

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6479024号  
(P6479024)

(45) 発行日 平成31年3月6日(2019.3.6)

(24) 登録日 平成31年2月15日(2019.2.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/90	(2006.01)
C 12 N 5/18	(2006.01)
A 01 K 67/027	(2006.01)
C 12 P 21/08	(2006.01)
C 07 K 16/00	(2006.01)
C 12 N 15/90	15/90
C 12 N 5/18	5/18
A 01 K 67/027	67/027
C 12 P 21/08	21/08
C 07 K 16/00	16/00

請求項の数 24 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-548101 (P2016-548101)
(86) (22) 出願日	平成27年1月23日 (2015.1.23)
(65) 公表番号	特表2017-505127 (P2017-505127A)
(43) 公表日	平成29年2月16日 (2017.2.16)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/012577
(87) 國際公開番号	W02015/112790
(87) 國際公開日	平成27年7月30日 (2015.7.30)
審査請求日	平成30年1月16日 (2018.1.16)
(31) 優先権主張番号	61/931,074
(32) 優先日	平成26年1月24日 (2014.1.24)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	596115687 ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 15, ボストン, シャタック・ストリート 55
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗体親和性の最適化のための高スループットマウスモデル

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

改变 IgH遺伝子座を含む細胞であって、該 IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントが、カセット標的配列を含み、かつ該改变 IgH遺伝子座が、IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントの3'末端とIgH遺伝子座のD<sub>H</sub>セグメントの5'末端の間に介在する核酸配列内に非機能性IGCR1配列をさらに含む、前記細胞。

## 【請求項 2】

カセット標的配列が最3'側V<sub>H</sub>セグメントの置換を可能にする、請求項1記載の細胞。

## 【請求項 3】

カセット標的配列が、

10

I-SceIメガヌクレアーゼ部位、Cas9/CRISPR標的配列、Talen標的配列、またはリコンビナーゼ媒介カセット交換システム

からなる群より選択される、請求項1記載の細胞。

## 【請求項 4】

IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントが、非ネイティブV<sub>H</sub>セグメント配列を含むよう改変されている、請求項1記載の細胞。

## 【請求項 5】

非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントがヒトV<sub>H</sub>セグメントである、請求項4記載の細胞。

## 【請求項 6】

非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントが、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来

20

のヒト $V_H$ セグメントである、請求項4記載の細胞。

【請求項 7】

(a) 1つまたは複数の $J_H$ セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、

欠失したネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットであって、5'から3'に向かって、

5'リコンビナーゼ部位、

逆位パッセンジャーVDJエクソンおよび／またはカセット標的配列、ならびに

成熟適合性 $V_H$ セグメント

を含む、パッセンジャーカセットと

をさらに含み、リコンビナーゼ部位が互いにに関して逆位である；または

10

(b) 1つまたは複数の $J_H$ セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、

欠失したネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットであって、5'から3'に向かって、

5'から3'への配向のパッセンジャーVDJエクソンおよび／またはカセット標的配列、

5'リコンビナーゼ部位、ならびに

成熟適合性 $V_H$ セグメント

を含む、パッセンジャーカセットと

をさらに含み、リコンビナーゼ部位が同じ配向である、

請求項1記載の細胞。

【請求項 8】

20

請求項1記載の細胞を含む、遺伝子改変マウス。

【請求項 9】

第1の集団が、V(D)J組み換え欠陥である細胞を含み、かつ

第2の集団が、請求項1記載の細胞を含む、

2つの細胞集団を含む、キメラ遺伝子改変マウス。

【請求項 10】

マウス胚盤胞に請求項1記載の細胞を注入する工程であって、細胞がマウス胚性幹細胞であり、 $V_H$ セグメントがネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に既知の抗体の $V_H$ セグメントを含む、工程；

胚盤胞から遺伝子改変マウスへと成熟させるのに適した条件下で、マウス胚盤胞をメスマウスに移植する工程；

30

遺伝子改変マウスから、

1) 非ネイティブ $V_H$ セグメントを含む最適化された抗体；または

2) 非ネイティブ $V_H$ セグメントを含む最適化された抗体を産生する細胞

を単離する工程

を含む、既知の抗体から最適化された抗体を作製する方法。

【請求項 11】

マウスIgH遺伝子座の最近位側 $V_H$ セグメントを既知のモノクローナル抗体由来の $V_H$ セグメントで置き換えることによって、マウス胚性幹細胞を改変する工程；

IgH遺伝子座の最3'側 $V_H$ セグメントの3'末端とIgH遺伝子座の $D_H$ セグメントの5'末端の間に介在する核酸配列内のIGCR1配列を、非機能性となるように改変する工程；および

40

成熟B細胞を形成することができないマウスの胚盤胞に、改変されたマウス胚性幹細胞を注入し、それによって既知のモノクローナル抗体由来の $V_H$ セグメントを含む $V_H$ (D) $J_H$ 再構成体を含むBリンパ球を生成するキメラマウスを作製する工程

を含む、既知のモノクローナル抗体由来の $V_H$ セグメントを含む $V_H$ (D) $J_H$ 再構成体を含むBリンパ球を生成する方法。

【請求項 12】

哺乳動物の末梢B細胞の大部分が関心対象の $V_H$ セグメントを発現するよう改変された請求項8記載の哺乳動物を、抗原で免疫する工程；

該哺乳動物におけるB細胞の活性化を測定する工程；および

50

該哺乳動物におけるB細胞の活性化が参照レベルに対して増大している場合に、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを含むB細胞集団の活性化因子として候補抗原を同定する工程を含む、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを含むB細胞集団を活性化させる抗原として候補抗原を同定する方法。

**【請求項 1 3】**

非機能性IGCR1配列が変異CBE配列を含むか；IGCR1配列のCBE配列が欠失しているか；またはIGCR1配列がIgH遺伝子座から欠失している、請求項1記載の細胞。

**【請求項 1 4】**

マウス細胞である、請求項1記載の細胞。

**【請求項 1 5】**

マウス幹細胞またはマウス胚性幹細胞である、請求項14記載の細胞。

10

**【請求項 1 6】**

幹細胞または胚性幹細胞である、請求項1記載の細胞。

**【請求項 1 7】**

リコンビナーゼ部位がLoxP部位であり、かつ前記細胞がcreリコンビナーゼをコードする遺伝子座をさらに含む、請求項7記載の細胞。

**【請求項 1 8】**

creリコンビナーゼをコードする遺伝子座が、未成熟B細胞において活性でなくかつ末梢B細胞において活性であるプロモーターの制御下にある、請求項17記載の改変細胞。

**【請求項 1 9】**

プロモーターがCD21プロモーターである、請求項18記載の細胞。

20

**【請求項 2 0】**

IgH遺伝子座が、

1つまたは複数の非ネイティブD<sub>H</sub>セグメント；

1つのネイティブD<sub>H</sub>セグメント；

J<sub>H</sub>セグメントがヒトJ<sub>H</sub>2であるなどの、1つまたは複数の非ネイティブJ<sub>H</sub>セグメント；

1つのネイティブJ<sub>H</sub>セグメント；

マウスIgH遺伝子座配列；

ヒトIgH遺伝子座配列；および／または

ヒト化IgH遺伝子座配列

30

をさらに含む、請求項1記載の細胞。

**【請求項 2 1】**

J<sub>H</sub>遺伝子座が、ヒトDおよびJ<sub>H</sub>カセットまたはヒトDJ<sub>H</sub>集合体を含むカセットによって置換されている、請求項1記載の細胞。

**【請求項 2 2】**

前記細胞が、請求項1記載の改変IgH遺伝子座に関してヘテロ接合性であり、かつ他方のIgH遺伝子座が不活性となるよう改変されており、前記細胞が、請求項1記載の改変IgH遺伝子座からのみIgH鎖を発現する、請求項1記載の細胞。

**【請求項 2 3】**

ヒト配列を有するIgL遺伝子座、

40

ヒト化IgL遺伝子座、

ヒトIgL遺伝子座、

1つのV<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座、

1つのJ<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座、

IgLカッパもしくはラムダ遺伝子座におけるヒトV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>再構成体、および／または

マウスIgLカッパもしくはラムダ遺伝子座におけるヒトV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>再構成体

をさらに含み；ならびに／または

IgL遺伝子座が、IG V1またはVRC01 IgLをコードする、

請求項1記載の細胞。

**【請求項 2 4】**

50

GC抗体成熟応答を増大させる遺伝子を活性化、不活性化、または変更することができる変異をさらに含む、請求項1記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、35 U.S.C. § 119(e)の下で、2014年1月24日に出願された米国仮出願第61/931,074号の恩典を主張し、その内容の全体を参照により本明細書に組み入れる。

【0002】

配列表

10

本願は、ASCII形式で電子的に提出された、その全体が参照により本明細書に組み入れられる配列表を含んでいる。2015年1月13日に作成されたこのASCIIコピーは、701039-080 511-PCT\_SL.txtと名付けられており、1,362バイトのサイズである。

【0003】

発明の分野

本発明は、改変抗体ならびに抗体を生成および／または抗原を同定する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

20

哺乳動物の適応免疫応答は、抗体に依存している。健常な動物は、各々が抗原と呼ばれる異なる分子に選択的に結合することができる、非常に多数の異なる抗体を產生する。抗体の抗原に対する結合は、身体にその抗原を破壊させる免疫応答を引き起こす。抗原が病原体上の分子である場合、身体はその病原体を攻撃することによって感染に抗することができる。

【0005】

抗体は、2つの同一のIg重鎖(IgH)ポリペプチドおよび2つの同一の軽鎖(IgL)ポリペプチドから構成される。可変領域と呼ばれるIgHおよびIgL鎖の一部が、抗原結合部位を形成する。抗原結合部位の配列は、抗体がどの抗原に結合することができるかおよびその結合がどの程度強いかを決定する。強固な免疫応答を有するためには、身体が任意の特定の抗原を認識することができるよう抗体集団により提示される幅広い抗原結合部位と、任意の特定の抗原を認識する能力を改善するために既存の抗体を改善する機構との両方を動物が有することが重要である。

30

【0006】

IgH可変領域は、B細胞のゲノムにおいて、V<sub>H</sub>、D、およびJ<sub>H</sub>と呼ばれる遺伝子セグメントから構築される。機能的な遺伝子セグメントのみを数えれば、ヒトIgH遺伝子座には、39個のV<sub>H</sub>、25個のD、および6個のJ<sub>H</sub>セグメントが存在する。抗体が発現される前に、IgH遺伝子は、1つのV<sub>H</sub>、1つのD、および1つのJ<sub>H</sub>セグメントを無作為に組み合わせて成熟抗体をコードする核酸配列を生成するV(D)J組み換えと呼ばれるプロセスに供される。V<sub>H</sub>、D、およびJ<sub>H</sub>の異なる組み合わせならびにV<sub>H</sub>、D、およびJ<sub>H</sub>セグメントの末端部が相互に連結される様式は、個体内に存在する抗体の大きな多様性に寄与する。B細胞中に存在する軽鎖も同様の一連のプロセスに供され、特有の軽および重鎖の対形成によってさらなる多様性が生じる。

40

【0007】

抗体が結合することができる外来抗原に遭遇すると、その特定の抗体を生成するB細胞が活性化される。これによりB細胞が複製され、それによって生じたB細胞はそれらの抗体の（例えば、体細胞超変異(SHM)または胚中心反応(GC)を通じた）さらなる多様化／親和性成熟をもたらし得るさらなるゲノム変更に供され得る。抗体の効果は、関連抗原に対するその特異性および親和性に依存する。上記のように、V(D)J組み換えおよびSHMの両方が、この点で、しかし抗体の進化の異なる点で、重要な寄与を果たす。V(D)J組み換えは、任意の潜在的な抗原が合理的な合致を見出し得るよう抗原結合部位の大きなプールを

50

生成し、ひとたび合致するB細胞が見出されれば、体細胞超変異およびGC反応が抗原結合部位を微調整し、抗体・抗原相互作用を完全なものにする。

#### 【0008】

自然免疫応答を研究することによって、特定の抗原に対する免疫応答の発生に関与すると考えられるV、DおよびJまたはJセグメントを同定することが可能である。しかし、現在の抗体作製法では、V(D)J組み換え、SHMおよびGCプロセス (Lonberg, Nature Biotechnology 23, 1117 (2005) (非特許文献1)) の力を既存抗体の最適化に適用することができない。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

10

#### 【0009】

【非特許文献1】Lonberg, Nature Biotechnology 23, 1117 (2005)

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

本発明は、少なくとも一部、新規の改変された免疫システムを用いて最適化された抗体を生成する新規かつ簡潔な方法に関する。改変された免疫システムは、1つまたは複数の非ネイティブ要素をモデル動物のモデル細胞のIg遺伝子座に簡単に挿入できるように変更されている。改変された免疫システムは、任意の所望の要素、例えば所望のV<sub>H</sub>セグメント、所望のDおよびJまたはDJセグメントを含むV(D)J組み換え体を生成するよう変更されており、また所望のV<sub>L</sub>セグメントを含み得る。これらのセグメントは、例えば、改善、例えば改善された親和性または特異性を必要とする既知の抗体から取得され得る。このシステムは、モデル動物、例えばマウスにおいて実行され得る。さらに、改変された免疫システムは、抗原を、例えばワクチン接種方法を最適化するためにも使用され得る。

20

#### 【0011】

本発明は、少なくとも一部、IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントはVDJセグメントを形成する上で優先的に組み換えられるが、ネイティブの最3'側V<sub>H</sub>セグメントは排除選択される、という発見に基づいている。ネイティブの最3'側V<sub>H</sub>セグメントが非ネイティブセグメントで置き換えた場合、その非ネイティブセグメントは、驚くべきことに、生成される多数の成熟抗体において見出される。加えて、IgH遺伝子座のIGCR1配列を非機能的にすることによって、そのような改変された遺伝子座から生成される抗体のさらに大部分が、最3'側V<sub>H</sub>セグメントを含むようになる。この発見により、所望のV<sub>H</sub>セグメントを含む抗体のエンジニアリングを、その抗体を抗体の多様性および機能性に寄与する重要なプロセスであるV(D)J組み換え、体細胞超変異および胚中心反応に参加させつつ行うことが可能になる。本明細書に記載される方法および組成物は、既存の方法によって生成される抗体と比較して改善された特異性およびJまたは親和性を有する抗体の開発を可能にし得る。

30

#### 【0012】

1つの局面において、IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントがカセット標的配列を含むよう改変されている改変IgH遺伝子座を含む細胞が本明細書に記載される。いくつかの局面において、カセット標的配列は、最3'側V<sub>H</sub>セグメントの置換を可能にする。いくつかの態様において、カセット標的配列は、I-SceIメガヌクレアーゼ部位、Cas9/CRISPR標的配列、Talen標的配列またはリコンビナーゼ媒介カセット交換システムからなる群より選択される。いくつかの態様において、IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントは、非ネイティブV<sub>H</sub>セグメント配列を含むよう改変される。1つの局面において、最3'側V<sub>H</sub>セグメントが非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントで置き換えられている改変IgH遺伝子座を含む細胞が本明細書に記載される。

40

#### 【0013】

いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、マウス遺伝子座であり、IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントは、元のマウスの最3'側V<sub>H</sub>セグメント以外の任意のV<sub>H</sub>セグメントを含むよう改変されている。

#### 【0014】

50

いくつかの態様において、細胞は、マウス胚性幹細胞である。いくつかの態様において、非ネイティブ $V_H$ セグメントは、ヒト $V_H$ セグメントである。いくつかの態様において、非ネイティブ $V_H$ セグメントは、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来の $V_H$ セグメントである。いくつかの態様において、非ネイティブ $V_H$ セグメントは、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来のヒト $V_H$ セグメントである。いくつかの態様において、ヒト $V_H$ セグメントは、IGHV1-2\*02、IGHV1-46またはIGHV1-69である。

#### 【0015】

いくつかの態様において、細胞はさらに、最3'側 $V_H$ セグメントの3'末端と $D_H$ セグメントの5'末端の間に介在する核酸配列内に非機能性IGCR1配列を含む。いくつかの態様において、非機能性IGCR1配列は、変異CBE配列を含む。いくつかの態様において、IGCR1配列のCBE配列は、欠失される。いくつかの態様において、IGCR1配列が、IgH遺伝子座から欠失される。

#### 【0016】

いくつかの態様において、細胞はさらに、1つまたは複数の $J_H$ セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、欠失したネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットとを含み、パッセンジャーカセットは、5'から3'に向かって、5'リコンビナーゼ部位、逆位パッセンジャーVDJエクソンおよび/またはカセット標的配列、ならびに成熟適合性 $V_H$ セグメントを含み、リコンビナーゼ部位は互いからみて逆位関係にある。

#### 【0017】

いくつかの態様において、細胞はさらに、1つまたは複数の $J_H$ セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、欠失したネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットとを含み、パッセンジャーカセットは、5'から3'に向かって、5'から3'への配向のパッセンジャーVDJエクソンおよび/またはカセット標的配列、5'リコンビナーゼ部位、ならびに成熟適合性 $V_H$ セグメントを含み、リコンビナーゼ部位は同じ配向である。

#### 【0018】

いくつかの態様において、リコンビナーゼ部位はLoxP部位であり、細胞はさらにcreリコンビナーゼをコードする遺伝子座を含む。いくつかの態様において、creリコンビナーゼをコードする遺伝子座は、未成熟B細胞において活性でなく、末梢B細胞において活性であるプロモーターの制御下にある。いくつかの態様において、プロモーターは、CD21プロモーターである。

#### 【0019】

いくつかの態様において、1つもしくは複数の $D_H$ 、1つもしくは複数の $J_H$ セグメントおよび/またはDJ $_H$ 融合体は、カセット標的配列を含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つまたは複数の非ネイティブ $D_H$ セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つの $D_H$ セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つまたは複数の非ネイティブ $J_H$ セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つの $J_H$ セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、マウスIgH遺伝子座配列を含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、ヒトIgH遺伝子座配列を含む。いくつかの態様において、この遺伝子座は、ヒト化IgH遺伝子座配列を含む。いくつかの態様において、 $J_H$ 遺伝子座は、ヒトDおよび $J_H$ カセットまたはヒトDJ $_H$ 集合体を含むカセットによって置換される。いくつかの態様において、細胞は改変IgH遺伝子座に関してヘテロ接合性であり、他方のIgH遺伝子座が不活性となるよう改変されており、細胞は改変IgH遺伝子座からのみIgH鎖を発現する。

#### 【0020】

いくつかの態様において、細胞はさらに、ヒト配列を有するIgL遺伝子座を含む。いくつかの態様において、細胞はさらに、ヒト化IgL遺伝子座を含む。いくつかの態様において、細胞はさらに、ヒトIgL遺伝子座を含む。いくつかの態様において、細胞はさらに、1つの $V_L$ セグメントを有するIgL遺伝子座を含む。いくつかの態様において、細胞はさらに

10

20

30

40

50

、1つの $J_L$ セグメントを有するIgL遺伝子座を含む。いくつかの態様において、細胞はさらに、IgLカッパまたはラムダ遺伝子座にヒト $V_LJ_L$ 再構成体を含む。いくつかの態様において、細胞はさらに、マウスIgLカッパまたはラムダ遺伝子座にヒト $V_LJ_L$ 再構成体を含む。いくつかの態様において、IgL遺伝子座は、IG V1をコードする。

#### 【0021】

いくつかの態様において、細胞は、幹細胞または胚性幹細胞である。いくつかの態様において、細胞は、マウス細胞である。いくつかの態様において、細胞はさらに、リンパ球固有様式でGC抗体成熟応答を増大させる遺伝子を活性化、不活性化または変更することができる変異を含む。

#### 【0022】

1つの局面において、本明細書に記載される改変細胞を含む遺伝子改変マウスが本明細書に記載される。1つの局面において、第1の集団がV(D)J組み換え欠陥である細胞を含み、第2の集団が本明細書に記載される改変細胞を含む、2つの細胞集団を含むキメラ遺伝子改変マウスが本明細書に記載される。いくつかの態様において、V(D)J組み換え欠陥細胞は、RAG2<sup>-/-</sup>細胞である。いくつかの態様において、哺乳動物はマウスである。

#### 【0023】

1つの局面において、既知の抗体から最適化された抗体を作製する方法が本明細書に記載され、本方法は以下の工程を含む：マウス胚盤胞に本明細書に記載される改変細胞を注入する工程であって、細胞がマウス胚性幹細胞であり、 $V_H$ セグメントがネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に既知の抗体の $V_H$ セグメントを含む、工程；胚盤胞から遺伝子改変マウスへと成熟させるのに適した条件下でマウス胚盤胞をメスマウスに移植する工程；遺伝子改変マウスから、1) 非ネイティブ $V_H$ セグメントを含む最適化された抗体または2) 非ネイティブ $V_H$ セグメントを含む最適化された抗体を産生する細胞を単離する工程。いくつかの態様において、この方法はさらに、単離工程の前に遺伝子改変マウスを所望の標的抗原で免疫する工程を含む。いくつかの態様において、この方法はさらに、遺伝子改変マウスの少なくとも1つの細胞からモノクローナル抗体を産生させる工程を含む。いくつかの態様において、胚性幹細胞のIgH遺伝子座は、既知の抗体由来の再構成済みDJ $_H$ セグメントを含む。いくつかの態様において、胚性幹細胞のIgL遺伝子座は、既知の抗体由来の構成済み軽鎖配列を含む。いくつかの態様において、関心対象の $V_H$ セグメントは、生殖系列 $V_H$ セグメント、親和性成熟中間体または成熟 $V_H$ セグメントである。

