(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118791596 A
(43)申请公布日 2024.10.18

(21)申请号 202410984383.4
(22)申请日 2011.08.02
(30)优先权数据
61/369,909 2010.08.02 US
(62)分案原申请数据
201180045609.5 2011.08.02
(71)申请人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 L·麦克唐纳德 S·史蒂文斯
C·古尔 K·A·霍西阿瓦
A·J·莫菲
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 张怡 张璐
(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
A01K 67/0278(2024.01)

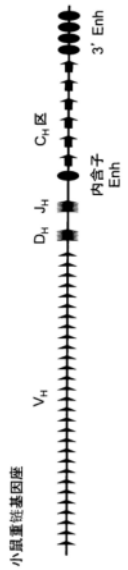
权利要求书3页 说明书37页
序列表（电子公布） 附图21页

(54)发明名称

制造包含VL结构域的结合蛋白的小鼠

(57)摘要

提供了经遗传修饰的小鼠和用于制造和使用它们的方法，其中所述小鼠包括用至少一个轻链V基因区段和至少一个轻链J基因区段替代全部或基本上全部免疫球蛋白重链V基因区段、D基因区段和J基因区段。提供了小鼠，其制造包含与重链恒定区可操作连接的轻链可变结构域的结合蛋白。提供了结合蛋白，其含有免疫球蛋白轻链可变结构域，其包括与重链恒定区相融合的、经体细胞超突变的轻链可变结构域。提供了经修饰的细胞，胚胎和小鼠，其编码用于制造所述结合蛋白的序列。



CN 118791596 A

1.靶向载体,其包含:

(a)第一靶向臂和第二靶向臂,其中所述第一靶向臂和所述第二靶向臂将靶向载体导向内源小鼠免疫球蛋白重链基因座;和

(b)连续序列,其包含:

(1)未重排的人V_L基因区段,或

(2)未重排的人V_L基因区段和未重排的人J_L基因区段,其中与所述靶向载体的同源重组产生杂交免疫球蛋白基因座,其包含:

(1)所述未重排的人V_L基因区段与内源小鼠免疫球蛋白重链基因座处的内源免疫球蛋白重链恒定区核酸序列可操作连接,或

(2)所述未重排的人V_L基因区段和所述未重排的人J_L基因区段与内源小鼠免疫球蛋白重链基因座处的内源免疫球蛋白重链恒定区核酸序列可操作连接,

可选地,其中:

所述未重排的人V_L基因区段包含人κ区段,人λ基因区段或它们的组合,

所述内源免疫球蛋白重链恒定区核酸序列选自由以下组成的组:C_H1序列,铰链序列,C_H2序列,C_H3序列以及它们的组合,同源重组后,所述未重排的人V_L基因区段和至少一个所述未重排的人J_L基因区段在内源小鼠免疫球蛋白重链基因座处分别替代内源啮齿类动物重链可变V_H基因区段和内源啮齿类动物重链J_H区段,进一步可选地,其中所述未重排的人V_L基因区段和所述至少一个未重排的人J_L基因区段替代所述内源啮齿类动物重链基因座的所有功能性啮齿类动物重链V_H,D_H和J_H基因区段,

所述未重排的人V_L基因区段仅包含人Vκ基因区段,且所述至少一个未重排的人J_L基因区段为人Jκ基因区段,

所述靶向载体包含至少六个或更多个未重排的人轻链V_L基因区段和至少一个未重排的人J_L基因区段,

所述连续序列选自由以下组成的组:(i)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1,(ii)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1至Jκ2,(iii)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1至Jκ3,(iv)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1至Jκ4,(v)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1至Jκ5,(vi)hVκ3-7至hVκ1-16,(vii)hVκ1-17至hVκ2-30,(viii)hVκ3-31至hVκ2-40,和(ix)它们的组合,

所述杂交免疫球蛋白基因座缺少所述未重排的人V_L基因区段和所述至少一个未重排的人J_L基因区段之间的任何功能性重链D_H区段,和/或

每个所述未重排的人V_L基因区段和所述至少一个未重排的人J_L基因区段包含重组信号序列,所述重组信号序列允许所述未重排的人V_L基因区段和所述至少一个未重排的人J_L基因区段重组以形成重排的人免疫球蛋白轻链可变区(V_L/J_L)核苷酸序列,所述重排的人免疫球蛋白轻链可变区(V_L/J_L)核苷酸序列与内源啮齿类动物免疫球蛋白重链基因座处的内源免疫球蛋白重链恒定区核酸序列连接。

2.小鼠细胞,其包含如权利要求1所述的靶向载体,可选地,其中所述小鼠细胞为小鼠ES细胞或小鼠B细胞。

3.制造经遗传修饰的小鼠的方法,所述经遗传修饰的小鼠在其种系中包含与重链恒定区核酸序列可操作连接的至少一个未重排的人免疫球蛋白轻链可变区(V_L)基因区段和至少一个未重排的人免疫球蛋白轻链连接(J_L)基因区段,所述方法包括:

(a)修饰全能小鼠细胞以通过同源重组包括如权利要求1所述的靶向载体,以使得所述全能小鼠细胞包含杂交免疫球蛋白基因座,所述杂交免疫球蛋白基因座包含与内源小鼠免疫球蛋白重链基因座处的内源免疫球蛋白重链恒定区核酸序列可操作连接的未重排的人V_L基因区段和至少一个未重排的人J_L基因区段;

(b)在合适的条件下维持所述全能小鼠细胞以发育成在其种系中包含所述杂交免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的小鼠。

4.小鼠基因组,其包含如权利要求1所述的靶向载体,可选地,其中所述小鼠基因组在内源免疫球蛋白重链基因座处包含如权利要求1所述的靶向载体,进一步可选地,其中内源免疫球蛋白重链调节元件与所述连续序列可操作地连接。

5.抗原结合蛋白,包括:

(1)第一多肽,其包含与第一免疫球蛋白重链恒定区(CH)相融合的第一轻链可变结构域(VL1);和

(2)第二多肽,其包含与轻链恒定区(CL)相融合的第二轻链可变结构域(VL2);和

其中VL1和VL2不是相同的。

6.获得编码轻链可变结构域的核苷酸序列的方法,所述方法包括从小鼠的淋巴细胞或从所述淋巴细胞产生的杂交瘤中获得编码杂交重链的核酸,所述杂交重链包含连接到重链恒定结构域的所述轻链可变结构域(VL),

其中所述小鼠在其种系中包含具有重链恒定区核酸序列的至少一个未重排的轻链可变(VL)基因区段和至少一个未重排的轻链连接(JL)基因区段,其中所述未重排的VL和JL基因区段各自包含重组信号序列,以使得所述至少一个未重排的VL基因区段和所述至少一个未重排的JL基因区段重组以形成与所述重链恒定区核酸序列可操作地连接的可变区序列,以形成重排的杂交重链基因,

其中所述重排的杂交重链基因编码能够与免疫球蛋白轻链缔合的所述杂交重链。

7.细胞,其包含如权利要求6所述的核酸。

8.免疫球蛋白,其由权利要求7所述的细胞产生。

9.由经遗传修饰的小鼠产生的杂交免疫球蛋白重链,其中所述小鼠在其种系中包含具有免疫球蛋白重链恒定区核酸序列的至少一个未重排的免疫球蛋白轻链可变(VL)基因区段和至少一个未重排的免疫球蛋白轻链连接(JL)基因区段,其中所述未重排的VL和JL基因区段各自包含重组信号序列,以使得所述至少一个未重排的VL基因区段和所述至少一个未重排的JL基因区段重组以形成与所述免疫球蛋白重链恒定区核酸序列可操作地连接的可变区序列,以形成重排的杂交重链基因,

其中所述重排的杂交重链基因编码所述杂交免疫球蛋白重链,所述杂交免疫球蛋白重链包含连接到免疫球蛋白重链恒定结构域的所述VL结构域,和

其中所述杂交免疫球蛋白重链能够与免疫球蛋白轻链缔合。

10.表达系统,其包含哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞包含编码杂交免疫球蛋白重链的表达DNA构建体,所述杂交免疫球蛋白重链包含与人CH结构域相融合的体细胞突变人VL结构域。

11.细胞,其包含编码人Vκ或Vλ结构域的核酸序列,所述编码人Vκ或Vλ结构域的核酸序列可操作地连接到包含小鼠重链恒定区核酸序列的核酸序列。

12.哺乳动物细胞,其包含编码杂交重链的DNA构建体,所述杂交重链包含与人CH结构域相融合的体细胞突变人VL结构域。

制造包含VL结构域的结合蛋白的小鼠

[0001] 本申请是申请号为202110412459.2、申请日2011年8月2日、发明名称为“制造包含VL结构域的结合蛋白的小鼠”的中国发明专利申请的分案申请。该中国发明专利申请是申请号为201180045609.5、申请日为2011年8月2日、发明名称为“制造包含VL结构域的结合蛋白的小鼠”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2011/046196的国家阶段申请,该国际申请要求申请日为2010年8月2日,申请号为61/369,909的美国申请的优先权。

发明领域

[0002] 提供了免疫球蛋白样结合蛋白,其包含与免疫球蛋白轻链可变结构域相融合的免疫球蛋白重链恒定区,还提供了结合蛋白,其具有与轻链恒定结构域相融合的免疫球蛋白轻链可变结构域,以及与重链恒定结构域相融合的免疫球蛋白轻链可变结构域。还提供了表达此类结合蛋白的细胞,制造它们的小鼠,以及相关的方法和组合物。

背景

[0004] 抗体通常包含四聚体结构,其具有两条相同的重链,每条重链包含与重链可变结构域(V_H)相融合的重链恒定区(C_H),所述重链与同轻链可变结构域(V_L)相融合的轻链恒定区(C_L)相缔合。对于典型的人IgG,抗体分子大小大致为约150kDa至约170kDa(例如,对于IgG3,其包含较长的铰链区),这取决于IgG的亚类(例如,IgG1,IgG3,IgG4)和可变区的(变化的)长度。

[0005] 在典型的抗体中,V_H与V_L结构域相缔合以形成结合靶抗原的结合位点。因此,关于亲和力和特异性的抗体的特点可大部分地取决于V_H和V_L结构域的特点。在人和小鼠中的典型抗体中,V_H结构域与λ或κV_L结构域相结合。然而,也已知的是可制造这样的V_L结构域:其在没有同源V_H结构域(例如,在抗体的情境中天然表达且与特定V_L结构域相缔合的V_H结构域)的情况下特异性结合靶抗原,而且可以分离这样的V_H结构域:其在没有同源V_L结构域的情况下特异性结合靶抗原。因此,基于免疫球蛋白的结合蛋白的有用的多样性通常是由产生特定V_H或V_L(以及体细胞超突变,在其发生的程度上)的重组以及同源V_H/V_L对的组合所赋予的。开发组合物和方法来开拓其它的多样性来源将是有用的。

[0006] 本领域中需要基于免疫球蛋白结构的结合蛋白,这包括免疫球蛋白可变区例如轻链可变区,且包括相对于传统抗体显示出提高的多样性的结合蛋白。也存在对于制造有用的结合蛋白的其它方法和动物的需求,所述结合蛋白包括:包含多种轻链免疫球蛋白可变区序列的结合蛋白。还需要用于基于免疫球蛋白的结合蛋白的有用形式,其提供用于从中选择的结合蛋白的增强的多样性,以及免疫球蛋白可变结构域的增强的多样性,这包括用于产生体细胞突变的和克隆选择的免疫球蛋白可变结构域的组合物和方法,所述免疫球蛋白可变结构域用于例如制造人治疗剂。

发明概要

[0007] 一方面,描述了结合蛋白,其包含免疫球蛋白可变结构域,所述可变结构域衍生自轻链(即kappa(κ)和/或lambda(λ))免疫球蛋白可变结构域,但不是来自全长重链免疫球蛋白可变结构域。还提供了用于制造结合蛋白的组合物和方法,包括经遗传修饰的小鼠。

[0008] 一方面,提供了核酸构建体,细胞,胚胎,小鼠和方法,用于制造包含一个或多个κ和/或λ轻链可变区免疫球蛋白序列及免疫球蛋白重链恒定区序列的蛋白,其中包括包含人λ或κ轻链可变结构域和人或小鼠重链恒定区序列的蛋白。

[0009] 一方面,提供了小鼠,其包含免疫球蛋白重链基因座,所述基因座包括用一个或多个轻链可变区(V_L)基因区段以及一个或多个轻链连接区(J_L)基因区段替代内源性小鼠免疫球蛋白重链基因座处的一个或多个免疫球蛋白重链可变区(V_H)基因区段,重链多样性(D_H)基因区段,和重链连接(J_H)基因区段。

[0010] 一方面,提供了小鼠,其包括免疫球蛋白重链基因座,所述基因座包含用一个或多个V_L基因区段以及一个或多个J_L基因区段替代全部或基本上全部V_H,D_H及J_H基因区段,以在内源重链基因座(VL_H基因座)处形成V_L基因区段序列,其中所述VL_H基因座能够与内源小鼠C_H基因重组以形成重排的基因,其衍生自V_L基因区段,J_L基因区段和内源小鼠C_H基因。

[0011] 在一个实施方案中,所述V_L区段是人V_L。在一个实施方案中,所述J_L区段为人J_L。在具体的实施方案中,所述V_L和J_L区段是人V_L和人J_L区段。

[0012] 在一个实施方案中,用至少六个人Vκ基因区段和至少一个Jκ基因区段替代全部或基本上全部V_H,D_H以及J_H基因区段。在一个实施方案中,用至少16个人Vκ基因区段(人Vκ)和至少一个Jκ基因区段替代全部或基本上全部V_H,D_H和J_H基因区段。在一个实施方案中,用至少30个人Vκ基因区段和至少一个Jκ基因区段替代全部或基本上全部V_H,D_H和J_H基因区段。在一个实施方案中,用至少40个人Vκ基因区段和至少一个Jκ基因区段替代全部或基本上全部V_H,D_H和J_H基因区段。在一个实施方案中,所述至少一个Jκ基因区段包含两个、三个、四个或五个人Jκ基因区段。

[0013] 在一个实施方案中,所述V_L区段为人Vκ区段。在一个实施方案中,所述人Vκ区段包含4-1,5-2,7-3,2-4,1-5和1-6。在一个实施方案中,所述κV_L包含3-7,1-8,1-9,2-10,3-11,1-12,1-13,2-14,3-15,1-16。在一个实施方案中,所述人Vκ区段包含1-17,2-18,2-19,3-20,6-21,1-22,1-23,2-24,3-25,2-26,1-27,2-28,2-29和2-30。在一个实施方案中,所述人Vκ区段包含3-31,1-32,1-33,3-34,1-35,2-36,1-37,2-38,1-39和2-40。

[0014] 在一个实施方案中,所述V_L区段为人Vκ区段且包含4-1,5-2,7-3,2-4,1-5,1-6,3-7,1-8,1-9,2-10,3-11,1-12,1-13,2-14,3-15和1-16。在一个实施方案中,所述Vκ区段还包含1-17,2-18,2-19,3-20,6-21,1-22,1-23,2-24,3-25,2-26,1-27,2-28,2-29和2-30。在一个实施方案中,所述Vκ区段还包含3-31,1-32,1-33,3-34,1-35,2-36,1-37,2-38,1-39和2-40。

[0015] 在一个实施方案中,所述V_L区段为人Vλ区段且包含人λ轻链基因座的簇(cluster)A的片段。在具体的实施方案中,所述人λ轻链基因座的簇A的片段从hVλ3-27延伸至hVλ3-1。

[0016] 在一个实施方案中,所述V_L区段包含人λ轻链基因座的簇B的片段。在具体的实施方案中,所述人λ轻链基因座的簇B的片段从hVλ5-52延伸至hVλ1-40。

[0017] 在一个实施方案中,所述V_L区段包含人λ轻链可变区序列,其包含簇A的基因组片

段和簇B的基因组片段。在一个实施方案中,所述人λ轻链可变区序列包含簇A的至少一个基因区段和簇B的至少一个基因区段。

[0018] 在一个实施方案中,所述V_L区段包含簇B的至少一个基因区段和簇C的至少一个基因区段。

[0019] 在一个实施方案中,所述V_L区段包含hVλ3-1,4-3,2-8,3-9,3-10,2-11和3-12。在具体的实施方案中,所述V_L区段包含从Vλ3-12跨至Vλ3-1的人λ轻链基因座的连续序列。在一个实施方案中,所述连续序列包含至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11或12个hVλ。在具体的实施方案中,所述hVλ包括3-1,4-3,2-8,3-9,3-10,2-11和3-12。在具体的实施方案中,所述hVλ包含从Vλ3-12跨至Vλ3-1的人λ基因座的连续序列。

[0020] 在一个实施方案中,所述hVλ包含13至28个或更多的hVλ。在具体的实施方案中,所述hVλ包括2-14,3-16,2-18,3-19,3-21,3-22,2-23,3-25和3-27。在具体的实施方案中,所述hVλ包含从Vλ3-27跨至Vλ3-1的人λ基因座的连续序列。

[0021] 在一个实施方案中,所述V_L区段包含29至40个hVλ。在具体的实施方案中,所述V_L区段包含从Vλ3-29跨至Vλ3-1的人λ基因座的连续序列,以及从Vλ5-52跨至Vλ1-40的人λ基因座的连续序列。在具体的实施方案中,经遗传修饰的小鼠中hVλ1-40和hVλ3-29之间的全部或基本上全部序列基本上由下列组成:在自然界中(例如在人类群体中)被发现在hVλ1-40基因区段下游(3'未翻译部分的下游)的约959bp的人λ序列,限制性酶切位点(例如PI-SceI),后跟在自然界中被发现在hVλ3-29基因区段上游的约3431bp的人λ序列。

[0022] 在一个实施方案中,所述Jκ是人的并且选自Jκ1,Jκ2,Jκ3,Jκ4,Jκ5及其组合。在具体的实施方案中,所述Jκ包含Jκ1至Jκ5。

[0023] 在一个实施方案中,所述V_L区段为人Vλ区段,且所述Jκ基因区段包含具有12-mer间隔子的RSS,其中所述RSS被并置于Jκ基因区段的上游末端。在一个实施方案中,所述V_L基因区段为人Vλ且所述VL_H基因座包含两个或更多个Jκ基因区段,其中每个都包含具有12-mer间隔子的RSS,其中所述RSS被并置于每个Jκ基因区段的上游末端。

[0024] 在具体的实施方案中,所述V_L区段包含从Vκ4-1至Vκ2-40跨越人κ基因座的连续人κ基因区段,且所述J_L区段包含从Jκ1至Jκ5跨越人κ基因座的连续基因区段。

[0025] 在一个实施方案中,其中所述V_L区段为Vλ区段且没有D_H区段存在于所述V_L区段和J区段之间,所述V_L区段的下游侧翼(即并置于下游一侧)是23-merRSS,且Jκ区段(如果存在的话)或Jλ区段(如果存在的话)的上游侧翼(即并置于上游一侧)是12-merRSS。

[0026] 在一个实施方案中,其中所述V基因区段为Vκ基因区段且没有D_H基因区段存在于所述V基因区段和J基因区段之间,其中每个所述Vκ基因区段的的下游一侧并置了12-merRSS,且每个Jκ区段(如果存在的话)或Jλ区段(如果存在的话)的上游一侧并置了23-merRSS。

[0027] 在一个实施方案中,小鼠包含重排的基因,其衍生自V_L基因区段,J_L基因区段和内源小鼠C_H基因。在一个实施方案中,所述重排的基因是经体细胞突变的。在一个实施方案中,所述重排的基因包含1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多个N添加。在一个实施方案中,在所述重排的基因中所观察到的衍生自V_L区段和J_L区段的N添加和/或体细胞突变是在内源轻链基因座处重排的重排轻链可变结构域(衍生自相同的V_L基因区段和相同的J_L基因区段)中所观察到的N添加和/或体细胞突变数目的1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍或至少5

倍。在一个实施方案中,所述重排的基因是特异性结合目的抗原的B细胞,其中所述B细胞以低纳摩尔范围内或更低的K_D(例如10纳摩尔或或更低的K_D)结合目的抗原。在具体的实施方案中,所述V_L区段、J_L区段或二者为人基因区段。在具体的实施方案中,所述V_L和J_L区段为人κ基因区段。在一个实施方案中,所述小鼠C_H基因选自IgM,IgD,IgG,IgA和IgE。在具体的实施方案中,所述小鼠IgG选自IgG1,IgG2A,IgG2B,IgG2C和IgG3。在另一个具体实施方案中,所述小鼠IgG为IgG1。

[0028] 在一个实施方案中,所述小鼠包含B细胞,其中所述B细胞从B细胞染色体上的基因座制造结合蛋白,其基本上由四条多肽链组成,其中所述四条多肽链基本上由下列组成:(a)两条相同的多肽,其包含与V_L相融合的内源小鼠C_H区;和(b)两条相同的多肽,其包含与V_L区相融合的内源小鼠C_L区,其中所述V_L区相关于与小鼠C_H区相融合的V_L区是同源的,并且在一个实施方案中为人(例如人κ)V_L区。在一个实施方案中,与内源小鼠C_H区相融合的V_L区为人V_L区。在具体的实施方案中,与小鼠C_H区相融合的人V_L区为Vκ区。在具体的实施方案中,与小鼠C_H区相融合的人V_L区与由经重排的人种系轻链核苷酸序列编码的V区相同。在具体的实施方案中,与小鼠C_H区相融合的人V_L区包含两个、三个、四个、五个、六个或更多个体细胞超突变。在一个实施方案中,与小鼠C_H区相融合的人V_L区是由包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加的重排的基因编码的。

[0029] 在一个实施方案中,小鼠制造的所有IgG分子中的至少50%包含这样的多肽:其包含IgG同种型C_H区和V_L区,其中所述多肽的长度不长于535,530,525,520或515氨基酸。在一个实施方案中,所有IgG分子中的至少75%包含本段落中所述的多肽。在一个实施方案中,所有IgG分子中的至少80%,85%,90%或95%包含本段落中所述的多肽。在具体的实施方案中,由小鼠制造的所有IgG分子都包含这样的多肽:其不长于本段落中所述的多肽的长度。

[0030] 在一个实施方案中,小鼠制造结合蛋白,其包含第一多肽和第二多肽,所述第一多肽包含与由重排的人V基因区段及J基因区段但不是D_H基因区段编码的可变结构域相融合的内源小鼠C_H区,所述第二多肽包含与由重排的人V基因区段及J基因区段但不是D_H基因区段编码的V结构域相融合的内源小鼠C_L区,并且所述结合蛋白以微摩尔、纳摩尔或皮摩尔范围内的亲和力特异性结合抗原。在一个实施方案中,所述J区段为人J区段(例如人κ基因区段)。在一个实施方案中,所述人V区段是人Vκ区段。在一个实施方案中,与内源小鼠C_H区相融合的可变结构域包含比与内源小鼠C_L区相融合的可变区数目更多的体细胞超突变;在具体的实施方案中,同与内源小鼠C_L区相融合的V区相比,与内源小鼠C_H区相融合的可变区包含约1.5,2-,3-,4-或5倍或更多的体细胞超突变;在具体的实施方案中,同与小鼠C_L区相融合的V区相比,与小鼠C_H区相融合的V区包含至少6,7,8,9,10,11,12,13,14或15或更多的体细胞超突变。在一个实施方案中,与小鼠C_H区相融合的V区是由包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加的经重排的基因编码的。

