

【發明說明書】

【中文發明名稱】

細胞、脊椎動物、群體及方法

【英文發明名稱】

CELLS, VERTEBRATES, POPULATIONS &
METHODS

【技術領域】

【0001】發明領域

本發明關於用於製造抗體鏈的細胞與非人脊椎動物，尤其是用於製造可用來治療或診斷的多特異性抗體。

【先前技術】

【0002】背景

抗體是快速增長的藥物類別。典型的4-鏈抗體含有兩條相同的重鏈與兩條相同的輕鏈，其形成帶有二價與單特異性抗原結合特徵的分子。雙特異性抗體是新穎的藥物類別，其可同時結合兩個不同抗原或相同抗原的兩個不同表位。用於疾病治療的雙特異性抗體有幾種應用。此概念的最廣泛使用的應用是癌症免疫療法，其中雙特異性抗體與細胞毒性T細胞接合並靶向欲破壞的腫瘤細胞。彼等亦可應用於同時阻斷兩個標靶(Klein, C et al. MABs. 2016. 8: 1010-20.)、或作用為酶促途徑的輔因子(Kitazawa, T. et al. Nat Med. 2012. 18: 1570-4.)。兩個雙特異性抗體，catumaxomab (抗-EpCAM x 抗-CD3)與blinatumomab (抗-19 x 抗-CD3)已被批准用於治療，一些另外的雙特異

性抗體目前正在臨床開發中。雙特異性抗體有五個不同的結構群組：(i)雙特異性IgG (BsIgG) (ii)附加有另外的抗原結合部分的IgG (iii) BsAb片段(iv)雙特異性融合蛋白與(v) BsAb共軛物(Spiess, C. et al. Mol. Immunol. 2015. 67:95-106.)。在彼等當中，BsIgG是分子量接近IgG分子的雙特異性抗體。它通常具有與典型IgG類似的生物學與生物物理學特徵。藉由在細胞中共同表現兩個抗體來製造BsIgG是項高度挑戰，因為所欲BsIgG的產率低並且很難去除密切相關的錯配IgG分子。兩條重鏈可能形成同源二聚體以及所欲的異源二聚體。此外，輕鏈可能和非同族(non-cognate)重鏈錯配。因此，由於重鏈配對與輕鏈配對問題，兩個抗體的共同表現產生了九個非所欲的IgG種類(species)以及僅一個所欲的BsIgG。

【0003】改造重鏈以有利於異源二聚化已藉由「杵-臼(knob-into-hole)」技術(Ridgway, J.B. et al. Protein Eng. 1996. 9: 617-21. ; Atwell, S. et al. J. Mol. Biol. 1997. 270: 26-35.)或「電荷配對」技術(Gunasekaran, K. et al. J. Biol. Chem. 2010. 285: 19637-46. ; Strop, P. et al. J. Mol. Biol. 2012. 420: 204-19.)來證實。該等技術旨在解決重鏈配對問題。輕鏈配對問題係藉由表現使用共同輕鏈的抗體來避免(Merchant, M. et al. Nat. Biotechnol. 1998. 16: 677-81.)。藉由應用該「杵-臼」或「電荷配對」、以及共同輕鏈技術，一條輕鏈與兩條重鏈的共同表現產生了一個主要的BsIgG與三個次要的錯配

種類。該杵-臼技術描述於US5,731,168與WO98/50431。已應用了使用陽離子交換(Sampeï, Z. et al. PLoS One. 2013. 8: e57479.)或差異化蛋白A結合(Smith, E.J. et al. Sci. Rep. 2015. 5: 17943.)的純化步驟來單離此主要的經表現BsIgG。

【0004】 辨識BsIgG的共同輕鏈是很有挑戰性的。非同族重鏈與輕鏈的強制配對通常導致低的表現產率或分子的不穩定性。兩條同族配對輕鏈之間的輕鏈混排(shuffling)已用來辨識該共同輕鏈(Sampeï, Z. et al. PLoS One. 2013. 8: e57479.)。然而，此仰賴繁瑣的步驟與大量的努力，結果也是不確定的。相較於此方法，「共同輕鏈轉基因」技術被認為更加直接簡單，依靠體內選擇來生成天然配對分子。在該等應用中，改造成僅含一個嵌合輕鏈編碼序列(人可變區與小鼠恒定區)的小鼠係用於辨識共享類似但不一定一致的輕鏈的抗體，因為插入的經重排輕鏈序列仍然對體細胞超突變(SHM)敏感。插入的輕鏈選項也是有限的，因為其仰賴帶有一個輕鏈序列插入的種系傳播小鼠。WO2004/106375、WO2009/1577771、EP2147594與WO2014/160179討論了與雙特異性抗體與共同輕鏈小鼠的製造相關的技術。

【發明內容】

【0005】發明聲明

發明人認知到在抗體鏈基因座中提供內含子增強子(intronic enhancer)的V結構域編碼可變區序列3'係使V

區的SHM減至最少，此允許本發明用於辨識並使用真實的共同輕鏈、VL結構域與VH結構域，其可和該等配對以製造抗原結合位點。

於是，在第一個組態中，本發明提供：-

【0006】一種細胞，其包含抗體輕鏈基因座(第一基因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)

- (a) 輕鏈內含子增強子；
- (b) 經重排的抗體可變區，其編碼經重排的抗體V結構域；以及
- (c) 抗體輕鏈恒定區，其編碼輕鏈C結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈。

在第二個組態中，本發明提供：-

【0007】一種細胞，其包含抗體重鏈基因座(第一基因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)

- (a) 重鏈內含子增強子(E μ)；
- (b) 經重排的抗體可變區，其編碼經重排的抗體V結構域；
- (c) 任擇的轉換序列；以及
- (d) 抗體重鏈恒定區，其編碼重鏈CH1結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該CH1結構域的抗體鏈。

在第三個組態中，本發明提供：-

【0008】一種轉基因非人脊椎動物，其包含根據本發明的複數個細胞。

在第四個組態中，本發明提供：-

【0009】一種轉基因非人脊椎動物，其抗體輕鏈庫就單一經重排VL結構域種類而言係至少95%純。

在第五個組態中，本發明提供：-

【0010】一種轉基因非人脊椎動物，其抗體輕鏈庫包含由第一VL基因區段與第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域，其中由該重組所衍生的全部VL結構域的至少95%包含相同的VL胺基酸序列。

在第六個組態中，本發明提供：-

【0011】根據本發明的脊椎動物的複數個脾、骨髓、B-細胞或血球，其包含複數個該第一基因座。

在第七個組態中，本發明提供：-

【0012】複數個脾、骨髓、B-細胞、融合瘤、CHO細胞、HEK細胞、MEF細胞、COS細胞、HeLa細胞或血球，其中各個細胞係根據本發明；以及其中

(a) 該抗體中至少95%共享相同的輕鏈VL結構域且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類；或

(b) 該抗體包含由第一VL基因區段與第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域，其中由該重組所衍生的全部該VL結構域中至少95%包含相同的VL胺基酸序列且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

在第八個組態中，本發明提供：-

【0013】一種多株抗體群體，其中該群體所包含之抗體中至少95%共享相同的輕鏈VL結構域且該群體包含至

少10個不同的VH結構域種類。

在第九個組態中，本發明提供：-

【0014】一種多株抗體群體，其包含由第一VL基因區段與第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域，其中由該重組所衍生的全部該VL結構域中至少95%包含相同的VL胺基酸序列且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

在第十個組態中，本發明提供：-

【0015】一種辨識或獲得抗體、抗體可變結構域、編碼抗體或抗體可變結構域的核苷酸序列、或能夠表現該抗體或結構域的表現載體或宿主細胞的方法，其中該抗體或結構域能夠特異性地結合至標靶抗原，該方法包含

(a) 使本發明之細胞群體、或本發明之抗體群體和該抗原(譬如，固定在固體支撐物上)接觸；

(b) 使該群體所表現或包含的抗體結合至該抗原；以及

(c) 單離或辨識結合至該抗原的一或多個抗體、或單離或辨識該一或多個抗體的VH及/或VL結構域；或辨識編碼該VH或VL的核苷酸序列；以及

(d) 任擇地

(i) 使之所辨識之抗體或結構域和編碼該等的核苷酸序列相關聯，藉此辨識該序列；

(ii) 擴增該序列(譬如，使用PCR)並將該序列插入表現載體或宿主細胞基因組中，以表現該經編碼的抗體或結構域；以及

(iii) 任擇地表現並單離該抗體或結構域(譬如，其中該結構域係包含在抗體鏈內)，

其中步驟(i)與(ii)可以任何順序執行。

在第十一個組態中，本發明提供：-

【0016】複數個B-細胞、融合瘤、CHO細胞、HEK細胞、MEF細胞、COS細胞、HeLa細胞，該等表現本發明的多株抗體群體。

在第十二個組態中，本發明提供：-

【0017】一種獲得編碼抗體或抗體可變結構域的核苷酸序列的方法，其中該抗體或結構域能夠特異性地結合至標靶抗原，該方法包含

- (a) 從本發明的細胞獲得VL及/或VH-編碼核苷酸序列；
- (b) 擴增該序列(譬如，使用PCR)；以及
- (c) 任擇地將該序列插入表現載體或宿主細胞基因組中，以表現該經編碼的抗體或結構域。

在第十三個組態中，本發明提供：-

【0018】一種獲得用於製造特異性地結合至抗原之抗體的抗體-製造細胞系的方法，該方法包含將VH與VL-編碼核苷酸序列插入宿主細胞(譬如，CHO、HEK、MEF、COS或HeLa細胞)的基因組中，其中

- (a) 各個VH序列可操作地插至抗體重鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以供包含VH與C結構域的細胞表現重鏈；
- (b) 各個VL序列可操作地插至抗體輕鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以供包含VL與C結構域的細胞表現輕鏈；

- (c) 其中該經表現的重鏈能夠與該輕鏈配對，以製造重-輕鏈對，各對包含能夠結合至抗原的VH/VL結合位點；以及
- (d) 其中VH與VL-編碼核苷酸序列是本發明的一或多個細胞的VH與VL-編碼核苷酸序列的序列。

在第十四個組態中，本發明提供：-

【0019】一種製造雙特異性4-鏈抗體的方法，其中該雙特異性抗體包含第一與第二抗原的相應結合位點，其中該等抗原是不同的，各個抗體包含第一重鏈-輕鏈對與第二重鏈-輕鏈對，其中

(a) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含第一VH，其中該第一VH（當表現為第一重鏈的一部分時）能夠和VL（當表現為輕鏈的一部分時）配對，以形成能夠特異性地結合至該第一抗原的第一VH/VL結合位點；以及

(b) 該第二重鏈-輕鏈對之重鏈包含第二VH，其中該第二VH（當表現為第二重鏈的一部分時）能夠和該VL（當表現為輕鏈的一部分時）配對，以形成能夠特異性地結合至該第二抗原的第二VH/VL結合位點；

該方法包含

(c) 藉由下列製造能夠表現該第一重鏈的第一細胞系：(i) 將編碼該第一VH的核苷酸序列插入第一細胞基因組中，其中該VH序列可操作地插至抗體重鏈恒定區（譬如，人恒定區）的5'，以表現包含第一VH與C結構域的第一重鏈；以及(ii) 培養該細胞，以製造表現第一重鏈的第一細胞系；

(d) 藉由下列製造能夠表現該第二重鏈的第二細胞系：(i)

將編碼該第二VH的核苷酸序列插入第二細胞基因組中，其中該VH序列可操作地插至抗體重鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以表現包含第二VH與C結構域的第二重鏈；以及(ii)培養該細胞，以製造表現第二重鏈的第二細胞系；(e) 表現來自該第一細胞系的第一重鏈與來自該第二細胞系的第二重鏈，並將包含該第一VH的第一重鏈、包含該第二VH的第二重鏈以及包含該VL的輕鏈混合在一起，藉其(iii)第一重鏈和輕鏈配對，以製造該第一重鏈-輕鏈對，(iv)第二重鏈和輕鏈配對，以製造該第二重鏈-輕鏈對；以及(v)該第一重鏈-輕鏈對和該第二重鏈-輕鏈對配對，藉此製造該雙特異性抗體

其中VH及/或VL-編碼核苷酸序列是本發明的一或多個細胞的VH及/或VL-編碼核苷酸序列的序列。

在第十五個組態中，本發明提供：-

【0020】一種製造雙特異性4-鏈抗體的方法，其中該雙特異性抗體包含第一與第二抗原的相應結合位點，其中該等抗原是不同的，各個抗體包含第一重鏈-輕鏈對與第二重鏈-輕鏈對，其中

(a) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含第一VH，其中該第一VH (當表現為第一重鏈的一部分時)能夠和一VL (當表現為輕鏈的一部分時)配對，以形成能夠特異性地結合至該第一抗原的第一VH/VL結合位點；以及

(b) 該第二重鏈-輕鏈對之重鏈包含第二VH，其中該第二VH (當表現為第二重鏈的一部分時)能夠和該VL (當表現

為輕鏈的一部分時)配對，以形成能夠特異性地結合至該第二抗原的第二VH/VL結合位點；

該方法包含

(c) 將包含該第一VH的第一重鏈、包含該第二VH的第二重鏈以及包含該VL的輕鏈混合在一起，藉其(i)第一重鏈和輕鏈配對，以製造該第一重鏈-輕鏈對，(ii)第二重鏈和輕鏈配對，以製造該第二重鏈-輕鏈對；以及(iii)該第一重鏈-輕鏈對和該第二重鏈-輕鏈對配對，藉此製造該雙特異性抗體

其中VH及/或VL是由VH及/或VL-編碼核苷酸序列所編碼，其中該核苷酸序列是本發明的一或多個細胞的VH及/或VL-編碼核苷酸序列的序列。

在第十六個組態中，本發明提供：-

【0021】一種製造用於治療或預防人或非人動物個體的疾病或病況(譬如，癌症)的藥學組成物的方法，該方法包含

- (a) 從藉由本發明的方法製造的細胞系表現抗體；
- (b) 將該抗體和稀釋劑或賦形劑混合；
- (c) 任擇地，其中該抗體係和藉由本發明的方法獲得的抗體一致。

在第十七個組態中，本發明提供：-

【0022】一種製造用於治療或預防人或非人動物個體的疾病或病況(譬如，癌症)的藥學組成物的方法，該方法包含將雙特異性抗體和稀釋劑或賦形劑混合，其中該抗

體係和藉由本發明的方法獲得的抗體一致。

在第十八個組態中，本發明提供：-

【0023】 一種製造本發明的細胞或脊椎動物的方法，該方法包含

(a) 獲得包含經重排的抗體可變區的核酸，其編碼經重排的抗體V結構域；以及

(b) 將該可變區或其複本插入細胞的基因組中，藉其該可變區被包含在該基因組的抗體基因座內，

其中該基因座包含(5'至3'方向)

(c) 抗體基因座內含子增強子；

(d) 該經重排的抗體可變區；以及

(e) 抗體恒定區，其編碼抗體C結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈；以及

(f) 任擇地，其中該細胞是非人脊椎動物ES細胞或iPS細胞，該方法更包含從該細胞生成本發明之非人脊椎動物。

在第十九個組態中，本發明提供：-

【0024】 一種非人脊椎動物(譬如，嚙齒類、大鼠或小鼠)胚胎或桑椹胚前胚胎，其植入有根據本發明的ES或iPS細胞或由根據本發明的方法獲得。

在第二十個組態中，本發明提供：-

【0025】 一種包含用於本發明方法之轉基因的核酸，該轉基因包含(5'至3'方向)

(a) 該內含子增強子；

- (b) 該經重排的抗體可變區；以及
- (c) 該抗體恒定區。

在第二十一個組態中，本發明提供：-

【0026】 一種包含編碼經重排的V結構域的經重排可變區序列的核酸，其係用於本發明的方法，該核酸包含該經重排的可變區序列，該序列

- (a) 在5'側接同源臂，以和該細胞基因組的第一核苷酸序列雜交，及/或
- (b) 在3'側接同源臂，以和該細胞基因組的第二核苷酸序列雜交；

其中

- (c) 該第一核苷酸序列係同源於該細胞的抗體輕鏈(譬如， κ)基因座的序列、其CL區的5'，該第二核苷酸序列係同源於該基因座的序列、該基因座的內含子增強子(譬如，Ei κ)的3'，藉其該同源臂與該細胞基因組之間的同源重組能夠插入該可變區序列，藉此製造包含(5至3'方向)內含子增強子、該可變區與CL區的基因座；或
- (d) 該第一核苷酸序列係同源於該細胞的重鏈抗體基因座的序列、其C μ 區的5'，該第二核苷酸序列係同源於該基因座的序列、該基因座的內含子增強子(E μ)的3'，藉其該同源臂與該細胞基因組之間的同源重組能夠插入該可變區序列，藉此製造包含(5至3'方向)內含子增強子、該可變區與C μ 區的基因座。

【0027】 下文藉由實作實驗與數據提供進一步的例

示。

【圖式簡單說明】

【0028】圖1

生成共同輕鏈等位基因的靶向策略的示意圖。小鼠ES細胞中的小鼠 κ 內含子增強子與小鼠 κ 恒定區(4.6 kb)被置換成 6.8 kb 的合成 DNA 片段，其含有 EF1 α -Puro-2A-EGFP盒、人V λ 3-21的天然啟動子與信號肽、小鼠 κ 內含子增強子、以及來自特異性地結合標靶X的抗體的重組人共同 λ 輕鏈等位基因。

【0029】圖2

單離脾B細胞的分選策略的示意圖，該脾B細胞表現帶有人 λ 輕鏈並特異性地結合來自共同輕鏈敲入嵌合體小鼠的人標靶X的抗體。該分選策略涉及淋巴球切片，接著選擇單細胞，接著選擇活細胞，接著選擇CD19+ B-細胞且最後選擇人 λ 陽性及抗原(標靶X)陽性細胞。SSC：側向散射。FSC：前向散射。SSC-A：側向散射區域。

【0030】圖3

分選圖顯示B細胞的單離，該B細胞表現帶有人 λ 輕鏈並特異性地結合來自共同輕鏈敲入嵌合體小鼠的人標靶X的抗體。圖表A-F是分選圖並顯示分選的流動。將第一個分選所選擇的細胞用於隨後的分選，並繼續選擇過程。A. 選擇淋巴球的分選圖。SSC-A (側向散射區域)對比於FSC-A (前向散射區域)。B. 選擇單細胞的分選圖。FSC-W (前向散射寬度)對比於FSC-A (前向散射區域)。C. 選擇單

細胞的分選圖。SSC-W (側向散射寬度)對比於SSC-A (側向散射寬度)。D.選擇活細胞的分選圖。SSC-A (側向散射區域)對比於活的/死亡7-AAD。E.選擇CD19+ B-細胞的分選圖。Y軸指示所用標記對比於CD19-PB。F.表現人 λ 輕鏈並特異性地結合人標靶X的B-細胞的分選圖。標記有AF647的人標靶X抗原對比於標記有PE的人 λ 輕鏈。

【0031】圖4

由NGS回收的輕鏈VL區基本上皆攜帶和敲入共同輕鏈等位基因相同的6個非種系突變。

【0032】圖5

相較於野生型小鼠(野生型)，用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠具有類似的總活脾細胞數。

【0033】圖6

相較於野生型小鼠(野生型)，用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠具有類似的CD19-陽性、B220-陽性B-細胞數。

【0034】圖7

用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠中的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群體百分比係類似於野生型小鼠(野生型)。

【0035】圖8

用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠中的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群

體百分比係類似於野生型小鼠(野生型)。

【0036】圖9

用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠中的抗原陽性B-細胞群體百分比係類似於野生型小鼠(野生型)。

【實施方式】

【0037】詳細說明

可用非人脊椎動物表達的本案態樣為小鼠，但應當理解的是，嚙齒類、大鼠、兔或任何其他非人脊椎動物可適用於實行本發明。

【0038】發明人認知到，在抗體鏈基因座中的內含子增強子的3'提供抗體輕或重鏈基因座中編碼V結構域的可變區序列係使該V區的SHM減至最少，其允許本發明用於辨識真實的共同輕或重鏈。在一些具體例中，該基因座是野生型或轉基因脊椎動物細胞或非人脊椎動物的內源性抗體基因座的修飾形式。在其他具體例中，該基因座不在內源性抗體鏈基因座，而是包含在插入於Rosa 26的基因座內或該基因座能夠表現抗體鏈的另一位置。舉例來說，本發明的基因座被包含在細胞或脊椎動物基因組中的隨機插入的轉基因內。藉由使V區的SHM減至最少或去除V區的SHM，該細胞或脊椎動物所包含的此類細胞更有可能表現單一(即「共同」)輕鏈。當SHM被去除時，該可變區表現僅單一類型的VL結構域，其可和該脊椎動物表現的不同VH結構域配對，藉此允許篩選及辨識一或多個VH結構

域，其可功能性地和該VL配對，以形成抗原或表位的VH/VL結合位點。即使可能發生一些突變，本發明也限制此可能性，所以相同V-J重組所製造的VL結構域的純度可能使得單一經重排VL遠佔優勢(譬如為至少95%或100%的位準，如下進一步所述)。因此，有用地，可預先確定所欲共同輕鏈的表現(譬如，藉由在該基因座或轉基因中提供已知的可變區(或輕鏈)序列，例如已知的經重排可變區(或輕鏈)序列，其編碼可特異性地結合至預定抗原或表位的已知抗體的VL(或輕鏈)。有利地，在具體例中使用輕鏈序列(譬如，帶有對抗原或表位之已知結合特異性及/或親和力的預定人抗體的人重排V_κJ_κC_κ)的能力可有益於配對，隨後可在用於最終抗體產物的完整的人輕鏈背景下，在本發明的脊椎動物體內進行選擇(譬如，雙特異性抗體藥劑)。

【0039】任擇地，該共同輕鏈包含下列或由下列構成：SEQ ID NO: 1的胺基酸序列、或與其至少70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%一致的胺基酸序列。任擇地，該共同輕鏈的可變結構域包含下列或由下列構成：SEQ ID NO: 1的輕鏈序列的可變結構域，任擇地帶有5個或更少、4個或更少、3個或更少、2或1個胺基酸變化。各個變化可為胺基酸刪除、取代或添加。在一例中，該可變結構域的序列是由Kabat編號決定。在一例中，該可變結構域的序列是由IMGT編號決定。

