

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-510273

(P2017-510273A)

(43) 公表日 平成29年4月13日(2017.4.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/12 (2006.01)	C 1 2 N 5/12	
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-558391 (P2016-558391)	(71) 出願人	597160510
(86) (22) 出願日	平成27年3月20日 (2015. 3. 20)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月21日 (2016. 9. 21)		・インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/021884		REGENERON PHARMACEU
(87) 国際公開番号	W02015/143406		TICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成27年9月24日 (2015. 9. 24)		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(31) 優先権主張番号	61/968, 896		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
(32) 優先日	平成26年3月21日 (2014. 3. 21)		・ミル・リバー・ロード777番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	62/079, 078		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成26年11月13日 (2014. 11. 13)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	62/088, 117		
(32) 優先日	平成26年12月5日 (2014. 12. 5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異なる結合特性を示すV_L抗原結合タンパク質

(57) 【要約】

重鎖定常領域と融合され、体細胞で高頻度変異した軽鎖可変ドメインを含む免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインを含有する結合タンパク質を作製する、特定する、単離する及び/または作製する方法が提供される。小分子に特異的な例となる結合タンパク質も提供される。本発明は、概して、小分子と結合するV_L抗原結合タンパク質、及び/ならびにV_L抗原結合タンパク質の相互作用を特徴付けること及びその特徴付けに由来する情報を使用して、従来抗体によっては示されない結合特性を持つ抗原結合V_Lタンパク質の選択の指針として使用することができる群にV_L抗原結合タンパク質を選別することに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 と第 2 の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む抗原結合タンパク質であって、前記第 1 と前記第 2 の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインが会合して小分子と特異的に結合する結合ポケットを形成する、前記抗原結合タンパク質。

【請求項 2】

前記第 1 及び / または前記第 2 の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインがヒトの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインである請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3】

前記軽鎖可変ドメインの前記結合ポケットが 50 nM 以下の親和性で前記小分子と結合する請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

10

【請求項 4】

前記第 1 及び / または前記第 2 の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインが第 1 の免疫グロブリン重鎖定常領域に操作可能に連結される請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 5】

前記第 1 の免疫グロブリン重鎖定常領域が非ヒト動物に由来する請求項 4 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

前記非ヒト動物が、マウス及びラットから選択される齧歯類である請求項 5 に記載の抗原結合タンパク質。

20

【請求項 7】

前記第 1 の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインが、(a) V_H 4 - 1 遺伝子断片、V_H 1 - 5 遺伝子断片、V_H 3 - 15 遺伝子断片、V_H 3 - 20 遺伝子断片、または V_H 1 - 33 遺伝子断片、及び (b) J_H 1 遺伝子断片、J_H 3 遺伝子断片、J_H 4 遺伝子断片、または J_H 5 遺伝子断片に由来する第 1 の再構成された軽鎖可変領域遺伝子によってコードされる請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 8】

前記第 1 の再構成された軽鎖可変領域遺伝子が V_H 4 - 1 遺伝子断片及び J_H 1 遺伝子断片に由来する請求項 7 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9】

前記第 1 の再構成された軽鎖可変領域遺伝子が、1 - 5 V_H 遺伝子断片と、J_H 3 遺伝子断片、J_H 4 遺伝子断片及び J_H 5 遺伝子断片から成る群から選択される J_H 遺伝子断片に由来する請求項 7 に記載の抗原結合タンパク質。

30

【請求項 10】

前記第 2 の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインが、ヒトの 3 - 20 V_L 遺伝子断片に由来する再構成された軽鎖可変領域遺伝子によってコードされる請求項 7 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 11】

小分子と特異的に結合する V_L 抗原結合タンパク質の作出方法であって、
 (a) 遺伝子操作された非ヒト動物を前記小分子で免疫するステップであって、前記遺伝子操作された非ヒト動物が
 (i) 非ヒトの重鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒトの免疫グロブリン軽鎖可変 (V_L) 及び軽鎖連結 (J_L) の遺伝子断片と、
 (ii) 非ヒトの軽鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒトの免疫グロブリン軽鎖可変 (V_L) と軽鎖連結 (J_L) の遺伝子断片とを含む、前記免疫するステップと、
 (b) 前記免疫された非ヒト動物から細胞または V_L 抗原結合タンパク質を単離するステップであって、前記細胞または V_L 抗原結合タンパク質は前記小分子と特異的に結合する、前記単離するステップとを含む、前記作出方法。

40

【請求項 12】

50

さらに、(c)ベクターの発現に十分な条件にて前記ベクターによって形質移入された細胞を培養することを含み、前記ベクターはヒトの重鎖定常領域遺伝子に操作可能に連結された核酸を含み、前記核酸はステップ(b)にて単離された前記V_L抗原結合タンパク質の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列と同一であるまたは実質的に同一である請求項11に記載の方法。

【請求項13】

さらに、(c)ハイブリドーマの培養の上清からV_L抗原結合タンパク質を回収するステップを含み、前記ハイブリドーマはステップ(b)にて単離された前記細胞から産生される請求項11に記載の方法。

【請求項14】

さらに、(d)ベクターの発現に十分な条件で前記ベクターによって形質移入した細胞を培養することを含み、前記ベクターはヒトの重鎖定常領域遺伝子に操作可能に連結された核酸を含み、前記核酸はステップ(c)にて回収された前記V_L抗原結合タンパク質の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列と同一であるまたは実質的に同一である請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記小分子が、担体に連結されたハプテンまたは分子量が6kDa未満である有機化合物である請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記非ヒト動物が哺乳類である請求項11に記載の方法。

【請求項17】

前記非ヒト動物がマウスまたはラットから選択される齧歯類である請求項16に記載の方法。

【請求項18】

請求項11に記載の前記方法に従って単離される細胞から作出されるハイブリドーマ。

【請求項19】

請求項11に記載の前記方法に従って単離されるV_L抗原結合タンパク質の可変ドメインをコードする核酸。

【請求項20】

請求項11に記載の前記方法に従って単離される細胞。

【請求項21】

遺伝子操作された非ヒト動物であって、

(a)そのゲノム内に

(i)非ヒトの重鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒトの免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片と

(ii)非ヒトの軽鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒトの免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片とを含み、及び

(b)小分子と特異的に結合するV_L抗原結合タンパク質を含む、前記遺伝子操作された非ヒト動物。

【請求項22】

前記非ヒト動物が、参照の非ヒト動物に比べて小分子に特異的な結合タンパク質の力価で2倍以上の増加を示す請求項21に記載の遺伝子操作された非ヒト動物。

【請求項23】

従来抗体に比べて抗原に特徴的な独特の結合を示す1以上のV_L抗原結合タンパク質の特定方法であって、

(a)抗原と結合する複数の免疫グロブリンタンパク質のそれぞれの1以上の結合特性をプロファイリングすることであって、前記複数の免疫グロブリンタンパク質はV_L抗原結合タンパク質及び従来抗体を含み、

各V_L抗原結合タンパク質は(i)1以上の軽鎖可変領域の遺伝子断片に由来する可変ド

10

20

30

40

50

メインと (i i) 1 以上の重鎖定常領域の遺伝子断片に由来する定常ドメインとを含むハイブリッド免疫グロブリン鎖を含み、

各従来の抗体は 1 以上の重鎖可変領域に由来する免疫グロブリンの重鎖可変領域と 1 以上の軽鎖可変領域の遺伝子断片に由来する免疫グロブリンの軽鎖可変領域の遺伝子断片とを含む、プロファイリングすることと、

(b) 前記免疫グロブリンタンパク質のそれぞれの少なくとも 1 つの結合特性に基づいて前記複数の免疫グロブリンタンパク質を 1 以上の群にピニングすることであって、類似の結合特性を示す V_L 抗原結合タンパク質及び従来の抗体が同一群にピニングされる、ピニングすることと、

(c) すべてのまたは実質的にすべての V_L 抗原結合タンパク質を含む群を特定することを含む、前記特定方法。

10

【請求項 2 4】

前記複数の免疫グロブリンタンパク質それぞれの 1 以上の結合特性を差別的抗原かく乱によってプロファイリングする請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

さらに、前記複数の免疫グロブリンタンパク質それぞれが結合する前記抗原の 1 以上のエピトープをマッピングすることを含み、その際、前記抗原の同一エピトープと結合する免疫グロブリンタンパク質が同一の機能群にピニングされる請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記免疫グロブリンタンパク質それぞれのピニングが主成分分析 (P C A) を含む請求項 2 3 に記載の方法。

20

【請求項 2 7】

前記免疫グロブリンタンパク質それぞれのピニングが階層的クラスタ分析を含む請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

群が、会合定数、解離定数、エピトープ特異性、エピトープ親和性またはそれらの組み合わせを含む結合特性に基づく請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 9】

さらに、最後のステップとして、(d) すべてのまたは実質的にすべての V_L 抗原結合タンパク質を含むと特定された機能群にピニングされた 1 以上の V_L 抗原結合タンパク質を単離することを含む請求項 2 3 に記載の方法。

30

【請求項 3 0】

さらに、最後のステップとして、(e) 単離された前記 1 以上の V_L 抗原結合タンパク質が、従来の抗体によって認識されない前記抗原の 1 以上のエピトープと結合することを確認することを含む請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

さらに、単離された前記 1 以上の V_L 抗原結合タンパク質の前記ハイブリッド免疫グロブリン鎖の配列を決定することを含む請求項 3 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年3月21日に出願された米国仮特許出願第61/968,896号、2014年12月5日に出願された米国仮特許出願第62/088,117号、及び2014年11月13日に出願された米国仮特許出願第62/079,078号の米国特許法第119条(e)に基づく利益を主張し、該出願のそれぞれは参照によって本明細書に組み入れられる。

【0002】

技術分野

本発明は、概して、小分子と結合する V_L 抗原結合タンパク質、及び/ならびに V_L 抗

50

原結合タンパク質の相互作用を特徴付けること及びその特徴付けに由来する情報を使用して、従来の抗体によっては示されない結合特性を持つ抗原結合V_Lタンパク質の選択の指針として使用することができる群にV_L抗原結合タンパク質を選別することに関する。

【背景技術】

【0003】

抗体は、生物学的な診断及び/または治療にとって有望なモダリティとして出現している。たとえば、中和抗体は、病原体が定着し、感染に達する前に病原体を妨害し、不活化することができる。アンタゴニスト抗体は、たとえば、腫瘍の進行または自己免疫において広く行き渡っている調節不全のシグナル伝達に干渉することができ、アゴニスト抗体は免疫応答を高めるのに使用することができる。これらの能力はある程度、抗体が結合する抗原の部位であるエピトープの抗体の特異的な認識及びエピトープへの親和性に基づく。多数の抗体が1つの標的抗原に対して生成されてもよく、各抗体が親和性とエピトープ認識のいずれかまたは双方の点で実質的に異なってもよい。さらに、従来の抗体における抗原結合部位がすべての抗原に上手く適合するわけではないので今までのような抗体に基づく設計は限定され得る。本発明は、免疫グロブリンに基づく治療設計の改善及び多様化に関するニーズが残っているという認識を包含する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書に記載されている種々の態様及び実施形態は、免疫グロブリンの重鎖定常領域に操作可能に連結された軽鎖可変ドメインと免疫グロブリンの軽鎖定常領域に操作可能に連結された軽鎖可変ドメインとを含有する結合タンパク質を発現する遺伝子操作された非ヒト動物が本明細書で認識される種々の課題を解決することができ、及び/または驚くべき結果をもたらすことができるという驚くべき発見にある程度基づく。たとえば、非ヒト動物であって、そのゲノムが(i)再構成されていないヒト軽鎖遺伝子断片(たとえば、V_L及びJ_Lの遺伝子断片)を含有する免疫グロブリン重鎖遺伝子座と(ii)再構成されていないヒト軽鎖遺伝子断片(たとえば、V_L及びJ_Lの遺伝子断片)を含有する免疫グロブリン軽鎖遺伝子座との双方を含む、非ヒト動物は、さらに多様化した抗原結合タンパク質のレパートリー、たとえば、V_L結合タンパク質を提供することができ、それは従来のヒト化された非ヒト動物から得るのは困難であった。本明細書で開示される遺伝子操作された動物にて生成されるV_L抗原結合タンパク質は、従来の抗体によって達成され得るよりも高い親和性で小分子に結合し、さらに従来の抗体によって示されるものとは異なる1以上の結合の特性または特質を示し得る。

20

30

【0005】

一般に、本明細書で開示されるようなV_L抗原結合タンパク質は、小分子と特異的に結合し、重鎖定常領域に操作可能に連結される免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むハイブリッド免疫グロブリン鎖を含む。V_L抗原結合タンパク質はまた、第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含んでもよく、その際、第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは会合して小分子と特異的に結合する結合ポケットを形成する。一部の実施形態では、本発明は、会合して結合ポケットを形成する第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインから本質的に成る抗原結合タンパク質を提供し、その際、該抗原結合タンパク質は小分子と特異的に結合する。

40

【0006】

一部の実施形態では、重鎖定常領域に操作可能に連結される第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインである。このハイブリッドV_L-C_H免疫グロブリン鎖は、軽鎖可変(V_L)遺伝子断片と重鎖定常領域遺伝子に操作可能に連結された軽鎖連結(J_L)遺伝子断片とに由来する。第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは軽鎖定常領域ドメインに操作可能に連結されてもよい(V_L-C_L)。

【0007】

一部の実施形態では、V_L抗原結合タンパク質の各鎖は、免疫グロブリン重鎖可変領域

50

の遺伝子断片によってコードされる及び/またはそれに由来するアミノ酸配列を欠く。

【 0 0 0 8 】

一部の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは、V₄₋₁、V₁₋₅、V₃₋₁₅、V₃₋₂₀及びV₁₋₃₃から成る群から選択されるヒトV遺伝子断片に由来する再構成された軽鎖可変ドメイン遺伝子によってコードされる。別の実施形態では、J₁、J₃、J₄及びJ₅から成る群から選択されるJ遺伝子断片に由来する第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインである。別の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₁₋₅遺伝子断片に由来する。別の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₁₋₅遺伝子断片に由来し、第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₃₋₂₀遺伝子断片に由来する。別の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₁₋₅遺伝子断片に由来し、J遺伝子断片はJ₃、J₄及びJ₅から成る群から選択される。一実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₄₋₁遺伝子断片に由来する。別の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₄₋₁遺伝子断片及びJ₁遺伝子断片に由来する。一実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₄₋₁遺伝子断片に由来し、第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₄₋₁またはV₃₋₂₀遺伝子断片に由来する。一実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₃₋₂₀遺伝子断片に由来する。別の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₃₋₂₀遺伝子断片及びJ₁またはJ₂遺伝子断片に由来する。一実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₃₋₂₀遺伝子断片に由来し、第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₄₋₁またはV₁₋₅遺伝子断片に由来する。一実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₃₋₁₅遺伝子断片に由来する。別の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₃₋₁₅遺伝子断片及びJ₅遺伝子断片に由来する。一実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₃₋₁₅遺伝子断片に由来し、第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはV₁₋₃₉遺伝子断片に由来する。他の実施形態では、第1及び第2の可変ドメインは表Aにて示されるようにそれぞれV₁:J₁ V₂:J₂の遺伝子断片に由来する。

10

20

【表 1 A】

表 A

第1の変域ドメイン		第2の変域ドメイン	
V _{K1}	J _{K1}	V _{K2}	J _{K2}
3-20	4	4-1	2
3-20	4	1-5	2
3-20	3	4-1	1
4-1	1	4-1	3
4-1	1	3-20	3
4-1	1	3-20	2
4-1	3	3-20	2
1-33	3	3-20	5
1-33	1	1-33	3
3-15	5	1-39	3
1-5	5	3-20	1
1-5	5	3-20	2
1-5	4	3-20	1
1-5	4	3-20	2
1-5	4	3-20	3
1-5	3	3-20	2
1-5	3	3-20	3

10

20

【0009】

一部の実施形態では、ハイブリッドV_L-C_H免疫グロブリン鎖のCDR3の長さは、軽鎖定常ドメインに連結された軽第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン(V_L-C_L)のCDR3の長さより短い。一部の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン軽鎖のCDR3は軽鎖のCDR3よりも少なくともアミノ酸1つ分短い。他の実施形態では、CDR3の長さは少なくともアミノ酸2つ分異なる。他の実施形態では、CDR3の長さは少なくともアミノ酸3つ分異なる。他の実施形態では、CDR3の長さは少なくともアミノ酸4つ分異なる。一部の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン鎖のCDR3は6アミノ酸長であり、軽鎖のCDR3はおよそ9アミノ酸長である。

30

【0010】

一部の特定の実施形態では、重鎖定常領域は非ヒト動物に由来する。一部の実施形態では、軽鎖定常領域は非ヒト動物に由来する。一部の実施形態では、重鎖定常領域は、CH1、ヒンジ、CH2、CH3、CH4、及びそれらの組み合わせから選択される。一部の実施形態では、重鎖定常領域はCH1、ヒンジ、CH2、及びCH3を含む。

40

【0011】

一部の実施形態では、第1及び/または第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは、ヒトの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインである。一部の実施形態では、第1及び/または第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは、マウス及びラットから選択される齧歯類に由来する。

