

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6009441号  
(P6009441)

(45) 発行日 平成28年10月19日 (2016. 10. 19)

(24) 登録日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)

(51) Int. Cl.	F I
AO 1 K 67/027 (2006. 01)	AO 1 K 67/027 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 5/18 (2006. 01)	C 1 2 N 5/18
CO 7 K 16/18 (2006. 01)	CO 7 K 16/18

請求項の数 21 (全 62 頁)

(21) 出願番号	特願2013-516716 (P2013-516716)	(73) 特許権者	597160510
(86) (22) 出願日	平成23年6月22日 (2011. 6. 22)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2013-531501 (P2013-531501A)		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成25年8月8日 (2013. 8. 8)		REGENERON PHARMACEU
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/041370		TICALS, INC.
(87) 国際公開番号	W02011/163314		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(87) 国際公開日	平成23年12月29日 (2011. 12. 29)		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
審査請求日	平成26年5月28日 (2014. 5. 28)		・ミル・リバー・ロード777番
(31) 優先権主張番号	61/357, 317	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成22年6月22日 (2010. 6. 22)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/357, 314		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成22年6月22日 (2010. 6. 22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリッド軽鎖マウス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マウス免疫グロブリン 軽鎖定常領域の核酸配列と連続する、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域の核酸配列 (h V ) および少なくとも1つのヒト J の核酸配列 ( J ) を含む、マウスであって、該マウスは、機能的なマウス V 遺伝子セグメントおよび機能的なマウス J 遺伝子セグメントを欠き、ここで、該 h V およびヒト J 核酸配列が、内在性のマウス V および J 遺伝子セグメントを置換しており、そして、該 J がヒト J ( h J ) である、マウス。

【請求項 2】

前記 h V および前記 h J が再配列されていない遺伝子セグメントである、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 3】

再配列されていない複数の h V 遺伝子セグメントおよび少なくとも1つの h J 遺伝子セグメントを含む、請求項 2 に記載のマウス。

【請求項 4】

前記再配列されていない複数の h V 遺伝子セグメントが、少なくとも12個の遺伝子セグメントである、請求項 3 に記載のマウス。

【請求項 5】

前記再配列されていない複数の h V 遺伝子セグメントが、少なくとも28個の遺伝子セグメントである、請求項 3 に記載のマウス。

10

20

## 【請求項 6】

前記再配列されていない複数の h V 遺伝子セグメントが、少なくとも 40 個の遺伝子セグメントである、請求項 3 に記載のマウス。

## 【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの h J 遺伝子セグメントが、J 1、J 2、J 3、J 7、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 に記載のマウス。

## 【請求項 8】

内在性マウス免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座が、全体的にまたは部分的に欠失される、請求項 1 に記載のマウス。

## 【請求項 9】

前記マウス免疫グロブリン 軽鎖定常領域の核酸配列が、内在性マウス免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に存在する、請求項 1 に記載のマウス。

## 【請求項 10】

前記マウスの B 細胞のうち 10% ~ 45% が、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変 (V) ドメインおよびマウス免疫グロブリン 軽鎖定常 (C) ドメインを含む免疫グロブリン 軽鎖を含む抗体を発現する、請求項 1 に記載のマウス。

## 【請求項 11】

前記ヒト 可変ドメインが、以下：

## 【化 1】

Vλ3-1/Jλ1, Vλ3-

1/Jλ7, Vλ4-3/Jλ1, Vλ4-3/Jλ7, Vλ2-8/Jλ1, Vλ3-9/Jλ1, Vλ3-10/Jλ1, Vλ3-10/Jλ3, Vλ3-10/Jλ7, Vλ2-14/Jλ1, Vλ3-19/Jλ1, Vλ2-23/Jλ1, Vλ3-25/Jλ1, Vλ1-40/Jλ1, Vλ1-40/Jλ2, Vλ1-40/Jλ3, Vλ1-40/Jλ7, Vλ7-43/Jλ1, Vλ7-43/Jλ3, Vλ1-44/Jλ1, Vλ1-44/Jλ7, Vλ5-45/Jλ1, Vλ5-45/Jλ2, Vλ5-45/Jλ7, Vλ7-46/Jλ1, Vλ7-46/Jλ2, Vλ7-46/Jλ7, Vλ9-49/Jλ1, Vλ9-49/Jλ2, Vλ9-49/Jλ7 および Vλ1-51/Jλ1

からなる群より選択される再配列された h V / h J の核酸配列に由来する、請求項 10 に記載のマウス。

## 【請求項 12】

ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座由来のヒト V - J 遺伝子間領域をさらに含む、請求項 1 に記載のマウスであって、ここで、該ヒト V - J 遺伝子間領域は、前記 V の核酸配列および前記 J の核酸配列と連続する、マウス。

## 【請求項 13】

前記ヒト V - J 遺伝子間領域は、前記 V の核酸配列と前記 J の核酸配列との間に配置される、請求項 12 に記載のマウス。

## 【請求項 14】

(a) 内在性のマウス V および J 遺伝子セグメントを置換する内在性マウス免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座における、少なくとも 12 個の再配列されていないヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよび少なくとも 1 つのヒト J 遺伝子セグメント；

(b) 該少なくとも 12 個のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子セグメントと該少なくとも 1 つのヒト J の核酸配列との間に配置されたヒト V - J 遺伝子間配列；を含むマウスであって、ここで、該マウスは、ヒト V ドメインおよびマウス C ドメインを含む免疫グロブリン 軽鎖を含む抗体を発現する、マウス。

## 【請求項 15】

(a) 前記内在性マウス免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座における、少なくとも 40 個の再配列されていないヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよび少なくとも 1 つのヒト J 遺伝子セグメント；

(b) 該少なくとも 40 個のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子セグメントと該少

10

20

30

40

50

なくとも1つのヒトJ の核酸配列との間に配置されたヒトV - J 遺伝子間配列；  
を含む、請求項14に記載のマウス。

【請求項16】

ヒト免疫グロブリン 可変配列およびマウス免疫グロブリン 軽鎖定常配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む抗体を発現するマウスであって、該マウスは、機能的なマウスV 遺伝子セグメントおよび機能的なマウスJ 遺伝子セグメントを欠き、ここで、該ヒト免疫グロブリン 可変配列およびヒトJ 核酸配列が、内在性のマウスV およびJ 遺伝子セグメントを置換しており、そして、該J がヒトJ (hJ)である、マウス。

【請求項17】

前記マウスが、1：1という の使用頻度と の使用頻度との比を示す、請求項16に記載のマウス。

【請求項18】

前記マウスの骨髓から得られる未熟B細胞の集団が、1：1という の使用頻度と の使用頻度との比を示す、請求項17に記載のマウス。

【請求項19】

抗原結合タンパク質を作製するための、請求項1～18に記載されたマウスの使用。

【請求項20】

請求項1～18に記載されたマウスに由来する、細胞または組織であって、該細胞は、マウス内在性免疫グロブリン 軽鎖定常領域の核酸配列と連続する、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域の核酸配列(hV) および少なくとも1つのヒトJの核酸配列(J)を含み、該マウスは、機能的なマウスV 遺伝子セグメントおよび機能的なマウスJ 遺伝子セグメントを欠き、ここで、該hV およびヒトJ核酸配列が、内在性のマウスV およびJ 遺伝子セグメントを置換しており、そして、該JがヒトJ (hJ)である、細胞または組織。

【請求項21】

目的の抗原に結合する、体細胞変異した抗体を作製するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 請求項1～18のいずれか1項に記載のマウスを、目的の抗原に曝露する工程；

(b) (a)のマウスの1以上のBリンパ球を取得する工程であって、該1以上のBリンパ球は、該目的の抗原に結合する抗体を産生する、工程；ならびに

(c) (b)の抗体の免疫グロブリン軽鎖をコードする核酸配列を特定する工程であって、該免疫グロブリン軽鎖は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインおよびマウス免疫グロブリン 定常ドメインを含む、工程；ならびに

(d) ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域の核酸配列と、(c)の核酸配列を使用して、該目的の抗原に結合するヒト抗体を作製する工程  
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

マウスまたはヒト軽鎖定常領域( またはカップ( ))と作動可能に接続されたマウスまたはヒトラムダ可変(V)軽鎖配列を含む遺伝的に改変されたマウス。ヒトラムダ可変(hV)遺伝子セグメント、ヒトラムダJ(hJ)遺伝子セグメントに由来する可変ドメインおよびマウス軽鎖定常(C<sub>L</sub>)ドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を含むエピトープ結合タンパク質を発現する遺伝的に改変されたマウス。内在性マウス軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンラムダ( )軽鎖可変核酸配列を含む遺伝的に改変されたマウス。1つ以上のhV 遺伝子セグメントおよび1つ以上のhJ 遺伝子セグメントによるすべての内在性マウス軽鎖可変領域遺伝子セグメントの置換を含む内在性軽鎖遺伝子座からキメラヒト /マウスC<sub>L</sub>軽鎖を再配列し、発現することができるマウス。hV ドメインおよびマウスC<sub>L</sub>ドメインを含む体細胞変異した抗体。

## 【背景技術】

## 【0002】

## 背景

完全にヒトの抗体、または部分的にヒトの抗体でありかつ部分的にマウスの抗体である抗体を発現するマウスが、当該分野で公知である。例えば、ヒト軽鎖および重鎖免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む導入遺伝子から完全ヒト抗体を発現するトランスジェニックマウスが、報告されている。同様に、ヒト重鎖可変領域（H C V R）および軽鎖可変領域（L C V R）遺伝子セグメントによる内在性マウスH C V R 遺伝子セグメントおよびカップ（ ）L C V R 遺伝子セグメントの置換を含み、キメラヒト/マウスカップ鎖を有するキメラ抗体を産生する、遺伝的に改変されたマウスも公知である。

10

## 【0003】

抗体軽鎖は、2個の別個の遺伝子座：カップ（ ）およびラムダ（ ）のうちの1つによってコードされる。マウス抗体軽鎖は、主に タイプである。ヒトにおける と の軽鎖の使用比は、約60：40であり、一方マウスでは、約95：5である。報告によると、マウスでの 軽鎖に偏った使用頻度（u s a g e）は、完全ヒト抗体または部分ヒト抗体を発現することができる遺伝的に改変されたマウスにおいても維持される。したがって、完全ヒト抗体または部分ヒト抗体を発現するマウスは、ラムダ可変の使用が抑制されているとみられる。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

20

## 【0004】

当該分野では、マウスであってもヒトであっても、エピトープ結合タンパク質を作製する際に使用するために、ラムダ可変領域を作製することが必要とされている。当該分野では、高いラムダ可変（V ）使用頻度を示す、完全ヒト抗体または部分ヒト抗体を発現するマウスが必要とされている。

## 【0005】

当該分野では、高い 可変（V ）使用頻度を示す、完全ヒト抗体または部分ヒト抗体を発現するマウスが必要とされている。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

30

## 要旨

遺伝的に改変されたマウス、胚、細胞、組織ならびにマウスを改変するための核酸構築物、ならびにそれらを作製するためおよび使用するための方法および組成物が提供される。カップ（ ）軽鎖という背景においてラムダ（ ）可変領域（ヒトまたは非ヒト）を産生するマウスおよび細胞が提供される。例えば、内在性マウス軽鎖遺伝子座から、または 軽鎖という背景においてヒト 可変領域を産生するマウスおよび細胞も提供される。ラムダ可変領域を含む抗体を作製するための方法も提供される。同族のラムダ可変領域とともに発現する重鎖を選択するための方法も提供される。

## 【0007】

体細胞変異した可変領域を含むキメラおよびヒト抗原結合タンパク質（例えば、抗体）（マウス軽鎖定常ドメインに融合されたヒトV およびヒトJ 遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含む軽鎖を有する抗体を含む）およびそれらをコードする核酸が提供される。

40

## 【0008】

1つの態様において、マウス定常領域を含む軽鎖においてヒト 可変領域配列を発現するマウスが提供される。1つの態様において、 定常領域を含む軽鎖においてヒト 可変領域配列を発現するマウスが提供される。1つの態様において、内在性マウス軽鎖遺伝子座から、ヒト 可変領域配列を含む軽鎖を発現するマウスが提供される。1つの態様において、マウス定常領域配列に接続されたヒト 可変配列を含む再配列された軽鎖遺伝子を含むマウスが提供され；1つの実施形態において、そのマウス定常領域配列は、 定常配

50

列であり；1つの実施形態において、そのマウス定常領域配列は、定常配列である。

【0009】

1つの態様において、遺伝的に改変されたマウスが提供され、ここで、そのマウスは、再配列されていないヒト軽鎖可変遺伝子セグメント(hV)およびヒト連結遺伝子セグメント(hJ)を含む。1つの実施形態において、その再配列されていないhVおよびhJは、マウス軽鎖遺伝子座に存在する。1つの実施形態において、その再配列されていないhVおよび再配列されていないhJは、導入遺伝子上に存在し、ヒトまたはマウス定常領域配列に作動可能に接続されている。1つの実施形態において、その再配列されていないhVおよび再配列されていないhJは、エピソーム上に存在する。1つの実施形態において、そのマウスは、再配列されていないhV配列およびhJ配列ならびにマウス軽鎖定常領域(C<sub>L</sub>)核酸配列に由来する軽鎖を含む免疫グロブリンを産生することができる。遺伝的に改変されたマウスを作製するためおよび使用するための方法および組成物も提供される。(a)マウス重鎖定常領域に融合されたヒト重鎖可変ドメイン(hV<sub>H</sub>)、および(b)マウスC<sub>L</sub>ドメインに融合されたヒトVを含む抗体が提供され、ここで、例えば、本発明のマウスにおける抗体または免疫細胞の選択中に、それらの可変ドメインの1つ以上が体細胞変異したものも含まれる。1つの実施形態において、再配列されていないhVおよび再配列されていないhJは、ヒトまたはマウス定常領域(C)と作動可能に接続される。1つの実施形態において、その再配列されていないhVおよび再配列されていないhJは、ヒトまたはマウス定常領域(C)と作動可能に接続される。

10

20

【0010】

1つの態様において、生殖細胞系列において内在性マウス軽鎖遺伝子座にヒト軽鎖可変領域配列を含むマウスが提供され、ここで、そのヒトラムダ可変領域配列は、マウス免疫グロブリン定常領域遺伝子配列を含む軽鎖において発現される。

【0011】

1つの実施形態において、内在性マウス軽鎖遺伝子座は、遺伝子座である。1つの実施形態において、内在性マウス軽鎖遺伝子座は、遺伝子座である。

【0012】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性マウス軽鎖遺伝子座において内在性軽鎖可変配列を欠く。

30

【0013】

1つの実施形態において、すべてまたは実質的にすべての内在性マウス軽鎖可変領域遺伝子セグメントが、1つ以上のヒト可変領域遺伝子セグメントで置換される。

【0014】

1つの実施形態において、ヒト軽鎖可変領域配列は、ヒトJ配列を含む。1つの実施形態において、そのヒトJ配列は、J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>7</sub>およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0015】

1つの実施形態において、ヒト軽鎖可変領域配列は、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスターAのフラグメントを含む。特定の実施形態において、そのヒト軽鎖遺伝子座のクラスターAのフラグメントは、hV<sub>3-27</sub>からhV<sub>3-1</sub>にわたる。

40

【0016】

1つの実施形態において、ヒト軽鎖可変領域配列は、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスターBのフラグメントを含む。特定の実施形態において、そのヒト軽鎖遺伝子座のクラスターBのフラグメントは、hV<sub>5-52</sub>からhV<sub>1-40</sub>にわたる。

【0017】

1つの実施形態において、ヒト軽鎖可変領域配列は、クラスターAのゲノムフラグメントおよびクラスターBのゲノムフラグメントを含む。1つの実施形態において、ヒト軽鎖可変領域配列は、クラスターAの少なくとも1つの遺伝子セグメントおよびクラスターBの少なくとも1つの遺伝子セグメントを含む。

50

## 【 0 0 1 8 】

1つの実施形態において、上記マウスの軽鎖ナイーブレパートリーの10%超が、2 - 8、2 - 23、1 - 40、5 - 45および9 - 49から選択される少なくとも2つのhV遺伝子セグメントに由来する。1つの実施形態において、上記マウスの軽鎖ナイーブレパートリーの20%超が、2 - 8、2 - 23、1 - 40、5 - 45および9 - 49から選択される少なくとも3つのhV遺伝子セグメントに由来する。1つの実施形態において、上記マウスの軽鎖ナイーブレパートリーの30%超が、2 - 8、2 - 23、1 - 40、5 - 45および9 - 49から選択される少なくとも4つのhV遺伝子セグメントに由来する。

## 【 0 0 1 9 】

10

1つの態様において、マウス定常領域と融合されたヒト可変配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスが提供され、ここで、そのマウスは、約1:1というの使用頻度との使用頻度との比を示す。

## 【 0 0 2 0 】

1つの実施形態において、その免疫グロブリン軽鎖は、内在性マウス軽鎖遺伝子座から発現される。

## 【 0 0 2 1 】

1つの態様において、マウス軽鎖定常領域配列と連続する、軽鎖可変領域配列(V)および少なくとも1つのJ配列(J)を含むマウスが提供される。

## 【 0 0 2 2 】

20

1つの実施形態において、そのマウスは、機能的なマウスVおよび/またはマウスJ遺伝子セグメントを欠く。

## 【 0 0 2 3 】

1つの実施形態において、そのVは、ヒトV(hV)であり、そのJは、ヒトJ(hJ)である。1つの実施形態において、そのhVおよびhJは、再配列されていない遺伝子セグメントである。

## 【 0 0 2 4 】

1つの実施形態において、上記マウスは、複数の再配列されていないhV遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのhJ遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、その複数の再配列されていないhV遺伝子セグメントは、少なくとも12個の遺伝子セグメント、少なくとも28個の遺伝子セグメントまたは少なくとも40個の遺伝子セグメントである。

30

## 【 0 0 2 5 】

1つの実施形態において、その少なくとも1つのhJ遺伝子セグメントは、J1、J2、J3、J7およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

## 【 0 0 2 6 】

1つの実施形態において、内在性マウス軽鎖遺伝子座は、全体的にまたは部分的に欠失される。

## 【 0 0 2 7 】

1つの実施形態において、マウス軽鎖定常領域配列は、内在性マウス軽鎖遺伝子座に存在する。

40

## 【 0 0 2 8 】

1つの実施形態において、上記マウスのB細胞の約10%~約45%は、ヒト軽鎖可変(V)ドメインおよびマウス軽鎖定常(C)ドメインを含む軽鎖を含む抗体を発現する。

## 【 0 0 2 9 】

1つの実施形態において、そのヒト可変ドメインは、3 - 1 / 1、3 - 1 / 7、4 - 3 / 1、4 - 3 / 7、2 - 8 / 1、3 - 9 / 1、3 - 10 / 1、3 - 10 / 3、3 - 10 / 7、2 - 14 / 1、3 - 19 / 1、2 - 23 / 1、3 - 25 / 1、1 - 40 / 1、1 - 40 / 2、1 - 40 / 3、1 - 40 / 7、7 - 43 / 1、7 - 43 / 3、1 - 44 / 1、

50

1 - 4 4 / 7、5 - 4 5 / 1、5 - 4 5 / 2、5 - 4 5 / 7、7 - 4 6 / 1、7 - 4 6 / 2、7 - 4 6 / 7、9 - 4 9 / 1、9 - 4 9 / 2、9 - 4 9 / 7および1 - 5 1 / 1からなる群より選択される再配列されたh V / h J 配列に由来する。

【0030】

1つの実施形態において、上記マウスは、ヒト 軽鎖遺伝子座由来のヒトV - J 遺伝子間領域をさらに含み、ここで、そのヒトV - J 遺伝子間領域は、V 配列およびJ 配列と連続する。特定の実施形態において、ヒトV - J 遺伝子間領域は、V 配列とJ 配列との間に配置される。

【0031】

1つの態様において、(a) 内在性マウス軽鎖遺伝子座に、少なくとも12個～少なくとも40個の再配列されていないヒト 軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのヒトJ 遺伝子セグメント；(b) 少なくとも12個～少なくとも40個のヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントと少なくとも1つのヒトJ 配列との間に配置されたヒトV - J 遺伝子間配列を含むマウスが提供され；ここで、そのマウスは、ヒトV ドメインおよびマウスC ドメインを含む軽鎖を含む抗体を発現する。

10

【0032】

1つの態様において、可変配列および 定常配列を含む軽鎖を含む抗体を発現するマウスが提供される。

【0033】

1つの実施形態において、そのマウスは、約1：1という の使用頻度と の使用頻度との比を示す。

20

【0034】

1つの実施形態において、そのマウスの骨髄から得られる未熟B細胞の集団は、約1：1という の使用頻度と の使用頻度との比を示す。

【0035】

1つの態様において、遺伝的に改変されたマウスが提供され、ここで、そのマウスは、マウスC<sub>L</sub> 遺伝子を含むマウス軽鎖遺伝子座に作動可能に接続された再配列されていない免疫グロブリンV およびJ 遺伝子セグメントを含む。

【0036】

1つの実施形態において、上記V および/またはJ 遺伝子セグメントは、ヒトの遺伝子セグメントである。1つの実施形態において、上記V および/またはJ 遺伝子セグメントは、マウスの遺伝子セグメントであり、C<sub>L</sub> は、マウスC である。

30

【0037】

1つの実施形態において、内在性マウス軽鎖遺伝子座は、 軽鎖遺伝子座である。1つの実施形態において、内在性マウス軽鎖遺伝子座は、 軽鎖遺伝子座である。

【0038】

1つの実施形態において、再配列されていないV およびJ 遺伝子セグメントは、内在性マウス軽鎖遺伝子座に存在する。

【0039】

1つの実施形態において、再配列されていない免疫グロブリンV およびJ 遺伝子セグメントは、導入遺伝子上に存在する。

40

【0040】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子座に、1つ以上のヒトV、Dおよび/またはJ 遺伝子セグメントによる1つ以上の重鎖V、Dおよび/またはJ 遺伝子セグメントの置換をさらに含む。

【0041】

1つの実施形態において、上記マウスは、マウスC 遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンV およびJ 遺伝子セグメントを含む。

【0042】

50

1つの実施形態において、上記マウスは、マウスC 遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていないヒト免疫グロブリン 軽鎖可変遺伝子セグメント(V )および 連結遺伝子セグメント(J )を含む。

#### 【0043】

1つの実施形態において、軽鎖可変遺伝子の遺伝子座(「V<sub>L</sub> 遺伝子座」)は、少なくとも1つのヒトV (hV )遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、そのV<sub>L</sub> 遺伝子座は、少なくとも1つのヒトJ (hJ )遺伝子セグメントを含む。別の実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、最大4個のhJ 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、そのV<sub>L</sub> 遺伝子座は、ヒト およびヒト ゲノム配列を含む連続する配列を含む。

10

#### 【0044】

1つの実施形態において、 軽鎖可変遺伝子の遺伝子座(「 遺伝子座」)は、少なくとも1つのヒトV (hV )遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、その 遺伝子座は、少なくとも1つのヒトJ (hJ )遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、その 遺伝子座は、最大4個のhJ 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、その 遺伝子座は、少なくとも1つのhV および少なくとも1つのhJ を含み、機能的なV 領域遺伝子セグメントを欠くかまたは実質的に欠き、機能的なJ 領域遺伝子セグメントを欠くかまたは実質的に欠く。1つの実施形態において、上記マウスは、機能的なV 領域遺伝子セグメントを含まない。1つの実施形態において、上記マウスは、機能的なJ 領域遺伝子セグメントを含まない。

20

#### 【0045】

1つの実施形態において、 軽鎖可変遺伝子の遺伝子座(「 遺伝子座」)は、少なくとも1つのhV 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、その 遺伝子座は、少なくとも1つのヒトJ (hJ )遺伝子セグメントを含む。別の実施形態において、その 遺伝子座は、最大4個のhJ 遺伝子セグメントを含む。

#### 【0046】

1つの実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、複数のhV を含む。1つの実施形態では、ヒトにおいて観察される約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%もしくは約90%またはそれ以上のV 使用頻度を反映する 軽鎖可変領域レパトリーの発現がもたらされるように、複数のhV が選択される。1つの実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、遺伝子セグメントhV 1-40、1-44、2-8、2-14、3-21およびそれらの組み合わせを含む。

30

#### 【0047】

1つの実施形態において、hV は、3-1、4-3、2-8、3-9、3-10、2-11および3-12を含む。特定の実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、V 3-12からV 3-1に及ぶヒト 軽鎖遺伝子座の連続する配列を含む。1つの実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のhV を含む。特定の実施形態において、hV は、3-1、4-3、2-8、3-9、3-10、2-11および3-12を含む。特定の実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、V 3-12からV 3-1に及ぶヒト 遺伝子座の連続する配列を含む。1つの実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在し、内在性 軽鎖遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。1つの実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在し、内在性 遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。

40

#### 【0048】

1つの実施形態において、V<sub>L</sub> 遺伝子座は、13~28個またはそれ以上のhV を含む。特定の実施形態において、それらのhV は、2-14、3-16、2-18、3-19、3-21、3-22、2-23、3-25および3-27を含む。特定の実施形態において、 遺伝子座は、V 3-27からV 3-1に及ぶヒト 遺伝子座の連続する

50

配列を含む。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在し、内在性 軽鎖遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。別の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在し、内在性 遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。

