

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-535418

(P2022-535418A)

(43)公表日 令和4年8月8日(2022.8.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 4
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/0781(2010.01)	C 1 2 N	5/0781		
C 1 2 N	5/20 (2006.01)	C 1 2 N	5/20		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全161頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-571945(P2021-571945)	(71)出願人	597160510 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国10591-6707 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番
(86)(22)出願日	令和2年6月4日(2020.6.4)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85)翻訳文提出日	令和3年12月23日(2021.12.23)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86)国際出願番号	PCT/US2020/036114	(72)発明者	マクウィルター, ジョン アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールドソーミ
(87)国際公開番号	WO2020/247623		
(87)国際公開日	令和2年12月10日(2020.12.10)		
(31)優先権主張番号	62/857,712		
(32)優先日	令和1年6月5日(2019.6.5)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 カッパ遺伝子座から発現される限られたラムダ軽鎖レパートリーを有する非ヒト動物及びその使用

(57)【要約】

本開示は、とりわけ、遺伝子改変された非ヒト動物であって、その生殖細胞系列ゲノムは、非ヒトC 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む、遺伝子改変された非ヒト動物を提供する。遺伝子改変された非ヒト動物のB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む。そのような動物、そのような動物からの組織、及びそのような動物からの細胞は、抗体、例えば、二重特異的抗体を生成するための有効なプラットフォームを表す。

【選択図】 図 1 A

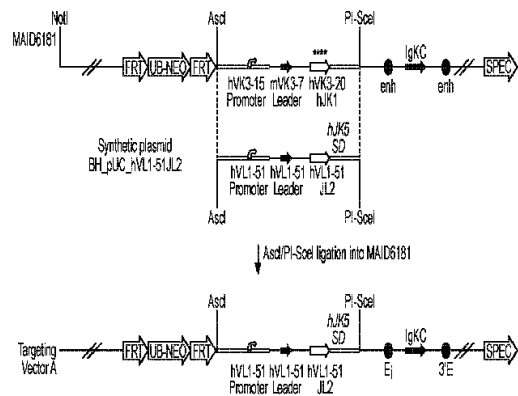


Figure 1A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

遺伝子改変されたげっ歯類であって、その生殖細胞系列ゲノムは、  
げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含み、

前記遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、前記遺伝子改変されたげっ歯類。

10

## 【請求項 2】

前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である、請求項 1 に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【請求項 3】

前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてヘテロ接合性である、請求項 1 に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【請求項 4】

前記生殖細胞系列ゲノムは、  
1 つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座をさらに含み、

前記遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及びげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

20

## 【請求項 5】

前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である、請求項 4 に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

30

## 【請求項 6】

前記遺伝子改変されたげっ歯類は、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座でげっ歯類 C 遺伝子を欠く、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【請求項 7】

前記ヒト V 遺伝子セグメントは、V<sub>1-51</sub>、V<sub>5-45</sub>、V<sub>1-44</sub>、V<sub>1-40</sub>、V<sub>3-21</sub>、または V<sub>2-14</sub> を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

40

## 【請求項 8】

前記ヒト V 遺伝子セグメントは、V<sub>1-51</sub> を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【請求項 9】

前記ヒト V 遺伝子セグメントは、V<sub>2-14</sub> を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【請求項 10】

前記ヒト J 遺伝子セグメントは、J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>6</sub>、または J<sub>7</sub> を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【請求項 11】

50

前記ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 12】

前記 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1 つ以上の内因性 V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の内因性 D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の内因性 J<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、またはそれらの組み合わせの代わりである、請求項 4 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 13】

前記 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1 つ以上の内因性 V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の内因性 D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の内因性 J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントにそれぞれ置き換わる、請求項 4 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。 10

【請求項 14】

前記 1 つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子は、1 つ以上の内因性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子である、請求項 12 または 13 に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 15】

(i) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 3 - 74、V<sub>H</sub> 3 - 73、V<sub>H</sub> 3 - 72、V<sub>H</sub> 2 - 70、V<sub>H</sub> 1 - 69、V<sub>H</sub> 3 - 66、V<sub>H</sub> 3 - 64、V<sub>H</sub> 4 - 61、V<sub>H</sub> 4 - 59、V<sub>H</sub> 1 - 58、V<sub>H</sub> 3 - 53、V<sub>H</sub> 5 - 51、V<sub>H</sub> 3 - 49、V<sub>H</sub> 3 - 48、V<sub>H</sub> 1 - 46、V<sub>H</sub> 1 - 45、V<sub>H</sub> 3 - 43、V<sub>H</sub> 4 - 39、V<sub>H</sub> 4 - 34、V<sub>H</sub> 3 - 33、V<sub>H</sub> 4 - 31、V<sub>H</sub> 3 - 30、V<sub>H</sub> 4 - 28、V<sub>H</sub> 2 - 26、V<sub>H</sub> 1 - 24、V<sub>H</sub> 3 - 23、V<sub>H</sub> 3 - 21、V<sub>H</sub> 3 - 20、V<sub>H</sub> 1 - 18、V<sub>H</sub> 3 - 15、V<sub>H</sub> 3 - 13、V<sub>H</sub> 3 - 11、V<sub>H</sub> 3 - 9、V<sub>H</sub> 1 - 8、V<sub>H</sub> 3 - 7、V<sub>H</sub> 2 - 5、V<sub>H</sub> 7 - 4 - 1、V<sub>H</sub> 4 - 4、V<sub>H</sub> 1 - 3、V<sub>H</sub> 1 - 2、V<sub>H</sub> 6 - 1、またはそれらの任意の組み合わせを含み、 20

(ii) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、D<sub>H</sub> 1 - 1、D<sub>H</sub> 2 - 2、D<sub>H</sub> 3 - 3、D<sub>H</sub> 4 - 4、D<sub>H</sub> 5 - 5、D<sub>H</sub> 6 - 6、D<sub>H</sub> 1 - 7、D<sub>H</sub> 2 - 8、D<sub>H</sub> 3 - 9、D<sub>H</sub> 3 - 10、D<sub>H</sub> 5 - 12、D<sub>H</sub> 6 - 13、D<sub>H</sub> 2 - 15、D<sub>H</sub> 3 - 16、D<sub>H</sub> 4 - 17、D<sub>H</sub> 6 - 19、D<sub>H</sub> 1 - 20、D<sub>H</sub> 2 - 21、D<sub>H</sub> 3 - 22、D<sub>H</sub> 6 - 25、D<sub>H</sub> 1 - 26、D<sub>H</sub> 7 - 27、またはそれらの任意の組み合わせを含み、 30

(iii) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、J<sub>H</sub> 1、J<sub>H</sub> 2、J<sub>H</sub> 3、J<sub>H</sub> 4、J<sub>H</sub> 5、J<sub>H</sub> 6、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 4 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 16】

前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む、請求項 4 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。 40

【請求項 17】

前記げっ歯類 C 遺伝子は、(i) マウス C 1、(ii) マウス C 2、または (iii) マウス C 3 遺伝子と少なくとも 80% 同一の配列を有する、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 18】

前記げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C 遺伝子を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 19】

前記げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C 1 遺伝子を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 50

項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 20】

前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、1つ以上のげっ歯類 V 遺伝子セグメント、1つ以上のげっ歯類 J 遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせの代わりである、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 21】

不活性化内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座をさらに含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 22】

前記遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 23】

前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、前記内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座におけるそれらの内因性位置で 1 つ以上の内因性エンハンサーをさらに含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 24】

前記げっ歯類は、ラットまたはマウスである、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【請求項 25】

遺伝子改変されたマウスであって、その生殖細胞系列ゲノムは、マウス C 1 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 1 - 5 1 遺伝子セグメント及びヒト J 2 遺伝子セグメントを含み、

前記遺伝子改変されたマウスの B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、前記遺伝子改変されたマウス。

【請求項 26】

遺伝子改変されたマウスであって、その生殖細胞系列ゲノムは、マウス C 1 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 2 - 1 4 遺伝子セグメント及びヒト J 2 遺伝子セグメントを含み、

前記遺伝子改変されたマウスの B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、前記遺伝子改変されたマウス。

【請求項 27】

げっ歯類胚であって、そのゲノムは、げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記げっ歯類胚。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスの B 細胞であって、

10

20

30

40

50

前記修飾された内因性 軽鎖遺伝子座の前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む、前記 B 細胞。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の B 細胞から生成されたハイブリドーマ。

【請求項 30】

単一の遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞の集団であって、前記げっ歯類は、その生殖細胞系列ゲノムにおいて、

(a) げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト J 遺伝子セグメントに機能可能に連結されたヒト V 遺伝子セグメントを含む、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座、及び

10

(b) 1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座

を含み、

前記 B 細胞の集団によって発現されるすべての抗体は、

(i) 前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン、及び

20

(ii) 少なくとも2つの異なる再編成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現される複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む、前記 B 細胞の集団。

【請求項 31】

げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む胚性幹細胞であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記胚性幹細胞。

【請求項 32】

抗体を発現する哺乳動物細胞であって、前記抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む重鎖及びヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む軽鎖を含み、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン、またはその両方は、請求項 4 ~ 26 のいずれか1項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスから同定された、前記哺乳動物細胞。

30

【請求項 33】

抗体を作製する方法であって、前記方法は、

(a) 請求項 1 ~ 26 のいずれか1項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを抗原に曝露すること；

(b) 前記遺伝子改変されたげっ歯類が前記抗原に対する免疫反応を起こすことを可能にすること；及び

40

(c) 前記遺伝子改変されたげっ歯類から前記抗原に特異的な抗体、前記抗原に特異的な抗体を発現する B 細胞、または前記抗原に特異的な抗体をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を単離すること

を含む、前記方法。

【請求項 34】

抗体を作製する方法であって、

(a) 哺乳動物細胞において2つのヒト免疫グロブリン 軽鎖及び2つのヒト免疫グロブリン重鎖を含む前記抗体を発現させる工程であって、各ヒト免疫グロブリン 軽鎖は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含み、各ヒト免疫グロブリン重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含み、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの少なく

50

とも1つ、前記 軽鎖可変ドメインの少なくとも1つ、またはそれらの組み合わせのアミノ酸配列は、請求項4～26のいずれか1項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスにおいて同定された、前記発現させる工程；及び

(b) 前記抗体を得る工程を含む、前記方法。

【請求項35】

二重特異的抗体を作製する方法であって、前記方法は、

(a) 請求項4～26のいずれか1項に記載の第1の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを第1の抗原の第1のエピトープと接触させること、

(b) 請求項4～26のいずれか1項に記載の第2の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを第2の抗原の第2のエピトープと接触させること、

(c) 前記第1の遺伝子改変されたげっ歯類から前記第1の抗原の前記第1のエピトープに特異的な第1の抗体を発現するB細胞を単離し、前記第1の抗体の第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；

(d) 前記第2の遺伝子改変されたげっ歯類から前記第2の抗原の前記第2のエピトープに特異的な第2の抗体を発現するB細胞を単離し、前記第2の抗体の第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；

(e) 前記第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、第1のヒト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列と機能可能に連結させて第1のヒト重鎖をコードする第1のヌクレオチド配列を生成すること；

(f) 前記第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、第2のヒト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列と機能可能に連結させて第2のヒト重鎖をコードする第2のヌクレオチド配列を生成すること；

(g) 哺乳動物細胞において、

(i) 第1のヌクレオチド配列；

(i i) 第2のヌクレオチド配列；及び

(i i i) ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域に機能可能に連結された前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む第3のヌクレオチド配列

を発現させること

を含む、前記方法。

【請求項36】

二重特異的抗体を作製する方法であって、前記方法は、

(a) 哺乳動物細胞において、

(i) 第1のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第1のヌクレオチド配列；

(i i) 第2のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第2のヌクレオチド配列；及び

(i i i) ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域に機能可能に連結されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む第3のヌクレオチド配列

を発現させることを含み、

前記第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第1の抗原の第1のエピトープで免疫された第1の遺伝子改変されたげっ歯類における第1の抗体から同定された第1のヒト重鎖可変ドメインをコードし、前記第1の抗体は、前記第1の抗原の前記第1のエピトープに特異的に結合し；

前記第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第2の抗原の第2のエピトープで免疫された第2の遺伝子改変されたげっ歯類における第2の抗体から同定された第2のヒト重鎖可変ドメインをコードし、前記第2の抗体は、前記第2の抗原の前記第2のエピトープに特異的に結合し；

前記第1及び第2の遺伝子改変されたげっ歯類はそれぞれ、請求項4～26のいずれか

10

20

30

40

50

1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスであり；

前記第 3 のヌクレオチドの前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンである、前記方法。

【請求項 37】

ヒト免疫グロブリン重鎖を作製するための方法であって、前記方法は、

(a) 請求項 4 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；

(b) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列を得る工程；及び

(c) 前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメイン配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン重鎖を形成する工程を含む、前記方法。

10

【請求項 38】

ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを作製するための方法であって、前記方法は、

(a) 請求項 4 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；及び

(b) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列を得る工程

を含む、前記方法。

20

【請求項 39】

ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションを作製する方法であって、

(a) 請求項 4 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露すること、及び

(b) 前記遺伝子改変されたげっ歯類から前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションを単離すること

を含み、

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションはそれぞれ、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインに結合し、

前記コレクションにおける前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのいずれか 1 つと対合した前記ヒト 軽鎖可変ドメインは、前記抗原に結合する、前記方法。

30

【請求項 40】

ヒト免疫グロブリン 軽鎖を作製するための方法であって、前記方法は、

(a) 請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；

(b) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列を得る工程；及び

(c) 前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列をヒト免疫グロブリン 軽鎖定常ドメイン配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン 軽鎖を形成する工程

を含む、前記方法。

40

【請求項 41】

ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを生成するための方法であって、前記方法は、

(a) 請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；及び

(b) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列を得る工程

を含む、前記方法。

【請求項 42】

ヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を作製するための方法であって

50

、前記方法は、

( a ) 請求項 4 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を得る工程；及び

( c ) 前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域をヒト免疫グロブリン重鎖定常領域配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を形成する工程

を含む、前記方法。

10

【請求項 43】

ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含むヌクレオチド配列を作製するための方法であって、前記方法は、

( a ) 請求項 4 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；及び

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を得る工程

を含む、前記方法。

【請求項 44】

20

ヒト免疫グロブリン 軽鎖をコードするヌクレオチド配列を作製するための方法であって、前記方法は、

( a ) 請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を得る工程；及び

( c ) 前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域をヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン 軽鎖をコードするヌクレオチド配列を形成する工程

30

を含む、前記方法。

【請求項 45】

ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むヌクレオチド配列を作製するための方法であって、前記方法は、

( a ) 請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の遺伝子改変されたげっ歯類またはマウスを対象となる抗原に曝露する工程；及び

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を得る工程

を含む、前記方法。

40

【請求項 46】

ターゲティングベクターであって、

( i ) 内因性げっ歯類 軽鎖遺伝子座における 5' 標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む 5' ホモロジーアーム；

( i i ) V 遺伝子セグメント及び J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域；

( i i i ) げっ歯類 C 遺伝子セグメント；及び

( i v ) 前記内因性げっ歯類 軽鎖遺伝子座における 3' 標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む 3' ホモロジーアーム

を含む、前記ターゲティングベクター。

50



## 【請求項 47】

遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法であって、

(a) ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 E S 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程；及び

(b) 工程 (a) において生成された前記げっ歯類 E S 細胞を使用してげっ歯類を生成する工程

を含む、前記方法。

## 【請求項 48】

遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法であって、

(a) げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 E S 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記導入する工程；及び

(b) 工程 (a) において生成された前記げっ歯類 E S 細胞を使用してげっ歯類を生成する工程

を含む、前記方法。

## 【請求項 49】

遺伝子改変されたげっ歯類 E S 細胞を作製する方法であって、

ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 E S 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程

を含む、前記方法。

## 【請求項 50】

遺伝子改変されたげっ歯類 E S 細胞を作製する方法であって、

げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 E S 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記導入する工程

を含む、前記方法。

## 【請求項 51】

遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法であって、

(a) 前記げっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を、げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むように修飾する工程であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記修飾する工程を含み、

これにより前記遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、前記方法。

## 【請求項 52】

組換えげっ歯類細胞を生成するための *in vitro* 方法であって、前記組換えげっ歯類細胞のゲノムを、

げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むように改変することを含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記 *in vitro*

10

20

30

40

50

○方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年6月5日に出願された米国仮出願第62/857,712号の利益を主張し、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2020年5月20日に作成されたASCIIコピーは、2010794-2050\_SL.txtという名前であり、サイズが47,576バイトである。

【背景技術】

【0003】

ヒト抗体は、最も急速に成長している治療剤のクラスである。それらの生成のために現在使用されている技術のうち、ヒト抗体を全体としてまたは部分的にコードする遺伝物質で修飾された遺伝子修飾された動物（例えば、げっ歯類）の開発は、様々な疾患の処置のためのヒト治療モノクローナル抗体の分野に改革をもたらしてきた。依然として、宿主の遺伝子修飾された動物においてヒト抗体レパートリーを最大化するヒトモノクローナル抗体を生成するための改善された*in vivo*システムの開発が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示は、遺伝子改変されたげっ歯類を提供する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、ラットまたはマウスである。いくつかの実施形態では、すべての内因性配列は、ラットまたはマウス配列である。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類は、ラットであり、すべての内因性配列は、ラット配列である。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類は、マウスであり、すべての内因性配列は、マウス配列である。

【0005】

いくつかの実施形態では、本開示は、第1の遺伝子改変されたげっ歯類、第2の遺伝子改変されたげっ歯類、及び第3の遺伝子改変されたげっ歯類を含む本明細書で提供される遺伝子改変されたげっ歯類の繁殖コロニーであって、第1、第2、及び第3の遺伝子改変されたげっ歯類はそれぞれ、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類である、繁殖コロニーを提供する。いくつかの実施形態では、第3の遺伝子改変されたげっ歯類は、第1の遺伝子改変されたげっ歯類及び第2の遺伝子改変されたげっ歯類の子孫である。

【0006】

提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーを含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーは、1つまたは2つの非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含み得る。いくつかの実施形態では、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーは、2つの非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及び4つの非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含み得る。いくつかの実施形態では、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーは、2つの非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及び5つの非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含み得る。いくつかの実施形態では、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーは、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み得る。

【0007】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及びげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む。

10

## 【0008】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された内因性げっ歯類免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された内因性げっ歯類免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された内因性げっ歯類免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類の生殖細胞系列ゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座（例えば、修飾された内因性免疫グロブリン または 軽鎖遺伝子座）についてホモ接合性である。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類の生殖細胞系列ゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座（例えば、修飾された内因性免疫グロブリン または 軽鎖遺伝子座）についてヘテロ接合性である。

20

## 【0009】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類の生殖細胞系列ゲノムは、2つのアレルを含む修飾された内因性免疫グロブリン 遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、第1のアレルは、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含み、第2のアレルは、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類、ならびにそれによるげっ歯類細胞及びげっ歯類組織の生殖細胞系列ゲノムは、げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む第1の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルを含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類、ならびにそれによるげっ歯類細胞またはげっ歯類組織は、げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む第2の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルを含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、そのような非ヒト動物または非ヒト組織は、第1の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルから 軽鎖及び第2の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルから 軽鎖を発現し得る。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 3 - 20またはV 1 - 39を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 1 - 51またはV 2 - 14を含む。一実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 3 - 20 / J 1であり、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 1 - 51 / J 2またはV 2 - 14 / J 2である。

30

40

## 【0010】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、軽鎖定常領域遺伝

50

子セグメントに機能可能に連結された限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む。

10

【0012】

いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 4 - 69、V 8 - 61、V 4 - 60、V 6 - 57、V 10 - 54、V 5 - 52、V 1 - 51、V 9 - 49、V 1 - 47、V 7 - 46、V 5 - 45、V 1 - 44、V 7 - 43、V 1 - 40、V 5 - 37、V 1 - 36、V 3 - 27、V 3 - 25、V 2 - 23、V 3 - 22、V 3 - 21、V 3 - 19、V 2 - 18、V 3 - 16、V 2 - 14、V 3 - 12、V 2 - 11、V 3 - 10、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及び V 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 5 - 52、V 1 - 51、V 9 - 49、V 1 - 47、V 7 - 46、V 5 - 45、V 1 - 44、V 7 - 43、V 1 - 40、V 5 - 37、V 1 - 36、V 3 - 27、V 3 - 25、V 2 - 23、V 3 - 22、V 3 - 21、V 3 - 19、V 2 - 18、V 3 - 16、V 2 - 14、V 3 - 12、V 2 - 11、V 3 - 10、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及び V 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 51、V 5 - 45、V 1 - 44、V 1 - 40、V 3 - 21、及び V 2 - 14 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 51 または V 2 - 14 である。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及び J 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。

20

30

【0013】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座でげっ歯類 C 遺伝子を欠く。

【0014】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、1つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結されている。

40

【0015】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変され

50

たげっ歯類は、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である生殖細胞系列ゲノムを有する。

【0016】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、1つ以上の内因性V<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の内因性D<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の内因性J<sub>H</sub>遺伝子セグメント、またはそれらの組み合わせの代わりに1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、1つ以上の内因性V<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の内因性D<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の内因性J<sub>H</sub>遺伝子セグメントにそれぞれ置き換わる1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む生殖細胞系列ゲノムを有する。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub>3-74、V<sub>H</sub>3-73、V<sub>H</sub>3-72、V<sub>H</sub>2-70、V<sub>H</sub>1-69、V<sub>H</sub>3-66、V<sub>H</sub>3-64、V<sub>H</sub>4-61、V<sub>H</sub>4-59、V<sub>H</sub>1-58、V<sub>H</sub>3-53、V<sub>H</sub>5-51、V<sub>H</sub>3-49、V<sub>H</sub>3-48、V<sub>H</sub>1-46、V<sub>H</sub>1-45、V<sub>H</sub>3-43、V<sub>H</sub>4-39、V<sub>H</sub>4-34、V<sub>H</sub>3-33、V<sub>H</sub>4-31、V<sub>H</sub>3-30、V<sub>H</sub>4-28、V<sub>H</sub>2-26、V<sub>H</sub>1-24、V<sub>H</sub>3-23、V<sub>H</sub>3-21、V<sub>H</sub>3-20、V<sub>H</sub>1-18、V<sub>H</sub>3-15、V<sub>H</sub>3-13、V<sub>H</sub>3-11、V<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>1-8、V<sub>H</sub>3-7、V<sub>H</sub>2-5、V<sub>H</sub>7-4-1、V<sub>H</sub>4-4、V<sub>H</sub>1-3、V<sub>H</sub>1-2、V<sub>H</sub>6-1、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、D<sub>H</sub>1-1、D<sub>H</sub>2-2、D<sub>H</sub>3-3、D<sub>H</sub>4-4、D<sub>H</sub>5-5、D<sub>H</sub>6-6、D<sub>H</sub>1-7、D<sub>H</sub>2-8、D<sub>H</sub>3-9、D<sub>H</sub>3-10、D<sub>H</sub>5-12、D<sub>H</sub>6-13、D<sub>H</sub>2-15、D<sub>H</sub>3-16、D<sub>H</sub>4-17、D<sub>H</sub>6-19、D<sub>H</sub>1-20、D<sub>H</sub>2-21、D<sub>H</sub>3-22、D<sub>H</sub>6-25、D<sub>H</sub>1-26、D<sub>H</sub>7-27、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、J<sub>H</sub>1、J<sub>H</sub>2、J<sub>H</sub>3、J<sub>H</sub>4、J<sub>H</sub>5、J<sub>H</sub>6、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

20

30

【0018】

いくつかの実施形態では、(i) 1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub>3-74、V<sub>H</sub>3-73、V<sub>H</sub>3-72、V<sub>H</sub>2-70、V<sub>H</sub>1-69、V<sub>H</sub>3-66、V<sub>H</sub>3-64、V<sub>H</sub>4-61、V<sub>H</sub>4-59、V<sub>H</sub>1-58、V<sub>H</sub>3-53、V<sub>H</sub>5-51、V<sub>H</sub>3-49、V<sub>H</sub>3-48、V<sub>H</sub>1-46、V<sub>H</sub>1-45、V<sub>H</sub>3-43、V<sub>H</sub>4-39、V<sub>H</sub>4-34、V<sub>H</sub>3-33、V<sub>H</sub>4-31、V<sub>H</sub>3-30、V<sub>H</sub>4-28、V<sub>H</sub>2-26、V<sub>H</sub>1-24、V<sub>H</sub>3-23、V<sub>H</sub>3-21、V<sub>H</sub>3-20、V<sub>H</sub>1-18、V<sub>H</sub>3-15、V<sub>H</sub>3-13、V<sub>H</sub>3-11、V<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>1-8、V<sub>H</sub>3-7、V<sub>H</sub>2-5、V<sub>H</sub>7-4-1、V<sub>H</sub>4-4、V<sub>H</sub>1-3、V<sub>H</sub>1-2、V<sub>H</sub>6-1、またはそれらの任意の組み合わせを含み、(ii) 1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、D<sub>H</sub>1-1、D<sub>H</sub>2-2、D<sub>H</sub>3-3、D<sub>H</sub>4-4、D<sub>H</sub>5-5、D<sub>H</sub>6-6、D<sub>H</sub>1-7、D<sub>H</sub>2-8、D<sub>H</sub>3-9、D<sub>H</sub>3-10、D<sub>H</sub>5-12、D<sub>H</sub>6-13、D<sub>H</sub>2-15、D<sub>H</sub>3-16、D<sub>H</sub>4-17、D<sub>H</sub>6-19、D<sub>H</sub>1-20、D<sub>H</sub>2-21、D<sub>H</sub>3-22、D<sub>H</sub>6-25、D<sub>H</sub>1-26、D<sub>H</sub>7-27、またはそれらの任意の組み合わせを含み、(iii) 1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、J<sub>H</sub>1、J<sub>H</sub>2、J<sub>H</sub>3、J<sub>H</sub>4、J<sub>H</sub>5、J<sub>H</sub>6、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子は、1つ以上の内因

50

性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子である。

【0020】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、機能性内因性げっ歯類 A d a m 6 遺伝子を欠く修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に含まれる1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、ヒト A d a m 6 偽遺伝子の代わりに1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、ヒト A d a m 6 偽遺伝子に置き換わる1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。

【0021】

いくつかの実施形態では、提供される遺伝子改変されたげっ歯類は、第1及び第2のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む1つ以上のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、ならびに第1のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと第2のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントとの間に1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。いくつかの実施形態では、第1のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 1 - 2であり、第2のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 6 - 1である。

【0022】

いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントとヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントとの間にある。

【0023】

いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>1</sub> と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>2</sub> と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>3</sub> 遺伝子と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。

【0024】

いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C 遺伝子であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>1</sub> 遺伝子であり、またはそれを含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C 1 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C 2 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C 3 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C 4 遺伝子と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一の配列を有する。

10

## 【0026】

いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C 遺伝子であり、またはそれを含む。

## 【0027】

いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、1つ以上のげっ歯類 V 遺伝子セグメント、1つ以上のげっ歯類 J 遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせの代わりである。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、1つ以上のげっ歯類 V 遺伝子セグメント、1つ以上のげっ歯類 J 遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせに置き換わる。

20

## 【0028】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変されたマウスは、機能性内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変されたマウスは、不活性化内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座のすべてまたは一部を欠失または反転させることによって不活性化される。いくつかの実施形態では、内因性 V 遺伝子セグメント、内因性 J 遺伝子セグメント、及び内因性 C 遺伝子は、全体としてまたは部分的に欠失される。

## 【0029】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変されたマウスは、内因性免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを検出可能に発現しない。

30

## 【0030】

本開示は、本明細書に記載される遺伝子改変を含むげっ歯類胚を提供する。いくつかの実施形態では、げっ歯類胚は、げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むゲノムを有し、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、げっ歯類胚のゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 51、V 5 - 45、V 1 - 44、V 1 - 40、V 3 - 21、及び V 2 - 14 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及び J 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 51 または V 2 - 14 である。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。

40

## 【0031】

いくつかの実施形態では、げっ歯類胚であって、そのゲノムは、1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む、げっ歯類胚が提供される。いくつかの実施形態では、げっ歯類胚のゲノムは、修飾された

50

内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である。

【0032】

本開示は、本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞は、修飾された内因性軽鎖遺伝子座の単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、本開示は、修飾された内因性軽鎖遺伝子座の単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞は、修飾された内因性重鎖遺伝子座において1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントのヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントのヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントに由来する再編成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。

10

【0034】

本開示は、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞から生成されたハイブリドーマを提供する。

【0035】

本開示は、本明細書に記載される単一の遺伝子改変されたげっ歯類からのB細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、B細胞の集団によって発現されるすべての抗体は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、B細胞の集団によって発現される抗体は、少なくとも2つの異なる再編成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現される複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む。

20

【0036】

本開示は、本明細書に記載される遺伝子改変を含む胚性幹(ES)細胞などの幹細胞を提供する。いくつかの実施形態では、幹細胞(例えば、ES細胞)は、げっ歯類C遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞(例えば、ES細胞)のゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である。いくつかの実施形態では、ヒトV遺伝子セグメントは、V<sub>4-69</sub>、V<sub>8-61</sub>、V<sub>4-60</sub>、V<sub>6-57</sub>、V<sub>10-54</sub>、V<sub>5-52</sub>、V<sub>1-51</sub>、V<sub>9-49</sub>、V<sub>1-47</sub>、V<sub>7-46</sub>、V<sub>5-45</sub>、V<sub>1-44</sub>、V<sub>7-43</sub>、V<sub>1-40</sub>、V<sub>5-37</sub>、V<sub>1-36</sub>、V<sub>3-27</sub>、V<sub>3-25</sub>、V<sub>2-23</sub>、V<sub>3-22</sub>、V<sub>3-21</sub>、V<sub>3-19</sub>、V<sub>2-18</sub>、V<sub>3-16</sub>、V<sub>2-14</sub>、V<sub>3-12</sub>、V<sub>2-11</sub>、V<sub>3-10</sub>、V<sub>3-9</sub>、V<sub>2-8</sub>、V<sub>4-3</sub>、及びV<sub>3-1</sub>からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV遺伝子セグメントは、V<sub>5-52</sub>、V<sub>1-51</sub>、V<sub>9-49</sub>、V<sub>1-47</sub>、V<sub>7-46</sub>、V<sub>5-45</sub>、V<sub>1-44</sub>、V<sub>7-43</sub>、V<sub>1-40</sub>、V<sub>5-37</sub>、V<sub>1-36</sub>、V<sub>3-27</sub>、V<sub>3-25</sub>、V<sub>2-23</sub>、V<sub>3-22</sub>、V<sub>3-21</sub>、V<sub>3-19</sub>、V<sub>2-18</sub>、V<sub>3-16</sub>、V<sub>2-14</sub>、V<sub>3-12</sub>、V<sub>2-11</sub>、V<sub>3-10</sub>、V<sub>3-9</sub>、V<sub>2-8</sub>、V<sub>4-3</sub>、及びV<sub>3-1</sub>からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV遺伝子セグメントは、V<sub>1-51</sub>、V<sub>5-45</sub>、V<sub>1-44</sub>、V<sub>1-40</sub>、V<sub>3-21</sub>、及びV<sub>2-14</sub>からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトJ遺伝子セグメントは、J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>6</sub>、及びJ<sub>7</sub>からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトJ遺伝子セグメントは、J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、及びJ<sub>7</sub>からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV遺伝子

30

40

50



セグメントは、V<sub>1</sub> - 51またはV<sub>2</sub> - 14である。いくつかの実施形態では、ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、J<sub>2</sub>である。

【0037】

いくつかの実施形態では、幹細胞（例えば、ES細胞）は、1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む。

【0038】

抗体を発現する哺乳動物細胞が本開示によって提供される。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞によって発現される抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む重鎖及びヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む軽鎖を含み、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン、またはその両方は、本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類から同定され、それから単離され、またはそれと同一である。

10

【0039】

いくつかの実施形態では、(a)本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；(b)遺伝子改変されたげっ歯類が対象となる抗原に対する免疫反応を生成するのに十分な条件下で遺伝子改変されたげっ歯類を維持する工程；及び(c)遺伝子改変されたげっ歯類から、(i)対象となる抗原に結合する抗体、(ii)対象となる抗原に結合する抗体のヒト軽鎖可変ドメイン、ヒト重鎖可変ドメイン、軽鎖、または重鎖をコードするヌクレオチド、または(iii)対象となる抗原に結合する抗体を発現する細胞を回収する工程であって、(c)の抗体は、ヒト重鎖可変及びヒト軽鎖可変ドメインを含む、回収する工程を含む方法によって調製される抗体。いくつかの実施形態では、抗体は、二重特異的抗体である。

20

【0040】

いくつかの実施形態では、抗体を作製する方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を抗原に曝露する工程；(b)遺伝子改変されたげっ歯類が抗原に対する免疫反応を起こすことを可能にする工程；及び(c)遺伝子改変されたげっ歯類から抗原に特異的な抗体、抗原に特異的な抗体を発現するB細胞、または抗原に特異的な抗体をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を単離する工程を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、二重特異的抗体である。

30

【0041】

いくつかの実施形態では、抗体を作製する方法は、(a)哺乳動物細胞において、2つのヒト免疫グロブリン軽鎖及び2つのヒト免疫グロブリン重鎖を含む前記抗体を発現させる工程であって、各ヒト免疫グロブリン軽鎖は、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含み、各ヒト免疫グロブリン重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含み、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの少なくとも1つ、軽鎖可変ドメインの少なくとも1つ、またはそれらの組み合わせのアミノ酸配列は、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類から同定され、または単離された、発現させる工程；及び(b)抗体を得る工程を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、二重特異的抗体である。

40

【0042】

いくつかの実施形態では、二重特異的抗体を作製する方法であって、(a)本明細書に記載される第1の遺伝子改変されたげっ歯類を第1の抗原の第1のエピトープと接触させること、(b)本明細書に記載される第2の遺伝子改変されたげっ歯類を第2の抗原の第2のエピトープと接触させること、(c)第1の遺伝子改変されたげっ歯類から第1の抗原の第1のエピトープに特異的な第1の抗体を発現するB細胞を単離し、第1の抗体の第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；(d)第2の遺伝子改変されたげっ歯類から第2の抗原の第2のエピトープに特異的な第2の抗体を発現するB細胞を単離し、第2の抗体の第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；(e)第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を第1のヒ

50

ト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結させて第1のヒト重鎖をコードする第1のヌクレオチド配列を生成すること；(f)第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を第2のヒト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結させて第2のヒト重鎖をコードする第2のヌクレオチド配列を生成すること；(g)哺乳動物細胞において、(i)第1のヌクレオチド配列；(ii)第2のヌクレオチド配列；及び(iii)ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域に機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む第3のヌクレオチド配列を発現させることを含む、方法が提供される。

【0043】

10

いくつかの実施形態では、二重特異的抗体を作製する方法であって、方法は、(a)哺乳動物細胞において、(i)第1のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第1のヌクレオチド配列；(ii)第2のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第2のヌクレオチド配列；及び(iii)ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域に機能可能に連結されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第3のヌクレオチド配列を発現させることを含む、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第1の抗原の第1のエピトープで免疫された本明細書に記載される第1の遺伝子改変されたげっ歯類における第1の抗体から同定された、単離された、またはそれと同一の第1のヒト重鎖可変ドメインをコードし、第1の抗体は、第1の抗原の第1のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第2の抗原の第2のエピトープで免疫された本明細書に記載される第2の遺伝子改変されたげっ歯類における第2の抗体から同定された、単離された、またはそれと同一の第2のヒト重鎖可変ドメインをコードし、第2の抗体は、第2の抗原の第2のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、第3のヌクレオチドのヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンである。

20

【0044】

いくつかの実施形態では、第1の遺伝子改変されたげっ歯類及び第2の遺伝子改変されたげっ歯類は、同一の遺伝子改変されたげっ歯類である。いくつかの実施形態では、第1の遺伝子改変されたげっ歯類及び第2の遺伝子改変されたげっ歯類は、異なる遺伝子改変されたげっ歯類である。

30

【0045】

いくつかの実施形態では、第1の抗原及び第2の抗原は、同じ抗原であり、第1のエピトープ及び第2のエピトープは、異なるエピトープである。いくつかの実施形態では、第1の抗原及び第2の抗原は、異なる抗原である。

【0046】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン重鎖を作製するための方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列を得る工程；及び(c)ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメイン配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン重鎖を形成する工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落の方法によって生成されるヒト免疫グロブリン重鎖が提供される。

40

【0047】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを作製するための方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列を得る工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落のこの方法によって生成されるヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン

50

が提供される。

【0048】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションを作製する方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程、及び(b)遺伝子改変されたげっ歯類からヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションを単離する工程を含む。いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションはそれぞれ、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインに結合し、コレクションにおけるヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのいずれか1つと対合したヒト軽鎖可変ドメインは、抗原と結合する。

10

【0049】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン軽鎖を作製するための方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列を得る工程；及び(c)ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列をヒト免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン軽鎖を形成する工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落の方法によって生成されるヒト免疫グロブリン軽鎖が提供される。

【0050】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを生成するための方法は、(a)本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列を得る工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落の方法によって生成されるヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインが提供される。

20

【0051】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を作製するための方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を得る工程；及び(c)ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域をヒト免疫グロブリン重鎖定常領域配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を形成する工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落の方法によって生成されるヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列が提供される。

30

【0052】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含むヌクレオチド配列を作製するための方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を得る工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落の方法によって生成されるヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含むヌクレオチド配列が提供される。

40

【0053】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン軽鎖をコードするヌクレオチド配列を作製するための方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を得る工程；及び(c)ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域をヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン

50

軽鎖をコードするヌクレオチド配列を形成する工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落の方法によって生成されるヒト免疫グロブリン 軽鎖をコードするヌクレオチド配列が提供される。

【0054】

いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むヌクレオチド配列を作製するための方法は、(a)本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び(b)抗原に特異的に結合し、かつ遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を得る工程を含む。いくつかの実施形態では、この段落の方法によって生成されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むヌクレオチド配列が提供される。

10

【0055】

いくつかの実施形態では、ターゲティングベクターが提供される。いくつかの実施形態では、ターゲティングベクターは、(i)内因性げっ歯類 軽鎖遺伝子座における5'標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む5'ホモロジーアーム；(ii)V 遺伝子セグメント及びJ 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域；(iii)げっ歯類C 遺伝子セグメント；及び(iv)内因性げっ歯類 軽鎖遺伝子座における3'標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む3'ホモロジーアームを含む。いくつかの実施形態では、ヒトV 遺伝子セグメントは、V 4-69、V 8-61、V 4-60、V 6-57、V 10-54、V 5-52、V 1-51、V 9-49、V 1-47、V 7-46、V 5-45、V 1-44、V 7-43、V 1-40、V 5-37、V 1-36、V 3-27、V 3-25、V 2-23、V 3-22、V 3-21、V 3-19、V 2-18、V 3-16、V 2-14、V 3-12、V 2-11、V 3-10、V 3-9、V 2-8、V 4-3、及びV 3-1からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV 遺伝子セグメントは、V 5-52、V 1-51、V 9-49、V 1-47、V 7-46、V 5-45、V 1-44、V 7-43、V 1-40、V 5-37、V 1-36、V 3-27、V 3-25、V 2-23、V 3-22、V 3-21、V 3-19、V 2-18、V 3-16、V 2-14、V 3-12、V 2-11、V 3-10、V 3-9、V 2-8、V 4-3、及びV 3-1からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1-51、V 5-45、V 1-44、V 1-40、V 3-21、及びV 2-14からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1-51またはV 2-14である。いくつかの実施形態では、ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及びJ 7からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 2である。

20

30

【0056】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法は、(a)ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類ES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程；及び(b)工程(a)において生成されたげっ歯類ES細胞を使用してげっ歯類を生成する工程を含む。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法は、(a)げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類ES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程であって、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメント

50

を含む、導入する工程；及び（b）工程（a）において生成されたげっ歯類ES細胞を使用してげっ歯類を生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、げっ歯類ES細胞のゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座で1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、げっ歯類ES細胞のゲノムは、1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列をさらに含む。

#### 【0058】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類ES細胞を作製する方法は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を、げっ歯類ES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入する工程を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類ES細胞を作製する方法は、げっ歯類C<sub>H</sub>遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を、げっ歯類ES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入する工程であって、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む、導入する工程を含む。いくつかの実施形態では、げっ歯類ES細胞のゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座で1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、げっ歯類ES細胞のゲノムは、1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列をさらに含む。

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法は、（a）遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン軽鎖が、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むように、げっ歯類の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を、げっ歯類C<sub>H</sub>遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含むように修飾する工程であって、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む、修飾する工程を含む。いくつかの実施形態では、方法は、（b）遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての重鎖が、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及びげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含むように、げっ歯類の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を、1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含むように修飾する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、工程（b）は、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を、1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列をさらに含むように修飾することを含む。いくつかの実施形態では、工程（a）及び/または工程（b）は、げっ歯類ES細胞において行われる。

#### 【0060】

いくつかの実施形態では、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 4 - 69、V<sub>H</sub> 8 - 61、V<sub>H</sub> 4 - 60、V<sub>H</sub> 6 - 57、V<sub>H</sub> 10 - 54、V<sub>H</sub> 5 - 52、V<sub>H</sub> 1 - 51、V<sub>H</sub> 9 - 49、V<sub>H</sub> 1 - 47、V<sub>H</sub> 7 - 46、V<sub>H</sub> 5 - 45、V<sub>H</sub> 1 - 44、V<sub>H</sub> 7 - 43、V<sub>H</sub> 1 - 40、V<sub>H</sub> 5 - 37、V<sub>H</sub> 1 - 36、V<sub>H</sub> 3 - 27、V<sub>H</sub> 3 - 25、V<sub>H</sub> 2 - 23

10

20

30

40

50

、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及びV 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV 遺伝子セグメントは、V 5 - 5 2、V 1 - 5 1、V 9 - 4 9、V 1 - 4 7、V 7 - 4 6、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 7 - 4 3、V 1 - 4 0、V 5 - 3 7、V 1 - 3 6、V 3 - 2 7、V 3 - 2 5、V 2 - 2 3、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及びV 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 またはV 2 - 1 4 である。いくつかの実施形態では、ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及びJ 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 2 である。

10

## 【0061】

いくつかの実施形態では、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、げっ歯類C 遺伝子を欠く。

## 【0062】

いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1つ以上の内因性V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の内因性D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の内因性J<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、またはそれらの組み合わせの代替りである。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1つ以上の内因性V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上の内因性D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び1つ以上の内因性J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントにそれぞれ置き換わる。

20

## 【0063】

いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 3 - 7 4、V<sub>H</sub> 3 - 7 3、V<sub>H</sub> 3 - 7 2、V<sub>H</sub> 2 - 7 0、V<sub>H</sub> 1 - 6 9、V<sub>H</sub> 3 - 6 6、V<sub>H</sub> 3 - 6 4、V<sub>H</sub> 4 - 6 1、V<sub>H</sub> 4 - 5 9、V<sub>H</sub> 1 - 5 8、V<sub>H</sub> 3 - 5 3、V<sub>H</sub> 5 - 5 1、V<sub>H</sub> 3 - 4 9、V<sub>H</sub> 3 - 4 8、V<sub>H</sub> 1 - 4 6、V<sub>H</sub> 1 - 4 5、V<sub>H</sub> 3 - 4 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 9、V<sub>H</sub> 4 - 3 4、V<sub>H</sub> 3 - 3 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 1、V<sub>H</sub> 3 - 3 0、V<sub>H</sub> 4 - 2 8、V<sub>H</sub> 2 - 2 6、V<sub>H</sub> 1 - 2 4、V<sub>H</sub> 3 - 2 3、V<sub>H</sub> 3 - 2 1、V<sub>H</sub> 3 - 2 0、V<sub>H</sub> 1 - 1 8、V<sub>H</sub> 3 - 1 5、V<sub>H</sub> 3 - 1 3、V<sub>H</sub> 3 - 1 1、V<sub>H</sub> 3 - 9、V<sub>H</sub> 1 - 8、V<sub>H</sub> 3 - 7、V<sub>H</sub> 2 - 5、V<sub>H</sub> 7 - 4 - 1、V<sub>H</sub> 4 - 4、V<sub>H</sub> 1 - 3、V<sub>H</sub> 1 - 2、V<sub>H</sub> 6 - 1、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、D<sub>H</sub> 1 - 1、D<sub>H</sub> 2 - 2、D<sub>H</sub> 3 - 3、D<sub>H</sub> 4 - 4、D<sub>H</sub> 5 - 5、D<sub>H</sub> 6 - 6、D<sub>H</sub> 1 - 7、D<sub>H</sub> 2 - 8、D<sub>H</sub> 3 - 9、D<sub>H</sub> 3 - 1 0、D<sub>H</sub> 5 - 1 2、D<sub>H</sub> 6 - 1 3、D<sub>H</sub> 2 - 1 5、D<sub>H</sub> 3 - 1 6、D<sub>H</sub> 4 - 1 7、D<sub>H</sub> 6 - 1 9、D<sub>H</sub> 1 - 2 0、D<sub>H</sub> 2 - 2 1、D<sub>H</sub> 3 - 2 2、D<sub>H</sub> 6 - 2 5、D<sub>H</sub> 1 - 2 6、D<sub>H</sub> 7 - 2 7、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、J<sub>H</sub> 1、J<sub>H</sub> 2、J<sub>H</sub> 3、J<sub>H</sub> 4、J<sub>H</sub> 5、J<sub>H</sub> 6、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

30

40

## 【0064】

いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子は、1つ以上の内因性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子である。

## 【0065】

いくつかの実施形態では、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、機能性内因性げっ歯

50

類 A d a m 6 遺伝子を欠く。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類の生殖細胞系ゲノムは、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片は、遺伝子改変されたげっ歯類によって発現される。いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に含まれる。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒト A d a m 6 偽遺伝子の代わりである。いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒト A d a m 6 偽遺伝子に置き換わる。

10

## 【0066】

いくつかの実施形態では、1つ以上のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、第1及び第2のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含み、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、第1のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと第2のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントとの間にある。いくつかの実施形態では、第1のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 1 - 2であり、第2のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 6 - 1である。

20

## 【0067】

いくつかの実施形態では、1つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントとヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントとの間にある。

## 【0068】

いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>1</sub> と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>2</sub> と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>3</sub> 遺伝子と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。

30

## 【0069】

いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C 遺伝子であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、マウス C<sub>1</sub> 遺伝子であり、またはそれを含む。

40

## 【0070】

いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C<sub>1</sub> と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C<sub>2</sub> と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C<sub>3</sub> と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一の配列を有する。いくつかの実施形態では、げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C<sub>4</sub> 遺伝子と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも

50

98%または少なくとも99%同一の配列を有する。

【0071】

いくつかの実施形態では、げっ歯類C 遺伝子は、ラットC 遺伝子であり、またはそれを含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、1つ以上のげっ歯類V 遺伝子セグメント、1つ以上のげっ歯類J 遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせの代わりである。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、1つ以上のげっ歯類V 遺伝子セグメント、1つ以上のげっ歯類J 遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせに置き換わる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子改変されたげっ歯類の生殖細胞系列ゲノムは、不活性化内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座をさらに含む。いくつかの実施形態では、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座のすべてまたは一部を欠失または反転させることによって不活性化される。いくつかの実施形態では、内因性V 遺伝子セグメント、内因性J 遺伝子セグメント、及び内因性C 遺伝子は、全体としてまたは部分的に欠失される。

10

【0073】

以下の図から構成される、本明細書に含まれる図面は、例示目的のためのものにすぎず、限定のためのものではない。

【図面の簡単な説明】

20

【0074】

【図1A】本開示による非ヒト動物の実施形態の生成において使用されるターゲティングベクター（実施例1及び4に記載されている）を構築するためのストラテジーの縮尺どおりではない例示的な実施形態の図を示している。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、loxP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリコンビナーゼシステム部位を示し；「UB-NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「enh」は、エンハンサーを示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SPEC」は、スペクチノマイシン耐性遺伝子を示し；「SD」は、スプライドナー部位を示し；「CDS」は、コーディング配列を示し；「lox」は、lox2372部位を示し；「loxP」は、loxP部位を示し；「UB-HYG」は、UBプロモーターを有するハイグロマイシン耐性遺伝子を示す。

30

【図1B】本開示による非ヒト動物の実施形態の生成において使用されるターゲティングベクター（実施例1及び4に記載されている）を構築するためのストラテジーの縮尺どおりではない例示的な実施形態の図を示している。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、loxP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリコンビナーゼシステム部位を示し；「UB-NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「enh」は、エンハンサーを示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SPEC」は、スペクチノマイシン耐性遺伝子を示し；「SD」は、スプライドナー部位を示し；「CDS」は、コーディング配列を示し；「lox」は、lox2372部位を示し；「loxP」は、loxP部位を示し；「UB-HYG」は、UBプロモーターを有するハイグロマイシン耐性遺伝子を示す。

40

【図2A】本開示による非ヒト動物の実施形態の生成において使用されるターゲティングベクター（実施例7及び10に記載されている）を構築するためのストラテジーの縮尺どおりではない例示的な実施形態の図を示している。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、loxP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリ

50



コンビナーゼシステム部位を示し；「UB - NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「enh」は、エンハンサーを示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SPEC」は、スペクチノマイシン耐性遺伝子を示し；「SD」は、スプライドナー部位を示し；「CDS」は、コーディング配列を示し；「lox」は、lox2372部位を示し；「loxP」は、lox P部位を示し；「UB - HYG」は、UBプロモーターを有するハイグロマイシン耐性遺伝子を示す。

【図2B】本開示による非ヒト動物の実施形態の生成において使用されるターゲティングベクター（実施例7及び10に記載されている）を構築するためのストラテジーの縮尺どおりではない例示的な実施形態の図を示している。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、loxP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリコンビナーゼシステム部位を示し；「UB - NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「enh」は、エンハンサーを示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SPEC」は、スペクチノマイシン耐性遺伝子を示し；「SD」は、スプライドナー部位を示し；「CDS」は、コーディング配列を示し；「lox」は、lox2372部位を示し；「loxP」は、lox P部位を示し；「UB - HYG」は、UBプロモーターを有するハイグロマイシン耐性遺伝子を示す。

【図3】げっ歯類胚性幹（ES）細胞クローン（実施例2に記載されている）の修飾されたIg 軽鎖遺伝子座へのターゲティングベクターA（実施例1に記載されている）の挿入の縮尺どおりではない図を示しており、ES細胞クローンは、本開示に従うげっ歯類の実施形態の生成において使用された。図には、胚性幹（ES）細胞クローンが所定の例示的な配列について陽性であることを確認するために使用される様々なプローブのおおよその位置（丸付きダッシュマークによって示される）が含まれている。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、loxP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリコンビナーゼシステム部位を示し；「UB - NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SD」は、スプライドナー部位を示す。「Het」はヘテロ接合性マウスを示し、「ho」はホモ接合性マウスを示す。

【図4】げっ歯類胚性幹（ES）細胞クローン（実施例5に記載されている）の修飾されたIg 軽鎖遺伝子座へのターゲティングベクターB（実施例4に記載されている）の挿入の縮尺どおりではない図を示しており、ES細胞クローンは、本開示に従うげっ歯類の実施形態の生成において使用された。図には、胚性幹（ES）細胞クローンが所定の例示的な配列について陽性であることを確認するために使用される様々なプローブのおおよその位置（丸付きダッシュマークによって示される）が含まれている。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、loxP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリコンビナーゼシステム部位を示し；「UB - NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SD」は、スプライドナー部位を示し；「loxP」は、lox P部位を示し；「UB - HYG」は、UBプロモーターを有するハイグロマイシン耐性遺伝子を示す。「Het」はヘテロ接合性マウスを示し、「ho」はホモ接合性マウスを示す。

【図5】げっ歯類胚性幹（ES）細胞クローン（実施例8に記載されている）の修飾されたIg 軽鎖遺伝子座へのターゲティングベクターC（実施例7に記載されている）の挿入の縮尺どおりではない図を示しており、ES細胞クローンは、本開示に従うげっ歯類の実施形態の生成において使用された。図には、胚性幹（ES）細胞クローンが所定の例示的な配列について陽性であることを確認するために使用される様々なプローブのおおよそ

10

20

30

40

50

の位置（丸付きダッシュマークによって示される）が含まれている。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、10xP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリコンビナーゼシステム部位を示し；「UB-NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SD」は、スプライスドナー部位を示す。「Het」はヘテロ接合性マウスを示し、「ho」はホモ接合性マウスを示す。

【図6】げっ歯類胚性幹（ES）細胞クローン（実施例11に記載されている）の修飾されたIg 軽鎖遺伝子座へのターゲティングベクターD（実施例10に記載されている）の挿入の縮尺どおりではない図を示しており、ES細胞クローンは、本開示に従うげっ歯類の実施形態の生成において使用された。図には、胚性幹（ES）細胞クローンが所定の例示的な配列について陽性であることを確認するために使用される様々なプローブのおおよその位置（丸付きダッシュマークによって示される）が含まれている。図中のラベルが別段示唆していない限り（例えば、選択カセット、10xP部位などについて）、塗りつぶした形状及び一本線は、マウス配列を表し、空の形状及び二重線はヒト配列を表す。「FRT」は、Frtリコンビナーゼシステム部位を示し；「UB-NEO」は、UBプロモーターを有するネオマイシン耐性遺伝子を示し；「Ei」は、イントロンエンハンサーを示し；「3'E」は、3'エンハンサーを示し；「SD」は、スプライスドナー部位を示し；「10xP」は、10x P部位を示し；「UB-HYG」は、UBプロモーターを有するハイグロマイシン耐性遺伝子を示す。「Het」はヘテロ接合性マウスを示し、「ho」はホモ接合性マウスを示す。

【図7】マウスC のヌクレオチド配列（配列番号25）を示している。コーディング配列は、太文字によって示されており、3'非翻訳領域は非太字である。

【図8】ラットC のヌクレオチド配列（配列番号27）を示している。コーディング配列は、太文字によって示されており、3'非翻訳領域は非太字である。

【図9A】修飾されたV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>ベクターのヌクレオチド配列（配列番号31）を示している。制限酵素部位配列 - AscI（配列の5'末端）及びPI-Scel（配列の3'末端）は、大文字のイタリック体文字で示されており；V<sub>1-51</sub>プロモーター配列は、小文字（非太字）によって示されており；V<sub>1-51</sub>の5'UTR配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており；再編成されたV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>配列は次を含む：V<sub>1-51</sub>のエクソン1配列は、大文字（非太字）によって示されており、その中でV<sub>1-51</sub>のエクソン1開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；V<sub>1-51</sub>のイントロン1配列は、小文字の太文字によって示されており；V<sub>1-51</sub>のエクソン2配列は、大文字で太文字で下線（実線の下線）が引かれた文字によって示されており、J<sub>2</sub>配列は、大文字で太文字で下線（破線の下線）が引かれた文字によって示されており；ヒトJ<sub>5-C</sub>イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。