【0012】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるV_L抗原結合タンパク質は免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の可変ドメインを含む抗原結合タンパク質よりも高い親和性で小分子と結合する。一部の実施形態では、V_L抗原結合タンパク質は50nM未満のK_Dで小分子と特異的に結合する。他の実施形態では、V_L抗原結合タンパク質のK_Dは40nM未満である。追加の実施形態では、V_L抗原結合タンパク質のK_Dは30nM未満である。別の

50

実施形態では、 V_L 抗原結合タンパク質の K_D は 20 nM 未満である。別の実施形態では、 V_L 抗原結合タンパク質の K_D は 10 nM 未満である。

【0013】

一態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示されるような小分子と特異的に結合する V_L 抗原結合タンパク質のハイブリッド免疫グロブリン鎖または軽鎖の可変ドメインをコードする再構成された軽鎖可変領域遺伝子を含む細胞または核酸、及びそのような細胞または核酸を得る方法である。

【0014】

一部の実施形態では、小分子に特異的な V_L 抗原結合タンパク質を得るための方法が提供され、それには、小分子と結合する V_L 抗原結合タンパク質の 1 以上の免疫グロブリン軽鎖可変 (V_L) ドメインを含む及び/またはコードする細胞または核酸配列を得ることが含まれてもよい。方法は一般に、本明細書で開示されるような遺伝子操作された非ヒト動物から小分子と結合する V_L 抗原結合タンパク質及び/または V_L 抗原結合タンパク質をコードする核酸配列を含む細胞を単離することを含み、その際、該 V_L 結合タンパク質は小分子と特異的に結合する。

10

【0015】

本明細書で開示される遺伝子操作された非ヒト動物には、たとえば、哺乳類、特定の実施形態では齧歯類（たとえば、マウス、ラットまたはハムスター）が挙げられる。一部の実施形態では、非ヒト動物には鳥類、たとえば、ニワトリが挙げられる。種々の実施形態では、齧歯類はマウス及びラットから選択される。

20

【0016】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるような非ヒト動物のゲノムには、(i) 再構成されていないヒト軽鎖遺伝子断片（たとえば、 V_L 及び J_L の遺伝子断片）を含有する免疫グロブリン重鎖遺伝子座と (ii) 再構成されていないヒト軽鎖遺伝子断片（たとえば、 V_L 及び J_L の遺伝子断片）を含有する免疫グロブリン軽鎖遺伝子座との双方が含まれる。一部の実施形態では、(i) の再構成されていないヒト免疫グロブリンの V_L 及び J_L の遺伝子断片はゲノムにおける内在性の免疫グロブリン重鎖遺伝子座に存在する。一部の実施形態では、非ヒト動物は内在性の機能的な V_H 、 D_H 及び J_H の遺伝子断片すべてを欠く。一部の実施形態では、非ヒト動物は内在性の機能的な V_H 、 D_H 及び J_H の遺伝子断片すべてを欠き、非ヒト動物は $A d a m 6 a$ 遺伝子、 $A d a m 6 b$ 遺伝子またはその双方を含む。一部の特定の実施形態では、 $A d a m 6 a$ 遺伝子、 $A d a m 6 b$ 遺伝子またはその双方はゲノムにて異所的に位置付けられる。

30

【0017】

一部の実施形態では、(ii) の再構成されていないヒト免疫グロブリン V_L 及び J_L の遺伝子断片は非ヒト動物の内在性の免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に存在する。一部の特定の実施形態では、内在性の免疫グロブリン軽鎖遺伝子座は 軽鎖遺伝子座である。

【0018】

一部の実施形態では、(i) の再構成されていないヒト免疫グロブリンの V_L 及び J_L の遺伝子断片はヒトの V 及び J の遺伝子断片である。一部の実施形態では、(ii) の再構成されていないヒト免疫グロブリンの V_L 及び J_L の遺伝子断片はヒトの V 及び J の遺伝子断片である。一部の実施形態では、(ii) の再構成されていないヒト免疫グロブリンの V_L 及び J_L の遺伝子断片はヒトの V 及び J の遺伝子断片であり、軽鎖定常領域の核酸配列はマウス C 領域の核酸配列またはラット C 領域の核酸配列である。

40

【0019】

一部の実施形態では、非ヒト動物は小分子と特異的に結合する V_L 抗原結合タンパク質を発現する細胞を含む。一部の実施形態では、細胞は、リンパ球、たとえば、NK細胞、T細胞またはB細胞である。一部の実施形態では、細胞はハイブリッド $V_L - C_H$ 鎖を含む V_L 結合タンパク質を発現する。一部の実施形態では、 V_L 結合タンパク質は 2 つの同一の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む。他の実施形態では、 V_L 結合タンパク質は

50

異種配列を持つ2つの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む。

【0020】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるような動物から単離される細胞はB細胞である。他の実施形態では、細胞はメモリーB細胞である。

【0021】

小分子と特異的に結合するV_L抗原結合タンパク質のハイブリッド免疫グロブリン鎖または軽鎖の可変ドメインをコードする再構成された軽鎖可変領域遺伝子を含む核酸は、たとえば、本明細書で開示される非ヒト動物から単離された細胞から、小分子と特異的に結合するV_L結合タンパク質の第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第1と第2の核酸配列を特定することによっても単離されてもよい。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような細胞及び/または核酸を得る方法は、(a)小分子または担体に連結された小分子で非ヒト動物を免疫し、その際、非ヒト動物はそのゲノムに(i)非ヒトの重鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片及び(ii)非ヒトの軽鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片を含むことと、(b)免疫した非ヒト動物から細胞を単離し、その際、該細胞は第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第1と第2の核酸配列を含むことと、(c)該細胞から小分子と特異的に結合するV_L結合タンパク質の第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第1と第2の核酸配列を特定することを含む。

10

20

【0022】

一部の実施形態では、非ヒト動物を免疫することは、小分子または担体に連結された小分子で非ヒト動物を感作することと、非ヒト動物をある期間休ませることと、小分子または担体に連結された小分子で該動物を再免疫することを含む。一部の実施形態では、期間は、2~3日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、または少なくとも1ヵ月である。一部の実施形態では、非ヒト動物を免疫することは、非ヒト動物に免疫応答を開始させることを含む。

【0023】

一部の実施形態では、細胞は蛍光活性化細胞選別(FACS)またはフローサイトメトリーを介して得られる。一部の実施形態では、細胞は免疫した非ヒト動物の組織から得られ、該組織は脾臓、リンパ節、血液及び骨髓から成る群から選択される。

30

【0024】

一部の実施形態では、本発明の方法はさらに、リンパ球を癌細胞と融合して、たとえば、ハイブリドーマを作製することを含む。一部の特定の実施形態では、癌細胞は骨髄腫細胞である。従って、本明細書で提供されるのはまた、ハイブリドーマ及びそれから単離される核酸であって、その際、該ハイブリドーマは小分子に特異的なV_L結合タンパク質を発現する。

【0025】

一部の実施形態では、小分子に特異的なV_L抗原結合タンパク質を作製する方法はまた、小分子と特異的に結合する二量体としての第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを発現するのに好適な発現系にて小分子に特異的なV_L抗原結合タンパク質の第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第1と第2の核酸を発現させることも含む。

40

【0026】

提供されるのはまた、非ヒト動物であって、(a)そのゲノムにて(i)非ヒトの重鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片と(ii)非ヒトの軽鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片とを含み、及び(b)小分子と特異的に結合するV_L抗原結合タンパク質を含む、非ヒト動物である。

50

【0027】

一部の実施形態では、該非ヒト動物は、参照非ヒト動物よりも、2倍以上、たとえば、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10倍、または20倍、またはそれより多い抗原陽性のB細胞を示す。一部の実施形態では、参照非ヒト動物は免疫の際、キメラ抗体を発現し、該キメラ抗体は、ヒトV_Hドメイン及びマウスC_Hドメインを含む重鎖とヒトV_Lドメイン及びマウスC_Lドメインを有する軽鎖とを有する。一部の特定の実施形態では、参照非ヒト動物は野生型の非ヒト動物である。一部の実施形態では、免疫は、小分子または担体に連結された小分子で非ヒト動物を感作することと、非ヒト動物をある期間休ませることと、小分子または担体に連結された小分子で該動物を再免疫することを含む。一部の

10

【0028】

一部の実施形態では、非ヒト動物は参照非ヒト動物よりも少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、または少なくとも5倍、またはそれより高い抗体力価を示す。一部の特定の実施形態では、参照非ヒト動物は遺伝子操作されたマウスであり、それは免疫の際、キメラ抗原結合タンパク質を発現し、該キメラ抗原結合タンパク質はヒトV_Hドメイン及びマウスC_Hドメインを含有する重鎖とヒトV_Lドメイン及びマウスC_Lドメインを有する軽鎖とを含む。一部の特定の実施形態では、参照非ヒト動物は野生型の

20

【0029】

一部の実施形態では、本発明の小分子はハプテンであり、担体に連結される。一部の特定の実施形態では、担体は、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ロコガイのヘモシアニン(CCH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、カチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、または卵白アルブミンを含む。

【0030】

一部の実施形態では、本発明の小分子は分子量が6kDa未満である有機化合物である。

【0031】

一態様では、本明細書で開示されるのは、従来の抗体によっては示されない結合特性を示す抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質を特定する、及び/または単離する方法、そのように特定され及び/または単離される抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質、それをコードする核酸、及び/またはそれを発現する宿主細胞である。

30

【0032】

一実施形態では、本明細書で開示されるような抗原と特異的に結合する従来の抗体によっては示されない抗原に特異的に結合するとき独特の結合特性を示す1以上のV_L抗原結合タンパク質を特定する方法は、(a)抗原と特異的に結合する複数の免疫グロブリンタンパク質のそれぞれの1以上の結合特性をプロファイリングし、その際、複数の免疫グロブリンタンパク質はV_L抗原結合タンパク質と従来の抗体を含み、各V_L抗原結合タンパク質は、(i)1以上の軽鎖可変領域遺伝子断片に由来する可変ドメインと(ii)1以上の重鎖定常領域遺伝子断片に由来する定常ドメインとを含むハイブリッド免疫グロブリン鎖を含み、各従来の抗体は1以上の重鎖可変領域に由来する免疫グロブリン重鎖可変領域と1以上の軽鎖可変領域遺伝子断片に由来する免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子断片とを含むことと、(b)各免疫グロブリンタンパク質の少なくとも1つの結合特性に基づいて複数の免疫グロブリンタンパク質を1以上の群にまとめ、その際、類似の結合特性を示すV_L抗原結合タンパク質及び従来の抗体は同じ群にビンディングすることと、(c)V_L抗原結合タンパク質すべてまたは実質的にすべてを含む群を特定することを含む。

40

【0033】

一部の実施形態では、複数の免疫グロブリンタンパク質それぞれの1以上の結合特性は

50

差別的抗原かく乱によってプロファイリングされる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような方法はさらに、複数の免疫グロブリンタンパク質それぞれによって結合される抗原の1以上のエピトープをマッピングすることを含み、その際、抗原の同じエピトープと結合する免疫グロブリンタンパク質は同じ機能群にピニングされる。一部の実施形態では、複数の免疫グロブリンタンパク質それぞれによって結合される抗原の1以上のエピトープをマッピングすることは、交差/阻止アッセイ、抗原変異体のアラニン走査、ペプチドプロット、ペプチド切断分析、エピトープ切除、エピトープ抽出、抗原の化学修飾、及びそれらの組み合わせから成る群から選択されるエピトープマッピングアッセイを含む。

【0034】

本明細書で開示される方法では、複数の抗原結合タンパク質の1以上の結合特性は固体表面に固定化された抗原を用いて決定される。一部の実施形態では、固体表面はバイオセンサーチップまたはポリスチレンビーズを含む。一部の実施形態では、固定化の後、及びプロファイリングに先立って抗原が修飾される。修飾は化学物質（たとえば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP・HCl）/ヨードアセトアミド、N-エチル-N'-（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）/エタノールアミン、ヨードアセトアミド及びヒドラジン、p-ヒドロキシフェニルグリオキサール（HPG）、過酸化水素、N-プロモスクシンイミド、N-アセチルイミダゾール、テトラニトロメタン、アルサニル酸、塩化ダンシル、グルタルアルデヒド、ニンヒドリン、ジエチルピロカルボネート（DEPC）、酢酸スルホスクシンイミジル（スルホ-NHS-酢酸）、ポリエチレングリコール5000（PEG-5000）、7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸、スクシンイミジルエステル、及びそれらの組み合わせ）及び/または酵素（たとえば、ブタトリプシン、エンドプロテイナーゼGluc、エンドプロテイナーゼAsp-N、キモトリプシン、エンドプロテイナーゼLys-C、及びエンドプロテイナーゼArg-C、ペプシン、パパン、サーモリシン、スブチリシン、プロテアーゼK、プロメラインスルフィドリル特異的プロテアーゼ（フィシン）、及びそれらの組み合わせ）によって達成されてもよい。

【0035】

本明細書で開示される方法に係るピニングは、主成分分析（PCA）及び/または階層的クラスタ分析を含んでもよい。一実施形態では、データを提示するために2つの主成分を選択する。一実施形態では、ピニングは主成分分析を含む。別の実施形態では、ピニングは階層的クラスタ分析を含む。別の実施形態では、ピニングは主成分分析と階層的クラスタ分析の双方を含む。ピニングは、上述のような化学的に及び/または酵素的にかく乱された/修飾された抗原表面のパネルへの各免疫グロブリンタンパク質の結合シグナル強度を含む1以上の結合プロファイルに基づいてもよい。そのようなピニングの結果は、たとえば、会合定数、解離定数、平衡定数、種々の種または同じ種の関連するファミリーメンバーに由来する抗原ホモログに対する結合特異性、機能活性データ（たとえば、リガンドの遮断、抗原のリン酸化及び/または抗原の細胞への内部移行を遮断する能力）、またはそれらの組み合わせのような免疫グロブリンタンパク質の群についての他の典型的なアッセイデータと並べてもよい、たとえば、差別的抗原かく乱の結合データに由来する階層性クラスタ分析系統樹が各免疫グロブリンタンパク質についての他の種々のアッセイデータと並べられる、「系図表」として表示されてもよい整理比較の結果を用いてピンを共有する免疫グロブリンタンパク質の間での挙動パターンを明らかにしてもよい。

【0036】

本明細書で開示されるような一部のプロファイリング法はさらに、(d) V_L 抗原結合タンパク質すべてまたは実質的にすべてを含むと特定された機能群にピニングされている1以上の V_L 抗原結合タンパク質を単離すること、及び/または(e) 単離された1以上の V_L 抗原結合タンパク質が従来の抗体によって認識されない抗原の1以上のエピトープと結合することを確認することを含む。単離された1以上の V_L 抗原結合タンパク質が従来の抗体によって認識されない抗原の1以上のエピトープと結合することを確認すること

10

20

30

40

50

は高処理能力の競合結合タンパク質アッセイを含んでもよい。

【0037】

アミノ酸配列及び/またはそれをコードする核酸配列を、本明細書で開示されるプロファイリング法に従って単離される1以上のV_L抗原結合タンパク質のいずれかについて決定してもよい。従って、本明細書で提供されるのはまた、本明細書で開示されるプロファイリング法に従って単離されるV_L抗原結合タンパク質、そのように特定され及び/または単離されたV_L抗原結合タンパク質のハイブリッド免疫グロブリン鎖の可変領域のCDRをコードする核酸配列を含む単離された核酸、及びそのような核酸を発現する宿主細胞である。

【0038】

本明細書で提供されるのはまた、本明細書で開示される方法を用いて従来の抗体によっては認識されない抗原のエピトープと結合する1以上のV_L抗原結合タンパク質を特定することと、(b)特定された1以上の抗原特異的な抗原結合タンパク質によって認識される1以上のエピトープをマッピングすることを含む、従来の抗体には覆い隠され、1以上の抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質によって認識される抗原の1以上のエピトープを特定する方法である。

【0039】

本発明の他の特長、目的及び利点は、以下の詳細な説明にて明らかである。しかしながら、詳細な説明は、本発明の実施形態を示すが、説明のみの目的で提供されるのであって、限定目的ではないことが理解されるべきである。本発明の範囲内での種々の変更及び改変は詳細な説明から当業者に明らかになるであろう。

【0040】

以下の図で構成される本明細書に含まれる図面は説明目的のみのためのものであり、限定目的のためのものではない。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】マウスの重鎖遺伝子座の模式図(正確な尺度ではない)を上、ヒトの軽鎖遺伝子座の模式図(正確な尺度ではない)を下に示す。マウスの重鎖遺伝子座は約3Mbの長さであり、約200の重鎖可変(V_H)遺伝子断片、13の重鎖多様性(D_H)遺伝子断片、及び4の重鎖連結(J_H)遺伝子断片、ならびにエンハンサー(E_{nh})及び重鎖定常(C_H)領域を含有する。ヒトの軽鎖遺伝子座はそれぞれ440kb及び600kbにわたる異極性の遠位コンティグと近位コンティグに複製される。2つのコンティグの間はV_L遺伝子断片がないと考えられる約800kbのDNAである。ヒトの軽鎖遺伝子座は、約76のV_L遺伝子断片、5のJ_L遺伝子断片、イントロンのエンハンサー(E_{nh})及び単一の定常領域(C_L)を含有する。