#### 【0049】

1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、29～40個のhV を含む。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、 $V_{3-29}$  から  $V_{3-1}$  に及ぶヒト 遺伝子座の連続する配列および  $V_{5-52}$  から  $V_{1-40}$  に及ぶヒト 遺伝子座の連続する配列を含む。特定の実施形態において、遺伝的に改変されたマウスにおけるhV  $1-40$  とhV  $3-29$  との間のすべてまたは実質的にすべての配列は、hV  $1-40$  遺伝子セグメントの下流(3'非翻訳部分の下流)に天然に(例えば、ヒト集団において)見られるおよそ959bpのヒト 配列、制限酵素部位(例えば、P I - S c e I)、それに続いて天然に見られるhV  $3-29$  遺伝子セグメントのおよそ3,431bp上流のヒト 配列から本質的になる。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性マウス 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性マウス 遺伝子座に存在し、内在性マウス 軽鎖遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。別の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性マウス 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性マウス 遺伝子座に存在し、内在性マウス 遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。

#### 【0050】

1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、少なくとも1つのhJ を含む。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、複数のhJ を含む。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、少なくとも2、3、4、5、6または7個のhJ を含む。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、4個のhJ を含む。特定の実施形態において、その4個のhJ は、hJ  $1$ 、hJ  $2$ 、hJ  $3$ およびhJ  $7$ である。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、 $V_L$  遺伝子座である。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在し、内在性 軽鎖遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、1個のhJ を含む。特定の実施形態において、その1個のhJ は、hJ  $1$ である。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在し、内在性 軽鎖遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。別の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、内在性 遺伝子座に存在し、内在性 遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。

#### 【0051】

1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、少なくとも1つのhV、少なくとも1つのhJ およびマウスC 遺伝子を含む。1つの実施形態において、 $V_L$  遺伝子座は、少なくとも1つのhV、少なくとも1つのhJ およびマウスC 遺伝子を含む。特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、C  $2$ である。特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、マウスC  $2$ と少なくとも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%、96%、97%、98%または少なくとも99%同一である。

#### 【0052】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性マウス 遺伝子座に、1つ以上のhV 遺伝子セグメントによる内在性マウスV 遺伝子セグメントの置換を含み、ここで、そのhV 遺伝子セグメントは、内在性マウスC 領域遺伝子に作動可能に接続されており、そのマウスは、ヒトV 遺伝子セグメントを再配列し、ヒトV ドメインおよびマウスC を含むリバースキメラ(reverse chimeric)免疫グロブリン軽鎖を発現する。1つの実施形態において、再配列されていないマウスV 遺伝子セグメントの

90～100%が、少なくとも1つの再配列されていないhV 遺伝子セグメントで置換される。特定の実施形態において、内在性マウスV 遺伝子セグメントのすべてまたは実質的にすべてが、少なくとも1つの再配列されていないhV 遺伝子セグメントで置換される。1つの実施形態において、その置換は、少なくとも12個、少なくとも28個または少なくとも40個の再配列されていないhV 遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、その置換は、少なくとも7個の機能的な再配列されていないhV

遺伝子セグメント、少なくとも16個の機能的な再配列されていないhV 遺伝子セグメントまたは少なくとも27個の機能的な再配列されていないhV 遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、上記マウスは、少なくとも1つの再配列されていないhJ 遺伝子セグメントによるすべてのマウスJ 遺伝子セグメントの置換を含む。1つの実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないhJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 4、J 5、J 6、J 7およびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、1つ以上のhV 遺伝子セグメントは、3-1、4-3、2-8、3-9、3-10、2-11、3-12、2-14、3-16、2-18、3-19、3-21、3-22、2-23、3-25、3-27、1-40、7-43、1-44、5-45、7-46、1-47、5-48、9-49、1-50、1-51、5-52 hV 遺伝子セグメントおよびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないhJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 7およびそれらの組み合わせから選択される。

#### 【0053】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性マウス 遺伝子座に、1つ以上のヒトV 遺伝子セグメントによる内在性マウスV 遺伝子セグメントの置換を内在性マウス 遺伝子座に含み、ここで、そのhV 遺伝子セグメントは、マウスC 領域遺伝子に作動可能に接続されており、そのマウスは、hV 遺伝子セグメントを再配列し、hV ドメインおよびマウスC を含むリパースキメラ免疫グロブリン軽鎖を発現する。特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、C 2である。特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、マウスC 2と少なくとも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%または少なくとも98%同一である。1つの実施形態において、再配列されていないマウスV 遺伝子セグメントの90～100%

が、少なくとも1つの再配列されていないhV 遺伝子セグメントで置換される。特定の実施形態において、内在性マウスV 遺伝子セグメントのすべてまたは実質的にすべてが、少なくとも1つの再配列されていないhV 遺伝子セグメントで置換される。1つの実施形態において、その置換は、少なくとも12個、少なくとも28個または少なくとも40個の再配列されていないhV 遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、その置換は、少なくとも7個の機能的な再配列されていないhV 遺伝子セグメント、少なくとも16個の機能的な再配列されていないhV 遺伝子セグメントまたは少なくとも27個の機能的な再配列されていないhV 遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、上記マウスは、少なくとも1つの再配列されていないhJ 遺伝子セグメントによるすべてのマウスJ 遺伝子セグメントの置換を含む。1つの実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないhJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 4、J 5、J 6、J 7およびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、その1つ以上のhV 遺伝子セグメントは、3-1、4-3、2-8、3-9、3-10、2-11、3-12、2-14、3-16、2-18、3-19、3-21、3-22、2-23、3-25、3-27、1-40、7-43、1-44、5-45、7-46、1-47、5-48、9-49、1-50、1-51、5-52 hV 遺伝子セグメントおよびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないhJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 7およびそれらの組み合わせから選択される。

#### 【0054】

1つの態様において、内在性マウス 軽鎖遺伝子座に配置されたヒトV - J 遺伝子間領域配列を含む遺伝的に改変されたマウスが提供される。

【0055】

1つの実施形態において、そのヒトV - J 遺伝子間領域配列は、hV およびhJ 遺伝子セグメントを含むマウスの内在性 軽鎖遺伝子座に存在し、そのヒトV - J 遺伝子間領域配列は、hV 遺伝子セグメントとhJ 遺伝子セグメントとの間に配置される。特定の実施形態において、そのhV およびhJ 遺伝子セグメントは、そのマウスにおいて、機能的なヒト 軽鎖可変ドメインを形成するように組み換わることができる。

【0056】

1つの実施形態において、複数のhV および1つ以上のhJ を含むマウスが提供され、転写の点から、ヒトV - J 遺伝子間領域配列は、近位または最も3'側のhV 配列の下流かつ最初のhJ 配列の上流または5'側に配置される。

【0057】

1つの実施形態において、ヒトV - J 遺伝子間領域は、ヒトV 4 - 1 遺伝子セグメントの約130bp下流または3'側、すなわち、ヒトV 4 - 1 遺伝子セグメントの3'非翻訳領域の約130bp下流に位置する領域であり、ヒトJ 1 遺伝子セグメントの約600bp上流または5'側までに及ぶ。特定の実施形態において、ヒトV - J 遺伝子間領域は、約22.8kbのサイズである。1つの実施形態において、V - J 遺伝子間領域は、ヒトV 4 - 1 遺伝子セグメントの3'非翻訳領域の末端からヒトJ 1 遺伝子セグメントの約600bp上流にわたるヒトV - J 遺伝子間領域と約90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上または約95%以上同一である。1つの実施形態において、V - J 遺伝子間領域は、配列番号100を含む。特定の実施形態において、V - J 遺伝子間領域は、配列番号100の機能的なフラグメントを含む。特定の実施形態において、V - J 遺伝子間領域は、配列番号100である。

【0058】

1つの態様において、列挙されたヒトV - J 遺伝子間領域配列を含むマウス、マウス細胞（例えば、マウス胚性幹細胞）、マウス胚およびマウス組織が提供され、ここで、その遺伝子間領域配列は、異所性のものである。特定の実施形態において、その異所性の配列は、ヒト化された内在性マウス免疫グロブリン遺伝子座に配置されている。

【0059】

1つの態様において、列挙されたヒトV - J 遺伝子間領域配列を含む単離された核酸構築物が提供される。1つの実施形態において、その核酸構築物は、ヒトV - J 遺伝子間領域配列をマウス軽鎖遺伝子座に標的化する標的化アーム(targeting arm)を含む。特定の実施形態において、そのマウス軽鎖遺伝子座は、遺伝子座である。特定の実施形態において、その標的化アームは、ヒトV - J 遺伝子間領域を改変された内在性マウス 遺伝子座に標的化し、ここで、その標的化は、hV 配列とhJ 配列との間の位置に対するものである。

【0060】

1つの態様において、遺伝的に改変されたマウスが提供され、ここで、そのマウスは、2つ以下の軽鎖対立遺伝子を含み、ここで、その軽鎖対立遺伝子は、(a)マウスC<sub>L</sub> 遺伝子を含む内在性マウス軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンヒトV およびJ 遺伝子セグメント；および(b)マウスC<sub>L</sub> 遺伝子を含む内在性マウス軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンV<sub>L</sub> およびJ<sub>L</sub> 遺伝子セグメントを含む。

【0061】

1つの実施形態において、内在性マウス軽鎖遺伝子座は、遺伝子座である。別の実施形態において、内在性マウス軽鎖遺伝子座は、遺伝子座である。

【0062】

1つの実施形態において、上記2つ以下の軽鎖対立遺伝子は、対立遺伝子および対立遺伝子、2つの対立遺伝子ならびに2つの対立遺伝子から選択される。特定の実施

10

20

30

40

50

形態において、その2つの軽鎖対立遺伝子のうちの1つは、C<sub>2</sub> 遺伝子を含む 対立遺伝子である。

【0063】

1つの実施形態において、上記マウスは、1つの機能的な免疫グロブリン軽鎖遺伝子座および1つの非機能的な軽鎖遺伝子座を含み、ここで、その機能的な軽鎖遺伝子座は、マウスC<sub>1</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンヒトV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む。

【0064】

1つの実施形態において、上記マウスは、1つの機能的な免疫グロブリン軽鎖遺伝子座および1つの非機能的な軽鎖遺伝子座を含み、ここで、その機能的な軽鎖遺伝子座は、マウスC<sub>1</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンヒトV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、そのC<sub>1</sub> 遺伝子は、C<sub>2</sub> である。特定の実施形態において、そのマウスC<sub>1</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>2</sub> と少なくとも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%または少なくとも98%同一である。

【0065】

1つの実施形態において、上記マウスは、少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖対立遺伝子をさらに含む。1つの実施形態において、その少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖対立遺伝子は、ヒト/マウス重鎖を発現するヒト重鎖遺伝子を含む内在性マウス重鎖遺伝子座に、ヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、ヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメントおよびヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、上記マウスは、2つの免疫グロブリン重鎖対立遺伝子を含み、そのマウスは、ヒト/マウス重鎖を発現する。

【0066】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性C<sub>1</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 遺伝子座に、再配列されていないhV<sub>H</sub> および再配列されていないhJ<sub>H</sub> を含む第1の軽鎖対立遺伝子；ならびに内在性C<sub>2</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 遺伝子座に、再配列されていないhV<sub>H</sub> および再配列されていないhJ<sub>H</sub> を含む第2の軽鎖対立遺伝子を含む。特定の実施形態において、その遺伝的に改変されたマウスにおいて機能的な軽鎖対立遺伝子は、その第1および第2の軽鎖対立遺伝子だけである。特定の実施形態において、上記マウスは、非機能的な 遺伝子座を含む。1つの実施形態において、遺伝的に改変されたマウスは、一定常領域を含む軽鎖を発現しない。

【0067】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性C<sub>1</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 遺伝子座に、再配列されていないhV<sub>H</sub> および再配列されていないhJ<sub>H</sub> を含む第1の軽鎖対立遺伝子；ならびに内在性C<sub>2</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 遺伝子座に、再配列されていないhV<sub>H</sub> および再配列されていないhJ<sub>H</sub> を含む第2の軽鎖対立遺伝子を含む。特定の実施形態において、その遺伝的に改変されたマウスにおいて機能的な軽鎖対立遺伝子は、その第1および第2の軽鎖対立遺伝子だけである。1つの実施形態において、その内在性C<sub>1</sub> 遺伝子は、C<sub>2</sub> である。特定の実施形態において、そのマウスC<sub>1</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>2</sub> と少なくとも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%または少なくとも98%同一である。

【0068】

1つの実施形態において、上記マウスは、6個の免疫グロブリン対立遺伝子を含み、ここで、第1の対立遺伝子は、マウスC<sub>1</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含み、第2の対立遺伝子は、マウスC<sub>2</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含み、第3の対立遺伝子は、マウスC<sub>1</sub> 遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含み、第4および第5の対立遺伝子は、各々独立して、マウス重鎖遺伝子を含む内在性マウス重鎖遺伝子座に、再配列されていないV<sub>H</sub> およびD<sub>H</sub> お

10

20

30

40

50

よび  $J_H$  遺伝子セグメントを含み、そして第 6 の対立遺伝子は、(a) マウス  $C$  遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリン  $V$  および  $J$  遺伝子セグメントを含むか、(b) 非機能的な 遺伝子座を含むか、または (c) 全体的にもしくは部分的に 遺伝子座の欠失を含む。

#### 【0069】

1 つの実施形態において、上記の第 1 の対立遺伝子は、再配列されていない  $hV$  および  $hJ$  を含む。1 つの実施形態において、上記の第 2 の対立遺伝子は、再配列されていない  $hV$  および  $hJ$  を含む。1 つの実施形態において、上記の第 3 の対立遺伝子は、再配列されていない  $hV$  および  $hJ$  を含む。1 つの実施形態において、上記の第 4 および第 5 の対立遺伝子は、各々独立して、再配列されていない  $hV_H$  および  $hD_H$  および  $hJ_H$  を含む。1 つの実施形態において、上記の第 6 の対立遺伝子は、全体的にまたは部分的に欠失された内在性マウス 遺伝子座を含む。

10

#### 【0070】

1 つの実施形態において、上記マウスは、6 個の免疫グロブリン対立遺伝子を含み、ここで、第 1 の対立遺伝子は、マウス  $C$  遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリン  $V$  および  $J$  遺伝子セグメントを含み、第 2 の対立遺伝子は、マウス  $C$  遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリン  $V$  および  $J$  遺伝子セグメントを含み、第 3 の対立遺伝子は、マウス  $C$  遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリン  $V$  および  $J$  遺伝子セグメントを含み、第 4 および第 5 の対立遺伝子は、各々独立して、マウス重鎖遺伝子を含む内在性マウス重鎖遺伝子座に、再配列されていない  $V_H$  および  $D_H$  および  $J_H$  遺伝子セグメントを含み、そして第 6 の対立遺伝子は、(a) マウス  $C$  遺伝子を含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリン  $V$  および  $J$  遺伝子セグメントを含むか、(b) 非機能的な 遺伝子座を含むか、または (c) 遺伝子座の 1 つ以上のエレメントの欠失を含む。

20

#### 【0071】

1 つの実施形態において、上記の第 1 の対立遺伝子は、再配列されていない  $hV$  および  $hJ$  遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 2 の対立遺伝子は、再配列されていない  $hV$  および  $hJ$  遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 3 の対立遺伝子は、再配列されていない  $hV$  および  $hJ$  遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 4 および第 5 の対立遺伝子は、各々独立して、再配列されていない  $hV_H$  および  $hD_H$  および  $hJ_H$  遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 6 の対立遺伝子は、機能的にサイレンシングされた内在性マウス 遺伝子座を含む。

30

#### 【0072】

1 つの実施形態において、上記遺伝的に改変されたマウスは、マウス  $C_L$  ドメインに作動可能に接続された再配列された  $hV$  ドメインを含む再配列された抗体遺伝子を含む B 細胞を含む。1 つの実施形態において、そのマウス  $C_L$  ドメインは、マウス  $C$  およびマウス  $C$  ドメインから選択される。特定の実施形態において、そのマウス  $C$  ドメインは、 $C_2$  遺伝子に由来する。特定の実施形態において、そのマウス  $C$  ドメインは、マウス  $C_2$  と少なくとも 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% または少なくとも 98% 同一である  $C$  ドメインに由来する。

40

#### 【0073】

1 つの態様において、 $C$  である  $C_L$  において  $V$  領域を発現する遺伝的に改変されたマウスが提供される。1 つの態様において、ヒト  $C$ 、ヒト  $C$  またはマウス  $C$  から選択される  $C_L$  において  $hV$  領域を発現する遺伝的に改変されたマウスが提供される。1 つの態様において、マウス  $C$  において  $hV$  領域を発現する遺伝的に改変されたマウスが提供される。

#### 【0074】

1 つの実施形態において、上記マウスの脾細胞の約 10% ~ 50% は、B 細胞 (すなわち

50

、CD19陽性)であるか、またはその約9~28%は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【0075】

特定の実施形態において、上記マウスの脾細胞の約23~34%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であるか、またはその約9~11%は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【0076】

特定の実施形態において、上記マウスの脾細胞の約19~31%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であるか、またはその約9~17%は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

10

【0077】

特定の実施形態において、上記マウスの脾細胞の約21~38%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であるか、またはその約24~27%は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【0078】

特定の実施形態において、上記マウスの脾細胞の約10~14%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であるか、またはその約9~13%は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【0079】

特定の実施形態において、上記マウスの脾細胞の約31~48%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であるか、またはその約15~21%は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。特定の実施形態において、上記マウスの脾細胞の約30~38%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であり、その約33~48%は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

20

【0080】

1つの実施形態において、上記マウスの骨髄の約52~70%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であるか、またはその約31~47%の未熟B細胞(すなわち、CD19陽性/B220中等度陽性(intermediate positive)/IgM陽性)は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

30

【0081】

1つの実施形態において、上記マウスの骨髄の約60%は、B細胞(すなわち、CD19陽性)であるか、またはその約38.3%の未熟B細胞(すなわち、CD19陽性/B220中等度陽性/IgM陽性)は、マウスCドメインに融合されたhVドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【0082】

1つの実施形態において、上記マウスは、ヒトVおよびヒトJ遺伝子セグメントに由来する可変ドメインならびにマウス定常領域遺伝子に由来する定常ドメインを含む軽鎖を含む抗体を発現する。1つの実施形態において、そのマウス定常領域遺伝子は、C遺伝子である。別の実施形態において、そのマウス定常領域遺伝子は、C遺伝子である。特定の実施形態において、そのC領域は、C2である。特定の実施形態において、そのマウスC遺伝子は、マウスC2と少なくとも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%または少なくとも98%同一であるC遺伝子に由来する。特定の実施形態において、上記抗体は、ヒトV、ヒトDおよびヒトJ遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含む重鎖、ならびにマウス重鎖定常領域遺伝子に由来する重鎖定常ドメインをさらに含む。1つの実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定常ドメインのヒンジ-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>配列を含む。別の実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定常ドメインのCH<sub>1</sub>-ヒンジ-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>配列を含む。別の実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定

40

50

常ドメインの  $CH_1 - CH_2 - CH_3 - CH_4$  配列を含む。別の実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定常ドメインの  $CH_2 - CH_3 - CH_4$  配列を含む。

【0083】

1つの実施形態において、上記マウスは、再配列されたヒトV<sub>H</sub> - J<sub>H</sub> 配列およびマウスC<sub>H</sub> 配列を含む軽鎖を含む抗体を発現する。1つの実施形態において、その再配列されたヒトV<sub>H</sub> - J<sub>H</sub> 配列は、3 - 1、4 - 3、2 - 8、3 - 9、3 - 10、2 - 14、3 - 19、2 - 23、3 - 25、1 - 40、7 - 43、1 - 44、5 - 45、7 - 46、1 - 47、9 - 49および1 - 51遺伝子セグメントから選択されるhV<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの再配列に由来する。1つの実施形態において、その再配列されたヒトV<sub>H</sub> - J<sub>H</sub> 配列は、J<sub>H</sub> 1、J<sub>H</sub> 2、J<sub>H</sub> 3およびJ<sub>H</sub> 7遺伝子セグメントから選択されるhJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの再配列に由来する。

10

【0084】

1つの実施形態において、上記マウスは、3 - 1 / 1、3 - 1 / 7、4 - 3 / 1、4 - 3 / 7、2 - 8 / 1、3 - 9 / 1、3 - 10 / 1、3 - 10 / 3、3 - 10 / 7、2 - 14 / 1、3 - 19 / 1、2 - 23 / 1、3 - 25 / 1、1 - 40 / 1、1 - 40 / 2、1 - 40 / 3、1 - 40 / 7、7 - 43 / 1、7 - 43 / 3、1 - 44 / 1、1 - 44 / 7、5 - 45 / 1、5 - 45 / 2、5 - 45 / 7、7 - 46 / 1、7 - 46 / 2、7 - 46 / 7、9 - 49 / 1、9 - 49 / 2、9 - 49 / 7および1 - 51 / 1から選択されるヒトV<sub>H</sub> / J<sub>H</sub> 配列を含む再配列された免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む軽鎖を含む抗体を発現する。特定の実施形態において、B細胞は、マウス重鎖定常ドメインと融合されたヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインおよびマウス 軽鎖定常ドメインと融合されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む抗体を発現する。

20

【0085】

1つの態様において、(a)再配列されていないヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントに由来する重鎖可変ドメインを含む重鎖(ここで、その重鎖可変ドメインは、マウス重鎖定常(C<sub>H</sub>)領域に融合されている)；および(b)再配列されていないhV<sub>H</sub> およびhJ<sub>H</sub> に由来する軽鎖可変ドメインを含む軽鎖(ここで、その軽鎖可変ドメインは、マウスC<sub>L</sub>領域に融合されている)を含む抗体を発現するマウスが提供される。

【0086】

1つの実施形態において、上記マウスは、(i)すべてまたは実質的にすべての機能的なヒトV<sub>H</sub>、DおよびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウスV<sub>H</sub>、DおよびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの置換、マウスC<sub>H</sub> 遺伝子を含む重鎖遺伝子座、(ii)すべて、実質的にすべてまたは複数の機能的なhV<sub>H</sub> およびhJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウスV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの置換、ならびにマウスC<sub>H</sub> 遺伝子を含む第1の 軽鎖遺伝子座、(iii)すべて、実質的にすべてまたは複数の機能的なhV<sub>H</sub> およびhJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウスV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの置換、ならびにマウスC<sub>H</sub> 遺伝子を含む第2の 軽鎖遺伝子座を含む。1つの実施形態において、上記マウスは、C<sub>H</sub> 領域を含む抗体を発現しない。1つの実施形態において、上記マウスは、C<sub>H</sub> 遺伝子および/またはV<sub>H</sub> および/またはJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの欠失を含む。1つの実施形態において、上記マウスは、非機能的な 軽鎖遺伝子座を含む。特定の実施形態において、その 軽鎖遺伝子座は、全体的にまたは部分的に欠失されている。

30

40

【0087】

1つの実施形態において、上記マウスは、(i)すべてまたは実質的にすべての機能的なヒトV<sub>H</sub>、DおよびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウスV<sub>H</sub>、DおよびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの置換、マウスC<sub>H</sub> 遺伝子を含む重鎖遺伝子座、(ii)すべて、実質的にすべてまたは複数の機能的なhV<sub>H</sub> およびhJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウスV<sub>H</sub> およびJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの置換ならびにマウスC<sub>H</sub> 遺伝子を含む第1の 軽鎖遺伝子座、(iii)

50

すべて、実質的にすべてまたは複数の機能的なhV およびhJ 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウスV およびJ 遺伝子セグメントの置換ならびにマウスC 遺伝子を含む第2の 軽鎖遺伝子座を含む。特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、C 2である。特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、マウスC 2と少なくとも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%または少なくとも98%同一であるC 遺伝子に由来する。

#### 【0088】

1つの実施形態において、上記マウスは、C 遺伝子および/またはV および/またはJ 遺伝子セグメントの欠失を含む。1つの実施形態において、上記マウスは、非機能的な 軽鎖遺伝子座を含む。

10

#### 【0089】

1つの態様において、抗体を発現する遺伝的に改変されたマウスが提供され、ここで、そのマウスによって産生される全IgG抗体の10%超、15%超、20%超、25%超、30%超、35%超、40%超、60%超、70%超、80%超または90%超が、由来の可変ドメインを含み、そのマウスは、マウスC 領域と融合された 由来の可変ドメインを含む抗体を発現する。特定の実施形態において、そのマウスによって産生される全抗体の約15~40%、20~40%、25~40%、30~40%または35~40%が、 由来の可変ドメインを含む。

#### 【0090】

20

1つの実施形態において、上記の 由来の可変ドメインは、hV およびhJ に由来する。1つの実施形態において、上記の 由来の可変ドメインは、マウスC 領域を含む軽鎖に存在する。特定の実施形態において、上記の 由来の可変領域は、マウスC 領域を含む軽鎖に存在する。別の特定の実施形態において、そのC 領域は、C 2領域である。1つの実施形態において、 由来の可変ドメインは、hV およびhJ に由来し、特定の実施形態では、マウスC 領域を含む軽鎖に存在する。

#### 【0091】

1つの態様において、上流の相同性アーム(homology arm)および下流の相同性アームを含む単離されたDNA構築物が提供され、ここで、その上流および下流の相同性アームは、その構築物をマウス 遺伝子座に標的化し、その構築物は、機能的な再配列されていないhV セグメントおよび機能的な再配列されていないhJ セグメントならびに選択配列またはマーカー配列を含む。

30

#### 【0092】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、マウスV 2の上流のマウス 配列を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにマウスJ 2の3'側のマウス 配列を標的化するための標的化アームを含む単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれた(Frt'ed)Hyg-TKカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウスC 2、J 4、C 4およびマウスエンハンサー2、4を含む。

40

#### 【0093】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、V 1に対して5'側のマウス 遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにマウスC 1に対して3'側のマウス 配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、loxで挟まれた(loxed)ネオマイシンカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウス 3'エンハンサーおよびマウス 3'エンハンサー3、1を含む。

#### 【0094】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、V 2に対して5

50

側側のマウス 遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにマウスJ 2に対して3'側かつマウスC 2に対して5'側のマウス 配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたハイグロマイシン-TKカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウスC 2-J 4-C 4遺伝子セグメントおよびマウスエンハンサー2.4を含む。

