

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和4年6月9日(2022.6.9)

【国際公開番号】WO2019/240998

【公表番号】特表2021-526828(P2021-526828A)

【公表日】令和3年10月11日(2021.10.11)

【出願番号】特願2020-568981(P2020-568981)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/13(2006.01)

A 0 1 K 67/027(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 0 7 K 16/00(2006.01)

C 1 2 P 21/08(2006.01)

C 1 2 N 5/16(2006.01)

C 0 7 K 16/46(2006.01)

C 1 2 N 15/90(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/13

A 0 1 K 67/027

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 16/00

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/16

C 0 7 K 16/46

C 1 2 N 15/90 1 0 4 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和4年6月1日(2022.6.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体多様化のために遺伝子変換を使用するトランスジェニック動物であって、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、

(a) 自律型重鎖(AHC)可変ドメインをコードする核酸を含む機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子と、

(b) 前記機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子に作動可能に連結され、遺伝子変換によって、ヌクレオチド配列を(a)の前記AHC可変ドメインをコードする核酸に供与する複数の偽遺伝子と、を含み、前記偽遺伝子が、前記機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子の上流または下流にある、B細胞を含む、トランスジェニック動物。

40

【請求項2】

前記偽遺伝子が、AHC可変ドメインをコードする、請求項1に記載のトランスジェニック動物。

【請求項3】

(b)の前記偽遺伝子および(a)の前記遺伝子が、ラクダ化可変ドメインをコードする、請求項1に記載のトランスジェニック動物。

50

【請求項 4】

前記偽遺伝子が、AHC可変ドメインではない可変ドメインをコードする、請求項1に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 5】

(a)の前記AHC可変ドメインが、最大10個のラクダ化アミノ酸置換を除いて、ヒト生殖系列重鎖Vセグメント、ヒト生殖系列重鎖Dセグメント、およびヒト生殖系列重鎖Jセグメントによってコードされる、請求項1～4のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

【請求項 6】

前記偽遺伝子が、Vセグメントのみを含むか、または
前記偽遺伝子が、VおよびDセグメントのみを含む、請求項1～5のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

10

【請求項 7】

(a)の前記AHC可変ドメインおよび(b)の前記偽遺伝子が、複数の異なるVH3ファミリーメンバーによってコードされるCDRを含む、請求項1～6のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

【請求項 8】

(b)の前記偽遺伝子において、FR1、FR2、およびFR3、ならびに、存在する場合、任意にFR4をコードする配列が、組み合わせられて、(a)の前記AHC可変ドメイン内の対応するFR1、FR2、およびFR3、ならびに任意にFR4をコードする組み合わせられた配列と少なくとも90%同一である、請求項1～7のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

20

【請求項 9】

(b)の前記偽遺伝子において、前記CDRをコードする配列が、(a)の前記AHC可変ドメイン内の対応するCDRをコードする配列と90%以下同一である、請求項1～8のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

【請求項 10】

前記偽遺伝子が、400ヌクレオチド未満の長さである、請求項1～9のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

【請求項 11】

前記内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、CH1欠失を含む重鎖をコードするか、
前記動物のゲノムが、ノックアウトされた軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含むか、または
前記動物のゲノムが、定常領域を含むが可変領域を含まない短縮型軽鎖をコードする軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含む、請求項1～10のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

30

【請求項 12】

前記動物が、ニワトリである、請求項1～11のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

【請求項 13】

(a)請求項1～12のいずれかに記載のトランスジェニック動物を抗原で免疫化することと、
(b)前記動物から、前記抗原に特異的に結合する抗体を得ることと、を含む、方法。

40

【請求項 14】

前記抗体が、自律型重鎖(AHC)可変ドメイン抗体である、請求項1～12のいずれかに記載のトランスジェニック動物によって産生される、モノクローナルまたはポリクローナル抗体。

【請求項 15】

請求項1～12のいずれかに記載の動物から単離された、B細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

50

【補正対象項目名】 0 0 0 5

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 0 5 】

本開示は、以下の〔 1 〕から〔 3 1 〕を含む。

〔 1 〕抗体多様化のために遺伝子変換を使用するトランスジェニック動物であって、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、

（ a ）自律型重鎖（ A H C ）可変ドメインをコードする核酸を含む機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子と、

（ b ）上記機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子に作動可能に連結され、遺伝子変換によって、ヌクレオチド配列を（ a ）の上記 A H C 可変ドメインをコードする核酸に供与する複数の偽遺伝子と、を含み、上記偽遺伝子が、上記機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子の上流または下流にある、B 細胞を含む、トランスジェニック動物。

10

〔 2 〕上記偽遺伝子が、A H C 可変ドメインをコードする、上記〔 1 〕に記載のトランスジェニック動物。

〔 3 〕（ b ）の上記偽遺伝子および（ a ）の上記遺伝子が、ラクダ化可変ドメインをコードする、上記〔 1 〕に記載のトランスジェニック動物。

〔 4 〕上記偽遺伝子が、A H C 可変ドメインではない可変ドメインをコードする、上記〔 1 〕に記載のトランスジェニック動物。

〔 5 〕（ a ）の上記 A H C 可変ドメインが、ラクダ化ヒト可変ドメインである、上記〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

20

〔 6 〕（ a ）の上記 A H C 可変ドメインが、ラクダ化ヒトモノクローナル抗体である、上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

