

FIG. 4A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載されるマウス、マウス由来の細胞または組織、方法、使用など。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

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

10

【背景技術】

【0002】

背景

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

20

【0003】

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

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

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

40

【0005】

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

【課題を解決するための手段】

【0006】

要旨

遺伝的に改変されたマウス、胚、細胞、組織ならびにマウスを改変するための核酸構築物、ならびにそれらを作製するためおよび使用するための方法および組成物が提供される

50

。カップー (κ) 軽鎖という背景においてラムダ (λ) 可変領域 (ヒトまたは非ヒト) を産生するマウスおよび細胞が提供される。例えば、内在性マウス軽鎖遺伝子座から、 κ または λ 軽鎖という背景においてヒト λ 可変領域を産生するマウスおよび細胞も提供される。ラムダ可変領域を含む抗体を作製するための方法も提供される。同族のラムダ可変領域とともに発現する重鎖を選択するための方法も提供される。

【0007】

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

10

【0008】

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

【0009】

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

20

30

【0010】

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

40

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

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

50

【0014】

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

【0015】

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

【0016】

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

【0017】

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

【0018】

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

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、その少なくとも1つのh J λ 遺伝子セグメントは、J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 7およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

10

【0029】

1つの実施形態において、そのヒトλ可変ドメインは、3-1/1、3-1/7、4-3/1、4-3/7、2-8/1、3-9/1、3-10/1、3-10/3、3-10/7、2-14/1、3-19/1、2-23/1、3-25/1、1-40/1、1-40/2、1-40/3、1-40/7、7-43/1、7-43/3、1-44/1、1-44/7、5-45/1、5-45/2、5-45/7、7-46/1、7-46/2、7-46/7、9-49/1、9-49/2、9-49/7および1-51/1からなる群より選択される再配列されたh V λ / h J λ 配列に由来する。

20

【0030】

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

【0031】

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

30

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

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

40

【0035】

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

【0036】

1つの実施形態において、上記Vλおよび/またはJλ遺伝子セグメントは、ヒトの遺伝子セグメントである。1つの実施形態において、上記Vλおよび/またはJλ遺伝子セグメントは、マウスの遺伝子セグメントであり、C_Lは、マウスCκである。

【0037】

50

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

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

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

【0047】

10

20

30

40

50

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

10

【0048】

1つの実施形態において、 V_L 遺伝子座は、13~28個またはそれ以上の $hV\lambda$ を含む。特定の実施形態において、それらの $hV\lambda$ は、2-14、3-16、2-18、3-19、3-21、3-22、2-23、3-25および3-27を含む。特定の実施形態において、 κ 遺伝子座は、 $V\lambda$ 3-27から $V\lambda$ 3-1に及ぶヒト λ 遺伝子座の連続する配列を含む。1つの実施形態において、 V_L 遺伝子座は、内在性 κ 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 V_L 遺伝子座は、内在性 κ 遺伝子座に存在し、内在性 λ 軽鎖遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。別の実施形態において、 V_L 遺伝子座は、内在性 λ 遺伝子座に存在する。特定の実施形態において、 V_L 遺伝子座は、内在性 λ 遺伝子座に存在し、内在性 κ 遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。

20

【0049】

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

30

【0050】

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

40

50

V_L 遺伝子座は、内在性 λ 遺伝子座に存在し、内在性 κ 遺伝子座は、部分的にまたは完全に欠失される。

【0051】

1つの実施形態において、V_L 遺伝子座は、少なくとも1つのh V λ、少なくとも1つのh J λおよびマウスC κ 遺伝子を含む。1つの実施形態において、V_L 遺伝子座は、少なくとも1つのh V λ、少なくとも1つのh J λおよびマウスC λ 遺伝子を含む。特定の実施形態において、そのマウスC λ 遺伝子は、C λ 2である。特定の実施形態において、そのマウスC λ 遺伝子は、マウスC λ 2と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、96%、97%、98%または少なくとも99%同一である。

10

【0052】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性マウスκ 遺伝子座に、1つ以上のh V λ 遺伝子セグメントによる内在性マウスV κ 遺伝子セグメントの置換を含み、ここで、そのh V λ 遺伝子セグメントは、内在性マウスC κ 領域遺伝子に作動可能に接続されており、そのマウスは、ヒトV λ 遺伝子セグメントを再配列し、ヒトV λ ドメインおよびマウスC κ を含むリバースキメラ (reverse chimeric) 免疫グロブリン軽鎖を発現する。1つの実施形態において、再配列されていないマウスV κ 遺伝子セグメントの90~100%が、少なくとも1つの再配列されていないh V λ 遺伝子セグメントで置換される。特定の実施形態において、内在性マウスV κ 遺伝子セグメントのすべてまたは実質的にすべてが、少なくとも1つの再配列されていないh V λ 遺伝子セグメントで置換される。1つの実施形態において、その置換は、少なくとも12個、少なくとも28個または少なくとも40個の再配列されていないh V λ 遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、その置換は、少なくとも7個の機能的な再配列されていないh V λ 遺伝子セグメント、少なくとも16個の機能的な再配列されていないh V λ 遺伝子セグメントまたは少なくとも27個の機能的な再配列されていないh V λ 遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、上記マウスは、少なくとも1つの再配列されていないh J λ 遺伝子セグメントによるすべてのマウスJ κ 遺伝子セグメントの置換を含む。1つの実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないh J λ 遺伝子セグメントは、J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 4、J λ 5、J λ 6、J λ 7およびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、1つ以上のh V λ 遺伝子セグメントは、3-1、4-3、2-8、3-9、3-10、2-11、3-12、2-14、3-16、2-18、3-19、3-21、3-22、2-23、3-25、3-27、1-40、7-43、1-44、5-45、7-46、1-47、5-48、9-49、1-50、1-51、5-52 h V λ 遺伝子セグメントおよびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないh J λ 遺伝子セグメントは、J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 7およびそれらの組み合わせから選択される。

20

30

【0053】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性マウスλ 遺伝子座に、1つ以上のヒトV λ 遺伝子セグメントによる内在性マウスV λ 遺伝子セグメントの置換を内在性マウスλ 遺伝子座に含み、ここで、そのh V λ 遺伝子セグメントは、マウスC λ 領域遺伝子に作動可能に接続されており、そのマウスは、h V λ 遺伝子セグメントを再配列し、h V λ ドメインおよびマウスC λ を含むリバースキメラ免疫グロブリン軽鎖を発現する。特定の実施形態において、そのマウスC λ 遺伝子は、C λ 2である。特定の実施形態において、そのマウスC λ 遺伝子は、マウスC λ 2と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%同一である。1つの実施形態において、再配列されていないマウスV λ 遺伝子セグメントの90~100%が、少なくとも1つの再配列されていないh V λ 遺伝子セグメントで置換される。特定の実施形態において、内在性マウスV λ 遺伝子セグメントのすべてまたは実質的にすべてが、少なくとも1つの再配列されていないh V λ 遺伝子セグメントで置換される。1つの実

40

50

施形態において、その置換は、少なくとも12個、少なくとも28個または少なくとも40個の再配列されていないhVλ遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、その置換は、少なくとも7個の機能的な再配列されていないhVλ遺伝子セグメント、少なくとも16個の機能的な再配列されていないhVλ遺伝子セグメントまたは少なくとも27個の機能的な再配列されていないhVλ遺伝子セグメントによる置換である。1つの実施形態において、上記マウスは、少なくとも1つの再配列されていないhJλ遺伝子セグメントによるすべてのマウスJλ遺伝子セグメントの置換を含む。1つの実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないhJλ遺伝子セグメントは、Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ4、Jλ5、Jλ6、Jλ7およびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、その1つ以上のhVλ遺伝子セグメントは、3-1、4-3、2-8、3-9、3-10、2-11、3-12、2-14、3-16、2-18、3-19、3-21、3-22、2-23、3-25、3-27、1-40、7-43、1-44、5-45、7-46、1-47、5-48、9-49、1-50、1-51、5-52 hVλ遺伝子セグメントおよびそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態において、その少なくとも1つの再配列されていないhJλ遺伝子セグメントは、Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ7およびそれらの組み合わせから選択される。

10

【0054】

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

【0055】

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

20

【0056】

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

30

【0057】

1つの実施形態において、ヒトVκ-Jκ遺伝子間領域は、ヒトVκ4-1遺伝子セグメントの約130bp下流または3'側、すなわち、ヒトVκ4-1遺伝子セグメントの3'非翻訳領域の約130bp下流に位置する領域であり、ヒトJκ1遺伝子セグメントの約600bp上流または5'側までに及ぶ。特定の実施形態において、ヒトVκ-Jκ遺伝子間領域は、約22.8kbのサイズである。1つの実施形態において、Vκ-Jκ遺伝子間領域は、ヒトVκ4-1遺伝子セグメントの3'非翻訳領域の末端からヒトJκ1遺伝子セグメントの約600bp上流にわたるヒトVκ-Jκ遺伝子間領域と約90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上または約95%以上同一である。1つの実施形態において、Vκ-Jκ遺伝子間領域は、配列番号100を含む。特定の実施形態において、Vκ-Jκ遺伝子間領域は、配列番号100の機能的なフラグメントを含む。特定の実施形態において、Vκ-Jκ遺伝子間領域は、配列番号100である。

40

【0058】

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

【0059】

1つの態様において、列挙されたヒトVκ-Jκ遺伝子間領域配列を含む単離された核酸構築物が提供される。1つの実施形態において、その核酸構築物は、ヒトVκ-Jκ遺

50

伝子間領域配列をマウス軽鎖遺伝子座に標的化する標的化アーム (targeting arm) を含む。特定の実施形態において、そのマウス軽鎖遺伝子座は、 κ 遺伝子座である。特定の実施形態において、その標的化アームは、ヒト $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ 遺伝子間領域を改変された内在性マウス κ 遺伝子座に標的化し、ここで、その標的化は、 hV_{λ} 配列と hJ_{λ} 配列との間の位置に対するものである。

【0060】

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

10

【0061】

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

【0062】

1つの実施形態において、上記2つ以下の軽鎖対立遺伝子は、 κ 対立遺伝子および λ 対立遺伝子、2つの κ 対立遺伝子ならびに2つの λ 対立遺伝子から選択される。特定の実施形態において、その2つの軽鎖対立遺伝子のうちの1つは、 $C_{\lambda} 2$ 遺伝子を含む λ 対立遺伝子である。

【0063】

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

20

【0064】

1つの実施形態において、上記マウスは、1つの機能的な免疫グロブリン軽鎖遺伝子座および1つの非機能的な軽鎖遺伝子座を含み、ここで、その機能的な軽鎖遺伝子座は、マウス C_{λ} 遺伝子を含む内在性マウス λ 軽鎖遺伝子座に、再配列されていない免疫グロブリンヒト V_{λ} および J_{λ} 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、その C_{λ} 遺伝子は、 $C_{\lambda} 2$ である。特定の実施形態において、そのマウス C_{λ} 遺伝子は、マウス $C_{\lambda} 2$ と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%同一である。

30

【0065】

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

【0066】

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

40

【0067】

1つの実施形態において、上記マウスは、内在性 C_{κ} 遺伝子を含む内在性マウス κ 遺伝

50

子座に、再配列されていない $h V \kappa$ および再配列されていない $h J \kappa$ を含む第 1 の軽鎖対立遺伝子；ならびに内在性 $C \lambda$ 遺伝子を含む内在性マウス λ 遺伝子座に、再配列されていない $h V \lambda$ および再配列されていない $h J \lambda$ を含む第 2 の軽鎖対立遺伝子を含む。特定の実施形態において、その遺伝的に改変されたマウスにおいて機能的な軽鎖対立遺伝子は、その第 1 および第 2 の軽鎖対立遺伝子だけである。1 つの実施形態において、その内在性 $C \lambda$ 遺伝子は、 $C \lambda 2$ である。特定の実施形態において、そのマウス $C \lambda$ 遺伝子は、マウス $C \lambda 2$ と少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % または少なくとも 98 % 同一である。

【0068】

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

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

1 つの実施形態において、上記の第 1 の対立遺伝子は、再配列されていない $h V \lambda$ および $h J \lambda$ 遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 2 の対立遺伝子は、再配列されていない $h V \lambda$ および $h J \lambda$ 遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 3 の対立遺伝子は、再配列されていない $h V \kappa$ および $h J \kappa$ 遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 4 および第 5 の対立遺伝子は、各々独立して、再配列されていない $h V_H$ および $h D_H$ および $h J_H$ 遺伝子セグメントを含む。1 つの実施形態において、上記の第 6 の対立遺伝子は、機能的にサイレンシングされた内在

10

20

30

40

50

性マウスκ遺伝子座を含む。

【0072】

1つの実施形態において、上記遺伝的に改変されたマウスは、マウスC_Lドメインに作動可能に接続された再配列されたhVλドメインを含む再配列された抗体遺伝子を含むB細胞を含む。1つの実施形態において、そのマウスC_Lドメインは、マウスCκおよびマウスCλドメインから選択される。特定の実施形態において、そのマウスCλドメインは、Cλ2遺伝子に由来する。特定の実施形態において、そのマウスCλドメインは、マウスCλ2と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%同一であるCλドメインに由来する。