【図9B】修飾されたV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>ベクターのヌクレオチド配列（配列番号31）を示している。制限酵素部位配列 - AscI（配列の5'末端）及びPI-Scel（配列の3'末端）は、大文字のイタリック体文字で示されており；V<sub>1-51</sub>プロモーター配列は、小文字（非太字）によって示されており；V<sub>1-51</sub>の5'UTR配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており；再編成されたV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>配列は次を含む：V<sub>1-51</sub>のエクソン1配列は、大文字（非太字）によって示されており、その中でV<sub>1-51</sub>のエクソン1開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；V<sub>1-51</sub>のイントロン1配列は、小文字の太文字によって示されており；V<sub>1-51</sub>のエクソン2配列は、大文字で太文字で下線（実線の下線）が引かれた文字によって示されており、J<sub>2</sub>配列は、大文字で太文字で下線（破線の下線）が引かれた文字によって示されており；ヒトJ<sub>5-C</sub>イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。

【図9C】修飾されたV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>ベクターのヌクレオチド配列（配列番号31）

）を示している。制限酵素部位配列 - A s c I（配列の 5' 末端）及び P I - S c e I（配列の 3' 末端）は、大文字のイタリック体文字で示されており；V 1 - 5 1 プロモーター配列は、小文字（非太字）によって示されており；V 1 5 1 の 5' U T R 配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており；再編成された V 1 - 5 1 / J 2 配列は次を含む：V 1 - 5 1 のエクソン 1 配列は、大文字（非太字）によって示されており、その中で V 1 - 5 1 のエクソン 1 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；V 1 - 5 1 のイントロン 1 配列は、小文字の太文字によって示されており；V 1 - 5 1 のエクソン 2 配列は、大文字で太文字で下線（実線の下線）が引かれた文字によって示されており、J 2 配列は、大文字で太文字で下線（破線の下線）が引かれた文字によって示されており；ヒト J 5 - C イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。 10

【図 1 0】V 1 - 5 1 イントロンを含む再編成された V 1 - 5 1 / J 2 可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 3 2）を示している。V 1 - 5 1 のエクソン 1 配列は、大文字によって示されており、その中で V 1 - 5 1 のエクソン 1 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；V 1 - 5 1 のイントロン 1 配列は、小文字の太文字によって示されており；V 1 - 5 1 のエクソン 2 配列は、大文字で太文字で下線（実線の下線）が引かれた文字によって示されており；J 2 配列は、大文字で太文字で下線（破線の下線）が引かれた文字によって示されている。

【図 1 1】V 1 - 5 1 イントロンを有さない再編成された V 1 - 5 1 / J 2 可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 3 3）を示している。V 1 - 5 1 コーディング配列は、大文字によって示されており、V 1 - 5 1 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；J 2 配列は、破線の下線を伴って大文字によって示されている。 20

【図 1 2】シグナルペプチドを含む再編成された V 1 - 5 1 / J 2 可変ドメインのアミノ酸配列（配列番号 3 4）を示している。イタリック体の太字は、シグナルペプチドの配列を示している。

【図 1 3 A】修飾された V 2 - 1 4 / J 2 ベクターのヌクレオチド配列（配列番号 3 6）を示している。制限酵素部位配列 - A s c I（配列の 5' 末端）及び P I - S c e I（配列の 3' 末端）は、大文字のイタリック体文字で示されており；V 1 - 5 1 プロモーター配列は、小文字（非太字）によって示されており；V 1 5 1 の 5' U T R 配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており；再編成された V 2 - 1 4 / J 2 配列は次を含む：V 2 - 1 4 のエクソン 1 配列は、大文字（非太字）によって示されており、その中で V 2 - 1 4 のエクソン 1 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；V 2 - 1 4 のイントロン 1 配列は、小文字の太文字によって示されており；V 2 - 1 4 のエクソン 2 配列は、大文字で太文字で下線（実線の下線）が引かれた文字によって示されており、J 2 配列は、大文字で太文字で下線（破線の下線）が引かれた文字によって示されており；ヒト J 5 - C イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。 30

【図 1 3 B】修飾された V 2 - 1 4 / J 2 ベクターのヌクレオチド配列（配列番号 3 6）を示している。制限酵素部位配列 - A s c I（配列の 5' 末端）及び P I - S c e I（配列の 3' 末端）は、大文字のイタリック体文字で示されており；V 1 - 5 1 プロモーター配列は、小文字（非太字）によって示されており；V 1 5 1 の 5' U T R 配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており；再編成された V 2 - 1 4 / J 2 配列は次を含む：V 2 - 1 4 のエクソン 1 配列は、大文字（非太字）によって示されており、その中で V 2 - 1 4 のエクソン 1 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；V 2 - 1 4 のイントロン 1 配列は、小文字の太文字によって示されており；V 2 - 1 4 のエクソン 2 配列は、大文字で太文字で下線（実線の下線）が引かれた文字によって示されており、J 2 配列は、大文字で太文字で下線（破線の下線）が引かれた文字によって示されており；ヒト J 5 - C イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。 40

【図 1 3 C】修飾された V 2 - 1 4 / J 2 ベクターのヌクレオチド配列（配列番号 3 50

6) を示している。制限酵素部位配列 - A s c I (配列の 5' 末端) 及び P I - S c e I (配列の 3' 末端) - は、大文字のイタリック体文字で示されており; V 1 - 5 1 プロモーター配列は、小文字 (非太字) によって示されており; V 1 5 1 の 5' U T R 配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており; 再編成された V 2 - 1 4 / J 2 配列は次を含む: V 2 - 1 4 のエクソン 1 配列は、大文字 (非太字) によって示されており、その中で V 2 - 1 4 のエクソン 1 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており; V 2 - 1 4 のイントロン 1 配列は、小文字の太文字によって示されており; V 2 - 1 4 のエクソン 2 配列は、大文字で太文字で下線 (実線の下線) が引かれた文字によって示されており、J 2 配列は、大文字で太文字で下線 (破線の下線) が引かれた文字によって示されており; ヒト J 5 - C イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。

10

【図 1 4】V 2 - 1 4 イントロンを含む再編成された V 2 - 1 4 / J 2 可変領域のヌクレオチド配列 (配列番号 3 7) を示している。V 2 - 1 4 のエクソン 1 配列は、大文字によって示されており、その中で V 2 - 1 4 のエクソン 1 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており; V 2 - 1 4 のイントロン 1 配列は、小文字の太文字によって示されており; V 1 - 5 1 のエクソン 2 配列は、大文字で太文字で下線 (実線の下線) が引かれた文字によって示されており; J 2 配列は、大文字で太文字で下線 (破線の下線) が引かれた文字によって示されている。

【図 1 5】V 2 - 1 4 イントロンを有さない再編成された V 2 - 1 4 / J 2 可変領域のヌクレオチド配列 (配列番号 3 8) を示している。V 2 - 1 4 配列は、大文字によって示されており、V 2 - 1 4 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており; J 2 配列は、破線の下線を伴って大文字によって示されている。

20

【図 1 6】シグナルペプチドを含む再編成された V 2 - 1 4 / J 2 可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 3 9) を示している。イタリック体の太字は、シグナルペプチドの配列を示している。

【発明を実施するための形態】

【0 0 7 5】

配列表における選択された配列の簡単な説明

本明細書に記載される非ヒト動物のいくつかの実施形態において使用され得る様々なヒト V 及び J 遺伝子セグメントの代表的なヌクレオチド及びアミノ酸配列は、the International Immunogenetics Information System のウェブサイトである [www.imgt.org](http://www.imgt.org)、または LeFranc, M - P., The Immunoglobulin Facts Book, Academic Press, May, 23, 2001 (本明細書で「LeFranc 2001」と称される) から入手可能である。

30

【0 0 7 6】

以下は、本明細書に記載される非ヒト動物のいくつかの実施形態において利用され得る様々なマウス、ラット、またはヒトラムダ定常領域またはドメインの代表的なヌクレオチド及びアミノ酸配列である。

40

50

## 【表 5】

表 5 : 所定のマウス Cλ 遺伝子セグメントのヌクレオチド配列

遺伝子セグメント	配列番号	配列
Cλ1	1	GCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTCCACCT TCCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGT GTACGATCACTGATTTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGAC TGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGTATGGAGAC AACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGC TAGCAGCTACCTGACCCCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGG CATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAAGGTCACA CTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGACTGTTCC
Cλ2	2	GTCAGCCCAAGTCCACTCCCCTCTCACCGTGTTCACCT TCCTCTGAGGAGCTCAAGGAAAACAAGCCACACTGGTGT GTCTGATTTCCAACCTTTTCCCCGAGTGGTGTGACAGTGGCC TGGAAGGCAAATGGTACACCTATCACCCAGGGTGTGGACA CTTCAAATCCCACCAAAGAGGGCAACAAGTTCATGGCCAG CAGCTTCCTACATTTGACATCGGACCAGTGGAGATCTCACA ACAGTTTTACCTGTCAAGTTACACATGAAGGGGACACTGTG GAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTCTC
Cλ3	3	GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACCATGTTTCACCT TTCCCCTGAGGAGCTCCAGGAAAACAAGCCACACTCGTG TGCTGATTTCCAATTTTCCCCAAGTGGTGTGACAGTGGC CTGGAAGGCAAATGGTACACCTATCACCCAGGGTGTGGAC ACTTCAAATCCCACCAAAGAGGACAACAAGTACATGGCCA GCAGCTTCTTACATTTGACATCGGACCAGTGGAGATCTCAC AACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGGACACTG TGGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTCTC

10

20

## 【表 6】

表 6 : 所定のマウス Cλ 遺伝子セグメントのアミノ酸配列

遺伝子セグメント	配列番号	配列
Cλ1	4	GQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVD WKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMASSYLTLTARAW ERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS
Cλ2	5	GQPKSTPTLTVFPPSSEELKENKATLVCLISNFSPSGVTVA WKANGTPITQGVDTSNPTKEGNKFMASFLHLTSDQWRS HNSFTCQVTHEGDTVEKSLSPAEL
Cλ3	6	GQPKSTPTLTMFPPSPEELQENKATLVCLISNFSPSGVTVA WKANGTPITQGVDTSNPTKEDNKYMASSFLHLTSDQWR SHNSFTCQVTHEGDTVEKSLSPAEL

30

40

50

## 【表 7】

表 7：所定のラット Cλ 遺伝子セグメントのヌクレオチド配列

遺伝子セグメント	配列番号	配列
Cλ1	7	GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCAC CTTCAACTGAGGAGCTCCAGGGAAACAAAGCCCACTGG TGTGTCTGATTTCTGATTTCTACCCGAGTGATGTGGAAGTG GCCTGGAAGGCAAATGGTGCACCTATCTCCCAGGGTGTGG ACACTGCAAATCCCACCAAACAGGGCAACAAATACATCG CCAGCAGCTTCTTACGTTTGACAGCAGAACAGTGGAGAT CTCGCAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGA ACACTGTGGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTGTC
Cλ2	8	ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCTGTTCCAC CTTCCTCTGAAGAGCTCAAGACTGACAAGGCTACACTGG TGTGTATGGTGACAGATTTCTACCCTGGTGTATGACAGTG GTCTGGAAGGCAGATGGTACCCCTATCACTCAGGGTGTGG AGACTACCCAGCCTTTCAAACAGAACAACAAGTACATGG CTACCAGCTACCTGCTTTTGACAGCAAAAGCATGGGAGA CTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCACCTCACGAAGAGA ACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGAGTGTTC
Cλ3	9	GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCAC CTTCAACTGAGGAGCTCCAGGGAAACAAAGCCCACTGG TGTGTCTGATTTCTGATTTCTACCCGAGTGATGTGGAAGTG GCCTGGAAGGCAAATGGTGCACCTATCTCCCAGGGTGTGG ACACTGCAAATCCCACCAAACAGGGCAACAAATACATCG CCAGCAGCTTCTTACGTTTGACAGCAGAACAGTGGAGAT CTCGCAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGA ACACTGTGGAAAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAGTGTGTC
Cλ4	10	ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCTGTTCCAC CTTCCTCTGAAGAGCTCAAGACTGACAAGGCTACACTGG TGTGTATGGTGACAGATTTCTACCCTGGTGTATGACAGTG GTCTGGAAGGCAGATGGTACCCCTATCACTCAGGGTGTGG AGACTACCCAGCCTTTCAAACAGAACAACAAGTACATGG CTACCAGCTACCTGCTTTTGACAGCAAAAGCATGGGAGA CTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCACCTCACGAAGAGA ACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGAGTGTTC

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表 8 : 所定のラット C $\lambda$  遺伝子セグメントのアミノ酸配列

遺伝子セグメント	配列番号	配列
C $\lambda$ 1	11	GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAW KANGAPISQGVDTANPTKQGNKYIASSFLRLTAEQWRSRNSF TCQVTHEGNTVEKSLSPAECV
C $\lambda$ 2	12	DQPKATPSVTLFPPSSEELKTDKATLVCMVTDYFPGVMTVV WKADGTPITQGVETTQPFKQNNKYMATSYLLLTAKAWETH SNYSCQVTHEENTVEKSLSRAECS
C $\lambda$ 3	13	GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAW KANGAPISQGVDTANPTKQGNKYIASSFLRLTAEQWRSRNSF TCQVTHEGNTVEKSLSPAECV
C $\lambda$ 4	14	DQPKATPSVTLFPPSSEELKTDKATLVCMVTDYFPGVMTVV WKADGTPITQGVETTQPFKQNNKYMATSYLLLTAKAWETH SNYSCQVTHEENTVEKSLSRAECS

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

表 9 : 所定のヒト C λ 遺伝子セグメントのヌクレオチド配列

遺伝子セグメント	配列番号	配列
C λ 1	15	CCCAAGGCCAACCCACGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCT CTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCT GATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCTTGG AGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACGAC CAAACCCTCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAG CAGCTACCTGAGCCTGACGCCGAGCAGTGGAAAGTCCCAC AGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCG TGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATAG
C λ 2	16	GTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCC TCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCT TGGAAAGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGA CCACCACACCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGG CCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTC CCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGC ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA
C λ 3	17	CCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCCCTCCTC TGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTC ATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTTGCCTGGAA GGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGGGTGGAGACCACC ACACCCTCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACA AAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGT GGAGAAGACAGTTGCCCTACGGAATGTTTCATAG
C λ 6	18	GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCATCGGTCACTCTGTTCCCGCC CTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT TGCCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGAAAGTGGC CTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAACACGGGAGTGGAG ACCACCACACCCTCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGT CCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTGCAGAATGTTTCATAG

10

20

30

【表 9 - 2】

遺伝子セグメント	配列番号	配列
C λ 7	19	GTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCC TCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT GTCTCGTAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCC TGGAAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGTGGGAGTGGAGA CCACCAAACCCTCAAACAAGCAACAACAAGTATGCGG CCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCGAGCAGTGGAAAGTC CCACAGAAGCTACAGCTGCCGGGTACGCATGAAGGGAGC ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTGCAGAATGCTCT

40

50



## 【表 10】

表 10：所定のヒト Cλ 遺伝子セグメントのアミノ酸配列

遺伝子セグメント	配列番号	配列
Cλ1	20	PKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Cλ2	21	QPKAAPSVTFLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Cλ3	22	PKAAPSVTFLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHK SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Cλ6	23	QPKAAPSVTFLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAW KADGSPVNTGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECs
Cλ7	24	QPKAAPSVTFLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYFGAVTVAW KADGSPVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECs

10

20

## 【0077】

以下は、本明細書に記載される非ヒト動物のいくつかの実施形態において利用され得るマウス、ラット、またはヒトCλ定常領域またはドメインの代表的なヌクレオチド及びアミノ酸配列である。

## 【0078】

マウスCλのヌクレオチド配列（配列番号25）（図7で再現されている）：

## 【0079】

GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACTCATC  
CAGTGAGCAGTTAAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGC  
TCTTGAACAACCTTCTACCCCAAGACATCAATGTCAAGT  
GGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAA  
CAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGC  
ATGAGCAGCACCTCTACGTTGACCAAGGACGAGTATGAAC  
GACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAGACATC  
AACTTCAACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT  
TAGagacaaaggctctgagacgccaccaccagctccccag  
ctccatccctctctctctctctctctctctctctctctctct  
cacaagcgcacctaccactgttgctgggtgctccaaaacctct  
ccccacctctctctctctctctctctctctctctctctctct  
atcatgctaataatttgcaaaaataattcaataaagtgagt  
ctttgcaactga

30

40

## 【0080】

配列番号25に関して、以下が適用される：

- コーディング配列は、太文字によって示されており；
- 3'非翻訳領域は非太字である。

## 【0081】

マウスCλのアミノ酸配列（配列番号26）：

## 【0082】

ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNIFYPKDINVKW

50

K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y E R  
H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E C

【0083】

ラットC のヌクレオチド配列 (配列番号27) (図8で再現されている) :

【0084】

G G G C T G A T G C T G C A C C A A C T G T A T C T A T C T T C C C A C C A T C  
C A C G G A A C A G T T A G C A A C T G G A G G T G C C T C A G T C G T G T G C  
C T C A T G A A C A A C T T C T A T C C C A G A G A C A T C A G T G T C A A G T  
G G A A G A T T G A T G G C A C T G A A C G A C G A G A T G G T G T C C T G G A  
C A G T G T T A C T G A T C A G G A C A G C A A A G A C A G C A C G T A C A G C  
A T G A G C A G C A C C C T C T C G T T G A C C A A G G C T G A C T A T G A A A  
G T C A T A A C C T C T A T A C C T G T G A G G T T G T T C A T A A G A C A T C  
A T C C T C A C C C G T C G T C A A G A G C T T C A A C A G G A A T G A G T G T  
T A G A C C C A A A G G T C C T G A G G T G C C A C C T G C T C C C C A G C T C  
C T T C C A A T C T T C C C T C C T A A G G T C T T G G A G A C T T C C C C A C  
A A G C G A C C T A C C A C T G T T G C G G T G C T C C A A A C C T C C T C C C  
C A C C T C A T C C T C C T T C C T T T C C T T G G C T T T G A T C A T G C T A  
A T A T T T G G G G A A T A T T A A A T A A A G T G A A T C T T T G C A C T T G  
A

10

【0085】

配列番号27に関して、以下が適用される :

- コーディング配列は、太文字によって示されており ;
- 3'非翻訳領域は非太字である。

20

【0086】

ラットC のアミノ酸配列 (配列番号28) :

【0087】

A D A A P T V S I F P P S T E Q L A T G G A S V V C L M N N F Y P R D I S V K W  
K I D G T E R R D G V L D S V T D Q D S K D S T Y S M S S T L S L T K A D Y E S  
H N L Y T C E V V H K T S S S P V V K S F N R N E C

30

【0088】

ヒトC のヌクレオチド配列 (配列番号29) :

【0089】

G A A C T G T G G C T G C A C C A T C T G T C T T C A T C T T C C C G C C A T C  
T G A T G A G C A G T T G A A A T C T G G A A C T G C C T C T G T T G T G T G C  
C T G C T G A A T A A C T T C T A T C C C A G A G A G G C C A A A G T A C A G T  
G G A A G G T G G A T A A C G C C C T C C A A T C G G G T A A C T C C C A G G A  
G A G T G T C A C A G A G C A G G A C A G C A A G G A C A G C A C C T A C A G C  
C T C A G C A G C A C C C T G A C G C T G A G C A A A G C A G A C T A C G A G A  
A A C A C A A A G T C T A C G C C T G C G A A G T C A C C C A T C A G G G C C T  
G A G C T C G C C C G T C A C A A A G A G C T T C A A C A G G G G A G A G T G T

40

【0090】

ヒトC のアミノ酸配列 (配列番号30) :

【0091】

T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W  
K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K  
H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

【0092】

修飾されたV 1 - 51 / J 2ベクターのヌクレオチド配列 (配列番号31) (図1Aに概略的に示されており、図9A~9Cで再現されている) :

【0093】

50

【化 1 - 1】

*GGCGCGCC* acctgcagtgacacctgaggtgacatggttctgaacatcacttccccattgaaggcccagtg  
acctatcactgcttctcaaaatcaggaactaggtgactctaggagagtgacacaggaagcttctgcatattcttcaagagattcagaggtca

【化 1 - 2】

ctgactctttttcaagactaaacacaaaatccacatccatcattctgctaaagagaccattctttttttgagatggagctcgcctctgttgc  
ccaagctggagtgagtgccatgatctcggtcactgcaagctctgcttctgggtcatgccctctcctgcctcagcctccaagtagctgg  
gactacaggcaccgcccatgcccgctaattttttagtggagatggggttcaacatggtggccagaatggtctgtatctctg  
acctgctgatccaccgctggcctcccaagtctgggattacaggtgtgagccactgcaccggcccaagatggggttcatcatgttgc  
acctggctggtctcaaacctcaacccaagtgatccactcactcagcctcccaagtctgggatgacaggcgtgagccacagtgcccg  
gcctagatcattgttaaatggtgatgtaaacctcatggtactacaactgcctggtgacagactcaccagagtaataactatcctgctgttct  
ccaaccatgggattccccaaacaagattgtgagccaagatgcatcatgccagaactctgagtcatacacataattgtttcatttaa  
taaatacggttatctttttctcatttttttaattgtatcatctctaggtttcattacacatacaagatgaataatttctctatcttaggacatg  
ctgaaaactcattagtgatttgaacagtattttcctaaacatcctagttggaatggtgatcctaaaagctaccatgtgtcaggctcactg  
agtgcagactgtggtctaacaagctaagtttaattctcattctcaaatcaggagcatattgctgttttctcttagcaaacactgcaaa  
gtcattgccaggatctctgcagactggcattcagtgatggagaacagactcctaggtgagatccctggtcacaggatccagatgactatg  
actgcaagtctggaaaagaagagacagaacaagattaccagcataaccctctgagaatgtgccccagccatcctggagggaagagctc  
cctattgaccagcactgcagaatccacagaggaaggacagctctggccaccaggagcagccacacgacaagagaggaccgggtgct  
cccacaggtaggaaatgagtcctgggctggtcagtgctctcatttctccataacaggactttgtgtatgaccacctgagtccta  
tacagtgaacagccaaggagacatggacagattcaccctgaggaaccagtagaatgtgaagtctgccctgaggtcacgaagaaaaga  
ctcggggggctgctggcctggccctgatggagggggccatggacagaacaacggggaggcaggggtgctctgagaggctctgtgca  
cctgtcatacaatggtggtgtacaatgtgcaccatggacactagggggcgcctgctgcaccattcctgagaagactgggtgtgatgagag  
caggaccagcggccactgtcctgctgtgctgctatgcttagggctcagatgcaactctccaccctgggaccacacagccccacc  
ctggcactcttgacatcctcaggcagaggagctgaccaggggccagggtgggatcagaaagctggagggtctgatttgcattggatgg  
accctcctctcagagtataagagggggcagggagagactggggaagctctgctcagctgTGAGCGCAGAAGGCAGG  
ACTCGGGACAATCTTCATCAIGACCTGCTCCCCCTCTCCTCCTCACCCCTTCTCATTCACT  
GCACAGgtgccagacacagggtcaggggaggggtccaggaagccatgaggccctgcttctcctctctcttagaccaag  
aatcaccgtgtgtgtctctctgcttccagGGTCCCTGGGCCAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC  
CTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCA  
GCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACA  
GCCCCAAACTCCTCATTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACT  
CCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGCAGCCTGA  
GTGCTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTAGgtaagtaattttcactattg  
tcttctgaaatttgggtctgatgcccagiatfagcttllagaggctlaaataggagttggtaaagattggtaaatgagggcattlaagattg  
ccatgggtfgcaaaagftaaactcagcttcaaaaatggattfggagaaaaaagattaaattgctctaaactgaatgacacaaaagtaa

10

20

30

40

【化 1 - 3】

aaaaaaaaaagtgiaactaaaaaggaacccttgaatttcaaggagcaaaaagtaaatttttttgcactcttgcacaatattgtattggtt  
gttctgatfatgatgatacagaaaagtggaaaaatacattttttagtcttctccttttggataaattttttgicagacaacaataaa  
aatcaatagcaagcccaagaTGCCATTTCATTACCTCTTCTCCGCACCCGACATAGAT

50

## 【0094】

配列番号31に関して、以下が適用される：

- 制限酵素部位配列 - A s c I (配列の5'末端)及びP I - S c e I (配列の3'末端)
- は、大文字のイタリック体文字で示されており；
- V 1 - 5 1プロモーター配列は、小文字(非太字)文字によって示されており；
- V 1 - 5 1の5'UTR配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており；
- 再編成されたV 1 - 5 1/J 2配列は次を含む：
  - o V 1 - 5 1のエクソン1配列は、大文字(非太字)によって示されており、その中でV 1 - 5 1のエクソン1開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；
  - o V 1 - 5 1のイントロン1配列は、小文字の太文字によって示されており；
  - o V 1 - 5 1のエクソン2配列は、大文字で太文字で下線(実線の下線)が引かれた文字によって示されており、
  - o J 2配列は、大文字で太文字で下線(破線の下線)が引かれた文字によって示されており；
- ヒトJ 5 - C イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。

10

## 【0095】

V 1 - 5 1イントロンを含む再編成されたV 1 - 5 1/J 2可変領域のヌクレオチド配列(配列番号32)(図10で再現されている)：

## 【0096】

## 【化2】

ATGACCTGCTCCCCTCTCCTCCTCACCCCTTCTCATTCACTGCACAGgtgccc  
cagacacagggtcaggggagggtccaggaagcccatgaggccctgcttctctctctctctagaccaagaatcacctgtctgtgtctc  
tcctgctccagGGTCCTGGGCCAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCC  
CCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAA  
TTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATTATGA  
CAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAC  
GTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTACT  
GCGGAACATGGGATAGCAGCCTGAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTG  
ACCGTCCTAG

30

## 【0097】

配列番号32に関して、以下が適用される：

- V 1 - 5 1のエクソン1配列は、大文字によって示されており、V 1 - 5 1のエクソン1開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；
- V 1 - 5 1のイントロン1配列は、小文字の太文字によって示されており；
- V 1 - 5 1のエクソン2配列は、大文字で太文字で下線(実線の下線)が引かれた文字によって示されており、
- J 2配列は、大文字で太文字で下線(破線の下線)が引かれた文字によって示されている。

40

## 【0098】

V 1 - 5 1イントロンを有さない再編成されたV 1 - 5 1/J 2可変領域のヌクレオチド配列(配列番号33)(図11で再現されている)：

## 【0099】

50

## 【化 3】

ATGACCTGCTCCCCTCTCCTCCTCACCCCTTCTCATTCACTGCACAGGGT  
CCTGGGCCAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGA  
AGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCT  
GGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATTATGACAATAATAAG  
CGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACC  
CTGGGCATCACCGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATG  
GGATAGCAGCCTGAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG

10

## 【0100】

配列番号 33 に関して、以下が適用される：

- V 1 - 51 コーディング配列は、大文字によって示されており、V 1 - 51 開始コ  
ドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；
- J 2 配列は、破線の下線を伴って大文字によって示されている。

## 【0101】

シグナルペプチドを含む再編成された V 1 - 51 / J 2 可変ドメインのアミノ酸配  
列（配列番号 34）（図 12 で再現されている）：

## 【0102】

## 【化 4】

MTCSPLLLTLIHCTGSWAQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNN  
YVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGT  
WDSSLSAVVFGGGTKLTVL

20

## 【0103】

配列番号 34 に関して、イタリック体の太字は、シグナルペプチドの配列を示している

## 【0104】

シグナルペプチドを有さない再編成された V 1 - 51 / J 2 可変ドメインのアミノ  
酸配列（配列番号 35）：

## 【0105】

Q S V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G S S S N I G N N Y V S W Y Q Q L  
P G T A P K L L I Y D N N K R P S G I P D R F S G S K S G T S A T L G I T G L Q  
T G D E A D Y Y C G T W D S S L S A V V F G G G T K L T V L

30

## 【0106】

修飾された V 2 - 14 / J 2 ベクターのヌクレオチド配列（配列番号 36）（図 2  
A に概略的に示されており、図 13 A ~ 13 C で再現されている）：

40

50

【化 5 - 1】

GGCGCGCCacctgcagtgacacctgaggtgacatggttctgaacatcactttcccattgaaggcccagtgacctatcacttgcttc  
 tcaaaattcaggaactaggtgactctaggagagtgcacaggaagctttctcatattttcaagagatttcgaggtcactgactctttttcaag  
 acttaaacacaaaaaccacatccatcattcttgcgtaaagagaccattcttttttttgatggagtctcgtctgttgccaagtggagtgca  
 gtggcatgatctcggctcactgcaagctctgtcttctgggttcatgcccttctcctgcctcagcctccaagtagctgggactacaggcacc  
 gccgccatgcccggctaattttttgatttttagtgagatggggttcaacatgtggccagaatggcttctgatctcttgacctcgtgatccacc  
 cgccttggcctcccaaagtctgggattacaggtgtgagccaactgcacccggccaagatggggttcatcatgttgacctggctggtctca  
 aactccaacctcaagtgatccactcactcagcctcccaaagtctgggatgacagggcgtgagccacagtgcaccggcctagtagcattgtt  
 aaatggtgcatgtaaaacctatggtactacaactgctgtgacagactcaccagagtaataactatcctgctgttctcaaccacatggg  
 attcccaacaaaagattgttgagtccaagatgcatcatgccagaactctgacgtcatacacataattgtttcatttaataataacggttatct  
 tttttctcagttattgttttaattgatcatcttctaggtttcattacacatacaagatgaataattctctcatcttaggacatgctgaaaaactcat  
 tagtgattttgaacagtattttctaaacatcctagttggaatggtgatcctaaaagctaccatgtgtcaggctcacctgagtgacagactgtg  
 gtctaaacaagctaagtttaattctccatcttcaatacggagcatatttctgttttctcttttagcaaaactgcгаагсcattcgccagg  
 atctctgcagactggcattcagtgatggagaacagactcctaggtgagatccctggtcacaggatccagatgactatgactgcaagtctgg  
 aaaagaagagacagaacaagattaccagcataacctctgagaatgtgccccagccatcctggagggaagagctccctattgaccag  
 cactgcagaatccacagaggaaggacagctctggccaccaggagcagccacacgacaagagaggaccgggtccccacaggtgag  
 gaaatgagtccatggggctggtcagtctcgtgattcattctgccataacaggactttgtgtagtcaccacctgagctctatacagtgaacag  
 ccaaggagacatggacagattcaccctgaggaaccagtagaatgtgaagtctgccctgaggtcacgaaagaaagactcggggggctg  
 cctggcctggccctgatggagggggacctggacagaacaacggggaggcaggggtgtctctgagaggctgtgtcacctgtcatacaat  
 ggtggtgtacaatgtcgcaccatggacactagggggcgcctgtcgcaccattcctgagaagactgggtgtgatgagagcaggaccagcgc  
 cacctgtcctgctgtggtgcctatgcttagggctcacagatgtcaactctccaccccctgggaccacacagccccaccctggcactctga  
 catcctcaggcagaggagctgaccagggccagggtgggatcagaaagctggagggtctgattgcatggatggaccctccttctca  
 gagtataaagaggggagggagagacttggggaagctctgctcagctgTGAGCGCAGAAGGCAGGACTCGGGA  
 CAATCTTCATCATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCCCTCCTCACTCAGGGCACAGgt  
 gacgctccaggggaaggggctcagggaccttgggtgatccttggctcctgctcctcaggctcaccggggcccagcactgactc  
 actggcatgtgttctccctctttccagGGTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTC  
 CGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCA

10

20

30

【化 5 - 2】

GTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAA  
GCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAAT  
CGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTC  
CAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCAC  
TCTCGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG*glaaglaattttcaactattgtc*  
*ttctgaaatllgggtctgatggccagiatltagacttttagaggctlaaataggagtllgglaaagattgglaaatgagggcattlaagattlgc*  
*catgggtlgaanaagllaaactcagctllcaaaaatggattggagaaaaaagattaaattgctctaaactgaatgacacaaaagtaaa*  
*aaaaaaaaagtlaaactaaaaggaaccctllglatllcaaggagcaaaaglaaattlattttgttcactcttgccaaatattglattgggtg*  
*llgctgattatgcatgatacagaaaagtgaaaaatacatttttaglctttcccttttggataaattattlgtcagacaacaataaaa*  
*atcaatagcacgcctaagaTGCCATTTCACTTCTTCTCCGCACCCGACATAGAT*

40

50

## 【0107】

配列番号36に関して、以下が適用される：

- 制限酵素部位配列 - A s c I (配列の5'末端)及びP I - S c e I (配列の3'末端)
- は、大文字のイタリック体文字で示されており；
- V 1 - 5 1プロモーター配列は、小文字(非太字)文字によって示されており；
- V 1 - 5 1の5'UTR配列は、大文字イタリック体太文字によって示されており；
- 再編成されたV 2 - 1 4 / J 2配列は次を含む：
  - o V 2 - 1 4のエクソン1配列は、大文字(非太字)によって示されており、その中でV 2 - 1 4のエクソン1開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；
  - o V 2 - 1 4のイントロン1配列は、小文字の太文字によって示されており；
  - o V 2 - 1 4のエクソン2配列は、大文字で太文字で下線(実線の下線)が引かれた文字によって示されており、
  - o J 2配列は、大文字で太文字で下線(破線の下線)が引かれた文字によって示されており；
  - o ヒトJ 5 - C イントロン配列は、小文字イタリック体文字によって示されている。

10

## 【0108】

V 2 - 1 4イントロンを含む再編成されたV 2 - 1 4 / J 2可変領域のヌクレオチド配列(配列番号37)(図14で再現されている)：

20

## 【化6-1】

ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCTCCTCACTCAGGGCACAGgtgacgcctccaggaag  
gggcttcagggacctctgggctgatccttggctcctgctcctcaggctcaccggggccagcactgactcactggcatgtgttctccctctt  
tccagGGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGCTGGGTCTCCTG  
GACAGTCGATACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACT

## 【化6-2】

ATGTCCTCTGGTACCAACAGCACCCAGGCCAAAGCCCCAAACTCATGATTTATGAGG  
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACA  
CGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCA  
GCTCATATAACAAGCAGCAGCACTCTCGTGGTATTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC  
GTCCTAG

30

## 【0109】

配列番号37に関して、以下が適用される：

- V 2 - 1 4のエクソン1配列は、大文字によって示されており、V 2 - 1 4のエクソン1開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；
- V 2 - 1 4のイントロン1配列は、小文字の太文字によって示されており；
- V 1 - 5 1のエクソン2配列は、大文字で太文字で下線(実線の下線)が引かれた文字によって示されており；
- J 2配列は、大文字で太文字で下線(破線の下線)が引かれた文字によって示されている。

40

## 【0110】

V 2 - 1 4イントロンを有さない再編成されたV 2 - 1 4 / J 2可変領域のヌクレオチド配列(配列番号38)(図15で再現されている)：

## 【0111】

50

## 【化 7】

ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCTCCTCACTCAGGGCACAGGGT  
CCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCTGGACAGT  
CGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCT  
CCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAACTCATGATTTATGAGGTCAGT  
AATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCC  
TCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACTGCAGCTCA  
TATACAAGCAGCAGCACTCTCGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCT  
AG

10

## 【0112】

配列番号 38 に関して、以下が適用される：

- V 2 - 14 配列は、大文字によって示されており、V 2 - 14 開始コドンは、さらにイタリック体で下線が引かれており；
- J 2 配列は、破線の下線を伴って大文字によって示されている。

## 【0113】

シグナルペプチドを含む再編成された V 2 - 14 / J 2 可変ドメインのアミノ酸配列（配列番号 39）（図 16 で再現されている）：

20

## 【0114】

## 【化 8】

MAWALLLLTLLTQGTGSWAQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGY  
NYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS  
SYTSSSTLVVFGGGTKLTVL

## 【0115】

配列番号 39 に関して、イタリック体の太字は、シグナルペプチドの配列を示している。

30

## 【0116】

シグナルペプチドを有さない再編成された V 2 - 14 / J 2 可変ドメインのアミノ酸配列（配列番号 40）：

## 【0117】

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q  
H P G K A P K L M I Y E V S N R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L T I S G L  
Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S S T L V V F G G G T K L T V L

## 【0118】

## 定義

本発明の範囲は、本明細書に添付された特許請求の範囲によって定義され、本明細書に記載の所定の実施形態によって限定されない。本明細書を読む当業者は、そのような記載された実施形態と同等であり、またはそうでなければ特許請求の範囲内であり得る様々な改変を認識することになる。通常、本明細書で使用される用語は、別段明確に示されない限り、当該技術分野におけるそれらの理解される意味に従う。所定の実施形態の明確な定義が以下に提供される；本明細書を通して特定の例におけるこれらの及び他の用語の意味は、文脈から当業者に明らかになる。以下の及び他の用語のための追加の定義が本明細書を通して示されている。本明細書内で引用される特許及び非特許文献の参考文献またはそれらの関連部分は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

## 【0119】

特許請求の範囲における請求項の要素を修飾するための「第 1」、「第 2」、「第 3」

50



などの序数詞用語の使用は、それ自体が、ある請求項の要素の別のものに対する任意の優先度、先行度、もしくは順序、または方法の行為が実施される時間的順序を含意するものではないが、所定の名称を有するある請求項の要素を、同じ名称（ただし、序数詞用語を使用する場合）を有する別の要素と区別して請求項の要素を区別するための標識として使用されるにすぎない。

#### 【0120】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書で使用される場合、明らかに反対に示されない限り、複数の言及を含むものとして理解されるべきである。群の1つ以上のメンバーの間に「または」を含む請求項または記載は、反対に示されない限り、または別段文脈から明らかでない限り、群のメンバーの1つ、複数、またはすべてが、所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられるか、またはそうでなければ関連している場合に満たされると考えられる。いくつかの実施形態では、群の正確に1つのメンバーが所与の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する。いくつかの実施形態では、複数、またはすべての群メンバーが所与の生成物またはプロセスに存在する、用いられる、またはそうでなければ関連する。本発明は、別段示されない限り、または矛盾もしくは不整合が生じるであろうことが当業者に明らかでない限り、列挙された請求項のうち1つ以上からの1つ以上の限定、要素、条項、記述用語などが、同じ基本請求項に従属する別の請求項（または、関連する場合、任意の他の請求項）に導入されるすべての類型、組み合わせ、並べ替えを包含することを理解されたい。要素が、リストとして（例えば、マーカッシュ群または類似する形式）で提示される場合、要素の各亜群も開示され、任意の要素（複数可）が群から除去され得ることを理解されたい。通常、実施形態または態様が特定の要素、特徴などを「含む」と称される場合、所定の実施形態または態様は、そのような要素、特徴などから「なる」または「本質的になる」ことが理解されるべきである。単純化の目的のため、それらの実施形態は、本明細書において非常に多くの言葉であらゆる場合に具体的に示されているわけではない。任意の実施形態または態様は、特定の除外が本明細書で記述されるかどうかにかかわらず、特許請求の範囲から明白に除外され得ることも理解されるべきである。

#### 【0121】

投与：本明細書で使用される場合、組成物（例えば、抗原または抗体）の対象またはシステムへの（例えば、細胞、器官、組織、生物、もしくは関連成分またはそれらの一連の成分への）投与を含む。当業者は、投与経路が、例えば、組成物が投与される対象またはシステム、組成物の特質、投与の目的などに応じて変わり得ることを理解する。例えば、所定の実施形態では、動物対象への（例えば、ヒトまたはげっ歯類への）投与は、気管支（気管支注入によるものを含む）、口腔内、腸内、皮間、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、髄腔内、静脈内、脳室内、粘膜、鼻、経口、直腸、皮下、舌下、局所、気管（気管内注入によるものを含む）、経皮、膈及び/または硝子体であり得る。いくつかの実施形態では、投与は、間欠的投薬を含み得る。いくつかの実施形態では、投与は、少なくとも選択された期間の連続投薬（例えば、かん流）を含み得る。

#### 【0122】

抗原結合タンパク質：本明細書で使用される場合、少なくとも1つの対象となる抗原に特異的に結合する任意のタンパク質またはポリペプチドを指す。抗原結合タンパク質には、抗体、重鎖、軽鎖（例えば、または軽鎖）、重鎖可変ドメイン、軽鎖可変ドメイン（例えば、または軽鎖可変ドメイン）、及び一本鎖可変断片（S c F v）が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、多重特異的であり、2つ以上のエピトープまたは抗原に特異的に結合し得る。

#### 【0123】

およそ：対象となる1つ以上の値に適用される場合、記述された参照値に類似する値を含む。所定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、別段記述されない限りまたは文脈から別段明らかでない限り、記述された参照値の（それよりも高いまたは低い） $\pm 10\%$ 以内に入る値の範囲を指す（そのような数が、可能性のある値の100%を超え

10

20

30

40

50

るであろう場合を除く)。

【0124】

生物学的に活性：本明細書で使用される場合、生物学的システムにおいて、*in vitro*でまたは*in vivo*で(例えば、生物において)活性を有する任意の物質の特徴を指す。例えば、生物に存在する場合、その生物内で生物学的効果を有する物質は、生物学的に活性と考えられる。特定の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドが生物学的に活性である場合、タンパク質またはポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を共有するそのタンパク質またはポリペプチドの部分は、典型的には、「生物学的に活性な」部分と称される。

【0125】

同等の：本明細書で使用される場合、2つ以上の物質、実体、状況、一連の状態などであって、互いに同一ではない場合があるが、観察される相違または類似性に基づいて合理的に結論が出され得るようにそれらの間の比較を可能とするのに十分に類似するものを指す。当業者は、文脈の中で、どの程度の同一性が、任意の所与の状況において2つ以上のそのような物質、実体、状況、一連の状態などが同等と考えられるために必要とされるかを理解する。

【0126】

保存的：本明細書で使用される場合、保存的アミノ酸置換を表す場合、類似する化学的特性(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を含む例を指す。通常、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の対象となる機能的特性、例えば、リガンドに結合する受容体の能力を実質的に変化させない。類似する化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸の基の例には、脂肪族側鎖、例えば、グリシン(Gly、G)、アラニン(Ala、A)、バリン(Val、V)、ロイシン(Leu、L)、及びイソロイシン(Ile、I)；脂肪族-ヒドロキシル側鎖、例えば、セリン(Ser、S)及びトレオニン(Thr、T)；アミド含有側鎖、例えば、アスパラギン(Asn、N)及びグルタミン(Gln、Q)；芳香族側鎖、例えば、フェニルアラニン(Phe、F)、チロシン(Tyr、Y)、及びトリプトファン(Trp、W)；塩基性側鎖、例えば、リジン(Lys、K)、アルギニン(Arg、R)、及びヒスチジン(His、H)；酸性側鎖、例えば、アスパラギン酸(Asp、D)及びグルタミン酸(Glu、E)；及び硫黄含有側鎖、例えば、システイン(Cys、C)及びメチオニン(Met、M)が含まれる。保存的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(Val/Leu/Ile、V/L/I)、フェニルアラニン/チロシン(Phe/Tyr、F/Y)、リジン/アルギニン(Lys/Arg、K/R)、アラニン/バリン(Ala/Val、A/V)、グルタミン酸/アスパラギン酸(Glu/Asp、E/D)、及びアスパラギン/グルタミン(Asn/Gln、N/Q)が含まれる。いくつかの実施形態では、保存的アミノ酸置換は、例えば、アラニンスキニング変異誘発において使用されるように、アラニンを有するタンパク質における任意のネイティブ残基の置換であり得る。いくつかの実施形態では、Gonnet, G.H. et al., 1992, Science 256: 1443-1445(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているPAM250対数尤度マトリックスにおいて正の値を有する保存的置換がなされる。いくつかの実施形態では、置換は適度な保存的置換であり、その場合、置換は、PAM250対数尤度マトリックスにおいて負ではない値を有する。

【0127】

対照：本明細書で使用される場合、結果が比較される標準である「対照」の当該技術分野で理解される意味を指す。典型的には、対照は、変数についての結論を出すために、そのような変数を分離することによって実験における完全性を増強するために使用される。いくつかの実施形態では、対照は、比較要素を提供するために試験反応またはアッセイと同時に実施される反応またはアッセイである。「対照」にはまた、「対照動物」が含まれる。「対照動物」は、本明細書に記載される改変を有し得、本明細書に記載されるものとは異なる改変を有し得、または改変を有さない場合がある(すなわち、野生型動物)。あ

10

20

30

40

50

る実験では、「試験」パラメータ（例えば、試験される変数）が適用される。もう一つの実験では、試験される変数である「対照」は適用されない。いくつかの実施形態では、対照は、既存対照（すなわち、既に実施された試験もしくはアッセイ、または既に知られている量もしくは結果の）である。いくつかの実施形態において、対照は、印刷されたまたはそうでなければ保存された記録であり、またはそれを含む。対照は、陽性対照または陰性対照であり得る。

【0128】

破壊：本明細書で使用される場合、DNA分子での（例えば、内因性相同配列、例えば、遺伝子または遺伝子座での）相同組換え事象の結果を指す。いくつかの実施形態では、破壊は、挿入、欠失、置換、置き換え、ミスセンス変異、もしくはDNA配列（複数可）のフレームシフト、またはそれらの任意の組み合わせを達成し、または表し得る。挿入には、遺伝子全体または遺伝子断片、例えば、エクソンの挿入が含まれ得、これは、内因性配列以外の起源のもの（例えば、異種配列）であり得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子または遺伝子産物の（例えば、遺伝子によってコードされるポリペプチドの）発現及び/または活性を増加させ得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子または遺伝子産物の発現及び/または活性を低下させ得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子またはコードされる遺伝子産物（例えば、コードされるポリペプチド）の配列を変化させ得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子またはコードされる遺伝子産物（例えば、コードされるポリペプチド）を切断または断片化し得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子またはコードされる遺伝子産物を伸長させ得る。いくつかのそのような実施形態では、破壊は、融合ポリペプチドの構築を達成し得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子または遺伝子産物の活性ではなくレベルに影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子または遺伝子産物のレベルではなく活性に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子または遺伝子産物のレベルに対する有意な影響を有しない場合がある。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子または遺伝子産物の活性に対する有意な影響を有しない場合がある。いくつかの実施形態では、破壊は、遺伝子または遺伝子産物のレベルに対しても活性に対しても有意な影響を有しない場合がある。

【0129】

決定すること、測定すること、評定すること、評価すること、アッセイすること及び分析すること：任意の測定形態を指すために本明細書で互換的に使用され、要素が存在するかしないかを決定することを含む。これらの用語には、定量的及び/または定性的決定の両方が含まれる。アッセイは相対的または絶対的であり得る。「の存在についてのアッセイ」は、存在する何かの量を決定すること及び/または存在するか存在しないかを決定することであり得る。

【0130】

内因性プロモーター：本明細書で使用される場合、内因性遺伝子と天然に関連する、例えば、野生型生物にあるプロモーターを指す。

【0131】

修飾された：本明細書で使用される場合、通常、人の手によって操作された態様を指す。例えば、いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、天然におけるその順序で互いに連結されていない2つ以上の配列が、修飾されたポリヌクレオチドにおいて互いに直接的に連結されるように人の手によって操作された場合、「修飾された」と考えられ得る。いくつかの実施形態では、修飾されたポリヌクレオチドは、天然では第1のコーディング配列と機能可能に関連して見られるが、第2のコーディング配列と機能可能に関連して見られず、人の手によって第2のコーディング配列と機能可能に関連するように連結された制御配列を含み得る。代替的に、または追加的に、いくつかの実施形態では、天然では互いに連結されていないポリペプチド要素またはドメインをそれぞれコードする第1及び第2の核酸配列は、単一の修飾されたポリヌクレオチドにおいて互いに連結され得る。同様に、いくつかの実施形態では、細胞または生物は、その遺伝情報が変化するように操作さ

10

20

30

40

50

れた場合（例えば、以前には存在しない新たな遺伝物質が導入された場合、または以前から存在する遺伝物質が変化または除去された場合）、「修飾された」と考えられ得る。一般的な実務であり、当業者によって理解されるように、修飾されたポリヌクレオチドまたは細胞の子孫は、典型的には、実際の操作が先行実体に対して実施された場合であっても、それでもなお「修飾された」と称される。さらに、当業者によって理解されるように、本明細書に記載される「修飾すること」が達成され得る多様な方法論が利用可能である。例えば、いくつかの実施形態では、「修飾すること」は、分析または比較を実施するように、またはそうでなければ配列、変化などを分析、推奨、及び/または選択するようにプログラムされたコンピュータシステムの使用を介する（例えば、核酸配列、ポリペプチド配列、細胞、組織、及び/または生物の）選択または設計を含み得る）。代替的に、または追加的に、いくつかの実施形態では、「修飾すること」は、*in vitro* 化学的合成方法論及び/または組換え核酸技術、例えば、核酸増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を介する）ハイブリダイゼーション、変異、形質転換、トランスフェクションなど、及び/または多様なコントロール交配方法論のいずれかの使用を含み得る。当業者によって理解されるように、多様な確立されたそのような技術（例えば、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養及び形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクションなど）のためのもの）は、当該技術分野でよく知られており、本明細書を通して引用及び/または論述される様々な一般的及びより具体的な参考文献に記載されている。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989及びPrinciples of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Manipulation, 5th Ed., ed. By Old, R.W. and S.B. Primrose, Blackwell Science, Inc., 1994（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照。

10

20

#### 【0132】

機能性：本明細書で使用される場合、特定の特性を示し（例えば、コーディング配列の一部を形成する）及び/または活性を示す実体の形態または断片（例えば、遺伝子または遺伝子セグメント）を指す。例えば、免疫グロブリンの文脈では、可変領域は、機能性コーディング配列を形成するように構築された（または組み換えられた）独自の遺伝子セグメント（すなわち、V、D及び/またはJ）によってコードされる。ゲノムに存在する場合、遺伝子セグメントはクラスターで組織されているが、バリエーションが存在する。「機能性」遺伝子セグメントは、発現される配列（すなわち、可変領域）に現れる遺伝子セグメントであって、対応するゲノムDNAが単離され（すなわち、クローニングされ）、配列によって同定された、遺伝子セグメントである。いくつかの免疫グロブリン遺伝子セグメント配列は、発現されるレパートリーには現れないものの、オープンリーディングフレームを含有し、機能性と考えられるのに対し、他の免疫グロブリン遺伝子セグメント配列は、変異（例えば、点変異、挿入、欠失など）を含有し、その結果、終止コドン及び/または切断された配列をもたらし、これはその後、そのような遺伝子セグメント配列が、非変異配列（複数可）に関連する特性（複数可）及び/または活性（複数可）を発揮することを不可能とする。そのような配列は、発現される配列には現れず、そのため、偽遺伝子として分類される。

30

40

#### 【0133】

遺伝子：本明細書で使用される場合、産物（例えば、RNA産物及び/またはポリペプチド産物）をコードする染色体におけるDNA配列を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子は、コーディング配列（すなわち、特定の産物をコードする配列）を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子は、ノンコーディング配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、遺伝子は、コーディング（例えば、エクソン）及びノンコーディング（例えば、イントロン）配列の両方を含み得る。いくつかの実施形態では、遺伝子は、例えば、遺伝子発

50

現（例えば、細胞タイプ特異的発現、誘導性発現など）の1つ以上の態様をコントロールし、またはそれに影響を与え得る1つ以上の制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）及び/またはイントロン配列を含み得る。明確性の目的のため、我々は、本開示において使用される場合、用語「遺伝子」が通常、ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸の一部を指すことを認識している；その用語は、任意に、当業者に文脈から明らかになるように、制御配列を包含し得る。この定義は、用語「遺伝子」の適用を非タンパク質コード発現単位へと除外することは意図されておらず、むしろ、ほとんどの場合において、本書類において使用されるその用語がポリペプチドをコードする核酸を指すことを明確化することが意図されている。

#### 【0134】

遺伝子改変された非ヒト動物または遺伝子修飾された非ヒト動物：本明細書において互換的に使用され、任意の天然に存在しない非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）であって、非ヒト動物の細胞の1つ以上が、対象となるポリペプチドをコードする異種核酸及び/または遺伝子を全体としてまたは部分的に含有するものを指す。例えば、いくつかの実施形態では、「遺伝子改変された非ヒト動物」または「遺伝子修飾された非ヒト動物」は、本明細書に記載される導入遺伝子または導入遺伝子コンストラクトを含有する非ヒト動物を指す。いくつかの実施形態では、異種核酸及び/または遺伝子は、前駆体細胞への導入によって直接的にまたは間接的に、熟考した遺伝子操作を用いて、例えば、マイクロインジェクションによってまたは組換えウイルスでの感染によって細胞に導入される。遺伝子操作という用語は、古典的な交配技術は含まれず、むしろ組換えDNA分子（複数可）の導入を対象とする。この分子は、染色体内に組み込まれ得る。語句「遺伝子改変された非ヒト動物」または「遺伝子修飾された非ヒト動物」は、異種核酸及び/または遺伝子についてヘテロ接合性またはホモ接合性である動物、及び/または異種核酸及び/または遺伝子の単一または複数のコピーを有する動物を指す。

#### 【0135】

生殖細胞系列構成：本明細書で使用される場合、野生型動物（例えば、マウス、ラット、またはヒト）の内因性生殖細胞系列ゲノムに見られる配列（例えば、遺伝子セグメント）の配置を指す。免疫グロブリン遺伝子セグメントの生殖細胞系列構成の例は、例えば、LeFranc, M - P., The Immunoglobulin Facts Book, Academic Press, May, 23, 2001（本明細書で「LeFranc 2001」と称される）で見ることができる；

ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメント及びヒト重鎖定常領域遺伝子の例示的な構成は、LeFranc 2001のp. 47で見ることができる；

ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント及びヒト軽鎖定常領域遺伝子の例示的な構成は、LeFranc 2001のp. 61で見ることができる；

ヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメント及びヒト軽鎖定常領域遺伝子の例示的な構成は、LeFranc 2001のp. 53で見ることができる；

マウス重鎖可変領域遺伝子セグメント及びマウス重鎖定常領域遺伝子の例示的な構成は、Lucas, J. et al., Chapter 1: The Structure and Regulation of the Immunoglobulin Loci, Molecular Biology of B Cells, 2nd Edition, Academic Press, 2015 (Lucas)で見ることができる；

マウス軽鎖可変領域遺伝子セグメント及びマウス軽鎖定常領域遺伝子の例示的な構成は、LeFranc, M - P et al., Chapter 4: Immunoglobulin Lambda (IGL) Genes of Human and Mouse, Molecular Biology of B Cells, 1st Edition, Academic Press, 2004 (LeFranc 2004)で見ることができる；

マウス軽鎖可変領域遺伝子セグメント及びマウス軽鎖定常領域遺伝子の例示的な構成は、Christele, M - J, et al., Nomenclature and

10

20

30

40

50

Overview of the Mouse (*Mus musculus* and *Mus sp.*) Immunoglobulin Kappa (IGK) Genes, *Exp Clin Immunogenet* 2001, 18: 255 - 279 (Christele) で見ることができる；

LeFranc 2001、Lucas、LeFranc 2004、及びChristeleの引用されたセクションの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0136】