#### 【0024】

1つの局面において、上記の方法のいずれか一つによって産生される最適化された抗体が、本明細書に記載される。

#### 【0025】

1つの局面において、既知のモノクローナル抗体由来のVHセグメントを含む $V_H(D)J_H$ 再構成体を含むBリンパ球を生成する方法が本明細書に記載され、本方法は以下の工程を含む：マウスIgH遺伝子座の最近位側 $V_H$ セグメントを既知のモノクローナル抗体由来の $V_H$ セグメントと置き換えることによってマウス胚性幹細胞を改変する工程；および成熟B細胞を形成することができないマウスの胚盤胞に改変されたマウス胚性幹細胞を注入し、それによって既知のモノクローナル抗体由来の $V_H$ セグメントを含む $V_H(D)J_H$ 再構成体を含むBリンパ球を生成するキメラマウスを作製する工程。いくつかの態様において、胚盤胞の細胞は、V(D)J組み換え欠陥細胞である。いくつかの態様において、胚盤胞の細胞は、RAG2<sup>-/-</sup>細胞である。いくつかの態様において、胚盤胞の細胞は、成熟リンパ球を形成することができない。いくつかの態様において、この方法はさらに、最近位側 $V_H$ セグメントの3'末端を隔離する核酸配列内のIGCR1配列の機能を破壊するようマウス胚性幹細胞を改変する工程を含む。いくつかの態様において、改変細胞はさらに、既知のモノクローナル抗体由来のIgL配列を含む。いくつかの態様において、改変細胞はさらに、ヒトDおよびJ $_H$ カセットまたはヒトDJ $_H$ 集合体を含むカセットで置換されたJ $_H$ 遺伝子座を含む。いくつかの態様において、この方法はさらに、既知の抗体由来の生殖系列 $V_H$ セグメントを有するマウスが生まれるようキメラマウスを繁殖させる工程を含む。いくつかの態様において、ES細胞は

10

20

30

40

50

、ヒト $V_H$ セグメントに関してヘテロ接合性にされる。いくつかの態様において、ヒト $V_H$ セグメントは、既知のモノクローナル抗体由来の $V_H$ セグメントの配列から本質的になる。

#### 【0026】

1つの局面において、関心対象の $V_H$ セグメントを含むB細胞集団を活性化させる抗原としての候補抗原を同定する方法が本明細書に記載され、本方法は以下の工程を含む：本明細書に記載される改変哺乳動物を、その哺乳動物の末梢B細胞の大部分が関心対象の $V_H$ セグメントを発現するよう、抗原で免疫する工程；哺乳動物におけるB細胞の活性化を測定する工程；および哺乳動物におけるB細胞の活性化が参照レベルに対して増大している場合に、関心対象の $V_H$ セグメントを含むB細胞集団の活性化因子として候補抗原を同定する工程。いくつかの態様において、B細胞活性化の増大は、Ig可変領域の体細胞超変異状態における増大である。いくつかの態様において、B細胞活性化の増大は、抗原に対する成熟抗体の親和性の増大である。いくつかの態様において、B細胞活性化の増大は、抗原に対する成熟抗体の特異性の増大である。いくつかの態様において、関心対象の $V_H$ セグメントは、生殖系列 $V_H$ セグメント、親和性成熟中間体または成熟 $V_H$ セグメントである。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0027】

【図1A】本明細書の実施例2に記載されるコンストラクトの概要を示している。

【図1B】本明細書の実施例2に記載されるコンストラクトの概要を示している。

【図1C】本明細書の実施例2に記載されるコンストラクトの概要を示している。

【図2A】IGHV1-2\*02コンストラクトの構築および分析を示している。

20

【図2B】IGHV1-2\*02コンストラクトの構築および分析を示している。

【図2C】IGHV1-2\*02コンストラクトの構築および分析を示している。

【図2D】IGHV1-2\*02コンストラクトの構築および分析を示している。

【図3】抗体、例えばBnAbの条件付き発現の概要を示している。

【図4】抗体の最適化、例えばBnAbの最適化の概要を示している。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0028】

#### 発明の詳細な説明

本明細書に記載される方法および組成物は、IgH遺伝子座の最3'側 $V_H$ セグメントがVDJセグメントを形成する上で優先的にDセグメントおよび $J_H$ セグメントと組み換えられるという本発明者らの発見に関連する。しかし、本発明者らはさらに、ネイティブのマウス最3'側 $V_H$ セグメント( $V_H81X$ )を含む抗体は、野生動物においてV(D)J組み換え時の $V_H81X$ の優先的組み換えが成熟抗体集団の形成に反映されないよう負の選択を受けることを発見した。しかし、 $V_H81X$ が非ネイティブ $V_H$ セグメントで置き換えられた場合、その非ネイティブ $V_H$ セグメントは、非常に多数の生成される成熟抗体において見出される。したがって、1つの局面において、最3'側 $V_H$ セグメントが非ネイティブ $V_H$ セグメントで置き換えられた改変されたIgH遺伝子座を含む細胞が本明細書に記載される。さらに、例えば関心対象の $V_H$ セグメントがカセット標的配列の位置に容易に導入され得るよう、IgH遺伝子座の最3'側 $V_H$ セグメントがカセット標的配列を含むよう改変された、改変されたIgH遺伝子座を含む細胞が本明細書に提供される。

30

#### 【0029】

本明細書で使用される場合、「IgH遺伝子座」という用語は、免疫グロブリン分子(例えば、BCRまたは抗体)の重鎖ポリペプチドをコードするかまたはコードするよう組み換えられ得るかのいずれかの遺伝子座を表す。VDJ組み換え前に、IgH遺伝子座は、5'から3'に向かって、1つまたは複数の $V_H$ セグメント、1つまたは複数の $D_H$ セグメントおよび1つまたは複数の $J_H$ セグメントならびに複数の介在配列、例えばVDJ組み換えおよび発現のプロセスを調節および/または制御する配列を含む。

40

#### 【0030】

本明細書で使用される場合、「 $V_H$ セグメント」という用語は、IgH遺伝子座の可変セグメントを表す。本明細書で使用される場合、「 $D_H$ セグメント」または「Dセグメント」と

50

いう用語は、IgH遺伝子座の多様性領域を表す。本明細書で使用される場合、「 $J_H$ セグメント」という用語は、IgH遺伝子座の連結領域を表す。当業者は、IgH遺伝子座または免疫グロブリン分子においてそのようなセグメントを容易に特定することができる。非限定的な例として、免疫グロブリンの構造は、Janeway et al. (eds.) (2001) *Immunobiology*. Fifth edition, Garland Sciences; Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242およびChothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917で議論されており、これらの全体が参考により本明細書に組み入れられる。

## 【0031】

10

B細胞発生期に、IgH  $D_H$ セグメントは $J_H$ セグメントと組み換えられ、それらが物理的にひとつに連結されて「 $DJ_H$ 再構成体」が形成される。B細胞発生における次の段階は $V_H$ セグメントと $DJ_H$ セグメントで組み換えを行い、「 $V_HDJ_H$ 再構成体」を形成する。すなわち、「 $V_HDJ_H$ 再構成体」または「 $DJ_H$ 再構成体」は、名前が挙がっているセグメントが組み換えられ、生殖系列で見出される介在配列が除去されたポリヌクレオチドである。そのような再構成体は、B細胞中で見出されるネイティブコンストラクトまたはインビトロで作製され任意で細胞に導入されるコンストラクトであり得る。

## 【0032】

Ig遺伝子のセグメント、例えば $V_H$ セグメントは、例えば、生殖系列 $V_H$ セグメント、親和性成熟中間体または成熟 $V_H$ セグメントであり得る。いくつかの態様において、生殖系列 $V_H$ セグメントは、例えば任意のV(D)J組み換えイベントの前に、生殖系列細胞のゲノムで見出される $V_H$ セグメントであり得る。いくつかの態様において、成熟中間体は、少なくとも1つのV(D)J組み換えイベント後であるがGC反応および/またはSHMの完了前の $V_H$ セグメントであり得る。いくつかの態様において、成熟 $V_H$ セグメントは、成熟B細胞において見出される $V_H$ セグメントであり得る。成熟中間体または成熟 $V_H$ セグメントに包含される $V_H$ セグメントは、 $DJ_H$ 再構成体との組み換えがなされたVDJ再構成体として細胞中に存在する。

20

## 【0033】

本明細書で使用される場合、「ネイティブ」という用語は、改変されていない細胞および/または動物のゲノム内の特定位置で見出される配列を表す。本明細書で使用される場合、「非ネイティブ」という用語は、改変されていない細胞および/または動物のゲノム内の特定位置で見出される配列と異なる配列を表す。非ネイティブ配列は、例えば、異なる種由来の配列またはゲノム内の非ネイティブ位置に移された同一種由来の配列であり得る。したがって、ある配列が改変されていない細胞のゲノムの特定遺伝子に対して「ネイティブ」であったとしても、それが改変された細胞の遺伝子内で移動されている場合は、それはもはやネイティブであるとはみなされない。いくつかの態様において、非ネイティブ配列は、ネイティブ配列と少なくとも5%、例えば少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%またはそれ以上相違する。いくつかの態様において、IgH遺伝子座はマウス遺伝子座であり、IgH遺伝子座の最3'側 $V_H$ セグメントは元のマウスの最3'側（すなわち、3'末端に対して最3'側近位であるまたは最も近接する） $V_H$ セグメント以外の任意の $V_H$ セグメントを含むよう改変されている。いくつかの態様において、非ネイティブ $V_H$ セグメントは、ヒト $V_H$ セグメントである。いくつかの態様において、非ネイティブ $V_H$ セグメントは、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来の $V_H$ セグメントである。いくつかの態様において、非ネイティブ $V_H$ セグメントは、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来のヒト $V_H$ セグメントである。

30

## 【0034】

40

本明細書に記載される方法および組成物は任意の $V_H$ セグメントと共に使用するのに適しているが、特定の $V_H$ セグメントは、それらの既知の抗原特異性から、本明細書に記載される組成物および方法において使用することが特に意図されている。本明細書に記載される任意の局面のいくつかの態様において、 $VH$ セグメントは、IGHV1-2\*02、IGHV1-46またはIG

50

HV1-69からなる群より選択され得る。これらのVHセグメントの配列は当技術分野で公知であり、例えばIGHV1-2\*02はGenbankアクセション番号FN550184.1 (SEQ ID NO:1) および国際特許公開公報WO 2010/054007のSEQ ID NO:13に示されており、IGHV1-46はGenbankアクセション番号AJ347091.1 (SEQ ID NO:2) に示されている。

#### 【0035】

本明細書で使用される場合、「カセット標的配列」という用語は、カセット標的配列を標的とする少なくとも1つの酵素の作用を通じて、カセット標的配列の位置でゲノムに関心対象の配列（例えば、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを含む配列）を挿入することができる配列を表す。カセット標的配列の非限定的な例は、I-SceIメガヌクレアーゼ部位、Cas9/CRISPR標的配列、Talen標的配列、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) およびリコンビナーゼ媒介カセット交換システムである。そのようなカセット標的化システムは、当技術分野で公知である、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるClark and Whitelaw Nature Reviews Genetics 2003 4: 825-833を参照のこと。いくつかの態様において、カセット標的配列は、最3'側V<sub>H</sub>セグメントの置換を可能にする。

#### 【0036】

I-SceI、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、Cas9/CRISPRシステムおよび転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) は、ヌクレアーゼである。ヌクレアーゼは、微生物種で広く見出され、非常に長い認識配列 (>14bp) を有するという特有の性質を有し、そのためそれらは所望の位置での切断に生来的に非常に特異的である。これは、例えばゲノムにおいて、部位特異的な二重鎖切断を行うために利用され得る。これらのヌクレアーゼは、ゲノムの所望の位置で切断することおよび特定の二重鎖切断点を作製することができ、これらはその後、細胞内因性プロセス、例えば相同組み換え (HR)、相同組み換え修復 (HDR) および非相同末端結合 (NHEJ) によって修復される。NHEJは、二重鎖切断部のDNA末端を直接連結し、HDRは切断点の失われたDNA配列を再生するための鋳型として相同的な配列を利用する。したがって、例えばカセット標的配列に特異的なZFN、CRISPRおよび/またはTALENを細胞内に導入することによって、少なくとも1つの二重鎖切断部がゲノム内に生成され、鋳型配列、例えば関心対象のVHセグメントを含む配列がその切断部を修復するために使用され、それによって鋳型配列がゲノムおよび所望位置に導入され得る（例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み入れられる、Gaj et al. Trends in Biotechnology 2013 31:397-405; Carlson et al. PNAS 2012 109:17382-7; およびWang et al. Cell 2013 153:910-8を参照のこと）。

#### 【0037】

特有の配列を認識するヌクレアーゼおよび/またはメガヌクレアーゼ変種を作製するために、変異誘発および高スループットスクリーニング法が使用されている。例えば、様々なヌクレアーゼが融合され、新規配列を認識するハイブリッド酵素が作製される。あるいは、ヌクレアーゼのDNA相互作用性アミノ酸は、配列特異的なヌクレアーゼを設計するために変更され得る（例えば、米国特許第8,021,867号を参照のこと）。ヌクレアーゼは、例えば、各々の内容の全体が参照により本明細書に組み入れられるCerto, MT et al. Nature Methods (2012) 9:973-975; 米国特許第8,304,222号; 同第8,021,867号; 同第8,119,381号; 同第8,124,369号; 同第8,129,134号; 同第8,133,697号; 同第8,143,015号; 同第8,143,016号; 同第8,148,098号; または同第8,163,514号に記載される方法を用いて設計され得る。あるいは、部位特異的切断特性を有するヌクレアーゼは、市販の技術、例えばPrecision BioSciences' Directed Nuclease Editor (商標) ゲノム編集技術を用いて得ることができる。

#### 【0038】

ZFNおよびTALEN制限エンドヌクレアーゼ技術は、特異的DNA配列認識ペプチド、例えばジンクフィンガーおよび転写活性化因子様エフェクター (TALE) に連結された非特異的DNA切断酵素を利用する。典型的に、そのDNA認識部位および切断部位が互いから離れているエンドヌクレアーゼが選択されそしてその切断部分が分離され、次いで配列認識ペプチドに連結され、それによって所望の配列に対して非常に高い特異性を有するエンドヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼが生成される。そのような特性を有する例示的な制限酵素はFokIである。加えて、FokIは、ヌクレアーゼ活性を有するために二量体化を必要とするという利点を有し、これは各々のヌクレアーゼパートナーが特有のDNA配列を認識する場合にその特異性が劇的に増大することを意味する。この効果を増強するために、FokIヌクレアーゼは、ヘテロ二量体としてのみ機能し得、向上した触媒活性を有し得るよう改変されている。ヘテロ二量体機能性ヌクレアーゼは、望ましくないホモ二量体活性の可能性を回避し、それによって二重鎖切断の特異性を増大させる。

#### 【 0 0 3 9 】

いくつかの態様において、本明細書に記載されるカセット標的配列に配列を導入するために、Cas9/CRISPRシステムが使用され得る。clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR関連(Cas)システムは、例えばRNAプログラマブルゲノム編集に有用である(例えば、すべてについてそれらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、Marraffini and Sontheimer. *Nature Reviews Genetics* 2010 11:181-190; Sorek et al. *Nature Reviews Microbiology* 2008 6:181-6; Karginov and Hannon. *Mol Cell* 2010 1:7-19; Hale et al. *Mol Cell* 2010:45:292-302; Jinek et al. *Science* 2012 337:815-820; Bikard and Marraffini *Curr Opin Immunol* 2012 24:15-20; Bikard et al. *Cell Host & Microbe* 2012 12:177-186を参照のこと)。二重鎖切断部を生成するゲノム内の所望の位置にCas酵素を標的とすることができるCRISPRガイドRNAが使用される。この技術は、当技術分野で公知であり、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるMali et al. *Science* 2013 339:823-6に記載されており、CRISPRを通じた遺伝子編集の設計および使用のためのキットは、例えばSystem Biosciences, Mountain View, CAからPRECISION X CAS9 SMART NUCLEASE(商標)システム(カタログ番号CAS900A-1)が市販されている。

#### 【 0 0 4 0 】

いくつかの態様において、CRISPR、TALENまたはZFN分子(例えば、ペプチドおよび/またはペプチド/核酸複合体)は、CRISPR、TALENまたはZFN分子の存在が一過的であり、その細胞の子孫またはその細胞由来の動物において検出可能でないように、細胞、例えば培養されたES細胞に導入され得る。いくつかの態様において、CRISPR、TALENまたはZFN分子をコードする核酸(例えば、ペプチドおよび/またはペプチド/核酸複合体の一部をコードする複数の核酸)は、その核酸が細胞内に一過的に存在し、CRISPR、TALENまたはZFN分子をコードする核酸およびCRISPR、TALENまたはZFN分子それ自体がその細胞の子孫またはその細胞由来の動物において検出可能でないように、細胞、例えば培養されたES細胞に導入され得る。いくつかの態様において、CRISPR、TALENまたはZFN分子をコードする核酸(例えば、ペプチドおよび/またはペプチド/核酸複合体の一部をコードする複数の核酸)は、その核酸が細胞内で維持され(例えば、ゲノムに組み込まれ)、CRISPR、TALENもしくはZFN分子をコードする核酸および/またはCRISPR、TALENもしくはZFN分子がその細胞の子孫またはその細胞由来の動物において検出可能なように、細胞、例えば培養されたES細胞に導入され得る。

#### 【 0 0 4 1 】

リコンビナーゼ媒介カセット交換システム(RMCE)は、リコンビナーゼ(例えば、FIP)およびリコンビナーゼによって認識される配列(例えば、FRT標的部位)を利用して、FRT標的部位によって標識されたゲノム由来の配列を、同様にFRT標的部位に隣接するカセット内の配列と交換する。RMCEは、当技術分野で、例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み入れられる、Cesari et al. *Genesis* 2014 38:87-92およびRoebroek et al. *Mol Cell Biol* 2006 26:605-616において公知となっている。

#### 【 0 0 4 2 】

本発明者らはさらに、IgH遺伝子座のIGCR1配列を非機能性にすることで最3'側V<sub>H</sub>セグメントがさらに高い率でVDJセグメントに組み換えられることを発見した。いくつかの態様において、改変IgH遺伝子は、非機能性IGCR1配列を含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子間制御領域1」または「IGCR1」は、IgH遺伝子座内の最3'側ネイティブVHセグメン

10

20

30

40

50

トの3'末端および最5'側ネイティブVDJセグメントの5'末端に位置する領域を表し、VDJ組み換えを制御する。IGCR1は、およそ4.1 kb長である。IGCR1は、IGCR1機能に必要とされる2つのCTCF結合エレメント(CBE)を含む。IGCR1の構造およびCBEは、例えばその全体が参照により本明細書に組み入れられるGuo et al. Nature 2011 477-424-431においてより詳細に説明されている。非機能性IGCR1配列は、50%またはそれ未満の野生型活性、例えば50%またはそれ未満の、最3'側V<sub>H</sub>セグメント以外のV<sub>H</sub>セグメントを含むVDJ再構成体を形成する能力を有するIGCR1配列であり得る。例えば特定のセグメントに特異的なプローブを用いるPCR(例えば、Guo et al. Nature 2011 477-424-431を参照のこと)による、任意の特定のセグメントを含むVDJ再構成体の割合を測定する方法が、当技術分野で公知である。

10

#### 【0043】

いくつかの態様において、非機能性IGCR1配列は、少なくとも1つのCBE配列が欠失した配列である。いくつかの態様において、非機能性IGCR1配列は、両方のCBE配列が欠失した配列である。いくつかの態様において、非機能性IGCR1配列は、IGCR1配列が欠失した、例えばIGCR1を含む4.1 kbが欠失した配列である。いくつかの態様において、非機能性IGCR1配列は、1つまたは複数のCBE配列が欠失した、例えば両方のCBE配列を含む2.6 kb配列が欠失した、または少なくとも1つのCBE配列を含むその2.6 kb配列の任意の部分が欠失した配列である。

#### 【0044】

いくつかの態様において、非機能性IGCR1配列は、1つまたは複数のCBE配列が変異している配列である。CTCF結合を少なくとも25%減少させる(例えば、25%もしくはそれ以上、50%もしくはそれ以上または75%もしくはそれ以上減少させる)ようCBE配列の配列を変異させることで、IGCR1が非機能性となり得る。特定の変異CBEへのCTCFの結合は、例えばサザンプロットによって、容易に測定され得る。そのような変異の非限定的な例は、例えばその全体が参照により本明細書に組み入れられるGuo et al. Nature 2011 477-424-431に記載されている。

20

#### 【0045】

特定のV<sub>H</sub>セグメントを含む抗体を単離および/または生成することは、そのV<sub>H</sub>セグメントが除外選択されるために、例えばそのV<sub>H</sub>セグメントが特に自己抗原を認識する可能性がある場合にそのV<sub>H</sub>セグメントを含むB細胞が除外選択される可能性がより高くなるために、困難であり得る。そのようなV<sub>H</sub>セグメントは、本明細書で「成熟不適合性」と称される。この用語は、BCRおよび/またはそのようなV<sub>H</sub>セグメントを含む抗体を発現するB細胞が必然的にクローン除去および/またはアネルギーに供されることを暗示するものではない。B細胞発生期のクローン除去および/またはアネルギーを回避し、発生の所望の時点でき、例えばクローン除去および/またはアネルギーが起こると考えられる時よりも後に、B細胞に成熟不適合性V<sub>H</sub>セグメントを発現させるための方法および組成物が本明細書に提供される。これらの方法および組成物は、パッセンジャーVDJエクソンを、それがその遺伝子座内に存在する間に発現されもせず通常のIgH V(D)J組み換えによって除去されもない様式でIgH遺伝子座に挿入することを含む。パッセンジャーVDJエクソンを含むB細胞は、第2の成熟適合性VDJエクソン(例えば、IgH V(D)J組み換えによって生成されるもの)を発現し、そして所望の時点で、その遺伝子座の配列が、成熟適合性エクソンの代わりにパッセンジャーVDJエクソンが発現されるよう操作され得る。本明細書で使用される場合、「パッセンジャー」エクソンは、生殖系列および成熟B細胞ゲノム中に存在するが、誘導された組み換えイベント、例えばCre媒介組み換えイベントに供されるまでそのゲノムが発現されないエクソンである。

30

#### 【0046】

第1のアプローチにおいて、成熟不適合性V<sub>H</sub>セグメントは(例えば、パッセンジャーVDJエクソンの一部として)、IgH遺伝子座に、そのIgH遺伝子座に対して3'から5'への配座で挿入され、成熟適合性VDJエクソン(または成熟適合性VDJエクソンを生成する組み換えられる配列)の5'側に配置される。パッセンジャーVDJエクソンの発現は、パッセンジ