[0031] 在一个实施方案中,小鼠表达结合蛋白,其包含:与免疫球蛋白重链恒定区序列相融合的第一轻链可变结构域(V_L1),和与免疫球蛋白轻链恒定区相融合的第二轻链可变结构域(V_L2),其中V_L1包含的体细胞超突变数目是V_L2中存在的体细胞超突变数目的约1.5至约5倍或者更多。在一个实施方案中,V_L1中的体细胞超突变数目是V_L2中的约2至约4倍。在一个实施方案中,V_L1中的体细胞超突变数目是V_L2中的约2至约3倍。在一个实施方案中,V_L1是

由包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加的序列编码的。

[0032] 一方面,提供了经遗传修饰的小鼠,其表达基本上由下列多肽组成的免疫球蛋白:两个相同的第一多肽,其中每个都基本上由与可变结构域相融合的C_H区组成,所述可变结构域衍生自基本上由V_L基因区段和J_L基因区段组成的基因区段;以及两个相同的第二多肽,其中每个都基本上由与可变结构域相融合的C_L区组成,所述可变结构域衍生自基本上由V_L区段和J_L区段组成的基因区段。

[0033] 在具体的实施方案中,具有C_H区的所述两个相同的多肽具有小鼠C_H区。

[0034] 在具体的实施方案中,具有C_L区的所述两个相同的多肽具有小鼠C_L区。

[0035] 在一个实施方案中,与C_L区融合的可变结构域是同与C_H区相融合的可变结构域同源的可变结构域。

[0036] 在一个实施方案中,与内源小鼠C_H区相融合的可变结构域包含比与内源小鼠C_L区相融合的可变结构域数目更多的体细胞超突变;在具体的实施方案中,同与内源小鼠C_L区相融合的可变结构域相比,与内源小鼠C_H区相融合的可变结构域包含约1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍或5倍或更多的体细胞超突变。在一个实施方案中,与内源小鼠C_L区相融合的可变结构域是由包含1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多个N添加的基因编码的。

[0037] 在一个实施方案中,一个或多个所述V区段和J区段是人基因区段。在具体的实施方案中,所述V区段和J区段都是人κ基因区段。在另一个具体实施方案中,所述V区段和J区段都是人λ基因区段。在一个实施方案中,所述V区段和J区段独立地选自人κ和人λ基因区段。在具体的实施方案中,所述V区段为Vκ区段且J区段为Jλ区段。在另一个具体实施方案中,所述V区段为Vλ区段且所述J区段为Jκ区段。

[0038] 在一个实施方案中,与C_L区相融合的一个或多个可变结构域以及与C_H区相融合的可变结构域为人可变结构域。在具体的实施方案中,所述人可变结构域为人Vκ结构域。在另一个具体实施方案中,所述人可变结构域为Vλ结构域。在一个实施方案中,所述人结构域独立地选自人Vκ和人Vλ结构域。在具体的实施方案中,与C_L区相融合的所述人可变结构域为人Vλ结构域且与C_H区相融合的人可变结构域为人Vκ结构域。在另一个实施方案中,与C_L区相融合的人可变结构域为人Vκ结构域且与C_H相融合的人可变结构域为人Vλ结构域。

[0039] 在一个实施方案中,所述两个相同的第一多肽的V_L基因区段选自人Vλ区段和人Vκ区段。在一个实施方案中,所述两个相同的第二多肽的V_L区段选自人Vλ区段和人Vκ区段。在具体的实施方案中,所述两个相同的第一多肽的V_L区段是人Vκ区段且所述两个相同的第二多肽的V_L区段选自人Vκ区段和人Vλ区段。在具体的实施方案中,所述两个相同的第一多肽的V_L区段是人Vλ区段且所述两个相同的第二多肽的V_L区段选自人Vλ区段和人Vκ区段。在具体的实施方案中,所述两个相同的第一多肽的人V_L区段是人Vκ区段,且所述两个相同的第二多肽的人V_L区段是人Vκ区段。

[0040] 在一个实施方案中,小鼠的IgG包括响应于抗原而制造的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含基本上由可变结构域和C_H区组成的多肽,其中所述可变结构域是由基本上由经重排的V_L区段和经重排的J区段组成的核苷酸序列编码的,并且其中所述结合蛋白以微摩尔,纳摩尔或皮摩尔范围内的K_D特异性结合抗原的表位。

[0041] 一方面,提供了小鼠,其中小鼠响应于抗原而制造的全部或基本上全部IgG都包含含有可变结构域的重链,其中所述可变结构域是由衍生自基本上由V基因区段和J基因区段

组成的基因区段的重排的基因编码的。在一个实施方案中,所述重排的基因包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加。

[0042] 在一个实施方案中,所述V区段是轻链的V区段。在一个实施方案中,所述轻链选自κ轻链和λ轻链。在具体的实施方案中,所述轻链为κ轻链。在具体的实施方案中,所述V区段为人V区段。在具体的实施方案中,所述V区段为人Vκ区段且所述J区段为人Jκ区段。

[0043] 在一个实施方案中,所述J区段为轻链的J区段。在一个实施方案中,所述轻链选自κ轻链和λ轻链。在具体的实施方案中,所述轻链为κ轻链。在具体的实施方案中,所述J区段为人J区段。在另一个实施方案中,所述J区段为重链的J区段(即J_H)。在具体的实施方案中,所述重链为小鼠来源的。在另一个具体实施方案中,所述重链为人来源的。

[0044] 在一个实施方案中,由不超过V区段和J区段构成的重链的可变结构域是体细胞突变的可变结构域。

[0045] 在一个实施方案中,由不超过V区段和J区段构成的重链的可变结构域与小鼠C_H区融合。

[0046] 在具体的实施方案中,由小鼠响应于抗原而制造的全部或基本上全部IgG都包含衍生自不超过一个人V区段和不超过一个人J区段的可变结构域,并且所述可变结构域与小鼠IgG恒定区相融合,且其中IgG还包含含有与小鼠C_L区相融合的人V_L结构域的轻链。在具体的实施方案中,与小鼠C_L区相融合的V_L结构域衍生自人Vκ区段和人Jκ区段。在具体的实施方案中,与小鼠C_L区相融合的V_L结构域衍生自人Vλ区段和人Jλ区段。

[0047] 一方面,提供了小鼠,其制造在包含C_H区的多肽上含有第一CDR3且在包含C_L区的多肽上含有第二CDR3的IgG,其中所述第一CDR3和第二CDR3各自独立地衍生自不超过两个基因区段,其中所述两个基因区段基本上由V_L基因区段和J_L基因区段组成。在一个实施方案中,包含C_H区的多肽上的CDR3含有下列序列:所述序列衍生自包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加的CDR3核苷酸序列。

[0048] 在一个实施方案中,所述V_L区段和J_L区段为人基因区段。在一个实施方案中,所述V_L区段和J_L区段为κ基因区段。在一个实施方案中,所述V_L区段和J_L区段为λ基因区段。

[0049] 一方面,提供了小鼠,其制造在含有C_H区的第一多肽上包含第一CDR3且在含有C_L区的第二多肽上包含第二CDR3的IgG,其中所述第一CDR3和第二CDR3二者每个都包含这样的氨基酸序列:其中超过75%的所述氨基酸衍生自V基因区段。在一个实施方案中,包含C_H区的所述多肽上的CDR3含有这样的序列:其衍生自包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加的CDR3核苷酸序列。

[0050] 在一个实施方案中,超过80%,超过90%或超过95%的所述第一CDR3的氨基酸,以及超过80%,超过90%或超过95%的所述第二CDR3的氨基酸衍生自轻链V区段。

[0051] 在一个实施方案中,所述第一CDR3的不超过两个氨基酸衍生自除轻链V区段之外的基因区段。在一个实施方案中,所述第二CDR3的不超过两个氨基酸衍生自除轻链V区段之外的基因区段。在具体的实施方案中,所述第一CDR3的不超过两个氨基酸和所述第二CDR3的不超过两个氨基酸衍生自除轻链V区段之外的基因区段。在一个实施方案中,没有所述IgG的CDR3包含衍生自D基因区段的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述第一多肽的CDR3不包含衍生自D区段的序列。

[0052] 在一个实施方案中,所述V区段是人V基因区段。在具体的实施方案中,所述V区段

是人Vκ基因区段。

[0053] 在一个实施方案中,所述第一和/或第二CDR3具有至少一个、两个、三个、四个、五个或六个体细胞超突变。在一个实施方案中,所述第一CDR3是由包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加的核酸序列编码的。

[0054] 在一个实施方案中,所述第一CDR3基本上由衍生自人轻链V基因区段和人轻链J基因区段的氨基酸组成,且所述第二CDR3基本上由衍生自人轻链V基因区段和人轻链J基因区段的氨基酸组成。在一个实施方案中,所述第一CDR3衍生自包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多N添加的核酸序列。在一个实施方案中,所述第一CDR3衍生自不超过两个基因区段,其中所述不超过两个基因区段是人Vκ基因区段和人Jκ基因区段;且所述第二CDR3衍生自不超过两个基因区段,其中所述不超过两个基因区段是人Vκ基因区段和选自人Jκ区段、人Jλ区段和人J_H区段的J基因区段。在一个实施方案中,所述第一CDR3衍生自不超过两个基因区段,其中所述不超过两个基因区段为人Vλ区段和选自人Jκ区段、人Jλ区段及人J_H区段的J区段。

[0055] 一方面,提供了小鼠,其制造不含衍生自D_H基因区段的氨基酸序列的IgG,其中所述IgG包含具有与小鼠C_L区融合的第一V_L结构域的第一多肽和具有与小鼠C_H区融合的第二V_L结构域的第二多肽,其中所述第一V_L结构域和所述第二V_L结构域不是相同的。在一个实施方案中,所述第一和第二V_L结构域衍生自不同的V区段。在另一个实施方案中,所述第一和第二V_L结构域衍生自不同的J区段。在一个实施方案中,所述第一和第二V_L结构域衍生自相同的V和J区段,其中与所述第一V_L结构域相比,所述第二V_L结构域包含更多数目的体细胞超突变。

[0056] 在一个实施方案中,所述第一和第二V_L结构域独立地选自人和小鼠V_L结构域。在一个实施方案中,所述第一和第二V_L结构域独立地选自Vκ和Vλ结构域。在具体的实施方案中,所述第一V_L结构域选自Vκ结构域和Vλ结构域,且所述第二V_L结构域为Vκ结构域。在另一个具体实施方案中,所述Vκ结构域为人Vκ结构域。

[0057] 一方面,提供了小鼠,其中由所述小鼠制造的全部或基本上全部IgG都基本上由下列组成:具有与小鼠C_L结构域融合的第一人V_L结构域的轻链,以及具有与小鼠C_H结构域融合的第二人V_L结构域的重链。

[0058] 在一个实施方案中,与小鼠C_H结构域融合的所述人V_L结构域是人Vκ结构域。

[0059] 在一个实施方案中,所述第一和第二人V_L结构域不是相同的。

[0060] 一方面,提供了小鼠,其中至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%或约100%的由所述小鼠制造的免疫球蛋白G基本上由二聚体组成:(a)第一多肽,其基本上由免疫球蛋白V_L结构域和免疫球蛋白C_L区组成;和(b)长度不超过535个氨基酸的第二多肽,其中所述第二多肽基本上由C_H区和缺少衍生自D_H基因区段的序列的V结构域组成。

[0061] 在一个实施方案中,所述第二多肽的长度为约435-535个氨基酸。在具体的实施方案中,所述第二多肽的长度为约435-530个氨基酸。在具体的实施方案中,所述第二多肽的长度为约435-525个氨基酸。在具体的实施方案中,所述第二多肽的长度为约435-520个氨基酸。在具体的实施方案中,所述第二多肽的长度为约435-515个氨基酸。

[0062] 在一个实施方案中,在约90%或更多由所述小鼠制造的IgG中,所述第二多肽的长

度为不超过约535个氨基酸。

[0063] 在一个实施方案中,在约50%或更多由所述小鼠制造的IgG中,所述第二多肽的长度不超过约535个氨基酸。在一个实施方案中,在约50%或更多由所述小鼠制造的免疫球蛋白G中,所述第二多肽的长度为不超过约530,525,520,515,510,505,500,495,490,485,480,475,470,465,460,455或450个氨基酸。在一个实施方案中,约60%,70%,80%,90%或95%或更多由所述小鼠制造的IgG是所述的长度。在具体的实施方案中,由所述小鼠制造的全部或基本上全部IgG是所述的长度。

[0064] 在一个实施方案中,所述第二多肽的V结构域为V_L结构域。在具体的实施方案中,所述第二多肽的V结构域选自Vκ和Vλ结构域。在具体的实施方案中,所述第二多肽的V结构域为人Vκ或Vλ结构域。

[0065] 一方面,提供了小鼠,其从其种系中的核苷酸序列表达包含轻链可变序列(例如V和/或J序列),D_H序列以及重链恒定区的多肽。

[0066] 在一个实施方案中,所述小鼠从内源小鼠重链基因座表达所述多肽,所述基因座包含用所述内源小鼠重链基因座处的多个人基因区段替代全部或基本上全部功能性内源小鼠重链可变基因座基因区段。

[0067] 在一个实施方案中,所述多肽包含衍生自Vλ或Vκ基因区段的V_L序列,所述多肽包含衍生自D_H基因区段的CDR3,且所述多肽包含衍生自J_H或Jλ或Jκ基因区段的序列。

[0068] 在一个实施方案中,所述小鼠包含内源小鼠重链免疫球蛋白基因座,所述基因座包含用一个或多个人轻链Vλ基因区段替代所有功能性V_H基因区段,其中所述一个或多个人Vλ区段中的每一个都在下游一侧并置了23-mer间隔的重组信号序列(RSS),其中所述Vλ区段与上游和下游并置了12-mer间隔的RSS的人或小鼠D_H区段可操作地连接;所述D_H基因区段与上游并置了23-mer间隔的RSS的J区段可操作地连接,所述RSS适于与并置于D_H基因区段的12-mer间隔的RSS重组;其中所述V,D_H和J区段与编码重链恒定区的核酸序列可操作地连接。

[0069] 在一个实施方案中,所述小鼠包含内源小鼠重链免疫球蛋白基因座,所述基因座包含用一个或多个人Vκ基因区段替代所有功能性V_H基因区段,每个所述Vκ基因区段下游都并置了12-mer间隔的重组信号序列(RSS),其中所述V区段与上游和下游都并置了23-mer间隔的RSS的人或小鼠D_H区段可操作地连接;所述D_H区段与上游并置了12-mer间隔的RSS的J区段可操作地连接,所述RSS适于与并置于所述D_H区段的23-mer间隔的RSS重组;其中所述V,D_H和J基因区段与编码重链恒定区的核酸序列可操作地连接。

[0070] 在一个实施方案中,所述重链恒定区为内源小鼠重链恒定区。在一个实施方案中,核酸序列编码选自C_H1,铰链,C_H2,C_H3及其组合的序列。在一个实施方案中,所述C_H1,铰链,C_H2和C_H3中的一个或多个为人的。

[0071] 在一个实施方案中,所述小鼠包含内源小鼠重链免疫球蛋白基因座,所述基因座包含用多个人Vλ或Vκ基因区段(其中每个人Vλ或Vκ基因区段的下游都并置了23-mer间隔的RSS)、上游和下游都并置了12-mer间隔的RSS的多个人D_H区段、上游和下游都并置了23-mer间隔的RSS的多个人J区段(J_H或Jλ或Jκ)替代所有功能性V_H基因区段,其中所述基因座包含选自C_H1,铰链,C_H2,C_H3及其组合的内源小鼠恒定区序列。在具体的实施方案中,所述小鼠包含全部或基本上全部功能性人Vλ或Vκ区段,全部或基本上全部功能性人D_H区段以及全部或

基本上全部J_H或Jλ或Jκ区段。

[0072] 在一个实施方案中,小鼠表达抗原结合蛋白,其包含:(a)多肽,所述多肽包含与包含小鼠序列的重链恒定序列相连接的人轻链序列;和(b)多肽,其包含与人或小鼠轻链恒定序列相连接的人轻链可变区。在具体的实施方案中,所述轻链序列为人轻链序列,并且在暴露于能够将抗体切割为Fc和Fab的蛋白酶时,形成包含至少四个轻链CDR的全人Fab,其中所述至少四个轻链CDR选自λ序列,κ序列及其组合。在一个实施方案中,所述Fab包含至少五个轻链CDR。在一个实施方案中,所述Fab包含六个轻链CDR。在一个实施方案中,所述Fab的至少一个CDR包含衍生自Vλ区段或Vκ区段的序列,且所述至少一个CDR还包含衍生自D区段的序列。在一个实施方案中,所述至少一个CDR为CDR3且所述CDR衍生自人Vκ区段,人D区段和人Jκ区段。

[0073] 在一个实施方案中,所述多肽包含衍生自人Vλ或Vκ基因区段,人D_H基因区段和人J_H或Jλ或Jκ基因区段的可变区。在具体的实施方案中,所述重链恒定序列衍生自人C_H1和小鼠C_H2以及小鼠C_H3序列。

[0074] 一方面,提供了小鼠,其在其种系中包含与人J基因区段以及重链恒定区序列可操作连接的未重排的人Vκ或Vλ基因区段,其中所述小鼠表达包含与重链恒定区相融合的人Vκ结构域的V_L结合蛋白,并且其中所述小鼠显示出在$CD19^+$B细胞中表达V_L结合蛋白的脾脏B细胞群,其中所述$CD19^+$B细胞包括过渡性B细胞($CD19^+IgM^{hi}IgD^{int}$)和成熟B细胞($CD19^+IgM^{int}IgD^{hi}$)。

[0075] 一方面,提供了小鼠,其在其种系中包含与人J基因区段和重链恒定区序列可操作连接的未重排的人Vκ或Vλ基因区段,其中所述小鼠在B细胞上表达包含与重链恒定区相融合的轻链可变结构域的免疫球蛋白,其中所述小鼠骨髓中的淋巴细胞群显示出数目与野生型小鼠中的原/前B细胞群(骨髓中的淋巴细胞)数目大致相同的原/前B细胞群。

[0076] 在一个实施方案中,小鼠包含至少6个未重排的hVκ基因区段和一个或多个未重排的hJκ基因区段,并且所述小鼠包含表达V_L结合蛋白的淋巴细胞-门控的且IgM^+的脾细胞群,其中所述群体至少为野生型小鼠中淋巴细胞-门控的且IgM^+的脾细胞群的75%大。

[0077] 在一个实施方案中,小鼠显示出总计约90%的IgD^+细胞和IgM^+细胞的成熟B细胞-门控的($CD19^+$)脾细胞群;在一个实施方案中,经修饰的小鼠的IgD^+细胞和IgM^+细胞的成熟B细胞-门控的($CD19^+$)脾细胞群与野生型小鼠的总IgD^+细胞和IgM^+细胞中为成熟B细胞-门控的($CD19^+$)脾细胞大致相同(例如在10%之内,或5%之内)。

[0078] 一方面,提供了小鼠,其从其种系内经修饰的内源重链基因座表达免疫球蛋白,其中所述经修饰的内源重链基因座缺少功能性小鼠重链V基因区段且所述基因座包含未经重排的轻链V基因区段和未经重排的J基因区段,其中所述未经重排的轻链V基因区段和未经重排的J基因区段与重链恒定区序列可操作地连接;其中所述免疫球蛋白基本上由第一多肽和第二多肽组成,其中所述第一多肽包含免疫球蛋白轻链序列和免疫球蛋白重链恒定序列,且所述第二多肽包含免疫球蛋白轻链可变结构域和轻链恒定区。

[0079] 一方面,提供了小鼠,其表达免疫球蛋白,其中所述免疫球蛋白缺少重链免疫球蛋白可变结构域,且所述免疫球蛋白包含衍生自轻链基因的第一可变结构域,和衍生自轻链基因的第二可变结构域,其中所述第一可变结构域和所述第二可变结构域相对于彼此是同源的,其中所述第一和第二轻链可变结构域不是相同的,并且其中所述第一和第二轻链可

变结构域缔合,且当它们缔合时特异性结合目的抗原。

[0080] 一方面,提供了小鼠,其从其种系中的未重排基因区段制造免疫球蛋白,所述免疫球蛋白包含完全衍生自基本上由未重排的人基因区段组成的基因区段的可变区,其中所述免疫球蛋白包含选自C_H1,铰链,C_H2,C_H3及其组合的免疫球蛋白轻链恒定序列和免疫球蛋白重链恒定序列。

[0081] 一方面,提供了小鼠,其从其种系中未经重排的基因区段制造免疫球蛋白,所述免疫球蛋白包含可变区和任选地一个或多个体细胞超突变(例如一个或多个N添加),其中所有可变区的所有CDR3都是完全从轻链V和J基因区段产生的。

[0082] 一方面,提供了小鼠,其制造衍生自所述小鼠的种系中未经重排的人免疫球蛋白轻链可变区基因区段的体细胞突变的免疫球蛋白,其中所述免疫球蛋白缺少包含衍生自D基因区段的序列的CDR,其中所述免疫球蛋白在与轻链恒定区融合的轻链可变结构域上包含第一CDR3,在与重链恒定区融合的轻链可变结构域上包含第二CDR3,并且其中所述第二CDR3衍生自包含1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加的经重排的轻链可变区序列。

[0083] 一方面,提供了本文中所述的小鼠,其中所述小鼠包含选自λ基因座、κ基因座及其组合的功能上被沉默的轻链基因座。在一个实施方案中,所述小鼠包含λ和/或κ基因座的完全或部分缺失,从而所述λ和/或κ基因座是无功能的。

[0084] 一方面,提供了小鼠胚胎,其包含含有如本文中所描述的经修饰的免疫球蛋白基因座的细胞。在一个实施方案中,所述小鼠为嵌合体且所述胚胎的细胞的至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或95%包含如本文中所述的经修饰的免疫球蛋白基因座。在一个实施方案中,所述胚胎的细胞的至少96%,97%,98%,99%或99.8%包含本文中所述的经修饰的免疫球蛋白基因座。在一个实施方案中,所述胚胎包含宿主细胞和衍生自供体ES细胞的细胞,其中所述衍生自供体ES细胞的细胞包含如本文中所描述的经修饰的免疫球蛋白基因座。在一个实施方案中,所述胚胎为2-,4-,8-,16-,32-或64-细胞阶段的宿主胚胎,或胚泡,并且还包含含有如本文中所描述的经修饰的免疫球蛋白基因座的供体ES细胞。

[0085] 一方面,提供了用本文中所描述的核酸构建体制造的小鼠或细胞。

[0086] 一方面,提供了用本文中所描述的细胞制造的小鼠。在一个实施方案中,所述细胞为小鼠ES细胞。

[0087] 一方面,提供了使用本文中所描述的小鼠来制造编码与第二人轻链免疫球蛋白可变序列(V_L2)同源的第一人轻链免疫球蛋白可变序列(V_L1)的核酸序列的用途,其中与人免疫球蛋白轻链恒定区(多肽1)融合的V_L1同与人免疫球蛋白重链恒定区(多肽2)融合的V_L2一起作为多肽1/多肽2的二聚体表达,以形成V_L1-V_L2抗体。

[0088] 一方面,提供了使用本文中所描述的小鼠来制造编码与人免疫球蛋白重链序列相融合的人免疫球蛋白轻链可变序列的核酸序列的用途,其中所述核酸序列编码人V_L-C_H多肽,其中所述人V_L-C_H多肽作为二聚体表达,并且其中所述二聚体在没有免疫球蛋白轻链(例如没有人λ或人κ轻链)时表达。在一个实施方案中,所述V_L-C_H二聚体在没有λ轻链和没有κ轻链时特异性结合目的抗原。

[0089] 一方面,提供了用如本文中所描述的小鼠来制造编码全部或一部分免疫球蛋白可变结构域的核酸序列的用途。在一个实施方案中,所述免疫球蛋白可变结构域为人Vλ或人V