#### 【0095】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、V 2に対して5'側のマウス 遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、hJ 1の末端に対して下流にhV 3-12由来のヒト 軽鎖遺伝子座の連続する領域を含むヒトゲノムフラグメント、ならびにマウスJ 2に対して3'側のマウス 配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたネオマイシンカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウスC 2-J 4-C 4遺伝子セグメントおよびマウスエンハンサー2.4を含む。

10

#### 【0096】

1つの態様において、hJ 1の末端に対して下流にhV 3-12由来のヒト 軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む、単離されたDNA構築物が提供される。

20

#### 【0097】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、V 2に対して5'側のマウス 遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにhV 2-8の末端に対して下流のhV 3-27由来のヒト 軽鎖遺伝子座の連続した領域を含むヒトゲノムフラグメントを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたハイグロマイシンカセットである。1つの実施形態において、そのヒトゲノムフラグメントは、3'標的化アームを構成する。特定の実施形態において、その3'標的化アームは、hV 2-8の末端に対して下流にhV 3-12由来の約53kbのヒト 軽鎖遺伝子座を含む。

30

#### 【0098】

1つの態様において、hV 3-12の末端に対して下流にhV 3-27由来のヒト 軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む、単離されたDNA構築物が提供される。

#### 【0099】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、V 2に対して5'側のマウス 遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、hV 1-40の末端の下流にhV 5-52由来のヒト 軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む第1のヒトゲノムフラグメント、制限酵素部位、ならびにhV 82Kの末端に対して下流にhV 3-29由来のヒト 軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む第2のヒトゲノムフラグメントを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたネオマイシンカセットである。1つの実施形態において、その制限酵素部位は、ホーミングエンドヌクレアーゼ(homing endonuclease)のための部位である。特定の実施形態において、そのホーミングエンドヌクレアーゼは、PI-Scelである。1つの(on)実施形態において、上記の第2のヒトゲノムフラグメントは、3'標的化アームである。特定の実施形態において、その3'標的化アームは、hV 82Kの末端に対して下流にhV 3-29由来の約27kbのヒト 軽鎖遺伝子座を含む。

40

#### 【0100】

1つの態様において、hV 1-40の末端に対して下流にhV 5-52由来のヒト 軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む、単離されたDNA構築物が提供される。

50

## 【0101】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、内在性V 遺伝子セグメントに対して5'側のマウス 遺伝子座を標的化するための標的化アーム、2個の並置されたリコンビナーゼ認識部位、その並置されたリコンビナーゼ認識部位に対して3'側の選択カセット、および 軽鎖可変遺伝子セグメントに対して5'側のマウス 配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その並置されたリコンビナーゼ認識部位は、互いに対して逆の向きである。特定の実施形態において、上記リコンビナーゼ認識部位は、異なる。別の特定の実施形態において、そのリコンビナーゼ認識部位は、10xP部位および10x511部位である。1つの実施形態において、選択カセットは、ネオマイシンカセットである。

10

## 【0102】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、マウスJ 遺伝子セグメントに対して5'側のマウス 遺伝子座を標的化するための標的化アーム、選択カセット、その選択カセットに対して3'側のリコンビナーゼ認識部位、およびマウスJ 遺伝子セグメントに対して3'側かつマウス イントロンエンハンサーに対して5'側のマウス 配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、ハイグロマイシン-TKカセットである。1つの実施形態において、そのリコンビナーゼ認識部位は、転写に関して選択カセットと同じ向きである。特定の実施形態において、そのリコンビナーゼ認識部位は、10xP部位である。

20

## 【0103】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、内在性マウスV 遺伝子セグメントの5'側の配列を含む第1のマウスゲノムフラグメント、第1の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、および内在性マウスJ 遺伝子セグメントの3'側かつマウス イントロンエンハンサーの5'側の配列を含む第2のマウスゲノムフラグメントを含む、単離されたDNA構築物が提供される。

## 【0104】

1つの態様において、遺伝的に改変されたマウスが提供され、ここで、その遺伝的改変は、上または本明細書中に記載されるDNA構築物の1つ以上による改変を含む。

## 【0105】

1つの態様において、本明細書中に記載されるようなマウスを作製するための単離されたDNA構築物の使用が提供される。1つの態様において、抗原結合タンパク質を作製するための方法における本明細書中に記載されるような単離されたDNA構築物の使用が提供される。

30

## 【0106】

1つの態様において、上および本明細書中に記載されるようなDNA構築物を含む標的化ベクターを含む非ヒト幹細胞が提供される。1つの態様において、非ヒト幹細胞が提供され、ここで、その非ヒト幹細胞は、本明細書中に記載されるマウスに由来する。

## 【0107】

1つの実施形態において、上記非ヒト幹細胞は、胚性幹(ES)細胞である。特定の実施形態において、そのES細胞は、マウスES細胞である。

40

## 【0108】

1つの態様において、本明細書中に記載されるようなマウスを作製するための本明細書中に記載されるような非ヒト幹細胞の使用が提供される。1つの態様において、抗原結合タンパク質を作製するための本明細書中に記載されるような非ヒト幹細胞の使用が提供される。

## 【0109】

1つの態様において、マウス胚が提供され、ここで、そのマウス胚は、本明細書中に提供されるような遺伝的改変を含む。1つの実施形態において、ドナーES細胞を含む宿主マウス胚が提供され、ここで、そのドナーES細胞は、本明細書中に記載されるような遺

50

伝的改変を含む。1つの実施形態において、上記マウス胚は、前桑実胚 (pre-morula) の段階の胚である。特定の実施形態において、その前桑実胚の段階の胚は、4細胞期の胚または8細胞期の胚である。別の特定の実施形態において、上記マウス胚は、胚盤胞である。

#### 【0110】

1つの態様において、本明細書中に記載されるようなマウスを作製するための本明細書中に記載されるようなマウス胚の使用が提供される。1つの態様において、抗原結合タンパク質を作製するための本明細書中に記載されるようなマウス胚の使用が提供される。

#### 【0111】

1つの態様において、非ヒト細胞が提供され、ここで、その非ヒト細胞は、本明細書中に記載されるような遺伝的に改変されたマウスに由来する再配列された免疫グロブリン軽鎖遺伝子配列を含む。1つの実施形態において、その細胞は、B細胞である。1つの実施形態において、その細胞は、ハイブリドーマである。1つの実施形態において、その細胞は、体細胞変異した、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインおよび/または免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする。

10

#### 【0112】

1つの態様において、非ヒト細胞が提供され、ここで、その非ヒト細胞は、本明細書中に記載されるような遺伝的に改変されたマウスに由来する再配列された免疫グロブリン軽鎖遺伝子配列を含む。1つの実施形態において、その細胞は、B細胞である。1つの実施形態において、その細胞は、ハイブリドーマである。1つの実施形態において、その細胞は、体細胞変異した、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインおよび/または免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする。

20

#### 【0113】

1つの態様において、本明細書中に記載されるようなマウスを作製するための本明細書中に記載されるような非ヒト細胞の使用が提供される。1つの態様において、抗原結合タンパク質を作製するための本明細書中に記載されるような非ヒト細胞の使用が提供される。

#### 【0114】

1つの態様において、(a) hV 遺伝子セグメントおよびhJ 遺伝子セグメントに由来する可変領域；ならびに(b) マウスC<sub>L</sub> 遺伝子を含む免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスB細胞が提供される。1つの実施形態において、そのマウスC<sub>L</sub> 遺伝子は、C<sub>1</sub> およびC<sub>2</sub> 遺伝子から選択される。特定の実施形態において、そのC<sub>1</sub> 遺伝子は、C<sub>2</sub> である。特定の実施形態において、上記マウスC<sub>1</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>2</sub> と少なくとも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%または少なくとも98%同一であるC<sub>1</sub> 遺伝子に由来する。1つの実施形態において、上記マウスB細胞は、さらに、(c) hV<sub>H</sub>、hD<sub>H</sub> に由来する可変領域および(d) hJ<sub>H</sub> セグメントを含む同族重鎖を発現する。1つの実施形態において、上記B細胞は、再配列された遺伝子を含まない。別の実施形態において、上記B細胞は、再配列された遺伝子を含まない。

30

#### 【0115】

1つの態様において、遺伝的に改変されたマウスにおいて抗体を作製するための方法が提供され、その方法は：(a) 遺伝的に改変されたマウスを抗原に曝露する工程（ここで、そのマウスは、内在性軽鎖遺伝子座に少なくとも1つのhV および少なくとも1つのhJ を含むゲノムを有し、その内在性軽鎖遺伝子座は、マウスC<sub>L</sub> 遺伝子を含む）；(b) その遺伝的に改変されたマウスにその抗原に対する免疫応答を生じさせる工程；および(c) (b) のマウスから、その抗原を特異的に認識する抗体を単離する工程、または(b) のマウスから、その抗原を特異的に認識する免疫グロブリンドメインを含む細胞を単離する工程（ここで、その抗体は、hV、hJ およびマウスC<sub>L</sub> 遺伝子に由来する軽鎖を含む）を包含する。特定の実施形態において、上記マウスC<sub>L</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>1</sub> 遺伝子である。

40

50

## 【0116】

1つの実施形態において、遺伝的に改変されたマウスにおいて抗体を作製するための方法が提供され、その方法は：(a) 遺伝的に改変されたマウスを抗原に曝露する工程（ここで、そのマウスは、内在性 遺伝子座に少なくとも1つのh V を含みかつその 遺伝子座に少なくとも1つのh J を含むゲノムを有し、その 遺伝子座は、マウスC 遺伝子を含む）；(b) その遺伝的に改変されたマウスにその抗原に対する免疫応答を生じさせる工程；および(c) (b) のマウスから、その抗原を特異的に認識する抗体を単離する工程、または(b) のマウスから、その抗原を特異的に認識する免疫グロブリンドメインを含む細胞を単離する工程（ここで、その抗体は、h V 、h J およびマウスC 遺伝子に由来する軽鎖を含む）を包含する。

10

## 【0117】

1つの実施形態において、上記 軽鎖定常遺伝子は、ヒトC 遺伝子およびマウスC 遺伝子から選択される。

## 【0118】

1つの実施形態において、遺伝的に改変されたマウスにおいて抗体を作製するための方法が提供され、その方法は：(a) 遺伝的に改変されたマウスを抗原に曝露する工程（ここで、そのマウスは、 軽鎖遺伝子座に少なくとも1つのh V を含み、かつその 軽鎖遺伝子座に少なくとも1つのJ を含むゲノムを有し、その 軽鎖遺伝子座は、マウスC 遺伝子を含む）；(b) その遺伝的に改変されたマウスにその抗原に対する免疫応答を生じさせる工程；および(c) (b) のマウスから、その抗原を特異的に認識する抗体を単離する工程、または(b) のマウスからその抗原を特異的に認識する免疫グロブリンドメインを含む細胞を単離する工程、またはBのマウスにおいて、その抗原に結合する重鎖および/または軽鎖可変ドメインをコードする核酸配列を特定する工程（ここで、その抗体は、h V 、h J およびマウスC 遺伝子に由来する軽鎖を含む）を包含する。

20

## 【0119】

1つの実施形態において、上記 軽鎖定常遺伝子は、ヒトC 遺伝子およびマウスC 遺伝子から選択される。1つの実施形態において、上記 軽鎖定常遺伝子は、ヒトC 遺伝子である。特定の実施形態において、そのヒトC 遺伝子は、C 1、C 2、C 3 およびC 7 から選択される。1つの実施形態において、上記 軽鎖定常遺伝子は、マウスC 遺伝子である。特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、C 1、C 2 およびC 3 から選択される。より特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、C 2 である。別の特定の実施形態において、そのマウスC 遺伝子は、マウスC 2 と少なくとも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%または少なくとも98%同一であるC 遺伝子に由来する。

30

## 【0120】

1つの態様において、遺伝的に改変されたマウスにおいて再配列された抗体遺伝子を作製するための方法が提供され、その方法は：(a) 遺伝的に改変されたマウスを抗原に曝露する工程（ここで、その遺伝的改変は、内在性軽鎖遺伝子座にh V およびh J を含み、その内在性軽鎖遺伝子座は、マウスC<sub>L</sub> 遺伝子またはその機能的なフラグメントを含む）；および(b) 前記マウスにおいて再配列された免疫グロブリン遺伝子を特定する工程（ここで、その再配列された免疫グロブリン遺伝子は、 軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよびC<sub>L</sub> 遺伝子またはその機能的なフラグメントを含む）を包含する。

40

## 【0121】

1つの実施形態において、上記方法はさらに、上記マウスから重鎖および/または軽鎖可変領域をコードする核酸配列をクローニングする工程を包含し、ここで、その重鎖および/または軽鎖可変領域は、ヒトV およびマウスC<sub>L</sub> を含む抗体に由来する。

## 【0122】

1つの実施形態において、上記マウスC<sub>L</sub> 遺伝子またはその機能的なフラグメントは、ヒトC<sub>L</sub> 遺伝子およびマウスC<sub>L</sub> 遺伝子またはそれらの機能的なフラグメントから選択される。

50

## 【 0 1 2 3 】

1つの実施形態において、遺伝的に改変されたマウスにおいて再配列された抗体遺伝子を作製するための方法が提供され、その方法は：（a）遺伝的に改変されたマウスを抗原に曝露する工程（ここで、その遺伝的改変は、軽鎖遺伝子座にhV およびhJ を含み、その軽鎖遺伝子座は、マウスC 遺伝子またはその機能的なフラグメントを含む）；および（b）前記マウスにおいて再配列された免疫グロブリン遺伝子を特定する工程（ここで、その再配列された免疫グロブリン遺伝子は、軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよびC 遺伝子またはその機能的なフラグメントを含む）を包含する。

## 【 0 1 2 4 】

1つの実施形態において、上記軽鎖定常遺伝子またはその機能的なフラグメントは、ヒトC 遺伝子およびマウスC 遺伝子またはそれらの機能的なフラグメントから選択される。

10

## 【 0 1 2 5 】

1つの実施形態において、上記方法はさらに、上記マウスから重鎖および/または軽鎖可変領域をコードする核酸配列をクローニングする工程を包含し、ここで、その重鎖および/または軽鎖可変領域は、ヒトV およびマウスC を含む抗体に由来する。

## 【 0 1 2 6 】

1つの実施形態において、遺伝的に改変されたマウスにおいて再配列された抗体遺伝子を作製するための方法が提供され、その方法は：（a）遺伝的に改変されたマウスを抗原に曝露する工程（ここで、その遺伝的改変は、マウス軽鎖遺伝子座にhV およびhJ を含み、その軽鎖遺伝子座は、マウスC 遺伝子またはその機能的なフラグメントを含む）；および（b）前記マウスにおいて再配列された免疫グロブリン遺伝子を特定する工程（ここで、その再配列された免疫グロブリン遺伝子は、軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよびC 遺伝子またはその機能的なフラグメントを含む）を包含する。

20

## 【 0 1 2 7 】

1つの実施形態において、上記軽鎖定常遺伝子またはその機能的なフラグメントは、ヒトC 遺伝子およびマウスC 遺伝子またはそれらの機能的なフラグメントから選択される。特定の実施形態において、上記軽鎖定常遺伝子は、マウスC 遺伝子またはその機能的なフラグメントである。

## 【 0 1 2 8 】

1つの実施形態において、上記方法は、重鎖および/または軽鎖可変領域をコードする核酸配列を上記マウスからクローニングする工程をさらに包含し、ここで、その重鎖および/または軽鎖可変領域は、ヒトV およびマウスC を含む抗体に由来する。

30

## 【 0 1 2 9 】

1つの態様において、抗体を作製するための方法が提供され、その方法は、本明細書中に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程、そのマウスに、その抗原に特異的に結合する抗体の産生を含む免疫応答を開始させる工程、そのマウス内の重鎖をコードする再配列された核酸配列およびそのマウス内の抗体の同族軽鎖可変ドメイン配列をコードする再配列された核酸配列を特定する工程（ここで、その抗体は、その抗原に特異的に結合する）、ならびにヒト定常ドメインに融合された重鎖および軽鎖可変ドメインの核酸配列を使用して、所望の抗体を作製する工程（ここで、その所望の抗体は、C<sub>L</sub>ドメインに融合されたV<sub>H</sub>ドメインを含む軽鎖を含む）を包含する。1つの実施形態において、そのV<sub>H</sub>ドメインは、ヒトのドメインであり、C<sub>L</sub>ドメインは、ヒトまたはマウスのC<sub>L</sub>ドメインである。1つの実施形態において、そのV<sub>H</sub>ドメインは、マウスのドメインであり、C<sub>L</sub>ドメインは、ヒトまたはマウスのC<sub>L</sub>ドメインである。

40

## 【 0 1 3 0 】

1つの実施形態において、抗体を作製するための方法が提供され、その方法は、本明細書中に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程、そのマウスに、その抗原に特異的に結合する抗体の産生を含む免疫応答を開始させる工程、そのマウス内の重鎖をコードする再配列された核酸配列およびそのマウス内の抗体の同族軽鎖可変ドメイン配列をコード

50

する再配列された核酸配列を特定する工程（ここで、その抗体は、その抗原に特異的に結合する）、ならびにヒト定常ドメインの核酸配列に融合された重鎖および軽鎖可変ドメインの核酸配列を使用して、所望の抗体を作製する工程（ここで、その所望の抗体は、Cドメインに融合されたVドメインを含む軽鎖を含む）を包含する。

【0131】

1つの実施形態において、抗体を作製するための方法が提供され、その方法は、本明細書中に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程、そのマウスに、その抗原に特異的に結合する抗体の産生を含む免疫応答を開始させる工程、そのマウス内の重鎖可変ドメインをコードする再配列された核酸配列および抗体の同族軽鎖可変ドメイン配列をコードする再配列された核酸配列を特定する工程（ここで、その抗体は、その抗原に特異的に結合する）、ならびにヒト重鎖定常ドメインおよびヒト軽鎖定常ドメインをコードする核酸配列に融合された核酸配列を使用して、ヒト配列に由来する抗体を作製する工程（ここで、その抗原に特異的に結合する抗体は、マウスC領域に融合されたヒトVドメインを含む軽鎖を含む）を包含する。

10

【0132】

1つの実施形態において、上記マウスC領域は、C1、C2およびC3から選択される。特定の実施形態において、上記マウスC領域は、C2である。

【0133】

1つの態様において、再配列された抗体軽鎖可変領域遺伝子配列を作製するための方法が提供され、その方法は、（a）本明細書中に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程；（b）そのマウスに免疫応答を開始させる工程；（c）マウスC<sub>L</sub>ドメインと融合された再配列されたヒトVドメイン配列をコードする核酸配列を含む細胞をそのマウスにおいて特定する工程（ここで、その細胞は、ヒトV<sub>H</sub>ドメインおよびマウスC<sub>H</sub>ドメインを含む同族重鎖もコードし、その細胞は、その抗原に結合する抗体を発現する）；（d）その細胞からヒトVドメインをコードする核酸配列および同族ヒトV<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸配列をクローニングする工程；および（e）ヒトVドメインをコードするクローニングされた核酸配列および同族ヒトV<sub>H</sub>ドメインをコードするクローニングされた核酸配列を使用して、完全ヒト抗体を作製する工程を包含する。

20

【0134】

1つの実施形態において、再配列された抗体軽鎖可変領域遺伝子配列を作製するための方法が提供され、その方法は、（a）本開示に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程；（b）そのマウスに免疫応答を開始させる工程；（c）マウスCドメインをコードする核酸配列と、同じ核酸分子上で連続する再配列されたヒトVドメイン配列をコードする核酸配列を含む細胞をそのマウスにおいて特定する工程（ここで、その細胞は、ヒトV<sub>H</sub>ドメインおよびマウスC<sub>H</sub>ドメインを含む同族重鎖もコードし、その細胞は、その抗原に結合する抗体を発現する）；（d）その細胞からヒトVドメインをコードする核酸配列および同族ヒトV<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸配列をクローニングする工程；および（e）ヒトVドメインをコードするクローニングされた核酸配列および同族ヒトV<sub>H</sub>ドメインをコードするクローニングされた核酸配列を使用して、完全ヒト抗体を作製する工程を包含する。

30

40

【0135】

1つの実施形態において、再配列された抗体軽鎖可変領域遺伝子配列を作製するための方法が提供され、その方法は、（a）本明細書中に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程；（b）そのマウスにその抗原に対する免疫応答を開始させる工程；（c）マウスCドメインと融合された再配列されたヒトVドメイン配列をコードするDNAを含む細胞をそのマウスにおいて特定する工程（ここで、その細胞は、ヒトV<sub>H</sub>ドメインおよびマウスC<sub>H</sub>ドメインを含む同族重鎖もコードし、その細胞は、その抗原に結合する抗体を発現する）；（d）その細胞から、再配列されたヒトVドメインをコードする核酸配列および同族ヒトV<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸配列をクローニングする工程；および（e）ヒトVドメインをコードするクローニングされた核酸配列および同族ヒトV<sub>H</sub>ドメ

50

インをコードするクローニングされた核酸配列を使用して、完全ヒト抗体を作製する工程を包含する。1つの実施形態において、上記マウスC<sub>L</sub>ドメインは、マウスC<sub>2</sub>である。特定の実施形態において、上記マウスC<sub>L</sub>ドメインは、マウスC<sub>2</sub>と少なくとも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%または少なくとも98%同一であるC<sub>L</sub>遺伝子に由来する。

【0136】

1つの態様において、内在性軽鎖定常領域(C<sub>L</sub>)に融合されたヒト由来の軽鎖を発現する遺伝的に改変されたマウスが提供され、ここで、そのマウスは、抗原で免疫されると、マウスC<sub>L</sub>ドメインに融合されたヒトV<sub>H</sub>ドメインを含む抗体を産生する。1つの実施形態において、そのマウスC<sub>L</sub>ドメインは、C<sub>L</sub>ドメインおよびC<sub>H</sub>ドメインから選択される。1つの実施形態において、そのマウスC<sub>L</sub>ドメインは、C<sub>L</sub>ドメインである。1つの実施形態において、そのマウスC<sub>L</sub>ドメインは、C<sub>L</sub>ドメインである。特定の実施形態において、そのC<sub>L</sub>ドメインは、C<sub>2</sub>である。特定の実施形態において、そのマウスC<sub>L</sub>ドメインは、マウスC<sub>2</sub>と少なくとも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%または少なくとも98%同一であるC<sub>L</sub>遺伝子に由来する。

【0137】

1つの態様において、複数の免疫グロブリン重鎖と会合される複数の免疫グロブリン軽鎖を発現する、本明細書中に記載されるような改変された内在性または軽鎖遺伝子座を含む遺伝的に改変されたマウスが提供される。1つの実施形態において、その重鎖は、ヒト配列を含む。様々な実施形態において、そのヒト配列は、可変配列、C<sub>H1</sub>、ヒンジ、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>およびそれらの組み合わせから選択される。1つの実施形態において、複数の免疫グロブリン軽鎖は、ヒト配列を含む。様々な実施形態において、そのヒト配列は、可変配列、定常配列およびそれらの組み合わせから選択される。1つの実施形態において、上記マウスは、無能力にされた(disabled)内在性免疫グロブリン遺伝子座を含み、導入遺伝子または染色体外エピソームから重鎖および/または軽鎖を発現する。1つの実施形態において、上記マウスは、一部もしくは全部の内在性マウス重鎖遺伝子セグメント(すなわち、V、D、J)、および/または一部もしくは全部の内在性マウス重鎖定常配列(例えば、C<sub>H1</sub>、ヒンジ、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>またはそれらの組み合わせ)および/または一部もしくは全部の内在性マウス軽鎖配列(例えば、V、J、定常またはそれらの組み合わせ)の内在性マウス遺伝子座に、1つ以上のヒト免疫グロブリン配列による置換を含む。

【0138】

1つの態様において、ヒト由来の軽鎖を有する抗体の作製に適したマウスが提供され、ここで、そのマウスにおいて産生されるすべてまたは実質的にすべての抗体は、ヒト由来の軽鎖とともに発現される。1つの実施形態において、そのヒト由来の軽鎖は、内在性軽鎖遺伝子座から発現される。1つの実施形態において、その内在性軽鎖遺伝子座は、軽鎖遺伝子座である。特定の実施形態において、その軽鎖遺伝子座は、マウス軽鎖遺伝子座である。

【0139】

1つの態様において、ヒト抗体用のヒト由来軽鎖を作製するための方法が提供され、その方法は、本明細書中に記載されるようなマウスから軽鎖配列および重鎖配列を得る工程、ならびにヒト抗体を作製する際にその軽鎖配列および重鎖配列を使用する工程を包含する。

【0140】

1つの態様において、抗原結合タンパク質を作製するための方法が提供され、その方法は、本明細書中に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程；そのマウスに免疫応答を開始させる工程；およびその抗原に結合する抗原結合タンパク質をそのマウスから得る工程、またはその抗原に結合する抗原結合タンパク質を作製する際に使用される配列をそのマウスから得る工程を包含する。

## 【 0 1 4 1 】

1つの態様において、本明細書中に記載されるようなマウスに由来する細胞が提供される。1つの実施形態において、その細胞は、胚性幹細胞、多能性細胞、誘導多能性細胞、B細胞およびハイブリドーマから選択される。

## 【 0 1 4 2 】

1つの態様において、本明細書中に記載されるような遺伝的改変を含む細胞が提供される。1つの実施形態において、その細胞は、マウス細胞である。1つの実施形態において、その細胞は、ハイブリドーマおよびクアドローマから選択される。1つの実施形態において、その細胞は、マウス定常配列と融合されたヒト 可変配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。特定の実施形態において、そのマウス定常配列は、マウス 定常配列である。