40

50

ヤーVDJエクソンをIgH遺伝子座の残りの部分に対して5'から3'への配向に「ひっくり返す」一対の逆位リコンビナーゼ部位の使用によって誘導される。いくつかの態様において、1つまたは複数のJ<sub>H</sub>セグメントの3'側に配置される3'リコンビナーゼ部位と、欠失したネイティブ最3'側V<sub>H</sub>セグメントの位置に配置されるパッセンジャーカセットと含む細胞が、本明細書に記載され、パッセンジャーカセットは、5'から3'に向かって、1) 5'リコンビナーゼ部位；2) 逆位パッセンジャーVDJエクソンまたはカセット標的配列；および3) 成熟適合性V<sub>H</sub>セグメントを含み、リコンビナーゼ部位は互いに対し逆位になっている。

## 【0047】

第2のアプローチにおいて、成熟不適合性VHセグメントは（例えば、パッセンジャーVDJエクソンの一部として）、IgH遺伝子座に対して5'から3'の向きに挿入され、V(D)J組み換えがこのパッセンジャーエクソンの下流で起こり、成熟適合性VDJエクソンを生成する。  
成熟適合性VDJエクソンは、次いで、所望の場合、一対のリコンビナーゼ部位において組み換え（例えば、Cre媒介組み換え）を誘導することによって切り出され、それによって細胞にパッセンジャーエクソンを発現させ得る。いくつかの態様において、1つまたは複数のJ<sub>H</sub>セグメントの3'側に配置される3'リコンビナーゼ部位と、欠失したネイティブ最3'側V<sub>H</sub>セグメントの位置に配置されるパッセンジャーカセットとを含む細胞が、本明細書に記載され、パッセンジャーカセットは、5'から3'に向かって、1) パッセンジャーVDJエクソンまたはカセット標的配列；2) 5'リコンビナーゼ部位；および3) 成熟適合性V<sub>H</sub>セグメントを含む。

## 【0048】

組み換え部位およびこれらの部位で組み換えを誘導するためのシステムは当技術分野で公知であり、例えばcre-LoxシステムまたはFIPリコンビナーゼがある。LoxP-Creシステムは、隣接するLox部位の間に位置するDNAの切除または反転を触媒するPIファージCreリコンビナーゼの発現を利用する。組織特異的プロモーターの制御下で発現されるCreまたはFIPリコンビナーゼが作用し得る変更された内因性遺伝子を有するバイナリトランスジン動物を生成する遺伝子標的技術を使用することによって、部位特異的組み換えにより空間的または時間的に制御された様式で配列が切除または反転され得る。例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,080,576号、同第5,434,066号および同第4,959,317号；ならびにJoyner, A.L., et al. *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*, Oxford University Press, New York (1997); Orban et al. (1992) PNAS 89:6861-6865; Aguzzi A, Brandner S, Isenmann S, Steinbatch JP, Sure U. Glia. 1995 Nov;15(3):348-64. Reviewを参照のこと。

## 【0049】

いくつかの態様において、細胞はさらに、リコンビナーゼ部位で組み換えを誘導するリコンビナーゼをコードする遺伝子を含む。いくつかの態様において、リコンビナーゼ部位は、LoxP部位である。いくつかの態様において、細胞はさらに、creリコンビナーゼをコードする遺伝子を含む。リコンビナーゼをコードする遺伝子は、例えば誘導性プロモーターまたは細胞特異的プロモーターの制御下に置かれ得る。リコンビナーゼを制御するための誘導性プロモーター、時期特異的および組織特異的プロモーターは、当技術分野で公知である。いくつかの態様において、リコンビナーゼをコードする遺伝子は、未成熟B細胞において活性でなく、末梢B細胞において活性なプロモーター、例えばCD21プロモーター、CD19プロモーター、CD84プロモーター、CD24プロモーター、CD45Rプロモーターの制御下に置かれる。

## 【0050】

特定のJ<sub>H</sub>セグメント、Dセグメント、DJ<sub>H</sub>セグメント集合体、V<sub>L</sub>セグメント、J<sub>L</sub>セグメント、V<sub>L</sub>J<sub>L</sub>セグメント集合体および/または軽鎖配列が本明細書に記載される細胞および/または動物によって産生される成熟抗体または抗体群に存在することが望まれる場合、IgHおよび/またはIgL遺伝子座は、そのような関心対象の配列を含むようさらに改変され得る。いくつかの態様において、これらの遺伝子座は、成熟抗体配列を形成するよう組み換えられ得るそのタイプの一つの可能性のあるセグメントであるように関心対象の配列を含

10

20

30

40

50

むよう改変され得る（例えば、ヒトJ<sub>H</sub>セグメントは、少なくとも1つのネイティブマウスJ<sub>H</sub>セグメントを維持しつつマウスIgH遺伝子座に導入され得る）。いくつかの態様において、その遺伝子座は、すべての成熟抗体配列に存在するそのタイプのセグメントであるように関心対象の配列を含むよう改変され得る（例えば、ヒトJ<sub>H</sub>セグメントは、すべてのネイティブマウスJ<sub>H</sub>セグメントが欠失または無効化されるようマウスIgH遺伝子座に導入され得る）。

#### 【0051】

いくつかの態様において、J<sub>H</sub>遺伝子座は、ヒトDおよびJ<sub>H</sub>カセットまたはヒトDJ<sub>H</sub>集合体を含むカセットにより置換され得る。いくつかの態様において、1つもしくは複数のD<sub>H</sub>、1つもしくは複数のJ<sub>H</sub>セグメントおよび／またはDJ<sub>H</sub>融合体は、カセット標的配列を含む。  
いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つまたは複数の非ネイティブD<sub>H</sub>セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つのD<sub>H</sub>セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つまたは複数の非ネイティブJ<sub>H</sub>セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、1つのJ<sub>H</sub>セグメントを含む。いくつかの態様において、IgH遺伝子座は、マウスIgH遺伝子座配列を含む。いくつかの態様において、遺伝子座は、ヒト化IgH遺伝子座配列を含む。

10

#### 【0052】

いくつかの態様において、細胞は、本明細書に記載される改変IgH遺伝子座に関してヘテロ接合性であり、他方のIgH遺伝子座は不活性となるよう改変され、細胞は本明細書に記載される改変IgH遺伝子座からのみIgH鎖を発現する。不活性なIgH遺伝子座は、非限定的な例として、欠失、部分欠失および／または変異され得る（例えば、IGCR1配列が変異および／もしくは欠失され得るかまたはV(D)J組み換えに必要とされる配列が変異および／もしくは欠失され得る（例えば、その遺伝子座のJ<sub>H</sub>部分の欠失））。

20

#### 【0053】

いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞は、ヒト配列を有するIgL遺伝子座を含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞は、ヒト化IgL遺伝子座を含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞は、ヒトイgL遺伝子座を含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞は、1つのV<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座を含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞は、1つのJ<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座を含み得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞は、IgL遺伝子座にヒトV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>再構成体を含み得る。いくつかの態様において、IgL遺伝子は、IG V1をコードする。

30

#### 【0054】

本明細書に記載される方法および組成物は、例えばGC反応およびSHMにより生じるバリエーションを利用する抗体の生成に関し得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞はさらに、リンパ球固有様式でGC抗体成熟応答を増大させる遺伝子を活性化、不活性化または変更することができる変異を含み得る。そのような変異は当技術分野で公知であり、非限定的な例として、PTEN<sup>-/-</sup>（例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Rolf et al. Journal of Immunology 2010 185:4042-4052を参照のこと）およびQA-1の変異または変更（例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み入れられる、L. Lu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 19420 (2008)およびH.J.Kim et al., Nature 467, 328 (2010)を参照のこと）を含み得る。

40

#### 【0055】

本明細書に記載される細胞は、非限定的な例として、幹細胞、胚性幹細胞、B細胞、成熟B細胞、未成熟B細胞および／またはハイブリドーマ細胞であり得る。本明細書に記載される細胞は、非限定的な例として、哺乳動物細胞、ヒト細胞および／またはマウス細胞であり得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される細胞は、マウス胚性幹細胞であり得る。

#### 【0056】

50

1つの局面において、本明細書に記載される改変細胞を含む遺伝子改変哺乳動物が本明細書に記載される。いくつかの態様において、哺乳動物はマウスであり得る。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法、例えば抗体および／または試験抗原を生成する方法は、遺伝子改変哺乳動物のB細胞を本明細書に記載されるように改変することのみに基づく。したがって、いくつかの態様において、遺伝子改変哺乳動物はキメラ体であり得る、例えば、それは2つの遺伝的に異なる細胞集団を含み得る。キメラ体の使用は、本明細書に記載される方法において使用される遺伝子改変哺乳動物を取得するプロセスを促進し得る。1つの局面において、第1の集団がV(D)J組み換え欠陥である細胞を含み、第2の集団が本明細書に記載される改変細胞を含む、2つの細胞集団を含む、キメラ遺伝子改変哺乳動物、例えばマウスが本明細書に記載される。V(D)J組み換え欠陥細胞は、当技術分野で公知であり、例えばRAG2<sup>-/-</sup>細胞がある。

10

#### 【0057】

本明細書に記載される細胞および哺乳動物は、既知の抗体の最適化を実現する。特定の抗原を認識することが知られているセグメント（例えば、特定の抗原を認識する既知の抗体由来のセグメント）を含む（V(D)J組み換え、GC反応および／またはSHMに供される）抗体を発現するよう細胞および／または哺乳動物を改変することによって、既知の抗体に関連する多数の抗体が生成され得る。これらの抗体は、インビトロおよび／またはインビボで、既知の抗体との比較で最適化された特徴に関してスクリーンおよび／または選別され得る。最適化は、例えば親和性および／または特異性の増大であり得る。

20

#### 【0058】

1つの局面において、既知の抗体から最適化された抗体を作製する方法が本明細書に記載され、本方法は以下の工程を含む：マウス胚盤胞に本明細書に記載される細胞を注入する工程であって、細胞がマウス胚性幹細胞であり、V<sub>H</sub>セグメントがネイティブ最3'側V<sub>H</sub>セグメントの位置に既知の抗体のV<sub>H</sub>セグメントを含む、工程；胚盤胞から遺伝子改変マウスへと成熟させるのに適した条件下でマウス胚盤胞をメスマウスに移植する工程；遺伝子改変マウスから、1) 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントを含む最適化された抗体、または2) 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントを含む最適化された抗体を産生する細胞を単離する工程。いくつかの態様において、胚盤胞細胞は、V(D)J組み換え欠陥細胞、例えばRAG2<sup>-/-</sup>細胞である。いくつかの態様において、胚盤胞細胞のIgH遺伝子座は、本明細書の他箇所に記載されるように非機能性にされる（例えば、胚盤胞細胞のIgH遺伝子座のJ<sub>H</sub>配列が欠失される）。いくつかの態様において、胚盤胞細胞は、成熟B細胞を形成することができず、かつ任意で成熟T細胞を形成することができない。いくつかの態様において、胚盤胞細胞は、成熟リンパ球を形成することができない。

30

#### 【0059】

いくつかの態様において、この方法はさらに、単離工程の前に遺伝子改変マウスを所望の標的抗原で免疫する工程を含み得る。いくつかの態様において、この方法はさらに、遺伝子改変マウスの少なくとも1つの細胞からモノクローナル抗体を産生させる工程を含み得る。

#### 【0060】

いくつかの態様において、胚性幹細胞のIgH遺伝子座は、既知の抗体由来の再構成済みD<sub>H</sub>セグメントを含む。いくつかの態様において、胚性幹細胞のIgL遺伝子座は、既知の抗体由来の構成済み軽鎖配列を含む。いくつかの態様において、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントは、生殖系列V<sub>H</sub>セグメント、親和性成熟中間体または成熟V<sub>H</sub>セグメントである。

40

#### 【0061】

本明細書に記載される細胞が本明細書に記載される方法を通じて生成された後、この細胞から幹細胞技術またはクローン技術のいずれかを通じて動物が生成され得る。例えば、核酸でトランスフェクトされる細胞がその生物の幹細胞（例えば、胚性幹細胞）である場合、この細胞は、トランスフェクションおよび培養の後、生殖系列細胞の中に改変された局面を含む生物を生成するために使用され得、ついでその生物が、その細胞のすべての中に改変された局面を含む別の動物を生成するために使用され得る。改変された局面を含む

50

動物を生成する他の方法において、クローン技術が使用され得る。これらの技術は、通常、改変された細胞の核を採取し、そして融合または置換のいずれかを通じて改変された核と卵母細胞を融合させ、次いでこれが動物を生成するよう操作され得る。ES技術に代えてクローン化を使用する手順の利点は、ES細胞以外の細胞をトランスフェクトできる点である。例えば、培養が非常に簡単である線維芽細胞が、改変される細胞として使用され得、この細胞由来の細胞が動物全体をクローン化するために使用され得る。

#### 【0062】

通常、改変された動物を生成するために使用される細胞（例えば、ES細胞）は、生成される動物と同じ種のものである。したがって例えば、マウス胚性幹細胞は通常、改変されたマウスの生成のために使用される。様々な細胞型を単離、培養および操作する方法は、当技術分野で公知である。非限定的な例として、胚性幹細胞は、当業者に周知の方法、例えばDoetschman et al. (1985) J. Embryol. Exp. Mol. Biol. 87:27-45に記載される方法を用いて生成および維持される。細胞は、当業者に周知の方法、例えばTeratocarcinoma and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. IRI. Press, Washington, D.C. [1987]においてRobertsonによって；Bradley et al. (1986) Current Topics in Devel. Biol. 20:357-371によって；およびHogan et al. (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1986))によって示された方法を用いる遺伝子改変のために培養および調製される。

#### 【0063】

いくつかの態様において、改変された局面を含む細胞が生成され、任意で選択された後、細胞は、例えばキメラ体を生成するために、胚または胚盤胞に挿入され得る。挿入は、当業者に公知の様々な方法で達成され得るが、典型的な方法はマイクロインジェクションによるものである。マイクロインジェクションの場合、約10～30個の細胞がマイクロビペットに回収され、発生期の胚または胚盤胞への改変ES細胞の組み込みを可能にする適切な発生段階にある胚に挿入される。例えば、ES細胞が、胚盤胞にマイクロインジェクションされ得る。ES細胞の導入のために使用される胚に適した発生段階は、極めて種依存的であるが、マウスの場合、それは約3.5日である。胚は、妊娠したメスの子宮をかん流することによって得られる。これを達成するのに適した方法は、当業者に公知である。

#### 【0064】

抗体および／または抗体産生細胞を単離する方法は、当技術分野で公知であり、非限定的な例として、例えばハイブリドーマの作製またはファージディスプレイを通じた、モノクローナル抗体の生成を含み得る。例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み入れられる、Little et al. Immunology Today 2000 21:364-370; Pasqualini et al. PNAS 2004 101:257-259; Reichert et al. Nature Reviews Drug Discovery 2007 6:349-356; およびWang et al. Antibody Technology Journal 2011 1:1-4を参照のこと。

#### 【0065】

1つの局面において、本明細書で上記された方法によって生成される最適化された抗体が本明細書に記載される。

#### 【0066】

1つの局面において、既知のモノクローナル抗体由来のVHセグメントを含むV<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>再構成体を含むBリンパ球を生成する方法が本明細書に記載され、本方法は以下の工程を含む：マウスIgH遺伝子座の最近位側V<sub>H</sub>セグメントを既知のモノクローナル抗体由来のV<sub>H</sub>セグメントで置き換えることによってマウス胚性幹細胞を改変する工程；およびマウスの胚盤胞に改変されたマウス胚性幹細胞を注入し、それによって既知のモノクローナル抗体由来のV<sub>H</sub>セグメントを含むV<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>再構成体を含むBリンパ球を生成するキメラマウスを作製する工程。いくつかの態様において、この方法はさらに、最近位側V<sub>H</sub>セグメントの3'末端を隔離する核酸配列内のIGCR1配列の機能を破壊するようマウス胚性幹細胞を改変する工程を含み得る。IGCR1配列を非機能性にする変異および／または変更は、本明細書の他箇所に記載されている。いくつかの態様において、胚盤胞の細胞は、V(D)J組み換え欠陥細

10

20

30

40

50

胞、例えばRAG2<sup>-/-</sup>細胞である。いくつかの態様において、胚盤胞細胞のIgH遺伝子座は、本明細書の他箇所に記載されるように非機能性にされている（例えば、胚盤胞細胞のIgH遺伝子座のJ<sub>H</sub>配列が欠失している）。いくつかの態様において、胚盤胞細胞は、成熟B細胞を形成することができず、かつ任意で成熟T細胞を形成することができない。いくつかの態様において、胚盤胞細胞は、成熟リンパ球を形成することができない。

#### 【0067】

いくつかの態様において、マウス胚性幹細胞はさらに、既知のモノクローナル抗体由來のIgL配列を含むよう改変される。いくつかの態様において、マウス胚性幹細胞はさらに、ヒトDおよびJ<sub>H</sub>カセットまたはヒトDJ<sub>H</sub>集合体を含むカセットで置換されたJ<sub>H</sub>遺伝子座を含むよう改変される。

10

#### 【0068】

いくつかの態様において、この方法はさらに、既知の抗体由來の生殖系列V<sub>H</sub>セグメントを有するマウスが生まれるようキメラマウスを繁殖させる工程を含む。いくつかの態様において、ES細胞は、ヒトV<sub>H</sub>セグメントに関してホモ接合性にされる。いくつかの態様において、ヒトV<sub>H</sub>セグメントは、既知のモノクローナル抗体由來のV<sub>H</sub>セグメントの配列から本質的になる。

#### 【0069】

本明細書の他箇所に記載されるように、特定のワクチン開発戦略は、1つまたは複数の中間抗原の同定に基づいており、その1つまたは複数の中間抗原による免疫がB細胞の活性化および抗体の多様化を誘導し、それによって最終標的抗原（例えば、HIV抗原）を認識する抗体が生成される。したがって、そのような中間抗原のインビオ評価を実現する方法および組成物が本明細書に記載される。いくつかの態様において、最終標的抗原を認識する抗体に関する構造情報、例えばHIVに対する自然抗体防御を示す希少な対象においてどのV<sub>H</sub>セグメントがHIV抗原に対する抗体に含まれるか、が知られている。本明細書に記載される方法および組成物を用いることで、そのようなV<sub>H</sub>セグメントを有する抗体を含むB細胞を活性化する中間抗原の能力が評価され得、それによって多抗原免疫療法の開発が可能になる。

20

#### 【0070】

1つの局面において、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを含むB細胞集団を活性化させる抗原として候補抗原を同定する方法が本明細書に記載され、本方法は以下の工程を含む：その哺乳動物の末梢B細胞の大部分が関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを発現するよう改変された、本明細書に記載される改変哺乳動物を抗原で免疫する工程；哺乳動物におけるB細胞の活性化を測定する工程；および哺乳動物におけるB細胞の活性化が参照レベルに対して増大している場合に、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを含むB細胞集団の活性化因子として候補抗原を同定する工程。B細胞活性化は、例えば、Ig可変領域の体細胞超変異状態の増大、抗原に対する成熟抗体の親和性の増大および／または抗原に対する成熟抗体の特異性の増大であり得る。

30

#### 【0071】

例えば、記載される方法は、より良いワクチン、例えばHIVまたはインフルエンザワクチンを作製および試験するために使用され得る。

40

#### 【0072】

例えば、HIVワクチン分野は、治療的に有効な抗HIV広域中和抗体（bNAB）を誘導するインビオ免疫戦略を試験するためのより良いマウスモデルからの恩恵を受けるであろう（1）。RAG-2欠損性胚盤胞補完（RDPC）法に基づく本発明者らの新規かつ高速なアプローチは、ワクチン接種研究において使用されるHIVワクチン分野への関心対象の特異的ヒト抗体をそれらのB細胞において発現するキメラマウスを生成するために使用され得る。このマウスモデルは、前駆抗体からBnAbへの親和性成熟を刺激する免疫原の効果の研究を促進し得る。

#### 【0073】

例えば、本発明者らは、VRC01の非変異前駆体を発現するマウスモデルを作製した。VRC

50

01の生殖系列V<sub>H</sub>セグメントは、IGHV1-2<sup>\*</sup>02である(2)。マウスにおいてIGHV1-2<sup>\*</sup>02を発現させるために、相同性媒介遺伝子標的化を使用してマウス胚性幹(ES)細胞においてマウスV<sub>H</sub>81XをIGHV1-2<sup>\*</sup>02で置換した(図1A、工程1)。V<sub>H</sub>81Xは、V(D)J組み換えにおいて最も頻繁に利用されるマウスV<sub>H</sub>セグメントなので(3)、IGHV1-2<sup>\*</sup>02は、V<sub>H</sub>81Xの代わりに挿入された場合に、同じ再構成優先性を示すであろうと予測された。IGHV1-2<sup>\*</sup>02置換を含むマウスを作製した。これらのマウスにおいて、B細胞のおよそ4%が再構成されたIGHV1-2<sup>\*</sup>02を有していた(図2Aおよび2B)。このマウスIgH遺伝子座は100個を超えるV<sub>H</sub>セグメントを含むので、この結果は、IGHV1-2<sup>\*</sup>02がこのマウスモデルにおけるV(D)J組み換えにおいて優先的に利用されることを示している。

## 【0074】

10

また、V<sub>H</sub>81X遺伝子座は、この遺伝子座に導入された任意のヒトV<sub>H</sub>セグメントが効果的に再構成を起こし末梢リンパ組織における成熟B細胞のレパートリーを支配するよう変更され得る。

## 【0075】

さらに、BnAbのヒトDJ<sub>H</sub>またはJ<sub>H</sub>セグメントが、それらがV<sub>H</sub>81X遺伝子座でヒトV<sub>H</sub>セグメントに連結され得るよう、マウスJ<sub>H</sub>遺伝子座に組み込まれ得る。加えて、再構成済み版のIgL可変領域をマウスIgk遺伝子座に組み込むことによってBnAbのヒトIg軽鎖(IgL)を発現するための将来のこの遺伝子座への他のヒトJ<sub>H</sub>セグメントの導入を容易にするよう、マウスJ<sub>H</sub>遺伝子座が変更され得る。

## 【0076】

20

本明細書に記載されるシステムは、VRC01の親和性成熟中間体を発現させるために使用され得る。これらのマウスは、親和性成熟を完全成熟BnAbへと誘導する非変異祖先または変異中間体の連続的免疫を可能にする。