κ结构域。

[0090] 一方面,提供了用如本文中所描述的小鼠来制造全人Fab(包含与人轻链恒定区融合的第一人V_L,以及与人重链恒定区序列融合的第二人V_L)或全人$F(ab)_2$的用途。

[0091] 一方面,提供了用如本文中所描述的小鼠来制造永生细胞系的用途。在一个实施方案中,所述永生细胞系包含这样的核酸序列:其编码与包含小鼠恒定区核酸序列的核酸序列可操作连接的人Vλ或Vκ结构域。

[0092] 一方面,提供了用本文中所描述的小鼠来制造杂交瘤或四价体瘤(quadroma)的用途。

[0093] 一方面,提供了细胞,其包含如本文中所描述的经修饰的免疫球蛋白基因座。在一个实施方案中,所述细胞选自全能细胞、多能细胞、诱导的多能干细胞(iPS)和ES细胞。在具体的实施方案中,所述细胞为小鼠细胞,例如小鼠ES细胞。在一个实施方案中,所述细胞对于经修饰的免疫球蛋白基因座为纯合的。

[0094] 一方面,提供了细胞,其包含编码第一多肽的核酸序列,所述第一多肽包含与人重链恒定区序列相融合的第一体细胞突变的人Vκ或Vλ序列。

[0095] 在一个实施方案中,所述细胞还包含第二多肽链,其包含与人轻链恒定区序列相融合的第二体细胞突变的人Vκ或Vλ序列。

[0096] 在一个实施方案中,所述第一多肽的人Vκ或Vλ序列与所述第二多肽的人Vκ或Vλ序列同源。

[0097] 在一个实施方案中,所述第一多肽的Vκ或Vλ和所述第二多肽的人Vκ或Vλ在缔合时特异性地结合目的抗原。在具体的实施方案中,所述第一多肽包含基本上由人Vκ组成的可变结构域,所述第二多肽包含由与所述第一多肽的人Vκ同源的人Vκ组成的可变结构域,且所述人恒定区序列为IgG序列。

[0098] 在一个实施方案中,所述细胞选自CHO细胞,COS细胞,293细胞,HeLa细胞和表达病毒核酸序列的人视网膜细胞(例如PERC.6™细胞)。

[0099] 一方面,提供了小鼠体细胞,其包含含有如本文所述的遗传修饰的染色体。

[0100] 一方面,提供了小鼠生殖细胞,其包含含有如本文所述的遗传修饰的核酸序列。

[0101] 一方面,提供了衍生自如本文中所描述的小鼠的多能、诱导的多能或全能细胞。在具体的实施方案中,所述细胞为小鼠胚胎干(ES)细胞。

[0102] 一方面,提供了本文所描述的细胞用于生产小鼠,细胞或治疗性蛋白(例如抗体或其它抗原结合蛋白)的用途。

[0103] 一方面,提供了核酸构建体,其包含上游和下游并置了23-mer间隔的RSS的人D_H基因区段。在具体的实施方案中,所述核酸构建体包含:与包含人Vκ基因区段的人基因组序列同源的同源臂。在一个实施方案中,靶向构建体包含全部或基本上全部的人D_H基因区段,每个都在上游和下游并置了23-mer间隔的RSS。

[0104] 一方面,提供了核酸构建体,其包含上游并置了12-mer间隔的RSS的人Jκ基因区段。在具体的实施方案中,所述核酸构建体包含第一同源臂,其含有与上游和下游并置了23-mer间隔的RSS的人基因组D_H基因序列的同源性。在一个实施方案中,所述核酸构建体包含第二同源臂,其含有与人基因组J基因序列的同源性、或含有与小鼠重链恒定区序列的同源性或含有与小鼠恒定区重链序列上游的J-C基因间序列的同源性。

[0105] 一方面,提供了核酸构建体,其包含下游并置了23-mer间隔的RSS的人Vλ区段、上游和下游并置了12-mer间隔的RSS的人D_H区段、以及人J区段,所述J区段选自上游并置了23-mer间隔的RSS的Jκ区段,上游并置于23-mer间隔的RSS的人Jλ区段以及上游并置了23-mer间隔的RSS的人J_H区段。在一个实施方案中,所述构建体包含同源臂,其含有与小鼠恒定区序列、J-C基因间小鼠序列和/或人Vλ序列的同源性。

[0106] 在一个实施方案中,所述核酸构建体包含人λ轻链可变区序列,其含有人λ轻链基因座的簇A的片段。在具体的实施方案中,所述人λ轻链基因座簇A的片段从hVλ3-27延伸至hVλ3-1。

[0107] 在一个实施方案中,所述核酸构建体包含人λ轻链可变区序列,其含有人λ轻链基因座的簇B的片段。在具体的实施方案中,所述人λ轻链基因座的簇B的片段从hVλ5-52延伸至hVλ1-40。

[0108] 在一个实施方案中,所述核酸构建体包含人λ轻链可变区序列,其含有簇A的基因组片段和簇B的基因组片段。在一个实施方案中,所述人λ轻链可变区序列包含簇A的至少一个基因区段和簇B的至少一个基因区段。

[0109] 在一个实施方案中,所述人λ轻链可变区序列包含簇B的至少一个基因区段和簇C的至少一个基因区段。

[0110] 一方面,提供了核酸构建体,其包含上游和下游并置了23-mer间隔的RSS的人D_H区段,所述23-mer间隔的RSS通常在自然界中被发现位于Jκ,J_H,Vλ或V_H区段的侧翼。在一个实施方案中,所述核酸构建体包含第一同源臂,其与人V-J基因间区同源或与包含人V基因区段的人基因组序列同源。在一个实施方案中,所述核酸构建体包含第二同源臂,其与人或小鼠重链恒定区序列同源。在具体的实施方案中,所述人或小鼠重链恒定区序列选自C_H1,铰链,C_H2,C_H3及它们的组合。在一个实施方案中,所述核酸构建体包含上游侧接了12-mer RSS的人J基因区段。在一个实施方案中,所述核酸构建体包含第二同源臂,其含有与上游侧接了12-mer RSS的J基因区段的同源性。在一个实施方案中,所述J基因区段选自人Jκ,人Jλ和人J_H。

[0111] 一方面,提供了核酸构建体,其包含上游和下游并置了23-mer间隔的RSS的人D_H区段,以及位点特异性重组酶识别序列,例如被位点特异性重组酶(例如Cre,Flp或Dre蛋白)识别的序列。

[0112] 一方面,提供了核酸构建体,其包含人Vλ或人Vκ区段,上游和下游并置了12-mer或23-mer间隔的RSS的D_H区段,以及具有12-mer或23-mer间隔的RSS的人J区段,其中所述12-mer或23-mer间隔的RSS位于紧邻人J区段5'处(即相对于转录的方向)。在一个实施方案中,所述构建体包含与3'23-mer间隔的RSS并置的人Vλ、上游和下游并置了12-mer间隔的RSS的人D_H区段,和并置了5'23-mer间隔的RSS的人Jκ区段。在一个实施方案中,所述构建体包含并置了3'12-mer间隔的RSS的人Vκ,上游和下游并置了23-mer间隔的RSS的人D_H区段以及并置了5'12-mer间隔的RSS的人Jλ区段。

[0113] 一方面,提供了靶向载体,其包含:(a)第一靶向臂和第二靶向臂,其中所述第一和第二靶向臂独立地选自人和小鼠靶向臂,其中所述靶向臂将载体导向内源或经修饰的免疫球蛋白V区基因基因座;和(b)人V_L基因区段的连续序列或人V_L基因区段的连续序列以及至少一个人Jκ基因区段,其中所述连续序列选自(i)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1,(ii)hVκ4-1至

hVκ1-6以及Jκ1至Jκ2,(iii)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1至Jκ3,(iv)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1至Jκ4,(v)hVκ4-1至hVκ1-6以及Jκ1至Jκ5,(vi)hVκ3-7至hVκ1-16,(vii)hVκ1-17至hVκ2-30,(viii)hVκ3-31至hVκ2-40,和(ix)它们的组合。

[0114] 在一个实施方案中,将载体导向内源或经修饰的免疫球蛋白基因座的靶向臂与内源或经修饰的免疫球蛋白基因座处的序列相同或实质上相同。

[0115] 一方面,提供了本文所描述的核酸构建体用于制造小鼠、细胞或治疗性蛋白(例如抗体或其它抗原结合蛋白)的用途。

[0116] 一方面,提供了来自本文所描述的小鼠的核酸序列用于制造细胞系的用途,所述细胞系用于制造人治疗剂。在一个实施方案中,所述人治疗剂为结合蛋白,其包含与人重链恒定序列相融合的人轻链可变序列(例如衍生自人Vκ或人Vκ区段)。在一个实施方案中,所述人治疗剂包含第一多肽和第二多肽,所述第一多肽为人λ或κ免疫球蛋白轻链,所述第二多肽包含与人重链恒定序列相融合的人Vλ或人Vκ可变序列。

[0117] 一方面,提供了表达系统,其包含以DNA构建体转染的哺乳动物细胞,所述构建体编码包含与人C_H结构域相融合的经体细胞突变的人V_L结构域的多肽。

[0118] 在一个实施方案中,所述表达系统还包含核苷酸序列,其编码与人C_L结构域相融合的免疫球蛋白V_L结构域,其中所述与人C_L结构域相融合的V_L结构域是与人C_H结构域相融合的V_L结构域的同源轻链。

[0119] 在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞选自CHO细胞,COS细胞,Vero细胞,293细胞以及表达病毒基因的视网膜细胞(例如PER.C6™细胞)。

[0120] 一方面,提供了用于制造结合蛋白的方法,所述方法包括:从来自本文所描述的小鼠的细胞的、编码与C_H区相融合的V_L区的基因获得编码V_L结构域的核苷酸序列;将所述编码V_L区序列的核苷酸序列与编码人C_H区的基因同框克隆以形成人结合蛋白序列;在合适的细胞中表达所述人结合蛋白序列。

[0121] 在一个实施方案中,小鼠经过了目的抗原免疫接种,且所述与C_H区融合的V_L区特异性结合(例如以微摩尔、纳摩尔或皮摩尔范围内的K_D)所述目的抗原的表位。在一个实施方案中,编码与C_H区融合的V_L区的核苷酸序列是在小鼠中经体细胞突变的。

[0122] 在一个实施方案中,所述合适的细胞选自B细胞,杂交瘤,四价体瘤,CHO细胞,COS细胞,293细胞,HeLa细胞和表达病毒核酸序列的人视网膜细胞(例如PERC.6™细胞)。

[0123] 在一个实施方案中,所述C_H区包含人IgG同种型。在具体的实施方案中,所述人IgG选自IgG1,IgG2和IgG4。在另一个具体实施方案中,所述人IgG为IgG1。在另一个具体实施方案中,所述人IgG为IgG4。在另一个具体实施方案中,所述人IgG4是经修饰的IgG4。在一个实施方案中,所述经修饰的IgG4在铰链区包含取代。在具体的实施方案中,相对于野生型人IgG4,所述经修饰的IgG4在氨基酸残基228处包含取代,编号是根据Kabat的EU编号索引。在具体的实施方案中,在氨基酸残基228处的取代为S228P取代,编号是根据Kabat的EU编号索引。

[0124] 在一个实施方案中,所述细胞还包含编码V_L结构域的核苷酸序列,所述V_L结构域来自同与C_H区相融合的V_L结构域同源的轻链,并且所述方法还包括表达编码与人Cκ或Cλ结构域相融合的同源V_L结构域的核苷酸序列。

[0125] 一方面,提供了制造经遗传修饰的小鼠的方法,所述方法包括用一个或多个人免

疫球蛋白轻链基因区段替代内源小鼠重链基因座处的一个或多个小鼠免疫球蛋白重链基因区段。在一个实施方案中,所述替代是用一个或多个功能性人轻链区段(即V_L和J_L区段)替代全部或基本上全部功能性小鼠免疫球蛋白重链区段(即V_H,D_H和J_H区段)。在一个实施方案中,所述替代是用全部或基本上全部人Vλ或Vκ区段以及至少一个Jλ或Jκ区段替代全部或基本上全部功能性小鼠重链V_H、D_H和J_H区段。在具体的实施方案中,所述替代包括全部或基本上全部功能性人Jλ或Jκ区段。

[0126] 一方面,提供了用于制造表达多肽的小鼠的方法,所述多肽包含衍生自与小鼠重链恒定区相融合的人免疫球蛋白Vλ或Vκ和/或Jλ或Jκ区段的序列,其包含用至少一个人Vλ或Vκ区段以及至少一个人Jλ或Jκ区段替代内源小鼠重链免疫球蛋白可变区段(V_H,D_H和J_H),其中所述替代在多能、诱导的多能或全能小鼠细胞中以形成经遗传修饰的小鼠祖细胞;所述经遗传修饰的小鼠祖细胞被引入小鼠宿主中;并且包含经遗传修饰的祖细胞的所述小鼠宿主经受孕以形成包含衍生自经遗传修饰的小鼠祖细胞的基因组的小鼠。在一个实施方案中,所述宿主为胚胎。在具体的实施方案中,所述宿主选自小鼠前-桑葚胚(例如8-或4-细胞阶段),四倍体胚胎,胚胎细胞聚集物或胚泡。

[0127] 一方面,提供了用于制造如本文所述的经遗传修饰的小鼠的方法,所述方法包括通过核转移将含有本文所述的修饰的核酸引入细胞中,以及在合适的条件下(例如包括培养所述细胞和在小鼠代孕母亲中孕育包含所述细胞的胚胎)维持所述细胞以发育成为如本文所述的小鼠。

[0128] 一方面,提供了用于制造经修饰的小鼠的方法,所述方法包括如本文所述的修饰小鼠ES细胞或多能或全能或诱导的多能小鼠细胞以包括与免疫球蛋白重链恒定序列可操作连接的一个或多个未重排的免疫球蛋白轻链可变基因区段,培养所述ES细胞,将所培养的ES细胞引入宿主胚胎中以形成嵌合胚胎,以及将所述嵌合胚胎引入合适的宿主小鼠中以发育成为经修饰的小鼠。在一个实施方案中,所述一个或多个未重排的免疫球蛋白轻链可变区基因区段为人λ或人κ基因区段。在一个实施方案中,所述一个或多个未重排的免疫球蛋白轻链可变区基因区段包含人Vλ或人Vκ区段和一个或多个Jλ,Jκ或J_H区段。在一个实施方案中,所述重链恒定基因序列为人序列,其选自C_H1,铰链,C_H2,C_H3以及它们的组合。在一个实施方案中,所述一个或多个未重排的免疫球蛋白轻链可变基因区段替代内源小鼠重链基因座处的全部或基本上全部功能性内源小鼠重链可变区基因区段,并且所述重链恒定序列为包含C_H1,铰链,C_H2和C_H3的小鼠序列。

[0129] 一方面,提供了在本文所述的小鼠中制造的免疫球蛋白可变区(VR)(例如包含与人J_L或J_H或D_H和J_H或D_H和J_L相融合的人V_L序列)。在具体的实施方案中,所述免疫球蛋白VR衍生自选自Vκ区段和Vλ区段的种系人基因区段,其中所述VR是由小鼠的经重排的序列编码的,其中所述经重排的序列是经体细胞超突变的。在一个实施方案中,所述经重排的序列包含1至5个体细胞超突变。在一个实施方案中,所述经重排的序列包含至少6,7,8,9或10个体细胞超突变。在一个实施方案中,所述经重排的序列包含超过10个体细胞超突变。在一个实施方案中,所述经重排的序列与一个或多个人或小鼠重链恒定区序列(例如选自人或小鼠C_H1,铰链,C_H2,C_H3以及它们的组合)相融合。

[0130] 一方面,提供了在本文所述的小鼠中制造的结合蛋白的免疫球蛋白可变结构域氨基酸序列。在一个实施方案中,所述VR与一个或多个人或小鼠重链恒定区序列(例如选自人

或小鼠C_H1,铰链,C_H2,C_H3以及它们的组合)相融合。

[0131] 一方面,提供了轻链可变结构域,其由衍生自本文所述的小鼠的核酸序列编码。

[0132] 一方面,提供了抗体或其抗原结合片段(例如Fab,$F(ab)_2$,scFv),其在本文所述的小鼠中制造,或衍生自在本文所述的小鼠中制造的序列。

附图说明

[0133] 图1A描绘了小鼠重链基因座的图示(不按比例)。所述小鼠重链基因座长度为约3Mb并且含有约200个重链可变(V_H)基因区段,13个重链多样性(D_H)基因区段和4个重链连接(J_H)基因区段以及增强子(Enh)和重链恒定(C_H)区。

[0134] 图1B描绘了人κ轻链基因座的图示(不按比例)。所述人κ轻链基因座被复制成为相反极性的远端和近端片段重叠群(contig),分别跨越约440kb和600kb。在所述两个片段重叠群之间为约800kb的DNA,其被认为不含Vκ基因区段。人κ轻链基因座包含约76个Vκ基因区段,5个Jκ基因区段和内含子增强子(Enh)以及单一恒定区(Cκ)。

[0135] 图2显示了将40个人Vκ和5个人Jκ基因区段逐步插入小鼠重链基因座中的靶向策略。显示了带有重组酶识别位点(R1,R2等)的潮霉素(HYG)和新霉素(NEO)选择盒。

[0136] 图3显示了经修饰的小鼠重链基因座,其包含与小鼠C_H区可操作连接的人Vκ和Jκ基因区段。

[0137] 图4A显示了用于将人Vλ和单一人Jλ基因区段逐步插入小鼠重链基因座中的示例性靶向策略。显示了带有重组酶识别位点(R1,R2等)的潮霉素(HYG)和新霉素(NEO)选择盒。

[0138] 图4B显示了用于将人Vλ和四个人Jλ基因区段逐步插入小鼠重链基因座中的示例性靶向策略。显示了带有重组酶识别位点(R1,R2等)的潮霉素(HYG)和新霉素(NEO)选择盒。

[0139] 图5A显示了将人Vλ,人D_H和人J_H基因区段逐步插入小鼠重链基因座中的示例性靶向策略。显示了带有重组酶识别位点(R1,R2等)的潮霉素(HYG)和新霉素(NEO)选择盒。

[0140] 图5B显示了将人Vλ,人D_H和人Jκ基因区段逐步插入小鼠重链基因座中的示例性靶向策略。显示了带有重组酶识别位点(R1,R2等)的潮霉素(HYG)和新霉素(NEO)选择盒。

[0141] 图6A显示了就B220和IgM的表面表达染色的脾细胞的等高线图,所述细胞来自代表性野生型(WT)和对置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的代表性小鼠(6hVκ-5hJκHO)。

[0142] 图6B显示了$CD19^+$B细胞上的脾细胞门控的等高线图,所述$CD19^+$B细胞就免疫球蛋白D(IgD)和免疫球蛋白M(IgM)染色,所述$CD19^+$B细胞来自代表性野生型(WT)和对置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的代表性小鼠(6hVκ-5hJκHO)。

[0143] 图6C显示了在来自从野生型(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)收获的脾脏中$CD19^+$B细胞、过渡性B细胞($CD19^+IgM^{hi}IgD^{int}$)和成熟B细胞($CD19^+IgM^{int}IgD^{hi}$)的总数。

[0144] 图7A显示了来自野生型小鼠(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)的、就免疫球蛋白M(IgM)和B220染色的对单态(singlet)门控的骨髓的等高线图。在每幅点图上标记了不成熟的、成熟的和原/前B细胞。

[0145] 图7B显示了从野生型小鼠(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个

人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)的股骨中分离的骨髓中前/原($B220^{+}IgM^{-}$),不成熟($B220^{int}IgM^{+}$)和成熟($B220^{hi}IgM^{+}$)B细胞的总数。

[0146] 图7C显示了来自野生型小鼠(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)的、就$ckit^{+}$和$CD43^{+}$染色的对$CD19^{+}$门控的骨髓的等高线图。在每幅点图上标记了原和前B细胞。

[0147] 图7D显示了在从野生型小鼠(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)的股骨收获的骨髓中,原B($CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$)和前B($CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$)细胞的数目。

[0148] 图7E显示了来自野生型小鼠(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)的、就CD19和CD43染色的对单态门控的骨髓的等高线图。在每幅点图上标记了不成熟的、前和原B细胞。

[0149] 图7F显示了来自野生型小鼠(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVk-5hJk HO)的、表达免疫球蛋白M(IgM)的、对前B细胞($CD19^{+}CD43^{int}$)门控的骨髓的直方图。

[0150] 图7G显示了在从野生型(WT)和对于置于内源重链基因座处的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)的股骨中收获的骨髓中,IgM^{+}前B细胞($CD19^{+}IgM^{+}CD43^{int}$)和不成熟的B细胞($CD19^{+}IgM^{+}CD43^{-}$)的数目。

[0151] 图8A显示了来自下列小鼠的、就$Ig\lambda^{+}$和$Ig\kappa^{+}$的表达染色的、对$CD19^{+}$门控的脾细胞的等高线图,所述小鼠为含有野生型重链基因座和用人Vκ及Jκ基因区段替代内源Vκ和Jκ基因区段的小鼠(WT)和对于内源重链基因座处的三十个hVκ和五个Jκ基因区段为纯合并且以人Vκ和Jκ基因区段对内源Vκ和Jκ基因区段的替代的小鼠(30hVκ-5hJκHO)。

[0152] 图8B显示了从下列小鼠的股骨中分离的、就Igλ和Igκ的表达染色的、对不成熟($B220^{int}IgM^{+}$)和成熟($B220^{hi}IgM^{+}$)B细胞门控的骨髓等高线图,所述小鼠为含有野生型重链基因座和用人Vκ及Jκ基因区段替代内源Vκ及Jκ基因区段的小鼠(WT)和对于内源重链基因座处的三十个hVκ和五个Jκ基因区段为纯合并且以人Vκ和Jκ基因区段对内源Vκ和Jκ基因区段的替代的小鼠(30hVκ-5hJκHO)。

[0153] 图9显示了从对于小鼠重链基因座处的三十个hVκ和五个Jκ基因区段为纯合并且以人Vκ和Jκ基因区段对内源Vκ和Jκ基因区段的替代的幼稚小鼠的脾细胞RNA扩增的十二个独立的RT-PCR克隆的Vκ-Jκ-mIgG连接的核苷酸序列比对。小写碱基表示由重组过程中的突变和/或N添加产生的非种系碱基。包括了人为的间隔(句点)来恰当地比对框架4区以及显示对IgG1,IgG2a/c和IgG3引发的克隆的小鼠重链IgG核苷酸序列的比对。

发明详述

[0155] 词语“双特异性结合蛋白”包括能够选择性结合两种或更多种表位的结合蛋白。双特异性结合蛋白包含两种不同的多肽,所述多肽包括与第一C_H区融合的第一轻链可变结构域(V_L1)和与第二C_H区融合的第二轻链可变结构域(V_L2)。一般地,所述第一和第二C_H区是相同的,或者它们仅以一个或多个氨基酸取代(例如如本文中所述的)而不同。V_L1和V_L2特异性地结合不同的表位—在两个不同的分子(例如抗原)上或者在同一分子上(例如在相同的抗原上)。如果双特异性结合蛋白选择性地结合两个不同的表位(第一表位和第二表位),则