生殖細胞系ゲノム：本明細書で使用される場合、動物の形成において使用される胚細胞（例えば、配偶子、例えば、精子または卵子）に見られるゲノムを指す。生殖細胞系ゲノムは、動物における細胞のためのゲノムDNAの源である。このように、その生殖細胞系ゲノムにおいて改変を有する動物（例えば、マウスまたはラット）は、その細胞のすべてのゲノムDNAにおいて改変を有するものと考えられる。

10

【0137】

生殖細胞系配列：本明細書で使用される場合、野生型動物（例えば、マウス、ラット、またはヒト）の内因性生殖細胞系ゲノムに見られるDNA配列、または動物（例えば、マウス、ラット、またはヒト）の内因性生殖細胞系ゲノムに見られるDNA配列によってコードされるRNAもしくはアミノ酸配列を指す。免疫グロブリン遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系配列は、例えば、LeFranc 2001で見ることができる；

本明細書に記載されるいくつかの実施形態において利用され得るヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系ヌクレオチド配列及びヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系アミノ酸配列は、LeFranc 2001の107～234頁で見ることができる；

20

本明細書に記載されるいくつかの実施形態において利用され得るヒトD遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系ヌクレオチド配列及びヒトD遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系アミノ酸配列は、LeFranc 2001の98～100頁で見ることができる；

本明細書に記載されるいくつかの実施形態において利用され得るヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系ヌクレオチド配列及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系アミノ酸配列は、LeFranc 2001の104頁で見ることができる；

本明細書に記載される非ヒト動物のいくつかの実施形態において利用され得るヒトV<sub>L</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系ヌクレオチド配列及びヒトV<sub>L</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系アミノ酸配列は、LeFranc 2001の350～428頁で見ることができる；及び

30

本明細書に記載される非ヒト動物のいくつかの実施形態において利用され得るヒトJ<sub>L</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系ヌクレオチド配列及びヒトJ<sub>L</sub>遺伝子セグメントの代表的な生殖細胞系アミノ酸配列は、LeFranc 2001の346頁で見ることができる。

LeFranc 2001の引用されたセクションの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0138】

異種：本明細書で使用される場合、異なる源からの物質または実体を指す。例えば、特定の細胞または生物に存在するポリペプチド、遺伝子、または遺伝子産物に関して使用される場合、その用語は、関連するポリペプチド、遺伝子、または遺伝子産物が、1) 人の手によって修飾されたこと；2) 人の手を介して（例えば、遺伝子修飾を介して）細胞または生物（またはその前駆体）に導入されたこと；及び/または3) 天然では関連する細胞または生物（例えば、関連する細胞タイプまたは生物タイプ）によって生成されず、その中に存在もしないことを明確化する。「異種」にはまた、通常は特定のネイティブ細胞または生物に存在するが、例えば、天然に関連しない、いくつかの実施形態では、非内因性の制御要素（例えば、プロモーター）のコントロール下で変異または配置によって変化または改変されたポリペプチド、遺伝子または遺伝子産物が含まれる。

40

50

## 【0139】

宿主細胞：本明細書で使用される場合、核酸またはタンパク質が導入された細胞を指す。本開示を読む当業者は、そのような用語が、特定の対象細胞を指すだけでなく、そのような細胞の子孫を指すために使用されることを理解する。変異または環境的影響のいずれかに起因して、後続の世代において所定の修飾が生じ得るため、そのような子孫は、実際には、親細胞と同一でない場合があるが、語句「宿主細胞」の範囲内に依然として含まれる。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、原核生物または真核細胞であり、またはそれを含む。通常、宿主細胞は、細胞が指定される生物界にかかわらず、異種核酸またはタンパク質を受け取る及び/または生成するのに好適な任意の細胞である。例示的な細胞には、原核生物及び真核生物のもの（単細胞または多細胞）、細菌細胞（例えば、*Escherichia coli*、*Bacillus spp.*、*Streptomyces spp.*などの系統）、マイコバクテリウム細胞、真菌細胞、酵母細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*、*Pichia 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）、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または例えば、ハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合物が含まれる。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラット、またはマウス細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は真核であり、以下の細胞から選択される：チャイニーズハムスター卵巣（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）、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT060562、セルトリ細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞、及び前述した細胞に由来する細胞株。いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上のウイルス遺伝子を含む、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞（例えば、PER.C6（登録商標）細胞）。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、単離された細胞であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、組織の一部である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、生物の一部である。

## 【0140】

同一性：配列の比較と組み合わせて本明細書で使用される場合、ヌクレオチド及び/またはアミノ酸配列同一性を測定するために使用され得る当該技術分野で知られている多数の異なるアルゴリズムによって決定される同一性を指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される同一性は、ClustalW v.1.83（slow）アライメントを使用して10.0のオープンギャップペナルティ、0.1のエクステンドギャップペナルティを用いて、及びGonnet類似性マトリックス（MACVECTOR（商標）10.0.2、MacVector Inc.、2008）を使用して決定される。

## 【0141】

の代わりに：本明細書で使用される場合、第1の核酸配列が、染色体における第2の核酸配列の位置（例えば、第2の核酸配列が染色体において、例えば、第2の核酸配列の内因性遺伝子座で以前に（例えば、元々）位置していた場所）に位置する位置的置換を指す。語句「の代わりに」は、第2の核酸配列が、例えば、遺伝子座または染色体から除去されることを必要としない。いくつかの実施形態では、第2の核酸配列及び第1の核酸配列は、例えば、第1及び第2の配列が互いに相同であり、対応する要素（例えば、タンパク質コード要素、制御要素など）を含有し、及び/または類似または同一の配列を有するという点で互いに同等である。いくつかの実施形態では、第1及び/または第2の核酸配列は、プロモーター、エンハンサー、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、イントロン、エクソン、非翻訳領域（UTR）のうちの一つ以上を含み；いくつかの実

施形態では、第1及び/または第2の核酸配列は、1つ以上のコーディング配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の核酸配列は、第2の核酸配列のホモログまたはバリエーション（例えば、変異体）である。いくつかの実施形態では、第1の核酸配列は、第2の配列のオルソログまたはホモログである。いくつかの実施形態では、第1の核酸配列は、ヒト核酸配列であり、またはそれを含む。第1の核酸配列がヒト核酸配列であり、またはそれを含む場合を含むいくつかの実施形態では、第2の核酸配列は、げっ歯類配列（例えば、マウスまたはラット配列）であり、またはそれを含む。第1の核酸配列がヒト核酸配列であり、またはそれを含む場合を含むいくつかの実施形態では、第2の核酸配列は、ヒト配列であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、第1の核酸配列は、第2の配列のバリエーションまたは変異体（すなわち、第2の配列と比較して、1つ以上の配列の相違、例えば、置換を含有する配列）である。このように配置された核酸配列は、このように配置された配列を得るために使用される核酸配列源の一部である1つ以上の制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、5'または3'非翻訳領域など）を含み得る。例えば、様々な実施形態では、第1の核酸配列は、このように配置された核酸配列（異種配列を含む）からの遺伝子産物の生成をもたらすが、内因性配列の発現をもたらさない異種配列の内因性配列の置換であり；第1の核酸配列は、内因性配列によってコードされるポリペプチドと類似する機能を有するポリペプチドをコードする核酸配列を有する内因性ゲノム配列のものである（例えば、内因性ゲノム配列は、非ヒト可変領域ポリペプチドを全体としてまたは部分的にコードし、DNA断片は、1つ以上のヒト可変領域ポリペプチドを全体としてまたは部分的にコードする）。様々な実施形態では、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントまたはその断片は、内因性非ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントまたは断片の代わりである。

10

20

## 【0142】

*in vitro*：本明細書で使用される場合、多細胞生物内ではなく、人工環境、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養などで生じる事象を指す。

## 【0143】

*in vivo*：本明細書で使用される場合、ヒト及び/または非ヒト動物などの多細胞生物内で生じる事象を指す。細胞ベースのシステムの文脈では、その用語は、（例えば、*in vitro*システムとは対照的に）生存細胞内で生じる事象を指すために使用され得る。

30

## 【0144】

単離された：本明細書で使用される場合、（1）最初に生成された時にそれが関連していた成分の少なくとも一部から分離された（天然において及び/または実験環境においてのいずれか）、及び/または（2）人の手によって設計、生成、調製、及び/または製造された物質または実体を指す。単離された物質及び/または実体は、それらが最初に関連していた他の成分の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超から分離され得る。いくつかの実施形態では、単離された物質は、それらが最初に関連していた他の成分の10%～100%、15%～100%、20%～100%、25%～100%、30%～100%、35%～100%、40%～100%、45%～100%、50%～100%、55%～100%、60%～100%、65%～100%、70%～100%、75%～100%、80%～100%、85%～100%、90%～100%、95%～100%、96%～100%、97%～100%、98%～100%、または99%～100%から分離される。いくつかの実施形態では、単離された物質は、それらが最初に関連していた他の成分の10%～100%、10%～99%、10%～98%、10%～97%、10%～96%、10%～95%、10%～90%、10%～85%、10%～80%、10%～75%、10%～70%、10%～65%、10%～60%、10%～55%、10%～50%、10%～45%、10%～40%、10%～35%、10%～30%、10%～25%、10%～20%、または10%～15%から分離される。いくつかの実施形態では

40

50



、単離された物質は、それらが最初に関連していた他の成分の11%～99%、12%～98%、13%～97%、14%～96%、15%～95%、20%～90%、25%～85%、30%～80%、35%～75%、40%～70%、45%～65%、50%～60%、または55%～60%から分離される。いくつかの実施形態では、単離された物質は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約99%超純粋である。いくつかの実施形態では、単離された物質は、80%～99%、85%～99%、90%～99%、95%～99%、96%～99%、97%～99%、または98%～99%純粋である。いくつかの実施形態では、単離された物質は、80%～99%、80%～98%、80%～97%、80%～96%、80%～95%、80%～90%、または80%～85%純粋である。いくつかの実施形態では、単離された物質は、85%～98%、90%～97%、または95%～96%純粋である。いくつかの実施形態では、物質は、それが他の成分を実質的に含まない場合、「純粋」である。いくつかの実施形態では、当業者によって理解されるように、物質は、例えば、1つ以上の担体または賦形剤（例えば、緩衝液、溶媒、水など）などの所定の他の成分と組み合わせた後に、依然として「単離された」またはさらに「純粋」と考えられる場合があり；そのような実施形態では、物質の単離率または純度は、そのような担体または賦形剤を含まずに計算される。例を1つだけ挙げると、いくつかの実施形態では、天然に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの生物学的ポリマーは、a) その誘導起源または源の要因によって、天然におけるその天然状態でそれに付随する成分の一部またはすべてと関連しない場合；b) 天然においてそれを生成する種と同一の種の他のポリペプチドまたは核酸を実質的に含まない場合；またはc) 天然においてそれを生成する種のものではない細胞もしくは他の発現系によって発現され、またはそうでなければその細胞もしくは他の発現系からの成分と関連する場合、「単離された」と考えられる。よって、例えば、いくつかの実施形態では、化学的に合成される、または天然で生成するものとは異なる細胞システムで合成されるポリペプチドは、「単離された」ポリペプチドと考えられる。代替的に、または追加的に、いくつかの実施形態では、1つ以上の精製技術に供されたポリペプチドは、a) 天然で会合している；及び/またはb) 最初に生成された時に関連していた他の成分から分離された程度まで「単離された」ポリペプチドと考えられ得る。

#### 【0145】

遺伝子座 (locus) または遺伝子座 (loci) : 本明細書で使用される場合、遺伝子、DNA配列、ポリペプチドをコードする配列の位置 (複数可)、または生物のゲノムの染色体上の場所を指す。例えば、「免疫グロブリン遺伝子座」は、免疫グロブリン遺伝子セグメント (例えば、V、D、JまたはC)、免疫グロブリン遺伝子セグメントDNA配列、免疫グロブリン遺伝子セグメントをコードする配列の位置、またはそのような配列が存在する場所に関して同定された生物のゲノムの染色体上の免疫グロブリン遺伝子セグメントの場所を指し得る。免疫グロブリン遺伝子セグメントの「免疫グロブリン遺伝子座」は、エンハンサー、プロモーター、5'及び/または3'制御配列もしくは領域、またはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない制御要素を含み得る。「免疫グロブリン遺伝子座」は、遺伝子間DNA、例えば、野生型遺伝子座における遺伝子セグメント間に通常存在するまたは現れるDNAを含み得る。当業者は、染色体が、いくつかの実施形態では、何百ものまたはさらに何千もの遺伝子を含み、異なる種間で比較した場合、類似する遺伝子座の物理的共局在化を実証し得ることを理解する。そのような遺伝子座は、共有されたシンテニーを有するものとして記述され得る。

#### 【0146】

天然に現れる : 生物学的要素 (例えば、核酸配列) に関して本明細書で使用される場合、生物学的要素が、細胞または生物 (例えば、動物) において、修飾 (例えば、遺伝子修飾) の非存在下で特定の状況及び/または場所で見ることができるとを意味する。すなわち、特定の状況及び/または位置で天然に現れる配列は、修飾 (例えば、遺伝子修飾) の結果として特定の状況及び/または場所に存在しない。例えば、内因性ヒト免疫グロブ

リンカップ軽鎖遺伝子座においてヒト」 1 遺伝子セグメントに隣接して天然に現れる配列は、ヒトにおいて、遺伝子修飾の非存在下で、内因性ヒト免疫グロブリンカップ軽鎖遺伝子座においてヒト」 1 遺伝子セグメントに隣接して見ることができる配列である。いくつかの実施形態では、配列は、細胞または生物において天然に現れる場所から得られ、誘導され、及び/または単離され得る。いくつかの実施形態では、細胞または生物は、細胞または生物において天然に現れる配列の直接的源ではない。例えば、細胞または生物における対応する配列は、当該技術分野で知られているメカニズムによって同定され、次いで生成または複製され得る。

【0147】

非ヒト動物：本明細書で使用される場合、ヒトではない任意の脊椎動物生物を指す。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、円口類、硬骨魚類、軟骨魚類（例えば、サメまたはエイ）、両生類、爬虫類、哺乳動物、及び鳥類である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物は、霊長類、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウシ、またはげっ歯類である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウスである。

10

【0148】

核酸：本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチド鎖であるか、またはそれに組み込まれ得る任意の化合物及び/または物質を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、ホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれるか、または組み込まれ得る化合物及び/または物質である。文脈から明らかであるように、いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基（例えば、ヌクレオチド及び/またはヌクレオシド）を指し；いくつかの実施形態では、「核酸」は、個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を指す。いくつかの実施形態では、「核酸」は、RNAであり、またはそれを含み；いくつかの実施形態では、「核酸」は、DNAであり、またはそれを含み。いくつかの実施形態では、「核酸」は、1つ以上の天然核酸残基であり、それを含み、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、「核酸」は、1つ以上の核酸アナログであり、それを含み、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、核酸アナログは、ホスホジエステル骨格を利用しない点で「核酸」とは異なる。例えば、いくつかの実施形態では、「核酸」は、当該技術分野で知られており、かつ骨格においてホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を含む1つ以上の「ペプチド核酸」であり、それを含み、またはそれからなる。代替的に、または追加的に、いくつかの実施形態では、「核酸」は、ホスホジエステル結合ではなく、1つ以上のホスホロチオエート及び/または5'-N-ホスホロアミダイト結合を有する。いくつかの実施形態では、「核酸」は、1つ以上の天然ヌクレオシド（例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン）であり、それを含み、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、「核酸」は、1つ以上のヌクレオシドアナログ（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C-5プロピニル-シチジン、C-5プロピニル-ウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザアデノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、2-チオシチジン、メチル化塩基、介在塩基、及びそれらの組み合わせ）であり、それを含み、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、「核酸」は、天然核酸におけるものと比較して1つ以上の改変糖類（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、及びヘキソース）を含む。いくつかの実施形態では、「核酸」は、機能性遺伝子産物、例えば、RNAまたはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、「核酸」は、1つ以上のイントロンを含む。いくつかの実施形態では、「核酸」は、1つ以上のエクソンを含む。いくつかの実施形態では、「核酸」は、天然源からの単離、相補性テンプレートに基づく

20

30

40

50

重合による酵素合成 (*in vivo* または *in vitro*)、組換え細胞またはシステムにおける複製、及び化学的合成のうちの一つ以上によって調製される。いくつかの実施形態では、「核酸」は、少なくとも、例えば、限定されないが、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000 またはそれ以上の残基長である。いくつかの実施形態では、「核酸」は一本鎖であり；いくつかの実施形態では、「核酸」は二本鎖である。いくつかの実施形態では、「核酸」は、ポリペプチドをコードする、またはポリペプチドをコードする配列の相補体である少なくとも一つの要素を含むヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態では、「核酸」は、酵素活性を有する。

10

#### 【0149】

機能可能に連結された：本明細書で使用される場合、記載される成分がそれらの意図された様式で機能する（例えば、成分が適正な組織、細胞タイプ、細胞活性などにある場合）ことを可能にする関係にある成分の並置を指す。例えば、1つ以上のV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のD遺伝子セグメント、及び1つ以上のJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントが、例えば、免疫系外の細胞（例えば、胚細胞）においてスプライシングが生じるかどうかにかかわらず、B細胞発達における適正な時間に重鎖定常領域にスプライシングされ得る場合、重鎖定常領域に「機能可能に連結されている」。コーディング配列に「機能可能に連結された」コントロール配列は、コーディング配列の発現がコントロール配列と適合性のある条件下で達成されるような方法でライゲーションされている。「機能可能に連結された」配列には、対象となる遺伝子と連続的である発現コントロール配列及びトランスでまたは離れて作用して対象となる遺伝子（または対象となる配列）をコントロールする発現コントロール配列の両方が含まれる。用語「発現コントロール配列」は、ライゲーションされるコーディング配列の発現及びプロセシングに影響を及ぼすのに必要なポリヌクレオチド配列を含む。「発現コントロール配列」には、適切な転写開始、終結、プロモーター及びエンハンサー配列；効率的なRNAプロセシングシグナル、例えば、スプライシング及びポリアデニル化シグナル；細胞質性mRNAを安定化する配列；翻訳効率を向上させる配列（すなわち、Kozakコンセンサス配列）；ポリペプチド安定性を向上させる配列；及び所望の場合は、ポリペプチド分泌を向上させる配列が含まれる。そのようなコントロール配列の特質は、宿主生物によって異なる。例えば、原核生物では、そのようなこのコントロール配列には通常、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列が含まれるに対し、真核生物では、典型的には、そのようなコントロール配列には、プロモーター及び転写終結配列が含まれる。用語「コントロール配列」は、存在が発現及びプロセシングに必須である成分を含むことが意図されており、また、存在が有利である追加の成分、例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列を含み得る。

20

30

#### 【0150】

ポリペプチド：本明細書で使用される場合、アミノ酸の任意のポリマー鎖を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然に存在するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然に存在しないアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、互いに別々に天然に存在する部分（すなわち、2つ以上の異なる生物からのもの、例えば、ヒト及び非ヒト部分）を含有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、人の手の作用を介して設計及び/または生成されたという点で修飾されたアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、天然に存在しない配列によってコードされるアミノ酸配列（例えば、前記ポリペプチドをコードするように人の手の作用を介して設計及び/または生成されたという点で修飾された配列）を有する。

40

50

## 【0151】

再編成された：本明細書で使用される場合、一緒に（直接的にまたは間接的に）接合された2つ以上の免疫グロブリン遺伝子セグメントを含むことにより、接合された遺伝子セグメントが、免疫グロブリンの可変領域をコードするDNA配列と一緒に有するDNA配列を表す。再編成されたDNA配列の2つ以上の免疫グロブリン遺伝子セグメントは、組換えシグナル配列（RSS）の機能にはもはや関連せず、このように、さらなる再編成を受けることができない。再編成されたDNA配列の2つ以上の免疫グロブリン遺伝子セグメントが、さらに再編成することができない場合があるが、これは、同じ遺伝子座内の他の免疫グロブリン遺伝子セグメントが、例えば、二次再編成を受けることができないことを意味するものではないことを当業者は認識する。当業者は、再編成された遺伝子セグメント（例えば、再編成された免疫グロブリン可変領域におけるもの）が、天然VDJ組換えプロセスを介して一緒に接合され得ることを理解する。当業者はまた、再編成された遺伝子セグメント（例えば、再編成された免疫グロブリン可変領域におけるもの）が、例えば、標準的な組換え技術を使用して遺伝子セグメントを接合することによって、一緒に接合されるように修飾され得ることを理解する。再編成された免疫グロブリン可変領域は、典型的には、2つ以上の接合された免疫グロブリン遺伝子セグメントを含む。例えば、再編成された免疫グロブリン軽鎖可変領域は、J遺伝子セグメントと接合されたV遺伝子セグメントを含み得る。再編成された免疫グロブリン重鎖可変領域は、接合されたV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、D遺伝子セグメント、J<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含み得る。当業者はまた、すべてのまたは実質的にすべての遺伝子間配列が、通常、再編成された免疫グロブリン可変領域免疫グロブリン可変領域において免疫グロブリン遺伝子セグメント間で除去されることを理解する。当業者は、再編成された配列が、遺伝子セグメントにおいて、とりわけ、イントロンを含み得ることをさらに理解する。

10

20

## 【0152】

組換え：本明細書で使用される場合、複数源（例えば、生物、組織、細胞、ゲノム、またはゲノムの一部）からの遺伝物質と一緒にするために遺伝子組換えの実験室的方法（例えば、クローニング）によって形成される分子（例えば、DNA、RNA、またはポリペプチド）を指す。いくつかの実施形態では、組換え手段によって設計、修飾、調製、発現、作製または単離される組換えポリペプチドは、例えば、宿主細胞にトランスフェクションされた組換え発現ベクターを使用して発現したポリペプチド、組換えコンビナトリアルヒトポリペプチドライブラリから単離されたポリペプチド（Hoogenboom, H. R., 1997, *TIB Tech.* 15: 62-70; Azzazy, H. and W. E. Highsmith, 2002, *Clin. Biochem.* 35: 425-45; Gavilondo, J. V. and J. W. Larrick, 2002, *BioTechniques* 29: 128-45; Hoogenboom H., and P. Chames, 2000, *Immunol. Today* 21: 371-8（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むように遺伝子修飾された動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylor, L. D. et al., 1992, *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-95; Kellermann, S. A. and L. L. Green, 2002, *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 593-7; Little, M. et al., 2000, *Immunol. Today* 21: 364-70; Osborn, M. J. et al., 2013, *J. Immunol.* 190: 1481-90; Lee, E. C. et al., 2014, *Nat. Biotech.* 32(4): 356-63; Macdonald, L. E. et al., 2014, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(14): 5147-52; Murphy, A. J. et al., 2014, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(14): 5153-8（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））または選択された配列要素を互いにスプライシングすることを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製または単離されたポリペプチドである。いくつかの実施形態では、そ

30

40

50

のような選択された配列要素のうちの一つ以上は、天然に見られる。いくつかの実施形態では、そのような選択された配列要素のうちの一つ以上は、*in silico*で設計される。いくつかの実施形態では、そのような選択された配列要素のうちの一つ以上は、例えば、天然または合成（例えば、人工）源からの既知の配列要素の変異誘発（例えば、*in vivo*または*in vitro*）に起因する。例えば、いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、対象となる生物源（例えば、ヒト、マウスなど）のゲノムに見られる配列を含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、変異誘発（例えば、*in vitro*または*in vivo*、例えば、非ヒト動物における）に起因するアミノ酸配列を有し、これにより組換えポリペプチドのアミノ酸配列は、ポリペプチド配列を起源とし、それに関連するが、*in vivo*で非ヒト動物のゲノム内に天然に存在しない場合がある配列となる。 10

#### 【0153】

参照：本明細書で使用される場合、対象となる物質、動物、コホート、個体、集団、サンプル、配列または値が比較される標準または対照物質、動物、コホート、個体、集団、サンプル、配列または値を指す。いくつかの実施形態では、参照物質、動物、コホート、個体、集団、サンプル、配列または値は、対象となる物質、動物、コホート、個体、集団、サンプル、配列または値の試験または決定と実質的に同時に試験及び/または決定される。いくつかの実施形態では、参照物質、動物、コホート、個体、集団、サンプル、配列または値は、任意に有形媒体で具現化された過去の参照である。いくつかの実施形態では、参照は、対照を指し得る。「参照」にはまた、「参照動物」が含まれる。「参照動物」は、本明細書に記載される改変、本明細書に記載されるものとは異なる改変を有する場合があります。また改変を有さない場合がある（すなわち、野生型動物）。典型的には、当業者によって理解されるであろうが、参照物質、動物、コホート、個体、集団、サンプル、配列または値は、対象となる物質、動物（例えば、哺乳動物）、コホート、個体、集団、サンプル、配列または値を決定または特性化するために利用されたものと同等の条件下で決定または特性化される。 20

#### 【0154】

置き換え：本明細書で使用される場合、宿主遺伝子座において（例えば、ゲノムにおいて）見られる「置き換えられる」核酸配列（例えば、遺伝子）がその遺伝子座から除去され、異なる「置き換え」核酸がその場所に配置されるプロセスを指す。いくつかの実施形態では、置き換えられる核酸配列及び置き換え核酸配列は、それらが互いに相同であり、対応する要素（例えば、タンパク質コード要素、制御要素など）を含有し、及び/または類似または同一の配列を有するという点で互いに同等である。いくつかの実施形態では、置き換えられる核酸配列は、プロモーター、エンハンサー、スプライスドナー部位、スプライサクセプター部位、イントロン、エクソン、非翻訳領域（UTR）のうちの一つ以上を含み；いくつかの実施形態では、置き換え核酸配列は、一つ以上のコーディング配列を含む。いくつかの実施形態では、置き換え核酸配列は、置き換えられる核酸配列のホモログまたはバリエーション（例えば、変異体）である。いくつかの実施形態では、置き換え核酸配列は、置き換えられる配列のオルソログまたはホモログである。いくつかの実施形態では、置き換え核酸配列は、ヒト核酸配列であり、またはそれを含む。置き換え核酸配列がヒト核酸配列であり、またはそれを含むいくつかの実施形態では、置き換えられる核酸配列は、げっ歯類配列（例えば、マウスまたはラット配列）であり、またはそれを含む。置き換え核酸配列がヒト核酸配列であり、またはそれを含むいくつかの実施形態では、置き換えられる核酸配列は、ヒト配列であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、置き換え核酸配列は、置き換えられる配列のバリエーションまたは変異体（すなわち、置き換えられる配列と比較して、一つ以上の配列相違、例えば、置換を含有する配列）である。このように配置された核酸配列は、このように配置された配列を得るために使用される核酸配列源の一部である一つ以上の制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、5'または3'非翻訳領域など）を含み得る。例えば、様々な実施形態では、置き換えは、このように配置された核酸配列（異種配列を含む）からの遺伝子産物の生成をもたらすが、 30 40 50

内因性配列の発現をもたらさない異種配列での内因性配列の置換であり；置き換えは、内因性配列によってコードされるポリペプチドと類似する機能を有するポリペプチドをコードする核酸配列を有する内因性ゲノム配列のものである（例えば、内因性ゲノム配列は、非ヒト可変領域ポリペプチドを全体としてまたは部分的にコードし、DNA断片は、1つ以上のヒト可変領域ポリペプチドを全体としてまたは部分的にコードする）。様々な実施形態では、内因性非ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントまたはその断片は、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントまたはその断片で置き換えられる。

【0155】

実質的に：本明細書で使用される場合、対象となる特徴または特性の全体またはほぼ全体の範囲または程度を示す量的な状態を指す。生物学分野における当業者は、生物学及び化学の現象が、皆無ではないにせよ、完結すること及び/または完全に進行することまたは絶対的な結果を達成することもしくは回避することがほとんどないことを理解する。用語「実質的に」は、そのため、多くの生物学的及び化学的現象において固有の完全性の潜在的欠如を捕捉するために本明細書で使用される。

10

【0156】

実質的類似性：本明細書で使用される場合、アミノ酸または核酸配列の間の比較を指す。当業者によって理解されるように、2つの配列は、通常、それらが、対応する位置で類似する残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）を含有する場合、「実質的に類似する」と考えられる。当該技術分野において理解されるように、類似する残基は、同一の残基であり得（以下の実質的同一性参照）、類似する残基はまた、おおよそ同等の構造及び/または機能的特徴を有する非同一残基であり得る。例えば、当業者によってよく知られているように、所定のアミノ酸は、典型的には、「疎水性」または「親水性」アミノ酸として、及び/または「極性」または「非極性」側鎖を有するものとして分類される。あるアミノ酸で同じタイプの別のものを置換することはしばしば、「保存的」置換と考えられ得る。典型的なアミノ酸分類が以下の表にまとめられている。

20

30

40

50

【表 1】

アラニン	Ala	A	非極性	中和	1.8
アルギニン	Arg	R	極性	陽性	-4.5
アスパラギン	Asn	N	極性	中和	-3.5
アスパラギン酸	Asp	D	極性	陰性	-3.5
システイン	Cys	C	非極性	中和	2.5
グルタミン酸	Glu	E	極性	陰性	-3.5
グルタミン	Gln	Q	極性	中和	-3.5
グリシン	Gly	G	非極性	中和	-0.4
ヒスチジン	His	H	極性	陽性	-3.2
イソロイシン	Ile	I	非極性	中和	4.5
ロイシン	Leu	L	非極性	中和	3.8
リジン	Lys	K	極性	陽性	-3.9
メチオニン	Met	M	非極性	中和	1.9
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中和	2.8
プロリン	Pro	P	非極性	中和	-1.6
セリン	Ser	S	極性	中和	-0.8
トレオニン	Thr	T	極性	中和	-0.7
トリプトファン	Trp	W	非極性	中和	-0.9
チロシン	Tyr	Y	極性	中和	-1.3
バリン	Val	V	非極性	中和	4.2

10

20

【表 2】

曖昧なアミノ酸	3文字	1文字
アスパラギンまたはアスパラギン酸	Asx	B
グルタミンまたはグルタミン酸	Glx	Z
ロイシンまたはイソロイシン	Xle	J
非特定または不明のアミノ酸	Xaa	X

30

## 【0157】

当該技術分野でよく知られているように、アミノ酸または核酸配列は、市販のコンピュータプログラムで利用可能なもの、例えば、ヌクレオチド配列の場合はBLASTNならびにアミノ酸配列の場合はBLASTP、gapped BLAST、及びPSI-BLASTを含む多様なアルゴリズムのいずれかを使用して比較され得る。例示的なそのようなプログラムは、Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul, S.F. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266: 460-80; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389-402; Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley,

40

50

1998;及びMisener et al. (eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132*, Humana Press, 1998 (これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。類似する配列を同定することに加えて、上記のプログラムは、典型的には、類似性の程度の指標を提供する。いくつかの実施形態では、2つの配列は、それらの対応する残基の少なくとも、例えば、限定されないが、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が残基の関連伸長部にわたって類似する(例えば、同一である、または保存的置換を含む)場合、実質的に類似すると考えられる。いくつかの実施形態では、関連伸長部は、完全配列(例えば、遺伝子の配列、遺伝子セグメント、ドメインをコードする配列、ポリペプチド、またはドメイン)である。いくつかの実施形態では、関連伸長部は、少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17またはそれ以上の残基である。いくつかの実施形態では、関連伸長部は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の残基である。いくつかの実施形態では、関連伸長部は、完全配列に沿って連続残基を含む。いくつかの実施形態では、関連伸長部は、完全配列に沿って非連続残基、例えば、ポリペプチドまたはその一部の折りたたまれたコンフォメーションによって一緒にされた非連続残基を含む。

10

#### 【0158】

実質的同一性：本明細書で使用される場合、アミノ酸または核酸配列の間の比較を指す。当業者によって理解されるように、2つの配列は、通常、それらが、対応する位置で同一の残基(例えば、アミノ酸またはヌクレオチド)を含有する場合、「実質的に同一」と考えられる。当該技術分野でよく知られているように、アミノ酸または核酸配列は、市販のコンピュータプログラムで利用可能なもの、例えば、ヌクレオチド配列の場合はBLASTNならびにアミノ酸配列の場合はBLASTP、gapped BLAST、及びPSI-BLASTを含む多様なアルゴリズムのいずれかを使用して比較され得る。例示的なそのようなプログラムは、Altschul, S.F. et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-10; Altschul, S.F. et al., 1996, *Meth. Enzymol.* 266:460-80; Altschul, S.F. et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402; Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (eds.) *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998;及びMisener et al. (eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132*, Humana Press, 1998 (これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。同一の配列を同定することに加えて、上記のプログラムは、典型的には、同一性の程度の指標を提供する。いくつかの実施形態では、2つの配列は、それらの対応する残基の少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上が残基の関連伸長部にわたって同一である場合、実質的に同一と考えられる。いくつかの実施形態では、残基の関連伸長部は、完全配列である。いくつかの実施形態では、残基の関連伸長部は、例えば、限定されないが、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の残基である。

20

30

40

#### 【0159】

ターゲティングコンストラクトまたはターゲティングベクター：本明細書で使用される場合、標的化領域を含むポリヌクレオチド分子を指す。標的化領域は、標的細胞、組織または動物における配列と同一または実質的に同一の配列を含み、相同組換えを介して細胞、組織または動物のゲノム内の位置へのターゲティングコンストラクトの組み込みを提供

50



する。部位特異的リコンビナーゼ認識部位（例えば、 $l o x P$ または $F r t$ 部位）を使用して標的化する標的化領域も含まれ、本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるターゲティングコンストラクトは、特定の対象となる核酸配列または遺伝子、選択可能なマーカー、コントロール及び/または制御配列、ならびにそのような配列を含む組換えを補助し、または容易化するタンパク質の外因性付加を介して媒介される組換えを可能にする他の核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるターゲティングコンストラクトは、対象となる遺伝子を全体としてまたは部分的にさらに含み、対象となる遺伝子は、内因性配列によってコードされるタンパク質と類似する機能を有するポリペプチドを全体としてまたは部分的にコードする異種遺伝子である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるターゲティングコンストラクトは、対象となるヒト化遺伝子を全体としてまたは部分的にさらに含み、対象となるヒト化遺伝子は、内因性配列によってコードされるポリペプチドと類似する機能を有するポリペプチドを全体としてまたは部分的にコードする。いくつかの実施形態では、ターゲティングコンストラクト（またはターゲティングベクター）は、人の手によって操作された核酸配列を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、ターゲティングコンストラクト（またはターゲティングベクター）は、修飾されたまたは組換えポリヌクレオチドであって、その天然の順序で一緒に連結されていないが、修飾されたまたは組換えポリヌクレオチドにおいて互いに直接的に連結されるように人の手によって操作された2つ以上の配列を含有する、修飾されたまたは組換えポリヌクレオチドを含有するように構築され得る。

10

#### 【0160】

20

導入遺伝子または導入遺伝子コンストラクト：本明細書で使用される場合、人の手によって、例えば、本明細書に記載の方法によって細胞に導入された核酸配列（例えば、対象となるポリペプチドを全体としてまたは部分的にコードする）を指す。導入遺伝子は、それが導入される遺伝子修飾された動物または細胞に対して部分的にまたは全体的に異種、すなわち、外来であり得る。導入遺伝子は、選択された核酸配列の発現に必要であり得る1つ以上の転写制御配列及び任意の他の核酸、例えば、イントロンまたはプロモーターを含み得る。

#### 【0161】

非再編成：本明細書で使用される場合、2つ以上の免疫グロブリン遺伝子セグメントであって、組換え事象を受けておらず、またはそうでなければ接合されておらず、そのため、それらの間に遺伝子間配列（複数可）を含む、2つ以上の免疫グロブリン遺伝子セグメントを含むDNA配列を表す。当業者は、非再編成V遺伝子セグメント及びJ遺伝子セグメントは、インタクトな組換えシグナル配列（RSS）に関連し得ることを理解する。非再編成D遺伝子セグメントは、2つのインタクトな組換えシグナル配列（RSS）によって挟まれている場合がある。当業者は、非再編成遺伝子セグメントが、とりわけ、イントロンを含み得ることをさらに理解する。

30

#### 【0162】

ベクター：本明細書で使用される場合、それが関連する別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。いくつかの実施形態では、ベクターは、真核及び/または原核生物細胞などの宿主細胞においてそれらが連結された核酸の染色体外複製及び/または発現が可能である。機能可能に連結された遺伝子の発現を誘導することが可能なベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

40

#### 【0163】

野生型：本明細書で使用される場合、「正常な」（変異体、罹患した、変化した、修飾したものなどとは対照的）状態または状況で天然に見られる構造及び/または活性を有する実体を指す。当業者は、野生型遺伝子及びポリペプチドがしばしば、複数の異なる形態（例えば、アレル）で存在することを理解する。  
（発明を実施するための形態）

#### 【0164】

本開示は、免疫グロブリン鎖対合及び親和性成熟を含む、非ヒト動物における内因性抗

50

体発達メカニズムが、外因性ヒト免疫グロブリン配列を含む抗原特異的高親和性抗体を生成するために利用され得るという洞察を提供する。そのような動物は、正常かつ頑丈な免疫反応を生成し得、これは、例えば、ヒト抗体治療剤を作製するために利用され得る。本開示は、遺伝子改変された非ヒト動物が、ヒト重鎖、軽鎖、及び軽鎖ドメインを含むヒト可変ドメインを含む抗体を生成するための有効かつ効率的なプラットフォームを提供することを認識する。本開示は、遺伝子改変された非ヒト動物が、親和性成熟したヒト重鎖、軽鎖、及び軽鎖可変ドメインを生成するためにヒト重鎖、軽鎖、及び軽鎖可変領域遺伝子セグメントを成功裏に利用することができることをさらに認識する。

#### 【0165】

本開示は、非ヒト動物におけるヒト軽鎖可変ドメインを含む抗体の生成が、所定の非ヒト動物における軽鎖の発現が低い場合に、先行して提示された課題を有することを認識する。例えば、マウスは、軽鎖よりも有意に多い軽鎖（すなわち、約95：5の比で）を利用する。本開示は、非ヒト動物の軽鎖可変領域レパートリーを限定することによる普遍的軽鎖（例えば、複数の重鎖に結合することが可能な軽鎖）を含む抗体の生成が、高親和性抗体の生成のための最も強力な多様性生成メカニズム、例えば、コンビナトリアル多様性、接合多様性、及び二次再編成の一部を排除するので、チャレンジングであり得ることをさらに認識する。それはまた、「様々に組み合わせられる（mix and match）」重鎖及び軽鎖対合に起因するであろう多様性生成効果を最小化する。これらの認識の観点から、限られたヒト軽鎖可変領域から非ヒト動物におけるヒト軽鎖可変領域を生成するためのプラットフォーム及び方法が当該技術分野で依然として必要とされている。

#### 【0166】

本開示は、軽鎖遺伝子座で限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーを含む非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）が、高親和性の抗原特異的抗体を有効に生成することができるという洞察を提供する。この結果は、非ヒト動物における限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーが、非ヒト動物に軽鎖可変領域配列を利用させるので予期されないことである。軽鎖可変領域配列の使用は、所定の非ヒト動物の天然の優先傾向に反する。上記のように、非ヒト動物における限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーの使用はまた、高親和性の抗原特異的抗体を生成するために使用される多くの天然メカニズムを排除する。

#### 【0167】

本開示は、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを発現する遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）であって、非ヒト動物が、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリー（1つまたは2つのヒトV遺伝子セグメントを含む）を有するものを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを発現する遺伝子改変された非ヒト動物であって、非ヒト動物が、限られたヒト軽鎖可変レパートリー、及びヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを有するものを提供する。親和性成熟したヒト重鎖可変ドメインの多様なレパートリーと会合する、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーから発現されるヒト軽鎖可変ドメインを生成するための生物学的システムも提供される。ヒト免疫グロブリン可変ドメイン（例えば、抗体、重鎖、軽鎖（例えば、軽鎖）、重鎖可変ドメイン、軽鎖可変ドメイン（例えば、軽鎖可変ドメイン）、一本鎖可変断片（ScFv））を含む抗原結合タンパク質を作製するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の非ヒト動物を対象となる抗原で免疫することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、抗原結合タンパク質（例えば、対象となる抗原に特異的に結合する結合タンパク質）において本明細書に記載の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）の免疫グロブリン可変領域遺伝子配列を用いることを含む。方法には、多重特異的抗原結合タンパク質の作製において使用するのに好適なヒト免疫グロブリン重鎖及び/または軽鎖可変ドメインを作製するための方法が含まれる。

#### 【0168】

10

20

30

40

50

ヒト 軽鎖可変領域遺伝子セグメントの限られたレパートリーからヒト 軽鎖可変ドメインの限られたレパートリーを発現する遺伝子修飾された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域配列（V / J 配列）を含むように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、1つまたは2つのみのヒト非再編成 軽鎖可変領域遺伝子セグメントを含むように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、1つまたは2つのみの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントを含むように遺伝子修飾される。所定の実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、4つまたは5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントを含む。本明細書に記載の非ヒト動物によって発現される再編成されたヒト 軽鎖可変ドメインは、そのような非ヒト動物によって発現される複数の親和性成熟したヒト重鎖の対合が可能であり、複数の重鎖可変領域は、異なるエピトープに特異的に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、非再編成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したヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを発現及び選択し、親和性成熟したヒト重鎖可変ドメインは、非ヒト動物の限られたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域遺伝子レパートリーに由来するヒト 軽鎖可変ドメインと会合し、発現する。本開示は、ヒト 軽鎖可変ドメイン及びヒト重鎖可変ドメイン（コードしているヒト 軽鎖可変領域及びヒト重鎖可変領域と共に）が、多重特異的抗体、特に二重特異的抗体の生成において利用され得るという洞察を提供する。

10

20

【0169】

非ヒト動物における抗体レパートリー

免疫グロブリン（抗体とも称される）は、病原体（例えば、ウイルス、細菌など）を中和するために宿主免疫系のB細胞によって生成される大きな（約150kD）Y形状の糖タンパク質である。各免疫グロブリン（Ig）は、2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖から構成され、その各々は、2つの構造成分：可変ドメイン及び定常ドメインを有する。重鎖及び軽鎖可変領域は、異なるB細胞によって生成される抗体で異なるが、単一のB細胞またはB細胞クローンによって生成されるすべての抗体について同じである。各抗体の重鎖及び軽鎖可変領域は一緒に、抗原結合領域（または抗原結合部位）を含む。免疫グロブリンは、それらが含有する重鎖定常領域（またはドメイン）に基づいてアイソタイプまたはクラスと称される異なる類型で存在し得る。重鎖定常領域は、同じアイソタイプのすべての抗体で同じであるが、異なるアイソタイプの抗体では異なる。以下の表は、マウス及びヒトにおける9種の抗体アイソタイプをまとめている。

30

【表3】

マウス	ヒト
IgM	IgM
IgD	IgD
IgG1	IgG1
IgG2a	IgG2
IgG2b	IgG3
IgG2c	IgG4
IgG3	IgE
IgE	IgA1
IgA	IgA2

40

【0170】

他の種ではさらなるアイソタイプが同定されている。アイソタイプは、異なるアイソタイプ間の異なる構造的特徴に起因して特徴的な生物学的特性を抗体に付与し、動物体内の異なる場所（細胞、組織など）に見られる。最初は、B細胞は、同一の抗原結合領域を有するIgM及びIgDを生成する。B細胞は、活性化されると、クラススイッチと称さ

50

れるプロセスによって異なるアイソタイプにスイッチするが、そのプロセスは、可変領域を同じままとすることにより元の抗体（B細胞）の抗原特異性を保持しながら、B細胞によって生成される抗体の定常領域が変化することを含む。

【0171】

2つの別々の遺伝子座（Ig<sub>H</sub>及びIg<sub>L</sub>）は、再編成されると、抗体の軽鎖をコードする遺伝子セグメントを含有し、アレル及びアイソタイプの両方の排除を示す。+対+ B細胞の発現比は、種間で多様である。例えば、ヒトは、約60：40（ $\frac{1}{2}$ ）の比を示す。マウス及びラットでは、95：5（ $\frac{19}{20}$ ）の比が観察される。興味深いことに、ネコ（5：95）で観察される $\frac{1}{20}$ 比は、マウス及びラットの逆である。これらの観察される比の背景にあり得る理由を説明するためにいくつかの研究が行われており、遺伝子座の複雑性（すなわち、遺伝子セグメント、特に、V遺伝子セグメントの数）及び遺伝子セグメント再構成の効率の両方が論拠として提案されている。ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座は、1,000 kbを超えて伸長し、3つのクラスターで組織されたおよそ70個のV遺伝子セグメント（29～33個の機能性）及び7個のJ-C遺伝子セグメント対（4～5個の機能性）を含有する（例えば、米国特許第9,006,511号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の図1参照）。発現される抗体レパートリーにおいて観察されるV領域の大多数は、最も近いクラスター（クラスターAと称される）内に含有される遺伝子セグメントによってコードされる。マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座は、系統に応じて、ヒト遺伝子座とはとりわけ異なり、2つの区別される遺伝子クラスターで組織された数個のV及びJ遺伝子セグメントを含有する（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,006,511号の図2参照）。

10

20

【0172】

様々なヒト疾患の処置のための治療抗体の開発は概ね、修飾された非ヒト動物系統であって、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対応するそれらのゲノムにおける様々な量の遺伝物質を保有する、修飾された非ヒト動物系統、特に、修飾されたげっ歯類系統の作製に集中している（例えば、Bruggemann, M. et al., 2015, Arch. Immunol. Ther. Exp. 63:101-8（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）でレビューされている）。そのような遺伝子修飾されたげっ歯類系統の作製における初期の取り組みは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部の組み込みに焦点を当てており、これはそれ自体で、遺伝子セグメントの組換え、ならびに不活化した内因性免疫グロブリン遺伝子座を有しながら完全にヒト型の重鎖及び/または軽鎖の生成をサポートし得る（例えば、Bruggemann, M. et al., 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 86:67-09-13; Bruggemann, M. et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21:1323-6; Taylor, L.D. et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Davies, N.P. et al., 1993, Biotechnol. 11:911-4; Green, L.L. et al., 1994, Nat. Genet. 7:13-21; Lonberg, N. et al., 1994, Nature 368:856-9; Taylor, L.D. et al., 1994, Int. Immunol. 6:579-91; Wagner, S.D. et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:2672-81; Fishwild, D.M. et al., 1996, Nat. Biotechnol. 14:845-51; Wagner, S.D. et al., 1996, Genomics 35:405-14; Mendez, M.J. et al., 1997, Nat. Genet. 15:146-56; Green, L.L. et al., 1998, J. Exp. Med. 188:483-95; Xian, J. et al., 1998, Transgenics 2:333-43; Little, M. et al., 2000, Immunol. Today 21:364-70; Kellermann, S.A. and L.L. Green, 2002, Cur. Opin. Biotechnol. 13:593-7（これらの各々は、それらの

30

40

50

全体が参照により組み込まれる)参照)。特に、いくつかの取り組みは、ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列の組み込みを含んでいた(例えば、米国特許出願公開第2002/0088016A1号、第2003/0217373A1号及び第2011/0236378A1号;米国特許第6,998,514号及び第7,435,871号;Nicholson, I. C. et al., 1999, J. Immunol. 163: 6898-906; Popov, A. V. et al., 1999, J. Exp. Med. 189(10): 1611-19(これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)参照)。そのような取り組みは、ヒトV<sub>H</sub>、J<sub>H</sub>及びC<sub>H</sub>配列を含有する酵母人工染色体をランダムに組み込み、それにより完全ヒト免疫グロブリン 軽鎖(すなわち、ヒトV<sub>H</sub>及びC<sub>H</sub>ドメイン)を発現するマウス系統を作製することに焦点を当てている。より最近の取り組みは、ヒトV<sub>H</sub>、J<sub>H</sub>及びC<sub>H</sub>配列も含有するコンストラクトを使用する類似する戦略を用いている(Osborn, M. J. et al., 2013, J. Immunol. 190: 1481-90; Lee, E. C. et al., 2014, Nat. Biotech. 32(4): 356-63(これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる))。

10

#### 【0173】

さらに他の取り組みは、ヒトV<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントが内因性免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結されるように、内因性げっ歯類免疫グロブリン軽鎖遺伝子座(及び)に前記ヒトV<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを特異的挿入することを含んでいた(例えば、米国特許第9,006,511号、第9,012,717号、第9,029,628号、第9,035,128号、第9,066,502号、第9,150,662号及び第9,163,092号(これらのすべては、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)参照)。そのような動物のいくつかの実施形態では、クラスターA及びBからのヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべて及び1つまたは4ついずれかのヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントが内因性免疫グロブリン 及び免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に挿入された。いくつかの異なるヒトV<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、げっ歯類抗体レパートリーで発現される機能性軽鎖を形成するための両方の修飾されたげっ歯類免疫グロブリン軽鎖遺伝子座での適正な再編成を実証し、その軽鎖は、内因性C<sub>H</sub>及びC<sub>H</sub>領域のいずれかについてヒトV<sub>H</sub>ドメインを含んでいた(例えば、米国特許第9,006,511号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)の表7及び図11~13参照)。特に、ヒトV<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを保有する修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有するマウスは、脾臓区画において約1:1のヒトラムダ対内因性ラムダ比を実証した(IgC<sub>κ</sub>対IgC<sub>λ</sub>比によって測定される)(例えば、米国特許第9,006,511号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)の表4参照)。実際、両方の修飾されたマウス系統(すなわち、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座または修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座)は、ヒトV<sub>H</sub>ドメインが、軽鎖発現において通常は大きなバイアスを示すげっ歯類において内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から発現され得ることを実証した(上記参照)。本開示は、代替の修飾された免疫グロブリン軽鎖遺伝子座構造が、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーからのヒト 軽鎖可変ドメインの発現を最大化するために生成され得るという認識を提供する。そのような代替の修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座構造は、それらの設計に起因する独自の抗体レパートリーのための能力を提供する。

20

30

40

#### 【0174】

本開示は、非ヒト動物であって、その生殖細胞系列ゲノムは、げっ歯類C<sub>H</sub>遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含有する、非ヒト動物を提供する。単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒ

50

ト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、非ヒトまたはヒト免疫グロブリン または免疫グロブリン 軽鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、そのような軽鎖の発現は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域の内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）への挿入によって達成され得る。いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物は、内因性免疫グロブリン 軽鎖可変領域の発現が不活性化（例えば、遺伝子欠失による）されるように修飾される。いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物は、内因性免疫グロブリン 軽鎖可変領域の発現が不活性化（例えば、挿入、置き換えまたは置換による）されるように修飾される。

10

## 【0175】

## 普遍的軽鎖

有用な多重特異的抗原結合タンパク質、例えば、二重特異的抗体を作製するための過去の取り組みは、共通のパラダイム：ヘテロ二量体二重特異的ヒト免疫グロブリンを対合させるための好適な形式を合理的に修飾する、または試行錯誤を通じて修飾するための配列の *in vitro* 選択または操作をたびたび共有する多様な問題によって妨げられてきた。不運なことに、*in vitro* 修飾アプローチのすべてではないとしてもほとんどは、概ね、仮にあったとしても、個々の分子のための好適なその場しのぎの解決策を提供する。

## 【0176】

ヒト治療剤をもたらすことが可能な適切な対合を選択するために複合生物を用いるための *in vivo* 方法が開発されてきた（例えば、米国特許第 10,143,186 号（その全体が参照により組み込まれる）参照）。しかしながら、十分な力価レベルでヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを有する高親和性普遍的 軽鎖の生成を含む頑強な免疫反応を生成することが可能な非ヒト動物は過去に生成されていない。通常、ネイティブ非ヒト配列は、多くの場合、ヒト治療用配列のための良好な源ではない。少なくともその理由から、普遍的ヒト軽鎖と対合する非ヒト重鎖免疫グロブリン可変ドメインを生成することは、実用的利用性が限られている。アウトカムは不確かであるが、エピトープ特異性及び親和性ならびに一般的なヒト軽鎖と結合する能力を保持することを期待して、非ヒト重鎖可変配列をヒト化しようとする試行錯誤のプロセスにおいてより多くの *in vitro* 修飾の取り組みがなされるであろう。そのようなプロセスの最後に、最終産物は、特異性及び親和性の一部を維持し、普遍的軽鎖と会合し得るが、最終的には、ヒトにおける免疫原性が重大なリスクを保持する可能性があるであろう。

20

30

## 【0177】

そのため、ヒト治療剤を作製するための好適な非ヒト動物は、内因性非ヒト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適切に広い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、再編成し、内因性非ヒト重鎖定常領域とスプライシングして逆キメラ重鎖（すなわち、ヒト可変ドメイン及び非ヒト定常ドメインを含む重鎖）を形成することが可能であるべきである。重鎖遺伝子座は、クラススイッチ及び体細胞超変異を受けること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適切に広いレパートリーは、非ヒト動物が、ヒト 軽鎖可変領域の限られたレパートリーによってコードされるヒト 軽鎖可変ドメインと会合し得るものを選択するのに利用可能となる。

40

## 【0178】

複数の重鎖のための普遍的軽鎖を選択する非ヒト動物は、実用的利用性を有する。様々な実施形態では、普遍的軽鎖のみを発現し得る非ヒト動物において発現する抗体は、同一のまたは実質的に同一の軽鎖と会合し、発現し得る重鎖を有する。これは、二重特異的抗体の作製において特に有用である。例えば、そのような非ヒト動物は、第 1 のエピトープに特異的に結合する抗体を発現する B 細胞を生成するために第 1 の免疫源で免疫され得る。非ヒト動物（またはその重鎖及び 軽鎖遺伝子座に対する同一の遺伝子改変を含む非ヒ

50

ト動物)は、第2のエピトープに特異的に結合する抗体を発現するB細胞を生成するために第2の免疫源で免疫され得る。可変重鎖領域は、B細胞からクローニングされ、同じ重鎖定常領域、及び同じ軽鎖と共に発現され、二重特異的抗体を作製するための細胞において発現され得、その場合、二重特異的抗体の軽鎖成分は、軽鎖成分と会合し、発現するように非ヒト動物によって選択されている。普遍的軽鎖を発現する非ヒト動物が開発されている(例えば、米国特許第10,143,186号(その全体が参照により組み込まれる)参照)。しかしながら、ヒト軽鎖可変ドメインを含む、普遍的軽鎖を発現することができる非ヒト動物の開発が依然として必要とされている。

#### 【0179】

本開示は、可変領域が生殖細胞系列配列から逸脱する重鎖、例えば、親和性成熟したまたは体細胞超変異した重鎖を含む、相当に多様なファミリーの重鎖と好適に対合する免疫グロブリン軽鎖を生成するための修飾された非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)を提供する。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ヒト軽鎖可変ドメインを体細胞変異を含むヒト重鎖可変ドメインと共に発現させ、対合するように修飾され、これによりヒト治療剤として使用するのに好適な高親和性結合タンパク質(例えば、抗体)への経路を可能にする。