10

## 【 0 1 4 3 】

1つの態様において、本明細書中に記載されるようなマウスに由来する組織が提供される。

## 【 0 1 4 4 】

1つの態様において、抗原結合タンパク質を作製するための本明細書中に記載されるようなマウスまたは細胞の使用が提供される。1つの実施形態において、その抗原結合タンパク質は、ヒトタンパク質である。1つの実施形態において、そのヒトタンパク質は、ヒト抗体である。

## 【 0 1 4 5 】

20

1つの態様において、本明細書中に記載されるようなマウス、細胞、組織または方法によって作製される抗原結合タンパク質が提供される。1つの実施形態において、その抗原結合タンパク質は、ヒトタンパク質である。1つの実施形態において、そのヒトタンパク質は、ヒト抗体である。

## 【 0 1 4 6 】

一実施形態において、本願は例えば以下の項目を提供する。

( 項目 1 )

マウス免疫グロブリン 軽鎖定常領域の核酸配列と連続する、免疫グロブリン 軽鎖可変領域の核酸配列 ( V ) および少なくとも1つのJの核酸配列 ( J ) を含む、マウス。

( 項目 2 )

30

前記マウスが、機能的なマウスV 遺伝子セグメントおよび/または機能的なマウスJ 遺伝子セグメントを欠く、項目1に記載のマウス。

( 項目 3 )

前記V がヒトV ( h V ) であり、前記JがヒトJ ( h J ) である、項目1に記載のマウス。

( 項目 4 )

前記h V および前記h J が再配列されていない遺伝子セグメントである、項目3に記載のマウス。

( 項目 5 )

再配列されていない複数のh V 遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのh J 遺伝子セグメントを含む、項目4に記載のマウス。

40

( 項目 6 )

前記再配列されていない複数のh V 遺伝子セグメントが、少なくとも12個の遺伝子セグメント、少なくとも28個の遺伝子セグメント、または少なくとも40個の遺伝子セグメントである、項目5に記載のマウス。

( 項目 7 )

前記少なくとも1つのh J 遺伝子セグメントが、J 1、J 2、J 3、J 7、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目3に記載のマウス。

( 項目 8 )

内在性マウス免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座が、全体的にまたは部分的に欠失される、

50

項目 1 に記載のマウス。

( 項目 9 )

前記マウス免疫グロブリン 軽鎖定常領域の核酸配列が、内在性マウス免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に存在する、項目 1 に記載のマウス。

( 項目 1 0 )

前記マウスの B 細胞のうち約 1 0 % ~ 約 4 5 % が、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変 ( V ) ドメインおよびマウス免疫グロブリン 軽鎖定常 ( C ) ドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を含む抗体を発現する、項目 1 に記載のマウス。

( 項目 1 1 )

前記ヒト 可変ドメインが、以下：

【化 1】

Vλ3-1/Jλ1, Vλ3-

1/Jλ7, Vλ4-3/Jλ1, Vλ4-3/Jλ7, Vλ2-8/Jλ1, Vλ3-9/Jλ1, Vλ3-10/Jλ1, Vλ3-10/Jλ3, Vλ3-10/Jλ7, Vλ2-14/Jλ1, Vλ3-19/Jλ1, Vλ2-23/Jλ1, Vλ3-25/Jλ1, Vλ1-40/Jλ1, Vλ1-40/Jλ2, Vλ1-40/Jλ3, Vλ1-40/Jλ7, Vλ7-43/Jλ1, Vλ7-43/Jλ3, Vλ1-44/Jλ1, Vλ1-44/Jλ7, Vλ5-45/Jλ1, Vλ5-45/Jλ2, Vλ5-45/Jλ7, Vλ7-46/Jλ1, Vλ7-46/Jλ2, Vλ7-46/Jλ7, Vλ9-49/Jλ1, Vλ9-49/Jλ2, Vλ9-49/Jλ7 および Vλ1-51/Jλ1

からなる群より選択される再配列された h V / h J の核酸配列に由来する、項目 1 0 に記載のマウス。

( 項目 1 2 )

ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座由来のヒト V - J 遺伝子間領域をさらに含む、項目 1 に記載のマウスであって、ここで、該ヒト V - J 遺伝子間領域は、前記 V の核酸配列および前記 J の核酸配列と連続する、マウス。

( 項目 1 3 )

前記ヒト V - J 遺伝子間領域は、前記 V の核酸配列と前記 J の核酸配列との間に配置される、項目 1 2 に記載のマウス。

( 項目 1 4 )

( a ) 内在性マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座における、少なくとも 1 2 個 ~ 少なくとも 4 0 個の再配列されていないヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよび少なくとも 1 つのヒト J 遺伝子セグメント；

( b ) 該少なくとも 1 2 個 ~ 少なくとも 4 0 個のヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントと該少なくとも 1 つのヒト J の核酸配列との間に配置されたヒト V - J 遺伝子間配列；

を含むマウスであって、ここで、該マウスは、ヒト V ドメインおよびマウス C ドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を含む抗体を発現する、マウス。

( 項目 1 5 )

免疫グロブリン 可変配列および免疫グロブリン 軽鎖定常配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む抗体を発現するマウス。

( 項目 1 6 )

前記マウスが、約 1 : 1 という の使用頻度と の使用頻度との比を示す、項目 1 5 に記載のマウス。

( 項目 1 7 )

前記マウスの骨髓から得られる未熟 B 細胞の集団が、約 1 : 1 という の使用頻度と の使用頻度との比を示す、項目 1 6 に記載のマウス。

( 項目 1 8 )

抗原結合タンパク質を作製するための、項目 1 ~ 1 7 に記載されたマウスの使用。

( 項目 1 9 )

10

20

30

40

50

項目 1 ~ 17 に記載されたマウスを使用して作製された抗原結合タンパク質。

(項目 20)

項目 1 ~ 17 に記載されたマウスに由来する、細胞または組織であって、該細胞は、内在性免疫グロブリン 軽鎖定常領域の核酸配列と連続する、免疫グロブリン 軽鎖可変領域の核酸配列 (V) および少なくとも 1 つの J の核酸配列 (J) を含む、細胞または組織。

(項目 21)

目的の抗原に結合する、体細胞変異した抗体を作製するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 項目 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のマウスを、目的の抗原に曝露する工程；
  - (b) (a) のマウスの 1 以上の B リンパ球を取得する工程であって、該 1 以上の B リンパ球は、該目的の抗原に結合する抗体を産生する、工程；ならびに
  - (c) (b) の抗体の免疫グロブリン軽鎖をコードする核酸配列を特定する工程であって、該免疫グロブリン軽鎖は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインおよびマウス免疫グロブリン 定常ドメインを含む、工程；ならびに
  - (d) ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域の核酸配列と、(c) の核酸配列を使用して、該目的の抗原に結合するヒト抗体を作製する工程
- を包含する、方法。

10

別段示されないかまたは文脈から明らかでない限り、本明細書中に記載されるいずれの実施形態および態様も、互いと組み合わせて使用することができる。他の実施形態は、下記の説明を検討することによって当業者に明らかになるだろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0147】

【図 1】図 1 は、V 遺伝子セグメントのクラスター (A、B および C) および J と C との領域対 (J - C 対) を含むヒト 軽鎖遺伝子座の一定の拡大比ではない詳細な説明図を示している。

【図 2】図 2 は、内在性マウス 軽鎖遺伝子座を不活性化するために使用された標的化ストラテジーの一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図 3】図 3 は、内在性マウス 軽鎖遺伝子座を不活性化するために使用された標的化ストラテジーの一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

30

【図 4 A】図 4 A は、12 個の hV 遺伝子セグメントおよび hJ 1 遺伝子セグメントを含むヒト 軽鎖配列を用いて内在性マウス 軽鎖遺伝子座を標的化するための最初の標的化ベクター (12 / 1 - 標的化ベクター) の一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図 4 B】図 4 B は、12 個の hV 遺伝子セグメントおよび hJ 1 遺伝子セグメント (12 / 1 - 標的化ベクター)、12 個の hV 遺伝子セグメントならびに hJ 1、2、3 および 7 遺伝子セグメント (12 / 4 - 標的化ベクター)、12 個の hV 遺伝子セグメント、ヒト V - J ゲノム配列および hJ 1 遺伝子セグメント (12 ( ) 1 - 標的化ベクター)、ならびに 12 個の hV 遺伝子セグメント、ヒト V - J ゲノム配列ならびに hJ 1、2、3 および 7 遺伝子セグメント (12 ( ) 4 - 標的化ベクター) を含むヒト 軽鎖配列を用いて内在性マウス 軽鎖遺伝子座を標的化するための 4 個の最初の標的化ベクターの一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

40

【図 5 A】図 5 A は、40 個の hV 遺伝子セグメントおよび単一の hJ 遺伝子セグメントをマウス 軽鎖遺伝子座に漸進的に挿入するための標的化ストラテジーの一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図 5 B】図 5 B は、40 個の hV 遺伝子セグメントおよび単一の hJ 遺伝子セグメントをマウス 遺伝子座に漸進的に挿入するための標的化ストラテジーの一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図 6】図 6 は、ヒト 遺伝子間配列、複数の hJ 遺伝子セグメントまたはその両方を含むハイブリッド軽鎖遺伝子座を構築するための独特のヒト - ハイブリッド標的化ベ

50

クターを作製するために使用された標的化工程および分子操作工程の一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図7A】図7Aは、内在性C<sub>2</sub>遺伝子に作動可能に接続された40個のhV<sub>2</sub>遺伝子セグメントおよび単一のhJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントを含む改変されたマウス軽鎖遺伝子座についての遺伝子座の構造の一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図7B】図7Bは、内在性C<sub>2</sub>遺伝子に作動可能に接続された連続するヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列ありまたはなしで、40個のhV<sub>2</sub>遺伝子セグメントおよび1個または4個のhJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントを含む4個の独立した改変されたマウス軽鎖遺伝子座についての遺伝子座の構造の一定の拡大比ではない全般的な説明を示している。

【図8A】図8Aは、野生型マウス(WT)、ヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む12個のhV<sub>2</sub>遺伝子セグメントおよび4個のhJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(12hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)ならびに40個のhV<sub>2</sub>遺伝子セグメントおよび1個のhJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-1hJ<sub>2</sub>)由来の、CD19<sup>+</sup>に対してゲーティングされたIg<sup>+</sup>およびIg<sup>+</sup>脾細胞のコンタープロット(contour plot)を示している。

【図8B】図8Bは、野生型(WT)、ヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む12個のhV<sub>2</sub>遺伝子セグメントおよび4個のhJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(12hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)ならびに40個のhV<sub>2</sub>遺伝子セグメントおよび1個のhJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-1hJ<sub>2</sub>)から回収された脾臓におけるCD19<sup>+</sup>B細胞の総数を示している。

【図9A】図9Aの上のパネルは、野生型マウス(WT)ならびにヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む40個のhV<sub>2</sub>および4個のJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)由来の、シングレット(single t)に対してゲーティングされ、かつBおよびT細胞(それぞれCD19<sup>+</sup>およびCD3<sup>+</sup>)について染色された脾細胞のコンタープロットを示している。下のパネルは、野生型マウス(WT)ならびにヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む40個のhV<sub>2</sub>および4個のJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)由来の、CD19<sup>+</sup>に対してゲーティングされ、かつIg<sup>+</sup>およびIg<sup>+</sup>発現について染色された、脾細胞のコンタープロットを示している。

【図9B】図9Bは、野生型マウス(WT)ならびにヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む40個のhV<sub>2</sub>および4個のJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)から回収された脾臓におけるCD19<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>Ig<sup>+</sup>およびCD19<sup>+</sup>Ig<sup>+</sup>B細胞の総数を示している。

【図9C】図9Cは、野生型マウス(WT)ならびにヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む40個のhV<sub>2</sub>および4個のJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)由来の、CD19<sup>+</sup>に対してゲーティングされ、かつ免疫グロブリンD(IgD)および免疫グロブリンM(IgM)について染色された、脾細胞のコンタープロットを示している。コンタープロットの各々において、成熟B細胞(WTについては72、40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>については51)および移行B細胞(transitional B cell)(WTについては13、40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>については22)が表示されている。

【図9D】図9Dは、野生型マウス(WT)ならびにヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む40個のhV<sub>2</sub>および4個のJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)から回収された脾臓におけるCD19<sup>+</sup>B細胞、移行B細胞(CD19<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>lo</sup>)および成熟B細胞(CD19<sup>+</sup>IgM<sup>lo</sup>IgD<sup>hi</sup>)の総数を示している。

【図10A】図10Aの上のパネルは、野生型マウス(WT)ならびにヒトV<sub>2</sub>-J<sub>2</sub>ゲノム配列を含む40個のhV<sub>2</sub>および4個のJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hV<sub>2</sub>-V<sub>2</sub>J<sub>2</sub>-4hJ<sub>2</sub>)由来の、BおよびT細胞(それぞれCD19<sup>+</sup>およびCD3<sup>+</sup>)について染色された骨髓のコンタープロットを示している。下のパネル

は、野生型マウス (WT) ならびにヒト V - J ゲノム配列を含む 40 個の h V および 4 個の J 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス (40 h V - V J - 4 h J) 由来の、CD19<sup>+</sup> に対してゲーティングされ、かつ c k i t<sup>+</sup> および CD43<sup>+</sup> について染色された、骨髄のコンタープロットを示している。下のパネルのコンタープロットでは、プロ B 細胞 (p r o B c e l l) およびプレ B 細胞 (p r e B c e l l) が表示されている。

【図 10 B】図 10 B は、野生型マウス (WT) ならびにヒト V - J ゲノム配列を含む 40 個の h V および 4 個の J 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス (40 h V - V J - 4 h J) の大腿骨から回収された骨髄中のプロ B 細胞 (CD19<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup> c k i t<sup>+</sup>) およびプレ B 細胞 (CD19<sup>+</sup> CD43<sup>-</sup> c k i t<sup>-</sup>) の数を示している。

10

【図 10 C】図 10 C は、野生型マウス (WT) ならびにヒト V - J ゲノム配列を含む 40 個の h V および 4 個の J 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス (40 h V - V J - 4 h J) 由来の、免疫グロブリン M (I g M) および B220 について染色されたシングレットに対してゲーティングされた骨髄のコンタープロットを示している。コンタープロットの各々において、未熟、成熟およびプロ/プレ B 細胞が表示されている。

【図 10 D】図 10 D は、野生型マウス (WT) ならびにヒト V - J ゲノム配列を含む 40 個の h V および 4 個の J 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス (40 h V - V J - 4 h J) の大腿骨から単離された骨髄中の未熟 B 細胞 (B220<sup>i n t</sup> I g M<sup>+</sup>) および成熟 B 細胞 (B220<sup>h i</sup> I g M<sup>+</sup>) の総数を示している。

20

【図 10 E】図 10 E は、野生型マウス (WT) ならびにヒト V - J ゲノム配列を含む 40 個の h V および 4 個の J 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス (40 h V - V J - 4 h J) の大腿骨から単離された、I g および I g 発現について染色された未熟 B 細胞 (B220<sup>i n t</sup> I g M<sup>+</sup>) および成熟 B 細胞 (B220<sup>h i</sup> I g M<sup>+</sup>) に対してゲーティングされた骨髄のコンタープロットを示している。

【図 11】図 11 は、内在性マウス 軽鎖遺伝子座にヒト 軽鎖遺伝子配列を有するマウスの脾細胞 RNA から増幅された 18 個の独立した RT - P C R クローンの V - J - C ジャンクションのヌクレオチド配列アラインメントを示している。A6 = 配列番号 57 ; B6 = 配列番号 58 ; F6 = 配列番号 59 ; B7 = 配列番号 60 ; E7 = 配列番号 61 ; F7 = 配列番号 62 ; C8 = 配列番号 63 ; E12 = 配列番号 64 ; 1 - 4 = 配列番号 65 ; 1 - 20 = 配列番号 66 ; 3B43 = 配列番号 67 ; 5 - 8 = 配列番号 68 ; 5 - 19 = 配列番号 69 ; 1010 = 配列番号 70 ; 11A1 = 配列番号 71 ; 7A8 = 配列番号 72 ; 3A3 = 配列番号 73 ; 2 - 7 = 配列番号 74。小文字の塩基は、組換え中の変異および/または N 付加に起因する非生殖細胞系列の塩基を示している。h J 1 およびマウス C のヌクレオチド配列によってコードされるフレームワーク 4 領域 (FWR4) 内のコンセンサスアミノ酸が、配列アラインメントの下に表示されている。

30

【図 12】図 12 は、内在性マウス 軽鎖遺伝子座に、連続するヒト V - J ゲノム配列を含むヒト 軽鎖遺伝子配列を有するマウスの脾細胞 RNA から増幅された 12 個の独立した RT - P C R クローンの V - J - C ジャンクションのヌクレオチド配列アラインメントを示している。5 - 2 = 配列番号 87 ; 2 - 5 = 配列番号 88 ; 1 - 3 = 配列番号 89 ; 4B - 1 = 配列番号 90 ; 3B - 5 = 配列番号 91 ; 7A - 1 = 配列番号 92 ; 5 - 1 = 配列番号 93 ; 4A - 1 = 配列番号 94 ; 11A - 1 = 配列番号 95 ; 5 - 7 = 配列番号 96 ; 5 - 4 = 配列番号 97 ; 2 - 3 = 配列番号 98。小文字の塩基は、組換え中の変異および/または N 付加に起因する非生殖細胞系列の塩基を示している。ヒト J およびマウス C の各々のヌクレオチド配列によってコードされるフレームワーク 4 領域 (FWR4) 内のコンセンサスアミノ酸が、配列アラインメントの下に表示されている。

40

【図 13】図 13 は、内在性マウス 軽鎖遺伝子座にヒト 軽鎖遺伝子配列を有するマウスの脾細胞 RNA から増幅された 3 個の独立した RT - P C R クローンの V - J - C

50

ジャンクションのヌクレオチド配列アラインメントを示している。2 D 1 = 配列番号 1 0 1 ; 2 D 9 = 配列番号 1 0 2 ; 3 E 1 5 = 配列番号 1 0 3。小文字の塩基は、組換え中の変異および/またはN付加に起因する非生殖細胞系列の塩基を示している。h J 1 およびマウス C 2 のヌクレオチド配列によってコードされるフレームワーク 4 領域 ( F W R 4 ) 内のコンセンサスアミノ酸が、配列アラインメントの下に表示されている。

【発明を実施するための形態】

【0148】

詳細な説明

様々な実施形態の具体的な特徴が、詳細に明らかにされるが、その具体的な態様、実施形態および実施例の記載は、請求項の対象を限定せず；請求項は、本発明の範囲を記載するものである。本開示において使用されるすべての用語および語句は、当該分野において通常それらに与えられている意味を包含する。

10

【0149】

用語「連続する」は、同じ核酸分子上に存在することに対する言及を包含し、例えば、2つの核酸配列が、同じ核酸 ( n u c l e i c ) 分子上に存在するが別の核酸配列によって中断されている場合、それらは「連続している」。例えば、再配列された V ( D ) J 配列の最後のコドンは、定常領域配列の最初のコドンに直接続いていないが、その V ( D ) J 配列は、定常領域遺伝子配列と「連続している」。別の例では、2個の V 遺伝子セグメント配列が、同じゲノムフラグメント上に存在する場合、それらは「連続している」が、それらは、V 領域のコドンをコードしない配列によって分断されていることがあり、例えば、それらは、制御配列、例えば、プロモーターまたは他の非コード配列によって分断されていることがある。1つの実施形態において、連続する配列は、野生型ゲノムに見られるように配置されたゲノム配列を含むゲノムフラグメントを含む。

20

【0150】

語句「～に由来する」は、言及されている遺伝子または遺伝子セグメント「に由来する」可変領域に関して使用されるとき、特定の再配列されていない遺伝子セグメントまたはその可変ドメインを発現する遺伝子を形成するように再配列された遺伝子セグメントまでその配列をさかのぼることができること（適用可能な場合、スプライシングの差異 ( s p l i c e d i f f e r e n c e s ) および体細胞変異を説明する）を含む。

【0151】

語句「機能的」は、可変領域遺伝子セグメントまたは連結遺伝子セグメントに関して使用されるとき、発現される抗体レパートリーの使用のことを指す；例えば、ヒトでは、V 遺伝子セグメント 3 - 1、4 - 3、2 - 8 などが機能的である一方、V 遺伝子セグメント 3 - 2、3 - 4、2 - 5 などは、非機能的である。

30

【0152】

「重鎖遺伝子座」は、野生型マウスにおいて重鎖可変 ( V<sub>H</sub> )、重鎖多様性 ( D<sub>H</sub> )、重鎖連結 ( J<sub>H</sub> ) および重鎖定常 ( C<sub>H</sub> ) 領域の DNA 配列が見られる、染色体上の位置、例えば、マウス染色体上の位置を含む。

【0153】

「遺伝子座」は、野生型マウスにおいて可変 ( V )、連結 ( J ) および定常 ( C ) 領域の DNA 配列が見られる、染色体上の位置、例えば、マウス染色体上の位置を含む。

40

【0154】

「遺伝子座」は、野生型マウスにおいて可変 ( V )、連結 ( J ) および定常 ( C ) 領域の DNA 配列が見られる、染色体上の位置、例えば、マウス染色体上の位置を含む。

【0155】

用語「再配列されていない」は、V 遺伝子セグメントおよび J 遺伝子セグメント（重鎖の場合、D 遺伝子セグメントも同様）が、別々に維持されているが、V ( D ) J レパートリーのうちの単一の V、( D )、J を含む再配列された V ( D ) J 遺伝子を形成するよう

50

に連結されることが可能である、免疫グロブリン遺伝子座の状態を含む。

【0156】

ヒト 可変ドメインを発現するマウス

完全にヒトのものである抗体または部分的にヒトのものでありかつ部分的にマウスのものである抗体を発現するマウスが以前に報告されている。VELOCIMMUNE（登録商標）遺伝子操作マウスは、内在性マウス遺伝子座に、ヒトV(D)J遺伝子セグメントによる再配列されていないV(D)J遺伝子セグメントの置換を含む。VELOCIMMUNE（登録商標）マウスは、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを有するキメラ抗体を発現する（例えば、米国特許第7,605,237号を参照のこと）。他のほとんどの報告は、無能力にされた内在性免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスにおいて、完全ヒト導入遺伝子から完全ヒト抗体を発現するマウスに関する。

10

【0157】

抗体軽鎖は、2個の別個の遺伝子座：カッパー（ ）およびラムダ（ ）のうちの1つによってコードされる。マウス抗体軽鎖は、主に タイプである。マウス抗体を産生するマウス、および完全ヒト抗体またはキメラヒト-マウス抗体を産生する改変されたマウスは、軽鎖の使用頻度に偏りを示す。ヒトもまた、軽鎖の偏りを示すが、マウスほど顕著でない；マウスにおける 軽鎖と 軽鎖との比は、約95：5である一方で、ヒトのその比は、約60：40である。マウスではまず第一に 可変遺伝子座がそれほど多様でないで、マウスにおけるより顕著な偏りは、抗体の多様性に深刻な影響を及ぼさないと考えられている。このことは、ヒトではそうではない。ヒト 軽鎖遺伝子座は、非常に多様である。

20

【0158】

ヒト 軽鎖遺伝子座は、1,000kbに及び、可変（V）または連結（J）セグメントをコードする80を超える遺伝子を含む（図1）。ヒト 軽鎖遺伝子座のうち、観察されるすべてのV ドメインの過半数が、遺伝子セグメント1-40、1-44、2-8、2-14および3-21によってコードされる。全体的に見て、約30程度のヒトV 遺伝子セグメントが、機能的であると考えられている。J 遺伝子セグメントは7つ存在し、そのうち4つ（J 1、J 2、J 3およびJ 7）だけが、一般的に機能的なJ 遺伝子セグメントとされている。

30

【0159】

ヒト 軽鎖遺伝子座が、機能的な軽鎖タンパク質を形成するように組み換わることができるいくつかの可変領域遺伝子セグメントを有するという点において、ヒトの 軽鎖遺伝子座は、マウスとヒトの両方の 遺伝子座と構造が似ている。ヒト 軽鎖遺伝子座は、およそ70個のV 遺伝子セグメントおよび7個のJ - C 遺伝子セグメント対を含む。これらのJ - C 遺伝子セグメント対の4つだけが、機能的であるとみられる。いくつかの対立遺伝子において、第5のJ - C 遺伝子セグメント対は、報告によると偽遺伝子（C 6）である。70個のV 遺伝子セグメントは、38個の機能的な遺伝子セグメントを含むとみられる。70個のV 配列は、3個のクラスターに配置されており、そのすべてが、異なるV 遺伝子ファミリー群の異なるメンバーを含む（クラスターA、BおよびC；図1）。これは、ヒトV領域を有する抗体を非ヒト動物において作製するための、相対的に利用されていない多様性の潜在的に豊富な供給源である。

40

【0160】

全く対照的に、マウス 軽鎖遺伝子座は、（系統に応じて）2つまたは3つのマウスV領域遺伝子セグメントしか含まない（図2）。少なくともこのために、マウスにおけるへの大きな偏りは、抗体多様性全体に対して特に不利益でないと考えられている。

【0161】

マウス 軽鎖遺伝子座の公開されているマップによると、その遺伝子座は、およそ200kb以内の2つのクラスターの遺伝子セグメントから本質的になる（図2）。その2つのクラスターは、独立した再配列が可能なV、JおよびC遺伝子の2セットを含む：V 2 - J 2 - C 2 - J 4 - C 4およびV 1 - J 3 - C 3 - J 1 - C 1。

50

V<sub>2</sub>は、すべてのJ 遺伝子セグメントと組み換わると見出されているが、V<sub>1</sub>は、もっぱらC<sub>1</sub>と組み換わるとみられる。C<sub>4</sub>は、スプライス部位を欠損した偽遺伝子であると考えられている。