【図2】マウス重鎖遺伝子座への40のヒトV_H及び5のヒトJ_Hの遺伝子断片の段階的挿入の例となる標的化戦略を示す図である。ハイグロマイシン(hyg)とネオマイシン(neo)の選択カセットをリコンビナーゼの認識部位(R1、R2等)と共に示す。マウスC_H領域に操作可能に連結されたヒトのV_H及びJ_Hの遺伝子断片を含む修飾されたマウス重鎖遺伝子座を下に示す。

【図3】マウス重鎖遺伝子座へのヒトV_H及びヒトJ_Hの遺伝子断片(または4のヒトJ_H遺伝子断片)の段階的挿入の例となる標的化戦略を示す図である。ハイグロマイシン(hyg)とネオマイシン(neo)の選択カセットをリコンビナーゼの認識部位(R1、R2等)と共に示す。マウスC_H領域に操作可能に連結された(1または4の)ヒトのV_H及びJ_Hの遺伝子断片を含む修飾されたマウス重鎖遺伝子座を下に示す。

【図4】KOHマウス(MAID1713/1242)及びVELOCIIMMUNE(登録商標)ヒト化マウス(VI3)から得られた抗原陽性抗体(すなわちV_L抗原結合タンパク質)の総数(左)及び百分率(右)を示すグラフである。

【図5】KOHマウス(MAID1713/1242)及びVELOCIIMMUNE(登録商標)ヒト化マウス(VI3)から得られた抗原Bに特異的な抗体の相対的な結合動態

10

20

30

40

50

を示す図である。

【図6】差別的抗原かく乱(DAD)によって測定した、典型的な抗原Aに特異的な抗体()とは異なる少なくとも1つの結合特性を示す抗原Cに特異的なV_L抗原結合タンパク質()のクラスターを強調する、糖タンパク質である抗原Cに特異的な739の結合タンパク質の二次元主成分分析(PCA)のプロットを示す図である。

【図7】(A)ハイブリッド鎖または(B)軽鎖におけるある特定のCDR3のアミノ酸長(x軸)を有する、抗原A(

【化1】



10

)、抗原B()または抗原C()に特異的なV_L結合タンパク質の数(総数、y軸)を提供する図である。

【発明を実施するための形態】

【0042】

定義

本発明は特定の方法、及び記載される実験条件に限定されず、これは、かかる方法及び条件が変化し得るからである。本発明の範囲はクレームによって定義されるので、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを記載する目的のためのものであって、限定を意図するものではないことも理解されるべきである。

【0043】

20

別様に定義されない限り、用語または語句が使用される文脈から相違することが明確に示されないまたは明瞭に明らかではない限り、本明細書で使用される用語及び表現はすべて、その用語及び表現について当該技術で確立されている意味を含む。

【0044】

「抗原結合タンパク質」、「結合タンパク質」、「免疫グロブリンタンパク質」等は、抗原結合部位を含み、体細胞で変異されてもよく、抗原(またはそのエピトープ部分)、たとえば、免疫応答及び特に親和性成熟した免疫グロブリン分子の産生を誘導することができる物質を認識し、それと結合することができる単量体または多量体のペプチド分子を指す。抗原結合タンパク質はV_L抗原結合タンパク質及び従来抗体を包含する。抗原結合タンパク質の「抗原結合部位」は抗原と結合する抗原結合タンパク質の領域を指す。

30

【0045】

「V_L抗原結合タンパク質」、「抗原結合V_Lタンパク質」、「V_L結合タンパク質」等は、重鎖定常領域に操作可能に連結される、抗原結合部位を形成してもよい、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む免疫グロブリンタンパク質を指す。「V_L抗原結合タンパク質」には、V_L結合タンパク質が抗原結合部位を形成してもよい2つの軽鎖可変ドメインを含むように軽鎖をさらに含む免疫グロブリン分子が含まれる。一実施形態では、V_L抗原結合タンパク質の少なくとも2つの軽鎖可変ドメインは同族である。一部の実施形態では、2つの軽鎖可変ドメインのそれぞれは、軽鎖可変領域(V_L)遺伝子断片及び/または軽鎖連結領域(J_L)遺伝子断片によってコードされる、またはそれに由来する。好適な実施形態では、2つの軽鎖可変ドメインの一方はハイブリッド免疫グロブリン鎖の一部であってもよく、2つの軽鎖可変ドメインの他方は免疫グロブリン軽鎖(L)の一部であってもよい。そのようなV_L結合ドメインは記載されている。たとえば、全体が参照によって本明細書に組み入れられる2011年8月2日に出願された米国特許公開第20120096572号を参照のこと。

40

【0046】

「抗体」、「従来抗体」、「典型的な抗体」、「抗原結合抗体」等の用語は一般に、少なくとも、(i)重鎖可変(V_H)遺伝子断片、重鎖多様性(D_H)遺伝子断片及び/または重鎖連結(J_H)遺伝子断片に由来する重鎖可変ドメインと、(ii)軽鎖可変(V_L)遺伝子断片及び/または軽鎖連結(J_L)遺伝子断片に由来する軽鎖可変ドメインとを含む抗原結合部位を含む免疫グロブリンタンパク質を指す。好適な実施形態では、抗

50

体の V_H と V_L のドメインは同族である。従って、抗体、従来の抗体、典型的な抗体等の用語は単鎖可変断片 (s c F v)、断片抗原結合 (F a b) 領域、 $F(a b')$ ₂ 断片等を包含する。そのような用語はまた、四量体分子、たとえば、ジスルフィド結合によって相互接続された2つの免疫グロブリン重 (H) 鎖と2つの免疫グロブリン軽 (L) 鎖とを有する分子も包含する。

【0047】

各重鎖は重鎖可変ドメインと重鎖定常領域 (C_H) を含む。重鎖定常領域は3つのドメイン、すなわち C_{H1} 、 C_{H2} 及び C_{H3} を含む。各軽鎖は軽鎖可変ドメインと軽鎖定常領域 (C_L) を含む。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、より保存されたフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる領域が点在する相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変の領域にさらに細分することができる。各重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、3つの CDR 及び4つの FR を、以下の順でアミノ末端からカルボキシ末端まで配置されて含む: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (重鎖 CDR は $HCDR1$ 、 $HCDR2$ 及び $HCDR3$ と略記されてもよく; 軽鎖 CDR は $LCDR1$ 、 $LCDR2$ 及び $LCDR3$ と略記されてもよい)。「高親和性」抗体という用語には、約 10^{-9} M 以下 (たとえば、約 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、または約 1×10^{-12} M) の標的エピトープに関する K_D を有する抗体が含まれる。一実施形態では、 K_D は表面プラスモン共鳴、たとえば、BIACORE (商標) によって測定され; 別の実施形態では、 K_D は ELISA によって測定される。

10

【0048】

「およそ」という用語には、本明細書で対象とする1以上の値に適用されるとき、言及される参照値に類似する値が含まれる。ある特定の実施形態では、「およそ」または「約」という用語には、別様に述べられない限りまたは文脈から別様に明らかではない限り (そのような数が考えられる値の100%を超える場合を除く)、言及される参照値のいずれかの方向 (超えるまたは未満) で25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満の範囲内に入る値の範囲が含まれる。

20

【0049】

「生物学的に活性がある」という用語には、生物系にて、試験管内でまたは生体内で (たとえば、生物にて) 活性を有する任意の作用因子の特性が含まれる。たとえば、生物にて存在するとき、その生物の中で生物学的な作用を有する作用因子は生物学的に活性があると見なされる。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がある場合、そのタンパク質またはポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を共有するタンパク質またはポリペプチドの部分は通常、「生物学的に活性がある」部分と呼ばれる。

30

【0050】

小分子の文脈における「担体」という用語、たとえば、小分子に連結される担体は、小分子が結合されて小分子を免疫原性にしてもよい高分子、一般にタンパク質を指す。

【0051】

「同族」は、「と同族」という用語、たとえば、第2の V_L ドメイン「と同族」である第1の V_L ドメインの意味で使用されるとき、本発明に従ってマウスによって作られた同じ結合タンパク質に由来する2つの V_L ドメイン間の関係への言及を含むように意図される。たとえば、本発明の実施形態に従って遺伝子操作されたマウス、たとえば、 V_H 、 D_H 及び J_H の領域を V_L 及び J_L の領域で置き換えている重鎖遺伝子座を有するマウスは、第1のヒト V_L ドメインと融合された同じマウスの C_H 領域 (たとえば、IgG アイソタイプ) で構成される2つの同一のポリペプチド鎖と、第2のヒト V_L ドメインと融合された同じマウスの C_L 領域で構成される2つの同一のポリペプチド鎖とを有する抗体様の結合タンパク質を作る。マウスにおけるクローン選択の間に、第1と第2のヒト V_L ドメインはクローン選択過程によって選択されて単一の抗体様の結合タンパク質の背景で一緒に出現した。従って、クローン選択過程の結果、単一の抗体様分子にて一緒に出現する第

40

50

1と第2のV_Lドメインは「同族」と言われる。対照的に、第1の抗体様分子に出現するV_Lドメインと第2の抗体様分子に出現するV_Lドメインは、第1と第2の抗体様分子が同一の重鎖を有さない限り（すなわち、第1のヒト重鎖領域に融合されたV_Lドメインと第2のヒト重鎖領域に融合されたV_Lドメインが同一でない限り）同族ではない。

【0052】

「相補性決定領域」という表現または「CDR」という用語には、免疫グロブリン分子（たとえば、抗体またはT細胞受容体）の軽鎖または重鎖の可変領域における2つのフレームワーク領域の間に通常（すなわち、野生型動物にて）出現する生物の免疫グロブリン遺伝子の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列が含まれる。CDRは、たとえば、生殖細胞系列の配列または再構成された配列若しくは再構成されていない配列によって、及びたとえば、ナイーブまたは成熟したB細胞またはT細胞によってコードされ得る。CDRを体細胞で変異させる（たとえば、動物の生殖細胞系列でコードされた配列とは異なる）ことができ、ヒト化することができ、及び/またはアミノ酸の置換、付加または欠失によって修飾することができる。一部の状況では（たとえば、CDR3については）、CDRは、（たとえば、再構成されていない核酸配列にて）隣接していないが、たとえば、配列をスプライスしたまたは接続した結果（たとえば、重鎖CDR3を形成するためのV-D-Jの組換え）、B細胞の核酸配列では隣接する、2以上の配列（たとえば、生殖細胞系列の配列）によってコードされ得る。

10

【0053】

「同等の」という用語には、互いに同一でないかもしれないが、観察される差異または類似性に基づいて結論が合理的に引き出され得るようにそれらの間で比較できるほど十分に類似する2以上の作用因子、実体、状況、一連の状態等が含まれる。当業者は背景を考慮して2以上の作用因子、実体、状況、一連の状態等が同等であると見なされるために所与の状況にてどの程度の同一性が必要とされるのかを理解するであろう。

20

【0054】

保存的なアミノ酸置換を記載するための「保存的な」という用語には、類似の化学的特性（たとえば、電荷または疎水性）を持つ側鎖R基を有する別のアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換が含まれる。一般に、保存的なアミノ酸置換はタンパク質の対象とする機能的特性、たとえば、リガンドに結合する受容体の能力を大幅に変化させないであろう。類似の化学的特性を持つ側鎖を有するアミノ酸の群の例には、たとえば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンのような脂肪族側鎖；たとえば、セリン及びスレオニンのような脂肪族ヒドロキシル側鎖；たとえば、アスパラギン及びグルタミンのようなアミド含有側鎖；たとえば、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンのような芳香族側鎖；たとえば、リジン、アルギニン及びヒスチジンのような塩基性側鎖；たとえば、アスパラギン酸及びグルタミン酸のような酸性側鎖；ならびに、たとえば、システイン及びメチオニンのようなイオウ含有側鎖が挙げられる。保存的なアミノ酸置換の群には、たとえば、バリン/ロイシン/イソロイシン、フェニルアラニン/チロシン、リジン/アルギニン、アラニン/バリン、グルタミン酸/アスパラギン酸、及びアスパラギン/グルタミンが挙げられる。一部の実施形態では、保存的なアミノ酸置換は、たとえば、アラニン走査変異誘発で使用されるようなタンパク質におけるアラニンによるいずれかの天然残基の置換であることができる。一部の実施形態では、保存的な置換は、参照によって本明細書に組み入れられるGonnetら、(1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science, 256: 1443-45にて開示されたPAM250対数尤度マトリクスにおいて正の値を有するものである。一部の実施形態では、置換は、PAM250対数尤度マトリクスにおいて非負の値を有するならば、「適度に保存的」と見なされる。

30

40

【0055】

一部の実施形態では、免疫グロブリンの軽鎖または重鎖における残基の位置は1以上の保存的なアミノ酸置換によって異なる。一部の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖または

50

その機能的断片（たとえば、B細胞からの発現及び分泌を可能にする断片）における残基の位置は、アミノ酸配列が本明細書に載せられている軽鎖と同一ではなく、1以上の保存的なアミノ酸置換によって異なる。

【0056】

「差別的抗原かく乱」の文脈外で使用される「かく乱」という用語には、（たとえば、相同組換えを介して）DNAに割り込む事象の結果が含まれる。一部の実施形態では、かく乱は、DNA配列（複数可）の欠失、挿入、逆位、修飾、置き換え、置換またはそれらのいかなる組み合わせをも達成してもよいし、または表してもよい。一部の実施形態では、かく乱は、DNAのコーディング配列（複数可）におけるミスセンス、ナンセンスまたはフレームシフト変異、またはそれらのいかなる組み合わせのような変異の導入を達成してもよいし、または表してもよい。一部の実施形態では、かく乱は細胞にとって内在性である遺伝子または遺伝子座において生じてもよい。一部の実施形態では、挿入には、細胞またはゲノムにおける内在性の部位への遺伝子全体または遺伝子の断片、たとえば、エクソンの挿入が含まれてもよい。一部の実施形態では、挿入により、挿入先の内在性の配列の起源以外の起源のものである配列を導入してもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または（たとえば、遺伝子によってコードされたタンパク質の）遺伝子産物の発現及び/または活性を高めてもよい。一部の実施形態では、かく乱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てもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物（たとえば、コードされたタンパク質）の配列を変えてもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物（たとえば、コードされたタンパク質）を切り詰めてもよいし、または断片化してもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物を伸長してもよく；一部のそのような実施形態では、かく乱は融合タンパク質の組み立てを達成してもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物のレベルに影響を与えてもよいが、活性には影響を与えなくてもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物の活性に影響を与えてもよいが、レベルには影響を与えなくてもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物のレベルに有意な影響を有さなくてもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物の活性に有意な影響を有さなくてもよい。一部の実施形態では、かく乱は遺伝子または遺伝子産物のレベルまたは活性のいずれにも有意な影響を有さなくてもよい。

10

20

30

【0057】

「内在性の遺伝子座」または「内在性の遺伝子」という表現には、かく乱（本明細書に記載されるような欠失、挿入、逆位、修飾、置き換え、置換またはそれらの組み合わせ）の導入に先立って親生物または参照生物で見いだされる遺伝学的遺伝子座が含まれる。一部の実施形態では、内在性の遺伝子座は自然界で見いだされる配列を有する。一部の実施形態では、内在性の遺伝子座は野生型である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような内在性の遺伝子座を含有する参照生物は野生型の生物である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような内在性の遺伝子座を含有する参照生物は操作された生物である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような内在性の遺伝子座を含有する参照生物は（野生型であろうと操作されていようと）実験室で飼育した生物である。

40

【0058】

「内在性プロモーター」という表現には、たとえば、野生型の生物にて内在性の遺伝子と自然に会合するプロモーターが含まれる。

【0059】

「エピトープ結合タンパク質」という表現には、少なくとも1つのCDRを有し、エピトープを選択的に認識することができる、たとえば、約1マイクロモル以下（たとえば、約 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、または約 1×10^{-12} Mである K_D ）である K_D でエピトープと結合することができるタンパク質が含まれる。治療用エピトープ結合タンパク質（たとえば、治療用抗体）はナノモルまたはピコモルの範囲である K_D を必要とすることが多い。

50

【0060】

たとえば、機能的なポリペプチドに関連した「機能的な」には、通常ネイティブなタンパク質に伴う少なくとも1つの生物活性を保持するポリペプチドが含まれる。別の例では、機能的な免疫グロブリンの遺伝子断片には、機能的な再構成を行って再構成された免疫グロブリン遺伝子配列を生成することができる可変遺伝子断片が含まれてもよい。

【0061】

「機能的な断片」という表現には、発現され、分泌され、マイクロモル、ナノモルまたはピコモルの範囲での K_D でエピトープに特異的に結合することができるエピトープ結合タンパク質の断片が含まれる。特異的な認識には、少なくともマイクロモル範囲、ナノモル範囲またはピコモル範囲である K_D を有することが含まれる。