#### 【0180】

本明細書に記載される遺伝子修飾された非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)は、生物内での抗体選択の長く複雑なプロセスを介して、ヒト重鎖可変ドメインの多様なコレクションと限られた数の軽鎖オプションとの対合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、非ヒト動物は、ヒト重鎖可変ドメインオプションの広い多様性と併せて限られた数のヒト軽鎖可変ドメインオプションを提示するように修飾される。本明細書に記載の非ヒト動物は、免疫源を投与されると、そのレパートリーにおけるソリューションの数を最大化して、そのレパートリーにおける数または軽鎖オプションによって概ねまたは専ら制限された、免疫源に対する抗体を発生させ得る。様々な実施形態では、これは、非ヒト動物が、軽鎖可変ドメインの好適で適合性のある体細胞変異を達成することを可能にすることを含み、その軽鎖可変ドメインは、それにもかかわらず、比較的多様なヒト重鎖可変ドメイン(特に、体細胞超変異したヒト重鎖可変ドメインを含む)と適合する。

#### 【0181】

ヒト軽鎖オプションの限られたレパートリーを達成するために、本明細書に記載される非ヒト動物は、ネイティブ非ヒト及び/または軽鎖可変ドメインを作製する、または再構成するその能力が非機能性または実質的に非機能性となるように修飾され得る。いくつかの実施形態では、これは、非ヒト動物の及び/または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され得る。いくつかの実施形態では、次いで内因性非ヒト遺伝子座は、内因性非ヒト軽鎖定常ドメインに機能可能に連結された好適な外因性ヒト軽鎖可変領域配列(複数可)で改変され得る。いくつかの実施形態では、外因性ヒト可変領域遺伝子セグメントは、再編成されておらず(例えば、2つのV遺伝子セグメント及び1つ以上のJ遺伝子セグメント)、再編成し、内因性非ヒト軽鎖定常領域遺伝子にスプライシングして再編成された逆キメラ軽鎖遺伝子(ヒト可変、非ヒト定常)を形成し得る。いくつかの実施形態では、外因性ヒト可変遺伝子セグメントは、再編成されており(例えば、1つのV遺伝子セグメント及び1つのJ遺伝子セグメント)、内因性非ヒト軽鎖定常領域遺伝子にスプライシングしてヒト可変領域及び非ヒト定常領域を含む逆キメラ軽鎖遺伝子を形成し得る。いくつかの実施形態では、外因性ヒト可変遺伝子セグメントは、再編成されており(例えば、1つのV遺伝子セグメント及び1つのJ遺伝子セグメント)、外因性ヒト軽鎖定常領域遺伝子にスプライシングしてヒト可変領域及びヒト定常領域を含むヒト化軽鎖遺伝子を形成し得る。様々な実施形態では、軽鎖可変領域は、体細胞超変異することが可能である。様々な実施形態では、適切なエンハンサー(複数可)は、非ヒト動物において保持される。エンハンサーは、軽鎖可変領域が体細胞変異を獲得する能力を最大化することが報告されている。例えば、内因性非ヒト動物可変領

10

20

30

40

50

域遺伝子セグメントをヒト 可変領域遺伝子セグメントで置き換えることによって非ヒト動物の 遺伝子座を改変することにおいて、非ヒト イントロンエンハンサー及び非ヒト 3'エンハンサーは、機能的に維持され、または破壊されない。エンハンサーが除去され、または破壊される実施形態が本開示によって企図されるが、そのような実施形態は、体細胞超変異を減少させ、または排除することが予期されるであろう。そのような実施形態では、軽鎖可変領域の体細胞超変異は、例えば、1つ以上の内因性非ヒトエンハンサーを含む軽鎖可変領域と比べて減少する。

【0182】

多様な逆キメラ（ヒト可変、非ヒト定常）重鎖に関連する逆キメラ（ヒト可変、非ヒト定常）軽鎖の限られたレパートリーを発現する遺伝子修飾された非ヒト動物が提供される。様々な実施形態では、内因性非ヒト 軽鎖可変領域遺伝子セグメントは、欠失され、または内因性非ヒト 定常領域遺伝子に機能可能に連結された単一の（または2つの）ヒト 軽鎖可変領域遺伝子セグメントで置き換えられる。いくつかの実施形態では、非ヒト イントロンエンハンサー及び非ヒト 3'エンハンサーが維持される。任意の1つの理論に縛られることなく、エンハンサーは、とりわけ、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化し得る。様々な実施形態では、非ヒト動物はまた、非機能性 軽鎖遺伝子座、もしくはその欠失、またはその遺伝子座が 軽鎖を作製することを不可能とする欠失を含む。

10

【0183】

様々な実施形態では、内因性非ヒト軽鎖可変遺伝子セグメントを欠き、かつ非ヒトC 遺伝子セグメントに機能可能に連結されたヒト可変遺伝子セグメント、いくつかの実施形態では、再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む軽鎖可変領域遺伝子座を含む遺伝子修飾された非ヒト動物であって、その遺伝子座は、体細胞超変異を受けることが可能であり、その遺伝子座は、非ヒトC 遺伝子セグメントに連結されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む軽鎖を発現する、遺伝子修飾された非ヒト動物が提供される。よって、様々な実施形態では、その遺伝子座は、体細胞超変異の正常な、または野生型のレベルと相関関係がある非ヒト 3'エンハンサーを含む。

20

【0184】

様々な実施形態では、遺伝子修飾された非ヒト動物は、対象となる抗原で免疫された場合、1つまたは2つの再編成された軽鎖と共に発現し、機能するヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の多様な再編成を示すB細胞を生成する。いくつかの実施形態では、ヒト 軽鎖可変領域は、体細胞超変異を含む。いくつかの実施形態では、ヒト 軽鎖可変領域はそれぞれ、1～5個の体細胞超変異を含む。様々な実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物によって発現される軽鎖は、非ヒト動物において発現されるヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む任意の重鎖と会合し、発現することが可能である。

30

【0185】

提供される非ヒト動物、細胞及び組織

(i) 1つまたは2つの非再編成V 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成J 遺伝子セグメント、または(ii)非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性非ヒト 軽鎖遺伝子座での非ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域配列の代わりに単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域に由来するヒト 軽鎖可変ドメインを含む軽鎖を含有する抗体を発現する（例えば、そのB細胞が発現する）非ヒト動物が提供される。本明細書に記載の様々な実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物は、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウスであり、本明細書に記載の非ヒト要素（エンハンサー、定常領域など）は、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス要素であることが理解されるであろう。本明細書に記載の非ヒト動物の好適な例には、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス、特に、マウスが含まれるがこれらに限定されない。

40

【0186】

本開示は、例えば、ヒトに影響を及ぼす多様な疾患の処置において使用され得る新たな抗原結合タンパク質、抗体、抗体成分（例えば、抗原結合部分及び/または組成物または

50



それを含む形式)、及び/または抗体ベースの治療剤を同定及び開発するための改善された *in vivo* システムを提供する。さらに、本開示は、修飾された免疫グロブリン遺伝子座、例えば、限られた 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)が有用であるという認識を包含する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、ヒトへの投与のための抗体及び/または抗体ベースの治療剤の開発のための改善された *in vivo* システムを提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、ヒト V 領域配列を含有する既存の *in vivo* システムから得られる抗体及び/または抗体ベースの治療剤と比較して、改善された及び/または異なる性能(例えば、抗原特異的抗体レパートリーでの発現及び/または出現)を特徴とするヒト 軽鎖可変ドメインを含有する抗体及び/または抗体ベースの治療剤の開発のための改善された *in vivo* システムを提供する。

10

## 【0187】

本開示は、とりわけ、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織を提供する。いくつかの実施形態では、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーの配列は、非ヒト軽鎖定常領域に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、げっ歯類(例えば、マウスまたはラット)軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、または 軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーの配列は、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス) C に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーの配列は、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス) C (例えば、C 1)に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト 軽鎖定常領域(例えば、マウス C 、例えば、マウス C 1)は、内因性非ヒト C の代替りである。

20

## 【0188】

本開示は、とりわけ、2つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒト J 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織を提供する。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 4 - 6 9、V 8 - 6 1、V 4 - 6 0、V 6 - 5 7、V 1 0 - 5 4、V 5 - 5 2、V 1 - 5 1、V 9 - 4 9、V 1 - 4 7、V 7 - 4 6、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 7 - 4 3、V 1 - 4 0、V 5 - 3 7、V 1 - 3 6、V 3 - 2 7、V 3 - 2 5、V 2 - 2 3、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及び V 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 5 - 5 2、V 1 - 5 1、V 9 - 4 9、V 1 - 4 7、V 7 - 4 6、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 7 - 4 3、V 1 - 4 0、V 5 - 3 7、V 1 - 3 6、V 3 - 2 7、V 3 - 2 5、V 2 - 2 3、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及び V 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及び V 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及び J 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J

30

40

50

2、J 3、及びJ 7を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7を含む。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、非ヒト軽鎖定常領域に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、または軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C （例えば、C 1）に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス、例えば、マウスC 、例えば、マウスC 1）は、内因性非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C の代わりである。

10

#### 【0189】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C に機能可能に連結された2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び4つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供する。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 51、V 5 - 45、V 1 - 44、V 1 - 40、V 3 - 21、及びV 2 - 14からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、4つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及びJ 7である。

20

#### 【0190】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C に機能可能に連結された2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供する。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 51、V 5 - 45、V 1 - 44、V 1 - 40、V 3 - 21、及びV 2 - 14からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7である。

30

#### 【0191】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C （例えば、C 1）に機能可能に連結された2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び4つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供する。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 51、V 5 - 45、V 1 - 44、V 1 - 40、V 3 - 21、及びV 2 - 14からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、4つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及びJ 7である。

40

#### 【0192】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C

50

(例えば、C 1)に機能可能に連結された2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織を提供する。いくつかの実施形態では、2つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7である。

#### 【0193】

本開示は、とりわけ、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織を提供する。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 4 - 6 9、V 8 - 6 1、V 4 - 6 0、V 6 - 5 7、V 10 - 5 4、V 5 - 5 2、V 1 - 5 1、V 9 - 4 9、V 1 - 4 7、V 7 - 4 6、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 7 - 4 3、V 1 - 4 0、V 5 - 3 7、V 1 - 3 6、V 3 - 2 7、V 3 - 2 5、V 2 - 2 3、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及びV 3 - 1からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 5 - 5 2、V 1 - 5 1、V 9 - 4 9、V 1 - 4 7、V 7 - 4 6、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 7 - 4 3、V 1 - 4 0、V 5 - 3 7、V 1 - 3 6、V 3 - 2 7、V 3 - 2 5、V 2 - 2 3、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及びV 3 - 1からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及びJ 7を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7を含む。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、非ヒト軽鎖定常領域に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、げっ歯類(例えば、マウスまたはラット)軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、または軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び1つ以上の非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C (例えば、C 1)に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス、例えば、マウスC、例えば、マウスC 1)は、内因性非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C の代替である。

#### 【0194】

本開示は、とりわけ、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C に機能可能に連結された1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメント及び4つの非再編成ヒト

10

20

30

40

50

ト J 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供する。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及び V 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、4つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 であり、4つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4 であり、4つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 である。

10

## 【0195】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C に機能可能に連結された1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメント及び5つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供する。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及び V 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、5つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及び J 7 である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 であり、5つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及び J 7 である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4 であり、5つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及び J 7 である。

20

## 【0196】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C に機能可能に連結された1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメント及び4つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供する。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及び V 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、4つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 であり、4つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4 であり、4つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 である。

30

40

## 【0197】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C に機能可能に連結された1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメント及び5つの非再編成ヒト J 遺伝子セグメントを含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供する。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0

50

、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1であり、5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7である。いくつかの実施形態では、1つの非再編成ヒトV 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4であり、5つの非再編成ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7である。

【0198】

本開示は、とりわけ、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域 (V/J) を含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物 (例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト (例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス) 細胞または非ヒト (例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス) 組織を提供する。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトV 遺伝子セグメントは、V 4 - 6 9、V 8 - 6 1、V 4 - 6 0、V 6 - 5 7、V 10 - 5 4、V 5 - 5 2、V 1 - 5 1、V 9 - 4 9、V 1 - 4 7、V 7 - 4 6、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 7 - 4 3、V 1 - 4 0、V 5 - 3 7、V 1 - 3 6、V 3 - 2 7、V 3 - 2 5、V 2 - 2 3、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及びV 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトV 遺伝子セグメントは、V 5 - 5 2、V 1 - 5 1、V 9 - 4 9、V 1 - 4 7、V 7 - 4 6、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 7 - 4 3、V 1 - 4 0、V 5 - 3 7、V 1 - 3 6、V 3 - 2 7、V 3 - 2 5、V 2 - 2 3、V 3 - 2 2、V 3 - 2 1、V 3 - 1 9、V 2 - 1 8、V 3 - 1 6、V 2 - 1 4、V 3 - 1 2、V 2 - 1 1、V 3 - 1 0、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及びV 3 - 1 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1である。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトV 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4である。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1である。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトJ 遺伝子セグメントは、J 2である。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域のヒトJ 遺伝子セグメントは、J 3である。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域は、非ヒト軽鎖定常領域に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、げっ歯類 (例えば、マウスまたはラット) 軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、非ヒト軽鎖定常領域は、または 軽鎖定常領域である。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域は、非ヒト (例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス) C に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域は、非ヒト (例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス) C (例えば、C 1) に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、非ヒト 軽鎖定常領域 (例えば、マウスC 、例えば、マウスC 1) は、内因性非ヒト (例えば、げっ歯類、例えばラットまたはマウス) C の代わりである。

【0199】

本開示は、とりわけ、マウスC に機能可能に連結された単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域を含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト

動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供し、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及び V 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 であり、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4 であり、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。

10

#### 【0200】

本開示は、とりわけ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C に機能可能に連結された単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域を含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有する非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織を提供し、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及び V 2 - 1 4 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、及び J 7 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 であり、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4 であり、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。

20

#### 【0201】

本開示は、とりわけ、マウス C に機能可能に連結された単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域を含むように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有するマウス、マウス細胞またはマウス組織を提供し、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 を含む。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4 を含む。いくつかの実施形態では、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 を含む。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1 であり、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。いくつかの実施形態では、ヒト V 遺伝子セグメントは、V 2 - 1 4 であり、ヒト J 遺伝子セグメントは、J 2 である。

30

#### 【0202】

本開示は、とりわけ、遺伝子改変されたマウス、マウス細胞またはマウス組織であって、その生殖細胞系列ゲノムは、マウス C 1 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 1 - 5 1 遺伝子セグメント及びヒト J 2 遺伝子セグメントを含み、遺伝子改変されたマウスの B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、遺伝子改変されたマウス、マウス細胞またはマウス組織を提供する。

40

#### 【0203】

本開示は、とりわけ、遺伝子改変されたマウス、マウス細胞またはマウス組織であって、その生殖細胞系列ゲノムは、マウス C 1 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、

50

ヒトV<sub>2-14</sub> 遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを含み、遺伝子改変されたマウスのB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、遺伝子改変されたマウス、マウス細胞またはマウス組織を提供する。

【0204】

いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えばラットまたはマウス）は、前記非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座からの抗体の発現を特徴とし、その抗体は、（1）ヒトV<sub>2</sub> ドメイン及び（2）非ヒトC<sub>2</sub> ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物は、1つ以上の参照の修飾された非ヒト動物と比較して、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座からのヒトV<sub>2</sub> 領域の改善された使用（例えば、限定されないが、約2倍）を特徴とする。

10

【0205】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織であって、その生殖細胞系列ゲノムが、（a）単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域、及び（b）C<sub>2</sub> 遺伝子を含む内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、（a）は、（b）に機能可能に連結されており、非ヒト動物は、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座で非ヒト動物C<sub>2</sub> 遺伝子を欠くものが提供される。

20

【0206】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織であって、そのゲノムが、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域及びC<sub>2</sub> 遺伝子の挿入を含む内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、前記C<sub>2</sub> 遺伝子に機能可能に連結されており、及びC<sub>2</sub> 遺伝子は、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座で非ヒトC<sub>2</sub> 遺伝子の代わりに挿入されているものが提供される。非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織の多くの実施形態では、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座で非ヒトC<sub>2</sub> 遺伝子の代わりに挿入されるC<sub>2</sub> 遺伝子は、非ヒトまたはヒトC<sub>2</sub> 遺伝子である。いくつかの実施形態では、非ヒトC<sub>2</sub> 遺伝子は、霊長類、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウシ、またはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）C<sub>2</sub> 遺伝子からなる群から選択される哺乳動物C<sub>2</sub> 遺伝子であり、またはそれを含む。

30

【0207】

いくつかの実施形態では、非ヒトC<sub>2</sub> 遺伝子は、げっ歯類C<sub>2</sub> 遺伝子であり、またはそれを含む。

【0208】

いくつかの実施形態では、げっ歯類C<sub>2</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>2</sub> 遺伝子であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、マウスC<sub>2</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>2-1</sub>、マウスC<sub>2-2</sub> 及びマウスC<sub>2-3</sub> からなる群から選択されるマウスC<sub>2</sub> 遺伝子と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、マウスC<sub>2</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>2-1</sub>、マウスC<sub>2-2</sub> 及びマウスC<sub>2-3</sub> からなる群から選択されるマウスC<sub>2</sub> 遺伝子と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、マウスC<sub>2-1</sub> 遺伝子は、配列番号1であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、マウスC<sub>2-2</sub> 遺伝子は、配列番号2であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、マウスC<sub>2-3</sub> 遺伝子は、配列番号3であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、マウスC<sub>2</sub> 遺伝子は、マウスC<sub>2-1</sub> 遺伝子と同一の配列を含む。

40

【0209】

50

いくつかの実施形態では、マウスC 遺伝子は、マウスC 1、マウスC 2及びマウスC 3からなる群から選択されるマウスC 遺伝子と80%~100%、85%~100%、90%~100%、95%~100%、または98%~100%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、マウスC 遺伝子は、マウスC 1、マウスC 2及びマウスC 3からなる群から選択されるマウスC 遺伝子と80%~98%、80%~95%、80%~90%、または80%~85%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、マウスC 遺伝子は、マウスC 1、マウスC 2及びマウスC 3からなる群から選択されるマウスC 遺伝子と85%~98%、90%~95%、または88%~93%同一の配列を含む。

【0210】

いくつかの実施形態では、げっ歯類C 遺伝子は、ラットC 遺伝子であり、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、ラットC 遺伝子は、ラットC 1、ラットC 2、ラットC 3及びラットC 4 遺伝子からなる群から選択されるラットC 遺伝子と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、ラットC 遺伝子は、ラットC 1、ラットC 2、ラットC 3及びラットC 4 遺伝子からなる群から選択されるラットC 遺伝子と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの所定の実施形態では、ラットC 1 遺伝子は、配列番号7であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ラットC 2 遺伝子は、配列番号8であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ラットC 3 遺伝子は、配列番号9であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ラットC 4 遺伝子は、配列番号10であり、またはそれを含む。

【0211】

いくつかの実施形態では、ラットC 遺伝子は、ラットC 1、ラットC 2、ラットC 3及びラットC 4 遺伝子からなる群から選択されるラットC 遺伝子と80%~100%、85%~100%、90%~100%、95%~100%、または98%~100%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、ラットC 遺伝子は、ラットC 1、ラットC 2、ラットC 3及びラットC 4 遺伝子からなる群から選択されるラットC 遺伝子と80%~98%、80%~95%、80%~90%、または80%~85%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、ラットC 遺伝子は、ラットC 1、ラットC 2、ラットC 3及びラットC 4 遺伝子からなる群から選択されるラットC 遺伝子と85%~98%、90%~95%、または88%~93%同一の配列を含む。

【0212】

いくつかの実施形態では、ヒトC 遺伝子は、ヒトC 1、ヒトC 2、ヒトC 3、ヒトC 6及びヒトC 7 遺伝子からなる群から選択されるヒトC 遺伝子と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒトC 遺伝子は、ヒトC 1、ヒトC 2、ヒトC 3、ヒトC 6及びヒトC 7 遺伝子からなる群から選択されるヒトC 遺伝子と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒトC 遺伝子は、ヒトC 1、ヒトC 2、ヒトC 3、ヒトC 6及びヒトC 7 遺伝子からなる群から選択されるヒトC 遺伝子と同一の配列を含む。いくつかの所定の実施形態では、ヒトC 1 遺伝子は、配列番号15であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ヒトC 2 遺伝子は、配列番号16であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ヒトC 3 遺伝子は、配列番号17であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ヒトC 6 遺伝子は、配列番号18であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ヒトC 7 遺伝子は、配列番号18であり、またはそれを含む。いくつかの所定の実施形態では、ヒトC 遺伝子は、ヒトC 2 遺伝子であり、またはそれを含む。

【0213】

いくつかの実施形態では、ヒトC 遺伝子は、ヒトC 1、ヒトC 2、ヒトC 3、



ヒトC<sub>6</sub>及びヒトC<sub>7</sub>遺伝子からなる群から選択されるヒトC<sub>6</sub>遺伝子と80%~100%、85%~100%、90%~100%、95%~100%、または98%~100%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒトC<sub>6</sub>遺伝子は、ヒトC<sub>1</sub>、ヒトC<sub>2</sub>、ヒトC<sub>3</sub>、ヒトC<sub>6</sub>及びヒトC<sub>7</sub>遺伝子からなる群から選択されるヒトC<sub>6</sub>遺伝子と80%~98%、80%~95%、80%~90%、または80%~85%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、ヒトC<sub>6</sub>遺伝子は、ヒトC<sub>1</sub>、ヒトC<sub>2</sub>、ヒトC<sub>3</sub>、ヒトC<sub>6</sub>及びヒトC<sub>7</sub>遺伝子からなる群から選択されるヒトC<sub>6</sub>遺伝子と85%~98%、90%~95%、または88%~93%同一の配列を含む。

#### 【0214】

提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織のいくつかの実施形態では、前記非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織の生殖細胞系列ゲノムは、1つ以上のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上のヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含むように改変された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座をさらに含み、ヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座で非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結されている（例えば、Macdonald, L. E., et al., "Precise and in situ genetic humanization of 6 Mb of mouse immunoglobulin genes," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 111(14): 5147-5152 (April 8, 2014)、米国特許第6,596,541号、第8,642,835号、第8,697,940号及び第8,791,323号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。

#### 【0215】

いくつかの実施形態では、1つ以上のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント及び1つ以上のヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの挿入は、全体としてまたは部分的に、非ヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの代わりであり、またはそれに置き換わる（例えば、非ヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのコーディング配列をヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのコーディング配列で位置的に置き換えるまたは置換する）。いくつかの実施形態では、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域は、内因性非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域であり、またはそれを含む。多くの実施形態では、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域（例えば、内因性）は、1つ以上の非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子または遺伝子セグメント（例えば、IgM、IgD、IgG、IgE、IgAなど）を含む。いくつかの所定の実施形態では、挿入は、ヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及びそれらの組み合わせの間に天然に現れるヒトノンコーディングDNAを含む。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載される免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントV<sub>H</sub>3-74、V<sub>H</sub>3-73、V<sub>H</sub>3-72、V<sub>H</sub>2-70、V<sub>H</sub>1-69、V<sub>H</sub>3-66、V<sub>H</sub>3-64、V<sub>H</sub>4-61、V<sub>H</sub>4-59、V<sub>H</sub>1-58、V<sub>H</sub>3-53、V<sub>H</sub>5-51、V<sub>H</sub>3-49、V<sub>H</sub>3-48、V<sub>H</sub>1-46、V<sub>H</sub>1-45、V<sub>H</sub>3-43、V<sub>H</sub>4-39、V<sub>H</sub>4-34、V<sub>H</sub>3-33、V<sub>H</sub>4-31、V<sub>H</sub>3-30、V<sub>H</sub>4-28、V<sub>H</sub>2-26、V<sub>H</sub>1-24、V<sub>H</sub>3-23、V<sub>H</sub>3-21、V<sub>H</sub>3-20、V<sub>H</sub>1-18、V<sub>H</sub>3-15、V<sub>H</sub>3-13、V<sub>H</sub>3-11、V<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>1-8、V<sub>H</sub>3-7、V<sub>H</sub>2-5、V<sub>H</sub>7-4-1、V<sub>H</sub>4-4、V<sub>H</sub>1-3、V<sub>H</sub>1-2、V<sub>H</sub>6-1、またはそれらの任意の組み合わせ、ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントD<sub>H</sub>1-1、D<sub>H</sub>2-2、D<sub>H</sub>3-3、D<sub>H</sub>4-4、D<sub>H</sub>5-5、D<sub>H</sub>6-6、D<sub>H</sub>1-7、D<sub>H</sub>2-8、D<sub>H</sub>3-9、D<sub>H</sub>3-10、D<sub>H</sub>5-12、D<sub>H</sub>6-13、D<sub>H</sub>2-15、D<sub>H</sub>3-16、D<sub>H</sub>4-17、D<sub>H</sub>6-19、D<sub>H</sub>1-20、D<sub>H</sub>2-21、D<sub>H</sub>3-22、D<sub>H</sub>6-25、D<sub>H</sub>1-26、D<sub>H</sub>7-27、またはそれらの任意の組み合わせ、及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントJ<sub>H</sub>1、J<sub>H</sub>2、J<sub>H</sub>3、J<sub>H</sub>4、J<sub>H</sub>5、J<sub>H</sub>6、またはそれらの任意の組み合わせの挿入を含む。いくつかの所定の実施形態

では、挿入は、内因性重鎖遺伝子座においてヒト V<sub>H</sub> 3 - 7 4、V<sub>H</sub> 3 - 7 3、V<sub>H</sub> 3 - 7 2、V<sub>H</sub> 2 - 7 0、V<sub>H</sub> 1 - 6 9、V<sub>H</sub> 3 - 6 6、V<sub>H</sub> 3 - 6 4、V<sub>H</sub> 4 - 6 1、V<sub>H</sub> 4 - 5 9、V<sub>H</sub> 1 - 5 8、V<sub>H</sub> 3 - 5 3、V<sub>H</sub> 5 - 5 1、V<sub>H</sub> 3 - 4 9、V<sub>H</sub> 3 - 4 8、V<sub>H</sub> 1 - 4 6、V<sub>H</sub> 1 - 4 5、V<sub>H</sub> 3 - 4 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 9、V<sub>H</sub> 4 - 3 4、V<sub>H</sub> 3 - 3 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 1、V<sub>H</sub> 3 - 3 0、V<sub>H</sub> 4 - 2 8、V<sub>H</sub> 2 - 2 6、V<sub>H</sub> 1 - 2 4、V<sub>H</sub> 3 - 2 3、V<sub>H</sub> 3 - 2 1、V<sub>H</sub> 3 - 2 0、V<sub>H</sub> 1 - 1 8、V<sub>H</sub> 3 - 1 5、V<sub>H</sub> 3 - 1 3、V<sub>H</sub> 3 - 1 1、V<sub>H</sub> 3 - 9、V<sub>H</sub> 1 - 8、V<sub>H</sub> 3 - 7、V<sub>H</sub> 2 - 5、V<sub>H</sub> 7 - 4 - 1、V<sub>H</sub> 4 - 4、V<sub>H</sub> 1 - 3、V<sub>H</sub> 1 - 2、または V<sub>H</sub> 6 - 1 に隣接して天然に現れるヒトノンコーディング DNA、ヒト D<sub>H</sub> 1 - 1、D<sub>H</sub> 2 - 2、D<sub>H</sub> 3 - 3、D<sub>H</sub> 4 - 4、D<sub>H</sub> 5 - 5、D<sub>H</sub> 6 - 6、D<sub>H</sub> 1 - 7、D<sub>H</sub> 2 - 8、D<sub>H</sub> 3 - 9、D<sub>H</sub> 3 - 1 0、D<sub>H</sub> 5 - 1 2、D<sub>H</sub> 6 - 1 3、D<sub>H</sub> 2 - 1 5、D<sub>H</sub> 3 - 1 6、D<sub>H</sub> 4 - 1 7、D<sub>H</sub> 6 - 1 9、D<sub>H</sub> 1 - 2 0、D<sub>H</sub> 2 - 2 1、D<sub>H</sub> 3 - 2 2、D<sub>H</sub> 6 - 2 5、D<sub>H</sub> 1 - 2 6、または D<sub>H</sub> 7 - 2 7 に隣接して天然に現れるヒトノンコーディング DNA、及び内因性重鎖遺伝子座においてヒト J<sub>H</sub> 1、J<sub>H</sub> 2、J<sub>H</sub> 3、J<sub>H</sub> 4、J<sub>H</sub> 5、または J<sub>H</sub> 6 に隣接して天然に現れるヒトノンコーディング DNA を含む。

#### 【0216】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、そのゲノム（例えば、その生殖細胞系列ゲノム）において A d a m 6 遺伝子を含み、これは A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする（例えば、米国特許第 8,642,835 号及び第 8,697,940 号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、そのゲノム（例えば、その生殖細胞系列ゲノム）においてげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）A d a m 6 遺伝子を含み、これは、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする（例えば、米国特許第 8,642,835 号及び第 8,697,940 号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。いくつかの実施形態では、A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片は、A d a m 6 遺伝子から発現される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変された非ヒト動物における A d a m 6 遺伝子は、その特定の非ヒト動物（例えば、ラット A d a m 6 遺伝子または別のマウスの系統から得られるマウス A d a m 6 遺伝子を含むマウス）を起源としない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、異所性 A d a m 6 遺伝子を含む。「異所性」A d a m 6 遺伝子は、本明細書で使用される場合、A d a m 6 遺伝子が野生型非ヒト動物に出現するのとは異なる状況にある A d a m 6 遺伝子を指す。例えば、A d a m 6 遺伝子は、異なる染色体上に位置し得、異なる遺伝子座に位置し得、または異なる配列に隣接して配置され得る。例示的な異所性 A d a m 6 遺伝子は、ヒト免疫グロブリン配列（例えば、ヒト重鎖可変領域遺伝子セグメント）内に位置するマウス A d a m 6 遺伝子である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、挿入されたまたは組み込まれた A d a m 6 遺伝子を含む。

#### 【0217】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、そのゲノムにおいて（例えば、その生殖細胞系列ゲノムにおいて）1つ以上の非ヒト A d a m 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列の挿入を含む。

#### 【0218】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、

ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織は、そのゲノムにおいて(例えば、その生殖細胞系列ゲノムにおいて)1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織は、そのゲノム(例えば、その生殖細胞系列ゲノム)においてマウスAdam6a遺伝子及び/またはマウスAdam6b遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、マウスADAM6a、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片、及び/またはマウスADAM6b、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む。

10

#### 【0219】

いくつかの実施形態では、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に挿入され、及び/または位置する。いくつかの実施形態では、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列がヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントと連続するような位置に挿入され、及び/または位置する。いくつかの実施形態では、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列がヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントに隣接するような位置に挿入され、及び/または位置する。いくつかの実施形態では、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列がヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメント間に位置するような位置に挿入され、及び/または位置する。いくつかの実施形態では、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、第1及び第2のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント間に挿入され、及び/または位置する。いくつかの実施形態では、第1のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>H</sub>1-2であり、第2のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>H</sub>6-1である。いくつかの実施形態では、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒトAdam6偽遺伝子の代わりに挿入され、及び/または位置する。いくつかの実施形態では、1つ以上の非ヒトADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントとヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントとの間に挿入される。

20

30

40

#### 【0220】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織は、ADAM6活性を回復または向上させるAdam6遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、Adam6遺伝子は、機能性内因性Adam6遺伝子を含む同等の非ヒト動物のレベルまでADAM6活性を回復させる。いくつかの実施形態では、Adam6遺伝子は、機能性Adam

50

6 遺伝子を含まない同等の非ヒト動物の A D A M 6 活性の少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、または少なくとも 10 倍のレベルまで A D A M 6 活性を向上させる。

【0221】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、雄の非ヒト動物で発現した場合、繁殖能力を回復または向上させる A d a m 6 遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、A d a m 6 遺伝子は、雄の非ヒト動物における繁殖能力を、機能性内因性 A d a m 6 遺伝子を含む同等の非ヒト動物のレベルまで回復させる。いくつかの実施形態では、A d a m 6 遺伝子は、雄の非ヒト動物との交配によって産まれる仔の数が機能性 A d a m 6 遺伝子を含まない同等の雄の非ヒト動物との同等の交配から産まれる仔の数の少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95% となるように、雄の非ヒト動物における繁殖能力を回復させる。いくつかの実施形態では、A d a m 6 遺伝子は、雄の非ヒト動物との交配によって産まれる仔の数が機能性 A d a m 6 遺伝子を含まない同等の雄の非ヒト動物との同様の交配から産まれる仔の数の少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、または少なくとも 10 倍になるように、雄の非ヒト動物の繁殖能力を向上させる。

10

20

【0222】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、少なくとも 1 つの内因性非ヒト A d a m 6 遺伝子を欠く。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの内因性非ヒト A d a m 6 遺伝子の欠如は、内因性非ヒト A d a m 6 遺伝子を欠く雄のげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）の A D A M 6 活性及び/または繁殖能力を低下させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、少なくとも 1 つの内因性非ヒト A d a m 6 遺伝子の破壊を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの内因性非ヒト A d a m 6 遺伝子の破壊は、内因性非ヒト A d a m 6 遺伝子を欠く雄のげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）における A D A M 6 活性及び/または繁殖能力を低下させる。

30

【0223】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織のいくつかの実施形態では、非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、本明細書に記載されるヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

【0224】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織のいくつかの実施形態では、非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、本明細書に記載されるヒト軽鎖可変遺伝子セグメント（ヒト可変 軽鎖遺伝子セグメント）を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性またはヘテロ接合性である。

40

【0225】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む第 1 の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルを含み

50

、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む第2の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルを含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、そのような非ヒト動物または非ヒト組織は、第1の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルから 軽鎖及び第2の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルから 軽鎖を発現し得る。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 3 - 20またはV 1 - 39を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 1 - 51またはV 2 - 14を含む。一実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 3 - 20 / J 1またはV 1 - 39 / J 5であり、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V 1 - 51 / J 2またはV 2 - 14 / J 2である。

【0226】

提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織のいくつかの実施形態では、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、全体としてまたは部分的に欠失されている。提供される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織のいくつかの実施形態では、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、機能的にサイレンシングされ、またはそうでなければ非機能性である（例えば、遺伝子標的化によって）。提供される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織のいくつかの所定の実施形態では、非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、機能的にサイレンシングされた、またはそうでなければ非機能性の本明細書に記載される内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である。

【0227】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、内因性免疫グロブリン 軽鎖を検出可能に発現しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、内因性免疫グロブリン 軽鎖を検出可能に発現しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、内因性免疫グロブリン 軽鎖または内因性免疫グロブリン 軽鎖を検出可能に発現しない。

【0228】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、内因性免疫グロブリン重鎖を検出可能に発現しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、内因性免疫グロブリン 軽鎖、内因性免疫グロブリン 軽鎖、及び内因性免疫グロブリン重鎖を検出可能に発現しない。

【0229】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、転写コントロール要素に機能可能に連結された外因性末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）をコードする核酸配列をさらに含むゲノムを有する。（例えば、WO2017/210586及び米国公開第2017/0347633号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。

【0230】

いくつかの実施形態では、転写コントロール要素は、RAG1転写コントロール要素、RAG2転写コントロール要素、免疫グロブリン重鎖転写コントロール要素、免疫グロブ

リン 軽鎖転写コントロール要素、免疫グロブリン 軽鎖転写コントロール要素、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0231】

いくつかの実施形態では、外因性 T d T をコードする核酸配列は、免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座、免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座、免疫グロブリン重鎖遺伝子座、R A G 1 遺伝子座、または R A G 2 遺伝子座に位置する。

【0232】

いくつかの実施形態では、T d T は、ヒト T d T である。いくつかの実施形態では、T d T は、T d T の短いアイソフォーム ( T d T S ) である。

【0233】

いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、挿入点の近くの非ヒト免疫グロブリン 軽鎖エンハンサー領域 ( またはエンハンサー配列 ) ( 例えば、非ヒト免疫グロブリン イントロンエンハンサー及び/または非ヒト免疫グロブリン 3' エンハンサー ) の全体性を維持する方法で内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入される。よって、そのような非ヒト動物は、ヒト及び非ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列 ( 例えば、ヒト V 及び J 遺伝子セグメント、及び非ヒト C または C ) に機能可能に連結されたまたはヒト免疫グロブリン 軽鎖配列 ( 例えば、ヒト V 及び J 遺伝子セグメント、及びヒト C または C ) に機能可能に連結された野生型免疫グロブリン 軽鎖エンハンサー領域 ( またはエンハンサー配列 ) を有する。

【0234】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される1つ以上のヒト免疫グロブリン 軽鎖配列で変化、移動、破壊、欠失、置換または修飾された非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、ネズミ科動物免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される1つ以上のヒト免疫グロブリン 軽鎖配列は、前記非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の2つのコピーのうち非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の1つのコピー ( すなわち、アレル ) に挿入され、ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列に関してヘテロ接合性である非ヒト動物がもたらされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される1つ以上のヒト免疫グロブリン 軽鎖配列を含む免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である非ヒト動物が提供される。

【0235】

いくつかの実施形態では、内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の1つ以上の内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列 ( またはその一部 ) は欠失されない。いくつかの実施形態では、内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の1つ以上の内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列 ( またはその一部 ) は欠失される。いくつかの実施形態では、内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の1つ以上の内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列 ( 例えば、V、J 及び/または C またはそれらの任意の組み合わせ ) は、前記非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座が機能的にサイレンシングされるように変化、移動、破壊、欠失、または置換される。いくつかの実施形態では、内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の1つ以上の内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列 ( 例えば、V、J 及び/または C またはそれらの任意の組み合わせ ) は、前記非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座が機能的に不活性化される ( すなわち、本明細書に記載される非ヒト動物の抗体レパートリーで発現される及び/または検出可能である抗体の機能性軽鎖の生成が不可能になる ) ようにターゲティングベクターで変化、移動、破壊、欠失、または置換される。内因性非ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の不活性化のためのガイダンスは、例えば、米国特許第 9, 006, 511 号 ( 例えば、図 2 参照 ) ( その全体が参照により本明細書に組み込まれる ) で提供されている。

【0236】

修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座または導入遺伝子 ( 例えば、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む ) またはその発現産物は、例えば、P C R、サザンブロット、制限断片長多型 ( R F L P )、アレルの獲得または喪失アッ

10

20

30

40

50

セイ、ウエスタンブロット、FACS分析などを含む多様な方法を使用して検出され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に関してヘテロ接合性である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に関して半接合性である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座または導入遺伝子の1つ以上のコピーを含有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織は、図面に示されているように修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含有する。

10

**【0237】**

本開示は、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織が、その抗体選択及び生成メカニズム（例えば、組換え及び体細胞超変異）においてそのゲノムに含まれるヒト重鎖、及び 軽鎖可変領域遺伝子セグメントを利用することを認識する。このように、様々な実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織によって生成されるヒト免疫グロブリンヒト重鎖及び 軽鎖可変ドメインは、それらのゲノムにそれぞれ含まれるヒト重鎖及び 軽鎖可変領域遺伝子セグメントまたはその体細胞超変異パリアントによってコードされる。

20

**【0238】**

いくつかの実施形態では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）であって、そのゲノムは、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、非ヒト動物は、体細胞超変異したヒト重鎖可変領域配列及び/またはヒト 軽鎖可変領域配列を含むB細胞を含む、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）が提供される。いくつかの実施形態では、本開示の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）のB細胞に存在するヒト重鎖可変領域配列及び/またはヒト 軽鎖は、1、2、3、4、5、またはそれ以上の体細胞超変異を有する。当業者は、成熟抗体配列における遺伝子セグメント源を同定するための方法を知っている。例えば、例として、DNAPLOT、IMGT/V-QUEST、JOINSOLVER、SODA、及び Ab-originaなどの様々なツールがこの分析において補助するために利用可能である。

30

**【0239】**

本開示は、とりわけ、本明細書に記載の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラット、マウス）からの細胞及び組織を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの脾細胞（及び/または他のリンパ組織）が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からのB細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からのプロB細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からのプレB細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの未熟B細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの成熟ナイーブB細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの活性化B細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からのメモリーB細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からのB系統リンパ球が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの血漿または血漿細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの幹細胞が提供される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、胚性幹細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの胚細胞が提供される。いくつかの実施形態では、胚細胞は、卵母細胞である。いくつかの実施形態では、胚細胞は、精子細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載

40

50

される非ヒト動物からの精子細胞は、1つ以上のADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片を発現する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの任意の細胞または組織は、単離され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物からの単離された細胞及び/または単離された組織が提供される。いくつかの実施形態では、ハイブリドーマが提供され、ハイブリドーマは、本明細書に記載される非ヒト動物のB細胞を用いて作製される。いくつかの実施形態では、ハイブリドーマは、対象となる抗原で免疫された非ヒト動物のB細胞を用いて作製される。いくつかの実施形態では、ハイブリドーマは、対象となる抗原上のエピトープに結合する（例えば、特異的に結合する）抗体を発現する非ヒト動物のB細胞を用いて作製される。

10

## 【0240】

本明細書に記載される任意の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、非ヒト動物が1つ以上の対象となる抗原に対する免疫反応を起こすのに十分な条件下及び時間、前記1つ以上の対象となる抗原で免疫され得る。当業者は、非ヒト動物を免疫するための方法を知っている。非ヒト動物を免疫するための例示的で非限定的な方法は、米国特許第7,582,298号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で見ることができる。

## 【0241】

本開示は、とりわけ、本明細書に記載される免疫された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、ならびにそれから単離された細胞及び組織を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物は、1つ以上のエピトープを含む抗原での免疫に反応してB細胞の集団を生成する。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、対象となる抗原の1つ以上のエピトープに結合する（例えば、特異的に結合する）抗体を発現するB細胞の集団を生成する。いくつかの実施形態では、抗原に反応して生成されたB細胞の集団によって発現される抗体は、ヒト重鎖可変領域配列によってコードされるヒト重鎖可変ドメインを有する重鎖及び/または本明細書に記載されるヒトラムダ軽鎖可変領域配列によってコードされるヒトラムダ軽鎖可変ドメインを有するラムダ軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗原に反応して生成されたB細胞の集団によって発現される抗体は、(i)ヒト重鎖可変領域配列によってコードされるヒト重鎖可変ドメインを有する重鎖、及び(ii)本明細書に記載されるヒトラムダ軽鎖可変領域配列によってコードされるヒトラムダ軽鎖可変ドメインを有するラムダ軽鎖を含む。

20

30

## 【0242】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、対象となる抗原の1つ以上のエピトープに結合する抗体を発現するB細胞の集団を生成し、抗原に反応して生成されたB細胞の集団によって発現される抗体は、(i)ヒト重鎖可変領域配列によってコードされるヒト重鎖可変ドメインを有する重鎖、及び(ii)本明細書に記載されるヒトラムダ軽鎖可変領域配列によってコードされるヒトラムダ軽鎖可変ドメインを有するラムダ軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるヒト重鎖可変領域配列及び/またはヒト軽鎖可変領域配列は、体細胞超変異している。いくつかの実施形態では、抗原に反応して生成されたB細胞の集団におけるB細胞の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%は、体細胞超変異したヒト重鎖可変領域配列及び/またはヒト軽鎖可変領域配列を含む。

40

## 【0243】

特定の例示的な実施形態 - 免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座

いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、非ヒトまたはヒトC 遺伝子セグメントの上流に挿入され、それに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、非ヒトまたはヒトC 遺伝子セグメントは、非ヒトC 遺伝子の代わりに挿入されている。本明細書に記載されるように、その

50



ような修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、非ヒト免疫グロブリン 軽鎖エンハンサー領域（またはエンハンサー配列）をさらに含む。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座のクラスター A において現れるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座のクラスター B において現れるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座のクラスター C において現れるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、V 4 - 69、V 8 - 61、V 4 - 60、V 6 - 57、V 10 - 54、V 5 - 52、V 1 - 51、V 9 - 49、V 1 - 47、V 7 - 46、V 5 - 45、V 1 - 44、V 7 - 43、V 1 - 40、V 5 - 37、V 1 - 36、V 3 - 27、V 3 - 25、V 2 - 23、V 3 - 22、V 3 - 21、V 3 - 19、V 2 - 18、V 3 - 16、V 2 - 14、V 3 - 12、V 2 - 11、V 3 - 10、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及び V 3 - 1 からなる群から選択されるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、V 5 - 52、V 1 - 51、V 9 - 49、V 1 - 47、V 7 - 46、V 5 - 45、V 1 - 44、V 7 - 43、V 1 - 40、V 5 - 39、V 5 - 37、V 1 - 36、V 3 - 27、V 3 - 25、V 2 - 23、V 3 - 22、V 3 - 21、V 3 - 19、V 2 - 18、V 3 - 16、V 2 - 14、V 3 - 12、V 2 - 11、V 3 - 10、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及び V 3 - 1 からなる群から選択されるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、V 5 - 52、V 1 - 51、V 9 - 49、V 1 - 47、V 7 - 46、V 5 - 45、V 1 - 44、V 7 - 43、V 1 - 40、V 3 - 27、V 3 - 25、V 2 - 23、V 3 - 22、V 3 - 21、V 3 - 19、V 2 - 18、V 3 - 16、V 2 - 14、V 3 - 12、V 2 - 11、V 3 - 10、V 3 - 9、V 2 - 8、V 4 - 3、及び V 3 - 1 からなる群から選択されるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、V 1 - 51、V 5 - 45、V 1 - 44、V 1 - 40、V 3 - 21、及び V 2 - 14 からなる群から選択されるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、V 1 - 51、V 1 - 40、及び V 2 - 14 からなる群から選択されるヒト V 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、J 1、J 2、J 3、J 6、及び J 7 からなる群から選択されるヒト J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、J 1、J 2、J 3、及び J 7 からなる群から選択されるヒト J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、ヒト J 2 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む。

10

20

30

40

本開示は、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）が、その抗体選択及び生成メカニズム（例えば、組換え及び体細胞超変異）においてそのゲノムに含まれるヒト 軽鎖可変領域遺伝子セグメントを利用することを認識する。このように、様々な実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物によって生成されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインは、それらのゲノムに含まれるヒト 軽鎖可変領域遺伝子セグメントまたはその体細胞超変異バリエーションによってコードされる。

#### 【0245】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）であって、そのゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、非ヒト動物は、体細胞超変異したヒト重鎖可変領域配列、及び/またはヒト 軽鎖可変領域配列を含むB細胞を含む、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）が提供される。いくつかの実施形態では、本開示の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）のB細胞に存在するヒト重鎖可変領域配列、及び/またはヒト 軽鎖可変領域配列は、1、2、3、4、5、またはそれ以上の体細胞超変異を有する。当業者は、成熟抗体配列における遺伝子セグメント源を同定するための方法を知っている。例えば、例として、DNAPLOT、IMGT/V-QUEST、JOINSOLVER、SoDA、及びAb-originなどの様々なツールがこの分析において補助するために利用可能である。

10

#### 【0246】

多くの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、野生型免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）において現れる非ヒト免疫グロブリン 軽鎖エンハンサー領域（またはエンハンサー配列）を含有する。いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）は、異なる種（例えば、異なるげっ歯類種）の野生型免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）において現れる非ヒト免疫グロブリン 軽鎖エンハンサー領域（またはエンハンサー配列）を含有する。

20

#### 【0247】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、その生殖細胞系列ゲノムにおいて、1つ以上の非ヒト免疫グロブリン 軽鎖エンハンサー（すなわち、エンハンサー配列またはエンハンサー領域）に機能可能に連結された限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域）を含む。いくつかの所定の実施形態では、前記限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域）は、ネズミ科動物免疫グロブリン 軽鎖イントロンエンハンサー領域（Ig E iまたはE i）に機能可能に連結されている。いくつかの所定の実施形態では、前記限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域）は、ネズミ科動物免疫グロブリン 軽鎖3'エンハンサー領域（Ig 3'Eまたは3'E）に機能可能に連結されている。いくつかの所定の実施形態では、前記限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域）は、ネズミ科動物E iに機能可能に連結されており、ネズミ科動物3'Eに機能可能に連結されている。

30

40

#### 【0248】

いくつかの実施形態では、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、例えば、マウスC 遺伝子またはラットC 遺伝子などのげっ歯類C 遺伝子である。いくつかの所定の実施形態では、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、129系統、BALB/c系統、C57BL/6系統、掛け合わされた129xC57BL/6系統またはそれらの組み合わせを含む遺伝的背景からのマウスC 遺伝子であり、またはそれを含む。

#### 【0249】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝

50

子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、配列番号1（マウスC 1）、配列番号2（マウスC 2）または配列番号3（マウスC 3）と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、配列番号1（マウスC 1）、配列番号2（マウスC 2）または配列番号3（マウスC 3）と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、マウスC 1 遺伝子の配列であり、またはそれを含む。

#### 【0250】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされる非ヒトC ドメインは、配列番号4（マウスC 1）、配列番号5（マウスC 2）または配列番号6（マウスC 3）と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされる非ヒトC ドメインは、配列番号4（マウスC 1）、配列番号5（マウスC 2）または配列番号6（マウスC 3）と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされる非ヒトC 遺伝子は、マウスC 1 ドメインポリペプチドであり、またはそれを含む。

#### 【0251】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、配列番号7（ラットC 1）、配列番号8（ラットC 2）、配列番号9（ラットC 3）または配列番号10（ラットC 4）と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、配列番号7（ラットC 1）、配列番号8（ラットC 2）、配列番号9（ラットC 3）または配列番号10（ラットC 4）と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）の非ヒトC 遺伝子は、ラットC 1 遺伝子の配列であり、またはそれを含む。

#### 【0252】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされる非ヒトC ドメインは、配列番号11（ラットC 1）、配列番号12（ラットC 2）、配列番号13（ラットC 3）または配列番号14（ラットC 4）と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされる非ヒトC ドメインは、配列番号11（ラットC 1）、配列番号12（ラットC 2）、配列番号13（ラットC 3）または配列番号14（ラットC 4）と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされる非ヒトC ドメインは、ラットC 1 ドメインポリペプチドであり、またはそれを含む。

#### 【0253】

いくつかの実施形態では、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）のヒトC 遺伝子は、例えば、ヒトC 1 遺伝子、ヒトC 2 遺伝子、ヒトC 3 遺伝子、ヒトC 6 遺伝子またはヒトC 7 遺伝子などのヒトC 遺伝子を含む。いくつかの所

10

20

30

40

50

定の実施形態では、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）のヒトC 遺伝子は、ヒトC 2 遺伝子であり、またはそれを含む。

【0254】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）のヒトC 遺伝子は、配列番号15（ヒトC 1）、配列番号16（ヒトC 2）、配列番号17（ヒトC 3）、配列番号18（ヒトC 6）または配列番号19（ヒトC 7）と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）のヒトC 遺伝子は、配列番号15（ヒトC 1）、配列番号16（ヒトC 2）、配列番号17（ヒトC 3）、配列番号18（ヒトC 6）または配列番号19（ヒトC 7）と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）のヒトC 遺伝子は、ヒトC 2 遺伝子の配列であり、またはそれを含む。

10

【0255】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされるヒトC ドメインは、配列番号20（ヒトC 1）、配列番号21（ヒトC 2）、配列番号22（ヒトC 3）、配列番号23（ヒトC 6）または配列番号24（ヒトC 7）と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされるヒトC ドメインは、配列番号20（ヒトC 1）、配列番号21（ヒトC 2）、配列番号22（ヒトC 3）、配列番号23（ヒトC 6）または配列番号24（ヒトC 7）と実質的に同一または同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（またはアレル）に位置する配列によってコードされるヒトC ドメインは、ヒトC 2 ドメインポリペプチドであり、またはそれを含む。

20

【0256】

特定の例示的な実施形態 - 免疫グロブリン重鎖遺伝子座

いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、生殖細胞系列構成で配列され、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された複数のヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメント、エンハンサー及び制御領域の存在を特徴とする修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはアレル）をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはアレル）は、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結された1つ以上のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント及び1つ以上のヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む。いくつかの所定の実施形態では、修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはアレル）は、少なくともヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントV<sub>H</sub>3-74、V<sub>H</sub>3-73、V<sub>H</sub>3-72、V<sub>H</sub>2-70、V<sub>H</sub>1-69、V<sub>H</sub>3-66、V<sub>H</sub>3-64、V<sub>H</sub>4-61、V<sub>H</sub>4-59、V<sub>H</sub>1-58、V<sub>H</sub>3-53、V<sub>H</sub>5-51、V<sub>H</sub>3-49、V<sub>H</sub>3-48、V<sub>H</sub>1-46、V<sub>H</sub>1-45、V<sub>H</sub>3-43、V<sub>H</sub>4-39、V<sub>H</sub>4-34、V<sub>H</sub>3-33、V<sub>H</sub>4-31、V<sub>H</sub>3-30、V<sub>H</sub>4-28、V<sub>H</sub>2-26、V<sub>H</sub>1-24、V<sub>H</sub>3-23、V<sub>H</sub>3-21、V<sub>H</sub>3-20、V<sub>H</sub>1-18、V<sub>H</sub>3-15、V<sub>H</sub>3-13、V<sub>H</sub>3-11、V<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>1-8、V<sub>H</sub>3-7、V<sub>H</sub>2-5、V<sub>H</sub>7-4-1、V<sub>H</sub>4-4、V<sub>H</sub>1-3、V<sub>H</sub>1-2、V<sub>H</sub>6-1、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの所定の実施形態では、修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはアレル）は、少なくともヒトD<sub>H</sub>遺伝子セ

30

40

50

グメント D<sub>H</sub> 1 - 1、D<sub>H</sub> 2 - 2、D<sub>H</sub> 3 - 3、D<sub>H</sub> 4 - 4、D<sub>H</sub> 5 - 5、D<sub>H</sub> 6 - 6、D<sub>H</sub> 1 - 7、D<sub>H</sub> 2 - 8、D<sub>H</sub> 3 - 9、D<sub>H</sub> 3 - 10、D<sub>H</sub> 5 - 12、D<sub>H</sub> 6 - 13、D<sub>H</sub> 2 - 15、D<sub>H</sub> 3 - 16、D<sub>H</sub> 4 - 17、D<sub>H</sub> 6 - 19、D<sub>H</sub> 1 - 20、D<sub>H</sub> 2 - 21、D<sub>H</sub> 3 - 22、D<sub>H</sub> 6 - 25、D<sub>H</sub> 1 - 26、D<sub>H</sub> 7 - 27、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの所定の実施形態では、修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはアレル）は、少なくともヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメント J<sub>H</sub> 1、J<sub>H</sub> 2、J<sub>H</sub> 3、J<sub>H</sub> 4、J<sub>H</sub> 5、J<sub>H</sub> 6、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0257】

本開示は、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）が、その抗体選択及び生成メカニズム（例えば、組換え及び体細胞超変異）においてそのゲノムに含まれるヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントを利用することを認識する。このように、様々な実施形態では、本明細書に記載の非ヒト動物によって生成されるヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインは、それらのゲノムに含まれるヒト重鎖可変領域遺伝子セグメントまたはその体細胞超変異バリエーションによってコードされる。