#### 【0162】

マウス 軽鎖遺伝子座は、著しく異なる。組換え事象に関与してマウス 遺伝子座から機能的な軽鎖タンパク質をもたらす遺伝子セグメントの構造および数は、相当に複雑である(図3)。したがって、マウス 軽鎖は、典型的なマウスでは抗体集団の多様性に大きく寄与しない。

#### 【0163】

とりわけ、マウスにおいてヒト 軽鎖遺伝子座の豊富な多様性を利用することは、軽鎖 Vドメインのより完全なヒトレパートリーに対して供給源をもたらす可能性がある。この多様性を利用する以前の試みでは、マウスゲノムにランダムに組み込まれたヒト 軽鎖遺伝子座の塊を含むヒト導入遺伝子を使用された(例えば、米国特許第6,998,514号および米国特許第7,435,871号を参照のこと)。報告によると、これらのランダムに組み込まれた(integrated)導入遺伝子を含むマウスは、完全ヒト 軽鎖を発現するが、しかしながら、場合によっては、片方または両方の内在性軽鎖遺伝子座がインタクトなまま残る。そのヒト 軽鎖配列は、マウスの発現抗体レパートリーにおいてマウス軽鎖(または )と競合するので、この状況は、望ましくない。

#### 【0164】

対照的に、本発明者らは、マウス軽鎖遺伝子座から直接1つ以上の 軽鎖核酸配列を発現すること(内在性マウス軽鎖遺伝子座における置換によるものを含む)ができる遺伝的に改変されたマウスを記載する。内在性遺伝子座からヒト 軽鎖配列を発現することができる遺伝的に改変されたマウスは、ヒト重鎖遺伝子座を含むマウスとさらに交配され得、それゆえ完全にヒトのものであるV領域(重鎖および軽鎖)を含む抗体を発現するために使用され得る。様々な実施形態において、それらのV領域は、マウス定常領域とともに発現する。様々な実施形態において、内在性マウス免疫グロブリン遺伝子セグメントは存在せず、それらのV領域は、ヒト定常領域とともに発現する。これらの抗体は、数多くの用途(診断的な用途と治療的な用途の両方)において有益であると判明するだろう。

#### 【0165】

ヒトV およびJ 遺伝子セグメントに由来する結合タンパク質をマウスにおいて発現させる様々な実施形態について、多くの利点を実現することができる。内在性軽鎖遺伝子座、例えば、マウス または 遺伝子座にヒト 配列を配置することによって、利点を実現することができる。そのようなマウスから産生される抗体は、マウスC<sub>L</sub>領域(具体的には、マウスC<sub>L</sub>またはC<sub>L</sub>領域)に融合されたヒトV ドメインを含む軽鎖を有し得る。そのマウスは、ヒトC<sub>L</sub>領域(具体的には、C<sub>L</sub> および/またはC<sub>L</sub>領域)とともに使用するための、同定およびクローニングに適したヒトV ドメインも発現し得る。そのようなマウスにおけるB細胞発生は、その他の点では正常であるので、C<sub>L</sub> またはC<sub>L</sub> 領域という背景において適合性のV ドメイン(体細胞変異したV ドメインを含む)を作製することが可能である。

#### 【0166】

免疫グロブリン または 軽鎖遺伝子座に再配列されていないV 遺伝子セグメントを含む遺伝的に改変されたマウスが記載される。C<sub>L</sub> および/またはC<sub>L</sub> 領域に融合されたヒトV ドメインを有する軽鎖を含む抗体を発現するマウスが記載される。

#### 【0167】

免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の無効の(sterile)転写物

マウスにおいてヒト免疫グロブリン 配列を発現するというテーマのバリエーションは、そのような発現が可能な遺伝的に改変されたマウスの様々な実施形態に反映される。したがって、いくつかの実施形態において、遺伝的に改変されたマウスは、ヒト遺伝子座由来のある特定の非コード配列を含む。1つの実施形態において、遺伝的に改変されたマウスは、内在性 軽鎖遺伝子座にヒトV およびJ 遺伝子セグメントを含み、さらに、ヒ

10

20

30

40

50

ト 軽鎖ゲノムフラグメントを含む。特定の実施形態において、そのヒト 軽鎖ゲノムフラグメントは、天然にはヒトV 遺伝子セグメントとヒトJ 遺伝子セグメントとの間に見られる非コード配列である。

#### 【0168】

上記ヒトおよびマウス 軽鎖遺伝子座は、開始コドンまたはオープンリーディングフレームのいずれかを欠く無効の転写物をコードし、かつ 軽鎖遺伝子座の転写を制御するエレメントとされている、配列を含む。これらの無効の転写物は、最も近位のV 遺伝子セグメントの下流または3'側、かつ 軽鎖定常領域遺伝子(C)の上流に存在する 軽鎖イントロンエンハンサー(E<sub>1</sub>)の上流または5'側に位置する遺伝子間配列から生じる。その無効の転写物は、その遺伝子間配列の再配列から生じ、それにより、Cに融合されたV-J 1セグメントが形成される。

10

#### 【0169】

C 遺伝子の上流の 軽鎖遺伝子座の置換によって、無効の転写物をコードする遺伝子間領域が除去され得る。それゆえ、様々な実施形態において、ヒト 軽鎖遺伝子セグメントによるマウスC 遺伝子の上流のマウス 軽鎖配列の置換は、ヒトV およびJ 遺伝子セグメントを含むが無効の転写物をコードする 軽鎖遺伝子間領域を含まないヒト化されたマウス 軽鎖遺伝子座をもたらす得る。

#### 【0170】

本明細書中に記載されるように、ヒト 軽鎖遺伝子セグメントによる内在性マウス 軽鎖遺伝子座のヒト化(ここで、そのヒト化によって遺伝子間領域が除去される)は、 軽鎖の使用頻度の著明な増加に加えて、 軽鎖遺伝子座の使用頻度の著しい低下をもたらす。それゆえ、その遺伝子間領域を欠くヒト化マウスは、そのマウスがヒト軽鎖可変ドメイン(例えば、ヒト または ドメイン)を有する抗体を産生し得る点で有用であるが、その遺伝子座からの使用頻度は低下する。

20

#### 【0171】

転写に関して、最終的なヒトV 遺伝子セグメントと第1のヒトJ 遺伝子セグメントとの間に 遺伝子間領域を含むV 遺伝子座を作製するためのヒト 遺伝子間領域の挿入に加えて、ヒトV およびJ 遺伝子セグメントによる内在性マウス 軽鎖遺伝子座のヒト化も記載され;それは、 遺伝子間領域を欠く遺伝子座よりも高発現のB細胞集団を示す。この知見は、その遺伝子間領域が(無効の転写物を介して直接または間接的に)内在性 軽鎖遺伝子座の使用を抑制するという仮説と一致する。そのような仮説の下では、その遺伝子間領域を含めることによって、内在性 軽鎖遺伝子座の使用頻度が低下し得、それにより、そのマウスは制限された選択肢となるが、改変された遺伝子座(を に)を使用して抗体が産生される。

30

#### 【0172】

様々な実施形態において、ヒト 軽鎖配列によるマウスC 遺伝子の上流のマウス 軽鎖配列の置換は、転写の点から最も3'側のV 遺伝子セグメントの3'非翻訳領域と第1のヒトJ 遺伝子セグメントに対して5'側との間に配置されたヒト 軽鎖遺伝子間領域をさらに含む。あるいは、そのような遺伝子間領域は、内在性 軽鎖遺伝子座において欠失を作製することによって、置換される内在性 軽鎖遺伝子座(マウスC 遺伝子の上流)から取り除かれ得る。同様に、この実施形態では、それらのマウスは、ヒト 軽鎖配列を含む内在性 軽鎖遺伝子座から抗体を産生する。

40

#### 【0173】

ヒトV ドメインを発現するようにマウスを操作するアプローチ

内在性C<sub>L</sub>(例えば、C またはC)領域に融合されたヒトV ドメインを有する軽鎖を含む抗体を産生する遺伝的に改変されたマウスを作製する様々なアプローチが記載される。様々な実施形態において、片方または両方の内在性軽鎖遺伝子座の欠失を含む遺伝的改変が記載される。例えば、内在性抗体レパトリからマウス 軽鎖を排除するために、第1のV-J-C 遺伝子クラスターの欠失、およびヒトV-J 遺伝子セグメントによる第2の遺伝子クラスターのV-J 遺伝子セグメントの全体的または部分

50

的な置換が行われ得る。遺伝的に改変されたマウス胚、細胞、ならびにそのマウス、マウス胚および細胞を作製するための標的化構築物も提供される。

#### 【0174】

内在性C 遺伝子は、インタクトなままであり、ゆえに正常な機能性および内在性重鎖の定常領域と会合する能力を保持するので、様々な実施形態において、1つの内在性V - J - C 遺伝子クラスターの欠失および別の内在性V - J - C 遺伝子クラスターのV - J 遺伝子セグメントの置換では、その動物における天然の抗体定常領域の会合および機能の相対的に最小限の破壊が用いられる。したがって、そのような実施形態では、その改変は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む機能的な抗体分子の組み立てのために機能的な軽鎖定常領域に依存する他の内在性重鎖定常領域に影響しない。さらに、様々な実施形態において、その改変は、内在性重鎖および軽鎖、例えば、マウスC 領域に接続されたhV ドメインを含む、膜に結合した機能的な抗体分子の組み立てにも影響しない。少なくとも1つの機能的なC 遺伝子が、内在性遺伝子座に保持されるので、ヒトV - J 遺伝子セグメントによる内在性V - J - C 遺伝子クラスターのV - J 遺伝子セグメントの置換を含む動物は、その動物の発現抗体レパートリー中に存在するヒトV - J 遺伝子セグメントによって、免疫応答中に抗原に結合することができる正常な 軽鎖を産生することができるはずである。

#### 【0175】

欠失される内在性マウスV - J - C 遺伝子クラスターの略図（一定の拡大比ではない）が、図2に提供される。図示されるように、マウス 軽鎖遺伝子座は、2つの遺伝子クラスターに組織化され、その両方が、機能的マウス 軽鎖を形成するように組み換えることができる機能的遺伝子セグメントを含む。内在性マウスV<sub>1</sub> - J<sub>3</sub> - C<sub>3</sub> - J<sub>1</sub> - C<sub>1</sub> 1遺伝子クラスターは、組換え部位に隣接したネオマイシンカセットを有する標的化構築物（標的化ベクター1）によって欠失される。他方の内在性遺伝子クラスター（V<sub>2</sub> - V<sub>3</sub> - J<sub>2</sub> - C<sub>2</sub> - J<sub>4</sub> - C<sub>4</sub>）は、組換え部位に隣接したハイグロマイシン - チミジンキナーゼカセットを有する標的化構築物（標的化ベクター2）によって部分的に欠失される。この第2の標的化事象では、C<sub>2</sub> - J<sub>4</sub> - C<sub>4</sub> 内在性遺伝子セグメントは保持される。第2の標的化構築物（標的化ベクター2）は、上記の第1の標的化構築物（標的化ベクター1）における組換え部位とは異なる組換え部位を用いて構築され、それにより、標的化が成功した後にその選択カセットの選択的な欠失が可能になる。得られる二重標的化された（double-targeted）遺伝子座は、内在性 軽鎖を産生することができないという点において、機能的にサイレンシングされている。この改変された遺伝子座は、ヒトV およびJ 遺伝子セグメントの挿入のために使用され、それにより、ヒトV およびJ 遺伝子セグメントを含む内在性マウス 遺伝子座が作製され得る（ここで、改変された遺伝子座において組換えが生じると、その動物は、内在性マウスC 遺伝子セグメントに接続された再配列されたヒトV およびJ 遺伝子セグメントを含む 軽鎖を産生する）。

#### 【0176】

内在性 遺伝子セグメントを非機能的にするようにマウスを遺伝的に改変することは、様々な実施形態において、その抗体レパートリーにおいてもっぱら 軽鎖を示すマウスをもたらし、そのマウスは、その免疫応答における 軽鎖の役割の評価にとって有用になり、また、V ドメインを含むがV ドメインを含まない抗体レパートリーの作製にとって有用になる。

#### 【0177】

内在性マウス 軽鎖遺伝子座において組み換えられるマウスC 遺伝子に接続されたhV を発現する遺伝的に改変されたマウスは、当該分野で公知の任意の方法によって作製され得る。ヒトV およびJ 遺伝子セグメントによる内在性マウスV<sub>2</sub> - V<sub>3</sub> - J<sub>2</sub> 2遺伝子セグメントの置換の略図（一定の拡大比ではない）が図4Aに提供される。図示されるように、非機能的にされた内在性マウス 軽鎖遺伝子座は、組換え部位に隣接したネオマイシンカセットを含む標的化構築物（12/1 - 標的化ベクター）によって置

10

20

30

40

50

換される。V<sub>2</sub> - V<sub>3</sub> - J<sub>2</sub> 遺伝子セグメントは、12個のhV<sub>2</sub> 遺伝子セグメントおよび単一のhJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを含むヒト 配列を含むゲノムフラグメントで置換される。

【0178】

したがって、この第1のアプローチによって、1つ以上のhV<sub>2</sub> 遺伝子セグメントが、単一のhJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントと連続する内在性 軽鎖遺伝子座に位置づけられる(図4A)。

【0179】

変更された内在性 軽鎖遺伝子座に対するさらなる変更は、より多くのhV<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを挿入する同様の手法を用いて達成され得る。例えば、さらなるヒトhV<sub>2</sub> 遺伝子セグメントの漸進的な挿入のために使用される2つの追加の標的化構築物(+16 - および+12 - 標的化ベクター)の略図が図5Aに提供される。図示されるように、特定のヒトhV<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを含む追加のゲノムフラグメントが、ヒト 軽鎖配列の先の挿入によって提供された相同性を用いて、逐次的な工程で、変更された内在性 軽鎖遺伝子座に挿入される。図示される各標的化構築物を用いた組換えの際、逐次的な様式で、28個の追加のhV<sub>2</sub> 遺伝子セグメントが、変更された内在性 軽鎖遺伝子座に挿入される。これにより、マウスC<sub>2</sub> 遺伝子に接続されたヒトV<sub>2</sub> - J<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを含む 軽鎖タンパク質を産生するキメラ遺伝子座が作製される。

【0180】

ヒト 軽鎖遺伝子セグメントをマウス 遺伝子座に挿入する上記のアプローチは、C<sub>2</sub> - J<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> 遺伝子セグメントの下流に位置づけられたエンハンサーを維持する(Enh<sub>2.4</sub>、EnhおよびEnh<sub>3.1</sub>と命名される、図4Aおよび図5A)。このアプローチによって、内在性マウス 軽鎖遺伝子座に単一の変更された対立遺伝子をもたらされる(図7A)。

【0181】

マウスC<sub>2</sub> 遺伝子セグメントに作動可能に接続されたhV<sub>2</sub> およびJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを含む軽鎖を発現するマウスを作製するための組成物および方法(内在性マウス 軽鎖遺伝子座からそのような遺伝子を発現するマウスを作製するための組成物および方法を含む)が提供される。それらの方法は、選択的に、1つの内在性マウスV<sub>2</sub> - J<sub>2</sub> - C<sub>2</sub> 遺伝子クラスターを非機能的にする工程(例えば、標的化された欠失によって)ならびにその内在性マウス 軽鎖遺伝子座においてhV<sub>2</sub> およびJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを使用してマウスにおいてhV<sub>2</sub> ドメインを発現させる工程を包含する。

【0182】

あるいは、第2のアプローチでは、ヒト 軽鎖遺伝子セグメントが、内在性 軽鎖遺伝子座に位置づけられ得る。その遺伝的変更は、様々な実施形態において、内在性 軽鎖遺伝子座の欠失を含む。例えば、内在性抗体レパートリーからマウス 軽鎖を排除するために、マウスV<sub>2</sub> およびJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントの欠失が行われ得る。遺伝的に変更されたマウス胚、細胞、ならびにそのマウス、マウス胚および細胞を作製するための標的化構築物も提供される。

【0183】

上で述べられた理由のために、マウスV<sub>2</sub> およびJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントの欠失では、相対的に最小限の破壊が用いられる。欠失されるマウスV<sub>2</sub> およびJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントの略図(一定の拡大比ではない)が図3に提供される。2個の正確に位置づけられた標的化ベクター(各々が部位特異的組換え部位を使用する)の間に位置するマウス配列のリコンビナーゼによって媒介される欠失を介して、内在性マウスV<sub>2</sub> およびJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントが欠失される。第1の標的化ベクター(J<sub>2</sub> 標的化ベクター)は、マウスJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを欠失させる第1の標的化事象において使用される。第2の標的化ベクター(V<sub>2</sub> 標的化ベクター)は、最も遠位のマウスV<sub>2</sub> 遺伝子セグメントの5'に位置する配列を欠失させる、第2の逐次的な標的化事象において使用される。両方の標的化ベクターが、部位特異的組換え部位を含み、それにより、標的化が成功した後に、両方の選択カセット

および介在するすべてのマウス 軽鎖配列の選択的欠失が可能になる。得られる欠失された遺伝子座は、内在性 軽鎖を産生することができないという点において、機能的にサイレンシングされている。この改変された遺伝子座は、h V および J 遺伝子セグメントの挿入のために使用され、それにより、h V および J 遺伝子セグメントを含む内在性マウス 遺伝子座が作製され得る（ここで、改変された遺伝子座において組換えが生じると、その動物は、内在性マウス C 遺伝子セグメントに作動可能に接続された再配列された h V および J 遺伝子セグメントを含む 軽鎖を産生する）。ヒト 軽鎖配列を含む様々な標的化ベクターが、この欠失されたマウス 遺伝子座と組み合わせて使用されることにより、マウス C 領域と作動可能に接続されたヒト 遺伝子セグメントを含むハイブリッド軽鎖遺伝子座が作製され得る。

10

#### 【0184】

したがって、第2のアプローチによって、1つ以上のヒト V 遺伝子セグメントが、単一のヒト J 遺伝子セグメントと連続するマウス 軽鎖遺伝子座に位置づけられる（12 / 1 - 標的化ベクター，図4B）。

#### 【0185】

様々な実施形態において、このアプローチに対する変法は、遺伝子セグメントおよび / または制御配列を付加することにより、マウス抗体レパートリー内のマウス 遺伝子座からのヒト 軽鎖配列の使用頻度が最適化され得る。

#### 【0186】

第3のアプローチでは、1つ以上の h V 遺伝子セグメントが、4個の h J 遺伝子配列と連続するマウス 軽鎖遺伝子座に位置づけられる（12 / 4 - 標的化ベクター，図4B）。

20

#### 【0187】

第3のアプローチでは、1つ以上の h V 遺伝子セグメントが、ヒト 遺伝子間配列および単一の h J 遺伝子配列と連続するマウス 軽鎖遺伝子座に位置づけられる（12（ ）1 - 標的化ベクター，図4B）。

#### 【0188】

第4のアプローチでは、1つ以上の h V 遺伝子セグメントが、ヒト 遺伝子間配列、4個の h J 遺伝子配列と連続するマウス 軽鎖遺伝子座に位置づけられる（12（ ）4 - 標的化ベクター図4B）。

30

#### 【0189】

マウス 遺伝子座にヒト 軽鎖遺伝子セグメントを挿入する上記アプローチのすべてが、C 遺伝子の下流に イントロンエンハンサーエレメント（E<sub>i</sub>と命名される，図4Bおよび図5B）を維持し、かつ C 遺伝子の下流に 3' エンハンサー（E<sub>3'</sub>と命名される，図4Bおよび図5B）を維持する。このアプローチは、内在性マウス 軽鎖遺伝子座に4個の別個の改変された対立遺伝子をもたらす（図7B）。

#### 【0190】

様々な実施形態において、遺伝的に改変されたマウスは、内在性マウス 軽鎖遺伝子座のノックアウトを含む。1つの実施形態において、その 軽鎖遺伝子座は、V<sub>2</sub>から J<sub>2</sub>に及ぶ領域および V<sub>1</sub>から C<sub>1</sub>に及ぶ領域を欠失させるストラテジーによってノックアウトされる（図2）。内在性 軽鎖遺伝子座が内在性 ドメインを発現する能力を低下させるかまたは排除する任意のストラテジーが、本開示における実施形態との使用に適している。

40

#### 【0191】

遺伝的に改変されたマウス由来のラムダドメイン抗体

マウス または 軽鎖遺伝子座にヒト 配列を含むマウスは、マウス C<sub>L</sub>（C または C<sub>1</sub>）領域に融合された h V 領域を含む軽鎖を発現する。これらは、（a）機能的にサイレンシングされた軽鎖遺伝子座（例えば、内在性マウス または 軽鎖遺伝子座のノックアウト）を含むマウス；（b）内在性マウス C 遺伝子に作動可能に接続された h V および h J 遺伝子セグメントを含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座を含むマウス；（c）内在

50

性マウスC 遺伝子に作動可能に接続されたhV およびhJ 遺伝子セグメントを含む内在性マウス 軽鎖遺伝子座を含むマウス；および(d)一方の 対立遺伝子がhV およびhJ を含み；他方の 対立遺伝子がhV およびhJ を含み；一方の 対立遺伝子がhV およびhJ を含み、一方の 対立遺伝子がサイレンシングされているかもしくはノックアウトされているか、または両方の 対立遺伝子が、hV およびhJ を含み；かつ各々がhV<sub>H</sub>、hD<sub>H</sub> およびhJ<sub>H</sub>を含む2個の重鎖対立遺伝子を含むマウスと都合よく交配される。

#### 【0192】

C またはC という背景において発現されるhV ドメインを含む抗体は、hV ドメインをコードする核酸を、ヒトC をコードする遺伝子を有する発現構築物にクローニングすることによって、完全ヒト抗体を作製するために使用される。得られる発現構築物は、hC に融合された完全なhV ドメインを示す抗体の発現に適した宿主細胞にトランスフェクトされる。

#### 【実施例】

#### 【0193】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物を作製するおよび使用する方法を説明するために提供され、本発明者らが本発明者らの発明と見なす範囲を制限することを目的としていない。別段示されない限り、温度は、セルシウス度で示され、圧力は、大気圧または大気圧付近である。

#### 【0194】

##### 実施例I

##### マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の欠失

マウス および 軽鎖遺伝子座を不活性化するためにマウスゲノム細菌人工染色体(BAC)ライブラリーを改変するために、VELOCI GENE(登録商標)技術(例えば、米国特許第6,586,251号およびValenzuelaら(2003)High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659を参照のこと)を用いて様々な標的化構築物を作製した。

#### 【0195】

マウス 軽鎖遺伝子座の欠失。V - J - C 遺伝子クラスターの標的化欠失によって内在性マウス 軽鎖遺伝子座を不活性化するために、マウスBACクローンRP23-135k15(Invitrogen)由来のDNAを相同組換えによって改変した(図2)。

#### 【0196】

簡潔には、V 1 遺伝子セグメントの5'側の配列を含む5'マウス相同性アームおよびC 1 遺伝子セグメントの3'側の配列を含む3'マウス相同性アームとともにLoxP部位に隣接したネオマイシンカセットを含む標的化ベクターを用いて、V 1 - J 3 - C 3 - J 1 - C 1 遺伝子セグメントを含む近位のクラスター全体を単一の標的化事象において欠失させた(図2, 標的化ベクター1)。

#### 【0197】

V 2 - J 2 - C 2 - J 4 - C 4を含む遠位の内在性マウス 遺伝子クラスターを正確に欠失させるために、第2の標的化構築物を調製したが、ただ、その第2の標的化構築物は、V 2 遺伝子セグメントの5'側の配列を含む5'マウス相同性アームおよび内在性C 2 遺伝子セグメントに対して5'側の配列を含む3'マウス相同性アームを含んでいた(図2, 標的化ベクター2)。したがって、その第2の標的化構築物は、内在性マウス 遺伝子座にC 2 - J 4 - C 4をインタクトなままで残して、V 2 - J 2を正確に欠失させた。不活性化された内在性 遺伝子座(上に記載されたような)を含むES細胞を、当該分野で公知の核型分析およびスクリーニング法(例えば、TAQMAN(登録商標))によって確かめた。次いで、その改変されたES細胞からDNAを単

離し、C R E リコンビナーゼによる処理に供することによって、ネオマイシンマーカ－遺伝子を含む近位の標的化カセットの欠失が媒介され、それにより、ただ1つの1 o x P 部位だけが欠失に残った(図2, 下)。

#### 【0198】

マウス 軽鎖遺伝子座の欠失。上に記載された方法と同様の方法を用いていくつかの標的化構築物を作製して、相同組換えによってマウスB A C クローンR P 2 3 - 3 0 2 g 1 2 およびR P 2 3 - 2 5 4 m 0 4 ( I n v i t r o g e n ) からのDNAを改変することにより、2工程プロセスでマウス 軽鎖遺伝子座を不活性化した(図3)。

#### 【0199】

簡潔には、ハイグロマイシン - チミジンキナーゼ ( h y g - T K ) カセットに対して3'に単一の1 o x P 部位を含むh y g - T K カセットを含む標的化ベクターを用いて、内在性マウス 軽鎖遺伝子座のJ 遺伝子セグメント(1 - 5)を単一の標的化事象において欠失させた(図3, J 標的化ベクター)。この標的化ベクターを作製するために使用された相同性アームは、内在性マウスJ 遺伝子セグメントの5'側および3'側のマウスゲノム配列を含んだ。第2の標的化事象では、最も遠位の内在性マウスV 遺伝子セグメントに対して上流(5')のマウスゲノム配列の一部を欠失させるための第2の標的化ベクターを調製した(図3, V 標的化ベクター)。この標的化ベクターは、逆向きの1 o x 5 1 1 部位、1 o x P 部位およびネオマイシンカセットを含んだ。この標的化ベクターを作製するために使用された相同性アームは、最も遠位のマウスV 遺伝子セグメントの上流のマウスゲノム配列を含んだ。それらの標的化ベクターを、E S 細胞においてDNAを標的化するために逐次的な様式で(すなわち、J に次いでV を)使用した。二重標的化染色体(すなわち、両方の標的化ベクターで標的化された単一の内在性マウス 遺伝子座)を有するE S を、当該分野で公知の核型分析およびスクリーニング法(例えば、T a q m a n (商標))によって確かめた。次いで、その改変されたE S 細胞からDNAを単離し、C r e リコンビナーゼによる処理に供することによって、2つの1 o x 部位が互いに対して逆向きで並置されつつ、内在性マウスV 遺伝子セグメントおよび両方の選択カセットの欠失が媒介された(図3, 下; 配列番号1)。