10

【0062】

「遺伝子断片」または「断片」という表現には、そのそれぞれが1以上の（重鎖または軽鎖の）定常（C）遺伝子断片に操作可能に連結されてもよい、（たとえば、内在性リコンビナーゼが介在する）再構成に関与して再構成されたV/Jまたは再構成されたV/D/Jの遺伝子配列を形成することができる免疫グロブリン遺伝子座（たとえば、ヒト及び齧歯類にて）での再構成されていない配列を含む、（重鎖または軽鎖の）可変（V）遺伝子断片、多様性（D）遺伝子断片または（重鎖または軽鎖の）連結J遺伝子断片への言及が含まれる。別様に指示されない限り、V、D及びJの断片は12/23ルールに従ってV/J組換えまたはV/D/J組換えを可能にする組換えシグナル配列（RSS）を含む。遺伝子断片にはまた、アイソタイプスイッチングを生じる部位特異的な組換えを可能にするスイッチ領域として知られる反復DNAを定常領域遺伝子断片の5'末端で含んでもよい、（重鎖または軽鎖の）定常領域遺伝子断片への言及も含まれる。重鎖定常領域の遺伝子配列は、たとえば、生殖細胞系列の組織化において1つの重鎖定常領域遺伝子断片または重鎖定常領域遺伝子断片のクラスタを含んでもよく、そのクラスタは好ましくは、各重鎖定常領域遺伝子断片の5'で、部位特異的な組換えによるアイソタイプスイッチングを可能にするスイッチ領域も含んでもよい。別様に指示されない限り、断片はさらに、それらが自然界に関連する配列またはその機能的な同等物（たとえば、V断片についてはプロモーター（複数可）及びリーダー（複数可））を含む。

20

【0063】

免疫グロブリンの核酸配列に関連して、「生殖細胞系列」という用語には、子孫に引き継ぐことができる核酸配列が含まれる。

30

【0064】

「免疫グロブリン重鎖」、「重鎖」等の表現は一般に、アミノ末端からカルボキシ末端までで重鎖可変ドメイン（ V_H ）及び重鎖定常ドメイン（ C_H ）を含み、 C_H1 ドメインを欠き、及び任意でさらにヒンジ領域を欠いている重鎖を含む、完全長の免疫グロブリンタンパク質を指す。免疫グロブリン重鎖の配列は任意の生物に由来してもよい。

【0065】

「重鎖可変ドメイン」は、一般に重鎖可変（ V_H ）遺伝子断片（またはその一部）、重鎖多様性（ D_H ）遺伝子断片（またはその一部）及び重鎖連結（ J_H ）遺伝子断片（またはその一部）に由来する配列を含む、好ましくは再構成された重鎖可変領域遺伝子によってコードされる、またはそれに由来するアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのドメインを指す。好適な実施形態では、重鎖可変領域の遺伝子配列、たとえば、再構成された V_H 、 $-D_H-J_H$ の遺伝子配列は、生産的な遺伝子再構成を受けることができる、たとえば、連結してインフレームの重鎖可変領域遺伝子配列を形成することができる再構成されていない V_H 、 D_H 及び J_H の遺伝子断片、好ましくは生殖細胞系列の再構成されていない V_H 、 D_H 及び J_H の遺伝子断片のレパートリーに由来する。 V_H 遺伝子断片、 D_H 遺伝子断片または J_H 遺伝子断片には、齧歯類（たとえば、マウス、ラット等）及びヒトを含むが、それらに限定されない任意の生物に由来する V_H 遺伝子断片、 D_H 遺伝子断片または J_L 遺伝子断片が挙げられる。体細胞突然変異（たとえば、 V_H 、 D_H 及び/または J_H の遺伝子断片の生殖細胞系列の配列によってコードされていないアミノ酸）を含む重鎖

40

50

可変ドメイン及びそれをコードする再構成された重鎖可変領域遺伝子はそれにもかかわらず、機能的に再構成されて先ず第1に、たとえば、抗原が介在する増殖に先立って重鎖可変ドメインをコードする遺伝子を形成する、生殖細胞系列の V_H 、 D_H 及び/または J_H の遺伝子断片またはその一部に由来すると見なされてもよい。

【0066】

免疫グロブリン重鎖可変ドメインは通常、別様に特定されない限り、アミノ末端からカルボキシ末端までに、3つの重鎖相補性決定領域(CDR)と4つの重鎖フレームワーク領域(FR)、たとえば、FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4を含む。 V_H ドメインはまた、重鎖のN末端から重鎖定常ドメインのN末端まで(N末端からC末端に)伸びる重鎖の部分も指してもよい。

10

【0067】

重鎖定常ドメイン(C_H)は、任意の生物に由来する重鎖定常領域の遺伝子断片またはその一部によって好ましくはコードされるアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのドメインを指す。例となる重鎖定常領域の遺伝子断片には、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、またはIgEの重鎖定常ドメインをコードする C_μ 遺伝子断片、 C_δ 遺伝子断片、 C_γ (たとえば、 $C_{\gamma 1}$ 、 $C_{\gamma 2}$ 、 $C_{\gamma 3}$ 、 $C_{\gamma 4}$)遺伝子断片、 C_α (たとえば、 $C_{\alpha 1}$ 、 $C_{\alpha 2}$)遺伝子断片、または C_λ 遺伝子断片が挙げられるが、それらに限定されない。典型的な重鎖定常領域の遺伝子断片は通常、それぞれ C_H1 ドメイン、ヒンジ、 C_H2 ドメイン、 C_H3 ドメイン、任意で C_H4 ドメイン(たとえば、IgMまたはIgEの場合)、及び任意で膜貫通(M)ドメイン(たとえば、リンパ球上の膜結合免疫グロブリンの場合)をコードするエクソンを含む。 C_H ドメインはまた、機能的な C_H1 領域を欠き、任意でさらに機能的なヒンジ領域を欠く重鎖定常領域遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのドメインも指してもよい。一般に、 C_H ドメインはまた重鎖のFR4の外側から重鎖のC末端に向かって(N末端側からC末端側に)伸びる重鎖の部分も指してもよい。 C_H ドメインはまたFR4の外側からハイブリッド鎖のC末端に向かって(N末端側からC末端側に)伸びるハイブリッド鎖の部分も指してもよい。

20

【0068】

軽微な逸脱、たとえば、C末端からの1、2、3または数個のアミノ酸の切り詰めを伴った重鎖定常ドメインは、「重鎖定常ドメイン」表現によって包含されることであろうし、配列の修飾、たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸置換を伴った重鎖定常ドメインも同様である。アミノ酸置換は、たとえば、(免疫グロブリンの定常ドメイン、たとえば、ヒトIgGの定常ドメインのEUの番号付けを参照して)、228、233、234、235、236、237、238、239、241、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438、及び439から選択される1以上の位置で行うことができる。

30

40

【0069】

たとえば、及び限定の目的ではなく、重鎖定常ドメインは修飾されて、向上した血清半減期(列挙される修飾(複数可)を持たない同じ重鎖定常ドメインと比べたとき)を示してもよく、250位(たとえば、EまたはQ); 250及び428位(たとえば、LまたはF); 252位(たとえば、L/Y/F/WまたはT)、254位(たとえば、SまたはT)、及び256位(たとえば、S/R/Q/E/DまたはT)における修飾; または428位及び/または433位(たとえば、L/R/P/QまたはK)及び/または43

50

4位(たとえば、H/FまたはY)における修飾;または250位及び/または428位における修飾;または307位または308位(たとえば、308F、V308F)、及び434位における修飾を有してもよい。別の例では、修飾は、428L(たとえば、M428L)及び434S(たとえば、N434S)の修飾;428L、259I(たとえば、V259I)、及び308F(たとえば、V308F)の修飾;433K(たとえば、H433K)及び434(たとえば、434Y)の修飾;252、254、及び256(たとえば、252Y、254T、及び256E)の修飾;250Q及び428Lの修飾(たとえば、T250Q及びM428L);307及び/または308の修飾(たとえば、308Fまたは308P)を含むことができる。残基はEUの番号付け方式に従って番号を付けられている。別の非限定例では、重鎖定常ドメインは修飾されて、プロテインA

10

【0070】

「異種の」という用語には異なる供給源に由来する作用因子または実体が含まれる。たとえば、ポリペプチド、遺伝子または遺伝子産物に関連して使用されるまたは特定の細胞若しくは生物に存在する場合、該用語は、関連するポリペプチド、遺伝子または遺伝子産物が、(1)ヒトの手によって操作された;(2)ヒトの手を介して(たとえば、遺伝子操作を介して)細胞または生物(またはその前駆体)に導入された;及び/または(3)関連する細胞または生物(たとえば、関連する細胞型または生物種)によって天然に産生

20

【0071】

「宿主細胞」という用語には、異種の(たとえば、外来性の)核酸またはタンパク質が導入されている細胞が含まれる。当業者は本開示を読むと、そのような用語が特定の対象細胞を含むだけでなく、その細胞の子孫を含むようにも使用されることを理解するであろう。ある特定の修飾が突然変異または環境のいずれかの影響に起因して後続する世代で生じてもよいので、そのような子孫は実際、親細胞と同一ではなくてもよいが、「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれることが当業者によって依然として理解される。一部の実施形態では、宿主細胞は原核細胞または真核細胞であり、またはそれを含む。一般に、宿主細胞は、細胞が指定される生命界にかかわらず、異種の核酸またはタンパク質を受け

取る及び/または産生するのに好適である任意の細胞である。本開示に従って宿主細胞として利用されてもよい例となる細胞には、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(たとえば、E. coli、Bacillus属、Streptomyces属等の株)、マイコバクテリアの細胞、真菌細胞、酵母細胞(たとえば、S. cerevisiae、S. pombe、P. pastoris、P. methanolicus等)、植物細胞、昆虫細胞(たとえば、SF-9、SF-21、バキュロウイルス感染昆虫細胞、Trichoplusia ni等)、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または、たとえば、ハイブリドーマ若しくはクアドローマのような細胞融合物が挙げられる。一部の実施形態では、細胞は、ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラットまたはマウスの細胞である。一部の実施形態では、細胞は真核細胞であり、以下の細胞から選択される:

CHO(たとえば、CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO)、COS(たとえば、COS-7)、腎細胞、Vero、CV1、腎臓(たとえば、HEK293、293EBNA、MSR293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC5、Colo205、HB8065、HL-60、(たとえば、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、BRL3A細胞、HT1080細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞、及び前述の細胞に由来する細胞株。一部の実施形態では、細胞は1以上のウイルス遺伝子を含み、たとえば、ウイルス遺伝子を発現する網膜細胞(たとえば、PER.C6(商標)細胞)である。一部の実施形態では、宿主細胞は単離された細胞である、またはそれを含む。一部の実施形態では

30

40

50

、宿主細胞は組織の一部である。一部の実施形態では、宿主細胞は生物の一部である。

【0072】

当該技術で理解されている「ヒト化された」という用語には、核酸またはタンパク質であって、構造（すなわち、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列）が、自然界で非ヒト動物にて見いだされ、自然界でヒトにて見いだされる対応する型とは区別できる関連する核酸またはタンパク質の型と実質的にまたは完全に同じように対応する部分を含み、及び構造が非ヒト動物の型に存在するものと異なり、代わりにヒト型で見いだされる互換性の構造にさらに密接に対応する部分も含む、核酸またはタンパク質が含まれる。一部の実施形態では、「ヒト化された」遺伝子は、ヒトのポリペプチド（たとえば、ヒトのタンパク質またはその一部、たとえば、その特徴的な部分）のアミノ酸配列としてのアミノ酸配列を実質的に有するポリペプチドをコードするものである。ほんの一例だけを挙げれば、膜受容体の場合、「ヒト化された」遺伝子は、アミノ酸配列がヒトの細胞外部分のそれと同一であるまたは実質的に同一である細胞外部分を持ち、その残りの配列が非ヒト（たとえば、マウス）のポリペプチドの配列と同一であるまたは実質的に同一であるポリペプチドをコードしてもよい。一部の実施形態では、ヒト化された遺伝子はヒト遺伝子のDNA配列の少なくとも一部を含む。一部の実施形態では、ヒト化された遺伝子はヒト遺伝子で見いだされるDNA配列全体を含む。一部の実施形態では、ヒト化されたタンパク質はヒトのタンパク質に出現する部分を含むアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、ヒト化されたタンパク質は配列全体がヒトのタンパク質で見いだされるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態（たとえば、ヒト化されたタンパク質が配列全体がヒトのタンパク質で見いだされるアミノ酸配列を有する幾つかを含む）では、ヒト化されたタンパク質は非ヒト動物の内在性の遺伝子座から発現され、内在性の遺伝子座はタンパク質をコードする関連するヒト遺伝子のホモログまたはオルソログに対応する。

10

20

【0073】

配列の比較と関連した「同一性」という用語には、ヌクレオチド及び/またはアミノ酸の配列同一性を測定するのに使用することができる当該技術で既知の多数の様々なアルゴリズムのいずれかによって決定されるような同一性が含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような同一性は、10.0の開放ギャップペナルティ、0.1の伸長ギャップペナルティを採用するClustalW v. 1.83（遅い）配列比較を用い、Gonnet類似性マトリクス（MACVECTOR（商標）10.0.2、MacVector Inc.、2008）を用いて決定される。「同一性」という用語には、ポリマー分子間、たとえば、核酸分子（たとえば、DNA分子及び/またはRNA分子）間、及びポリペプチド分子間での全体的な関連性が含まれる。一部の実施形態では、高分子は、その配列が少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一であれば、互いに「実質的に同一である」と見なされる。当業者によって理解されるように、異なる配列にてどの残基が互いに「対応する」かを検討する際、もう1つの配列に比べた一方の配列における指定された長さのギャップを許容することによることを含む、相同性の程度を決定するために配列の比較を可能とする種々のアルゴリズムが利用できる。2つの核酸配列間での同一性パーセントの算出は、たとえば、最適な比較の目的で2つの配列を並べることによって実施することができる（たとえば、最適な配列比較のために第1と第2の核酸配列の一方または双方にギャップを導入することができ、比較目的のために対応しない配列を無視することができる）。ある特定の実施形態では、比較の目的で並べた配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または実質的に100%である。次いで対応するヌクレオチドの位置でのヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じヌクレオチドによって占められる場合、そのときは分子はその位置で同一である。2つの配列間での同一性パーセントは、ギャップの数及び2つの配列の最適な配列比較のために導入されることが必要である各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共

30

40

50

有される同一の位置の数の関数である。2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントを決定するのに有用な代表的なアルゴリズム及びコンピュータプログラムには、たとえば、PAM120加重残基表、12のギャップ長ペナルティ及び4のギャップペナルティを用いたALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているMeyers及びMiller(CABIOS, 1989, 4:11-17)のアルゴリズムが挙げられる。或いは、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、たとえば、NWSgapdna.CMPマトリクスを用いたGCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラムを用いて決定することができる。

【0074】

「単離される」という用語には、(1)最初に産生されたとき(自然界であれ、及び/または実験上の設定であれ)伴っていた成分の少なくとも幾つかから分離されている、及び/または(2)ヒトの手で設計され、作出され、調製され及び/または製造されている物質及び/または実体が含まれる。単離された物質及び/または実体は、それらが当初伴っ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%から、または約99%を超えて分離されてもよい。一部の実施形態では、単離された作用因子は、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%を超えて純粋である。物質は、実質的に他の成分を含まなければ、「純粋」である。一部の実施形態では、当業者によって理解されるように、物質は、たとえば、1以上の担体または賦形剤(たとえば、緩衝液、溶媒、水等)のようなある特定の他の成分と組み合わせられた後も、「単離された」またはさらに「純粋である」と依然として見なされてもよく;そのような実施形態では、物質の単離パーセントまたは純度パーセントは、そのような担体または賦形剤を含まないで算出される。ほんの一例を挙げると、一部の実施形態では、自然界に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドのような生体高分子は、(a)導出の起源または供給源が理由で、自然界にて天然状態でそれに伴う成分の一部またはすべてと会合していない場合、(b)自然界にてそれを産出する種に由来する同じ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、(c)自然界にてそれを産出する種のものではない細胞または他の発現系に由来する成分によって発現されるまたはそうでなければそれと共にある場合、「単離される」と見なされる。従って、たとえば、一部の実施形態では、化学的に合成されるポリペプチドまたは自然界にてそれを産出するものとは異なる細胞系で合成されるポリペプチドは「単離された」ポリペプチドであると見なされる。代わりにまたはさらに、一部の実施形態では、1以上の精製法に供されているポリペプチドは、(a)自然界でそれに伴う他の成分から及び/または(b)当初産出された際それに伴っていた他の成分からそれが分離されている限り「単離された」ポリペプチドであると見なされてもよい。

【0075】

「軽鎖可変ドメイン」は、一般に軽鎖可変(V_L)遺伝子断片(またはその一部)と軽鎖連結(J_L)遺伝子断片(またはその一部)に由来する配列を含む、再構成された軽鎖可変領域遺伝子によって好ましくはコードされるまたはそれに由来するアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのドメインを指す。好適な実施形態では、軽鎖可変領域の遺伝子配列、たとえば、再構成された $V_L - J_L$ の遺伝子配列は、再構成されていない V_L 及び/または J_L の遺伝子断片のレパートリー、好ましくは、生産的な遺伝子再構成を受けることができる、たとえば、再構成してインフレームの軽鎖可変領域の遺伝子配列を形成することができる生殖細胞系列の再構成されていない V_L 遺伝子断片及び/または生殖細胞系列の再構成されていない J_L 遺伝子断片のレパートリーに由来する。 V_L 遺伝子断片または J_L 遺伝子断片には、齧歯類(たとえば、マウス、ラット等)及びヒトを含むが、これらに限定されない任意の生物に由来する V_L 遺伝子断片または J_L 遺伝子断片が含まれる。体細胞突然変異(たとえば、 V_L 及び/または J_L の遺伝子断片の生殖細胞系列の配列によってコードされないアミノ酸)を含む軽鎖可変ドメイン及びそれをコードする再構成さ