10

【0258】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、体細胞超変異したヒト重鎖可変領域配列、及び/またはヒト軽鎖可変領域配列を含む B 細胞を含む。いくつかの実施形態では、本開示の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）の B 細胞に存在するヒト重鎖可変領域配列、及び/またはヒト軽鎖可変領域配列は、1、2、3、4、5、またはそれ以上の体細胞超変異を有する。当業者は、成熟抗体配列における遺伝子セグメント源を同定するための方法を知っている。例えば、例として、DNA PL O T、I M G T / V - Q U E S T、J O I N S O L V E R、S o D A、及び A b - o r i g i n などの様々なツールがこの分析において補助するために利用可能である。

20

【0259】

いくつかの実施形態では、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、免疫グロブリン M ( I g M )、免疫グロブリン D ( I g D )、免疫グロブリン G ( I g G )、免疫グロブリン E ( I g E ) 及び免疫グロブリン A ( I g A ) などの 1 つ以上の非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子を含む。いくつかの所定の実施形態では、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域は、げっ歯類 I g M、げっ歯類 I g D、げっ歯類 I g G 3、げっ歯類 I g G 1、げっ歯類 I g G 2 b、げっ歯類 I g G 2 a、げっ歯類 I g E 及びげっ歯類 I g A 定常領域遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、前記ヒト V<sub>H</sub>、D<sub>H</sub> 及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1 つ以上の非ヒト免疫グロブリン重鎖エンハンサー（すなわち、エンハンサー配列またはエンハンサー領域）に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、前記ヒト V<sub>H</sub>、D<sub>H</sub> 及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1 つ以上の非ヒト免疫グロブリン重鎖制御領域（または制御配列）に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、前記ヒト V<sub>H</sub>、D<sub>H</sub> 及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1 つ以上の非ヒト免疫グロブリン重鎖エンハンサー（またはエンハンサー配列）及び 1 つ以上の非ヒト免疫グロブリン重鎖制御領域（または制御配列）に機能可能に連結されている。

30

【0260】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、内因性 A d a m 6 遺伝子を含みしない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、同じ種の野生型非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムに見られるものと同じ生殖細胞系列ゲノム位置において内因性 A d a m 6 遺伝子（または A d a m 6 をコードする配列）を含みしない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、ヒト A d a m 6 偽遺伝子を含みしない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、1 つ以上の非ヒト（例えば、げっ歯類）A d a m 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列の挿入を含む。いくつかの実施形態では、前記挿入は、本明細書に記載さ

40

50

れる修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の外（例えば、限定されないが、最も5'側のV<sub>H</sub>遺伝子セグメントの上流）、修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の中または非ヒト動物（例えば、限定されないが、ランダムに導入された非ヒトAdam6コード配列）、細胞または組織の生殖細胞系列ゲノムにおける他の個所に存在し得る。

#### 【0261】

様々な実施形態では、本明細書に記載される提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、抗体分子において内因性非ヒトV<sub>H</sub>領域を全体としてまたは部分的に検出可能に発現しない。様々な実施形態では、本明細書に記載される提供される非ヒト動物は、抗体分子において内因性非ヒトV<sub>H</sub>領域（例えば、V<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及び/またはJ<sub>H</sub>）を全体としてまたは部分的にコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含有しない（または欠く、もしくはその欠失を含有する）。様々な実施形態では、本明細書に記載される提供される非ヒト動物は、内因性非ヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントの欠失を全体としてまたは部分的に含む生殖細胞系列ゲノムを有する。様々な実施形態では、提供される非ヒト動物は、繁殖可能である。

#### 【0262】

そのような修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはアレル）を保有するターゲティングベクター、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞及び動物の作製のためのガイダンスは、Macdonald（2014）、米国特許第6,596,541号、第8,642,835号、第8,697,940号及び第8,791,323号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で見ることができる。当業者は、非ヒト（例えば、哺乳動物）ゲノムのそのような遺伝子修飾及び/または操作を達成するための、または非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムに導入するためのそのような配列を調製、提供、または製造するための当該技術分野で知られている多様な技術を知っている。

#### 【0263】

特定の例示的な実施形態 - 免疫グロブリン遺伝子座の組み合わせ

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、その生殖細胞系列ゲノムにおいて、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含み、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントまたは他のヒトまたはヒト化遺伝子（例えば、TdTをコードするヒト遺伝子）を（例えば、交雑または複数遺伝子標的化ストラテジーを介して）含む1つ以上の追加の免疫グロブリン遺伝子座をさらに含む。そのような非ヒト動物は、非ヒト動物の意図された使用に応じて所望の修飾された遺伝子型を達成するために、上述したように、または当該技術分野で知られている方法を使用して調製され得る。他の免疫グロブリン遺伝子座における追加のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントまたは他のヒトまたはヒト化遺伝子（例えば、TdTをコードするヒト遺伝子）は、上述した遺伝子改変を有する細胞（例えば、胚性幹細胞）のゲノムのさらなる変化を介してまたは所望に応じて他の遺伝子改変された系統との当該技術分野で知られている交配技術を介して導入され得る。

#### 【0264】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、その生殖細胞系列ゲノムにおいて、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含み、その生殖細胞系列ゲノムにおいて、1つ以上の非ヒト動物免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD遺伝子セグメント、及び1つ以上のヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座をさらに含む。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域レパートリー（

10

20

30

40

50

例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）についてヘテロ接合性またはホモ接合性である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、本明細書に記載される修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性またはホモ接合性である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）についてホモ接合性であり、本明細書に記載される修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である。

#### 【0265】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、その生殖細胞系列ゲノムにおいて、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）、1つ以上の非ヒト動物免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD遺伝子セグメント、及び1つ以上のヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、機能的に不活性化した（例えば、全体としてまたは部分的に欠失した、またはそうでなければ非機能性とされた）内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）をさらに含む。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）についてヘテロ接合性またはホモ接合性である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、本明細書に記載される修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性またはホモ接合性である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、機能的に不活性化した（例えば、全体としてまたは部分的に欠失した、またはそうでなければ非機能性とされた）内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）についてヘテロ接合性またはホモ接合性である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）を含む修飾された内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）についてホモ接合性であり、本明細書に記載される修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性であり、機能的に不活性化した（例えば、全体としてまたは部分的に欠失した、またはそうでなければ非機能性とされた）内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）についてホモ接合性である。

#### 【0266】

いくつかの実施形態では、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）である遺伝子改変された非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムは、2つのアレルを含む修飾された内因性免疫グロブリン（遺伝子座）を含む。いくつかの実施形態では、第1のアレルは、限られたヒト（軽鎖可変領域）レパートリーを含み、第2のアレルは、限られたヒト（軽鎖可変領域）レパートリーを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）細胞またはげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）組織の生殖細胞系列ゲノムは、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）C<sub>H</sub>遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）を含む第1の修飾された内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）アレルを含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、及びそれによるげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）細胞またはげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）組織は、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）C<sub>H</sub>遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）を含む第2の修飾された内因性免疫グロブリン（軽鎖遺伝子座）アレルを含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン（軽鎖可変領域）は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>

10

20

30

40

50

遺伝子セグメントを含む。いくつかの実施形態では、そのようなげっ歯類（例えば、マウスまたはラット）組織は、第1の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルから 軽鎖及び第2の修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座アレルから 軽鎖を発現し得る。いくつかの実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V<sub>3-20</sub>またはV<sub>1-39</sub>を含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V<sub>1-51</sub>またはV<sub>2-14</sub>を含む。一実施形態では、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub>であり、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、V<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>またはV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>である。

#### 【0267】

いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、(a)非ヒト動物が非ヒトC<sub>H</sub>ドメイン配列に融合されたヒトV<sub>H</sub>ドメイン配列を含む免疫グロブリン重鎖を発現するように、1つ以上の内因性非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結されたヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含むホモ接合性またはヘテロ接合性免疫グロブリン重鎖遺伝子座；(b)非ヒト動物が非ヒトC<sub>L</sub>ドメイン配列に融合されたヒトV<sub>L</sub>ドメイン配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現するように、非ヒト（例えば、げっ歯類）免疫グロブリンC<sub>L</sub>遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖を含む免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。

#### 【0268】

いくつかの実施形態では、提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、(a)非ヒト動物が非ヒトC<sub>H</sub>ドメイン配列に融合されたヒトV<sub>H</sub>ドメイン配列を含む免疫グロブリン重鎖を発現するように、1つ以上の内因性非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結されたヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含むホモ接合性またはヘテロ接合性免疫グロブリン重鎖遺伝子座；(b)非ヒト動物が非ヒトC<sub>L</sub>ドメイン配列に融合されたヒトV<sub>L</sub>ドメイン配列を含む免疫グロブリン軽鎖を発現するように、非ヒト（例えば、げっ歯類）免疫グロブリンC<sub>L</sub>遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖を含む免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座；及び(c)全体としてまたは部分的に機能的に不活性化または欠失したホモ接合性またはヘテロ接合性の内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む生殖細胞系列ゲノムを有する。

#### 【0269】

例えば、本明細書に記載されるように、本明細書に記載される修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む非ヒト動物は、（例えば、交雑または複数遺伝子標的化ストラテジーを介して）米国特許第8,642,835号、第8,697,940号、第9,006,511号、第9,035,128号、第9,066,502号、第9,150,662号及び第9,163,092号（これらの各々は、その全体が参照により組み込まれる）に記載される1つ以上の改変をさらに含み得る。

#### 【0270】

##### 核酸コンストラクト

典型的には、ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列（例えば、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域、または1つもしくは2つの非再編成V<sub>L</sub>遺伝子セグメントと少なくとも1つの非再編成J<sub>L</sub>遺伝子セグメント）、またはその部分（複数可）を含有するポリヌクレオチド分子が、宿主細胞においてポリヌクレオチド分子を複製するために、ベクター、好ましくはDNAベクターと連結される（例えば、それに挿入される）。

#### 【0271】

ヒト免疫グロブリン 軽鎖配列は、既知の配列または源（例えば、ライブラリ）から直接的にクローニングされ、GenBankから利用可能な公開された配列または他の公共に利用可能なデータベース（例えば、IMGT）に基づいて*in silico*で設計された生殖細胞系列配列から合成され得る。代替的には、細菌人工染色体（BAC）ライブ

10

20

30

40

50



ラリは、対象となる免疫グロブリンDNA配列（例えば、ヒトV及びJ配列ならびにそれらの組み合わせ）を提供し得る。BACライブラリは、100～150kbのインサートサイズを含有し得、300kbもの大きさのインサートを保有することが可能である（Shizuya, et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 8794 - 8797; Swiatek, et al., 1993, Genes and Development 7: 2071 - 2084; Kim, et al., 1996, Genomics 34: 213 - 218（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる））。例えば、164～196kbの平均インサートサイズを有するヒトBACライブラリが記載されている（Osoegawa, K. et al., 2001, Genome Res. 11(3): 483 - 96; Osoegawa, K. et al., 1998, Genomics 52: 1 - 8, Article No. GE985423（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。ヒト及び非ヒト動物ゲノムBACライブラリが構築されており、市販されている（例えば、ThermoFisher）。ゲノムBACライブラリはまた、免疫グロブリンDNA配列及び転写コントロール領域の源として機能し得る。

10

#### 【0272】

代替的には、免疫グロブリンDNA配列は、酵母人工染色体（YAC）から単離され、クローニングされ、及び/または移行され得る。例えば、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座のヌクレオチド配列が決定されている（例えば、Dunham, I. et al., 1999, Nature 402: 489 - 95（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。さらに、YACは、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座導入遺伝子を構築するために以前から用いられている（例えば、Popov, A. V. et al., 1996, Gene 177: 195 - 201; Popov, A. V. et al., 1999, J. Exp. Med. 189(10): 1611 - 19（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。免疫グロブリン軽鎖遺伝子座全体（ヒトまたは非ヒト）がクローニングされ、いくつかのYAC内に含有され得る。含まれる配列にかかわらず、複数のYACが用いられ、重複する類似領域を含有する場合、それらは酵母宿主系統内で組み換えられて、遺伝子座全体または遺伝子座の所望の部分（例えば、ターゲティングベクターで標的とされる領域）を表す単一のコンストラクトが生成され得る。YACアームは、当該技術分野で知られている及び/または本明細書に記載される方法によってコンストラクトを胚性幹細胞または胚に導入する際に補助するために哺乳動物選択カセットでの改良によって追加的に改変され得る。

20

30

#### 【0273】

本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の構築において使用するためのヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントのDNA及びアミノ酸配列は、公開されているデータベース（例えば、GenBank、IMG Tなど）及び/または公開されている抗体配列から得られ得る。

#### 【0274】

いくつかの所定の実施形態では、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメント（例えば、単一の再編成されたヒト軽鎖可変領域、または1つもしくは2つの非再編成V遺伝子セグメントと少なくとも1つの非再編成J遺伝子セグメント）を含有する核酸コンストラクトは、ヒトまたは非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）免疫グロブリンまたは免疫グロブリン軽鎖定常領域（それぞれCまたはC'）遺伝子に機能可能に連結されている。いくつかの所定の実施形態では、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメント（例えば、単一の再編成されたヒト軽鎖可変領域、または1つもしくは2つの非再編成V遺伝子セグメントと少なくとも1つの非再編成J遺伝子セグメント）を含有する核酸コンストラクトは、1つ以上の非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）免疫グロブリンまたは免疫グロブリン軽鎖エンハンサー領域（またはエンハンサー配列）に機能可能に連結されている。いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメント（例えば、単一の再編成されたヒト軽鎖可変領

40

50

域、または1つもしくは2つの非再編成V 遺伝子セグメントと少なくとも1つの非再編成J 遺伝子セグメント)を含有する核酸コンストラクトは、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)またはヒトC 領域遺伝子及び非ヒト免疫グロブリン軽鎖エンハンサー領域(またはエンハンサー配列)に機能可能に連結されている。

【0275】

いくつかの実施形態では、非再編成ヒトV 及びJ 配列を含有する核酸コンストラクトは、ヒト及び/またはネズミ科動物起源の遺伝子間DNAをさらに含む。いくつかの実施形態では、遺伝子間DNAは、ノンコーディングネズミ科動物免疫グロブリン軽鎖配列、ノンコーディングヒト免疫グロブリン軽鎖配列、ノンコーディングネズミ科動物免疫グロブリン軽鎖配列、またはそれらの組み合わせであり、またはそれを含む。

10

【0276】

核酸コンストラクトは、当該技術分野で知られている方法を使用して調製され得る。例えば、核酸コンストラクトは、より大きなプラスミドの一部として調製され得る。そのような調製は、当該技術分野で知られているように効率的な方法で正確な構築物のクローニング及び選択を可能にする。本明細書に記載されるヒト免疫グロブリン軽鎖配列を全体としてまたは部分的に含有する核酸コンストラクトは、それらが所望の非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)への組み込みのために残存プラスミド配列から単離され得るように、プラスミド上の制限部位間に配置され得る。

【0277】

核酸コンストラクト(例えば、プラスミド)の調製及び宿主生物の形質転換において用いられる様々な方法が当該技術分野で知られている。原核生物及び真核細胞の両方のための他の好適な発現系、ならびに一般的な組換え手順については、Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Manipulation, 5th Ed., ed. By Old, R. W. and S. B. Primrose, Blackwell Science, Inc., 1994 and Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, J. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989(これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

20

30

【0278】

ターゲティングベクター

ターゲティングベクターは、核酸コンストラクトを標的ゲノム遺伝子座に導入するために用いられ得る。ターゲティングベクターは、核酸コンストラクト及び前記核酸コンストラクトを挟むホモロジーアームを含み得;当業者は、ターゲティングベクターの設計、構造、及び/または使用に一般的に適用可能な多様なオプション及び特徴を知っている。例えば、ターゲティングベクターは、線状形態または環状形態であり得、それらは一本鎖または二本鎖であり得る。ターゲティングベクターは、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)であり得る。参照を容易にするため、ホモロジーアームは、本明細書では5'及び3'(すなわち、上流及び下流)ホモロジーアームと称される。この専門用語は、ターゲティングベクター内の核酸コンストラクトに対するホモロジーアームの相対的位置に関する。5'及び3'ホモロジーアームは、標的とされる遺伝子座内の領域にまたは別のターゲティングベクター内の領域に対応し、これは、本明細書では「5'標的配列」及び「3'標的配列」とそれぞれ称される。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームはまた、5'または3'標的配列として機能し得る。

40

【0279】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、互いに組み換えることが可能な2つ、3つまたはそれ以上のターゲティングベクターを用いる。様々な実施形態では、ターゲティングベクターは、本明細書の他の箇所に記載されているように、大きなターゲティ

50

ングベクター ( L T V E C ) である。いくつかの実施形態では、第 1、第 2、及び第 3 のターゲットベクターはそれぞれ、5' 及び 3' ホモロジーアームを含む。第 1 のターゲットベクターの 3' ホモロジーアームは、第 2 のターゲットベクターの 5' ホモロジーアームと重複する配列 ( すなわち、重複配列 ) を含み、これは、第 1 及び第 2 の L T V E C 間の相同組換えを可能にする。

【 0 2 8 0 】

二重標的化方法では、第 1 のターゲットベクターの 5' ホモロジーアーム及び第 2 のターゲットベクターの 3' ホモロジーアームは、標的ゲノム遺伝子座内の対応するセグメント ( すなわち、標的配列 ) に類似し得、これは、第 1 及び第 2 のターゲットベクターの、対応するゲノムセグメントとの相同組換えを促進し、標的ゲノム遺伝子座を

10

【 0 2 8 1 】

三重標的化方法では、第 2 のターゲットベクターの 3' ホモロジーアームは、第 3 のターゲットベクターの 5' ホモロジーアームと重複する配列 ( すなわち、重複配列 ) を含み得、これは、第 2 及び第 3 の L T V E C の間の相同組換えを可能にし得る。第 1 のターゲットベクターの 5' ホモロジーアーム及び第 3 のターゲットベクターの 3' ホモロジーアームは、標的ゲノム遺伝子座内の対応するセグメント ( すなわち、標的配列 ) に類似し、これは、第 1 及び第 3 のターゲットベクターの、対応するゲノムセグメントとの相同組換えを促進し、標的ゲノム遺伝子座を改変し得る。

【 0 2 8 2 】

ホモロジーアーム及び標的配列または 2 つのホモロジーアームは、2 つの領域が互いの配列同一性の十分なレベルを共有し、これによりそれらが相同組換え反応のための基質として作用し得る場合、互いに「対応する」または「対応している」。所与の標的配列とターゲットベクターに見られる対応するホモロジーアーム ( すなわち、重複配列 ) との間または 2 つのホモロジーアーム間の配列同一性は、相同組換えが生じることを可能にする任意の程度の配列同一性であり得る。例を 1 つだけ挙げると、ターゲットベクター ( またはその断片 ) のホモロジーアーム及び別のターゲットベクターの標的配列または標的ゲノム遺伝子座の標的配列 ( またはその断片 ) によって共有される配列同一性の量は、配列が相同組換えを受けるように、例えば、限定されないが、少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性であり得る。

20

30

【 0 2 8 3 】

その上、ホモロジーアームと、対応する標的配列との間の類似性 ( 例えば、同一性 ) の対応する領域は、標的ゲノム遺伝子座で相同組換えを促進するのに十分な任意の長さのものであり得る。例えば、所与のホモロジーアーム及び / または対応する標的配列は、ホモロジーアームが、細胞の標的ゲノム遺伝子座内のまたは別のターゲットベクター内の対応する標的配列 ( 複数可 ) との相同組換えを受けるのに十分な類似性を有するように、例えば、限定されないが、長さが約 5 ~ 1 0 k b、5 ~ 1 5 k b、5 ~ 2 0 k b、5 ~ 2 5 k b、5 ~ 3 0 k b、5 ~ 3 5 k b、5 ~ 4 0 k b、5 ~ 4 5 k b、5 ~ 5 0 k b、5 ~ 5 5 k b、5 ~ 6 0 k b、5 ~ 6 5 k b、5 ~ 7 0 k b、5 ~ 7 5 k b、5 ~ 8 0 k b、5 ~ 8 5 k b、5 ~ 9 0 k b、5 ~ 9 5 k b、5 ~ 1 0 0 k b、1 0 0 ~ 2 0 0 k b、または 2 0 0 ~ 3 0 0 k b ( 例えば、本明細書の他の個所で記載されている ) である類似性の対応する領域を含み得る。いくつかの実施形態では、所与のホモロジーアーム及び / または対応する標的配列は、ホモロジーアームが、細胞の標的ゲノム遺伝子座内のまたは別のターゲットベクター内の対応する標的配列 ( 複数可 ) との相同組換えを受けるのに十分な類似性を有するように、例えば、限定されないが、長さが約 1 0 ~ 1 0 0 k b、1 5 ~ 1 0 0 k b、2 0 ~ 1 0 0 k b、2 5 ~ 1 0 0 k b、3 0 ~ 1 0 0 k b、3 5 ~ 1 0 0 k b、4 0 ~ 1 0 0 k b、4 5 ~ 1 0 0 k b、5 0 ~ 1 0 0 k b、5 5 ~ 1 0 0 k b、6 0 ~ 1 0 0 k b、6 5 ~ 1 0 0 k b、7 0 ~ 1 0 0 k b、7 5 ~ 1 0 0 k b、8 0 ~

40

50

100 kb、85~100 kb、90~100 kb、または95~100 kb（例えば、本明細書の他の個所で記載されている）である類似性の対応する領域を含む。

【0284】

第1のターゲットングベクターの3'ホモロジーアーム及び第2のターゲットングベクターの5'ホモロジーアームの、または第2のターゲットングベクターの3'ホモロジーアーム及び第3のターゲットングベクターの5'ホモロジーアームの重複配列は、前記ターゲットングベクター間の相同組換えを促進するのに十分な任意の長さのものであり得る。例えば、ホモロジーアームの所与の重複配列は、ホモロジーアームの重複配列が別のターゲットングベクター内の対応する重複配列との相同組換えを受けるのに十分な類似性を有するように、長さが約1~5 kb、5~10 kb、5~15 kb、5~20 kb、5~25 kb、5~30 kb、5~35 kb、5~40 kb、5~45 kb、5~50 kb、5~55 kb、5~60 kb、5~65 kb、5~70 kb、5~75 kb、5~80 kb、5~85 kb、5~90 kb、5~95 kb、5~100 kb、100~200 kb、または200~300 kbである対応する重複領域を含み得る。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームの所与の重複配列は、ホモロジーアームの重複配列が別のターゲットングベクター内の対応する重複配列との相同組換えを受けるのに十分な類似性を有するように、長さが約1~100 kb、5~100 kb、10~100 kb、15~100 kb、20~100 kb、25~100 kb、30~100 kb、35~100 kb、40~100 kb、45~100 kb、50~100 kb、55~100 kb、60~100 kb、65~100 kb、70~100 kb、75~100 kb、80~100 kb、85~100 kb、90~100 kb、または95~100 kbである重複領域を含む。いくつかの実施形態では、重複配列は、1~5 kb（両端含む）である。いくつかの実施形態では、重複配列は、約1 kb~約70 kb（両端含む）である。いくつかの実施形態では、重複配列は、約10 kb~約70 kb（両端含む）である。いくつかの実施形態では、重複配列は、約10 kb~約50 kb（両端含む）である。いくつかの実施形態では、重複配列は、少なくとも10 kbである。いくつかの実施形態では、重複配列は、少なくとも20 kbである。例えば、重複配列は、約1 kb~約5 kb（両端含む）、約5 kb~約10 kb（両端含む）、約10 kb~約15 kb（両端含む）、約15 kb~約20 kb（両端含む）、約20 kb~約25 kb（両端含む）、約25 kb~約30 kb（両端含む）、約30 kb~約35 kb（両端含む）、約35 kb~約40 kb（両端含む）、約40 kb~約45 kb（両端含む）、約45 kb~約50 kb（両端含む）、約50 kb~約60 kb（両端含む）、約60 kb~約70 kb（両端含む）、約70 kb~約80 kb（両端含む）、約80 kb~約90 kb（両端含む）、約90 kb~約100 kb（両端含む）、約100 kb~約120 kb（両端含む）、約120 kb~約140 kb（両端含む）、約140 kb~約160 kb（両端含む）、約160 kb~約180 kb（両端含む）、約180 kb~約200 kb（両端含む）、約200 kb~約220 kb（両端含む）、約220 kb~約240 kb（両端含む）、約240 kb~約260 kb（両端含む）、約260 kb~約280 kb（両端含む）、または約280 kb~約300 kb（両端含む）であり得る。例を1つだけ挙げると、重複配列は、約20 kb~約60 kb（両端含む）であり得る。代替的には、重複配列は、少なくとも1 kb、少なくとも5 kb、少なくとも10 kb、少なくとも15 kb、少なくとも20 kb、少なくとも25 kb、少なくとも30 kb、少なくとも35 kb、少なくとも40 kb、少なくとも45 kb、少なくとも50 kb、少なくとも60 kb、少なくとも70 kb、少なくとも80 kb、少なくとも90 kb、少なくとも100 kb、少なくとも120 kb、少なくとも140 kb、少なくとも160 kb、少なくとも180 kb、少なくとも200 kb、少なくとも220 kb、少なくとも240 kb、少なくとも260 kb、少なくとも280 kb、または少なくとも300 kbであり得る。いくつかの実施形態では、重複配列は、多くとも400 kb、多くとも350 kb、多くとも300 kb、多くとも280 kb、多くとも260 kb、多くとも240 kb、多くとも220 kb、多くとも200 kb、多くとも180 kb、多くとも160 kb、多くとも140 kb、多くとも120

10

20

30

40

50

k b、多くとも100 k b、多くとも90 k b、多くとも80 k b、多くとも70 k b、多くとも60 k bまたは多くとも50 k bであり得る。

【0285】

ホモロジーアームは、いくつかの実施形態では、細胞に対してネイティブである遺伝子座（例えば、標的とされる遺伝子座）に対応し、または代替的にそれらは、細胞のゲノムに組み込まれたDNAの異種または外因性セグメントの領域（例えば、導入遺伝子、発現カセット、またはDNAの異種もしくは外因性領域を含む）に対応し得る。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、いくつかの実施形態では、細胞におけるターゲティングベクター上の領域に対応し得る。いくつかの実施形態では、ターゲティングベクターのホモロジーアームは、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、ヒト人工染色体の領域、または適切な宿主細胞に含有される任意の他の修飾された領域に対応し得る。またさらに、ターゲティングベクターのホモロジーアームは、BACライブラリ、コスミドライブラリ、またはP1ファージライブラリの領域に対応し、またはそれに由来し得る。いくつかの所定の実施形態では、ターゲティングベクターのホモロジーアームは、原核生物、酵母、トリ（例えば、ニワトリ）、非ヒト哺乳動物、げっ歯類、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）、飼育慣らされた哺乳動物、農業用哺乳動物、または対象となる任意の他の生物に対してネイティブ、異種、または外因性である遺伝子座に対応する。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、ヌクレアーゼ物質（例えば、Casタンパク質）によって誘導されるニックまたは二本鎖切断の非存在下で、慣用の方法を使用する標的化に対する限られた感受性を示し、または標的とされる部位での相対的に低いレベルの成功裏の組み込み、及び/または有意なレベルのオフターゲット組み込みを示した細胞の遺伝子座に対応する。いくつかの実施形態では、ホモロジーアームは、修飾されたDNAを含むように設計される。

【0286】

いくつかの実施形態では、ターゲティングベクター（複数可）の5'及び3'ホモロジーアームは、標的とされるゲノムに対応する。代替的には、ホモロジーアームは、関連するゲノムに対応する。例えば、標的とされるゲノムは、第1の系統のマウスゲノムであり、ターゲティングアームは、第2の系統のマウスゲノムに対応し、第1の系統及び第2の系統は異なる。所定の実施形態では、ホモロジーアームは、同じ動物のゲノムに対応し、または同じ系統のゲノムからのものであり、例えば、標的とされるゲノムは、第1の系統のマウスゲノムであり、ターゲティングアームは、同じマウスからのまたは同じ系統からのマウスゲノムに対応する。

【0287】

ターゲティングベクターのホモロジーアームは、例えば、長さが1~5 k b（両端含む）、5~10 k b（両端含む）、5~15 k b（両端含む）、5~20 k b（両端含む）、5~25 k b（両端含む）、5~30 k b（両端含む）、5~35 k b（両端含む）、5~40 k b（両端含む）、5~45 k b（両端含む）、5~50 k b（両端含む）、5~55 k b（両端含む）、5~60 k b（両端含む）、5~65 k b（両端含む）、5~70 k b（両端含む）、5~75 k b（両端含む）、5~80 k b（両端含む）、5~85 k b（両端含む）、5~90 k b（両端含む）、5~95 k b（両端含む）、5~100 k b（両端含む）、100~200 k b（両端含む）、または200~300 k b（両端含む）を含む、対応する標的配列との相同組換え事象を促進するのに十分な任意の長さのものであり得る。いくつかの実施形態では、ターゲティングベクターのホモロジーアームは、長さが1~100 k b（両端含む）、5~100 k b（両端含む）、10~100 k b（両端含む）、15~100 k b（両端含む）、20~100 k b（両端含む）、25~100 k b（両端含む）、30~100 k b（両端含む）、35~100 k b（両端含む）、40~100 k b（両端含む）、45~100 k b（両端含む）、50~100 k b（両端含む）、55~100 k b（両端含む）、60~100 k b（両端含む）、65~100 k b（両端含む）、70~100 k b（両端含む）、75~100 k b（両端

含む)、80~100kb(両端含む)、85~100kb(両端含む)、90~100kb(両端含む)、または95~100kb(両端含む)である、対応する標的配列との相同組換え事象を促進するのに十分な長さを有する。本明細書に記載されるように、大きなターゲティングベクターは、より長いターゲティングアームを用いることができる。

#### 【0288】

標的遺伝子座の改変(例えば、免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の改変、または既に改変されたもしくは修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の改変)を容易化するために、ヌクレアーゼ物質(例えば、CRISPR/Casシステム)がターゲティングベクターと組み合わせて用いられ得る。そのようなヌクレアーゼ物質は、ターゲティングベクターと標的遺伝子座との間の相同組換えを促進し得る。ヌクレアーゼ物質がターゲティングベクターと組み合わせて用いられる場合、ヌクレアーゼ切断部位でのニックまたは二本鎖破断時に標的配列とホモロジーアームとの間の相同組換え事象の発生を促進するように、ターゲティングベクターは、ヌクレアーゼ切断部位に十分に近接して位置する5'及び3'標的配列に対応する5'及び3'ホモロジーアームを含み得る。用語「ヌクレアーゼ切断部位」は、ニックまたは二本鎖破断がヌクレアーゼ物質によってもたらされるDNA配列(例えば、Cas9切断部位)を含む。ターゲティングベクターの5'及び3'ホモロジーアームに対応する標的とされる遺伝子座内の標的配列は、認識部位でのニックまたは二本鎖破断時に5'及び3'標的配列とホモロジーアームとの間の相同組換え事象の発生を促進するような距離である場合、ヌクレアーゼ切断部位に「十分に近接して位置する」。よって、所定の実施形態では、ターゲティングベクターの5'及び/または3'ホモロジーアームに対応する標的配列は、所与の認識部位の少なくとも1ヌクレオチド内にあり、または所与の認識部位の少なくとも10ヌクレオチドから約14kbの中にある。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼ切断部位は、標的配列の少なくとも一方または両方に直接隣接する。

#### 【0289】

ターゲティングベクターのホモロジーアームに対応する標的配列とヌクレアーゼ切断部位との空間的關係は多様であり得る。例えば、標的配列は、ヌクレアーゼ切断部位に対して5'に位置し得、標的配列は、認識部位に対して3'に位置し得、または標的配列は、ヌクレアーゼ切断部位を挟み得る。

#### 【0290】

ターゲティングベクター(例えば、大きなターゲティングベクターを含む)とヌクレアーゼ物質とを組み合わせた使用は、ターゲティングベクター単独の使用と比較して、向上した標的化効率をもたらし得る。例えば、ターゲティングベクターがヌクレアーゼ物質と併せて使用される場合、ターゲティングベクターの標的化効率は、ターゲティングベクター単独の使用と比較した場合、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、またはこれらの整数から形成される範囲内、例えば、2~10倍向上し得る。

#### 【0291】

いくつかのターゲティングベクターは、「大型ターゲティングベクター」または「LTVEC」であり、これは、細胞における相同組換えを実施することが意図された他のアプローチによって典型的に使用されるものよりも大きな核酸配列に対応し、それに由来するホモロジーアームを含むターゲティングベクターを含む。LTVECは、例えば、長さが少なくとも10kbであり得、または5'ホモロジーアーム及び3'ホモロジーアームの総計は、例えば、少なくとも10kbであり得る。LTVECにはまた、細胞における相同組換えを実施することが意図された他のアプローチによって典型的に使用されるものよりも大きな核酸コンストラクトを含むターゲティングベクターが含まれる。例えば、LTVECは、伝統的なプラスミドベースのターゲティングベクターによってそれらのサイズ制限により提供することができない大きな遺伝子座の改変を可能とする。例えば、標的とされる遺伝子座は、ヌクレアーゼ物質(例えば、Casタンパク質)によって誘導されるニ

ックまたは二本鎖切断の非存在下で、慣用の方法を使用して標的とすることが不可能であり、または不正確でしかもしくは有意に低い効率を伴ってでしか標的とすることができない細胞の遺伝子座であり得る（すなわち、5'ホモロジーアーム及び3'ホモロジーアームは、その遺伝子座に対応し得る）。

#### 【0292】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、3元または4元組換え事象で互いに及び標的ゲノム遺伝子座と組み換えることが可能な2つまたは3つのL T V E Cを用いてもよい。そのような方法は、単一のL T V E Cを使用すると達成できない大きな遺伝子座の改変を可能とする。

#### 【0293】

L T V E Cの例には、細菌人工染色体（B A C）、ヒト人工染色体、または酵母人工染色体（Y A C）に由来するベクターが含まれる。L T V E Cは、線状形態または環状形態であり得る。L T V E C及びそれを作製するための方法の例は、例えば、M a c d o n a l d（2014）、米国特許第6,586,251号、第6,596,541号及び第7,105,348号；ならびに国際特許出願公開第W O 2 0 0 2 / 0 3 6 7 8 9号（これらの各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

#### 【0294】

提供される非ヒト動物を作製する方法

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製するための組成物及び方法であって、その生殖細胞系列ゲノムは、ヒトV<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>セグメントの特定の多型形態（例えば、特定のV<sub>H</sub>及び/またはJ<sub>H</sub>アレルまたはバリエーション）を含む配列をコードするヒト免疫グロブリン軽鎖を含む1つ以上のヒト免疫グロブリン軽鎖配列（例えば、ヒトV<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメント）を非ヒト免疫グロブリン軽鎖配列の代わりに含む修飾された免疫グロブリン軽鎖遺伝子座を含む、組成物及び方法が提供され、これには、非ヒトまたはヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含有する免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から構築された、ヒト可変領域及び非ヒトまたはヒト定常領域を含有する免疫グロブリン軽鎖を含む抗体を発現する非ヒト動物を作製するための組成物及び方法であって、非ヒトまたはヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子は、野生型非ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に通常現れる非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子の代わりに配置されている、組成物及び方法が含まれる。いくつかの実施形態では、内因性免疫グロブリンエンハンサー（複数可）及び/または内因性免疫グロブリン制御配列（複数可）のコントロール下でそのような抗体を発現する非ヒト動物を作製するための組成物及び方法も提供される。いくつかの実施形態では、異種免疫グロブリンエンハンサー（複数可）及び/または異種免疫グロブリン制御配列（複数可）のコントロール下でそのような抗体を発現する非ヒト動物を作製するための組成物及び方法も提供される。

#### 【0295】

本明細書に記載の方法は、非ヒトまたはヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子（例えば、げっ歯類、例えば、ネズミ科動物、例えば、ラットまたはマウス）またはヒトC<sub>H</sub>領域遺伝子の上流にヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を挿入することを含み、非ヒトまたはヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子は、野生型非ヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に通常現れる非ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域遺伝子の代わりに配置されており、これにより抗体が発現され、その抗体は、ヒト軽鎖可変ドメイン及び非ヒトC<sub>H</sub>ドメイン（例えば、げっ歯類（例えば、ネズミ科動物、例えば、ラットまたはマウス）C<sub>H</sub>ドメイン）を含有する軽鎖の存在またはヒト軽鎖可変及びヒトC<sub>H</sub>ドメインを含有する軽鎖の存在を特徴とし、B細胞の表面上及び非ヒト動物の血清中の両方で発現される。

#### 【0296】

いくつかの実施形態では、方法は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を含有する遺伝物質の、免疫グロブリン軽鎖遺伝子座（例えば、非ヒト動物（例え

10

20

30

40

50

ば、げっ歯類、例えばラットまたはマウス)の野生型、改変または修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座)への挿入を含む。いくつかの実施形態では、方法は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含有する遺伝物質の、非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)の改変または修飾された系統の免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座への挿入を含む。

【0297】

いくつかの実施形態では、方法は、単一のES細胞クローンにおける複数の挿入を含む。いくつかの実施形態では、方法は、後継ES細胞クローンにおいて行われる逐次挿入を含む。いくつかの実施形態では、方法は、修飾されたES細胞クローンにおいて行われる単一の挿入を含む。

10

【0298】

いくつかの実施形態では、方法は、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子(またはヒトC<sub>2</sub>遺伝子)の上流へのDNA挿入(複数可)を含み、これにより前記DNA挿入(複数可)は、前記非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子(またはヒトC<sub>2</sub>遺伝子)に機能可能に連結され、DNA挿入(複数可)は、V<sub>4-69</sub>、V<sub>8-61</sub>、V<sub>4-60</sub>、V<sub>6-57</sub>、V<sub>10-54</sub>、V<sub>5-52</sub>、V<sub>1-51</sub>、V<sub>9-49</sub>、V<sub>1-47</sub>、V<sub>7-46</sub>、V<sub>5-45</sub>、V<sub>1-44</sub>、V<sub>7-43</sub>、V<sub>1-40</sub>、V<sub>5-39</sub>、V<sub>5-37</sub>、V<sub>1-36</sub>、V<sub>3-27</sub>、V<sub>3-25</sub>、V<sub>2-23</sub>、V<sub>3-22</sub>、V<sub>3-21</sub>、V<sub>3-19</sub>、V<sub>2-18</sub>、V<sub>3-16</sub>、V<sub>2-14</sub>、V<sub>3-12</sub>、V<sub>2-11</sub>、V<sub>3-10</sub>、V<sub>3-9</sub>、V<sub>2-8</sub>、V<sub>4-3</sub>、及びV<sub>3-1</sub>からなる群から選択される1つまたは2つのヒトV<sub>1</sub>遺伝子セグメント、ならびにJ<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>6</sub>、及びJ<sub>7</sub>からなる群から選択される1つ以上のヒトJ<sub>1</sub>遺伝子セグメントを含み、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子(またはヒトC<sub>2</sub>遺伝子)は、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子の代わりに配置される。いくつかの実施形態では、方法は、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子(またはヒトC<sub>2</sub>遺伝子)の上流へのDNA挿入(複数可)を含み、これにより前記DNA挿入(複数可)は、前記非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子(またはヒトC<sub>2</sub>遺伝子)に機能可能に連結され、DNA挿入(複数可)は、V<sub>4-69</sub>、V<sub>8-61</sub>、V<sub>4-60</sub>、V<sub>6-57</sub>、V<sub>10-54</sub>、V<sub>5-52</sub>、V<sub>1-51</sub>、V<sub>9-49</sub>、V<sub>1-47</sub>、V<sub>7-46</sub>、V<sub>5-45</sub>、V<sub>1-44</sub>、V<sub>7-43</sub>、V<sub>1-40</sub>、V<sub>5-39</sub>、V<sub>5-37</sub>、V<sub>1-36</sub>、V<sub>3-27</sub>、V<sub>3-25</sub>、V<sub>2-23</sub>、V<sub>3-22</sub>、V<sub>3-21</sub>、V<sub>3-19</sub>、V<sub>2-18</sub>、V<sub>3-16</sub>、V<sub>2-14</sub>、V<sub>3-12</sub>、V<sub>2-11</sub>、V<sub>3-10</sub>、V<sub>3-9</sub>、V<sub>2-8</sub>、V<sub>4-3</sub>、及びV<sub>3-1</sub>からなる群から選択されるヒトV<sub>1</sub>遺伝子セグメント、及びJ<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>6</sub>、及びJ<sub>7</sub>からなる群から選択されるヒトJ<sub>1</sub>遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域を含み、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子(またはヒトC<sub>2</sub>遺伝子)は、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)C<sub>1</sub>遺伝子の代わりに位置する。

20

30

40

【0299】

適切な場合、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインをコードするヒト免疫グロブリン 軽鎖配列(すなわち、ヒトV<sub>1</sub>及びJ<sub>1</sub>遺伝子セグメントを含有する配列)は、非ヒト動物における発現に最適化されたコドンを含むように別々に改変され得る(例えば、米国特許第5,670,356号及び第5,874,304号(これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)参照)。コドン最適化配列は、修飾された配列であり、好ましくは非コドン最適化親ポリヌクレオチドによってコードされる同一のポリペプチド(または全長ポリペプチドと実質的に同じ活性を有する全長ポリペプチドの生物学的に活性な断

50



片)をコードする。いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインをコードするヒト免疫グロブリン 軽鎖配列は、特定の細胞タイプ(例えば、げっ歯類細胞、例えば、ラットまたはマウス細胞)についてコドン使用頻度を最適化するために変化した配列を別々に含み得る。例えば、本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)のゲノムに挿入される各ヌクレオチド配列のコドンは、非ヒト動物の細胞における発現のために最適化され得る。そのような配列は、コドン最適化配列として記載され得る。

#### 【0300】

ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列の挿入は、本明細書に記載される非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムの最小の変更を用い、ヒトV<sub>H</sub>ドメインを有する軽鎖を含む抗体の発現をもたらす、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインは、内因性の修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座から発現される。ノックアウト及びノックインを含む、修飾された非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)を生成するための方法は、当該技術分野で知られている(例えば、Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc., 2000(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)参照)。例えば、遺伝子修飾されたげっ歯類の生成は、1つ以上の内因性げっ歯類遺伝子(または遺伝子セグメント)の遺伝子座の破壊及び1つ以上の異種遺伝子(または遺伝子セグメントもしくはヌクレオチド配列)のげっ歯類ゲノムへの、いくつかの実施形態では、内因性げっ歯類遺伝子(または遺伝子セグメント)と同じ場所での導入を任意に含み得る。いくつかの実施形態では、ヒトV<sub>H</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列は、げっ歯類の生殖細胞系列ゲノムにおけるランダムに挿入された修飾された軽鎖導入遺伝子の非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)またはヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域遺伝子の上流に導入される。いくつかの実施形態では、ヒトV<sub>H</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列は、げっ歯類の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)またはヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域遺伝子の上流に導入され;いくつかの所定の実施形態では、内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、マウスC<sub>1</sub>遺伝子に機能可能に連結されたまたはヒトC<sub>2</sub>遺伝子に機能可能に連結されたヒト免疫グロブリン 遺伝子セグメント(例えば、ヒトV<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>)を含有するように変更され、変更され、または修飾される。

#### 【0301】

本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を構築するための例示的な方法の概略図(縮尺どおりではない)が図1~6に提供されている。特に、図1~6は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含有するヌクレオチド配列の挿入を特徴とする修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の構築のための例示的な戦略、及び対応するターゲティングベクターを示している。ターゲティングベクターは、線状化され、げっ歯類胚性幹(ES)細胞にエレクトロポレーションされて、生殖細胞系列ゲノムが、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むげっ歯類が作製され得る。以下の実施例のセクションに記載されているように、ターゲティングベクターのエレクトロポレーションで用いられたげっ歯類ES細胞は、米国特許第10,143,186号(それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)に先行記載されている修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含有していた。陽性げっ歯類ES細胞クローンは、当該技術分野で知られているスクリーニング方法を使用して確認される。任意の残存する選択カセットは、所望に応じてリコンビナーゼ媒介欠失を介して欠失され得る。

#### 【0302】

代替的には、マウスC<sub>1</sub>遺伝子の代わりにヒトC<sub>2</sub>遺伝子がターゲティングベクターにおいて用いられ得る。ターゲティングベクターは、ヒトC<sub>2</sub>遺伝子(例えば、C<sub>2</sub>)をコードする配列がターゲティングベクターに修飾導入される場合を除き、上記と同様の手法で(または以下の実施例で)構築され得る。そのようなアプローチを使用することによ

10

20

30

40

50

りヒト抗体治療剤の開発が可能になるが、その理由は、軽鎖の可変及び定常領域をコードするDNAと一緒に単離され、それにより完全ヒト抗体の調製のためにヒト軽鎖定常領域を連結する任意の後続のクローニング工程を排除できるからである。

#### 【0303】

本明細書に記載される修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を構築するためのターゲティングベクターは、非ヒト細胞（例えば、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）胚性幹細胞）の生殖細胞系列ゲノムに組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるターゲティングベクターは、1つ以上の免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子と機能可能に連結されたヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>ゲノムDNA（例えば、複数のヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含有する）をさらに含有する非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞の生殖細胞系列ゲノムにおける野生型免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に組み込まれる（例えば、Macdonald（2014）、米国特許第6,596,541号、第8,642,835号、第8,697,940号及び第8,791,323号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるターゲティングベクターは、1つ以上の免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子と機能可能に連結されたヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>ゲノムDNA（例えば、複数のヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含有する）をさらに含有する非ヒト細胞の生殖細胞系列ゲノムにおける改変または修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に組み込まれる（例えば、Macdonald（2014）、米国特許第6,596,541号、第8,642,835号、第8,697,940号、第8,791,323号、第9,006,511号、第9,012,717号、第9,029,628号、第9,035,128号、第9,066,502号、第9,150,662号及び第9,163,092号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）。

#### 【0304】

ターゲティングベクターは、エレクトロポレーションによって非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、マウスまたはラット）胚性幹細胞に導入され、これによりターゲティングベクターに含有される配列は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン及び非ヒトまたはヒト軽鎖定常（C<sub>H</sub> またはC<sub>L</sub>）ドメインを含む軽鎖を有する抗体を発現する非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）の能力をもたらし、その軽鎖は、修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座から発現される。本明細書に記載されるように、非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムにおいて、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（例えば、内因性げっ歯類C<sub>H</sub> 遺伝子の代わりにげっ歯類またはヒトC<sub>H</sub> 遺伝子に機能可能に連結されたヒト免疫グロブリン 軽鎖配列（すなわち、再編成されたヒト 軽鎖可変領域）を含有する内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座）が生成された遺伝子修飾された非ヒト動物が生成される。ヒトV<sub>H</sub> ドメイン及び非ヒトまたはヒトC<sub>H</sub> ドメインを有する軽鎖を特徴とする抗体が、非ヒト動物B細胞の表面上及び前記非ヒト動物の血清中で発現される。本明細書に記載される非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座が、ターゲティングベクターによって標的とされない場合、修飾された免疫グロブリン 軽鎖導入遺伝子は、好ましくは、内因性非ヒト動物免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座以外の場所で挿入される（例えば、ランダムに挿入された導入遺伝子）。

#### 【0305】

上述した非ヒト動物における修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の生成は、ヒトV<sub>H</sub> ドメイン及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）またはヒトC<sub>H</sub> ドメインを有するそのような修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座から発現される免疫グロブリン 軽鎖を含む抗体を生成する修飾された非ヒト動物システムを提供する。免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された複数のヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の存在と共に利用すると、ヒト抗体ベースの治療剤の開発のための抗体及び抗体成分を生成する修飾された非ヒト

10

20

30

40

50

動物系統が作製される。よって、単一の修飾された非ヒト動物系統は、ヒト疾患を処置するための新たな抗体ベースの薬剤の開発のためにヒトV<sub>H</sub>ドメインを利用するための代替的な*in vivo*システムを提供するための能力を有することが判明した。

【0306】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）胚性幹（ES）細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入することを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法は、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）C<sub>H</sub>遺伝子セグメントを、非ヒトES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入することを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、上述した非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）ES細胞を使用して非ヒト動物を生成することを含む。

10

【0307】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を、非ヒトES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入することを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物を作製する方法は、非ヒトC<sub>H</sub>遺伝子セグメントを、非ヒトES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入することを含む。

20

【0308】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、（a）ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を、非ヒトES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入する工程；及び（b）非ヒトC<sub>H</sub>遺伝子セグメントを、非ヒトES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入する工程を含む。

30

【0309】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、（a）ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域を、非ヒト胚性幹（ES）細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入する工程；（b）非ヒトC<sub>H</sub>遺伝子セグメントを、非ヒトES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に導入する工程；及び（c）工程（a）及び（b）において生成された非ヒトES細胞を使用して非ヒト動物を生成する工程を含む。

【0310】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを、非ヒトES細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に導入することを含む。

40

【0311】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、（d）1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1

50

つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを、非ヒト E<sub>S</sub> 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に導入する工程をさらに含む。

【0312】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を、非ヒト C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むように修飾することを含み、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含み、これにより遺伝子改変された非ヒト動物の B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0313】

いくつかの実施形態では、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法は、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）の生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を、1 つ以上の非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含むように修飾することを含み、これにより遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）の B 細胞によって発現されるすべての重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む。

20

【0314】

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法のいくつかの実施形態では、DNA 断片は、生殖細胞系列ゲノムが 1 つ以上の修飾された免疫グロブリン遺伝子座（例えば、免疫グロブリン重鎖、免疫グロブリン 軽鎖、免疫グロブリン 軽鎖、及びそれらの組み合わせ）を含む非ヒト胚性幹細胞に導入される。いくつかの所定の実施形態では、修飾された免疫グロブリン遺伝子座は、内因性の修飾された免疫グロブリン遺伝子座である。

30

【0315】

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法のいくつかの実施形態では、DNA 断片は、免疫グロブリン 軽鎖配列及び/または免疫グロブリン 軽鎖配列を含む修飾された配列を含む。非ヒト動物を作製する方法のいくつかの実施形態では、DNA 断片は、免疫グロブリン 軽鎖配列及び/または免疫グロブリン 軽鎖配列を非免疫グロブリン配列（例えば、組換えシグナル配列、耐性遺伝子、及びそれらの組み合わせ）と共に含む修飾された配列を含む。

【0316】

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法のいくつかの実施形態では、DNA 断片は、非ヒト胚性幹細胞であって、そのゲノムは、1 つ以上のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上のヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント及び 1 つ以上のヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入を含む内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、ヒト V<sub>H</sub>、D<sub>H</sub> 及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結されている、非ヒト胚性幹細胞に導入される。いくつかの実施形態では、E<sub>S</sub> 細胞は、1 つ以上のげっ歯類 A<sub>D</sub>A<sub>M</sub>6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

40

【0317】

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法のいくつかの実施形態では、DNA 断片は、非ヒト胚性幹細胞であって、その生殖細胞系列ゲノ

50

ムは、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域の挿入を含む内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、ヒトV 及びJ 遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン または 軽鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結されている、非ヒト胚性幹細胞に導入される。

【0318】

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法のいくつかの実施形態では、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域）を含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むように非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムを改変することは、非ヒト胚性幹細胞において行われ、そのゲノムは、1つ以上のヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメント及び1つ以上のヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入を含む内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、ヒトV<sub>H</sub>、D<sub>H</sub> 及びJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結されている。

10

【0319】

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法のいくつかの実施形態では、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むように非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムを改変することは、非ヒト胚性幹細胞において行われ、その生殖細胞系列ゲノムは、1つ以上のヒトV 及び1つ以上のヒトJ 遺伝子セグメントの挿入を含む内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、ヒトV 及びJ 遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結されている。非ヒト動物を作製する方法のいくつかの実施形態では、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むように非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムを改変することは、非ヒト胚性幹細胞において行われ、その生殖細胞系列ゲノムは、1つ以上のヒトV 及び1つ以上のヒトJ 遺伝子セグメント、ならびに前記1つ以上のヒトV 遺伝子セグメントと前記1つ以上のヒトJ 遺伝子セグメントとの間に位置し、配置されまたは配されたヒト免疫グロブリン 軽鎖配列の挿入を含む内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、ヒトV 及びJ 遺伝子セグメントは、非ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結されている。

20

【0320】

非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を作製する方法のいくつかの実施形態では、1つ以上のヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメント及び1つ以上のヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントの挿入は、内因性ヒト免疫グロブリン遺伝子座においてヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメントに隣接して天然に現れるヒトノンコーディングDNA、ヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメントに隣接して天然に現れるヒトノンコーディングDNA 及びヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントに隣接して天然に現れるヒトノンコーディングDNA を含む。

30

【0321】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法から作製された、生成された、産生された、得られたまたは得ることが可能な非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）が提供される。

40

【0322】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）のゲノムは、Macdonald (2014)、米国特許第6,596,541号、第8,642,835号、第8,697,940号及び第8,791,323号（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域をさらに含む。代替的には、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、例えば、VELOCE IMMUNE（登録商標）系統などの異なる改変系統の胚性幹細胞に修飾導入され得る（例えば、Macdonald (2014)、米国特許第6,596,541号及び/または第8,642,835号（それらの全体が参照

50

により本明細書に組み込まれる)参照)。本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座のホモ接合性は、その後、交配によって達成され得る。代替的には、ランダムに挿入された修飾された免疫グロブリン 軽鎖導入遺伝子(上述している)の場合、非ヒト動物系統は、とりわけ、導入遺伝子からのヒトV<sub>H</sub>ドメインの発現に基づいて選択され得る。いくつかの実施形態では、VELOCIMMUNE(登録商標)マウスは、VELOCIMMUNE(登録商標)1(VI-1)マウスであり得、これは、18個のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべて、及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべてを含む。VI-1マウスはまた、16個のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべてを含み得る。いくつかの実施形態では、VELOCIMMUNE(登録商標)マウスは、VELOCIMMUNE(登録商標)2(VI-2)マウスであり得、これは、39個のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべて、及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべてを含む。VI-2マウスはまた、30個のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべてを含み得る。いくつかの実施形態では、VELOCIMMUNE(登録商標)マウスは、VELOCIMMUNE(登録商標)3(VI-3)マウスであり得、これは、80個のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべて、及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべてを含む。VI-3マウスはまた、40個のヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのすべてを含み得る。

10

#### 【0323】

代替的に、及び/または追加的に、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)の生殖細胞系列ゲノムは、欠失された、不活性化された、機能的にサイレンシングされたまたはそうでなければ非機能性の内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座をさらに含む。遺伝子または遺伝子座を欠失させるまたは非機能性とするのための遺伝子改変は、本明細書に記載の方法及び/または当該技術分野で知られている方法を使用して達成され得る。

20

#### 【0324】

遺伝子修飾された創始非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)は、その生殖細胞系列ゲノムにおける本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の存在及び/または非ヒト動物の組織または細胞におけるヒト 軽鎖可変ドメイン及び非ヒトまたはヒトC<sub>H</sub>ドメインを有する抗体の発現に基づいて同定され得る。次いで遺伝子修飾された創始非ヒト動物は、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を保有するさらなる非ヒト動物を交配し、それにより限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の1つ以上のコピーをそれぞれ保有する非ヒト動物のコホートを作製するために使用され得る。その上、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を保有する遺伝子修飾された非ヒト動物は、他の導入遺伝子(例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子)または所望に応じて修飾された免疫グロブリン遺伝子座を保有する他の遺伝子修飾された非ヒト動物とさらに交配され得る。

30

40

#### 【0325】

遺伝子修飾された非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)はまた、導入遺伝子または組み込まれた配列(複数可)の制御された、仕向けられた、誘導性の及び/または細胞タイプ特異的な発現を可能とする選択されたシステムを含有するように生成され得る。例えば、本明細書に記載される非ヒト動物は、条件付きで発現される抗体のヒト 軽鎖可変ドメインをコードする1つ以上の配列を含有するように修飾され得る(例えば、Rajewski, K. et al., 1996, J. Clin. Invest. 98(3): 600-3(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)でレビューされている)。例示的なシステムには、バクテリオファージP1のCre/loxPリコンビナーゼシステム(例えば、Laksó, M. et al., 1992, Proc.

50

Nat l . Acad . Sci . U . S . A . 8 9 : 6 2 3 2 - 6 ( その全体が参照により本明細書に組み込まれる ) 参照 ) 及び S . cerevisiae の FLP / FRT リコンビナーゼシステム ( O ' Gorman , S . et al , 1991 , Science 251 : 1351 - 5 ( その全体が参照により本明細書に組み込まれる ) ) が含まれる。そのような動物は、例えば、2つの遺伝子修飾された動物、すなわち、一方は選択された改変を含む導入遺伝子 ( 例えば、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座 ) を含有するもの及び他方はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子 ( 例えば、Cre リコンビナーゼ ) を含有するものを交配することによって「二重の」遺伝子修飾された動物の構築を介して提供され得る。

【0326】

10

本明細書に記載される非ヒト動物 ( 例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス ) は、しばしば非ヒト動物の意図された使用に応じて、さらなるヒト、ヒト化またはそうでなければ修飾された遺伝子を含むように、上述したように、または当該技術分野で知られている方法を使用して調製され得る。そのようなヒト、ヒト化またはそうでなければ修飾された遺伝子の遺伝物質は、上述した遺伝子改変または変更を有する細胞 ( 例えば、胚性幹細胞 ) のゲノムのさらなる変更を介してまたは所望に応じて他の遺伝子改変されたまたは修飾されたシステムを用いた当該技術分野で知られている交配技術を介して導入され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ヒト重鎖遺伝子セグメントさらに含むように調製される ( 例えば、Murphy , A . J . et al . , ( 2014 ) Proc . Nat l . Acad . Sci . U . S . A . 111 ( 14 ) : 5153 - 5158 ; Macdonald ( 2014 )、米国特許第 6 , 596 , 541 号、第 8 , 642 , 835 号、第 8 , 697 , 940 号及び第 8 , 791 , 323 号 ; 米国特許第 8 , 791 , 323 号 ; ならびに米国特許出願公開第 2013 / 0096287 A 1 号 ( これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる ) 参照 ) 。

20

【0327】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物 ( 例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス ) は、本明細書に記載のターゲティングベクターを、改変または修飾されたシステムからの細胞に導入することによって調製され得る。例えば、本明細書に記載されるターゲティングベクターは、VELOCIIMUNE ( 登録商標 ) マウスに導入され得る。VELOCIIMUNE ( 登録商標 ) マウスは、完全ヒト可変ドメイン及びマウス定常ドメインを有する抗体を発現する。別の例では、本明細書に記載されるターゲティングベクターは、米国特許第 9 , 006 , 511 号、第 9 , 012 , 717 号、第 9 , 029 , 628 号、第 9 , 035 , 128 号、第 9 , 066 , 502 号、第 9 , 150 , 662 号及び第 9 , 163 , 092 号 ( それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる ) のいずれか 1 つに記載される修飾されたマウスに導入され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子 ( 可変及び / または定常領域遺伝子 ) をさらに含むように調製される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座及び異種の種 ( 例えば、ヒト ) からの遺伝物質を含み、遺伝物質は、1つ以上のヒト重鎖可変領域を全体としてまたは部分的にコードする。

30

40

【0328】

例えば、本明細書に記載されるように、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む非ヒト動物 ( 例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス ) は、( 例えば、交雑または複数遺伝子標的化ストラテジーを介して ) Murphy , A . J . et al . , ( 2014 ) Proc . Nat l . Acad . Sci . U . S . A . 111 ( 14 ) : 5153 - 8 ; Macdonald ( 2014 ) ; 米国特許第 6 , 596 , 541 号、第 8 , 642 , 835 号、第 8 , 697 , 940 号及び第 8 , 791 , 323 号 ( これらのすべては、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる ) に記載される 1 つ以上の改変をさらに含む得る

50

。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む非ヒト動物は、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座（例えば、Macdonald（2014）、米国特許第6,596,541号、第8,642,835号、第8,697,940号及び/または第8,791,323号（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）を含む非ヒト動物と交配される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む非ヒト動物は、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座（例えば、Macdonald（2014）、米国特許第6,596,541号、第8,642,835号、第8,697,940号及び/または第8,791,323号（参照により本明細書に組み込まれる）参照）及び不活性化内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座（例えば、米国特許第9,006,511号、第9,012,717号、第9,029,628号、第9,035,128号、第9,066,502号、第9,150,662号及び第9,163,092号（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）参照）を含む非ヒト動物と交配される。

10

20

30

40

50

### 【0329】

マウス（すなわち、ヒト 軽鎖可変ドメイン及びマウスまたはヒトC またはC ドメインを含有する抗体が発現するように、マウスまたはヒトC またはC 遺伝子と機能可能に連結された限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーの存在を特徴とする修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を有するマウス）における修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座の構築を記載する実施形態が、本明細書で広範に論述されているが、修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む他の非ヒト動物も提供される。そのような非ヒト動物には、例えば、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ（例えば、ウシ、雄牛、スイギュウ）、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）などを含む、本明細書に記載される抗体を発現するように遺伝子改変され得るもののいずれかが含まれる。例えば、好適な遺伝子改変可能なES細胞が容易に利用可能ではない非ヒト動物の場合、遺伝子改変を含む非ヒト動物を作製するために他の方法が用いられる。そのような方法は、例えば、非ES細胞ゲノム（例えば、線維芽細胞または人工多能性細胞）を改変すること及び体細胞核移植（SCNT）を用いて遺伝子改変されたゲノムを好適な細胞、例えば、除核卵母細胞に移植すること、ならびに胚を形成するための好適な条件下で改変された細胞（例えば、改変された卵母細胞）を非ヒト動物に懐胎させることを含む。

### 【0330】

非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノム（例えば、ブタ、ウシ、げっ歯類、ニワトリなどのゲノム）を改変するための方法は、例えば、ジnkフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはCasタンパク質（すなわち、CRISPR/Casシステム）を用いて、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含めることを含む。非ヒト動物の生殖細胞系列ゲノムを改変するための方法のためのガイダンスは、例えば、米国特許第9,738,897号、ならびに米国特許出願公開第US2016/0145646号（2016年5月26日に公開）及び第US2016/0177339号（2016年6月23日に公開）（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で見ることができる。

### 【0331】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、例えば、DipodidaeまたはMuridae上科の小型哺乳動物である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変された動物は、げっ歯類である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるげっ歯類は、マウス、ラット、及びハムスターから選択される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるげっ歯類は、Muridae上科から選択



される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変された動物は、*Calomyscidae* (例えば、マウス様ハムスター)、*Cricetidae* (例えば、ハムスター、ニューワールドラット及びマウス、ハタネズミ)、*Muridae* (純種のマウス及びラット、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミラット)、*Nesomyidae* (キノボリマウス、ロックマウス、オジロラット、マダガスカルラット及びマウス)、*Platacanthomyidae* (例えば、トゲヤマネ)、及び *Spalacidae* (例えば、メクラネズミ、タケネズミ、及びモグラネズミ) から選択される科からのものである。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたげっ歯類は、純種のマウスまたはラット (*Muridae* 科)、アレチネズミ、トゲヤマネ、及びタテガミラットから選択される。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたマウスは、*Muridae* 科のメンバーからのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、げっ歯類である。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載されるげっ歯類は、マウス及びラットから選択される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、マウスである。

10

#### 【0332】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、及びC57BL/Olaから選択されるC57BL系統のマウスであるげっ歯類である。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載されるマウスは、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1 (例えば、129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129/SvJae、129S6 (129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2である系統からなる群から選択される129系統である (例えば、Festing et al., 1999, *Mammalian Genome* 10: 836; Auerbach, W. et al., 2000, *Biotechniques* 29(5): 1024-1028, 1030, 1032 (これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる) 参照)。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子改変されたマウスは、前述した129系統及び前述したC57BL/6系統のミックスである。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載されるマウスは、前述した129系統のミックス、または前述したBL/6系統のミックスである。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載されるミックスの129系統は、129S6 (129/SvEvTac) 系統である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるマウスは、BALB系統、例えば、BALB/c系統である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるマウスは、BALB系統及び別の前述した系統のミックスである。

20

30

#### 【0333】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、ラットである。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載されるラットは、Wistarラット、LEA系統、Sprague Dawley系統、Fischer系統、F344、F6、及びDark Agoutiから選択される。いくつかの所定の実施形態では、本明細書に記載されるラット系統は、Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6、及びDark Agoutiからなる群から選択される2つ以上の系統のミックスである。

40

#### 【0334】

ラット多能性及び/または分化全能性細胞は、例えば、ACIラット系統 (August及びCopenhagen系統に元々由来する近交系統)、Dark Agouti (DA) ラット系統、Wistarラット系統、LEAラット系統、Sprague Dawley (SD) ラット系統、またはFischerラット系統、例えば、Fisher F344またはFisher F6を含む任意のラット系統からのものであり得る。ラッ

50

ト多能性及び/または分化全能性細胞はまた、上記の2つ以上の系統のミックスに由来する系統から得られ得る。例えば、ラット多能性及び/または分化全能性細胞は、DA系統またはACI系統からのものであり得る。ACIラット系統は、白色の腹部及び肢ならびにRT1av1ハロタイプを伴って黒色アグーチを有するものとして特性化される。そのような系統は、Harlan Laboratoriesを含む多様な供給源から利用可能である。ACIラットからのラットES細胞株の例は、ACI.G1ラットES細胞である。DAラット系統は、アグーチコート及びRT1av1ハロタイプを有するものとして特性化される。そのようなラットは、Charles River及びHarlan Laboratoriesを含む多様な供給源から利用可能である。DAラットからのラットES細胞株の例は、DA.2BラットES細胞株及びDA.2CラットES細胞株である。いくつかの実施形態では、ラット多能性及び/または分化全能性細胞は、近交系ラット系統からのものである(例えば、2014年8月14日に公開された米国特許出願公開第2014-0235933A1号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)参照)。本明細書に記載される方法及び/またはコンストラクトを使用してラットゲノムにおいて(例えば、ラットES細胞において)改変を生成するためのガイダンスは、例えば、米国特許出願公開第2014-0310828号及び第2017-0204430号(これらの両方は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)で見ることができる。

10

#### 【0335】

提供される非ヒト動物、細胞または組織を使用する方法

20

本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞及び非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織は、抗体の開発のためのプラットフォームとして使用され得る。特に、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織は、限られたヒト軽鎖レパートリーから発現されるヒト軽鎖可変ドメインと対合するヒト重鎖可変ドメイン、及びそのようなヒト重鎖可変ドメインを含む抗体の生成及び同定のための特に有利なプラットフォームを表す。そのようなヒト重鎖可変ドメインは、例えば、二重特異的抗原結合タンパク質の生成において使用され得る。

#### 【0336】

したがって、本開示は、本明細書に記載の非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞及び非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織が抗体を作製する方法において使用され得ることを提供する。本開示に従って作製される抗体には、例えば、ヒト抗体、キメラ抗体、逆キメラ抗体、これらの抗体のいずれかの断片、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。

30

#### 【0337】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞及び非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織は、ヒト抗体(例えば、完全ヒト抗体)を作製するために用いられ得、ヒト抗体は、本明細書に記載される非ヒト動物の細胞の遺伝物質によってコードされる核酸配列に由来する可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、遺伝子改変されたげっ歯類、例えば、遺伝子改変されたラットまたはマウス)は、非ヒト動物が対象となる抗原に対する免疫反応を起こすのに十分な条件下及び時間にて、前記対象となる抗原で免疫される。抗体及び/または抗体配列(すなわち、抗体の一部、例えば、可変領域配列をコードする配列)は、免疫された非ヒト動物(または1つ以上の細胞、例えば、1つ以上のB細胞)から単離及び/または同定され、例えば、親和性、特異性、エピトープマッピング、リガンド-受容体相互作用を遮断するための能力、阻害受容体活性化などを測定する様々なアッセイを使用して特性化される。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織によって生成される抗体は、非ヒト動物、

40

50

非ヒト細胞または非ヒト組織から単離される1つ以上のヒト可変領域ヌクレオチド配列に由来する1つ以上のヒト可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗薬物抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）が、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織において作られ得る。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織によって生成される抗体は、ヒト軽鎖可変ドメイン及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）軽鎖定常ドメイン及び/またはヒト重鎖可変ドメイン及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）重鎖定常ドメインを含む逆キメラ抗体である。

【0338】

様々な実施形態では、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織によって生成される抗体は、ヒト可変ドメイン及び非ヒト定常ドメインを有する重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織によって生成される抗体は、ヒト軽鎖可変ドメイン及び非ヒト（例えば、げっ歯類）軽鎖定常ドメインを含む逆キメラ抗体である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織によって生成される抗体は、ヒト重鎖可変ドメイン及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）重鎖定常ドメインを含む逆キメラ抗体である。

【0339】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を対象となる抗原で免疫することを含む。いくつかの実施形態では、提供される方法は、前記非ヒト動物からリンパ球（例えば、クローン選択されたリンパ球）を同定することを含み、そのリンパ球は、対象となる抗原に結合する（例えば、特異的に結合する）抗体を発現する。いくつかの実施形態では、リンパ球は、B細胞である。いくつかの実施形態では、ヒト重鎖可変領域配列及び/またはヒトラムダ軽鎖可変領域配列は、リンパ球（例えば、B細胞）から得られ、及び/または同定される（例えば、ジェノタイピングされる、例えば、シーケンシングされる）。いくつかの実施形態では、ヒト重鎖可変ドメイン及び/またはヒトラムダ軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、リンパ球（例えば、B細胞）から得られ、及び/または同定される（例えば、シーケンシングされる）。いくつかの実施形態では、非ヒト動物のB細胞からのヒト重鎖可変領域配列及び/またはヒトラムダ軽鎖可変領域配列は、宿主細胞において発現される。いくつかの実施形態では、非ヒト動物のB細胞からのヒト重鎖可変領域配列及び/またはヒトラムダ軽鎖可変領域配列のバリエーションは、宿主細胞において発現される。いくつかの実施形態では、バリエーションは、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、バリエーションを含む抗体の薬物動態及び/または薬力学的特性を改善し得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の変異は、バリエーションを含む抗体の特異性、親和性、及び/または免疫原性を改善し得る。

【0340】

いくつかの実施形態では、ヒト抗体を作製する方法は、本明細書に記載の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織からのヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及び/またはヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を同定すること；ならびに(i)ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列と接合またはライゲーションし、それにより完全ヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヒト免疫グロブリン重鎖配列を形成すること、及び/または(ii)ヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列と接合またはライゲーションし、それにより完全ヒト免疫グロブリン軽鎖をコードするヒト免疫グロブリン軽鎖配列を形成することを含む。所定の実施形態では、ヒト免疫グロブリ

10

20

30

40

50

ン重鎖配列、及びヒト免疫グロブリン 軽鎖配列は、完全ヒト免疫グロブリン重鎖及び完全ヒト免疫グロブリン 軽鎖が発現され、ヒト抗体を形成するように、細胞（例えば、宿主細胞、哺乳動物細胞）において発現される。いくつかの実施形態では、ヒト抗体は、細胞または細胞を含む培地から単離される。

#### 【0341】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、二重特異的抗体を作製する方法に用いられ得、その方法は、（a）非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）定常領域に機能可能に連結された単一の再編成されたヒトIg 軽鎖可変領域を含む本明細書に記載される第1の遺伝子改変された非ヒト動物を第1の抗原の第1のエピトープと接触させること、（b）非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）定常領域（例えば、第1の非ヒト動物に存在するものと同じ単一の再編成されたヒトIg 軽鎖可変領域）に機能可能に連結された単一の再編成されたヒトIg 軽鎖可変領域を含む本明細書に記載される第2の遺伝子改変された非ヒト動物を第2の抗原の第2のエピトープと接触させること、（c）第1の遺伝子改変された非ヒト動物から第1の抗原の第1のエピトープに特異的な第1の抗体を発現するB細胞を単離し、第1の抗体の第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；（d）第2の遺伝子改変された非ヒト動物から第2の抗原の第2のエピトープに特異的な第2の抗体を発現するB細胞を単離し、第2の抗体の第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；（e）第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、第1のヒト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結させて第1のヒト重鎖をコードする第1のヌクレオチド配列を生成すること；（f）第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、第2のヒト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列に機能可能に連結させて第2のヒト重鎖をコードする第2のヌクレオチド配列を生成すること；（g）哺乳動物細胞において、（i）第1のヌクレオチド配列；（ii）第2のヌクレオチド配列；及び（iii）ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域に機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む第3のヌクレオチド配列を発現させることを含む。

#### 【0342】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞は、二重特異的抗体を作製する方法のために用いられ得、その方法は、（a）非ヒト細胞において、（i）第1のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第1のヌクレオチド配列；（ii）第2のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第2のヌクレオチド配列；及び（iii）ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域に機能可能に連結されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む第3のヌクレオチド配列を発現させることを含み、第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第1の抗原の第1のエピトープで免疫された第1の遺伝子改変された非ヒト動物において同定された第1のヒト重鎖可変ドメインをコードし、第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第2の抗原の第2のエピトープで免疫された第2の遺伝子改変された非ヒト動物において同定された第2のヒト重鎖可変ドメインをコードし、第1及び第2の遺伝子改変された非ヒト動物はそれぞれ、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）定常領域に機能可能に連結された単一の再編成されたヒトIg 軽鎖可変領域を含む、本明細書に記載される遺伝子改変された非ヒト動物であり、第3のヌクレオチドのヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンである。同定されたアミノ酸または核酸は、本明細書で同定される可変ドメインを含有する抗体または抗原結合タンパク質を作製するために使用される。

#### 【0343】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）

、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、例えば、エピトープまたは抗原に対する抗体の一部としての、本明細書に記載の非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織によって生成されるヒト可変ドメインをコードするヌクレオチドまたは核酸配列を同定するために用いられ得る。

【0344】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、例えば、エピトープまたは抗原に対する抗体の一部としての、本明細書に記載の非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織によって生成されるヒト可変ドメインのアミノ酸配列を同定するために用いられ得る。

10

【0345】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、多様なアッセイに有用なヒト抗体を生成するための改善された *in vivo* システム及び生物学的物質源（例えば、細胞、ヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質複合体）を提供する。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織は、対象となるポリペプチド（例えば、膜貫通または分泌ポリペプチド）を標的とし、及び/または前記対象となるポリペプチドに関連する1つ以上の活性を調節し、及び/または前記対象となるポリペプチドと他の結合パートナー（例えば、リガンドまたは受容体ポリペプチド）との相互作用を調節する治療剤を開発するために使用される。例えば、様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織は、1つ以上の受容体ポリペプチドを標的とし、受容体ポリペプチド活性を調節し、及び/または他の結合パートナーとの受容体ポリペプチド相互作用を調節する治療剤を開発するために使用される。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織は、対象となる1つ以上のポリペプチドに結合する候補治療剤（例えば、抗体、*scFvs* など）を同定、スクリーニング及び/または開発するために使用される。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織は、対象となる1つ以上のポリペプチドの活性を阻害し、または対象となる1つ以上の受容体ポリペプチドの活性を阻害する候補治療剤（例えば、抗体、*scFvs* など）をスクリーニング及び開発するために使用される。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織は、対象となる1つ以上のポリペプチドのアンタゴニスト及び/またはアゴニストの結合プロファイルを決定するために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織は、対象となる1つ以上のポリペプチドに結合する1つ以上の候補治療抗体のエピトープ（複数可）を決定するために使用される。

20

30

【0346】

様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、1つ以上のヒト抗体候補の薬物動態プロファイルを決定するために使用される。様々な実施形態では、本明細書に記載される1つ以上の非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織ならびに1つ以上の対照または参照非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織はそれぞれ、1つ以上のヒト抗体候補に様々な用量（例えば、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、7.5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、または50 mg/kg またはそれ以上）で曝露される。候補治療抗体は、非経口及び非経口以外の投与経路を含む任意の所望の投与経路を介して本明細書に記載される非ヒト動物に投薬され得る。非経口経路には、例えば、静脈内、動脈内、門脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、髄腔内、鞘内

40

50

、側脳室内、頭蓋内、胸腔内または他の注射経路が含まれる。非経口以外の経路には、例えば、経口、経鼻、経皮、経肺、経直腸、口腔粘膜、腔、眼が含まれる。投与はまた、連続注入、局所投与、インプラント（ゲル、膜など）からの持続放出、及び/または静脈内注射によるものであり得る。様々な時点（例えば、0時間、6時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、もしくは最大30日、またはそれ以上）で、非ヒト動物（ヒト化及び対照）から血液が単離される。総IgG、抗治療抗体反応、凝集などを含むがこれらに限定されない、投与された候補治療抗体の薬物動態プロファイルを決定するために、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞及び非ヒト組織から得られたサンプルを使用して様々なアッセイが実施され得る。

#### 【0347】

様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、対象となるポリペプチドの活性を遮断または調節する治療効果及び細胞性変化の結果としての遺伝子発現に対する効果または、受容体ポリペプチドの観点からは、非ヒト動物、非ヒト細胞または非ヒト組織における細胞の表面上の受容体ポリペプチドの密度を測定するために使用される。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物（またはそれから単離された細胞）、非ヒト細胞または非ヒト組織は、対象となるポリペプチドに結合する候補治療剤に曝露され、それに続く期間の後、前記対象となるポリペプチドに関連する特定の細胞プロセス、例えば、リガンド-受容体相互作用またはシグナル伝達に対する効果について分析される。

#### 【0348】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、ヒト抗体可変領域を発現し、よって、細胞、細胞株、及び細胞培養物は、結合及び機能性アッセイにおいて使用するためのヒト抗体可変領域源として機能するために、例えば、特にアンタゴニストまたはアゴニストが、対象となるヒト抗原に特異的であり、またはリガンド-受容体相互作用（結合）において機能するエピトープに特異的である場合に、アンタゴニストまたはアゴニストの結合または機能についてアッセイするために生成され得る。様々な実施形態では、候補治療抗体または断片によって結合されるエピトープ（例えば、VH、VL、CH1及びCLドメインからなる一価断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片；(iii) VH及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVH及びVLドメインからなるFv断片、(v) 単一可変ドメインを含むdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341 : 544-546)；ならびに(vi) 単離された相補性決定領域(CDR))が、本明細書に記載される非ヒト動物から単離された細胞を使用して決定され得る。

#### 【0349】

提供される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）からの細胞は、場当たりに単離及び使用され得、または多くの世代のために培養下で維持され得る。様々な実施形態では、提供される非ヒト動物からの細胞は、不死化（例えば、ウイルスの使用を介して）され、培養下で無限に（例えば、連続培養で）維持される。

#### 【0350】

いくつかの実施形態では、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞は、非ヒトリンパ球である。いくつかの実施形態では、非ヒト細胞は、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球及びT細胞から選択される。いくつかの実施形態では、非ヒト細胞は、未熟B細胞、成熟ナイーブB細胞、活性化B細胞、メモリーB細胞、及び/または血漿細胞である。

#### 【0351】

いくつかの実施形態では、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞は、非ヒト胚性幹(ES)細胞である。いくつかの実施形態では、非ヒトES細胞は

10

20

30

40

50

、げっ歯類 E S 細胞である。いくつかの所定の実施形態では、げっ歯類 E S 細胞は、マウス E S 細胞であり、129 系統、C57BL 系統、BALB/c またはそれらの混合系からのものである。いくつかの所定の実施形態では、げっ歯類胚性幹細胞は、マウス胚性幹細胞であり、129 及び C57BL 系統の混合系である。いくつかの所定の実施形態では、げっ歯類胚性幹細胞は、マウス胚性幹細胞であり、129、C57BL 及び BALB/c 系統の混合系である。

【0352】

いくつかの実施形態では、非ヒト動物を作製するための本明細書に記載される非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）E S 細胞の使用が提供される。いくつかの所定の実施形態では、非ヒト E S 細胞は、マウス E S 細胞であり、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レポーターを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むマウスを作製するために使用される。いくつかの所定の実施形態では、非ヒト E S 細胞は、ラット E S 細胞であり、本明細書に記載される限られたヒト 軽鎖可変領域レポーターを含む修飾された免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含むラットを作製するために使用される。

10

【0353】

いくつかの実施形態では、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、脂肪、膀胱、脳、乳房、骨髄、眼、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、筋肉、脾臓、血漿、血清、皮膚、脾臓、胃、胸腺、精巣、卵子、及びそれらの組み合わせから選択される。

20

【0354】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される単離された非ヒト細胞または組織から作製され、生成され、産生され、または得られた不死化細胞が提供される。

【0355】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト E S 細胞から作製され、生成され、産生され、または得られた非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）胚が提供される。いくつかの所定の実施形態では、非ヒト胚は、げっ歯類胚；いくつかの実施形態では、マウス胚；いくつかの実施形態では、ラット胚である。

【0356】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、対象となるポリペプチドに結合するヒト抗体可変領域のバリエーション（例えば、ヒト V ドメインバリエーション）の生成のための *in vivo* システムを提供する。そのようなバリエーションは、対象となるポリペプチドの 2 つ以上のバリエーションによって共有される共通のエピトープに対する所望の機能性、特異性、低い交差反応性を有するヒト抗体可変領域を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、所望のまたは改善された機能性についてスクリーニングされる一連のバリエーション可変領域を含有するヒト抗体可変領域のパネルを生成するために用いられる。

30

【0357】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、ヒト抗体可変領域ライブラリ（例えば、ヒト V ドメインライブラリ）を生成するための *in vivo* システムを提供する。そのようなライブラリは、当該技術分野で知られている技術（例えば、部位特異的変異誘発、エラープローン PCR など）を使用して可変領域配列の親和性成熟源として使用される、及び/または例えば、キメラ抗原受容体（すなわち、抗体成分、例えば、scFv を使用して修飾された分子）、多重特異的結合物質（例えば、二重特異的結合物質）及び融合タンパク質（例えば、単ドメイン抗体、scFvs など）などの抗体ベースの治療分子の生成のための抗体成分源として使用される、所望のエフェクター機能に基づいて異なる Fc 領域にグラフトされ得る重鎖及び/または軽鎖可変領域配列源を提供する。

40

【0358】

いくつかの実施形態では、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）

50

動物において抗体を生成する方法であって、方法は、(a)本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)を対象となる抗原で免疫する工程；(b)非ヒト動物が対象となる抗原に対する免疫反応を生成する(例えば、抗体を発現する)のに十分な条件下で非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)を維持する工程；及び(c)非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、または非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)の細胞(例えば、B細胞)から対象となる抗原に結合する抗体を回収する工程を含む、方法が提供される。

【0359】

非ヒト動物において抗体を生成する方法のいくつかの実施形態では、非ヒト細胞は、B細胞である。非ヒト動物において抗体を生成する方法のいくつかの実施形態では、非ヒト細胞は、ハイブリドーマである。

10

【0360】

いくつかの実施形態では、(a)本明細書に記載される非ヒト動物を提供する工程；(b)非ヒト動物を対象となる抗原で免疫する工程；(c)非ヒト動物が対象となる抗原に対する免疫反応を生成するのに十分な条件下で非ヒト動物を維持する工程；及び(d)非ヒト動物、または非ヒト細胞から、対象となる抗原に結合する抗体を回収する工程であって、(d)の抗体は、ヒトV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含む、回収する工程を含む方法によって調製される抗体が提供される。

【0361】

方法によって調製される抗体のいくつかの実施形態では、ヒト重鎖可変ドメインは、ヒトV<sub>H</sub>3-74、V<sub>H</sub>3-73、V<sub>H</sub>3-72、V<sub>H</sub>2-70、V<sub>H</sub>1-69、V<sub>H</sub>3-66、V<sub>H</sub>3-64、V<sub>H</sub>4-61、V<sub>H</sub>4-59、V<sub>H</sub>1-58、V<sub>H</sub>3-53、V<sub>H</sub>5-51、V<sub>H</sub>3-49、V<sub>H</sub>3-48、V<sub>H</sub>1-46、V<sub>H</sub>1-45、V<sub>H</sub>3-43、V<sub>H</sub>4-39、V<sub>H</sub>4-34、V<sub>H</sub>3-33、V<sub>H</sub>4-31、V<sub>H</sub>3-30、V<sub>H</sub>4-28、V<sub>H</sub>2-26、V<sub>H</sub>1-24、V<sub>H</sub>3-23、V<sub>H</sub>3-21、V<sub>H</sub>3-20、V<sub>H</sub>1-18、V<sub>H</sub>3-15、V<sub>H</sub>3-13、V<sub>H</sub>3-11、V<sub>H</sub>3-9、V<sub>H</sub>1-8、V<sub>H</sub>3-7、V<sub>H</sub>2-5、V<sub>H</sub>7-4-1、V<sub>H</sub>4-4、V<sub>H</sub>1-3、V<sub>H</sub>1-2、V<sub>H</sub>6-1を含む再編成されたヒト重鎖可変領域、またはその体細胞超変異バリエーションによってコードされる。

20

30

【0362】

方法によって調製される抗体のいくつかの実施形態では、本明細書に記載される限られたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域レパートリーを含む非ヒト動物から得られるヒト軽鎖可変ドメインは、ヒトV<sub>L</sub>4-69、V<sub>L</sub>8-61、V<sub>L</sub>4-60、V<sub>L</sub>6-57、V<sub>L</sub>10-54、V<sub>L</sub>5-52、V<sub>L</sub>1-51、V<sub>L</sub>9-49、V<sub>L</sub>1-47、V<sub>L</sub>7-46、V<sub>L</sub>5-45、V<sub>L</sub>1-44、V<sub>L</sub>7-43、V<sub>L</sub>1-40、V<sub>L</sub>5-39、V<sub>L</sub>5-37、V<sub>L</sub>1-36、V<sub>L</sub>3-27、V<sub>L</sub>3-25、V<sub>L</sub>2-23、V<sub>L</sub>3-22、V<sub>L</sub>3-21、V<sub>L</sub>3-19、V<sub>L</sub>2-18、V<sub>L</sub>3-16、V<sub>L</sub>2-14、V<sub>L</sub>3-12、V<sub>L</sub>2-11、V<sub>L</sub>3-10、V<sub>L</sub>3-9、V<sub>L</sub>2-8、V<sub>L</sub>4-3、V<sub>L</sub>3-1を含む再編成されたヒト軽鎖可変領域、またはその体細胞超変異バリエーションによってコードされる。

40

【0363】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)細胞または非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)組織は、療法または診断のための薬物(例えば、抗体またはその断片)の製造及び/または開発において使用するために提供される。

【0364】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)、非ヒト(例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス)

50



細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織は、疾患、障害または病態の処置、予防または好転のための薬品の製造において使用するために提供される。

【0365】

いくつかの実施形態では、医療において使用するための、例えば、薬剤として使用するための薬物またはワクチンの製造及び/または開発における本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織の使用が提供される。

【0366】

いくつかの実施形態では、抗体またはその断片の製造及び/または開発における本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）、非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）細胞、または非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）組織の使用が提供される。

【0367】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、薬物またはワクチンの分析及び試験のための *in vivo* システムを提供する。様々な実施形態では、候補薬物またはワクチンは、本明細書に記載される1つ以上の非ヒト動物に送達され、続いて薬物またはワクチンに対する免疫反応、薬物またはワクチンの安全性プロファイル、または疾患または病態及び/または疾患または病態の1つ以上の症状に対する効果のうち1つ以上を決定するために非ヒト動物がモニタリングされ得る。安全性プロファイルを決定するために使用される例示的な方法は、毒性、最適な用量濃度、抗体（すなわち、抗薬物）反応、薬物またはワクチンの有効性及び可能性のあるリスク因子の測定を含む。そのような薬物またはワクチンは、そのような非ヒト動物において改善及び/または開発され得る。

【0368】

ワクチン有効性は、多数の方法で決定され得る。簡潔には、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、当該技術分野で知られている方法を使用してワクチン接種され、次いでワクチンを投与されるか、またはワクチンは、既に感染した非ヒト動物に投与される。ワクチンに対する非ヒト動物（複数可）の反応は、ワクチンの有効性を決定するために非ヒト動物（複数可）（またはそれから単離された細胞）をモニタリングすることによって、及び/またはそれに対する1つ以上のアッセイを実施することによって測定され得る。次いで、ワクチンに対する非ヒト動物（複数可）の反応は、当該技術分野で知られている及び/または本明細書に記載される1つ以上の指標を使用して、対照動物と比較される。

【0369】

ワクチン有効性は、ウイルス中和アッセイによってさらに決定され得る。簡潔には、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は免疫され、免疫後の様々な日に血清が収集される。血清の段階希釈物は、ウイルスに特異的な血清中の抗体がそれに結合する時間、ウイルスと共に事前インキュベートされる。次いで、ウイルス/血清混合物は、プラークアッセイまたはマイクロ中和アッセイによって感染性を決定するために許容細胞に添加される。血清中の抗体がウイルスを中和する場合、対照群と比較して少ないプラークまたは低い相対的ルシフェラーゼ単位が存在する。

【0370】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、ヒト抗体可変領域を生成し、そのため、診断用途（例えば、免疫学、血清学、微生物学、細胞病理学など）において使用するためのヒト抗体の生成のための *in vivo* システムを提供する。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物は、例えば、病理学的変化を示す特定の細胞表面マーカーの発現などの細胞性変化の同定のための相対的抗原部位に結合するヒト抗体可変領域を生成するために使用され得る。そのような抗体

10

20

30

40

50

は、様々な化学的実体（例えば、放射性トレーサー）にコンジュゲートされ得、所望に応じて様々な *in vivo* 及び/または *in vitro* アッセイにおいて用いられ得る。

【0371】

本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、腫瘍学及び/または感染性疾患において使用するためのヒト抗体の開発及び選択の改善された *in vivo* システムを提供する。様々な実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物及び対照非ヒト動物（例えば、本明細書に記載されるものとは異なる遺伝子改変を有する動物、または遺伝子改変のない、すなわち、野生型の動物）は、腫瘍（または腫瘍細胞）が移植され得、またはウイルス（例えば、インフルエンザ、HIV、HCV、HPVなど）で感染させられ得る。移植または感染させた後、非ヒト動物に候補治療剤が投与され得る。腫瘍またはウイルスは、候補治療剤の投与前に、非ヒト動物内の1つ以上の場所に定着するのに十分な時間が与えられ得る。代替的に、及び/または追加的に、治療剤として開発され得る潜在的ヒト抗体を特性化し、選択するために、そのような非ヒト動物における免疫反応がモニタリングされ得る。

【0372】

複数のエピトープに結合する抗原結合タンパク質

本明細書に記載の組成物及び方法は、複数のエピトープに結合する結合タンパク質、例えば、二重特異的抗体を作製するために使用され得る。本発明の利点には、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（その各々が単一の軽鎖に会合する）を選択する能力が含まれる。

【0373】

二重特異的結合タンパク質の合成及び発現は、2つの異なる重鎖と会合し、発現し得る好適な軽鎖を同定することに関連する問題に部分的に起因して、また、単離の問題に部分的に起因して課題が存在する。本明細書に記載の方法及び組成物により、遺伝子改変された非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、体細胞超変異した（例えば、親和性成熟した）重鎖を含む複数の重鎖と会合し、発現し得るヒト軽鎖可変ドメインを含む好適な軽鎖を別途天然プロセスを介して選択することが可能となる。逆キメラ重鎖（すなわち、ヒト可変ドメイン及び非ヒト（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）定常ドメイン）を有する親和性成熟した抗体を発現する本明細書に記載される免疫されたマウスの好適なB細胞からのヒトV<sub>H</sub> 及びV<sub>H</sub>配列が同定され、好適なヒト定常領域遺伝子配列（例えば、ヒトIgG1）と共に発現ベクターにおいてインフレームでクローニングされ得る。2つのそのようなコンストラクトが調製され得、各コンストラクトは、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。生殖細胞系配列またはその体細胞超変異バージョンを有する遺伝子セグメント（例えば、B細胞から同定される）を含む再編成されたヒト軽鎖可変領域（例えば、ヒトV<sub>L</sub> 1-51/J<sub>L</sub> 2またはヒトV<sub>L</sub> 2-14/J<sub>L</sub> 2）は、好適なヒト定常領域遺伝子（例えば、ヒト定常遺伝子）とインフレームで融合され得る。これらの3つの完全ヒト重鎖及び軽鎖コンストラクトは、発現のための好適な細胞内に配置され得る。細胞は、2つの主要な種：同一の軽鎖を有するホモ二量体重鎖、及び同一の軽鎖を有するヘテロ二量体重鎖を発現する。これらの主要な種の容易な分離を可能にするため、重鎖の一方は、プロテインA結合決定基を除外するように改変され、ヘテロ二量体結合タンパク質とは異なるホモ二量体結合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及び方法は、米国特許第8,586,713号；第9,309,326号；及び第9,982,013号（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0374】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗原結合タンパク質であって、ヒトV<sub>H</sub> 及びV<sub>H</sub>配列が、対象となるエピトープを含む抗原または対象となる抗原で免疫された本明細書に記載のマウスに由来する、抗原結合タンパク質が提供される。

【0375】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質であって、第1及び第2のポリペプチド

を含み、第1のポリペプチドは、N末端からC末端まで、第1のエピトープに選択的に結合する第1の抗原結合ドメインと、それに続くIgG1、IgG2、及びIgG4から選択されるヒトIgGの第1のCH3ドメインを含む定常ドメインを含み；第2のポリペプチドは、N末端からC末端まで、第2のエピトープに選択的に結合する第2の抗原結合ドメインと、それに続くIgG1、IgG2、及びIgG4から選択されるヒトIgGの第2のCH3ドメインを含む定常ドメインを含み、第2のCH3ドメインは、プロテインAに対する第2のCH3ドメインの結合を減少または排除する改変を含む、抗原結合タンパク質が提供される。

【0376】

いくつかの実施形態では、第1の重鎖及び第2の重鎖を含む抗原結合タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、第1の重鎖は、N末端からC末端まで、第1のエピトープに（ヒト軽鎖可変ドメインと共に）選択的に結合する第1のヒト重鎖可変ドメインと、それに続くIgG1、IgG2、及びIgG4から選択されるヒトIgGの第1のCH3ドメインを含む定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2の重鎖は、N末端からC末端まで、第2のエピトープ（第1のエピトープと同じまたは異なる抗原上にあり得る）に（同じヒト軽鎖可変ドメインと共に）選択的に結合する第2のヒト重鎖可変ドメインと、それに続くIgG1、IgG2、及びIgG4から選択されるヒトIgGの第2のCH3ドメインを含む定常ドメインを含み、第2のCH3ドメインは、プロテインAに対する第2のCH3ドメインの結合を減少または排除する改変を含む。

【0377】

いくつかの実施形態では、CH3ドメインは、プロテインAに対するCH3ドメインの結合を減少または除外する改変を含む。いくつかの実施形態では、プロテインAに対するCH3ドメインの結合を減少または排除する改変は、H95R改変（IMGTエクソナンバリングによる；EUNアンバリングによるH435R）を含む。いくつかの実施形態では、プロテインAに対するCH3ドメインの結合を減少または排除する改変は、Y96F改変（IMGT；EUによるY436F）を含む。いくつかの実施形態では、プロテインAに対するCH3ドメインの結合を減少または排除する改変は、H95R改変（IMGTエクソナンバリングによる；EUNアンバリングによるH435R）及びY96F改変（IMGT；EUによるY436F）を含む。

【0378】

いくつかの実施形態では、CH3ドメインは、H95R改変（IMGTエクソナンバリングによる；EUNアンバリングによるH435R）、Y96F改変（IMGT；EUによるY436F）、またはその両方を含むIgG1ドメインであり、D16E改変、L18M改変、N44S改変、K52N改変、V57M改変、V82I改変、またはそれらの組み合わせ（IMGT；EUによるD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、V422I、またはそれらの組み合わせ）をさらに含む。

【0379】

いくつかの実施形態では、CH3ドメインは、H95R改変（IMGTエクソナンバリングによる；EUNアンバリングによるH435R）、Y96F改変（IMGT；EUによるY436F）、またはその両方を含むIgG2ドメインであり、N44S改変、K52N改変、V82I改変、またはそれらの組み合わせ（IMGT；EUによるN384S、K392N、V422I、またはそれらの組み合わせ）をさらに含む。

【0380】

いくつかの実施形態では、CH3ドメインは、H95R改変（IMGTエクソナンバリングによる；EUNアンバリングによるH435R）、Y96F改変（IMGT；EUによるY436F）、またはその両方を含むIgG4ドメインであり、Q15R改変、N44S改変、K52N改変、V57M改変、R69K改変、E79Q改変、及びV82I改変（IMGT；EUによるQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、V422I、またはそれらの組み合わせ）をさらに含む。

【0381】

10

20

30

40

50

複数のエピトープに結合する抗原結合タンパク質を作製するための1つの方法は、本明細書に記載される、限られたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域レパートリーを有する第1の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）を、対象となる第1のエピトープを含む第1の抗原で免疫することであり、その場合、非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）は、非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む。そのような非ヒト動物は、免疫された場合、限られたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域）から発現されるヒト 軽鎖可変ドメインを含む逆キメラ抗体を作製する。対象となるエピトープに結合するヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするB細胞が同定され得る。いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列が読み出され（例えば、PCRによる）、好適なヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインと共にインフレームで発現コンストラクトにクローニングされ得る。いくつかの実施形態では、このプロセスは、第2の抗原の第2のエピトープに結合する第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを同定するために繰り返され得、第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインは読み出され、第2の好適な免疫グロブリン定常領域にインフレームで発現ベクターにクローニングされ得る。いくつかの実施形態では、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列が読み出され（例えば、PCRによる）、好適なヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域と共にインフレームで発現コンストラクトにクローニングされ得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2の免疫グロブリンヒト重鎖定常ドメインは、同じまたは異なるアイソタイプであり得る。いくつかの実施形態では、免疫グロブリンヒト重鎖定常ドメインの一方（他方はそうではない）は、本明細書または米国特許第8,586,713号；第9,309,326号；及び第9,982,013号（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように改変され得る。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、好適な細胞において発現され、例えば、米国特許第8,586,713号；第9,309,326号；及び第9,982,013号（これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ホモ二量体抗原結合タンパク質と比較して、プロテインAに対するその異なる親和性に基づいて単離され得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2の抗原は同じであり得、第1及び第2のエピトープは異なり得る。いくつかの実施形態では、第1及び第2の抗原は異なる。いくつかの実施形態では、二重特異的抗原結合タンパク質は、同じ抗原に結合する単一特異的抗原結合タンパク質よりも高い親和性で抗原に結合する。いくつかの実施形態では、二重特異的抗原結合タンパク質は、異なる親和性で第1のエピトープ及び第2のエピトープに結合する。

#### 【0382】

いくつかの実施形態では、二重特異的抗原結合タンパク質を作製するための方法であって、内因性 軽鎖遺伝子座で単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域、ならびに非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）からの第1の親和性成熟した（例えば、1つ以上の体細胞超変異を含む）ヒト重鎖可変ドメインを同定することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、二重特異的抗原結合タンパク質を作製するための方法は、内因性 軽鎖遺伝子座で単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域（例えば、第1の可変ドメインを生成するために使用された非ヒト動物におけるものと同じ単一の再編成されたヒト 軽鎖可変領域）、ならびに非ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む、本明細書に記載される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）からの第2の親和性成熟した（例

例えば、1つ以上の体細胞超変異を含む)重鎖可変ドメインを同定することを含む。いくつかの実施形態では、第1の親和性成熟ヒト重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列は、米国特許第8,586,713号;第9,309,326号;及び第9,982,013号(これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、プロテインA決定基改変を欠くヒト重鎖定常領域と共にインフレームでクローニングされて、完全ヒト重鎖をコードする第1のヌクレオチド配列が形成される。いくつかの実施形態では、第2の親和性成熟ヒト重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列は、米国特許第8,586,713号;第9,309,326号;及び第9,982,013号(これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているようにプロテインA決定基を含むヒト重鎖定常領域と共にインフレームでクローニングされて、第2の完全ヒト重鎖が形成される。いくつかの実施形態では、この段落に記載されている第1の完全ヒト重鎖をコードするヌクレオチド、及びこの段落に記載されている第2の完全ヒト重鎖をコードするヌクレオチドは、宿主細胞(例えば、哺乳動物細胞)に導入される。いくつかの実施形態では、この段落に記載されている第1の完全ヒト重鎖をコードするヌクレオチドは、第1の発現ベクターに含まれる。いくつかの実施形態では、この段落に記載されている第2の完全ヒト重鎖をコードするヌクレオチドは、第2の発現ベクターに含まれる。いくつかの例では、第1及び第2の発現ベクターは、同じであり、または異なる。いくつかの実施形態では、二重特異的抗体を作製する方法は、この段落に記載されている第1の完全ヒト重鎖をコードするヌクレオチド、この段落に記載されている第2の完全ヒト重鎖をコードするヌクレオチド、及びヒト軽鎖可変ドメインを含むヒト軽鎖をコードするヌクレオチドを宿主細胞において発現させることを含み、これによりヒト軽鎖可変ドメインが、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリー(例えば、単一の再編成されたヒト軽鎖可変領域)を有する本明細書に記載される非ヒト動物によって生成された配列を有する二重特異的抗体が形成される。他の実施形態では、ヒト軽鎖可変ドメインは、非ヒト動物に存在するものと同じヒトV/J再編成(例えば、非ヒト動物に存在するものと同じ単一の再編成されたヒト軽鎖可変領域)に由来する配列を有する。いくつかの実施形態では、二重特異的抗体を作製する方法は、例えば、宿主細胞またはその培地から二重特異的抗体を得ることを含む。

10

20

30

40

50

### 【0383】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、原核生物及び真核生物の細胞(単細胞または多細胞)、細菌細胞(例えば、*Escherichia coli*、*Bacillus spp.*、*Streptomyces spp.*などの系統)、マイコバクテリウム細胞、真菌細胞、酵母細胞(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*、*Pichia methanolic*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)、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または例えば、ハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合物であり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラット、またはマウス細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、真核であり、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、HB8065、HL-60、(例えば、BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、セルトリ細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞、及び前述した細胞に由来する細胞株。いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上のウイルス遺伝子を含む、例えば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞(例えば、PER.C6(登録商標)細胞)。

### 【0384】

### 薬学的組成物

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される非ヒト動物によって生成されるまたは本明細書に開示される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）によって生成される抗体、核酸、またはその治療的に関連する部分に由来する抗原結合タンパク質、抗原結合タンパク質をコードする核酸、またはその治療的に関連する部分は、対象（例えば、ヒト対象）に投与され得る。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に開示される非ヒト動物によって生成される抗体を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、緩衝液、希釈剤、賦形剤、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、組成物はまた、所望の場合、1つ以上の追加の治療的活性物質を含有し得る。

10

#### 【0385】

本明細書で提供される薬学的組成物の説明は、主に、ヒトへの倫理的投与に好適な薬学的組成物に向けられているが、そのような組成物は、通常、すべての種類の動物への投与に好適であることが当業者によって理解される。組成物を様々な動物に対する投与に好適なものとするためのヒトへの投与に好適な薬学的組成物の改変はよく理解されており、通常の熟練された獣医学的薬理学者は、存在する場合でも慣用の実験を伴ってそのような改変を設計及び/または実施し得る。

#### 【0386】

例えば、本明細書で提供される薬学的組成物は、滅菌注射可能な形態（例えば、皮下注射または静脈内注入に好適な形態）であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、注射に好適な液体投薬形態で提供される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、任意に真空下で、注射前に水性希釈剤（例えば、水、緩衝液、塩溶液など）で再構成され得る粉末（例えば、凍結乾燥及び/または滅菌される）として提供される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、水、塩化ナトリウム溶液、酢酸ナトリウム溶液、ベンジルアルコール溶液、リン酸緩衝生理食塩水などで希釈及び/または再構成される。いくつかの実施形態では、粉末は、水性希釈剤と穏やかに混合されるべきである（例えば、振盪しない）。

20

#### 【0387】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬理学の分野で知られているまたは今後開発される任意の方法によって調製され得る。通常、そのような調製方法は、活性成分を希釈剤もしくは別の賦形剤及び/または1つ以上の他の付属成分と関連させ、次いで、必要に応じて及び/または所望により、生成物を所望の単一または複数用量単位に成形及び/または包装する工程を含む。

30

#### 【0388】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される非ヒト動物（例えば、げっ歯類、例えば、ラットまたはマウス）によって生成される抗体を含む薬学的組成物は、保存または投与のための容器、例えば、バイアル、シリンジ（例えば、IVシリンジ）、または袋（例えば、IV袋）に含まれ得る。本開示に従う薬学的組成物は、バルクで、単一単位用量として、及び/または複数の単一単位用量として調製、包装、及び/または販売され得る。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、既定量の活性成分を含む薬学的組成物の個別量である。活性成分の量は、通常、対象に投与されるであろう活性成分の投薬量及び/または例えば、そのような投薬量の2分の1または3分の1などのそのような投薬量の好都合な分数と等しい。

40

#### 【0389】

本開示による薬学的組成物における活性成分、薬学的に許容可能な賦形剤、及び/または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズ、及び/または状態に応じて、及びさらに組成物が投与される経路に応じて変わり得る。例として、組成物は、0.1% ~ 100% (w/w) の間の活性成分を含み得る。

#### 【0390】

薬学的組成物は、本明細書で使用される場合、所望の特定の投薬形態に好適となるよう

50

に、任意の及びすべての溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体ビヒクル、分散または懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘または乳化剤、防腐剤、固体結合剤、滑沢剤などを含む薬学的に許容可能な賦形剤を追加的に含み得る。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) は、薬学的組成物の製剤化において使用される様々な賦形剤及びそれを調製するための既知の技術を開示している。任意の従来の賦形剤媒体が、任意の望ましくない生物学的作用をもたらす、またはそうでなければ薬学的組成物の任意の他の成分（複数可）と有害な様式で相互作用することなどにより、物質またはその誘導體と不適合である場合を除き、その使用は、本発明の範囲内であることが企図される。 10

【0391】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%純粋である。いくつかの実施形態では、賦形剤は、ヒトにおける使用のために及び獣医学的使用のために承認されている。いくつかの実施形態では、賦形剤は、米国食品医薬品局によって承認されている。いくつかの実施形態では、賦形剤は、薬学的グレードである。いくつかの実施形態では、賦形剤は、米国薬局方（USP）、欧州薬局方（EP）、英国薬局方、及び/または国際薬局方の基準を満たす。 20

【0392】

薬学的組成物の製造において使用される薬学的に許容可能な賦形剤には、不活性希釈剤、分散及び/または造粒剤、表面活性剤及び/または乳化剤、崩壊剤、結合剤、防腐剤、緩衝剤、滑沢剤、及び/または油が含まれるがこれらに限定されない。そのような賦形剤は、薬学的製剤に任意に含まれ得る。賦形剤、例えば、ココアバター及び座剤ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味、香味、及び/または芳香剤は、製剤製造者の判断に従って、組成物に存在し得る。 30

【0393】

いくつかの実施形態では、提供される薬学的組成物は、1つ以上の薬学的に許容可能な賦形剤（例えば、防腐剤、不活性希釈剤、分散剤、表面活性剤及び/または乳化剤、緩衝剤など）を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、1つ以上の防腐剤を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、防腐剤を含まない。 30

【0394】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、冷蔵及び/または冷凍され得る形態で提供される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、冷蔵及び/または冷凍することができない形態で提供される。いくつかの実施形態では、再構成された溶液及び/または液体投薬形態は、再構成後に所定期間（例えば、2時間、12時間、24時間、2日、5日、7日、10日、2週、1ヶ月、2ヶ月、またはそれ以上）保存され得る。いくつかの実施形態では、特定の時間よりも長い間の抗体組成物の保存は、抗体分解をもたらす。 40

【0395】

液体投薬形態及び/または再構成された溶液は、投与前に粒子状物質及び/または変色を含み得る。いくつかの実施形態では、溶液は、変色及び/または混濁している場合、及び/または粒子状物質が濾過後に残留する場合、使用されるべきではない。 40

【0396】

薬学的製剤の製剤化及び/または製造における一般的考慮事項は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005で見ることができる。 40

【0397】

キット

本開示は、少なくとも本明細書に記載される非ヒト細胞、タンパク質（単一または複合） 50

体（例えば、抗体またはその断片）、DNA断片、ターゲティングベクター、またはそれらの任意の組み合わせが充填された1つ以上の容器を含むパックまたはキットをさらに提供する。キットは、任意の適用可能な方法（例えば、研究方法）において使用され得る。そのような容器（複数可）には、医薬品または生物製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形式の文書を任意に添付してもよく、文書は、（a）ヒト投与のための製造、使用または販売に関する当局による承認、（b）使用の指示、及び/または（c）材料及び/または生物製品（例えば、本明細書に記載される非ヒト動物または非ヒト細胞）を2つ以上の実体及びこれらの組み合わせの間で移送することを管理する契約を示すものである。

【0398】

10

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト細胞、非ヒト組織、不死化細胞、非ヒトES細胞、または非ヒト胚を含むキットが提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞、非ヒト組織、不死化細胞、非ヒトES細胞、または非ヒト胚からのアミノ酸（例えば、抗体またはその断片）を含むキットが提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞、非ヒト組織、不死化細胞、非ヒトES細胞、または非ヒト胚からの核酸（例えば、抗体またはその断片をコードする核酸）を含むキットが提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される非ヒト動物、非ヒト細胞、非ヒト組織、不死化細胞、非ヒトES細胞、または非ヒト胚から同定された配列（アミノ酸及び/または核酸配列）を含むキットが提供される。

20

【0399】

いくつかの実施形態では、療法または診断のための薬物（例えば、抗体またはその断片）の製造及び/または開発において使用するための本明細書に記載されるキットが提供される。

【0400】

いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態の処置、予防または好転のための薬物（例えば、抗体またはその断片）の製造及び/または開発において使用するための本明細書に記載されるキットが提供される。

【0401】

所定の実施形態の他の特徴は、以下の例示的な実施形態の説明の過程において明らかになり、これは例示のために提供され、それを限定することは意図されていない。

30

【実施例】

【0402】

以下の実施例は、本明細書に記載の方法及び組成物を作製及び使用する仕方を当業者に説明するために提供され；本開示の範囲を限定することは意図されていない。別段示されない限り、温度は摂氏で示され、圧力は大気圧またはその近くで示される。