【0040】提供了使用嵌合小鼠(或其他非人脊椎動物)辨識多-或雙-特異性抗體的共同輕鏈的體內方式的例子，

其中來自該小鼠的B細胞是衍生自帶有經重排輕鏈基因座的ES細胞，並表現帶有單個或極度有限數目的輕鏈可變結構域的免疫球蛋白輕鏈庫。該嵌合小鼠是，舉例來說，產自被注射攜帶該敲入經重排人輕鏈編碼序列與未重排人或內源性IgH基因座的小鼠ES細胞的野生型、RAG剔除或IgH剔除小鼠胚胎。將該經重排人輕鏈的DNA序列插入，俾使可以沒有體細胞超突變(SHM)。提供了用於製作表現共同輕鏈的此類嵌合小鼠或其他非人脊椎動物的方法。提供了用於辨識用作雙特異性抗體(譬如，用於人類癌症治療)的抗原特異性共同輕鏈抗體的方法，如同此類抗體本身及表現該等的細胞。

【0041】一個特定例示工作流程可為：-

1. 獲得包含第一人VH與VL結構域的第一抗體，其中該抗體特異性地結合至第一預定抗原；或獲得編碼該抗體之VL或該輕鏈的核苷酸序列；
2. 獲得包含IgH基因座(雜合或純合形式)的轉基因小鼠ES細胞，其中該IgH基因座包含人源化可變區，以表現複數個不同的人VH結構域；
3. 將編碼該抗體之輕鏈或其VL的核苷酸序列插入該ES細胞的基因組，其中該插入是在該ES細胞基因組的κ基因座等位基因的Eiκ與Cκ之間；
4. 任擇地修飾該另一κ基因座等位基因，使其不能表現κ輕鏈，或修飾等位基因，藉其將編碼該第一或第二抗體之輕鏈或其VL的核苷酸序列插入該另一κ基因座等位基因的

E κ 與C κ 之間；

5. 使該ES細胞發育成小鼠(譬如，藉由將該ES細胞植入接受者胚胎或桑椹胚前胚胎(譬如，RAG及/或IgH剔除胚胎或桑椹胚前胚胎)並將該胚胎或桑椹胚前胚胎植入偽妊娠雌性小鼠，藉其一或多隻幼崽從該雌性生出)，其中如此發育之小鼠或(多隻)幼崽包含能夠表現該輕鏈或VL的至少一個 κ 基因座，其中該輕鏈或VL和該小鼠所表現的重鏈或VH配對，以形成VH/VL抗原結合位點；

6. 任擇地獲得子代小鼠，其中該子代各自包含能夠表現該輕鏈或VL的至少一個 κ 基因座，其中該輕鏈或VL和子代小鼠所表現的重鏈或VH配對，以形成VH/VL抗原結合位點；

7. 用第二抗原將步驟5小鼠或該子代小鼠免疫，其中該第一與第二抗原是不同的；

8. 從步驟7的免疫小鼠獲得(譬如，使用步驟7的免疫小鼠的B-細胞及/或B-細胞融合瘤技術的DNA的PCR)編碼和該VL配對的VH (第二VH) (或和該輕鏈VL配對之重鏈VH)的核苷酸序列，其中該第二VH與VL形成特異性地結合至該第二抗原的抗原結合位點；

9. 任擇地將編碼該第一VH的核苷酸序列、編碼該第二VH的核苷酸序列、及編碼該VL的核苷酸序列插入一或多個表現載體或插入一或多個宿主細胞的基因組中，各個V核苷酸序列分別可操作地連接抗體的第一CH、第二CH或CL區的5'，以分別表現第一抗體重鏈、第二抗體重鏈或抗體輕鏈；任擇地其中該第一與第二CH區編碼第一與第二CH結

構域，該等是一起配對的經突變人CH結構域(譬如，使用電荷對突變或杵-臼突變)及/或其中該第一與第二鏈具有不同的pI (譬如，分隔0.5-1 pI單位)；

10. 任擇地獲得步驟9的宿主細胞並表現該宿主細胞中的重鏈與輕鏈，藉其製造各自包含下列的雙特異性抗體：包含能夠特異性地結合至該第一抗原的VH/VL結合位點的第一重鏈/輕鏈對，並包含能夠特異性地結合至該第二抗原的VH/VL結合位點的第二重鏈/輕鏈對；以及

11. 任擇地單離該雙特異性抗體。

【0042】在一另擇例中，使用抗原的第一與第二表位來代替第一與第二抗原。在具體例中，該方法包含步驟1至8；1至9；1至10或1至11。在一例中，提供有一種用於獲得雙特異性抗體的方法，該方法從步驟7開始。在一例中，提供有一種用於獲得雙特異性抗體的方法，該方法從步驟8開始。在一例中，提供有一種用於獲得雙特異性抗體的方法，該方法從步驟9開始。在一例中，提供有一種用於獲得雙特異性抗體的方法，該方法從步驟10開始。在一例中，提供有一種用於獲得雙特異性抗體的方法，該方法從步驟11開始。

【0043】在一例中，步驟7中使用的每隻小鼠的輕鏈庫就VL而言為至少95、96、97、98或99%純(或100%純)。此可以，舉例來說，藉由獲得來自該小鼠的B-細胞樣本(譬如，脾及/或骨髓B-細胞樣本)、獲得其VL-編碼核苷酸序列(譬如，mRNA或cDNA)並進行次世代定序(NGS)測定採

樣核苷酸序列之VL (以及任何其他VL種類)的百分比來測定。熟習此藝者將熟知常規NGS技術。於是，舉例來說，在本案中，關於VL的「95%純」意指該庫(譬如，小鼠的採樣庫)包含編碼譬如由NGS測定之佔該庫或樣本95%或更高比例之預定VL的序列(譬如，mRNA、cDNA或DNA)。在具體例中，該小鼠所表現的全部(或實質上全部)之VL結構域是和步驟1之抗體的VL一致。由於根據本發明，該VL-編碼序列定位在內含子增強子的3'，例如介於此增強子與恒定區之間，所以此可有利地實現。

【0044】在一另擇例中，該VL-編碼可變區序列(譬如在上文的步驟3與4)是介於小鼠 λ 2-4與C λ 之間或小鼠 λ 4-10增強子與C λ 之間之細胞或小鼠的(多個) λ 基因座等位基因的插入物。此外，在一具體例中，該VL-編碼可變區序列是介於Ei κ 與C κ 之間之細胞或小鼠的(多個) κ 基因座等位基因的插入物。

【0045】在一另擇例中，該 λ 基因座等位基因中僅有一個包含該插入物；以及該 κ 基因座等位基因中僅有一個包含該插入物。

【0046】在該 λ 與 κ 、或在2 λ 或在2 κ 等位基因之VL-編碼可變區插入物可相同或不同(即，對於相同或不同的抗原，編碼相同或不同的VLs，例如具預定特異性的2個不同抗體的VLs)。

【0047】在一具體例中，第一與第二小鼠(或其他非人脊椎動物，例如大鼠) ES細胞被修改成包含本發明的第一

與第二基因座，譬如各個細胞係根據步驟1至4來修改，但是其中在該細胞內之VL-編碼核苷酸序列插入物是不同的(即，編碼不同的VL結構域，例如具不同抗原或表位特異性的不同抗體的VL結構域)。該第一與第二ES細胞(或其子代)被植入相同的胚胎或桑椹胚前胚胎，使小鼠(或其子代)發育，其中該小鼠或子代表現該不同VL結構域，以供和小鼠或子代表現的VH結構域(譬如，人VH)配對。

【0048】有利地，第一代小鼠(即，從本案的ES細胞所植入的胚胎或桑椹胚直接生長)是有益的，因為它可被免疫，而無需進一步育種到子代小鼠。這節省了繁殖的時間與複雜性。可能需要，舉例來說，接收該ES細胞植入物之胚胎或桑椹胚前包含其IgH基因座剔除或為RAG剔除，因為此迫使該第一代小鼠(或子代小鼠)所製造的全部生產性B-細胞皆是ES細胞所衍生的，藉此確保全部生產性B-細胞包含本發明的一或多個基因座。

【0049】任擇地，於是一般而言，有利的是，不一定要在非人脊椎動物子代或譜系中獲得本發明基因座的種系傳遞，而是有可能和生長自該胚胎或桑椹胚前胚胎的嵌合體脊椎動物工作，其提供超越先前技術的顯著時間優勢，其中描述了輕鏈等位基因修飾的種系傳遞。於是，在一個具體例中，本發明的小鼠或脊椎動物是包含本發明的第一複數個細胞與非根據本發明的第二複數個細胞(譬如，不包含本發明基因座的野生型或轉基因細胞)的嵌合體。任擇地，該嵌合體可包含根據本發明的第三複數個細胞，其包

含根據本發明的基因座但能夠表現不同於該第一複數個細胞的本發明基因座所表現的V結構域的V結構域。於是，有可能開發可表現第一與第二VL結構域的嵌合脊椎動物，該第一與第二VL結構域是不同的但從本發明基因座表現時是預定的。剔除第二複數個細胞的一或多個輕及/或重鏈基因座的表現可能是有利的，使得該脊椎動物中的重鏈與輕鏈僅由該第一與任擇的第三複數個細胞貢獻。此外或另擇地，該第二複數個細胞可具有RAG (譬如，RAG-1及/或RAG-2)剔除，以消除在脊椎動物中的來自此類細胞的抗體鏈貢獻。

【0050】在另擇的組態中，認知到由於不需要繁殖且節省時間，如此生成及使用本發明的嵌合體與第一代非人脊椎動物是有利的，而且此並非倚賴於指涉在內含子增強子的3'提供該可變區插入物的本發明特徵。於是，提供了一另擇的組態，其中本案的任何特徵在經必要的變更後可應用於本發明基因座包含該可變區位在內含子增強子的5'的另擇情形，藉其該基因座能夠表現包含該V與C結構域的抗體鏈。再者，在另擇的組態中，該可變區可為包含複數個VH基因區段、一或多個D基因區段與一或多個JH基因區段的未重排可變區，其中該可變區能夠重排，以表現複數個不同的VH結構域；或該可變區可為包含複數個VL基因區段與一或多個JH基因區段的未重排可變區，其中該可變區能夠重排，以表現複數個不同的VL結構域；或僅一個、兩個、三個、四個或五個經重排可變區可在該增強子的5'，

以表現V結構域的受限多樣性(譬如，VL結構域)。尤其，此組態在該脊椎動物為嵌合體，例如本案所述第一代脊椎動物時是有益的。本發明的此另擇組態亦提供用抗原將此類嵌合體或脊椎動物免疫並單離特異性地結合至該抗原的抗體、其VH結構域、其VL結構域、或編碼該等任何一者的核苷酸序列的方法。有益地，藉由免疫在不需要繁殖週期下所製造的脊椎動物的可能性，此方法被簡化了。

【0051】「特異性地結合至」或「特異於」特定抗原或表位的V結構域或結合位點是結合至該特定抗原或表位而實質上不結合至其他抗原或表位的V結構域或結合位點。舉例來說，當該抗體是以1mM或更小，譬如100 μ M或更小、10 μ M或更小、1 μ M或更小、100 nM或更小，譬如，10 nM或更小、1 nM或更小、500 pM或更小、100 pM或更小、或10pM或更小的KD結合時，則結合至該抗原或表位是特異的。該結合親和力(KD)可使用熟習此藝者已知的標準流程來測定，譬如，在ELISA中結合及/或使用表面電漿子共振的親和力測定(譬如，Biacore™、Proteon™或可偵測到低至fM親和力的KinExA™溶液相親和力測量(Sapidyne Instruments, Idaho))。在一個具體例中，表面電漿子共振(SPR)是在25°C執行。在一個具體例中，SPR是在37°C執行。在一個具體例中，SPR是在生理pH下執行，例如約pH7或在pH7.6(譬如，使用pH7.6的Hepes緩衝鹽水(亦稱作HBS-EP))執行。在一個具體例中，SPR是在生理鹽位準，譬如，150mM NaCl執行。在

一個具體例中，SPR是在不大於0.05體積%的清潔劑位準，譬如，在0.05%的P20 (polysorbate 20；譬如，Tween-20TM)與3mM EDTA的存在下執行。在一個具體例中，SPR是在25oC或37oC，在pH7.6的緩衝液、150mM NaCl、0.05%清潔劑(譬如，P20)與3mM EDTA執行。該緩衝液可含有10mM Hepes。在一個具體例中，SPR是在25oC或37oC、於HBS-EP中執行。HBS-EP可購自Teknova Inc (California；目錄號H8022)。

【0052】 在一例中，親和力是使用SPR藉由下列測量：

1. 使抗小鼠(或其他相關非人脊椎動物，舉例來說，以匹配抗體的C區) IgG (譬如，Biacore BR-1008-38)偶合至生物感測器晶片(譬如，GLM晶片)，例如藉由一級胺偶合；
2. 使該抗小鼠IgG (非人脊椎動物抗體)暴露至測試IgG抗體或重鏈，以在晶片上捕獲測試抗體；
3. 使該測試抗原以1024nM、256nM、64nM、16nM、4nM和0nM (即，僅緩衝液)通過晶片的捕獲表面；以及
4. 並使用表面電漿子共振，譬如在上述SPR條件下測定測試抗體/鏈結合至測試抗原的親和力(譬如，於25oC，在生理緩衝液中)。SPR可使用任何標準SPR裝置執行，例如藉由BiacoreTM或使用ProteOn XPR36TM (Bio-Rad®)。

【0053】 捕獲表面的再生可用pH1.7的10mM甘胺酸進行。此去除所捕獲的抗體並使該表面用於另一次交互作用。可使用標準技術將結合數據擬合至固有的1:1模型，譬如使用ProteOn XPR36TM分析軟體固有的模型。

【0054】術語「抗體」包括單株抗體(包括具有免疫球蛋白Fc區的全長抗體)、帶有多表位特異性的抗體組成物、多特異性抗體(譬如，雙特異性抗體、雙抗體、與單鏈分子，以及抗體片段(譬如，Fab、具有成對的(多個) VH/VL 抗原結合位點的F(ab')₂)。

【0055】「結構域(domain)」是折疊的蛋白質結構，其具有獨立於蛋白質其餘部分的三級結構。一般而言，結構域負責蛋白質的離散功能特性，而且在許多情況下可添加、去除或轉移至其他蛋白質，而不喪失該蛋白質及/或該結構域的其餘部分的功能。

【0056】任擇地，本案的任何多特異性抗體是雙特異性抗體。此包括諸如下列的型式：DVD-Ig、mAb2、FIT-Ig、mAb-dAb、停靠及鎖定(dock and lock)、Fab-臂交換、SEED體、Triomab、LUZ-Y、Fcab、κλ-體、正交Fab、sc雙功能抗體-Fc(scDiabody-Fc)、雙功能抗體-Fc(diabody-Fc)、串聯scFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、內單鏈抗體(intrabody)、BiTE、雙功能抗體(diabody)、DART、TandAb、sc雙功能抗體(scDiabody)、sc雙功能抗體-CH₃(scDiabody-CH₃)、雙功能抗體-CH₃(Diabody-CH₃)、三功能抗體(Triple body)、微型抗體、小型抗體(minibody)、TriBi小型抗體、scFv-CH₃ KIH、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂-scFv、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四價HCab、ImmTAC、杵-臼、帶有共同輕鏈的杵-臼、帶有共同輕鏈及電荷對的杵-臼、電荷對、

帶有共同輕鏈的電荷對、DT-IgG、DutaMab、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig與zybody。關於雙特異性格式的回顧，參閱Spiess, C., et al.,. Mol. Immunol. (2015)。任擇地，多特異性配體是DVD-Ig、mAb2、FIT-Ig、mAb-dAb、停靠及鎖定、SEEDbody、sc雙功能抗體-Fc、雙功能抗體-Fc、串聯scFv-Fc、Fab-scFv-Fc、Fab-scFv、內單鏈抗體、BiTE、雙功能抗體、DART、TandAb、sc雙功能抗體、sc雙功能抗體-CH3、雙功能抗體-CH3、小型抗體、杵-臼配體、帶有共同輕鏈的杵-臼配體、帶有共同輕鏈及電荷對的杵-臼、電荷對、具有帶有共同輕鏈的電荷對的配體；在各情況中，包含至少一個VH/VL 抗原結合位點。

【0057】任擇地，在該輕鏈基因座中之該經重排的可變區(譬如，編碼VL、Vλ或Vκ結構域，譬如人結構域的經重排可變區)的上游包含下列成對之一的啟動子與信號肽(即，5'至3'順序為啟動子、SP與V區):-

- 1) 小鼠Vλ啟動子+小鼠Vλ SP
- 2) 小鼠Vλ啟動子+非小鼠嚙齒類Vλ SP
- 3) 小鼠Vλ啟動子+人類Vλ SP
- 4) 小鼠 Vλ 啟動子+非人靈長類 Vλ SP

- 5) 小鼠VK啟動子+小鼠V λ SP
- 6) 小鼠VK啟動子+非小鼠嚙齒類V λ SP
- 7) 小鼠VK啟動子+人類V λ SP
- 8) 小鼠VK啟動子+非人靈長類V λ SP

- 9) 非小鼠嚙齒類V λ 啟動子+小鼠V λ SP
- 10) 非小鼠嚙齒類V λ 啟動子+非小鼠嚙齒類V λ SP
- 11) 非小鼠嚙齒類V λ 啟動子+人類V λ SP
- 12) 非小鼠嚙齒類V λ 啟動子+非人靈長類V λ SP

- 13) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+小鼠V λ SP
- 14) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+非小鼠嚙齒類V λ SP
- 15) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+人類V λ SP
- 16) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+非人靈長類V λ SP

- 17) 人類V λ 啟動子+小鼠V λ SP
- 18) 人類V λ 啟動子+非小鼠嚙齒類V λ SP
- 19) 人類V λ 啟動子+人類V λ SP
- 20) 人類V λ 啟動子+非人靈長類V λ SP

- 21) 人類VK啟動子+小鼠V λ SP
- 22) 人類VK啟動子+非小鼠嚙齒類V λ SP
- 23) 人類VK啟動子+人類V λ SP
- 24) 人類VK啟動子+非人靈長類V λ SP

- 25) 非人靈長類Vλ啟動子+小鼠Vλ SP
- 26) 非人靈長類Vλ啟動子+非小鼠嚙齒類Vλ SP
- 27) 非人靈長類Vλ啟動子+人類Vλ SP
- 28) 非人靈長類Vλ啟動子+非人靈長類Vλ SP

- 29) 非人靈長類VK啟動子+小鼠Vλ SP
- 30) 非人靈長類VK啟動子+非小鼠嚙齒類Vλ SP
- 31) 非人靈長類VK啟動子+人類Vλ SP
- 32) 非人靈長類VK啟動子+非人靈長類Vλ SP

- 33) 小鼠Vλ啟動子+小鼠VK SP
- 34) 小鼠Vλ啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP
- 35) 小鼠Vλ啟動子+人類VK SP
- 36) 小鼠Vλ啟動子+非人靈長類VK SP

- 37) 小鼠VK啟動子+小鼠VK SP
- 38) 小鼠VK啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP
- 39) 小鼠VK啟動子+人類VK SP
- 40) 小鼠VK啟動子+非人靈長類VK SP

- 41) 非小鼠嚙齒類Vλ啟動子+小鼠VK SP
- 42) 非小鼠嚙齒類Vλ啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP
- 43) 非小鼠嚙齒類Vλ啟動子+人類VK SP

44) 非小鼠嚙齒類Vλ啟動子+非人靈長類VK SP

45) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+小鼠VK SP

46) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP

47) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+人類VK SP

48) 非小鼠嚙齒類VK啟動子+非人靈長類VK SP

49) 人類Vλ啟動子+小鼠VK SP

50) 人類Vλ啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP

51) 人類Vλ啟動子+人類VK SP

52) 人類Vλ啟動子+非人靈長類VK SP

53) 人類VK啟動子+小鼠VK SP

54) 人類VK啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP

55) 人類VK啟動子+人類VK SP

56) 人類VK啟動子+非人靈長類VK SP

57) 非人靈長類Vλ啟動子+小鼠VK SP

58) 非人靈長類Vλ啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP

59) 非人靈長類Vλ啟動子+人類VK SP

60) 非人靈長類Vλ啟動子+非人靈長類VK SP

61) 非人靈長類VK啟動子+小鼠VK SP

62) 非人靈長類VK啟動子+非小鼠嚙齒類VK SP

63) 非人靈長類VK啟動子+人類VK SP

64) 非人靈長類VK啟動子+非人靈長類VK SP

【0058】嚙齒類的例子是大鼠、海狸、地鼠、倉鼠、沙鼠、豪豬、南美栗鼠、旅鼠或田鼠。非人靈長類的例子是黑猩猩、猿、大猩猩、紅毛猩猩、猿猴、猴子(譬如，恒河獼猴或食蟹猴)、狐猴或狒狒。該啟動子及/或SP的序列的來源包括，舉例來說，www.imgt.org、www.ensembl.org與使用來自此類嚙齒類或靈長類或人的樣本(譬如，血液樣本與該序列的PCR)獲得的序列，這對於技術人員來說是顯而易見的。

【0059】在一例中，本發明的細胞、脊椎動物、哺乳動物或小鼠的輕鏈基因座並無選擇標記。在下文的實施例中，選擇標記被保留並所欲地執行了基因座。在一另擇例中，在建構基因座時可包括可切除的選擇標記，接著在該脊椎動物或小鼠發育之前將標記切除。在一例中，該標記係側接piggyBac末端重複序列，並且PBase在已建構該基因座的ES細胞中短暫表現，藉此切除該標記。在一例中，該標記包含側接piggyBac末端重複序列的puro-delta-tk。

【0060】本發明可藉由下列聲明來例示。

聲明：

【0061】1. 一種包含抗體輕鏈基因座(第一基因座)的細胞，其中該基因座包含(5'至3'方向)