## 【0077】

いくつかの局面においては、IGCRIエレメントが欠失され得る。IGCRIは、V<sub>H</sub>とDの間の介在領域内の調節エレメントである(5)。IGCRIの欠失は、V(D)J組み換えにおけるV<sub>H</sub>81Xの偏った使用を強める(5)。IGCRIを、IGHV1-2<sup>\*</sup>02が組み込まれたIgH対立遺伝子から欠失させた(図1A 工程2)。IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID ES細胞を、Rag2欠損性胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。Rag2はV(D)J組み換えに必須なので、BおよびT細胞は、Rag2が十分なESクローニングからのみ生じ得、Rag2欠損性胚盤胞からは生じない(4)。このRDBC法は、キメラマウスにおけるBおよびT細胞に対するES細胞の任意の遺伝子操作の影響の評価を可能にする。IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRIDキメラマウスの成熟B細胞におけるIGHV1-2<sup>\*</sup>02の使用の頻度を決定した(図2Aおよび2B)。ハイブリドーマ分析に基づき、脾臓B細胞の59%が再構成されたIGHV1-2<sup>\*</sup>02を含んでいた。したがって、IGCRIの欠失は、IGHV1-2<sup>\*</sup>02の使用を15倍増加させた。IGHV1-2<sup>\*</sup>02を含む組み換え連結体を配列分析し、20%が生産的であることが見出された(図2C)。学説による拘束を望まないが、非生産的IGHV1-2<sup>\*</sup>02再構成体は、他のIgH対立遺伝子の生産的再構成によってB細胞の発生を完遂した。

30

## 【0078】

いくつかの局面においては、IgH<sup>b</sup>対立遺伝子のJ<sub>H</sub>領域が欠失され得る。IGHV1-2<sup>\*</sup>02を含むIgH対立遺伝子にV(D)J組み換えを制限するために、本発明者らは、他方のIgH対立遺伝子のJ<sub>H</sub>領域を欠失させた。本明細書で使用されたES細胞は、129とC57BL/6マウスの間のF1ハイブリッドから得られる。129およびC57BL/6マウスのIgH対立遺伝子は、それぞれ、IgH<sup>a</sup>およびIgH<sup>b</sup>アロタイプに属し；IGHV1-2<sup>\*</sup>02置換およびIGCRI欠失は、IgH<sup>a</sup>対立遺伝子上で行われた。IgH<sup>b</sup>対立遺伝子を不活性化するために、J<sub>H</sub><sup>b</sup>領域を欠失させ(図1B、工程3)、そして操作されたES細胞をRDBCのために使用した。IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup> RDBCマウスにおける脾臓B細胞間でのIGHV1-2<sup>\*</sup>02使用の頻度を決定し、B細胞の34%がIGHV1-2<sup>\*</sup>02再構成体を含み、そのすべてが生産的であることが見出された(図2A～2D)。したがってIGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup> ESクローニングは、マウスモデルにおいて任意のヒトV<sub>H</sub>セグメントを発現させる効果的なプラットフォームとして機能し得る。

## 【0079】

40

50

いくつかの局面においては、VRC01の非変異前駆体のためのIg軽鎖(IgL)がマウスJ<sub>k</sub>遺伝子座に組み込まれる。VRC01ファミリーのBnAbのIgL鎖の特徴は、短い5アミノ酸のCDR L3である(6)。デノボ再構成を通じてそのような短いCDR L3を得る可能性は低いため、再構成済み版の非変異VRC01 IgLをマウスJ<sub>k</sub><sup>a</sup>遺伝子座に組み込んだ(図1C、工程4)。このESクローン(IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup>D/VRC01LC)をRag2欠損性胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。

#### 【0080】

いくつかの局面においては、ヒトJ<sub>H</sub>2セグメントがマウスJ<sub>H</sub>遺伝子座に組み込まれる。VRC01ファミリーにおいて唯一保存されているCDR H3の特徴は、100B位のW残基であり(6)、これはヒトJ<sub>H</sub>2セグメントによって提供され得る。VRC01抗体内で高レベルの変異およびN-スクレオチドの無作為的性質から、そのDセグメントの同定を含む、真正の生殖系列CDR H3配列を究明するのは困難である。したがって、本発明者らは、ヒトJ<sub>H</sub>2セグメントをマウスJ<sub>H</sub><sup>a</sup>遺伝子座に組み込んだ;ヒトJ<sub>H</sub>2とマウスDセグメントの組み換えは、多様なCDR H3を生成する。VRC01ファミリーの抗体のCDR H3の性質のばらつき(6)から、この組み換えによって生成されるCDR H3の少なくとも一部はVRC01とgp120の相互作用に適合する。加えて、多様なCDR H3は、gp120に結合するが自己抗原と交差反応しない、したがって骨髓免疫寛容機構を通じた発生阻止に供されない抗体の選択を可能にする。本発明者らは、全マウスJ<sub>H</sub>1-J<sub>H</sub>4領域をヒトJ<sub>H</sub>2で置換するための標的コンストラクトを作製した(図1A、工程5)。この標的コンストラクトを、IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup>D/VRC01LC ESクローンに導入した。

10

#### 【0081】

Qa-1内の特定の変異は、マウスにおいて異常に大きな胚中心をもたらすことが示されている(7)。本発明者らは、それが親和性成熟を促進するかどうかを確認するために、本明細書に示されているシステムへのそのようなQa-1変異の組み込みを調査した。しかし、本発明者らは体細胞超変異の頻度がQa-1と対照マウスの間で同等であることを見出したため、本発明者らはこの変異からの付加的な利益を見出すことができなかった(データ示さず)。しかし、これは、いくつかの局面においてその機能を強化するために付加的な変異がシステムに導入され得る選択肢を排除するものではない。

#### 【0082】

いくつかの局面において、本発明は、VRC01抗体の非変異前駆体を発現させるためのマウスマodelまたはマウスシステムを提供する。このシステムへの他のヒト抗体遺伝子の組み込みを容易にするため、I-SceI切断部位をV<sub>H</sub>81X遺伝子座に、Cas9のガイドRNAのための標的配列をJ<sub>k</sub>に遺伝子座に導入した;ヒトJ<sub>H</sub>2をこのJ<sub>H</sub>遺伝子座に組み込むための標的コンストラクトにCas9のガイドRNAのための標的部位を組み込むこともできる。I-SceIまたはCas9によるこれらの遺伝子座における二重鎖切断部の導入は、遺伝子標的化の効率を向上させ得る。この変更されたESクローンは、キメラマウスの集団を効率的に生成するRDBCアプローチと共に使用され得る。さらに、RDBCキメラマウスのすべてが、今のところ、それらの遺伝的変更を生殖系列に伝達する。

20

#### 【0083】

特定の局面において、本発明は、VRC01の非変異前駆体を発現するマウスマodelを提供する。本発明者らは、VRC01の非変異前駆体を発現するマウスマodelならびにVRC01 Ig軽鎖およびヒトJ<sub>H</sub>2セグメントを含むマウスについて説明する。VRC01の様々な親和性成熟中間体を組み込んだ、例えばES細胞も、本明細書に記載される(8)。

40

#### 【0084】

骨髓における免疫寛容機構による負の制御に供されるBnAbの条件付き発現システムの開発。いくつかのBnAbは、多反応性であり、自己抗原に結合し得る。結果として、マウスにおいてこれらのBnAbを発現するB細胞は、骨髓における免疫寛容機構による発生阻止に供される(9)。

#### 【0085】

この課題に対処するために、いくつかの局面において、本発明者らは、成熟B細胞にお

50

いて特異的にBnAbを発現し、それによって骨髄における免疫寛容機構を回避するシステムおよび方法を提供する。このシステムまたは方法において、B細胞前駆体において非自己反応性抗体をコードするIg可変領域遺伝子が骨髄で発現され；これらの抗体遺伝子は、本明細書で「ドライバーV遺伝子」と称される（図3）。BnAb遺伝子は、このドライバーV遺伝子の上流に配置され、骨髄において発現されない。これらのB細胞が末梢リンパ組織において成熟B細胞になったとき、ドライバーV遺伝子は、成熟B細胞段階で特異的に発現されるcreリコンビナーゼによって隣接loxP部位により除去される（CD21-cre、図3）。結果として、BnAb遺伝子がドライバーV遺伝子と置き換わり、成熟B細胞において発現される。この方法またはシステムは、例えばBnAb VRC26（10）およびDH270を発現するために使用され得る。

10

#### 【0086】

本発明者らは、CD21-creトランスジェニックマウスからES細胞株を得；それによって本発明者らは、マウスの繁殖への依存に代えてCD21-cre ES細胞株に直接導入する条件付き発現を構築することができた。次いでVRC26およびDH270の条件付き発現コンストラクトを構築し、CD21-cre ES細胞にトランスフェクトした。

#### 【0087】

いくつかの局面において、本発明は、HIV感染を処置するためのBnAbの最適化のための方法を提供する。上記のシステムは、例えば、本明細書に記載されるAIDS治療のためにBnAbを改善するよう適合され得る。この応用において、BnAbのV<sub>H</sub>およびDJ<sub>H</sub>セグメントが、それぞれ、V<sub>H</sub>81XおよびJ<sub>H</sub>遺伝子座に組み込まれる（図4）。V<sub>H</sub>およびDJ<sub>H</sub>セグメントがB細胞発生期にV(D)J組み換えを通じて連結されると、連結多様性がCDR H3の範囲を大きく拡張し、抗原結合部位に小さな違いを有する関連抗原のライブラリを本質的に生成する。標的抗原を用いた免疫は、高親和性抗体を発現するB細胞を選別し、これがさらに体細胞超変異を通じて最適化され得る。いくつかの態様において、BnAbは、DH270またはCH103であり得る（11）。成熟DH270抗体は、比較的低レベルの体細胞超変異を含み、潜在的にさらなる親和性成熟の周回によるさらなる最適化の余地をより多く残す。CH103抗体の変異頻度はまた、VRC01に関して報告されているよりも低く、他のBnAbのいくつかほど広域的な中和活性を示さない。DH270およびCH103の両方に関して、CDR H3は、HIVエンベロープタンパク質との接触面の重要な部分を構成する。

20

#### 【0088】

利便性を考慮して、本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において使用されるいくつかの用語およびフレーズの意味を以下に提供する。そうでないことが示されていない限り、または文脈から暗示されていない限り、以下の用語およびフレーズは、以下に提供される意味を含む。定義は、具体的な態様を説明するのを補助するために提供されるものであり、特許請求の範囲に記載の発明を限定することは意図されておらず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定される。そうでないことが示されていない限り、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、本発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。当技術分野における用語の用法と本明細書に提供されるその定義の間に明白な食い違いが生じた場合は、本明細書内に提供される定義が優先されるべきである。

30

#### 【0089】

「減少（decrease）」、「減少（reduced）」、「減少（reduction）」または「阻害」という用語はすべて、統計的に有意な量の減少を意味するよう本明細書で使用される。いくつかの態様において、「減少（reduce）」、「減少（reduction）」または「減少（decrease）」または「阻害」は、典型的に、参照レベル（例えば、特定の処置の不存在）と比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%またはそれ以上

40

50

の減少を含み得る。本明細書で使用される場合、「減少（reduction）」または「阻害」は、参照レベルと比較して完全な阻害または減少を含まない。「完全な阻害」は、参照レベルと比較して100%の阻害である。減少は、好ましくは、特定の障害を有さない個体における正常の範囲内として受け入れられるレベルへの低下であり得る。

#### 【0090】

「増大された（increased）」、「増大する（increase）」、「増強」または「活性化」という用語はすべて、統計的に有意な量の増加を意味するよう本明細書で使用される。いくつかの態様において、「増大された（increased）」、「増大する（increase）」、「増強」または「活性化」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば参照レベルと比較して少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、もしくは100%を含む最大100%の増加、もしくは10～100%の間の任意の増加、または参照レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍の増加、もしくは2倍～10倍もしくはそれ以上の間の任意の増加を意味し得る。マーカーまたは兆候との関係で、「増大（increase）」は、そのようなレベルの統計的に有意な増大である。10

#### 【0091】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は本明細書で言い換え可能に使用され、隣接する残基のアルファ・アミノ基とカルボキシ基の間のペプチド結合によって相互に接続されたひとつながりのアミノ酸残基群を意味する。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、そのサイズまたは機能に関係なく、修飾アミノ酸（例えば、リン酸化、糖化、グリコシリ化等）およびアミノ酸アナログを含む、アミノ酸のポリマーを表す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は多くの場合、比較的大きなポリペプチドを参照する際に使用され、一方、「ペプチド」という用語は多くの場合、小さなポリペプチドを参照する際に使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の用法は重複している。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびそのフラグメントを参照する場合、本明細書で言い換え可能に使用される。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質は、遺伝子産物、天然タンパク質、ホモログ、オルトロゴ、パラログ、フラグメントならびに上記のものの他の等価物、変種、フラグメントおよびアナログを含む。2030

#### 【0092】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デオキシリボ核酸またはそれらのアナログの単位を組み込んだ任意の分子、好ましくはポリマー分子を表す。核酸は、単鎖または二重鎖のいずれかであり得る。単鎖核酸は、変性した二重鎖DNAの一方の核酸鎖であり得る。あるいは、それは、いかなる二重鎖DNAにも由来しない単鎖核酸であり得る。1つの局面において、核酸は、DNAであり得る。別の局面において、核酸は、RNAであり得る。適当な核酸分子は、ゲノムDNAまたはcDNAを含むDNAである。他の適当な核酸分子は、mRNAを含むRNAである。

#### 【0093】

本明細書で使用される場合、B細胞の活性化に関連して使用される「活性化因子」という用語は、B細胞の活性化を増大させる、例えばB細胞の増殖、SHMおよび/またはGC反応を増大させる抗原を表す。40

#### 【0094】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、生来的に抗体を產生する任意の種に由来するものであるかまたは組み換えDNA技術によって作製されたものであるか、血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ、酵母または細菌から単離されたものであるかによらず、IgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgE分子またはそれらの抗原特異的抗体フラグメント（Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、単ドメイン抗体、閉構造多特異性抗体、ジスルフィド連結scFv、ダイアボディを含むがこれらに限定されない）を表す。50

## 【0095】

別の例において、抗体は、2つの重（H）鎖可変領域および2つの軽（L）鎖可変領域を含む。VH領域（例えば、免疫グロブリンポリペプチドの一部）は本明細書の他箇所に記載される $V_H$ セグメントと同じでないことに注目されたい。VHおよびVL領域はさらに、より保存された「フレームワーク領域」（「FR」）と呼ばれる領域によって分断された「相補性決定領域」（「CDR」）と呼ばれる超可変性の領域に细分類され得る。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、厳密に定義されている（それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242およびChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917を参照のこと）。VHおよびVLの各々は典型的に、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順に配置される、3つのCDRおよび4つのFRから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

## 【0096】

「単特異性抗体」という用語は、特定の標的、例えばエピトープに対する单一の結合特異性および親和性を示す抗体を表す。この用語は、本明細書で使用される場合にその抗体がどのようにして生成されたかによらず单一の分子組成の抗体またはそのフラグメントの調製物を表す「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含む。

## 【0097】

本明細書に記載される場合、「抗原」は、抗体上の結合部位によって結合される分子である。典型的に、抗原は、抗体リガンドによって結合され、インビオで抗体応答を誘起することができる。抗原は、ポリペプチド、タンパク質、核酸もしくは他の分子またはそれらの一部分であり得る。「抗原性決定基」という用語は、抗原結合分子によって、より具体的にはその分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピトープを表す。

## 【0098】

本明細書で使用される場合、「親和性」という用語は、相互反応、例えば抗原に対する抗体の結合の強度を表し、解離定数（ $K_D$ ）として量的に表現され得る。アビディティーは、抗原結合分子（例えば、本明細書に記載される抗体試薬）と関連抗原の間の結合の強度の尺度である。アビディティーは、抗原性決定基と抗原結合分子上の抗原結合部位の間の親和性および抗原結合分子上に存在する関連結合部位の数の両方に関係する。典型的に、抗原結合タンパク質（例えば、本明細書に記載される抗体試薬）は、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ モル/リットルまたはそれ未満、好ましくは $10^{-7} \sim 10^{-12}$ モル/リットルまたはそれ未満、より好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ モル/リットルの解離定数（ $K_D$ ）（すなわち、 $10^5 \sim 10^{12}$ リットル/モルまたはそれ以上、好ましくは $10^7 \sim 10^{12}$ リットル/モルまたはそれ以上、より好ましくは $10^8 \sim 10^{12}$ リットル/モルの結合定数（ $K_A$ ））でそれらの同族または特異的抗原に結合する。通常、 $10^{-4}$ モル/リットルを超える任意の $K_D$ 値（または $10^4 M^{-1}$ を下回る任意の $K_A$ 値）が、非特異的結合を示すとみなされる。有意義（例えば、特異的）であるとみなされる生物学的相互作用の $K_D$ は、典型的に、 $10^{-10} M (0.1 nM) \sim 10^{-5} M (10000 nM)$ の範囲である。相互作用が強いほど、その $K_D$ が低くなる。好ましくは、本明細書に記載される抗体試薬上の結合部位は、500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは10 nM未満、例えば500 pM未満の親和性で所望の抗原に結合する。抗原または抗原性決定基に対する抗体試薬の特異的結合は、例えばScatchard分析ならびに／または競合結合アッセイ、例えば放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）およびサンドイッチ競合アッセイならびにそれ自体が当技術分野で公知のそれらの異なる派生法、ならびに本明細書で言及されているその他の技術を含むそれ自体公知の任意の適当な様式で決定され得る。

## 【0099】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」または「特異性」という用語は、第1の物体が非標的である第3の物体に結合するよりも高い特異性および親和性で第2の標的物体に結合する2つの分子、化合物、細胞および／または粒子間の化学的相互作用を表す。いくつかの態様において、特異的結合は、第3の非標的物体に対する親和性よりも少なくとも1

10

20

30

40

50

0倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍またはそれ以上高い第2の標的物体に対する第1の物体の親和性を表し得る。したがって、本明細書で使用される場合、「選択的に結合」または「特異的に結合」は、 $10^{-5}$  M ( $10000$  nM) もしくはそれ未満、例えば $10^{-6}$  Mもしくはそれ未満、 $10^{-7}$  Mもしくはそれ未満、 $10^{-8}$  Mもしくはそれ未満、 $10^{-9}$  Mもしくはそれ未満、 $10^{-10}$  Mもしくはそれ未満、 $10^{-11}$  Mもしくはそれ未満または $10^{-12}$  Mもしくはそれ未満の $K_D$ で、標的、例えば、例えば特定の抗原のアミノ酸配列を含む、ペプチドに結合する本明細書に記載される薬剤（例えば、抗体試薬）の能力を表す。例えば、本明細書に記載される薬剤が $10^{-5}$  Mまたはそれ未満の $K_D$ で抗原を含む第1のペプチドに結合するが、別の無作為に選択されたペプチドには結合しない場合、その薬剤は、その第1のペプチドに特異的に結合すると言われる。特異的結合は、例えば、その薬剤の親和性およびアビディティーならびにその薬剤の濃度に影響され得る。当業者は、任意の適当な方法、例えば適当な細胞中での薬剤の滴定および／またはペプチド結合アッセイを用いて、薬剤が標的に選択的に結合する適当な条件を決定することができる。  
。

#### 【 0 1 0 0 】

本明細書で使用される場合、「キメラ」という用語は、抗体または抗体をコードする配列との関係で使用される場合、異なる動物種由来の2つまたはそれ以上のセグメントまたは部分によって特徴付けられる免疫グロブリン分子を表す。例えば、キメラ抗体の可変領域は非ヒト哺乳動物抗体、例えばマウスモノクローナル抗体由来であり、免疫グロブリン定常領域はヒト免疫グロブリン分子由来である。キメラ抗体の可変セグメントは、典型的に、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にヒト免疫グロブリンのそれ、の少なくとも一部に連結される。ヒト定常領域DNA配列は、周知の手順にしたがい様々なヒト細胞、例えば不死化されたB細胞から単離され得る（その全体が参照により本明細書に組み入れられる、WO 87/02671）。抗体は、軽鎖および重鎖定常領域の両方を含み得る。重鎖定常領域は、CH1、ヒンジ、CH2、CH3およびときにCH4領域を含み得る。治療目的で、CH2ドメインが欠失または省略され得る。例えば、適当な抗原特異性のマウス、または他の種の抗体分子由来の遺伝子と適当な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の作製のために開発された技術が当技術分野で公知である（それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Take da et al., Nature 314:452-454 (1985)を参照のこと）。

#### 【 0 1 0 1 】

本明細書で使用される場合、「ヒト化」という用語は、CDRはヒト起源ではないがIgタンパク質の残りの配列（例えば、フレームワーク領域および定常領域）の配列がヒト起源である抗体（またはそのフラグメント、例えば軽または重鎖）を表す。当業者は、特定の抗体をヒト化する方法を理解している、例えば米国特許第5,585,089号；同第6,835,823号；同第6,824,989号を参照のこと。

#### 【 0 1 0 2 】

本明細書で使用される場合、「改变」という用語は、人の手によって操作されたという局面を表す。例えば、遺伝子座は、その遺伝子座において生来的にはその順でひとつに連結されていない2つまたはそれ以上の配列が改变された遺伝子座において相互に直接的に連結されるよう人の手によって操作されている場合、「改变された」ものとみなされる。例えば、本発明のいくつかの態様において、改变された遺伝子座は、そのすべてが自然界で見出されるが同じ遺伝子座では見出されないまたは自然界でその遺伝子座においてその順では見出されない非ネイティブVHセグメントを有する様々なIgH配列を含む。一般的な慣行であり当業者に理解されていることであるが、改变されたポリヌクレオチド（および／またはそのようなポリヌクレオチドを含む細胞もしくは動物）の子孫および複製物は、典型的に、実際の操作が以前の物体に対して行われているにもかかわらず、なおも「改变された」ものと称される。

#### 【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「組み換え欠陥」という用語は、組み換え、特にIgHおよびIgL遺伝子座においてV(D)J組み換えを起こすことができない細胞（または動物）を表す。典型的に、V(D)J組み換え欠陥細胞は、V(D)J組み換えを起こすのに必要とされるタンパク質をコードする遺伝子に変異を含む細胞である。細胞および／または動物をV(D)J組み換え欠陥にする変異は、当技術分野で公知であり、例えばRAG2<sup>-/-</sup>細胞はV(D)J組み換え欠陥であり、そのような変異を有するマウスは市販されている（例えば、ストック番号008449、Jackson Laboratories, Bar Harbor, MEを参照のこと）。V(D)J組み換え欠陥変異のさらなる非限定的な例は、RAG1<sup>-/-</sup>である。いくつかの態様において、細胞は、例えば生殖系列J<sub>H</sub>セグメントを欠失させることにより、1つのみの遺伝子座、例えばIgH遺伝子座においてV(D)J組み換え欠陥にされ得る。