【0403】

概して、再編成されたヒト 軽鎖可変領域を保有するターゲティングベクターを V E L O C I G E N E（登録商標）技術を使用して作製した（例えば、米国特許第 6,586,251号及び Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6): 652-659（これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる）参照）。マウスゲノム細菌人工染色体（BAC）クローンを、単一の再編成されたヒトラムダ軽鎖可変領域を含有するゲノムコンストラクトを生成するように改変した。そのコンストラクトを、内因性 V 及び J 遺伝子セグメントを欠失するように事前に改変された内因性 軽鎖遺伝子座に挿入した。

40

【0404】

実施例 1 - 再編成されたヒト V<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> を含むターゲティングベクターの生成

50



当該技術分野で認識されている標準的な分子生物学技術を使用して再編成されたヒト V<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub> を作製した。再編成されたヒト V<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub> に含まれるヒト V<sub>1-51</sub> 遺伝子セグメント及びヒト J<sub>2</sub> 遺伝子セグメントは、ヒト V<sub>1-51</sub> 生殖細胞系列配列及びヒト J<sub>2</sub> 生殖細胞系列配列をそれぞれ有していた。

【0405】

DNA断片を *de novo* DNA合成 (Blue Heron Biotech) によって作製した。断片は、AscI 部位、2 kb のヒト V<sub>1-51</sub> プロモーター領域、ヒト V<sub>1-51</sub> の 5' 非翻訳領域 (UTR)、ヒト V<sub>1-51</sub> 遺伝子セグメントのエクソン 1 のコーディング配列 (リーダーペプチドをコードする配列を含む)、ヒト V<sub>1-51</sub> 遺伝子セグメントのイントロン 1、ヒト V<sub>1-51</sub> 遺伝子セグメントの第 2 エクソン及び J<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを含む再編成されたヒト V<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub> 可変配列、ヒト J<sub>5-C</sub> イントロンの最初の 412 bp (J<sub>5</sub> スプライスドナー部位 (SD) を含む)、及び P1-SceI 部位を含有していた (配列番号 31; 図 1A 及び図 9A~C も参照)。

10

【0406】

上の段落に記載されている断片を先述のターゲティングベクターにライゲーションして図 1A におけるターゲティングベクター A を生成した。先述のターゲティングベクターは、BAC CT7-302g12 に由来する約 23 kb の 5' マウスホモロジーアーム、Frt-Ub-Neo-Frt カセット、AscI 部位、再編成されたヒト V<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub> 可変領域、P1-SceI 部位、及び BAC CT7-254m04 に由来する約 75 kb の 3' マウスホモロジーアームを含有していた (例えば、米国特許第 9,334,334 号の図 14B、及び米国特許第 10,143,186 号の図 2 (これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる) 参照)。マウスホモロジーアームは、Macdonald et al. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:5147-52 (参照により本明細書に組み込まれる) によって先行記載されているものと同一であった。5' アームは、内因性カッパ遺伝子座の上流の約 23 kb のゲノム配列を含有し、3' アームは、約 2.4 kb のマウス J<sub>5-C</sub> イントロン、マウス C<sub>1</sub> エクソン、及びマウス<sub>1</sub> 遺伝子座の下流の約 72 kb のゲノム配列を含有していた。図 1A 参照。

20

【0407】

ターゲティングベクター A は、5' から 3' まで、BAC CT7-302g12 に由来する約 23 kb の 5' マウスホモロジーアーム、Frt-Ub-Neo-Frt カセット、AscI 部位、2 kb のヒト V<sub>1-51</sub> プロモーター領域、ヒト V<sub>1-51</sub> の 5' 非翻訳領域 (UTR)、ヒト V<sub>1-51</sub> 遺伝子セグメントのエクソン 1 のコーディング配列 (リーダーペプチドをコードする配列を含む)、ヒト V<sub>1-51</sub> 遺伝子セグメントのイントロン 1、ヒト V<sub>1-51</sub> 遺伝子セグメントの第 2 エクソン及び J<sub>2</sub> 遺伝子セグメントを含む再編成されたヒト V<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub> 可変配列、ヒト J<sub>5-C</sub> イントロンの最初の 412 bp (J<sub>5</sub> スプライスドナー部位 (SD) を含む)、P1-SceI 部位、ならびに約 2.4 kb のマウス J<sub>5-C</sub> イントロン、マウス C<sub>1</sub> エクソン、及びマウス<sub>1</sub> 遺伝子座の下流の約 72 kb のゲノム配列を含む、BAC CT7-254m04 に由来する約 75 kb の 3' マウスホモロジーアームを含有していた。

30

40

【0408】

実施例 2 - 再編成されたヒト V<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> を含む ES 細胞の生成

実施例 1 に記載されているターゲティングベクター A を、内因性 V<sub>H</sub> 及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントが再編成されたヒト V<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub> で置き換えられ、かつ免疫グロブリン重鎖遺伝子座がマウス重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒト V<sub>H</sub>、D、及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含むマウス ES 細胞にエレクトロポレーションする。マウス ES 細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子座はまた、機能性マウス Adam6a 及び Adam6b 遺伝子を含む (米国特許第 10,130,081 号 (参照により本明細書に組み込

50

まれる)参照)。相同組換えを受けたクローンの選択は、再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2及びマウスC<sub>H</sub>からの抗体を発現するキメラマウスを生成するための改変されたES細胞をもたらす。

【0409】

陽性ES細胞クローンを、内因性遺伝子座に挿入された再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2に特異的なプライマー及びプローブを使用してTAQMAN(商標)スクリーニングによって確認する(上記のValenzuela et al.(参照により本明細書に組み込まれる)参照)。検出に使用され得る様々なプローブのおおよその位置が図3において丸付きダッシュマークによって示されている。アッセイにおいて使用されるプライマー及びプローブは、以下の表Aにおけるものの中に列挙されている。

【表A-1】

表A-アレルの改変アッセイに使用されるプライマー及びプローブ

名称	フォワードプライマー	プローブ	リバースプライマー
ラムダ普遍的軽鎖プライマー及びプローブ			
hTU _1- 51	GGGACGAGGCCG ATTATTACTG (配 列番号41)	CGGAACATGGGATAG CAGCCTGA (配列番号 42)	CCTCCGCCGA ATACCACA (配列番号43)
hTU 2_1 -51	GCATCACCGGAC TCCAGACT (配列番 号44)	CGAGGCCGATTATTA CTGCGGAACA (配列番号 45)	AGGACGGTCA GCTTGGTC (配列番号46)
hTU _2- 14	CAGGACTCGGGA CAATCTTCATC (配列番号47)	ATGGCCTGGGCTCTG CTGCTC (配列番号48)	TGTGCCCTGA GTGAGGAG (配列番号49)
hTU 2_2 -14	AGCGCAGAAGGC AGGACTC (配列番号 50)	ACAATCTTCATCATG GCCTGGGCTC (配列番号 51)	CGTCACTGT GCCCTGAG (配列番号52)
hTU 3_1 -51 pro	TGTTGCCCAAGC TGGAGTG (配列番号 53)	TGGCATGATCTCGGC TCACTGC (配列番号54)	GAGGCTGAGG CAGGAGAA (配列番号55)
mIg KC- 4	GGCCACTCACAA GACATCAAC (配列 番号56)	TCACCCATTTGTCAAG AGCTTCAACA (配列番号 57)	CGTCTCAGGA CCTTTGTCTC TAAC (配列番号 58)
mIg KLC 1-2	TCCTTGTTACTT CATACCATCCTC T (配列番号59)	TTCTTCCTCAGGCC AGCCC (配列番号60)	AGGGTGACTG ATGGCGAAGA CT (配列番号61)

10

20

30

40

50

【表 A - 2】

親プライマー及びプローブ			
16 35 h2	TCCAGGCACC CTGTCTTTG (配列番号62)	AAAGAGCCACCCT CTCCTGCAGGG (配列番号63)	AAGTAGCT GCTGCTAA CACTCTGA CT (配列番号 64)
UL Cm 1	AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG (配 列番号65)	CCATTATGATGCT CCATGCCTCTCTG TTC (配列番号66)	TGACAAAT GCCCTAAT TATAGTGA TCA (配列番号 67)
Ne o	GGTGGAGAGG CTATTCGGC (配列番号68)	TGGGCACAAACAGA CAATCGGCTG配列番 号69)	GAACACGG CGGCATCA G (配列番号 70)
Hy g	TGCGGCCGAT CTTAGCC (配列 番号71)	ACGAGCGGGTTTCG GCCCATTC (配列番号 72)	TTGACCGA TTCCTTGC GG (配列番号 73)

10

20

## 【0410】

再編成されたヒトV<sub>1-51/J</sub>2を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座を保有するES細胞(図3参照)を、ターゲティングコンストラクトによって導入されたFRTEドネオマイシンカセットを除去するために、FLPを発現するコンストラクトでトランスフェクションする。任意に、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(例えば、US6, 774, 279(その全体が参照により組み込まれる))と交配することによって除去される。任意に、ネオマイシンカセットは、マウスにおいて保持される。

## 【0411】

実施例3 - 再編成されたヒトV<sub>1-51/J</sub>2及びマウスCに由来する軽鎖を発現するマウスの生成

上記の実施例2に記載の標的ES細胞をドナーES細胞として使用し、VELOCIMOUSE(登録商標)法によって8細胞期のマウス胚に導入する(例えば、米国特許第7,294,754号及びPoueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25(1): 91-99(これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)参照)。マウスCに連結された再編成されたヒトV<sub>1-51/J</sub>2を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座を保有するVELOCIMICE(登録商標)を、再編成されたヒトV<sub>1-51/J</sub>2の存在を検出するアレルの改変アッセイ(上記のValenzuela et al. (参照により本明細書に組み込まれる))を使用してジェノタイピングすることによって同定する。1つ目の遺伝子座アレルでマウスCに連結された再編成されたヒトV<sub>1-51/J</sub>2を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座を保有するマウスは、2つ目の遺伝子座アレルでマウスCに連結された再編成されたヒトV<sub>3-20/J</sub>1を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座を保有し、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有し得る。

30

40

## 【0412】

50

マウスを、再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2及びマウスC<sub>H</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座についてホモ接合性、及びマウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性となるように交配する。1つの方法では、これはまず、1つ目の軽鎖遺伝子座アレルでマウスC<sub>H</sub>に連結された再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、2つ目の軽鎖遺伝子座アレルでマウスC<sub>H</sub>に連結された再編成されたヒトV<sub>H</sub> 3-20/J<sub>H</sub> 1を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、及び(両方の重鎖アレルで)マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含むマウスを、以下にさらに記載されているように、内因性重鎖及び軽鎖カップ遺伝子座のノックアウト(KO)を含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOも含むマウスと交配することによって達成され得る。代替的には、マウスを、内因性軽鎖カップ遺伝子座のKOを含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOを含み、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスと交配し得る。得られたマウスを、免疫グロブリン遺伝子座、例えば、修飾された及び/または内因性の免疫グロブリン遺伝子座、例えば、ヒト化ラムダ軽鎖及び重鎖遺伝子座でホモ接合性となるように交配する。

10

20

#### 【0413】

仔をジェノタイピングし、再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2及びマウスC<sub>H</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座についてヘテロ接合性またはホモ接合性の仔を選択し、再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2またはその体細胞超変異パリアントからのヒト軽鎖可変ドメインの発現を評価し、特性化する。本明細書に記載の修飾された軽鎖を含むマウスにおけるヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2のB細胞表面発現をFACS分析を使用して検出する。

#### 【0414】

実施例4 - 再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2及びマウスC<sub>H</sub> 1を含むターゲティングベクターの生成

30

ターゲティングベクターAにおけるマウスC<sub>H</sub>をマウスC<sub>H</sub> 1で置き換えるために、追加のクローニング工程を実施した(図1B参照)。ターゲティングベクターAを2つのCas9:gRNA複合体で*in vitro*で切断した:イントロンカップエンハンサー(E<sub>i</sub>)の上流の第1の切断及びC<sub>H</sub>の下流の第2の切断。次いでギブソンアセンブリを実施して、欠失した領域を、Cas9切断ターゲティングベクターの3'末端との45bpの重複、E<sub>i</sub>、マウスC<sub>H</sub> 1、loxP-Ub-Hyg-loxPカセット、及びCas9切断ターゲティングベクターの5'末端との80bpの重複を含有する4.9kbの合成断片で置き換えた。合成断片は、参照により本明細書に組み込まれるPCT/US2018/063841の図1AのプラスミドpEの制限断片から得られた。得られたターゲティングベクターであるターゲティングベクターBが図1Bに示されている。

40

#### 【0415】

ターゲティングベクターBは、マウスC<sub>H</sub>がマウスC<sub>H</sub> 1で置き換えられ、loxP-Ub-Hyg-loxPカセットがC<sub>H</sub>ポリAシグナルの下流に挿入されたことを除き、ターゲティングベクターAと同一である。

#### 【0416】

実施例5 - 再編成されたヒトV<sub>H</sub> 1-51/J<sub>H</sub> 2及びマウスC<sub>H</sub> 1を含むES細胞の生成

実施例4に記載されているターゲティングベクターBを、内因性V<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントが再編成されたヒトV<sub>H</sub> 3-20/J<sub>H</sub> 1で置き換えられ、かつ免疫グロブリン重鎖遺伝子座がマウス重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D

50

、及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含んでいたマウス E S 細胞にエレクトロポレーションした。マウス E S 細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子座はまた、機能性マウス A d a m 6 a 及び A d a m 6 b 遺伝子を含んでいた（米国特許第 1 0 , 1 3 0 , 0 8 1 号（参照により本明細書に組み込まれる）参照）。相同組換えを受けたクローンの選択は、再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> からの抗体を発現するキメラマウスを生成するための改変された E S 細胞をもたらした。

【 0 4 1 7 】

陽性 E S 細胞クローンを、内因性 遺伝子座に挿入された再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> に特異的なプライマー及びプローブを使用して T A Q M A N （商標）スクリーニングによって確認した（上記の V a l e n z u e l a e t a l . （参照により本明細書に組み込まれる）参照）。検出に使用された様々なプローブのおおよその位置が図 4 において丸付きダッシュマークによって示されている。アッセイにおいて使用されたプライマー及びプローブは、上記の表 A におけるものの中に列挙されている。

10

【 0 4 1 8 】

再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座（図 4 参照）を保有する E S 細胞を、F R T e d ネオマイシンまたは F l o x e d ハイグロマイシンカセットを除去するために、F L P 及び / または C R E を発現するコンストラクトでトランスフェクションした。任意に、ネオマイシンカセットは、F L P リコンビナーゼを発現するマウス（例えば、U S 6 , 7 7 4 , 2 7 9 （その全体が参照により組み込まれる））と交配することによって除去され得、及び / またはハイグロマイシンカセットは、C R E リコンビナーゼを発現するマウスと交配することによって除去され得る。任意に、ネオマイシン及び / またはハイグロマイシンカセットは、マウスにおいて保持される。

20

【 0 4 1 9 】

実施例 6 - 再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> に由来する軽鎖を発現するマウスの生成

上記の実施例 5 に記載の標的 E S 細胞をドナー E S 細胞として使用し、V E L O C I M O U S E （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 , 2 9 4 , 7 5 4 号及び P o u e y m i r o u e t a l . （2007）F 0 g e n e r a t i o n m i c e t h a t a r e e s s e n t i a l l y f u l l y d e r i v e d f r o m t h e d o n o r g e n e - t a r g e t e d E S c e l l s a l l o w i n g i m m e d i a t e p h e n o t y p i c a n a l y s e s , N a t u r e B i o t e c h . 2 5 ( 1 ) : 9 1 - 9 9 （これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる）参照）。再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座を保有する V E L O C I M I C E （登録商標）を、再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> またはマウス C<sub>1</sub> の存在を検出するアレルアッセイ（上記の V a l e n z u e l a e t a l . （参照により本明細書に組み込まれる）参照）の改変を使用してジェノタイピングすることによって同定した。1 つ目の遺伝子座アレルでマウス C<sub>1</sub> に連結された再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座を保有するマウスは、2 つ目の遺伝子座アレルでマウス C<sub>1</sub> に連結された再編成されたヒト V<sub>3-20</sub> / J<sub>1</sub> を含む修飾された内因性 軽鎖遺伝子座を保有し、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウス A d a m 6 a 及び A d a m 6 b 遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒト V<sub>H</sub>、D、及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有し得る。

30

40

【 0 4 2 0 】

マウスを、再編成されたヒト V<sub>1-51</sub> / J<sub>2</sub> 及びマウス C<sub>1</sub> を含む改変された軽鎖遺伝子座についてホモ接合性、及びマウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウス A d a m 6 a 及び A d a m 6 b 遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒト V<sub>H</sub>、D、及び J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接

50

合性となるように交配する。1つの方法では、これはまず、1つ目の軽鎖遺伝子座アレルでマウスC<sub>1</sub>に連結された再編成されたヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、2つ目の軽鎖遺伝子座アレルでマウスC<sub>1</sub>に連結された再編成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、及び(両方の重鎖アレルで)マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含むマウスを、以下にさらに記載されているように、内因性重鎖及び軽鎖カッパ遺伝子座のノックアウト(KO)を含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOも含むマウスと交配することによって達成され得る。代替的には、マウスを、内因性軽鎖カッパ遺伝子座のKOを含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOを含み、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスと交配し得る。得られたマウスを、免疫グロブリン遺伝子座、例えば、修飾された及び/または内因性の免疫グロブリン遺伝子座、例えば、ヒト化ラムダ軽鎖及び重鎖遺伝子座でホモ接合性となるように交配する。

10

#### 【0421】

仔をジェノタイピングし、再編成されたヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座についてヘテロ接合性またはホモ接合性の仔を選択し、再編成されたヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>またはその体細胞超変異バリエーションからのヒト軽鎖可変ドメインの発現を評価し、特性化する。本明細書に記載の修飾された軽鎖を含むマウスにおけるヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>のB細胞表面発現をFACS分析を使用して検出した。

20

#### 【0422】

実施例7 - 再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含むターゲティングベクターの生成

当該技術分野で認識されている標準的な分子生物学技術を使用して再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>を作製した。再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>に含まれるヒトV<sub>2-14</sub>遺伝子セグメント及びヒトJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントは、ヒトV<sub>2-14</sub>生殖細胞系列配列及びヒトJ<sub>2</sub>生殖細胞系列配列をそれぞれ有していた。

30

#### 【0423】

DNA断片をde novo DNA合成(Blue Heron Biotech)によって作製した。断片は、AscI部位、2 kbのヒトV<sub>1-51</sub>プロモーター領域、ヒトV<sub>1-51</sub>の5'非翻訳領域(UTR)、ヒトV<sub>2-14</sub>遺伝子セグメントのエクソン1のコーディング配列(リーダーペプチドをコードする配列を含む)、ヒトV<sub>2-14</sub>遺伝子セグメントのイントロン1、ヒトV<sub>2-14</sub>遺伝子セグメントの第2エクソン及びJ<sub>2</sub>遺伝子セグメントを含む再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>可変配列、ヒトJ<sub>5-C</sub>イントロンの最初の412 bp(J<sub>5</sub>スプライスドナー部位(SD)を含む)、及びPI-SceI部位を含有していた(配列番号36;図2A及び図13A~Cも参照)。

40

#### 【0424】

上の段落に記載されている断片を先述のターゲティングベクターにライゲーションして図2AにおけるターゲティングベクターCを生成した。先述のターゲティングベクターは、BAC CT7-302g12に由来する約23 kbの5'マウスホモロジーマーム、Frt-Ub-Neo-Frtカセット、AscI部位、再編成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub>可変領域、PI-SceI部位、及びBAC CT7-254m04に由来する約75 kbの3'マウスホモロジーマームを含有していた(例えば、米国特許第9,334,334号の図14B、及び米国特許第10,143,186号の図2(これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)参照)。マウスホモロジーマームは、Macdonald et al.(2014)Proc.Natl.Acad.Sci.USA

50

, 1 1 1 : 5 1 4 7 - 5 2 ( 参照により本明細書に組み込まれる ) によって先行記載されているものと同一であった。5'アームは、内因性カッパ遺伝子座の上流の約23 kbのゲノム配列を含有し、3'アームは、約2.4 kbのマウスJ<sub>κ</sub>-C<sub>κ</sub>イントロン、マウスC<sub>κ</sub>エクソン、及びマウス<sub>κ</sub>遺伝子座の下流の約72 kbのゲノム配列を含有していた。図2A参照。

#### 【0425】

ターゲティングベクターCは、5'から3'まで、BAC<sub>κ</sub>CT7-302g12に由来する約23 kbの5'マウスホモロジーアーム、Frt-Ub-Neo-Frtカセット、AscI部位、2 kbのヒトV<sub>H</sub>1-51プロモーター領域、ヒトV<sub>H</sub>1-51の5'UTR、V<sub>H</sub>2-14遺伝子セグメントのエクソン1のコーディング配列(リーダーペプチドをコードする配列を含む)、ヒトV<sub>H</sub>2-14遺伝子セグメントのイントロン1、ヒトV<sub>H</sub>2-14遺伝子セグメントの第2エクソン及びJ<sub>H</sub>2遺伝子セグメントを含む再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2可変配列、ヒトJ<sub>H</sub>5-C<sub>H</sub>イントロンの最初の412 bp (J<sub>H</sub>5スプライス部位を含む)、PI-ScEI部位、ならびに約2.4 kbのマウスJ<sub>κ</sub>-C<sub>κ</sub>イントロン、マウスC<sub>κ</sub>エクソン、及びマウス<sub>κ</sub>遺伝子座の下流の約72 kbのゲノム配列を含むBAC<sub>κ</sub>CT7-254m04に由来する約75 kbの3'マウスホモロジーアームを含有する。

#### 【0426】

実施例8-再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2及びマウスC<sub>κ</sub>を含むES細胞の生成

ターゲティングベクターCを、内因性V<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントが再編成されたヒトV<sub>H</sub>3-20/J<sub>H</sub>1で置き換えられ、かつ免疫グロブリン重鎖遺伝子座がマウス重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>H、D、及びJ<sub>H</sub>H遺伝子セグメントを含むマウスES細胞にエレクトロポレーションする。マウスES細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子座はまた、機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子を含む(米国特許第10,130,081号(参照により本明細書に組み込まれる)参照)。相同組換えを受けたクローンの選択は、再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2及びマウスC<sub>κ</sub>からの抗体を発現するキメラマウスを生成するための改変されたES細胞をもたらす。

#### 【0427】

陽性ES細胞クローンを、内因性<sub>κ</sub>遺伝子座に挿入された再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2に特異的なプライマー及びプローブを使用してTAQMAN(商標)スクリーニングによって確認する(上記のValenzuela et al.(参照により本明細書に組み込まれる)参照)。検出に使用される様々なプローブのおおよその位置が図5において丸付きダッシュマークによって示されている。アッセイにおいて使用されるプライマー及びプローブは、上記の表Aにおけるものの中に列挙されている。

#### 【0428】

再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2を含む修飾された内因性<sub>κ</sub>軽鎖遺伝子座(図5参照)を保有するES細胞を、ターゲティングコンストラクトによって導入されたFRTEドネオマイシンカセットを除去するために、FLPを発現するコンストラクトでトランスフェクションする。任意に、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(例えば、US6,774,279(その全体が参照により組み込まれる))と交配することによって除去される。任意に、ネオマイシンカセットは、マウスにおいて保持される。

#### 【0429】

実施例9-再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2及びマウスC<sub>κ</sub>に由来する軽鎖を発現するマウスの生成

上記の実施例8に記載の標的ES細胞をドナーES細胞として使用し、VELOCIMOUSE(登録商標)法によって8細胞期のマウス胚に導入する(例えば、米国特許第7,294,754号及びPoueymirou et al.(2007)F0 generation mice that are essentially fully

10

20

30

40

50

derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25 (1): 91-99 (これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)参照)。再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>及びマウスCを含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座を保有するVELOCIMICE(登録商標)を、再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>の存在を検出するアレリアッセイ(上記のValenzuela et al. (参照により本明細書に組み込まれる))の改変を使用してジェノタイピングすることによって同定する。1つ目の遺伝子座アレルでマウスCに連結された再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座を保有するマウスは、2つ目の遺伝子座アレルでマウスCに連結された再編成されたヒトV<sub>3-20/J<sub>1</sub></sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座を保有し、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有し得る。

10

#### 【0430】

マウスを、再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>及びマウスCを含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座についてホモ接合性、及びマウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性となるように交配する。1つの方法では、これはまず、1つ目の軽鎖遺伝子座アレルで再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>及びマウスCを含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、2つ目の軽鎖遺伝子座アレルでマウスCに連結された再編成されたヒトV<sub>3-20/J<sub>1</sub></sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、及び(両方の重鎖アレルで)マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含むマウスを、以下にさらに記載されているように、内因性重鎖及び軽鎖カップ遺伝子座のノックアウト(KO)を含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOも含むマウスと交配することによって達成され得る。代替的には、マウスを、内因性軽鎖カップ遺伝子座のKOを含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOを含み、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスと交配し得る。得られたマウスを、免疫グロブリン遺伝子座、例えば、修飾された及び/または内因性の免疫グロブリン遺伝子座、例えば、ヒト化ラムダ軽鎖及び重鎖遺伝子座でホモ接合性となるように交配する。

20

30

#### 【0431】

仔をジェノタイピングし、再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>及びマウスCを含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座についてヘテロ接合性またはホモ接合性の仔を選択し、再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>またはその体細胞超変異バリエーションからのヒト軽鎖可変ドメインの発現を評価し、特性化する。本明細書に記載の修飾された軽鎖を含むマウスにおけるヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>のB細胞表面発現をFACS分析を使用して検出する。

40

#### 【0432】

実施例10 - 再編成されたヒトV<sub>2-14/J<sub>2</sub></sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含むターゲティングベクターの生成

ターゲティングベクターCにおけるマウスC<sub>1</sub>をマウスC<sub>1</sub>で置き換えるために、追加のクローニング工程を実施した(図2B参照)。ターゲティングベクターCを2つのCas9:gRNA複合体でin vitroで切断した:イントロンカップエンハンサー(E<sub>i</sub>)の上流の第1の切断及びC<sub>1</sub>の下流の第2の切断。次いでギブソンアセンブリを実施して、欠失した領域を、Cas9切断ターゲティングベクターの3'末端との45b

50



pの重複、E<sub>i</sub>、マウスC<sub>1</sub>、loxP-Ub-Hyg-loxPカセット、及びCas9切断ターゲティングベクターの5'末端との80bpの重複を含有する4.9kbの合成断片で置き換えた。合成断片は、参照により本明細書に組み込まれるPCT/US2018/063841の図1AのプラスミドpEの制限断片から得られた。得られたターゲティングベクターであるターゲティングベクターDが図2Bに示されている。

【0433】

ターゲティングベクターDは、マウスC<sub>1</sub>がマウスC<sub>1</sub>で置き換えられ、loxP-Ub-Hyg-loxPカセットがC<sub>1</sub>ポリAシグナルの下流に挿入されたことを除き、ターゲティングベクターCと同一である。

【0434】

実施例11-再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含むES細胞の生成

ターゲティングベクターDを、内因性V<sub>H</sub>及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントが再編成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub>で置き換えられ、かつ免疫グロブリン重鎖遺伝子座がマウス重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含むマウスES細胞にエレクトロポレーションする。マウスES細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子座はまた、機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子を含む(米国特許第10,130,081号(参照により本明細書に組み込まれる)参照)。相同組換えを受けたクローンの選択は、再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>からの抗体を発現するキメラマウスを生成するための改変されたES細胞をもたらす。

【0435】

陽性ES細胞クローンを、内因性<sub>H</sub>遺伝子座に挿入された再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>に特異的なプライマー及びプローブを使用してTAQMAN(商標)スクリーニングによって確認する(上記のValenzuela et al.(参照により本明細書に組み込まれる)参照)。検出に使用される様々なプローブのおおよその位置が図6において丸付きダッシュマークによって示されている。アッセイにおいて使用されるプライマー及びプローブは、上記の表Aにおけるものの中に列挙されている。

【0436】

再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含む修飾された内因性<sub>H</sub>軽鎖遺伝子座を保有するES細胞(図6参照)を、FRTedネオマイシンまたはFlxedハイグロマイシンカセットを除去するために、FLP及び/またはCREを発現するコンストラクトでトランスフェクションする。任意に、ネオマイシンカセットを、FLPリコンビナーゼを発現するマウス(例えば、US6,774,279(その全体が参照により組み込まれる))と交配することによって除去し、及び/またはハイグロマイシンカセットを、CREリコンビナーゼを発現するマウスと交配することによって除去する。任意に、ネオマイシン及び/またはハイグロマイシンカセットは、マウスにおいて保持される。

【0437】

実施例12-再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>に由来する<sub>H</sub>軽鎖を発現するマウスの生成

上記の実施例11に記載の標的ES細胞をドナーES細胞として使用し、VELOCIMOUSE(登録商標)法によって8細胞期のマウス胚に導入する(例えば、米国特許第7,294,754号及びPoueymirou et al.(2007)F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25(1):91-99(これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる)参照)。再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含む修飾された内因性<sub>H</sub>軽鎖遺伝子座を保有するVELOCIMICE

10

20

30

40

50

(登録商標)を、再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>またはマウスC<sub>1</sub>の存在を検出するアレリアッセイ(上記のValenzuela et al. (参照により本明細書に組み込まれる)参照)の改変を使用してジェノタイピングすることによって同定する。1つ目の遺伝子座アレリでマウスC<sub>1</sub>に連結された再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座を保有するマウスは、2つ目の遺伝子座アレリでマウスC<sub>1</sub>に連結された再編成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座を保有し、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有し得る。

#### 【0438】

マウスを、再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含む改変された軽鎖遺伝子座についてホモ接合性、及びマウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性となるように交配する。1つの方法では、これはまず、1つ目の軽鎖遺伝子座アレリで再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、2つ目の軽鎖遺伝子座アレリでマウスC<sub>1</sub>に連結された再編成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座、及び(両方の重鎖アレリで)マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含むマウスを、以下にさらに記載されているように、内因性重鎖及び軽鎖カップ遺伝子座のノックアウト(KO)を含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOも含むマウスと交配することによって達成され得る。代替的には、マウスを、内因性軽鎖カップ遺伝子座のKOを含み、任意に内因性ラムダ遺伝子座のKOを含み、マウス重鎖定常領域遺伝子ならびに機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子に機能可能に連結された非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスと交配し得る。得られたマウスを、免疫グロブリン遺伝子座、例えば、修飾された及び/または内因性の免疫グロブリン遺伝子座、例えば、ヒト化ラムダ軽鎖及び重鎖遺伝子座でホモ接合性となるように交配する。

#### 【0439】

仔をジェノタイピングし、再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>及びマウスC<sub>1</sub>を含む修飾された内因性軽鎖遺伝子座についてヘテロ接合性またはホモ接合性の仔を選択し、再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>またはその体細胞超変異バリエーションからのヒト軽鎖可変ドメインの発現を評価し、特性化する。本明細書に記載の修飾された軽鎖を含むマウスにおけるヒトV<sub>12-14</sub>/J<sub>2</sub>のB細胞表面発現をFACS分析を使用して検出する。

#### 【0440】

##### 実施例13 - マウスの交配

この実施例は、複数の遺伝子改変された免疫グロブリン遺伝子座を保有する複数の遺伝子改変されたマウス系統を作製するために、本明細書に記載の遺伝子改変されたマウスのいずれか1つと交配され得るいくつかの遺伝子改変されたマウス系統を記載する。

#### 【0441】

多くの様々な交配スキームは、マウスが再編成されたヒトIg可変ドメインを有する軽鎖及び再編成されたヒト重鎖可変ドメインを有する重鎖を発現するように、本明細書に記載の修飾された軽鎖及び重鎖遺伝子座でホモ接合性のマウスをもたらすことが想定される。1つのそのようなスキームでは、(内因性カップ遺伝子座における)1つ目の軽鎖遺伝子座アレリでの再編成されたヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>または再編成されたヒトV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>軽鎖及び(内因性カップ遺伝子座における)2つ目の軽鎖遺伝子座アレリでの再編成されたヒトV<sub>3-20</sub>/J<sub>1</sub>についてヘテロ接合性であり、かつ上述した

10

20

30

40

50

非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である上記の実施例3、6、9、及び12に記載の遺伝子改変されたマウスを、内因性マウスI g<sub>κ</sub>、I g<sub>λ</sub>及びI g重鎖遺伝子座の欠失についてホモ接合性のマウスと交配する。再編成された軽鎖可変ドメインを発現する得られた子孫を互いに交配して、再編成されたヒトV<sub>H</sub>1-51/J<sub>H</sub>2または再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2軽鎖についてホモ接合性及び非再編成ヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む（及び上述した機能性マウスAdam6a及びAdam6b遺伝子も含む）修飾された免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性のマウスを得る。交配は、当該技術分野で認識されている標準的な技術によって、代替的には、商業的ブリーダー（例えば、The Jackson Laboratory）によって実施される。

10

## 【0442】

内因性I g<sub>κ</sub>ノックアウト（I g<sub>κ</sub> KO）。例えば、上述した再編成されたヒトラムダ軽鎖可変領域及びヒト重鎖可変領域を含むマウスを、内因性I g<sub>κ</sub>軽鎖遺伝子座が内因性I g<sub>κ</sub>軽鎖を発現することを不可能にする内因性I g<sub>κ</sub>遺伝子座のすべてまたは一部の欠失を含むマウスと交配し得る。そのような例示的なマウスは、Macdonald et al. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111: 5147-52（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

## 【0443】

内因性I g<sub>κ</sub>ノックアウト（I g<sub>κ</sub> KO）。限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーの使用を最適化するために、上述した再編成されたヒトラムダ軽鎖可変領域及びヒト重鎖可変領域を含むマウスを、内因性I g<sub>κ</sub>軽鎖遺伝子座が内因性I g<sub>κ</sub>軽鎖を発現することを不可能にする内因性I g<sub>κ</sub>軽鎖遺伝子座のすべてまたは一部の欠失を含有するマウスと交配する（例えば、米国特許第9,066,502号（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例1参照）。この手法では、得られた子孫は、それらの軽鎖のみとして、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリー（例えば、実施例3、6、9及び12に記載されている再編成されたヒトV<sub>H</sub>/J<sub>H</sub>）から発現される可変ドメインを有する軽鎖を発現する。限られたヒト軽鎖可変領域レパートリー及び内因性I g<sub>κ</sub>軽鎖遺伝子座のすべてまたは一部の欠失を保有するマウス系統を、限られたヒト軽鎖可変領域レパートリーの存在及び内因性マウスI g<sub>κ</sub>の非存在についてスクリーニングする。

20

## 【0444】

内因性I g<sub>λ</sub>重鎖ノックアウト（I g<sub>λ</sub> KO）。例えば、上述した再編成されたヒトラムダ軽鎖可変領域及び非再編成ヒト重鎖可変領域を含むマウスを、内因性I g<sub>λ</sub>重鎖遺伝子座が内因性I g<sub>λ</sub>重鎖を発現することを不可能にする内因性I g<sub>λ</sub>重鎖遺伝子座のすべてまたは一部の欠失を含むマウスと交配し得る。そのような例示的なマウスは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第10,457,960号の実施例7に記載されている。

30

## 【0445】

よって、上述したように、上述した再編成されたヒトラムダ軽鎖可変領域及びヒト重鎖可変領域を含むマウスを、内因性I g<sub>κ</sub>、I g<sub>λ</sub>、及び/またはI g重鎖遺伝子座のすべてまたは一部の欠失を含むマウスと交配し得る。後の子孫を、免疫グロブリン遺伝子座、例えば、修飾された及び/または内因性の免疫グロブリン遺伝子座、例えば、ヒト化ラムダ軽鎖及び重鎖遺伝子座でホモ接合性となるように交配する。

40

## 【0446】

実施例14 - 重鎖遺伝子使用及びラムダ軽鎖の体細胞超変異頻度

再編成されたヒトV<sub>H</sub>1-51/J<sub>H</sub>2または再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2軽鎖可変領域及び内因性重鎖可変領域の本明細書で上述したヒト重鎖可変領域での置き換えを含むマウスからの重鎖遺伝子使用は、当該技術分野で知られているいくつかの方法を介して決定され得る。1つのそのような方法では、次世代シーケンシング技術が使用される。

## 【0447】

普遍的な再編成されたヒトV<sub>H</sub>1-51/J<sub>H</sub>2または再編成されたヒトV<sub>H</sub>2-14/J<sub>H</sub>2

50

ノ J 2 軽鎖マウス及び内因性重鎖可変領域の本明細書で上述したヒト重鎖可変領域での置き換えを含むマウスから採取された脾細胞または骨髄を、それらの抗体の重鎖可変領域セグメント使用について分析する。骨髄は、2.5%ウシ胎仔血清(FBS)を含有する1×リン酸緩衝生理食塩水(PBS, Gibco)で大腿骨をフラッシングすることによって大腿骨から収集し、骨髄細胞を必要に応じて異なるB細胞サブタイプについてFACS選別する。単一細胞懸濁液をマウス脾臓から調製する。脾臓及び骨髄調製物からの赤血球をACK溶解緩衝液(Gibco)で溶解する。抗CD19(マウス、B細胞のためのマーカー)磁性ビーズ及びMACS(登録商標)カラム(Miltenyi Biotec h)を使用して磁気セルソーティングによって全脾細胞から脾臓B細胞を陽性濃縮する。RNeasy Plus RNA単離キット(Qiagen)を使用して製造業者の指示書に従って骨髄及び精製された脾臓B細胞からトータルRNAを単離する。

10

## 【0448】

SMARTer(商標)RACE cDNA増幅キット(Clontech)及びIgMまたはIgG特異的プライマーを使用して逆転写を実施してIgMまたはIgG定常領域配列を含有するヒト重鎖cDNAを生成する。逆転写の間、プレートスイッチ(TS)プライマーの逆相補体であるDNA配列は、新たに合成されたcDNAの3'末端に結合する。精製されたcDNAを、2回のセミネスト(semi-nested)PCRによって増幅して、mRNAが得られた細胞によって発現した総IgMまたはIgG可変ドメイン相補体をコードする複数のcDNAを生成し、続いて3回のPCRを行ってシーケンシングプライマー及びインデックスを結合させる。ヒト可変ドメインcDNAをPippin Prep(SAGE Science)を使用してサイズ選択し、KAPAライブラリ定量キット(KAPA Biosystems)を使用してqPCRによって定量してから、サンプルをシーケンシングのためにMiSeqシーケンサー(Illumina)にロードする。

20

## 【0449】

バイオインフォマティクス分析のため、Raw Illumina配列を脱マルチプレックス化し、対応するIgMまたはIgG定常領域遺伝子プライマーに対する質、長さ及び一致に基づいてフィルター処理する。重複するペアエンドリードをマージし、カスタムインハウスパイプラインを使用して分析する。そのパイプラインは、IgBLAST(NCBI, v2.2.25+)のローカルインストールを使用し、再編成された重鎖配列をヒト生殖細胞系列重鎖V、D、及びJ遺伝子セグメントデータベースにアライメントし、終止コドンの存在と共に生産性及び非生産性接合を表示する。CDR3配列及び予測される非プレートヌクレオチドを、International Immunogenetics Information System(IMG T)において定義されている境界を使用して抽出する。

30

## 【0450】

上記の方法は、様々なヒトV、D、及びJセグメント使用及び本明細書に記載の普遍的な再編成されたヒト軽鎖マウスにおける特定のヒトVDJ再編成の頻度の決定を可能にする。

## 【0451】

普遍的な再編成されたヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>またはV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>軽鎖可変領域を含むマウスのラムダ軽鎖における体細胞超変異の存在及び頻度を決定するために、類似する次世代シーケンシング技術を使用し得る。例えば、マウスC(例えば、C<sub>1</sub>)定常領域に連結された普遍的な再編成されたヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>またはV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>軽鎖可変領域を含むマウスの場合、免疫グロブリンC(例えば、C<sub>1</sub>)特異的プライマーを使用して上述した逆転写PCRを実施して、免疫グロブリン定常領域(例えば、C<sub>1</sub>)遺伝子配列を含有するcDNAを生成し、バイオインフォマティクス分析を行って、再編成された軽鎖配列をヒト生殖細胞系列V及びJ遺伝子セグメントデータベースに対してアライメントする。マウスC定常領域に連結された普遍的な再編成されたヒトV<sub>1-51</sub>/J<sub>2</sub>またはV<sub>2-14</sub>/J<sub>2</sub>軽鎖可変領域の場合、

40

50

マウス C 特異的プライマーを代わりに使用する。ラムダ軽鎖における体細胞超変異の存在及び頻度を定量する。

【0452】

実施例 15 - マウスからのヒト抗体の生成

限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリー（例えば、実施例 3、6、9 及び 12 に記載されている再編成されたヒト V / J ）を含むマウスを、他の内因性 I g 遺伝子座の改変及び欠失を含有する様々な所望の系統（例えば、実施例 13 に記載されている）と交配した後、選択されたマウスを対象となる抗原で免疫し得る。

【0453】

通常、限られたヒト 軽鎖可変領域レパートリーを含むマウス（それらの生殖細胞系列ゲノムにおいてヒト重鎖可変領域遺伝子セグメント及び内因性マウス 軽鎖遺伝子座の、修飾された V<sub>1</sub>-51 / J<sub>2</sub> ヒト軽鎖領域または修飾された V<sub>2</sub>-14 / J<sub>2</sub> ヒト軽鎖領域（上述）のいずれかでの置き換えを含み、内因性 遺伝子座の除去を伴うまたは伴わないマウス）を対象となる抗原で免疫する。血液を収集し、抗体免疫反応を標準的な抗原特異的 E L I S A イムノアッセイによってモニタリングする。

【0454】

所望の免疫反応が達成された場合、1つの方法では、脾細胞（及び/または他のリンパ組織）を採取し、マウス骨髄腫細胞と融合して、それらの生存性を維持し、不死ハイブリドーマ細胞株を形成する。生成されたハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし（例えば、E L I S A アッセイによって）、選択して抗原特異的抗体を生成するハイブリドーマ細胞株を同定する。ハイブリドーマを、所望に応じて相対的結合親和性及びアイソタイプについてさらに特性化し得る。この技術、及び上述した免疫原を使用して、いくつかの抗原特異的キメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメイン及びマウス定常ドメインを保有する抗体）を得る。

【0455】

代替的には、別の方法では、本明細書に記載される及び/または例示される修飾されたマウスの B 細胞によって生成される抗原特異的キメラ抗体、及び/またはその 軽鎖及び/または重鎖の可変ドメインをコードする D N A を、抗原特異的 B 細胞から直接的に単離し得る。例えば、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する高親和性キメラ抗体を単離及び特性化し得、対象となる特定の抗体（及び/またはそれを生成する B 細胞）を定義する。例を数個だけ挙げると、そのような抗体、及び/またはその可変及び/または定常領域の評価された特徴は、エピトープの親和性、選択性、同一性などのうちの 1 つ以上であり、またはそれを含み得る。抗原特異的抗体を、例えば、米国特許第 7, 582, 298 号（その全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれる）に記載されているように、骨髄腫細胞に融合することなく、抗原陽性 B 細胞（免疫されたマウスからのもの）から直接的に単離する。

【0456】

重鎖及び 軽鎖の可変領域をコードする D N A を、単離し、またはそうでなければ調製し得、完全ヒト抗体の調製のためにヒト重鎖（例えば、所望のアイソタイプのもの）及びヒト 軽鎖定常領域にそれぞれ連結し得る。単離された重鎖及び 軽鎖可変領域は、体細胞変異している場合がある。これは、抗原特異的レパートリーに対してさらなる多様性を付与する。完全ヒト抗体（及び/またはその重鎖または 軽鎖）を、細胞、典型的には C H O 細胞などの哺乳動物細胞において生成し得る。次いで完全ヒト抗体を、対象となる抗原の相対的結合親和性及び/または中和活性について特性化し得る。

【0457】

実施例 16 - 二重特異的抗体の結合親和性

完全ヒト二重特異的抗体は、当該技術分野で知られている標準的な組換え D N A 技術を使用して上述した対象となる抗原に特異的な選択された単一特異的抗体のクローニングされたヒト重鎖可変領域から構築される。簡潔には、修飾されたヒト V<sub>1</sub>-51 / J<sub>2</sub> 軽鎖または修飾されたヒト V<sub>2</sub>-14 / J<sub>2</sub> 軽鎖領域のいずれかを含むマウスから得

10

20

30

40

50

られる2つの選択された単一特異的抗体からのヒト重鎖可変領域を含む2つのヒト重鎖を、マウスに存在する同じ可変領域、またはその体細胞超変異バージョンを含むヒト軽鎖と一緒に好適な細胞株において発現させ；所望の特徴（例えば、2つの抗原について所望の親和性）を含む二重特異的抗体を得る。

【0458】

対象となる抗原に特異的な二重特異的または親単一特異的抗体の、抗原のすべてまたは一部に対する結合を、B I A C O R E（商標）2000装置（G E H e a l t h c a r e）でリアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサーアッセイを使用して決定する。

【0459】

所定の実施形態

実施形態1．遺伝子改変されたげっ歯類であって、その生殖細胞系列ゲノムは、げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含み、

前記遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、前記遺伝子改変されたげっ歯類。

【0460】

実施形態2．前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である、実施形態1に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0461】

実施形態3．前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてヘテロ接合性である、実施形態1に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0462】

実施形態4．前記生殖細胞系列ゲノムは、

1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座をさらに含み、

前記遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及びげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む、実施形態1～3のいずれかに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0463】

実施形態5．前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である、実施形態4に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0464】

実施形態6．前記遺伝子改変されたげっ歯類は、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座でげっ歯類C 遺伝子を欠く、実施形態1～5のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0465】

実施形態7．前記ヒトV 遺伝子セグメントは、V<sub>1</sub>-51、V<sub>5</sub>-45、V<sub>1</sub>-44、V<sub>1</sub>-40、V<sub>3</sub>-21、及びV<sub>2</sub>-14からなる群から選択される、実施形態1～6のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0466】

実施形態8．前記ヒトJ 遺伝子セグメントは、J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>6</sub>、及

10

20

30

40

50

び J<sub>H</sub> 7 からなる群から選択される、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0467】

実施形態 9 . 前記 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1 つ以上の内因性 V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の内因性 D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の内因性 J<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、またはそれらの組み合わせの代わりである、実施形態 4 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0468】

実施形態 10 . 前記 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、1 つ以上の内因性 V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の内因性 D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の内因性 J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントにそれぞれ置き換わる、実施形態 4 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

10

【0469】

実施形態 11 . 前記 1 つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子は、1 つ以上の内因性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子である、実施形態 9 または 10 に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0470】

実施形態 12 .

20

( i ) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 3 - 7 4、V<sub>H</sub> 3 - 7 3、V<sub>H</sub> 3 - 7 2、V<sub>H</sub> 2 - 7 0、V<sub>H</sub> 1 - 6 9、V<sub>H</sub> 3 - 6 6、V<sub>H</sub> 3 - 6 4、V<sub>H</sub> 4 - 6 1、V<sub>H</sub> 4 - 5 9、V<sub>H</sub> 1 - 5 8、V<sub>H</sub> 3 - 5 3、V<sub>H</sub> 5 - 5 1、V<sub>H</sub> 3 - 4 9、V<sub>H</sub> 3 - 4 8、V<sub>H</sub> 1 - 4 6、V<sub>H</sub> 1 - 4 5、V<sub>H</sub> 3 - 4 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 9、V<sub>H</sub> 4 - 3 4、V<sub>H</sub> 3 - 3 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 1、V<sub>H</sub> 3 - 3 0、V<sub>H</sub> 4 - 2 8、V<sub>H</sub> 2 - 2 6、V<sub>H</sub> 1 - 2 4、V<sub>H</sub> 3 - 2 3、V<sub>H</sub> 3 - 2 1、V<sub>H</sub> 3 - 2 0、V<sub>H</sub> 1 - 1 8、V<sub>H</sub> 3 - 1 5、V<sub>H</sub> 3 - 1 3、V<sub>H</sub> 3 - 1 1、V<sub>H</sub> 3 - 9、V<sub>H</sub> 1 - 8、V<sub>H</sub> 3 - 7、V<sub>H</sub> 2 - 5、V<sub>H</sub> 7 - 4 - 1、V<sub>H</sub> 4 - 4、V<sub>H</sub> 1 - 3、V<sub>H</sub> 1 - 2、V<sub>H</sub> 6 - 1、またはそれらの任意の組み合わせを含み、

( i i ) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、D<sub>H</sub> 1 - 1、D<sub>H</sub> 2 - 2、D<sub>H</sub> 3 - 3、D<sub>H</sub> 4 - 4、D<sub>H</sub> 5 - 5、D<sub>H</sub> 6 - 6、D<sub>H</sub> 1 - 7、D<sub>H</sub> 2 - 8、D<sub>H</sub> 3 - 9、D<sub>H</sub> 3 - 10、D<sub>H</sub> 5 - 12、D<sub>H</sub> 6 - 13、D<sub>H</sub> 2 - 15、D<sub>H</sub> 3 - 16、D<sub>H</sub> 4 - 17、D<sub>H</sub> 6 - 19、D<sub>H</sub> 1 - 20、D<sub>H</sub> 2 - 21、D<sub>H</sub> 3 - 22、D<sub>H</sub> 6 - 25、D<sub>H</sub> 1 - 26、D<sub>H</sub> 7 - 27、またはそれらの任意の組み合わせを含み、

30

( i i i ) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、J<sub>H</sub> 1、J<sub>H</sub> 2、J<sub>H</sub> 3、J<sub>H</sub> 4、J<sub>H</sub> 5、J<sub>H</sub> 6、またはそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 4 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0471】

実施形態 13 . 前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、機能性内因性げっ歯類 A d a m 6 遺伝子を欠く、実施形態 4 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

40

【0472】

実施形態 14 . 前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む、実施形態 4 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0473】

実施形態 15 . 前記 1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片は、前記遺伝子改変されたげっ歯類によって発現される、実施形態 14 に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

50

## 【0474】

実施形態16．前記1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に含まれる、実施形態14または15に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【0475】

実施形態17．前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、前記1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む、実施形態14～16のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

10

## 【0476】

実施形態18．前記1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒトAdam6偽遺伝子の代わりである、実施形態14～17のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【0477】

実施形態19．前記1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒトAdam6偽遺伝子に置き換わる、実施形態14～18のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

20

## 【0478】

実施形態20．前記1つ以上のヒトVH遺伝子セグメントは、第1及び第2のヒトVH遺伝子セグメントを含み、前記1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、前記第1のヒトVH遺伝子セグメントと前記第2のヒトVH遺伝子セグメントとの間にある、実施形態14～19のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【0479】

実施形態21．前記第1のヒトVH遺伝子セグメントは、VH1-2であり、前記第2のヒトVH遺伝子セグメントは、VH6-1である、実施形態20に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

30

## 【0480】

実施形態22．前記1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒトVH遺伝子セグメントとヒトDH遺伝子セグメントとの間にある、実施形態14～17のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【0481】

実施形態23．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、(i)マウスC<sub>1</sub>、(ii)マウスC<sub>2</sub>、または(iii)マウスC<sub>3</sub>遺伝子と少なくとも80%同一の配列を有する、実施形態1～22のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【0482】

実施形態24．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、マウスC<sub>1</sub>遺伝子を含む、実施形態1～23のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

40

## 【0483】

実施形態25．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、マウスC<sub>1</sub>遺伝子を含む、実施形態1～23のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【0484】

実施形態26．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、(i)ラットC<sub>1</sub>、(ii)ラットC<sub>2</sub>、(iii)ラットC<sub>3</sub>または(iv)ラットC<sub>4</sub>遺伝子と少なくとも80%同一の配列を有する、実施形態1～22に記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

## 【0485】

50



実施形態 27 . 前記げっ歯類 C 遺伝子は、ラット C 遺伝子を含む、実施形態 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0486】

実施形態 28 . 前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、1 つ以上のげっ歯類 V 遺伝子セグメント、1 つ以上のげっ歯類 J 遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせの代わりである、実施形態 1 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0487】

実施形態 29 . 前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、1 つ以上のげっ歯類 V 遺伝子セグメント、1 つ以上のげっ歯類 J 遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせに置き換わる、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0488】

実施形態 30 . 不活性化内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座をさらに含む、実施形態 1 ~ 29 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0489】

実施形態 31 . 前記内因性 V 遺伝子セグメント、前記内因性 J 遺伝子セグメント、及び前記内因性 C 遺伝子は、全体としてまたは部分的に欠失されている、実施形態 1 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0490】

実施形態 32 . 前記げっ歯類は、内因性免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを検出可能に発現しない、実施形態 1 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0491】

実施形態 33 . 前記遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、実施形態 1 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0492】

実施形態 34 . 前記げっ歯類は、ラットまたはマウスである、実施形態 1 ~ 33 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類。

【0493】

実施形態 35 . 第 1 の遺伝子改変されたげっ歯類、第 2 の遺伝子改変されたげっ歯類、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類を含む遺伝子改変されたげっ歯類の繁殖コロニーであって、前記第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類は、前記第 1 の遺伝子改変されたげっ歯類及び前記第 2 の遺伝子改変されたげっ歯類の子孫であり、前記第 1、第 2、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類はそれぞれ、それらの生殖細胞系列ゲノムにおいて、

げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含み、

前記第 1、第 2、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、前記繁殖コロニー。

【0494】

実施形態 36 . 前記第 1、第 2、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である、実施形態 35 に記載の繁殖コロニー。

【0495】

実施形態 37 . 前記第 1、第 2、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類の各々の前記修

10

20

30

40

50

飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座における前記ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4 からなる群から選択される、実施形態 3 5 または 3 6 に記載の繁殖コロニー。

【0496】

実施形態 3 8 . 前記第 1、第 2、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類の各々の前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座における前記ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7 からなる群から選択される、実施形態 3 5 ~ 3 7 のいずれか 1 つに記載の繁殖コロニー。

【0497】

実施形態 3 9 . 前記第 1、第 2、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類はそれぞれ、それらの生殖細胞系列ゲノムにおいて、

1 つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された 1 つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、

前記遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及びげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む、実施形態 3 5 ~ 3 8 のいずれか 1 つに記載の繁殖コロニー。

【0498】

実施形態 4 0 . 前記第 1、第 2、及び第 3 の遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である、実施形態 3 9 に記載の繁殖コロニー。

【0499】

実施形態 4 1 . げっ歯類胚であって、そのゲノムは、げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含み、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む、前記げっ歯類胚。

【0500】

実施形態 4 2 . 前記げっ歯類胚の前記ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である、実施形態 4 1 に記載のげっ歯類胚。

【0501】

実施形態 4 3 . 前記ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4 からなる群から選択される、実施形態 4 1 または 4 2 に記載のげっ歯類胚。

【0502】

実施形態 4 4 . 前記ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7 からなる群から選択される、実施形態 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 つに記載のげっ歯類胚。

【0503】

実施形態 4 5 . 1 つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された 1 つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座をさらに含む、実施形態 4 1 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載のげっ歯類胚。

【0504】

実施形態 4 6 . 前記げっ歯類胚の前記ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてホモ接合性である、実施形態 4 5 に記載のげっ歯類胚。

【0505】

実施形態 4 7 . 実施形態 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類の

B細胞であって、  
前記修飾された内因性 軽鎖遺伝子座の前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む、前記B細胞。