10

20

30

40

50

れた軽鎖可変領域遺伝子はそれにもかかわらず、生産に再構成されて先ず第1に、たとえば、抗原が介在する増殖に先立って軽鎖可変ドメインをコードする遺伝子を形成する、生殖細胞系列の V_L 及び/または J_L の遺伝子断片またはその一部に由来すると見なされてもよい。

【0076】

免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインは通常、アミノ末端からカルボキシ末端までに、別様に特定されない限り、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)と4つのフレームワーク領域(FR)、たとえば、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を含む。 V_L ドメインは、軽鎖のN末端から軽鎖の軽鎖定常ドメインのN末端(N末端からC末端に)に伸びる軽鎖の部分も指してもよい。 V_L ドメインはまた、ハイブリッド鎖のN末端からハイブリッド鎖の重鎖定常ドメインのN末端(N末端からC末端に)に伸びるハイブリッド鎖の部分も指してもよい。

10

【0077】

軽鎖定常ドメイン(C_L)は、 C または C の遺伝子断片、たとえば、齧歯類またはヒトの C または C の遺伝子断片によってコードされるアミノ酸配列のような、しかし、それらに限定されない、任意の生物に由来する軽鎖定常領域遺伝子によって好ましくはコードされるアミノ酸配列を有する免疫グロブリンのドメインを指す。そのような C または C のドメインは当該技術で周知である。一般に、 C_L ドメインはFR4の外側から軽鎖のC末端まで(N末端からC末端に)伸びる軽鎖の部分も指してもよい。

20

【0078】

「マイクロモル範囲」という表現は1~999マイクロモルを意味するように意図され、「ナノモル範囲」という表現は1~999ナノモルを意味するように意図され、「ピコモル範囲」という表現は1~999ピコモルを意味するように意図される。

【0079】

「免疫グロブリンのハイブリッド鎖」、「ハイブリッド鎖」、「ハイブリッドの免疫グロブリン鎖」等の表現は、アミノ末端からカルボキシ末端までに軽鎖可変ドメイン(体細胞で変異させてもよく、または変異させなくてもよい)と重鎖定常ドメインを含む免疫グロブリンタンパク質を指す。一般に、ハイブリッド鎖は、重鎖定常領域の遺伝子配列に操作可能に連結された再構成された軽鎖可変領域の遺伝子配列によってコードされる。ハイブリッド免疫グロブリン鎖の軽鎖可変領域の遺伝子配列は一般に、軽鎖可変(V_L)遺伝子断片(またはその一部)及び軽鎖連結(V_J)遺伝子断片に由来する配列を含んでもよい。好適な実施形態では、ハイブリッド鎖の可変ドメインをコードする軽鎖可変領域の遺伝子配列、たとえば、再構成された V_L-J_L の遺伝子配列は、(a)生産的な再構成を受けることができる、たとえば、再構成してインフレームの軽鎖可変領域の遺伝子配列を形成することができる、及び(b)1以上の重鎖定常領域の遺伝子断片、たとえば、定常領域の遺伝子断片の再構成されていないクラスまたは定常領域の遺伝子断片の1つに操作可能に連結される、再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子断片のレパートリー、好ましくは、生殖細胞系列の再構成されていない V_L 及び J_L 遺伝子断片のレパートリーに由来する。

30

【0080】

「非ヒト動物」という表現には、ヒトではない脊椎生物が含まれる。一部の実施形態では、非ヒト動物は、円口類、硬骨魚、軟骨魚(たとえば、サメまたはエイ)、両生類、爬虫類、哺乳類または鳥類である。一部の実施形態では、非ヒト動物は、霊長類、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウシまたは齧歯類である。一部の実施形態では、非ヒト動物は、たとえば、ラットまたはマウスのような齧歯類である。

40

【0081】

「核酸」という表現には広義で、オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれているまたは組み込むことができる任意の化合物及び/または物質が含まれる。一部の実施形態では、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または組み込むことができる化合物及び/または物質である。文脈から明らかになるように、一部の実施形

50

態では、「核酸」には1以上の個々の核酸残基（たとえば、ヌクレオチド及び/またはヌクレオシド）が含まれ；一部の実施形態では、「核酸」には個々の核酸残基を含むオリゴヌクレオチド鎖が含まれる。

【0082】

「操作可能に連結される」はまた、操作可能に連結された成分がそれらの意図された様式で機能する関係も指す。一例では、タンパク質をコードする核酸配列は、適正な転写調節を保持するように調節配列（たとえば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーの配列等）に操作可能に連結されてもよい。一例では、免疫グロブリン可変領域（すなわちV(D)J断片）の核酸配列は、再構成された免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の遺伝子配列への配列間の適正な組換えを可能にするように免疫グロブリンの定常領域の核酸配列に操作可能に連結されてもよい。

10

【0083】

「ポリペプチド」という用語にはアミノ酸のいずれのポリマー鎖も含まれる。一部の実施形態では、ポリペプチドは自然界に存在するアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは自然界に存在しないアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ヒトの手の行動を介して設計される及び/または作出されるという点で操作されているアミノ酸配列を有する。

【0084】

「組換えの」という用語には、組換え手段によって設計される、操作される、調製される、発現される、創製される、または単離されるポリペプチド（たとえば、本明細書で記載されるようなB細胞活性化因子タンパク質）、たとえば、宿主細胞に形質移入された組換え発現ベクターを用いて発現されるポリペプチド、組換えのコンビナトリアルヒトポリペプチドのライブラリから単離されるポリペプチド（Hoogenboom, H. R., (1997), *TIB Tech.* 15: 62-70; Azzazy, H., 及び Highsmith, W. E., (2002), *Clin. Biochem.* 35: 425-445; Gavilondo, J. V., 及び Larrick, J. W. (2002), *BioTechniques*, 29: 128-145; Hoogenboom, H., 及び Chames, P. (2000), *Immunology Today*, 21: 371-378）、ヒトの免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（たとえば、マウス）から単離される抗体（たとえば、Taylor, L. D., et al. (1992), *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295; Kellermann, S. A., 及び Green, L. L. (2002), *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 593-597; Little, M. et al (2000), *Immunology Today*, 21: 364-370を参照のこと）、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が関与するいずれかの他の手段によって調製される、発現される、創製されるまたは単離されるポリペプチドを含むように意図される。一部の実施形態では、そのような選択された配列要素の1以上は自然界で見いだされる。一部の実施形態では、そのような選択された配列要素の1以上はコンピュータによって設計される。一部の実施形態では、1以上のそのような選択された配列要素は、既知の配列要素の変異誘発（たとえば、生体内でまたは試験管内で）から、たとえば、天然の供給源または合成の供給源から生じる。たとえば、一部の実施形態では、組換えポリペプチドは、対象とする供給源生物（たとえば、ヒト、マウス等）のゲノムに見いだされる配列で構成される。一部の実施形態では、組換えポリペプチドは変異誘発（たとえば、試験管内で、または生体内で、たとえば、非ヒト動物にて）の結果生じるアミノ酸配列を有するので、組換えポリペプチドのアミノ酸配列は、ポリペプチドの配列を起源とし、それに関連するが、生体内で非ヒト動物のゲノム内には天然に存在しなくてもよい配列である。

20

30

40

【0085】

「参照」という用語は、対象とする作用因子または値が比較される標準のまたは対照の作用因子または値を記載するのに本明細書で使用される。一部の実施形態では、対象とす

50

る作用因子または値の試験または測定と実質的に同時に参照の作用因子が試験され、及び/または参照の値が測定される。一部の実施形態では、参照の作用因子または値は履歴に基づく参照であり、任意で有形の媒体にて具現化される。通常、当業者によって理解されるように、参照の作用因子または値は、対象とする作用因子または値を測定するまたは特徴付けるのに利用されるものと同等の条件下で測定されるまたは特徴付けられる。一部の実施形態では、対照のまたは「参照」の非ヒト動物（たとえば、マウス）が本明細書で提供され、それには、ゲノムが従来の免疫グロブリン分子（すなわち、同族のV_HとV_Lドメインを有する免疫グロブリン）を発現する遺伝子操作された非ヒト動物が挙げられる。一部の特定の実施形態では、対照の遺伝子操作された非ヒト動物には、V E L O C I M M U N E（登録商標）ヒト化マウス（たとえば、参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第8,502,018号及び同第8,642,835号を参照のこと）及び/または「ULCマウス」（US2011-0195454A1、US2012-0021409A1、US2012-0192300A1、US2013-0045492A1、US2013-0185821A1及びUS2013-0302836A1を参照のこと）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0086】

「置き換え」という用語は、宿主遺伝子座にて（たとえば、ゲノムにて）見いだされる「置き換えられる」核酸配列（たとえば、遺伝子）がその遺伝子座から取り除かれ、異なる「置き換え」核酸がその場に位置する過程を含むように本明細書で使用される。一部の実施形態では、置き換えられる核酸配列と置き換え核酸配列は、たとえば、それらが互いに相同性である及び/または対応する要素（たとえば、タンパク質をコードする要素、調節性要素等）を含有するという点で互いに同等である。一部の実施形態では、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、スプライスレシーバ部位、イントロン、エクソン、非翻訳領域（UTR）の1以上を含み；一部の実施形態では、置き換え核酸配列は、1以上のコーディング配列を含む。一部の実施形態では、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である。一部の実施形態では、置き換え核酸配列は置き換えられる核酸配列のオルソログである。一部の実施形態では、置き換え核酸配列はヒトの核酸配列である、またはそれを含む。一部の実施形態では、置き換え核酸配列がヒトの核酸配列である、またはそれを含む場合を含めて、置き換えられる核酸配列は齧歯類の配列（たとえば、マウスの配列）である、またはそれを含む。そのように配置される核酸配列は、そのように配置される配列を得るのに使用される供給源の核酸配列の一部である1以上の調節配列（たとえば、プロモーター、エンハンサー、5'-または3'-非翻訳領域等）を含んでもよい。たとえば、種々の実施形態では、置き換えは、内在性配列の発現ではなく、そのように配置された核酸配列（異種の配列を含む）からの遺伝子産物の作出を生じる、内在性配列の異種配列による置換であり；置き換えは、内在性配列によってコードされるタンパク質と同様の機能を有するタンパク質をコードする核酸配列を持つ内在性のゲノム配列のものである（たとえば、内在性のゲノム配列は可変ドメインをコードし、DNA断片は1以上のヒトの可変ドメインをコードする）。種々の実施形態では、内在性の遺伝子またはその断片は対応するヒトの遺伝子またはその断片で置き換えられる。対応するヒトの遺伝子またはその断片は、構造及び/または機能において置き換えられる内在性の遺伝子またはその断片のオルソログである、またはそれに実質的に類似するまたは同じであるヒトの遺伝子またはその断片である。

【0087】

語句「小分子」という表現には、担体の非存在下での分子量が約6キログルトン（kD）未満のサイズであり、天然の供給源から抽出することができるまたは合成で産出することができる（生体異物性）有機化合物を指す。「小分子」は、さらに無機原子、たとえば、金属錯体を含む有機化合物も含んでもよい。「小分子」はハプテン、たとえば、従来の免疫グロブリン形式で抗原結合タンパク質と結合してもよいが、適応免疫応答を引き出すことができない分子を指してもよい。一部の実施形態では、小分子は担体の非存在下では、約5kD、4kD、3kD、約2kDまたは約1kD未満である。一部の実施形態では

、本明細書で記載されるような小分子の分子量は担体の非存在下では1 k Dから6 k Dまでの範囲である。一部の実施形態では、小分子の分子量は担体の非存在下で1 . 5 k D未満である。一部の特定の実施形態では、本明細書で記載されるような小分子の分子量は担体の非存在下では、1 4 0 0 ダルトン (D) 未満、1 3 0 0 D 未満、1 2 0 0 D 未満、1 1 0 0 D 未満、1 0 0 0 D 未満、9 0 0 D 未満、8 0 0 D 未満、7 0 0 D 未満、6 0 0 D 未満、5 0 0 D 未満、4 0 0 D 未満、3 0 0 D 未満、2 0 0 D 未満、または1 0 0 D 未満である。一部の実施形態では、小分子は担体の非存在下で約8 0 0 ダルトン (D)、約6 0 0 D、約5 0 0 D、約4 0 0 D、約3 0 0 D、約2 0 0 D、または約1 0 0 D 未満である。一部の実施形態では、小分子は担体の非存在下で約2 0 0 0 g / モル未満、約1 5 0 0 g / モル未満、約1 0 0 0 g / モル未満、約8 0 0 g / モル未満、または約5 0 0 g / モル未満である。一部の実施形態では、小分子はポリマーではない。一部の実施形態では、小分子はポリマー部分を含まない。一部の実施形態では、小分子はタンパク質またはポリペプチドではない (たとえば、オリゴペプチドまたはペプチドではない)。一部の実施形態では、小分子はポリヌクレオチドではない (たとえば、オリゴヌクレオチドではない)。一部の実施形態では、小分子は多糖類ではない。一部の実施形態では、小分子は多糖類を含まない (たとえば、糖タンパク質、プロテオグリカン、糖脂質等ではない)。一部の実施形態では、小分子は脂質ではない。一部の実施形態では、小分子は調節剤である。一部の実施形態では、小分子は生物活性がある。一部の実施形態では、小分子は検出可能である (たとえば、少なくとも1つの検出可能な部分を含む)。一部の実施形態では、小分子は治療剤である。

10

20

【0088】

「体細胞で高頻度変異した」という表現には、クラススイッチを受けたB細胞に由来する体細胞の核酸配列によってコードされる核酸配列またはアミノ酸配列への言及が含まれ、その際、クラススイッチしたB細胞における免疫グロブリン可変領域の核酸配列 (たとえば、軽鎖可変ドメインをコードするまたは軽鎖CDR若しくはFRの配列を含むヌクレオチド配列) は、たとえば、クラススイッチを受けていないB細胞とクラススイッチを受けているB細胞の間でのCDRまたはフレームワークの核酸配列における差異のように、クラススイッチの前のB細胞における核酸配列とは同一ではない。「体細胞変異した」にはまたは、親和性成熟していないB細胞における対応する免疫グロブリン可変領域の配列 (すなわち、生殖細胞系列の細胞のゲノムにおける配列) とは同一ではない親和性成熟したB細胞に由来する核酸配列またはそれによってコードされるアミノ酸配列への言及が含まれる。「体細胞変異した」という表現にはまた、対象とするエピトープにB細胞を曝露した後のB細胞に由来する免疫グロブリン可変領域の核酸配列への言及も含まれ、その際、核酸配列は対象とするエピトープにB細胞を曝露する前の対応する核酸配列とは異なる。「体細胞変異した」という用語には、ヒトの免疫グロブリン可変領域の核酸配列を有する動物、たとえばマウスにて、抗原感作に応答して生成されている、及びそのような動物にて生得的に作動する選択過程の結果生じる免疫グロブリンに由来する配列が含まれる。

30

【0089】

「実質的に」という用語には、対象とする特徴または特性の総量または総量に近い度合いまたは程度を示す質的状态が含まれる。生物学技術の当業者は、生物学的な及び化学的な現象は、仮にあるとしても稀にしか、完了まで進まない及び/または完全性に進行しない、または絶対的な結果を達成しない若しくは回避しないことを理解するであろう。従って、「実質的に」という用語は多数の生物学的な及び化学的な現象にて本来存在する完全性の潜在的な欠如をとらえるように本明細書では使用される。

40

【0090】

「実質的な相同性」という表現には、アミノ酸配列間または核酸配列間の比較が含まれる。当業者によって十分に理解されるように、2つの配列は、それらが対応する位置で相同の残基を含有するのであれば、「実質的に相同である」と一般に見なされる。相同の残基は同一の残基であってもよい。或いは、相同の残基は、適切に類似の構造及び/または機能的な特徴を持つ非同一残基であってもよい。たとえば、当業者によって周知のように

50

、ある特定のアミノ酸は通常、「疎水性の」または「親水性の」アミノ酸として、及び/または「極性」側鎖または「非極性」側鎖を有するとして分類される。1つのアミノ酸の同一型のもう1つのアミノ酸への置換は多くの場合「相同性」置換と見なされてもよい。典型的なアミノ酸の分類を表1及び表2にて要約する。

【0091】

この当該技術で周知のように、アミノ酸配列または核酸配列は、たとえば、ヌクレオチド配列についてはBLASTN、及びアミノ酸配列についてはBLASTP、ギャップのあるBLAST及びPSI-BLASTのような市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、種々のアルゴリズムのいずれかを用いて比較されてもよい。例となるそのようなプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acid Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., 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, 1999にて記載されている。相同性の配列を特定することに加えて、上述のプログラムは通常、相同性の程度の指標を提供する。一部の実施形態では、2つの配列は、それらの対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより多くが適切な残基の区間にわたって相同であるならば、実質的に相同であると見なされる。一部の実施形態では、適切な区間は完全な配列である。一部の実施形態では、適切な区間は少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、またはそれより多い残基である。一部の実施形態では、適切な区間には、完全な配列に沿った隣接する残基が含まれる。一部の実施形態では、適切な区間には完全な配列に沿った不連続な残基が含まれる。一部の実施形態では、適切な区間は少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれより多い残基である。