(a) 輕鏈內含子增強子；

(b) 經重排的抗體可變區，其編碼經重排的抗體V結構域

(譬如，V_H、V_λ或V_κ，譬如，V_L)；以及

(c) 抗體輕鏈恒定區，其編碼輕鏈C結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈。

【0062】舉例來說，該V結構域與C結構域是人的。舉例來說，該V結構域與C結構域是人V_κ與人C_κ，譬如包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內。舉例來說，該V結構域與C結構域是人V_λ與人C_λ，譬如包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內。舉例來說，該細胞是嚙齒類、大鼠、吾人的小鼠細胞。

【0063】任擇地，該可變結構域包含下列或由下列構成：SEQ ID NO: 1的輕鏈序列的可變結構域，任擇地帶有5個或更少、4個或更少、3個或更少、2或1個胺基酸變化。各個變化可為胺基酸刪除、取代或添加。在一例中，該可變結構域的序列是由Kabat編號決定。在一例中，該可變結構域的序列是由IMGT編號決定。任擇地，該可變結構域特異性地結合至蛋白質抗原，譬如，人蛋白質抗原。

【0064】舉例來說，該細胞是嚙齒類、大鼠、吾人的小鼠細胞，並且該V結構域與C結構域是人V_κ與小鼠C_κ，譬如包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內；或該V結構域與C結構域是人V_λ與小鼠C_λ，譬如包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內。

【0065】在一例中，該恒定區編碼C κ 或C λ 且該恒定區的3'沒有另外的C結構域-編碼核苷酸序列。

【0066】較佳地，該V結構域能夠特異性地結合抗原，譬如，人抗原，例如當包含在抗體的VH/VL結合位點內時。

【0067】任擇地，本發明的細胞是脊椎動物、哺乳動物、非人哺乳動物、嚙齒類、小鼠、大鼠或人類細胞。任擇地，該細胞是人或嚙齒類(譬如，小鼠或大鼠)細胞。任擇地，該細胞或小鼠是129或C57BL/6品系細胞或小鼠(譬如，雜合體129或雜合體C57BL/6品系細胞或小鼠)。任擇地，該細胞或小鼠是雜合體129/C57BL/6品系細胞或小鼠，例如F1H4品系細胞或小鼠。

【0068】任擇地，該基因座被隨機插入細胞基因組中的轉基因所包含、或位在該細胞的內源性抗體基因座之外的位置。任擇地，該基因座位在該細胞的內源性抗體基因座。任擇地，該基因座係緊鄰該細胞的內源性抗體基因座、或位在該細胞的內源性抗體基因座，例如3'或5'的10、5、1或0.5kb以內。任擇地，該增強子及/或恒定區是該細胞的內源性抗體基因座增強子或恒定區。任擇地，該恒定區在該細胞的內源性抗體基因座恒定區的5' (譬如，緊接5'或在500、400、300、200、100或50bp 5'以內)。舉例來說，本發明基因座的恒定區(譬如，人C κ 或C λ)是緊接該細胞的內源性C κ 恒定區的5'或在5'的500、400、300、200、100或50bp以內。

【0069】任擇地，在本發明的任何細胞中，該抗體可變區不超過該基因座增強子的3' (或在另擇的組態中，5') 的400、300、200、150、100、50、30、20、10或5bp。

【0070】任擇地，在本發明的任何細胞中，該抗體可變區不超過該基因座恒定區5'的400、300、200、150、100、50、30、20、10或5bp。

【0071】在另擇的組態中，該抗體可變區是該細胞(譬如，其中該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞)的內源性抗體(譬如， κ 或 λ)基因座的3'增強子的3'。任擇地，在此組態中，該抗體可變區不超過該3'增強子3'的400、300、200、150、100、50、30、20、10或5bp。

【0072】在一例中，本發明基因座的恒定區是該細胞(譬如，其中該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞)的內源性抗體恒定區。在另一例子中，本發明基因座的恒定區是人抗體恒定區(譬如，其中該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞)，任擇地，其中該人恒定區是該細胞的內源性抗體恒定區的5' (譬如，內源性C κ 或C λ)。

【0073】舉例來說，該基因座包含(5'至3'方向)

- (a) 輕鏈內含子增強子；
- (b) 經重排抗體人可變區，其編碼經重排的抗體V結構域(譬如，人V結構域)；
- (c) 人類或小鼠或大鼠抗體輕鏈恒定區，其編碼輕鏈C結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經

重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈。

【0074】舉例來說，該基因座包含(5'至3'方向)

- (a) 輕鏈內含子增強子；
- (b) 經重排的抗體可變區，其編碼經重排的抗體V結構域(譬如，人V結構域)；
- (c) 內源性抗體輕鏈恒定區(譬如，人C κ 或C λ)，其編碼輕鏈C結構域；以及
- (d) 該細胞(譬如，其中該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞)的內源性抗體輕鏈恒定區

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈。

【0075】舉例來說，該基因座包含(5'至3'方向)

- (a) 該細胞(譬如，其中該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞)的內源性輕鏈內含子增強子；
- (b) 經重排的抗體可變區，其編碼經重排的抗體V結構域(譬如，人V結構域)；
- (c) 抗體輕鏈恒定區，其編碼輕鏈C結構域(譬如，人C結構域，例如當該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞時)；以及
- (d) 任擇地，該細胞的內源性抗體輕鏈恒定區；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈。

【0076】較佳地，該內含子增強子是該細胞(譬如，其中該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞)的內源性增強子，較佳為 κ 基因座Ei κ 增強子。較佳地，該細胞是第一物種

(species)或品系(譬如，小鼠或大鼠物種或品系)的細胞，本發明的內含子增強子包含該物種或品系的野生型內含子增強子序列。舉例來說，該細胞是F1H4、129或C57BL6品系細胞，該增強子是該品系的內含子增強子；任擇地，其中該增強子是Ei κ 及/或該可變區是該細胞的內源性 κ 恒定區上游(譬如，介於該細胞的內源性可變區(例如小鼠細胞內的人或小鼠可變區)與細胞的 κ 基因座的內源性C κ (譬如，小鼠C κ)之間)的插入物。

【0077】2. 如聲明1的細胞，其中該基因座是 κ 輕鏈基因座且該增強子是Ei κ 。

【0078】在一例中，該增強子是Ei κ ，譬如，該基因是 λ 輕鏈基因座。較佳地，在此例或聲明中，該V結構域與C結構域是人V κ 與人C κ ，譬如包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內；或該V結構域與C結構域是人V λ 與人C λ ，譬如包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內，其中，舉例來說，該細胞是嚙齒類、大鼠、吾人的小鼠細胞。

【0079】舉例來說，該基因座是 κ 輕鏈基因座且該增強子是Ei κ ，該細胞是小鼠細胞，該V結構域與C結構域是人V κ 與人C κ ，譬如，被包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內。舉例來說，該基因座是 κ 輕鏈基因座且該增強子是Ei κ ，該細胞是小鼠細胞，該V結構域與C結構域是人V λ 與人C λ ，譬如，被包含在結合預定抗原(譬如，上述之第一抗原)的已知抗體內。

【0080】在具體例中，該細胞是嚙齒類、小鼠或大鼠細胞且該增強子分別是嚙齒類、小鼠或大鼠內含子增強子(譬如，Ei κ)。

【0081】在一例中，該輕鏈恒定區是C κ 且該基因座包含可操作地連接在該C κ 的3'的 κ 3'增強子。在另一例中，該輕鏈恒定區是C λ 。

【0082】任擇地，該恒定區是人恒定區。任擇地，該恒定區是小鼠恒定區。任擇地，該恒定區是大鼠恒定區。

【0083】任擇地，該恒定區是人C κ 。任擇地，該恒定區是小鼠C κ 。任擇地，該恒定區是大鼠C κ 。

【0084】任擇地，該恒定區是人C λ 。任擇地，該恒定區是小鼠C λ 。任擇地，該恒定區是大鼠C λ 。

【0085】任擇地，該增強子是人增強子。任擇地，該增強子是小鼠增強子。任擇地，該增強子是大鼠增強子。

【0086】任擇地，該增強子是人Ei κ 增強子。任擇地，該增強子是小鼠Ei κ 增強子。任擇地，該增強子是大鼠Ei κ 增強子。

【0087】任擇地，該增強子是人 λ 增強子。任擇地，該增強子是小鼠 λ 增強子。任擇地，該增強子是大鼠 λ 增強子。

【0088】在一例中，該增強子的5'及/或3'係緊接人 κ 或 λ 可變區內含子序列(譬如，其中該增強子是小鼠增強子且該細胞是小鼠或大鼠細胞；或其中該增強子是大鼠增強子且該細胞是小鼠或大鼠細胞)。任擇地，各個側接序列是

介於編碼該V結構域(其中該V結構域是VL)的核苷酸序列的信號肽-編碼序列與VL-編碼序列之間的人VL內含子所包含的序列。舉例來說，該基因座包含能夠表現該VL結構域(或包含該VL的輕鏈)的B-細胞的基因組片段，其中該片段包含(5'至3'順序)啟動子、VL信號肽-編碼序列、第一內含子序列、該增強子、第二內含子序列、該可變區及任擇地該恒定區，其中該第一與第二內含子序列在B-細胞基因組中是天然相連的或相隔不超過500、400、300、200、100、50或20bp (bp=鹼基對)。

【0089】舉例來說，該基因座包含編碼抗體(譬如，其中該抗體特異性地結合至預定抗原或表位)的經重排輕鏈(譬如， κ 或 λ 鏈)的核苷酸序列。舉例來說，該核苷酸序列被包含在製造抗體之細胞，例如表現該抗體之B-細胞或融合瘤的選殖基因組片段內。在一例中，該核苷酸序列是該製造抗體之細胞的選殖基因組序列，其包含該可變區的啟動子至(並包括)該可變區且任擇地亦至(並包括)可操作地聯接至該可變區之恒定區的序列。舉例來說，該細胞是小鼠或大鼠細胞且該基因組片段包含製造專對預定抗原的 κ 抗體之細胞的基因組片段的序列，其中該基因組序列包含該可變區的啟動子至(並包括)該可變區的核苷酸序列；任擇地，其中該序列被包含在本發明基因座，該基因座的人C κ 恒定區的5'。舉例來說，該細胞是小鼠或大鼠細胞且該基因組片段包含製造專對預定抗原的 λ 抗體之細胞的基因組片段的序列，其中該基因組序列包含該可變區的啟動子

至(並包括)該可變區的核苷酸序列；任擇地，其中該序列被包含在本發明基因座，該基因座的人C λ 或C κ 恒定區的5'。在一例中，該核苷酸序列是該細胞的 κ 或 λ 基因座的插入物，譬如，可操作地聯接該細胞的 κ 或 λ 基因座的內源性3'增強子的5'。

【0090】 在本案的任何細胞、脊椎動物的例子或本發明其他態樣中，該細胞或脊椎動物的內源性 λ 及/或 κ 鏈表現是失活的或實質上失活的。在一具體例中，失活係超過50% (即50%或更少的抗體或轉錄本是該內源性抗體鏈)、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。舉例來說，在一具體例中，該內源性 λ 鏈表現是實質上失活的，俾使該脊椎動物的不超過85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的 λ 鏈庫是由內源性 λ 鏈提供。舉例來說，內源性 λ 鏈表現是失活的，俾使該脊椎動物並無或實質上無 λ 鏈庫是由內源性 λ 鏈提供。舉例來說，在一具體例中，該內源性 κ 鏈表現是實質上失活的，俾使該脊椎動物的不超過85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的 κ 鏈庫是由內源性 κ 鏈提供。舉例來說，內源性 κ 鏈表現是失活的，俾使該脊椎動物並無或實質上無 κ 鏈庫是由內源性 κ 鏈提供。

【0091】 在一例中，本發明基因座是該細胞的內源性 κ 基因座等位基因的改良，任擇地，就該改良而言，該細胞是雜合的或純合的。在一具體例中，就該改良而言，該細胞是雜合的且該細胞在另個 κ 基因座等位基因包含野生

型或人源化基因座。

【0092】 在一例中，本發明基因座是該細胞的內源性 λ 基因座等位基因的改良，任擇地，就該改良而言，該細胞是雜合的或純合的。在一具體例中，就該改良而言，該細胞是雜合的且該細胞在另個 λ 基因座等位基因包含野生型或人源化基因座。

【0093】 3. 如聲明1的細胞，其中該細胞是小鼠細胞，基因座是 λ 輕鏈基因座且該增強子是小鼠 λ 2-4或4-10增強子。

【0094】 4. 如任何前述聲明的細胞，其中

- (a) 該經重排的V結構域是 V_{κ} 且該C結構域是 C_{κ} ；
- (b) 該經重排的V結構域是 V_{κ} 且該C結構域是 C_{λ} ；
- (c) 該經重排的V結構域是 V_{λ} 且該C結構域是 C_{λ} ；或
- (d) 該經重排的V結構域是 V_{λ} 且該C結構域是 C_{κ} 。

【0095】 5. 一種細胞，其包含抗體重鏈基因座(第一基因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)

- (a) 重鏈內含子增強子(E_{μ})；
- (b) 經重排的抗體可變區，其編碼經重排的抗體V結構域(譬如， V_L 、 V_{λ} 或 V_{κ} ，譬如， V_H)；
- (c) 任擇的轉換序列；以及
- (d) 抗體重鏈恒定區，其編碼重鏈 $CH1$ 結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該 $CH1$ 結構域的抗體鏈。

【0096】 任擇地，該恒定區編碼抗體Fc (譬如，N-至

C-端方向：CH1 - 任擇的鉸鏈 - CH2-CH3)。

【0097】任擇地，該CH1是人或小鼠CH1，譬如，當該細胞是小鼠細胞時。

【0098】在一例中，該恒定區編碼抗體Fc (譬如，N-至C-端方向：CH1 - 任擇的鉸鏈 - CH2-CH3)，該恒定區的3'沒有另外的C結構域-編碼核苷酸序列。

【0099】6. 如任何前述聲明的細胞，其中該基因座包含(5'至3'方向)

- (a) 可操作地促進可變區轉錄的啟動子；
- (b) 編碼可變結構域信號肽的核苷酸序列；
- (c) 該內含子增強子；
- (d) 該經重排的抗體可變區；以及
- (e) 該抗體輕鏈恒定區，

其中該基因座是可操作地表現編碼(N-至C-端方向)融合至該可變結構域的胺基酸序列之信號肽序列的RNA轉錄本。

【0100】任擇地，該啟動子及/或該信號肽-編碼序列是可與包含與表現抗原-特異性V結構域的可變區一致的序列的野生型細胞(譬如人細胞，當該V區是包含在人細胞內的人V區時)、B-細胞或融合瘤，例如B-細胞或融合瘤內的可變區(或其V基因區段序列)操作的那些序列。

【0101】7. 如任何前述聲明的細胞，其中該細胞是ES (譬如，129、C57BL/6、AB2.1、AB2.2、JM8或F1H4型ES細胞)、iPS、融合瘤或B-細胞。

【0102】 8. 如任何前述聲明的細胞，其中該經重排的V結構域是 κ 或 λ V結構域，譬如，經重排人 κ 或 λ V結構域。

【0103】 9. 如任何前述聲明的細胞，其中該可變區編碼對第一預定抗原或第一表位具有結合特異性的V結構域(譬如，當和另一經重排的V結構域配對時)，其中該基因座是可操作地表現包含保留該特異性的V結構域的抗體鏈(譬如，當與該其他V結構域配對時)。

【0104】 舉例來說，該可變區編碼對第一預定抗原或第一表位具有結合特異性的VL結構域(譬如，當和經重排VH結構域配對時)，其中該基因座是可操作地表現包含保留該特異性的VL結構域的抗體輕鏈(譬如，當和該VH結構域配對時)。舉例來說，該VL與VH是和能夠特異性地結合至預定抗原的已知抗體的VL與VH一致。

【0105】 10. 如任何前述聲明的細胞，其中該細胞包含可操作地表現第二抗體鏈的第二抗體基因座，其中該第二鏈包含和該第一經重排的V結構域形成結合位點的第二經重排的V結構域，其中該結合位點能夠特異性地結合至預定抗原或表位。

【0106】 舉例來說，該第一基因座編碼VL結構域且該第二基因座編碼VH結構域，其中該VL與VH能夠對預定抗原或表位形成VH/VL結合位點。

【0107】 11. 如聲明10的細胞，當其依附於聲明9時，其中該預定抗原是不同的且該其他及第二V結構域是不同的；或其中該表位是不同的且該其他及第二V結構域是不

同的。

【0108】舉例來說，該等表位是相同抗原所包含的不同表位。

【0109】12. 如聲明11的細胞，其中

(a) 該第一結構域是VL (譬如，V κ 或V λ)結構域且該第二及該其他V結構域是VH結構域；或

(b) 其中該第一結構域是VH結構域且該第二及該其他V結構域是VL (譬如，V κ 或V λ 兩者)結構域。

【0110】13. 如任何前述聲明的細胞，其中該可變區是在該增強子3'的0.5、0.4、0.3、0.2或0.1 kb以內。

【0111】任擇地，該可變區與該內含子增強子相隔不超過0.5、0.4、0.3、0.2或0.1 kb。

【0112】14. 如任何前述聲明的細胞，其中該基因座包含在恒定區3'的第二增強子。

【0113】任擇地，該基因座(譬如，根據聲明5)是重鏈基因座，而該第二增強子是重鏈3'增強子。

【0114】任擇地，該基因座(譬如，根據聲明1)是 κ 鏈基因座，而該第二增強子是 κ 鏈3'增強子。

【0115】任擇地，該基因座(譬如，根據聲明1)是 λ 鏈基因座，而該第二增強子是 λ 鏈3'增強子，譬如，小鼠 λ 3-1增強子。

【0116】15. 如任何前述聲明的細胞，其中該細胞是非人哺乳動物或嚙齒類(譬如，小鼠或大鼠)細胞。

【0117】16. 如任何前述聲明的細胞，其中該恒定區

位於該細胞的內源性抗體基因座。

【0118】 17. 任擇地，另外的可變區(譬如，小鼠可變區或人可變區)是該內含子增強子的5'；舉例來說，就表現可變結構域而言，該另外的可變區是失活的。任擇地，並無可變區(譬如，小鼠可變區或人可變區)是該內含子增強子的5'。任擇地，該另外的可變區包含病變(譬如，J區病變或無J基因區段)或neo (新黴素抗藥性)標記，藉此使該另外的可變區的經重排失活。

【0119】 17. 如聲明16的細胞，當其依附於聲明1時，其中該內源性基因座是內源性κ鏈基因座。

【0120】 18. 如聲明16的細胞，當其依附於聲明5時，其中該內源性基因座是內源性重鏈基因座。

【0121】 19. 如聲明1至15中任一聲明的細胞，其中該基因座被包含在轉基因內，該轉基因被包含在細胞基因組內的內源性抗體基因座之外的位置(譬如位於Rosa 26)。

【0122】 任擇地，該細胞基因組包含複數個該轉基因。

【0123】 20. 如任何前述聲明的細胞，其中該細胞就該基因座而言是純合的。

【0124】 或者，該細胞就該基因座而言是雜合的。

【0125】 21. 如任何前述聲明的細胞，當其依附於聲明1時，其中該細胞基因組包含第二抗體基因座，其中該第二基因座是未經重排的抗體重鏈基因座，包含(5'至3'方向)

- (a) 一或多個VH基因區段；
- (b) 一或多個DH基因區段；
- (c) 一或多個JH基因區段；以及
- (d) 重鏈恒定區，其編碼一或多個CH結構域；

其中該重鏈基因座是可操作地表現複數個重鏈，其任擇地包含複數個抗原特異性或親和力，各個該重鏈能夠和該第一基因座所編碼的抗體鏈(譬如， κ 或 λ 輕鏈)配對，以製造包含抗原結合位點的成對鏈。

【0126】較佳地，該VH (譬如，該VH、DH與JH)基因區段是人基因區段。任擇地，該CH是嚙齒類，譬如，小鼠或大鼠、或人CH (譬如，當該細胞是小鼠或大鼠細胞)。

【0127】任擇地，在一另擇例中，本發明的細胞包含重鏈轉基因，其包含可操作地連接重鏈恒定區(譬如，小鼠、大鼠或人恒定區)的5'的未經重排重鏈可變區(譬如，人V區)，以表現複數個不同重鏈。

【0128】在一例中，根據聲明21之第二基因座或該轉基因之重鏈可變區包含由下列所構成之群組的至少5、10、15個或全部人VH基因區段：IGHV1-3、IGHV1-8、IGHV1-18、IGHV1-46、IGHV3-7、IGHV3-9、IGHV3-11、IGHV3-15、IGHV3-20、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHV3-48、IGHV3-53、IGHV4-4、IGHV4-31、IGHV4-34、IGHV4-39、IGHV4-59、IGHV4-61、IGHV5-51、IGHV6-1與IGHV7-4-1。

【0129】在一例中，本發明之第一基因座係編碼輕鏈，其中該輕鏈係和由下列所構成之群組的至少5、10、15個或全部人VH基因區段配對或能夠和由下列所構成之群組的至少5、10、15個或全部人VH基因區段配對：IGHV1-3、IGHV1-8、IGHV1-18、IGHV1-46、IGHV3-7、IGHV3-9、IGHV3-11、IGHV3-15、IGHV3-20、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHV3-48、IGHV3-53、IGHV4-4、IGHV4-31、IGHV4-34、IGHV4-39、IGHV4-59、IGHV4-61、IGHV5-51、IGHV6-1與IGHV7-4-1。

【0130】在一例中，該輕鏈係和下列的人VH基因區段配對或能夠和下列的人VH基因區段配對：本發明脊椎動物的IGHV1-3、IGHV1-8、IGHV1-18、IGHV1-46、IGHV3-7、IGHV3-9、IGHV3-11、IGHV3-15、IGHV3-20、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30、IGHV3-33、IGHV3-48、IGHV3-53、IGHV4-4、IGHV4-31、IGHV4-34、IGHV4-39、IGHV4-59、IGHV4-61、IGHV5-51、IGHV6-1與IGHV7-4-1。