## 【0506】

実施形態48．実施形態4～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞であって、

前記修飾された内因性 軽鎖遺伝子座の前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョン；及び

前記修飾された内因性重鎖遺伝子座において前記1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントのヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、前記1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメントのヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び前記1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントのヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントに由来する再編成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、前記遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞。

10

## 【0507】

実施形態49．実施形態47または48に記載のB細胞から生成されたハイブリドーマ。

## 【0508】

実施形態50．単一の遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞の集団であって、その生殖細胞系列ゲノムにおいて、

(a) げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトJ 遺伝子セグメントに機能可能に連結されたヒトV 遺伝子セグメントを含む、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座、及び

20

(b) 1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、

前記B細胞の集団によって発現されるすべての抗体は、

30

(i) 前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン、及び

(ii) 少なくとも2つの異なる再編成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現される複数のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む、前記B細胞の集団。

## 【0509】

実施形態51．げっ歯類C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を含む幹細胞であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒトV 遺伝子セグメント及びヒトJ 遺伝子セグメントを含む、前記幹細胞。

40

## 【0510】

実施形態52．前記幹細胞の前記ゲノムは、前記修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座についてホモ接合性である、実施形態51に記載の幹細胞。

## 【0511】

実施形態53．前記ヒトV 遺伝子セグメントは、V<sub>1</sub>-51、V<sub>5</sub>-45、V<sub>1</sub>-44、V<sub>1</sub>-40、V<sub>3</sub>-21、及びV<sub>2</sub>-14からなる群から選択される、実施形態51または52に記載の幹細胞。

## 【0512】

実施形態54．前記ヒトV 遺伝子セグメントは、J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>6</sub>、及びJ<sub>7</sub>からなる群から選択される、実施形態51～53のいずれか1つに記載の幹細胞

50

胞。

【0513】

実施形態55．1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含む修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座をさらに含む、実施形態51～54のいずれか1つに記載の幹細胞。

【0514】

実施形態56．抗体を発現する哺乳動物細胞であって、前記抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含む重鎖及びヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む軽鎖を  
10  
含み、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン、前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン、またはその両方は、実施形態4～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類から同定された、前記哺乳動物細胞。

【0515】

実施形態57．

(a) 実施形態1～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象とする抗原に曝露する工程；

(b) 前記遺伝子改変されたげっ歯類が前記対象となる抗原に対する免疫反応を生成するのに十分な条件下で前記遺伝子改変されたげっ歯類を維持する工程；及び

(c) 前記遺伝子改変されたげっ歯類から、  
20

(i) 前記対象となる抗原に結合する抗体、

(i i) 前記対象となる抗原に結合する抗体のヒト軽鎖もしくは重鎖可変ドメイン、軽鎖、または重鎖をコードするヌクレオチド、または

(i i i) 前記対象となる抗原に結合する抗体を発現する細胞

を回収する工程

を含む方法によって調製される抗体であって、

(c) の抗体は、ヒト重鎖可変及びヒト 軽鎖可変ドメインを含む、前記抗体。

【0516】

実施形態58．抗体を作製する方法であって、前記方法は、

(a) 実施形態1～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を抗原に曝  
30  
露すること；

(b) 前記遺伝子改変されたげっ歯類が前記抗原に対する免疫反応を起こすことを可能にすること；及び

(c) 前記遺伝子改変されたげっ歯類から前記抗原に特異的な抗体、前記抗原に特異的な抗体を発現するB細胞、または前記抗原に特異的な抗体をコードする1つ以上のヌクレオチド配列を単離すること

を含む、前記方法。

【0517】

実施形態59．抗体を作製する方法であって、

(a) 哺乳動物細胞において2つのヒト免疫グロブリン 軽鎖及び2つのヒト免疫グロ  
40  
ブリン重鎖を含む前記抗体を発現させる工程であって、各ヒト免疫グロブリン 軽鎖は、ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含み、各ヒト免疫グロブリン重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含み、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインの少なくとも1つ、前記 軽鎖可変ドメインの少なくとも1つ、またはそれらの組み合わせのアミノ酸配列は、実施形態1～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類において同定された、前記発現させる工程；及び

(b) 前記抗体を得る工程

を含む、前記方法。

【0518】

実施形態60．前記抗体は、二重特異的抗体である、実施形態58または59に記載の  
50

方法。

【0519】

実施形態61．二重特異的抗体を作製する方法であって、前記方法は、

- (a) 実施形態1～35のいずれか1つに記載の第1の遺伝子改変されたげっ歯類を第1の抗原の第1のエピトープと接触させること、
  - (b) 実施形態1～35のいずれか1つに記載の第2の遺伝子改変されたげっ歯類を第2の抗原の第2のエピトープと接触させること、
  - (c) 前記第1の遺伝子改変されたげっ歯類から前記第1の抗原の前記第1のエピトープに特異的な第1の抗体を発現するB細胞を単離し、前記第1の抗体の第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；
  - (d) 前記第2の遺伝子改変されたげっ歯類から前記第2の抗原の前記第2のエピトープに特異的な第2の抗体を発現するB細胞を単離し、前記第2の抗体の第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを決定すること；
  - (e) 前記第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、第1のヒト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列と機能可能に連結させて第1のヒト重鎖をコードする第1のヌクレオチド配列を生成すること；
  - (f) 前記第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、第2のヒト免疫グロブリン定常ドメインをコードするヌクレオチド配列と機能可能に連結させて第2のヒト重鎖をコードする第2のヌクレオチド配列を生成すること；
  - (g) 哺乳動物細胞において、
  - (i) 第1のヌクレオチド配列；
  - (ii) 第2のヌクレオチド配列；及び
  - (iii) ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域に機能可能に連結された前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンを含む第3のヌクレオチド配列
- を発現させること  
を含む、前記方法。

【0520】

実施形態62．二重特異的抗体を作製する方法であって、前記方法は、

- (a) 哺乳動物細胞において、
  - (i) 第1のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第1のヌクレオチド配列；
  - (ii) 第2のヒト免疫グロブリン定常領域に機能可能に連結された第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第2のヌクレオチド配列；及び
  - (iii) ヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域に機能可能に連結されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含む第3のヌクレオチド配列
- を発現させることを含み、
- 前記第1のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第1の抗原の第1のエピトープで免疫された第1の遺伝子改変されたげっ歯類における第1の抗体から同定された第1のヒト重鎖可変ドメインをコードし、前記第1の抗体は、前記第1の抗原の前記第1のエピトープに特異的に結合し；
- 前記第2のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域は、第2の抗原の第2のエピトープで免疫された第2の遺伝子改変されたげっ歯類における第2の抗体から同定された第2のヒト重鎖可変ドメインをコードし、前記第2の抗体は、前記第2の抗原の前記第2のエピトープに特異的に結合し；
- 前記第1及び第2の遺伝子改変されたげっ歯類はそれぞれ、実施形態4～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類であり；
- 前記第3のヌクレオチドの前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンである、前記方法。

10

20

30

40

50

## 【0521】

実施形態63．前記第1及び第2の遺伝子改変されたげっ歯類は、同一の遺伝子改変されたげっ歯類である、実施形態59または62に記載の方法。

## 【0522】

実施形態64．前記第1及び第2の遺伝子改変されたげっ歯類は、異なる遺伝子改変されたげっ歯類である、実施形態59または62に記載の方法。

## 【0523】

実施形態65．前記第1及び第2の抗原は、同じ抗原であり、前記第1及び第2のエピトープは、異なるエピトープである、実施形態59～64のいずれか1つに記載の方法。

## 【0524】

実施形態66．前記第1及び第2の抗原は、異なる抗原である、実施形態59～64のいずれか1つに記載の方法。

## 【0525】

実施形態67．ヒト免疫グロブリン重鎖を作製するための方法であって、前記方法は、  
 (a) 実施形態4～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；

(b) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列を得る工程；及び

(c) ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメイン配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン重鎖を形成する工程

を含む、前記方法。

## 【0526】

実施形態68．実施形態67に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン重鎖。

## 【0527】

実施形態69．ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインを作製するための方法であって、前記方法は、

(a) 実施形態4～34のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び

(b) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列を得る工程

を含む、前記方法。

## 【0528】

実施形態70．実施形態69に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン。

## 【0529】

実施形態71．ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションを作製する方法であって、

(a) 実施形態4～35のいずれか1つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露すること、及び

(b) 前記遺伝子改変されたげっ歯類から前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションを単離すること

を含み、

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのコレクションはそれぞれ、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインに結合し、

前記コレクションにおける前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインのいずれか1つと対合した前記ヒト 軽鎖可変ドメインは、前記抗原に結合する、前記方法。

## 【0530】

実施形態72．ヒト免疫グロブリン 軽鎖を作製するための方法であって、前記方法は

10

20

30

40

50

、  
 ( a ) 実施形態 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列を得る工程；及び

( c ) 前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列をヒト免疫グロブリン 軽鎖定常ドメイン配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン 軽鎖を形成する工程を含む、前記方法。

【 0 5 3 1 】

実施形態 7 3 . 実施形態 7 2 に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖。 10

【 0 5 3 2 】

実施形態 7 4 . ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを生成するための方法であって、前記方法は、

( a ) 実施形態 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列を得る工程を含む、前記方法。

【 0 5 3 3 】

実施形態 7 5 . 実施形態 7 4 に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン。 20

【 0 5 3 4 】

実施形態 7 6 . ヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を作製するための方法であって、前記方法は、

( a ) 実施形態 4 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を得る工程；及び 30

( c ) 前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域をヒト免疫グロブリン重鎖定常領域配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列を形成する工程を含む、前記方法。

【 0 5 3 5 】

実施形態 7 7 . 実施形態 7 6 に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン重鎖をコードするヌクレオチド配列。

【 0 5 3 6 】

実施形態 7 8 . ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含むヌクレオチド配列を作製するための方法であって、前記方法は、 40

( a ) 実施形態 4 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を得る工程

を含む、前記方法。

【 0 5 3 7 】

実施形態 7 9 . 実施形態 7 8 に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン重鎖可変領域を含むヌクレオチド配列。

【 0 5 3 8 】

実施形態 80 .

ヒト免疫グロブリン 軽鎖をコードするヌクレオチド配列を作製するための方法であって、前記方法は、

( a ) 実施形態 1 ~ 34 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を得る工程；及び

( c ) 前記ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域をヒト免疫グロブリン 軽鎖定常領域配列に機能可能に連結させてヒト免疫グロブリン 軽鎖をコードするヌクレオチド配列を形成する工程

を含む、前記方法。

【0539】

実施形態 81 . 実施形態 80 に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖をコードするヌクレオチド配列。

【0540】

実施形態 82 . ヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むヌクレオチド配列を作製するための方法であって、前記方法は、

( a ) 実施形態 1 ~ 34 のいずれか 1 つに記載の遺伝子改変されたげっ歯類を対象となる抗原に曝露する工程；及び

( b ) 前記抗原に特異的に結合し、かつ前記遺伝子改変されたげっ歯類によって生成された抗体のヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメイン配列をコードするヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を得る工程

を含む、前記方法。

【0541】

実施形態 83 . 実施形態 82 に記載の方法によって生成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むヌクレオチド配列。

【0542】

実施形態 84 . ターゲティングベクターであって、

( i ) 内因性げっ歯類 軽鎖遺伝子座における 5 ' 標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む 5 ' ホモロジーアーム；

( i i ) V 遺伝子セグメント及び J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域；

( i i i ) げっ歯類 C 遺伝子セグメント；及び

( i v ) 前記内因性げっ歯類 軽鎖遺伝子座における 3 ' 標的配列に対応するヌクレオチド配列を含む 3 ' ホモロジーアーム

を含む、前記ターゲティングベクター。

【0543】

実施形態 85 . 前記ヒト V 遺伝子セグメントは、V<sub>1-51</sub>、V<sub>5-45</sub>、V<sub>1-44</sub>、V<sub>1-40</sub>、V<sub>3-21</sub>、及び V<sub>2-14</sub> からなる群から選択される、実施形態 84 に記載のターゲティングベクター。

【0544】

実施形態 86 . 前記ヒト J 遺伝子セグメントは、J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、J<sub>3</sub>、J<sub>6</sub>、及び J<sub>7</sub> からなる群から選択される、実施形態 84 または 85 に記載のターゲティングベクター。

【0545】

実施形態 87 . 遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法であって、

( a ) ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 ES 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程；及び

10

20

30

40

50



(b) 工程 (a) において生成された前記げっ歯類 E S 細胞を使用してげっ歯類を生成する工程を含む、前記方法。

【0546】

実施形態 88 . 遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法であって、

(a) げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 E S 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記導入する工程；及び

(b) 工程 (a) において生成された前記げっ歯類 E S 細胞を使用してげっ歯類を生成する工程を含む、前記方法。

【0547】

実施形態 89 . 前記げっ歯類 E S 細胞のゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座で 1 つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む、実施形態 87 または 88 に記載の方法。

【0548】

実施形態 90 . 遺伝子改変されたげっ歯類 E S 細胞を作製する方法であって、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 E S 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程を含む、前記方法。

【0549】

実施形態 91 . 遺伝子改変されたげっ歯類 E S 細胞を作製する方法であって、げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を、げっ歯類 E S 細胞のゲノムにおける修飾された内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座に導入する工程であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記導入する工程を含む、前記方法。

【0550】

実施形態 92 . 前記げっ歯類 E S 細胞の前記ゲノムは、修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座で 1 つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された 1 つ以上の非再編成ヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメント、及び 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含む、実施形態 90 または 91 に記載の方法。

【0551】

実施形態 93 . 遺伝子改変されたげっ歯類を作製する方法であって、

(a) 前記げっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座を、げっ歯類 C 遺伝子セグメントに機能可能に連結された単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域を含むように修飾する工程であって、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域は、ヒト V 遺伝子セグメント及びヒト J 遺伝子セグメントを含む、前記修飾する工程を含み、

これにより前記遺伝子改変されたげっ歯類の B 細胞によって発現されるすべての免疫グロブリン 軽鎖は、前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン 軽鎖可変領域またはその体細胞超変異バージョンから発現されるヒト免疫グロブリン 軽鎖可変ドメインを含む、前記方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 5 5 2 】

実施形態 9 4 . 前記方法は、

( b ) 前記げっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムにおける内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座を、1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子に機能可能に連結された1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントを含むように修飾する工程をさらに含み、

これにより前記遺伝子改変されたげっ歯類のB細胞によって発現されるすべての重鎖は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメイン及びげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含む、実施形態 9 3 に記載の方法。

10

## 【 0 5 5 3 】

実施形態 9 5 . 工程 ( a ) 及び / または工程 ( b ) は、げっ歯類ES細胞において行われる、実施形態 9 3 または 9 4 に記載の方法。

## 【 0 5 5 4 】

実施形態 9 6 . 前記内因性免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は、げっ歯類C 遺伝子を欠く、実施形態 9 3 ~ 9 5 のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 5 5 5 】

実施形態 9 7 . 前記ヒトV 遺伝子セグメントは、V 1 - 5 1、V 5 - 4 5、V 1 - 4 4、V 1 - 4 0、V 3 - 2 1、及びV 2 - 1 4 からなる群から選択される、実施形態 9 3 ~ 9 6 のいずれか1つに記載の方法。

20

## 【 0 5 5 6 】

実施形態 9 8 . 前記ヒトJ 遺伝子セグメントは、J 1、J 2、J 3、J 6、及びJ 7 からなる群から選択される、実施形態 9 3 ~ 9 7 のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 5 5 7 】

実施形態 9 9 . 前記1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、1つ以上の内因性V<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の内因性D<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の内因性J<sub>H</sub>遺伝子セグメント、またはそれらの組み合わせの代わりである、実施形態 9 4 ~ 9 8 のいずれか1つに記載の方法。

30

## 【 0 5 5 8 】

実施形態 1 0 0 . 前記1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の非再編成ヒトD<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の非再編成ヒトJ<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、1つ以上の内因性V<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上の内因性D<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び1つ以上の内因性J<sub>H</sub>遺伝子セグメントにそれぞれ置き換わる、実施形態 9 4 ~ 9 9 のいずれか1つに記載の方法。

## 【 0 5 5 9 】

実施形態 1 0 1 . 前記1つ以上のげっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子は、1つ以上の内因性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子である、実施形態 9 4 ~ 1 0 0 のいずれか1つに記載の方法。

40

## 【 0 5 6 0 】

実施形態 1 0 2 .

( i ) 前記1つ以上の非再編成ヒトV<sub>H</sub>遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 3 - 7 4、V<sub>H</sub> 3 - 7 3、V<sub>H</sub> 3 - 7 2、V<sub>H</sub> 2 - 7 0、V<sub>H</sub> 1 - 6 9、V<sub>H</sub> 3 - 6 6、V<sub>H</sub> 3 - 6 4、V<sub>H</sub> 4 - 6 1、V<sub>H</sub> 4 - 5 9、V<sub>H</sub> 1 - 5 8、V<sub>H</sub> 3 - 5 3、V<sub>H</sub> 5 - 5 1、V<sub>H</sub> 3 - 4 9、V<sub>H</sub> 3 - 4 8、V<sub>H</sub> 1 - 4 6、V<sub>H</sub> 1 - 4 5、V<sub>H</sub> 3 - 4 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 9、V<sub>H</sub> 4 - 3 4、V<sub>H</sub> 3 - 3 3、V<sub>H</sub> 4 - 3 1、V<sub>H</sub> 3 - 3 0、V<sub>H</sub> 4 - 2 8、V<sub>H</sub> 2 - 2 6、V<sub>H</sub> 1 - 2 4、V<sub>H</sub> 3 - 2 3、V<sub>H</sub> 3 - 2 1、V<sub>H</sub> 3 - 2 0、V<sub>H</sub> 1 - 1 8、V<sub>H</sub> 3 - 1 5、V<sub>H</sub> 3 - 1 3、V<sub>H</sub> 3 - 1 1、V<sub>H</sub> 3 - 9、V<sub>H</sub> 1 - 8、V<sub>H</sub> 3 - 7、V<sub>H</sub> 2 - 5、V<sub>H</sub> 7 - 4 - 1、V<sub>H</sub> 4 - 4、V<sub>H</sub> 1 - 3、V<sub>H</sub> 1 - 2、V<sub>H</sub> 6 - 1、またはそれらの任意の組

50

み合わせを含み、

( i i ) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト D<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、D<sub>H</sub> 1 - 1、D<sub>H</sub> 2 - 2、D<sub>H</sub> 3 - 3、D<sub>H</sub> 4 - 4、D<sub>H</sub> 5 - 5、D<sub>H</sub> 6 - 6、D<sub>H</sub> 1 - 7、D<sub>H</sub> 2 - 8、D<sub>H</sub> 3 - 9、D<sub>H</sub> 3 - 10、D<sub>H</sub> 5 - 12、D<sub>H</sub> 6 - 13、D<sub>H</sub> 2 - 15、D<sub>H</sub> 3 - 16、D<sub>H</sub> 4 - 17、D<sub>H</sub> 6 - 19、D<sub>H</sub> 1 - 20、D<sub>H</sub> 2 - 21、D<sub>H</sub> 3 - 22、D<sub>H</sub> 6 - 25、D<sub>H</sub> 1 - 26、D<sub>H</sub> 7 - 27、またはそれらの任意の組み合わせを含み、

( i i i ) 前記 1 つ以上の非再編成ヒト J<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、J<sub>H</sub> 1、J<sub>H</sub> 2、J<sub>H</sub> 3、J<sub>H</sub> 4、J<sub>H</sub> 5、J<sub>H</sub> 6、またはそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態 94 ~ 101 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 1 】

実施形態 103 . 前記内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、機能性内因性げっ歯類 A d a m 6 遺伝子を欠く、実施形態 94 ~ 102 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 2 】

実施形態 104 . 前記遺伝子改変されたげっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む、実施形態 94 ~ 103 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 3 】

実施形態 105 . 前記 1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片は、前記遺伝子改変されたげっ歯類によって発現される、実施形態 104 に記載の方法。

【 0 5 6 4 】

実施形態 106 . 前記 1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列は、前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上に含まれる、実施形態 104 または 105 に記載の方法。

【 0 5 6 5 】

実施形態 107 . 前記修飾された内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座は、前記 1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む、実施形態 104 ~ 106 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 6 】

実施形態 108 . 前記 1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列は、ヒト A d a m 6 偽遺伝子の代わりである、実施形態 104 ~ 107 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 7 】

実施形態 109 . 前記 1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列は、ヒト A d a m 6 偽遺伝子に置き換わる、実施形態 104 ~ 108 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 8 】

実施形態 110 . 前記 1 つ以上のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、第 1 及び第 2 のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントを含み、前記 1 つ以上のげっ歯類 A D A M 6 ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列は、前記第 1 のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントと前記第 2 のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントとの間にある、実施形態 104 ~ 109 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 5 6 9 】

実施形態 111 . 前記第 1 のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 1 - 2 であり、前記第 2 のヒト V<sub>H</sub> 遺伝子セグメントは、V<sub>H</sub> 6 - 1 である、実施形態 110 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【0570】

実施形態112．前記1つ以上のげっ歯類ADAM6ポリペプチド、その機能性オルソログ、機能性ホモログ、または機能性断片をコードする1つ以上のヌクレオチド配列は、ヒトVH遺伝子セグメントとヒトDH遺伝子セグメントとの間にある、実施形態104～111のいずれか1つに記載の方法。

## 【0571】

実施形態113．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、(i)マウスC<sub>1</sub>、(ii)マウスC<sub>2</sub>、または(iii)マウスC<sub>3</sub>遺伝子と少なくとも80%同一の配列を有する、実施形態93～112のいずれか1つに記載の方法。

## 【0572】

実施形態114．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、マウスC<sub>1</sub>遺伝子を含む、実施形態93～113のいずれか1つに記載の方法。

## 【0573】

実施形態115．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、マウスC<sub>1</sub>遺伝子を含む、実施形態93～114のいずれか1つに記載の方法。

## 【0574】

実施形態116．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、(i)ラットC<sub>1</sub>、(ii)ラットC<sub>2</sub>、(iii)ラットC<sub>3</sub>、または(iv)ラットC<sub>4</sub>遺伝子と少なくとも80%同一の配列を有する、実施形態93～112のいずれか1つに記載の方法。

## 【0575】

実施形態117．前記げっ歯類C<sub>1</sub>遺伝子は、ラットC<sub>1</sub>遺伝子を含む、実施形態93～112のいずれか1つに記載の方法。

## 【0576】

実施形態118．前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域は、1つ以上のげっ歯類V<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のげっ歯類J<sub>H</sub>遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせの代わりである、実施形態93～117のいずれか1つに記載の方法。

## 【0577】

実施形態119．前記単一の再編成されたヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域は、1つ以上のげっ歯類V<sub>H</sub>遺伝子セグメント、1つ以上のげっ歯類J<sub>H</sub>遺伝子セグメント、またはそれらの任意の組み合わせに置き換わる、実施形態93～118のいずれか1つに記載の方法。

## 【0578】

実施形態120．前記げっ歯類の前記生殖細胞系列ゲノムは、不活性化内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座をさらに含む、実施形態93～119のいずれか1つに記載の方法。

## 【0579】

実施形態121．前記内因性V<sub>H</sub>遺伝子セグメント、前記内因性J<sub>H</sub>遺伝子セグメント、及び前記内因性C<sub>H</sub>遺伝子は、全体としてまたは部分的に欠失されている、実施形態93～120のいずれか1つに記載の方法。

## 【0580】

実施形態122．前記げっ歯類は、ラットまたはマウスである、実施形態93～121のいずれか1つに記載の方法。

## 【0581】

均等物

本開示に対する様々な変更、改変、及び改善が当業者に容易に思いつくことが当業者によって理解されるべきである。そのような変更、改変、及び改善は、本開示の一部であることが意図されており、本発明の趣旨及び範囲内であることが意図されている。したがって、前述の説明及び図面は、例示に過ぎず、以下の特許請求の範囲によってさらに詳細に記載されている場合、本開示に記載の任意の発明である。

10

20

30

40

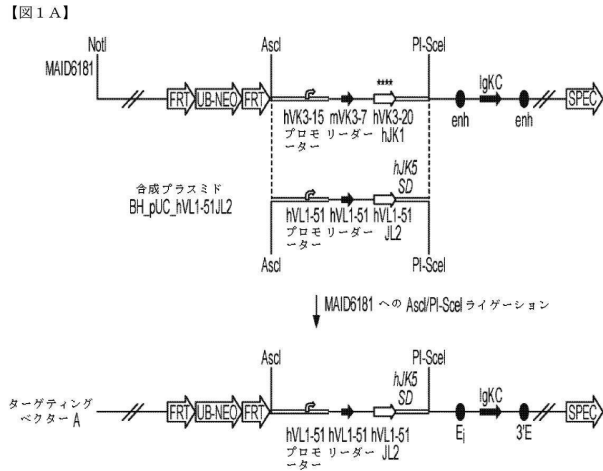
50

【 0 5 8 2 】

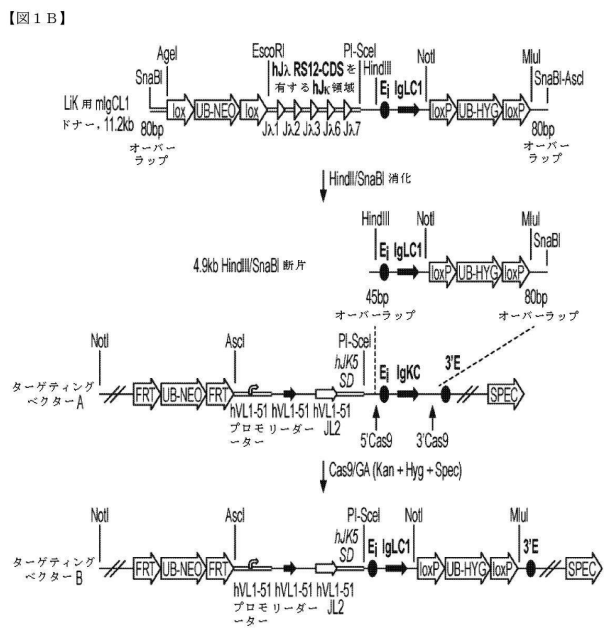
当業者は、本明細書に記載されるアッセイまたは他のプロセスで得られた値に起因する逸脱または誤差の典型的な基準を理解する。本発明の背景技術を説明するために及びその実施に関する追加の詳細を提供するために本明細書で参照された刊行物、ウェブサイト及び他の参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 図 面 】

【 図 1 A 】



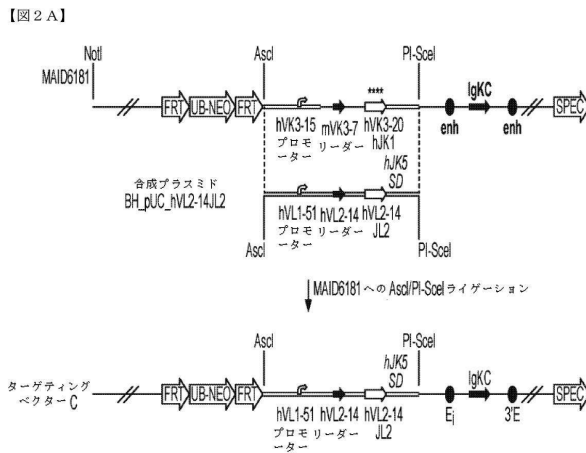
【 図 1 B 】



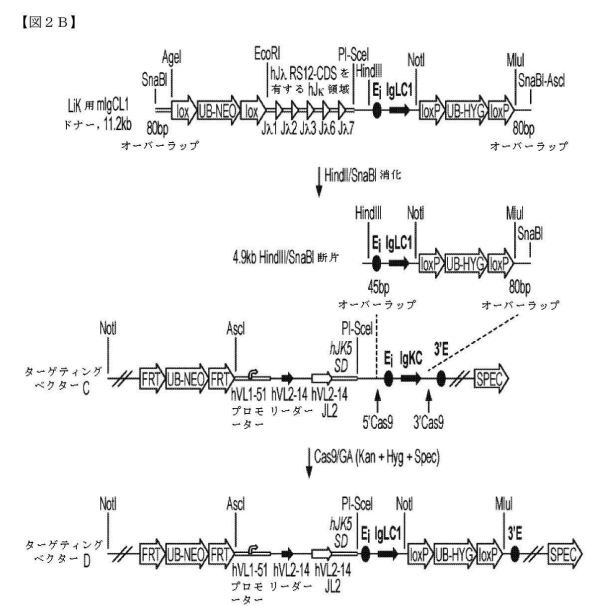
10

20

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



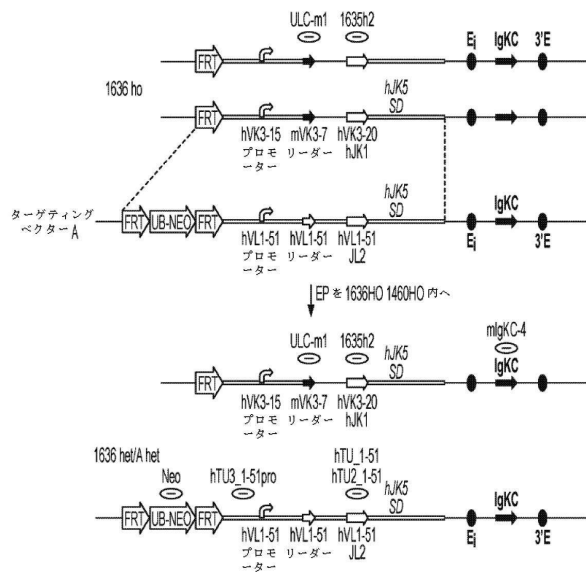
30

40

50

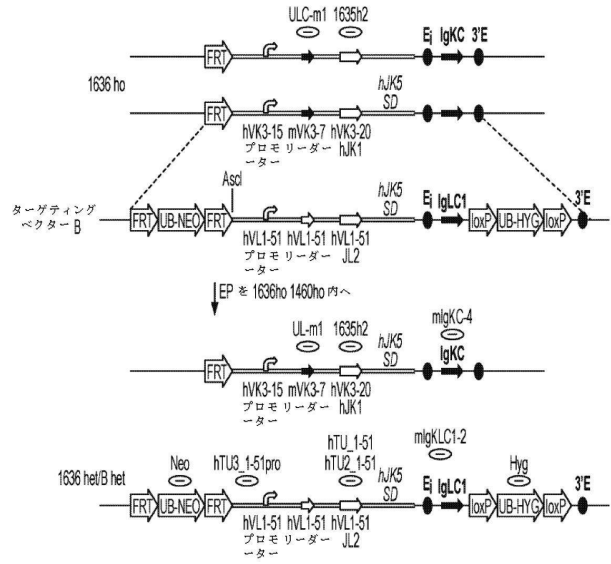
【 図 3 】

【 図 3 】



【 図 4 】

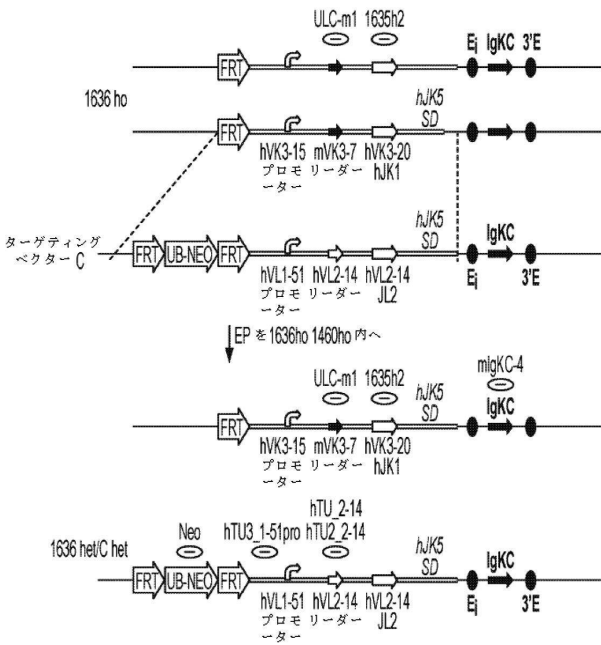
【 図 4 】



10

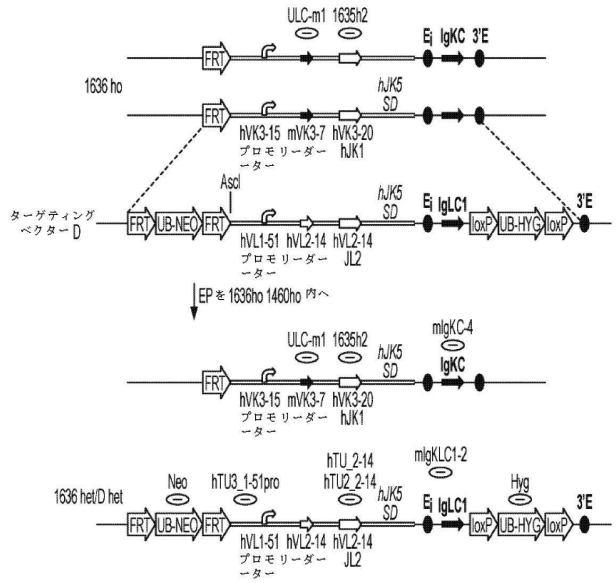
【 図 5 】

【 図 5 】



【 図 6 】

【 図 6 】



20

30

40

50

【 図 7 】

【 図 7 】

マウスCκのヌクレオチド配列 (配列番号 25) :

GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCAICTTCCCAACCATCCAGTGAGCAGT
TAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACACTTCTACCCCC
AAGACATCAATGTC AAGTGGAAGATGTATGGCAGTGAAACGACAAAATGGC
GTCTGAAACAGTGGAGCTGATCAGGACAGCAAAAGACAGCACCTACAGCAT
GAGCAGACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCT
ATACCTGTGAGGCCACTCAAAAGACATCACTTCAACCATGTCAAGAGCT
TCAACAGGAATGATGTGTAAGACAAGAGTCCTGTAGAGGCCACCACCAGCTC
CCCAGCTCCATCCTATCTCCCTCTAAAGTCTTGGAGGCTTCCCCACAAAGGA
CCTACCACTGTTGGGTGCCTCCAAACCTCCTCCCACTCCTTCTCCTCCCTCCT
CCTTCCCTTGGCTTATTATCATGCTATAATTTGCAAGAAAATATTCATAATAAAGTGAGT
CTTTGCACTTGA

【 図 8 】

【 図 8 】

ラットCκのヌクレオチド配列 (配列番号 27) :

GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCTATCTTCCCAACCATCCACGGAAACAGT
TAGCAACTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCCCTCATGAAACAACACTTCTATCCCA
GAGACATCAGTGCAAGTGGAAAGTATGATGGCACTGAAACGACGGAGATGTT
GTCTTGGACAGTGTACTGTATCAGGACAGCAAAAGACAGCACGTACAGCAT
GAGCAGCACCCCTCGTTGACCAAGGCTGACTATGAAAGTCATAAACCCTTA
TACCTGTGAGGTTGTTCATAAGACATCATCCCTACGCCGTCTCAAGAGCTTT
CAACAGGAATGAGTGTAGACCCAAAAGTCTTGAGGTGCCACCTGTCCCTCCCA
GCTCCTCCAACTCCTTAAAGGTTGAGACTTCCCACTTCCCAAGCGACCTA
CCACTGTTGGGTGCCTCAAAACCTCCTCCCAACTCATCCTCCTTCTCTTCTTGG
GCTTTGATCATGCTATAATTTGGGGAATATTAATAAAGTGATCTTTTGCACCTTGA

【 図 9 A 】

【 図 9 A 】

修飾された Vλ1-51/Jλ2 ペカナーのヌクレオチド配列 (配列番号 31)

GGCGCGCCaccigaglgatccctgagagacgggtcctgacatccctccatggagccgggagatccatccctgcttccaaatcaggaact
agggtgactctggagaglgagcagaaggcttctgcatatcttcaagagattcggagtcactgactcttcttcaagacttaaaacacaaatacaatccatctcattctt
cgtaaaggaccattcttcttcttggggagcctcctcttcttctcctggagcagccttggaccatggcctctctggctcaagccctgctctcctgggtctgcttggcc
ttctctgctctcagccccaagggctgggagcacaaggcaccggcggccggcccaatgtttttgttttggagatgggggtttcaacatgctggcagaat
gggttctgtactcttggactctgatacaccggcctggtccctcccaagggcctggggaattcagggcctggatggtgtgcacagggcctggccctgcatcagctggac
ctggctgtcctcaaatcccnaactcaaggtaccctactcctgcccamaaggtctggggaaagcagggcctggacacagggcgtggcacaagggccggccctgcatcagcctgct
gggtgcatgtaaaacctcatgggtacacagcctgggtgacagcactcaacagagaaataaactctctgctctccaacacactggggtatcccccaaaaagaatggtt
gggtccaaggtgcatcctgcaagaactctgcatcacaataatgttcttcaataaaaggttatctgttcttctcagttatgttttaataagatcatctctgagtctc
attaacatcaaaaagaaataattctctctcattttgagacagcctgaaaacactcattatgatttgaaacagatattcttcaaaacatccctggaaatggggtgactcaaa
agctaacctgctgcatggcctcaacctggagagcctggtgtcaaaaagcctaaaggttttaattcttcaattcctcaaaatcagggcctatattgtctgtttgctctttgaca
cactgcaaaagtcttccagactcctcctgcaaggacgtgagggacactcagggagcctgagggactcctgggtgcacagagatccagatgactgactgagctgacgaa

【 図 9 B 】

【 図 9 B 】

修飾された Vλ1-51/Jλ2 ペカナーのヌクレオチド配列 (配列番号 31) (続き)

gctggaaagaagagagacaagaatgatttaaccaataaaccctctgagaaatggccccagcattcttggagggggaagagctcctctattggaccag
cactgcaaatcccaagaggaagacaagctcctggcccacagggagcagcccacagacagaaagagggagcccgggtgctcccacagaggtggaggaatg
agttccattggggctgggtcagctctgattctgattcactgataaaggactttgtggactaccaccctgagctctatacaggtgactgaaacagcaaggagact
ggcagatfcaacctggaggaaacccagtagaaatgtagggctgcccctggggcagaaagagactcctggggggctgctggcccctggccctgatgg
ggaggggcgatggagacaacaagggggggaggggggggggtgtcttggaggggcctggtctatcacaatgggtggtgagatgctgcaacctgg
gacactagggggggcccctggcccaccattctgagagaagacgggggtgtagaaagagggacagggaccaggcccactgctctggctggccctgatgg
gctcaagatgctaactctaccctggggaccacacagcccactggcactctctgactcctcaggcagagaggctgacccaggccagggcoca
gggtgggactcagaagaagcctggagggtctgattggcagtgagaggaccttctcctagatataaaggggggcccaggagagactgggggaagcctgg
cttcagctggAGGGCAGAGGCAGGACTCGGACAAATCTTCATCAGCTGCTCCCTCTCCTC
CTCACCTTCTCATTCACTGCACAGgtggcccaacacaggggtcaggggggggggggggacgggaagcccagggccctggctctcct
ttctcttctctctagacaagaataaccctggctggctgctctctctctcctggcttcag

【 9 C 】

【図 9 C】

図 9 C を含む再編成された VA1-51/JA2 ベクターのヌクレオチド配列 (配列番号 31) (続き)

GGTCTGGGGCCCACTCTGTGTTGACCGCAGCCGCCCTCACTGTTCTGGGGCCCCAGGA  
 CAGAAGGTCAACCATCTCTGTGCTCTGGAAAGCAGCTCCAAACATTTGGGAATAATATGATAT  
 CCTGGTACCAGCAAGCTCCCAAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCAATTTATGACAATAATAA  
 GCGACCCCTCAGGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAAGTCTGGCACGTCAGCCAC  
 CCTGGGCATCACCGGACTCCAGACTGGGACGAGGCCGATTAATTACTGCGGGAACAATG  
GGATAGACGCTGAGTGTCTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTAGct  
 agtataattttccattttctgaataatttggctctgactggccagattttgaccttttttagaggcttaanaataagctttggtaanaagattggtaaatggggg  
 atttaagattggccatggggtgcaaatgtaaacctcgcctcaanaattggctttggggaataanaangattanaattgtctcaaacgaatgaatgacacata  
 gtaaaaaaanaaagtgttaactaaanaaangggacacctgtgtttcttaaggggcaaaaatgaatattttttttttcttcactctgccaatattgtatgttgt  
 gctgattatgcaatgatacagaaaaggcaaaaalacattttttttagttttccctttttggtttgtaaatattttttgtcagaccacaaataaanaaatcaatag  
 caccgcccataagatGCCATTTCATTACCTCTTTCTCCCGCACCCCGACATAGAT

【 10 】

【図 10】

VA1-51 イントロンを含む再編成された VA1-51/JA2 可変領域のヌクレオチド配列 (配列番号 32):

ATGACCTGTCCCTCTCCCTCTCCACTTCACCCCTTCTCACTGCACAGgtgcccagacacacaggggtcagggg  
 agggctcagaaagcccatggcccgtttctctctctctagaccagaatcaccgtgtgtgtgtctctctctctcagGGCTCC  
TGGGGCCCACTCTGTGTTGACCGCAGCCGCCCTCACTGCTCTGGGGCCCCAGGACAGAA  
 GGTCAACCATCTCTGTGCTCTGGAAAGCAGCTCCAAACATTTGGGAATAATATGATATCTTGG  
 TACCAGCAAGCTCCCAAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCAATTTATGACAATAATAAAGCGAC  
 CCTAGGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAAGTCTGGCACGCTCAGCCACCCCTGG  
 GCATCACCGGACTCCAGACTGGGGAGGAGCCGATTAATTACTGCGGGAACAATGGGATA  
 GCAGCCCTGAGTGTCTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTAG

10

20

30

40

50

【 11 】

【図 11】

VA1-51 イントロンを含む再編成された VA1-51/JA2 可変領域のヌクレオチド配列 (配列番号 33):

ATGACCTGTCCCTCTCCCTCTCCACTTCATTCAGTGCACAGGGTCTGGGGCCCAAGTC  
 TGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCAAGGACAGAAAGGTCAACCATCTCTGC  
 TCTGGAAAGCAAGCTCCAAACATTTGGGAATAATATGATATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAAGAAC  
 AGCCCCAAACTCCTCAATTTATGACAAATAATAAGCACCCCTCAGGGGATTCCTGACCGGATCT  
 CTGGCTCCAAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCCTGGGCAATCACCGGACTCCAGACTGGGGACG  
 AGCCGATTTACTGGCGAACATGGGATAGCAGCTGAGTGTGGTATTTCGGCGGAGG  
GACCAAGCTGACCGTCTCTAG

【 12 】

【図 12】

シグナルペプチドを含む再編成された VA1-51/JA2 可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 34):

MTCSPLLLTLHCTGSW<sup>4</sup>IQSVLTQPPSVSAAPGQKVITSCSGSSSNIIGNNYVSWYQQLPGTAPK  
 LLYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSAILGITGLQTGDEADYCYCGTWDSSLSANVFFGGGTLIVL

30

40





【 図 1 5 】

【図15】

V12-14 イントロンを有さない再編成された V12-14/J12 可変領域のヌクレオチド配列 (配列番号 38) :

ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCCCTCCTCACTCAGGGCACAGGGTCCTGGGCCAGT  
CTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTCCGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCACTCCTCTGC  
ACTGGAACCCAGCAGTGACGTTGGTGTATACTATGTCCTCTGTACCACACAGCACCCAG  
GCAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGTCAATAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGC  
TTCTTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCACTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGG  
ACGAGGCTGATTAATACTGCAGCTCATATACAAAGCAGCAGCCTCTCTGGTATTCGGCGGA  
GGGACCAAGCTGACCGTCTTAG

【 図 1 6 】

【図16】

シグナルペプチドを有する再編成された V12-14/J12 可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 39) :

MAWALLLLTLLTQGTGSH/QSALTPASVSGSPGQISITCTGTSDDYGGYNYVSWYQQHPGK  
APKLMYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEADYYCSSYTSSTLVVFGGGTKLLT  
VL

10

20

【 配 列 表 】

2022535418000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/036114

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A01K67/027 C07K16/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/008123 A2 (KYMAB LTD [GB]) 10 January 2019 (2019-01-10)	1-7, 10, 12-14, 18, 21-24, 27-52
Y	page 22 - page 28; figure 1; examples 1-3  ----- -/--	8, 9, 11, 15-17, 19, 20, 25, 26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  25 August 2020		Date of mailing of the international search report  15/09/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Deleu, Laurent

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2020/036114

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THOMAS TILLER ET AL: "A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties", MABS, vol. 5, no. 3, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 445-470, XP055377037, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.24218 figure 3	8,9,11, 15,25,26
Y	----- WO 2014/160179 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 2 October 2014 (2014-10-02) claims 1-7	15
Y	----- WO 2013/096142 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 27 June 2013 (2013-06-27) paragraph [0721] - paragraph [0723]; claim 1	16
Y	----- WO 2011/163311 A1 (REGENERON PHARMA [US]; MACDONALD LYNN [US] ET AL.) 29 December 2011 (2011-12-29) example 1	17,19,20

10

20

30

40

2

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/036114

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019008123 A2	10-01-2019	EP 3648587 A2	13-05-2020
		TW 201907010 A	16-02-2019
		US 2020214274 A1	09-07-2020
		WO 2019008123 A2	10-01-2019
-----			
WO 2014160179 A1	02-10-2014	AU 2014244079 A1	24-09-2015
		CA 2903696 A1	02-10-2014
		CN 105189545 A	23-12-2015
		EP 2970437 A1	20-01-2016
		HK 1218550 A1	24-02-2017
		JP 2016519568 A	07-07-2016
		KR 20150126863 A	13-11-2015
		NL 2012424 C2	08-12-2014
		NL 2013851 C2	08-06-2015
		NL 2015603 A	16-03-2016
		RU 2015143108 A	20-04-2017
		SG 11201506294T A	29-09-2015
		WO 2014160179 A1	02-10-2014
-----			
WO 2013096142 A1	27-06-2013	AU 2012323987 A1	04-07-2013
		AU 2015238803 A1	29-10-2015
		AU 2017251797 A1	16-11-2017
		AU 2020201596 A1	19-03-2020
		BR 112014015238 A2	13-06-2017
		CA 2859408 A1	27-06-2013
		CN 104159444 A	19-11-2014
		DK 2793567 T3	15-04-2019
		EP 2793567 A1	29-10-2014
		EP 3527070 A1	21-08-2019
		ES 2720186 T3	18-07-2019
		HK 1202772 A1	09-10-2015
		HR P20190897 T1	20-09-2019
		HU E044266 T2	28-10-2019
		IL 233153 A	30-04-2018
		IL 258561 A	30-05-2019
		IL 266268 A	31-05-2020
		JP 6327750 B2	23-05-2018
		JP 6728308 B2	22-07-2020
		JP 2015502177 A	22-01-2015
		JP 2017046722 A	09-03-2017
		JP 2019047806 A	28-03-2019
		KR 20140116135 A	01-10-2014
		KR 20180132938 A	12-12-2018
		KR 20190124339 A	04-11-2019
		KR 20200021552 A	28-02-2020
		LT 2793567 T	10-04-2019
		MX 356429 B	29-05-2018
		NZ 627211 A	31-03-2016
		PL 2793567 T3	30-09-2019
		PT 2793567 T	27-05-2019
		RU 2014127339 A	10-02-2016
		RU 2018119366 A	09-11-2018
SG 10201605675W A	29-09-2016		
SG 10201913164Y A	30-03-2020		
SG 11201403326V A	30-07-2014		
SI 2793567 T1	31-05-2019		
TR 201903439 T4	22-04-2019		
US 2013160153 A1	20-06-2013		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

page 1 of 4

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/036114

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2014017228 A1	16-01-2014
		US 2017332609 A1	23-11-2017
		US 2020221675 A1	16-07-2020
		US 2020221676 A1	16-07-2020
		WO 2013096142 A1	27-06-2013
-----			
WO 2011163311	A1	29-12-2011	AU 2011271043 A1
			31-01-2013
			AU 2011271046 A1
			31-01-2013
			BR 112012032991 A2
			06-10-2015
			BR 112012033248 A2
			28-11-2017
			CA 2803864 A1
			29-12-2011
			CA 2804311 A1
			29-12-2011
			CN 103068993 A
			24-04-2013
			CN 103068994 A
			24-04-2013
			CN 104342455 A
			11-02-2015
			CN 104404050 A
			11-03-2015
			CY 1117537 T1
			26-04-2017
			CY 1117692 T1
			17-05-2017
			CY 1118126 T1
			28-06-2017
			CY 1119478 T1
			07-03-2018
			DK 2480675 T3
			01-08-2016
			DK 2480676 T3
			20-06-2016
			DK 2568049 T3
			01-08-2016
			DK 2905338 T3
			06-11-2017
			DK 3034608 T3
			06-05-2019
			EP 2480675 A1
			01-08-2012
			EP 2480676 A1
			01-08-2012
			EP 2568049 A1
			13-03-2013
			EP 2905338 A1
			12-08-2015
			EP 3034608 A1
			22-06-2016
			EP 3205726 A1
			16-08-2017
			EP 3456832 A1
			20-03-2019
			ES 2570131 T3
			17-05-2016
			ES 2575223 T3
			27-06-2016
			ES 2576928 T3
			12-07-2016
			ES 2646052 T3
			11-12-2017
			ES 2721749 T3
			05-08-2019
			HK 1168384 A1
			12-05-2017
			HK 1170766 A1
			12-05-2017
			HK 1183321 A1
			12-05-2017
			HK 1226766 A1
			06-10-2017
			HR P20160497 T1
			15-07-2016
			HR P20160794 T1
			12-08-2016
			HR P20160865 T1
			07-10-2016
			HR P20171666 T1
			15-12-2017
			HR P20190807 T1
			23-08-2019
			HU E029691 T2
			28-03-2017
			HU E029692 T2
			28-03-2017
			HU E030285 T2
			29-05-2017
			HU E036597 T2
			30-07-2018
			HU E044001 T2
			30-09-2019
			IL 223719 A
			31-10-2016
			IL 223720 A
			29-05-2017
			IL 244450 A
			30-11-2017
			IL 247386 A
			31-07-2017
			IL 255179 A
			28-06-2018
			IL 259965 A
			28-02-2019
			IL 264634 A
			26-09-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/036114

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 5988969 B2	07-09-2016
		JP 6009441 B2	19-10-2016
		JP 6073441 B2	01-02-2017
		JP 6243384 B2	06-12-2017
		JP 6341972 B2	13-06-2018
		JP 6545773 B2	17-07-2019
		JP 2013531501 A	08-08-2013
		JP 2013532974 A	22-08-2013
		JP 2016010415 A	21-01-2016
		JP 2016010417 A	21-01-2016
		JP 2017006152 A	12-01-2017
		JP 2017012204 A	19-01-2017
		JP 2018023403 A	15-02-2018
		JP 2018201527 A	27-12-2018
		JP 2018201528 A	27-12-2018
		JP 2019033765 A	07-03-2019
		JP 2020062061 A	23-04-2020
		KR 20130027555 A	15-03-2013
		KR 20130121814 A	06-11-2013
		KR 20180135996 A	21-12-2018
		KR 20180135997 A	21-12-2018
		KR 20190014576 A	12-02-2019
		KR 20190014578 A	12-02-2019
		KR 20190049932 A	09-05-2019
		KR 20190073584 A	26-06-2019
		KR 20190142436 A	26-12-2019
		KR 20200064166 A	05-06-2020
		LT 2480675 T	10-10-2016
		LT 2568049 T	10-10-2016
		LT 2905338 T	27-12-2017
		LT 3034608 T	27-05-2019
		ME 02440 B	20-09-2016
		ME 02442 B	20-09-2016
		ME 02444 B	20-09-2016
		ME 02902 B	20-04-2018
		MX 336344 B	15-01-2016
		MX 347318 B	21-04-2017
		MX 347322 B	21-04-2017
		MX 348942 B	04-07-2017
		MY 157477 A	15-06-2016
		MY 165287 A	21-03-2018
		NO 2905338 T3	30-12-2017
		NZ 605751 A	31-10-2014
		NZ 605758 A	29-08-2014
		NZ 626979 A	29-05-2015
		NZ 627119 A	29-05-2015
		NZ 707198 A	29-04-2016
		NZ 707200 A	29-04-2016
		PL 2480675 T3	31-03-2017
		PL 2480676 T3	31-10-2016
		PL 2568049 T3	31-03-2017
		PL 2905338 T3	31-01-2018
		PL 3034608 T3	30-08-2019
		PT 2480675 T	11-07-2016
		PT 2480676 E	09-06-2016
		PT 2568049 T	11-07-2016
		PT 2905338 T	10-11-2017
		PT 3034608 T	28-05-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/036114

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		RU 2013102595 A	27-07-2014
		RU 2013102596 A	27-07-2014
		RU 2016119423 A	07-11-2018
		SG 186390 A1	30-01-2013
		SG 186391 A1	30-01-2013
		SG 10201504324U A	30-07-2015
		SG 10201504568Y A	30-07-2015
		SI 2905338 T1	29-12-2017
		SI 3034608 T1	28-06-2019
		SM T201600212 B	31-08-2016
		SM T201600213 B	31-08-2016
		SM T201600229 B	31-08-2016
		TR 201905992 T4	21-05-2019
		US 2012070861 A1	22-03-2012
		US 2012073004 A1	22-03-2012
		US 2013323790 A1	05-12-2013
		US 2013326647 A1	05-12-2013
		US 2014137275 A1	15-05-2014
		US 2015089680 A1	26-03-2015
		US 2015173331 A1	25-06-2015
		US 2015173332 A1	25-06-2015
		US 2015176002 A1	25-06-2015
		US 2015246976 A1	03-09-2015
		US 2015246977 A1	03-09-2015
		US 2015320023 A1	12-11-2015
		US 2015351371 A1	10-12-2015
		US 2016057979 A1	03-03-2016
		US 2016060359 A1	03-03-2016
		US 2017107484 A1	20-04-2017
		US 2017258059 A1	14-09-2017
		US 2018064078 A1	08-03-2018
		US 2019153384 A1	23-05-2019
		US 2019203171 A1	04-07-2019
		US 2020239837 A1	30-07-2020
		WO 2011163311 A1	29-12-2011
		WO 2011163314 A1	29-12-2011
		ZA 201300062 B	25-09-2014
		ZA 201300063 B	25-09-2014
		ZA 201404600 B	30-09-2015
		ZA 201404601 B	24-02-2016
		ZA 201506598 B	29-03-2017

10

20

30

40



## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0735(2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/07	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z
C 1 2 N 15/90 (2006.01)	C 1 2 N 15/90	1 0 4 Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K  
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N  
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,  
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付

- (72)発明者 ハンセン , ジョアンナ  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロー  
ド 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 バブ , ロバート  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロー  
ド 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 グオ , チュングァン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロー  
ド 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付
- (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 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロー  
ド 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付
- (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 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロー  
ド 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01  
4B065 AA92X AA92Y AB01 AB05 AC14 BA02 CA25 CA44