10

#### 【0104】

本明細書で使用される場合、「カセット」という用語は、（例えば、本明細書の他箇所に記載されるカセット標的配列を用いて）宿主細胞に導入し宿主細胞のゲノムに組み込むことができる核酸分子またはそのフラグメントを表す。カセットは、遺伝子（例えば、IgH遺伝子）またはそのフラグメント、例えばV<sub>H</sub>セグメントを含み得る。カセットは、単離されたヌクレオチドフラグメント、例えばdsDNAであり得るまたはベクター、例えばプラスミド、コスミドおよび／もしくはウイルスベクターに含まれ得る。

#### 【0105】

本明細書で使用される場合、「B細胞」という用語は、液性免疫応答において役割を果たし、かつ適応免疫系の要素であるリンパ球を表す。本願において、「B細胞（B cell）」、「B細胞（B-cell）」および「Bリンパ球」という表現は、同じ細胞を表す。

20

#### 【0106】

未成熟B細胞は、ほとんどの哺乳動物の骨髄で産生される。骨髄においてIgM+未成熟段階に達した後、これらの未成熟B細胞はリンパ組織に移動し、そこではそれらは移行B細胞と呼ばれ、その一部がその後、成熟Bリンパ球に分化する。B細胞の発生はいくつかの段階を通じて起こり、各段階は抗体遺伝子座におけるゲノム内容の変化によって特徴付けられる。

#### 【0107】

各B細胞は、その表面上に、特有の抗原に結合することができる特有の受容体タンパク質（B細胞受容体（BCR）と呼ばれる）を有する。BCRは膜結合型免疫グロブリンであり、B細胞を他のタイプのリンパ球から区別し、インビボでのB細胞活性化において中心的な役割を果たすのはこの分子である。B細胞がその同族抗原に遭遇し、Tヘルパー細胞から追加のシグナルを受け取ると、それはさらに2つのタイプのB細胞（形質B細胞およびメモリーB細胞）の一方に分化し得る。B細胞は、これらの細胞型の一方に直接的に得るかまたはB細胞がその免疫グロブリン遺伝子の可変領域を超変異させ（「体細胞超変異」）そしておそらくクラススイッチを行う中間分化工程である胚中心反応を起こし得るかのいずれかである。

30

#### 【0108】

形質B細胞（形質細胞としても公知）は、抗原に曝露され、多量の抗体を産生および分泌する大きなB細胞である。これらは短命の細胞であり、通常その免疫応答を誘導した抗体がなくなるとアポトーシスを起こす。メモリーB細胞は、一次免疫応答の間に遭遇した抗原に対して特異的な活性化されたB細胞から形成される。これらの細胞は、長期間生存することができ、かつ同じ抗原への第2の曝露後に素早く応答し得る。

40

#### 【0109】

本明細書で使用される場合、「GC反応」という用語は、胚中心で起こるプロセスを表し、その間にB細胞はSHM、記憶形成および／またはクラス／アイソタイプスイッチを起こす。胚中心（GC）反応は、外来病原体に対するT依存性液性免疫および適応免疫応答の最終発現の基礎である。GCでは、増殖性抗原特異的B細胞、T濾胞性ヘルパー細胞および二次リンパ器官の中央濾胞領域を構成的に占拠する特化した濾胞樹状細胞の間で特有の協調が見られる。

50

## 【0110】

本明細書で使用される場合、「体細胞超変異」または「SHM」という用語は、ポリヌクレオチド配列に対するAID(活性化誘導シチジンデアミナーゼ)の作用により開始されるまたはその作用に関連するIg遺伝子座におけるポリヌクレオチド配列の変異を表す。SHMは、B細胞増殖中に起こり、ゲノムにおける通常の変異率よりも少なくとも $10^5 \sim 10^6$ 倍高い変異率で起こる。

## 【0111】

本明細書で使用される場合、「幹細胞」という用語は、自己再生の特性を有しあつより分化した細胞型に自然に分化する発生能を有する未分化または部分分化状態の細胞を表し、発生能(すなわち、全能性(totipotent)、多能性(pluripotent)、多能性(multipotent)等)に関して特定の言外の意味を有さない。自己再生は、幹細胞がその発生能を維持しつつ増殖しより多くのそのような幹細胞を生じることができることを意味する。したがって、「幹細胞」という用語は、特定の環境下でより特化したまたは分化した表現型に分化する発生能を有しあつ特定の環境下で実質的に分化せずに増殖する能力を保持する細胞の任意のサブセットを表す。「体性幹細胞」という用語は、胎児、若年および成体組織を含む非胚性組織から得られる任意の幹細胞を表すよう本明細書で使用される。天然の体性幹細胞は、血液、骨髄、脳、嗅上皮、皮膚、臍臍、骨格筋および心筋を含む幅広い成体組織から単離されている。例示的な天然に存在する体性幹細胞は、間葉幹細胞および造血幹細胞を含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、幹または前駆細胞は、胚性幹細胞であり得る。本明細書で使用される場合、「胚性幹細胞」は、典型的には妊娠約10~12週前であるがそうである必要はない妊娠期の任意の時点で採取された前胚組織(例えば、胚盤胞)、胚組織または胎児組織を含む、受精後であるが妊娠終了の前に形成される組織から得られる幹細胞を表す。最も多くの場合、胚性幹細胞は、初期胚または胚盤胞由来の全能性細胞である。胚性幹細胞は、ヒト組織を含むがこれに限定されない適当な組織から直接的にまたは樹立された胚細胞株から取得され得る。1つの態様において、胚性幹細胞は、Thomsonら(それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,843,780号および同第6,200,806号; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133ff, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995)によって記載されるようにして取得される。

## 【0112】

例示的な幹細胞は、胚性幹細胞、成体幹細胞、多能性幹細胞、骨髓幹細胞、造血幹細胞等を含む。幹細胞についての説明は、それらを単離および培養する方法も含めて、特に、*Embryonic Stem Cells, Methods and Protocols*, Turksen, ed., Humana Press, 2002; Weisman et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17:387 403; Pittinger et al., Science, 284:143 47, 1999; *Animal Cell Culture*, Masters, ed., Oxford University Press, 2000; Jackson et al., PNAS 96(25):14482 86, 1999; Zuk et al., Tissue Engineering, 7:211 228, 2001 ("Zuk et al."); Atala et al., 特に第33 41章; ならびに米国特許第5,559,022号、同第5,672,346号および同第5,827,735号において見出され得る。間質細胞についての説明は、それらを単離する方法を含めて、特に、Prockop, Science, 276:71 74, 1997; Theise et al., Hepatology, 31:235 40, 2000; *Current Protocols in Cell Biology*, Bonifacino et al., eds., John Wiley & Sons, 2000 (2002年3月版を通じた改定を含む); および米国特許第4,963,489号において見出され得る。

## 【0113】

「統計的に有意」または「有意」という用語は、統計的有意性を表し、通常、2標準偏差(2SD)またはそれ以上の差を意味する。

## 【0114】

実施例を実施する以外では、またはそうでないことが示されていない限り、本明細書で使用される成分の量または反応条件を表すすべての数値は、すべての例において、「約」という用語によって修飾されていると理解されるべきである。「約」という用語は、百分率に関連して使用される場合、±1%を意味し得る。

10

20

30

40

50

**【0115】**

本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」または「含む (comprises)」という用語は、その方法または組成物にとって必須である組成物、方法およびそれらの各要素を参照するために使用されるが、それが必須であろうとなかろうと、未指定の要素を含む余地を残している。

**【0116】**

「からなる」という用語は、その態様の説明の中で言及されていないあらゆる要素に対して排他的である、本明細書に記載される組成物、方法およびそれらの各要素を表す。

**【0117】**

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という用語は、特定の態様に必要とされる要素を表す。この用語は、その態様の基本的かつ新規または機能的な特徴に実質的に影響しない要素の存在を許容する。

10

**【0118】**

単数形「a」、「an」および「the」は、文脈がそうでないことを明確に示していない限り、複数の参照を含む。同様に、「または、もしくは」という単語は、文脈がそうでないことを明確に示していない限り、「および、ならびに」を含むことが意図されている。本開示を実施または試験する際には本明細書に記載されているのと同様または同等の方法および材料を使用することができるが、以下には適当な方法および材料が記載されている。「例えば (e.g.)」という略語は、ラテン語の*exempli gratia*に由来し、本明細書で非限定的な例を示すために使用される。したがって、「例えば (e.g.)」という略語は、「例えば (for example)」という用語と同義である。

20

**【0119】**

細胞生物学および分子生物学における一般用語の定義は、「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」、第19版、Merck Research Laboratories出版、2006年 (ISBN 0-911910-19-0) ; Robert S. Porterら (編)、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd.出版、1994年 (ISBN 0-632-02182-9) ; Benjamin Lewin、Genes X、Jones & Bartlett Publishing出版、2009年 (ISBN-10: 0763766321) ; Kendrewら (編)、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.出版、1995年 (ISBN 1-56081-569-8) およびCurrent Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coliganら編において見出され得る。

30

**【0120】**

それ以外のことが言及されていない限り、本発明は、例えば、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); または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 Cell Biology (CPCB)(Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.) およびCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005)、Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol.57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998) に記載されるような標準的手順を用いて実施され、これらはすべてその全体が参考により本明細書に組み入れられる。

40

**【0121】**

他の用語は、本発明の様々な局面の説明の中で本明細書で定義されている。

**【0122】**

本願を通じて引用されている、参考文献、発行された特許、公開された特許出願および同時係属中の特許出願を含む、すべての特許およびその他の刊行物は、明示的に、例えば、本明細書に開示される技術と関連して使用され得るそのような刊行物に記載される方法

50

論を説明および開示する目的で、参照により本明細書に組み入れられる。これらの刊行物は、それらの開示が本願の出願日より以前であるために提供されるにすぎない。これに関するいかなる事情も、本発明者らが、それが先行発明であるためまたは任意のその他の理由によりそのような開示よりも先の日付を主張する資格を有さないとの承認とみなされるべきではない。これらの書類の日付または内容の説明に関するすべての言及は、出願人が入手し得た情報に基づいており、これらの書類の日付または内容の正確性に関する承認とはならない。

#### 【 0 1 2 3 】

本開示の態様の説明は、排他的であることまたは本開示を開示された正確な形態に限定することを意図していない。本開示の個々の態様および実施例は例示を目的として本明細書に開示されており、関連技術分野の当業者が認識するように、様々な等価な変更が本開示の範囲内で可能である。例えば、方法の工程または機能はある順で示されているが、代替の態様は異なる順で機能を実施し得、または機能は実質的に同時に実施され得る。本明細書に提供される開示の技術は、他の手順または方法に適切に適用することができる。本明細書に開示される様々な態様は、さらなる態様を提供するよう組み合わせることができる。本開示の局面は、必要に応じて、本開示のなおさらなる態様を提供するために、上記参考文献および出願の組成、機能およびコンセプトを利用するよう変更され得る。さらに、生物学的機能の等価性を考慮して、タンパク質構造に関して、その生物学的または化学的作用に種または量的に影響を与えるに、様々な変更がなされ得る。これらおよびその他の変更は、詳細な説明に照らして本開示に対してなされ得る。すべてのそのような変更は、添付の特許請求の範囲内に包含されることが意図されている。

10

#### 【 0 1 2 4 】

上記態様のいずれかの個々の要素は、他の態様の要素と組み合わせることができまた他の態様の要素で置き換えることができる。さらに、本開示の特定の態様に関連する利点は、これらの態様との関係で記載されているが、他の態様もまたそのような利点を示し得、そしてすべての態様が本開示の範囲に包含されるためにそのような利点を示すことを必要とするものではない。

20

#### 【 0 1 2 5 】

本明細書に記載される技術は、以下の実施例によってさらに例証されるが、これらはいかなる事情によってもさらなる限定とみなされるべきでない。

30

#### 【 0 1 2 6 】

本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、以下の番号が付された項目のいずれかにしたがい定義することができる。

1 . IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントがカセット標的配列を含むよう改変された改変IgH遺伝子座を含む、細胞。

2 . カセット標的配列が最3'側V<sub>H</sub>セグメントの置換を可能にする、項目1記載の細胞。

3 . カセット標的配列が、

I-SceIメガヌクレアーゼ部位、Cas9/CRISPR標的配列、Talen標的配列、またはリコンビナーゼ媒介カセット交換システム

からなる群より選択される、項目1記載の細胞。

40

4 . IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントが、非ネイティブV<sub>H</sub>セグメント配列を含むよう改変されている、項目1～3のいずれか一項記載の細胞。

5 . IgH遺伝子座がマウス遺伝子座であり、IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントが元のマウスの最3'側V<sub>H</sub>セグメント以外の任意のV<sub>H</sub>セグメントを含むよう改変されている、項目4記載の細胞。

6 . マウス胚性幹細胞である、項目1～5のいずれか一項記載の細胞。

7 . 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントがヒトV<sub>H</sub>セグメントである、項目4～6のいずれか一項記載の細胞。

8 . 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントが、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来のV<sub>H</sub>セグメントである、項目1記載の細胞。

50

9 . 非ネイティブ $V_H$ セグメントが、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来のヒト $V_H$ セグメントである、項目8記載の細胞。

10 . ヒト $V_H$ セグメントが、IGHV1-2\*02、IGHV1-46、またはIGHV1-69である、項目9記載の細胞。

11 . 最3'側 $V_H$ セグメントの3'末端と $D_H$ セグメントの5'末端の間に介在する核酸配列内に非機能性IGCR1配列をさらに含む、項目1~10のいずれか一項記載の細胞。

12 . 非機能性IGCR1配列が変異CBE配列を含む、項目11記載の細胞。

13 . IGCR1配列のCBE配列が欠失している、項目11記載の細胞。

14 . IGCR1配列がIgH遺伝子座から欠失している、項目11記載の細胞。

15 . 1つまたは複数の $J_H$ セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、

欠失したネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットであって、5'から3'に向かって、

5'リコンビナーゼ部位、

逆位パッセンジャーVDJエクソンおよび/またはカセット標的配列、ならびに

成熟適合性 $V_H$ セグメント

を含む、パッセンジャーカセットと

をさらに含み、リコンビナーゼ部位が互いに関して逆位である、項目1~14のいずれか一項記載の細胞。

16 . 遺伝子座が、

1つまたは複数の $J_H$ セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、

欠失したネイティブ最3'側 $V_H$ セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットであって、5'から3'に向かって、

5'から3'への配向のパッセンジャーVDJエクソンおよび/またはカセット標的配列、

5'リコンビナーゼ部位、ならびに

成熟適合性 $V_H$ セグメント

を含む、パッセンジャーカセットと

をさらに含み、リコンビナーゼ部位が同じ配向である、項目1~14のいずれか一項記載の細胞。

17 . リコンビナーゼ部位がLoxP部位であり、前記細胞がcreリコンビナーゼをコードする遺伝子座をさらに含む、項目15~16のいずれか一項記載の細胞。

18 . creリコンビナーゼをコードする遺伝子座が、

未成熟B細胞において活性でなくかつ末梢B細胞において活性であるプロモーターの制御下にある、項目17記載の改変細胞。

19 . プロモーターがCD21プロモーターである、項目18記載の細胞。

20 . 1つもしくは複数の $D_H$ 、1つもしくは複数の $J_H$ セグメント、および/または $DJ_H$ 融合体が、カセット標的配列を含む、項目1~19のいずれか一項記載の細胞。

21 . IgH遺伝子座が、1つまたは複数の非ネイティブ $D_H$ セグメントを含む、項目1~20のいずれか一項記載の細胞。

22 . IgH遺伝子座が1つの $D_H$ セグメントを含む、項目1~21のいずれか一項記載の細胞。

23 . IgH遺伝子座が、1つまたは複数の非ネイティブ $J_H$ セグメントを含む、項目1~22のいずれか一項記載の細胞。

24 .  $J_H$ セグメントがヒト $J_H$ 2である、項目23記載の細胞。

25 . IgH遺伝子座が1つの $J_H$ セグメントを含む、項目1~24のいずれか一項記載の細胞。

26 . IgH遺伝子座がマウスIgH遺伝子座配列を含む、項目1~25のいずれか一項記載の細胞。

27 . IgH遺伝子座がヒトIgH遺伝子座配列を含む、項目1~26のいずれか一項記載の細胞。

。

28 . 遺伝子座がヒト化IgH遺伝子座配列を含む、項目1~27のいずれか一項記載の細胞。

。

29 .  $J_H$ 遺伝子座が、ヒトDおよび $J_H$ カセットまたはヒト $DJ_H$ 集合体を含むカセットによ

10

20

30

40

50

つて置換されている、項目1～28のいずれか一項記載の細胞。

30 . 前記細胞が項目1～29のいずれか一項記載の改変IgH遺伝子座に関してヘテロ接合性であり、他方のIgH遺伝子座が不活性となるよう改変されており、前記細胞が項目1～29のいずれか一項記載の改変IgH遺伝子座からのみIgH鎖を発現する、項目1～29のいずれか一項記載の細胞。

31 . ヒト配列を有するIgL遺伝子座をさらに含む、項目1～30のいずれか一項記載の細胞。

32 . ヒト化IgL遺伝子座をさらに含む、項目1～31のいずれか一項記載の細胞。

33 . ヒトIgL遺伝子座をさらに含む、項目1～32のいずれか一項記載の細胞。

34 . 1つのV<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座をさらに含む、項目1～33のいずれか一項記載の細胞。 10

35 . 1つのJ<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座をさらに含む、項目1～34のいずれか一項記載の細胞。

36 . IgLカッパまたはラムダ遺伝子座にヒトV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>再構成体をさらに含む、項目1～35のいずれか一項記載の細胞。

37 . マウスIgLカッパまたはラムダ遺伝子座にヒトV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>再構成体をさらに含む、項目1～36のいずれか一項記載の細胞。

38 . IgL遺伝子座がIG V1またはVRC01 IgLをコードする、項目31～37のいずれか一項記載の細胞。

39 . 幹細胞または胚性幹細胞である、項目1～38のいずれか一項記載の細胞。 20

40 . マウス細胞である、項目1～39のいずれか一項記載の細胞。

41 . リンパ球固有様式でGC抗体成熟応答を増大させる遺伝子を活性化、不活性化、または変更することができる変異

をさらに含む、項目1～40のいずれか一項記載の細胞。

42 . 最3'側V<sub>H</sub>セグメントが非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントで置換されている、改変IgH遺伝子座を含む細胞。

43 . IgH遺伝子座がマウス遺伝子座であり、IgH遺伝子座の最3'側V<sub>H</sub>セグメントが、元のマウスの最3'側V<sub>H</sub>セグメント以外の任意のV<sub>H</sub>セグメントを含むよう改変されている、項目42記載の細胞。

44 . マウス胚性幹細胞である、項目42～43のいずれか一項記載の細胞。 30

45 . 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントがヒトV<sub>H</sub>セグメントである、請求42～44のいずれか一項記載の細胞。

46 . 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントが、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来のV<sub>H</sub>セグメントである、請求42～45のいずれか一項記載の細胞。

47 . 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントが、親和性または特異性の改善を必要とする既知の抗体由来のヒトV<sub>H</sub>セグメントである、項目46記載の細胞。

48 . ヒトV<sub>H</sub>セグメントが、IGHV1-2\*02、IGHV1-46、またはIGHV1-69である、項目47記載の細胞。

49 . 最3'側V<sub>H</sub>セグメントの3'末端とD<sub>H</sub>セグメントの5'末端の間に介在する核酸配列内に非機能性IGCR1配列をさらに含む、項目42～48のいずれか一項記載の細胞。 40

50 . 非機能性IGCR1配列が変異CBE配列を含む、項目49記載の細胞。

51 . IGCR1配列のCBE配列が欠失している、項目49記載の細胞。

52 . IGCR1配列がIgH遺伝子座から欠失している、項目49記載の細胞。

53 . 1つまたは複数のJ<sub>H</sub>セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、欠失したネイティブ最3'側V<sub>H</sub>セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットであって、5'から3'に向かって、

5'リコンビナーゼ部位、

逆位パッセンジャーVDJエクソンおよび／またはカセット標的配列、ならびに

成熟適合性V<sub>H</sub>セグメント

を含む、パッセンジャーカセットと

50

をさらに含み、リコンビナーゼ部位が互いにに関して逆位である、項目42～52のいずれか一項記載の細胞。

5 4 . 遺伝子座が、

1つまたは複数のJ<sub>H</sub>セグメントの3'側に配置された3'リコンビナーゼ部位と、

欠失したネイティブ最3'側V<sub>H</sub>セグメントの位置に配置されたパッセンジャーカセットであって、5'から3'に向かって、

5'から3'への配向のパッセンジャーVDJエクソンおよび／またはカセット標的配列、

5'リコンビナーゼ部位、ならびに

成熟適合性V<sub>H</sub>セグメント

を含む、パッセンジャーカセットと

10

をさらに含み、リコンビナーゼ部位が同じ配向である、項目42～52のいずれか一項記載の細胞。

5 5 . リコンビナーゼ部位がLoxP部位であり、前記細胞がcreリコンビナーゼをコードする遺伝子座をさらに含む、項目53～54のいずれか一項記載の細胞。

5 6 . creリコンビナーゼをコードする遺伝子座が、

未成熟B細胞において活性でなくかつ末梢B細胞において活性であるプロモーターの制御下にある、項目55記載の改変細胞。

5 7 . プロモーターがCD21プロモーターである、項目56記載の細胞。

5 8 . 1つもしくは複数のD<sub>H</sub>、1つもしくは複数のJ<sub>H</sub>セグメント、および／またはDJ<sub>H</sub>集合体が、カセット標的配列を含む、項目42～57のいずれか一項記載の細胞。