10

20

30

【表 1】

表 1

アラニン	Ala	A	非極性	中性	1.8	
アルギニン	Arg	R	極性	正	-4.5	
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3.5	
アスパラギン酸	Asp	D	極性	負	-3.5	
システイン	Cys	C	非極性	中性	2.5	
グルタミン酸	Glu	E	極性	負	-3.5	10
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3.5	
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0.4	
ヒスチジン	His	H	極性	正	-3.2	
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4.5	
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3.8	
リジン	Lys	K	極性	正	-3.9	
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1.9	
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2.8	
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1.6	
セリン	Ser	S	極性	中性	-0.8	20
スレオニン	Thr	T	極性	中性	-0.7	
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0.9	
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1.3	
バリン	Val	V	非極性	中性	4.2	

【表 2】

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	30
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	
特定されないまたは未知のアミノ酸	Xaa	X	

【 0 0 9 2 】

語句「実質的な同一性」という表現には、アミノ酸配列間または核酸配列間の比較が含まれる。当業者によって十分に理解されるように、2つの配列は、それらに対応する位置で同一の残基を含有するのであれば「実質的に同一である」と一般に見なされる。この当該技術で周知のように、アミノ酸配列または核酸配列は、たとえば、ヌクレオチド配列についてはBLASTN、及びアミノ酸配列についてはBLASTP、ギャップのあるBLAST及びPSI-BLASTのような市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、種々のアルゴリズムのいずれかをを用いて比較されてもよい。例となるそのようなプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997; Baxevanis et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及び Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Met 40 50

hods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999にて記載されている。同一性の配列を特定することに加えて、上述のプログラムは通常、同一性の程度の指標を提供する。一部の実施形態では、2つの配列は、それらの対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより多くが残基の適切な区間にわたって同一であるならば、実質的に同一であると見なされる。一部の実施形態では、適切な区間は完全な配列である。一部の実施形態では、適切な区間は少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれより多い残基である。

10

【0093】

「ターゲティングベクター」または「ターゲティング構築物」という表現には、ターゲティング領域を含むポリヌクレオチド分子が含まれる。ターゲティング領域は、標的の細胞、組織または動物における配列と同一であるまたは実質的に同一である配列を含み、相同組換えを介した細胞、組織または動物のゲノム内の位置へのターゲティング構築物の組み込みを提供する。部位特異的なリコンビナーゼの認識部位（たとえば、LoxPまたはFrt部位）を用いて標的化するターゲティング領域も含まれる。一部の実施形態では、本発明のターゲティング構築物はさらに、特に対象とする核酸配列または遺伝子、選択可能なマーカー、制御配列及び/または調節配列、及びそのような配列が関与する組換えに役立つまたはそれを促すタンパク質の外からの追加が介在する組換えを可能にする他の核酸配列を含む。一部の実施形態では、本発明のターゲティング構築物はさらに、対象とする遺伝子全体またはその一部を含み、その際、対象とする遺伝子は、内在性の配列によってコードされるタンパク質と類似の機能を有するタンパク質全体をまたはその一部をコードする異種の遺伝子である。

20

【0094】

核酸配列に関連した「再構成されていない」という用語には、動物細胞の生殖細胞系列に存在する核酸配列が含まれる。一般に、操作されていない非ヒト動物におけるB細胞の発生の間で、再構成されていない遺伝子断片の最初の再構成は重鎖遺伝子座における D_H と J_H の遺伝子断片の連結であり、プロB細胞を生成する。それに続く再構成には、重鎖遺伝子座における $V_H - D_H J_H$ の連結が含まれ、生産的であれば、軽鎖可変領域の遺伝子断片の再構成、たとえば、軽鎖遺伝子座内での V_L 遺伝子断片の J_L 遺伝子断片との連結が含まれる。再構成は、連結がインフレーム（「生産的」）であれば、「生産的である」と見なされる。一方の対立遺伝子における生産的な再構成が結果的に対立遺伝子排除、たとえば、他方の対立遺伝子のサイレンシングを生じてもよい。「再構成されていない」はまた、機能的再構成を受けて重鎖定常領域の遺伝子断片に操作可能に連結された軽鎖可変領域の遺伝子を形成することができる再構成されていない V_L 及び J_L の遺伝子断片も指し、そのような操作可能な連結はハイブリッド免疫グロブリン鎖をコードする遺伝子を生じ、それはまた、1以上の内在性の重鎖対立遺伝子の対立遺伝子排除及び/または1以上の内在性の軽鎖遺伝子座における軽鎖可変領域の遺伝子断片の再構成も生じてもよい。

30

【0095】

「可変ドメイン」という表現には、N末端からC末端への順で（特に指示されない限り）以下のアミノ酸領域を含む免疫グロブリンの軽鎖または重鎖（所望のように修飾される）のアミノ酸配列が含まれる：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

40

【0096】

「変異体」という用語には、参照実体と有意な構造上の同一性を示すが、参照実体と比較して1以上の化学部分の存在またはレベルにおいて参照実体と構造的に異なる実体が含まれる。多数の実施形態では、変異体は機能的にもその参照実体と異なる。一般に、特定の実体が参照実体の「変異体」であると適正に見なされるかどうかは、参照実体との構造上の同一性の程度に基づく。当業者によって十分に理解されるように、いずれの生物学的

50

な及び化学的な参照実体も、ある特定の特徴的な構造要素を有する。定義によれば変異体は、1以上のそのような特徴的な構造要素を共有する異なる化学実体である。ほんの数例を挙げれば、小分子は、小分子の変異体がコアの構造要素及び特徴的なペンダント部分を共有するが、他のペンダント部分及び/またはコア内に存在する結合の型(単結合対二重結合、E対Z等)で異なるように特徴的なコアの構造要素(たとえば、大員環のコア)及び/または1以上の特徴的なペンダント部分を有してもよく、ポリペプチドは、線状空間または三次元空間にて互いに対して指定された位置を有する及び/または特定の生物機能に寄与する複数のアミノ酸で構成される特徴的な配列要素を有してもよく、核酸は、線状空間または三次元空間にて互いに対して指定された位置を有する複数のヌクレオチド残基で構成される特徴的な配列要素を有してもよい。たとえば、変異体ポリペプチドは、アミノ酸配列における1以上の差異及び/またはポリペプチド主鎖に共有結合された化学部分(たとえば、糖質、脂質等)における1以上の差異の結果として参照ポリペプチドと異なってもよい。一部の実施形態では、変異体ポリペプチドは、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、または99%である参照ポリペプチドとの全体的な配列同一性を示す。代わりにまたはさらに、一部の実施形態では、変異体ポリペプチドは参照ポリペプチドと少なくとも1つの特徴的な配列要素を共有しない。一部の実施形態では、参照ポリペプチドは1以上の生物活性を有する。一部の実施形態では、変異体ポリペプチドは参照ポリペプチドの生物活性の1以上を共有する。一部の実施形態では、変異体ポリペプチドは参照ポリペプチドの生物活性の1以上を欠く。一部の実施形態では、変異体ポリペプチドは参照ポリペプチドと比べて1以上の生物活性の低下したレベルを示す。多数の実施形態では、対象ポリペプチドは、対象ポリペプチドが特定の位置での少数の配列変化を別にすれば親と同一であるアミノ酸配列を有するのであれば、親ポリペプチドまたは参照ポリペプチドの「変異体」であると見なされる。通常、親と比べて、変異体における残基の20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%未満が置換される。一部の実施形態では、変異体は親と比べて10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1の置換された残基を有する。多くの場合、変異体は非常に少数の(たとえば、5、4、3、2または1未満の)置換された機能的な残基(すなわち、特定の生物活性に關与する残基)を有する。さらに、変異体は通常親と比べて、5、4、3、2または1を超える付加または欠失は有さず、付加または欠失を有さないことが多い。さらに、付加または欠失は通常、約25、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約10、約9、約8、約7、約6未満、及び一般に約5、約4、約3、または約2未満の残基である。一部の実施形態では、親ポリペプチドまたは参照ポリペプチドは自然界で見いだされるものである。当業者によって理解されるように、対象となる特定のポリペプチドの複数の変異体は、特に対象となるポリペプチドが感染性作用因子のポリペプチドである場合、一般に自然界で見いだされてもよい。

10

20

30

40

50

【0097】

「ベクター」という用語には、核酸分子であって、それが会合する別の核酸を輸送することができる核酸分子が含まれる。一部の実施形態では、ベクターは、それらが、たとえば、真核細胞及び/または原核細胞のような宿主細胞にて連結される核酸の染色体外の複製及び/または発現が可能である。操作可能に連結された遺伝子の発現を指図することができるベクターは本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

【0098】

「野生型」という用語は、「正常な」(変異体、病んだ、変化した等と対比されるような)状態または背景で自然界にて見いだされるような構造及び/または活性を有する実体を含む当該技術で理解される意味を有する。当業者は、野生型の遺伝子及びポリペプチドが複数の異なる形態(たとえば、対立遺伝子)にて存在することが多いことを十分に理解するであろう。

【0099】

ある特定の実施形態の詳細な説明

本発明は、とりわけ、軽鎖可変ドメイン（たとえば、 V_L 領域）コードするヒトの遺伝物質を有する遺伝子操作された非ヒト動物の使用方法を提供する。ある特定の実施形態では、そのような非ヒト動物は、たとえば、従来の免疫グロブリン型を逃れる抗原決定基と結合するヒト V_L ドメインの、及びそのようなヒト V_L ドメインに含まれる相補性決定領域（CDR）の作出及び単離に有用である。そのような非ヒト動物は、独特の抗原結合特性を示すヒト V_L ドメインの生成及び親和性成熟のための新規の生体内の系を提供することが企図される。そのような抗原結合タンパク質は天然の免疫グロブリンから逃れてもよい外来抗原を認識する能力を有する。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、対照の遺伝子操作された非ヒト動物と比べて抗原に結合する同族のヒト V_L ドメインを生成することができ；一部の実施形態では、そのような非ヒト哺乳類は、構造で免疫グロブリンに似た結合タンパク質を発現するが、重鎖可変配列を欠いているB細胞集団を発生させる及び/または有する。一部の実施形態では、そのような非ヒト動物によって発現される抗原結合タンパク質は、抗原結合部分が専らヒト V_L ドメインで構成されることを特徴とする。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、非ヒト動物及び異なる種（たとえば、ヒト）に由来する遺伝物質を含有する内在性の免疫グロブリン重鎖の遺伝子座と非ヒト動物及び異なる種（たとえば、ヒト）に由来する遺伝物質を含有する内在性の免疫グロブリン軽鎖の遺伝子座を含む。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、再構成されていないヒト V_L 及び J_L の遺伝子断片を含む免疫グロブリン重鎖の遺伝子座と再構成されていないヒト V_L 及び J_L の遺伝子断片を含む免疫グロブリン軽鎖の遺伝子座とを含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質の発現は、非ヒトの免疫グロブリン遺伝物質（たとえば、非ヒトの免疫グロブリンのプロモーター及び/またはエンハンサー）の制御下にある。

【0100】

本発明の種々の態様が以下の節で詳細に記載される。節の使用は本発明を限定することを意図するものではない。各節は本発明の任意の態様に適用することができる。

【0101】

小分子に特異的な免疫グロブリン様の結合タンパク質

一態様では、小分子と特異的に結合する V_L 抗原結合タンパク質が提供される。本明細書に記載される V_L 抗原結合タンパク質の態様には、好ましくは再構成されていないヒトの J_L 遺伝子断片（またはその一部）及びさらに好ましくは1以上の重鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結されたヒトの J_L 遺伝子断片（またはその一部）と共に、好ましくは再構成されていないヒトの V_L 遺伝子断片（またはその一部）及びさらに好ましくは再構成されたヒトの V_L 遺伝子断片（またはその一部）を含む、またはそれに由来するハイブリッド免疫グロブリン遺伝子によってコードされるハイブリッド鎖を含む V_L 抗原結合タンパク質が含まれる。軽鎖遺伝子断片の再構成の際、重鎖定常領域をコードする配列に融合された軽鎖可変領域をコードする配列を含む再構成されたヌクレオチド配列が得られる。この配列は、重鎖定常ドメインに融合された軽鎖定常ドメインを有するハイブリッド免疫グロブリン鎖をコードする。従って、一実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリンは、N末端からC末端までの V_L ドメインと C_H ドメインとから本質的に成る。一実施形態では、 C_H ドメインは C_H1 領域、ヒンジ、 C_H2 領域、 C_H3 領域、及び任意で C_H4 領域を含む。別の実施形態では、 C_H1 ドメインは機能的な C_H1 ドメインを欠き、たとえば、 C_H1 ドメイン全体またはその一部を欠くが、さらにヒンジ領域を欠いてもよい。

【0102】

一部の実施形態では、 V_L 抗原結合タンパク質は、小分子に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むハイブリッド免疫グロブリン鎖を含み、その際、該免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは重鎖定常領域に操作可能に連結される。一部の実施形態では、 V_L 抗原結合タンパク質は、第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含み、その際、第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは会合して小分子と特異的に結合する結合ポケットを形成してもよい。一態様では、会合して結合ポケットを形成する第1と

第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインから本質的に成る抗原結合タンパク質が提供され、その際、該抗原結合タンパク質は小分子と特異的に結合する。

【0103】

一実施形態では、第1及び/または第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはヒトの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインである。一実施形態では、第1及び/または第2の免疫グロブリン軽鎖ドメインは齧歯類に由来する。一実施形態では、齧歯類はマウスまたはラットから選択される。

【0104】

種々の実施形態では、本明細書で開示されるような V_L 抗原結合タンパク質、たとえば、本明細書で開示される遺伝子操作された非ヒト動物、たとえば、マウスによって産生されるものは、従来抗体よりも平均して小さくてもよく、小さなサイズに関連する利点を持ってよい。より小さなサイズは少なくとも部分的には、通常 V_H ドメインに存在する D_H 領域によってコードされるアミノ酸配列が存在しないことで実現される。より小さなサイズはまた、たとえば、 V 領域及び J 領域に由来する $CDR3$ の形成において実現することもできる。

10

【0105】

一実施形態では、軽鎖可変ドメインは、ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の可変ドメインから形成されるヒト抗原結合タンパク質の結合ポケットよりも高い親和性で小分子と結合する。

【0106】

一実施形態では、第1及び/または第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインはヒトの軽鎖可変ドメインである。一実施形態では、該軽鎖可変ドメインの結合ポケットはヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の可変ドメインから形成されるヒト抗体の結合ポケットよりも高い親和性で小分子と結合する。

20

【0107】

一実施形態では、第1の軽鎖可変ドメインは第1の免疫グロブリン重鎖定常領域に連結される。一実施形態では、第1の免疫グロブリン重鎖定常領域は非ヒト動物に由来する。一実施形態では、非ヒト動物は齧歯類である。一実施形態では、齧歯類はマウスまたはラットから選択される。一実施形態では、非ヒト動物はニワトリである。一実施形態では、第1の免疫グロブリン重鎖定常領域は、 $CH1$ 、ヒンジ、 $CH2$ 、 $CH3$ 、 $CH4$ 及びそれらの組み合わせから選択される。一実施形態では、第1の免疫グロブリン重鎖定常領域は $CH1$ 、ヒンジ、 $CH2$ 、及び $CH3$ を含む。

30

【0108】

一実施形態では、第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインは第2の免疫グロブリン軽鎖定常領域に連結される。一実施形態では、第2の免疫グロブリン軽鎖定常領域は非ヒト動物に由来する。一実施形態では、非ヒト動物は齧歯類である。一実施形態では、齧歯類はマウスまたはラットから選択される。一実施形態では、非ヒト動物はニワトリである。

【0109】

一実施形態では、 V_L 抗原結合タンパク質は2つの同一の軽鎖可変ドメインを含む。一実施形態では、 V_L 抗原結合タンパク質は異種配列を持つ2つの軽鎖可変ドメインを含む。

40

【0110】

小分子と結合する V_L 抗原結合タンパク質は、本明細書で開示されるような遺伝子操作された非ヒト動物から得てもよいし、または該小分子で免疫した後のそのような動物から単離される細胞及び/または核酸に由来してもよい。

【0111】

V_L タンパク質を発現する遺伝子操作された非ヒト動物

免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと融合された重鎖定常ドメインを有するハイブリッド免疫グロブリン鎖を含む V_L 抗原結合タンパク質を発現する非ヒト動物が提供される。さらに、 V_L 抗原結合タンパク質の一部としてハイブリッド鎖を発現するように、たとえば

50

、ラット及びマウスを含むが、それらに限定されない齧歯類のような非ヒト動物を遺伝子操作する複数の戦略が提供され、その際、該ハイブリッド鎖は、 C_H 領域をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された V_L 領域をコードする核酸によってコードされる、またはそれに由来する。そのような遺伝子操作された非ヒト動物は、一部の従来の抗体の四量体構造を有するが、今までの抗体と比べて独特の結合特性を示す V_L 抗原結合タンパク質の集団を生成するための供給源を表す。