【0073】

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

【0074】

1つの実施形態において、上記マウスの脾細胞の約10～50%は、B細胞（すなわち、CD19陽性）であるか、またはその約9～28%は、マウスCκドメインに融合されたhVλドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【0075】

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

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

1つの実施形態において、上記マウスの骨髄の約60%は、B細胞（すなわち、CD1

10

20

30

40

50

9陽性)であるか、またはその約38.3%の未熟B細胞(すなわち、CD19陽性/B220中等度陽性/IgM陽性)は、マウスC κ ドメインに融合されたhV λ ドメインを含む免疫グロブリン軽鎖を発現する。

【0082】

1つの実施形態において、上記マウスは、ヒトVおよびヒトJ遺伝子セグメントに由来する可変ドメインならびにマウス定常領域遺伝子に由来する定常ドメインを含む軽鎖を含む抗体を発現する。1つの実施形態において、そのマウス定常領域遺伝子は、C κ 遺伝子である。別の実施形態において、そのマウス定常領域遺伝子は、C λ 遺伝子である。特定の実施形態において、そのC λ 領域は、C λ 2である。特定の実施形態において、そのマウスC λ 遺伝子は、マウスC λ 2と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%同一であるC λ 遺伝子に由来する。特定の実施形態において、上記抗体は、ヒトV、ヒトDおよびヒトJ遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含む重鎖、ならびにマウス重鎖定常領域遺伝子に由来する重鎖定常ドメインをさらに含む。1つの実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定常ドメインのヒンジ-CH₂-CH₃配列を含む。別の実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定常ドメインのCH₁-ヒンジ-CH₂-CH₃配列を含む。別の実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定常ドメインのCH₁-CH₂-CH₃-CH₄配列を含む。別の実施形態において、そのマウス重鎖定常領域遺伝子は、重鎖定常ドメインのCH₂-CH₃-CH₄配列を含む。

【0083】

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

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0087】

1 つの実施形態において、上記マウスは、(i) すべてまたは実質的にすべての機能的なヒト V、D および J 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウス V、D および J 遺伝子セグメントの置換、マウス C $_H$ 遺伝子を含む重鎖遺伝子座、(i i) すべて、実質的にすべてまたは複数の機能的な h V λ および h J λ 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウス V λ および J λ 遺伝子セグメントの置換ならびにマウス C λ 遺伝子を含む第 1 の λ 軽鎖遺伝子座、(i i i) すべて、実質的にすべてまたは複数の機能的な h V λ および h J λ 遺伝子セグメントによるすべてまたは実質的にすべての機能的な内在性マウス V λ および J λ 遺伝子セグメントの置換ならびにマウス C λ 遺伝子を含む第 2 の λ 軽鎖遺伝子座を含む。特定の実施形態において、そのマウス C λ 遺伝子は、C λ 2 である。特定の実施形態において、そのマウス C λ 遺伝子は、マウス C λ 2 と少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % または少なくとも 98 % 同一である C λ 遺伝子に由来する。

20

【0088】

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

【0089】

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

30

【0090】

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

40

【0091】

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

【0092】

50

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、マウスVλ2の上流のマウスλ配列を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにマウスJλ2の3'側のマウスλ配列を標的化するための標的化アームを含む単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれた(Frt'ed)Hyg-TKカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウスCλ2、Jλ4、Cλ4およびマウスエンハンサー2.4を含む。

【0093】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、Vλ1に対して5'側のマウスλ遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにマウスCλ1に対して3'側のマウスλ配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、loxで挟まれた(loxed)ネオマイシンカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウスλ3'エンハンサーおよびマウスλ3'エンハンサー3.1を含む。

10

【0094】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、Vλ2に対して5'側のマウスλ遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにマウスJλ2に対して3'側かつマウスCλ2に対して5'側のマウスλ配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたハイグロマイシン-TKカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウスCλ2-Jλ4-Cλ4遺伝子セグメントおよびマウスλエンハンサー2.4を含む。

20

【0095】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、Vλ2に対して5'側のマウスλ遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、hJλ1の末端に対して下流にhVλ3-12由来のヒトλ軽鎖遺伝子座の連続する領域を含むヒトゲノムフラグメント、ならびにマウスJλ2に対して3'側のマウスλ配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたネオマイシンカセットである。1つの実施形態において、その3'標的化アームは、マウスCλ2-Jλ4-Cλ4遺伝子セグメントおよびマウスλエンハンサー2.4を含む。

30

【0096】

1つの態様において、hJλ1の末端に対して下流にhVλ3-12由来のヒトλ軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む、単離されたDNA構築物が提供される。

【0097】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、Vλ2に対して5'側のマウスλ遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、ならびにhVλ2-8の末端に対して下流のhVλ3-27由来のヒトλ軽鎖遺伝子座の連続した領域を含むヒトゲノムフラグメントを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたハイグロマイシンカセットである。1つの実施形態において、そのヒトゲノムフラグメントは、3'標的化アームを構成する。特定の実施形態において、その3'標的化アームは、hVλ2-8の末端に対して下流にhVλ3-12由来の約53kbのヒトλ軽鎖遺伝子座を含む。

40

【0098】

1つの態様において、hVλ3-12の末端に対して下流にhVλ3-27由来のヒトλ軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む、単離されたDNA構築物が提供される。

50

【0099】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、Vλ2に対して5'側のマウスλ遺伝子座を標的化するための標的化アーム、リコンビナーゼ認識部位と5'側および3'側で隣接した選択カセット、hVλ1-40の末端の下流にhVλ5-52由来のヒトλ軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む第1のヒトゲノムフラグメント、制限酵素部位、ならびにhVλ82Kの末端に対して下流にhVλ3-29由来のヒトλ軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む第2のヒトゲノムフラグメントを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その選択カセットは、Frtで挟まれたネオマイシンカセットである。1つの実施形態において、その制限酵素部位は、ホーミングエンドヌクレアーゼ(homing endonuclease)のための部位である。特定の実施形態において、そのホーミングエンドヌクレアーゼは、PI-Scelである。1つの(on)実施形態において、上記の第2のヒトゲノムフラグメントは、3'標的化アームである。特定の実施形態において、その3'標的化アームは、hVλ82Kの末端に対して下流にhVλ3-29由来の約27kbのヒトλ軽鎖遺伝子座を含む。

10

【0100】

1つの態様において、hVλ1-40の末端に対して下流にhVλ5-52由来のヒトλ軽鎖遺伝子座の連続する領域を含む、単離されたDNA構築物が提供される。

【0101】

1つの態様において、転写の方向に関して5'から3'に向かって、内在性Vκ遺伝子セグメントに対して5'側のマウスκ遺伝子座を標的化するための標的化アーム、2つの並置されたリコンビナーゼ認識部位、その並置されたリコンビナーゼ認識部位に対して3'側の選択カセット、およびκ軽鎖可変遺伝子セグメントに対して5'側のマウスκ配列を標的化するための3'標的化アームを含む、単離されたDNA構築物が提供される。1つの実施形態において、その並置されたリコンビナーゼ認識部位は、互いに対して逆の向きである。特定の実施形態において、上記リコンビナーゼ認識部位は、異なる。別の特定の実施形態において、そのリコンビナーゼ認識部位は、loxP部位およびlox511部位である。1つの実施形態において、選択カセットは、ネオマイシンカセットである。

20

【0102】

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

30

【0103】

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

40

【0104】

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

【0105】

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

50

供される。

【0106】

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

【0107】

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

【0108】

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

10

【0109】

1つの態様において、マウス胚が提供され、ここで、そのマウス胚は、本明細書中に提供されるような遺伝的改変を含む。1つの実施形態において、ドナーES細胞を含む宿主マウス胚が提供され、ここで、そのドナーES細胞は、本明細書中に記載されるような遺伝的改変を含む。1つの実施形態において、上記マウス胚は、前桑実胚（pre-morula）の段階の胚である。特定の実施形態において、その前桑実胚の段階の胚は、4細胞期の胚または8細胞期の胚である。別の特定の実施形態において、上記マウス胚は、胚盤胞である。

20

【0110】

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

【0111】

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

30

【0112】

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

【0113】

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

40

【0114】

1つの態様において、（a）hVλ遺伝子セグメントおよびhJλ遺伝子セグメントに由来する可変領域；ならびに（b）マウスC_L遺伝子を含む免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスB細胞が提供される。1つの実施形態において、そのマウスC_L遺伝子は、CκおよびCλ遺伝子から選択される。特定の実施形態において、そのCλ遺伝子は、Cλ2である。特定の実施形態において、上記マウスCλ遺伝子は、マウスCλ2と少なくとも

50

60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%同一であるCλ遺伝子に由来する。1つの実施形態において、上記マウスB細胞は、さらに、(c) hV_H、hD_Hに由来する可変領域および(d) hJ_Hセグメントを含む同族重鎖を発現する。1つの実施形態において、上記B細胞は、再配列されたλ遺伝子を含まない。別の実施形態において、上記B細胞は、再配列されたκ遺伝子を含まない。

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

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

【0119】

1つの実施形態において、上記λ軽鎖定常遺伝子は、ヒトCλ遺伝子およびマウスCλ遺伝子から選択される。1つの実施形態において、上記λ軽鎖定常遺伝子は、ヒトCλ遺伝子である。特定の実施形態において、そのヒトCλ遺伝子は、Cλ1、Cλ2、Cλ3およびCλ7から選択される。1つの実施形態において、上記λ軽鎖定常遺伝子は、マウスCλ遺伝子である。特定の実施形態において、そのマウスCλ遺伝子は、Cλ1、Cλ2およびCλ3から選択される。より特定の実施形態において、そのマウスCλ遺伝子は、Cλ2である。別の特定の実施形態において、そのマウスCλ遺伝子は、マウスCλ2と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なく

とも95%または少なくとも98%同一であるC λ 遺伝子に由来する。

【0120】

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

【0121】

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

【0122】

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

【0123】

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

【0124】

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

【0125】

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

【0126】

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

【0127】

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

【0128】

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

10

20

30

40

50

【0129】

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

10

【0130】

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

20

【0131】

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

30

【0132】

1つの実施形態において、上記マウスC_λ領域は、C_λ1、C_λ2およびC_λ3から選択される。特定の実施形態において、上記マウスC_λ領域は、C_λ2である。

【0133】

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

40

【0134】

1つの実施形態において、再配列された抗体軽鎖可変領域遺伝子配列を作製するための方法が提供され、その方法は、（a）本開示に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程；（b）そのマウスに免疫応答を開始させる工程；（c）マウスC_κドメインをコードする核酸配列と、同じ核酸分子上で連続する再配列されたヒトV_λドメイン配列をコー

50

ドする核酸配列を含む細胞をそのマウスにおいて特定する工程（ここで、その細胞は、ヒト V_H ドメインおよびマウス C_H ドメインを含む同族重鎖もコードし、その細胞は、その抗原に結合する抗体を発現する）；（d）その細胞からヒト V_L ドメインをコードする核酸配列および同族ヒト V_H ドメインをコードする核酸配列をクローニングする工程；および（e）ヒト V_L ドメインをコードするクローニングされた核酸配列および同族ヒト V_H ドメインをコードするクローニングされた核酸配列を使用して、完全ヒト抗体を作製する工程を包含する。

【0135】

1つの実施形態において、再配列された抗体軽鎖可変領域遺伝子配列を作製するための方法が提供され、その方法は、（a）本明細書中に記載されるようなマウスを抗原に曝露する工程；（b）そのマウスにその抗原に対する免疫応答を開始させる工程；（c）マウス C_L ドメインと融合された再配列されたヒト V_L ドメイン配列をコードするDNAを含む細胞をそのマウスにおいて特定する工程（ここで、その細胞は、ヒト V_H ドメインおよびマウス C_H ドメインを含む同族重鎖もコードし、その細胞は、その抗原に結合する抗体を発現する）；（d）その細胞から、再配列されたヒト V_L ドメインをコードする核酸配列および同族ヒト V_H ドメインをコードする核酸配列をクローニングする工程；および（e）ヒト V_L ドメインをコードするクローニングされた核酸配列および同族ヒト V_H ドメインをコードするクローニングされた核酸配列を使用して、完全ヒト抗体を作製する工程を包含する。1つの実施形態において、上記マウス C_L ドメインは、マウス C_L2 である。特定の実施形態において、上記マウス C_L ドメインは、マウス C_L2 と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%同一である C_L 遺伝子に由来する。

【0136】

1つの態様において、内在性軽鎖定常領域（ C_L ）に融合されたヒト V_L 由来の軽鎖を発現する遺伝的に改変されたマウスが提供され、ここで、そのマウスは、抗原で免疫されると、マウス C_L ドメインに融合されたヒト V_L ドメインを含む抗体を産生する。1つの実施形態において、そのマウス C_L ドメインは、 C_{K1} ドメインおよび C_{L1} ドメインから選択される。1つの実施形態において、そのマウス C_L ドメインは、 C_{K1} ドメインである。1つの実施形態において、そのマウス C_L ドメインは、 C_{L1} ドメインである。特定の実施形態において、その C_{L1} ドメインは、 $C_{L1}2$ である。特定の実施形態において、そのマウス C_{L1} ドメインは、マウス $C_{L1}2$ と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%同一である C_{L1} 遺伝子に由来する。

【0137】

1つの態様において、複数の免疫グロブリン重鎖と会合される複数の免疫グロブリン V_L 軽鎖を発現する、本明細書中に記載されるような改変された内在性 κ または λ 軽鎖遺伝子座を含む遺伝的に改変されたマウスが提供される。1つの実施形態において、その重鎖は、ヒト配列を含む。様々な実施形態において、そのヒト配列は、可変配列、 CH_1 、ヒンジ、 CH_2 、 CH_3 およびそれらの組み合わせから選択される。1つの実施形態において、複数の免疫グロブリン V_L 軽鎖は、ヒト配列を含む。様々な実施形態において、そのヒト配列は、可変配列、定常配列およびそれらの組み合わせから選択される。1つの実施形態において、上記マウスは、無能力にされた（disabled）内在性免疫グロブリン遺伝子座を含み、導入遺伝子または染色体外エピソームから重鎖および／または V_L 軽鎖を発現する。1つの実施形態において、上記マウスは、一部もしくは全部の内在性マウス重鎖遺伝子セグメント（すなわち、 V 、 D 、 J ）、および／または一部もしくは全部の内在性マウス重鎖定常配列（例えば、 CH_1 、ヒンジ、 CH_2 、 CH_3 またはそれらの組み合わせ）および／または一部もしくは全部の内在性マウス軽鎖配列（例えば、 V 、 J 、定常またはそれらの組み合わせ）の内在性マウス遺伝子座に、1つ以上のヒト免疫グロブリン配列による置換を含む。

【0138】

10

20

30

40

50

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

【0139】

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

10

【0140】

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

【0141】

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

20

【0142】

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

【0143】

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

30

【0144】

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

【0145】

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

40

【0146】

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

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目A1)

生殖細胞系列において、内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にヒト免疫グロブリンλ軽鎖可変領域の核酸配列を含むマウスであって、ここで、該ヒト免疫グロブリンλ可変領域の核酸配列は、マウス免疫グロブリン定常領域の核酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖におい

50

て発現される、マウス。

(項目 A 2)

上記内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座が、免疫グロブリン λ 遺伝子座である、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 3)

上記内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座が、免疫グロブリン κ 遺伝子座である、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 4)

上記マウスが、上記内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座において内在性免疫グロブリン軽鎖可変配列を欠く、項目 A 1 に記載のマウス。

10

(項目 A 5)

すべてまたは実質的にすべての内在性免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントが、1 つ以上のヒト免疫グロブリン λ 可変領域遺伝子セグメントで置換されている、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 6)

上記ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖可変領域配列が、ヒト J λ 配列を含む、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 7)

上記ヒト J λ 配列が、J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 7 およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目 A 6 に記載のマウス。

20

(項目 A 8)

上記ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖可変領域配列が、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座のクラスター A のフラグメントを含む、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 9)

上記ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖遺伝子座のクラスター A のフラグメントが、h V λ 3-27 から h V λ 3-1 にわたる、項目 A 8 に記載のマウス。

(項目 A 10)

上記ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖可変領域配列が、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座のクラスター B のフラグメントを含む、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 11)

上記ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖遺伝子座のクラスター B のフラグメントが、h V λ 5-52 から h V λ 1-40 にわたる、項目 A 10 に記載のマウス。

30

(項目 A 12)

上記ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖可変領域配列が、ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖遺伝子座のクラスター A のゲノムフラグメントおよびクラスター B のゲノムフラグメントを含む、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 13)

上記ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖可変領域配列が、ヒト免疫グロブリン λ 軽鎖遺伝子座のクラスター A の少なくとも 1 つの遺伝子セグメントおよびクラスター B の少なくとも 1 つの遺伝子セグメントを含む、項目 A 12 に記載のマウス。

40

(項目 A 14)

上記マウスの免疫グロブリン軽鎖レパートリーの 10 % 超が、2-8、2-23、1-40、5-45 および 9-49 から選択される少なくとも 2 つの h V λ 遺伝子セグメントに由来する、項目 A 1 に記載のマウス。

(項目 A 15)

上記マウスの免疫グロブリン軽鎖レパートリーの 20 % 超が、2-8、2-23、1-40、5-45 および 9-49 から選択される少なくとも 3 つの h V λ 遺伝子セグメントに由来する、項目 A 14 に記載のマウス。

(項目 A 16)

上記マウスの免疫グロブリン軽鎖レパートリーの 30 % 超が、2-8、2-23、1-4

50

0、5-45および9-49から選択される少なくとも4つのhVλ遺伝子セグメントに由来する、項目A15に記載のマウス。

(項目A17)

マウス定常領域と融合されたヒトラムダ可変配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスであって、ここで、該マウスは、約1:1というκの使用頻度とλの使用頻度との比を示す、マウス。

(項目A18)

上記免疫グロブリン軽鎖が、内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から発現される、項目A17に記載のマウス。

(項目A19)

10

抗原結合タンパク質を作製するための、前述の項目のいずれか1項に記載されたマウスの使用。

(項目A20)

上記抗原結合タンパク質がヒトの抗原結合タンパク質である、項目A19に記載の使用。

(項目A21)

項目A1~18のいずれか1項に記載のマウスに由来する、細胞または組織であって、該細胞は、内在性免疫グロブリン軽鎖定常領域の核酸配列と連続する、ヒト免疫グロブリンλ軽鎖可変領域の核酸配列を含む、細胞または組織。

(項目A22)

20

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

(a) 項目A1~18のいずれか1項に記載のマウスを、目的の抗原に曝露する工程；

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

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

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

30

【図面の簡単な説明】

【0147】

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

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

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

40

【図4A】図4Aは、12個のhVλ遺伝子セグメントおよびhJλ1遺伝子セグメントを含むヒトλ軽鎖配列を用いて内在性マウスλ軽鎖遺伝子座を標的化するための最初の標的化ベクター(12/1-λ標的化ベクター)の一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図4B】図4Bは、12個のhVλ遺伝子セグメントおよびhJλ1遺伝子セグメント(12/1-κ標的化ベクター)、12個のhVλ遺伝子セグメントならびにhJλ1、2、3および7遺伝子セグメント(12/4-κ標的化ベクター)、12個のhVλ遺伝子セグメント、ヒトVκ-Jκゲノム配列およびhJλ1遺伝子セグメント(12(κ)1-κ標的化ベクター)、ならびに12個のhVλ遺伝子セグメント、ヒトVκ-Jκゲノム配列ならびにhJλ1、2、3および7遺伝子セグメント(12(κ)4-κ標的化ベクター)を含むヒトλ軽鎖配列を用いて内在性マウスκ軽鎖遺伝子座を標的化するため

50

の4個の最初の標的化ベクターの一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

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

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

【図6】図6は、ヒトκ遺伝子間配列、複数のhJλ遺伝子セグメントまたはその両方を含むハイブリッド軽鎖遺伝子座を構築するための独特のヒトλ-κハイブリッド標的化ベクターを作製するために使用された標的化工程および分子操作工程の一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

【図7A】図7Aは、内在性Cλ2遺伝子に作動可能に接続された40個のhVλ遺伝子セグメントおよび単一のhJλ遺伝子セグメントを含む改変されたマウスλ軽鎖遺伝子座についての遺伝子座の構造の一定の拡大比ではない全体的な説明図を示している。

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

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

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

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

【図9B】図9Bは、野生型マウス(WT)ならびにヒトVκ-Jκゲノム配列を含む40個のhVλおよび4個のJλ遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス(40hVλ-VκJκ-4hJλ)から回収された脾臓におけるCD19⁺、CD19⁺Igκ⁺およびCD19⁺Igλ⁺B細胞の総数を示している。

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

10

20

30

40

50

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

【図10A】図10Aの上のパネルは、野生型マウス（WT）ならびにヒトV κ -J κ ゲノム配列を含む40個のhV λ および4個のJ λ 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス（40hV λ -V κ J κ -4hJ λ ）由来の、BおよびT細胞（それぞれCD19⁺およびCD3⁺）について染色された骨髄のコンタープロットを示している。下のパネルは、野生型マウス（WT）ならびにヒトV κ -J κ ゲノム配列を含む40個のhV λ および4個のJ λ 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス（40hV λ -V κ J κ -4hJ λ ）由来の、CD19⁺に対してゲーティングされ、かつckit⁺およびCD43⁺について染色された、骨髄のコンタープロットを示している。下のパネルのコンタープロットでは、プロB細胞（pro B cell）およびプレB細胞（pre B cell）が表示されている。

10

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

20

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

【図10D】図10Dは、野生型マウス（WT）ならびにヒトV κ -J κ ゲノム配列を含む40個のhV λ および4個のJ λ 遺伝子セグメントについてホモ接合のマウス（40hV λ -V κ J κ -4hJ λ ）の大腿骨から単離された骨髄中の未熟B細胞（B220^{int}IgM⁺）および成熟B細胞（B220^{hi}IgM⁺）の総数を示している。

30

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

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

40

【図12】図12は、内在性マウス κ 軽鎖遺伝子座に、連続するヒトV κ -J κ ゲノム配列を含むヒト λ 軽鎖遺伝子配列を有するマウスの脾細胞RNAから増幅された12個の独立したRT-PCRクロンのV λ -J λ -C κ ジャンクションのヌクレオチド配列アラインメントを示している。5-2=配列番号87；2-5=配列番号88；1-3=配列

50

番号 89 ; 4B-1 = 配列番号 90 ; 3B-5 = 配列番号 91 ; 7A-1 = 配列番号 92 ; 5-1 = 配列番号 93 ; 4A-1 = 配列番号 94 ; 11A-1 = 配列番号 95 ; 5-7 = 配列番号 96 ; 5-4 = 配列番号 97 ; 2-3 = 配列番号 98 。小文字の塩基は、組換え中の変異および／またはN付加に起因する非生殖細胞系列の塩基を示している。ヒトJλ およびマウスCκ の各々のヌクレオチド配列によってコードされるフレームワーク4領域 (FWR4) 内のコンセンサスアミノ酸が、配列アラインメントの下に表示されている。

【図13】図13は、内在性マウスλ軽鎖遺伝子座にヒトλ軽鎖遺伝子配列を有するマウスの脾細胞RNAから増幅された3個の独立したRT-PCRクロンのVλ-Jλ-Cλジャンクションのヌクレオチド配列アラインメントを示している。2D1 = 配列番号101 ; 2D9 = 配列番号102 ; 3E15 = 配列番号103。小文字の塩基は、組換え中の変異および／またはN付加に起因する非生殖細胞系列の塩基を示している。hJλ1 およびマウスCλ2 のヌクレオチド配列によってコードされるフレームワーク4領域 (FWR4) 内のコンセンサスアミノ酸が、配列アラインメントの下に表示されている。

【発明を実施するための形態】

【0148】

詳細な説明

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

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

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

【0152】

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

【0153】

「κ遺伝子座」は、野生型マウスにおいてκ可変 (V_κ)、κ連結 (J_κ) およびκ定常 (C_κ) 領域のDNA配列が見られる、染色体上の位置、例えば、マウス染色体上の位

10

20

30

40

50

置を含む。

【0154】

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

【0155】

用語「再配列されていない」は、 V 遺伝子セグメントおよび J 遺伝子セグメント（重鎖の場合、 D 遺伝子セグメントも同様）が、別々に維持されているが、 $V(D)J$ レポートリーのうちの単一の V 、(D)、 J を含む再配列された $V(D)J$ 遺伝子を形成するように連結されることが可能である、免疫グロブリン遺伝子座の状態を含む。

10

【0156】

ヒト λ 可変ドメインを発現するマウス

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

20

【0157】

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

30

【0158】

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

【0159】

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

40

50

【0160】

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

【0161】

マウス λ 軽鎖遺伝子座の公開されているマップによると、その遺伝子座は、およそ200 kb以内の2つのクラスターの遺伝子セグメントから本質的になる（図2）。その2つのクラスターは、独立した再配列が可能な V 、 J および C 遺伝子の2セットを含む： $V\lambda 2-J\lambda 2-C\lambda 2-J\lambda 4-C\lambda 4$ および $V\lambda 1-J\lambda 3-C\lambda 3-J\lambda 1-C\lambda 1$ 。 $V\lambda 2$ は、すべての $J\lambda$ 遺伝子セグメントと組み換わると見出されているが、 $V\lambda 1$ は、もっぱら $C\lambda 1$ と組み換わるとみられる。 $C\lambda 4$ は、スプライス部位を欠損した偽遺伝子であると考えられている。

10

【0162】

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

【0163】

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

20

【0164】

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

30

【0165】

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

40

【0166】

免疫グロブリン κ または λ 軽鎖遺伝子座に再配列されていない $V\lambda$ 遺伝子セグメントを

50

含む遺伝的に改変されたマウスが記載される。C κ および／またはC λ 領域に融合されたヒトV λ ドメインを有する軽鎖を含む抗体を発現するマウスが記載される。

【0167】

免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座の無効の (sterile) 転写物

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

10

【0168】

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

20

【0169】

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

【0170】

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

30

【0171】

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

40

【0172】

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

50

列を含む内在性 κ 軽鎖遺伝子座から抗体を産生する。

【0173】

ヒトV λ ドメインを発現するようにマウスを操作するアプローチ

内在性C λ （例えば、C κ またはC λ ）領域に融合されたヒトV λ ドメインを有する軽鎖を含む抗体を産生する遺伝的に改変されたマウスを作製する様々なアプローチが記載される。様々な実施形態において、片方または両方の内在性軽鎖遺伝子座の欠失を含む遺伝的改変が記載される。例えば、内在性抗体レパートリーからマウス λ 軽鎖を排除するために、第1のV λ -J λ -C λ 遺伝子クラスターの欠失、およびヒトV λ -J λ 遺伝子セグメントによる第2の遺伝子クラスターのV λ -J λ 遺伝子セグメントの全体的または部分的な置換が行われ得る。遺伝的に改変されたマウス胚、細胞、ならびにそのマウス、マウス胚および細胞を作製するための標的化構築物も提供される。

10

【0174】

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

20

【0175】

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

30

40

【0176】

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

50

、また、V κ ドメインを含むがV λ ドメインを含まない抗体レパートリーの作製にとって有用になる。

【0177】

内在性マウス λ 軽鎖遺伝子座において組み換えられるマウスC λ 遺伝子に接続されたhV λ を発現する遺伝的に改変されたマウスは、当該分野で公知の任意の方法によって作製され得る。ヒトV λ およびJ λ 遺伝子セグメントによる内在性マウスV λ 2-V λ 3-J λ 2遺伝子セグメントの置換の略図（一定の拡大比ではない）が図4Aに提供される。図示されるように、非機能的にされた内在性マウス λ 軽鎖遺伝子座は、組換え部位に隣接したネオマイシンカセットを含む標的化構築物（12/1- λ 標的化ベクター）によって置換される。V λ 2-V λ 3-J λ 2遺伝子セグメントは、12個のhV λ 遺伝子セグメントおよび単一のhJ λ 遺伝子セグメントを含むヒト λ 配列を含むゲノムフラグメントで置換される。

10

【0178】

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

【0179】

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

20

【0180】

ヒト λ 軽鎖遺伝子セグメントをマウス λ 遺伝子座に挿入する上記のアプローチは、C λ 2-J λ 4-C λ 4遺伝子セグメントの下流に位置づけられたエンハンサーを維持する（Enh2.4、EnhおよびEnh3.1と命名される、図4Aおよび図5A）。このアプローチによって、内在性マウス λ 軽鎖遺伝子座に単一の改変された対立遺伝子をもたらされる（図7A）。

30

【0181】

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

40

【0182】

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

【0183】

上で述べられた理由のために、マウスV κ およびJ κ 遺伝子セグメントの欠失では、相

50

対的に最小限の破壊が用いられる。欠失されるマウス V κ および J κ 遺伝子セグメントの略図（一定の拡大比ではない）が図 3 に提供される。2 個の正確に位置づけられた標的化ベクター（各々が部位特異的組換え部位を使用する）の間に位置するマウス配列のリコンビナーゼによって媒介される欠失を介して、内在性マウス V κ および J κ 遺伝子セグメントが欠失される。第 1 の標的化ベクター（J κ 標的化ベクター）は、マウス J κ 遺伝子セグメントを欠失させる第 1 の標的化事象において使用される。第 2 の標的化ベクター（V κ 標的化ベクター）は、最も遠位のマウス V κ 遺伝子セグメントの 5' に位置する配列を欠失させる、第 2 の逐次的な標的化事象において使用される。両方の標的化ベクターが、部位特異的組換え部位を含み、それにより、標的化が成功した後に、両方の選択カセットおよび介在するすべてのマウス κ 軽鎖配列の選択的欠失が可能になる。得られる欠失された遺伝子座は、内在性 κ 軽鎖を産生することができないという点において、機能的にサイレンシングされている。この改変された遺伝子座は、h V λ および J λ 遺伝子セグメントの挿入のために使用され、それにより、h V λ および J λ 遺伝子セグメントを含む内在性マウス κ 遺伝子座が作製され得る（ここで、改変された遺伝子座において組換えが生じると、その動物は、内在性マウス C κ 遺伝子セグメントに作動可能に接続された再配列された h V λ および J λ 遺伝子セグメントを含む λ 軽鎖を産生する）。ヒト λ 軽鎖配列を含む様々な標的化ベクターが、この欠失されたマウス κ 遺伝子座と組み合わせて使用されることにより、マウス C κ 領域と作動可能に接続されたヒト λ 遺伝子セグメントを含むハイブリッド軽鎖遺伝子座が作製され得る。

【0184】

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

【0185】

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

【0186】

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

【0187】

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

【0188】

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

【0189】

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

【0190】

様々な実施形態において、遺伝的に改変されたマウスは、内在性マウス λ 軽鎖遺伝子座のノックアウトを含む。1 つの実施形態において、その λ 軽鎖遺伝子座は、V λ 2 から J λ 2 に及ぶ領域および V λ 1 から C λ 1 に及ぶ領域を欠失させる戦略によってノックアウトされる（図 2）。内在性 λ 軽鎖遺伝子座が内在性 λ ドメインを発現する能力を

低下させるかまたは排除する任意のストラテジーが、本開示における実施形態との使用に適している。

【0191】

遺伝的に改変されたマウス由来のラムダドメイン抗体

マウス κ または λ 軽鎖遺伝子座にヒト λ 配列を含むマウスは、マウス C_L ($C\kappa$ または $C\lambda$) 領域に融合された $hV\lambda$ 領域を含む軽鎖を発現する。これらは、(a) 機能的にサイレンシングされた軽鎖遺伝子座 (例えば、内在性マウス κ または λ 軽鎖遺伝子座のノックアウト) を含むマウス; (b) 内在性マウス $C\lambda$ 遺伝子に作動可能に接続された hV および hJ 遺伝子セグメントを含む内在性マウス λ 軽鎖遺伝子座を含むマウス; (c) 内在性マウス $C\kappa$ 遺伝子に作動可能に接続された $hV\kappa$ および $hJ\kappa$ 遺伝子セグメントを含む内在性マウス κ 軽鎖遺伝子座を含むマウス; および (d) 一方の κ 対立遺伝子が $hV\kappa$ および $hJ\kappa$ を含み; 他方の κ 対立遺伝子が $hV\lambda$ および $hJ\lambda$ を含み; 一方の λ 対立遺伝子が $hV\lambda$ および $hJ\lambda$ を含み、一方の λ 対立遺伝子がサイレンシングされているかもしくはノックアウトされているか、または両方の λ 対立遺伝子が、 $hV\lambda$ および $hJ\lambda$ を含み; かつ各々が hV_H 、 hD_H および hJ_H を含む2個の重鎖対立遺伝子を含むマウスと都合よく交配される。

10

【0192】

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

20

【実施例】

【0193】

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

【0194】

実施例 I

30

マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の欠失

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

【0195】

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

40

【0196】

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

【0197】

50

V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4を含む遠位の内在性マウス λ 遺伝子クラスターを正確に欠失させるために、第2の標的化構築物を調製したが、ただ、その第2の標的化構築物は、V λ 2遺伝子セグメントの5'側の配列を含む5'マウス相同性アームおよび内在性C λ 2遺伝子セグメントに対して5'側の配列を含む3'マウス相同性アームを含んでいた(図2, 標的化ベクター2)。したがって、その第2の標的化構築物は、内在性マウス λ 遺伝子座にC λ 2-J λ 4-C λ 4をインタクトなままに残して、V λ 2-J λ 2を正確に欠失させた。不活性化された内在性 λ 遺伝子座(上に記載されたような)を含むES細胞を、当該分野で公知の核型分析およびスクリーニング法(例えば、Taqman(登録商標))によって確かめた。次いで、その改変されたES細胞からDNAを単離し、Creリコンビナーゼによる処理に供することによって、ネオマイシンマーカ遺伝子を含む近位の標的化カセットの欠失が媒介され、それにより、ただ1つのloxP部位だけが欠失に残った(図2, 下)。

10

【0198】

マウス κ 軽鎖遺伝子座の欠失。上に記載された方法と同様の方法を用いていくつかの標的化構築物を作製して、相同組換えによってマウスBACクローンRP23-302g12およびRP23-254m04(Invitrogen)からのDNAを改変することにより、2工程プロセスでマウス κ 軽鎖遺伝子座を不活性化した(図3)。

【0199】

簡潔には、ハイグロマイシン-チミジンキナーゼ(hyg-TK)カセットに対して3'に単一のloxP部位を含むhyg-TKカセットを含む標的化ベクターを用いて、内在性マウス κ 軽鎖遺伝子座のJ κ 遺伝子セグメント(1-5)を単一の標的化事象において欠失させた(図3, J κ 標的化ベクター)。この標的化ベクターを作製するために使用された相同性アームは、内在性マウスJ κ 遺伝子セグメントの5'側および3'側のマウスゲノム配列を含んだ。第2の標的化事象では、最も遠位の内在性マウスV κ 遺伝子セグメントに対して上流(5')のマウスゲノム配列の一部を欠失させるための第2の標的化ベクターを調製した(図3, V κ 標的化ベクター)。この標的化ベクターは、逆向きのlox511部位、loxP部位およびネオマイシンカセットを含んだ。この標的化ベクターを作製するために使用された相同性アームは、最も遠位のマウスV κ 遺伝子セグメントの上流のマウスゲノム配列を含んだ。それらの標的化ベクターを、ES細胞においてDNAを標的化するために逐次的な様式で(すなわち、J κ に次いでV κ を)使用した。二重標的化染色体(すなわち、両方の標的化ベクターで標的化された単一の内在性マウス κ 遺伝子座)を有するESを、当該分野で公知の核型分析およびスクリーニング法(例えば、Taqman(商標))によって確かめた。次いで、その改変されたES細胞からDNAを単離し、Creリコンビナーゼによる処理に供することによって、2つのlox部位が互いに対して逆向きで並置されつつ、内在性マウスV κ 遺伝子セグメントおよび両方の選択カセットの欠失が媒介された(図3, 下; 配列番号1)。

20

30

【0200】

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

40

【0201】

実施例II

ヒト λ 軽鎖ミニ遺伝子座によるマウス軽鎖遺伝子座の置換

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

【0202】

50

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

【0203】

最初の標的化ベクターの第1のセットについては、12個のh V λ遺伝子セグメントおよびh J λ 1遺伝子セグメントを含む7 2 9 g 4 B A Cクローンからの1 2 4, 1 2 5 b pのDNAフラグメントを、3'マウス相同性アームのライゲーション用にh J λ 1遺伝子セグメントの9 9 6 b p下流(3')にP I-S c e I部位を含むように作出した。2個の異なるセットの相同性アームを、このヒトフラグメントへのライゲーションに使用した；一方のセットの相同性アームは、1 3 5 k 1 5 B A Cクローンからの内在性マウスλ配列を含み(図4 A)、もう一方のセットは、それぞれマウスB A CクローンR P 2 3-3 0 2 g 1 2およびR P 2 3-2 5 4 m 0 4のマウスV κおよびJ κ遺伝子セグメントの5'側および3'側の内在性κ配列を含んだ(図4 B)。

【0204】

12/1-λ標的化ベクターの場合(図4 A)、実施例1に記載された改変されたマウスλ遺伝子座のマウスC λ 2-J λ 4-C λ 4およびエンハンサー2. 4を含む2 7, 8 4 7 b pのDNAフラグメントの5'末端にP I-S c e I部位を作出した。その約2 8 k bのマウスフラグメントを、約1 2 4 k bのヒトλフラグメントへのライゲーションによって3'相同性アームとして使用することにより、5'から3'に向かって、h J λ 1遺伝子セグメント、そのh J λ 1遺伝子セグメントの3'側の9 9 6 b pのヒトλ配列、マウスC λ 2遺伝子に対して5'側の1 2 2 9 b pのマウスλ配列、マウスC λ 2遺伝子、およびその約2 8 k bのマウスフラグメントの残りの部分を含む3'ジャンクションが作製された。ヒトV λ 3-1 2遺伝子セグメントの上流(5')には、内在性マウスλ遺伝子座の5'側の配列に対応する2 3, 7 9 2 b pのマウスゲノムDNAを含む5'マウス相同性アームの開始部(s t a r t)より前に、追加の1 4 5 6 b pのヒトλ配列が存在した。5'相同性アームとそのヒトλ配列の始まりとの間に、F r t部位に隣接したネオマイシンカセットが存在した。

【0205】

したがって、12/1-λ標的化ベクターは、5'から3'に向かって、内在性λ遺伝子座の5'側の約2 4 k bのマウスλゲノム配列を含む5'相同性アーム、5'F r t部位、ネオマイシンカセット、3'F r t部位、初めの12個の連続したh V λ遺伝子セグメントおよびh J λ 1遺伝子セグメントを含む約1 2 3 k bのヒトゲノムλ配列、P I-S c e I部位、ならびに内在性C λ 2-J λ 4-C λ 4遺伝子セグメント、マウスエンハンサー2. 4配列およびそのエンハンサー2. 4の下流(3')の追加のマウスゲノム配列を含む約2 8 k bのマウスゲノム配列を含む3'相同性アームを含んだ(図4 A)。

【0206】

同様の様式において、12/1-κ標的化ベクター(図4 B)は、内在性κ遺伝子座に対する標的化が相同組換えによって達成され得るようにマウスκ配列を含むマウス相同性アームを使用したことを除いて、同じ約1 2 4ヒトλフラグメントを使用した。したがって、12/1-κ標的化ベクターは、5'から3'に向かって、内在性κ遺伝子座の5'側の約2 3 k bのマウスゲノム配列を含む5'相同性アーム、I-C e u I部位、5'F r t部位、ネオマイシンカセット、3'F r t部位、初めの12個の連続したh V λ遺伝子セグメントおよびh J λ 1遺伝子セグメントを含む約1 2 4 k bのヒトゲノムλ配列、P I-S c e I部位、ならびに内在性マウスC κ遺伝子、E κ iおよびE κ 3'ならびにそのE κ 3'の下流(3')の追加のマウスゲノム配列を含む約2 8 k bのマウスゲノム配列を含む3'相同性アームを含んだ(図4 B, 12/1-κ標的化ベクター)。

【0207】

これらの2つの最初の標的化ベクターのいずれかによる相同組換えによって、内在性マウス軽鎖定常遺伝子およびエンハンサー（ $C\kappa$ または $C\lambda 2$ および $E\kappa i / E\kappa 3'$ または $Enh2.4 / Enh3.1$ ）遺伝子に作動可能に接続された12個の $hV\lambda$ 遺伝子セグメントおよび $hJ\lambda 1$ 遺伝子セグメントを含む改変されたマウス軽鎖遺伝子座（ κ または λ ）が作製された（それは、組換えが生じると、キメラ λ 軽鎖の形成をもたらす）。

【0208】

12個のヒト $V\lambda$ 遺伝子セグメントおよび4個のヒト $J\lambda$ 遺伝子セグメントを有するヒト λ ミニ遺伝子座。キメラ λ 軽鎖遺伝子座に多様性を付加する別のアプローチでは、クラスターA由来の初めの12個の連続したヒト $V\lambda$ 遺伝子セグメントならびに $hJ\lambda 1$ 、2、3および7遺伝子セグメントをマウス κ 軽鎖遺伝子座に挿入するために、第3の最初の標的化ベクターを作出した（図4B、12/4- κ 標的化ベクター）。各 $J\lambda$ 遺伝子セグメントならびに各 $J\lambda$ 遺伝子セグメントのすぐ隣りの5'領域と3'領域の両方からの約100bpのヒトゲノム配列を含む、 $hJ\lambda 1$ 、 $J\lambda 2$ 、 $J\lambda 3$ および $J\lambda 7$ 遺伝子セグメントを含むDNAセグメントをデノボDNA合成（Integrated DNA Technologies）によって作製した。PI-SceI部位を、この約1kbのDNAフラグメントの3'末端に作出し、クロラムフェニコール（chloramphenicol）カセットにライゲートした。ヒトBACクロン729g4の $hJ\lambda 1$ 遺伝子セグメントに対して5'位および3'位におけるヒト λ 配列から相同性アームをPCR増幅した。この中間体標的化ベクターによる相同組換えを、5'Frt部位に対して5'側にI-CeuI部位も含むFrt部位に隣接したネオマイシンカセットでヒト $V\lambda 3-12$ 遺伝子セグメントの上流（5'）に対して事前に標的化された、改変された729g4 BACクロンにおいて行った。その二重標的化された729g4 BACクロンは、5'から3'に向かって、I-CeuI部位、5'Frt部位、ネオマイシンカセット、3'Frt部位、初めの12個の $hV\lambda$ 遺伝子セグメントを含む約123kbのフラグメント、ヒト $J\lambda 1$ 、2、3および7遺伝子セグメントを含む約1kbのフラグメント、PI-SceI部位ならびにクロラムフェニコールカセットを含んだ。この中間体標的化ベクターを、I-CeuIとPI-SceIとで同時に消化し、続いて、改変されたマウスBACクロン（上に記載されたもの）にライゲートすることにより、第3の標的化ベクターを作製した。

【0209】

このライゲーションによって、ヒト λ 配列を内在性 κ 軽鎖遺伝子座に挿入するための第3の標的化ベクターがもたらされ、それは、5'から3'に向かって、内在性マウス κ 遺伝子座の5'側の約23kbのゲノム配列を含む5'マウス相同性アーム、I-CeuI部位、5'Frt部位、ネオマイシンカセット、3'Frt部位、初めの12個の $hV\lambda$ 遺伝子セグメントを含む約123kbのフラグメント、 $hJ\lambda 1$ 、2、3および7遺伝子セグメントを含む約1kbのフラグメント、PI-SceI部位、ならびに内在性マウス $C\kappa$ 遺伝子、 $E\kappa i$ および $E\kappa 3'$ ならびにその $E\kappa 3'$ の下流の（3'）の追加のマウスゲノム配列を含む約28kbのマウスゲノム配列を含む3'相同性アームを含んだ（図4B、12/4- κ 標的化ベクター）。この第3の標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウス $C\kappa$ 遺伝子に作動可能に接続された、12個の $hV\lambda$ 遺伝子セグメントおよび4個の $hJ\lambda$ 遺伝子セグメントを含む改変されたマウス κ 軽鎖遺伝子座が作製された（それらは、組換えが生じると、キメラヒト λ /マウス κ 軽鎖の形成をもたらす）。

【0210】

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

天然に位置する約 23 kb のヒト κ ゲノム配列を含むように構築された。このヒト κ ゲノム配列を、これらの 2 つの追加の標的化ベクターにおいてヒト V λ 遺伝子セグメントとヒト J λ 遺伝子セグメントとの間に特異的に位置づけた (図 4 B, 12 (κ) 1- κ および 12 (κ) 4- κ 標的化ベクター)。

【0211】

上記ヒト κ ゲノム配列を含む両方の標的化ベクターを、上に記載された改変された R P 11-729 g 4 B A C クローンを用いて作製した (図 6)。この改変された B A C クローンを、N o t I および A s i S I 制限酵素認識部位に隣接したスペクチノマイシン選択カセットで標的化した (図 6, 左上)。スペクチノマイシンカセットによる相同組換えによって、二重標的化された 729 g 4 B A C クローンがもたらされ、それは、5' から 3' に向かって、I-C e u I 部位、5' F r t 部位、ネオマイシンカセット、3' F r t 部位、初めの 12 個の h V λ 遺伝子セグメントを含む約 123 kb のフラグメント、h V λ 3-1 遺伝子セグメントの九量体配列の約 200 b p 下流 (3') の N o t I 部位、スペクチノマイシンカセットおよび A s i S I 部位を含んだ。二重標的化された改変された 729 g 4 B A C クローンに含まれる h V λ 遺伝子セグメントとのライゲーション用の約 23 kb のフラグメントのその後のクローニングを可能にするために h V κ 4-1 遺伝子セグメントと h J κ 1 遺伝子セグメントとの間の位置に制限酵素認識部位を作出するために、ヒト κ 配列を含む別個のヒト B A C クローン (C T D-2366 j 12) を独立して 2 回標的化した (図 6, 右上)。

【0212】

簡潔には、2366 j 12 B A C クローンは、約 132 kb のサイズであり、h V κ 遺伝子セグメント 1-6、1-5、2-4、7-3、5-2、4-1、それらの V κ 遺伝子セグメントの下流のヒト κ ゲノム配列、h J κ 遺伝子セグメント 1-5、h C κ 、およびヒト κ 遺伝子座の約 20 kb の追加のゲノム配列を含む。まず、このクローンを、F r t 部位に隣接したハイグロマイシンカセットおよび 3' F r t 部位の下流 (3') に N o t I 部位を含む標的化ベクターで標的化した。この標的化ベクターに対する相同性アームは、その B A C クローン内の V κ 遺伝子セグメントの 5' 側および 3' 側のヒトゲノム配列を含んだ (それにより、この標的化ベクターによる相同組換えが生じると、V κ 遺伝子セグメントは欠失し、h V κ 4-1 遺伝子セグメントの約 133 b p 下流に N o t I 部位が作出された) (図 6, 右上)。この改変された 2366 j 12 B A C クローンを、3' 末端において 2 つの標的化ベクターで独立して標的化し、クロラムフェニコールカセットで h J κ 遺伝子セグメントを欠失させた (このクロラムフェニコールカセットは、h J λ 1 遺伝子セグメント、P I-S c e I 部位および A s i S I 部位、または 4 個の h J λ 遺伝子セグメントを含むヒト λ ゲノムフラグメント (前出)、P I-S c e I 部位および A s i S I 部位のいずれかも含む) (図 6, 右上)。これらの 2 個の類似の標的化ベクターに対する相同性アームは、h J κ 遺伝子セグメントの 5' 側および 3' 側の配列を含んだ。これらの第 2 の標的化ベクターおよび改変された 2366 j 12 B A C クローンによる相同組換えによって二重標的化された 2366 j 12 クローンが得られ、それは、5' から 3' に向かって、5' F r t 部位、ハイグロマイシンカセット、3' F r t 部位、N o t I 部位、V κ 4-1 遺伝子セグメントと J κ 1 遺伝子セグメントとの間の遺伝子間領域を含むヒト κ 遺伝子座の 22, 800 b p のゲノムフラグメント、h J λ 1 遺伝子セグメントまたは h J λ 1、J λ 2、J λ 3 および J λ 7 を含むヒト λ ゲノムフラグメントのいずれか、P I-S c e I 部位ならびにクロラムフェニコールカセットを含んだ (図 6, 右上)。二重標的化された 729 g 4 および 2366 j 12 クローンを用いた 2 つのライゲーション工程によって、2 つの追加の改変を行うための 2 つの最終的な標的化ベクターが得られた。

【0213】

二重標的化された 729 g 4 および 2366 j 12 クローンを N o t I および A s i S I で消化したところ、それぞれ、ネオマイシンカセットおよび h V λ 遺伝子セグメントを含む 1 つのフラグメント、ならびに V κ 4-1 遺伝子セグメントと J κ 1 遺伝子セグメン

トとの間の遺伝子間領域を含むヒト κ 遺伝子座の約23 kbのゲノムフラグメント、hJ λ 1遺伝子セグメントまたはhJ λ 1、J λ 2、J λ 3およびJ λ 7遺伝子セグメントを含むゲノムフラグメントのいずれか、P I - S c e I 部位ならびにクロラムフェニコールカセットを含む別のフラグメントを得た。これらのフラグメントのライゲーションによって2つの独特のBACクローンが生成され、それらは、5'から3'に向かって、hV λ 遺伝子セグメント、V κ 4-1遺伝子セグメントとJ κ 1遺伝子セグメントとの間のヒト κ ゲノム配列、hJ λ 1遺伝子セグメントまたはhJ λ 1、J λ 2、J λ 3およびJ λ 7遺伝子セグメントを含むゲノムフラグメントのいずれか、P I - S c e I 部位ならびにクロラムフェニコールカセットを含んだ(図6, 下)。次いで、これらの新しいBACクローンをI - C e u I およびP I - S c e I で消化することにより、上流のネオマイシンカセットおよび連続するヒト λ および κ 配列を含む独特のフラグメントが放出され、それらを、5'から3'に向かって、内在性 κ 遺伝子座の5'側のマウスゲノム配列、I - C e u I 部位、5' F r t 部位、ネオマイシンカセット、3' F r t 部位、hV λ 遺伝子セグメント(3-12から3-1)、V λ 3-1の約200 bp下流のN o t I 部位、ヒトV κ 4-1遺伝子セグメントとJ κ 1遺伝子セグメントとの間に天然に見られる約23 kbのヒト κ 配列、hJ λ 1遺伝子セグメントまたはhJ λ 1、J λ 2、J λ 3およびJ λ 7遺伝子セグメントを含むゲノムフラグメントのいずれか、マウスE κ i、マウスC κ 遺伝子およびE κ 3'を含む改変されたマウスBACクローン302 g 12にライゲートした(図4, 12 hV λ -V κ J κ -hJ λ 1および12 hV λ -V κ J κ -4 hJ λ 標的化ベクター)。これらの両方の標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウスC κ 遺伝子に作動可能に接続された、12個のhV λ 遺伝子セグメント、ヒト κ ゲノム配列および1個または4個のhJ λ 遺伝子セグメントを含む2つの別個の改変されたマウス κ 軽鎖遺伝子座が作製された(それらは、組換えが生じると、キメラヒト λ /マウス κ 軽鎖の形成をもたらす)。

【0214】

実施例 I I I

ヒト λ 軽鎖ミニ遺伝子座への追加のヒトV λ 遺伝子セグメントの操作

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

【0215】

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

【0216】

簡潔には、16個の追加のhV λ 遺伝子セグメントを、実施例2に記載された改変されたマウス軽鎖遺伝子座に導入するための2つの標的化ベクターを作出した(図5Aおよび5B, +16- λ または+16- κ 標的化ベクター)。クラスターA由来の21個の連続したhV λ 遺伝子セグメントを含むヒトBACクローンR P 1 1 - 7 6 1 1 1 3 (I n v i t r o g e n) 由来の約172 kbのDNAフラグメントを、内在性 κ または λ 軽鎖遺伝子座に対して5'側のマウスゲノム配列を含む5'相同性アームおよびヒトゲノム λ 配列を含む3'相同性アームを用いて作出した。これらの標的化構築物において使用された5'マウス κ または λ 相同性アームは、実施例2に記載されたものと同じ5'相同性アームだった(図5Aおよび5B)。3'相同性アームは、実施例2に記載されたヒトゲノム λ 配列の約123 kbのフラグメントの等価な5'末端に対応するヒトゲノム λ 配列の53, 057 bpの重複を含んだ。これらの2つの標的化ベクターは、5'から3'に向かって、内在性マウス κ 軽鎖遺伝子座の5'側の約23 kbのゲノム配列または内在性 λ 軽

10

20

30

40

50

鎖遺伝子座の5'側の約24 kbのマウスゲノム配列を含む5'マウス相同性アーム、5' F r t 部位、ハイグロマイシンカセット、3' F r t 部位、および21個の連続したh V λ 遺伝子セグメントを含む171, 457 bpのヒトゲノムλ配列（そのうちの約53 kbは、実施例3に記載されたヒトλ配列の5'末端と重複し、この標的化構築物に対する3'相同性アームとして働く）を含んだ（図5 Aおよび5 B, +16-λまたは+16-κ 標的化ベクター）。これらの標的化ベクターによる相同組換えによって、独立して改変されたマウスκおよびλ 軽鎖遺伝子座（各々が、内在性マウス定常遺伝子（CκまたはCλ2）に作動可能に接続された28個のh V λ 遺伝子セグメントおよびh J λ 1 遺伝子セグメントを含む）が作製された（それらは、組換えが生じると、キメラ軽鎖の形成をもたらす）。

10

【0217】

同様の様式において、+16-κ 標的化ベクターを使用することによっても、組み込まれたヒトκ 配列ありおよびなしで複数のh J λ 遺伝子セグメントを組み込む実施例2に記載されたその他の最初の改変物（図4 B）に、16個の追加のh V λ 遺伝子セグメントを導入した。その他の最初の改変物を含む内在性マウスκ 遺伝子座におけるこの標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウスCκ 遺伝子に作動可能に接続されたヒトVκ-Jκゲノム配列ありおよびなしで28個のh V λ 遺伝子セグメントならびにh J λ 1、2、3および7 遺伝子セグメントを含むマウスκ 軽鎖遺伝子座が作製された（それらは、組換えが生じると、キメラλ-κ 軽鎖の形成をもたらす）。

【0218】

20

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

【0219】

簡潔には、上に記載された改変されたマウスκおよびλ 軽鎖遺伝子座に12個の追加のh V λ 遺伝子セグメントを導入するために、標的化ベクターを作出した（図5 Aおよび5 B, +12-λまたは12-κ 標的化ベクター）。クラスターB由来の12個の連続したh V λ 遺伝子セグメントを含むヒトBACクローンRP11-22118 (Invitrogen) 由来の93, 674 bpのDNAフラグメントを、内在性マウスκまたはλ 軽鎖遺伝子座に対して5'側のマウスゲノム配列を含む5'相同性アームおよびヒトゲノムλ配列を含む3'相同性アームを用いて操作した。この標的化構築物において使用された5'相同性アームは、上に記載された16個のh V λ 遺伝子セグメントの付加に使用されたものと同じ5'相同性アームだった（図5 Aおよび5 B）。BACクローンRP11-761113由来のヒトλ配列の27, 468 bpのゲノムフラグメントに含まれるヒトVλ3-29P 遺伝子セグメントに対して約3431 bpだけ5'側にP I -S c e I 部位を作出することによって、3'相同性アームを作製した。このP I -S c e I 部位は、+16-λまたは+16-κ 標的化ベクター（図5 Aおよび5 B）を用いて、追加のヒトλ配列の約94 kbのフラグメントと、先の改変におけるヒトλ配列の5'末端と重複するヒトλ配列の約27 kbのフラグメントとを連結するライゲーション点として働いた。これらの2つの標的化ベクターは、5'から3'に向かって、内在性κ 軽鎖遺伝子座の5'側の約23 kbのマウスゲノム配列または内在性λ 軽鎖遺伝子座の5'側の約24 kbのマウスゲノム配列を含む5'相同性アーム、5' F r t 部位、ネオマイシンカセット、3' F r t 部位、ならびに16個のh V λ 遺伝子セグメントおよびP I -S c e I 部位を含む121, 188 bpのヒトゲノムλ配列（そのうちの約27 kbは、16個の追加のh V λ 遺伝子セグメントの挿入からのヒトλ配列の5'末端と重複し、この標的化構築物に対する3'相同性アームとして働く）を含んだ（図5 Aおよび5 B, +12-λまたは12-κ 標的化ベクター）。これらの標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウス定常遺伝子（CκまたはCλ2）に作動可能に接続された40個のh V λ 遺伝子セグメントおよびヒトJλ1を含む改変されたマウスκおよびλ 軽鎖遺伝子座が独立して作

30

40

50

製された（それらは、組換えが生じると、キメラ軽鎖の形成をもたらす）（図 5 A および 5 B の下部）。

【0220】

同様の様式において、+12- κ 標的化ベクターを使用することによっても、組み込まれたヒト κ 配列ありおよびなしで複数の hJ λ 遺伝子セグメントを組み込むその他の最初の改変物（図 4 B）に、12 個の追加の hV λ 遺伝子セグメントを導入した。その他の改変物を含む内在性マウス κ 遺伝子座におけるこの標的化ベクターによる相同組換えによって、内在性マウス C κ 遺伝子に作動可能に接続されたヒト V κ -J κ ゲノム配列ありおよびなしで 40 個の hV λ 遺伝子セグメントならびに hJ λ 1、2、3 および 7 遺伝子セグメントを含むマウス κ 軽鎖遺伝子座が作製された（それらは、組換えが生じると、キメラ λ - κ 軽鎖の形成をもたらす）。

10

【0221】

実施例 I V

ヒト λ 軽鎖遺伝子セグメントを有する標的化された E S 細胞の同定

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

20

【0222】

ヒト V λ 5-52-V λ 1-40 遺伝子セグメントを含む標的化構築物の挿入によって導入された F r t で挟まれたネオマイシンカセットを除去するために、ヒト λ 軽鎖遺伝子セグメントを有する E S 細胞は必要に応じて、F L P を発現する構築物でトランスフェクトされる（図 5 A および 5 B）。そのネオマイシンカセットは必要に応じて、F L P リコンビナーゼを発現するマウス（例えば、米国特許第 6, 774, 279 号）と交配させることによって除去され得る。そのネオマイシンカセットは、必要に応じて、それらのマウスに保持される。

30

【0223】

【表 1】

表1

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

【 0 2 2 4 】

10

20

30

40

【表 2 - 1】

表2

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

【 0 2 2 5 】

【表 2 - 2】

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

実施例 V

内在性軽鎖遺伝子座からヒトλ軽鎖を発現するマウスの作製

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

【0226】

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

【0227】

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

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

【0228】

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

10

【0229】

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

【0230】

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

20

【0231】

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

30

【0232】

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

40

【0233】

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

50

）およびλ軽鎖（CD19⁺Igκ⁻Igλ⁺）発現についての平均パーセント値を示している。表5は、野生型ならびにマウスCκ遺伝子に作動可能に接続されたヒトVκ-Jκゲノム配列を含む40個のhVλ遺伝子セグメントおよび4個のhJλ遺伝子セグメントについてホモ接合のマウスの骨髄において観察されたB細胞（CD19⁺）、成熟B細胞（B220^hiIgM⁺）、未熟B細胞（B220ⁱn^tIgM⁺）、κ軽鎖を発現する未熟B細胞（B220ⁱn^tIgM⁺Igκ⁺）およびλ軽鎖を発現する未熟B細胞（B220ⁱn^tIgM⁺Igλ⁺）についての平均パーセント値を示している。この実験は、上に記載された追加のマウス群を用いて繰り返され、同様の結果を示した（データ示さず）。

【0234】

【表3】

表3

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

【0235】

【表4】

表4

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

【0236】

【表5】

表5

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

ヒトλ軽鎖遺伝子セグメントを有するマウスにおけるヒトVλ遺伝子の使用頻度。ヒトλ配列の第1の挿入（hVλ3-12-hVλ3-1およびhJλ1，図5B）についてヘテロ接合のマウスおよびヒトλ配列の第3の挿入（hVλ5-52-hVλ3-1およびhJλ1，図5B）についてホモ接合のマウスを、脾細胞から単離されたRNAを用いた逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によってヒトλ軽鎖遺伝子の使用頻

10

20

30

40

50

度について解析した。

【0237】

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

10

【0238】

ヒトhVλ遺伝子セグメントおよびマウスCκ遺伝子に特異的なプライマー(表6)を用いて、脾細胞RNAにおいてRT-PCRを行った。PCR産物をゲル精製し、pCR2.1-TOPO TAベクター (Invitrogen)にクローニングし、そのベクター内のクローニング部位に隣接する位置に位置するプライマーM13Forward (GTAAACGACGGCCAG; 配列番号55)およびM13Reverse (CAGGAACAGCTATGAC; 配列番号56)を用いて配列決定した。ヒトλ配列の第1および第3の挿入に由来する合計84個のクローンの配列決定を行うことにより、hVλ遺伝子の使用頻度を決定した(表7)。選択されたRT-PCRクローンについてのhVλ-hJλ1-mCκジャンクションのヌクレオチド配列を図11に示す。

20

【0239】

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

30

【0240】

同様の様式において、内在性マウスCλ2遺伝子に作動可能に接続されたヒトλ軽鎖遺伝子セグメント(12個のhVλ遺伝子セグメントおよびhJλ1, 図4Aおよび図5A)の第1の挿入についてホモ接合のマウスを、脾細胞から単離されたRNAを用いるRT-PCRによってヒトλ軽鎖遺伝子の使用頻度について解析した(上に記載されたように)。hVλ遺伝子セグメントに特異的なプライマー(表6)を、マウスCλ2遺伝子に特異的な2つのプライマー; Cλ2-1 (配列番号104)またはCλ2-2 (配列番号105)のうちの1つと対にした。

【0241】

hλ1に再配列された複数のhVλ遺伝子セグメントが、内在性マウスλ軽鎖遺伝子座にヒトλ軽鎖遺伝子セグメントを有するマウス由来のRT-PCRクローンから観察された。選択されたRT-PCRクローンについてのhVλ-hJλ-mCλ2ジャンクションのヌクレオチド配列を図13に示す。

40

【0242】

【表 6】

表 6

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

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

【 0 2 4 3 】

10

20

【表 7】

表 7

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

表 8

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

図 1 1 は、単一の h J λ 遺伝子セグメントとともに h V λ 遺伝子セグメントの第 1 および第 3 の挿入を有するマウス由来の R T - P C R クローンについての h V λ - h J λ 1 - m C κ ジャンクションの配列を示している。図 1 1 に示されている配列は、マウス C κ 遺伝子に組み換えられた h J λ 1 とともに種々の h V λ 遺伝子セグメントを含む独特の再配列を示している。1 2 個の h V λ 遺伝子セグメントおよび h J λ 1 を含む単一の改変された内在性 κ 遺伝子座を有するヘテロ接合マウスと、4 0 個の h V λ 遺伝子セグメントおよび h J λ 1 を含む 2 個の改変された内在性 κ 遺伝子座を有するホモ接合マウスの両方ともが、マウス C κ 遺伝子に作動可能に接続されたヒト λ 遺伝子セグメントを生成することができ、ヒト λ 軽鎖を発現する B 細胞を産生することができた。これらの再配列は、それらのキメラ遺伝子座が、これらのマウスの複数の独立した B 細胞においてヒト λ 遺伝子セグメントを独立して再配列することができたことを実証する。さらに、h J λ 1 とともに再配列すると観察された 1 6 個の異なる h V λ 遺伝子セグメントによって証明されるように（表 7）、内在性 κ 軽鎖遺伝子座に対するこれらの改変は、いずれの h V λ 遺伝子セグメ

10

20

30

40

50

ントも作動不能にせず、またB細胞発生中にキメラ遺伝子座が複数のhVλおよびhJλ (Jλ1) 遺伝子セグメントの組換えを妨げなかった。さらに、これらのマウスは、内在性免疫グロブリン軽鎖レパートリーの一部としてマウスCκ遺伝子に作動可能に接続された再配列されたヒトVλ-Jλ遺伝子セグメントを含む機能的な抗体を産生した。

【0244】

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

【0245】

図13は、12個のhVλ遺伝子セグメントおよびhJλ1についてホモ接合のマウス由来の3個の個別のRT-PCRクローンについてのhVλ-hJλ-mCλ2ジャンクションの配列を示している。図13に示されている配列は、第1の挿入の長さにわたって異なるhVλ遺伝子セグメントを含む追加の独特の再配列を示している（hJλ1は、再配列され、マウスCλ2遺伝子に作動可能に接続されている）（2D1=Vλ2-8Jλ1；2D9=Vλ3-10Jλ1；3E15=Vλ3-1Jλ1）。1つのクローンが、hVλ-hJλジャンクションにおけるNの付加に起因して、非産生性の再配列を示した（2D1, 図13）。これは、V(D)J組換えでは珍しいことではない。なぜなら、組換え中の遺伝子セグメントの連結は不正確であると示されているからである。このクローンは、これらのマウスの軽鎖レパートリーに存在する非産生性の組換え体を代表するが、これは、抗体遺伝子間のジャンクションの多様性に寄与する遺伝的メカニズムが、これらのマウスにおいて正常に作動しており、それにより、より高い多様性を有する軽鎖を含む抗体レパートリーがもたらされることを実証する。

【0246】

12個のhVλ遺伝子セグメントおよびhJλ1を含む改変された内在性λ遺伝子座を有するホモ接合マウスもまた、内在性マウスCλ遺伝子に作動可能に接続されたヒトλ遺伝子セグメントを生成することができ、マウスCλ領域に接続されたhVλ領域を含むリバースキメラλ軽鎖を発現するB細胞を産生することができた。これらの再配列はさらに、その他の軽鎖遺伝子座（すなわち、λ遺伝子座）に配置されたヒトλ軽鎖遺伝子セグメントが、これらのマウスの複数の独立したB細胞においてヒトλ遺伝子セグメントを独立して再配列することができたことを実証する。さらに、内在性λ軽鎖遺伝子座に対する改変は、ヒトλ遺伝子セグメントの挿入が、いずれのhVλ遺伝子セグメントおよび／またはhJλ1遺伝子セグメントも作動不能にせず、またB細胞発生中にキメラ遺伝子座がhVλおよびhJλ1遺伝子セグメントの組換えを妨げなかったことを実証する。さらに、これらのマウスもまた、内在性免疫グロブリン軽鎖レパートリーの一部としてマウスCλ

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

【0247】

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

10

【0248】

実施例 V I

内在性軽鎖遺伝子座からヒト λ 軽鎖を発現するマウスの交配

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

20

【0249】

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

30

40

【0250】

実施例 V I I

ヒト重鎖およびヒト λ 軽鎖を発現するマウスからの抗体の産生

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

【0251】

50

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

10

【0252】

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

20

（項目1） 生殖細胞系列において、内在性マウス軽鎖遺伝子座にヒトλ軽鎖可変領域配列を含むマウスであって、ここで、該ヒトラムダ可変領域配列は、マウス免疫グロブリン定常領域遺伝子配列を含む軽鎖において発現される、マウス。

（項目2） 上記内在性マウス軽鎖遺伝子座が、λ遺伝子座である、項目1に記載のマウス。

（項目3） 上記内在性マウス軽鎖遺伝子座が、κ遺伝子座である、項目1に記載のマウス。

（項目4） 上記マウスが、上記内在性マウス軽鎖遺伝子座において内在性軽鎖可変配列を欠く、項目1に記載のマウス。

30

（項目5） すべてまたは実質的にすべての内在性マウス軽鎖可変領域遺伝子セグメントが、1つ以上のヒトλ可変領域遺伝子セグメントで置換されている、項目1に記載のマウス。

（項目6） 上記ヒトλ軽鎖可変領域配列が、ヒトJ λ配列を含む、項目1に記載のマウス。

（項目7） 上記ヒトJ λ配列が、J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 7およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目6に記載のマウス。

（項目8） 上記ヒトλ軽鎖可変領域配列が、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスターAのフラグメントを含む、項目1に記載のマウス。

（項目9） 上記ヒトλ軽鎖遺伝子座のクラスターAのフラグメントが、h V λ 3-27からh V λ 3-1にわたる、項目8に記載のマウス。

40

（項目10） 上記ヒトλ軽鎖可変領域配列が、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスターBのフラグメントを含む、項目1に記載のマウス。

（項目11） 上記ヒトλ軽鎖遺伝子座のクラスターBのフラグメントが、h V λ 5-52からh V λ 1-40にわたる、項目10に記載のマウス。

（項目12） 上記ヒトλ軽鎖可変領域配列が、クラスターAのゲノムフラグメントおよびクラスターBのゲノムフラグメントを含む、項目1に記載のマウス。

（項目13） 上記ヒトλ軽鎖可変領域配列が、クラスターAの少なくとも1つの遺伝子セグメントおよびクラスターBの少なくとも1つの遺伝子セグメントを含む、項目12に記載のマウス。

50

(項目14) 上記マウスの軽鎖レパートリーの10%超が、2-8、2-23、1-40、5-45および9-49から選択される少なくとも2つのhVλ遺伝子セグメントに由来する、項目1に記載のマウス。

(項目15) 上記マウスの軽鎖レパートリーの20%超が、2-8、2-23、1-40、5-45および9-49から選択される少なくとも3つのhVλ遺伝子セグメントに由来する、項目14に記載のマウス。

(項目16) 上記マウスの軽鎖レパートリーの30%超が、2-8、2-23、1-40、5-45および9-49から選択される少なくとも4つのhVλ遺伝子セグメントに由来する、項目15に記載のマウス。

(項目17) マウス定常領域と融合されたヒトラムダ可変配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現するマウスであって、ここで、該マウスは、約1:1というκの使用頻度とλの使用頻度との比を示す、マウス。

(項目18) 上記免疫グロブリン軽鎖が、内在性マウス軽鎖遺伝子座から発現される、項目17に記載のマウス。

(項目19) 抗原結合タンパク質を作製するための、前述の項目のいずれか1項に記載されたマウスの使用。

(項目20) 上記抗原結合タンパク質がヒトの抗原結合タンパク質である、項目19に記載の使用。

(項目21) 項目1~18のいずれか1項に記載のマウスに由来する、細胞または組織。

10

20

【図1】

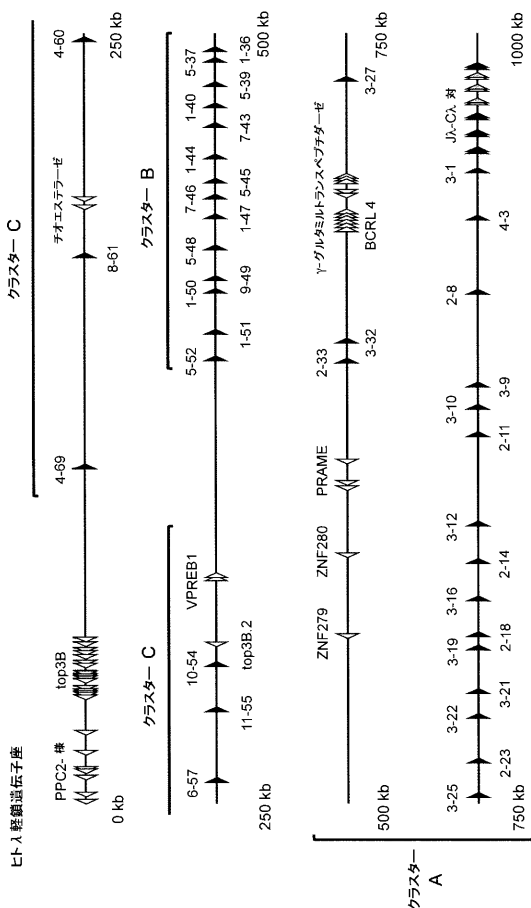


FIG. 1

【図2】

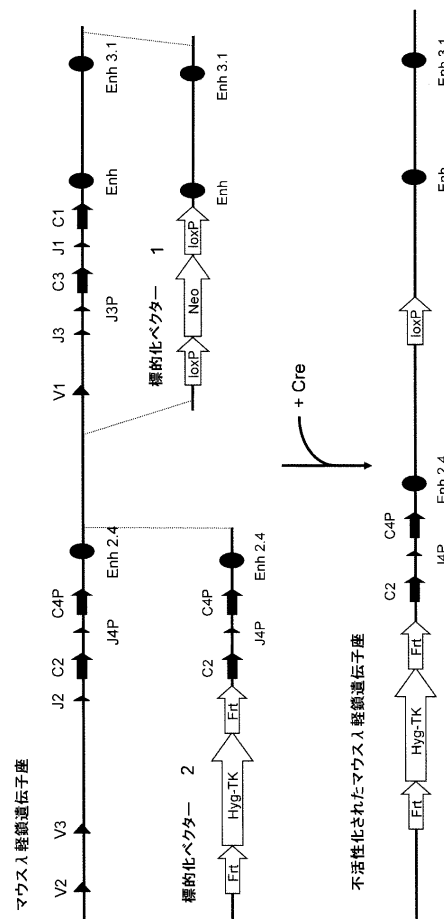
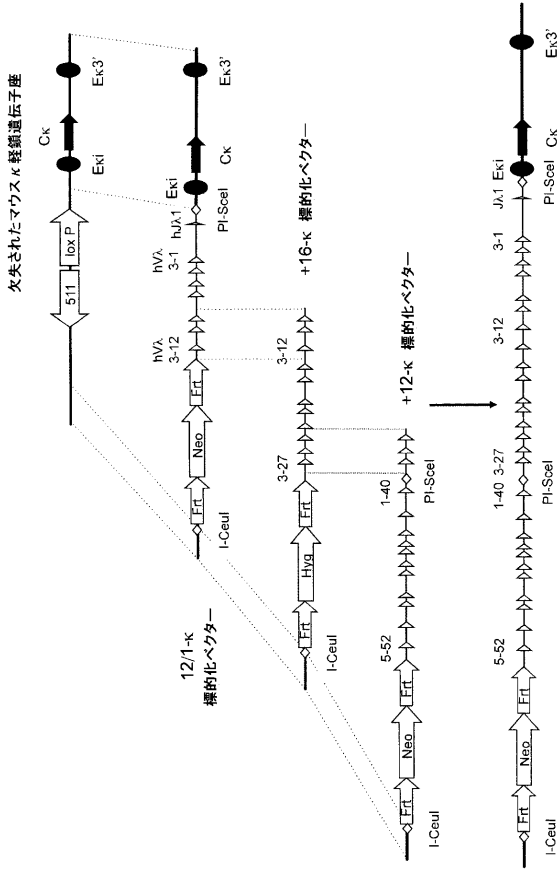


FIG. 2

【図 5 B】



【 図 6 】

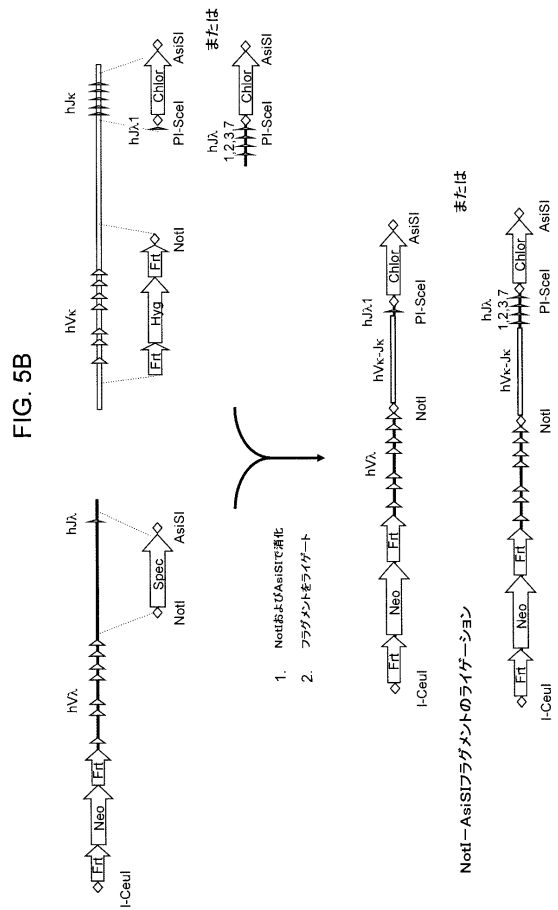


FIG. 6

【图 7 A】

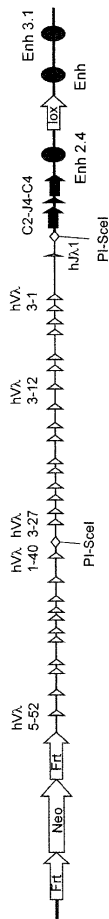


FIG. 7A

【 図 7 B 】

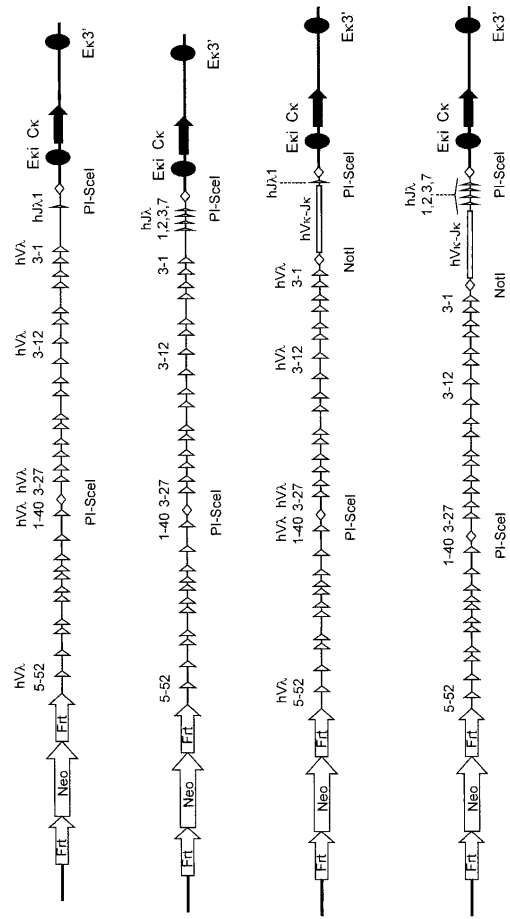


FIG. 7B

【図 8 A】

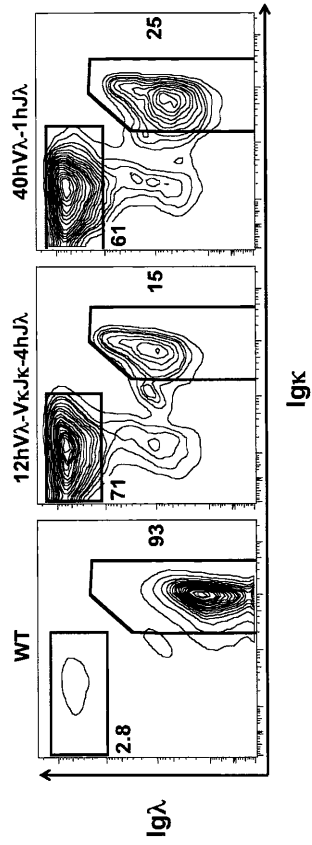


FIG. 8A

【図 8 B】

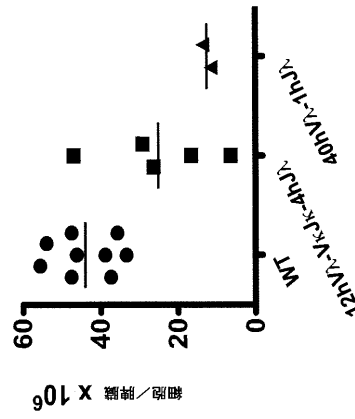


FIG. 8B

【図 9 A】

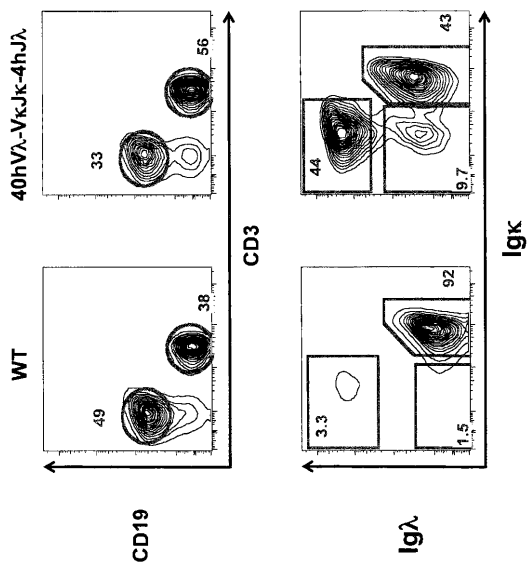


FIG. 9A

【図 9 B】

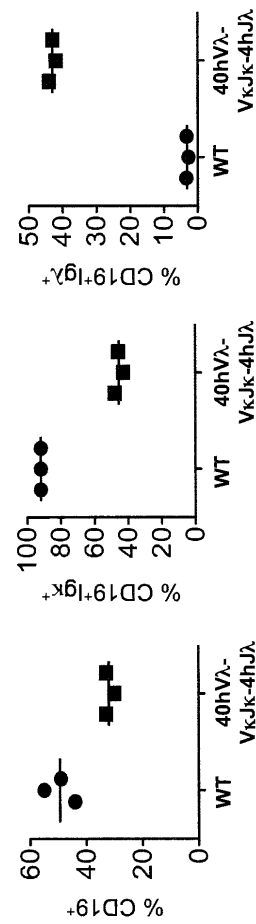


FIG. 9B

【図 9 C】

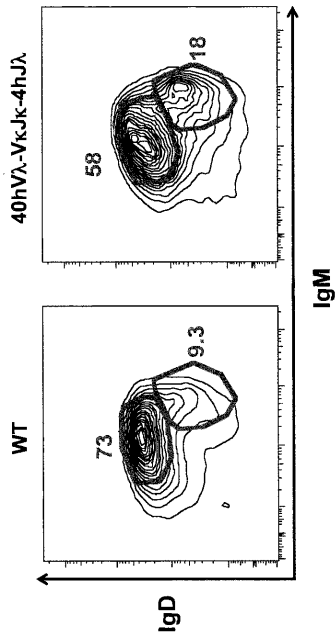


FIG. 9C

【図 9 D】

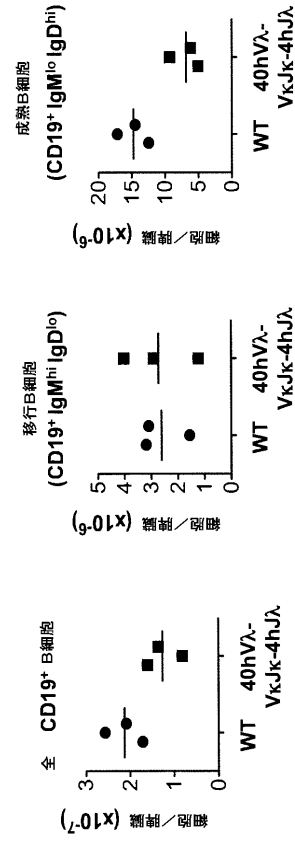


FIG. 9D

【図 10 A】

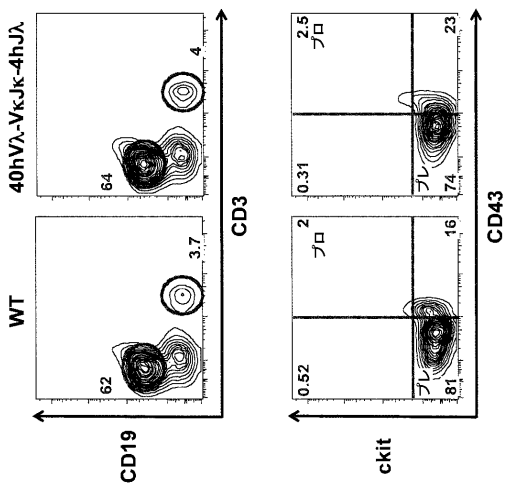


FIG. 10A

【図 10 B】

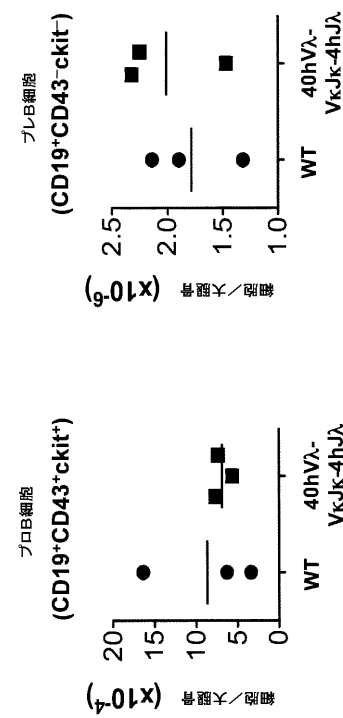


FIG. 10B

【図10C】

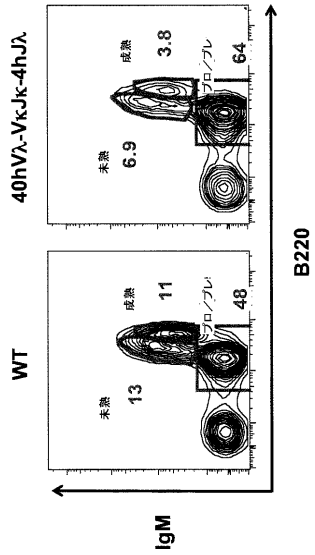


FIG. 10C

【図10D】

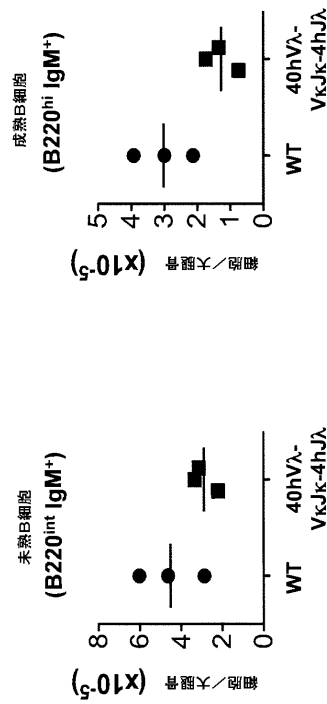


FIG. 10D

【図10E】

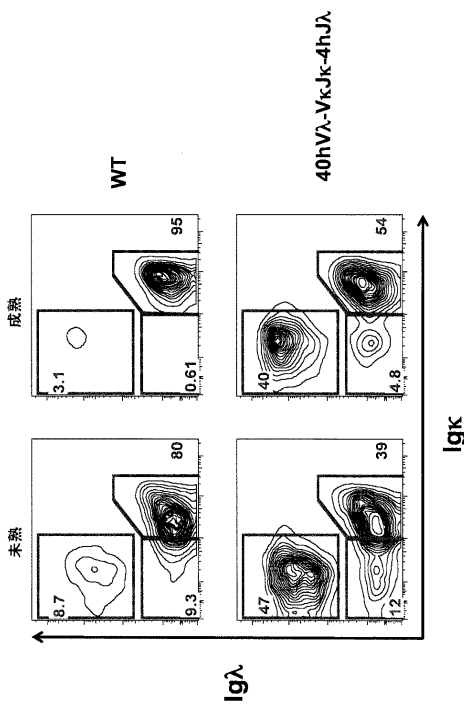


FIG. 10E

【図11】

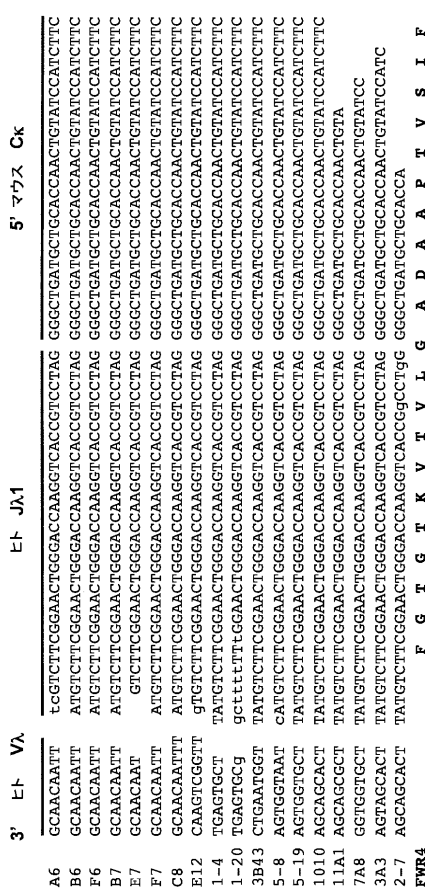


FIG. 11

【☒ 1 2】

	3' エト Vλ	エト Jλ	5' マウス Cκ
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTTCGGAGAGGACACCGGCTGACCGCGCTCG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGCTCG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGCTCG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGCTCG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGTAAAT	GCTGTGTTTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGCTCG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGTAAATCATAG	GGGTGTTTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGTTATTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTGCTC	GGGTGTTTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGTGCGa	GTATTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTGTGT	CTGTGTTTCGGAGAGGACCAAGCTGACCGCTCG	GGGCTGATGCTGTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

FIG. 12

【☒ 1 3】

	3' エト Vλ	エト Jλ1	5' マウス Cλ2
2D1	GCAGCAGCAACAATTTa	aGTC TTCGGAAC TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTACGCCCAAGTCGACTCCCACTCTC
2D9	GACAGCAGTGTAAATCAT	TATGTC TTCGGAAC TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTACGCCCAAGTCGACTCCCACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGGc	GTCTTCGGAAC TGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GTACGCCCAAGTCGACTCCCACTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

FIG. 13

【配列表】

2018201528000001.app

フロントページの続き

- | (51)Int.Cl. | F I | | テーマコード (参考) | |
|--------------------------|---------|--------|-------------|--|
| C 1 2 Q 1/6851 (2018.01) | C 1 2 Q | 1/6851 | Z | |
| C 1 2 Q 1/686 (2018.01) | C 1 2 Q | 1/686 | Z | |
| C 1 2 Q 1/6876 (2018.01) | C 1 2 Q | 1/6876 | Z | |
- (72)発明者 リン マクドナルド
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 6 0 5, ホワイト プレインズ, ゲッドニー ウェイ
1 6
- (72)発明者 ショーン スティーブンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 5 8, サンフランシスコ, ベリー ストリート 3
5 5, ナンバー 4 1 3
- (72)発明者 ケーガン グーラー
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 5, バルハラ, パメラ レーン 8
- (72)発明者 アンドリュー ジェイ. マーフィー
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 2 0, クロトニーオンーハドソン, ニュートン コー
ト 1 0
- (72)発明者 キャロライナ エー. ホシアワ
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1, タリータウン, チャーチ ストリート 1 4,
2 エヌディー フロア
- F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32
QR35 QR55 QR62 QS25 QS32 QX01 QX02
4B064 AG26 AG27 BJ12 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA87X AA87Y AA90X AA90Y AA91X AA93X AA93Y AB01 AB02 AB04
AC14 BA01 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50
FA74

【外国語明細書】
2018201528000001.pdf