【0131】在一例中，根據聲明21之第二基因座或該轉基因之重鏈可變區包含由下列所構成之群組的至少5、10、15個或全部人VH基因區段：IGHV1-3*01、IGHV1-8*01、IGHV1-18*01、IGHV1-46*03、IGHV3-7*01、IGHV3-9*01、IGHV3-11*01、IGHV3-15*01、IGHV3-20*d01、IGHV3-21*03、

IGHV3-23*04 、 IGHV3-30*18 、 IGHV3-33*01 、
IGHV3-48*02 、 IGHV3-53*01 、 IGHV4-4*02 、
IGHV4-31*03 、 IGHV4-34*01 、 IGHV4-39*01 、
IGHV4-59*01 、 IGHV4-61*01 、 IGHV5-51*01 、
IGHV6-1*01與IGHV7-4-1*01 。

【0132】在一例中，本發明之第一基因座係編碼輕鏈，其中該輕鏈是和由下列所構成之群組的至少5、10、15個或全部人VH基因區段配對或能夠和由下列所構成之群組的至少5、10、15個或全部人VH基因區段配對：
IGHV1-3*01 、 IGHV1-8*01 、 IGHV1-18*01 、
IGHV1-46*03 、 IGHV3-7*01 、 IGHV3-9*01 、
IGHV3-11*01 、 IGHV3-15*01 、 IGHV3-20*d01 、
IGHV3-21*03 、 IGHV3-23*04 、 IGHV3-30*18 、
IGHV3-33*01 、 IGHV3-48*02 、 IGHV3-53*01 、
IGHV4-4*02 、 IGHV4-31*03 、 IGHV4-34*01 、
IGHV4-39*01 、 IGHV4-59*01 、 IGHV4-61*01 、
IGHV5-51*01、IGHV6-1*01與IGHV7-4-1*01 。

【0133】在一例中，該輕鏈是和下列的人VH基因區段配對或能夠和下列的人VH基因區段配對：本發明脊椎動物的IGHV1-3*01、IGHV1-8*01、IGHV1-18*01、IGHV1-46*03、IGHV3-7*01、IGHV3-9*01、IGHV3-11*01、IGHV3-15*01、IGHV3-20*d01、IGHV3-21*03、IGHV3-23*04、IGHV3-30*18、IGHV3-33*01、IGHV3-48*02、IGHV3-53*01、

IGHV4-4*02 、 IGHV4-31*03 、 IGHV4-34*01 、
IGHV4-39*01 、 IGHV4-59*01 、 IGHV4-61*01 、
IGHV5-51*01、IGHV6-1*01與IGHV7-4-1*01 。

【0134】任擇地，該細胞是能夠分別發育成小鼠或大鼠的小鼠或大鼠ES細胞，其中該小鼠或大鼠能夠表現複數個重鏈，其任擇地包含複數個抗原特異性或親和力，各個該重鏈能夠和該第一基因座所編碼的抗體鏈(譬如， κ 或 λ 輕鏈)配對，以製造包含抗原結合位點的成對鏈。

【0135】22. 如聲明1至20中任一聲明的細胞，當其依附於聲明5時，其中該細胞包含一或多個另外的抗體基因座，各個另外的基因座能夠表現輕鏈，各個該輕鏈能夠和該第一基因座所編碼的抗體鏈(譬如，VH-Fc)配對，以製造包含抗原結合位點的成對鏈。

【0136】任擇地，該細胞是能夠分別發育成小鼠或大鼠(或其他脊椎動物)的小鼠或大鼠(或其他非人脊椎動物)ES細胞，其中該小鼠或大鼠(或脊椎動物)能夠表現一或多個輕鏈，其任擇地包含複數個抗原特異性或親和力，各個該輕鏈能夠和該第一基因座所編碼的抗體鏈(譬如，VH-Fc)配對，以製造包含抗原結合位點的成對鏈。此可有利於實行製造雙特異性抗體的下列方法:-

【0137】一種方法，包含

(i) 提供根據先前段落的非人脊椎動物(譬如，小鼠或大鼠)，其中該第一基因座之可變區編碼特異性地結合至第一預定抗原之抗體的VH結構域；

- (ii) 用第二預定抗原將該脊椎動物免疫化，其中該脊椎動物表現複數個該輕鏈，其中該等鏈的VL結構域和該VH的複本配對，以形成特異性地結合至該第二抗原的VH/VL抗原結合位點；
- (iii) 單離結合至該第一與第二抗原的一或多個VH/VL對；或獲得表現結合該等抗原之該VH/VL對的一或多個B-細胞或融合瘤；或獲得編碼該對之VL的核苷酸序列及/或該對之VH的核苷酸序列；
- (iv) 任擇地，將該等核苷酸序列插入一或多個表現載體或一或多個宿主細胞，以表現包含VH/VL成對結合位點的雙特異性抗體，其中各個結合位點能夠特異性地結合至該第一與第二抗原；以及
- (v) 任擇地表現並單離該雙特異性抗體。

【0138】在一例中，步驟(i)的脊椎動物是如本案所述的嵌合體，其中該嵌合體表現該一或多個輕鏈。

【0139】亦提供有：-

一種製造雙特異性抗體的方法，該方法包含由宿主細胞系表現複數個抗體，其中該宿主細胞系係藉由步驟(i)至(iv)獲得或由依此獲得的細胞培養。

【0140】亦提供有：-

一種製造雙特異性抗體的方法，該方法包含由宿主細胞系表現複數個抗體，其中各個宿主細胞基因組包含可表現之核苷酸序列，其編碼雙特異性抗體的重鏈可變結構域，其中該可變結構域能夠特異性地結合第一抗原，該核苷酸序

列和本發明脊椎動物的B-細胞的核苷酸序列一致(或至少80、85、90或95%一致)，其中該脊椎動物已用該第一抗原免疫化。在一例中，各個宿主細胞基因組包含編碼輕鏈可變結構域的核苷酸序列，其和B-細胞的核苷酸序列一致(或至少80、85、90或95%一致)，其中該重與輕鏈結構域形成一成對VH/VL第一抗原結合位點。任擇地，該方法包含單離複數個此類雙特異性抗體，任擇地另用載劑、稀釋劑或賦形劑來調配該抗體，以製造組成物(例如藥學組成物)。本發明亦關於藉由此方法或本發明的任何其他方法獲得或可獲得的此類複數個抗體或組成物。

【0141】 在一另擇例中，該第一基因座並非編碼VH，該第一基因座係編碼VL或輕鏈，脊椎動物能夠表現一或多個重鏈，其任擇地包含複數個抗原特異性或親和力，各個該重鏈能夠和該第一基因座所編碼的抗體鏈(譬如，輕)配對，以製造包含抗原結合位點的成對鏈。此類脊椎動物可比照適用於包含步驟(i)等的方法，其中該VL是特異性地結合至該第一抗原之抗體的VL。

【0142】 以此方式，可根據本發明在體內進行鏈混排，其中該起始點可為已知抗原結合特異性之抗體的固定的預定VH或VL。最終結果是抗體，其中VH/VL結合位點本身對第一與第二抗原(或者相同抗原的第一與第二表位)係具雙特異性。

【0143】 23. 如任何前述聲明的細胞，其中各個可變區或基因區段是人的，任擇地，該恒定區是人的。

【0144】任擇地，各個基因區段是人種系基因區段。

【0145】24. 如任何前述聲明的細胞，其中該細胞是小鼠細胞且各個恒定區是小鼠、大鼠或人恒定區。

【0146】舉例來說，各個恒定區是人恒定區。

【0147】25. 如任何前述聲明的細胞，其中各個該增強子是該細胞的內源性增強子。

【0148】在一例中，該內含子增強子係和該細胞為相同物種或品系、包含該細胞的內源性增強子序列、或包含插入該細胞基因組的插入物(譬如，包含和該內源性增強子序列一致的增強子序列的插入物)。

【0149】26. 如任何前述聲明的細胞，其中該細胞是小鼠細胞且各個該增強子是小鼠增強子。

【0150】舉例來說，該增強子是129雜合體或C57BL6雜合體品系增強子(而且任擇地，該細胞分別是129雜合體或C57BL6雜合體品系)。舉例來說，該增強子是129增強子且該細胞是F1H4或AB2.1細胞。

【0151】27. 如任何前述聲明的細胞，其中

(a) 該細胞是小鼠細胞，該可變區是人可變區，該內含子增強子是位在該細胞的內源性抗體基因座(譬如， κ 基因座)的小鼠內含子增強子(譬如，和內源性小鼠內含子增強子一致的序列)且該恒定區是小鼠、大鼠或人恒定區(譬如，該細胞的內源性小鼠恒定區)；或

(b) 該細胞是大鼠細胞，該可變區是人可變區，該內含子增強子是位在該細胞的內源性抗體基因座(譬如， κ 基因座)

的大鼠內含子增強子(譬如，和內源性大鼠內含子增強子一致的序列)且該恒定區是小鼠、大鼠或人恒定區(譬如，該細胞的內源性大鼠恒定區)。

【0152】 舉例來說，該細胞是小鼠細胞，該可變區是人可變區，該內含子增強子包含和內源性小鼠內含子增強子一致的序列並位於該細胞的內源性 κ 基因座，而且該恒定區是人恒定區。

【0153】 舉例來說，該細胞是小鼠F1H4細胞，該可變區是人可變區，該內含子增強子包含和小鼠129 E κ 內含子增強子一致的序列並位於該細胞的內源性 κ 基因座，而且該恒定區是人恒定區。舉例來說，該細胞是小鼠AB2.1細胞，該可變區是人可變區，該內含子增強子包含和小鼠129 E κ 內含子增強子一致的序列並位於該細胞的內源性 κ 基因座，而且該恒定區是人恒定區。

【0154】 舉例來說，該細胞是小鼠F1H4細胞，該可變區是人 λ 可變區，該內含子增強子包含和小鼠129 E κ 內含子增強子一致的序列並位於該細胞的內源性 κ 基因座，而且該恒定區是人 λ 恒定區。舉例來說，該細胞是小鼠AB2.1細胞，該可變區是人 λ 可變區，該內含子增強子包含和小鼠129 E κ 內含子增強子一致的序列並位於該細胞的內源性 κ 基因座，而且該恒定區是人 λ 恒定區。

【0155】 舉例來說，該細胞是小鼠F1H4 細胞，該可變區是人 κ 可變區，該內含子增強子包含和小鼠129 E κ 內含子增強子一致的序列並位於該細胞的內源性 κ 基因座，

而且該恒定區是人 κ 恒定區。舉例來說，該細胞是小鼠AB2.1細胞，該可變區是人 κ 可變區，該內含子增強子包含和小鼠129 E κ 內含子增強子一致的序列並位於該細胞的內源性 κ 基因座，而且該恒定區是人 κ 恒定區。

【0156】28. 如任何前述聲明的細胞，其中該經重排的可變區是下列的重排：

(a) 人 IGLV3-21 與 IGLJ3 (譬如， IGLV3-21*01 與 IGLJ3*02) 且任擇地可操作地連接至人種系 IGLV3-21 (譬如， IGLV3-21*01) 啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列；

(b) 人 IGK1-39 與 IGKJ1 或 5 且任擇地可操作地連接至人種系 IGKV1-39 啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列；

(c) 人 IGK3-20 與 IGKJ1 或 5 且任擇地可操作地連接至人種系 IGKV3-20 啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列；

(d) 人 VpreB 與 J λ 5 且任擇地可操作地連接至人種系 VpreB 啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列。

【0157】29. 一種轉基因非人脊椎動物，其包含根據任何前述聲明的複數個細胞。

【0158】舉例來說，該脊椎動物是包含如同本發明細胞之至少20、30、40或50%細胞的胚胎。舉例來說，該脊椎動物是包含如同本發明細胞之至少20、30、40或50%細胞的嚙齒類(譬如，小鼠或大鼠)幼兒，譬如，如毛色百分比所指示(譬如，白化總面積對比於刺鼠毛色)。

【0159】30. 如聲明29的脊椎動物，其中該脊椎動物

之種系包含如聲明1至28中任一聲明所定義的第一基因座(以及任擇地，該第二基因座)。

【0160】舉例來說，本發明提供轉基因非人脊椎動物嵌合體，其包含根據任何前述聲明的複數個細胞。任擇地，該嵌合體(或聲明31之嵌合體)的種系不包含聲明1至28中任一聲明所定義的第一基因座(而且任擇地亦非該第二基因座)。於是，對於本發明，避免了生成顯示基因座的種系傳遞的脊椎動物所需的時間與精力，可簡單地生成與使用嵌合體而無種系傳遞，其為優於先前技術組態的益處。

【0161】31. 如聲明29的脊椎動物，其中該脊椎動物是該細胞與不包含該第一基因座(譬如，其中該其他細胞包含野生型抗體基因座)的複數個其他細胞的嵌合體，其中該脊椎動物之種系不包含第一基因座。

【0162】任擇地，該其他細胞包含RAG剔除。此係有益的，因為嵌合體中的生產性成熟B-細胞將僅產自本發明的細胞，藉此去除不想要的背景。在此，生產性是指可表現有助於該脊椎動物之抗體庫的抗體的B-細胞。

【0163】在一例中，本發明的細胞是F1H4、AB2.1、AB2.2、129或C57BL6品系細胞且該其他細胞是F1H4、AB2.1、AB2.2、129或C57BL6品系細胞(譬如，野生型胚胎或桑椹胚前胚胎的子代細胞；或RAG剔除胚胎或桑椹胚前胚胎)。

【0164】32. 如聲明29至31中任一聲明的脊椎動物，其包含第一複數個細胞與第二複數個細胞，其中該第一複

數個之細胞包含相同的第一個一致抗體基因座，該第二複數個之細胞包含相同的額外一致抗體基因座，其中各個該抗體基因座係如聲明1至28中任一聲明之第一基因座，其中該脊椎動物能夠表現來自該第一個一致基因座的第一複數個抗體鏈及來自該額外基因座的第二複數個抗體鏈，其中該第一細胞之抗體基因座係異於該第二細胞之抗體基因座。

【0165】 33. 如聲明32的脊椎動物，其中該脊椎動物包含第三複數個細胞，其中該第三複數個之細胞包含相同的另外抗體基因座，其中該另外基因座係如聲明1至28中任一聲明並異於該第一與第二細胞之抗體基因座，其中該脊椎動物能夠表現來自該另外基因座的第三複數個抗體鏈。

【0166】 34. 如聲明32或33的脊椎動物，其中該脊椎動物是該細胞與不包含如聲明1至28中任一聲明的第一基因座或該額外或另外的基因座(譬如，其中該其他細胞包含野生型抗體基因座)的複數個其他細胞的嵌合體。

【0167】 35. 一種轉基因非人脊椎動物，其抗體輕鏈庫就單一經重排VL結構域種類而言為至少95、96、97、98或99%純(或為100%純)。

【0168】 這因此意指該脊椎動物表現的全部VL為該VL結構域種類，或僅少於5% VL是另一種類。

【0169】 在一例中，本案的脊椎動物是初始的(naïve)。在另一例中，該脊椎動物是經抗原免疫化的(譬

如，經人抗原免疫化的)。

【0170】純度可以，舉例來說，使用標準NGS並任擇地用PCR擴增樣本所包含的VL-編碼核苷酸序列而從該脊椎動物的血液樣本或VL-編碼核苷酸序列樣本測定。任擇地，將來自或產自該樣本的B-細胞或融合瘤分選至一或多個盤的個別孔中，隨後對其VL-編碼核苷酸序列進行任擇的PCR，接著藉由NGS測定各孔中的核苷酸序列的序列。分析該等序列以測定編碼該單一經重排VL結構域種類的比例。

【0171】在一例中，該VL種類是人類V κ 。在一例中，該VL種類是人類V λ 。

【0172】36. 如聲明35的脊椎動物，其中該庫就單一經重排VL結構域種類而言為至少99%。

【0173】37. 如聲明35或36的脊椎動物，其中該輕鏈庫之其餘輕鏈包含該VL結構域種類的突變體。

【0174】38. 一種轉基因非人脊椎動物，其抗體輕鏈庫包含由第一VL基因區段與第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域，其中由該重組所衍生的全部VL結構域中至少95%包含相同的VL胺基酸序列。

【0175】在另一個具體例中，本發明提供了一種轉基因非人脊椎動物，其中該脊椎動物之抗體輕鏈庫的全部VL結構域中至少95、96、97、98或99% (或100%)是由該脊椎動物基因組包含的相同輕鏈可變區序列所編碼。

【0176】在另一個具體例中，本發明提供了一種轉基

因非人脊椎動物，其中該脊椎動物之人VL庫的全部VL結構域中至少95、96、97、98或99% (或100%)是由該脊椎動物基因組包含的相同輕鏈可變區序列所編碼。

【0177】 39. 如聲明38的脊椎動物，其中由該重組所衍生的全部VL結構域中至少99%包含相同的VL胺基酸序列。

【0178】 40. 一種如聲明29至39中任一聲明或如聲明38之其他具體例的脊椎動物的複數個脾、骨髓、B-細胞或血球，其包含如聲明1至28中任一聲明的複數個第一基因座。

【0179】 41. 一種複數個脾、骨髓、B-細胞、融合瘤、CHO細胞、HEK細胞、MEF細胞、COS細胞、HeLa細胞或血球，其中各個細胞是如聲明1或當依附於聲明1時，如聲明2至28中任一聲明；而且任擇地，其中該細胞表現至少10個不同的抗體種類，其中

(a) 該抗體中至少95、96、97、98或99% (或100%)共享相同的輕鏈VL結構域且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類；或

(b) 該抗體包含由第一VL基因區段與第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域(譬如，人種系V κ 與J κ 基因區段或人種系V λ 與J λ 基因區段)，其中由該重組所衍生的全部該VL結構域中至少95%包含相同的VL胺基酸序列且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

【0180】 任擇地，該細胞是HEK293細胞，譬如，

HEK293T或S細胞、COS-1或COS-7細胞。

【0181】任擇地，該細胞表現至少100、1000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、或1000000000個不同的抗體種類。任擇地，該群體包含至少100、1000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、或1000000000個不同的VH結構域種類。

【0182】42. 一種多株抗體群體，其中該群體包含之抗體中至少95、96、97、98或99% (或100%)共享相同的輕鏈VL結構域且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

【0183】任擇地，該群體包含至少100、1000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、或1000000000個不同的VH結構域種類。

【0184】在一例中，本案的抗體群體被裝在無菌或醫用容器中、在試管、培養皿或燒瓶中。任擇地該群體與B-細胞混合，其中該B-細胞包含根據本發明的基因座。

【0185】43. 一種多株抗體群體，其包含由第一VL基因區段與第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域(譬如，人種系V κ 與J κ 基因區段或人種系V λ 與J λ 基因區段)，其中由該重組所衍生的全部該VL結構域中至少95、96、97、98或99% (或100%)包含相同的VL胺基酸序列且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

【0186】任擇地，該群體包含至少100、1000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、或

1000000000個不同VH結構域種類。

【0187】 44. 一種辨識或獲得抗體、抗體可變結構域、編碼抗體或抗體可變結構域的核苷酸序列(譬如，DNA或RNA序列)、或能夠表現該抗體或結構域的載體或宿主細胞，其中該抗體或結構域能夠特異性地結合至標靶抗原，該方法包含

(a) 使如聲明41之細胞群體、或如42或43之抗體群體和該抗原(譬如，固定在固體支撐物上)接觸；

(b) 使該群體所表現或包含的抗體結合至該抗原；以及

(c) 單離或辨識結合至該抗原的一或多個抗體、或單離或辨識該一或多個抗體的VH及/或VL結構域；或辨識編碼該VH或VL的核苷酸序列；以及

(d) 任擇地

(i) 使之所辨識之抗體或結構域和編碼該等的核苷酸序列(譬如，DNA、cDNA、RNA或mRNA序列)相關聯，藉此辨識該序列；

(ii) 擴增該序列(譬如，使用PCR)並將該序列插入表現載體或宿主細胞基因組中，以表現該經編碼的抗體或結構域；以及

(iii) 任擇地表現並單離該抗體或結構域(譬如，其中該結構域係包含在抗體鏈內)，

其中步驟(i)與(ii)可以任何順序執行。

【0188】 NGS可用，舉例來說，於該相關聯。

【0189】 45. 如聲明44的方法，其包含使用該方法擴

增編碼該經辨識的抗體之VH與VL結構域之VH與VL核苷酸序列，更包含將該VH與VL核苷酸序列插入該載體或細胞以共同表現該VH與VL來製造能夠結合至該抗原的成對VH/VL結合位點，並表現(以及任擇地單離)該結合位點(譬如被包含在載體或細胞所編碼的抗體內)。

【0190】 46. 如聲明45的方法，其中該方法包含在另外的VH結構域種類的存在下表現該VH與VL，其中該VL與該另外的VH形成另外的成對VH/VL位點，其能夠結合至另外的抗原，其中該另外的抗原與如聲明45之抗原是不同的，該方法包含共同表現(以及任擇地單離)該等結合位點(譬如被包含在該載體或細胞所編碼的雙特異性抗體內，其中該雙特異性抗體包含對各個該抗原的分別結合位點)。

【0191】 47. 如聲明46的方法，其中該雙特異性抗體是包含第一重鏈-輕鏈對與第二重鏈-輕鏈對的4-鏈抗體，其中

- (a) 在該第一與第二對中之輕鏈包含該VL結構域，
- (b) 該第一對之重鏈包含如聲明45之VH結構域，其中該VH結構域和該VL結構域形成VH/VL結合位點且其中該結合位點能夠特異性地結合至如聲明45之抗原；
- (c) 該第二對之重鏈包含和該VL結構域形成VH/VL結合位點之另外的VH結構域且其中該結合位點能夠特異性地結合至如聲明46之另外的抗原。

【0192】 48. 如聲明47的方法，其中各個4-鏈抗體包

含經突變的重鏈恒定區，以促進該第一與第二重-輕對之重鏈的配對；任擇地其中該突變是杵-白突變或電荷配對突變。

【0193】舉例來說，各個恒定區係由包含在表現載體內的重鏈恒定區序列所編碼。

【0194】有利地，在一例中，該第一對之重鏈具有第一pI且該第二對之重鏈具有第二pI，其中該pI值是不同的，舉例來說，相差0.5-1.5 pI單位，譬如，相差0.5-1 pI單位。這在該等鏈的體外純化期間分離該第一鏈與該第二鏈是有益的，如同抗體製造與量產期間是有益的。舉例來說，各個pI係於5至6.5的範圍內。