【0112】

本明細書で記載される操作された非ヒト動物は、ハイブリッド鎖と対合した同族の軽鎖も含んで抗体様である、たとえば、四量体であってもよい V_L 抗原結合タンパク質であるが、重鎖（または重鎖の対）の代わりに、 V_L 抗原結合タンパク質が C_H ドメインに融合された、 V_H ドメインではなく、 V_L ドメインを含むハイブリッド鎖（またはハイブリッド鎖の対）を含む V_L 抗原結合タンパク質を生成してもよい。

10

【0113】

種々の実施形態では、操作された非ヒト動物は V_L 抗原結合タンパク質を作り、その際、ハイブリッド鎖の V_L ドメインは軽鎖の V_L ドメイン全体にわたる高い程度の体細胞高頻度変異を示す。一部の実施形態では、ハイブリッド鎖の V_L 領域は、 C_L 領域と融合された V_L 領域よりも約1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍または5倍、またはそれより多い体細胞高頻度変異を示す。一部の実施形態では、操作された非ヒト動物、たとえば、マウスは、抗原に应答してハイブリッド鎖の V_L ドメインを含む抗原結合タンパク質の集団を提示し、その際、 V_L 抗原結合タンパク質の該集団は、同じ抗原に应答して野生型マウスが示す抗原結合タンパク質、たとえば、軽鎖の V_L ドメインの集団にて観察されるよりも、ハイブリッド鎖の V_L ドメインにて平均約1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍または5倍、またはそれより多い体細胞高頻度変異を示す。

20

【0114】

一実施形態では、ハイブリッド鎖の V_L ドメインにおける体細胞高頻度変異は $CDR3$ における1以上または2以上のN付加を含む。種々の実施形態では、 V_L 抗原結合タンパク質は、内在性の軽鎖遺伝子座から再構成された軽鎖について自然界で観察されるよりも多数のN付加を含む免疫グロブリン軽鎖の配列によってコードされる可変ドメインを含むハイブリッド鎖を含み、たとえば、 V_L 遺伝子断片とヒト J_L 遺伝子断片が再構成して重鎖定常領域の遺伝子に操作可能に連結された再構成された可変領域の遺伝子を形成し、その際、再構成された軽鎖可変領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれより多いN付加を含む。

30

【0115】

一態様では、免疫グロブリンのハイブリッド鎖の遺伝子座を含む非ヒト動物、たとえば、マウスが提供される。一実施形態では、ハイブリッド鎖の遺伝子座は、内在性の重鎖遺伝子座の中に創られ、その際、内在性のマウス免疫グロブリン重鎖の遺伝子座における1以上の免疫グロブリン重鎖可変領域（ V_H ）の遺伝子断片、重鎖多様性（ D_H ）の遺伝子断片、及び重鎖連結（ J_H ）の遺伝子断片が、1以上の軽鎖可変領域（ V_L ）の遺伝子断片及び1以上の軽鎖連結領域（ J_L ）の遺伝子断片によって置き換えられる。一態様では、内在性の免疫グロブリン重鎖の遺伝子座を置き換えるハイブリッド鎖の遺伝子座を含む非ヒト動物が提供され、たとえば、一方または双方の重鎖遺伝子座における内在性の V_H 、 D_H 及び J_H の遺伝子断片すべてまたは実質的にすべてが、内在性のマウス C_H 遺伝子と組み換えて V_L 遺伝子断片、 J_L 遺伝子断片、及び内在性のマウス C_H 遺伝子に由来する再構成された遺伝子を形成することができる内在性の重鎖遺伝子座にて再構成された V_L 遺伝子配列を形成する1以上の V_L 遺伝子断片及び1以上の J_L 遺伝子断片によって置き換えられる。

40

【0116】

非ヒト動物はまた、一部の従来の抗体の四量体構造に類似するが、結合特性で異なる結合タンパク質、たとえば、 V_L 抗原結合タンパク質の発現を生じ、非ヒト動物の細胞の膜

50

表面に前記V_L抗原結合タンパク質の発現を生じる免疫グロブリン遺伝子座のヒト化も包含する。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、抗原に結合するV_L抗原結合タンパク質のハイブリッド鎖及び軽鎖のいずれかまたは双方でヒトV_Lドメインを生成することができ；一部の実施形態では、そのような非ヒト動物は、いかなるV_H、D_H及び/またはJ_Hの遺伝子断片配列によってもコードされないまたはそれらに由来しない可変ドメインを含む結合タンパク質を発現するB細胞集団を発生する及び/または有する。一部の実施形態では、そのような非ヒト動物によって発現されるV_L抗原結合タンパク質は、抗原結合部分が専らヒトV_Lドメインで構成されることを特徴とする。一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、内在性の免疫グロブリン重鎖の遺伝子座にて非ヒト動物及び異なる種（たとえば、ヒト）に由来する遺伝物質を含み、及び内在性の免疫グロブリン軽鎖の遺伝子座にて非ヒト動物及び異なる種（たとえば、ヒト）に由来する遺伝物質を含む。

10

【0117】

一部の実施形態では、本発明の非ヒト動物は、再構成されていないヒトV_Lの遺伝子断片及び/またはヒトJ_Lの遺伝子断片を含む免疫グロブリンのハイブリッド鎖の遺伝子座、好ましくは再構成されていないヒトV_Lの遺伝子断片及び/またはヒトJ_Lの遺伝子断片を含む免疫グロブリンの軽鎖の遺伝子座を含む。一部の実施形態では、V_L抗原結合タンパク質の発現は、非ヒト免疫グロブリンの遺伝物質（たとえば、非ヒト免疫グロブリンのプロモーター及び/またはエンハンサー）の制御下にある。

【0118】

一実施形態では、V_L断片はヒトのV_Lである。一実施形態では、J_L断片はヒトのJ_Lである。特定の実施形態では、V_L及びJ_Lの断片はヒトV_L及びヒトJ_Lの断片である。

20

【0119】

一実施形態では、すべてのまたは実質的にすべてのV_H、D_H及びJ_Hの遺伝子断片が少なくとも6つのヒトV_Hの遺伝子断片及び少なくとも1つのJ_H遺伝子断片によって置き換えられる。一実施形態では、すべてのまたは実質的にすべてのV_H、D_H及びJ_Hの遺伝子断片が少なくとも16のヒトV_Hの遺伝子断片（ヒトV_H）及び少なくとも1つのJ_H遺伝子断片によって置き換えられる。一実施形態では、すべてのまたは実質的にすべてのV_H、D_H及びJ_Hの遺伝子断片が少なくとも30のヒトV_Hの遺伝子断片及び少なくとも1つのJ_H遺伝子断片によって置き換えられる。一実施形態では、すべてのまたは実質的にすべてのV_H、D_H及びJ_Hの遺伝子断片が少なくとも40のヒトV_Hの遺伝子断片及び少なくとも1つのJ_H遺伝子断片によって置き換えられる。一実施形態では、少なくとも1つのJ_H遺伝子断片は2、3、4、または5のヒトJ_Hの遺伝子断片を含む。

30

【0120】

一実施形態では、V_L断片はヒトのV_L断片である。一実施形態では、ヒトのV_L断片は、4-1、5-2、7-3、2-4、1-5、及び1-6を含む。一実施形態では、V_L断片は、3-7、1-8、1-9、2-10、3-11、1-12、1-13、2-14、3-15、1-16を含む。一実施形態では、ヒトのV_L断片は、1-17、2-18、2-19、3-20、6-21、1-22、1-23、2-24、3-25、2-26、1-27、2-28、2-29、及び2-30を含む。一実施形態では、ヒトのV_L断片は、3-31、1-32、1-33、3-34、1-35、2-36、1-37、2-38、1-39、及び2-40を含む。

40

【0121】

一実施形態では、V_L断片はヒトのV_L断片であり、4-1、5-2、7-3、2-4、1-5、1-6、3-7、1-8、1-9、2-10、3-11、1-12、1-13、2-14、3-15、及び1-16を含む。一実施形態では、V_L断片はさらに1-17、2-18、2-19、3-20、6-21、1-22、1-23、2-24、3-25、2-26、1-27、2-28、2-29、及び2-30を含む。一実施形態では、V_L断片はさらに3-31、1-32、1-33、3-34、1-35、2-36、1-37、2-38、1-39、及び2-40を含む。

50

【0122】

一実施形態では、 V_L 断片はヒトの V 断片であり、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスタAの断片を含む。特定の実施形態では、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスタAの断片は hV_3-27 から hV_3-1 に伸びる。

【0123】

一実施形態では、 V_L 断片は、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスタBの断片を含む。特定の実施形態では、ヒト軽鎖遺伝子座のクラスタBの断片は hV_5-52 から hV_1-40 に伸びる。

【0124】

一実施形態では、 V_L 断片は、クラスタAのゲノム断片とクラスタBのゲノム断片とを含むヒト軽鎖可変領域の配列を含む。一実施形態では、ヒト軽鎖可変領域の配列はクラスタAの少なくとも1つの遺伝子断片とクラスタBの少なくとも1つの遺伝子断片とを含む。

10

【0125】

一実施形態では、 V_L 断片はクラスタBの少なくとも1つの遺伝子断片とクラスタCの少なくとも1つの遺伝子断片とを含む。

【0126】

一実施形態では、 V_L 断片は hV_3-1 、 $4-3$ 、 $2-8$ 、 $3-9$ 、 $3-10$ 、 $2-11$ 、及び $3-12$ を含む。特定の実施形態では、 V_L 断片は、 V_3-12 から V_3-1 に及ぶヒト軽鎖遺伝子座の隣接する配列を含む。一実施形態では、隣接する配列は少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12の hV を含む。特定の実施形態では、 hV には $3-1$ 、 $4-3$ 、 $2-8$ 、 $3-9$ 、 $3-10$ 、 $2-11$ 、及び $3-12$ が含まれる。特定の実施形態では、 hV は、 V_3-12 から V_3-1 に及ぶヒト遺伝子座の隣接する配列を含む。

20

【0127】

一実施形態では、 hV は $13 \sim 28$ 以上の hV を含む。特定の実施形態では、 hV には $2-14$ 、 $3-16$ 、 $2-18$ 、 $3-19$ 、 $3-21$ 、 $3-22$ 、 $2-23$ 、 $3-25$ 、及び $3-27$ が含まれる。特定の実施形態では、 hV は V_3-27 から V_3-1 に及ぶヒト遺伝子座の隣接する配列を含む。

【0128】

一実施形態では、 V_L 断片は $29 \sim 40$ の hV を含む。特定の実施形態では、 V_L 断片は、 V_3-29 から V_3-1 に及ぶヒト遺伝子座の隣接する配列と、 V_5-52 から V_1-40 に及ぶヒト遺伝子座の隣接する配列とを含む。特定の実施形態では、遺伝子操作されたマウスにおける hV_1-40 と hV_3-29 との間の配列すべてまたは実質的にすべては、 hV_1-40 の遺伝子断片(3'非翻訳部分の下流)の下流にて自然界(たとえば、ヒト集団)で見いだされるおよそ959bpのヒト配列と、制限酵素部位(たとえば、 $PI-SceI$)と、それに続く自然界で見いだされる hV_3-29 遺伝子断片の上流のおよそ3,431bpのヒト配列から本質的に成る。

30

【0129】

一実施形態では、 J はヒトのものであり、 J_1 、 J_2 、 J_3 、 J_4 、 J_5 及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。特定の実施形態では、 J は J_1 から J_5 までを含む。

40

【0130】

一実施形態では、 V_L 断片はヒト V 断片であり、 J 遺伝子断片は12量体のスペーサーを有するRSSを含み、RSSは J 遺伝子断片の上流末端で並置される。一実施形態では、 V_L 遺伝子断片はヒト V 断片であり、 V_{LH} 遺伝子断片は、それぞれ12量体のスペーサーを有するRSSを含む2以上の J 遺伝子断片を含み、RSSは各 J 遺伝子断片の上流末端で並置される。

【0131】

特定の実施形態では、 V_L 断片は、 V_4-1 から V_2-40 までのヒト遺伝子座

50

に及び隣接するヒト 遺伝子断片を含み、 J_L 断片は J_1 から J_5 までのヒト 遺伝子座に及び隣接する遺伝子断片を含む。

【0132】

一実施形態では、 V_L 断片が V 断片であり、 V_L 断片と J 断片の間に D_H 断片が存在しない場合、 V_L 断片は23量体のRSSの下流に隣接し(すなわち、下流側に並置され)、 J 断片は存在するならば、または J 断片は存在するならば、12量体のRSSの上流に隣接する(すなわち、上流側に並置される)。

【0133】

一実施形態では、 V 遺伝子断片が V 遺伝子断片であり、 V 遺伝子断片と J 遺伝子断片の間に D_H 遺伝子断片が存在しない場合、 V 遺伝子断片はそれぞれ12量体のRSSの下流に並置され、 J 断片は存在するならば、または J 断片は存在するならば、23量体のRSSの上流にそれぞれ並置される。

10

【0134】

一態様では、本明細書に記載されるように操作された免疫グロブリンの遺伝子座を含む細胞が提供される。一実施形態では、細胞は、全能性細胞、多能性細胞、人工多能性(iPS)細胞及びES細胞から選択される。一実施形態では、ES細胞は、さらにマウスの軽鎖遺伝子断片のヒト軽鎖遺伝子断片による*in situ*置換を含有した129S6/SvEvTac及びC57BL/6NTacヘテロ接合体胚に由来するF1 ES株(F1H4; Valenzuela et al., 2007, 上記)である(たとえば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許第6,596,541号及び同第8,642,835号を参照のこと)。一実施形態では、遺伝子操作は、ハイブリッドES細胞株であって、そのゲノムが50%のBALB/c[Tac]、25%のC57BL/6N[Tac]及び25%の129S4/SvJae(V17)を含むハイブリッドES細胞株にて実施される。

20

【0135】

特定の実施形態では、細胞はマウスの細胞、たとえば、マウスのES細胞である。一実施形態では、細胞は操作される免疫グロブリンの遺伝子座についてホモ接合体である。一実施形態では、細胞はラット細胞、たとえば、ラットES細胞である(その全体が参照によって本明細書に組み入れられるUS-2014-0310828-A1を参照のこと)。

30

【0136】

小分子

一実施形態では、小分子はハプテンであり、小分子は担体に連結される。一実施形態では、担体は、スカシガイのヘモシアニン(KLH)、ロコガイのヘモシアニン(CCH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、カチオン化ウシ血清アルブミン(cBSA)、または卵白アルブミンを含む。一部の実施形態では、小分子は分子量が6kDa未満である有機化合物である。

【0137】

一部の実施形態では、小分子は、大きな担体に連結された場合のみ免疫応答を引き出す。それ以外は同等の条件下で、担体または他のアジュバントを欠く、たとえば、アジュバントの非存在下にて単独で免疫原として採用される場合、有用なまたは十分な免疫応答を生じないという点でハプテンである。ハプテンの例には、抗生剤、農薬、除草剤、殺虫剤、薬剤、ビタミン、ステロイド、ホルモン、毒素、爆薬、及び染料が挙げられるが、それらに限定されない(たとえば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれるGunter, S. et al., SuperHapten: a comprehensive database for small immunogenic compounds, Nucleic Acids Res., 2007, D906-910を参照のこと)。ハプテン及び対応するハプテン/担体複合体の包括的なリストは、ハプテンデータベース(Singh, M. et al., Bioinformatics, 2006, 22:253-255)でも見いだすことができ、それはURL「imtech.res」

40

50

in/raghava/haptendb/」にてワールド・ワイド・ウェブ(www)上でインターネットを介してアクセスできる。

【0138】

一部の実施形態では、担体はハプテンと結合し、それが免疫応答を誘導するのを可能にする高分子である。一部の実施形態では、担体は分泌タンパク質または細胞表面タンパク質である。一部の実施形態では、担体はポリマーである。一部の実施形態では、担体はスカシガイのヘモシアニン(KLH)である。一部の実施形態では、担体はロコガイのヘモシアニン(CCH)の精製調製物である。一部の実施形態では、担体はウシ血清アルブミン(BSA)である。一部の実施形態では、担体は、過剰なエチレンジアミンで天然BSAを修飾することによって、本質的に負に荷電したカルボキシル基を正に荷電した1級アミンでキャッピングすることによって調製されるカチオン化BSA(cBSA)である。一部の実施形態では、担体は卵白アルブミンである。

10

【0139】

一部の実施形態では、小分子は天然のステロイドである。一部の実施形態では、小分子は、4つの環に配置された17の炭素原子の分子構造を特徴とするステロイドである。本明細書に記載されるようなステロイドの例にはホルモン及びアルカロイドが挙げられるが、それらに限定されない。

【0140】

一部の実施形態では、ステロイドは強心性ステロイド(CTS)である。一部の実施形態では、CTSはNa⁺/K⁺のATPアーゼの阻害剤である。CTSの例には、カルデノリド(内在性のウアバイン)、プファジエノリド、プファリン、マリノプファゲニン(MBG)及びテロシノプファギンが挙げられるが、それらに限定されない。一部の実施形態では、ハプテンはマリノプファゲニン(MBG)であり、担体はウシ血清アルブミンである。一部の実施形態では、ステロイドはコルチゾールである。

20

【0141】

一部の実施形態では、小分子は、パラチオン、馬拉チオン、テトラエチルピロリン酸(TEPP)、4,6-ジニトロ-o-クレゾール(DNOC)、メタシド、デメトン(systex)、クロルダン、トキサフェン、アルドリン、六塩化ベンゼン、リンダン、ジエルドリン、ロテノン、ペステックス、ジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)、セレンウム化合物(シロシド)、リン化亜鉛(Zn₃P₂)、ストリキニン化合物、ワーファリン及び三酸化ヒ素を含むが、それらに限定されない毒物または毒性物質である。