20

5 9 . IgH遺伝子座が、1つまたは複数の非ネイティブD<sub>H</sub>セグメントを含む、項目42～58のいずれか一項記載の細胞。

6 0 . IgH遺伝子座が1つのD<sub>H</sub>セグメントを含む、項目42～59のいずれか一項記載の細胞。

。

6 1 . IgH遺伝子座が、1つまたは複数の非ネイティブJ<sub>H</sub>セグメントを含む、項目42～60のいずれか一項記載の細胞。

6 2 . J<sub>H</sub>セグメントがヒトJ<sub>H</sub>2である、項目61記載の細胞。

6 3 . IgH遺伝子座が1つのJ<sub>H</sub>セグメントを含む、項目42～62のいずれか一項記載の細胞。

。

6 4 . IgH遺伝子座がマウスIgH遺伝子座配列を含む、項目42～63のいずれか一項記載の細胞。

30

6 5 . IgH遺伝子座がヒトIgH遺伝子座配列を含む、項目42～63のいずれか一項記載の細胞。

6 6 . 遺伝子座がヒト化IgH遺伝子座配列を含む、項目42～63のいずれか一項記載の細胞。

。

6 7 . J<sub>H</sub>遺伝子座が、ヒトDおよびJ<sub>H</sub>カセットまたはヒトDJ<sub>H</sub>集合体を含むカセットによって置換されている、項目42～66のいずれか一項記載の細胞。

6 8 . 前記細胞が項目42～67のいずれか一項記載の改変IgH遺伝子座に関してヘテロ接合性であり、他方のIgH遺伝子座が不活性となるよう改変されており、前記細胞が項目42～67のいずれか一項記載の改変IgH遺伝子座からのみIgH鎖を発現する、項目42～67のいずれか一項記載の細胞。

40

6 9 . ヒト配列を有するIgL遺伝子座をさらに含む、項目42～68のいずれか一項記載の細胞。

7 0 . ヒト化IgL遺伝子座をさらに含む、項目42～69のいずれか一項記載の細胞。

7 1 . ヒトイgL遺伝子座をさらに含む、項目42～70のいずれか一項記載の細胞。

7 2 . 1つのV<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座をさらに含む、項目42～71のいずれか一項記載の細胞。

7 3 . 1つのJ<sub>L</sub>セグメントを有するIgL遺伝子座をさらに含む、項目42～72のいずれか一項記載の細胞。

7 4 . IgLカッパまたはラムダ遺伝子座にヒトイ<sub>L</sub>J<sub>L</sub>再構成体をさらに含む、項目42～73の

50

いずれか一項記載の細胞。

75. マウスIgLカッパまたはラムダ遺伝子座にヒトV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>再構成体をさらに含む、項目42～74のいずれか一項記載の細胞。

76. IgL遺伝子座がIG V1またはVRC01 IgLをコードする、項目42～75のいずれか一項記載の細胞。

77. 幹細胞または胚性幹細胞である、項目42～76のいずれか一項記載の細胞。

78. マウス細胞である、項目42～77のいずれか一項記載の細胞。

79. リンパ球固有様式でGC抗体成熟応答を増大させる遺伝子を活性化、不活性化、または変更することができる変異

をさらに含む、項目42～78のいずれか一項記載の細胞。

10

80. 項目1～79のいずれか一項記載の細胞を含む、遺伝子改変マウス。

81. 第1の集団が、V(D)J組み換え欠陥である細胞を含み、

第2の集団が、項目1～79のいずれか一項記載の細胞を含む、

2つの細胞集団を含むキメラ遺伝子改変マウス。

82. V(D)J組み換え欠陥細胞がRAG2<sup>-/-</sup>細胞である、項目81記載のマウス。

83. 哺乳動物がマウスである、項目80～82のいずれか一項記載のマウス。

84. マウス胚盤胞に項目1～79のいずれか一項記載の細胞を注入する工程であって、細胞がマウス胚性幹細胞であり、V<sub>H</sub>セグメントがネイティブ最3'側V<sub>H</sub>セグメントの位置に既知の抗体のV<sub>H</sub>セグメントを含む、工程；

胚盤胞から遺伝子改変マウスへと成熟させるのに適した条件下でマウス胚盤胞をメスマウスに移植する工程；

遺伝子改変マウスから

3) 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントを含む最適化された抗体；または

4) 非ネイティブV<sub>H</sub>セグメントを含む最適化された抗体を産生する細胞

を単離する工程

を含む、既知の抗体から最適化された抗体を作製する方法。

85. 単離する工程の前に遺伝子改変マウスを所望の標的抗原で免疫する工程をさらに含む、項目84記載の方法。

86. 遺伝子改変マウスの少なくとも1つの細胞からモノクローナル抗体を産生させる工程をさらに含む、項目84～85のいずれか一項記載の方法。

30

87. 胚性幹細胞のIgH遺伝子座が、既知の抗体由来の再構成済みDJ<sub>H</sub>セグメントを含む、項目84～86のいずれか一項記載の方法。

88. 胚性幹細胞のIgL遺伝子座が、既知の抗体由来の構成済み軽鎖配列を含む、項目84～87のいずれか一項記載の方法。

89. 関心対象のV<sub>H</sub>セグメントが、生殖系列V<sub>H</sub>セグメント、親和性成熟中間体、または成熟V<sub>H</sub>セグメントである、項目84～88のいずれか一項記載の方法。

90. 項目84～89記載の方法のいずれか一つによって産生される、最適化された抗体。

91. マウスIgH遺伝子座の最近位側V<sub>H</sub>セグメントを既知のモノクローナル抗体由来のV<sub>H</sub>セグメントで置き換えることによって、マウス胚性幹細胞を改変する工程；および

成熟B細胞を形成することができないマウスの胚盤胞に、改変されたマウス胚性幹細胞を注入し、それによって既知のモノクローナル抗体由来のV<sub>H</sub>セグメントを含むV<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>再構成体を含むBリンパ球を生成するキメラマウスを作製する工程

を含む、既知のモノクローナル抗体由来のVHセグメントを含むV<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>再構成体を含むBリンパ球を生成する方法。

92. 胚盤胞の細胞が、V(D)J組み換え欠陥細胞である、項目91記載の方法。

93. 胚盤胞の細胞が、RAG2<sup>-/-</sup>細胞である、項目92記載の方法。

94. 胚盤胞の細胞が、成熟リンパ球を形成することができない、項目91記載の方法。

95. 最近位側V<sub>H</sub>セグメントの3'末端を隔離する核酸配列内のIGCR1配列の機能を破壊するようにマウス胚性幹細胞を改変する工程をさらに含む、項目91～94のいずれか一項記載の方法。

40

50

96. 改変細胞が、既知のモノクローナル抗体由来のIgL配列をさらに含む、項目91～95のいずれか一項記載の方法。

97. 改変細胞が、ヒトDおよびJ<sub>H</sub>カセットまたはヒトDJ<sub>H</sub>集合体を含むカセットで置換されたJ<sub>H</sub>遺伝子座をさらに含む、項目91～96のいずれか一項記載の方法。

98. 既知の抗体由来の生殖系列V<sub>H</sub>セグメントを有するマウスが生まれるようにキメラマウスを繁殖させる工程をさらに含む、項目91～97のいずれか一項記載の方法。

99. ES細胞が、ヒトV<sub>H</sub>セグメントに関してヘテロ接合性にされる、項目91～98のいずれか一項記載の方法。

100. ヒトV<sub>H</sub>セグメントが、既知のモノクローナル抗体由来のV<sub>H</sub>セグメントの配列から本質的になる、項目91～99のいずれか一項記載の方法。 10

101. 哺乳動物の末梢B細胞の大部分が関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを発現するよう改変された項目80～83記載の哺乳動物を、抗原で免疫する工程；

該哺乳動物におけるB細胞の活性化を測定する工程；および

該哺乳動物におけるB細胞の活性化が参照レベルに対して増大している場合に、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを含むB細胞集団の活性化因子として候補抗原を同定する工程を含む、関心対象のV<sub>H</sub>セグメントを含むB細胞集団を活性化させる抗原として候補抗原を同定する方法。

102. B細胞活性化の増大が、Ig可変領域の体細胞超変異状態の増大である、項目101記載の方法。

103. B細胞活性化の増大が、抗原に対する成熟抗体の親和性の増大である、項目101記載の方法。 20

104. B細胞活性化の増大が、抗原に対する成熟抗体の特異性の増大である、項目101記載の方法。

105. 関心対象のV<sub>H</sub>セグメントが、生殖系列V<sub>H</sub>セグメント、親和性成熟中間体、または成熟V<sub>H</sub>セグメントである、項目101～104のいずれか一項記載の方法。

#### 【実施例】

##### 【0127】

###### 実施例1

以下の実施例は、例示的な態様として本明細書に提供され、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものとみなされるべきでない。 30

##### 【0128】

ヒト化抗体は、今日、自己免疫から癌に及ぶ幅広い疾患群に対する治療剤の中心的存在となっている(1)。それらは、HIV感染の管理に関しても開発段階にある(2)。ヒトモノクローナル抗体は、ファージディスプレイ、ヒト化免疫グロブリン(Ig)遺伝子座を含むマウスの免疫(1)および、例えばHIVの場合、広域中和抗体を产生する感染患者の単細胞からの抗体可変領域遺伝子のクローニング(3)を含む多くの異なるアプローチから得られる。そのようなヒトまたはヒト化抗体は治療上極めて効果的であり、インビボ免疫戦略を通じてより高い親和性または変更された特異性を有するこれらの抗体の変種を迅速に生成する能力は、より効果的な抗体治療剤を作製するためおよび患者内での抗体産生を誘導する潜在的ワクチン戦略を究明するための両方の観点で非常に望ましい。本発明者らは、ここで、上記の目標を達成することができる「高スループット」抗体産生マウスモデルの作製に関する、本発明者らの研究所による多くの技術的進歩に基づく新規のアプローチについて説明する。 40

##### 【0129】

###### 一次および二次(親和性成熟)抗体レパートリーの多様性

Bリンパ球の抗原受容体は、同一のIg重(IgH)鎖および軽(IgL)鎖の対から構成される。この複合体の分泌形態が抗体である。IgHおよびIgL鎖の可変領域が抗原結合部位を形成し、IgH鎖の定常領域は抗体のエフェクター機能を媒介する。IgHおよびIgL可変領域をコードするエクソンは、成体骨髄においてB細胞の成熟中に起こるV(D)J組み換え反応を通じてそれぞれV<sub>H</sub>、D、J<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>、J<sub>L</sub>遺伝子セグメントから構築される(4)。一次抗体レ 50

パートリーの多様化は、主にV(D)J組み換えに起因するものである。したがって、機能的な遺伝子セグメントのみを数えると、ヒトIgH遺伝子座には39個のV<sub>H</sub>、25個のD<sub>H</sub>および6個のJ<sub>H</sub>セグメントが存在し、2つのIgL遺伝子座（および）は同等の複雑さを有する（5）。各々の生殖系列Vセグメントは2つの異なるコードされる抗原接觸領域（「CDR1」および「CDR2」）を含んでいるので、これらの異なるV、DおよびJセグメントの組み合わせが異なるアソートメントで形成されることで、多数の異なる抗原結合部位が発生する。さらに、V<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>結合領域は、V(D)J組み換えによって体細胞により生成される第3のCDR（CDR3）をコードする。ヒトにおいてIgHの場合はV<sub>H</sub>DおよびDJ<sub>H</sub>結合体にまたはV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>結合体に対してヌクレオチドの欠失および付加の両方がなされ（非鑄型様式で）、それによって可変領域のCDR3の複雑さが、したがって各々が特有のBCR特異性を有する非常に多数のB細胞を産生する身体の能力がさらに高められるので、CDR3は膨大な多様性を有し得る。異なるIgHおよびIgL鎖の会合は抗体レパートリーに別の階層の多様性を付加する。発生期の骨髄B細胞においてIgHおよびIgL可変領域エクソンの集合が完了すると、2つの鎖はB細胞受容体（BCR）として発現され、生じたBリンパ球は骨髄を出て様々なリンパ組織内を循環し、そこで個々のB細胞はそれらのBCRに結合する病原体由来の抗原に曝露され得、それによってそれらは抗体を分泌し、また潜在的に、それらのBCR／抗体のさらなる多様化／親和性成熟をもたらし得るさらなる遺伝子変化を起こすよう活性化される。それらの発生過程で、発生期のB細胞の大部分は、IgHおよびIgL鎖の集合体の対形成の欠如、対形成されたIgHおよびIgL鎖の自己反応性ならびにその他の関連する要因により失われる。  
しかし、機能的な末梢B細胞になるよう動き出した巨大な一次B細胞集団の中に、遭遇し得る異なる抗原の広大な多様性のいずれかを少なくとも一部のB細胞が認識するのに十分なBCRの多様性が存在する。

#### 【0130】

末梢リンパ器官でのB細胞受容体への抗原の結合は、IgHクラススイッチ組み換え（CSR）ならびにIgHおよびIgL可変領域エクソンの体細胞超変異を起こすようB細胞を活性化する（6、7）。クラススイッチ組み換えにより、B細胞は、異なるエフェクター機能を媒介する異なるIgH定常領域を含む異なるクラスの抗体、例えばIgM、IgG、IgAおよびIgEを產生できるようになる。体細胞超変異は、胚中心（GC）反応の下でIgHおよびIgL可変領域エクソンの配列を変化させ、それによって身体は、より高い親和性の抗原結合性BCRおよび分泌抗体を生成するそれらの可変領域エクソンにSHMを有するB細胞を選択することができる。この一般的プロセスは、抗体親和性成熟と呼ばれる。BCR親和性に対して中立であるまたは負の効果を有するSHMを有するB細胞は、通常、GC反応の間に失われる。最終的に、より高い親和性の抗体を產生することができるB細胞がメモリーB細胞および長寿命形質細胞に分化し、さらなる感染に対する長期的保護を付与する。CSRはインビトロB細胞活性化条件下で反復され得るが、SHMもGC反応もインビトロでは再現されていない。

#### 【0131】

高い親和性および／または変化した特異性を有する治療抗体の生成

抗体の効果は、その関連抗原に対する特異性および親和性に依存し、上記のように、V(D)J組み換えおよびSHMの両方が、この局面において、しかし抗体の進化の異なる時点で重要な寄与を果たす。V(D)J組み換えは、任意の潜在的な抗原が合理的な一致を見出し得る抗原結合部位の大きなプールを生成し、ひとたび一致するB細胞が見出されれば、体細胞超変異およびGC反応が抗体・抗原相互作用を完全にするよう抗原結合部位を微調整する。本発明者らは、治療適用される既知の抗体を最適化するためまたは既知の中間体から所望のモノクローナル抗体を生成するアプローチを設計するためにV(D)J組み換えおよび特に体細胞超変異の能力を利用することを提案する。

#### 【0132】

今日まで、所望のヒトV<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>エクソンを有するV(D)J再構成体は、マウスIgHまたはIgL遺伝子座のV(D)J部分を不活性化させ、ヒトIgHまたはIgL遺伝子座の全V、DおよびJセグメントのいずれかの一部を含むマウスを作製し、それらの抗体の產生にヒトV、DおよびJセグメントを使用するようそのマウスを強制することによって入手されている（8  
10  
20  
30  
40  
50

)。デノボ構築されたヒトIgHおよびIgL V(D)Jエクソンを用いる大きな一次B細胞レパートリーを有するマウスを作製する能力を利用するこのアプローチは、ほとんどの新規抗原に対する新規抗体を作製する上で明らかに望ましい。そのようなマウスは、その後、試験抗原に結合する希少B細胞クローニングをインビオで選別し親和性成熟させるよう免疫され得る。極めて効果的ではあるが、この様式でまたはファージディスプレイ等の他の方法によつて作製された多くの抗体は、特定の治療アプローチでは可能性のある最適な結合効率または親和性を有さない場合がある。したがつて、再構成されたIgHおよびIgL V(D)Jエクソン配列が既知であるヒトモノクローナル抗体の結合特異性をさらに増強または変化させるインビオ方法が望まれる。本発明者らの研究所からの様々な最近の発見に沿つて本発明者らの研究所において開発された様々なアプローチに基づき、本発明者らは、この目標を達成する迅速かつ効率的なアプローチを策定している。

10

## 【0133】

このインビオ抗体親和性成熟アプローチは、すべての成熟B(およびT)リンパ球がそれらのゲノムの標的化された変更を含むES細胞から生成されるキメラマウスを作製する方法として20年前に本発明者らの研究所によって開発されたRAG-2欠損性胚盤胞補完(RDBC)法の使用に基づく(9)。その基本的なアプローチは、ES細胞を所望の様式で変更し、次いで変更されたES細胞をRAG-2欠損性マウス由来の胚盤胞に注入することである。これらのES細胞を注入された胚盤胞は、次いで、育ての母に移植され、それによって、通常その体細胞組織が注入されたES細胞由来系統と胚盤胞由来系統の両方からの派生細胞を有する子孫が生み出される。しかし、RAG-2はV(D)J組み換えに必須であるので、そのようなキメラ体内のすべてのBおよびTリンパ球は、注入されたRAG十分なES細胞から発生する。このアプローチは、その免疫システムのすべての成熟リンパ球が遺伝子的に変更されたES細胞から発生する多数のキメラマウスを迅速かつ効率的に作製することができ、生殖系列伝達の時間および費用を回避するアプローチである。しかし、生殖系列伝達は、所望の場合、RDBCキメラ体を繁殖させることによって達成され得る。本発明者らの研究所は、それらの成熟BおよびT細胞のすべてが、それらの抗原受容体遺伝子座の様々な変更を含むES細胞を含む変異ES細胞由来であるマウスを作製するためにこのアプローチを日常的に使用していた。

20

## 【0134】

マウスIgH遺伝子座は、ほぼ3メガ塩基(MB)に及び、その遠位端に約100個の機能性V<sub>H</sub>セグメントが数MBにわたって広がつてあり、その後に100kbの間隔があり、次いで13個のDセグメントがあよそ80kbの領域に埋もれており、そこから直接1kb下流の1kb領域に4個のJ<sub>H</sub>セグメントが存在する(10)。IgH定常領域(「C<sub>H</sub>」)をコードするエクソンは、J<sub>H</sub>領域の下流の200kb領域内に埋もれている。完全なV(D)Jエクソンは、J<sub>H</sub>遺伝子座で構築され、D対J<sub>H</sub>再構成が最初に起こつてDJ<sub>H</sub>中間体が生成され、次いでV<sub>H</sub>セグメントがDJ<sub>H</sub>中間体に付加されV(D)Jエクソンが生成される。V<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>エクソンの上流にあるプロモーターからの転写がIgH定常領域エクソンを通じて行われ、RNAスプライシングが成熟V<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>C<sub>H</sub>mRNAの形式でV<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>にC<sub>H</sub>を付加する。

30

## 【0135】

通常、十分に網羅的なV<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>レパートリーを生成するためにV<sub>H</sub>セグメントのすべてが発生期のBリンパ球において利用されるが、本発明者らは、最近位側V<sub>H</sub>セグメント(V<sub>H</sub>81X)が一次V<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>再構成体を生成する上で極めて高頻度で利用されることを見出した(11)。しかし、V<sub>H</sub>81Xは、(初期B細胞発生に必要とされる)代理IgL鎖およびIgL鎖との対形成が困難であり、かつ自己反応性抗体をコードする傾向もあるため(12)、生産的な(発現される)V<sub>H</sub>(D)J<sub>H</sub>再構成体にほとんど寄与しない。しかし、本発明者らは、V<sub>H</sub>81Xに代わつて挿入された任意のV<sub>H</sub>がまた、それがV<sub>H</sub>81Xの様に対抗選択を受けなかつた場合、高頻度で再構成され、それによって一次IgH V(D)Jレパートリーにおいて高度に提示されると推測した。この考えを試験するため、本発明者らは、マウスES細胞(「試験ES細胞」)の1つの対立遺伝子においてV<sub>H</sub>81XをヒトV<sub>H</sub>セグメントIGVH1-2\*02で置換し、RDBCにおいてそれらの細胞を使用した。得られたキメラ体において、IGVH1-2\*02を使用する再構成体が、

40

50

末梢B細胞抗体レパートリーにおいて大いに提示された（すなわち、脾臓B細胞由来のハイブリドーマの分析に基づき $V_H(D)J_H$ 再構成体の4%またはそれ以上を占めた）。

#### 【 0 1 3 6 】

$V_H-D_H$ および $D_H-J_H$ 結合へのランダムヌクレオチドの付加により、再構成されるV(D)J領域は、オープンリーディングフレームを含みIgH鎖を生産的にコードする場合と、フレーム外でありIgH鎖をコードしない（すなわち、非生産的である）場合がある。生産的 $V_H81X$ 再構成体の細胞レベルでの対抗選択により、 $V_H81X$ は大部分が非生産的再構成体として末梢で見られる（13、14）。しかし、本発明者らは、末梢成熟B細胞の中で $IGVH1-2^*02$ を含む $V_H(D)J_H$ 再構成体の約70%が生産的であること、これによりこのヒト $V_H$ セグメントがマウス $D_H$ 、 $J_H$ およびマウスIgLとの関係で機能的に発現され得ることが示唆されたこと、さらに、それらのBCRの一部として $IGVH1-2^*02$ を取り込んだB細胞は、それらの成熟プロセスの間に負の選択に供されないことを見出した。加えて、そのような $IGVH1-2^*02DJ_H$ BCRを有するB細胞は、ヒツジ赤血球によるキメラ体の免疫後に再構成体の $IGVH1-2^*02$ セグメントにおいて塩基対あたり約 $1 \times 10^{-2}$ の頻度でSHMを起こした。これらの発見は、本発明者らがマウスIgH遺伝子座において $V_H81X$ をヒト $V_H$ で置換することができること、およびそれが $V_H(D)J_H$ 再構成体に生産的に関与し、免疫応答に関与しSHMを起こすことができる末梢B細胞を生成することの原理証明の証拠を提供する。本発明者らはまた、生殖系列 $IGVH1-2^*02$ セグメント置換を有するマウス系統を構築するためにRDBCキメラ体を繁殖させ、それによつてRDBCによって確立された関心対象の遺伝的変更をさらなる研究のためまたは共同研究者に送付するために生殖系列に移動させる本発明者らの能力を実証した。