【0195】49. 一種複數個B-細胞、融合瘤、CHO細胞、HEK細胞、MEF細胞、COS細胞、HeLa細胞，其表現如聲明42或43之多株抗體群體。

【0196】任擇地，該細胞是HEK293細胞，譬如，HEK293T或S細胞、COS-1或COS-7細胞。

【0197】50. 如聲明44至48中任一聲明的方法，其中該方法包含獲得來自如聲明41或47之細胞的VL及/或VH-編碼核苷酸序列，以及在步驟(d) (i)中，使用該核苷酸序列以使該等的一或多者和結合該抗原之該抗體的一或多個VH及/或VL結構域相關聯。

【0198】51. 一種獲得編碼抗體或抗體可變結構域的核苷酸序列的方法，其中該抗體或結構域能夠特異性地結合至標靶抗原，該方法包含

- (a) 獲得來自如聲明41或47之細胞的VL及/或VH-編碼核苷酸序列；
- (b) 擴增該序列(譬如，使用PCR)；以及
- (c) 任擇地將該序列插入表現載體或宿主細胞基因組中，以表現該經編碼的抗體或結構域。

【0199】在一例中，本案的表現載體是用於CHO宿主細胞的CHO細胞表現載體。在一例中，本案的表現載體是用於HEK293宿主細胞的HEK293細胞表現載體。

【0200】52. 一種獲得用於製造特異地結合至一抗原之抗體的抗體-製造細胞系的方法，該方法包含將VH與VL-編碼核苷酸序列插入宿主細胞(譬如，CHO、HEK、MEF、COS或HeLa細胞)之基因組中，其中

- (a) 各個VH序列可操作地插入抗體重鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以使包含VH與C結構域之細胞表現重鏈；
- (b) 各個VL序列可操作地插入抗體輕鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以使包含VL與C結構域之細胞表現輕鏈；
- (c) 其中該表現的重鏈能夠與該輕鏈配對，以製造重-輕鏈對，各對包含能夠結合至抗原的VH/VL結合位點；以及
- (d) 其中VH與VL-編碼核苷酸序列是如聲明41或47的一或多個細胞的VH與VL-編碼核苷酸序列的序列。

【0201】任擇地，該宿主細胞是HEK293細胞，譬如，HEK293T或S細胞、COS-1或COS-7細胞。

【0202】53. 如聲明52的方法，其包含將第一與第二VH-編碼核苷酸序列插入該細胞基因組中，其中

(a) 該第一VH (當表現為第一重鏈的一部分時)能夠和該VL (當表現為輕鏈的一部分時)配對，以形成能夠特異性地結合至第一抗原的第一VH/VL結合位點；

(b) 該第二VH (當表現為第二重鏈的一部分時)能夠和該VL (當表現為輕鏈的一部分時)配對，以形成能夠特異性地結合至第二抗原的第二VH/VL結合位點；以及

(c) 該第一與第二抗原是不同的；

其中該第一與第二重鏈和該輕鏈能夠配對，以製造包含第一重鏈-輕鏈對與第二重鏈-輕鏈對的雙特異性4-鏈抗體，其中

(d) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含該第一VH；以及

(e) 該第二重鏈-輕鏈對之重鏈包含該第二VH結構域。

【0203】 54. 一種製造雙特異性4-鏈抗體的方法，其中該雙特異性抗體包含第一與第二抗原的相應結合位點，其中該等抗原是不同的，各個抗體包含第一重鏈-輕鏈對與第二重鏈-輕鏈對，其中

(a) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含第一VH，其中該第一VH (當表現為第一重鏈的一部分時)能夠和VL (當表現為輕鏈的一部分時)配對，以形成能夠特異性地結合至第一抗原的第一VH/VL結合位點；以及

(b) 該第二重鏈-輕鏈對該重鏈包含第二VH，其中該第二VH (當表現為第二重鏈的一部分時)能夠和該VL (當表現為輕鏈的一部分時)配對，以形成能夠特異性地結合至第二抗原的第二VH/VL結合位點；

該方法包含

- (c) 藉由下列製造能夠表現該第一重鏈的第一細胞系：(i) 將編碼該第一VH的核苷酸序列插入第一細胞基因組，其中該VH序列可操作地插至抗體重鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以表現包含第一VH與C結構域的第一重鏈；以及(ii)培養該細胞，以製造表現第一重鏈的第一細胞系；
- (d) 藉由下列製造能夠表現該第二重鏈的第二細胞系：(i) 將編碼該第二VH的核苷酸序列插入第二細胞基因組，其中該VH序列可操作地插至抗體重鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以表現包含第二VH與C結構域的第二重鏈；以及(ii)培養該細胞，以製造表現第二重鏈的第二細胞系；
- (e) 表現來自該第一細胞系的第一重鏈與來自該第二細胞系的第二重鏈，並將包含該第一VH的第一重鏈、包含該第二VH的第二重鏈以及包含該VL的輕鏈混合在一起，藉其(iii)第一重鏈和輕鏈配對，以製造該第一重鏈-輕鏈對，(iv)第二重鏈和輕鏈配對，以製造該第二重鏈-輕鏈對；以及(v)該第一重鏈-輕鏈對和該第二重鏈-輕鏈對配對，藉此製造該雙特異性抗體

其中VH及/或VL-編碼核苷酸序列是如聲明41或47的一或多個細胞的VH及/或VL-編碼核苷酸序列的序列。

【0204】任擇地，該第一重鏈與第二重鏈具有本案所述的第一與第二不同pI值，其中該方法更包含共同表現該鏈以製造混合物，並使用混合物的pH變化將第一鏈與第二鏈分離(譬如，來自介質的沖提液)，藉此製造與複數個第

二鏈分開的複數個第一鏈；以及將該第一與第二鏈和該輕鏈合併，以製造該雙特異性抗體。

【0205】本發明再提供了藉由本發明的方法獲得或可獲得的抗體(譬如，雙特異性抗體)。任擇地，該抗體用於治療或預防人或動物個體的疾病或病況。

【0206】55. 如聲明54的方法，其包含

- (a) 藉由下列製造能夠表現該輕鏈的第三細胞系：(i)將編碼該VL的核苷酸序列插入第三細胞基因組，其中該VL序列可操作地插至抗體輕鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以表現包含VL與C結構域的輕鏈；以及(ii)培養該細胞，以製造表現該輕鏈的第三細胞系；
- (b) 表現來自該第三細胞系之輕鏈，其中該輕鏈是如聲明54的步驟(e)的輕鏈。

【0207】56. 如聲明54的方法，其包含

- (a) 將編碼該VL的核苷酸序列插入該第一及/或第二細胞或細胞系之基因組中，其中該VL序列可操作地插至抗體輕鏈恒定區(譬如，人恒定區)的5'，以表現包含該VL與C結構域的輕鏈；以及
- (b) 表現來自包含該VH序列之細胞系之輕鏈，其中該輕鏈是如聲明54的步驟(e)之輕鏈。

【0208】57. 如聲明54、55或56的方法，其中該鏈之混合是藉由共同培養該等細胞系來執行。

【0209】58. 如聲明54、55或56的方法，其中該鏈之混合是藉由單離該等細胞系所表現的鏈並將所單離的鏈混

合在一起(譬如，在不包含該細胞的容器中)來執行。

【0210】該單離可以，舉例來說，使用本案所述之鏈的不同pI來進行。

【0211】59. 一種製造雙特異性4-鏈抗體的方法，其中該雙特異性抗體包含第一與第二抗原的相應結合位點，其中該等抗原是不同的，各個抗體包含第一重鏈-輕鏈對與第二重鏈-輕鏈對，其中

(a) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含第一VH，其中該第一VH (當表現為第一重鏈的一部分)能夠和VL (當表現為輕鏈的一部分)配對，以形成能夠特異性地結合至該第一抗原的第一VH/VL結合位點；以及

(b) 該第二重鏈-輕鏈對之重鏈包含第二VH，其中該第二VH (當表現為第二重鏈的一部分)能夠和該VL (當表現為輕鏈的一部分)配對，以形成能夠特異性地結合至該第二抗原的第二VH/VL結合位點；

該方法包含

(c) 將包含該第一VH的第一重鏈、包含該第二VH的第二重鏈以及包含該VL的輕鏈混合在一起，藉其(i)第一重鏈和輕鏈配對，以製造該第一重鏈-輕鏈對，(ii)第二重鏈和輕鏈配對，以製造該第二重鏈-輕鏈對；以及(iii)該第一重鏈-輕鏈對和該第二重鏈-輕鏈對配對，藉此製造該雙特異性抗體

其中VH及/或VL是由VH及/或VL-編碼核苷酸序列所編碼，其中該核苷酸序列是如聲明41或47的一或多個細胞的

VH及/或VL-編碼核苷酸序列的序列。

【0212】 60. 如聲明54至59中任一聲明的方法，其中各個4-鏈抗體包含突變的重鏈恒定區，以促進該第一與第二重-輕對之重鏈的配對；任擇地其中該突變是杵-臼突變或電荷配對突變。

【0213】 舉例來說，可提供表現載體，其中插入VH-編碼序列以和突變的人重鏈恒定區-編碼核苷酸序列的5'可操作地連接，其中該突變是用於和另一重鏈以杵-臼配對或用於和另一重鏈以電荷配對。於是，該第一重-輕對之重鏈之VH可插入此類載體第一突變重鏈恒定區的5'，該第二重-輕對之重鏈之VH可插入此類載體(相同或不同載體)第二突變重鏈恒定區的5'，其中該第一與第二重鏈可由該(等)載體表現並可使用該杵-臼或電荷配對突變配對。或者，該VH-編碼序列係插至相同或不同宿主細胞的基因組的分別恒定區的5'，以表現該重鏈。

【0214】 61. 一種製造用於治療或預防人或非人動物個體的疾病或病況(譬如，癌症或自體免疫疾病)的藥學組成物的方法，該方法包含

- (a) 從藉由如聲明52或53的方法製造的細胞系表現抗體；以及
- (b) 將該抗體和稀釋劑或賦形劑混合；
- (c) 任擇地，其中該抗體是和藉由如聲明54至60中任一聲明的方法獲得的抗體一致、或包含和藉由如聲明54至60中任一聲明的方法獲得的抗體一致的可變結構域。

【0215】 62. 一種製造用於治療或預防人或非人動物個體的疾病或病況(譬如，癌症或自體免疫疾病)的藥學組成物的方法，該方法包含將雙特異性抗體和稀釋劑或賦形劑混合，其中該抗體是和藉由如聲明54至60中任一聲明的方法獲得的抗體一致、或包含和藉由如聲明54至60中任一聲明的方法獲得的抗體一致的可變結構域。

【0216】 63. 一種製造如聲明1至28中任一聲明的細胞或如聲明29至39中任一聲明的脊椎動物的方法，該方法包含

(a) 獲得包含經重排的抗體可變區的核酸(譬如，DNA或cDNA，其編碼經重排的抗體V結構域；以及

(b) 將該可變區或其複本插入細胞之基因組中，藉其該可變區被包含在該基因組的抗體基因座內，

其中該基因座包含(5'至3'方向)

(c) 抗體基因座內含子增強子；

(d) 該經重排的抗體可變區；以及

(e) 抗體恒定區，其編碼抗體C結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈；以及

(f) 任擇地，其中該細胞是非人脊椎動物ES細胞或iPS細胞，該方法更包含從該細胞生成如聲明29至39中任一聲明之非人脊椎動物。

【0217】 任擇地，該細胞是多能的(pluripotent)、ES或iPS細胞且該細胞不能夠生成人或人胚胎。舉例來說，

該細胞不是人ES或iPS或多能幹細胞。

【0218】任擇地，該細胞是非人脊椎動物(譬如，嚙齒類、小鼠或大鼠)細胞，譬如，ES或iPS細胞。

【0219】熟習此藝者將知悉，並且輕易地取得使用本發明的ES或iPS細胞製造轉基因非人脊椎動物(譬如，小鼠與大鼠)的標準技術。舉例來說，本發明的一或多個ES細胞可在植入雌性非人脊椎動物(譬如，偽妊娠小鼠或大鼠，當該ES與胚胎/桑椹胚前胚胎分別是小鼠或大鼠時)之前被引進接受者胚胎或桑椹胚前胚胎。任擇地，該其他細胞、胚胎或桑椹胚前胚胎包含RAG剔除(譬如，RAG-1及/或RAG-2剔除)。此在確保非人脊椎動物中的全部抗體鏈，例如本發明的細胞與基因座製造之鏈是由本發明基因座貢獻100%而非該胚胎或桑椹胚前胚胎細胞是有用的。此外或另擇地，內源性IgH表現被剔除或失活，其中本發明之非人脊椎動物能夠表現包含人可變結構域與人或非人脊椎動物恒定結構域的抗體重鏈(譬如，來自該脊椎動物細胞所包含的轉基因IgH基因座)。

【0220】任擇地，步驟(a)之核酸包含(5'至3'方向)該經重排的抗體可變區與編碼一或多個抗體C結構域(譬如，C κ 、C λ 或重鏈Fc)的恒定區。任擇地，該核酸再包含(該可變區的5')可操作用於促進該可變區轉錄的啟動子，以及編碼可變結構域信號肽的核苷酸序列，其中該核酸編碼信號肽-V結構域 - C結構域。

【0221】任擇地，該基因座是抗體輕鏈基因座(第一基

因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)

(g) 輕鏈內含子增強子；

(h) 經重排的抗體可變區，其編碼經重排的抗體V結構域；
以及

(i) 抗體輕鏈恒定區，其編碼輕鏈C結構域；

其中該基因座在該細胞中是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈。

【0222】 任擇地，該基因座是抗體輕鏈基因座(第一基因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)輕鏈內含子增強子與編碼經重排輕鏈的核苷酸序列，其中該基因座在該細胞中是可操作地表現該輕鏈。

【0223】 任擇地，該細胞是嚙齒類(譬如，小鼠或大鼠細胞)且該基因座是抗體κ輕鏈基因座(第一基因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)小鼠或大鼠Eiκ內含子增強子與編碼經重排人類輕鏈的核苷酸序列，其中該基因座在該細胞中是可操作地表現該輕鏈。

【0224】 在本發明的任何細胞、脊椎動物、群體、組成物或方法的例子中，該V結構域是Vκ(譬如，人Vκ)且C結構域是Cκ(譬如，人Cκ)。在一例中，該V結構域是Vλ(譬如，人Vλ)且該C結構域是Cλ(譬如，人Cλ)。舉例來說，該核酸編碼抗體的經重排輕鏈(譬如，其中該抗體特異性地結合至預定抗原或表位)。

【0225】 64. 如聲明63的方法，其中該可變結構域是VL(譬如，人Vλ或Vκ)且該C結構域是CL(譬如，人Cλ或

C κ)。

【0226】舉例來說，該可變結構域是人V λ 且該C結構域是人C λ 。舉例來說，該可變結構域是人V κ 且該C結構域是人C κ 。

【0227】65. 如聲明63或64的方法，其中該插入是以該細胞的染色體DNA使用同源重組或位點特異性重組(譬如，使用lox位點)來執行。

【0228】66. 如聲明63至65中任一聲明的方法，其包含
獲得包含下列的轉基因(5'至3'方向)

- (a) 該內含子增強子(譬如，Ei κ ，例如小鼠或大鼠Ei κ)；
 - (b) 該經重排的抗體可變區(譬如，人VL-編碼可變區)；以及
 - (c) 該抗體恒定區(譬如，人CL-編碼區)；以及
- 將該轉基因插入該細胞之基因組，藉其該抗體基因座被該細胞包含在內。

【0229】舉例來說，該插入是位在或毗鄰該細胞的Rosa26基因座、或隨機進入該基因組。

【0230】67. 如聲明63至65中任一聲明的方法，其包含將該可變區插入

- (a) 該細胞基因組的輕鏈基因座之內含子增強子與該CL之間；或
- (b) 該細胞基因組的重鏈基因座之內含子增強子(E μ)與該C μ 之間。

【0231】在本案的任何插入中，接受者核酸的核苷酸序列(譬如，細胞染色體DNA)可隨著該刪除被同時或依序刪除。或者，插入並不會刪除接受者核酸序列。

【0232】68. 如聲明63至67中任一聲明的方法，其中該可變區編碼特異性地結合至預定抗原之抗體的V結構域(譬如，VL結構域)。

【0233】69. 如聲明68的方法，其中如聲明63所述之獲得包含該經重排的抗體可變區之核酸之步驟包含：

(a) 獲得表現如聲明68所述之該抗體的另外細胞(譬如，融合瘤或B-細胞)；

(b) 獲得或複製(譬如，使用PCR)

i. 該另外細胞的DNA (譬如，染色體DNA或cDNA) 序列，其包含編碼該V結構域之經重排可變區序列；
或

ii. 該另外細胞的RNA序列(譬如，mRNA序列序列)，其包含編碼該V結構域之經重排可變區序列，並創建該RNA序列的DNA複本；

藉此獲得該核酸。

【0234】在一例中，RNA可用於製造其cDNA複本，該cDNA是用於本發明的方法。

【0235】70. 如聲明63至69中任一聲明的方法，其包含培養該所得細胞，以製造複數個細胞，其中各個細胞是如聲明1至28中任一聲明。

【0236】任擇地，該複數個包含至少100、103、104、

105、106、107、108、109、1010、1011或1012個細胞，其中各個細胞是根據本發明(任擇地，其中各個細胞是和該其他細胞一致或該細胞包含相同的本發明第一基因座)。

【0237】 71. 一種非人脊椎動物(譬如，嚙齒類、大鼠或小鼠)胚胎或桑椹胚前胚胎，其被植入如聲明1至28中任一聲明的ES或iPS細胞或如聲明63至70中任一聲明的方法獲得的ES或iPS細胞。

【0238】 任擇地，該胚胎或桑椹胚前胚胎包含RAG剔除(譬如，RAG-1及/或RAG-2剔除)。此在確保非人脊椎動物中由該胚胎或桑椹胚前胚胎生長的全部抗體鏈是由非人脊椎動物中的本發明基因座貢獻100%而非該胚胎或桑椹胚前胚胎細胞是有用的。在一例中，該接受者胚胎或桑椹胚前是小鼠品系，例如C57BL/6，任擇地，該ES或iPS細胞是129、129雜合體、F1H4或AB2.1品系。

【0239】 72. 一種包含用於聲明66的方法的轉基因的核酸(譬如，DNA)，該轉基因包含(5'至3'方向)

- (a) 該內含子增強子；
- (b) 該經重排的抗體可變區；以及
- (c) 該抗體恒定區。

【0240】 73. 一種核酸，包含用於聲明67的方法的編碼經重排的V結構域之經重排可變區序列，該核酸包含側接有下列之該經重排的可變區序列：

- (a) 5'側接同源臂，以和該細胞基因組的第一核苷酸序列雜交，及/或

(b) 3'側接同源臂，以和該細胞基因組的第二核苷酸序列雜交；

其中

(c) 該5'同源臂是和該細胞的抗體輕鏈(譬如， κ)基因座的序列、其CL區的5'同源，且該3'同源臂是和該基因座的序列、該基因座之內含子增強子(譬如，Ei κ)的3'同源，藉其該同源臂與該細胞之基因組之間的同源重組能夠插入該可變區序列，藉此製造包含(5至3'方向)內含子增強子、該可變區與CL區的基因座；或

(d) 該5'同源臂是和該細胞的重鏈抗體基因座的序列、其C μ 區的5'同源，且該3'同源臂是和該基因座的序列、該基因座之內含子增強子(E μ)的3'同源，藉其該同源臂與該細胞之基因組之間的同源重組能夠插入該可變區序列，藉此製造包含(5至3'方向)內含子增強子、該可變區與C μ 區的基因座。

【0241】 74. 如聲明73的核酸，其中核酸或該5'同源臂包含(5'至3'方向)

(a) 可操作以促進該可變區轉錄的啟動子；

(b) 編碼可變結構域信號肽的核苷酸序列；以及

(c) 任擇地，該內含子增強子序列，

其中當該可變區序列插入該細胞基因組時，該可變區是以可操作連接方式插入該啟動子與信號肽-編碼序列的3'，以表現包含(N-至C-端方向)信號序列-V結構域-C結構域的抗體鏈。

【0242】本發明進一步提供組成物(譬如，藥學組成物或或醫用組成物)，該組成物包含藉由本案揭示方法所獲得或可獲得的抗體、雙特異性抗體、抗體鏈(譬如，輕鏈)、其VL或核苷酸序列；任擇地其中該組成物包含稀釋劑、賦形劑或載劑，任擇地其中該組成物是內含在IV容器(譬如，與IV袋)或連接到IV注射器的容器中。當該組成物是藥物組成物或醫用組成物時，該稀釋劑、賦形劑或載劑是藥學上可接受的。「藥學上可接受的」是指由美國聯邦或州政府的管理機構已批准或可批准的或列在美國藥典或其他公認的藥典中的用於動物，包括人。「藥學上可接受的載劑、賦形劑、或佐劑」是指能和一藥劑(agent)，譬如本案所述的任何抗體、VL或抗體鏈一起投予個體的載劑、賦形劑、或佐劑，該等並不破壞該藥劑的藥理活性，而且在足以遞送該藥劑之治療量的藥量投予時，該等是無毒的。

【0243】單數術語「一(a)」、「一(an)」、與「該(the)」包括複數參照物，除非上下文另有明確指示。類似地，用語「或(or)」意圖包括「與(and)」，除非上下文另有明確指示。儘管與本案所述的類似或等效的方法與材料可用於本揭示內容的實行或測試，但以下說明了適宜的方法與材料。縮寫「譬如(e.g.)」衍生自拉丁文比如(exempli gratia)，並在本案中用於指示非設限例。於是，縮寫「譬如」與術語「舉例來說(for example)」同義。

【0244】細胞生物學與分子生物學的常見術語的定義可在下列找到："The Merck Manual of Diagnosis and

Therapy", 19th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0) ; Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) ; Benjamin Lewin, Genes X, published by Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321) ; Kendrew et al. (eds.), , Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) 以及 Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds. °