〔 7 〕（ a ）の上記 A H C 可変ドメインが、最大 1 0 個のラクダ化アミノ酸置換を除いて、ヒト生殖系列重鎖 V セグメント、ヒト生殖系列重鎖 D セグメント、およびヒト生殖系列重鎖 J セグメントによってコードされる、上記〔 1 〕～〔 6 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

〔 8 〕上記ヒト生殖系列重鎖 V セグメントが、V H 3 セグメントである、上記〔 7 〕に記載のトランスジェニック動物。

〔 9 〕上記ヒト生殖系列重鎖 J セグメントが、J H 1、J H 2、J H 3、J H 4、J H 5、または J H 6 セグメントである、上記〔 7 〕に記載のトランスジェニック動物。

30

〔 1 0 〕上記偽遺伝子が、V セグメントのみを含む、上記〔 1 〕～〔 9 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

〔 1 1 〕上記偽遺伝子が、V および D セグメントのみを含む、上記〔 1 〕～〔 1 0 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

〔 1 2 〕D セグメントが、生殖系列 D 配列またはヒトモノクローナル抗体に由来する、上記〔 7 〕～〔 1 1 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

〔 1 3 〕（ a ）の上記 A H C 可変ドメインおよび（ b ）の上記偽遺伝子が、複数の異なる V H 3 ファミリーメンバーによってコードされる C D R を含む、上記〔 1 〕～〔 1 2 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

40

〔 1 4 〕（ b ）の上記偽遺伝子において、F R 1、F R 2、および F R 3、ならびに、存在する場合、任意に F R 4 をコードする配列が、組み合わせられて、（ a ）の上記 A H C 可変ドメイン内の対応する F R 1、F R 2、および F R 3、ならびに任意に F R 4 をコードする組み合わせられた配列と少なくとも 9 0 % 同一である、上記〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

〔 1 5 〕（ b ）の上記偽遺伝子において、上記 C D R をコードする配列が、（ a ）の上記 A H C 可変ドメイン内の対応する C D R をコードする配列と 9 0 % 以下同一である、上記〔 1 〕～〔 1 4 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

〔 1 6 〕上記偽遺伝子が、4 0 0 ヌクレオチド未満の長さである、上記〔 1 〕～〔 1 5 〕のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

50

[1 7] 上記偽遺伝子が、300～400ヌクレオチドの長さである、上記[1]～[1 6]のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

[1 8] 上記内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、C H 1 欠失を含む重鎖をコードする、上記[1]～[1 7]のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

[1 9] 上記動物のゲノムが、ノックアウトされた軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含む、上記[1]～[1 8]のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

[2 0] 上記動物のゲノムが、定常領域を含むが可変領域を含まない短縮型軽鎖をコードする軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含む、上記[1]～[1 9]のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

[2 1] 上記動物が、ニワトリである、上記[1]～[2 0]のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

[2 2] 上記動物が、上記遺伝子座についてホモ接合性である、上記[1]～[2 1]のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

[2 3] 上記動物が、上記遺伝子座についてヘテロ接合性である、上記[1]～[2 2]のいずれかに記載のトランスジェニック動物。

[2 4] (a) 上記[1]～[2 3]のいずれかに記載のトランスジェニック動物を抗原で免疫化することと、

(b) 上記動物から、上記抗原に特異的に結合する抗体を得ることと、を含む、方法。

[2 5] 上記抗体が、ポリクローナルである、上記[2 4]に記載の方法。

[2 6] 上記抗体が、モノクローナルである、上記[2 4]に記載の方法。

[2 7] (c) 上記トランスジェニック動物のB細胞を使用してハイブリドーマを作製することと、

(d) 上記ハイブリドーマをスクリーニングして、上記抗原に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを同定することと、をさらに含む、上記[2 4]～[2 6]のいずれかに記載の方法。

[2 8] (c) ハイブリドーマを作製せずにB細胞をスクリーニングして、上記抗原に特異的に結合する抗体を産生するB細胞を同定することをさらに含む、上記[2 4]～[2 6]のいずれかに記載の方法。

[2 9] P C Rを使用して、上記トランスジェニック動物のB細胞から少なくとも上記重鎖可変領域をコードする核酸を増幅することと、上記増幅された核酸を使用して組換え抗体を発現させることと、をさらに含む、上記[2 4]～[2 6]のいずれかに記載の方法。

[3 0] 上記抗体が、自律型重鎖(A H C)可変ドメイン抗体である、上記[1]～[2 3]のいずれかに記載のトランスジェニック動物によって産生される、モノクローナルまたはポリクローナル抗体。

[3 1] 上記[1]～[2 3]のいずれかに記載の動物から単離された、B細胞。

本開示は、とりわけ、抗体多様化のために遺伝子変換を使用するトランスジェニック動物であって、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座が、(a) 自律型重鎖(A H C)可変ドメインをコードする核酸を含む機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子と、(b) 当該機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子に作動可能に連結され、遺伝子変換によって、ヌクレオチド配列を(a)のA H C可変ドメインをコードする核酸に供与する複数の偽遺伝子と、を含み、偽遺伝子が、機能的免疫グロブリン重鎖遺伝子の上流または下流にある、B細胞を含む、トランスジェニック動物を提供する。

10

20

30

40

50