V_L1对于所述第一表位的亲和力一般将比V_L1对所述第二表位的亲和力低至少一个至两个或三个或四个数量级,对于V_L2反之亦然。双特异性结合蛋白所识别的表位可在相同或不同的靶标上(例如在相同或不同的抗原上)。可通过例如组合识别相同抗原的不同表位的V_L1和V_L2来制备双特异性结合蛋白。例如,可将编码识别相同抗原的不同表位的V_L序列的核酸序列与编码不同C_H区的核酸序列相融合,并且此类序列可被表达在表达免疫球蛋白轻链的细胞中,或者可被表达在不表达免疫球蛋白轻链的细胞中。典型的双特异性结合蛋白具有两条重链,每条具有三个轻链CDR,后跟(N-末端至C-末端)C_H1结构域,铰链,C_H2结构域和C_H3结构域,以及免疫球蛋白轻链,所述免疫球蛋白轻链:不赋予抗原结合特异性但是能够与每条重链相缔合;或者,能够与每条重链相缔合且能够结合V_L1和/或V_L2所结合的一个或多个表位;或者能够与每条重链相缔合并且使得所述重链中的一条或两条能够与一个或两个表位相结合或辅助这种结合。

[0156] 因此,两种一般类型的双特异性结合蛋白为(1)V_L1-C_H(二聚体),和(2)V_L1-C_H:轻链+V_L2-C_H:轻链,其中所述轻链是相同或不同的。在任一种情形中,所述C_H(即所述重链恒定区)可如本文中所述地被差异化地修饰(例如,以便有差异地结合A,以便增加血清半衰期等),或者可以是相同的。

[0157] 当与表达序列相关使用时,术语“细胞”包括适于表达重组核酸序列的任何细胞。所述细胞包括:原核生物和真核生物(单细胞或多细胞)的那些,细菌细胞(例如大肠杆菌菌株,芽孢杆菌菌株,链霉菌菌株等),分枝杆菌细胞,真菌细胞,酵母细胞(例如酿酒酵母,裂殖酵母,毕赤酵母,甲醇型酵母等),植物细胞,昆虫细胞(例如SF-9,SF-21,杆状病毒感染的昆虫细胞,粉纹夜蛾等,非人动物细胞,人细胞,B细胞,或细胞融合物例如,杂交瘤或四价体瘤。在一些实施方案中,所述细胞为人,猴,猿,仓鼠,大鼠或小鼠细胞。在某些实施方案中,所述细胞为真核的并且选自下列细胞:CHO(例如CHO K1,DXB-11CHO,Veggie-CHO),COS(例如COS-7),视网膜细胞,Vero,CV1,肾(例如HEK293,293EBNA,MSR 293,MDCK,HaK,BHK),HeLa,HepG2,WI38,MRC 5,Colo205,HB 8065,HL-60(例如BHK21),Jurkat,Daudi,A431(表皮),CV-1,U937,3T3,L细胞,C127细胞,SP2/0,NS-0,MMT060562,Sertoli细胞,BRL 3A细胞,HT1080细胞,骨髓瘤细胞,肿瘤细胞,以及源自前述细胞的细胞系。在某些实施方案中,所述细胞包含一个或多个病毒基因,例如表达病毒基因的视网膜细胞(例如PER.C6™细胞)。

[0158] 当以“与…同源”的意思使用时(例如与第二V_L结构域“同源”的第一V_L结构域),术语“同源”意在包括指根据本发明的小鼠所制造的同一结合蛋白的两个V_L结构域之间的关系。例如,根据本发明的实施方案经遗传修饰的小鼠(例如具有重链基因座的小鼠,在所述重链基因座中V_H,D_H和J_H区被V_L和J_L区替代)制造抗体样结合蛋白,其具有两条相同的、由与第一人V_L结构域相融合的相同的小鼠C_H区(例如IgG同种型)构成的多肽链,以及两条相同的、由与第二人V_L结构域相融合的相同的小鼠C_L区构成的多肽链。在于小鼠中进行克隆选择的过程中,通过克隆选择过程选择所述第一和第二人V_L结构域使得其在单一抗体样结合蛋白的情境中一起出现。因此,作为克隆选择过程的结果而一起出现在单一抗体样分子中的第一和第二V_L结构域被称为是“同源”的。相反,出现在第一抗体样分子中的V_L结构域和出现在第二抗体样分子中的V_L结构域是非同源的,除非所述第一和第二抗体样分子具有相同的重链(即除非与所述第一人重链区融合的V_L结构域和与所述第二人重链区融合的V_L结构域是相同的)。

[0159] 词语“互补决定区”或术语“CDR”包括由生物体的免疫球蛋白基因的核酸序列所编码的氨基酸序列,其通常(即在野生型动物中)出现在免疫球蛋白分子(例如抗体或T细胞受体)的轻链或重链的可变区中的两个框架区之间。CDR可被例如种系序列或者经重排或未经重排的序列编码,并且例如可被幼稚或成熟B细胞或T细胞编码。在某些情形中(例如对于CDR3),CDR可被不连续(例如在未重排的核酸序列中)但在B细胞核酸序列中是连续的两个或更多个序列(例如种系序列)编码,例如作为剪接或连接序列(例如V-D-J重组以形成重链CDR3)的结果。

[0160] 词语“基因区段”或“区段”包括指V(轻或重)或D或J(轻或重)免疫球蛋白基因区段,其包括免疫球蛋白基因座(在例如人和小鼠中)处的未重排序列,其可参与重排(由例如内源重组酶介导的)以形成经重排的V/J或V/D/J序列。除非另行指出,所述V,D和J区段包括允许根据12/23规则进行V/J重组或V/D/J重组的重组信号序列(RSS)。除非另行指出,所述区段还包括它们在自然界中与之相关联的序列,或者其功能性等同体(例如对于V区段,启动子和前导子)。

[0161] 词语“重链”或“免疫球蛋白重链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白重链恒定区序列,并且除非另外指出,其包括重链可变结构域(V_H)。除非另外指出,V_H结构域包括三个重链CDR和四个框架(FR)区。重链片段包括CDR,CDR和FR,以及它们的组合。典型的重链基本上由下列组成:在可变结构域之后(从N-末端至C-末端),为C_H1结构域,铰链,C_H2结构域,C_H3结构域,以及任选地C_H4结构域(例如在IgM或IgE的情形中)和跨膜(M)结构域(例如在淋巴细胞上的膜结合免疫球蛋白的情形中)。重链恒定区是从重链的FR4之外延伸至C-末端的重链区(从N-末端侧至C-末端侧)。具有小偏差(例如从C-末端重链恒定区截短一个、两个、三个或数个氨基酸)的重链恒定区以及具有序列修饰的重链恒定区(例如1,2,3,4,5,6,7,8,9或10个氨基酸取代)将被词语“重链恒定区”所涵盖。可在一个或多个位置进行氨基酸取代,所述位置为例如(参照免疫球蛋白恒定区(例如人IgG恒定区)的EU编号)228,233,234,235,236,237,238,239,241,248,249,250,252,254,255,256,258,265,267,268,269,270,272,276,278,280,283,285,286,289,290,292,293,294,295,296,297,298,301,303,305,307,308,309,311,312,315,318,320,322,324,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,337,338,339,340,342,344,356,358,359,360,361,362,373,375,376,378,380,382,383,384,386,388,389,398,414,416,419,428,430,433,434,435,437,438和439。

[0162] 例如(而不是通过限制的方式),可修饰重链恒定区以展现出增强的血清半衰期(与没有所述修饰的相同重链恒定区相比)且在下列位置具有修饰:250(例如E或Q);250和428(例如L或F);252(例如L/Y/F/W或T),254(例如S或T),以及256(例如S/R/Q/E/D或T);或者428和/或433(例如L/R/SI/P/Q或K)和/或434(例如H/F或Y)处的修饰;或者250和/或428处的修饰;或者307或308(例如308F,V308F)以及434处的修饰。在另一个实例中,所述修饰可包括428L(例如M428L)和434S(例如N434S)修饰;428L,259I(例如V259I)和308F(例如V308F)修饰;433K(例如H433K)和434(例如434Y)修饰;252,254和256(例如252Y,254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(例如T250Q和M428L);307和/或308修饰(例如308F或308P)。

[0163] 词语“轻链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白轻链恒定(C_L)区序列,并且除非另外指出包括人κ和λ轻链。除非另外指出,轻链可变(V_L)结构域通常包括三个轻链CDR和四个框架(FR)区。一般地,全长轻链(V_L+C_L)从氨基末端至羧基末端包括V_L结构域(其包括FR1-

CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4)和C_L区。可与本发明一起使用的轻链(V_L+C_L)包括例如那些:不与结合蛋白所选择性结合的第一或第二(在双特异性结合蛋白的情形中)表位(例如与C_H结构域融合的V_L结构域所选择性结合的表位)选择性结合的。不选择性结合与C_H结构域相融合的V_L所结合的表位的V_L结构域包括在现有抗体文库(湿文库或生物信息学的)中就最常采用的轻链进行筛选时可被鉴别出的那些,其中所述轻链不实质上干扰结合蛋白的表位结合结构域的亲和力和/或选择性。合适的轻链包括能够结合(单独地或者与同C_H区相融合的其同源V_L相组合)与C_H区相融合的V_L所特异性结合的表位的那些。

[0164] 词语"微摩尔范围"意在指1-999微摩尔;词语"纳摩尔范围"意在指1-999纳摩尔;词语"皮摩尔范围"意在指1-999皮摩尔。

[0165] 术语"非人动物"意在包括任何脊椎动物,例如圆口类,硬骨鱼,软骨鱼(例如鲨鱼和鳐鱼),两栖动物,爬行动物,哺乳动物和鸟类。合适的非人动物包括哺乳动物。合适的哺乳动物包括非人灵长类,山羊,绵羊,猪,狗,母牛和啮齿类动物。合适的非人动物选自包括大鼠和小鼠的啮齿类动物。在一个实施方案中,所述非人动物为小鼠。

[0166] 小鼠,核苷酸序列和结合蛋白

[0167] 提供了由免疫球蛋白基因座的元件编码的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含与免疫球蛋白轻链可变结构域相融合的免疫球蛋白重链恒定区。此外,提供了多种策略来遗传修饰小鼠中的免疫球蛋白重链基因座,以编码含有由免疫球蛋白轻链基因座所编码的元件的结合蛋白。此类经遗传修饰的小鼠代表用于产生下列独特的结合蛋白群体的来源:所述结合蛋白具有免疫球蛋白结构但与传统抗体相比显示出增强的多样性。

[0168] 本文中所描述的结合蛋白方面包括由经修饰的免疫球蛋白基因座所编码的结合蛋白,所述基因座经修饰从而通常(即在野生型动物中)编码免疫球蛋白轻链可变结构域(或其部分)的基因区段与编码重链恒定区的核苷酸序列可操作地连接。在轻链基因区段重排之后,获得了经重排的核苷酸序列,其包含编码与编码重链恒定区的序列相融合的轻链可变结构域的序列。此序列编码具有与重链恒定区相融合的免疫球蛋白轻链可变结构域的多肽。因此,在一个实施方案中,所述多肽基本上由下列组成(从N-末端至C-末端):V_L结构域,C_H1区,铰链,C_H2区,C_H3区以及任选地C_H4区。

[0169] 在本文中所描述的经修饰的小鼠中,制造了也包含同源轻链的此类结合蛋白,其中在一个实施方案中,所述同源轻链与上文所述的多肽配对以制造为抗体样的结合蛋白,但是所述结合蛋白包含与C_H区相融合的V_L区—而非V_H区。

[0170] 在多种实施方案中,所述经修饰的小鼠制造结合蛋白,其包含与C_H区相融合的V_L区(杂合重链),其中所述杂合重链的V_L区展现出增强的体细胞超突变程度。在这些实施方案中,所述增强是在与C_L区(轻链)相融合的V_L区。在某些实施方案中,与同C_L区相融合的V_L区相比,杂合重链的V_L区展现出约1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍或5倍或更多的体细胞超突变。在某些实施方案中,所述经修饰的小鼠响应于抗原而展现出包含杂合重链的V_L区的结合蛋白群体,其中与在响应于相同抗原的野生型小鼠中所观察到的相比,所述结合蛋白群体展现出平均约1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍或更多的所述杂合重链的V_L区中的体细胞超突变。在一个实施方案中,所述杂合重链的V_L区中的体细胞超突变包括CDR3中的一个或多个、或者两个或更多个N添加。

[0171] 在多种实施方案中,所述结合蛋白包含由下述免疫球蛋白轻链序列编码的可变结

构域:与对于在自然界中从内源轻链基因座重排的轻链所观察到的相比,其包含更大数目的N添加,例如包含与源自人轻链V基因区段和人(轻链或重链)J基因区段的可变结构域相融合的小鼠重链恒定区的结合蛋白,其中所述人V和人J区段重排以形成包含1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10或更多N添加的重排的基因。

[0172] 在多种实施方案中,本发明的小鼠制造这样的结合蛋白:其平均小于野生型抗体(即具有V_H结构域的抗体)并且具有与更小的大小相关的优势。更小的大小至少部分是通过缺少由D_H区编码的氨基酸序列(通常存在于V_H结构域中)而实现的。更小的大小也可在CDR3的形成中实现,所述CDR3源自例如Vκ区和Jκ区。

[0173] 另一方面,提供了用于提供下列结合蛋白群体的小鼠和方法,所述结合蛋白具有经体细胞超突变的V_L结构域,例如经体细胞突变的人Vκ结构域,和例如由包含1-10个或更多个N添加的经重排的κ可变基因编码的人Vκ结构域。在一个实施方案中,在没有用于产生抗体多样性的V_H区时,本发明的小鼠将产生下述结合蛋白(例如响应于抗原的刺激):其V结构域仅为或基本上为V_L结构域。因此,所述小鼠的克隆选择过程限于仅从或基本上从具有V_L结构域而非V_H结构域的结合蛋白中选择。与野生型小鼠(也以某种频率突变V_L结构域)中的相比,所述V_L结构域的体细胞超突变将同样频繁地或实质上更频繁地(例如2至5倍更高,或者更多)。本发明小鼠中的克隆选择过程将从经修饰的免疫球蛋白基因座产生高亲和力结合蛋白,包括以纳摩尔或皮摩尔范围内的亲和力特异性结合表位的结合蛋白。可使用适当的表达系统,将编码此类结合蛋白的序列用于制作含有人可变区和人恒定区的治疗性结合蛋白。

[0174] 在其它实施方案中,可制作根据本发明的小鼠,其中所述小鼠重链和/或轻链免疫球蛋白基因座是失能的,成为无功能的,或者被敲除,且可将全人或嵌合人-小鼠转基因置于所述小鼠中,其中所述转基因中的至少一个含有经修饰的重链基因座(例如具有与一个或多个重链基因序列可操作连接的轻链基因区段)。此类小鼠也可制作如本文所述的结合蛋白。

[0175] 一方面,提供了用于增加多样性的方法,包括通过体细胞超突变或通过V_L结构域中的N添加,所述方法包括使未重排的轻链V基因区段和未重排的J基因区段与小鼠C_H基因序列可操作连接,使动物暴露于目的抗原,以及从所述动物中分离所述动物的经重排和经体细胞超突变的V(轻链)/J基因序列,其中所述经重排的V(轻链)/J基因序列与编码免疫球蛋白C_H区的核苷酸序列相融合。

[0176] 在一个实施方案中,与所述超突变的V_L相融合的所述免疫球蛋白重链为IgM;在另一个实施方案中,为IgG;在另一个实施方案中,为IgE;在另一个实施方案中,为IgA。

[0177] 在一个实施方案中,与对于具有与C_L序列可操作地连接的V_L序列的经重排和类别转换的抗体所观察到的相比,所述经体细胞超突变且经类别转换的V_L结构域含有约2至5倍或更多的体细胞超突变。在一个实施方案中,与从同C_H区相融合的V_H基因表达的V_H结构域中所观察到的体细胞超突变相比,在经体细胞超突变的V_L结构域中所观察到的体细胞超突变数目大致相同。

[0178] 一方面,提供了用于制造高亲和力人V_L结构域的方法,所述方法包括使本发明的小鼠暴露于目的抗原,允许所述小鼠产生对所述目的抗原的免疫应答,以及从所述小鼠分离以高亲和力特异性结合所述目的抗原的、经体细胞突变、类别转换的人V_L结构域。

[0179] 在一个实施方案中,所述包含所述经体细胞突变、经类别转换的人V_L结构域的结合蛋白的K_D在纳摩尔或皮摩尔的范围内。

[0180] 在一个实施方案中,所述结合蛋白基本上由多肽二聚体组成,其中所述多肽基本上由包含与人C_H区相融合的人V_L结构域的经体细胞突变、类别转换的结合蛋白组成。

[0181] 在一个实施方案中,所述结合蛋白基本上由多肽二聚体和两条轻链组成,其中所述多肽基本上由具有与人C_H区相融合的人V_L结构域的经体细胞突变、类别转换的结合蛋白组成;并且其中所述二聚体的每个多肽都与包含同源轻链V_L结构域及人C_L区的同源轻链相缔合。

[0182] 一方面,提供了用于体细胞超突变人V_L基因序列的方法,所述方法包括使人V_L基因区段和人J_L基因区段与内源小鼠重链免疫球蛋白基因座处的内源小鼠C_H基因可操作连接,使所述小鼠暴露于目的抗原,以及从所述小鼠获得结合所述目的抗原的经体细胞超突变的人V_L基因序列。

[0183] 在一个实施方案中,所述方法还包括从所述小鼠获得V_L基因序列,所述V_L基因序列来自与结合目的抗原的人体细胞超突变的人V_L基因序列同源的轻链。

[0184] 具有D_H序列的V_L结合蛋白

[0185] 在各个方面,包含未重排的免疫球蛋白轻链V基因区段和未重排的(例如轻链或重链)J基因区段的小鼠也包含能够与J区段重组以形成经重排的D/J序列的未重排的DH基因区段,所述经重排的D/J序列继而能够与轻链V区段重排以形成经重排的可变序列,其衍生自(a)轻链V区段,(b)DH区段和(c)(例如轻链或重链)J区段;其中所述经重排的可变序列可操作地与重链恒定序列(例如选自CH1,铰链,CH2,CH3以及它们的组合)相连接;例如可操作地连接小鼠或人CH1,铰链,CH2和CH3。

[0186] 在各个方面,还包含人D区段的、包含未经重排的人轻链V区段和J区段的小鼠可用于,例如作为CDR3序列的增加的多样性的来源。通常,CDR3序列出现在来自V/J重组的轻链以及来自V/D/J重组的重链中。其它的多样性由重组过程中发生的核苷酸添加(例如N添加)提供,并且也作为体细胞超突变的结果。由CDR3序列所赋予的结合特性一般限于由轻链CDR3序列、重链CDR3序列、以及轻链和重链CDR3序列的组合所赋予的那些,视情况而定。然而,在本文所述的小鼠中,由于第一轻链CDR3(在重链多肽上)和第二轻链CDR3(在轻链多肽上)的组合所赋予的结合特性,可有附加的多样性来源。其它的多样性是可能的,其中所述第一轻链CDR3可含有源自D基因区段的序列,如同来自本文所描述的下列小鼠的:其包含来自轻链V区的未重排的V区段,其与D区段可操作连接并且与J区段(轻链或重链)可操作连接,其中采用本文中所教导的RSS工程化。

[0187] 另一个多样性的来源是N和/或P添加,其可在V(轻链)/J或V(轻链)/D/J重组中(在所述的小鼠中是可能的)发生。因此,本文所述的小鼠不仅提供不同的多样性(轻链-轻链)来源还提供其它的多样性来源,这是由于本文所述的小鼠中经重排的V(轻链)/J或经重排的V(轻链)/D/J基因中的添加(例如1,2,3,4,5,6,7,8,9或10或更多个N添加)。

[0188] 在各个方面,使用与J基因区段和轻链V基因区段可操作连接的D基因区段提供了增强的多样性。在这种情况下,D_H区段的可操作连接将要求所述D区段能够与同其一起列出的J区段重组。因此,所述D区段将要求在下游并置的、与并置在J区段上游的RSS相匹配的RSS,从而D区段和J区段可重排。此外,D区段将需要在上游并置的、与并置于V区段下游的

RSS相匹配的适当的RSS,从而经重排的D/J区段和V区段可重排以形成编码可变结构域的基因。

[0189] RSS或重组信号序列包含保守的核酸七聚物序列,其通过12个碱基对(bp)或23个碱基对(bp)的不保守序列与保守的核酸九聚物序列分隔开。RSS被重组酶用于在重排过程中按照12/23规则实现免疫球蛋白基因区段的连接。根据12/23规则,并置了具有12bp(不保守的)间隔子的RSS的基因区段同并置了具有23bp(不保守的)间隔子的RSS的基因区段重排;即一般观察不到每个都具有12bp间隔子的RSS的基因区段之间的重排,或每个都具有23bp间隔子的RSS的基因区段之间的重排。

[0190] 在λ轻链基因座的情形中,可变基因区段(Vλ基因区段)下游侧接具有23-mer间隔子的RSS(相对于V序列的转录方向),且连接基因区段(Jλ基因区段)在上游侧接具有12-mer间隔子的RSS(相对于J序列的转录方向)。因此,Vλ和Jλ区段侧接在12/23规则下相容的RSS并因此能够在重排过程中重组。

[0191] 然而,在野生型生物体的κ基因座处,每个功能性Vκ区段都在下游侧接具有12-mer间隔子的RSS。因此,Jκ区段具有并置于Jκ区段上游侧的23-mer间隔。在重链基因座处,V_H基因区段在下游并置具有23-mer间隔子的RSS,后跟在上游和下游并置了12-mer间隔子的D_H区段,以及每个都具有并置于J_H区段上游侧的23-mer区段的J_H区段。在重链基因座处,D/J重组首先通过具有12-mer间隔子的下游D_H RSS和具有23-mer间隔子的上游J_H RSS介导而发生,以产生中间的经重排的D-J序列,其具有并置于上游侧的RSS,所述上游侧具有12-mer间隔子的RSS。然后,所述具有并置于上游侧的12-merRSS的经重排的D-J区段与具有并置于V_H区段下游侧的23-merRSS的所述V_H区段重排以形成经重排的V/D/J序列。

[0192] 在一个实施方案中,在重链基因座处与具有为Jλ区段的J基因区段一起采用Vλ区段,其中所述Vλ区段包含并置于Vλ序列下游侧的RSS,且所述RSS包含23-mer间隔子,且所述J区段为具有并置于其上游侧且具有12-mer间隔子的RSS的Jλ区段(例如,如在自然界中发现的)。

[0193] 在一个实施方案中,在重链基因座处与为Jκ或J_H基因区段的J基因区段一起采用Vλ区段,其中所述Vλ序列具有并置于其下游侧的包含23-mer间隔子的RSS,且所述Jκ或J_H区段具有并置于其上游侧的包含12-mer间隔子的RSS。

[0194] 在一个实施方案中,在重链基因座处与D_H基因区段和J基因区段一起采用Vλ区段。在一个实施方案中,所述Vλ区段包含并置于Vλ序列下游侧的RSS且带有具有23-mer间隔子的RSS;所述D_H区段包含并置于D_H序列的上游侧和下游侧的RSS且带有具有12-mer间隔子的RSS;以及J区段具有并置于其上游侧的具有23-mer间隔子的RSS,其中所述J区段选自Jλ,Jκ和J_H。

[0195] 在一个实施方案中,在重链基因座处与J基因区段(没有介于中间的D区段)一起采用Vκ区段,其中所述Vκ区段具有并置于所述Vκ区段下游侧的RSS且具包含12-mer间隔的RSS,所述J区段具有并置于其上游侧的23-mer间隔的RSS,且所述Jκ区段选自Jκ区段,Jλ区段和J_H区段。在一个实施方案中,所述V区段和/或J区段为人的。

[0196] 在一个实施方案中,在重链基因座处与D区段和J区段一起采用Vκ区段,其中所述Vκ区段具有并置于所述Vκ区段下游侧的RSS且包含12-mer间隔的RSS,所述D区段具有并置于其上游和下游侧的23-mer间隔的RSS,且所述J区段具有并置于其上游侧的12-mer间隔的