【0245】除另有說明外，本發明使用標準流程進行，舉例來說，說明於 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) ; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995) ; 或 Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger and A. R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987) ; Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.) 、 Current Protocols in 細胞

Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)、以及Culture of Animal 細胞s: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005)、Animal 細胞Culture Methods (Methods in 細胞Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)，該等皆以參照方式整體併入本案。

【0246】其他術語在本案中係於說明本發明的各個態樣中定義。

【0247】為了說明與揭示目的，本申請案全文中所列舉的全部專利及其他出版物；包括文獻參考、已核准專利、已公開專利申請案、以及待審未決的專利申請案(包括該等任何一者的美國對應案)以參照方式明確地併入本案，舉例來說，可能與本案所述的技術結合使用的此類出版物所述的方法論。提供該等出版物僅僅是因為彼等在本申請案的提申日之前揭露。在此方面的任何內容皆不應被解讀為承認發明人無權因先前發明或任何其他原因而早於該等揭露內容。對日期的全部聲明或對該等文件的內容的呈現是基於申請人可取得的資訊，並不構成對該等文件的日期或內容的正確性的任何承認。

【0248】本揭示內容的具體例的說明並非意圖窮舉或將本揭示內容限制於所揭示的精確形式。儘管本揭示內容的特定具體例、以及實施例是為了例示目的而揭示於本

案，但熟習相關技術人員將認知到，落於本揭示內容範疇內的各種等效修改例是可行的。舉例來說，儘管方法步驟或功能是以既定順序呈現，但另擇具體例可以不同順序執行功能，或可實質上同時地執行功能。適當的話，本案提供的本揭示內容的教示可應用至其他流程或方法。本案所述的各種具體例可合併，以提供另外的具體例。若有必要，可修改本揭示內容的態樣，以運用上述文獻及申請案的組成物、功能與概念來提供本揭示內容的再另外的具體例。而且，由於生物功能等效性的考量，可對蛋白質結構進行一些改變，而不影響生物或化學作用的種類或份量。依據該詳細說明，可對本揭示內容進行該等及其他改變。全部該等修改意圖被包括在隨附申請專利範圍的範疇以內。

【0249】任何前述具體例的特定元素可合併或取代其他具體例中的元素。再者，儘管已在該等實施例的上下文中說明與本揭示內容的某些具體例相關的優點，但其他具體例亦可展現此類優點，並非全部具體例皆必須展現落於本揭示內容範疇內的此類優點。

【0250】將理解的是，本案所述的特定組態、態樣、實施例、具體例是以舉例方式展示而非限制本發明。可在各種具體例中運用本發明的主要特徵，而不脫離本發明之範疇。熟習此藝者將認知到—或能夠確切使用不超過常規的研究—本案所述特定流程的眾多等效物。此類等效物被視為落於本發明的範疇內並為申請專利範圍所涵蓋。說明書中提到的所有出版品及專利申請案指示本發明所屬技術

領域的技術人員的技術水平。所有出版品及專利申請案(包括美國等效案)以參照方式併入本案，彷彿各個個別出版品或專利申請案係明確地並個別地指示以參照方式併入。在申請專利範圍及/或說明書中連同術語「包含(comprising)」使用時，用語「一(a)」或「一(an)」的使用可意指「一個(one)」，但亦與「一或多個(one or more)」、「至少一個(at least one)」，以及「一個或多於一個(one or more than one)」的意義一致。在申請專利範圍使用術語「或(or)」是用於意指「及/或(and/or)」，除非明確指出僅指稱替代方案或替代方案是相互排斥的，儘管本揭示內容支持僅指稱替代方案與「及/或」的定義。在通篇申請案中，術語「約(about)」是用於指示數值包括該裝置的固有誤差變化、測定該數值所運用的方法、或研究對象之間存在的差異。

【0251】如在本說明書與(多項)請求項所用，用語「包含(comprising)」(及任何形式的包含，例如「包含(comprise)」與「包含(comprises)」)、「具有(having)」(及任何形式的具有，例如「具有(have)」與「具有(has)」)、「包括(including)」(及任何形式的包括，例如「包括(includes)」與「包括(include)」)或「含有(containing)」(及任何形式的含有，例如「含有(contains)」與「含有(contain)」)皆為包容性的或開放的且不排除額外的、未列舉的元素或方法步驟。

【0252】本揭示內容的任何部分可連同本揭示內容

的任何其餘部分一併閱讀，除非上下文明顯不符。

【0253】可依據本揭示內容來製作及執行本案所揭示及主張的所有組成物及/或方法，而無需過度實驗。儘管本發明的組成物及方法已就較佳具體例說明，但對於熟習此藝者而言很明顯的是，可對組成物及/或方法以及在本案所述方法中的步驟或步驟順序施加變動，而不逸離本發明的概念、精神與範疇。對於熟習此藝者而言很明顯的所有此類類似取代及修改被認為落於由隨附申請專利範圍所界定的本發明的精神、範疇與概念以內。

【0254】在下列非設限實施例中更詳細地說明本發明。

實施例

實施例1. 構建用於小鼠ES細胞靶向的靶向載體

1.1 pUC57_N128L_KI載體DNA合成

【0255】N128L是由人IGLV3-21*01與IGLJ3*02 (VL結構域序列在下文給出)重排的人 λ 輕鏈。含有野生型人IGLV3-21*01啟動子(pV λ)與信號肽(SP)、小鼠內含子的 κ 增強子(miE κ)、以及N128L輕鏈可變區與恒定區的DNA片段是由Genscript合成。將 κ 基因座中的V κ 與J κ 區之間的1-kb片段、以及小鼠 κ 恒定區(C κ)與小鼠3' κ 增強子(m3'E κ)之間的1-kb片段作為同源臂，以靶向該N128L敲入匣。在成功靶向之後，藉由該N128L敲入將包括小鼠C κ 的 κ 等位基因DNA置換(圖1)。

1.2 pUC57_N128L_EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA 靶

向載體

【0256】用 NotI 與 AscI 消化 EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA 載體。使用 QIAquick™ PCR Purification Ki (QIAGEN) 藉由所附指導手冊描述的方法純化 3.6 kb 片段。用 NotI 與 AscI 消化 pUC57_N128L_KI 載體。使用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 藉由所附指導手冊描述的方法純化 7.9 kb 片段。使用 T4 接合酶 (New England Biolabs) 根據所附指導手冊描述的方法接合 NotI-AscI-消化的 EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA 與 pUC57_N128L_KI 片段。用接合溶液將大腸桿菌 (E.coli) DH10B 品系 (ElectroMax™ DH10B (Invitrogen)) 轉形。使用 QIAprep™ Spin Miniprep Kit (QIAGEN) 從獲得的安比西林抗藥性選殖體將個別的質體 DNAs 單離。藉由桑格定序法 (Sanger sequencing) 確認所得的個別安比西林抗藥性轉形體具有該插入。

1.3 製備用於小鼠 ES 細胞靶向的質體 DNA

【0257】對於 pUC57_N128L_EF1 α _Puro_2A_EGFP_SV40pA 靶向載體，使用 QIAprep Maxi plus Kit™ (QIAGEN) 藉由所附指導手冊描述的方法將質體 DNA 從定序法已驗證的選殖體單離。藉由桑格定序法確認個別的質體 DNAs 具有該插入。

實施例 2. 生成 N128L 敲入小鼠 ES 細胞系

2.1 製備鼠ES細胞

【0258】將來自兩隻獨立小鼠胚胎幹細胞(ES)系的細胞在STO飼養盤上擴增，以用於電穿孔。用新鮮的M15培養基餵養ES細胞，直到彼等在顯微鏡下達到80%至85%匯合。使用電穿孔引進敲入構築體。

【0259】在補充有嘌呤黴素(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的M15培養基中培養ES細胞。電穿孔後7天，嘌呤黴素抗藥性菌落足夠地大，可進行挑取。

2.2 顯微注射靶向的小鼠ES細胞選殖體

【0260】將靶向的ES細胞注射至C57BL6品系胚胎。注射後，將胚胎移至注射前3天與輸精管切除的雄性交配的C57BL6品系F1雜合體雌性的子宮中。使該嵌合體胚胎在偽妊娠接受者中發育至足月，其發育成包含敲入該輕鏈的幼崽。

實施例3：共同輕鏈小鼠

【0261】以人標靶X將帶有在IgH基因座中的共同輕鏈敲入等位基因與功能性未重排人類VH區的八隻嵌合體小鼠免疫。

該敲入編碼下列N128L VL (N-至C-端方向)：-

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQ
QKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLT
ISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLTV
L

【0262】免疫後，使用標記有PE之針對人 λ 輕鏈的單

株抗體以及標記有AF647之針對人標靶X的單株抗體在脾B進行分選(圖2與3)。將對於PE與AF647兩者均呈陽性的B細胞作為單細胞分選到96孔盤上的個別孔中。使用標準程序構建單細胞NGS庫並投至NGS定序。

【0263】在從吾人的實驗所包括的PCR對照組中減去序列後，吾人發現346個選殖體，該等皆包含衍生自IGLV3-21*01與IGLJ3*02的預期λ輕鏈組合。將該等輕鏈序列與敲入輕鏈等位基因的序列分群證實了346個選殖體中的339個未突變，其餘7個選殖體具有一個或多個突變(圖4)。

表1：共同L鏈的頻率

選殖體數目(總共 346 個)	對於由人 IGLV3-21*01 與 IGLJ3*02 重排的預定人 λ 輕鏈的一致性百分比
339	100.00%
1	97.23%
1	98.15%
1	99.08%
4	99.69%

【0264】相較於與插入的輕鏈序列完美(即100%)匹配的序列相比，不完全匹配的序列具有較低的信賴度得分(81.6%信賴度得分(對於指為100%匹配的序列的平均值)比上31.7%信賴度得分(對於7個其餘序列的平均值)，100%代表最高的信賴度，0%代表最低的信賴度)。於是，吾人發現在基於人IGLV3-21*01與IGLJ3*02組合的所有

VLs當中，98%包含該一致的輸入共同輕鏈V序列。

【0265】在生物資訊學分析之後，理想地發現到該等選殖體的人重鏈V結構域序列庫是多樣的。藉由生物資訊學分析沒有辨識到顯著的人VH、DH或JH的使用。此符合來自初始嵌合體小鼠的脾B細胞中的重鏈可變區的巨量NGS分析(數據未顯示)。

人VH基因區段的使用包含下列：

【0266】IGHV1-3*01 、 IGHV1-8*01 、 IGHV1-18*01 、 IGHV1-46*03 、 IGHV3-7*01 、 IGHV3-9*01 、 IGHV3-11*01 、 IGHV3-15*01 、 IGHV3-20*d01 、 IGHV3-21*03 、 IGHV3-23*04 、 IGHV3-30*18 、 IGHV3-33*01 、 IGHV3-48*02 、 IGHV3-53*01 、 IGHV4-4*02 、 IGHV4-31*03 、 IGHV4-34*01 、 IGHV4-39*01 、 IGHV4-59*01 、 IGHV4-61*01 、 IGHV5-51*01 、 IGHV6-1*01 與 IGHV7-4-1*01 。

實施例4：用於小鼠ES細胞靶向的共同輕鏈靶向載體的構建

【0267】如下製作另外的共同輕鏈小鼠。

生成共同輕鏈靶向載體

【0268】合成含有野生型人類Vλ啟動子(pVλ)與信號肽(SP)、小鼠內含子的κ增強子(miEκ)、編碼人輕鏈可變區與恒定區的核苷酸序列的DNA片段。該輕鏈可變結構域對下文使用的標靶Y以外的標靶(標靶Z)具有特異性。將

V κ 與J κ (1-5)之間的1kb片段、以及小鼠 κ 恒定區(C κ)與小鼠3' κ 增強子(m3'E κ)之間的1kb片段用作用於靶向該共同輕鏈敲入匣的同源臂。在成功靶向之後，該人J κ (1-5)與小鼠C κ 將被一個或兩個等位基因上的共同輕鏈敲入匣置換。

生成共同輕鏈靶向小鼠ES細胞

【0269】將來自兩隻獨立小鼠胚胎幹細胞(ES)系的細胞在STO飼養盤上擴增，以用於電穿孔。用新鮮的M15培養基餵養ES細胞，直到彼等在顯微鏡下達到80%至85%匯合。

【0270】在電穿孔前2小時，用新鮮的M15培養基餵養ES細胞。在電穿孔之前，ES細胞用PBS洗滌兩次，並藉由加入胰蛋白酶從平板中解離。在37°C培育20分鐘後，藉由加入相同體積的M15培養基使胰蛋白酶失活。藉由重複移液將ES細胞解離成單細胞懸浮液。藉由以1,100 rpm離心4分鐘讓ES細胞沉澱，並藉由所附指導手冊描述的方法再次懸浮於電穿孔緩衝液(Lonza)中。

【0271】使用預設小鼠ES細胞程序，使用Lonza Amaxa™機器進行電穿孔。電穿孔之後，將來自各次電穿孔的ES細胞再次懸浮於新鮮的M15培養基中，並鋪在一個10cm飼養盤上。

【0272】在電穿孔之後，用M15培養基餵養ES細胞3天。將來自各次電穿孔的ES細胞以1:3繼代至三個10 cm飼養盤。繼代後兩天，將ES細胞培養在補充有嘌呤黴素(1

$\mu\text{g/mL}$)的M15培養基中。電穿孔後7天，嘌呤黴素抗藥性菌落足夠地大，可進行挑取。

【0273】在挑取前2小時，在10 cm STO飼養盤上的嘌呤黴素抗藥性菌落用新鮮M15培養基餵養。將50 μl 胰蛋白酶加至96孔圓底盤的各孔。用PBS緩衝液將10 cm STO飼養盤上的菌落洗滌兩次。將10 ml PBS緩衝液加至各個10cm盤。

【0274】使用Gilson移液管從飼養盤中挑取單一菌落，並移至帶有胰蛋白酶的96孔盤的孔中(1個菌落/孔)。完成一盤後(挑取96個菌落)，使胰蛋白酶盤在37°C培育30分鐘。在那之後，將150 μl 新鮮M15培養基加至各孔。藉由重複移液將菌落分解。將單一細胞懸浮液移至96孔飼養盤並在TC培育箱中於37°C培養。用新鮮的M15培養基餵養ES細胞，直到彼等在顯微鏡下達到80%至85%匯合。

繼代共同輕鏈小鼠ES細胞

【0275】繼代前2小時，用新鮮的M15培養基餵養ES細胞。在繼代之前，ES細胞用PBS緩衝液洗滌兩次，並藉由加入胰蛋白酶從該等盤解離。於37°C培育20分鐘後，加入相同體積的M15培養基使胰蛋白酶失活。藉由重複移液將ES細胞分解成單一細胞懸浮液。

【0276】將單個ES細胞懸浮液以1：4分成4個96孔STO飼養盤。用新鮮的M15培養基餵養ES細胞，直到彼等在顯微鏡下達到80%至85%匯合。

在96孔盤上冷凍ES細胞

【0277】 冷凍前2小時，用新鮮的M15培養基餵養ES細胞。在冷凍之前，ES細胞用PBS緩衝液洗滌兩次，並藉由加入胰蛋白酶從該等盤解離。於37°C培育20分鐘後，加入相同體積的2X冷凍培養基(60% DMEM，20% FBS，20% DMSO，新鮮製備)使胰蛋白酶失活。藉由重複移液將ES細胞分解成單一細胞懸浮液。將96孔盤密封並置於-80°C冷凍櫃內的聚苯乙烯盒中，以促進非常緩慢的冷凍過程。

基因組DNA提取

【0278】 用PBS緩衝液洗滌ES細胞兩次，將帶有蛋白酶K (1 mg/mL)的50 µL ES細胞裂解緩衝液(10 mM Tris-HCl，pH 7.5，10 mM EDTA，0.5% SDS，10 mM NaCl)加至96孔盤的各孔。將盤密封，用濕紙巾包裹，並放入餐盒中。將餐盒於55 °C培育過夜。

【0279】 第二天，將100 µL冰冷的乙醇/NaCl混合物(1.5 mL 5M NaCl加至98.5 mL 100%乙醇)加至96孔盤的各孔。使該等盤在室溫下待約30分鐘。培育後，將該等盤以3,000rpm離心20分鐘。將該等盤倒置以傾析液體，並在紙巾上乾燥以去除多餘液體。添加150 µL冷的70%乙醇將該等盤洗滌兩次。待DNA沉澱丸粒乾燥後，加入30 µL TE (pH 8.0)緩衝液並藉由在55 °C培育30分鐘使DNA再次懸浮。

解凍與擴增共同輕鏈小鼠ES細胞選殖體

【0280】 將冷凍的96孔盤從-80°C 冷凍櫃中取出，並

於37°C 培育箱中解凍，直至該等盤的每個孔變得透明。將2 mL新鮮M15培養基加至24孔STO飼養盤的各孔。將來自96孔盤的所欲孔的全部內容物移到24孔盤的孔中。在將全部靶向選殖體移至24孔盤後，在TC培育箱中於37°C培養。用新鮮的M15培養基餵養ES細胞，直到彼等在顯微鏡下達到80%至85%匯合。一旦彼等匯合，將彼等以1:1繼代至6孔STO飼養盤並凍結下來以用於顯微注射。

共同輕鏈小鼠ES細胞選殖體的顯微注射

【0281】在注射前解凍小鼠ES細胞並擴展。注射前2小時，用新鮮的M15培養基餵養ES細胞。注射之前，ES細胞用PBS緩衝液洗滌兩次，並藉由加入胰蛋白酶從該等盤解離。於37°C培育20分鐘後，加入相同體積的新鮮M15培養基使胰蛋白酶失活。藉由重複移液將ES細胞分解成單一細胞懸浮液，並置於冰上以用於注射。

【0282】將靶向的ES細胞注射至E3.5 Rag^{-/-}胚胎。注射之後，將胚胎移至CBA的子宮；在注射前3天，使C57BL6/J F1雜合體雌性與輸精管切除的雄性交配。The使該嵌合體胚胎在偽妊娠接受者中發育至足月。得到的小鼠包含衍生自經改造ES細胞的細胞，其中該細胞基因組包含位在一個小鼠κ基因座的人λ輕鏈敲入(另個κ基因座是藉由J區刪除而失活)以及純合的IgH基因座所包含的未重排人重鏈可變區。

實施例5：製造針對標靶Y的抗體

免疫

【0283】如下所述，用標靶Y對共同輕鏈嵌合體小鼠進行免疫。作為第一次免疫，皮下投予經CpG (Sigma)與鋁鹽(1:1抗原)乳化的40 µg/標靶Y的頭部。四週後，藉由腹膜內注射經CpG (Sigma)與鋁鹽(1:1抗原)乳化的5 µg/標靶Y的頭部(第一次增強)。一週後，處死四隻小鼠並提取脾。第一次增強的四週後，將經CpG (Sigma)與鋁鹽(1:1抗原)乳化的2 µg/標靶Y的頭部(第二次增強)藉由腹膜內注射另外四隻小鼠。一週後，處死該些小鼠，並提取脾。

抗原特異性B細胞分選

【0284】將收獲並處理好的脾組織再次懸浮於20 mL 3% FBS/PBS。使細胞在40°C、300 g沉澱10秒，並再次懸浮於300 µl 3% FBS/PBS緩衝液中。

【0285】加入20ul Fc阻斷劑，歷時10秒，使用前儲存於4°C。

【0286】將標記有Alexa-647的人類標靶Y庫存液(0.8 mg/mL)稀釋至20 µg/mL並以1:40稀釋(最終濃度0.5 µg/mL)用於染色。

【0287】將含有CD19-PB、IgM-APC-Cy7、IgD-APC-Cy7、CD38-FITC、CD95-PE、Hu-標靶Y-Alexa 647的100 µl染色混摻物混合並加至300 µl脾細胞懸浮液中。於4°C培育20分鐘後，將5 ml 3% FBS/PBS緩衝液加至該等樣本。使細胞在300 g沉澱10分鐘，並再次懸浮於400 µl 3% FBS/PBS緩衝液中並經由30 µm細胞過濾器過濾。分選前5分鐘，加入8 µl 7AAD (1:100稀釋)。

分選的閘控策略顯示於下。

B-細胞篩選(BCT)及回收耦合的抗體重與輕鏈以用於表現

【0288】BCT技術大致上描述於WO2015/040401，其以參照方式併入本案。

【0289】對於RT，將0.1 μ L IgG恒定區特異性引子(10 μ M)、0.1 μ L IgK恒定區特異性引子(10 μ M)、0.05 μ L IgL恒定區特異性引子(10 μ M)、1 μ L dNTP混合物(10 mM)、2 μ L 5X第一股緩衝液(First-Strand Buffer)、1 μ L 0.1 M DTT、0.4 μ L RNaseOUT™ RNase 抑制劑(Invitrogen)、0.25 μ L SuperScript™ III RT (200單位/ μ L，Invitrogen)、與1.1 μ L無RNase水的混合物加至各孔，使最終體積為10 μ L。進行RT反應，生成第1股cDNA。

【0290】對於第1輪PCR，將12.5 μ L 2X Q5主混物、0.15 μ L的VH特異性引子混合物(10 μ M)、0.1 μ M的VL特異性引子混合物(10 μ M)、0.15 μ L的VK特異性引子混合物(10 μ M)、0.1 μ L IgG恒定區特異性引子(10 μ M)、0.1 μ L IgK恒定區特異性引子(10 μ M)、0.1 μ L IgL恒定區特異性引子(10 μ M)、與1.8 μ L無RNase水的混合物和各孔中的10 μ L RT產物混合，使最終體積為25 μ L。進行RT反應，以擴增重鏈與輕鏈可變區。

【0291】對於第2輪PCR，將12.5 μ L of 2X Q5主混物、0.2 μ L VH巢式PCR引子(10 μ M)、0.2 μ L VK巢式PCR引子(10 μ M)、0.2 μ L VL巢式PCR引子(10 μ M)、0.2 μ L IgG恒定區巢式PCR引子(10 μ M)、0.2 μ L IgK恒定區

巢式PCR引子(10 μ M)、0.2 μ L IgL恒定區巢式PCR引子(10 μ M)、與10.3 μ L 無RNase水的混合物和各孔中的1 μ L第一輪PCR產物混合，使最終體積為25 μ L。進行RT反應，以擴增重鏈與輕鏈可變區。