#### 【0200】

このようにして、下に記載される標的化ベクターを用いて再配列されていないヒト 生殖細胞系列遺伝子セグメントを正確な様式で漸進的に挿入するための、インタクトなエンハンサーおよび定常領域を含む2つの改変された内在性軽鎖遺伝子座( および ) が作製された。

#### 【0201】

##### 実施例I I

##### ヒト 軽鎖ミニ遺伝子座によるマウス軽鎖遺伝子座の置換

上に記載された方法と同様の方法を用いて内在性マウス および 軽鎖遺伝子座にヒト 遺伝子セグメントを漸進的に挿入するための複数の標的化ベクターを作出した。複数の独立した最初の改変を、内在性軽鎖遺伝子座に対して行ったところ、その各々が、マウス軽鎖定常遺伝子およびエンハンサーに作動可能に接続されたh V およびJ 遺伝子セグメントを含むキメラ軽鎖遺伝子座をもたらした。

#### 【0202】

12個のヒトV および1個のヒトJ 遺伝子セグメントを含むヒト ミニ遺伝子座。R P 1 1 - 7 2 9 g 4 と命名されたヒトB A C クローン( I n v i t r o g e n ) を用いて、クラスターAからの初めの12個の連続したヒトV 遺伝子セグメントおよびh J 1 遺伝子セグメントまたは4個のh J 遺伝子セグメントを含むように、一連の最初の標的化ベクターを作出した。図4 A および4 B は、それぞれマウス および 軽鎖遺伝子座においてヒト 軽鎖遺伝子セグメントの最初の挿入を行うために構築された標的化ベクターを示している。

#### 【0203】

最初の標的化ベクターの第1のセットについては、12個のh V 遺伝子セグメントお

よび h J 1 遺伝子セグメントを含む 7 2 9 g 4 B A C クローンからの 1 2 4 , 1 2 5 b p の DNA フラグメントを、 3 ' マウス相同性アームのライゲーション用に h J 1 遺伝子セグメントの 9 9 6 b p 下流 ( 3 ' ) に P I - S c e I 部位を含むように作出した。 2 個の異なるセットの相同性アームを、このヒトフラグメントへのライゲーションに使用した；一方のセットの相同性アームは、 1 3 5 k 1 5 B A C クローンからの内在性マウス配列を含み ( 図 4 A )、もう一方のセットは、それぞれマウス B A C クローン R P 2 3 - 3 0 2 g 1 2 および R P 2 3 - 2 5 4 m 0 4 のマウス V および J 1 遺伝子セグメントの 5 ' 側および 3 ' 側の内在性配列を含んだ ( 図 4 B )。

#### 【 0 2 0 4 】

1 2 / 1 - 標的化ベクターの場合 ( 図 4 A )、実施例 1 に記載された改変されたマウス遺伝子座のマウス C 2 - J 4 - C 4 およびエンハンサー 2 . 4 を含む 2 7 , 8 4 7 b p の DNA フラグメントの 5 ' 末端に P I - S c e I 部位を作出した。その約 2 8 k b のマウスフラグメントを、約 1 2 4 k b のヒトフラグメントへのライゲーションによって 3 ' 相同性アームとして使用することにより、 5 ' から 3 ' に向かって、 h J 1 遺伝子セグメント、その h J 1 遺伝子セグメントの 3 ' 側の 9 9 6 b p のヒト配列、マウス C 2 遺伝子に対して 5 ' 側の 1 2 2 9 b p のマウス配列、マウス C 2 遺伝子、およびその約 2 8 k b のマウスフラグメントの残りの部分を含む 3 ' ジャンクションが作製された。ヒト V 3 - 1 2 遺伝子セグメントの上流 ( 5 ' ) には、内在性マウス遺伝子座の 5 ' 側の配列に対応する 2 3 , 7 9 2 b p のマウスゲノム DNA を含む 5 ' マウス相同性アームの開始部 ( s t a r t ) より前に、追加の 1 4 5 6 b p のヒト配列が存在した。 5 ' 相同性アームとそのヒト配列の始まりとの間に、 F r t 部位に隣接したネオマイシンカセットが存在した。

#### 【 0 2 0 5 】

したがって、 1 2 / 1 - 標的化ベクターは、 5 ' から 3 ' に向かって、内在性遺伝子座の 5 ' 側の約 2 4 k b のマウスゲノム配列を含む 5 ' 相同性アーム、 5 ' F r t 部位、ネオマイシンカセット、 3 ' F r t 部位、初めの 1 2 個の連続した h V 遺伝子セグメントおよび h J 1 遺伝子セグメントを含む約 1 2 3 k b のヒトゲノム配列、 P I - S c e I 部位、ならびに内在性 C 2 - J 4 - C 4 遺伝子セグメント、マウスエンハンサー 2 . 4 配列およびそのエンハンサー 2 . 4 の下流 ( 3 ' ) の追加のマウスゲノム配列を含む約 2 8 k b のマウスゲノム配列を含む 3 ' 相同性アームを含んだ ( 図 4 A )。

#### 【 0 2 0 6 】

同様の様式において、 1 2 / 1 - 標的化ベクター ( 図 4 B ) は、内在性遺伝子座に対する標的化が相同組換えによって達成され得るようにマウス配列を含むマウス相同性アームを使用したことを除いて、同じ約 1 2 4 ヒトフラグメントを使用した。したがって、 1 2 / 1 - 標的化ベクターは、 5 ' から 3 ' に向かって、内在性遺伝子座の 5 ' 側の約 2 3 k b のマウスゲノム配列を含む 5 ' 相同性アーム、 I - C e u I 部位、 5 ' F r t 部位、ネオマイシンカセット、 3 ' F r t 部位、初めの 1 2 個の連続した h V 遺伝子セグメントおよび h J 1 遺伝子セグメントを含む約 1 2 4 k b のヒトゲノム配列、 P I - S c e I 部位、ならびに内在性マウス C 2 遺伝子、 E i および E 3 ' ならびにその E 3 ' の下流 ( 3 ' ) の追加のマウスゲノム配列を含む約 2 8 k b のマウスゲノム配列を含む 3 ' 相同性アームを含んだ ( 図 4 B , 1 2 / 1 - 標的化ベクター )。

#### 【 0 2 0 7 】

これらの 2 つの最初の標的化ベクターのいずれかによる相同組換えによって、内在性マウス軽鎖定常遺伝子およびエンハンサー ( C 2 または C 2 および E i / E 3 ' または E n h 2 . 4 / E n h 3 . 1 ) 遺伝子に作動可能に接続された 1 2 個の h V 遺伝子セグメントおよび h J 1 遺伝子セグメントを含む改変されたマウス軽鎖遺伝子座 ( または ) が作製された ( それは、組換えが生じると、キメラ軽鎖の形成をもたらす )。

#### 【 0 2 0 8 】

1 2 個のヒト V 遺伝子セグメントおよび 4 個のヒト J 遺伝子セグメントを有するヒトミニ遺伝子座。キメラ軽鎖遺伝子座に多様性を付加する別のアプローチでは、クラ

10

20

30

40

50

スター A 由来の初めの 12 個の連続したヒト V 遺伝子セグメントならびに h J 1、2、3 および 7 遺伝子セグメントをマウス 軽鎖遺伝子座に挿入するために、第 3 の最初の標的化ベクターを作出した (図 4 B, 12 / 4 - 標的化ベクター)。各 J 遺伝子セグメントならびに各 J 遺伝子セグメントのすぐ隣りの 5' 領域と 3' 領域の両方からの約 100 bp のヒトゲノム配列を含む、h J 1、J 2、J 3 および J 7 遺伝子セグメントを含む DNA セグメントをデノボ DNA 合成 (Integrated DNA Technologies) によって作製した。P I - S c e I 部位を、この約 1 kb の DNA フラグメントの 3' 末端に作出し、クロラムフェニコール (chloramphenicol) カセットにライゲートした。ヒト B A C クローン 729 g 4 の h J 1 遺伝子セグメントに対して 5' 位および 3' 位におけるヒト 配列から相同性アームを P C R 増幅した。この中間体標的化ベクターによる相同組換えを、5' F r t 部位に対して 5' 側に I - C e u I 部位も含む F r t 部位に隣接したネオマイシンカセットでヒト V 3 - 12 遺伝子セグメントの上流 (5' ) に対して事前に標的化された、改変された 729 g 4 B A C クローンにおいて行った。その二重標的化された 729 g 4 B A C クローンは、5' から 3' に向かって、I - C e u I 部位、5' F r t 部位、ネオマイシンカセット、3' F r t 部位、初めの 12 個の h V 遺伝子セグメントを含む約 123 kb のフラグメント、ヒト J 1、2、3 および 7 遺伝子セグメントを含む約 1 kb のフラグメント、P I - S c e I 部位ならびにクロラムフェニコールカセットを含んだ。この中間体標的化ベクターを、I - C e u I と P I - S c e I とで同時に消化し、続いて、改変されたマウス B A C クローン (上に記載されたもの) にライゲートすることにより、第 3 の標的化ベクターを作製した。

#### 【0209】

このライゲーションによって、ヒト 配列を内在性 軽鎖遺伝子座に挿入するための第 3 の標的化ベクターがもたらされ、それは、5' から 3' に向かって、内在性マウス 遺伝子座の 5' 側の約 23 kb のゲノム配列を含む 5' マウス相同性アーム、I - C e u I 部位、5' F r t 部位、ネオマイシンカセット、3' F r t 部位、初めの 12 個の h V 遺伝子セグメントを含む約 123 kb のフラグメント、h J 1、2、3 および 7 遺伝子セグメントを含む約 1 kb のフラグメント、P I - S c e I 部位、ならびに内在性マウス C 遺伝子、E i および E 3' ならびにその E 3' の下流の (3' ) の追加のマウスゲノム配列を含む約 28 kb のマウスゲノム配列を含む 3' 相同性アームを含んだ (図 4 B, 12 / 4 - 標的化ベクター)。この第 3 の標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウス C 遺伝子に作動可能に接続された、12 個の h V 遺伝子セグメントおよび 4 個の h J 遺伝子セグメントを含む改変されたマウス 軽鎖遺伝子座が作製された (それらは、組換えが生じると、キメラヒト / マウス 軽鎖の形成をもたらす)。

#### 【0210】

組み込まれたヒト 軽鎖配列を有するヒト ミニ遺伝子座。同様の様式において、内在性 軽鎖遺伝子座へのヒト 遺伝子セグメントの最初の挿入を行うために作出された標的化ベクター (図 4 B, 12 / 1 - および 12 / 4 - 標的化ベクター) と類似の 2 個の追加の標的化ベクターを作出し、連続するヒト および ゲノム配列を含む独特に構築された標的化ベクターを用いてヒト 軽鎖遺伝子セグメントを漸進的に挿入した。これらの標的化ベクターは、ヒト V 4 - 1 遺伝子セグメントと J 1 遺伝子セグメントとの間に天然に位置する約 23 kb のヒト ゲノム配列を含むように構築された。このヒト ゲノム配列を、これらの 2 つの追加の標的化ベクターにおいてヒト V 遺伝子セグメントとヒト J 遺伝子セグメントとの間に特異的に位置づけた (図 4 B, 12 ( ) 1 - および 12 ( ) 4 - 標的化ベクター)。

#### 【0211】

上記ヒト ゲノム配列を含む両方の標的化ベクターを、上に記載された改変された R P 11 - 729 g 4 B A C クローンをを用いて作製した (図 6)。この改変された B A C クローンを、N o t I および A s i S I 制限酵素認識部位に隣接したスペクチノマイシン選択カセットで標的化した (図 6, 左上)。スペクチノマイシンカセットによる相同組換えに

10

20

30

40

50

10

## 20

30

## 40

50

ーンをI - C e u IおよびP I - S c e Iで消化することにより、上流のネオマイシンカセットおよび連続するヒト および 配列を含む独特のフラグメントが放出され、それらを、5'から3'に向かって、内在性 遺伝子座の5'側のマウスゲノム配列、I - C e u I部位、5' F r t部位、ネオマイシンカセット、3' F r t部位、h V 遺伝子セグメント(3 - 12から3 - 1)、V 3 - 1の約200bp下流のN o t I部位、ヒトV 4 - 1遺伝子セグメントとJ 1遺伝子セグメントとの間に天然に見られる約23kbのヒト 配列、h J 1遺伝子セグメントまたはh J 1、J 2、J 3およびJ 7遺伝子セグメントを含むゲノムフラグメントのいずれか、マウスE i、マウスC 遺伝子およびE 3'を含む改変されたマウスB A Cクローン302g12にライゲートした(図4, 12 h V - V J - h J 1および12 h V - V J - 4 h J 標的化ベクター)。これらの両方の標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウスC 遺伝子に作動可能に接続された、12個のh V 遺伝子セグメント、ヒト ゲノム配列および1個または4個のh J 遺伝子セグメントを含む2つの別個の改変されたマウス 軽鎖遺伝子座が作製された(それらは、組換えが生じると、キメラヒト / マウス 軽鎖の形成をもたらす)。

#### 【0214】

##### 実施例I I I

ヒト 軽鎖ミニ遺伝子座への追加のヒトV 遺伝子セグメントの操作

同様の標的化ベクターおよび方法(図5A, +16 - 標的化ベクターおよび図5B, +16 - 標的化ベクター)を用いて、追加のh V 遺伝子セグメントを、実施例2に記載された最初の各改変物に独立して付加した。

#### 【0215】

16個の追加のヒトV 遺伝子セグメントの導入。16個の追加のh V 遺伝子セグメントを実施例2に記載された改変された軽鎖遺伝子座に付加するための標的化ベクターを構築する際に使用された上流の(5')相同性アームは、内在性 または 軽鎖遺伝子座の5'側のマウスゲノム配列を含んだ。3'相同性アームは、すべての標的化ベクターに関して同じであり、実施例2に記載されたような改変物のヒト 配列の5'末端と重複するヒトゲノム配列を含んだ。

#### 【0216】

簡潔には、16個の追加のh V 遺伝子セグメントを、実施例2に記載された改変されたマウス軽鎖遺伝子座に導入するための2つの標的化ベクターを作出した(図5Aおよび5B, +16 - または+16 - 標的化ベクター)。クラスターA由来の21個の連続したh V 遺伝子セグメントを含むヒトB A CクローンR P 11 - 761113 (I n v i t r o g e n)由来の約172kbのDNAフラグメントを、内在性 または 軽鎖遺伝子座に対して5'側のマウスゲノム配列を含む5'相同性アームおよびヒトゲノム 配列を含む3'相同性アームを用いて作出した。これらの標的化構築物において使用された5'マウス または 相同性アームは、実施例2に記載されたものと同じ5'相同性アームだった(図5Aおよび5B)。3'相同性アームは、実施例2に記載されたヒトゲノム 配列の約123kbのフラグメントの等価な5'末端に対応するヒトゲノム 配列の53,057bpの重複を含んだ。これらの2つの標的化ベクターは、5'から3'に向かって、内在性マウス 軽鎖遺伝子座の5'側の約23kbのゲノム配列または内在性 軽鎖遺伝子座の5'側の約24kbのマウスゲノム配列を含む5'マウス相同性アーム、5' F r t部位、ハイグロマイシンカセット、3' F r t部位、および21個の連続したh V 遺伝子セグメントを含む171,457bpのヒトゲノム 配列(そのうちの約53kbは、実施例3に記載されたヒト 配列の5'末端と重複し、この標的化構築物に対する3'相同性アームとして働く)を含んだ(図5Aおよび5B, +16 - または+16 - 標的化ベクター)。これらの標的化ベクターによる相同組換えによって、独立して改変されたマウス および 軽鎖遺伝子座(各々が、内在性マウス定常遺伝子(C または C 2)に作動可能に接続された28個のh V 遺伝子セグメントおよびh J 1遺伝子セグメントを含む)が作製された(それらは、組換えが生じると、キメラ軽鎖の形成をも

10

20

30

40

50

たらず)。

#### 【0217】

同様の様式において、+16 - 標的化ベクターを使用することによっても、組み込まれたヒト配列ありおよびなしで複数のhJ遺伝子セグメントを組み込む実施例2に記載されたその他の最初の改変物(図4B)に、16個の追加のhV遺伝子セグメントを導入した。その他の最初の改変物を含む内在性マウス遺伝子座におけるこの標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウスC遺伝子に作動可能に接続されたヒトV-Jゲノム配列ありおよびなしで28個のhV遺伝子セグメントならびにhJ1、2、3および7遺伝子セグメントを含むマウス軽鎖遺伝子座が作製された(それらは、組換えが生じると、キメラ - 軽鎖の形成をもたらす)。

10

#### 【0218】

12個の追加のヒトV遺伝子セグメントの導入。同様の標的化ベクターおよび方法を用いて、追加のhV遺伝子セグメントを、上に記載された各改変物に独立して付加した。追加のhV遺伝子セグメントを含む標的化ベクターによる相同組換えから生じる最終的な遺伝子座の構造は、図7Aおよび7Bに示されている。

#### 【0219】

簡潔には、上に記載された改変されたマウスおよび軽鎖遺伝子座に12個の追加のhV遺伝子セグメントを導入するために、標的化ベクターを作出した(図5Aおよび5B, +12 - または12 - 標的化ベクター)。クラスターB由来の12個の連続したhV遺伝子セグメントを含むヒトBACクローンRP11-22118(Invitrogen)由来の93,674bpのDNAフラグメントを、内在性マウスまたは軽鎖遺伝子座に対して5'側のマウスゲノム配列を含む5'相同性アームおよびヒトゲノム配列を含む3'相同性アームを用いて操作した。この標的化構築物において使用された5'相同性アームは、上に記載された16個のhV遺伝子セグメントの付加に使用されたものと同じ5'相同性アームだった(図5Aおよび5B)。BACクローンRP11-761113由来のヒト配列の27,468bpのゲノムフラグメントに含まれるヒトV3-29P遺伝子セグメントに対して約3431bpだけ5'側にPI-ScEI部位を作出することによって、3'相同性アームを作製した。このPI-ScEI部位は、+16 - または+16 - 標的化ベクター(図5Aおよび5B)を用いて、追加のヒト配列の約94kbのフラグメントと、先の改変におけるヒト配列の5'末端と重複するヒト配列の約27kbのフラグメントとを連結するライゲーション点として働いた。これらの2つの標的化ベクターは、5'から3'に向かって、内在性軽鎖遺伝子座の5'側の約23kbのマウスゲノム配列または内在性軽鎖遺伝子座の5'側の約24kbのマウスゲノム配列を含む5'相同性アーム、5'Frt部位、ネオマイシンカセット、3'Frt部位、ならびに16個のhV遺伝子セグメントおよびPI-ScEI部位を含む121,188bpのヒトゲノム配列(そのうちの約27kbは、16個の追加のhV遺伝子セグメントの挿入からのヒト配列の5'末端と重複し、この標的化構築物に対する3'相同性アームとして働く)を含んだ(図5Aおよび5B, +12 - または12 - 標的化ベクター)。これらの標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウス定常遺伝子(CまたはC2)に作動可能に接続された40個のhV遺伝子セグメントおよびヒトJ1を含む改変されたマウスおよび軽鎖遺伝子座が独立して作製された(それらは、組換えが生じると、キメラ軽鎖の形成をもたらす)(図5Aおよび5Bの下部)。

20

30

40

#### 【0220】

同様の様式において、+12 - 標的化ベクターを使用することによっても、組み込まれたヒト配列ありおよびなしで複数のhJ遺伝子セグメントを組み込むその他の最初の改変物(図4B)に、12個の追加のhV遺伝子セグメントを導入した。その他の改変物を含む内在性マウス遺伝子座におけるこの標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウスC遺伝子に作動可能に接続されたヒトV-Jゲノム配列ありおよびなしで40個のhV遺伝子セグメントならびにhJ1、2、3および7遺伝子セグ

50

メントを含むマウス 軽鎖遺伝子座が作製された（それらは、組換えが生じると、キメラ - 軽鎖の形成をもたらす）。

【 0 2 2 1 】

実施例 I V

ヒト 軽鎖遺伝子セグメントを有する標的化された E S 細胞の同定

前述の実施例に従って作製された標的化された B A C D N A を使用して、マウス E S 細胞をエレクトロポレートすることにより、ヒト 軽鎖遺伝子セグメントを発現するキメラマウス作製の改変された E S 細胞を作製した。再配列されていないヒト 軽鎖遺伝子セグメントの挿入を含む E S 細胞を定量的 T A Q M A N（登録商標）アッセイによって同定した。特異的プライマーセットおよびプローブを、ヒト 配列および付随する選択カセットの挿入（対立遺伝子の獲得，G O A）、内在性マウス配列および任意の選択カセットの喪失（対立遺伝子の喪失，L O A）、ならびに隣接するマウス配列の保持（対立遺伝子の保持，A R）についてデザインした。ヒト 配列の追加の各挿入については、追加のプライマーセットおよびプローブを使用して、その追加のヒト 配列の存在を確かめ、ならびに先のプライマーセットおよびプローブを使用して、先に標的化されていたヒト配列の保持を確かめた。表 1 は、定量的 P C R アッセイにおいて使用されたプライマーおよび関連するプローブを示している。表 2 は、E S 細胞クローンにおいてヒト 軽鎖遺伝子セグメントの各区分の挿入を確かめるために使用された組み合わせを示している。

10

【 0 2 2 2 】

ヒト V 5 - 5 2 - V 1 - 4 0 遺伝子セグメントを含む標的化構築物の挿入によって導入された F r t で挟まれたネオマイシンカセットを除去するために、ヒト 軽鎖遺伝子セグメントを有する E S 細胞は必要に応じて、F L P を発現する構築物でトランスフェクトされる（図 5 A および 5 B）。そのネオマイシンカセットは必要に応じて、F L P リコンビナーゼを発現するマウス（例えば、米国特許第 6 , 7 7 4 , 2 7 9 号）と交配させることによって除去され得る。そのネオマイシンカセットは、必要に応じて、それらのマウスに保持される。

20

【 0 2 2 3 】

【表 1】

表1

プライマー	配列番号	： プローブ	配列番号	：
hL2F	2	hL2P	24	
hL2R	3			
hL3F	4	hL3P	25	
hL3R	5			
NeoF	6	NeoP	26	
NeoR	7			
61hJ1F	8	61hJ1P	27	
61hJ1R	9			
67hT1F	10	67hT1P	28	
67hT1R	11			
67hT3F	12	67hT3P	29	
67hT3R	13			
HygF	14	HygP	30	
HygR	15			
MKD2F	16	MKD2P	31	
MKD2R	17			
MKP8F	18	MKP8P	32	
MKP8R	19			
MKP15F	20	MKP15P	33	
MKP15R	21			
MK20F	22	—	—	
MKP4R	23			
68h2F	34	68h2P	38	
68h2R	35			
68h5F	36	68h5P	39	
68h5R	37			
mL1F	75	mL1P	83	
mL1R	76			
mL2F	77	mL2P	84	
mL2R	78			
mL11F	79	mL11P	85	
mL11R	80			
mL12F	81	mL12P	86	
mL12R	82			

【 0 2 2 4 】

【表 2 - 1】

表2

変更	アッセイ	順方向／逆方向 プライマーセット	プローブ	配列の位置
12個のhVλおよび hJλ1の挿入	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	hJλ 配列
		NeoF/NeoR	NeoP	ネオマイシンカセット
	LOA	MK20F/MKP4R	—	不活性化されたκ 遺伝子座 のlox511/loxP配列
		HygF/HygR	HygP	不活性化されたλ 遺伝子座 からのハイグロマイシンカセッ ト
		mL1F/mL1R	mL1P	マウス Vλ1-Cλ1 クラスター
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	マウス Vλ2-Cλ2 クラスター
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Vκ 遺伝子座の5'における マウス配列
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Vκ 遺伝子座の3'における マウス配列
16個のhVλ の挿入	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 – hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	ハイグロマイシンカセット
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	ネオマイシンカセット
		mL1F/mL1R	mL1P	マウス Vλ1-Cλ1 クラスター
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	マウス Vλ2-Cλ2 クラスター
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Vκ 遺伝子座の5'における マウス配列
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Vκ 遺伝子座の3'における マウス配列

【 0 2 2 5 】

【表 2 - 2】

12個のhVλ の挿入	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hVλ5-52 – hVλ1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	ネオマイシンカセット
	LOA	HygF/HygR	HygP	ハイグロマイシンカセット
		mL1F/mL1R	mL1P	マウス Vλ1-Cλ1 クラスター
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	マウス Vλ2-Cλ2 クラスター
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 – hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Vκ 遺伝子座の5'における マウス配列
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Vκ 遺伝子座の3'における マウス配列

## 実施例 V

内在性軽鎖遺伝子座からヒト 軽鎖を発現するマウスの作製

上に記載された標的化されたES細胞を、ドナーES細胞として使用し、VELOCIMOUSE（登録商標）法によって8細胞期のマウス胚に導入した（例えば、米国特許第7,294,754号およびPoueymirouら（2007）F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99を参照のこと）。ヒト 遺伝子セグメントを独立して有するVELOCIMICE（登録商標）（完全にドナーES細胞に由来するF0マウス）を、独特のヒト 遺伝子セグメント（前出）の存在を検出する対立遺伝子アッセイの変法（Valenzuelaら、前出）を用いたジェノタイピングによって同定した。