#### 【 0 1 3 7 】

本発明者らは最近、最遠位（ $V_H$ 近位）Dセグメントのすぐ上流にある遺伝子間制御領域1（IGCR-1）と呼ばれるマウスIgH遺伝子座V(D)J組み換え調節領域を発見した（15）。この4kbのIGCR-1領域は、その機能に関して、各々約18bp長の2つのCTCF結合エレメント（CBE）の完全性に依存しており、その活性は、CBEの配列をスクランブルするだけで不活性化させることができる。IGCR-1は、IgHのV対 $D_J$ 組み換えの様々な局面を調節するが、本発明者らの提案する抗体親和性成熟法との関係で最も重要なことは、それが約90kb上流にある $V_H81X$ 可変領域遺伝子セグメントの再構成を抑制することである。したがって、IGCR1を欠失させた場合、または単にIGCR-1 CBEを変異させた場合、 $V_H81X$ は、IGCR-1/CBE変異以外の全IgH遺伝子座が完全であるにもかかわらず、変異させた対立遺伝子上でのほとんどの $V_H$ 対 $D_J$ 再構成体において使用される。したがって、継続中の実験において、本発明者らは、 $V_H81X$ をヒト $IGVH1-2^*02$ で置換した試験ES細胞においてIGCR-1を欠失させた。 $IGVH1-2^*02$ は、成熟B細胞内での高い割合（70%）の生産的 $IGVH1-2^*02$ 再構成体によって示唆されるように、発生の間に感知できる規模の負の選択に供されないので、本発明者らは、ヒト $IGVH1-2^*02$ が $V_H81X$ と置き換わっており、IGCR-1が不活性化されているES細胞由来のRDBCキメラ体はヒト $IGVH1-2^*02$ 遺伝子セグメントが大部分の末梢B細胞レパートリーを生成するために使用される末梢B細胞を有すると予測する。本発明者らが本発明者らの研究所で広く使用されている様々な方法のいずれかによってそのようなES細胞をホモ接合体にする場合、または本発明者らが第2のIgH対立遺伝子を（例えば、対抗選択された $V_H81X$ のみがそこで再構成されるよう1kb  $J_H$ 領域を欠失させることによってもしくはIGCR-1を不活性化されることによって）不活性化させる場合、ほぼすべてのB細胞が、それらのBCRのIgH鎖を生成する機能的 $V_HDJ_H$ 再構成体において $IGVH1-2^*02$ を使用すると本発明者らは予想する。

#### 【 0 1 3 8 】

既知の特異性を有する任意の所望のヒトモノクローナル抗体の高親和性変種を迅速に作製するための最適効率化システムを構築するため、および所望の $V_HDJ_H$ （および $V_LJ_L$ ）再構成体（例えば、高変異広域中和性抗HIV抗体）から特定の結合特異性に関して選択するための免疫戦略を試験するシステムも提供するため、本発明者らはRDBCに使用するための試験ES細胞に対する以下のさらなる変更を行った。

#### 【 0 1 3 9 】

10

20

30

40

50

本発明者らは、任意の所望のヒト $V_H$ セグメントまたはヒト $V_H$ セグメントカセットとの迅速かつ効率的な遺伝子標的化置換が可能なように $V_H81X$ 遺伝子座に変更を加えた。本発明者らのヒト $IGVH1-2^*02$ による $V_H81X$ の置換の間に、本発明者らは、 $IGVH1-2^*02$ のすぐ下流に $I-SceI$ メガヌクレアーゼ部位を挿入し、この $I-SceI$ エンドヌクレアーゼの発現によりこの標的部位にDNA二重鎖切断部(DSB)を導入できるようにした。さらなる $V_H$ 置換実験における遺伝子標的化の際のDSBの導入は、標的化効率を大きく増大させると考えられる。同様に、同じ目的で初期Cas9/CRISPR技術も利用することができる(16)。あるいは、高い標的化効率は、組み換え媒介カセット交換システムを導入することによっても達成され得る(17)。この一般的なアプローチにより、本発明者らは、IGCR-1機能を欠く試験ES細胞を、それらが $V_H81X$ に代えて任意の所望のヒト $V_H$ 遺伝子セグメントを有するよう迅速に変更することができる。これらのES細胞から生成したRDBCキメラ体において、挿入されたヒト $V_H$ は、非常に高いレベルで再構成し、末梢B細胞のレパートリーを支配する。

#### 【0140】

本発明者らはまた、マウス $J_H$ 遺伝子座を、ヒト $V_H$ 対 $DJ_H$ 組み換えイベントの基質として機能するヒトDおよび $J_H$ カセットまたはヒト $DJ_H$ 集合体を含むカセットと置換され得る同様に高度に標的化可能な配列で(例えば、Cas9/CRISPR標的部位で)置換するよう試験ES細胞を変更した。そのような種類の細胞において、Dおよび $J_H$ または $DJ_H$ は、関心対象の $V_HDJ_H$ 再構成体において使用される配列を表し得、例えばCDR3の長さを変化させるようまたはSHMの効率を高めるために潜在的SHM標的化モチーフを導入するように異なる方法で変更され得る。

#### 【0141】

上記のアプローチは、マウスにおいてB細胞成熟の間にデノボ $V(D)J$ 組み換えを通じてヒトV、D、J遺伝子セグメントを組み込むよう設計された。このアプローチの利点は、 $V(D)J$ 組み換えが、CDR3連結多様性の導入を通じて抗原結合特異性の範囲を大きく拡張させることができることである。しかし、このアプローチは、定義されたCDR3が抗体機能に必要とされる場合に最適でないかもしれない。例えば、マウスにおいて抗HIV広域中和抗体(BnAb)の中間体を完全に成熟させるワクチン接種戦略を開発するために、成熟中間体をコードする $V(D)J$ エクソンがB細胞で発見されなければならず(18)、そのような再構成 $V(D)J$ エクソンはときどき、一部が $V(D)J$ 組み換え中ではなく親和性成熟中に生じたと考えられる普通でないCDR3領域を含む。他方、末梢におけるすでにSHMを起こした再構成 $V(D)J$ エクソンの発現は、ときどき、その再構成 $V(D)J$ エクソンが自己抗原に対する反応性を示し得、したがって骨髄における成熟中に対応するB細胞を欠失させ得るために問題となる(19)。この問題が、これまで、マウスにおいて抗HIV BnAbをコードする完全成熟 $V(D)J$ エクソンを発現させることを妨げている。

#### 【0142】

この問題を回避するために、本発明者らは、特に成熟B細胞において所望の $V(D)J$ 「パッセンジャー」エクソンを発見させる $V(D)J$ エクソン逆位および/または欠失システムを使用した。所望のパッセンジャー $V(D)J$ エクソンの逆位活性化のために、本発明者らは、試験ES細胞株の $J_H$ 遺伝子座の下流にLoxP部位を導入する。本発明者らは次に、試験ES細胞の $V_H81X$ に代えて、一次 $V_H(D)J_H$ 再構成体に組み込まれた場合に排除選択されない正常な向きの $V_H$ セグメント(例えば、 $IGVH1-2^*02$ )の上流にある所望の逆位のヒトパッセンジャー $V_H$  $DJ_H$ エクソンの上流に( $J_H$  LoxP部位に対して)逆位のLoxP部位を含むカセットを挿入する。カセット内の下流の $V_H$ セグメントは、発生上再構成され、発生の進行を促進し、そしてその後に上流の逆位パッセンジャー $V_HDJ_H$ エクソンが、例えばCD21プロモーターの制御下でのcreリコンビナーゼの発現を通じて、末梢B細胞においてCre-LoP媒介逆位組み換えによって反転され得る(20)。同様の逆位戦略が、メモリーB細胞においてBCR抗原結合特異性を変化させるために使用された(21)。逆位 $V(D)J$ エクソンを発現するB細胞を有するマウスは、その後、末梢で活性化された $V(D)J$ セグメントの親和性成熟変種を選択するため免疫され得る。同じ一般的なアプローチが、上流カセット $V(D)J$ エクソンがカセット内の下流 $V_H$ と同じ配向でありLoxP部位が末梢において下流 $V(D)J$ エクソンを欠失させそれによつ

10

20

30

40

50

て上流パッセンジャーV(D)Jエクソンを活性化させる配向にされている欠失アプローチを通じて成熟B細胞において所望のパッセンジャーV(D)Jエクソンの発現を活性化させるために使用され得る。

#### 【0143】

本発明者らはまた、特定の抗体特異性の進化が適当なヒトIgHおよびIgLの両方との関係で実施され得るようマウスIgL遺伝子座に関連するヒト $V_L J_L$ 再構成体を導入することによってさらに変更されたES細胞を試験した。例えば、いくつかの抗HIV広域中和抗体が、親和性成熟形態のヒトIGHV1-2\*02およびIG\_V1対立遺伝子によってコードされる(18)。親和性成熟形態のIG\_V1の発現は、HIV抗原を用いた免疫に応じたIGHV1-2対立遺伝子の親和性成熟を促進させ得る。

10

#### 【0144】

本発明者らはさらに、ES細胞が、リンパ球固有様式でGC抗体成熟応答を増大させ得る遺伝子を活性化、不活性化または変更し得る任意の追加の既知のまたは未だ同定されていない変異を導入するよう変更され得るかどうかを試験した。そのような変異の例は、文献に報告されている(22、23)。

#### 【0145】

要約すると、本発明者らは、臨床適用のために治療抗体をさらに改善することができる免疫プロトコルのために、様々なES細胞株由来のRDBCキメラ体を使用した。適切に設計されたRDBCキメラ体はまた、ワクチン候補の効果および親和性成熟に関する免疫プロトコルを評価するためにも使用され得る。上記のように、現在の免疫およびファージディスプレイアプローチは、標的抗原に対する効果的な治療抗体を生成するが、多くのそのような抗体は意図されている治療適用において必要とされる特異性および親和性の要件を常に満たすものではないかもしれないかまたはそうであったとしてもそれらは潜在的に親和性／特異性に関してさらに改善され得る。

20

#### 【0146】

そのような抗体を改善するために、本発明者らは、IGHV1-2\*02置換を用いた本発明者の実験と同様に、本発明者らのシステムにおいて $V_H 81X$ を置換するためにそれらのIgH Vセグメントを使用することができる。このアプローチにおいて、そのIgH可変領域はV(D)J組み換えを起こし、それにより異なるヒト $D_H$ および $J_H$ セグメントの組み合わせならびに連結ヌクレオチドの付加を通じてCDR3の多様性が拡張される。

30

#### 【0147】

元の抗体で使用されたものに対応する組み立て済みのDJH再構成体も、既知の特異性の既存抗体のさらなる成熟を誘導するために使用することができる。この設定において、マウスは、変更版の抗原結合IgH可変領域を発現するが、 $V_H$ -D連結部における連結ヌクレオチドの付加によりCDR3の範囲が大きく拡張されているB細胞を主に含む。IgH CDR3の連結多様性は、潜在的に、元抗体におけるそれよりも特異的な抗原結合部位を生成し得、そのような抗体は標的抗原でマウスを免疫することによって選別され得る。免疫の後、Ig可変領域は、抗原結合特異性をさらに改善する体細胞超変異を起こし得る。

#### 【0148】

したがって、本発明者らのシステムにおいては、特定抗原への結合に関してすでに選択されたIgH V(D)J領域が、V(D)J組み換えおよびSHMによってさらに変更される。適当な抗原選択により、これら2つのメカニズムの組み合わせは、抗体の特異性および親和性を大きく改善する。

40

#### 【0149】

定義されたCDR3が必要な場合、V(D)Jエクソン逆位システムが、B細胞発生の早期段階での自己反応性に対する対抗選択という事態を回避するために、そのような再構成V(D)Jエクソンを成熟B細胞段階で発現するよう使用され得る。上記のように、このシステムは、抗体親和性成熟をさらに誘導する所望のIgL鎖を提供するよう変更され得る。

#### 【0150】

最後に、リンパ球特異的様式で抗体応答を増強する変異を導入することによってこの方

50

法がさらに最適化され得る。

#### 【0151】

本発明者らのアプローチは、任意の治療抗体の親和性および／または特異性を改善するために使用され得る。このアプローチの主な利点は、最初の標的化から免疫までの6ヶ月未満に末梢B細胞の大部分において任意の所望のセットのヒト可変領域エクソンを発現する免疫用マウスコホートを生成する能力を提供できることである。

#### 【0152】

1つの例として、以下で、本発明者らは、HIVワクチン開発戦略との関係でこのアプローチのさらなる適用を説明する。HIVワクチンに加えて、季節性インフルエンザを効果的に制御するためおよび新規のインフルエンザ系統により引き起こされる流行病を阻止するためにインフルエンザ用広域ワクチンが必要とされる。インフルエンザウイルスに対するBnAbもまた同定されており、HIV BnAbと同様、インフルエンザBnAbもまた、特定のヒトV<sub>H</sub>セグメント、例えばIGHV1-69から生じるようである(24)。したがって、HIVワクチン開発に関して以下で説明されるアプローチは、インフルエンザまたは他のワクチン開発戦略の情報提供に対しても等しく適用可能であり得る。

10

#### 【0153】

広域中和抗体(BnAb)によるHIV感染からの保護

原理証明実験として、また臨床的に重要であるがこれまで解決困難であった問題を解決するため、本発明者らは、HIVワクチンの開発のためのアプローチの試験を容易にするために本発明者らのシステムを使用することを提案する。HIVワクチンは、AIDS流行を制御するためには至急必要とされている。現時点では、HIVワクチン接種は、ヒト対象を様々なHIV抗原で免疫するという伝統的なアプローチに基づいている。HIVの主たる表面タンパク質はgp120であり、これはT細胞上のCD4に結合し、ウイルスの侵入を仲介する。HIVワクチンの主目標は、感染を阻止するためにgp120に対する抗体を誘導することである。しかし、gp120を用いた免疫は、臨床試験においてヒト対象をHIV感染から保護することに失敗した。この失敗は、HIV系統の多様性に起因するものであり、1つのウイルス系統由来のgp120を用いた免疫は、その特定のHIV系統のみに対する中和抗体を誘導するが、多くの異なるウイルス系統に対しては効果がない。このジレンマから逃れる1つの方法は、抗体をgp120の保存された部分に標的化させることである。このアプローチの実現性は、最近の、特定のAIDS患者の間での幅広いHIV系統に対する広域中和抗体(BnAb)の同定によって支持されている(3)。抗HIV BnAbの効力は、ウイルスのT細胞侵襲にとって重要なgp120 CD4結合部位へのそれらの緊密な結合に基づいている(25)。この発見に照らして、HIV感染に対する保護は、潜在的に、BnAbを誘起することができるワクチンにより達成され得る。

20

#### 【0154】

バイオインフォマティクス分析に基づき、複数名のAIDS患者由来のBnAb Ig遺伝子は、それらの共通祖先として生殖系列V<sub>H</sub>遺伝子セグメントIGHV1-2\*02を共有しているようである。生殖系列IGHV1-2\*02から抗HIV BnAbにおいて用いられているそれへの進化の間に、おそらく慢性的なHIV感染に応じた大規模な体細胞超変異により、または潜在的に親和性成熟プロセスの間のSHM標的化モチーフの獲得により、IGHV1-2\*02配列は30%もの変異を蓄積する(3)。これらの変異の生殖系列配列への逆戻しはBnAbの中和活性を消滅させるので、これらの変異は機能的に重要である。BnAb/gp120複合体の構造分析は、なぜIGHV1-2\*02がBnAbの適当な前駆体であるのかに関する妥当な説明を提供した。BnAbは、主にIgH可変領域を通じてgp120 CD4結合部位と相互作用し、そしてIGHV1-2\*02内の特定のアミノ酸残基がgp120 CD4結合部位との決定的な接触を確立する。IGHV1-2\*02とgp120 CD4結合部位との間の相互作用はさらに、IgH可変領域をgp120の天然リガンドであるCD4の構造模倣体にリモデルする大規模な体細胞超変異によって増強される(18)。

30

#### 【0155】

この情報に基づき、BnAbを誘導するため、ワクチンは、そのB細胞受容体の一部としてIGHV1-2\*02を発現するB細胞を活性化するはずであり、そして活性化されたB細胞は、gp120 CD4結合部位にぴったり当てはまるよう抗体可変領域を仕立てる非常に大規模な体細胞超

40

50

変異を起こすことを必要とし得る。概念的には単純であるが、このアプローチをモデル化するには、容易に入手可能でない様々な試薬が必要になる。

【0156】

第1に、IGHV1-2<sup>\*</sup>02はBnAbの前駆体であるが、gp120は生殖系列IGHV1-2<sup>\*</sup>02を含む抗体とはほとんど相互作用せず、IGHV1-2<sup>\*</sup>02発現B細胞を誘導するにはカスタム設計された抗原が必要とされ得る。

【0157】

第2に、IGHV1-2<sup>\*</sup>02からBnAbへといたる道程は、桁外れのレベルの体細胞超変異を伴うものであり、変異プロセスの生来的に無作為的な性質を考慮すると、B細胞は、BnAbへの生産的な変異経路に沿って誘導される必要がある。バイオインフォマティクス分析に基づき、親和性成熟プロセスは、gp120 CD4結合部位に対する結合親和性が増大する中間体群を必要とするようであり、親和性成熟の方向づけられた進化は、潜在的に、それらの親和性成熟中間体に特異的な抗原を用いて達成され得る。全体として、BnAbの誘導を成功させるには複数の抗原、生殖系列IGHV1-2<sup>\*</sup>02を発現するB細胞を活性化するものおよび親和性成熟中間体を選択するもの、が必要となり得る。

10

【0158】

上記のワクチン接種スキームを実現するために、抗原は、生殖系列IGHV1-2<sup>\*</sup>02を含む抗体に結合する合理的に設計された抗原の最近の報告に示されるようにタンパク質工学を通じて設計され得る(26)。しかし、そのような改変された抗原の、インビボで関連B細胞を活性化させる能力は、動物モデルにおいて評価される必要がある。この要件を満たすために、本発明者らは、大部分のB細胞がIGHV1-2<sup>\*</sup>02またはその親和性成熟中間体を発現するRDBCキメラ体を生成する試験ES細胞を作製した。これらのマウスは、各B細胞集団を活性化するよう設計されたワクチン候補のためのインビボアッセイを提供し得る。

20

【0159】

特定のIg可変領域を発現する1つの従来的な方法は、組み立て済み(再構成された)V(D)JエクソンをIg遺伝子座のJ領域に組み込むことである。Ig遺伝子の单一対立遺伝子発現を確保する対立遺伝子除去を利用することで、再構成されたV(D)Jエクソンは、内因性Ig遺伝子座におけるV(D)J組み換えを阻害し、IgHまたはIgLのいずれかに対して単一の機能性Ig可変領域を提示する。本発明者らの目的において、このアプローチに伴う主たる問題は、BnAbの生殖系列版がCDR3の不確実性に起因してV<sub>H</sub>D<sub>H</sub>連結体およびD<sub>H</sub>J<sub>H</sub>連結体の領域を含めて完全に既知でないことがある。この領域において、特定のヌクレオチドがV(D)J組み換えの間に連結体に挿入されたかどうかまたはB細胞活性化の過程で体細胞超変異によって導入されたかどうかを確認することは困難である。CDR3は抗体と抗原の間の鍵となるインターフェースを提供し、IGHV1-2<sup>\*</sup>02は異なるCDR3によって異なる結合性を示し得るため、この問題は重要である。

30

【0160】

これらの不確定性に対処するため、本発明者らは、ヒトB細胞において通常のことである、多様なCDR3との関係でIGHV1-2<sup>\*</sup>02を発現させるために以下の戦略を使用した。このスキームにおいて、IGHV1-2<sup>\*</sup>02は、HIV BnABにおけるそれを模倣する挿入されたヒトD<sub>H</sub>およびJ<sub>H</sub>セグメントまたは再構成済みDJ<sub>H</sub>連結体に対するIGHV1-2<sup>\*</sup>02の優先的な再構成を確保するために、上記のようにIGCR-1変異ES細胞においてV<sub>H</sub>81Xと置き換えるために使用される。D対J<sub>H</sub>またはV<sub>H</sub>対DJ<sub>H</sub>連結における無作為ヌクレオチドの追加と組み合わせ、このプロセスは、多様なCDR3を有するIGHV1-2<sup>\*</sup>02 IgH可変領域のファミリーを生成する。IGHV1-2<sup>\*</sup>02がこの状況下で発現されると、それはマウスIgLと対を形成し、ヒトとマウスの免疫グロブリン間の構造的類似性から、ヒトIgH可変領域はマウスIgLとの関係で機能的な抗原結合部位を形成すると考えられる。しかし、ヒト免疫系にさらに近づけるために、本発明者らは、必要とされるIgH鎖の親和性成熟進化を潜在的に誘導するよう、上記のように成熟抗HIV BnAB IgLを発現するようB細胞を改変することができる。また、発生初期における対抗選択により特定の親和性成熟中間体を発現させるのが困難である場合、本発明者らは、成熟B細胞でのみそれらを発現させるよう本発明または上記の逆位または欠失システム

40

50

を使用することができる。

【0161】

試験RDBCキメラ体は、次いで、候補抗原で免疫され得る。免疫後、IGVH1-2\*02 Ig可変領域の体細胞超変異状態が分析され得る。並行して、免疫が親和性成熟を促進するかどうかを決定するために、gp120 CD4結合部位に対する抗体親和性が測定される。本発明者らはまた、本発明者らのシステムに変異中間体を取り込み、親和性成熟の中間段階においてB細胞を活性化するそれらの能力について候補抗原をアッセイすることができる。IGVH1-2\*02に加えて、他のヒトV<sub>H</sub>セグメント、例えばIGVH1-46(27)も、CD4結合部位、V1V2領域およびgp120のグリカンならびにgp41の膜近傍外抗原(MPER)を含む様々なHIV標的を認識する異なるタイプのBnAbの前駆体として機能する(28)。大規模SHMとは別に、これらのBnAbの一部は特別長いIgH CDR3を特徴とする。本発明者らのシステムは、末梢B細胞がV(D)J組み換えの間に長いCDR3を再現してそのような特別な抗体を生成するヒトIgH可変領域工クソンを発現する免疫試験用マウスを生成することができる。  
10

【0162】

参考文献

本明細書においてならびに詳細な説明および実施例を通して引用されている参考文献は、それらの全体が参考により本明細書に組み入れられる。

1. P. J. Carter, Nat. Rev. Immunol. 6, 343 (2006).
2. F. Klein et al., Nature 492, 118 (2012).  
20
3. X. Wu et al., Science 329, 856 (2010).
4. C. H. Bassing et al., Cell 109, S45 (2002).
5. F. Matsuda, Molecular Biology of B cells, 1 (2004).
6. J. Chaudhuri et al., Adv. Immunol. 94, 157 (2007).
7. J. M. Di Noia, M. S. Neuberger, Annu. Rev. Biochem. 94, 157 (2007).
8. N. Lonberg, Nature Biotechnology 23, 1117 (2005).
9. J. Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4528 (1993).
10. R. Riblet, Molecular Biology of B cells, 19 (2004).  
30
11. G. D. Yancopoulos et al., Nature 311, 727 (1984).
12. F. Melchers et al., Immunol. Rev. 175, 33 (2000).
13. B. A. Malynn et al., J. Exp. Med. 171, 843 (1990).
14. D. J. Decker et al., J. Immunol. 147, 1406 (1991).
15. C. Guo et al., Nature 447, 424 (2011).
16. F. Ran et al., Nat. Protoc. 8, 2281 (2013).
17. Turan et al., Gene 515, 1 (2013).
18. X. Wu et al., Science 333, 1593 (2011).  
40

19. G. Yang et al., J. Exp. Med. 210, 241 (2013).
20. M. Kraus et al., Cell 117, 787 (2004).
21. M. Maruyama et al., Nature 407, 636 (2000).
22. L. Lu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 19420 (2008).
23. H. J. Kim et al., Nature 467, 328 (2010).
24. D. Lingwood et al., Nature 489, 566 (2012).
25. T. Zhou et al., Science 329, 811 (2010).
26. J. Jardine et al., Science 340, 711 (2013). 10
27. J. F. Scheid et al., Science 333, 1633 (2011).
28. D. R. Burton et al., Science 337, 183 (2012).