RSS。在一个实施方案中,所述J区段选自Jκ区段,Jλ区段和J_H区段。在一个实施方案中,所述V区段和/或J区段为人的。

[0197] 使用本领域已知的用于制造核酸序列的任何合适的方法来制造具有并置于其上游端且具有23-mer间隔子的RSS的Jλ区段,或者具有并置于其上游端且具有12-mer间隔子的RSS的Jκ或J_H区段。制造具有并置于上游的RSS的J区段(其中所述RSS具有所选的间隔子,例如12-mer或23-mer)的合适的方法是化学合成包含七聚物、九聚物和所选间隔子的核酸并使其与经化学合成或从合适的来源(例如人序列来源)克隆的J区段序列相融合,并且在靶向载体中采用所述融合的J区段序列和RSS来将RSS-J靶向合适的位点。

[0198] 可通过本领域中已知的任何方法来制造具有并置于上游和下游的23-mer间隔的RSS的D区段。一种方法包括化学合成上游23-merRSS和D区段序列以及下游23-merRSS,并将所述侧翼接有RSS的D区段置于合适的载体中。可引导所述载体以用具有并置于上游和下游侧的12-merRSS序列的人D区段替代一个或多个小鼠D区段,或者可引导所述载体插入例如人V区段和人或小鼠J区段之间处的人源化基因座中。

[0199] 用于RSS构建的合适的九聚物和七聚物是本领域已知的(例如见Janeway's Immunobiology,7th ed.,Murphy等人,(2008,Garland Science,Taylor&Francis Group,LLC)第148页,图4.5,通过引用而并入)。合适的非保守间隔子序列包括,例如在人或小鼠免疫球蛋白基因座处的RSS序列中观察到的间隔子序列。

[0200] 双特异性-结合蛋白

[0201] 本文中所描述的结合蛋白以及编码它们的核苷酸序列可被用于制造多特异性结合蛋白,例如双特异性结合蛋白。在这方面,基本上由与C_H区相融合的第一V_L结构域组成的第一多肽可与基本上由与C_H区相融合的第二V_L结构域组成的第二多肽相缔合。当所述第一V_L结构域和所述第二V_L结构域特异性地结合不同的表位时,可使用所述两种V_L结构域来制造双特异性-结合分子。所述C_H区可以是相同或不同的。在一个实施方案中,例如所述C_H区之一可以是经修饰的从而清除蛋白A结合决定子,而另一个重链恒定区不是经这样修饰的。这种特定的安排简化了从例如同源二聚体的混合物(例如所述第一或所述第二多肽的同源二聚体)中分离所述双特异性结合蛋白。

[0202] 一方面,本文所述的方法和组合物用于制作双特异性-结合蛋白。在这个方面,各自独立地、与相同同种型的人IgG序列(例如人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4)同框地克隆与C_H区相融合的第一V_L和与C_H区相融合的第二V_L。所述第一V_L特异性地结合第一表位,且所述第二V_L特异性地结合第二表位。所述第一和第二表位可以在不同的抗原上,或者在相同的抗原上。

[0203] 在一个实施方案中,与所述第一V_L相融合的C_H区的IgG同种型和与所述第二V_L相融合的C_H区的IgG同种型是相同的同种型,但是在以下方面有差异:一种IgG同种型包含至少一个氨基酸取代。在一个实施方案中,与缺少所述取代的重链相比,所述至少一个氨基酸取代使得携带所述取代的重链不能或实质上不能结合蛋白A。

[0204] 在一个实施方案中,所述第一C_H区包含选自IgG1,IgG2和IgG4的人IgG的第一C_H3结构域;所述第二C_H区包含选自IgG1,IgG2和IgG4的人IgG的第二C_H3结构域,其中所述第二C_H3结构域包含减少或清除所述第二C_H3结构域与蛋白A的结合的修饰。

[0205] 在一个实施方案中,所述第二C_H3结构域包含435R修饰,其根据Kabat的EU索引而

编号。在另一个实施方案中,所述第二C_H3结构域还包含436F修饰,其根据Kabat的EU索引而编号。

[0206] 在一个实施方案中,所述第二C_H3结构域是人IgG1的,其包含选自下组的修饰:D356E,L358M,N384S,K392N,V397M和V422I,其根据Kabat的EU索引而编号。

[0207] 在一个实施方案中,所述第二C_H3结构域为人IgG2的,其包含选自下组的修饰:N384S,K392N和V422I,其根据Kabat的EU索引而编号。

[0208] 在一个实施方案中,所述第二C_H3结构域是人IgG4的,其包含选自下组的修饰:Q355R,N384S,K392N,V397M,R409K,E419Q和V422I,其根据Kabat的EU索引而编号。

[0209] 在一个实施方案中,所述结合蛋白包含具有一个或多个本文所述的修饰的C_H区,其中所述结合蛋白的恒定区在人中为非免疫原性的或基本上非免疫原性的。在具体的实施方案中,所述C_H区包含在人中不呈递免疫原性表位的氨基酸序列。在另一个具体实施方案中,所述结合蛋白包含在野生型人重链中没有发现的C_H区,且所述C_H区不包含产生T-细胞表位的序列。

[0210] 本公开还提供以下实施方式。实施方式1.小鼠,其在其种系中包括可操作地连接于重链恒定区核酸序列的未重排的轻链V区段和未重排的J区段。

[0211] 实施方式2.实施方式1的小鼠,其中所述未重排的轻链V区段选自:人κ区段,人λ区段,以及它们的组合。

[0212] 实施方式3.实施方式1的小鼠,其中所述重链恒定区核酸序列选自:C_H1序列,铰链序列,C_H2序列,C_H3序列,以及它们的组合。

[0213] 实施方式4.实施方式1的小鼠,其中所述未重排的轻链V区段和所述未重排的J区段在内源小鼠重链基因座处替代内源小鼠重链V区段和内源小鼠重链J区段。

[0214] 实施方式5.实施方式4的小鼠,其中所述未重排的轻链V区段替代内源小鼠重链基因座的全部或基本上全部功能性小鼠重链V区段。

[0215] 实施方式6.实施方式4的小鼠,其中所述未重排的J区段包括轻链J区段,且所述轻链J区段替代内源小鼠重链基因座的全部或基本上全部功能性小鼠重链J区段。

[0216] 实施方式7.实施方式6的小鼠,其中所述未重排的轻链V区段和未重排的轻链J区段可操作地连接,且所述小鼠在所述未重排的轻链V区段和未重排的轻链J区段之间缺少功能性D区段。

[0217] 实施方式8.实施方式7的小鼠,其中所述未重排的轻链V区段为人κ区段且所述未重排的轻链J区段为人κ区段。

[0218] 实施方式9.实施方式1的小鼠,其包含B细胞,所述B细胞在其基因组中包括含有可操作地连接于小鼠恒定区基因的人κ可变区的经重排的免疫球蛋白基因。

[0219] 实施方式10.实施方式1的小鼠,其中所述经重排的免疫球蛋白基因位于内源小鼠免疫球蛋白重链基因座处。

[0220] 实施方式11.实施方式1的小鼠,其还在其种系中包括可操作地连接于轻链恒定基因的人轻链V区段和人轻链J区段。

[0221] 实施方式12.实施方式11的小鼠,其中所述轻链恒定基因为小鼠轻链恒定基因。

[0222] 实施方式13.实施方式12的小鼠,其中所述人轻链V区段为人κV区段。

[0223] 实施方式14.实施方式13的小鼠,其中所述小鼠轻链恒定基因为小鼠κ轻链恒定基

因。

[0224] 实施方式15.从其种系表达免疫球蛋白的小鼠,所述免疫球蛋白包含:含有与免疫球蛋白重链恒定区相融合的第一人轻链可变区序列的第一多肽,以及,含有与免疫球蛋白轻链恒定区相融合的第二人轻链可变区的第二多肽。

[0225] 实施方式16.实施方式15的小鼠,其中所述第一人轻链可变区序列包含人κ可变区序列,且所述第二人轻链可变区选自人κ可变区和人λ可变区。

[0226] 实施方式17.实施方式16的小鼠,其中所述免疫球蛋白重链恒定区选自人重链恒定区和小鼠重链恒定区。

[0227] 实施方式18.实施方式16的小鼠,其中所述免疫球蛋白轻链恒定区选自人轻链恒定区和小鼠轻链恒定区。

[0228] 实施方式19.实施方式16的小鼠,其中所述第一多肽从缺少功能性内源重链V基因区段的经修饰的内源小鼠免疫球蛋白重链基因座表达。

[0229] 实施方式20.实施方式19的小鼠,其中所述第二多肽从缺少功能性内源轻链V基因区段的经修饰的内源小鼠免疫球蛋白轻链基因座表达。

[0230] 实施方式21.小鼠,其在所述小鼠的种系的内源小鼠免疫球蛋白重链基因座处包括用至少六个或更多个未重排的轻链V基因区段和一个或多个未重排的J基因区段替代全部或基本上全部功能性内源小鼠重链可变基因区段,其中所述未重排的轻链V基因区段与所述J基因区段可操作地连接,其中所述小鼠不能表达源自重链V基因区段的免疫球蛋白重链,并且其中所述小鼠包含脾脏B细胞群($B220^{+}/IgM^{+}$),其为野生型小鼠脾脏B细胞群($B220^{+}/IgM^{+}$)的大小的至少约75%。

[0231] 实施方式22.根据前述任一项实施方式的小鼠用于产生包含人轻链可变结构域的结合蛋白的用途。

[0232] 实施方式23.根据实施方式1-21中任一项的小鼠用于产生抗体的用途。

[0233] 实施方式24.实施方式23的用途,其中所述抗体为人抗体。

[0234] 实施方式25.根据实施方式1-21中任一项的小鼠用于产生双特异性抗体的用途。

[0235] 实施方式26.细胞或组织,其源自根据实施方式1-21中任一项的小鼠。

[0236] 实施方式27.实施方式26的细胞,其中所述细胞选自ES细胞、B细胞和杂交瘤。

实施例

[0237] 提供了下列实施例来描述如何制作和使用本发明的方法和组合物,而不意在限制发明人所认为是其发明的范围。除非另行指出,所示的温度是摄氏度,压力为大气压或接近大气压。

[0238] 实施例I

[0239] 将轻链基因区段导入重链基因座中

[0240] 使用VELOCIGENE®遗传工程化技术制造了多种靶向构建体(见,例如美国专利号6,586,251和Valenzuela,D.M.,Murphy,A.J.,Frendewey,D.,Gale,N.W.,Economides,A.N.,Auerbach,W.,Poueymirou,W.T.,Adams,N.C.,Rojas,J.,Yasenchak,J.,Chernomorsky,R.,Boucher,M.,Elsasser,A.L.,Esau,L.,Zheng,J.,Griffiths,J.A.,Wang,X.,Su,H.,Xue,Y.,Dominguez,M.G.,Noguera,I.,Torres,R.,Macdonald,L.E.,

Stewart,A.F.,DeChiara,T.M.,Yancopoulos,G.D.(2003).High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis.Nat Biotechnol 21,652-659),以修饰小鼠基因组细菌人工染色体(BAC)文库。通过同源重组修饰小鼠BAC DNA以通过靶向缺失V_H,D_H和J_H基因区段来灭活内源小鼠重链基因座,用于继而插入未重排人种系κ轻链基因序列(图2上部)。

[0241] 简要地,使用重组酶介导的重组在两个连续的靶向事件中缺失小鼠重链基因座。第一靶向事件包括使用从5'至3'包含5'小鼠同源臂、重组酶识别位点、新霉素盒和3'同源臂的靶向载体来在小鼠重链基因座的5'端进行靶向。所述5'和3'同源臂包含小鼠重链基因座的5'的序列。第二靶向事件包括使用从5'至3'包含5'小鼠同源臂、5'重组酶识别位点、第二重组酶识别位点、潮霉素盒、第三重组酶识别位点,和3'小鼠同源臂的第二靶向载体来在小鼠重链基因座的3'端、在J_H基因区段的区域中进行靶向。所述5'和3'同源臂含有侧接小鼠J_H基因区段及在内含子增强子和恒定区5'的序列。通过染色体核型分析证实了用两种靶向载体(如上文所述)都靶向的含有经修饰的重链基因座的阳性ES细胞。然后从所述双靶向ES细胞中分离DNA并使其经受用重组酶进行的处理,从而介导第一靶向载体中5'重组酶识别位点与第二靶向载体中5'重组酶识别位点之间的小鼠重链基因座的基因组DNA的缺失,留下单一的重组酶识别位点和侧翼为两个重组酶识别位点的潮霉素盒(见图2上部)。因此,创造了含有完整C_H基因的经修饰的小鼠重链基因座,用于使用下文所述的靶向载体以精确的方式逐步插入人κ种系基因区段。

[0242] 工程化了四种单独的靶向载体以使用本领域中所认可的标准分子技术来将40种人Vκ基因区段和五种人Jκ基因区段逐步插入灭活的小鼠重链基因座中(上文所述的)(图2)。用于工程化所述四种靶向构建体的人κ基因区段是在种系人κ轻链基因座的近端重叠群中天然发现的(图1B和表1)。

[0243] 将含有第一六个人Vκ基因区段和五个人Jκ基因区段的约110,499bp的人基因组片段工程化以在人Jκ5基因区段的下游(3')431bp含有PI-SceI位点。在含有小鼠重链内含子增强子、IgM转换区(Sμ)及小鼠重链基因座的IgM基因的约7,852bp基因组片段的5'端工程化另一个PI-SceI位点。通过与约110.5kb的人片段连接而将这种小鼠片段用作3'同源臂,这产生了3'连接,其从5'至3'含有约110.5kb的人κ轻链基因座的基因组序列,其含有第一六个连续Vκ基因区段和五个Jκ基因区段,PI-SceI位点,约7,852bp的含有小鼠内含子增强子、Sμ和小鼠IgM恒定基因的小鼠重链序列。在5'小鼠同源臂起始点之前,在人Vκ1-6基因区段的上游(5')是另外的3,710bp人κ序列,所述5'小鼠同源臂含有相应于小鼠重链基因座5'的序列的19,752bp的小鼠基因组DNA。在所述5'同源臂与人κ序列的起始点之间是新霉素盒,其侧翼是三个重组酶识别位点(见靶向载体1,图2)。用于人κ序列的第一插入的最终靶向载体从5'至3'包括5'同源臂(其含有重链基因座5'的约20kb的小鼠基因组序列),第一重组酶识别位点(R1),新霉素盒,第二重组酶识别位点(R2),第三重组酶识别位点(R3),约110.5kb的人基因组κ序列(含有第一六个连续的人Vκ基因区段和五个人Jκ基因区段),PI-SceI位点和3'同源臂(含有约8kb的小鼠基因组序列,包括内含子增强子、Sμ和小鼠IgM恒定基因)(见图2,靶向载体1)。与这一靶向载体的同源重组产生了经修饰的小鼠重链基因座,其含有与内源小鼠重链恒定基因可操作连接的六个人Vκ基因区段和五个人Jκ基因区段,其在重组后引起形成杂合重链(即人Vκ结构域和小鼠C_H区)。

[0244] 表1

[0245]

靶向载体	人κ序列的大小	所添加的人κ基因区段	
		V	J
1	~110.5 kb	4-1，5-2，7-3，2-4，1-5，1-6	1－5
2	~140 kb	3-7，1-8，1-9，2-10，3-11，1-12，1-13，2-14，3-15，1-16	-
3	~161 kb	1-17，2-18，2-19，3-20，6-21，1-22，1-23，2-24，3-25，2-26，1-27，2-28，2-29，2-30	-
4	~90 kb	3-31，1-32，1-33，3-34，1-35，2-36，1-37，2-38，1-39，2-40	-

[0246] 将十个另外的人Vκ基因区段导入杂合重链基因座中。工程化了第二个靶向载体用于将十个另外的人Vκ基因区段导入上文所述的经修饰的小鼠重链基因座中(见图2,靶向载体2)。用含有小鼠重链基因座5'的小鼠基因组序列的5'同源臂和含有人基因组κ序列的3'同源臂工程化了含有来自人κ轻链基因座的12个连续人Vκ基因区段的140,058bp的人基因组片段。在所述5'小鼠同源臂起始点之前,在人Vκ1-16基因区段的上游(5')是另外的10,170bp的人κ序列,所述5'小鼠同源臂与用于构建靶向载体1(见图2)的5'同源臂是相同的。在所述5'同源臂和人κ序列的起始点之间是潮霉素盒,其侧翼为重组酶识别位点。所述3'同源臂包括31,165bp的人基因组κ序列重叠,其相应于靶向载体1(图2)的人基因组κ序列的约110.5kb片段的等同的5'端。用于插入10个另外的人Vκ基因区段的最终靶向载体从5'至3'包括5'同源臂(其含有约20kb的重链基因座5'的小鼠基因组序列),第一重组酶识别位点(R1),潮霉素盒,第二重组酶识别位点(R2)以及约140kb的人基因组κ序列(其含有12个连续的人Vλ基因区段),其中的约31kb与靶向载体1的人κ序列的5'段重叠并作为此靶向构建体的3'同源臂。与此靶向载体的同源重组产生了经修饰的小鼠重链基因座,其含有与小鼠重链恒定基因可操作连接的16个人Vκ基因区段和五个人Jκ基因区段,其在重组后引起形成杂合重链。

[0247] 将十四个另外的人Vκ基因区段导入杂合重链基因座中。工程化第三个靶向载体以用于将14个另外的人Vκ基因区段导入上文所述的经修饰的小鼠重链基因座中(见图2,靶向载体3)。用5'同源臂(含有小鼠重链基因座5'的小鼠基因组序列)和3'同源臂(含有人基因组κ序列)工程化含有15个连续的人Vκ基因区段的160,579bp人基因组片段。人Vκ2-30基因区段的上游(5')是5'小鼠同源臂起始点之前的另外14,687bp的人κ序列,所述5'小鼠同源臂是用于之前的两个靶向载体相同的5'同源臂(上文所述,也见图2)。在所述5'同源臂和人κ序列的起始点之间是新霉素盒,其侧翼是重组酶识别位点。所述3'同源臂包括21,275bp的人基因组κ序列重叠,其相应于靶向载体2(图2)的人基因组κ序列的约140kb片段的等同5'端。用于插入14个另外的人Vκ基因区段的最终靶向载体从5'至3'包括5'同源臂(含有小鼠重链基因座5'的约20kb的小鼠基因组序列)、第一重组酶识别位点(R1),新霉素盒,第二重组酶识别位点(R2)和约161kb的人基因组κ序列(含有15个人Vκ基因区段),其中约21kb与靶

向载体2的人κ序列的5’端重叠并作为此靶向构建体的3’同源臂。与此靶向载体的同源重组产生与小鼠重链恒定基因可操作地连接的经修饰的小鼠重链基因座(含有30个人Vκ基因区段和五个人Jκ基因区段),其在重组后引起形成嵌合κ重链。

[0248] 将十个另外的人Vκ基因区段导入杂合重链基因座中。工程化了第四个靶向载体用于将10个另外的人Vκ基因区段导入上文所述的经修饰的小鼠重链基因座(见图2,靶向载体4)。用5’同源臂(含有小鼠重链基因座5’的小鼠基因组序列)和3’同源臂(含有人基因组κ序列)工程化90,398bp的人基因组片段(含有16个连续的人Vκ基因区段)。人Vκ2-40基因区段的上游(5’)是5’小鼠同源臂起始点之前的另外8,484bp的人κ序列,所述5’小鼠同源臂是之前的靶向载体的相同5’同源臂(如上文所述,也见图2)。在所述5’同源臂与人κ序列起始点之间是潮霉素盒,其侧翼是重组酶识别位点。所述3’同源臂包括人基因组κ序列的61,615bp的重叠,其相应于靶向载体3(图2)的人基因组κ序列的约160kb片段的等同5’端。用于插入10个另外的人Vκ基因区段的最终靶向载体从5’至3’包括5’同源臂(含有小鼠重链基因座5’的约20kb的小鼠基因组序列)、第一重组酶识别位点(R1)、潮霉素盒、第二重组酶识别位点(R2)和约90kb的人基因组κ序列(含有16个人Vκ基因区段),其中的约62kb与靶向载体3的人κ序列的5’端重叠并且作为此靶向构建体的3’同源臂。与此靶向载体的同源重组产生了经修饰的小鼠重链基因座,其含有与小鼠重链恒定基因可操作连接的40个人Vκ基因区段和五个人Jκ基因区段,其在重组后引起形成嵌合κ重链(图3)。

[0249] 使用如上文所述的相似的方法,构建了小鼠重链恒定区情境中人轻链可变结构域的其它组合。另外的轻链可变结构域可源自人Vλ和Jλ基因区段(图4A和4B)。

[0250] 人λ轻链基因座延伸超过1,000kb并且含有超过80个编码可变(V)或连接(J)区段的基因。根据已发表的报导,在人λ轻链基因座的70个Vλ基因区段中,30-38中的任何位置似乎都是功能性基因区段。70个Vλ序列被排布为三个簇,它们都含有不同V基因家族组(簇A,B和C)中的不同成员。在人λ轻链基因座中,所有所观察到的Vλ结构域中超过一半是由基因区段1-40,1-44,2-8,2-14和3-21编码的。有七个Jλ基因区段,其中仅有四个一般被认为是功能性Jλ基因区段(Jλ1,Jλ2,Jλ3和Jλ7)。报道了在一些等位基因中,第五个Jλ-Cλ基因区段对为假基因(Cλ6)。如本文所述将多个人Jλ基因区段并入杂合重链基因座中是通过从新合成构建的。以这种方式,用多个人Vλ基因区段工程化种系构型中含有多个人Jλ基因区段的基因组片段并允许其在重链恒定区的情境中进行正常的V-J重组。

[0251] 将轻链可变结构域与重链恒定区偶联代表了多样性的潜在丰富来源,用于在非人动物中产生具有人V_L区的独特V_L结合蛋白。在小鼠中利用人λ轻链基因座(或如上文所述的人κ基因座)的这种多样性引起对独特的杂合重链的工程化并向经遗传修饰的动物的免疫储库以及其随后作为产生治疗剂的下一代平台的用途提供另一个维度的结合蛋白。

[0252] 此外,人D_H和J_H(或Jκ)基因区段可与人Vκ或Vλ基因区段整合以构建新的杂合基因座,其在重组后将产生新的经工程化的可变结构域(图5A和5B)。在后者的情形中,工程化通常不包含在单一基因座中的基因区段的组合将需要特别注意与相应基因区段相关的重组信号序列(RSS)从而当将它们组合到单一基因座中时可实现正常的重组。例如,已知V(D)J重组是由保守的非编码DNA序列(已知为七聚物和九聚物序列,被发现临近于重组所发生的精确位置处的每个基因区段)指导的。在这些非编码DNA序列之间是长度为12或23碱基对(bp)的非保守间隔子区。一般地,重组仅发生在位于相同染色体的基因区段处,并且侧翼是

12-bp间隔子的那些基因区段可与侧翼是23-bp间隔子的基因区段连接(即12/23规则),虽然在一小部分抗体中观察到了两个D_H基因区段(每个侧翼都是12-bp间隔子)的连接。为了允许通常不具有相容间隔子的基因区段之间的重组(例如Vκ和D_H或D_H和Jλ),在所需基因区段的临近位置合成了独特的、相容的间隔子,用于构建独特的杂合重链,其允许成功的重组以形成含有轻链可变区的独特重链。

[0253] 因此,使用上述策略来将人κ轻链基因区段整合到内源重链基因座中允许了使用人λ轻链基因区段的其它组合、以及特定的人重链基因区段(例如D_H和J_H),以及它们的组合。

[0254] 实施例II

[0255] 鉴别在内源重链基因座处携带人轻链基因区段的被靶向的ES细胞

[0256] 使用前述实施例中制备的被靶向的BAC DNA来电穿孔小鼠ES细胞,以产生经修饰的ES细胞用于产生表达V_L结合蛋白(即与小鼠重链恒定区可操作连接的人κ轻链基因区段)的嵌合小鼠。通过定量PCR测定法**TAQMAN®**(Lie and Petropoulos,1998.Curr.Opin.Biotechnology 9:43-48)鉴别了含有未重排人κ轻链基因区段插入的ES细胞。设计了特定的引物组和探针用于人κ序列和相关选择盒的插入、小鼠重链序列的丧失和侧接所述内源重链基因座的小鼠序列的保留。

[0257] 可用表达重组酶的构建体转染携带人κ轻链基因区段的ES细胞,从而去除由插入含有人κ基因区段的靶向构建体而导入的任何不需要的选择盒。任选地,可通过与表达重组酶的小鼠繁殖而去除所述选择盒(例如US 6774279)。任选地,所述选择盒被保留在小鼠中。

[0258] 实施例III

[0259] 产生和分析表达V_L结合蛋白的小鼠

[0260] 使用上文所述的被靶向的ES细胞作为供体ES细胞并通过**VELOCIMOUSE®**方法将其引入8-细胞阶段的小鼠胚胎中(见,例如美国专利号7294754和Poueymirou,W.T.,Auerbach,W.,Frendewey,D.,Hickey,J.F.,Escaravage,J.M.,Esau,L.,Dore,A.T.,Stevens,S.,Adams,N.C.,Dominguez,M.G.,Gale,N.W.,Yancopoulos,G.D.,DeChiara,T.M.,Valenzuela,D.M.(2007))。F0代小鼠完全源自经基因-靶向的胚胎干细胞,这允许立即进行表型分析(Nat Biotechnol 25,91-99)。通过基因型分型鉴别了在小鼠重链基因座处独立携带人κ基因区段的**VELOCIMICE®**(F0小鼠完全源自供体ES细胞),其中使用检测内源重链基因座处独特人κ基因区段的存在(见上文)的等位基因测定法的改进(Valenzuela等人,见上文)。对幼崽进行基因分型,并且选择对于杂合重链基因基因座为杂合的幼崽用于表征V_L结合蛋白的表达。

[0261] 流式细胞术。在F1 ES系(F1H4;Valenzuela等人,2007,见上文)中进行将人κ轻链基因区段导入小鼠重链基因座中,所述F1 ES系源自129S6/SvEvTac和C57BL/6NTac杂合胚胎,其还含有人κ轻链基因区段对小鼠κ轻链基因区段的原位替代(US 6,596,541)。人κ轻链种系可变基因区段被靶向至129S6等位基因,其携带IgM^a单体型,而所述未经修饰的小鼠C576BL/6N等位基因携带IgM^b单倍体型。可通过使用特异于在IgM^a或IgM^b等位基因中发现的多态性的抗体通过流式细胞术来区分IgM的这些等位基因形式。使用流式细胞术,就人V_L结合蛋白的表达评估了实施例I中所描述的在内源重链基因座处携带人κ轻链基因区段的杂合小鼠。

[0262] 简要地,从小鼠(n=6/组)组中取血并使用玻片压磨。使用C57BL/6和Balb/c小鼠

作为对照组。用ACK裂解缓冲液(Lonza Walkersville)进行红细胞(RBC)裂解之后,将细胞重悬于BD Pharmingen FACS染色缓冲液中并用抗-小鼠CD16/32(BD Pharmingen)进行封闭。用抗小鼠IgM^b-FITC(BD Pharmingen),抗小鼠IgM^a-PE(BD Pharmingen),抗小鼠CD19(Clone 1D3;BD Biosciences)和抗小鼠CD3(17A2;BIOLEGEND®)对淋巴细胞进行染色,随后用BD CYTOFIX™进行固定,这些都根据生产商的指导进行。将最终的细胞沉淀物重悬于染色缓冲液中并使用BD FACSCALIBUR™和BD细胞QUEST PRO™软件进行分析。表2显示了在携带每种遗传修饰的动物组中观察到的B细胞($CD19^+$),T细胞($CD3^+$),杂合重链($CD19^+IgM^{a+}$)和野生型重链($CD19^+IgM^{b+}$)表达的平均百分比值。

[0263] 在相似的实验中,使用多种细胞表面标记物的流式细胞术就经过B细胞发育的进程分析了来自小鼠的脾、血液和骨髓部分的B细胞含量,所述小鼠对于与小鼠重链恒定区可操作连接的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的(实施例I中所描述的,图2)。

[0264] 简要地,将两组(每组n=3,8周大的雌性)野生型和对于与小鼠重链恒定区可操作连接的六个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的小鼠处死并收获血液、脾和骨髓。将血液收集到含有EDTA的microtainer管(BD Biosciences)中。通过用补充了胎牛血清、丙酮酸钠、Hepes、2-巯基乙醇、非必要氨基酸和庆大霉素的完全RPMI培养基冲洗而从股骨中收集骨髓。用ACK裂解缓冲液(Lonza Walkersville)裂解来自脾和骨髓制备物的RBC,随后用完全RPMI培养基进行清洗。

[0265] 在冰上用抗小鼠CD16/CD32(2.4G2,BD)将细胞($1x10^6$)孵育十分钟,随后用下列抗体混合物在冰上标记三十分钟:抗小鼠FITC-CD43(1B11,BIOLEGEND®),PE-ckit(2B8,BIOLEGEND®),PeCy7-IgM(II/41,EBIOSCIENCE®),PerCP-Cy5.5-IgD(11-26c.2a,BIOLEGEND®),APC-eFluor 780-B220(RA3-6B2,EBIOSCIENCE®),APC-CD19(MB19-1,EBIOSCIENCE®)。骨髓:不成熟的B细胞($B220^{int}IgM^+$),成熟的B细胞($B220^{hi}IgM^+$),原B细胞($CD19^+ckit^+CD43^+$),前B细胞($CD19^+ckit^-CD43^-$),前-B细胞($CD19^+CD43^{int}IgM^{+/-}$),不成熟的B细胞($CD19^+CD43^-IgM^{+/-}$)。血液和脾:B细胞($CD19^+$),成熟B细胞($CD19^+IgM^{int}IgD^{hi}$),过渡性/不成熟B细胞($CD19^+IgM^{hi}IgD^{int}$)。

[0266] 在染色之后,清洗细胞并在2%甲醛中固定。在LSRII流式细胞分析仪上进行数据获取并用FLOWJO™软件(Tree Star,Inc.)进行分析。图6A,6B和6C显示了脾部分的结果。图7A-7G显示了骨髓部分的结果。与来自每组的脾部分的结果相比,从每组小鼠的血液部分获得的结果显示出相似的结果(数据未显示)。

[0267] 在相似的实验中,使用多种细胞表面标记物的流式细胞术就经过B细胞发育的进程分析了来自小鼠脾、血液和骨髓部分的B细胞含量,所述小鼠对于与小鼠重链恒定区可操作连接的三十个人Vκ和五个人Jκ基因区段为纯合的(实施例I中所述,图2)。

[0268] 简要地,将两组(每组n=3,6周大的雌性)含有野生型重链基因座和人Vκ及Jκ基因区段对内源Vκ和Jκ基因区段的替代的小鼠(WT)以及对于三十个hVκ和五个Jκ基因区段为纯合并且含有人Vκ及Jκ基因区段对内源Vκ和Jκ基因区段的替代的小鼠(30hVκ-5hJκHO)处死并收获脾脾和骨髓。准备骨髓和脾细胞用于用多种细胞表面标记物进行染色(如上文所述)。

[0269] 用抗小鼠CD16/CD32(2.4G2,BD Biosciences)将细胞($1x\ 10^6$)在冰上孵育十分钟,随后用骨髓或脾细胞组在冰上标记三十分钟。骨髓组:抗小鼠FITC-CD43(1B11,

BIOLEGEND®),PE-ckit(2B8,BIOLEGEND®),PeCy7-IgM(II/41,EBIOSCIENCE®),APC-CD19(MB19-1,EBIOSCIENCE®)。骨髓和脾组:抗小鼠FITC-Igκ(187.1BD Biosciences),PE-Igλ(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)。骨髓:不成熟B细胞($B220^{int}IgM^{+}$),成熟B细胞($B220^{hi}IgM^{+}$),原B细胞($CD19^{+}ckit^{+}CD43^{+}$),前B细胞(CD19+ckit-CD43-),不成熟$Ig\kappa^{+}$B细胞($B220^{int}IgM^{+}Ig\kappa^{+}Ig\lambda^{-}$),不成熟$Ig\lambda^{+}$B细胞($B220^{int}IgM^{+}Ig\kappa^{-}Ig\lambda^{+}$),成熟$Ig\kappa^{+}$B细胞($B220^{hi}IgM^{+}Ig\kappa^{+}Ig\lambda^{-}$),成熟$Ig\lambda^{+}$B细胞($B220^{hi}IgM^{+}Ig\kappa^{-}Ig\lambda^{+}$)。脾:B细胞($CD19^{+}$),成熟B细胞($CD19^{+}IgD^{hi}IgM^{int}$),过渡性/不成熟B细胞($CD19^{+}IgD^{int}IgM^{hi}$)。骨髓和脾:$Ig\kappa^{+}$B细胞($CD19^{+}Ig\kappa^{+}Ig\lambda^{-}$),$Ig\lambda^{+}$B细胞($CD19^{+}Ig\kappa^{-}Ig\lambda^{+}$)。

[0270] 染色之后,清洗细胞并在2%甲醛中固定。在LSRII流式细胞分析仪上进行数据获取并用FLOWJO™软件(Tree Star,Inc.)进行分析。与对于六个人Vκ和五个人Jκ基因区段纯合的小鼠(上文所述)相比,对于所有三个部分结果都显示出相似的染色模式和细胞群。然而,这些小鼠显示出脾和骨髓部分都缺少内源λ轻链表达(分别为图8A和8B),虽然所述内源λ轻链基因座在这些小鼠中是完整的。这可反映出重排的人κ轻链结构域在重链恒定区的情境中不能与鼠λ轻链结构域配对或缔合,导致缺失$Ig\lambda^{+}$细胞。

[0271] 同种型表达。对于人重链和κ轻链可变基因基因座为纯合的小鼠(VELCOIMMUNE®人源化小鼠,见US 7,105,348)和对于工程化到内源重链基因座中的六个人Vκ和5个人Jκ基因区段为纯合的小鼠(6hVκ-5hJκHO)使用TAQMAN®探针、通过定量PCR测定确定了总的及表面(即膜结合的)免疫球蛋白M(IgM)和免疫球蛋白G1(IgG1)(如上文实施例II中所描述的)。

[0272] 简要地,根据制造商的指导,使用小鼠CD19微珠(Miltenyi Biotec)从小鼠组(n=3至4小鼠/组)的脾中纯化了$CD19^{+}$B细胞。使用RNEASY™迷你试剂盒(Qiagen)纯化了总的RNA。使用无RNA酶的DNA酶在柱处理(Qiagen)上移除基因组RNA。使用第一链cDNA合成试剂盒(Invitrogen)将约200ng mRNA反转录为cDNA,然后使用ABI 7900序列检测系统(Applied Biosystems)以TAQMAN®通用PCR Master混合物(Applied Biosystems)进行扩增。采用了独特的引物/探针组合来特异性地确定IgM和IgG1同种型的总的、表面的(即跨膜的)和分泌形式的表达(表3)。针对小鼠κ恒定区(mCκ)对相对表达进行归一化。

[0273] 表2

[0274]

小鼠基因型	% CD3	% CD19	% IgM[a]	% IgM[b]
C57BL/6	22	63	0	100
Balb/c	11	60	100	0
6hVκ-5hJκ HET	43	30	7	85
16hVκ-5hJκ HET	33	41	7	81

[0275] 表3

[0276]

同种型	序列 (5'-3')	SEQ ID NO:
表面 IgM	有义: GAGAGGACCG TGGACAAGTC	1
	反义: TGACGGTGGT GCTGTAGAAG	2
	探针: ATGCTGAGGA GGAAGGCTTT GAGAACCT	3
总 IgM	有义: GCTCGTGAGC AACTGAACCT	4
	反义: GCCACTGCAC ACTGATGTC	5
	探针: AGTCAGCCAC AGTCACCTGC CTG	6
表面 IgG1	有义: GCCTGCACAA CCACCATAC	7
	反义: GAGCAGGAAG AGGCTGATGA AG	8
	探针: AGAAGAGCCT CTCCCACTCT CCTGG	9
总 IgG1	有义: CAGCCAGCGG AGAACTACAA G	10
	反义: GCCTCCCAGT TGCTCTTCTG	11
	探针: AACACTCAGC CCATCATGGA CACA	12

[0277]

Cκ	有义: TGAGCAGCAC CCTCACGTT	13
	反义: GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	14
	探针: ACCAAGGACG AGTATGAA	15

[0278] 来自定量**TAQMAN®**PCR测定的结果显示出总IgM和总IgG1的减少。然而,与**VELCOIMMUNE®**人源化小鼠相比,分泌的与表面形式的IgM和IgG1的比率显示正常(数据未显示)。

[0279] 人κ基因区段使用和Vκ-Jκ连接分析。就小鼠重链(IgG)上独特的人Vκ-Jκ重排分析了对于三十个hVκ和五个Jκ基因区段为纯化并且以人Vκ和Jκ基因区段对内源Vκ和Jκ基因区段的替代的幼稚小鼠(30hVκ-5hJκHO),其中使用分离自脾细胞的RNA、通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)进行分析。

[0280] 简要地,收获脾并在无菌的一次性袋子中用10mL含有5％ HI-FBS的RPMI-1640(Sigma)进行灌注。然后将含有单一脾的每个袋子都置于STOMACHER™(Seward)中并在中等设置下均质化30秒。使用0.7μm的细胞过滤器过滤经均质化的脾,然后用离心机将其沉淀(1000rpm,10分钟)并在BD PHARM LYSE™(BD Biosciences)中裂解RBC 3分钟。用RPMI-1640稀释脾细胞并再次离心,随后重悬于1mL的PBS(Irvine Scientific)中。使用本领域中已知的标准技术从沉淀的脾细胞中分离RNA。

[0281] 使用特异于人hVκ基因区段和小鼠IgG的引物在脾细胞RNA上进行RT-PCR。设计小鼠IgG引物,从而使得其能够扩增源自所有小鼠IgG同种型的RNA。用凝胶纯化PCR产物并将其克隆到pCR2.1-TOPO TA载体(Invitrogen)中,并且用引物M13正向(GTAAAACGAC GGCCAG;SEQ ID NO:16)和M13反向(CAGGAAACAG CTATGAC;SEQ ID NO:17)进行测序,所述引物位于所述载体中侧翼于克隆位点的位置。表4中显示了在12个所选的克隆中人Vκ和Jκ基因区段的使用。图9显示了用于十二个所选的RT-PCR克隆的hVκ-hJκ-mIgG连接的核苷酸序列。

[0282] 如此实施例中所示的,对于六个人Vκ和五个人Jκ基因区段纯合或者对于与小鼠重链恒定区可操作连接的三十个人Vκ和五个人Jκ基因区段纯合的小鼠显示出来自经修饰的

重链基因座(含有为其种系构型的轻链可变基因区段)的人轻链可变区的表达。在这些小鼠中观察到了进展经过B细胞发育的各个阶段,表明来自内源重链基因座的、涉及轻链可变基因区段的多个生产性重组事件以及这种杂合重链(即与重链恒定区相连接的人轻链可变区)作为抗体储库的一部分的表达。

[0283] 表4

[0284]

克隆	杂合重链			SEQ ID NO:
	Vκ	Jκ	C_H	
1E	1-5	4	IgG2A/C	18
1G	1-9	4	IgG2A/C	19
1A	1-16	5	IgG3	20
2E	1-12	2	IgG1	21
1C	1-27	4	IgG2A/C	22
2H	2-28	1	IgG1	23
3D	3-11	4	IgG1	24
3A	3-20	4	IgG2A/C	25
4B	4-1	5	IgG2A/C	26
4C	4-1	2	IgG3	27
5A	5-2	2	IgG2A/C	28
5D	5-2	1	IgG1	29

[0285] 实施例IV

[0286] 繁育表达V_L结合蛋白的小鼠

[0287] 为了产生新一代的V_L结合蛋白,可将携带未重排的人κ基因区段的小鼠与含有其它内源重链等位基因的缺失的另一种小鼠进行繁育。以这种方式,所获得的后代将仅表达如实施例I中所描述的杂合重链。通过本领域中所认可的标准技术来进行繁育,且备选地,所述繁育由商业公司(例如The Jackson Laboratory)进行。就独特杂合重链的存在和传统小鼠重链的不存在筛选携带杂合重链基因座的小鼠品系。

[0288] 备选地,可通过与含有一个或多个小鼠轻链基因座(κ和λ)中的缺失的其它小鼠进行繁育而优化在小鼠重链基因座处携带有未重排的人κ基因区段的小鼠。以这种方式,所获得的后代将表达如实施例I中所述的独特的仅有人κ重链的抗体。通过本领域中所认可的标准技术来类似地进行繁育,备选地,所述繁育由商业公司(例如The Jackson Laboratory)进行。就含有人κ轻链结构域和小鼠重链恒定结构域的独特杂合重链的存在以及内源小鼠轻链的不存在筛选携带杂合重链基因座和小鼠轻链基因座的一个或多个缺失的小鼠品系。

[0289] 还将携带未重排的杂合重链基因座的小鼠与含有人κ轻链可变基因基因座对内源小鼠κ轻链可变基因基因座的替代的小鼠(见US 6,596,541,Regeneron Pharmaceuticals, **VELOCIMMUNE®**人源化小鼠技术)进行繁育。所述**VELOCIMMUNE®**人源化小鼠包括(部分地)具有包含与内源小鼠κ轻链可变恒定区基因座可操作连接的人κ轻链可变区的基因组,从而所述小鼠响应于抗原性刺激而产生包含人κ轻链可变结构域和小鼠

重链恒定结构域的抗体。可分离编码所述抗体的轻链可变区的DNA并将其与编码人轻链恒定区的DNA可操作连接。然后,可在能够表达抗体的全人轻链的细胞中表达所述DNA。在适当的繁育计划之后,可获得携带人κ轻链基因座对内源小鼠κ轻链的替代以及未重排的杂合重链基因座的小鼠。在用目的抗原进行免疫接种后,可分离含有经体细胞突变的人Vκ结构域的独特的V_L结合蛋白。

[0290] 实施例V

[0291] V_L结合蛋白的产生

[0292] 在将含有未重排的杂合重链基因座的小鼠与含有其它内源Ig基因座的修饰和缺失的多种所需品系进行繁育后(如实施例IV中所述),可用目的抗原免疫接种所选的小鼠。

[0293] 一般地,用抗原刺激含有至少一个杂合重链基因座的VELOCIMMUNE®人源化小鼠,并从所述动物(例如从脾或淋巴结)中回收细胞(例如B-细胞)。可使所述细胞与骨髓瘤细胞系相融合以制备永生杂交瘤细胞系,并且筛选和选择这种杂交瘤细胞系以鉴别出产生含有特异于用于免疫接种的抗原的杂合重链的抗体的杂交瘤细胞系。可分离编码所述杂合重链的人Vκ区的DNA并将其与所需的恒定区(例如重链和/或轻链)相连接。由于存在与小鼠重链恒定区相融合的人Vκ基因区段,产生了独特的抗体样储库并且由于所产生的独特抗体形式而大大增加了免疫球蛋白储库的多样性。这在免疫接种后赋予了抗原特异性储库增加水平的多样性。所产生的经克隆的抗体序列可随后在细胞(例如CHO细胞)中产生。备选地,可直接从抗原特异性淋巴细胞(例如B细胞)中分离编码所述抗原特异性V_L结合蛋白或所述可变结构域的DNA。

[0294] 起初,分离了高亲和力V_L结合蛋白,其具有人Vκ区和小鼠恒定区。如上文中所描述的,表征所述V_L结合蛋白并就所需的特性对其进行选择,所述特性包括亲和力、选择性、表位等。用所需的人恒定区替代小鼠恒定区以从本发明的未重排的杂合重链基因座产生含有经体细胞突变的人Vκ结构域的独特的全人V_L结合蛋白。合适的人恒定区包括,例如野生型或经修饰的IgG1或IgG4或者,备选地Cκ或Cλ。

[0295] 用人细胞-表面受体蛋白质(抗原X)免疫接种分别的小鼠群,所述小鼠含有用六个人Vκ和五个人Jκ基因区段对内源小鼠重链基因座的替代(如实施例I中所述)以及用人Vκ和Jκ基因区段对内源Vκ和Jκ的替代。以每3-4天的六次连续注射将抗原X直接施用在小鼠的后足垫上。在注射前,将两至三微克抗原X与10μg的CpG寡核苷酸(Cat#tlrl-modn-ODN1826寡核苷酸;InVivogen,San Diego,CA)及25μg的Adju-Phos(磷酸铝凝胶佐剂,Cat#H-71639-250;Brenntag Biosector,Frederikssund,丹麦)相混合。在最终的抗原回忆(recall)之前总共给予六次注射,所述抗原回忆在处死前3-5天给予。在第四次和第六次注射之后收集血液并通过标准的抗原特异性免疫测定法监控抗体免疫应答。

[0296] 当实现了所需的免疫应答时,收获脾细胞并将其与小鼠骨髓瘤细胞相融合以保存其存活性并形成杂交瘤细胞系。筛选并选择所述杂交瘤细胞系以鉴别出产生抗原X特异性V_L结合蛋白的细胞系。使用这种技术获得了数种抗-抗原X特异性V_L结合蛋白(即在小鼠重链和轻链恒定结构域的情境中具有人Vκ结构域的结合蛋白)。

[0297] 备选地,直接从抗原阳性B细胞中分离抗-抗原X V_L结合蛋白而不与骨髓瘤细胞融合,如U.S.2007/0280945A1中所描述的,在此以其全部通过引用而特别并入。使用这种方法,获得了数种全人抗-抗原X V_L结合蛋白(即具有人Vκ结构域和人恒定结构域的抗体)。

[0298] 人κ基因区段使用。为了分析所产生的抗-抗原X V_L结合蛋白的结构，克隆了编码人Vκ结构域(来自V_L结合蛋白的重链和轻链)的核酸并使用从US2007/0280945A1(见上文)中所描述的那些方法调适的方法进行测序。从所述核酸序列和所预测的抗体氨基酸序列，对从经免疫的小鼠获得的所选V_L结合蛋白的杂合重链可变区(如上所述)鉴别了基因使用。表5显示了来自所选抗-抗原X V_L结合蛋白的人Vκ和Jκ基因区段的基因使用，其显示出由于内源重链和κ轻链基因座(二者均含有未重排的人Vκ和Jκ基因区段)处的多种重排，根据本发明的小鼠从多种人Vκ和Jκ基因区段产生抗原特异性V_L结合蛋白。人Vκ基因区段与多种人Jκ区段重排以产生独特的抗原特异性V_L结合蛋白。

[0299] 表5

[0300]

抗体	杂合重链		轻链	
	Vκ	Jκ	Vκ	Jκ
A	4-1	3	3-20	1
B	4-1	3	3-20	1
C	4-1	3	3-20	1
D	4-1	3	3-20	1
E	4-1	3	3-20	1
F	4-1	3	3-20	1
G	4-1	3	3-20	1
H	4-1	3	3-20	1
I	4-1	3	3-20	1
J	1-5	3	1-33	3

[0301]

K	4-1	3	3-20	1
L	4-1	3	1-9	3
M	4-1	1	1-33	4
N	4-1	1	1-33	3
O	1-5	1	1-9	2
P	1-5	3	1-16	4
Q	4-1	3	3-20	1
R	4-1	3	3-20	1
S	1-5	1	1-9	2
T	1-5	1	1-9	2
U	5-2	2	1-9	3
V	1-5	2	1-9	2
W	4-1	1	1-33	4

[0302] 酶联免疫吸附测定(ELISA)。在ELISA测定中，就其阻断抗原X的天然配体(配体Y)

的结合的能力测试了针对抗原X产生的人V_L结合蛋白。

[0303] 简要地,以在PBS中稀释的2μg/mL的浓度将配体Y涂覆在96孔板上并过夜孵育,随后用含有0.05% Tween-20的PBS清洗四次。然后用含有0.5%(w/v)BSA(Sigma-Aldrich Corp.,St.Louis,MO)的PBS(Irvine Scientific,Santa Ana,CA)将所述板在室温下封闭一小时。在另外的板中,以1:10在缓冲液中稀释含有抗-抗原X V_L结合蛋白的上清液。使用含有相同V_L结合蛋白组分的模拟上清作为阴性对照。将抗原X的细胞外结构域(ECD)与小鼠IgG2a的Fc部分缀合(抗原X-mFc)。以0.150nM的终浓度加入抗原X-mFc并在室温下孵育1小时。然后,将V_L结合蛋白/抗原X-mFc混合物加入含有配体Y的板中并在室温下孵育1小时。用与抗5-His抗体缀合的辣根过氧化物酶(HRP)(Qiagen,Valencia,CA)来确定结合至配体Y的抗原X-mFc的检测,并使用以硫酸中和的四甲基联苯胺(TMB)底物(BD Biosciences,San Jose,CA)、通过标准的比色反应进行显色。在OD450处读取吸光度0.1秒。从所有的样品中减去不含抗原X的样品的背景吸光度。如下对大于250种(三个96孔板)抗原X特异性V_L结合蛋白计算了百分比封闭:用每个样品的减去了背景的MFI除以经调整的阴性对照值,乘以100并用100减去所得的值。

[0304] 结果显示出数种从用抗原X免疫接种的小鼠分离的V_L结合蛋白都特异性结合与小鼠IgG2a的Fc部分融合的抗原X的细胞外结构域(数据未显示)。

[0305] 亲和力确定。使用BIACORE™T100设备(GE Healthcare)、通过SPR(表面等离子体共振)确定了所选择的抗原X特异性V_L结合蛋白上清液的平衡解离常数(K_D)。所有的数据都是通过使用HBS-EP(10mM HEPES,150mM NaCl,0.3mM EDTA,0.05%表面活性剂P20,pH 7.4)作为运行和样品缓冲液而获得的(在25℃)。

[0306] 简要地,在CM5感应芯片表面上从粗制上清液样品中捕获V_L结合蛋白,之前使用标准胺偶联化学以高密度的抗人Fc抗体将所述感应芯片表面衍生化。在捕获步骤的过程中,以3μL/min的流速将上清液注射跨过抗人Fc表面总过3分钟。所述捕获步骤之后是以35μL/min的流速注射运行缓冲液或者浓度为100nM的分析物2分钟。监控抗原从被捕获的V_L结合蛋白的解离6分钟。通过简短地注射10mM甘油(pH 1.5)来去除被捕获的V_L结合蛋白。通过从分析物传感图中减去来自缓冲液注射的传感图而对所有的传感图进行双参照,从而去除由V_L结合蛋白从捕获表面解离而引起的假象。使用BIAcore T100评估软件v2.1以质量传递使每种V_L结合蛋白的结合数据拟合至1:1结合模型。

[0307] 三十四个所选的V_L结合蛋白的结合亲和性是不同的,其中所有都展现出纳摩尔范围内的K_D(1.5至130nM)。此外,约70%所选的V_L结合蛋白(34种中的23种)显示出单位数的纳摩尔亲和力。对这些所选V_L结合蛋白的$T^{1/2}$测量显示出约0.2至66分钟的范围。在所述三十四种V_L结合蛋白中,六种显示出大于3nM的对抗原X的亲和力(1.53,2.23,2.58,2.59,2.79和2.84)。所述亲和力数据与由与重链和轻链恒定区相连的重排人轻链可变结构域的组合缔合产生的V_L结合蛋白相一致(描述在表4中),其为高亲和力、经克隆选择、和经体细胞突变的。由本文所描述的小鼠产生的V_L结合蛋白包含多样的高亲和力独特结合蛋白的集合,所述结合蛋白展现出对于抗原X上的一个或多个表位的特异性。

[0308] 在另一个实验中,在**LUMINEX®**基于珠子的测定中就其阻断抗原X的天然配体(配体Y)与抗原X结合的能力测试了所选的针对抗原X产生的人V_L结合蛋白。这些结果显示出,除了以纳摩尔范围的亲和力(上文所述)特异性地结合抗原X的细胞外结构域外,所选

的V_L结合蛋白还能够结合来自猕猴(食蟹猴)的抗原X。

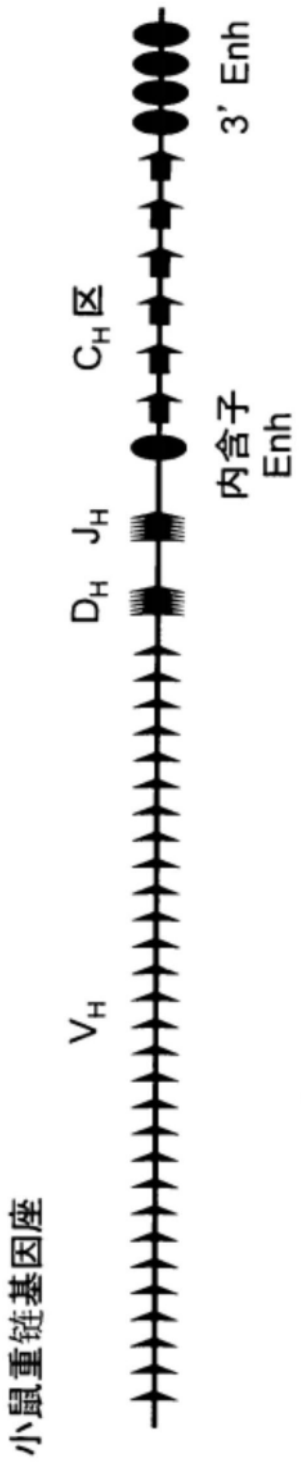


图1A

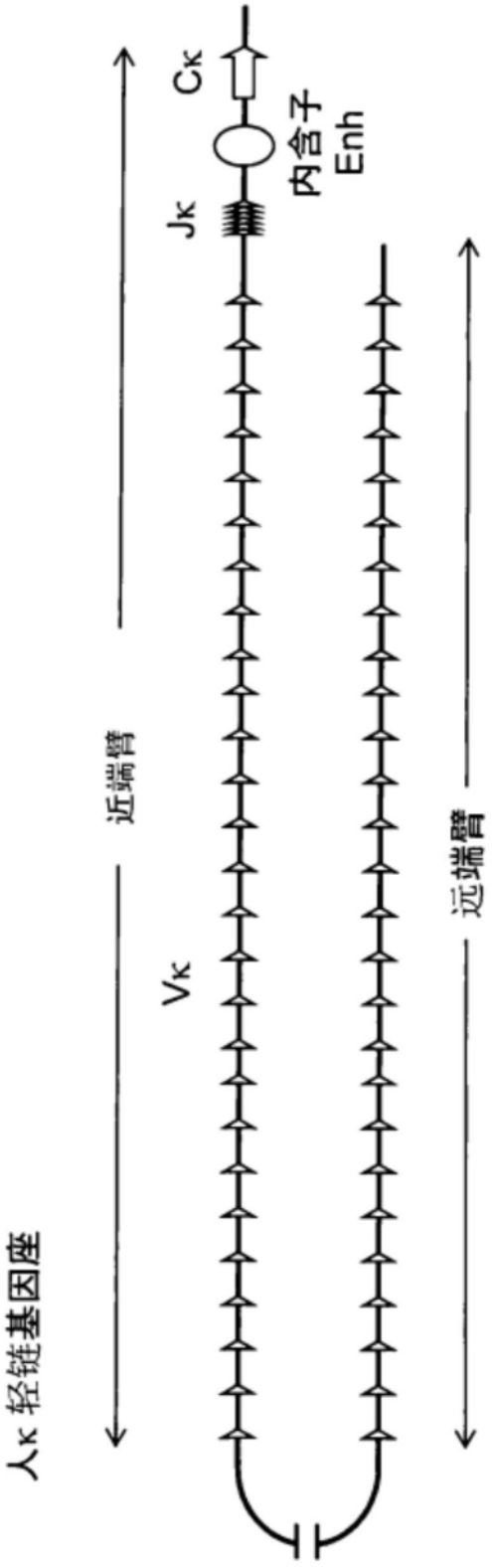


图1B

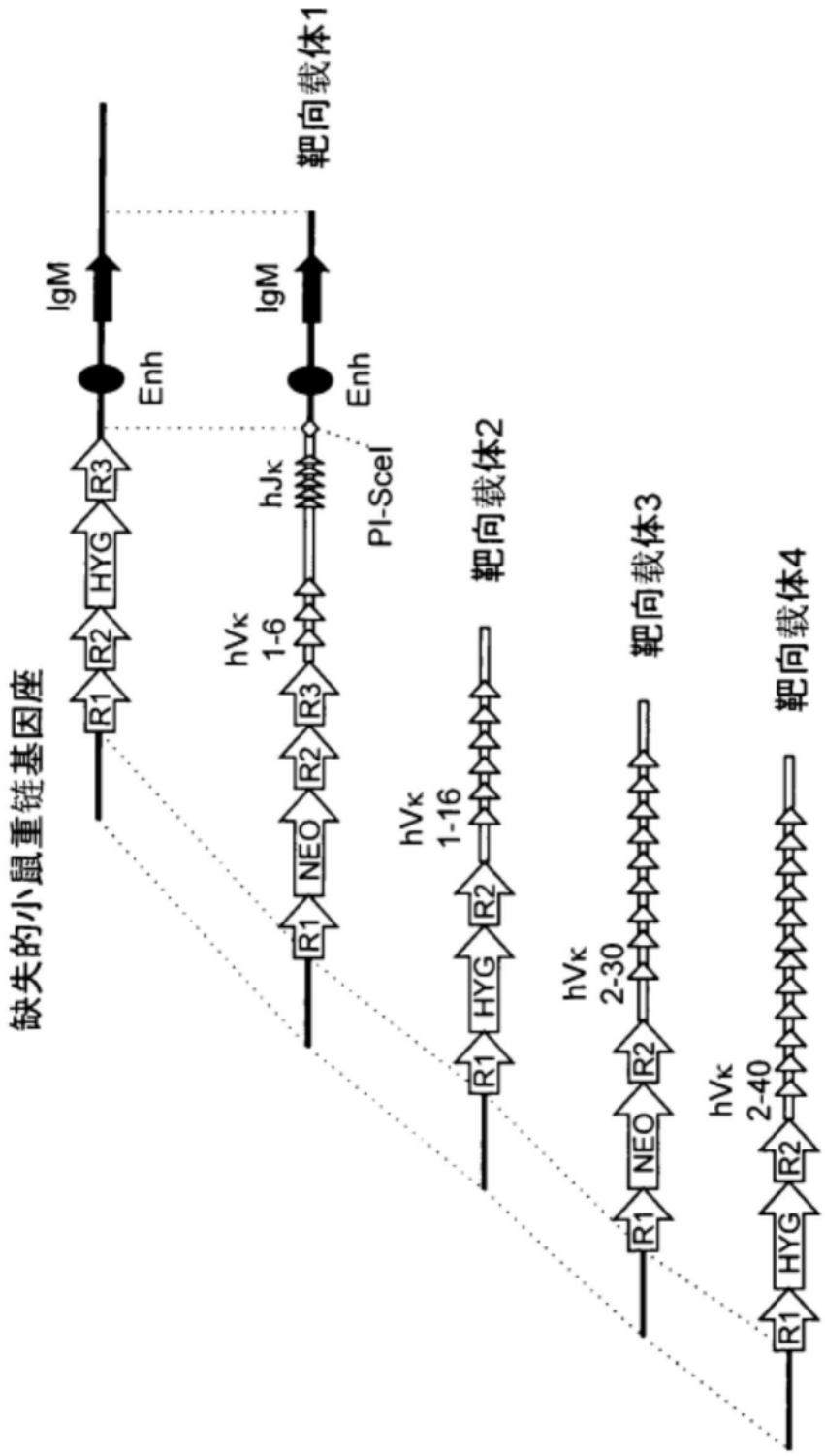

缺失的小鼠重链基因座
IgM
Enh
R1
R2
HYG
R3
靶向载体1
IgM
Enh
hJκ
PI-SceI
hVκ
1-6
R1
NEO
R2
R3
靶向载体2
hVκ
1-16
R1
HYG
R2
靶向载体3
hVκ
2-30
R1
NEO
R2
靶向载体4
hVκ
2-40
R1
HYG
R2

图2

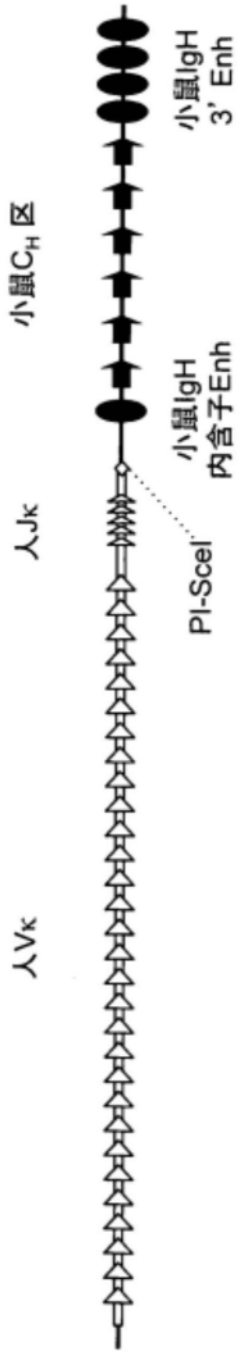


图3

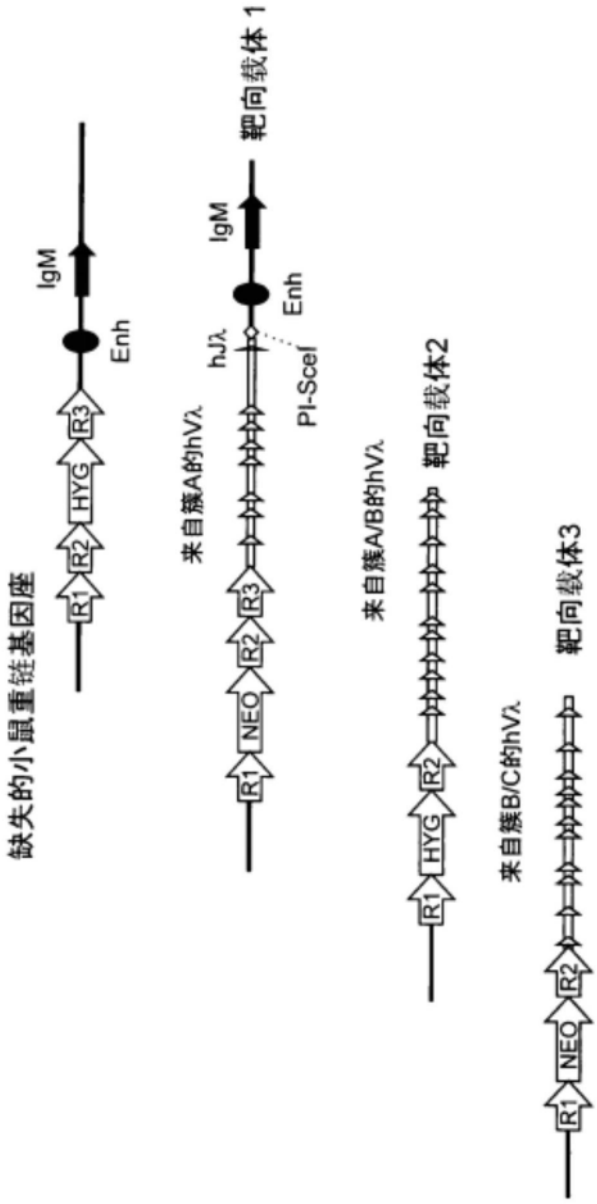

缺失的小鼠重链基因座
IgM
Enh
R1
R2
HYG
R3
来自簇A的hVλ
hJλ
IgM
Enh
PI-SceI
靶向载体 1
R1
NEO
R2
R3
来自簇A/B的hVλ
R1
HYG
R2
靶向载体2
来自簇B/C的hVλ
R1
NEO
R2
靶向载体3

图4A

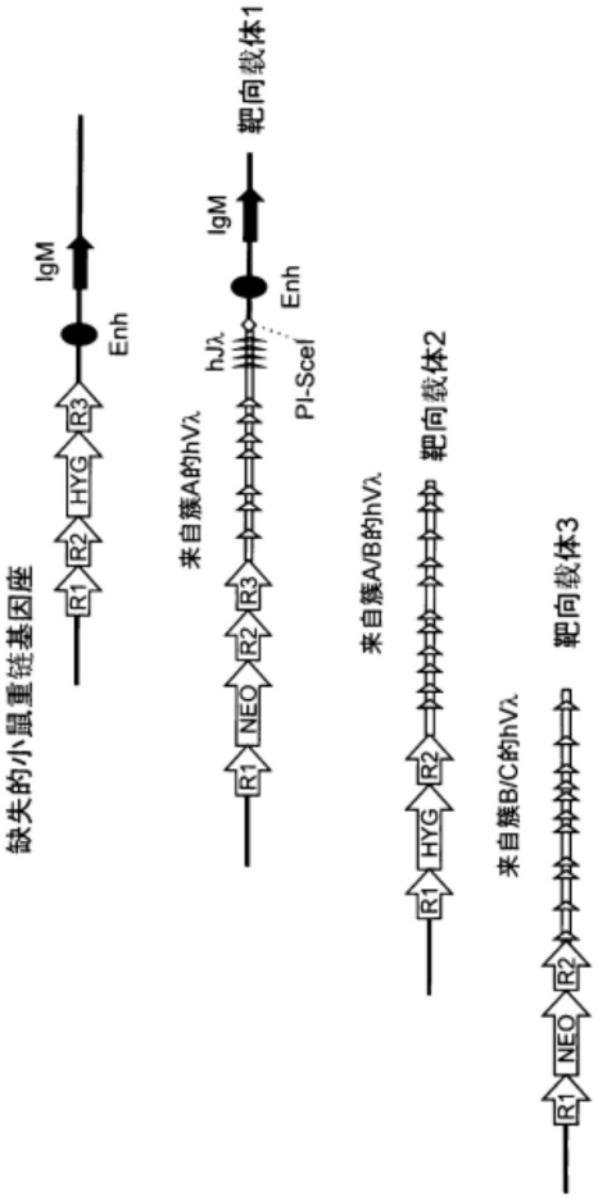

缺失的小鼠重链基因座
IgM
Enh
R1
R2
HYG
R3
来自簇A的hVλ
hJλ
IgM
Enh
PI-SceI
靶向载体1
R1
NEO
R2
R3
来自簇A/B的hVλ
R1
HYG
R2
靶向载体2
来自簇B/C的hVλ
R1
NEO
R2
靶向载体3

图4B

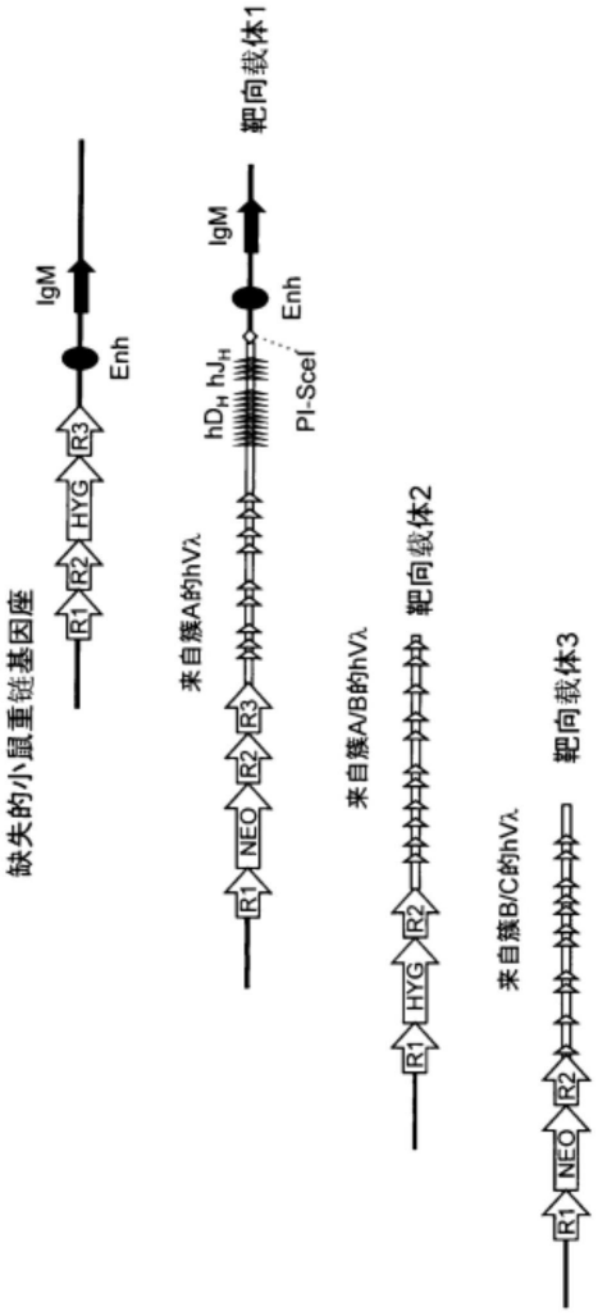

缺失的小鼠重链基因座
IgM
Enh
R1
R2
HYG
R3
来自簇A的hVλ
hDH hJH
IgM
Enh
PI-SceI
靶向载体1
R1
NEO
R2
R3
来自簇A/B的hVλ
R1
HYG
R2
靶向载体2
来自簇B/C的hVλ
R1
NEO
R2
靶向载体3