## 【0226】

ヒト 軽鎖遺伝子セグメントを有するマウスの： 軽鎖使用頻度。単一のhJ 遺伝子セグメントを含むhV 遺伝子セグメント（図5B）の連続した3つの挿入の各々についてホモ接合のマウス、およびヒトV - J ゲノム配列を含む、単一のhJ 遺伝子セグメントまたは4個のヒトJ 遺伝子セグメントを含むhV 遺伝子セグメント（図4B）の第1の挿入についてホモ接合のマウスを、フローサイトメトリーを用いて脾細胞における および 軽鎖発現について解析した。

## 【0227】

簡潔には、マウスの群（1群あたり3～7匹の動物の範囲）から脾臓を回収し、スライドガラスを用いて粉碎した。ACK溶解緩衝液（Lonza Walkersville）を用いて赤血球（RBC）を溶解した後、脾細胞を、マウスCD19（クローン1D3；BD Biosciences）、マウスCD3（17A2；Biolegend）、マウスIg（187.1；BD Biosciences）およびマウスIg（RML-42；Biolegend）に特異的な蛍光色素結合抗体で染色した。BD（商標）LSRIIFローサイトメーター（BD Biosciences）を用いてデータを取得し、FLOWJO（商標）ソフトウェア（Tree Star, Inc.）を用いて解析した。表3は、各遺伝的改変を有する動物の群由来の脾細胞において観察されたB細胞（CD19<sup>+</sup>）、 軽鎖（CD19<sup>+</sup>Ig<sup>+</sup>Ig<sup>-</sup>）および 軽鎖（CD19

$^{+}Ig^{-}Ig^{+}$  ) 発現についての平均パーセント値を示している。

#### 【0228】

同様の実験において、マウスC 遺伝子に作動可能に接続されたヒトV - J ゲノム配列を含む12個のhV 遺伝子セグメントおよび4個のhJ 遺伝子セグメント(図4Bの下部)の第1の挿入についてホモ接合のマウスならびに40個のhV 遺伝子セグメントおよび1個のhJ 遺伝子セグメント(図5Bの下部または図7Bの上部)についてホモ接合のマウス由来の脾臓のコンパートメントのB細胞の含有量を、フローサイトメトリーを用いて(上に記載されたように)Ig およびIg 発現について解析した。図8Aは、各群の代表的なマウスに対するCD19<sup>+</sup>B細胞におけるIg およびIg 発現を示している。脾臓1つあたりのCD19<sup>+</sup>B細胞の数もまた、各マウスについて記録した(図8B)。

10

#### 【0229】

別の実験では、マウスC 遺伝子に作動可能に接続されたヒトV - J ゲノム配列を含む40個のhV 遺伝子セグメントおよび4個のhJ 遺伝子セグメント(図7Bの下部)についてホモ接合のマウス由来の脾臓および骨髓コンパートメントのB細胞の含有量を、様々な細胞表面マーカーのフローサイトメトリーを用いて、B細胞発生の経過について解析した。

#### 【0230】

簡潔には、野生型ならびにマウスC 遺伝子に作動可能に接続されたヒトV - J ゲノム配列を含む40個のhV 遺伝子セグメントおよび4個のhJ 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウスの2つの群(各々N=3、9~12週齢、雄および雌)を屠殺し、脾臓および骨髓を回収した。完全RPMI培地(ウシ胎仔血清、ビルビン酸ナトリウム、Hepes、2-メルカプトエタノール、可欠アミノ酸およびゲンタマイシンが補充されたRPMI培地)で流すことによって大腿骨から骨髓を回収した。脾臓および骨髓の調製物由来のRBCを、ACK溶解緩衝液(Lonza Walkersville)で溶解した後、完全RPMI培地で洗浄した。1×10<sup>6</sup>細胞を抗マウスCD16/CD32(2.4G2, BD Biosciences)とともに氷上で10分間インキュベートした後、氷上で30分間、選択された抗体パネルで標識した。

20

#### 【0231】

骨髓パネル: 抗マウスFITC-CD43(1B11, BioLegend)、PE-ckit(2B8, BioLegend)、PeCy7-IgM(II/41, eBioscience)、PerCP-Cy5.5-IgD(11-26c.2a, BioLegend)、APC-B220(RA3-6B2, eBioscience)、APC-H7-CD19(ID3, BD)およびPacific Blue-CD3(17A2, BioLegend)。

30

#### 【0232】

骨髓および脾臓パネル: 抗マウスFITC-Ig (187.1, BD)、PE-Ig (RML-42, BioLegend)、PeCy7-IgM(II/41, eBioscience)、PerCP-Cy5.5-IgD(11-26c.2a, BioLegend)、Pacific Blue-CD3(17A2, BioLegend)、APC-B220(RA3-6B2, eBioscience)、APC-H7-CD19(ID3, BD)。

40

#### 【0233】

染色後、細胞を洗浄し、2%ホルムアルデヒド中で固定した。FACSCANTO II(商標)フローサイトメーター(BD Biosciences)においてデータを取得し、FLOWJO(商標)ソフトウェア(Tree Star, Inc.)を用いて解析した。図9A~9Dは、各群の代表的な1匹のマウスの脾臓コンパートメントについての結果を示している。図10A~10Eは、各群の代表的な1匹のマウスの骨髓コンパートメントについての結果を示している。表4は、様々な遺伝的改変を有する動物の群由来の脾細胞において観察されたB細胞(CD19<sup>+</sup>)、軽鎖(CD19<sup>+</sup>Ig<sup>+</sup>Ig<sup>-</sup>)

50

）および 軽鎖（ $CD19^+ Ig^- Ig^+$ ）発現についての平均パーセント値を示している。表5は、野生型ならびにマウスC 遺伝子に作動可能に接続されたヒトV - J ゲノム配列を含む40個のhV 遺伝子セグメントおよび4個のhJ 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウスの骨髄において観察されたB細胞（ $CD19^+$ ）、成熟B細胞（ $B220^{hi} IgM^+$ ）、未熟B細胞（ $B220^{int} IgM^+$ ）、 軽鎖を発現する未熟B細胞（ $B220^{int} IgM^+ Ig^+$ ）および 軽鎖を発現する未熟B細胞（ $B220^{int} IgM^+ Ig^+$ ）についての平均パーセント値を示している。この実験は、上に記載された追加のマウス群を用いて繰り返され、同様の結果を示した（データ示さず）。

【0234】

【表3】

表3

遺伝子型	% B 細胞	% Igκ <sup>+</sup>	% Igλ <sup>+</sup>
野生型	46.2	91.0	3.6
12 hVλ+hJλ1	28.3	10.4	62.5
12 hVλ-VκJκ-hJλ1	12.0	11.0	67.5
12 hVλ-VκJκ-4hJλ	41.8	17.2	68.4
28 hVλ+hJλ1	22.0	13.3	51.1
40 hVλ+hJλ1	28.2	24.3	53.0

【0235】

【表4】

表 4

遺伝子型	% B 細胞	% Igκ <sup>+</sup>	% Igλ <sup>+</sup>
野生型	49.8	91.2	3.5
40 hVλ-VκJκ-4hJλ	33.3	41.6	43.1

【0236】

【表5】

表 5

遺伝子型	% B細胞	% 成熟 B細胞	% 未熟 B細胞	% 未熟 Igκ <sup>+</sup> B細胞	% 未熟 Igλ <sup>+</sup> B細胞
野生型	62.2	9.2	12.0	79.0	8.84
40hVλ-VκJκ-4hJλ	60.43	2.59	7.69	38.29	43.29

ヒト 軽鎖遺伝子セグメントを有するマウスにおけるヒトV 遺伝子の使用頻度。ヒト配列の第1の挿入（hV 3 - 12 - hV 3 - 1およびhJ 1，図5B）についてヘテロ接合のマウスおよびヒト配列の第3の挿入（hV 5 - 52 - hV 3 - 1およびhJ 1，図5B）についてホモ接合のマウスを、脾細胞から単離されたRNAを用いた逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によってヒト 軽鎖遺伝子の使用頻

10

20

30

40

50

度について解析した。

#### 【0237】

簡潔には、脾臓を回収し、滅菌された使い捨てバッグにおいて、5%HI-FBSを含む10mLのRPMI-1640(Sigma)で灌流した。次いで、1個の脾臓が入った各バッグをSTOMACHER(商標)(Seward)に入れ、中位の設定で30秒間ホモジナイズした。ホモジナイズされた脾臓を0.7μmセルストレーナーで濾過し、次いで、遠心機でペレットにし(1000rpmで10分間)、RBCをBD PHARM L Y S E(商標)(BD Biosciences)中で3分間溶解した。脾細胞をRPMI-1640で希釈し、再度遠心した後、1mLのPBS(Irvine Scientific)に再懸濁した。ペレットになった脾細胞から、当該分野で公知の標準的な手法を用いてRNAを単離した。

10

#### 【0238】

ヒトhV 遺伝子セグメントおよびマウスC 遺伝子に特異的なプライマー(表6)を用いて、脾細胞RNAにおいてRT-PCRを行った。PCR産物をゲル精製し、pCR2.1-TOPO TAベクター(Invitrogen)にクローニングし、そのベクター内のクローニング部位に隣接する位置に位置するプライマーM13Forward(GTAAACGACGGCCAG;配列番号55)およびM13Reverse(CAGGAACAGCTATGAC;配列番号56)を用いて配列決定した。ヒト 配列の第1および第3の挿入に由来する合計84個のクローンの配列決定を行うことにより、hV 遺伝子の使用頻度を決定した(表7)。選択されたRT-PCRクローンについてのhV - hJ 1 - mC ジャンクションのヌクレオチド配列を図11に示す。

20

#### 【0239】

同様の様式において、内在性マウスC 遺伝子に作動可能に接続されたヒト 軽鎖遺伝子配列(すなわち、ヒトV - J ゲノム配列を含む40個のhV 遺伝子セグメントおよび4個のhJ 遺伝子セグメント、図7Bの下部)の第3の挿入についてホモ接合のマウスを、脾細胞から単離されたRNAを用いるRT-PCRによってヒト 軽鎖遺伝子の使用頻度について解析した(上に記載されたように)。26個の選択されたRT-PCRクローンについてのヒト 軽鎖遺伝子セグメントの使用頻度を表8に示す。選択されたRT-PCRクローンについてのhV - hJ - mC ジャンクションのヌクレオチド配列を図12に示す。

30

#### 【0240】

同様の様式において、内在性マウスC 2 遺伝子に作動可能に接続されたヒト 軽鎖遺伝子セグメント(12個のhV 遺伝子セグメントおよびhJ 1, 図4Aおよび図5A)の第1の挿入についてホモ接合のマウスを、脾細胞から単離されたRNAを用いるRT-PCRによってヒト 軽鎖遺伝子の使用頻度について解析した(上に記載されたように)。hV 遺伝子セグメントに特異的なプライマー(表6)を、マウスC 2 遺伝子に特異的な2つのプライマー;C 2 - 1(配列番号104)またはC 2 - 2(配列番号105)のうちの1つと対にした。

#### 【0241】

h 1に再配列された複数のhV 遺伝子セグメントが、内在性マウス 軽鎖遺伝子座にヒト 軽鎖遺伝子セグメントを有するマウス由来のRT-PCRクローンから観察された。選択されたRT-PCRクローンについてのhV - hJ - mC 2 ジャンクションのヌクレオチド配列を図13に示す。

40

#### 【0242】

【表 6】

表 6

5' hV $\lambda$ プライマー	配列 (5'-3')	配列番号 :
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	40
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	41
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSCTCTCC	44
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	45
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CTACTT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL-11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53

3' マウス C $\kappa$ プライマー	配列 (5'-3')	配列番号 :
mlgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

【 0 2 4 3 】

【表 7】

表 7

hVλ	観察されたクローン の数
3-1	2
4-3	3
2-8	7
3-9	4
3-10	3
2-14	1
3-19	1
2-23	7
3-25	1
1-40	9
7-43	2
1-44	2
5-45	8
7-46	3
9-49	6
1-51	3

表 8

クローン	hVλ	hJλ
1-3	1-44	7
1-5	1-51	3
2-3	9-49	7
2-5	1-40	1
2-6	1-40	7
3b-5	3-1	7
4a-1	4-3	7
4a-5	4-3	7
4b-1	1-47	3
5-1	3-10	3
5-2	1-40	7
5-3	1-40	7
5-4	7-46	2
5-6	1-40	7
5-7	7-43	3
6-1	1-40	1
6-2	1-40	2
6-7	1-40	3
7a-1	3-10	7
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

図 11 は、単一の hJ 遺伝子セグメントとともに hV 遺伝子セグメントの第 1 および第 3 の挿入を有するマウス由来の RT-PCR クローンについての hV - hJ 1 - mC ジャンクションの配列を示している。図 11 に示されている配列は、マウス C 遺伝子に組み換えられた hJ 1 とともに種々の hV 遺伝子セグメントを含む独特の再配列を示している。12 個の hV 遺伝子セグメントおよび hJ 1 を含む単一の改変された内在性 遺伝子座を有するヘテロ接合マウスと、40 個の hV 遺伝子セグメントおよび hJ 1 を含む 2 個の改変された内在性 遺伝子座を有するホモ接合マウスの両方ともが、マウス C 遺伝子に作動可能に接続されたヒト 遺伝子セグメントを生成することができ、ヒト 軽鎖を発現する B 細胞を産生することができた。これらの再配列は、それらのキメラ遺伝子座が、これらのマウスの複数の独立した B 細胞においてヒト 遺伝子セグメントを独立して再配列することができたことを実証する。さらに、hJ 1 とともに再配列すると観察された 16 個の異なる hV 遺伝子セグメントによって証明されるように（表 7）、内在性 軽鎖遺伝子座に対するこれらの改変は、いずれの hV 遺伝子セグメ

10

20

30

40

50

ントも作動不能にせず、またB細胞発生中にキメラ遺伝子座が複数のhV およびhJ (J 1) 遺伝子セグメントの組換えを妨げなかった。さらに、これらのマウスは、内在性免疫グロブリン軽鎖レパートリーの一部としてマウスC 遺伝子に作動可能に接続された再配列されたヒトV - J 遺伝子セグメントを含む機能的な抗体を産生した。

#### 【0244】

図12は、ヒトV - J ゲノム配列を含む40個のhV 遺伝子セグメントおよび4個のhJ 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス由来の選択されたRT-PCRクローンについてのhV - hJ - mC ジャンクシジョンの配列を示している。図12に示されている配列は、キメラ遺伝子座全体にわたって複数の異なるhV 遺伝子セグメントを含む独特の追加の再配列を示している(複数の異なるhJ 遺伝子セグメントは、再配列され、マウスC 遺伝子に作動可能に接続されている)。40個のhV 遺伝子セグメントおよび4個のhJ 遺伝子セグメントを含む改変された内在性 遺伝子座を有するホモ接合マウスもまた、マウスC 遺伝子に作動可能に接続されたヒト 遺伝子セグメントを生成することができ、ヒト 軽鎖を発現するB細胞を産生することができた。これらの再配列は、すべての段階のキメラ遺伝子座が、これらのマウスの複数の独立したB細胞においてヒト 遺伝子セグメントを独立して再配列することができたことをさらに実証する。さらに、26個の選択されたRT-PCRクローン由来の4つすべてのhJ 遺伝子セグメントとともに再配列すると観察された12個の異なるhV 遺伝子セグメントによって証明されるように(表8)、内在性 軽鎖遺伝子座に対するこれらの追加の改変は、ヒト 遺伝子セグメントの各挿入が、いずれのhV 遺伝子セグメントおよび/またはJ 遺伝子セグメントも作動不能にせず、またB細胞発生中にキメラ遺伝子座がhV およびJ 遺伝子セグメントの組換えを妨げなかったことを実証する。さらに、これらのマウスも同様に、内在性免疫グロブリン軽鎖レパートリーの一部としてマウスC 領域に作動可能に接続されたヒトV - J 遺伝子セグメントを含む機能的な抗体を産生した。

#### 【0245】

図13は、12個のhV 遺伝子セグメントおよびhJ 1についてホモ接合のマウス由来の3個の個別のRT-PCRクローンについてのhV - hJ - mC 2ジャンクシジョンの配列を示している。図13に示されている配列は、第1の挿入の長さによって異なるhV 遺伝子セグメントを含む追加の独特の再配列を示している(hJ 1は、再配列され、マウスC 2遺伝子に作動可能に接続されている)(2D1 = V 2 - 8 J 1; 2D9 = V 3 - 10 J 1; 3E15 = V 3 - 1 J 1)。1つのクローンが、hV - hJ ジャンクシジョンにおけるNの付加に起因して、非産生性の再配列を示した(2D1, 図13)。これは、V(D)J組換えでは珍しいことではない。なぜなら、組換え中の遺伝子セグメントの連結は不正確であると示されているからである。このクローンは、これらのマウスの軽鎖レパートリーに存在する非産生性の組換え体を代表するが、これは、抗体遺伝子間のジャンクシジョンの多様性に寄与する遺伝的メカニズムが、これらのマウスにおいて正常に作動しており、それにより、より高い多様性を有する軽鎖を含む抗体レパートリーがもたらされることを実証する。

#### 【0246】

12個のhV 遺伝子セグメントおよびhJ 1を含む改変された内在性 遺伝子座を有するホモ接合マウスもまた、内在性マウスC 遺伝子に作動可能に接続されたヒト 遺伝子セグメントを生成することができ、マウスC 領域に接続されたhV 領域を含むリバースキメラ 軽鎖を発現するB細胞を産生することができた。これらの再配列はさらに、その他の軽鎖遺伝子座(すなわち、 遺伝子座)に配置されたヒト 軽鎖遺伝子セグメントが、これらのマウスの複数の独立したB細胞においてヒト 遺伝子セグメントを独立して再配列することができたことを実証する。さらに、内在性 軽鎖遺伝子座に対する改変は、ヒト 遺伝子セグメントの挿入が、いずれのhV 遺伝子セグメントおよび/またはhJ 1遺伝子セグメントも作動不能にせず、またB細胞発生中にキメラ遺伝子座がhV およびhJ 1遺伝子セグメントの組換えを妨げなかったことを実証する。さらに、これらのマウスもまた、内在性免疫グロブリン軽鎖レパートリーの一部としてマウスC

領域に作動可能に接続されたヒト V<sub>H</sub> - J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む機能的な抗体を産生した。

#### 【0247】

機能的な軽鎖は、脾臓と骨髄の両方における B 細胞発生の様々なチェックポイントにおいて必要とされるので、この実施例で示されるように、内在性 および 軽鎖遺伝子座にヒト 軽鎖遺伝子セグメントを有するマウスは、ヒト 軽鎖遺伝子セグメントを再配列すること、ならびにそれらをそのマウスの通常の抗体レパートリーの一部としてマウス C<sub>H</sub> および / または C<sub>H</sub> 領域という背景において発現することができる。さらに、B 細胞の初期のサブセット（例えば、プレ - 、プロ - および移行 B 細胞）が、これらのマウスにおいて野生型同腹仔と比べて正常な表現型を示す（図 9 D、10 A および 10 B）。骨髄および末梢 B 細胞集団において軽微な欠陥が観察された（これは、自己反応性未熟 B 細胞のサブセットの欠失および / またはヒト 軽鎖とマウス重鎖との最適以下の会合に起因し得る）。しかしながら、これらのマウスにおいて観察された I g G / I g M 使用頻度は、マウスにおいて観察される軽鎖発現よりもヒト軽鎖発現に似た状況を示す。

#### 【0248】

##### 実施例 V I

内在性軽鎖遺伝子座からヒト 軽鎖を発現するマウスの交配

内在性マウス軽鎖遺伝子座におけるヒト 遺伝子セグメントの使用頻度を最適化するために、再配列されていないヒト 遺伝子セグメントを有するマウスを、対立する内在性軽鎖遺伝子座（または ）に欠失を含む別のマウスと交配させる。例えば、内在性 遺伝子座に位置づけられたヒト 遺伝子セグメントだけが、内在性 軽鎖遺伝子座にも欠失を有するマウスに存在する機能的な軽鎖遺伝子セグメントであり得る。この様式では、得られる子孫は、前述の実施例に記載されたようにヒト 軽鎖だけを発現し得る。交配は、当該分野において認められている標準的な手法によって、およびあるいは、営利会社、例えば、The Jackson Laboratory によって、行われる。内在性 遺伝子座にヒト 軽鎖遺伝子セグメントを有し、かつ内在性 軽鎖遺伝子座の欠失を有するマウス系統は、独特のリバースキメラ（ヒト - マウス） 軽鎖の存在および内在性マウス軽鎖の非存在についてスクリーニングされる。

#### 【0249】

再配列されていないヒト 軽鎖遺伝子座を有するマウスは、ヒト重鎖可変遺伝子の遺伝子座による内在性マウス重鎖可変遺伝子の遺伝子座の置換を含むマウス（米国特許第 6, 596, 541 号, Regeneron Pharmaceuticals を参照のこと。VELOCIMMUNE（登録商標）遺伝子操作マウス）とも交配される。VELOCIMMUNE（登録商標）マウスには、内在性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に接続されたヒト重鎖可変領域を含むゲノムを有するマウスが部分的に含まれる（そのマウスは、抗原性の刺激に応答してヒト重鎖可変領域およびマウス重鎖定常領域を含む抗体を産生する）。それらの抗体の重鎖の可変領域をコードする DNA は、単離され得、ヒト重鎖定常領域をコードする DNA に作動可能に接続され得る。次いで、その DNA は、抗体の完全ヒト重鎖を発現することができる細胞において発現され得る。好適な交配スケジュールが行われると、ヒト重鎖遺伝子座による内在性マウス重鎖遺伝子座の置換を有し、かつ内在性 軽鎖遺伝子座に再配列されていないヒト 軽鎖遺伝子座を有するマウスが得られる。目的の抗原で免疫されると、体細胞変異したヒト重鎖可変領域およびヒト 軽鎖可変領域を含む抗体が単離され得る。

#### 【0250】

##### 実施例 V I I

ヒト重鎖およびヒト 軽鎖を発現するマウスからの抗体の産生

再配列されていないヒト 軽鎖遺伝子座を含むマウスを他の内在性 I g 遺伝子座の改変および欠失（上に記載されたような）を含む様々な所望の系統と交配させた後、選択されたマウスを目的の抗原で免疫する。

#### 【0251】

一般には、単一の再配列されたヒト生殖細胞系列軽鎖領域のうちの1つを含むV E L O C I M M U N E (登録商標)マウスを抗原で負荷(c h a l l e n g e)し、その動物の血清からリンパ細胞(例えば、B細胞)を回収する。そのリンパ細胞をミエローマ細胞株と融合させることにより、不死のハイブリドーマ細胞株が調製され、そのようなハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、選択することにより、ヒト重鎖およびヒト 軽鎖を含む、免疫に使用した抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株が同定され得る。その重鎖および 軽鎖の可変領域をコードするD N Aを単離し、その重鎖および軽鎖の望ましいアイソタイプの定常領域に接続し得る。内在性マウス 遺伝子座と比べてさらにh V 遺伝子セグメントが存在するおかげで、軽鎖レパートリーの多様性は、劇的に増加し、免疫されると抗原特異的レパートリーに対してより高い多様性を付与する。得られるクローニングされた抗体配列は、続いて、C H O細胞などの細胞において生成され得る。あるいは、抗原特異的キメラ抗体または軽鎖および重鎖の可変ドメインをコードするD N Aが、抗原特異的リンパ球(例えば、B細胞)から直接単離され得る。

# 【0252】

はじめに、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する高親和性キメラ抗体が単離される。上に記載されたように、それらの抗体を特徴付け、親和性、選択性、エピトープなどをはじめとした望ましい特徴について選択する。それらのマウス定常領域を、所望のヒト定常領域で置換することにより、体細胞変異したヒト重鎖、および本発明の再配列されていないヒト 軽鎖遺伝子座に由来するヒト 軽鎖を含む完全ヒト抗体が生成される。好適なヒト定常領域としては、例えば、野生型のまたは改変されたI g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4が挙げられる。

(項目1) マウス 軽鎖定常領域配列と連続する、 軽鎖可変領域配列(V )および少なくとも1つのJ配列(J)を含む、マウス。

(項目2) 上記マウスが、機能的なマウスV 遺伝子セグメントおよび/または機能的なマウスJ 遺伝子セグメントを欠く、項目1に記載のマウス。

(項目3) 上記V がヒトV (h V )であり、上記JがヒトJ (h J )である、項目1に記載のマウス。

(項目4) 上記h V および上記h J が再配列されていない遺伝子セグメントである、項目3に記載のマウス。

(項目5) 再配列されていない複数のh V 遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのh J 遺伝子セグメントを含む、項目4に記載のマウス。

(項目6) 上記再配列されていない複数のh V 遺伝子セグメントが、少なくとも12個の遺伝子セグメント、少なくとも28個の遺伝子セグメント、または少なくとも40個の遺伝子セグメントである、項目5に記載のマウス。

(項目7) 上記少なくとも1つのh J 遺伝子セグメントが、J 1、J 2、J 3、J 7、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目3に記載のマウス。

(項目8) 内在性マウス 軽鎖遺伝子座が、全体的にまたは部分的に欠失される、項目1に記載のマウス。

(項目9) 上記マウス 軽鎖定常領域配列が、内在性マウス 軽鎖遺伝子座に存在する、項目1に記載のマウス。

(項目10) 上記マウスのB細胞のうち約10%~約45%が、ヒト 軽鎖可変(V )ドメインおよびマウス 軽鎖定常(C )ドメインを含む軽鎖を含む抗体を発現する、項目1に記載のマウス。

