) HO マウスを用いた

【図 10】



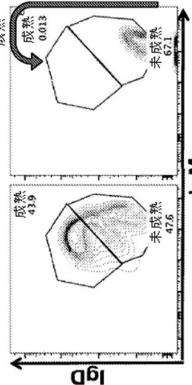
A

シングルレット
にゲート



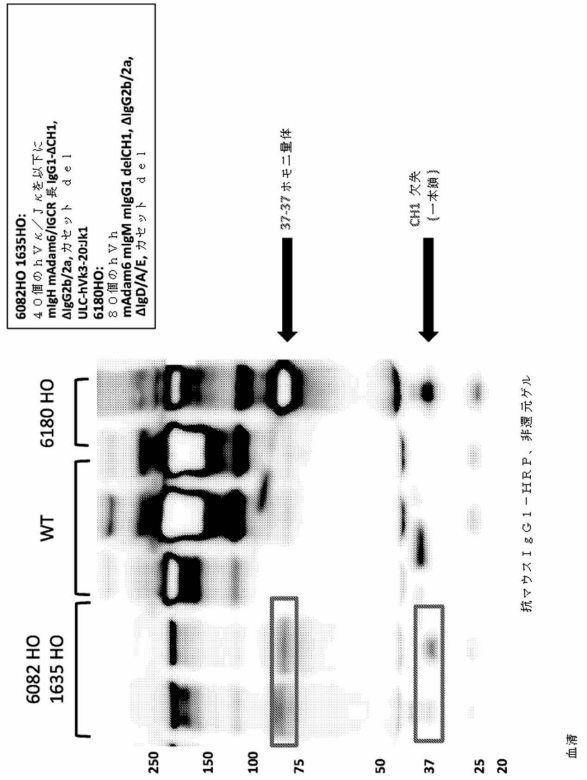
C

CD19+細胞
にゲート



脾臓

【 図 18 】



【 配列表 】

0006636498000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 マクドナルド, リン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 マーフィー, アンドリュー ジェイ.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ギュラー, ケイガン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ミクウィルター, ジョン
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 国際公開第2009/143472(WO, A2)
国際公開第2012/141798(WO, A1)
特表2013-513388(JP, A)
特表2013-518597(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A01K 67/027
C12N 15/00
C07K 16/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)