图5A

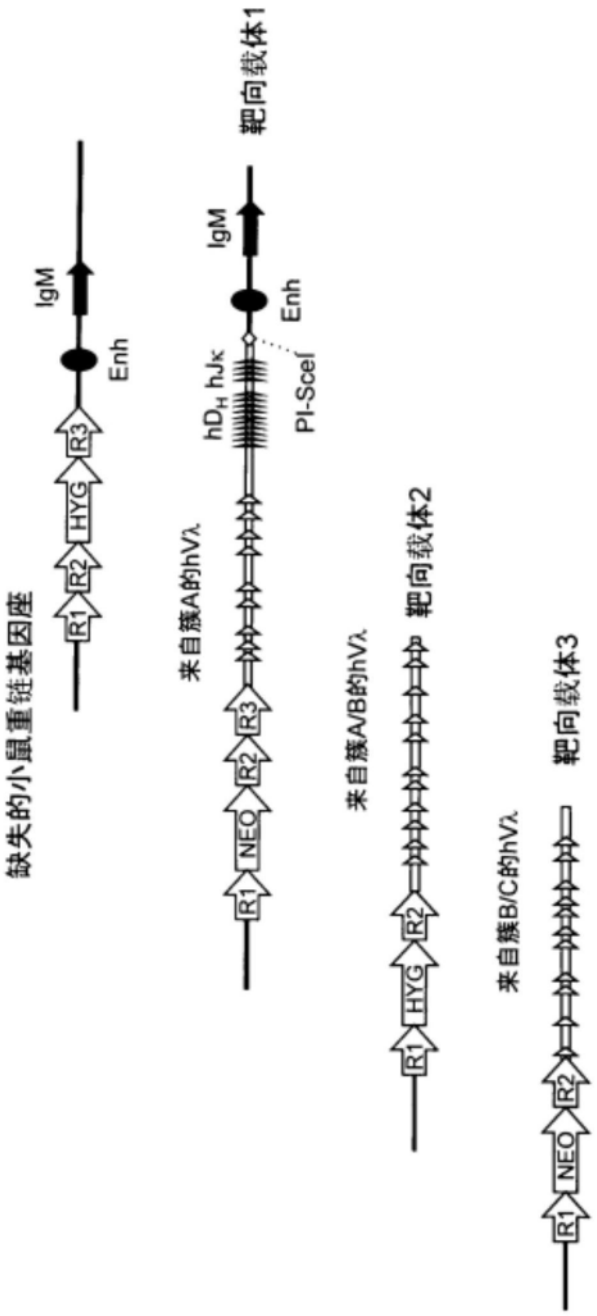

缺失的小鼠重链基因座
IgM
Enh
R1
R2
HYG
R3
来自簇A的hVλ
hDH hJκ
IgM
Enh
PI-SceI
靶向载体1
R1
NEO
R2
R3
来自簇A/B的hVλ
靶向载体2
R1
HYG
R2
来自簇B/C的hVλ
靶向载体3
R1
NEO
R2

图5B

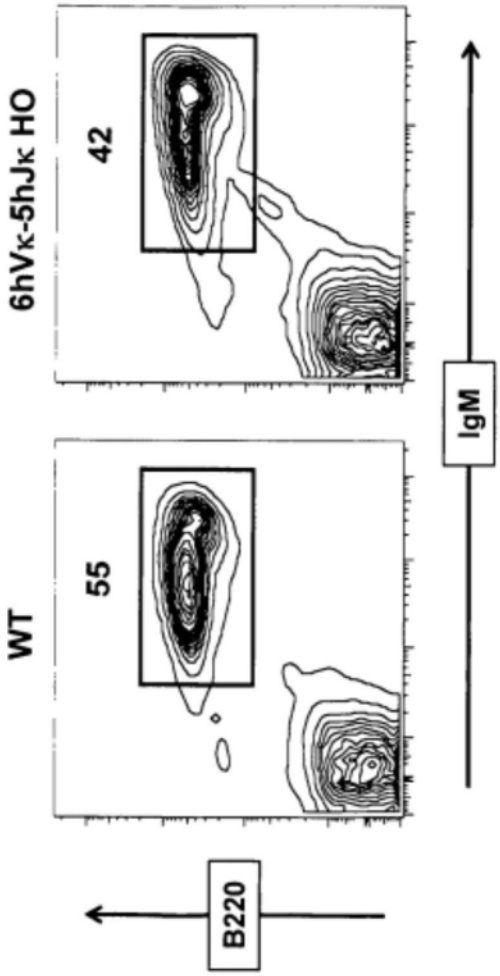


图6A

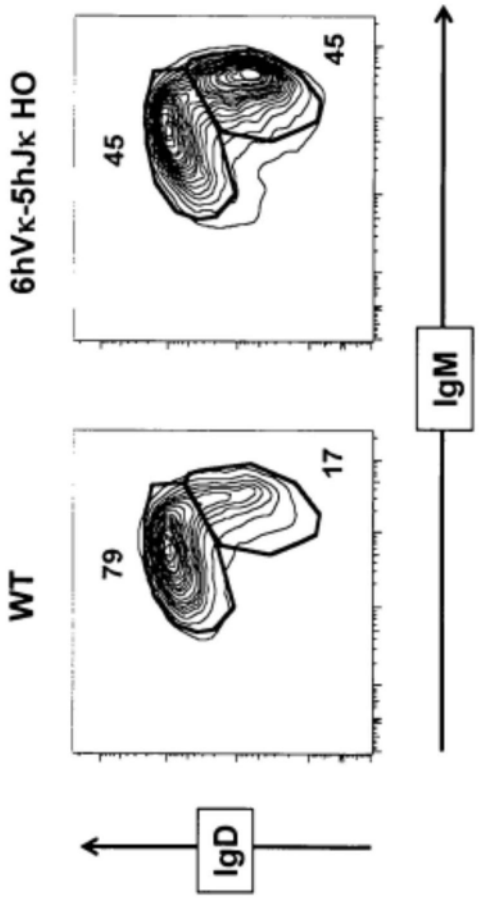


图6B

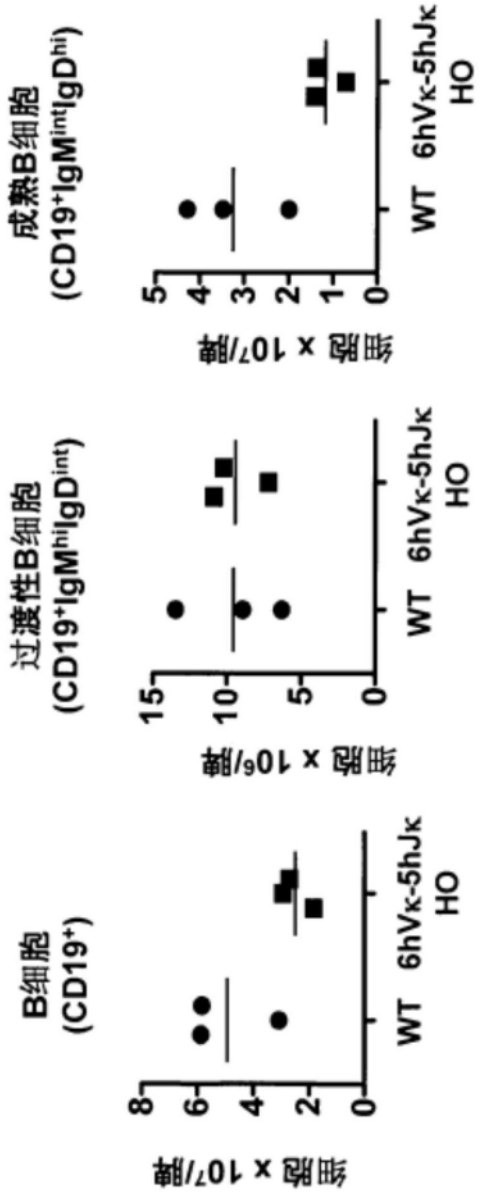

成熟B细胞
(CD19+IgMintIgDhi)
细胞 x 10^7/脾
0
1
2
3
4
5
WT
6hVκ-5hJκ HO
过渡性B细胞
(CD19+IgMhiIgDint)
细胞 x 10^6/脾
0
5
10
15
WT
6hVκ-5hJκ HO
B细胞
(CD19+)
细胞 x 10^7/脾
0
2
4
6
8
WT
6hVκ-5hJκ HO

图6C

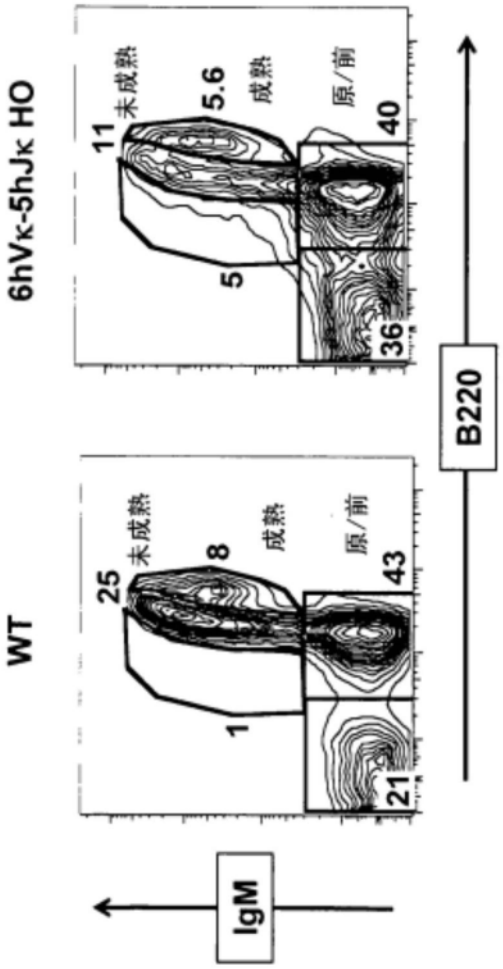


图7A

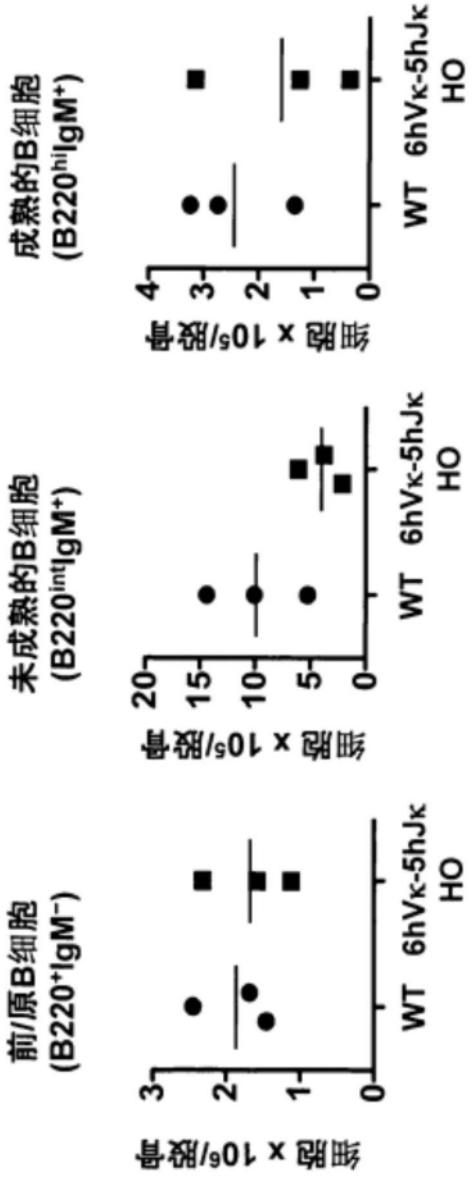

前/原B细胞
(B220+IgM−)
细胞 x 10⁶/股骨
0
1
2
3
WT
6hVκ-5hJκ HO
未成熟的B细胞
(B220intIgM+)
细胞 x 10⁵/股骨
0
5
10
15
20
WT
6hVκ-5hJκ HO
成熟的B细胞
(B220hiIgM+)
细胞 x 10⁵/股骨
0
1
2
3
4
WT
6hVκ-5hJκ HO

图7B

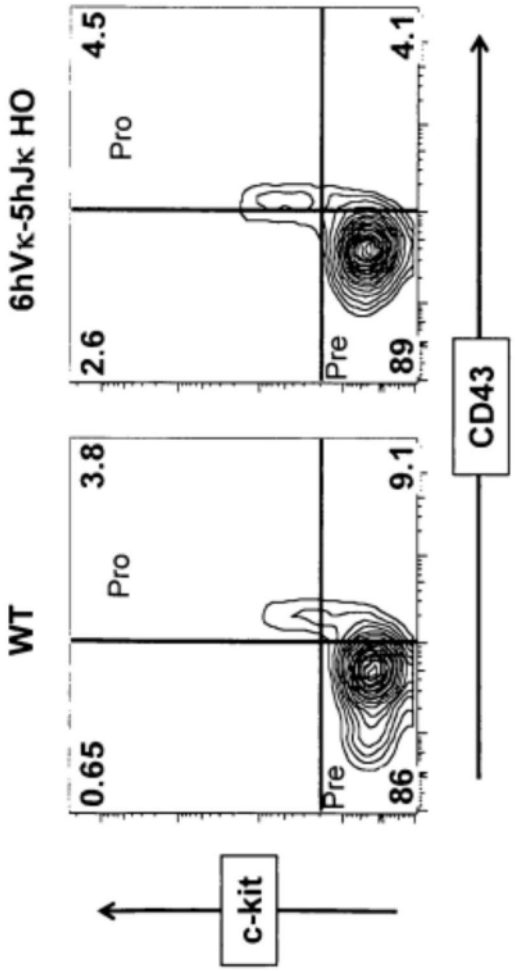


图7C

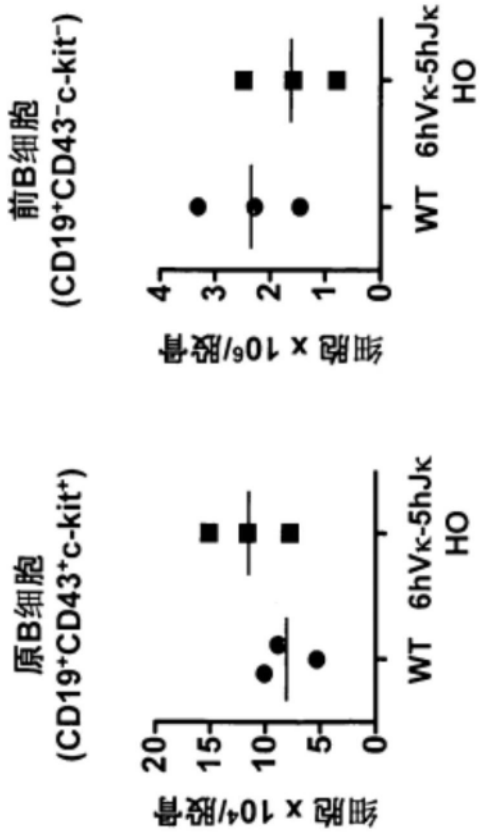

前B细胞
(CD19+CD43-c-kit-)
细胞 x 10⁶/股骨
0
1
2
3
4
WT
6hVκ-5hJκ HO
原B细胞
(CD19+CD43+c-kit+)
细胞 x 10⁴/股骨
0
5
10
15
20
WT
6hVκ-5hJκ HO

图7D

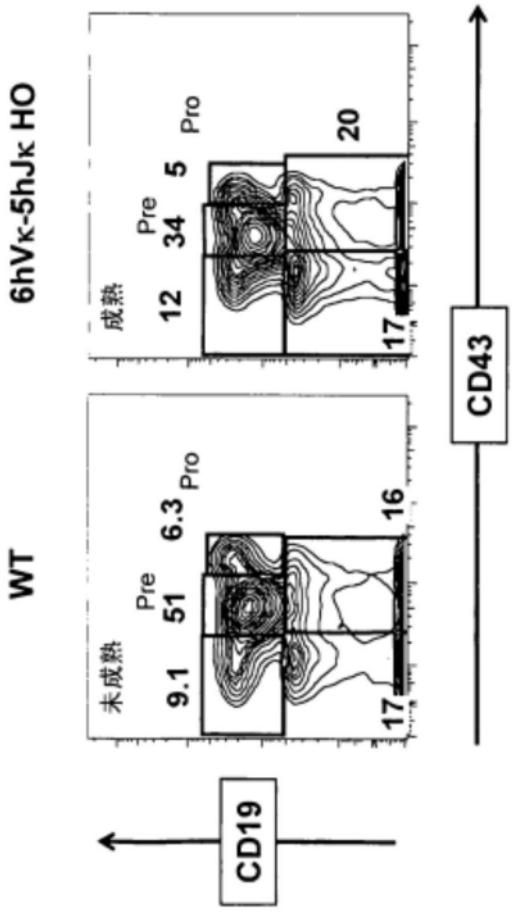

6hVκ-5hJκ HO
WT
成熟
Pre
Pro
12
34
5
20
17
未成熟
9.1
51
6.3
16
17
CD19
CD43

图7E

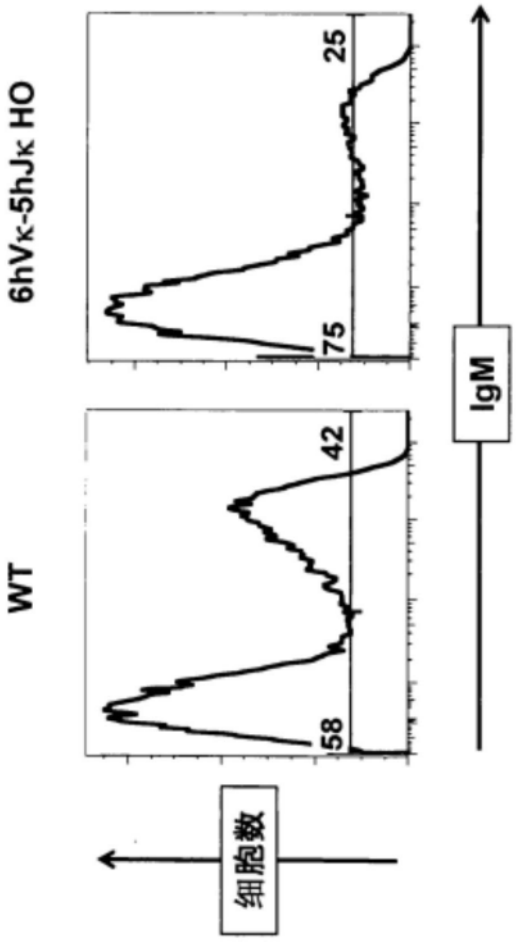


图7F

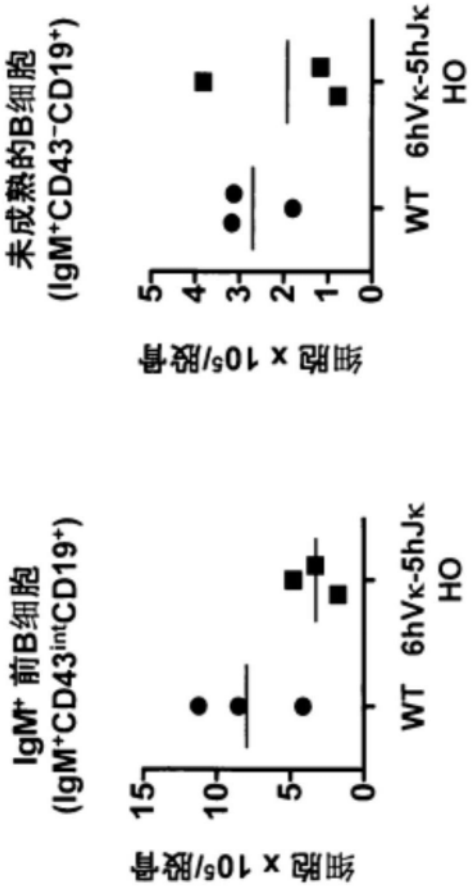

未成熟的B细胞
(IgM+CD43-CD19+)
细胞 x 10⁵/股骨
0
1
2
3
4
5
WT
6hVκ-5hJκ HO
IgM+ 前B细胞
(IgM+CD43intCD19+)
细胞 x 10⁵/股骨
0
5
10
15
WT
6hVκ-5hJκ HO

图7G

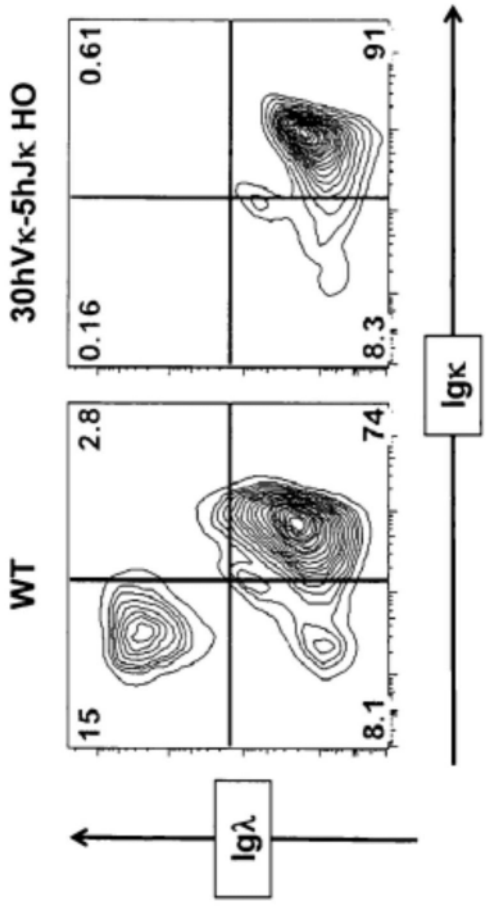


图8A

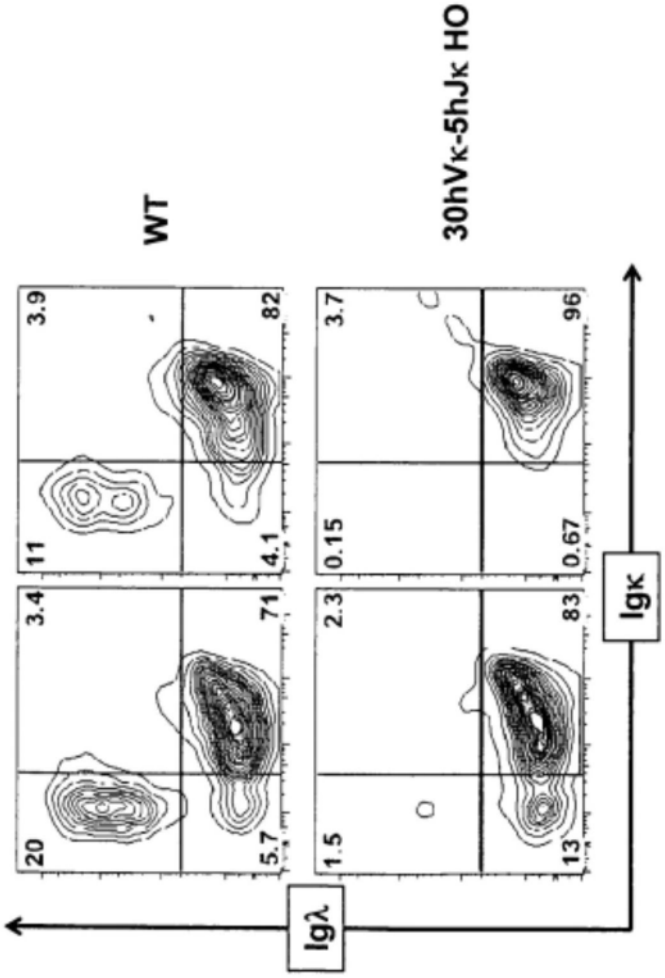

WT
30hVκ-5hJκ HO
成熟的
未成熟的
3.9
82
11
4.1
3.4
71
20
5.7
3.7
96
0.15
0.67
2.3
83
1.5
13
Igλ
Igκ

图8B


重排的人 VK-JK
小鼠 IgG1
2E TGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC.CCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCA
2H TGCATGCAAGCTCTACAAAtttcGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC.CCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCA
3D TGTCAGCAGCGTAGCccccgtt...TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC.CCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCA
5D TGTCTACAACATGATAATT.....GGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC.CCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCA
重排的人 VK-JK
小鼠 IgG2A/2C
1E TGCCAACAGTATAATAccC.....TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC.CCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATC
1G TGTCAACAGCTTAATAGTTACCCTtTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC.CCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATC
1C TGTCAAAAGTATAACAGTGCCCCTCaCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC.CCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATC
3A TGTCAGCAGTATGGTAGCTCA...CTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC.CCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATC
4B TGTCAGCAATATTATAGTACTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTTAAAC.CCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATC
5A TGTCTACAACATGATAATTTCCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC.CCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATC
重排的人 VK-JK
小鼠 IgG3
1A TGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCCCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAC.CTACAACAACAGCCCCATCTGTCTATC
4C TGTCAGCAATATTATAGTACTgggcCCACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC.CTACAACAACAGCCCCATCTGTCTATC

图9