【0292】對於橋式PCR，將15 μ L 2X Q5主混物、0.1 μ L 重載體(100 ng/ μ l)、0.05 μ L K載體(100ng/ μ l)、與1 μ L HLP479/480混合物(各10 μ M)、與12.85 μ L無RNase水的混合物和各孔中的1 μ L第二輪PCR產物混合，使最終體積為25 μ L。進行RT反應，以擴增重鏈與輕鏈可變區。

Expi293F細胞轉染

【0293】關於抗體表現與純化的更多細節，參見實施例6與7。

【0294】轉染前一天，將培養的Expi293F細胞(Invitrogen)計數以用於細胞接種計算。使Expi293F細胞於300 rpm沉澱10分鐘。將細胞再次懸浮於預熱的新鮮Expi293表現培養基中，以給予每毫升 2.5×10^6 個細胞的最終稀釋度。使200 ml細胞懸浮液在庫納氏振盪培育箱(37°C，140 rpm，8% CO₂)中培育，直到隔天早晨。

【0295】在轉染當天，將培養的Expi293F細胞計數並使用新鮮的Expi293表現培養基稀釋至每毫升 4×10^6 個細胞。使用Multidrop Combi將500 μ l細胞懸浮液等分到96孔深孔盤的各孔中。分配後，將該等盤用Duetz夾層蓋覆蓋，並於庫納氏振盪培育箱(37°C，300 rpm，50 mm軌道拋擲式，濕度80%)中培育2-2.5小時。

【0296】對於各個轉染，製備兩個混合物。

混合物1：每孔25 μ l B細胞橋產物 + 55 μ l RSM + 100ng PBase

混合物2：1 μ l ExpiFectamine™ 293 (Invitrogen) + 79 μ l RSM

【0297】將混合物2加至混合物1並於室溫中培育15分鐘。隨後將培育的混合物加至500 μ l細胞培養液中，並於庫納氏振盪培育箱(37°C，300 rpm，50mm軌道拋擲式)中培育一週。

實施例6：抗體的表現

【0298】哺乳動物瞬時表現系統可能夠靈活並快速地生產蛋白質。彼等是表現人或其他哺乳動物蛋白質的理想選擇，因為該等系統生成帶有更多天然折疊與轉譯後修飾的重組蛋白質。

1. 轉染前一天，藉由自動細胞計數器(Eve細胞計數器)將Expi293細胞計數，將該等細胞以每毫升 $\sim 1.7 \times 10^6$ 個細胞的密度接種在預熱的表現培養基中，並於軌道式振盪培育箱(37°C，8% CO₂，140 rpm)中培育過夜

2. 在轉染當天，將細胞計數並將該細胞數目調整至每毫升 2.5×10^6 個細胞。將2000 μ l細胞懸浮液分配到24孔深孔盤中並置於庫納氏振盪培育箱 (37°C，8% CO₂，225rpm)

製備DNA溶液

【0299】製備含有質體DNA的混合溶液用於轉染Expi293細胞。對於2 mL細胞培養物，使用各為1 μ g的重

鏈表現質體與輕鏈表現質體。各次轉染使用在超純水中稀釋的2 μ g DNA質體混合物。

轉染

製備兩個混合物：

【0300】 混合物1：2 μ g 質體DNA，稀釋於40 μ l Opti-MEM® I培養基。

【0301】 混合物2：80 μ l ExpiFectamine™ 293轉染試劑 + 40 μ l OptiMEM I培養基。

【0302】 將混合物2與混合物1合併，並於室溫培育20–30分鐘。培育完成後，將165 μ l DNA-ExpiFectamine™ 293試劑複合物分配到24孔深孔盤的各孔中。使細胞在庫納氏振盪培育箱(37°C，8% CO₂，225rpm)中培育6天。在轉染後6天，收獲細胞培養物上清液。

實施例7：從共同輕鏈小鼠純化抗體

【0303】 採用96孔盤純化從Expi293F細胞培養物上清液中純化抗體。此方法容許在抗體篩選實驗中進行多個樣本的快速小規模親和力抗體純化。為實現高回收率%，使用MabSelect Sure LX™，其為帶有非常動態的結合活性的蛋白質A親和力(每毫升培養基60 mg人IgG)、延長的停駐時間、耐鹼性與低配體滲漏。

流程

【0304】

1. 將MabSelect Sure LX樹脂(GE Healthcare)於1X PBS (Gibco)中平衡至10 %漿液的終濃度，以去除儲存緩衝液。

2. 將600 μ l 10 %漿液加至96孔盤AcroPrep™ Advance (Pall)的各孔
3. 使樹脂於4 C、70 x rcf離心1 min。
4. 用300 μ l 1X PBS洗滌樹脂，於70x rcf快轉1 min。此步驟重複兩次。
5. 將2 ml細胞培養物上清液(pH 7-8)加載到置於96孔純化盤裡的MabSelect Sure LX 樹脂上，並於70 – 100 x rcf離心1分鐘。
6. 使用600 μ l 1 x PBS洗滌盤並於70 – 100 x rcf離心1分鐘。此步驟總共執行四次。
7. 將70 μ l沖提緩衝液(IgG Elute Pierce)加至各孔並培育1 min。
8. 使該盤於70 – 100 x rcf離心1分鐘，收集沖提液。此步驟總共執行兩次。

實施例8：對於抗原Y的抗體的SPR分析

實驗目標

【0305】 進行SPR分析，以測定Hit 1 (即，來自吾人的共同輕鏈小鼠的 λ -型抗體)對標靶Y的結合親和力與交互作用的動力學。將純化抗體的親和力與動力學和基準與同型對照組(ISTC)比較。

方法

【0306】 使用表面電漿子共振(SPR)測定對抗原Y的結合親和力(KD)、動力學常數的導通速率(kon)與解離速率(koff)。該分析是使用Biacore 8K (GE Healthcare)系

統執行。

【0307】根據製造商的指示手冊將抗-人IgG Fc抗體固定在CM4晶片(GE Healthcare目錄號BR100534)。使用胺偶合套組(BioRad)來激活晶片的表面。然後用1M乙醇胺將表面阻斷。固定化運行是在25°C使用HBS-EP作為固定化運行緩衝液來執行。

【0308】來自實施例7的經純化單特異性抗體(稱為配體)以大約2ug/ml被捕獲到抗-人IgG Fc CM4表面上。在全部8個流動通道的全部活性通道中以10 ul/min注射配體60秒。該運行是在25°C使用中性 pH HBS-P 1X + CaCl₂ 2.5 mM作為運行緩衝液來執行。

【0309】人抗原Y在運行緩衝液中以1mg/ml重構並用作分析物。以3個濃度(1.5uM、500nM與166.7 nM)以120秒締合階段與200秒解離階段，在活性與參照通道兩者中，以30ul/sec的流速，以多重循環動力學(MCK)模式注射抗原Y。三次注射10 mM甘胺酸pH 1.5，以10 μl/min持續60 sec.係用於再生階段。

【0310】在參照通道中以10 μl/min、1ug/ml持續60 sec捕獲同型對照組抗體hIgG4PE KYAB2229 (ISTC；此不特異性地結合抗原Y)。亦在活性通道中捕獲同型對照組抗體hIgG4PE作為陰性對照組。將針對抗原Y的兩個抗體用作基準(基準1與基準2)。將數據參照減去緩衝液並擬合至Langmuir 1:1模型。在模型中評估解離的前30秒。

表2.抗-抗原Y抗體的結合親和力與動力學常數的導通速

率(kon)與解離速率(koff)

捕獲的抗體	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
基準1	2.94×10^4	4.27×10^{-2}	1.45×10^{-6}
基準2	4.13×10^4	2.72×10^{-2}	6.60×10^{-7}
抗體Hit 1	1.19×10^5	1.25×10^{-1}	1.05×10^{-6}
hIgG4PE ISTC			NB

【0311】使用生物分子反應模型(1：1 Langmuir模型)擬合該交互作用的締合與解離數據。藉由BIA評估軟體從結合數據計算締合速率常數(kon)、解離速率常數(koff)與解離常數(KD)。

基準1：抗體抗-抗原Y

基準2：抗體抗-抗原Y

NB：未觀察到任何結合

hIgG4PE ISTC：人同型對照組IgG4

【0312】Hit 1抗體為IgG4PE格式。

結論

【0313】Hit 1顯示以表2所提供的親和力範圍結合至抗原Y，以及對於抗原Y的快速締合(kon)與解離(koff)速率。用ISTC未觀察到與抗原Y的結合。

【0314】相較於基準抗體，Hit 1抗體顯示對於抗原Y的類似動力學速率與結合親和力。此顯示吾人的共同輕鏈小鼠可用生成帶有以所欲結合動力學特異性地結合至標靶抗原的人可變結構域的抗體。

實施例9：分析來自共同輕鏈小鼠的B-細胞群體

【0315】吾人分析了本發明小鼠的B-細胞隔室。結果如下圖5至9所示。「靶向Rag-/-」小鼠是如實施例4中所述製造的小鼠，其衍生自改造的ES細胞。於是，該小鼠的基因組包含經重排入 λ 輕鏈敲入與包含在IgH基因座內的未重排入重鏈可變區。

圖5

【0316】相較於野生型小鼠(野生型)，用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠具有類似的總活脾細胞數。用未揭示抗原(標靶Y)進行免疫(兩次抗原增強之後引發抗原)之後的總活脾細胞數。作為對照組，未免疫Rag-/-缺失小鼠展現低的總活脾細胞數。靶向Rag-/-，衍生自靶向ES-細胞及Rag-/- 缺失胚胎的嵌合體小鼠；野生型，野生型小鼠；Rag-/-初始，未免疫Rag-/- 缺失小鼠。

圖6

【0317】相較於野生型小鼠(野生型)，用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠具有類似的CD19-陽性、B220-陽性B-細胞數。用未揭示抗原(標靶Y)進行免疫(兩次抗原增強之後引發抗原)之後的總活脾細胞數。作為對照組，未免疫Rag-/- 缺失小鼠(Rag-/- 初始)展現最少的總B-細胞(CD19+ / B220+)數。靶向Rag-/-，衍生自靶向ES-細胞及Rag-/- 缺失胚胎的嵌合體小鼠；野生型，野生型小鼠；Rag-/- 初始，未免疫Rag-/- 缺失小鼠。

圖7

【0318】用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠中的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群體百分比係類似於野生型小鼠(野生型)。用未揭示抗原(標靶Y)進行免疫(兩次抗原增強之後引發抗原)之後的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群體百分比。作為對照組，未免疫Rag-/-缺失小鼠(Rag-/-初始)展現最少的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群體百分比。靶向Rag-/-，衍生自靶向ES-細胞及Rag-/- 缺失胚胎的嵌合體小鼠；野生型，野生型小鼠；Rag-/-初始，未免疫Rag-/-缺失小鼠。

圖8

【0319】用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-胚胎所生成的嵌合體小鼠中的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群體百分比係類似於野生型小鼠(野生型)。用未揭示抗原(標靶Y)進行免疫(兩次抗原增強之後引發抗原)之後的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群體百分比。作為對照組，未免疫Rag-/-缺失小鼠(Rag-/-初始)展現最少的CD19-陽性、B220-陽性脾B-細胞群體百分比。靶向Rag-/-，衍生自靶向工程化ES-細胞及Rag-/- 缺失胚胎的嵌合體小鼠；野生型，野生型小鼠；Rag-/-初始，未免疫Rag-/-缺失小鼠。

圖9

【0320】用靶向ES細胞(靶向Rag-/-)微注射的Rag-/-

胚胎所生成的嵌合體小鼠中的抗原陽性B-細胞群體百分比係類似於野生型小鼠(野生型)。用未揭示抗原(標靶Y)進行免疫(一或兩次抗原增強之後引發抗原)之後的CD19-陽性或B220-陽性、IgM-陰性與IgD-陰性的脾B-細胞群體百分比。靶向Rag-/-，衍生自靶向工程化ES-細胞的嵌合體小鼠及Rag-/- 缺失小鼠；野生型，野生型小鼠。

結論

【0321】將工程化ES細胞微注射進入Rag-/- 缺失胚胎所衍生的「靶向Rag-/-」嵌合體小鼠在以類似於野生型小鼠的方式引發抗原與一或兩次抗原增強之後製造了IgM-陰性、IgD-陰性、抗原-陽性脾B-細胞。相比之下，非嵌合Rag-/-缺失小鼠不製造脾B-細胞。該等觀察支持吾人的觀察，將工程化ES細胞微注射進入Rag-/-胚胎所生成的小鼠具有功能性免疫回應，其回應免疫方案生成抗原陽性IgG B-細胞。

【0322】有益地，該共同輕鏈的分別複本可和來自結合至標靶Y的抗體(單離自本發明的經免疫共同輕鏈小鼠)的重鏈複本配對以及和來自結合標靶Z的抗體的重鏈複本配對，以製造特異性地結合Y與Z的雙特異性4-鏈抗體。此可從包含(i)可表現的核苷酸序列，其編碼該輕鏈；(ii)可表現的核苷酸序列，其編碼特異性地結合標靶Y的重鏈；以及(iii)可表現的核苷酸序列，其編碼特異性地結合標靶Z的重鏈的細胞(譬如真核、哺乳動物、人、CHO、Cos或HEK293細胞)表現。或者，該細胞包含(i)與(ii)且第二細

胞包含(iii)，其中可混合該等細胞之重與輕鏈表現產物，以製造該雙特異性抗體。或者，該細胞包含(i)與(iii)且第二細胞包含(ii)，其中可混合該等細胞之重與輕鏈表現產物，以製造該雙特異性抗體。或者，該細胞包含(ii)與(iii)且第二細胞包含(i)，其中可混合該等細胞之重與輕鏈表現產物，以製造該雙特異性抗體。或者，(i)、(ii)與(iii)包含在單獨、分別的細胞中，並可混合該等細胞之抗體鏈表現產物，以製造該雙特異性抗體。在一例中，該重鏈恒定區包含促進抗-標靶Y重鏈和抗-標靶Z重鏈配對的模體(motifs)或突變(譬如，電荷對或杵-臼模體，見上文參考文獻)。

方法

介紹：

【0323】在用抗原Y免疫後，處理並以單細胞分選表現對於該抗原具特異性、已類別轉換的抗體的脾B-細胞。分析了靶向Rag-/-嵌合體小鼠的功能性免疫系統的證據，並與野生型對照組小鼠比較。對於非嵌合Rag-/-小鼠進行了另外的比較，其驗證最小的基線免疫回應。

材料：

表3：試劑表：

試劑	供應商	Cat #	Lot #
RPMI	Gibco	11835-063	1881906
熱失活的胎牛血清	Gibco	10270-106	08G2073K
RNA 裂解緩衝液	Epicentre	QER090150	20151690

TruStain fcX/Fc 阻斷劑	Biolegend	101320	B221805
7-AAD	eBioscience	00-6993-50	4298663
CD19-BUV395	BD Horizon	563557	7125716
CD45R/B220-BUV395	BD Horizon	563793	7177756
IgM-BV786	BD Horizon	564028	7048650
IgD-BV605	BD Horizon	563003	7226860
Ly-6G-APCCy7	BD Pharmingen	557661	7040615
CD8a-APC-H7	BD Pharmingen	560182	7110593
F4/80-APCCy7	Biolegend	123118	B217243
CD4-APC-H7	BD Pharmingen	560181	7012678
CD11c-APC-Cy7	BD Pharmingen	561241	7096608
ACK 裂解緩衝液	Life Technologies	A10492-01	N/A
未揭示的抗原 Y-647 (1 µg/ml)	內部		

方法：

樣本的處理：

【0324】從免疫小鼠取出脾，並使用40 µm細胞過濾器使用無菌流程均化。離心沉澱細胞(於4 °C，350 rcf，10分鐘)，小心吸出上清液。使用1 ml ACK裂解緩衝液藉由裂解去除紅血球並於室溫培育2分鐘。添加過量的3 % FBS / RPMI緩衝液來終止裂解反應。然後使用40 µm細胞

過濾器過濾細胞，如先前般沉澱並再次懸浮於340 μ l緩衝液。使用Fc阻斷劑阻斷經處理細胞上表現的任何Fc受體，去除B-細胞的非特異性染色，同時維持抗體-介導的特異性染色。在此階段，採用總細胞計數。

染色：

【0325】由脾製備的單細胞懸浮液以下列方式染色。使用BUV395-共軛抗-CD45R (選擇)、BUV395-共軛抗-CD19 (選擇)、BV786-共軛抗-IgM (無)與BV605-共軛抗-IgD (無)來定義成熟的、已類別轉換B-細胞脾群體。排除B-細胞以外的細胞，例如嗜中性粒與單核球、CD8-陽性T-細胞、巨噬細胞、CD4陽性T-細胞與樹突細胞。分別使用APCCy7-共軛抗-Ly-6G/C、APC-H7-共軛抗-CD8a、APCCy7-共軛抗-F4/80、APC-H7-共軛抗-CD4與APC-Cy7-共軛抗-CD11c。使用用於免疫的標記有Alexa-647的相同抗原辨識抗原陽性群體。使用7-AAD排除非活細胞。創建未標記的抗原對照組細胞庫，以衍生FMO (螢光扣除)。亦採取了額外的陽性染色對照組與7AAD (活/死)對照組。使用 1×10^6 個細胞在帶有3% FBS的100 μ l PBS中，使全部染色反應在4 $^{\circ}$ C培育20 min。用帶有3% FBS的400 μ l PBS洗滌樣本兩次並在BD FACSAria融合式流式細胞儀(BD Biosciences)上分析。使用Flow-Jo™軟體分析所有獲取的數據。將感興趣的細胞直接以單細胞分選到的96孔盤。隨後使用B-細胞技術(BCT)處理樣本。

【符號說明】

(無)



201907010

【發明摘要】

【中文發明名稱】

細胞、脊椎動物、群體及方法

【英文發明名稱】

CELLS, VERTEBRATES, POPULATIONS & METHODS

【中文】

本發明關於用於製造抗體鏈(譬如，真實的共同L或H鏈)的細胞與非人脊椎動物，尤其是用於製造可用來治療或診斷的多特異性抗體。

【英文】

The invention relates to cells and non-human vertebrates for producing antibody chains (eg, truly common L or H chains), in particular for use in producing multi-specific antibodies useful for therapy or diagnosis.

【指定代表圖】 圖4

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種細胞，其包含一抗體輕鏈基因座(第一基因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)

(a) 一輕鏈內含子增強子(intronic enhancer)；

(b) 一經重排的抗體可變區，其編碼一經重排的抗體V結構域；以及

(c) 一抗體輕鏈恒定區，其編碼一輕鏈C結構域；

其中該基因座是可操作地表現一包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈。

【第2項】 如請求項1的細胞，其中該基因座是一 κ 輕鏈基因座且該增強子是Ei κ 。

【第3項】 如請求項1的細胞，其中該細胞是一小鼠細胞，該基因座是一 λ 輕鏈基因座且該增強子是一小鼠 λ 2-4或4-10增強子。

【第4項】 如任何前述請求項的細胞，其中

(a) 該經重排的V結構域是一V κ 且該C結構域是一C κ ；

(b) 該經重排的V結構域是一V κ 且該C結構域是一C λ ；

(c) 該經重排的V結構域是一V λ 且該C結構域是一C λ ；或

(d) 該經重排的V結構域是一V λ 且該C結構域是一C κ 。

【第5項】 一種細胞，其包含抗體重鏈基因座(第一基

因座)，其中該基因座包含(5'至3'方向)

(a) 一重鏈內含子增強子(E μ)；

(b)一經重排的抗體可變區，其編碼一經重排的抗體V結構域；

(c) 一任擇的轉換序列(switch sequence)；以及

(d) 一抗體重鏈恒定區，其編碼一重鏈CH1結構域；

其中該基因座是可操作地表現包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該CH1結構域的抗體鏈。

【第6項】 如任何前述請求項的細胞，其中該基因座包含(5'至3'方向)

(a) 一可操作地促進可變區轉錄的啟動子；

(b) 一核苷酸序列，其編碼一可變結構域信號肽；

(c) 該內含子增強子；

(d) 該經重排的抗體可變區；以及

(e) 該抗體輕鏈恒定區，

其中該基因座是可操作地表現編碼(N-至C-端方向)融合至該可變結構域之胺基酸序列之信號肽序列的RNA轉錄本。

【第7項】 如任何前述請求項的細胞，其中該細胞是一ES、iPS、融合瘤或B-細胞。

【第8項】 如任何前述請求項的細胞，其中該經重排的V結構域是一 κ 或 λ V結構域。

【第9項】 如任何前述請求項的細胞，其中該可變區編碼對一第一預定抗原或一第一表位具有結合特異性的一

V結構域，其中該基因座是可操作地表現包含保留該特異性之V結構域的一抗體鏈。

【第10項】如任何前述請求項的細胞，其中該細胞包含可操作地表現一第二抗體鏈的一第二抗體基因座，其中該第二抗體鏈包含和該第一經重排的V結構域形成一結合位點的一第二經重排的V結構域，其中該結合位點能夠特異性地結合至一預定抗原或表位。

【第11項】如請求項10的細胞，當其依附於請求項9時，其中該預定抗原是不同的，且該其他及第二V結構域是不同的；或是其中該表位是不同的，且該其他及第二V結構域是不同的。

【第12項】如請求項11的細胞，其中

(a) 該第一結構域是一VL結構域，且該第二及該其他V結構域是VH結構域；或

(b) 其中該第一結構域是一VH結構域，且該第二及該其他V結構域是VL結構域。

【第13項】如任何前述請求項的細胞，其中該可變區是在該增強子3'的0.5 kb以內。

【第14項】如任何前述請求項的細胞，其中該基因座包含在該恒定區3'的一第二增強子。

【第15項】如任何前述請求項的細胞，其中該細胞是一非人哺乳動物、小鼠、大鼠或嚙齒類細胞。

【第16項】如任何前述請求項的細胞，其中該恒定區是位於該細胞的一內源性抗體基因座。

【第17項】如請求項16的細胞，當其依附於請求項1時，其中該內源性基因座是一內源性κ鏈基因座。

【第18項】如請求項16的細胞，當其依附於請求項5時，其中該內源性基因座是一內源性重鏈基因座。

【第19項】如請求項1至15中任一請求項的細胞，其中該基因座是由一轉基因組成，該轉基因是在一內源性抗體基因座之外的一位置由該細胞之基因組組成。

【第20項】如任何前述請求項的細胞，其中該細胞就該基因座而言是純合的。

【第21項】如任何前述請求項的細胞，當其依附於請求項1時，其中該細胞基因組包含一第二抗體基因座，其中該第二基因座是一未經重排的抗體重鏈基因座，包含(5'至3'方向)

(a) 一或多個VH基因區段；

(b) 一或多個DH基因區段；

(c) 一或多個JH基因區段；以及

(d) 一重鏈恒定區，其編碼一或多個CH結構域；

其中該重鏈基因座是可操作地表現複數個重鏈，任擇地包含複數個抗原特異性或親和力，各個該重鏈能與該第一基因座所編碼之抗體鏈配對，以製造包含一抗原結合位點的成對鏈。

【第22項】如請求項1至20中任一請求項的細胞，當其依附於請求項5時，其中該細胞包含一或多個另外的抗體基因座，各個另外的基因座能夠表現一輕鏈，各個該輕

鏈能夠和由該第一基因座所編碼的一抗體鏈配對，以製造包含一抗原結合位點的成對鏈。

【第23項】如任何前述請求項的細胞，其中各個可變區或基因區段是人的。

【第24項】如任何前述請求項的細胞，其中該細胞是一小鼠細胞，且各個恒定區是一小鼠、大鼠或人恒定區。

【第25項】如任何前述請求項的細胞，其中各個該增強子是該細胞的一內源性增強子。

【第26項】如任何前述請求項的細胞，其中該細胞是一小鼠細胞，且各個該增強子是一小鼠增強子。

【第27項】如任何前述請求項的細胞，其中

(a) 該細胞是一小鼠細胞，該可變區是一人可變區，該內含子增強子是位在該細胞的一內源性抗體基因座的一小鼠內含子增強子，且該恒定區是一小鼠、大鼠或人恒定區；或

(b) 該細胞是一大鼠細胞，該可變區是一人可變區，該內含子增強子是位在該細胞的一內源性抗體基因座的一大鼠內含子增強子，且該恒定區是一小鼠、大鼠或人恒定區。

【第28項】如任何前述請求項的細胞，其中該經重排的可變區是下列的重排：

(a) 人IGLV3-21與IGLJ3，且任擇地可操作地連接至人種系IGLV3-21啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列；

(b) 人IGK1-39與IGKJ1或5，且任擇地可操作地連接

至人種系IGKV1-39啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列；

(c) 人IGK3-20與IGKJ1或5，且任擇地可操作地連接至人種系IGKV3-20啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列；

(d) 人VpreB與Jλ5，且任擇地可操作地連接至人種系VpreB啟動子及/或信號肽-編碼核苷酸序列。

【第29項】一種轉基因非人脊椎動物，其包含如任何前述請求項的複數個細胞。

【第30項】如請求項29的脊椎動物，其中該脊椎動物之種系包含如請求項1至28中任一項所定義的第一基因座(以及任擇地該第二基因座)。

【第31項】如請求項29的脊椎動物，其中該脊椎動物是該細胞與不包含該第一基因座的複數個其他細胞的嵌合體，其中該脊椎動物之種系不包含該第一基因座。

【第32項】如請求項29至31中任一項的脊椎動物，其包含第一複數個細胞與第二複數個細胞，其中該第一複數個之細胞包含相同的第一個一致抗體基因座，該第二複數個之細胞包含相同的額外一致抗體基因座，其中各個該抗體基因座是如請求項1至28中任一項之第一基因座，其中該脊椎動物能夠表現來自該第一個一致基因座的第一複數個抗體鏈及來自該額外基因座的第二複數個抗體鏈，其中該第一細胞之抗體基因座係異於該第二細胞之抗體基因座。

【第33項】如請求項32的脊椎動物，其中該脊椎動物包含第三複數個細胞，其中該第三複數個之細胞包含相同

的另外抗體基因座，其中該另外基因座是如請求項1至28中任一項並異於該第一與第二細胞之抗體基因座，其中該脊椎動物能夠表現來自該另外基因座的第三複數個抗體鏈。

【第34項】如請求項32或33的脊椎動物，其中該脊椎動物是該細胞與不包含如請求項1至28中任一項的第一基因座或該額外或另外的基因座的複數個其他細胞的嵌合體。

【第35項】一種轉基因非人脊椎動物，其抗體輕鏈庫就單一經重排VL結構域種類而言為至少95%純。

【第36項】如請求項35的脊椎動物，其中該庫就單一經重排VL結構域種類而言為至少99%純。

【第37項】如請求項35或36的脊椎動物，其中該輕鏈庫之其餘輕鏈包含該VL結構域種類的突變體。

【第38項】一種轉基因非人脊椎動物，其中該脊椎動物之抗體輕鏈庫的全部VL結構域中至少95%是由該脊椎動物基因組包含的相同輕鏈可變區序列所編碼。

【第39項】如請求項38的脊椎動物，其中由該重組所衍生的全部VL結構域中至少99%包含相同的VL胺基酸序列。

【第40項】一種如請求項29至39中任一項的脊椎動物的複數個脾、骨髓、B-細胞或血球，其包含如請求項1至28中任一項的複數個第一基因座。

【第41項】一種脾、骨髓、B-細胞、融合瘤、CHO細

胞、HEK細胞、MEF細胞、COS細胞、HeLa細胞或血球(blood cell)之群體(population)，其中各個細胞是如請求項1，或是當依附於請求項1時如請求項2至28中任一項；以及任擇地，其中該細胞表現至少10個不同的抗體種類，其中

(a) 該抗體中至少95%共享相同的輕鏈VL結構域且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類；或

(b) 該抗體包含由第一VL基因區段與第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域，其中由該重組所衍生的全部該VL結構域的至少95%包含相同的VL胺基酸序列且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

【第42項】一種多株抗體群體，其中該群體所包含之抗體的至少95%共享相同的輕鏈VL結構域，且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

【第43項】一種多株抗體群體，其包含由一第一VL基因區段與一第一JL基因區段之重組所衍生的VL結構域，其中由該重組所衍生的全部該VL結構域的至少95%包含相同的VL胺基酸序列且該群體包含至少10個不同的VH結構域種類。

【第44項】一種用於辨識或獲得一抗體、一抗體可變結構域、一編碼抗體或抗體可變結構域的核苷酸序列、或一能夠表現該抗體或結構域的載體或宿主細胞，其中該抗體或結構域能夠特異性地結合至一標靶抗原，該方法包含

(a) 使如請求項41之細胞群體或如請求項42或43之抗

體群體，與該抗原接觸；

(b) 使該群體所表現或包含的抗體結合至該抗原；以及

(c) 單離或辨識結合至該抗原的一或多個抗體，或是單離或辨識該一或多個抗體的一VH及/或一VL結構域；或是辨識編碼該VH或VL的一核苷酸序列；以及

(d) 任擇地

(i) 使之所辨識之抗體或結構域和一編碼該等的核苷酸序列相關聯，藉此辨識該序列；

(ii) 擴增該序列並將該序列插入一表現載體或一宿主細胞基因組中，以表現該經編碼的抗體或結構域；以及

(iii) 任擇地表現並單離該抗體或結構域，

其中步驟(i)與(ii)可以任何順序執行。

【第45項】 如請求項44的方法，其包含使用該方法擴增編碼該經辨識的抗體之該VH與VL結構域之VH與VL核苷酸序列；且進一步包含將該VH與VL核苷酸序列插入該載體或細胞，以共同表現該VH與VL來製造能夠結合至該抗原的成對VH/VL結合位點，並表現(以及任擇地單離)該結合位點。

【第46項】 如請求項45的方法，其中該方法包含在另外的VH結構域種類的存在下表現該VH與VL，其中該VL與該另外的VH形成另外的成對VH/VL位點，其能夠結合至一另外的抗原，其中該另外的抗原與如請求項45之抗原是不同的，該方法包含共同表現(以及任擇地單離)該等結

合位點，其中該結合位點被包含在該載體或細胞所編碼的雙特異性抗體內，其中該雙特異性抗體包含一對各個該抗原的分別結合位點。

【第47項】如請求項46的方法，其中該雙特異性抗體是包含一第一重鏈-輕鏈對與一第二重鏈-輕鏈對的4-鏈抗體，其中

(a) 在該第一與第二對中之輕鏈包含該VL結構域，

(b) 該第一對之重鏈包含如請求項45之VH結構域，其中該VH結構域和該VL結構域形成一VH/VL結合位點，且其中該結合位點能夠特異性地結合至如請求項45之抗原；

(c) 該第二對之重鏈包含和該VL結構域形成一VH/VL結合位點之另外的VH結構域，且其中該結合位點能夠特異性地結合至如請求項46之之另外的抗原。

【第48項】如請求項47的方法，其中各個4-鏈抗體包含突變的重鏈恒定區，以促進該第一與第二重-輕對之重鏈的配對；任擇地其中該突變是杵-臼突變(knob-in-hole mutations)或電荷配對突變。

【第49項】一種B-細胞、融合瘤、CHO細胞、HEK細胞、MEF細胞、COS細胞、HeLa細胞之群體，其表現如請求項42或43之多株抗體群體。

【第50項】如請求項44至48中任一項的方法，其中該方法包含獲得來自如請求項41或47之細胞的VL及/或VH-編碼核苷酸序列，以及在步驟(d) (i)中，使用該核苷酸序列以使該等的一或多者和結合該抗原之該抗體的一或多個

VH及/或VL結構域相關聯。

【第51項】一種用於獲得編碼一抗體或一抗體可變結構域之一核苷酸序列的方法，其中該抗體或結構域能夠特異性地結合至一標靶抗原，該方法包含

(a) 獲得來自如請求項41或47之細胞的VL及/或VH-編碼核苷酸序列；

(b) 擴增該序列；以及

(c) 任擇地將該序列插入一表現載體或一宿主細胞基因組中，以表現該經編碼的抗體或結構域。

【第52項】一種用來獲得一用於製造特異地結合至一抗原之抗體的抗體-製造細胞系的方法，該方法包含將VH與VL-編碼核苷酸序列插入一宿主細胞之基因組中，其中

(a) 各個VH序列可操作地插入一抗體重鏈恒定區的5'，以使包含VH與C結構域之細胞表現重鏈；

(b) 各個VL序列可操作地插入一抗體輕鏈恒定區的5'，以使包含VL與C結構域之細胞表現輕鏈；

(c) 其中該表現的重鏈能夠與該輕鏈配對，以製造重-輕鏈對，各對包含能夠結合至一抗原的VH/VL結合位點；以及

(d) 其中VH與VL-編碼核苷酸序列是如請求項41或47的一或多個細胞的VH與VL-編碼核苷酸序列的序列。

【第53項】如請求項52的方法，其包含將第一與第二VH-編碼核苷酸序列插入該細胞基因組中，其中

(a) 該第一VH（當表現為第一重鏈的一部分）能夠和

該VL (當表現為輕鏈的一部分)配對，以形成一能夠特異性地結合至一第一抗原的第一VH/VL結合位點；

(b) 該第二VH (當表現為第二重鏈的一部分)能夠和該VL (當表現為輕鏈的一部分)配對，以形成一能夠特異性地結合至一第二抗原的第二VH/VL結合位點；以及

(c) 該第一與第二抗原是不同的；

其中該第一與第二重鏈和該輕鏈能夠配對，以製造包含一第一重鏈-輕鏈對與一第二重鏈-輕鏈對的雙特異性4-鏈抗體，其中

(d) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含該第一VH；以及

(e) 該第二重鏈-輕鏈對之重鏈包含該第二VH結構域。

【第54項】一種用於製造雙特異性4-鏈抗體的方法，其中該雙特異性抗體包含第一與第二抗原的相應結合位點，其中該等抗原是不同的，各個抗體包含一第一重鏈-輕鏈對與一第二重鏈-輕鏈對，其中

(a) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含一第一VH，其中該第一VH (當表現為第一重鏈的一部分)能夠和一VL (當表現為輕鏈的一部分)配對，以形成一能夠特異性地結合至該第一抗原的第一VH/VL結合位點；以及

(b) 該第二重鏈-輕鏈對該重鏈包含一第二VH，其中該第二VH (當表現為第二重鏈的一部分)能夠和該VL (當表現為輕鏈的一部分)配對，以形成一能夠特異性地結合至該第二抗原的第二VH/VL結合位點；

該方法包含

(c) 藉由下列製造一能夠表現該第一重鏈的第一細胞系：(i)將編碼該第一VH的一核苷酸序列插入一第一細胞基因組，其中該VH序列可操作地插至一抗體重鏈恒定區的5'，以表現包含第一VH與C結構域的第一重鏈；以及(ii)培養該細胞，以製造表現第一重鏈的第一細胞系；

(d) 藉由下列製造一能夠表現該第二重鏈的第二細胞系：(i)將編碼該第二VH的一核苷酸序列插入一第二細胞基因組，其中該VH序列可操作地插至一抗體重鏈恒定區的5'，以表現包含第二VH與C結構域的第二重鏈；以及(ii)培養該細胞，以製造表現第二重鏈的第二細胞系；

(e) 表現來自該第一細胞系的第一重鏈與來自該第二細胞系的第二重鏈，並將包含該第一VH的第一重鏈、包含該第二VH的第二重鏈以及包含該VL的輕鏈混合在一起，藉其(iii)第一重鏈和輕鏈配對，以製造該第一重鏈-輕鏈對，(iv)第二重鏈和輕鏈配對，以製造該第二重鏈-輕鏈對；以及(v)該第一重鏈-輕鏈對和該第二重鏈-輕鏈對配對，藉此製造該雙特異性抗體

其中VH及/或VL-編碼核苷酸序列是如請求項41或47的一或多個細胞的VH及/或VL-編碼核苷酸序列的序列。

【第55項】如請求項54的方法，其包含

(a) 藉由下列製造一能夠表現該輕鏈的第三細胞系：
(i)將編碼該VL的一核苷酸序列插入一第三細胞基因組，其中該VL序列可操作地插至一抗體輕鏈恒定區的5'，以表現包含VL與C結構域的輕鏈；以及(ii)培養該細胞，以製

造表現該輕鏈的第三細胞系；

(b) 表現來自該第三細胞系之輕鏈，其中該輕鏈是如請求項54的步驟(e)的輕鏈。

【第56項】如請求項54的方法，其包含

(a) 將編碼該VL的核苷酸序列插入該第一及/或第二細胞或細胞系之基因組中，其中該VL序列可操作地插至一抗體輕鏈恒定區的5'，以表現包含該VL與C結構域的輕鏈；以及

(b) 表現來自包含該VH序列之細胞系之輕鏈，其中該輕鏈是如請求項54的步驟(e)之輕鏈。

【第57項】如請求項54、55或56的方法，其中該鏈之混合是藉由共同培養該等細胞系來執行。

【第58項】如請求項54、55或56的方法，其中該鏈之混合是藉由單離該等細胞系所表現的鏈並將所單離的鏈混合在一起來執行。

【第59項】一種用於製造雙特異性4-鏈抗體的方法，其中該雙特異性抗體包含第一與第二抗原的相應結合位點，其中該等抗原是不同的，各個抗體包含一第一重鏈-輕鏈對與一第二重鏈-輕鏈對，其中

(a) 該第一重鏈-輕鏈對之重鏈包含一第一VH，其中該第一VH (當表現為第一重鏈的一部分)能夠和一VL (當表現為輕鏈的一部分)配對，以形成一能夠特異性地結合至該第一抗原的第一VH/VL結合位點；以及

(b) 該第二重鏈-輕鏈對之重鏈包含一第二VH，其中

該第二VH (當表現為第二重鏈的一部分)能夠和該VL (當表現為輕鏈的一部分)配對,以形成一能夠特異性地結合至該第二抗原的第二VH/VL結合位點;

該方法包含

(c) 將包含該第一VH的第一重鏈、包含該第二VH的第二重鏈以及包含該VL的輕鏈混合在一起,藉其(i)第一重鏈和輕鏈配對,以製造該第一重鏈-輕鏈對,(ii)第二重鏈和輕鏈配對,以製造該第二重鏈-輕鏈對;以及(iii)該第一重鏈-輕鏈對和該第二重鏈-輕鏈對配對,藉此製造該雙特異性抗體

其中VH及/或VL是由VH及/或VL-編碼核苷酸序列所編碼,其中該核苷酸序列是如請求項41或47的一或多個細胞的VH及/或VL-編碼核苷酸序列的序列。

【第60項】 如請求項54至59中任一項的方法,其中各個4-鏈抗體包含經突變的重鏈恒定區,以促進該第一與第二重-輕對之重鏈的配對;任擇地其中該突變是杵-臼突變或電荷配對突變。

【第61項】 一種用來製造用於治療或預防人或非人動物個體之疾病或病況的藥學組成物之方法,該方法包含

(a) 從藉由如請求項52或53的方法所製造之細胞系表現一抗體;以及

(b) 將該抗體和稀釋劑或賦形劑混合;

(c) 任擇地,其中該抗體係和如請求項54至60中任一項的方法所獲得的抗體一致。

【第62項】一種用來製造用於治療或預防人或非人動物個體的疾病或病況的方法，該方法包含將一雙特異性抗體和稀釋劑或賦形劑混合，其中該抗體是和如請求項54至60中任一項的方法所獲得的抗體一致。

【第63項】一種用於製造如請求項1至28中任一項的細胞或如請求項29至39中任一項的脊椎動物之方法，該方法包含

(a) 獲得包含一經重排的抗體可變區的一核酸，其編碼一經重排的抗體V結構域；以及

(b) 將該可變區或其複本插入一細胞之基因組中，藉其該可變區被包含在該基因組的一抗體基因座內，

其中該基因座包含(5'至3'方向)

(c) 一抗體基因座內含子增強子；

(d) 該經重排的抗體可變區；以及

(e) 一抗體恒定區，其編碼一抗體C結構域；

其中該基因座是可操作地表現一包含(N-至C-端方向)該經重排的V結構域與該C結構域的抗體鏈；以及

(f) 任擇地，其中該細胞是一非人脊椎動物ES細胞或一iPS 細胞，該方法進一步包含從該細胞生成如請求項29至39中任一項之非人脊椎動物。

【第64項】如請求項63的方法，其中該可變結構域是一VL且該C結構域是CL。

【第65項】如請求項63或64的方法，其中該插入是以該細胞的染色體DNA使用同源重組或位點特異性重組來

執行。

【第66項】如請求項63至65中任一項的方法，其包含獲得包含下列的轉基因(5'至3'方向)

- (a) 該內含子增強子；
- (b) 該經重排的抗體可變區；以及
- (c) 該抗體恒定區；以及

將該轉基因插入該細胞之基因組，藉其該抗體基因座被該細胞包含在內。

【第67項】如請求項63至65中任一項的方法，其包含將該可變區插入

- (a) 該細胞基因組的一輕鏈基因座之內含子增強子與該CL之間；或
- (b) 該細胞基因組的一重鏈基因座之內含子增強子(E μ)與該C μ 之間。

【第68項】如請求項63至67中任一項的方法，其中該可變區編碼特異性地結合至一預定抗原之一抗體的一V結構域。

【第69項】如請求項68的方法，其中如請求項63之獲得包含該經重排的抗體可變區之核酸的步驟包含：

- (a) 獲得一另外的細胞，其表現如請求項68之抗體；
- (b) 獲得或複製
 - i. 該另外的細胞之一DNA序列，其包含編碼該V結構域之一經重排可變區序列；或
 - ii. 該另外細胞的一RNA序列，其包含編碼該V結構

域之一經重排可變區序列，並創建該RNA序列的一DNA複本；

藉此獲得該核酸。

【第70項】如請求項63至69中任一項的方法，其包含培養該所得之細胞，以製造複數個細胞，其中各個細胞是如請求項1至28中任一請求項之細胞。

【第71項】一種非人脊椎動物胚胎或桑椹胚前胚胎，其被植入如請求項1至28中任一項的ES或iPS細胞或如請求項63至70中任一項的方法獲得的ES或iPS細胞。

【第72項】一種包含用於請求項66的方法的轉基因的核酸，該轉基因包含(5'至3'方向)

- (a) 該內含子增強子；
- (b) 該經重排的抗體可變區；以及
- (c) 該抗體恒定區。

【第73項】一種核酸，包含用於如請求項67之方法的編碼一經重排的V結構域之一經重排可變區序列，該核酸包含側接有下列之該經重排的可變區序列：

(a) 5'側接一同源臂，以和該細胞基因組的一第一核苷酸序列雜交，及/或

(b) 3'側接一同源臂，以和該細胞基因組的一第二核苷酸序列雜交；

其中

(c) 該5'同源臂是和該細胞的一抗體輕鏈基因座的一序列、其CL區的5'同源，且該3'同源臂是和該基因座的一

序列、該基因座之內含子增強子的3'同源，藉其該同源臂與該細胞之基因組之間的同源重組能夠插入該可變區序列，藉此製造包含(5至3'方向)內含子增強子、該可變區與CL區的基因座；或

(d) 該5'同源臂是和該細胞的一重鏈抗體基因座的一序列、其C μ 區的5'同源，且該3'同源臂是和該基因座的一序列、該基因座之內含子增強子(E μ)的3'同源，藉其該同源臂與該細胞之基因組之間的同源重組能夠插入該可變區序列，藉此製造一包含(5至3'方向)一內含子增強子、該可變區與一C μ 區的基因座。

【第74項】如請求項73的核酸，其中該核酸或5'同源臂包含(5'至3'方向)

(a) 一可操作以促進該可變區轉錄的啟動子；

(b) 一編碼可變結構域信號肽的核苷酸序列；以及

(c) 任擇地，該內含子增強子序列，

其中當該可變區序列插入該細胞基因組時，該可變區是以可操作連接方式插入該啟動子與信號肽-編碼序列的3'，以表現包含(N-至C-端方向)一信號序列-V結構域-C結構域的一抗體鏈。