(項目11) 上記ヒト 可変ドメインが、3 - 1 / 1、3 - 1 / 7、4 - 3 / 1、4 - 3 / 7、2 - 8 / 1、3 - 9 / 1、3 - 10 / 1、3 - 10 / 3、3 - 10 / 7、2 - 14 / 1、3 - 19 / 1、2 - 23 / 1、3 - 25 / 1、1 - 40 / 1、1 - 40 / 2、1 - 40 / 3、1 - 40 / 7、7 - 43 / 1、7 - 43 / 3、1 - 44 / 1、1 - 44 / 7、5 - 45 / 1、5 - 45 / 2、5 - 45 / 7、7 - 46 / 1、7 - 46 / 2、7 - 46 / 7、9 - 49 / 1、9 - 49 / 2、9 - 49 / 7および1 - 51 / 1からなる群より選

10

20

30

40

50

扱われる再配列されたhV / hJ 配列に由来する、項目10に記載のマウス。

(項目12) ヒト 軽鎖遺伝子座由来のヒトV - J 遺伝子間領域をさらに含む、項目1に記載のマウスであって、ここで、該ヒトV - J 遺伝子間領域は、上記V 配列および上記J 配列と連続する、マウス。

(項目13) 上記ヒトV - J 遺伝子間領域は、上記V 配列と上記J 配列との間に配置される、項目12に記載のマウス。

(項目14) (a) 内在性マウス軽鎖遺伝子座における、少なくとも12個～少なくとも40個の再配列されていないヒト 軽鎖可変領域遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのヒトJ 遺伝子セグメント；

(b) 該少なくとも12個～少なくとも40個のヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントと該少なくとも1つのヒトJ 配列との間に配置されたヒトV - J 遺伝子間配列；を含むマウスであって、ここで、該マウスは、ヒトV ドメインおよびマウスC ドメインを含む軽鎖を含む抗体を発現する、マウス。

(項目15) 可変配列および 定常配列を含む軽鎖を含む抗体を発現するマウス。

(項目16) 上記マウスが、約1：1という の使用頻度と の使用頻度との比を示す、項目15に記載のマウス。

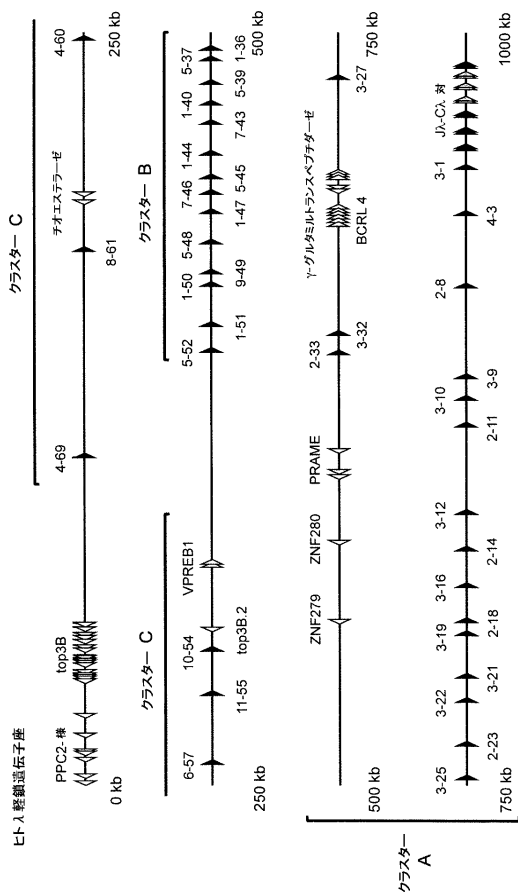
(項目17) 上記マウスの骨髄から得られる未熟B細胞の集団が、約1：1という の使用頻度と の使用頻度との比を示す、項目16に記載のマウス。

(項目18) 抗原結合タンパク質を作製するための、項目1～17に記載されたマウスの使用。

(項目19) 項目1～17に記載されたマウスを使用して作製された抗原結合タンパク質。

(項目20) 項目1～17に記載のマウスに由来する、細胞または組織。

【図1】



【図2】

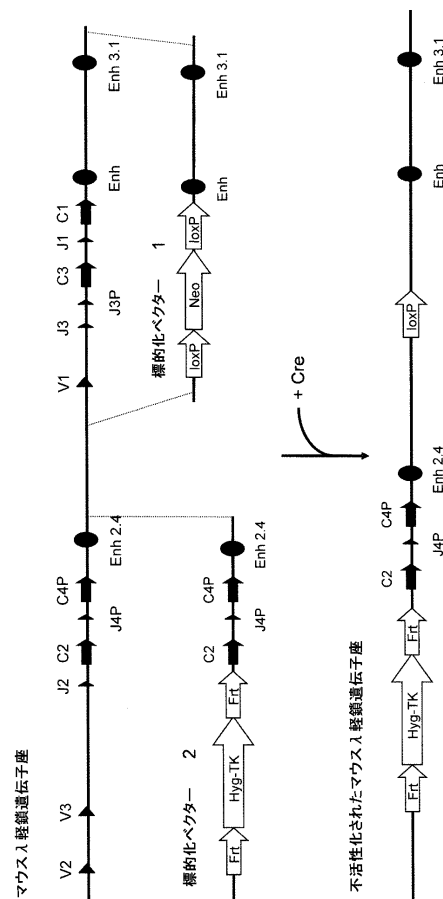


FIG. 2

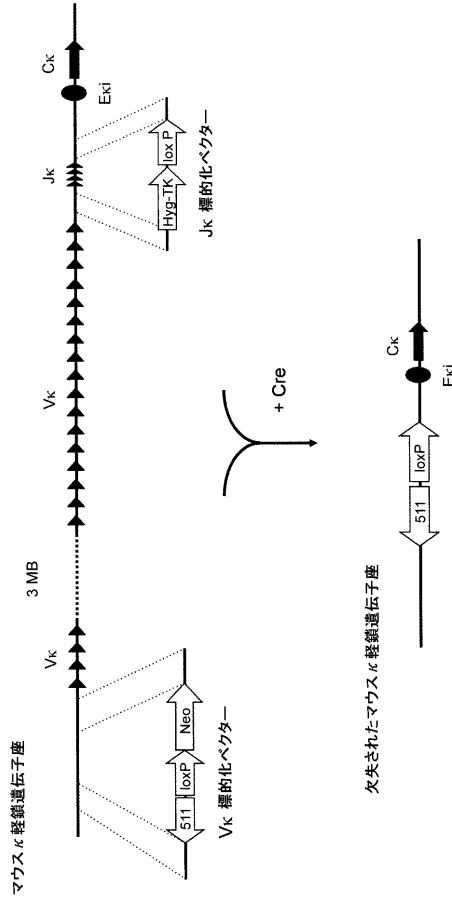
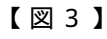


FIG. 3

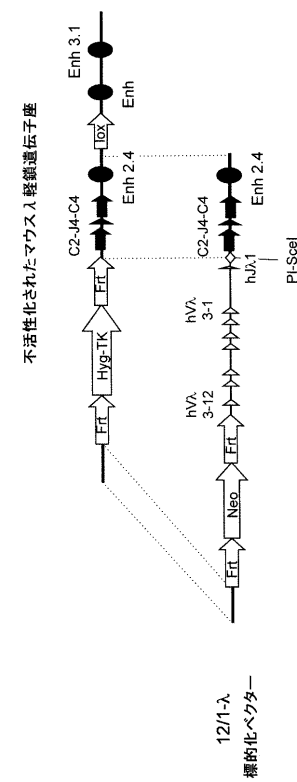
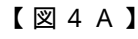


FIG. 4A

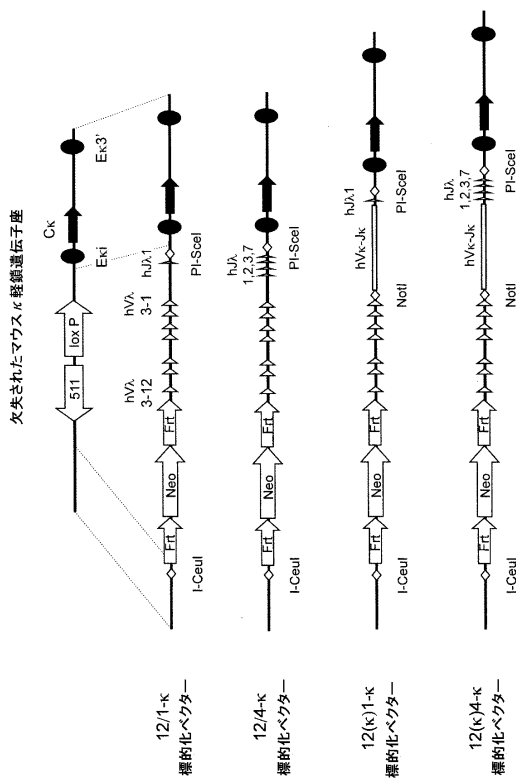
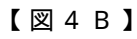


FIG. 4B

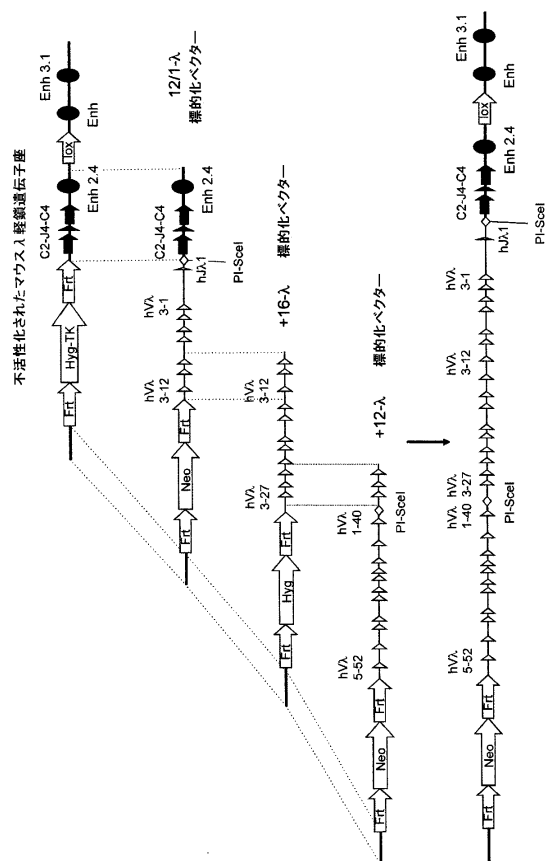
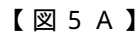
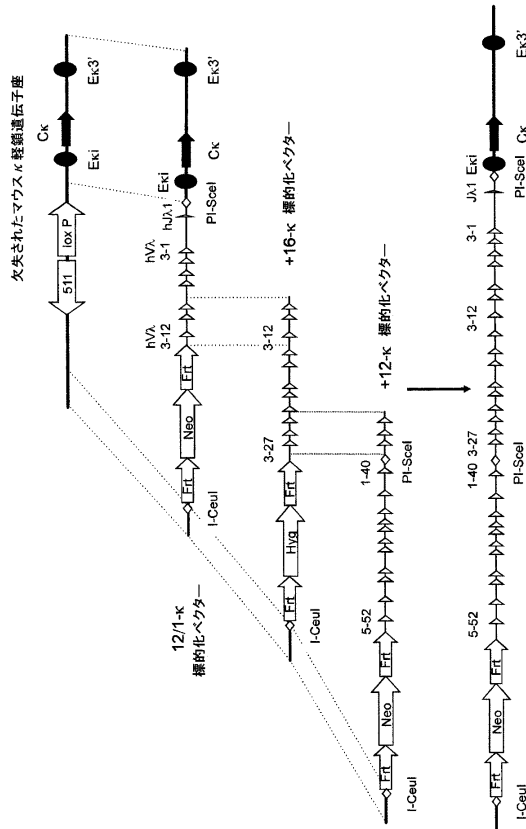


FIG. 5A

【 図 5 B 】



【 図 6 】

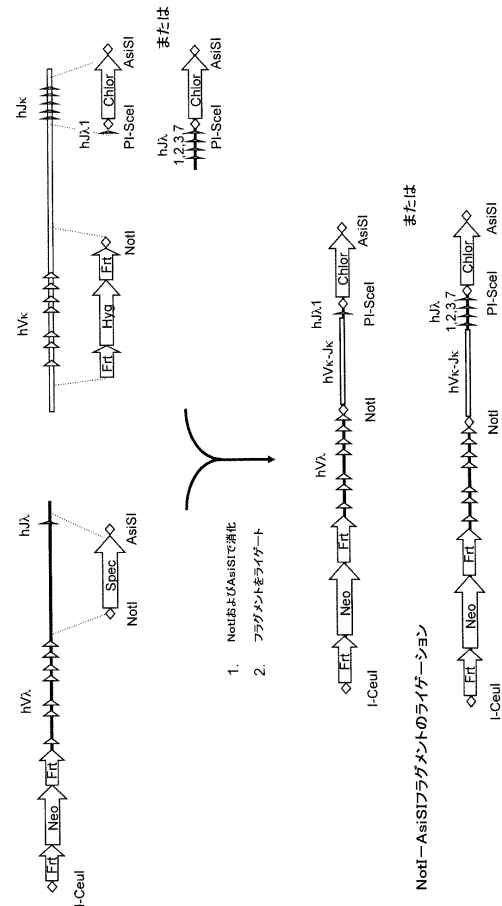


FIG. 6

【 図 7 A 】

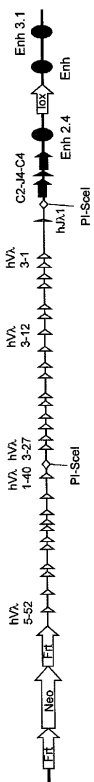


FIG. 7A

【 図 7 B 】

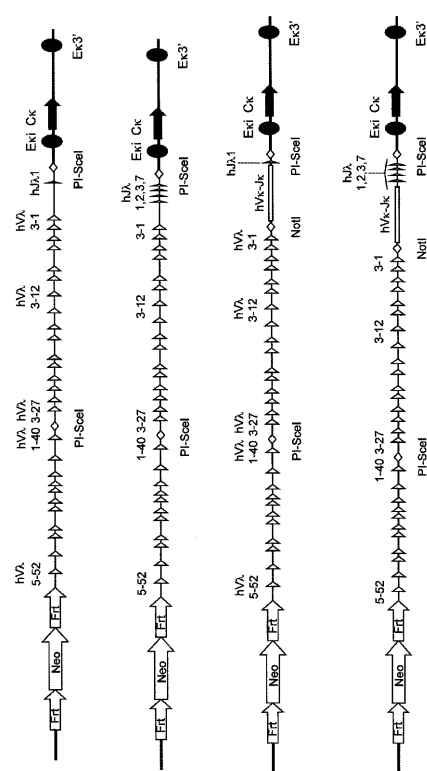


FIG. 7B

【 図 8 A 】

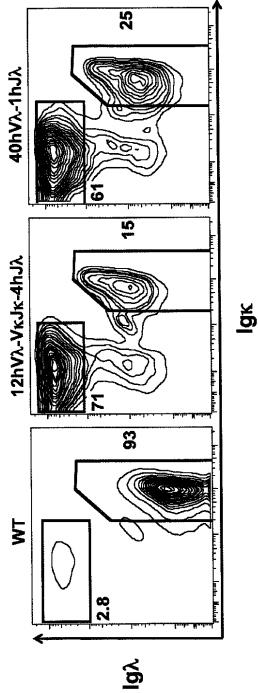


FIG. 8A

【 図 8 B 】

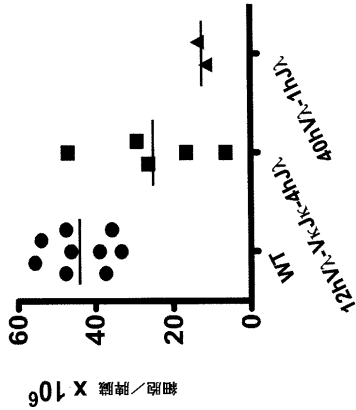


FIG. 8B

【 図 9 A 】

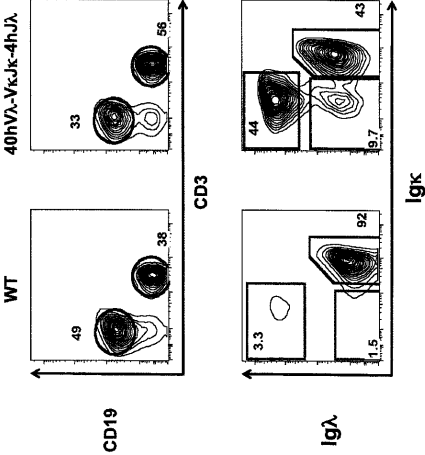


FIG. 9A

【 図 9 B 】

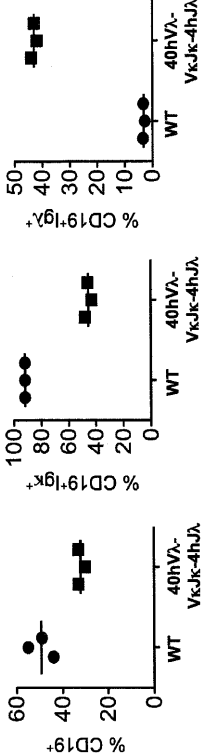


FIG. 9B

【図 9 C】

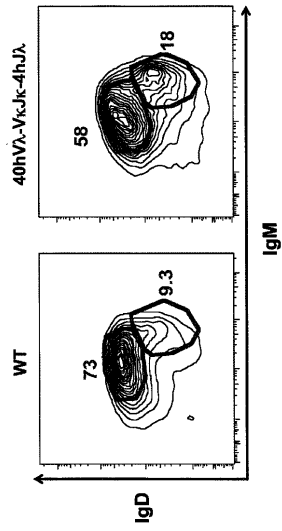


FIG. 9C

【図 9 D】

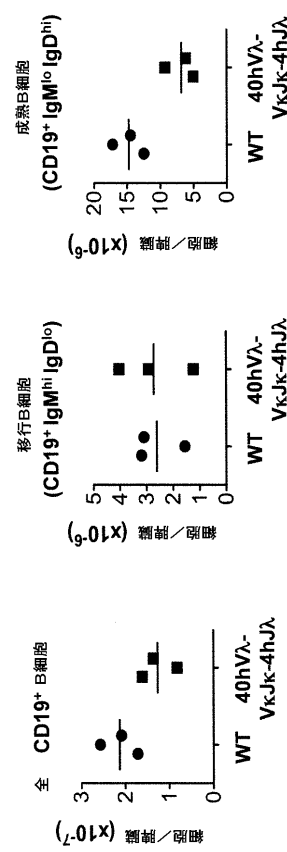


FIG. 9D

【図 10 A】

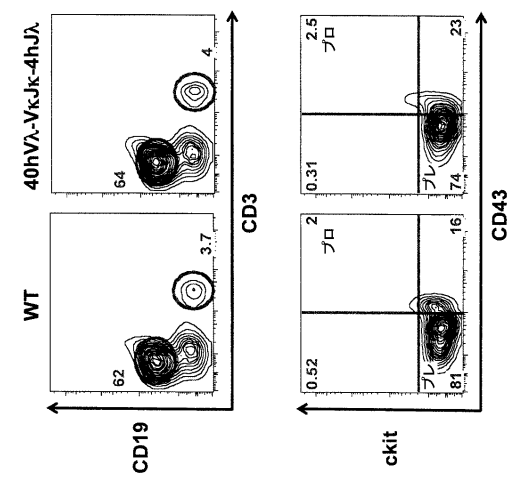


FIG. 10A

【図 10 B】

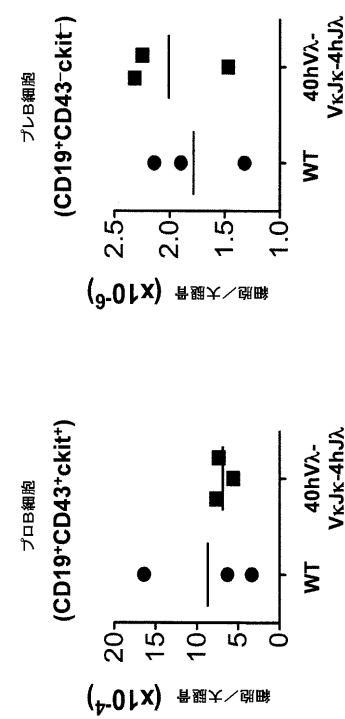


FIG. 10B

【図 10C】

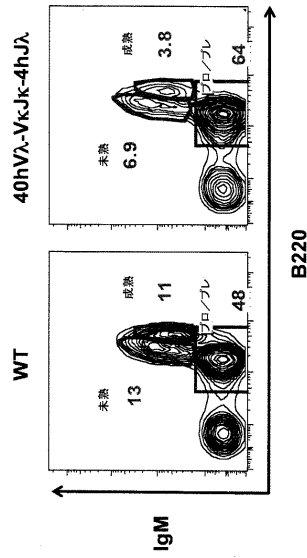


FIG. 10C

【図 10D】

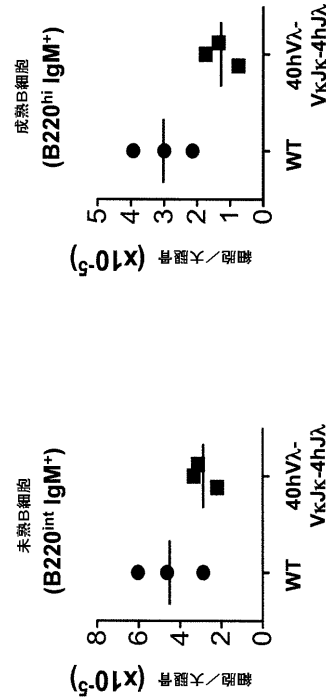


FIG. 10D

【図 10E】

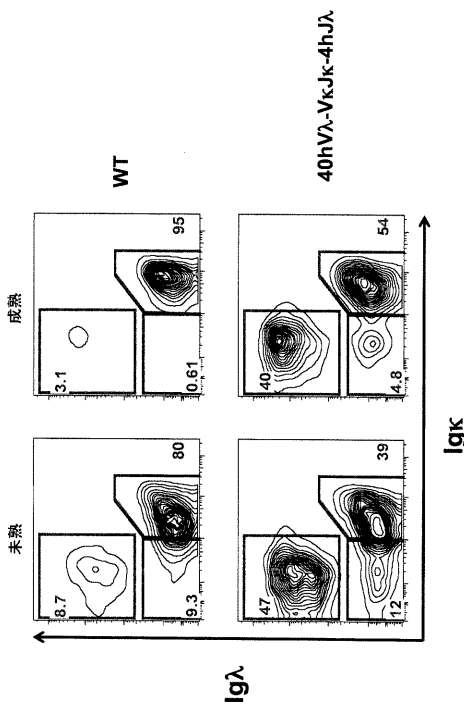


FIG. 10E

【図 11】

3'	ヒト Vλ	ヒト Jλ1	5' マウス Cκ
A6	GCAACAATT	TCGTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
B6	GCAACAATT	ATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F6	GCAACAATT	ATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
B7	GCAACAATT	ATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E7	GCAACAATT	ATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F7	GCAACAATT	ATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
C8	GCAACAATT	ATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E12	CAAGTCGGTT	GTGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-4	AGTGGTAA	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-20	TGAGTGCg	gcttttttCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
3B43	CTGAATGGT	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-8	AGTGGTAA	CAATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-19	AGTGGTAA	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1010	AGCAGCACT	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
11A1	AGCAGCACT	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
7A8	GGTGGTGC	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
3A3	AGTAGCACT	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
2-7	AGCAGCACT	TATGCTCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTACACCGTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
FWR4			F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F

FIG. 11


【 1 2】

【配列表】

0006009441000001.app

	3' エト Vλ	エト Jλ	5' マウス Cκ
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTCCGGAGGAGCACCCCGGCTGACCCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAAGTGGACCAAGGTACCGCTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGACCCAGCTGACCCGCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGCTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGACTGC	TGTGTTCCGGAGGAGGACCCAGCTGACCGGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGACCCAGCTGACCGGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGGTGTTCCGGCGGAGGAGGACCAAGCTGACCGCTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAAGTGGACCAAGGTACCGCTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGTTATTCCGGAGTGGGACCAAGCTGACCGCTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGTGTGTGCTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGAGGACCAAGCTGACCGCTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGTGTGCTGa	GTATTCCGGCGGAGGAGGACCAAGCTGACCGCTCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTCCGGAGGAGGACCCAGCTGACCGGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

FIG. 12

【 1 3】

	3' エト Vλ	エト Jλ1	5' マウス Cλ2
2D1	GCAGGCAGCAACAATTTa	aGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTACCGTCTCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACCTCCCACTCTC
2D9	GACAGCAGTGGTATCAT	TATGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTACCGTCTCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACCTCCCACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GCTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTACCGTCTCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACCTCCCACTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

FIG. 13

---

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 10605, ホワイト プレインズ, ゲッドニー ウェイ  
16
- (72)発明者 スティーブンス, ショーン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94158, サンフランシスコ, ベリー ストリート 3  
55, ナンバー 413
- (72)発明者 グーラー, ケーガン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10595, バルハラ, パメラ レーン 8
- (72)発明者 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 10520, クロトン - オン - ハドソン, ニュートン コー  
ト 10
- (72)発明者 ホシアワ, キャロライナ エー.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, チャーチ ストリート 14,  
2エヌディー フロア

審査官 名和 大輔

- (56)参考文献 国際公開第2000/026373(WO, A1)  
国際公開第2011/004192(WO, A1)  
国際公開第2002/050120(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)