**【 0 1 6 3 】**

**実施例2**

上記のように、HIVワクチン分野は、治療的に有効な抗HIV広域中和抗体（bNAB）を誘起するインビオ免疫戦略を試験するためのより良いマウスモデルからの利益を享受するであろう（1）。この要望に取り組むために、ワクチン接種研究において使用するためのHIVワクチン分野にとって関心対象となる特定のヒト抗体をそれらのB細胞において発現するキメラマウスを作製するためのRAG-2欠損胚盤胞補完（RDBC）法に基づく新規かつ高速なアプローチが本明細書に記載される。このマウスモデルは、前駆体抗体からBnAbへとしたる親和性成熟を刺激する免疫原の効果の研究を促進するであろう。 20

**【 0 1 6 4 】**

VRC01の非変異前駆体を発現するそのようなマウスモデルの作製が本明細書に記載される。VRC01の生殖系列 $V_H$ セグメントはIGHV1-2\*02である（2）。マウスにおいてIGHV1-2\*02を発現させるために、相同性媒介遺伝子標的化を使用してマウス胚性幹（ES）細胞においてマウス $V_H81X$ をIGHV1-2\*02で置換した（図1A、工程1）。 $V_H81X$ はV(D)J組み換えにおいて最も頻繁に利用されるマウス $V_H$ セグメントなので（3）、IGHV1-2\*02は、 $V_H81X$ に代えて挿入された場合、同じ再構成優先性を示すと考えられる。IGHV1-2\*02置換を含むマウスを作製した。これらのマウスにおいて、B細胞のおよそ4%が、再構成されたIGHV1-2\*02を有していた（図2Aおよび2B）。マウスIgH遺伝子座が100個を超える $V_H$ セグメントを含んでいることを考慮すれば、この結果は、IGHV1-2\*02が実際にV(D)J組み換えにおいて実際に優先的に利用されることを示している。 30

**【 0 1 6 5 】**

本発明者らは、この遺伝子座に導入された任意のヒト $V_H$ セグメントが効率的な再構成を起こし、末梢リンパ組織において成熟B細胞のレパートリーを支配するように $V_H81X$ 遺伝子座を変更した。

**【 0 1 6 6 】**

本発明者らは、BnAbのヒトDJ $_H$ またはJ $_H$ セグメントをマウスJ $_H$ 遺伝子座に組み込み、それらが $V_H81X$ 遺伝子座でヒト $V_H$ セグメントと連結され得るようにした。加えて、本発明者らは、将来のこの遺伝子座への他のヒトJ $_H$ セグメントの導入を容易にするようマウスJ $_H$ 遺伝子座を変更することを提案した。 40

**【 0 1 6 7 】**

IgL可変領域の再構成済み版をマウスIgk遺伝子座に組み込むことによってBnAbのヒトIg軽鎖（IgL）を発現させるため。

**【 0 1 6 8 】**

本発明者らは、特定の変異が親和性成熟のプロセスを加速させ得るかどうかを試験した。

**【 0 1 6 9 】**

本発明者らは、本明細書に記載されるシステムを使用して、VRC01の親和性成熟中間体

10

20

30

40

50

を発現させた。これらのマウスを、非変異祖先または変異中間体の連続的な免疫が完全成熟BnAbへの親和性成熟を誘導し得ることを示すために使用した。

#### 【 0 1 7 0 】

##### IGCRIエレメントの検出

IGCRIは、V<sub>H</sub>とDの間の介在領域に存在する調節エレメントである(5)。IGCRIの欠失は、V(D)J組み換えにおけるV<sub>H</sub>81Xの偏った利用を増強する(5)。この観察に基づき、IGHV1-2<sup>\*</sup>02を組み込んだIgH対立遺伝子からIGCRIを欠失させた(図1A工程2)。IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID ES細胞をRag2欠損胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。Rag2はV(D)J組み換えに必須なので、BおよびT細胞は、Rag2十分なESクローンのみから生じ得、Rag2欠損胚盤胞からは生じない(4)。このRDDB法は、キメラマウスにおけるBおよびT細胞に対するES細胞の任意の遺伝子操作の影響の評価を可能にする。IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRIDキメラマウスの成熟B細胞におけるIGHV1-2<sup>\*</sup>02利用の頻度を決定した(図2Aおよび2B)。ハイブリドーマ分析に基づき、脾臓B細胞の59%が、再構成されたIGHV1-2<sup>\*</sup>02を含んでいた。したがって、IGCRIの欠失は、IGHV1-2<sup>\*</sup>02の利用を15倍増加させた。IGHV1-2<sup>\*</sup>02を含む組み換え連結体の配列決定を行い、20%が生産的なものであることが見出された(図2C)。学説による拘束を望まないが、非生産的IGHV1-2<sup>\*</sup>02再構成体は、他方のIgH対立遺伝子の生産的再構成によってB細胞発生を完遂すると考えられる。

10

#### 【 0 1 7 1 】

##### IgH<sup>b</sup>対立遺伝子のJ<sub>H</sub>領域の欠失

V(D)J組み換えをIGHV1-2<sup>\*</sup>02を含むIgH対立遺伝子に限定するため、他方のIgH対立遺伝子のJ<sub>H</sub>領域を欠失させた。本明細書で使用されるES細胞は、129とC57BL/6マウスの間のF1ハイブリッドから得られる。129およびC57BL/6マウスのIgH対立遺伝子は、それぞれ、IgH<sup>a</sup>およびIgH<sup>b</sup>アロタイプに属し、IGHV1-2<sup>\*</sup>02置換およびIGCRI欠失は、IgH<sup>a</sup>対立遺伝子で行った。IgH<sup>b</sup>対立遺伝子を不活性化させるために、J<sub>H</sub><sup>b</sup>領域を欠失させ(図1B、工程3)、操作されたES細胞をRDDBに使用した。IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup> RDDBマウスにおける脾臓B細胞間でのIGHV1-2<sup>\*</sup>02利用の頻度を決定し、B細胞の34%がIGHV1-2<sup>\*</sup>02再構成体を含んでおり、そのすべてが生産的なものであることが見出された(図2A～2D)。したがって、IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup> ESクローンは、マウスモデルにおいて任意のヒトV<sub>H</sub>セグメントを発現させるための効果的なプラットフォームとして機能し得る。

20

#### 【 0 1 7 2 】

##### マウスJ<sub>k</sub>遺伝子座へのVRC01の非変異前駆体のためのIg軽鎖(IgL)の組み込み

VRC01ファミリーのBnAbのIgL鎖の特徴は、短い5アミノ酸のCDR L3である(6)。デノボ再構成を通じてそのような短いCDR L3を得る可能性は低いため、再構成済み版の非変異VRC01 IgLをマウスJ<sub>k</sub><sup>a</sup>遺伝子座に組み込んだ(図1C、工程4)。このESクローン(IGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup>D/VRC01LC)をRag2欠損性胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。

30

#### 【 0 1 7 3 】

##### マウスJ<sub>H</sub>遺伝子座へのヒトJ<sub>H</sub>2セグメントの組み込み

VRC01ファミリーにおいて唯一の保存されているCDR H3の特徴は、100B位のW残基であり(6)、これはヒトJ<sub>H</sub>2セグメントによって提供され得る。VRC01抗体体内での高レベルの変異およびNヌクレオチドの無作為的性質から、Dセグメントの同定を含む真正の生殖系列CDR H3配列を確認することは困難である。したがって、ヒトJ<sub>H</sub>2セグメントのみをマウスJ<sub>H</sub><sup>a</sup>遺伝子座に組み込んだ;ヒトJ<sub>H</sub>2とマウスDセグメントの組み換えは多様なCDR H3が生成するであろう。VRC01ファミリーの抗体のCDR H3のばらつきのある性質を考慮すれば(6)、この組み合わせによって生成されるCDR H3の少なくとも一部分は、VRC01とgp120の相互作用に適合する。加えて、多様なCDR H3は、gp120に結合するが自己抗原と交差反応せず、したがって骨髄免疫寛容機構を通じた発生阻止に供されない抗体の選択を可能にする。全マウスJ<sub>H</sub>1～J<sub>H</sub>4領域をヒトJ<sub>H</sub>2で置き換える標的コンストラクトを作製した(図1A、工程5)。この標的コンストラクトをIGHV1-2<sup>\*</sup>02/IGCRID/J<sub>H</sub><sup>b</sup>D/VRC01LC ESクローンに導入した。

40

#### 【 0 1 7 4 】

50

本発明者らはまた、Qa-1変異が胚中心反応を増強し得るかどうかを試験した。Qa-1内の特定の変異は、マウスにおいて異常に大きな胚中心をもたらすことが示されている(7)。本発明者らは、それが親和性成熟を加速させるかどうかを確認するために、本明細書に記載されるシステムへのそのようなQa-1変異の組み込みを検討した。しかし、本発明者らは、体細胞超変異の頻度がQa-1と対照マウスの間で同程度であることを見出し(データ示さず)、この変異からの付加的な利益を見出すことができなかった。

#### 【0175】

VRC01抗体の非変異前駆体を発現させるためのマウスシステムを構築した。このシステムへの他のヒト抗体遺伝子の組み込みを容易にするため、I-SceI切断部位をV<sub>H</sub>81X遺伝子座およびCas9のガイドRNAのための標的配列をJ<sub>k</sub>遺伝子座に導入した;ヒトJ<sub>H</sub>2をこのJ<sub>H</sub>遺伝子座に組み込む標的コンストラクトにCas9のガイドRNAのための標的部位を組み込むこともできる。I-SceIまたはCas9によるこれらの遺伝子座における二重鎖切断部の導入は、遺伝子標的化の効率を向上させ得る。変更されたESクローンは、キメラマウスの集団を効果的に生成するためのRDBCアプローチと共に使用され得る。さらに、RDBCキメラマウスのすべてが、現時点で、それらの遺伝的変更を生殖系列に伝達する。

10

#### 【0176】

VRC01の非変異前駆体を発現するマウスモデル

VRC01の非変異前駆体を発現するマウスモデルならびにVRC01 Ig軽鎖およびヒトJ<sub>H</sub>2セグメントを含むマウスが本明細書に記載される。例えば、VRC01の様々な親和性成熟中間体を含むES細胞もまた本明細書に記載される(8)。

20

#### 【0177】

骨髄における免疫寛容機構による負の制御に供されるBnAbの条件付き発現システムの開発一部のBnAbは、多反応性であり、自己抗原に結合し得る。結果として、マウスにおいてこれらのBnAbを発現するB細胞は、骨髄における免疫寛容機構による発生阻止に供される(9)。この課題に取り組むため、成熟B細胞において特異的にBnAbを発現させ、それによつて骨髄における免疫寛容機構を回避する戦略が本明細書に記載される。この目的を達成するため、骨髄内のB細胞前駆体において非自己反応性抗体をコードするIg可変領域遺伝子を発現させる;これらの抗体遺伝子は、本明細書で「ドライバーV遺伝子」と称される(図3)。BnAb遺伝子は、ドライバーV遺伝子の上流に配置され、骨髄では発現されない。これらのB細胞が末梢リンパ組織において成熟B細胞になったとき、ドライバーV遺伝子は、成熟B細胞段階で特異的に発現されるcreリコンビナーゼによって隣接loxP部位により欠失される(CD21-cre、図3)。結果として、BnAb遺伝子がドライバーV遺伝子と置き換わり、成熟B細胞において発現される。この方法は、例えば、BnAb VRC26(10)およびDH270を発現させるために使用され得る。マウスの繁殖に依存するのに代えてこの条件付き発現コンストラクトがCD21-cre ES細胞株に直接導入され得るように、ES細胞株をCD21-cre トランジェニックマウスから得た。VRC26およびDH270の条件付き発現コンストラクトを構築し、CD21-cre ES細胞にトランスフェクトした。

30

#### 【0178】

HIV感染の処置に関するBnAbの最適化

AIDS治療のためにBnAbを改善するための上記システムの適合が、本明細書に記載される。本明細書に記載されるアプローチのこの適用において、BnAbのV<sub>H</sub>およびDJ<sub>H</sub>セグメントが、それぞれ、V<sub>H</sub>81XおよびJ<sub>H</sub>遺伝子に組み込まれる(図4)。V<sub>H</sub>およびDJ<sub>H</sub>セグメントがB細胞発生期にV(D)J組み換えを通じて連結された場合、連結多様性がCDR H3の範囲を大きく拡張し、本質的に、抗原結合部位に小さな相違を有する関連抗原のライブラリを生成する。標的抗原を用いた免疫は、高親和性抗体を発現するB細胞を選別し、これはさらに体細胞超変異を通じて最適化される。いくつかの態様において、BnAbは、DH270またはCH103であり得る(11)。成熟DH270抗体は、比較的低いレベルの体細胞超変異を含み、潜在的に、さらなる親和性成熟の周回によるさらなる最適化の余地をより多く残す。CH103抗体の変異頻度はまた、VRC01に関して報告されているものよりも低く、他のBnAbのいくつかと同程度の広範囲の中和活性を示さない。DH270およびCH103の両方に関して、CDR H3はHI

40

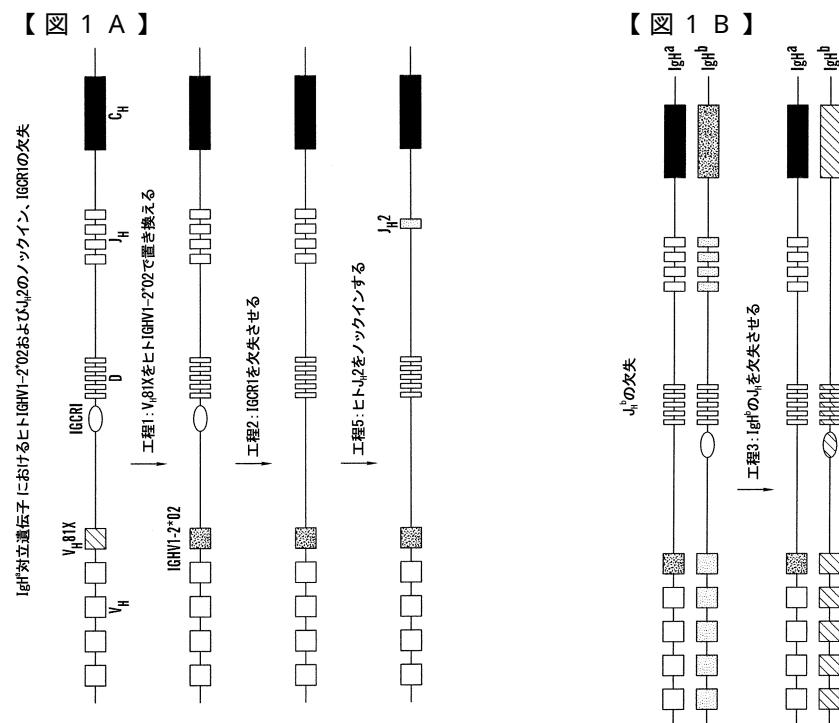
50

Vエンベロープタンパク質とのインターフェースの重要な部分を構成する。

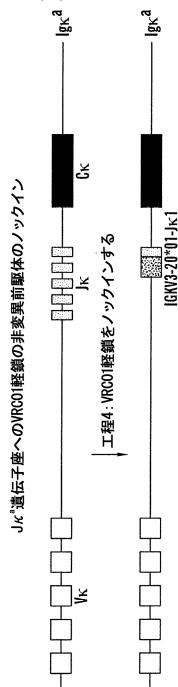
【0179】

参考文献

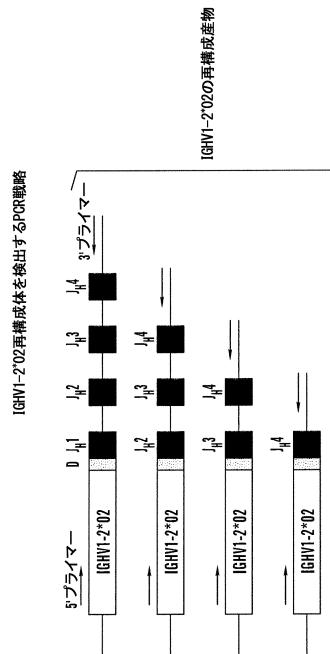
1. J. R. Mascola, B. F. Haynes, *Immunological Reviews* **254**, 225 (2013).
2. X. Wu et al., *Science* **329**, 856 (2009).
3. G. D. Yancopoulos et al., *Nature* **311**, 727 (1984).
4. J. Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4528 (1993).
5. C. Guo et al., *Nature* **447**, 424 (2011).
6. A. P. West et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E2083 (2012). 10
7. H. J. Kim et al., *Nature* **467**, 328 (2010).
8. X. Wu et al., *Science* **333**, 1593 (2011).
9. Y. Chen et al., *Journal of Immunology* **191**, 1260 (2013).
10. N. A. Doria-Rose et al., *Nature* **509**, 55 (2014).
11. H. Liao et al. *Nature* **496**, 469 (2013).



【図 1 C】



【図 2 A】



【図 2 B】

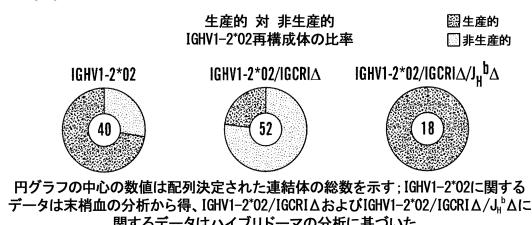
ハイブリドーマからのIGHV1-2\*02再構成体のPCR増幅の代表的結果  
IGHV1-2\*02  
IGHV1-2\*02/IGCRIΔ  
IGHV1-2\*02/IGCRIΔ/JHΔ

【図 2 C】

ハイブリドーマ内でのIGHV1-2\*02再構成体の頻度

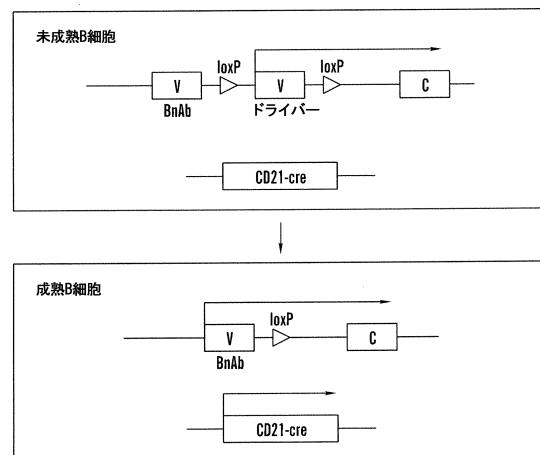
	IGHV1-2*02	IGHV1-2*02/IGCRIΔ	IGHV1-2*02/IGCRIΔ/JHΔ
IGHV1-2*02 <sup>+</sup>	11	122	65
計	303	208	192
IGHV1-2*02 <sup>+</sup> %	4%	59%	34%

【図 2 D】

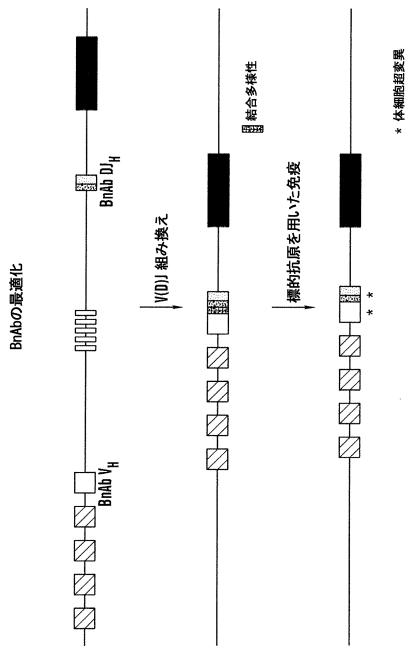


【図 3】

BnAbの条件付き発現



【図4】



【配列表】

0006479024000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395 N
A 61 K 35/17 (2015.01)	A 61 K 35/17 Z
A 61 K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00 H

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
 (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
 (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
 (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
 (74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
 (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
 (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘  
 (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
 (72)発明者 オルト フレデリック  
アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ハーバード ストリート 3  
21 アパートメント 201  
 (72)発明者 チェン ウェイ - リン  
アメリカ合衆国 01532 マサチューセッツ州 ノースパラ ブライドル パス ドライブ  
8  
 (72)発明者 ティアン ミン  
アメリカ合衆国 02115 マサチューセッツ州 ボストン ブルックライン アベニュー 4  
00 アパートメント 23イー

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第2013/059230 (WO, A1)  
 国際公開第2013/041844 (WO, A1)  
 国際公開第2013/022782 (WO, A1)  
 千葉医学, 1990年, Vol.66, p.183-191  
 Immunity, 2006年, Vol.25, p.43-53

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )