

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5955781号  
(P5955781)

(45) 発行日 平成28年7月20日 (2016. 7. 20)

(24) 登録日 平成28年6月24日 (2016. 6. 24)

(51) Int. Cl.		F I			
<b>AO1K</b> 67/027 (2006.01)		AO1K	67/027	ZNA	
<b>C12P</b> 21/08 (2006.01)		C12P	21/08		
<b>C12N</b> 15/09 (2006.01)		C12N	15/00	A	

請求項の数 26 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2012-552144 (P2012-552144)	(73) 特許権者	597160510
(86) (22) 出願日	平成23年2月8日 (2011. 2. 8)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2013-518597 (P2013-518597A)		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成25年5月23日 (2013. 5. 23)		REGENERON PHARMACEU
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/023971		TICALS, INC.
(87) 国際公開番号	W02011/097603		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(87) 国際公開日	平成23年8月11日 (2011. 8. 11)		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
審査請求日	平成26年1月15日 (2014. 1. 15)		・ミル・リバー・ロード777番
(31) 優先権主張番号	61/302, 282	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成22年2月8日 (2010. 2. 8)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共通の軽鎖のマウス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における、単一の再構成されたヒトV<sub>1-39</sub>/J 配列、または単一の再構成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J 配列の挿入であって、該単一の再構成されたヒトV<sub>1-39</sub>/J 配列は、ヒト生殖系列V<sub>1-39</sub>セグメントとヒト生殖系列J セグメントとを含み、該単一の再構成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J 配列は、ヒト生殖系列V<sub>3-20</sub>セグメントとヒト生殖系列J セグメントとを含み、該ヒト配列は内因性マウス 定常遺伝子に作動可能に連結される、挿入；および

(b) 複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの、内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座における挿入であって、該ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは内因性マウス免疫グロブリン重鎖定常領域に作動可能に連結され、該ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成して、再構成されたヒト/マウスメラ免疫グロブリン重鎖遺伝子を形成することが可能である、挿入を含む、マウス。

【請求項2】

再構成して、マウス 可変領域をコードする遺伝子を形成することが可能な内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、請求項1に記載のマウス。

【請求項3】

前記マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域の5'にマウス イントロンエンハンサーをさ

らに含む、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 4】

マウス 3' エンハンサーをさらに含む、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 5】

前記複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントが、VH 1 - 2 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 1 - 8 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 1 - 2 4 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 2 - 5 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 7 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 9 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 1 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 1 3 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 1 5 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 2 0 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 2 3 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 3 0 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 3 3 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 3 - 4 8 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 4 - 3 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 4 - 3 9 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 4 - 5 9 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、VH 5 - 5 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、および VH 6 - 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントから選択されるセグメントを含む、請求項 1 に記載のマウス。

10

【請求項 6】

20

前記複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントが、D 1 - 7 遺伝子セグメント、D 1 - 2 6 遺伝子セグメント、D 3 - 3 遺伝子セグメント、D 3 - 1 0 遺伝子セグメント、D 3 - 1 6 遺伝子セグメント、D 3 - 2 2 遺伝子セグメント、D 5 - 5 遺伝子セグメント、D 5 - 1 2 遺伝子セグメント、D 6 - 6 遺伝子セグメント、D 6 - 1 3 遺伝子セグメント、D 7 - 2 7 遺伝子セグメント、またはその組合せから選択されるセグメントを含む、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のマウスであって、該マウスが、再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含む B 細胞を含み、該再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列が、VH 2 - 5、VH 3 - 2 3、VH 3 - 3 0、VH 4 - 3 9、VH 4 - 5 9、または VH 5 - 5 1 から選択される VH 遺伝子セグメントに由来し、かつ D 1 - 7、D 1 - 2 6、D 3 - 3、D 3 - 1 6、D 3 - 1 0、D 3 - 2 2、D 5 - 5、D 5 - 1 2、D 6 - 6、D 6 - 1 3、または D 7 - 2 7 から選択される D 遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子を含む、マウス。

30

【請求項 8】

前記ヒト V 1 - 3 9 / J 配列がヒト J 5 遺伝子セグメントを含む、請求項 1 に記載のマウス。

【請求項 9】

前記ヒト V 3 - 2 0 / J 配列がヒト J 1 遺伝子セグメントを含む、請求項 1 に記載のマウス。

40

【請求項 10】

二重特異性抗体を作製するためのヒト可変領域を選択するための方法であって、

( a ) 目的の抗原で遺伝子改変マウスを免疫化するステップであって、該マウスは、

( i ) 内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における、単一の再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列、または単一の再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列の挿入であって、該単一の再構成されたヒト V 1 - 3 9 / J 配列は、ヒト生殖系列 V 1 - 3 9 セグメントとヒト生殖系列 J セグメントとを含み、該単一の再構成されたヒト V 3 - 2 0 / J 配列は、ヒト生殖系列 V 3 - 2 0 セグメントとヒト生殖系列 J セグメントとを含み、該ヒト配列は内因性マウス 定常遺伝子に作動可能に連結される、挿入；および

50

( i i ) 複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの、内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子の遺伝子座における挿入であって、該ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは内因性マウス免疫グロブリン重鎖定常遺伝子に作動可能に連結され、該ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成して、再構成されたヒト/マウスキメラ免疫グロブリン重鎖遺伝子を形成することが可能である、挿入を含む、ステップと、

( b ) 該マウスに該目的の抗原への免疫応答を起こさせるステップと、

( c ) 該目的の抗原に特異的に結合する抗体を発現する該マウスのクローン性選択リンパ球を同定して、該リンパ球または該抗体から、該目的の抗原に特異的に結合するヒト免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を得るステップと、

( d ) 二重特異性抗体の作製において ( c ) のヌクレオチド配列を使用するステップとを含む、方法。

【請求項 1 1】

前記マウスが、再構成して、マウス 可変領域をコードする遺伝子を形成することが可能な内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域の 5 ' にマウス イントロンエンハンサーをさらに含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

マウス 3 ' エンハンサーをさらに含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントが、V H 1 - 2 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 1 - 8 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 1 - 2 4 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 2 - 5 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 7 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 9 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 1 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 1 3 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 1 5 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 2 0 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 2 3 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 3 0 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 3 3 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 3 - 4 8 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 4 - 3 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 4 - 3 9 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 4 - 5 9 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、V H 5 - 5 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、および V H 6 - 1 ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントから選択されるセグメントを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントが、D 1 - 7 遺伝子セグメント、D 1 - 2 6 遺伝子セグメント、D 3 - 3 遺伝子セグメント、D 3 - 1 0 遺伝子セグメント、D 3 - 1 6 遺伝子セグメント、D 3 - 2 2 遺伝子セグメント、D 5 - 5 遺伝子セグメント、D 5 - 1 2 遺伝子セグメント、D 6 - 6 遺伝子セグメント、D 6 - 1 3 遺伝子セグメント、D 7 - 2 7 遺伝子セグメント、またはその組合せから選択されるセグメントを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記マウスが、再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含む B 細胞を含み、該再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列が、V H 2 - 5、V H 3 - 2 3、V H 3 - 3 0、V H 4 - 3 9、V H 4 - 5 9、または V H 5 - 5 1 から選択される V H 遺伝子セグメントに由来し、かつ D 1 - 7、D 1 - 2 6、D 3 - 3、D 3 - 1 6、D 3

10

20

30

40

50

- 10、D3 - 22、D5 - 5、D5 - 12、D6 - 6、D6 - 13、またはD7 - 27から選択されるD遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項17】

前記ヒトV 1 - 39 / J 配列がヒトJ 5 遺伝子セグメントを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項18】

前記ヒトV 3 - 20 / J 配列がヒトJ 1 遺伝子セグメントを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項19】

請求項10に記載の方法であって、1回目に目的の第一の抗原についてステップ(a)から(d)を実行して、第一のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列を生成し、2回目に目的の第二の抗原についてステップ(a)から(d)を実行して、第二のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列を生成し、該第一のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列を第一のヒト免疫グロブリン重鎖定常領域と融合させて発現させて第一のヒト免疫グロブリン重鎖を形成し、該第二のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列を第二のヒト免疫グロブリン重鎖定常領域と融合させて発現させて第二のヒト免疫グロブリン重鎖を形成し、ここで、該第一のヒト免疫グロブリン重鎖および該第二のヒト免疫グロブリン重鎖は、前記マウスに存在するものと同じ再構成されたヒト生殖系列配列に由来する単一のヒト免疫グロブリン軽鎖の存在下で発現させられる、方法。

【請求項20】

前記第一のヒト免疫グロブリン重鎖が、プロテインAへの該第一のヒト免疫グロブリン重鎖の親和性を除去するか実質的に低減する改変を含み、前記第二のヒト免疫グロブリン重鎖が、プロテインAに結合する能力を保持する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記第一のヒト免疫グロブリン重鎖のプロテインAへの親和性を除去するか実質的に低減する前記改変が、95R(EU 435R)、96F(EU 436F)、またはその組合せから選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

二重特異性抗原結合タンパク質を作製する方法であって、以下：

(a) 第一および第二のB細胞に由来する第一および第二のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を得るステップであって、ここで；

該第一のB細胞は、第一のマウスによって生成され、該第一のマウスは、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座において、単一の再構成されたヒトV 1 - 39 / J 配列、または、単一の再構成されたヒトV 3 - 20 / J 配列の挿入を含み、該単一の再構成されたヒトV 1 - 39 / J 配列は、ヒト生殖系列V 1 - 39 セグメントとヒト生殖系列J セグメントとを含み、該単一の再構成されたヒトV 3 - 20 / J 配列は、ヒト生殖系列V 3 - 20 セグメントとヒト生殖系列J セグメントとを含み、該ヒト生殖系列配列は、内因性マウス 定常遺伝子に作動可能に連結され、第一の複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを発現し；そして

該第二のB細胞は、第二のマウスによって生成され、該第二のマウスは、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座において、単一の再構成されたヒトV 1 - 39 / J 配列、または、単一の再構成されたヒトV 3 - 20 / J 配列の挿入を含み、該単一の再構成されたヒトV 1 - 39 / J 配列は、ヒト生殖系列V 1 - 39 セグメントとヒト生殖系列J セグメントとを含み、該単一の再構成されたヒトV 3 - 20 / J 配列は、ヒト生殖系列V 3 - 20 セグメントとヒト生殖系列J セグメントとを含み、該ヒト遺伝子配列は、内因性マウス 定常遺伝子に作動可能に連結され、第二の複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを発現する、ステップ；および

(b) 該二重特異性抗原結合タンパク質を作製するステップであって、該二重特異性抗原結合タンパク質が、以下：

10

20

30

40

50

2つのヒト免疫グロブリン重鎖であって、第一のヒト免疫グロブリン重鎖が、該第一のB細胞に由来する免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列によってコードされるヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを有し、該第二のヒト免疫グロブリン重鎖が、該第二のB細胞に由来する免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列によってコードされるヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを有する、2つのヒト免疫グロブリン重鎖；および

再構成されたヒトV<sub>H</sub> 1-39/J 配列または再構成されたヒトV<sub>H</sub> 3-20/J 配列に由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを有する、ステップを含む、方法。

【請求項23】

前記第一のマウスと前記第二のマウスが同じマウスであり、前記第一のB細胞と前記第二のB細胞が、該同じマウスによって生成される2つの異なるB細胞である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記ヒト生殖系列J 遺伝子セグメントが、ヒトJ<sub>H</sub> 5 遺伝子セグメントまたはヒトJ<sub>H</sub> 1 遺伝子セグメントである、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記第一のマウスが、目的の第一の抗原に曝露されており、該第一の抗原は第一のエピトープを含み、該第一のマウスは、該第一のエピトープに結合する第一のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする第一の免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含み、

前記第二のマウスが、目的の第二の抗原に曝露されており、該第二の抗原は第二のエピトープを含み、該第二のマウスは、該第二のエピトープに結合する第二のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする第二の免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項26】

前記第一の抗原と前記第二の抗原が同じ抗原であり、前記第一のエピトープと前記第二のエピトープが、該同じ抗原の2つの異なるエピトープである、請求項25に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

多様なヒト可変/マウス定常重鎖と会合している共通のヒト可変/マウス定常軽鎖を有する抗体を発現する遺伝子改変マウスが提供される。マウスのB細胞のヒト可変領域遺伝子配列からヒト二重特異性抗体を作製する方法が提供される。

【背景技術】

【0002】

抗体は、各重鎖モノマーが同一の軽鎖と会合しているホモダイマー重鎖成分を一般的に含む。ヘテロダイマー重鎖成分を有する抗体(例えば、二重特異性抗体)は、治療抗体として望ましい。しかし、二重特異性抗体の重鎖の各々と十分に会合することができる好適な軽鎖成分を有する二重特異性抗体を作製することには、問題があることが判明した。

【0003】

1つの手法では、全ての軽鎖可変ドメインの使用統計値を調査し、ヒト抗体で最も頻繁に使用される軽鎖を同定し、その軽鎖を異なる特異性の2つの重鎖と*in vitro*で対合させることによって、軽鎖を選択することができる可能性がある。

【0004】

別の手法では、ファージディスプレイライブラリー(例えば、ヒト軽鎖可変領域配列を含むファージディスプレイライブラリー、例えばヒトScFvライブラリー)において軽鎖配列を観察し、最も一般的に用いられる軽鎖可変領域をライブラリーから選択することによって、軽鎖を選択することができる可能性がある。次に、軽鎖を、目的の2つの異なる

10

20

30

40

50

る重鎖について試験することができる。

【0005】

別の手法では、目的の両方の重鎖の重鎖可変配列をプローブとして用いて、軽鎖可変配列のファージディスプレイライブラリーを分析することによって、軽鎖を選択することができる可能性がある。両方の重鎖可変配列と会合する軽鎖は、それら重鎖のための軽鎖として選択することができる可能性がある。

【0006】

別の手法では、候補軽鎖を重鎖の関連軽鎖とアラインメントさせることができ、両方の重鎖の関連軽鎖に共通する配列特性により緊密に一致するように軽鎖が改変される。免疫原性の可能性を最小にする必要がある場合、改変は好ましくは、公知のヒト軽鎖配列に存在する配列をもたらし、ここで、タンパク分解プロセッシングが、免疫原性の可能性を評価するための当技術分野で公知であるパラメータおよび方法（すなわち、*in silico* およびウェットアッセイ）に基づいたT細胞エピトープを生成する可能性は低い。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記の手法のいずれも、例えば配列同一性、特異的な前選択された重鎖と会合する能力などのいくつかのアプリオリ制限を含む *in vitro* の方法に依存する。共通する軽鎖を含むヒトエピトープ結合性タンパク質を作製するための、*in vitro* 条件における操作に頼らず、代わりにより生物学的で実用的な手法を使用する組成物および方法への必要性が当技術分野にある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

ヒト免疫グロブリンの重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを発現し、限られた軽鎖可変レパートリーを有する遺伝子改変マウスが提供される。親和性成熟ヒト重鎖可変ドメインの多様なレパートリーと会合して発現するヒト軽鎖可変ドメインを生成する生物系が提供される。免疫グロブリン可変ドメインを含む結合性タンパク質の作製方法であって、目的の抗原で限定された免疫グロブリン軽鎖レパートリーを有するマウスを免疫化すること、および目的の抗原に特異的に結合する結合性タンパク質においてマウスの免疫グロブリン可変領域遺伝子配列を使用することを含む方法が提供される。方法には、多重特異性抗原結合性タンパク質の作製で用いるのに適するヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの作製方法が含まれる。

【0009】

再構成されていないヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントのレパートリーに由来する好適な親和性成熟ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを選択する遺伝子操作マウスであって、親和性成熟ヒト重鎖可変ドメインは、1つのヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントに由来する単一のヒト軽鎖可変ドメインと会合して発現する、遺伝子操作マウスが提供される。2つのヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントの選択を提示する遺伝子操作されたマウスも提供される。

【0010】

ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントの限定されたレパートリーからの、ヒト軽鎖可変ドメインの限定されたレパートリーまたは単一のヒト軽鎖可変ドメインを発現する遺伝子操作マウスが提供される。マウスは、単一の再構成されていないヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント（または2つのヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント）を含むように遺伝子操作され、これは、再構成して、単一の軽鎖を発現する（または2つの軽鎖の一方もしくは両方を発現する）再構成されたヒト軽鎖可変領域遺伝子（または再構成された2つの軽鎖可変領域遺伝子）を形成する。再構成されたヒト軽鎖可変ドメインは、マウスによって選択される複数の親和性成熟ヒト重鎖との対合が可能であり、ここで、重鎖可変領域は異なるエピトープと特異的に結合する。

【0011】

一態様では、再構成して、ヒトの免疫グロブリン軽鎖のV Lドメインをコードすることが可能な単一のヒト免疫グロブリン軽鎖可変(V L)領域遺伝子セグメントを含む遺伝子改変マウスが提供される。別の態様では、マウスは、再構成して、ヒトの免疫グロブリン軽鎖のV Lドメインをコードすることが可能である2つ以下のヒトV L遺伝子セグメントを含む。

【0012】

一態様では、ヒトの免疫グロブリン軽鎖のV Lドメインをコードする単一の再構成された(V/J)ヒト免疫グロブリン軽鎖可変(V L)領域セグメント(すなわち、V/Jセグメント)を含む遺伝子改変マウスが提供される。別の態様では、マウスは、ヒトの免疫グロブリン軽鎖のV Lドメインをコードすることが可能である2つ以下の再構成されたヒトV L遺伝子セグメントを含む。

10

【0013】

一実施形態では、V L遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>1-39</sub>J<sub>5</sub>遺伝子セグメントまたはヒトV<sub>3-20</sub>J<sub>1</sub>遺伝子セグメントである。一実施形態では、マウスは、ヒトV<sub>1-39</sub>J<sub>5</sub>遺伝子セグメントおよびヒトV<sub>3-20</sub>J<sub>1</sub>遺伝子セグメントの両方を有する。

【0014】

一実施形態では、ヒトV L遺伝子セグメントは、ヒトまたはマウスのリーダー配列に作動可能に連結される。一実施形態では、リーダー配列はマウスのリーダー配列である。具体的な実施形態では、マウスのリーダー配列は、マウスV<sub>3-7</sub>リーダー配列である。

20

【0015】

一実施形態では、V L遺伝子セグメントは、免疫グロブリンプロモーター配列に作動可能に連結される。一実施形態では、プロモーター配列は、ヒトのプロモーター配列である。具体的な実施形態では、ヒト免疫グロブリンプロモーターは、V<sub>3-15</sub>プロモーターである。

【0016】

一実施形態では、遺伝子改変マウスは、再構成して免疫グロブリン軽鎖遺伝子を形成することが可能な内因性マウスV L遺伝子セグメントを含まないV L遺伝子座を含み、ここで、V L遺伝子座は、再構成して軽鎖遺伝子のV L領域をコードすることが可能な単一のヒトV L遺伝子セグメントを含む。具体的な実施形態では、ヒトV L遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>1-39</sub>J<sub>5</sub>遺伝子セグメントまたはヒトV<sub>3-20</sub>J<sub>1</sub>遺伝子セグメントである。

30

【0017】

一実施形態では、V L遺伝子座は、5' (V L遺伝子セグメントの転写方向に関して)にヒト免疫グロブリンプロモーターが隣接し、3'に、再構成して、内因性マウス軽鎖定常領域(C L)を含むリバースキメラ(reverse chimeric)軽鎖のV LドメインをコードするヒトV L遺伝子セグメントが隣接する、リーダー配列を含む。具体的な実施形態では、V L遺伝子セグメントはマウスカッパ( )V L遺伝子座にあり、マウスC Lはマウス C Lである。

【0018】

一実施形態では、マウスは機能しないラムダ( )免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含む。具体的な実施形態では、 遺伝子座は、遺伝子座の1つまたは複数の配列の欠失を含み、ここで、1つまたは複数の欠失は、 遺伝子座が再構成して軽鎖遺伝子を形成することを不可能にする。別の実施形態では、 遺伝子座のV L遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全てが欠失されている。

40

【0019】

一実施形態では、改変マウスのV L遺伝子座は 遺伝子座であり、 遺伝子座はマウスイントロンエンハンサー、マウス 3'エンハンサー、またはイントロンエンハンサーおよび3'エンハンサーの両方を含む。

【0020】

50

一実施形態では、マウスは、ヒトV L遺伝子セグメントに由来する体細胞変異V Lドメインを含む軽鎖を作る。一実施形態では、軽鎖は、ヒトV L遺伝子セグメントに由来する体細胞変異V Lドメインおよびマウス C L領域を含む。一実施形態では、マウスは軽鎖を発現しない。

【0021】

一実施形態では、遺伝子改変マウスは、ヒトV L領域配列を体細胞超変異させることが可能である。具体的な実施形態では、マウスは、再構成して、V Lドメインをコードすることが可能であるヒトV L遺伝子セグメントに由来する再構成された免疫グロブリン軽鎖遺伝子を含む細胞を含み、再構成された免疫グロブリン軽鎖遺伝子は体細胞変異V Lドメインを含む。

10

【0022】

一実施形態では、マウスは、マウス C Lに連結された体細胞変異ヒトV Lドメインを含む軽鎖を発現する細胞を含み、ここで、軽鎖は、ヒトV H遺伝子セグメントに由来する体細胞変異V Hドメインを含む重鎖と会合し、重鎖はマウス重鎖定常領域(C H)を含む。

【0023】

一実施形態では、マウスは、1つまたは複数のヒトV H遺伝子セグメントによる内因性マウスV H遺伝子セグメントの置換を含み、ここで、ヒトV H遺伝子セグメントはマウスC H領域遺伝子に作動可能に連結され、したがってマウスはヒトV H遺伝子セグメントを再構成して、ヒトV HドメインおよびマウスC Hを含むリバースキメラ免疫グロブリン重鎖を発現する。一実施形態では、再構成されていないマウスV H遺伝子セグメントの90~100%は、少なくとも1つの再構成されていないヒトV H遺伝子セグメントで置換される。具体的な実施形態では、内因性マウスV H遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全ては、少なくとも1つの再構成されていないヒトV H遺伝子セグメントで置換される。一実施形態では、置換は、少なくとも19、少なくとも39または少なくとも80もしくは81個の再構成されていないヒトV H遺伝子セグメントによる。一実施形態では、置換は、少なくとも12個の機能的な再構成されていないヒトV H遺伝子セグメント、少なくとも25個の機能的な再構成されていないヒトV H遺伝子セグメントまたは少なくとも43個の機能的な再構成されていないヒトV H遺伝子セグメントによる。一実施形態では、マウスは、少なくとも1つの再構成されていないヒトDセグメントおよび少なくとも1つの再構成されていないヒトJセグメントによる全てのマウスDおよびJセグメントの置換を含む。一実施形態では、少なくとも1つの再構成されていないヒトDセグメントは、D1-7、D1-26、D3-3、D3-10、D3-16、D3-22、D5-5、D5-12、D6-6、D6-13、D7-27およびその組合せから選択される。一実施形態では、少なくとも1つの再構成されていないヒトJセグメントは、J1、J3、J4、J5、J6およびその組合せから選択される。具体的な実施形態では、1つまたは複数のヒトV H遺伝子セグメントは、1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1ヒトV H遺伝子セグメントおよびその組合せから選択される。

20

30

40

【0024】

一実施形態では、マウスは、目的の抗原に特異的に結合する結合性タンパク質を発現するB細胞を含み、ここで、結合性タンパク質はヒトV 1-39/J 5再構成またはヒトV 3-20/J 1再構成に由来する軽鎖を含み、細胞は、V H2-5、V H3-23、V H3-30、V H4-39、V H4-59およびV H5-51遺伝子セグメントから選択されるヒト遺伝子セグメントの再構成に由来する再構成された免疫グロブリン重鎖遺伝子を含む。一実施形態では、1つまたは複数のヒトV H遺伝子セグメントは、J1、J3、J4、J5およびJ6から選択されるヒト重鎖J遺伝子セグメントと共に再構成される。一実施形態では、1つまたは複数のヒトV HおよびJ遺伝子セグメントは、D1-7、D1-26、D3-3、D3-10、D3-16、D3-22、D5-5、D5-1

50

2、D6-6、D6-13およびD7-27から選択されるヒトD遺伝子セグメントと共に再構成される。具体的な実施形態では、軽鎖遺伝子は、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ、またはそれ以上の体細胞超変異を有する。

【0025】

一実施形態では、マウスは、

【0026】

【化1】

VH 2-5 + JH1 + D6-6, VH3-23 + JH4 + D3, VH3-23 + JH4 +  
D3-10, VH3-30 + JH1 + D6-6, VH3-30 + JH3 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D1-7, VH3-30 + JH4 +  
D5-12, VH3-30 + JH4 + D6-13, VH3-30 + JH4 + D6-6, VH3-30 + JH4 + D7-27, VH3-30 +  
JH5 + D3-22, VH3-30 + JH5 + D6-6, VH3-30 + JH5 + D7-27, VH4-39 + JH3 + D1-26, VH4-  
59 + JH3 + D3-16, VH4-59 + JH3 + D3-22, VH4-59 + JH4 + D3-16, VH5-51 + JH3 + D5-5,  
VH5-51 + JH5 + D6-13, および VH5-51 + JH6 + D3-16

10

から選択される、VH、JHおよびDH遺伝子セグメントを含む再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含むB細胞を含む。具体的な実施形態では、B細胞は、マウス重鎖定常領域と融合したヒト免疫グロブリン重鎖可変領域、およびマウス軽鎖定常領域と融合したヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む結合性タンパク質を発現する。

【0027】

一実施形態では、ヒトVL遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>L</sub> 1-39J<sub>L</sub> 5遺伝子セグメントであり、マウスは、(i)ヒトVL遺伝子セグメントに由来するVLドメイン、および(ii)マウスCLを含むリパースキメラ軽鎖を発現し、ここで、軽鎖は、(i)マウスCHならびに(ii)1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51、および6-1ヒトVH遺伝子セグメントおよびその組合せから選択されるヒトVH遺伝子セグメントに由来する体細胞変異ヒトVHドメインを含むリパースキメラ重鎖と会合している。一実施形態では、マウスは、体細胞変異した軽鎖を発現する。一実施形態では、CLはマウスCLである。

20

【0028】

一実施形態では、ヒトVL遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>L</sub> 3-20J<sub>L</sub> 1遺伝子セグメントであり、マウスは、(i)ヒトVL遺伝子セグメントに由来するVLドメイン、および(ii)マウスCLを含むリパースキメラ軽鎖を発現し、ここで、軽鎖は(i)マウスCHならびに(ii)1-2、2-5、3-7、3-9、3-11、3-20、3-23、3-30、3-33、4-59、および5-51ヒトVH遺伝子セグメントおよびその組合せから選択されるヒトVH遺伝子セグメントに由来する体細胞変異ヒトVHを含むリパースキメラ重鎖と会合している。一実施形態では、マウスは、体細胞変異した軽鎖を発現する。一実施形態では、CLはマウスCLである。

30

【0029】

一実施形態では、マウスはヒトV<sub>L</sub> 1-39J<sub>L</sub> 5遺伝子セグメントおよびヒトV<sub>L</sub> 3-20J<sub>L</sub> 1遺伝子セグメントの両方を含み、マウスは、(i)ヒトV<sub>L</sub> 1-39J<sub>L</sub> 5遺伝子セグメントまたはヒトV<sub>L</sub> 3-20J<sub>L</sub> 1遺伝子セグメントに由来するVLドメイン、および(ii)マウスCLを含むリパースキメラ軽鎖を発現し、ここで、軽鎖は(i)マウスCHならびに(ii)1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1ヒトVH遺伝子セグメントおよびその組合せから選択されるヒトVH遺伝子セグメントに由来する体細胞変異ヒトVHを含むリパースキメラ重鎖と会合している。一実施形態では、マウスは、体細胞変異した軽鎖を発現する。一実施形態では、CLはマウスCLである。

40

【0030】

50

一実施形態では、内因性の再構成されていないマウスVH遺伝子セグメントの90～100%は、少なくとも1つの再構成されていないヒトVH遺伝子セグメントで置換される。具体的な実施形態では、内因性の再構成されていないマウスVH遺伝子セグメントの全てまたは実質的に全ては、少なくとも1つの再構成されていないヒトVH遺伝子セグメントで置換される。一実施形態では、置換は、少なくとも18、少なくとも39、少なくとも80または81個の再構成されていないヒトVH遺伝子セグメントによる。一実施形態では、置換は、少なくとも12個の機能的な再構成されていないヒトVH遺伝子セグメント、少なくとも25個の機能的な再構成されていないヒトVH遺伝子セグメントまたは少なくとも43個の再構成されていないヒトVH遺伝子セグメントによる。

【0031】

一実施形態では、遺伝子改変マウスはC57BL系統であり、具体的な実施形態では、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/Grfa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、C57BL/Olaから選択される。具体的な実施形態では、遺伝子改変マウスは、前記の129系統および前記のC57BL/6系統の混合体である。別の具体的な実施形態では、マウスは、前記の129系統の混合体または前記のBL/6系統の混合体である。具体的な実施形態では、混合体の129系統は、129S6(129/SvEvTac)系統である。

【0032】

一実施形態では、マウスは、マウスCLおよびヒトV1-39J5遺伝子セグメントまたはヒトV3-20J1遺伝子セグメントに由来する体細胞変異ヒトVLDメインを含む軽鎖、ならびにマウスCHおよび1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51、および6-1ヒトVH遺伝子セグメントから選択されるヒトVH遺伝子セグメントに由来する体細胞変異ヒトVHドメインを含む重鎖を含むリパースキメラ抗体を発現し、ここで、マウスは完全なマウスの抗体を発現せず、完全なヒトの抗体を発現しない。一実施形態では、マウスは、ヒトV1-39J5遺伝子セグメントまたはヒトV3-20J1遺伝子セグメントによる内因性マウスVL遺伝子セグメントの置換を含む軽鎖遺伝子座を含み、ならびにヒトVH遺伝子セグメントの完全であるか実質的に完全であるレパトリーによる全てまたは実質的に全ての内因性マウスVH遺伝子セグメントの置換を含む。

【0033】

一態様では、本明細書に記載されるマウスから単離されるマウス細胞が提供される。一実施形態では、細胞はES細胞である。一実施形態では、細胞はリンパ球である。一実施形態では、リンパ球はB細胞である。一実施形態では、B細胞は、ヒト遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含むキメラ重鎖、および再構成されたヒトV1-39/Jセグメント、再構成されたヒトV3-20/Jセグメントまたはその組合せに由来する軽鎖を発現し、ここで、重鎖可変ドメインはマウス定常領域と融合され、軽鎖可変ドメインはマウスまたはヒトの定常領域と融合される。

【0034】

一態様では、本明細書に記載されるマウスのB細胞で作製されるハイブリドーマが提供される。具体的な実施形態では、B細胞は、目的のエピトープを含む免疫原で免疫化された本明細書に記載されるマウスに由来し、B細胞は、目的のエピトープに結合する結合性タンパク質を発現し、結合性タンパク質は、体細胞変異ヒトVHドメインおよびマウスCHを有し、ヒトV1-39J5またはヒトV3-20J1遺伝子セグメントに由来するヒトVLDメインおよびマウスCLを有する。

【0035】

一態様では、本明細書に記載されるマウスに由来するドナーES細胞を含むマウス胚が提供される。

【0036】

10

20

30

40

50

一態様では、ベクターの5'および3'マウス相同性アームの配列に関して転写方向の5'から3'にかけて、5'マウス相同性アーム、ヒトまたはマウスの免疫グロブリンプロモーター、ヒトまたはマウスのリーダー配列、およびヒトV<sub>H</sub> 1-39J<sub>H</sub>5またはヒトV<sub>L</sub> 3-20J<sub>L</sub>1遺伝子セグメントから選択されるヒトLCVR遺伝子セグメント、および3'マウス相同性アームを含むターゲティングベクターが提供される。一実施形態では、5'および3'相同性アームはそのベクターを、マウス定常領域遺伝子の5'に存在し、近位であるエンハンサー配列の5'にある配列にターゲティングする。一実施形態では、プロモーターはヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントプロモーターである。具体的な実施形態では、プロモーターはヒトV<sub>H</sub> 3-15プロモーターである。一実施形態では、リーダー配列はマウスのリーダー配列である。具体的な実施形態では、マウスのリーダー配列は、マウスV<sub>L</sub> 3-7リーダー配列である。

10

## 【0037】

一態様では、前記の通りであるが、ヒトまたはマウスのプロモーターの5'に、5'マウス相同性アームの代わりに部位特異的リコンビナーゼ認識部位(SRRS)が隣接し、ヒトLCVR遺伝子セグメントの3'に、3'マウス相同性アームの代わりにSRRSが隣接する、ターゲティングベクターが提供される。

## 【0038】

一態様では、マウスCLおよびヒトVLを含む軽鎖ならびにヒトVHおよびマウスCHを含む重鎖を含む、本明細書に記載されるマウスによって作製されるリバースキメラ抗体が提供される。

20

## 【0039】

一態様では、抗体の作製方法であって、単一の細胞で、(a)ヒトCH遺伝子配列と融合される本明細書に記載の免疫化マウスの第一のVH遺伝子配列、(b)ヒトCL遺伝子配列と融合される本明細書に記載の免疫化マウスのVL遺伝子配列を発現させること、および(c)完全なヒトの抗体を発現させるのに十分な条件の下で細胞を維持し、抗体を単離することを含む方法が提供される。一実施形態では、細胞は、ヒトCH遺伝子配列と融合される本明細書に記載の第二の免疫化マウスの第二のVH遺伝子配列を含み、第一のVH遺伝子配列は第一のエピトープを認識するVHドメインをコードし、第二のVH遺伝子配列は第二のエピトープを認識するVHドメインをコードし、ここで、第一のエピトープおよび第二のエピトープは同一でない。

30

## 【0040】

一態様では、エピトープ結合性タンパク質の作製方法であって、目的のエピトープを含む免疫原に本明細書に記載のマウスを曝露させること、目的のエピトープに特異的に結合する免疫グロブリン分子をマウスが生成するのに十分な条件の下でマウスを維持すること、および目的のエピトープに特異的に結合する免疫グロブリン分子を単離することを含み、エピトープ結合性タンパク質は、マウスCLおよびヒトV<sub>H</sub> 1-39J<sub>H</sub>5またはヒトV<sub>L</sub> 3-20J<sub>L</sub>1遺伝子セグメントに由来するヒトVLを含む軽鎖に会合している、体細胞変異ヒトVHおよびマウスCHを含む重鎖を含む方法が提供される。

## 【0041】

一態様では、エピトープ結合性タンパク質を発現する細胞であって、(a)ヒト免疫グロブリン軽鎖定常ドメインcDNA配列(例えば、ヒト定常ドメインDNA配列)と(直接的に、またはリンカーを通して)融合される、ヒトV<sub>H</sub> 1-39J<sub>H</sub>5またはヒトV<sub>L</sub> 3-20J<sub>L</sub>1遺伝子セグメントに由来するヒトVLDドメインをコードするヒトVLヌクレオチド配列、および(b)第一のヒトVHヌクレオチド配列に由来するヒトVHドメインをコードする第一のヒトVHヌクレオチド配列であって、ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインcDNA配列と(直接的に、またはリンカーを通して)融合される、第一のヒトVHヌクレオチド配列、を含み、エピトープ結合性タンパク質は第一のエピトープを認識する、細胞が提供される。一実施形態では、エピトープ結合性タンパク質は、 $10^{-6}$  M未満、 $10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、 $10^{-10}$  M未満、 $10^{-11}$  M未満または $10^{-12}$  M未満の解離定数で第一のエピトープに結合する。

40

50

## 【 0 0 4 2 】

一実施形態では、細胞は、第二のヒトVHドメインをコードする第二のヒトVHヌクレオチド配列を含み、第二のヒトVH配列はヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインcDNA配列と（直接的に、またはリンカーを通して）融合され、第二のヒトVHドメインは第一のエピトープを特異的に認識せず（例えば $10^{-6}$  M、 $10^{-5}$  M、 $10^{-4}$  Mまたはそれ以上の解離定数を例えば示す）、エピトープ結合性タンパク質は第一のエピトープおよび第二のエピトープを認識し、第一および第二の免疫グロブリン重鎖は（a）の同一の軽鎖と各々会合する。

## 【 0 0 4 3 】

一実施形態では、第二のVHドメインは、 $10^{-6}$  M未満、 $10^{-7}$  M未満、 $10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、 $10^{-10}$  M未満、 $10^{-11}$  M未満または $10^{-12}$  M未満の解離定数で第二のエピトープに結合する。

## 【 0 0 4 4 】

一実施形態では、エピトープ結合性タンパク質は、ヒトV<sub>H</sub> 1-39 J<sub>H</sub> 5またはヒトV<sub>H</sub> 3-20 J<sub>H</sub> 1遺伝子セグメントから選択されるヒトV<sub>L</sub>遺伝子セグメントに由来する同一の軽鎖と各々会合している第一の免疫グロブリン重鎖および第二の免疫グロブリン重鎖を含み、第一の免疫グロブリン重鎖はナノモルからピコモルの範囲の解離定数で第一のエピトープに結合し、第二の免疫グロブリン重鎖はナノモルからピコモルの範囲の解離定数で第二のエピトープに結合し、第一のエピトープおよび第二のエピトープは同一でなく、第一の免疫グロブリン重鎖は第二のエピトープに結合しないか、マイクロモルの範囲より弱い（例えば、ミリモルの範囲）解離定数で第二のエピトープに結合し、第二の免疫グロブリン重鎖は第一のエピトープに結合しないか、マイクロモルの範囲より弱い（例えば、ミリモルの範囲）解離定数で第一のエピトープに結合し、V<sub>L</sub>、第一の免疫グロブリン重鎖のVHおよび第二の免疫グロブリン重鎖のVHの1つまたは複数は、体細胞変異している。

## 【 0 0 4 5 】

一実施形態では、第一の免疫グロブリン重鎖はプロテインA結合性残基を含み、第二の免疫グロブリン重鎖はプロテインA結合性残基を欠く。

## 【 0 0 4 6 】

一実施形態では、細胞は、CHO、COS、293、HeLa、およびウイルス核酸配列を発現する網膜細胞（例えば、PERC.6<sup>TM</sup>細胞）から選択される。

## 【 0 0 4 7 】

一態様では、ヒトVHおよびマウス重鎖定常ドメイン、ヒトVLおよびマウス軽鎖定常ドメインを含むリバースキメラ抗体が提供され、ここで、抗体は、本明細書に記載されるマウスをエピトープを含む免疫原で免疫化することを含むプロセスによって作製され、抗体は、マウスを免疫化した免疫原のエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、VLドメインは、体細胞変異している。一実施形態では、VHドメインは、体細胞変異している。一実施形態では、VLドメインおよびVHドメインの両方は、体細胞変異している。一実施形態では、VLはマウス定常ドメインに連結される。

## 【 0 0 4 8 】

一態様では、内因性マウス遺伝子座の全てまたは実質的に全てのマウス重鎖可変遺伝子セグメントを置換するヒト重鎖可変遺伝子セグメント、全てのマウス軽鎖可変遺伝子セグメントを置換する、再構成されたV<sub>H</sub> 1-39/J<sub>H</sub> および再構成されたV<sub>H</sub> 3-20/J<sub>H</sub> セグメントまたはその組合せから選択される1つまたは2つ以下のヒト軽鎖可変遺伝子セグメントを含むマウスが提供され、ヒト重鎖可変遺伝子セグメントはマウス定常遺伝子と連結され、ヒト軽鎖可変遺伝子セグメント（複数可）はヒトまたはマウスの定常遺伝子と連結される。

## 【 0 0 4 9 】

一態様では、ヒト重鎖可変遺伝子セグメントによる全てまたは実質的に全てのマウス重鎖可変遺伝子セグメントの置換、および1つまたは2つ以下の再構成されたヒト軽鎖V<sub>L</sub>

10

20

30

40

50

Jセグメントを含むマウスES細胞が提供され、ここで、ヒト重鎖可変遺伝子セグメントはマウス免疫グロブリン重鎖定常遺伝子と連結され、ヒト軽鎖V/Jセグメントはマウスまたはヒトの免疫グロブリン軽鎖定常遺伝子と連結される。具体的な実施形態では、軽鎖定常遺伝子は、マウスの定常遺伝子である。

【0050】

一態様では、本明細書に記載されるマウスによって作製される抗原結合性タンパク質が提供される。具体的な実施形態では、抗原結合性タンパク質は、マウス定常領域と融合されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域、およびV<sub>1-39</sub>遺伝子セグメントまたはV<sub>3-20</sub>遺伝子セグメントに由来するヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、軽鎖定常領域はマウスの定常領域である。

10

【0051】

一態様では、本明細書に記載されるマウスからの免疫グロブリン可変領域遺伝子配列から作製される完全なヒトの抗原結合性タンパク質が提供され、ここで、抗原結合性タンパク質は、本明細書に記載されるマウスの配列に由来するヒト可変領域を含む完全にヒトの重鎖、およびV<sub>1-39</sub>またはV<sub>3-20</sub>可変領域を含む完全にヒトの軽鎖を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域は1から5個の体細胞変異を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域は、マウスのB細胞で重鎖可変領域と対になる関連軽鎖可変領域である。

【0052】

一実施形態では、完全なヒトの抗原結合性タンパク質は、第一の重鎖および第二の重鎖を含み、第一の重鎖および第二の重鎖は、本明細書に記載されるマウスに独立して由来する同一でない可変領域を含み、第一および第二の重鎖の各々は、V<sub>1-39</sub>遺伝子セグメントまたはV<sub>3-20</sub>遺伝子セグメントに由来するヒト軽鎖と関連する宿主細胞から発現する。一実施形態では、第一の重鎖は第一の抗原の第一のエピトープに特異的に結合する第一の重鎖可変領域を含み、第二の重鎖は第二の抗原の第二のエピトープに特異的に結合する第二の重鎖可変領域を含む。具体的な実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は異なる。具体的な実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は同じであり、第一のエピトープおよび第二のエピトープは同一でない。具体的な実施形態では、結合性タンパク質の第一の分子による第一のエピトープの結合は、結合性タンパク質の第二の分子による第二のエピトープの結合をブロックしない。

20

【0053】

一態様では、本明細書に記載されるマウスのヒト免疫グロブリン配列に由来する完全なヒトの結合性タンパク質は、第一の免疫グロブリン重鎖および第二の免疫グロブリン重鎖を含み、第一の免疫グロブリン重鎖は、第二の免疫グロブリン重鎖の可変領域と同一ではない第一の可変領域を含み、第一の免疫グロブリン重鎖は、野生型プロテインA結合性決定基を含み、第二の重鎖は、野生型プロテインA結合性決定基を欠く。一実施形態では、第一の免疫グロブリン重鎖は単離条件の下でプロテインAに結合し、第二の免疫グロブリン重鎖はプロテインAに結合しないか、第一の免疫グロブリン重鎖が単離条件の下でプロテインAに結合するよりも少なくとも10倍、100倍または1000倍弱くプロテインAに結合する。具体的な実施形態では、第一および第二の重鎖はIgG1アイソタイプであり、第二の重鎖は95R(EU<sub>435R</sub>)、96F(EU<sub>436F</sub>)およびその組合せから選択される改変を含み、第一の重鎖はそのような改変を欠く。

30

40

【0054】

一態様では、二重特異的抗原結合性タンパク質の作製方法であって、本明細書に記載される第一のマウスを、第一のエピトープを含む目的の第一の抗原に曝露させること、本明細書に記載される第二のマウスを、第二のエピトープを含む目的の第二の抗原に曝露させること、第一および第二のマウスに目的の抗原への免疫応答を各々開始させること、目的の第一の抗原の第一のエピトープに結合する第一のヒト重鎖可変領域を第一のマウスで同定すること、目的の第二の抗原の第二のエピトープに結合する第二のヒト重鎖可変領域を第二のマウスで同定すること、目的の第一の抗原の第一のエピトープに結合する第一の重鎖をコードする第一の完全なヒトの重鎖遺伝子を作製すること、目的の第二の抗原の第二

50

のエピトープに結合する第二の重鎖をコードする第二の完全なヒトの重鎖遺伝子を作製すること、ヒトV<sub>H</sub> 1 - 39またはヒトV<sub>H</sub> 3 - 20遺伝子セグメントに由来する単一の完全なヒトの軽鎖を発現する細胞で第一の重鎖および第二の重鎖を発現させて二重特異的抗原結合性タンパク質を形成すること、ならびに二重特異的抗原結合性タンパク質を単離することを含む方法が提供される。

【0055】

一実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は同一でない。

【0056】

一実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は同じであり、第一のエピトープおよび第二のエピトープは同一でない。一実施形態では、第一のエピトープへの第一の重鎖可変領域の結合は、第二のエピトープへの第二の重鎖可変領域の結合をブロックしない。

10

【0057】

一実施形態では、第一の抗原は可溶性抗原および細胞表面抗原（例えば、腫瘍抗原）から選択され、第二の抗原は細胞表面受容体を含む。具体的な実施形態では、細胞表面受容体は免疫グロブリン受容体である。具体的な実施形態では、免疫グロブリン受容体はFc受容体である。一実施形態では、第一の抗原および第二の抗原は同じ細胞表面受容体であり、第一のエピトープへの第一の重鎖の結合は第二のエピトープへの第二の重鎖の結合をブロックしない。

【0058】

一実施形態では、軽鎖の軽鎖可変ドメインは、2から5個の体細胞変異を含む。一実施形態では、軽鎖可変ドメインは、第一または第二の重鎖可変ドメインを有する第一または第二の免疫化マウスのB細胞で発現される体細胞変異関連軽鎖である。

20

【0059】

一実施形態では、第一の完全なヒトの重鎖は、プロテインAへのその親和性を低減するアミノ酸改変を有し、第二の完全なヒトの重鎖はプロテインAへのその親和性を低減する改変を含まない。

【0060】

一態様では、本発明に従って作製されたヒト重鎖可変ドメインを含む抗体または二重特異性抗体が提供される。別の態様では、完全なヒトの抗体または完全なヒトの二重特異性抗体を作製するための本明細書に記載されるマウスの使用が提供される。

30

【0061】

本明細書に記載される実施形態および態様のいずれも、特に明記しない限り、または文脈から明らかでない限り、互いに一緒に用いることができる。他の実施形態は、後に続く記載の概観から当業者にとって明らかになる。

本願は、特定の実施形態において、例えば以下の項目を提供する：

(項目1)

(a) 内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における、ヒトV<sub>H</sub> 1 - 39 / J 遺伝子セグメント、ヒトV<sub>H</sub> 3 - 20 / J 遺伝子セグメントまたはその組合せによる、全部または実質的に全部の内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントの置換であって、該ヒト遺伝子セグメントは内因性マウス 定常遺伝子に作動可能に連結される、置換；および

40

(b) 複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントによる、内因性マウス重鎖可変領域遺伝子の遺伝子座の全部または実質的に全部の置換であって、該ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは内因性マウス重鎖定常遺伝子に作動可能に連結され、該ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成して、再構成されたヒト/マウスキメラ重鎖遺伝子を形成することが可能である、置換

を含む、マウス。

(項目2)

再構成して、マウス 可変領域をコードする遺伝子を形成することが可能な内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、項目1に記載のマウス。

50

(項目3)

前記マウス軽鎖定常領域の5'にマウスイントロンエンハンサーをさらに含む、項目1に記載のマウス。

(項目4)

マウス3'エンハンサーをさらに含む、項目1に記載のマウス。

(項目5)

前記複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントが、1-2ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、1-8ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、1-24ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、2-5ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-7ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-9ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-11ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-13ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-15ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-20ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-23ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-30ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-33ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-48ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、4-31ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、4-39ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、4-59ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、5-51ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、および6-1ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントから選択されるセグメントを含む、項目1に記載のマウス。

10

20

(項目6)

前記複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントが、D1-7遺伝子セグメント、D1-26遺伝子セグメント、D3-3遺伝子セグメント、D3-10遺伝子セグメント、D3-16遺伝子セグメント、D3-22遺伝子セグメント、D5-5遺伝子セグメント、D5-12遺伝子セグメント、D6-6遺伝子セグメント、D6-13遺伝子セグメント、D7-27遺伝子セグメントおよびその組合せから選択されるセグメントを含む、項目1に記載のマウス。

(項目7)

項目1に記載のマウスであって、該マウスが、再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含むB細胞を含み、該再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列が、VH2-5、VH3-23、VH3-30、VH4-39、VH4-59、VH5-51から選択されるVH遺伝子セグメントに由来し、かつD1-7、D1-26、D3-3、D3-16、D3-10、D3-22、D5-5、D5-12、D6-6、D6-13およびD7-27から選択されるD遺伝子セグメントに由来するヒト重鎖可変領域遺伝子を含む、マウス。

30

(項目8)

前記ヒトV1-39遺伝子セグメントがヒトJ5遺伝子セグメントとの再構成において存在する、項目1に記載のマウス。

(項目9)

前記ヒトV3-20遺伝子セグメントがヒトJ1遺伝子セグメントとの再構成において存在する、項目1に記載のマウス。

40

(項目10)

二重特異性抗体を作製するためのヒト可変領域を選択するための方法であって、

(a) 目的の抗原で遺伝子改変マウスを免疫化するステップであって、該マウスは、

(i) 内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座における、ヒトV1-39/J遺伝子セグメント、ヒトV3-20/J遺伝子セグメントまたはその組合せによる、全部または実質的に全部の内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントの置換であって、該ヒト遺伝子セグメントは内因性マウス定常遺伝子に作動可能に連結される、置換；および

(ii) 複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントによる、内因性マウス重鎖可変領

50

域遺伝子の遺伝子座の全部または実質的に全部の置換であって、該ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは内因性マウス重鎖定常遺伝子に作動可能に連結され、該ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは、再構成して、再構成されたヒト/マウスキメラ重鎖遺伝子を形成することが可能である、置換を含む、ステップと、

(b) 該マウスに該目的の抗原への免疫応答を起こさせるステップと、

(c) 該目的の抗原に特異的に結合する抗体を発現する該マウスのクローン性選択リンパ球を同定して、該リンパ球または該抗体から、該目的の抗原に特異的に結合するヒト重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を得るステップと、

(d) 二重特異性抗体の作製において(c)のヌクレオチド配列を使用するステップとを含む、方法。

10

(項目11)

前記マウスが、再構成して、マウス 可変領域をコードする遺伝子を形成することが可能な内因性マウス 免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を欠く、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記マウス軽鎖定常領域の5'にマウス イントロンエンハンサーをさらに含む、項目10に記載の方法。

(項目13)

マウス 3'エンハンサーをさらに含む、項目10に記載の方法。

20

(項目14)

前記複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントが、1-2ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、1-8ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、1-24ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、2-5ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-7ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-9ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-11ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-13ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-15ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-20ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-23ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-30ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-33ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、3-4

8ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、4-31ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、4-39ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、4-59ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、5-51ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメント、および6-1ヒト免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントから選択されるセグメントを含む、項目10に記載の方法。

30

(項目15)

前記複数のヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントが、D1-7遺伝子セグメント、D1-26遺伝子セグメント、D3-3遺伝子セグメント、D3-10遺伝子セグメント、D3-16遺伝子セグメント、D3-22遺伝子セグメント、D5-5遺伝子セグメント、D5-12遺伝子セグメント、D6-6遺伝子セグメント、D6-13遺伝子セグメント、D7-27遺伝子セグメントおよびその組合せから選択されるセグメントを含む、項目10に記載の方法。

40

(項目16)

前記マウスが、再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列を含むB細胞を含み、該再構成された免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子配列が、VH2-5、VH3-23、VH3-30、VH4-39、VH4-59、VH5-51から選択されるVH遺伝子セグメントに由来し、かつD1-7、D1-26、D3-3、D3-16、D3-10、D3-22、D5-5、D5-12、D6-6、D6-13およびD7-27から選択されるD遺伝子セグメントに由来するヒト重鎖可変領域遺伝子を含む、項目10に記載の方法。

50

(項目17)

前記ヒトV 1 - 3 9 遺伝子セグメントがヒトJ 5 遺伝子セグメントとの再構成において存在する、項目10に記載の方法。

(項目18)

前記ヒトV 3 - 2 0 遺伝子セグメントがヒトJ 1 遺伝子セグメントとの再構成において存在する、項目10に記載の方法。

(項目19)

項目10に記載の方法であって、1回目に目的の第一の抗原についてステップ(a)から(d)を実行して、第一のヒト重鎖可変領域配列を生成し、2回目に目的の第二の抗原についてステップ(a)から(d)を実行して、第二のヒト重鎖可変領域配列を生成し、該第一のヒト重鎖可変領域配列を第一のヒト重鎖定常領域と融合させて発現させて第一のヒト重鎖を形成し、該第二のヒト重鎖可変領域配列を第二のヒト重鎖定常領域と融合させて発現させて第二のヒト重鎖を形成し、ここで、該第一のヒト重鎖および該第二のヒト重鎖は、V 1 - 3 9 遺伝子セグメントまたはV 3 - 2 0 遺伝子セグメントに由来する単一のヒト軽鎖の存在下で発現させられる、方法。

10

(項目20)

前記第一のヒト重鎖が、プロテインAへの該第一のヒト重鎖の親和性を除去するか実質的に低減する改変を含み、前記第二のヒト重鎖が、プロテインAに結合する能力を保持する、項目19に記載の方法。

20

(項目21)

前記第一のヒト重鎖のプロテインAへの親和性を除去するか実質的に低減する前記改変が、95R(EU 435R)、96F(EU 436F)およびその組合せから選択される、項目20に記載の方法。

【図面の簡単な説明】【0062】

【図1】図1は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒトV 1 - 3 9 J 5 遺伝子領域で置換するためのターゲティング戦略を説明する。

【図2】図2は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒトV 3 - 2 0 J 1 遺伝子領域で置換するためのターゲティング戦略を説明する。

【図3】図3は、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子セグメントをヒトV p r e B / J 5 遺伝子領域で置換するためのターゲティング戦略を説明する。

30

【発明を実施するための形態】【0063】

本発明は特定の方法、および記載される実験条件に限定されず、したがって、方法および条件は変更することができる。本発明の範囲は請求項の範囲によって規定されるので、本明細書で用いられる用語は、特定の実施形態に記載することだけを目的とし、限定するものではないことも理解するべきである。

【0064】

別に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての用語および語句は、反対が明らかに示されるか、その用語または語句が用いられる文脈から明らかに明白でない限り、その用語および語句が当技術分野で獲得した意味を含む。本明細書に記載される方法および材料に類似するか同等であるいかなる方法および材料も本発明の実施または試験で用いることができるが、特定の方法および材料がこれから記載される。言及された全ての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0065】

本明細書で用いる用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続する4つのポリペプチド鎖、2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖可変(VH)領域および重鎖定常領域(CH)を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変(VL)領域および軽鎖定常領域(CL)を含む。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域(F

50

R)と呼ばれる保存されている領域の間に散在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化することができる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置される3つのCDRおよび4つのFRを含む: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重鎖CDRは、HC DR1、HC DR2およびHC DR3と略すことができ;軽鎖CDRは、LC DR1、LC DR2およびLC DR3と略すことができる)。用語「高親和性」抗体は、その標的エピトープに関して約 $10^{-9}$ M以下の $K_D$ (例えば、約 $1 \times 10^{-9}$ M、 $1 \times 10^{-10}$ M、 $1 \times 10^{-11}$ Mまたは約 $1 \times 10^{-12}$ M)を有する抗体を指す。一実施形態では、 $K_D$ は表面プラズモン共鳴、例えばBIACORE™によって測定され、別の実施形態では、 $K_D$ はELISAによって測定される。

10

## 【0066】

語句「二重特異性抗体」は、2つ以上のエピトープに選択的に結合することが可能な抗体を含む。二重特異性抗体は、2つの同一ではない重鎖を一般に含み、各重鎖は、2つの異なる分子上(例えば、2つの異なる免疫原上の異なるエピトープ)または同じ分子上(例えば、同じ免疫原上の異なるエピトープ)の異なるエピトープに特異的に結合する。二重特異性抗体が2つの異なるエピトープ(第一のエピトープおよび第二のエピトープ)に選択的に結合することが可能な場合、第一のエピトープに対する第一の重鎖の親和性は、第二のエピトープに対する第一の重鎖の親和性より少なくとも1桁から2桁、または3桁または4桁またはそれ以上一般に低く、逆もまた同じである。二重特異性抗体が特異的に結合するエピトープは、同じか異なる標的の上(例えば、同じか異なるタンパク質の上) 20  
 にあってよい。二重特異性抗体は、例えば、同じ免疫原の異なるエピトープを認識する重鎖を組み合わせることによって作ることができる。例えば、同じ免疫原の異なるエピトープを認識する重鎖可変配列をコードする核酸配列は、同じか異なる重鎖定常領域をコードする核酸配列に融合させることができ、そのような配列は免疫グロブリン軽鎖を発現する細胞で発現させることができる。一般的な二重特異性抗体は、各々3つの重鎖CDRと、続く(N末端からC末端にかけて)CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメインおよびCH3ドメインを有する2つの重鎖、ならびに、エピトープ結合特異性を付与しないが各重鎖と会合することができるか、または各重鎖と会合することができ、かつ重鎖エピトープ結合性領域が結合するエピトープの1つもしくは複数に結合することができるか、または各重鎖と会合することができ、かつ一方もしくは両方のエピトープへの重鎖の一方もしくは 30  
 両方の結合を可能にすることができる免疫グロブリン軽鎖を有する。

20

30

## 【0067】

用語「細胞」には、組換え核酸配列を発現させるのに適する任意の細胞が含まれる。細胞には、原核生物および真核生物(単細胞または多細胞)のもの、細菌細胞(例えば、E. coliの株、Bacillus spp.、Streptomyces spp.など)、マイコバクテリウム細胞、真菌細胞、酵母細胞(例えば、S. cerevisiae、S. pombe、P. pastoris、P. methanolicaなど)、植物細胞、昆虫細胞(例えば、SF-9、SF-21、バキュロウイルス感染昆虫細胞、Trichoplusia niなど)、ヒト以外の動物細胞、ヒト細胞、または細胞融合体、例えばハイブリドーマもしくはクアドローマが含まれる。一部の実施形態では、細胞は 40  
 ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラットまたはマウスの細胞である。一部の実施形態では、細胞は真核細胞であり、以下の細胞から選択される: CHO(例えば、CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS(例えば、COS-7)、網膜細胞、Vero、CV1、腎臓(例えば、HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60(例えば、BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮性)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、Sertoli細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞および前記細胞に由来する細胞系。一部の 50  
 実施形態では、細胞は、1つまたは複数のウイルス遺伝子を含む(例えばウイルス遺伝子

40

50

を発現する網膜細胞（例えば、PER.C6<sup>T<sub>M</sub></sup>細胞）。

【0068】

語句「相補性決定領域」または用語「CDR」には、通常（すなわち、野生型動物で）免疫グロブリン分子（例えば、抗体またはT細胞受容体）の軽鎖または重鎖の可変領域の2つのフレームワーク領域の間に現れる、生物体の免疫グロブリン遺伝子の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列が含まれる。CDRは、例えば、生殖系列配列または再構成されたか再構成されていない配列がコードすることができ、例えば、ナイーブであるか成熟したB細胞またはT細胞がコードすることができる。CDRは体細胞変異してもよく（例えば、動物の生殖系列でコードされている配列と異なる）、ヒト化、および/またはアミノ酸の置換、付加もしくは欠失で改変されてもよい。一部の状況（例えば、CDR3 10  
に関して）では、CDRは、2つ以上の配列（例えば、生殖系列配列）であって、（例えば、再構成されていない核酸配列において）不連続であるが、例えば、配列のスプライシングまたは接続の結果として（例えば、V-D-J組換えによって重鎖CDR3を形成する）B細胞核酸配列において連続している、2つ以上の配列（例えば、生殖系列配列）によってコードされてもよい。

【0069】

保存的なアミノ酸置換を記載するために用いられる場合、用語「保存的」には、類似した化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖R基を有する別のアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換が含まれる。一般に、保存的なアミノ酸置換は、タンパク質の目的の機能特性、例えば標的エピトープに所望の親和性で特異的に結合する可変領域の能力 20  
を實質的に変えない。類似した化学特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンなどの脂肪族側鎖；セリンおよびトレオニンなどの脂肪族ヒドロキシル側鎖；アスパラギンおよびグルタミンなどのアミドを含む側鎖；フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンなどの芳香族の側鎖；リシン、アルギニンおよびヒスチジンなどの塩基性側鎖；アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性側鎖；ならびにシステインおよびメチオニンなどの硫黄を含む側鎖が含まれる。保存的なアミノ酸置換基には、例えば、バリン/ロイシン/イソロイシン、フェニルアラニン/チロシン、リシン/アルギニン、アラニン/バリン、グルタミン酸/アスパラギン酸、およびアスパラギン/グルタミンが含まれる。一部の実施形態では、例えばアラニンスキャニング変異生成で用いられるように、保存的なアミノ酸置換は、アラニンによる 30  
タンパク質の任意の天然の残基の置換であってよい。一部の実施形態では、参照により本明細書に組み込まれるGonnetら（1992年）Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database、Science 256巻：1443～45頁に開示されるPAM250対数尤度マトリックスで正の値を有する保存的な置換がもたらされる。一部の実施形態では、置換は、PAM250対数尤度マトリックスで置換が負ではない値を有するような適度に保存的な置換である。

【0070】

一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖または重鎖での残基位置は、1つまたは複数の保存的なアミノ酸置換によって異なる。一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖または 40  
その機能的断片（例えば、B細胞などからの発現および分泌を可能にする断片）における残基位置は、アミノ酸配列が本明細書に記載されている軽鎖と同一ではなく、1つまたは複数の保存的なアミノ酸置換によって異なる。

【0071】

語句「エピトープ結合性タンパク質」には、少なくとも1つのCDRを有し、エピトープを選択的に認識することが可能な、例えばエピトープに約1マイクロモル以下のK<sub>D</sub>（例えば、約1×10<sup>-6</sup>M、1×10<sup>-7</sup>M、1×10<sup>-9</sup>M、1×10<sup>-9</sup>M、1×10<sup>-10</sup>M、1×10<sup>-11</sup>Mまたは約1×10<sup>-12</sup>MのK<sub>D</sub>）で結合することが可能であるタンパク質が含まれる。治療的なエピトープ結合性タンパク質（例えば、治療的な抗体）は、ナノモルまたはピコモルの範囲のK<sub>D</sub>をしばしば必要とする。 50

## 【 0 0 7 2 】

語句「機能的断片」には、発現、分泌させることができ、マイクロモル、ナノモルまたはピコモルの範囲の $K_D$ でエピトープに特異的に結合するエピトープ結合性タンパク質の断片が含まれる。特異的な認識には、少なくともマイクロモルの範囲、ナノモルの範囲またはピコモルの範囲の $K_D$ を有することが含まれる。

## 【 0 0 7 3 】

用語「生殖系列」には、非体細胞変異細胞、例えば非体細胞変異B細胞またはプロB細胞または造血細胞中の免疫グロブリン核酸配列への言及が含まれる。

## 【 0 0 7 4 】

語句「重鎖」または「免疫グロブリン重鎖」には、任意の生物体からの免疫グロブリン重鎖定常領域配列が含まれる。特に明記しない限り、重鎖可変ドメインには3つの重鎖CDRおよび4つのFR領域が含まれる。重鎖の断片には、CDR、CDRおよびFR、ならびにその組合せが含まれる。一般的な重鎖は、可変ドメインに続いて(N末端からC末端に向かって)CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメインおよびCH3ドメインを有する。重鎖の機能的断片には、エピトープを特異的に認識する(例えば、マイクロモル、ナノモルまたはピコモルの範囲の $K_D$ でエピトープを認識する)ことが可能で、細胞から発現および分泌させることが可能で、少なくとも1つのCDRを含む断片が含まれる。

## 【 0 0 7 5 】

配列に関連して用いられる場合、用語「同一性」には、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列の同一性を測定するために用いることができる当技術分野で公知であるいくつかの異なるアルゴリズムで決定される同一性が含まれる。本明細書に記載される一部の実施形態では、同一性は、10.0のオープンギャップペナルティ、0.1のエクステンデッドギャップペナルティを使用するClustalW v.1.83(スロー)アラインメントを用い、およびGonnetの類似度マトリックス(MacVector<sup>TM</sup> 10.0.2、MacVector Inc.、2008)を用いて決定される。配列の同一性に関して比較される配列の全長は特定の配列に依存するが、軽鎖定常ドメインの場合、全長は、自己会合して正規の軽鎖定常ドメインを形成することが可能な、例えばベータストランドを含む2つのシートを形成することが可能であり、およびヒトまたはマウスの少なくとも1つのCH1ドメインと相互作用することが可能な軽鎖定常ドメインに折り畳まれるのに十分な長さの配列を含むべきである。CH1ドメインの場合、配列の全長は、ベータストランドを含む2つのシートを形成することが可能であり、およびマウスまたはヒトの少なくとも1つの軽鎖定常ドメインと相互作用することが可能なCH1ドメインに折り畳まれるのに十分な長さの配列を含むべきである。

## 【 0 0 7 6 】

語句「免疫グロブリン分子」には、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖が含まれる。重鎖は同一であっても異なってもよく、軽鎖は同一であっても異なってもよい。

## 【 0 0 7 7 】

語句「軽鎖」には、任意の生物体からの免疫グロブリン軽鎖配列が含まれ、特に明記しない限りヒトおよび軽鎖およびVpreB、ならびに代替りの軽鎖が含まれる。特に明記しない限り、軽鎖可変(VL)ドメインには3つの軽鎖CDRおよび4つのフレームワーク(FR)領域が一般に含まれる。一般に、完全長軽鎖には、アミノ末端からカルボキシル末端にかけて、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を含むVLドメインおよび軽鎖定常ドメインが含まれる。軽鎖には、例えば、軽鎖が現れるエピトープ結合性タンパク質が選択的に結合する第一または第二のエピトープのいずれにも選択的に結合しないものが含まれる。軽鎖には、軽鎖が現れるエピトープ結合性タンパク質が選択的に結合する1つまたは複数のエピトープに結合し認識するものか、重鎖による結合および認識を助けるものがさらに含まれる。共通の軽鎖はヒトV<sub>H</sub> 1-39 J 5遺伝子セグメントまたはヒトV<sub>H</sub> 3-20 J 1遺伝子セグメントに由来するものであり、その体細胞変異(例えば、親和性成熟)バージョンが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0078】

語句「マイクロモルの範囲」は、1～999マイクロモルを意味するものとする。語句「ナノモルの範囲」は、1～999ナノモルを意味するものとする。語句「ピコモルの範囲」は、1～999ピコモルを意味するものとする。

## 【0079】

語句「体細胞変異」には、クラススイッチングを経たB細胞からの核酸配列への言及が含まれ、ここで、クラススイッチングされたB細胞での免疫グロブリン可変領域の核酸配列（例えば、重鎖可変ドメインまたは重鎖CDRもしくはFR配列を含む）は、クラススイッチングの前のB細胞の核酸配列に同一でなく、例えば、クラススイッチングを経していないB細胞とクラススイッチングを経たB細胞との間のCDRまたはフレームワーク核酸配列において差がある。「体細胞変異」には、親和性成熟していないB細胞での対応する免疫グロブリン可変領域配列（すなわち、生殖系列細胞のゲノム中の配列）に同一ではない親和性成熟B細胞からの核酸配列への言及が含まれる。語句「体細胞変異」には、目的のエピトープへのB細胞の曝露の後のB細胞からの免疫グロブリン可変領域核酸配列への言及も含まれ、ここで、核酸配列は、目的のエピトープへのB細胞の曝露の前の対応する核酸配列と異なる。語句「体細胞変異」は、免疫原チャレンジに応じて動物で、例えばヒト免疫グロブリン可変領域核酸配列を有するマウスで生成される、そのような動物で生得的に作動する選択プロセスから生じる抗体からの配列を指す。

10

## 【0080】

核酸配列に関して用語「再構成されていない」には、動物細胞の生殖系列に存在する核酸配列が含まれる。

20

## 【0081】

語句「可変ドメイン」には、N末端からC末端（特に明記しない限り）の順序での以下のアミノ酸領域を含む免疫グロブリン軽鎖または重鎖（所望により改変される）のアミノ酸配列が含まれる：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

## 【0082】

## 共通の軽鎖

有用な多重特異性エピトープ結合性タンパク質、例えば二重特異性抗体を作製するこれまでの努力は、共通のパラダイムをしばしば共有する様々な問題によって妨害された：ヘテロダイマー二重特異的ヒト免疫グロブリンを対合させるのに適するフォーマットを、合理的に操作するか、試行錯誤を通して遺伝子操作するための配列の*in vitro*選択または操作。残念ながら、*in vitro*操作手法の全てではないにしてもそのほとんどは、個々の分子に適する（あるとしても）主にその場しのぎの修正を提供する。他方、ヒト治療法へと導くことが可能である適当な対合を選択するために複雑な生物体を使用するための*in vivo*方法は、実現されていない。

30

## 【0083】

一般に、天然のマウス配列は、しばしば、ヒトの治療的な配列のための良い供給源ではない。少なくともその理由から、共通のヒト軽鎖と対合するマウス重鎖免疫グロブリン可変領域を生成することは、実用性において限定される。共通のヒト軽鎖と結合する能力を維持し、かつエピトープの特異性および親和性を保持することを望みながら、不確定な結果を伴ってマウス重鎖可変配列をヒト化しようと試みるための試行錯誤のプロセスにおいて、より多くの*in vitro*操作努力が費やされる。そのようなプロセスの終わりに、最終生成物は特異性および親和性の一部を維持し、かつ共通の軽鎖と会合することができる場合があるが、最終的にはヒトでの免疫原性が根深いリスクとして残るだろう。

40

## 【0084】

したがって、ヒト治療法を作るのに適するマウスは、内因性のマウス重鎖可変領域遺伝子セグメントの代わりに、ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントの好適に大きなレパートリーを含むであろう。ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントは、リバースキメラ重鎖（すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常領域を含む重鎖）を形成するために、再構成して、内因性マウス重鎖定常ドメインと再結合することができるべきである。重鎖は、クラス

50

スイッチングおよび体細胞超変異が可能であるべきであり、これにより、重鎖可変ドメインの好適に大きなレパトリーを、マウスがヒト軽鎖可変領域の限られたレパトリーと会合することができるものを選択するために、利用可能である。

【0085】

複数の重鎖について共通の軽鎖を選択するマウスは、実際的な有用性を有する。様々な実施形態では、共通の軽鎖だけを発現することができるマウスで発現する抗体は、同一であるか実質的に同一の軽鎖と会合して発現することができる重鎖を有する。これは、二重特異性抗体の作製で特に有益である。例えば、そのようなマウスは第一の免疫原で免疫化して、第一のエピトープに特異的に結合する抗体を発現するB細胞を生成することができる。マウス（または、遺伝的に同じマウス）は、第二の免疫原で免疫化して、第二のエピトープに特異的に結合する抗体を発現するB細胞を生成することができる。重鎖可変領域はB細胞からクローニングすることができ、同じ重鎖定常領域および同じ軽鎖と共に発現し、かつ細胞で発現されて二重特異性抗体を作製することができ、ここで、二重特異性抗体の軽鎖成分は、軽鎖成分と会合して発現するようにマウスによって選択される。

10

【0086】

可変領域が生殖系列配列から逸脱する重鎖、例えば親和性成熟または体細胞変異可変領域を含む、重鎖のかなり多様なファミリーと好適に対合する免疫グロブリン軽鎖を生成するために、発明者らはマウスを操作した。様々な実施形態では、マウスは、ヒト軽鎖可変ドメインが、体細胞変異を含むヒト重鎖可変ドメインと対合するように工夫され、このようにして、ヒト治療法として使用するのに適する高親和性結合性タンパク質への経路を可能にする。

20

【0087】

生物体における抗体選択の長く複雑なプロセスを介して、遺伝子操作マウスは、ヒト重鎖可変ドメインの多様なコレクションを限定された数のヒト軽鎖選択肢と対合させることにおいて、生物学的に適切な選択をする。これを達成するために、多様なヒト重鎖可変ドメイン選択肢と一緒に限定された数のヒト軽鎖可変ドメイン選択肢を提示するようにマウスは操作される。免疫原チャレンジに際して、マウスは免疫原に対する抗体を発生させるためにそのレパトリーにおける解法の数に最大にし、これは、そのレパトリーでの軽鎖選択肢の数によって大きく、またはそれ単独で制限される。様々な実施形態では、これは、軽鎖可変ドメインの好適で適合性の体細胞変異をマウスに達成させることを含み、該変異は、それにもかかわらず、特に体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含む、比較的多様なヒト重鎖可変ドメインに適合する。

30

【0088】

限られたレパトリーの軽鎖選択肢を達成するために、天然のマウス軽鎖可変ドメインを作製または再構成する能力を、非機能的または実質的に非機能的にするようにマウスを操作する。これは、例えば、マウスの軽鎖可変領域遺伝子セグメントを欠失させることによって達成することができる。内因性マウス遺伝子座は、次に、外来性のヒト可変領域遺伝子セグメントが再構成して内因性マウス軽鎖定常領域遺伝子と再結合でき、再構成されたリバースキメラ軽鎖遺伝子（ヒト可変、マウス定常）を形成することができる方法で、選択された外来性の好適なヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント（これは、内因性のマウス軽鎖定常ドメインに作動可能に連結される）によって改変され得る。様々な実施形態では、軽鎖可変領域は、体細胞変異させることが可能である。様々な実施形態では、体細胞変異を得る軽鎖可変領域の能力を最大にするために、適当なエンハンサー（複数可）がマウスで保持される。例えば、ヒト可変領域遺伝子セグメントで内因性マウス可変領域遺伝子セグメントを置換するためにマウス遺伝子座を改変することにおいて、マウスのイントロンエンハンサーおよびマウス 3'エンハンサーは機能的に維持されるか、破壊されない。

40

【0089】

多様なリバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）重鎖と会合する限られたレパトリーのリバースキメラ（ヒト可変、マウス定常）軽鎖を発現する遺伝子操作マウスが提供され

50

る。様々な実施形態では、内因性マウス 軽鎖可変領域遺伝子セグメントが欠失し、内因性マウス 定常領域遺伝子に作動可能に連結される単一の（または2つの）ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントで置換される。ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントの体細胞超変異を最大にするための実施形態では、マウス イントロンエンハンサーおよびマウス 3'エンハンサーが維持される。様々な実施形態では、マウスは非機能的な 軽鎖遺伝子座、またはその欠失、またはその遺伝子座が 軽鎖を作製できないようにする欠失をさらに含む。

#### 【0090】

様々な実施形態では、内因性マウス軽鎖可変遺伝子セグメントを欠き、マウス定常領域に作動可能に連結されるヒト可変遺伝子セグメント（一実施形態では再構成されたヒトV/J配列）を含む、軽鎖可変領域遺伝子座を含む遺伝子操作マウスが提供され、ここで、遺伝子座は体細胞超変異を経ることが可能であり、および遺伝子座は、マウス定常領域に連結されたヒトV/J配列を含む軽鎖を発現する。したがって、様々な実施形態では、遺伝子座はマウス 3'エンハンサーを含み、それは正常または野生型のレベルの体細胞超変異と関連している。

#### 【0091】

目的の抗原で免疫化されるとき、様々な実施形態での遺伝子操作マウスは、1つまたは2つの再構成された軽鎖を発現し、軽鎖と共に機能するヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の多様な再構成を示すB細胞を生成し、これには、1つまたは2つの軽鎖が、例えば1から5個の体細胞変異を含むヒト軽鎖可変領域を含む実施形態が含まれる。様々な実施形態では、そのように発現されるヒト軽鎖は、マウスで発現される任意のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域と会合して発現することが可能である。

#### 【0092】

複数のエピトープに結合するエピトープ結合性タンパク質

本明細書に記載される組成物および方法は、複数のエピトープに高親和性で結合する結合性タンパク質、例えば二重特異性抗体を作製するために用いることができる。本発明の利点には、その各々が単一の軽鎖と会合する好適に高い結合性の（例えば、親和性成熟した）重鎖免疫グロブリン鎖を選択する能力が含まれる。

#### 【0093】

二重特異的結合性タンパク質の合成および発現は、一部は、2つの異なる重鎖と会合して発現することができる好適な軽鎖を同定することに関連する問題のため、および一部は、単離の問題のために厄介であった。本明細書に記載される方法および組成物は、遺伝子改変マウスが、他の点では天然であるプロセスを介して、体細胞変異された（例えば、親和性成熟した）重鎖を含む複数の重鎖と会合して発現することができる好適な軽鎖を選択することを可能にする。リパースキメラ重鎖（すなわち、ヒト可変およびマウス定常）を有する親和性成熟抗体を発現する、本明細書に記載される免疫化マウスの適するB細胞からのヒトV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>配列を同定して、適するヒト定常領域遺伝子配列（例えば、ヒトIgG1）を有する発現ベクターにインフレイムでクローニングすることができる。2つのそのような構築物を調製することができ、ここで、各構築物は異なるエピトープに結合するヒト重鎖可変ドメインをコードする。生殖系列配列における、またはB細胞（ここで、配列は体細胞変異されている）からのヒトV<sub>L</sub>の1つ（例えば、ヒトV<sub>L</sub> 1-39J 5またはヒトV<sub>L</sub> 3-20J 1）は、適するヒト定常領域遺伝子（例えば、ヒト 定常遺伝子）にインフレイムで融合させることができる。これら3つの完全なヒトの重鎖および軽鎖構築物は、発現のために適する細胞に入れることができる。細胞は、2つの主要な種を発現する：同一の軽鎖を有するホモダイマー重鎖、および同一の軽鎖を有するヘテロダイマー重鎖。これらの主要な種の容易な分離を可能にするために、重鎖の1つはプロテインA結合決定基が削除されるように改変され、これにより、ヘテロダイマー結合性タンパク質とは異なるホモダイマー結合性タンパク質の親和性がもたらされる。この問題に対処する組成物および方法は、参照により本明細書に組み込まれる、US 2010/0331527 A1として公開された、20010年6月25日に出願された「Readily

10

20

30

40

50

Isolated Bispecific Antibodies with Native Immunoglobulin Format」という名称のUSSN12/832,838に記載される。

【0094】

一態様では、本明細書に記載されるエピトープ結合性タンパク質が提供され、ここで、ヒトV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>配列は、目的のエピトープを含む抗原で免疫化されている本明細書に記載されるマウスに由来する。

【0095】

一実施形態では、第一および第二のポリペプチドを含むエピトープ結合性タンパク質が提供され、第一のポリペプチドは、N末端からC末端にかけて、第一のエピトープに選択的に結合する第一のエピトープ結合性領域、続いてIgG1、IgG2、IgG4およびその組合せから選択されるヒトIgGの第一のCH3領域を含む定常領域を含み；第二のポリペプチドは、N末端からC末端にかけて、第二のエピトープに選択的に結合する第二のエピトープ結合性領域、続いてIgG1、IgG2、IgG4およびその組合せから選択されるヒトIgGの第二のCH3領域を含む定常領域を含み、第二のCH3領域は、プロテインAへの第二のCH3ドメインの結合を低減または除去する改変を含む。

10

【0096】

一実施形態では、第二のCH3領域はH95R改変を含む(IMGTEクソンナンバリングによる；EUNナンバリングによりH435R)。別の実施形態では、第二のCH3領域はY96F改変をさらに含む(IMGTE；EUによりY436F)。

20

【0097】

一実施形態では、第二のCH3領域は改変ヒトIgG1に由来し、D16E、L18M、N44S、K52N、V57MおよびV82I(IMGTE；EUによりD356E、L358M、N384S、K392N、V397MおよびV422I)からなる群より選択される改変をさらに含む。

【0098】

一実施形態では、第二のCH3領域は改変ヒトIgG2に由来し、N44S、K52NおよびV82I(IMGTE；EUによりN384S、K392NおよびV422I)からなる群より選択される改変をさらに含む。

【0099】

一実施形態では、第二のCH3領域は改変ヒトIgG4に由来し、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79QおよびV82I(IMGTE；EUによりQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419QおよびV422I)からなる群より選択される改変をさらに含む。

30

【0100】

複数のエピトープに結合するエピトープ結合性タンパク質を作製するための1つの方法は、目的の第一のエピトープを含む抗原で本発明による第一のマウスを免疫化することであり、ここで、マウスは、軽鎖を再構成して形成することが可能な内因性マウスV<sub>L</sub>を含まない内因性免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座を含み、ここで、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座はマウス内因性軽鎖定常領域遺伝子に作動可能に連結される単一のヒトV<sub>L</sub>遺伝子セグメントであり、ヒトV<sub>L</sub>遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>L</sub>1-39J5およびヒトV<sub>L</sub>3-20J1から選択され、内因性マウスV<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントによって全部または一部が置換され、したがって、マウスによって作製される免疫グロブリン重鎖は、もっぱらまたは実質的に、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを含む重鎖である。免疫化されるとき、そのようなマウスは、2つのヒト軽鎖可変ドメインの1つだけ(例えば、ヒトV<sub>L</sub>1-39J5またはヒトV<sub>L</sub>3-20J1の1つ)を含むリパースキメラ抗体を作る。目的のエピトープに結合するV<sub>H</sub>をコードするB細胞が同定されると、V<sub>H</sub>(および、任意選択でV<sub>L</sub>)のヌクレオチド配列を引き出して(例えば、PCRによって)、適するヒト免疫グロブリン定常ドメインとインフレームで発現構築物にクローニングすることができる。第二のエピト-

40

50

に結合する第二のVHドメインを同定するためにこのプロセスを繰り返すことができ、第二のVH遺伝子配列を引き出して、第二の適する免疫グロブリン定常ドメインとインフレーションで発現ベクターにクローニングすることができる。第一および第二の免疫グロブリン定常ドメインは、同じか異なるアイソタイプであってよく、免疫グロブリン定常ドメインの1つ(他のものではない)を、本明細書またはUS 2010/0331527A1に記載されるように改変することができ、エピトープ結合性タンパク質を適する細胞で発現させ、例えばUS 2010/0331527A1に記載されるように、ホモダイマーエピトープ結合性タンパク質と比較してプロテインAに対するその異なった親和性に基づいて単離することができる。

#### 【0101】

一実施形態では、二重特異的エピトープ結合性タンパク質の作製方法であって、本明細書に記載されるマウスから第一の親和性成熟(例えば、1つまたは複数の体細胞超変異を含む)ヒトVHヌクレオチド配列(VH1)を同定すること、本明細書に記載されるマウスから第二の親和性成熟(例えば、1つまたは複数の体細胞超変異を含む)ヒトVHヌクレオチド配列(VH2)を同定すること、VH1をUS 2010/0331527A1に記載されるプロテインA決定基改変を欠くヒト重鎖とインフレーションでクローニングして重鎖1(HC1)を形成すること、VH2をUS 2010/0331527A1に記載されるプロテインA決定基を含むヒト重鎖とインフレーションでクローニングして重鎖2(HC2)を形成すること、HC1を含む発現ベクターおよびHC2を含む同じか異なる発現ベクターを細胞に導入することであって、ここで、細胞はヒト軽鎖定常ドメインに融合したヒトV<sub>1</sub>-39/ヒトJ<sub>5</sub>またはヒトV<sub>3</sub>-20/ヒトJ<sub>1</sub>を含むヒト免疫グロブリン軽鎖をさらに発現する、導入すること、VH1によってコードされるVHドメインおよびVH2によってコードされるVHドメインを含む二重特異的エピトープ結合性タンパク質を細胞に発現させること、ならびに単一特異的なホモダイマーエピトープ結合性タンパク質と比較して、プロテインAに結合するその異なった能力に基づいて二重特異的エピトープ結合性タンパク質を単離すること、を含む方法が提供される。具体的な実施形態では、HC1はIgG1であり、HC2は、改変H95R(IMG T; EUによりH435R)を含み、改変Y96F(IMG T; EUによりY436F)をさらに含むIgG1である。一実施形態では、VH1によってコードされるVHドメイン、VH2によってコードされるVHドメイン、またはその両方は、体細胞変異される。

#### 【0102】

共通のヒトVLと共に発現するヒトVH遺伝子

4つの異なる抗原に対して形成された親和性成熟抗体からの様々なヒト可変領域は、それらの関連軽鎖、またはヒトV<sub>1</sub>-39J<sub>5</sub>、ヒトV<sub>3</sub>-20J<sub>1</sub>もしくはヒトVpreBJ<sub>5</sub>から選択される少なくとも1つのヒト軽鎖と共に発現された(実施例1を参照)。抗原の各々に対する抗体について、異なる遺伝子ファミリーからの体細胞変異高親和性重鎖は、再構成されたヒト生殖系列V<sub>1</sub>-39J<sub>5</sub>およびV<sub>3</sub>-20J<sub>1</sub>領域と上手く対合し、重鎖および軽鎖を発現する細胞から分泌された。V<sub>1</sub>-39J<sub>5</sub>およびV<sub>3</sub>-20J<sub>1</sub>について、以下のヒトVHファミリーに由来するVHドメインが有利に発現した: 1-2、1-8、1-24、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、4-31、4-39、4-59、5-51および6-1。したがって、V<sub>1</sub>-39J<sub>5</sub>およびV<sub>3</sub>-20J<sub>1</sub>の片方または両方からヒトVLドメインの限られたレパートリーを発現するように遺伝子操作されているマウスは、ヒトVH遺伝子セグメントでマウスVH遺伝子セグメントを置換するように改変されたVH遺伝子座から、体細胞変異ヒトVHドメインの多様な集団を生成する。

#### 【0103】

単一の再構成された軽鎖(例えば、V<sub>1</sub>-39/JまたはV<sub>3</sub>-20/J)と会合しているリバースキメラ(ヒト可変、マウス定常)免疫グロブリン重鎖を発現するように遺伝子操作されたマウスは、目的の抗原で免疫化される場合、多様なヒトVセグメント再

10

20

30

40

50

構成を含み、かつ多様な特性（リガンドへの抗原の結合をブロックする能力に関して、および抗原のバリエーションに結合する能力に関して）を有する多様な高親和性抗原特異的抗体を発現するB細胞を生成した（実施例5から10を参照）。

【0104】

したがって、本明細書に記載されるマウスおよび方法は、多様な再構成から生じ、多種多様な親和性を示し（約ナノモルまたはそれ以下の $K_D$ を示すことを含む）、多種多様な特異性を示し（同じ抗原の異なるエピトープへの結合を含む）、同じか実質的に同じヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域と会合して発現する、体細胞変異ヒト重鎖可変ドメインを含む、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの作製および選択で有用である。

【0105】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物を作製、使用方法を当業者に説明するために提供され、発明者が彼らの発明とみなすものの範囲を限定するものではない。用いる数（例えば、量、温度など）に関して正確性を保証するように努めたが、多少の実験誤差および逸脱があることが考慮されるべきである。特に明記しない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏で示され、気圧は大気圧またはその近くである。

【実施例】

【0106】

（実施例1）

選択されたヒト軽鎖可変領域と会合するヒト重鎖可変領域の同定

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖を抗原特異的ヒト抗体からのヒト重鎖と共発現させることができるか否かを判定するために、*in vitro*発現系を構築した。

【0107】

遺伝子改変マウスでヒト抗体を生成する方法は、公知である（例えば、US6,596,541を参照、Regeneron Pharmaceuticals、VELOCIMMUNE（登録商標））。VELOCIMMUNE（登録商標）技術は、マウスが抗原刺激に応じてヒト可変領域およびマウス定常領域を含む抗体を生成するように、内因性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結されたヒト重鎖および軽鎖可変領域を含むゲノムを有する遺伝子改変マウスの生成を含む。VELOCIMMUNE（登録商標）マウスから生成される抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNAは、完全にヒトである。最初に、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。下記のように、抗体は、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特徴付けされ、選択される。マウス定常領域は所望のヒト定常領域で置換され、非IgMアイソタイプ、例えば野生型または改変されたIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含む完全にヒトの抗体が生成される。選択される定常領域は具体的な用途によって異なることができるが、高親和性抗原結合および標的特異性特性は可変領域に存在する。

【0108】

VELOCIMMUNE（登録商標）マウスを血管形成を促進する増殖因子（抗原C）で免疫化し、当技術分野で認められる標準技術を用いて抗原特異的ヒト抗体を単離し、V遺伝子の使用について配列決定をした。選択された抗体をヒト重鎖および軽鎖定常領域にクローニングし、69個の重鎖を以下の3つのヒト軽鎖の1つとの対合のために選択した：（1）ヒト定常領域に連結された関連軽鎖、（2）ヒト定常領域に連結された再構成されたヒト生殖系列V<sub>H</sub>1-39J<sub>H</sub>5、または（3）ヒト定常領域に連結された再構成されたヒト生殖系列V<sub>H</sub>3-20J<sub>H</sub>1。重鎖および軽鎖の各対を、標準技術を用いてCHO-K1細胞に共トランスフェクトした。上清中の抗体の存在は、ELISAアッセイで抗ヒトIgGによって検出された。各重鎖/軽鎖対について抗体力価（ng/ml）を決定し、様々な再構成された生殖系列軽鎖による力価を、親の抗体分子（すなわち、関連軽鎖と対になった重鎖）で得られた力価と比較し、天然の力価の百分率を計算した（表1）。V<sub>H</sub>：重鎖可変遺伝子。ND：現在の実験条件下で発現は検出されない。

【0109】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1					
V <sub>H</sub>	抗体力価 (ng/ml)			天然の力価の百分率	
	関連 LC	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1	Vκ1-39Jκ5	Vκ3-20Jκ1
3-15	63	23	11	36.2	17.5
1-2	103	53	ND	51.1	-
3-23	83	60	23	72.0	27.5
3-33	15	77	ND	499.4	-
4-31	22	69	17	309.4	76.7
3-7	53	35	28	65.2	53.1
-	22	32	19	148.8	89.3
1-24	3	13	ND	455.2	-
3-33	1	47	ND	5266.7	-
3-33	58	37	ND	63.1	-
-	110	67	18	60.6	16.5
3-23	127	123	21	96.5	16.3
3-33	28	16	2	57.7	7.1
3-23	32	50	38	157.1	119.4
-	18	45	18	254.3	101.7
3-9	1	30	23	2508.3	1900.0
3-11	12	26	6	225.9	48.3
1-8	16	ND	13	-	81.8
3-33	54	81	10	150.7	19.1
-	34	9	ND	25.9	-
3-20	7	14	54	203.0	809.0
3-33	19	38	ND	200.5	-
3-11	48	ND	203	-	423.6
-	11	23	8	212.7	74.5
3-33	168	138	182	82.0	108.2
3-20	117	67	100	57.5	86.1
3-23	86	61	132	70.7	154.1
3-33	20	12	33	60.9	165.3
4-31	69	92	52	133.8	75.0
3-23	87	78	62	89.5	71.2
1-2	31	82	51	263.0	164.6
3-23	53	93	151	175.4	285.4

10

20

30

40

【 0 1 1 0 】

【表 1 - 2】

-	11	8	17	75.7	151.4
3-33	114	36	27	31.6	23.4
3-15	73	39	44	53.7	59.6
3-33	1	34	16	5600.0	2683.3
3-9	58	112	57	192.9	97.6
3-33	67	20	105	30.1	157.0
3-33	34	21	24	62.7	70.4
3-20	10	49	91	478.4	888.2
3-33	66	32	25	48.6	38.2
3-23	17	59	56	342.7	329.8
-	58	108	19	184.4	32.9
-	68	54	20	79.4	29.9
3-33	42	35	32	83.3	75.4
-	29	19	13	67.1	43.9
3-9	24	34	29	137.3	118.4
3-30/33	17	33	7	195.2	43.1
3-7	25	70	74	284.6	301.6
3-33	87	127	ND	145.1	-
6-1	28	56	ND	201.8	-
3-33	56	39	20	69.9	36.1
3-33	10	53	1	520.6	6.9
3-33	20	67	10	337.2	52.3
3-33	11	36	18	316.8	158.4
3-23	12	42	32	356.8	272.9
3-33	66	95	15	143.6	22.5
3-15	55	68	ND	123.1	-
-	32	68	3	210.9	10.6
1-8	28	48	ND	170.9	-
3-33	124	192	21	154.3	17.0
3-33	0	113	ND	56550.0	-
3-33	10	157	1	1505.8	12.5
3-33	6	86	15	1385.5	243.5
3-23	70	115	22	163.5	31.0
3-7	71	117	21	164.6	29.6
3-33	82	100	47	122.7	57.1
3-7	124	161	41	130.0	33.5

10

20

30

40

類似した実験では、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスをいくつかの異なる抗原で免疫化し、抗原特異的ヒト抗体の選択された重鎖を、様々な再構成されたヒト生殖系列軽鎖と対合するそれらの能力について試験した（前記の通り）。この実験で用いた抗原には、コレステロールホメオスタシスに關与する酵素（抗原A）、グルコースホメオスタシスの調節に關与する血清ホルモン（抗原B）、血管形成を促進する増殖因子（抗原C）および細胞表面レセプター（抗原D）が含まれた。抗原特異的抗体は各免疫化群のマウスから単離され、重鎖および軽鎖可変領域がクローニングされ、配列決定された。重鎖および軽鎖の配列から、V遺伝子の使用が決定され、選択された重鎖はそれらの関連軽鎖または再構成されたヒト生殖系列V 1 - 39 J 5領域と対にさせられた。各重鎖/軽鎖対

50

を、CHO-K1細胞に共トランスフェクトし、上清中の抗体の存在はELISAアッセイで抗ヒトIgGによって検出した。各重鎖/軽鎖対について抗体力価(μg/ml)を決定し、様々な再構成されたヒト生殖系列軽鎖による力価を、親の抗体分子(すなわち、関連軽鎖と対になった重鎖)で得られた力価と比較し、天然の力価の百分率を計算した(表2)。V<sub>H</sub>:重鎖可変遺伝子。V<sub>L</sub>:軽鎖可変遺伝子。ND:現在の実験条件下で発現は検出されない。

【0111】

【表2-1】

抗原	抗体	V <sub>H</sub>	V <sub>K</sub>	力価 (μg/ml)			天然の力価の百分率
				V <sub>H</sub> のみ	V <sub>H</sub> + V <sub>K</sub>	V <sub>H</sub> + V <sub>K</sub> 1-39J <sub>K</sub> 5	
A	320	1-18	2-30	0.3	3.1	2.0	66
	321	2-5	2-28	0.4	0.4	1.9	448
	334	2-5	2-28	0.4	2.7	2.0	73
	313	3-13	3-15	0.5	0.7	4.5	670
	316	3-23	4-1	0.3	0.2	4.1	2174
	315	3-30	4-1	0.3	0.2	3.2	1327
	318	4-59	1-17	0.3	4.6	4.0	86
B	257	3-13	1-5	0.4	3.1	3.2	104
	283	3-13	1-5	0.4	5.4	3.7	69
	637	3-13	1-5	0.4	4.3	3.0	70
	638	3-13	1-5	0.4	4.1	3.3	82
	624	3-23	1-17	0.3	5.0	3.9	79
	284	3-30	1-17	0.3	4.6	3.4	75
	653	3-33	1-17	0.3	4.3	0.3	7
	268	4-34	1-27	0.3	5.5	3.8	69
633	4-34	1-27	0.6	6.9	3.0	44	
C	730	3-7	1-5	0.3	1.1	2.8	249
	728	3-7	1-5	0.3	2.0	3.2	157

【0112】

10

20

30

【表 2 - 2】

	691	3-9	3-20	0.3	2.8	3.1	109
	749	3-33	3-15	0.3	3.8	2.3	62
	750	3-33	1-16	0.3	3.0	2.8	92
	724	3-33	1-17	0.3	2.3	3.4	151
	706	3-33	1-16	0.3	3.6	3.0	84
	744	1-18	1-12	0.4	5.1	3.0	59
	696	3-11	1-16	0.4	3.0	2.9	97
	685	3-13	3-20	0.3	0.5	3.4	734
	732	3-15	1-17	0.3	4.5	3.2	72
	694	3-15	1-5	0.4	5.2	2.9	55
	743	3-23	1-12	0.3	3.2	0.3	10
	742	3-23	2-28	0.4	4.2	3.1	74
	693	3-23	1-12	0.5	4.2	4.0	94
D	136	3-23	2-28	0.4	5.0	2.7	55
	155	3-30	1-16	0.4	1.0	2.2	221
	163	3-30	1-16	0.3	0.6	3.0	506
	171	3-30	1-16	0.3	1.0	2.8	295
	145	3-43	1-5	0.4	4.4	2.9	65
	49	3-48	3-11	0.3	1.7	2.6	155
	51	3-48	1-39	0.1	1.9	0.1	4
	159	3-7	6-21	0.4	3.9	3.6	92
	169	3-7	6-21	0.3	1.3	3.1	235
	134	3-9	1-5	0.4	5.0	2.9	58
	141	4-31	1-33	2.4	4.2	2.6	63
	142	4-31	1-33	0.4	4.2	2.8	67

10

20

これらの実験から得られた結果は、様々な遺伝子ファミリーからの体細胞変異高親和性重鎖は、再構成されたヒト生殖系列V<sub>H</sub> 1-39J 5およびV<sub>H</sub> 3-20J 1領域と対合することができ、細胞から正常な抗体分子として分泌させることができることを示す。表1に示すように、親の抗体の関連軽鎖と比較して、抗体力価は、再構成されたヒトV<sub>H</sub> 1-39J 5軽鎖と対にした場合、約61%（69中42個）の重鎖で増加し、再構成されたヒトV<sub>H</sub> 3-20J 1軽鎖と対にした場合、約29%（69中20個）の重鎖で増加した。重鎖の約20%（69中14個）について、親の抗体の関連軽鎖と比較して、再構成されたヒト生殖系列軽鎖の両方が発現の増加を付与した。表2に示すように、再構成されたヒト生殖系列V<sub>H</sub> 1-39J 5領域は、親の抗体の関連軽鎖と比較して、様々な異なるクラスの抗原に特異的ないくつかの重鎖の発現の増加を付与した。親の抗体の関連軽鎖と比較して、重鎖の約35%（15/43）で抗体力価は2倍を超えて増加した。2つの重鎖（315および316）では、増加は親の抗体と比較して10倍を超えていた。親の抗体の関連軽鎖と比較して発現の増加を示した全ての重鎖の中で、ファミリー3（V<sub>H</sub> 3）の重鎖は、他の重鎖可変領域遺伝子ファミリーと比較してより多く提示されている。これは、再構成されたヒト生殖系列V<sub>H</sub> 1-39J 5およびV<sub>H</sub> 3-20J 1軽鎖と対合するヒトV<sub>H</sub> 3重鎖の好ましい関係を示す。

30

40

## 【0113】

## （実施例2）

## 再構成されたヒト生殖系列軽鎖遺伝子座の生成

マウスゲノム細菌人工染色体（BAC）クローン302g12および254m04（Invitrogen）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年）Hi

50

gh-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis、Nature Biotech. 21巻(6号):652~659頁を参照)を用いて、様々な再構成されたヒト生殖系列軽鎖ターゲティングベクターが作製された。これらの2つのBACクローンを用いて、ゲノム構築物を単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を含むように操作し、内因性可変および連結遺伝子セグメントを欠失させるために事前に改変しておいた内因性軽鎖遺伝子座に挿入した。

#### 【0114】

A.再構成されたヒト生殖系列軽鎖ターゲティングベクターの構築

当技術分野で認められる標準の分子生物学技術を用いて、3つの異なる再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を作製した。これらの3つの領域を構築するために用いたヒト可変遺伝子セグメントには、再構成されたヒトV<sub>1-39J</sub> 5配列、再構成されたヒトV<sub>3-20J</sub> 1配列および再構成されたヒトVpreBJ 5配列が含まれた。

#### 【0115】

マウスV<sub>3-7</sub>遺伝子のエクソン1(リーダーペプチドをコードする)およびイントロン1を含むDNAセグメントを、新規DNA合成(Integrated DNA Technologies)によって作製した。天然に存在するB1pI制限酵素部位までの5'非翻訳領域の一部が含まれた。ヒトV<sub>1-39</sub>およびV<sub>3-20</sub>遺伝子のエクソンを、ヒトゲノムBACライブラリーからPCR増幅した。フォワードプライマーは、マウスV<sub>3-7</sub>遺伝子のイントロン1のスプライス受容部位を含む5'伸長部を有した。ヒトV<sub>1-39</sub>配列のPCRのために用いられたリバースプライマーは、ヒトJ<sub>5</sub>をコードする伸長部を含んでいたが、ヒトV<sub>3-20</sub>配列のPCRのために用いられたリバースプライマーはヒトJ<sub>1</sub>をコードする伸長部を含んでいた。ヒトVpreBJ 5配列は、新規DNA合成(Integrated DNA Technologies)によって作製した。スプライスドナー部位を含むヒトJ<sub>1</sub>-Cイントロンの一部を、プラスミドpBS-296-HA18-PIsceIからPCR増幅した。フォワードPCRプライマーは、ヒトJ<sub>5</sub>、J<sub>1</sub>またはJ<sub>5</sub>配列のいずれかの一部をコードする伸長部を含んでいた。リバースプライマーは、イントロンにおいて事前に操作されたPI-SceI部位を含んでいた。

#### 【0116】

マウスV<sub>3-7</sub>エクソン1/イントロン1、ヒト可変軽鎖エクソンおよびヒトJ<sub>1</sub>-Cイントロン断片を重複伸長PCRによって一つにまとめ(sew)、B1pIおよびPI-SceIで消化し、ヒトV<sub>3-15</sub>可変遺伝子セグメントからのプロモーターを含むプラスミドpBS-296-HA18-PIsceIにライゲーションした。プラスミドpBS-296-HA18-PIsceI内のloxedハイグロマイシンカセットを、NotIおよびAscI部位が隣接するFRTedハイグロマイシンカセットで置換した。このプラスミドのNotI/PI-SceI断片を、マウスJ<sub>1</sub>-Cイントロンの一部、マウスC<sub>1</sub>エクソン、およびマウスES細胞での相同組み換えのために3'相同性アームを提供したマウス遺伝子座の下流のゲノム配列の約75kbを含んでいた改変マウスBAC 254m04にライゲーションした。次にこのBACのNotI/AscI断片を、FRTedネオマイシンカセットおよびマウスES細胞での相同組み換えのための内因性遺伝子座の上流のゲノム配列の約23kbを含んでいた改変マウスBAC 302g12にライゲーションした。

#### 【0117】

B.再構成されたヒト生殖系列V<sub>1-39J</sub> 5ターゲティングベクター(図1)ターゲティングベクターへのクローニングのために、操作軽鎖挿入物の5'末端および3'末端に制限酵素部位を導入した:5'末端にAscI部位、3'末端にPI-SceI部位。5'AscI部位および3'PI-SceI部位の中で、5'から3'までのターゲティング構築物は、マウスBACクローン302g12から得られた内因性マウス軽鎖遺伝子座の5'側配列を含む5'相同性アーム、FRTedネオマイシン耐性遺

10

20

30

40

50

伝子、ヒトV<sub>3-15</sub>プロモーターを含むゲノム配列、マウスV<sub>3-7</sub>可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスV<sub>3-7</sub>可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列V<sub>1-39J5</sub>領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJ-Cイントロンの一部を含むゲノム配列、ならびにマウスBACクローン254m04から得られた内因性マウスJ<sub>5</sub>遺伝子セグメントの3'側配列を含む3'相同性アームを含んでいた(図1、中央)。内因性マウス軽鎖遺伝子座の上流および最も3'側のJ<sub>5</sub>遺伝子セグメントの下流(例えば、内因性3'エンハンサー)の遺伝子および/または配列は、ターゲティング構築物によって改変されていなかった(図1を参照)。操作されたヒトV<sub>1-39J5</sub>遺伝子座の配列を、配列番号1に示す。

#### 【0118】

再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域中の配列に位置するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、BAC DNAへの再構成されたヒト生殖系列V<sub>1-39J5</sub>領域のターゲティング挿入を確認した。簡潔には、マウスV<sub>3-7</sub>リーダー配列の3'側イントロン配列は、プライマーULC-m1F(AGGTGAGGGTACAGATAAGTGTATGAG;配列番号2)およびULC-m1R(TGACAAATGCCTAATTATA GTGATCA;配列番号3)で確認した。再構成されたヒト生殖系列V<sub>1-39J5</sub>領域のオープンリーディングフレームは、プライマー1633-h2F(GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A;配列番号4)および1633-h2R(TGCAAACTGG ATGCAGCATA G;配列番号5)で確認した。ネオマイシンカセットは、プライマーneoF(GGTGGAGAGGCTATTCGGC;配列番号6)およびneoR(GAACACGGCGGCATCAG;配列番号7)で確認した。再構成されたヒト生殖系列V<sub>1-39J5</sub>領域を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を形成するために、マウスES細胞をエレクトロポレーションするために、次にターゲティングBAC DNAを用いた。

#### 【0119】

内因性遺伝子座に挿入された操作されたV<sub>1-39J5</sub>軽鎖領域に特異的なプローブを用いるTAQMANTMスクリーニングおよび核型分析によって、陽性のES細胞クローンを確認した。簡潔には、ネオマイシンマーカージェノムの中で結合するプローブneoP(TGGGCACACACAGACAAATCGGCTG;配列番号8)、マウスV<sub>3-7</sub>リーダー配列の3'側のイントロン配列中で結合するプローブULC-m1P(CCATTTATGATGCTCCATGCC TCTCTGTTC;配列番号9)、および再構成されたヒト生殖系列V<sub>1-39J5</sub>オープンリーディングフレーム中で結合するプローブ1633h2P(ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT;配列番号10)。生殖系列V<sub>1-39J5</sub>軽鎖領域を発現する同腹仔を生ませるために、雌性マウスに移植するために、次に陽性のES細胞クローンを用いた。

#### 【0120】

あるいは、再構成されたヒト生殖系列V<sub>1-39J5</sub>軽鎖領域を有するES細胞は、ターゲティング構築物によって導入されたFRTedネオマイシンカセットを除去するために、FLPを発現する構築物でトランスフェクトされる。任意選択で、ネオマイシンカセットは、FLPリコンビナーゼを発現するマウスを繁殖させることによって除去される(例えば、US6,774,279)。任意選択で、ネオマイシンカセットは、マウスで保持される。

#### 【0121】

C.再構成されたヒト生殖系列V<sub>3-20J1</sub>ターゲティングベクター(図2)同じように、再構成されたヒト生殖系列V<sub>3-20J1</sub>領域を発現する操作軽鎖遺伝子座を、5'から3'にかけて、マウスBACクローン302g12から得られた内因性マウス軽鎖遺伝子座の5'側配列を含む5'相同性アーム、FRTedネオマイシン耐性遺伝子、ヒトV<sub>3-15</sub>プロモーターを含むゲノム配列、マウスV<sub>3-7</sub>可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスV<sub>3-7</sub>可変遺伝子セグメントのイントロン配

10

20

30

40

50

列、再構成されたヒト生殖系列V 3 - 20 J 1領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJ - C イントロンの一部を含むゲノム配列、ならびにマウスBACクローン254m04から得られた内因性マウスJ 5遺伝子セグメントの3'側配列を含む3'相同性アームを含むターゲッティング構築物を用いて作製した(図2、中央)。操作されたヒトV 3 - 20 J 1遺伝子座の配列を、配列番号11に示す。

#### 【0122】

再構成されたヒト生殖系列V 3 - 20 J 1軽鎖領域中の配列に位置するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、BAC DNAへの再構成されたヒト生殖系列V 3 - 20 J 1領域のターゲッティング挿入を確認した。簡潔には、マウスV 3 - 7リーダー配列の3'側イントロン配列は、プライマーULC - m1F(配列番号2)およびULC - m1R(配列番号3)で確認した。再構成されたヒト生殖系列V 3 - 20 J 1領域のオープンリーディングフレームは、プライマー1635 - h2F(TCCAGGCACC CTGTC TT TG; 配列番号12)および1635 - h2R(AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; 配列番号13)で確認した。ネオマイシンカセットは、プライマーneoF(配列番号6)およびneoR(配列番号7)で確認した。再構成されたヒト生殖系列V 3 - 20 J 1軽鎖を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を形成するために、マウスES細胞をエレクトロポレーションするために、次にターゲッティングBAC DNAを用いた。

#### 【0123】

内因性 軽鎖遺伝子座に挿入された操作されたV 3 - 20 J 1軽鎖領域に特異的なプローブを用いるTaqman<sup>TM</sup>スクリーニングおよび核型分析によって、陽性のES細胞クローンを確認した。簡潔には、ネオマイシンマーカー遺伝子の中で結合するプローブneoP(配列番号8)、マウスV 3 - 7リーダー配列の中で結合するプローブULC - m1P(配列番号9)、およびヒトV 3 - 20 J 1オープンリーディングフレームの中で結合するプローブ1635h2P(AAAGAGCCAC CCTCTCTCTGC A G G G; 配列番号14)。雌性マウスに移植するために、陽性のES細胞クローンを次に用いた。ヒト生殖系列V 3 - 20 J 1軽鎖領域を発現する同腹仔。

#### 【0124】

あるいは、ヒト生殖系列V 3 - 20 J 1軽鎖領域を有するES細胞は、ターゲッティング構築物によって導入されたFRTedネオマイシンカセットを除去するために、FLPを発現する構築物でトランスフェクトされてもよい。任意選択で、ネオマイシンカセットは、FLPリコンビナーゼを発現するマウスを繁殖させることによって除去されてもよい(例えば、US6,774,279)。任意選択で、ネオマイシンカセットは、マウスで保持される。

#### 【0125】

D.再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5ターゲッティングベクター(図3) 同じように、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域を発現する操作軽鎖遺伝子座を、5'から3'にかけて、マウスBACクローン302g12から得られた内因性マウス 軽鎖遺伝子座の5'側配列を含む5'相同性アーム、FRTedネオマイシン耐性遺伝子、ヒトV 3 - 15プロモーターを含むゲノム配列、マウスV 3 - 7可変遺伝子セグメントのリーダー配列、マウスV 3 - 7可変遺伝子セグメントのイントロン配列、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域のオープンリーディングフレーム、ヒトJ - C イントロンの一部を含むゲノム配列、ならびにマウスBACクローン254m04から得られた内因性マウスJ 5遺伝子セグメントの3'側配列を含む3'相同性アームを含むターゲッティング構築物を用いて作製した(図3、中央)。操作されたヒトVpreBJ 5遺伝子座の配列を、配列番号15に示す。

#### 【0126】

再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域軽鎖領域中の配列に位置するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、BAC DNAへの再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域のターゲッティング挿入を確認した。簡潔には、マウ

10

20

30

40

50

スV 3 - 7リーダ配列の3'側イントロン配列は、プライマーULC - m1F (配列番号2) およびULC - m1R (配列番号3) で確認した。再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5領域のオープンリーディングフレームは、プライマー1616 - h1F (TGTCCTCGGC CCTTGG A ; 配列番号16) および1616 - h1R (CCGATGTCAT GGTCGTTCTCT ; 配列番号17) で確認した。ネオマイシンカセットは、プライマーneoF (配列番号6) およびneoR (配列番号7) で確認した。再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5軽鎖を発現するキメラマウスを生成するための改変ES細胞を形成するために、マウスES細胞をエレクトロポレーションするために、次にターゲティングBAC DNAを用いた。

#### 【0127】

内因性 軽鎖遺伝子座に挿入された操作されたVpreBJ 5軽鎖領域に特異的なプローブを用いるTAQMAN<sup>TM</sup>スクリーニングおよび核型分析によって、陽性のES細胞クローンを確認する。簡潔には、ネオマイシンマーカー遺伝子の中で結合するプローブneoP (配列番号8)、マウスIgV 3 - 7リーダ配列の中で結合するプローブULC - m1P (配列番号9)、およびヒトVpreBJ 5オープンリーディングフレームの中で結合するプローブ1616h1P (ACAATCCGCC TCACCTGCACCCT ; 配列番号18)。生殖系列軽鎖領域を発現する同腹仔を生ませるために、雌性マウスに移植するために、次に陽性のES細胞クローンをを用いる。

#### 【0128】

あるいは、再構成されたヒト生殖系列VpreBJ 5軽鎖領域を有するES細胞は、ターゲティング構築物によって導入されたFRTedネオマイシンカセットを除去するために、FLPを発現する構築物でトランスフェクトされる。任意選択で、ネオマイシンカセットは、FLPリコンビナーゼを発現するマウスを繁殖させることによって除去される(例えば、US6,774,279)。任意選択で、ネオマイシンカセットは、マウスで保持される。

#### 【0129】

##### (実施例3)

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖を発現するマウスの生成

上記のターゲティングES細胞をドナーES細胞として用い、VELOCIMOUSE (登録商標) 法によって8細胞期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年) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25巻(1号): 91~99頁を参照)。特有な再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の存在を検出する対立遺伝子アッセイ(Valenzuelaら、上記)の改変型を用いる遺伝子タイピングによって、操作されたヒト生殖系列V 1 - 39J 5軽鎖領域、V 3 - 20J 1軽鎖領域またはVpreBJ 5軽鎖領域を独立して有するVELOCIMICE (登録商標) を同定する。

#### 【0130】

再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の発現を特徴付けするために、仔を遺伝子タイピングし、特有な再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域についてヘテロ接合である仔を選択する。

#### 【0131】

##### (実施例4)

単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖を発現するマウスの繁殖

##### A. 内因性Ig ノックアウト(KO)

操作された軽鎖遺伝子座の使用を最適化するために、再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の1つを有するマウスを、内因性 軽鎖遺伝子座に欠失を含む別のマウスと繁殖させる。この様式において、得られる子孫は、それらの唯一の軽鎖として、実施例2に記載され

10

20

30

40

50

る再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を発現する。繁殖は、当技術分野で認められる標準技術によって、あるいは商業的な繁殖家（例えば、Jackson Laboratory）によって実施される。操作された軽鎖遺伝子座、および内因性軽鎖遺伝子座の欠失を有するマウス系統は、特有な軽鎖領域の存在および内因性マウス軽鎖の非存在についてスクリーニングされる。

#### 【0132】

##### B．ヒト化内因性重鎖遺伝子座

操作されたヒト生殖系列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因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と繁殖させられる（US 6,596,541を参照；VELOCIMMUNE（登録商標）マウス、Regeneron Pharmaceuticals, Inc.）。VELOCIMMUNE（登録商標）マウスは、マウスが抗原刺激に応じ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生成するように、内因性マウス定常領域遺伝子座に作動可能に連結されたヒト重鎖可変領域を含むゲノムを含む。抗体の重鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、ヒト重鎖定常領域をコードするDNAに作動可能に連結させる。DNAは次に、抗体の完全なヒトの重鎖を発現することが可能な細胞で発現される。

10

#### 【0133】

ヒトVH遺伝子座による内因性マウスVH遺伝子座の置換、および内因性軽鎖遺伝子座に単一の再構成されたヒト生殖系列VL領域を有するマウスが得られる。目的の抗原による免疫化に際して、単一のヒト軽鎖（ヒトVLおよびマウスCL）と体細胞変異重鎖（ヒトVHおよびマウスCH）を含むリバースキメラ抗体が得られる。抗体を発現するB細胞のVHおよびVLヌクレオチド配列を同定し、完全にヒトの抗体を、適する発現系でVHおよびVLヌクレオチド配列をヒトCHおよびCLヌクレオチド配列と融合させることによって作製する。

20

#### 【0134】

##### （実施例5）

ヒト重鎖および再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域を発現するマウスからの抗体の生成操作されたヒト軽鎖領域を含むマウスを、他の内因性Ig遺伝子座（実施例4に記載の）の改変および欠失を含む様々な所望の系統へ繁殖させた後、選択されたマウスを目的の抗原で免疫化することができる。

30

#### 【0135】

一般に、単一の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域の1つを含むVELOCIMMUNE（登録商標）マウスは抗原でチャレンジされ、リンパ細胞（B細胞など）が動物の血清から収集される。不死のハイブリドーマ細胞系を調製するためにリンパ細胞を骨髄腫細胞系と融合させ、そのようなハイブリドーマ細胞系は、ヒト可変重鎖および再構成されたヒト生殖系列軽鎖を含む抗体（これは、免疫化のために用いる抗原に特異的である）を生成するハイブリドーマ細胞系を同定するためにスクリーニングおよび選択される。重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNAを単離し、重鎖および軽鎖の望ましいアイソタイプ定常領域に連結させる。内因性マウス配列の存在および内因性遺伝子座に存在するあらゆるさらなるシス活性エレメントのために、各抗体の単一の軽鎖は体細胞変異することがある。これは、単一の軽鎖および多様な重鎖配列を含む抗原特異的レパートリーにさらなる多様性を加える。生じるクローニングされた抗体配列は、CHO細胞などの細胞でその後発現される。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DNAは、抗原特異的リンパ球から直接的に同定される。

40

#### 【0136】

最初に、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。上記のように、抗体は、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特徴付けられ、選択される。体細胞変異したヒト重鎖および本発明の再構成されたヒト生殖系列軽鎖領域に由来する単一の軽鎖を含む完全なヒトの抗体を生成するために、マウス定常領域は所望のヒト定常領域で置換される。適するヒト定常領域には、例えば野生型ま

50

たは改変型の I g G 1 または I g G 4 が含まれる。

【 0 1 3 7 】

ヒト V<sub>H</sub>、D および J 遺伝子セグメントによる内因性マウス重鎖遺伝子座の置換、ならびに操作された生殖系列 V<sub>H</sub> 1 - 3 9 J<sub>H</sub> 5 ヒト軽鎖領域または操作された生殖系列 V<sub>L</sub> 3 - 2 0 J<sub>L</sub> 1 ヒト軽鎖領域 ( 上記 ) による内因性マウス 軽鎖遺伝子座の置換を含む V E L O C I M M U N E ( 登録商標 ) マウスの別々のコホートを、ヒト細胞表面レセプタータンパク質 ( 抗原 E ) で免疫化した。抗原 E は、3 ~ 4 日おきの 6 回の連続的な注射でマウスの後ろの足蹠に直接投与する。注射の前に、2 から 3 マイクログラムの抗原 E を 1 0 μ g の C p G オリゴヌクレオチド ( カタログ t l r 1 - m o d n - O D N 1 8 2 6 オリゴヌクレオチド ; I n V i v o g e n , S a n D i e g o , C A ) および 2 5 μ g の A d j u - P h o s ( リン酸アルミニウムゲルアジュバント、カタログ H - 7 1 6 3 9 - 2 5 0 ; B r e n n t a g B i o s e c t o r , F r e d e r i k s s u n d , D e n m a r k ) と混合する。屠殺の 3 ~ 5 日前に与えられる最終抗原リコールの前に、合計 6 回の注射を与える。4 回目および 6 回目の注射の後に血液を収集し、抗体免疫応答を標準の抗原特異的イムノアッセイによってモニタリングする。

10

【 0 1 3 8 】

所望の免疫応答が達成されるとき、脾細胞を収集し、それらの生存能力を保存し、ハイブリドーマ細胞系を形成するためにマウス骨髄腫細胞と融合させる。抗原 E 特異的な共通軽鎖抗体を生成する細胞系を同定するために、ハイブリドーマ細胞系をスクリーニングし、選択する。この技術を用いて、いくつかの抗抗原 E 特異的な共通軽鎖抗体 ( すなわち、ヒト重鎖可変ドメイン、同じヒト軽鎖可変ドメインおよびマウス定常ドメインを有する抗体 ) が得られる。

20

【 0 1 3 9 】

あるいは、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる U . S . 2 0 0 7 / 0 2 8 0 9 4 5 A 1 に記載されるように、抗抗原 E 共通軽鎖抗体は、骨髄腫細胞との融合なしに抗原陽性 B 細胞から直接的に単離される。この方法を用いて、いくつかの完全なヒトの抗抗原 E 共通軽鎖抗体 ( すなわち、ヒト重鎖可変ドメイン、操作されたヒト V<sub>H</sub> 1 - 3 9 J<sub>H</sub> 5 軽鎖か操作されたヒト V<sub>L</sub> 3 - 2 0 J<sub>L</sub> 1 軽鎖領域のいずれか、およびヒト定常ドメインを有する抗体 ) が得られた。

【 0 1 4 0 】

この実施例の方法に従って生成された例示的な抗抗原 E 共通軽鎖抗体の生物学的特性は、下に示すセクションで詳細に記載される。

30

【 0 1 4 1 】

( 実施例 6 )

抗原特異的共通軽鎖抗体での重鎖遺伝子セグメントの使用

生成されたヒト抗抗原 E 共通軽鎖抗体の構造を分析するために、重鎖抗体可変領域をコードする核酸をクローニングし、配列決定をした。抗体の核酸配列および予測されたアミノ酸配列から、操作されたヒト V<sub>H</sub> 1 - 3 9 J<sub>H</sub> 5 軽鎖か操作されたヒト V<sub>L</sub> 3 - 2 0 J<sub>L</sub> 1 軽鎖領域のいずれかを含む免疫化 V E L O C I M M U N E ( 登録商標 ) マウスから得られた、選択された共通軽鎖抗体の重鎖可変領域 ( H C V R ) について、遺伝子使用を特定した。結果を表 3 および 4 に示す。それらは、ヒト V<sub>H</sub> 1 - 3 9 またはヒト V<sub>L</sub> 3 - 2 0 に由来する軽鎖だけから軽鎖を発現するマウスを使用するとき、様々な再構成のために、本発明によるマウスが様々なヒト重鎖遺伝子セグメントから抗原特異的共通軽鎖抗体を生成することを示す。2、3、4 および 5 ファミリーのヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、様々なヒト D<sub>H</sub> セグメントおよびヒト J<sub>H</sub> セグメントと再構成されて、抗原特異的抗体を与えた。

40

【 0 1 4 2 】

【表 3 - 1】

表 3			
VK1-39JK5 共通軽鎖抗体			
抗体	HCVR		
	V <sub>H</sub>	D <sub>H</sub>	J <sub>H</sub>
2952	2-5	6-6	1
3022	3-23	3-10	4
3028	3-23	3-3	4
2955	3-30	6-6	1
3043	3-30	6-6	3
3014	3-30	1-7	4
3015	3-30	1-7	4
3023	3-30	1-7	4
3024	3-30	1-7	4
3032	3-30	1-7	4
3013	3-30	5-12	4
3042	3-30	5-12	4
2985	3-30	6-13	4
2997	3-30	6-13	4
3011	3-30	6-13	4
3047	3-30	6-13	4
3018	3-30	6-6	4
2948	3-30	7-27	4
2987	3-30	7-27	4
2996	3-30	7-27	4
3005	3-30	7-27	4
3012	3-30	7-27	4
3020	3-30	7-27	4
3021	3-30	7-27	4
3025	3-30	7-27	4
3030	3-30	7-27	4

10

20

30

【 0 1 4 3 】

【表 3 - 2】

3036	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5
2949	3-30	6-6	5
2950	3-30	6-6	5
2954	3-30	6-6	5
2978	3-30	6-6	5
3016	3-30	6-6	5
3017	3-30	6-6	5
3033	3-30	6-6	5
3041	3-30	6-6	5
3004	3-30	7-27	5
3010	4-59	3-16	3
3019	4-59	3-16	3
2964	4-59	3-22	3
3027	4-59	3-16	4
3046	5-51	5-5	3

10

【 0 1 4 4 】

20

【表 4】

表 4			
Vκ3-20Jκ1 共通軽鎖抗体			
抗体	HCVR		
	V <sub>H</sub>	D <sub>H</sub>	J <sub>H</sub>
2968	4-39	1-26	3
2975	5-51	6-13	5
2972	5-51	3-16	6

30

(実施例 7)

Luminex<sup>TM</sup> アッセイによる抗原特異的共通軽鎖抗体のブロック能力の判定

ビーズベースのアッセイで、抗原 E に対する 98 個のヒト共通軽鎖抗体を、抗原 E への抗原 E の天然のリガンド (リガンド Y) の結合をブロックするそれらの能力について試験した。

【 0 1 4 5 】

抗原 E の細胞外ドメイン (ECD) を 2 つの myc エピトープタグおよび 6 × ヒスチジンタグとコンジュゲートさせ (抗原 E - mmH)、MES 緩衝液中の 20 μg/mL の濃度でカルボキシル化マイクロスフェアにアミンカップリングさせた。混合液を室温で 2 時間インキュベートし、続いて 1 M トリス pH 8.0 でビーズ非活性化を行い、続いて 0.05% (v/v) の Tween-20 を含む PBS で洗浄した。次にビーズを 2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) を含む PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) でブロックした。96 穴フィルタープレート中で、抗原 E 特異的共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で 1:15 に希釈した。抗体上清と同じ媒質成分による模擬上清を含む陰性対照を調製した。抗原 E 標識ビーズを上清に加え、4 晩で一晚インキュベートした。ビオチン化リガンド Y タンパク質を 0.06 nM の最終濃度まで加え、室温で 2 時間インキュベートした。抗原 E - myc - myc - 6 His 標識ビーズに結合したビオチン化リガンド Y の検出を、ストレプトアビジンとコンジュゲートされた R - フィコエリトリン (Moss Inc

40

50

、Pasadena、MD)で判定し、続いてLuminex<sup>TM</sup>フローサイトメトリーベースのアナライザーで測定した。リガンドYのない試料のバックグラウンド平均蛍光強度(MFI)を、全ての試料から引いた。ブロック百分率は、各試料のバックグラウンドを引いたMFIを調整された陰性対照値で割り、100を掛け、生じた値を100から引くことによって計算された。

【0146】

同様の実験において、抗原Eに対する同じ98個のヒト共通軽鎖抗体を、リガンドY標識ビーズへの抗原Eの結合をブロックするそれらの能力について試験した。

【0147】

簡潔には、MES緩衝液に希釈した20 $\mu$ g/mLの濃度で、リガンドYをカルボキシル化マイクロスフェアにアミンカップリングさせた。混合液を室温で2時間インキュベートし、続いて1MトリスpH8でビーズの非活性化を行い、続いて0.05%(v/v)のTween-20を含むPBSで洗浄した。次にビーズを2%(w/v)BSA(Sigma-Aldrich Corp.、St. Louis、MO)を含むPBS(Irvine Scientific、Santa Ana、CA)でブロックした。96穴フィルタープレート中で、抗原E特異的共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で1:15に希釈した。抗体上清と同じ媒質成分による模擬上清を含む陰性対照を調製した。ビオチン化抗原E-mmHを0.42nMの最終濃度まで加え、4で一晚インキュベートした。リガンドY標識ビーズを次に抗体/抗原E混合物に加え、室温で2時間インキュベートした。リガンドYビーズに結合したビオチン化抗原E-mmHの検出は、ストレプトアビジンと  
10  
20

【0148】

表5および6は、両方のLuminex<sup>TM</sup>アッセイで試験された全98個の抗抗原E共通軽鎖抗体のブロック百分率を示す。ND:現在の実験条件下で判定されない。

【0149】

上記の第一のLuminex<sup>TM</sup>実験では、V1-39J5操作軽鎖を含む80個の共通軽鎖抗体を、抗原E標識ビーズへのリガンドY結合をブロックするそれらの能力について試験した。これらの80個の共通軽鎖抗体のうち、68個は>50%のブロックを示し、12個は<50%のブロック(6個は25~50%のブロック、6個は<25%のブロック)を示した。V3-20J1操作軽鎖を含む18個の共通軽鎖抗体については、12個は抗原E標識ビーズへのリガンドY結合の>50%のブロックを示し、6個は<50%のブロック(3個は25~50%のブロック、3個は<25%のブロック)を示した。  
30

【0150】

上記の第二のLuminex<sup>TM</sup>実験では、V1-39J5操作軽鎖を含む同じ80個の共通軽鎖抗体を、リガンドY標識ビーズへの抗原Eの結合をブロックするそれらの能力について試験した。これらの80個の共通軽鎖抗体のうち、36個は>50%のブロックを示し、44個は<50%のブロック(27個は25~50%のブロック、17個は<25%のブロック)を示した。V3-20J1操作軽鎖を含む18個の共通軽鎖抗体については、1個はリガンドY標識ビーズへの抗原Eの結合の>50%のブロックを示し、17個は<50%のブロック(5個は25~50%のブロック、12個は<25%のブロック)を示した。  
40

【0151】

表5および6のデータは、表3および4に記載される再構成が、その関連受容体抗原EへのリガンドYの結合を様々な程度の効力でブロックした抗抗原E特異的共通軽鎖抗体を生成したことを証明し、このことは、抗原Eに関して重複するおよび重複しないエピト  
50

プ特異性を有する抗体を含む表 3 および 4 の抗抗原 E 共通軽鎖抗体と矛盾しない。

【 0 1 5 2 】

【表 5 - 1】

表 5		
Vκ1-39Jκ5 共通軽鎖抗体		
抗体	% 抗原E標識ビーズのブロック	% 溶液における抗原Eのブロック
2948	81.1	47.8
2948G	38.6	ND
2949	97.6	78.8
2949G	97.1	73.7
2950	96.2	81.9
2950G	89.8	31.4
2952	96.1	74.3
2952G	93.5	39.9

【 0 1 5 3 】

【表 5 - 2】

2954	93.7	70.1
2954G	91.7	30.1
2955	75.8	30.0
2955G	71.8	ND
2964	92.1	31.4
2964G	94.6	43.0
2978	98.0	95.1
2978G	13.9	94.1
2982	92.8	78.5
2982G	41.9	52.4
2985	39.5	31.2
2985G	2.0	5.0
2987	81.7	67.8
2987G	26.6	29.3
2996	87.3	55.3
2996G	95.9	38.4
2997	93.4	70.6
2997G	9.7	7.5
3004	79.0	48.4
3004G	60.3	40.7
3005	97.4	93.5
3005G	77.5	75.6
3010	98.0	82.6
3010G	97.9	81.0
3011	87.4	42.8
3011G	83.5	41.7
3012	91.0	60.8
3012G	52.4	16.8
3013	80.3	65.8
3013G	17.5	15.4
3014	63.4	20.7
3014G	74.4	28.5
3015	89.1	55.7
3015G	58.8	17.3
3016	97.1	81.6
3016G	93.1	66.4
3017	94.8	70.2
3017G	87.9	40.8
3018	85.4	54.0
3018G	26.1	12.7

10

20

30

40

【 0 1 5 4 】

【表 5 - 3】

3019	99.3	92.4
3019G	99.3	88.1
3020	96.7	90.3
3020G	85.2	41.5
3021	74.5	26.1
3021G	81.1	27.4
3022	65.2	17.6
3022G	67.2	9.1
3023	71.4	28.5
3023G	73.8	29.7
3024	73.9	32.6
3024G	89.0	10.0
3025	70.7	15.6
3025G	76.7	24.3
3027	96.2	61.6
3027G	98.6	75.3
3028	92.4	29.0
3028G	87.3	28.8
3030	6.0	10.6
3030G	41.3	14.2
3032	76.5	31.4
3032G	17.7	11.0
3033	98.2	86.1
3033G	93.6	64.0
3036	74.7	32.7
3036G	90.1	51.2
3041	95.3	75.9
3041G	92.4	51.6
3042	88.1	73.3
3042G	60.9	25.2
3043	90.8	65.8
3043G	92.8	60.3

10

20

30

【 0 1 5 5 】

【表 6】

表 6		
V <sub>K</sub> 3-20J <sub>K</sub> 1 共通軽鎖抗体		
抗体	% 抗原E標識ピーズのプロック	% 溶液における抗原Eのプロック
2968	97.1	73.3
2968G	67.1	14.6
2969	51.7	20.3
2969G	37.2	16.5
2970	92.2	34.2
2970G	92.7	27.2
2971	23.4	11.6
2971G	18.8	18.9
2972	67.1	38.8
2972G	64.5	39.2
2973	77.7	27.0
2973G	51.1	20.7
2974	57.8	12.4
2974G	69.9	17.6
2975	49.4	18.2
2975G	32.0	19.5
2976	1.0	1.0
2976G	50.4	20.4

(実施例 8)

E L I S Aによる抗原特異的共通軽鎖抗体のプロック能力の判定

E L I S Aアッセイにおいて、抗原Eに対するヒト共通軽鎖抗体を、リガンドYコーティング表面への抗原Eの結合をブロックするそれらの能力について試験した。

【 0 1 5 6 】

リガンドYをPBSに希釈した2 μg/mLの濃度で96穴プレートにコーティングし、一晚インキュベートし、続いて0.05% Tween-20を含むPBSで4回洗浄した。次にプレートを0.5% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) を含むPBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) によって室温で1時間ブロックした。別々のプレート中で、抗抗原E共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で1:10に希釈した。抗体の同じ成分を有する模擬上清を、陰性対照として用いた。抗原E-mmH (上記) を0.150 nMの最終濃度まで加え、室温で1時間インキュベートした。次に、リガンドYを含むプレートに抗体/抗原E-mmH混合物を加え、室温で1時間インキュベートした。リガンドYに結合した抗原E-mmHの検出は、抗ペンタ-His抗体とコンジュゲートさせた西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (Qiagen, Valencia, CA) で判定し、硫酸によって中和されるテトラメチルベンジジン (TMB) 基質 (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いる標準の比色応答によって発色させた (develop)。吸光度をOD450で0.1秒間読み取った。抗原Eのない試料のバックグラウンド吸光度を、全ての試料から引いた。ブロック百分率は、各試料のバックグラウンドを引いたMFIを調整された陰性対照値で割り、100を掛け、生じた値を100から引くことによって計算された。

【 0 1 5 7 】

表7および8は、ELISAアッセイで試験された全98個の抗抗原E共通軽鎖抗体のブロック百分率を示す。ND：現在の実験条件下で判定されない。

【0158】

この実施例に記載されているように、リガンドYコーティング表面への抗原Eの結合をブロックするそれらの能力を試験された、V<sub>H</sub>1-39J<sub>H</sub>5操作軽鎖を含む80個の共通軽鎖抗体のうち、22個は>50%のブロックを示し、58個は<50%のブロック(20個は25~50%のブロック、38個は<25%のブロック)を示した。V<sub>H</sub>3-20J<sub>H</sub>1操作軽鎖を含む18個の共通軽鎖抗体については、1個はリガンドYコーティング表面への抗原Eの結合の>50%のブロックを示し、17個は<50%のブロック(5個は25~50%のブロック、12個は<25%のブロック)を示した。

10

【0159】

これらの結果はまた、抗原Eに関して重複するおよび重複しないエピトープ特異性を有する抗体を含む抗原E特異的共通軽鎖抗体プールと矛盾しない。

【0160】

【表7-1】

表 7	
V <sub>K</sub> 1-39J <sub>K</sub> 5 共通軽鎖抗体	
抗体	% 溶液における抗原Eのブロック
2948	21.8
2948G	22.9
2949	79.5
2949G	71.5
2950	80.4
2950G	30.9
2952	66.9
2952G	47.3

20

30

【0161】

【表 7 - 2】

2954	55.9	
2954G	44.7	
2955	12.1	
2955G	25.6	
2964	34.8	
2964G	47.7	
2978	90.0	
2978G	90.2	10
2982	59.0	
2982G	20.4	
2985	10.5	
2985G	ND	
2987	31.4	
2987G	ND	
2996	29.3	
2996G	ND	
2997	48.7	20
2997G	ND	
3004	16.7	
3004G	3.5	
3005	87.2	
3005G	54.3	
3010	74.5	
3010G	84.6	
3011	19.4	
3011G	ND	
3012	45.0	30
3012G	12.6	
3013	39.0	
3013G	9.6	
3014	5.2	
3014G	17.1	
3015	23.7	
3015G	10.2	
3016	78.1	
3016G	37.4	40
3017	61.6	
3017G	25.2	
3018	40.6	
3018G	14.5	

【 0 1 6 2 】

【表 7 - 3】

3019	94.6
3019G	92.3
3020	80.8
3020G	ND
3021	7.6
3021G	20.7
3022	2.4
3022G	15.0
3023	9.1
3023G	19.2
3024	7.5
3024G	15.2
3025	ND
3025G	13.9
3027	61.4
3027G	82.7
3028	40.3
3028G	12.3
3030	ND
3030G	9.5
3032	ND
3032G	13.1
3033	77.1
3033G	32.9
3036	17.6
3036G	24.6
3041	59.3
3041G	30.7
3042	39.9
3042G	16.1
3043	57.4
3043G	46.1

10

20

30

【 0 1 6 3 】

【表 8】

表 8	
V $\kappa$ 3-20J $\kappa$ 1 共通軽鎖抗体	
抗体	% 溶液における抗原Eのブロック
2968	68.9
2968G	15.2
2969	10.1
2969G	23.6
2970	34.3
2970G	41.3
2971	6.3
2971G	27.1
2972	9.6
2972G	35.7
2973	20.7
2973G	23.1
2974	ND
2974G	22.0
2975	8.7
2975G	19.2
2976	4.6
2976G	26.7

10

20

(実施例 9)

抗原特異的共通軽鎖抗体についての B I A c o r e<sup>T M</sup> 親和性判定

B I A c o r e<sup>T M</sup> T 1 0 0 機器 ( G E H e a l t h c a r e ) を用いる S P R ( 表面プラズモン共鳴 ) によって、選択された抗体上清の平衡解離定数 (  $K_D$  ) を判定した。全てのデータは、ランニング緩衝液および試料緩衝液の両方として H B S - E P ( 1 0 m M H e p e s 、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 3 m M E D T A 、 0 . 0 5 % 界面活性剤 P 2 0 、 p H 7 . 4 ) を用いて 2 5 で得られた。標準のアミンカップリング化学を用いて高密度の抗ヒト F c 抗体で事前に誘導体化させた C M 5 センサーチップ表面で、抗体を粗製上清試料から捕捉した。捕捉工程中、合計 3 分間、上清を 3  $\mu$  L / 分の流速で抗ヒト F c 表面全域に注入した。捕捉工程の後に、3 5  $\mu$  L / 分の流速で 2 分間の、ランニング緩衝液または 1 0 0 n M の濃度の分析物の注入が続いた。捕捉された抗体からの抗原の解離を、6 分間モニタリングした。捕捉された抗体は、1 0 m M グリシン、p H 1 . 5 の短時間注入によって除去した。緩衝液注入からのセンサーグラムを分析物センサーグラムから引き、それによって捕捉表面からの抗体の解離に起因するアーチファクトを除くことによって、全てのセンサーグラムをダブルリファレンス ( d o u b l e r e f e r e n c e ) とした。B I A c o r e<sup>T M</sup> T 1 0 0 評価ソフトウェア v 2 . 1 を用いて、各抗体の結合データを、マストランスポートを有する 1 : 1 結合モデルにあてはめた。結果を表 9 および 1 0 に示す。

30

40

【 0 1 6 4 】

表 3 および 4 に示す再構成を含む共通軽鎖抗体の結合親和性は様々であり、ほとんど全てはナノモル範囲の  $K_D$  を示す。親和性データは、高親和性で、クローン選択され、体細胞変異している表 3 および 4 に記載の再構成された可変ドメインの組合せ会合から生じる共通軽鎖抗体と矛盾しない。前に示すデータと合わせると、表 3 および 4 に記載される共

50

通軽鎖抗体は、抗原 E の上の 1 つまたは複数のエピトープに特異性を示す、多様な高親和性抗体の集合を含む。

【 0 1 6 5 】

【 表 9 - 1 】

表 9		
Vκ1-39Jκ5 共通軽鎖抗体		
抗体	100nM 抗原 E	
	K <sub>D</sub> (nM)	T <sub>1/2</sub> (分)
2948	8.83	28
2948G	95.0	1
2949	3.57	18
2949G	6.37	9
2950	4.91	17
2950G	13.6	5
2952	6.25	7
2952G	7.16	4
2954	2.37	24
2954G	5.30	9
2955	14.4	6
2955G	12.0	4
2964	14.8	6
2964G	13.0	9
2978	1.91	49
2978G	1.80	58
2982	6.41	19

10

20

30

【 0 1 6 6 】

【表 9 - 2】

2982G	16.3	9
2985	64.4	9
2985G	2.44	8
2987	21.0	11
2987G	37.6	4
2996	10.8	9
2996G	24.0	2
2997	7.75	19
2997G	151	1
3004	46.5	14
3004G	1.93	91
3005	2.35	108
3005G	6.96	27
3010	4.13	26
3010G	2.10	49
3011	59.1	5
3011G	41.7	5
3012	9.71	20
3012G	89.9	2
3013	20.2	20
3013G	13.2	4
3014	213	4
3014G	36.8	3
3015	29.1	11
3015G	65.9	0
3016	4.99	17
3016G	18.9	4
3017	9.83	8
3017G	55.4	2
3018	11.3	36
3018G	32.5	3
3019	1.54	59
3019G	2.29	42
3020	5.41	39
3020G	41.9	6
3021	50.1	6
3021G	26.8	4
3022	25.7	17
3022G	20.8	12
3023	263	9

10

20

30

40

【 0 1 6 7 】

【表 9 - 3】

3023G	103	5
3024	58.8	7
3024G	7.09	10
3025	35.2	6
3025G	42.5	8
3027	7.15	6
3027G	4.24	18
3028	6.89	37
3028G	7.23	22
3030	46.2	7
3030G	128	3
3032	53.2	9
3032G	13.0	1
3033	4.61	17
3033G	12.0	5
3036	284	12
3036G	18.2	10
3041	6.90	12
3041G	22.9	2
3042	9.46	34
3042G	85.5	3
3043	9.26	29
3043G	13.1	22

10

20

【 0 1 6 8 】

【表 1 0 - 1】

表 10		
Vκ3-20Jκ1 共通輕鎖抗体		
抗体	100nM 抗原 E	
	K <sub>D</sub> (nM)	T <sub>1/2</sub> (分)
2968	5.50	8
2968G	305	0
2969	34.9	2
2969G	181	1
2970G	12.3	3
2971G	32.8	22
2972	6.02	13
2972G	74.6	26
2973	5.35	39
2973G	11.0	44

30

40

【 0 1 6 9 】

【表 10 - 2】

2974	256	0
2974G	138	0
2975	38.0	2
2975G	134	1
2976	6.73	10
2976G	656	8

(実施例 10)

Luminesx<sup>TM</sup> アッセイによる抗原特異的共通軽鎖抗体の結合特異性の判定

10

選択された抗抗原 E 共通軽鎖抗体を、抗原 E の ECD および抗原 E ECD バリエーションに結合するそれらの能力について試験した (例えば、そのアミノ酸残基の約 10% がヒトタンパク質と異なる、カニクイザルオルソログ (Mf 抗原 E); ECD の C 末端から最後の 10 アミノ酸を欠く抗原 E の欠失変異体 (抗原 E - CT); ならびにリガンド Y との相互作用が疑われる位置にアラニン置換を含む 2 つの変異体 (抗原 E - Ala 1 および抗原 E - Ala 2))。抗原 E タンパク質は CHO 細胞で生成され、各々は myc - myc - His C 末端タグを含んでいた。

【0170】

結合試験のために、抗 myc モノクローナル抗体 (MAb 9E10、ハイブリドーマ細胞系 CRL - 1729<sup>TM</sup>; ATCC, Manassas, VA) で共有結合コーティングされた  $1 \times 10^6$  個のマイクロスフェア (Luminesx<sup>TM</sup>) ビーズと一緒に室温で 2 時間のインキュベーションによって、1 mL の培養培地からの抗原 E ECD タンパク質またはバリエーションタンパク質 (上記) を捕捉した。次に、ビーズを使用前に PBS で洗浄した。抗抗原 E 共通軽鎖抗体を含む上清を緩衝液で 1:4 に希釈し、96 穴フィルタープレートに加えた。抗体のない模擬上清を、陰性対照として用いた。捕捉された抗原 E タンパク質を含むビーズを次に抗体試料に加え (ウェルにつき 3000 個のビーズ)、4 で一晩インキュベートした。次の日、試料ビーズを洗浄し、結合した共通軽鎖抗体を R - フィコエリトリンとコンジュゲートさせた抗ヒト IgG 抗体で検出した。ビーズの蛍光強度 (約 100 個のビーズを各抗原 E タンパク質への各抗体試料の結合について計数した) は、Luminesx<sup>TM</sup> フローサイトメトリーベースのアナライザーで測定し、ビーズ / 抗体相互作用につき少なくとも 100 個の計数されたビーズの中央蛍光強度 (MFI) を記録した。結果を表 11 および 12 に示す。

20

30

【0171】

【表 1 1 - 1】

表 11					
Vκ1-39Jκ5 共通輕鎖抗体					
抗体	平均蛍光強度 (MFI)				
	抗原 E-ECD	抗原 E-ΔCT	抗原 E-Ala1	抗原 E-Ala2	Mf 抗原 E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51

10

20

30

40

【 0 1 7 2 】

【表 1 1 - 2】

3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912
3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210

10

20

30

40

【 0 1 7 3 】

【表 1 1 - 3】

3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

10

【 0 1 7 4 】

【表 1 2】

表 12					
Vk3-20Jk1 共通軽鎖抗体					
抗体	平均蛍光強度 (MFI)				
	抗原 E-ECD	抗原 E-ΔCT	抗原 E-Ala1	抗原 E-Ala2	Mf 抗原 E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

20

30

抗抗原 E 共通軽鎖抗体上清は、抗原 E - E C D に連結されたビーズへの高特異的結合を示した。これらのビーズについては、陰性対照模擬上清は、抗原 E - E C D ビーズ試料と組み合わせたときは無視できるシグナル ( $< 10 \text{ MFI}$ ) をもたらししたが、抗抗原 E 共通軽鎖抗体を含む上清は、強い結合シグナルを示した (98 個の抗体上清については  $2627$  の平均  $\text{MFI}$ ;  $91/98$  の抗体試料については  $\text{MFI} > 500$ )。

40

【 0 1 7 5 】

抗原 E の E C D の上の異なるエピトープを同定する選択された抗抗原 E 共通軽鎖抗体の能力の測定手段として、バリエーションに対する抗体の相対的結合を判定した。天然の抗原 E - E C D 結合試験について上で記載したように、全 4 つの抗原 E バリエーションを抗  $\text{myc LumineX}^{\text{TM}}$  ビーズに捕捉し、相対的な結合比 ( $\text{MFI}_{\text{バリエーション}} / \text{MFI}_{\text{抗原 E-ECD}}$ ) を判定した。表 1 1 および 1 2 に示す 98 個の試験された共通軽鎖抗体上清に

50

ついて、平均比 ( M F I バリエーション / M F I 抗原 E - E C D ) は各バリエーションで異なり、  
 ピーズ上でのタンパク質の様々な捕捉量を反映しているようである ( 抗原 E - C T、抗  
 原 E - A l a 1、抗原 E - A l a 2 および M f 抗原 E についてそれぞれ 0 . 6 1、2 . 9  
 、2 . 0 および 1 . 0 の平均比)。各タンパク質バリエーションについて、98 個の試験され  
 た共通軽鎖抗体のサブセットの結合は、大きく低減された結合を示し、このことは、所与  
 のバリエーションを特徴付けた変異への感度を示した。例えば、共通軽鎖抗体試料の 19 個は  
 、 < 8 % の M F I バリエーション / M F I 抗原 E - E C D で M f 抗原 E に結合した。この群の  
 多くは高いか適度に高い親和性の抗体 ( 5 個は  $K_D < 5 n M$ 、15 個は  $K_D < 50 n M$  )  
 を含むので、この群の低いシグナルは、低い親和性からではなく、天然の抗原 E - E C D  
 と所与のバリエーションとの間の配列 ( エピトープ ) の差への感度から生じるようである。

10

【 0 1 7 6 】

表 3 および 4 に記載される共通軽鎖抗体が、抗原 E の上の複数のエピトープを特異的に  
 認識する抗原 E 特異的共通軽鎖抗体の多様な群を実際に表すことを、これらのデータは証  
 明する。

【 図 1 】

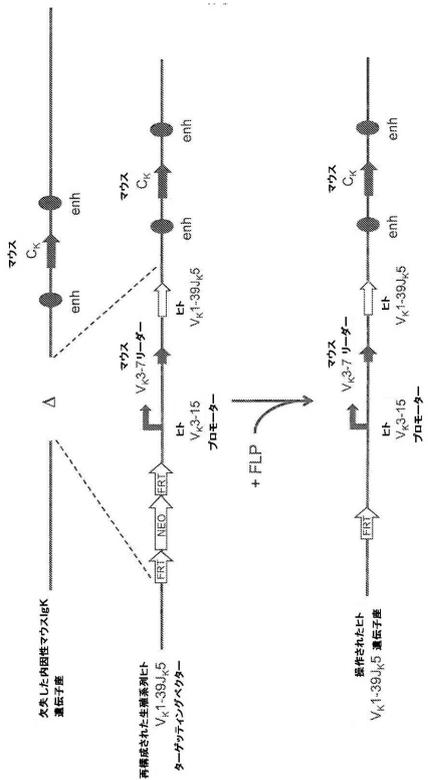


Figure 1

【 図 2 】

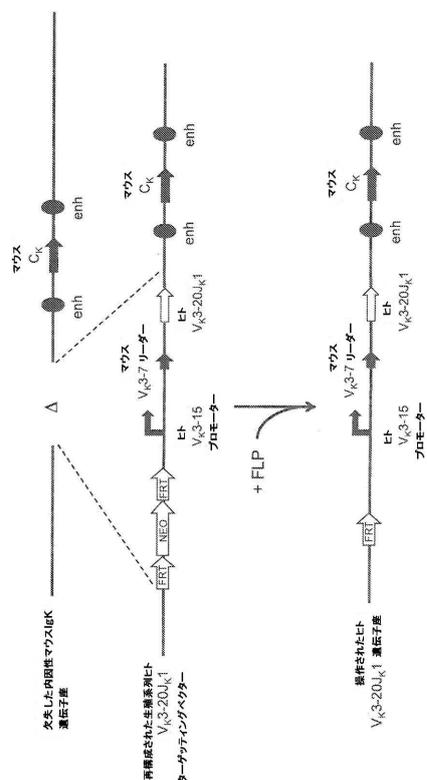


Figure 2



## フロントページの続き

- (72)発明者 マクホワイター, ジョン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, クレセント ドライブ 20  
35
- (72)発明者 マクドナルド, リン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10605, ホワイト プレインズ, ゲッドニー ウェイ  
16
- (72)発明者 スティーブズ, ショーン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94158, サンフランシスコ, ベリー ストリート 3  
55 ナンバー413
- (72)発明者 デイビス, サミュエル  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10024, ニューヨーク, ウエスト 88ティーエイチ  
ストリート 332, アpartment ビー2
- (72)発明者 バックラー, デイビッド アール.  
アメリカ合衆国 ニュージャージ 07930, チェスター, エリック コート 6
- (72)発明者 マーフィー, アンドリュー ジェイ.  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10520, クロトン-オン-ハドソン, ニュートン コー  
ト 10

審査官 松浦 安紀子

- (56)参考文献 特表2004-524841(JP,A)  
特開2007-054076(JP,A)  
米国特許出願公開第2006/0015957(US,A1)  
特表2006-515503(JP,A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01K 67/027

C12P 21/08

C12N 15/09

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)