30

【0142】

一部の実施形態では、小分子は、向精神薬または向精神剤であって、脳血管関門を交差し、それが脳機能に影響を及ぼす中枢神経系に作用して知覚、気分、意識、認知及び挙動に変化を生じる向精神薬または向精神剤である。一部の実施形態では、小分子は、カフェイン、ニコチン、アンフェタミン及びコカインを含むが、それらに限定されない刺激剤である。一部の実施形態では、小分子は、モルヒネ、コデイン、ヘロイン、フェンタニル、メタドン及びオキシコドンを含むが、それらに限定されないオピオイドアルカロイドである。一部の実施形態では、小分子は、視覚及び音声を含む知覚をゆがめる幻覚剤である。幻覚剤の例には、メサカリン、シロシピン、ジメチルトリプタミン(DMT)、リゼルゲ酸ジエチルアミド(LSD)、ジメトキシメチルアンフェタミン(DOMまたは「STP」)、メチレンジオキシメタンフェタミン(MDMAまたは「エクスタシー」)が挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0143】

一部の実施形態では、小分子は、アセチルコリン、ノルエピネフリン、エピネフリン、ドーパミン、セロトニン、グルタミン酸塩、グリシン及びガンマ-アミノ酪酸(GABA)を含むが、それらに限定されない神経伝達物質である。

【0144】

一部の実施形態では、小分子には、フォルスコリン、ソラマリジン、クロシン、マリファナ化合物、アヘンアルカロイド、ギンセノシド、ベルベリン、センノシド、ペオニフロ

50

リン、グリチルリジン、ギンコール酸、アコニチンアルカロイド及びバイカリンが挙げられるが、それらに限定されない。

【0145】

核酸構築物、細胞及びそれらを作製する方法

一態様では、提供されるのは、小分子と特異的に結合する V_L 結合ドメインの可変ドメインをコードする核酸、及び該核酸を発現する細胞である。

【0146】

一態様では、ヒトの治療剤を製造するために細胞株を作製するための本明細書に記載されるようなマウスに由来する核酸配列の使用が提供される。一実施形態では、ヒトの治療剤は、ヒト重鎖定常配列に融合されたヒト軽鎖可変配列（たとえば、ヒト V_H またはヒト V_L の断片に由来する）を含む結合タンパク質である。一実施形態では、ヒトの治療剤は、ヒトのまたはの免疫グロブリン軽鎖である第1のポリペプチドと、ヒト重鎖定常配列に融合されたヒトの V_H またはヒトの V_L の可変配列を含む第2のポリペプチドを含む。

10

【0147】

一態様では、ヒトの C_H ドメインに融合された体細胞変異したヒト V_L ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸を含む哺乳類細胞を含む発現系が提供される。

【0148】

一実施形態では、該発現系はさらに、ヒト C_L ドメインに融合された免疫グロブリン V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列を含み、その際、ヒト C_L ドメインと融合された V_L ドメインはヒト C_H ドメインと融合された V_L ドメインとは同族の軽鎖である。

20

【0149】

一実施形態では、好適な細胞は、ウイルスの核酸配列を発現するB細胞、ハイブリドーマ、クアドローマ、CHO細胞、COS細胞、293細胞、HeLa細胞及びヒト網膜細胞（たとえば、PERC.6（商標）細胞）から選択される。

【0150】

一態様では、本明細書で開示されるような非ヒト動物から細胞または核酸を単離する、結合タンパク質を作製する方法が提供され、その際、該細胞または核酸は小分子と結合する V_L 結合タンパク質を含む、またはコードする。一部の実施形態では、方法はさらに、 V_L 領域の配列をヒト C_H 領域をコードする遺伝子とインフレームでコードするヌクレオチド配列をクローニングしてヒト結合タンパク質の配列を形成し、好適な細胞にて該ヒト結合タンパク質の配列を発現することを含む。

30

【0151】

一実施形態では、非ヒトは小分子または担体に連結された小分子で免疫されており、 C_H 領域に融合された V_L 領域は小分子のエピトープと（たとえば、マイクロモル、ナノモルまたはピコモルの範囲の K_D で）特異的に結合する。一実施形態では、 C_H 領域に融合された V_L 領域をコードするヌクレオチド配列はマウスにて体細胞変異を受ける。

【0152】

一態様では、小分子と結合する抗原結合タンパク質を作製する方法が提供され、該方法は、(a)非ヒト動物を小分子または担体に連結された小分子で免疫し、その際、非ヒト動物はその生殖細胞系列に(i)非ヒトの重鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片と、(ii)非ヒト軽鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒトの免疫グロブリンの軽鎖可変(V_L)及び軽鎖連結(J_L)の遺伝子断片を含むことと、(b)非ヒト動物が小分子または担体に連結された小分子に対する免疫応答を開始するのを可能にすることと、(c)免疫した非ヒト動物から細胞（たとえば、リンパ球）を単離し、その際、該細胞は第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第1と第2の免疫グロブリン可変領域の核酸配列を含むことと、(d)対合すると、小分子または担体に連結された小分子と特異的に結合する、第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをコードする第1と第2の免疫グロブリン軽鎖可変領域の核酸配列を

40

50

特定することと、(e)小分子と結合する第1と第2の軽鎖可変ドメインの二量体を含む抗原結合タンパク質を形成するように抗原結合タンパク質を発現するのに好適な発現系で(d)の核酸配列を発現させることとを含む。

【0153】

一部の実施形態では、細胞(たとえば、B細胞)は動物から(たとえば、脾臓またはリンパ節から)回収される。該細胞を骨髓腫細胞株と融合させて不死のハイブリドーマ細胞株を調製してもよく、そのようなハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、選択して、免疫に用いた抗原に特異的なハイブリッド重鎖を含有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を特定する。

【0154】

一実施形態では、免疫は、小分子または担体に連結された小分子でマウスを抗原刺激することと、ある期間非ヒト動物を休ませることと、小分子または担体に連結された小分子で動物を再免疫することとを含む。一部の実施形態では、該期間は2~3日、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも4週間、または少なくとも1ヵ月である。

【0155】

一態様では、本明細書に記載されるようなマウスにて作られる免疫グロブリン可変領域(V_R)(たとえば、ヒトJ_Lと融合させたヒトV_L配列を含む)が提供される。特定の実施形態では、免疫グロブリンV_Rは、V_H断片及びV_L断片から選択される生殖細胞系列のヒト遺伝子断片に由来し、その際、V_Rは、再構成された配列が体細胞高頻度変異を受けるマウスに由来する再構成された配列によってコードされる。一実施形態では、再構成された配列は1~5の体細胞高頻度変異を含む。一実施形態では、再構成された配列は少なくとも6、7、8、9または10の体細胞高頻度変異を含む。一実施形態では、再構成された配列は10を超える体細胞高頻度変異を含む。一実施形態では、再構成された配列は1以上のヒトまたはマウスの重鎖定常領域の配列(たとえば、ヒトまたはマウスのC_{H1}、ヒンジ、C_{H2}、C_{H3}及びそれらの組み合わせから選択される)と融合される。

【0156】

一態様では、本明細書に記載されるようなマウスで作られる結合タンパク質の免疫グロブリン可変ドメインのアミノ酸配列が提供される。一実施形態では、V_Rは、1以上のヒトまたはマウスの重鎖定常領域の配列(たとえば、ヒトまたはマウスのC_{H1}、ヒンジ、C_{H2}、C_{H3}及びそれらの組み合わせから選択される)と融合される。

【0157】

一態様では、本明細書に記載されるようなマウスに由来する核酸配列によってコードされる軽鎖可変ドメインが提供される。

【0158】

一態様では、本明細書に記載されるようなマウスにて作られる、または本明細書に記載されるようなマウスにて作られる配列に由来する結合タンパク質またはその抗原結合断片(たとえば、Fab、F(ab)₂、scFv)が提供される。

【0159】

二重特異性の結合タンパク質

免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと融合された免疫グロブリン重鎖定常領域を含む免疫グロブリン様の結合タンパク質が提供され、同様に軽鎖定常ドメインに融合された免疫グロブリン軽鎖可変ドメインと重鎖定常ドメインに融合された免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを有する結合タンパク質が提供される。そのような結合タンパク質を発現する細胞、それを作るマウス、及び関連する方法及び組成物も提供される。

【0160】

本明細書に記載される結合タンパク質及びそれをコードするヌクレオチド配列を用いて、多重特異性の結合タンパク質、たとえば、二重特異性の結合タンパク質を作ることができる。この態様では、C_H領域と融合された第1のV_Lドメインから本質的に成る第1のポリペプチドが、C_H領域と融合された第2のV_Lドメインから本質的に成る第2のポリ

10

20

30

40

50

ペプチドと会合することができる。第1の V_L ドメイン及び第2の V_L ドメインが異なるエピトープと特異的に結合する場合、2つの V_L ドメインを用いて二重特異性の結合分子を作ることができる。 C_H 領域は同一であってもよいし、異なってもよい。一実施形態では、たとえば、プロテインA結合決定基を取り除くように C_H 領域の一方を修飾することができるのに対して他方の重鎖定常領域はそのように修飾されない(その全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第8,586,713B2号を参照のこと)。この特定の配置は、たとえば、ホモ二量体(たとえば、第1または第2のポリペプチドのホモ二量体)の混合物からの二重特異性の結合タンパク質の単離を簡略にする。

【0161】

一態様では、ヒトの C_H または 軽鎖可変ドメインとヒトまたはマウスの重鎖定常領域の配列を含むタンパク質を含む、1以上の V_L 及び/または 軽鎖可変領域の免疫グロブリン配列と免疫グロブリン重鎖定常領域の配列とを含むタンパク質を作るために核酸構築物、細胞、胚、マウス及び方法が提供される。

10

【0162】

一態様では、軽鎖(すなわち、カッパ(κ)及び/またはラムダ(λ))免疫グロブリン可変ドメインに由来するが、完全長の重鎖免疫グロブリン可変ドメインには由来しない免疫グロブリン可変ドメインを含む結合タンパク質が記載される。遺伝子操作されたマウスを含む、結合タンパク質を作るための方法及び組成物も提供される。

【0163】

一態様では、本明細書に記載される方法及び組成物を用いて二重特異性の結合タンパク質を作製する。この態様では、 C_H 領域に融合される第1の V_L と C_H 領域に融合される第2の V_L は、同じアイソタイプ(たとえば、ヒトのIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4)のヒトIgG配列とインフレームでそれぞれ独立してクローニングされる。第1の V_L は第1のエピトープと特異的に結合し、第2の V_L は第2のエピトープと特異的に結合する。第1と第2のエピトープは異なる抗原上にあってもよいし、または同一の抗原上にあってもよい。

20

【0164】

一実施形態では、第1の V_L に融合される C_H 領域のIgGアイソタイプと第2の V_L に融合される C_H 領域のIgGアイソタイプは同じアイソタイプであるが、一方のIgGアイソタイプが少なくとも1つのアミノ酸置換を含むという点で異なる。一実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸置換によって、置換を欠く重鎖と比べて置換を持つ重鎖がプロテインAと結合できなくなるまたは実質的に結合できなくなる。

30

【0165】

一実施形態では、第1の C_H 領域はIgG1、IgG2及びIgG4から選択されるヒトIgGの第1の C_H 3ドメインを含み;第2の C_H 領域はIgG1、IgG2及びIgG4から選択されるヒトIgGの第2の C_H 3ドメインを含み、その際、第2の C_H 3ドメインは、第2の C_H 3ドメインのプロテインAへの結合を減らすまたは取り除く修飾を含む(その全体が参照によって組み入れられる米国特許第8,586,713B2号を参照のこと)。

【0166】

一実施形態では、第2の C_H 3ドメインはEU番号付け方式に従って番号を付けた435Rの修飾を含む。別の実施形態では、第2の C_H 3ドメインはEU番号付け方式に従って番号を付けた436Fの修飾をさらに含む。

40

【0167】

一実施形態では、第2の C_H 3ドメインは、EU番号付け方式に従って番号を付けたD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、及びV422Iから成る群から選択される修飾を含むヒトIgG1のものである。

【0168】

一実施形態では、第2の C_H 3ドメインは、EU番号付け方式に従って番号を付けたN384S、K392N、及びV422Iから成る群から選択される修飾を含むヒトIgG

50

2のものである。

【0169】

一実施形態では、第2のC_H3ドメインは、EU番号付け方式に従って番号を付けたQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、及びV422Iから成る群から選択される修飾を含むヒトIgG4のものである。

【0170】

一実施形態では、結合タンパク質は本明細書で列挙されるような1以上の修飾を有するC_H領域を含み、その際、結合タンパク質の定常領域はヒトにおいて非免疫原性である、または実質的に非免疫原性である。特定の実施形態では、C_H領域はヒトにおいて免疫原性エピトープを提示しないアミノ酸配列を含む。別の特定の実施形態では、結合タンパク質は、野生型のヒト重鎖にて見いだされないC_H領域を含み、C_H領域はT細胞エピトープを生成する配列を含まない。

10

【0171】

一実施形態では、結果としてエフェクター機能に影響を与える変化したFc受容体結合を有するようにFcドメインを修飾することができる。Fcドメインを含む操作された重鎖定常領域(C_H)はキメラであってもよい。したがって、キメラC_H領域は1を超える免疫グロブリンのアイソタイプに由来するC_Hドメインを組み合わせる。たとえば、キメラC_H領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2またはヒトIgG4の分子に由来するC_H2ドメインの一部またはすべてを、ヒトIgG1、ヒトIgG2またはヒトIgG4の分子に由来するC_H3ドメインの一部またはすべてと組み合わせる。キメラC_H領域はまたキメラのヒンジ領域も含有することができる。たとえば、キメラのヒンジは、ヒトIgG1、ヒトIgG2またはヒトIgG4のヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」アミノ酸配列(EU番号付けに従った216~227位のアミノ酸残基)を、ヒトIgG1、ヒトIgG2またはヒトIgG4のヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列(EU番号付けに従った228~236位のアミノ酸残基)と組み合わせる。一実施形態では、キメラのヒンジ領域は、ヒトIgG1またはヒトIgG4の上部ヒンジに由来するアミノ酸残基とヒトIgG2の下部ヒンジに由来するアミノ酸残基とを含む。

20

【0172】

ある特定の治療法については、Fc含有タンパク質(たとえば、抗体)の所望の薬物動態特性に影響を与えることなく正常なFcのエフェクター機能のすべて、一部を活性化するように、またはどれも活性化しないようにFcドメインが操作されてもよい。キメラC_H領域を含み、変化したエフェクター機能を有するタンパク質の例については、その全体が本明細書に組み込まれる、2014年1月31日に出願された米国特許出願第14/170,166号を参照のこと。

30

【0173】

結合特性、ピニング及び関連する方法のプロファイリング

本明細書で開示されるのは、V_L抗原結合タンパク質が、特に本明細書で開示されるようなハイブリッド免疫グロブリン遺伝子を含む非ヒト動物にて生成されるのであれば、抗原と特異的に結合する場合、1以上の独特のまたは異なる結合特性を、すなわち、同じ抗原と特異的に結合する典型的なまたは従来抗体によっては示されない結合特性を示し得るという予想外の発見である。そのようなV_L抗原結合タンパク質の特定及び/または単離は、そのような抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質の抗原への結合特性を評価する方法を含むが、同じ抗原と特異的に結合する典型的なまたは従来抗体の結合特性とそれらの結合特性を比較することも含んでもよい。一部の実施形態はさらに、1以上の異なる結合特性を示すV_L抗原結合タンパク質をコードする核酸配列を単離することと、任意で該核酸配列を発現させることとを含む。

40

【0174】

一般的な概説として、抗原結合タンパク質の結合特性をプロファイリングする方法は、(a)結合、好ましくは特異的な結合を可能にする条件下で抗原(その断片及び/または修飾されたその断片を含む)に抗原特異的結合タンパク質を接触させることと、(b)あ

50

るとしたら、抗原（その断片及び／または修飾されたその断片）と結合タンパク質との間で形成される結合タンパク質／抗原の複合体を検出することを含む。「結合特性」は本明細書で使用されるとき、感受性、特異性、結合活性、親和性等を含むが、それらに限定されない周知の測定可能な特性のいずれか1つを指す。技量のある熟練者は、これらの一般的な結合特性が特定の結合特性、たとえば、エピトープ特異性、会合定数、解離定数、平衡定数等の組み合わせの結果であってもよいことを認識するであろう。結合プロフィールはそのような結合特性のいずれか1以上を含む。

【0175】

「特異的に結合する」、「特異的な結合」、「特異的に結合する」、「抗原特異的な」等は、生理的条件下で相対的に安定である抗原との複合体を形成する抗原結合タンパク質を指す。特異的な結合は、普通低い親和性と中程度から高い能力を有する非特異的な結合と区別されるように高い親和性と中程度から低い能力を特徴とする。通常、結合は会合定数 K_A が 10^6 M^{-1} より高いと特異的であると見なされる。必要に応じて結合条件を変えることによって特異的な結合に実質的に影響を与えることなく非特異的な結合を減らすことができる。たとえば、抗原結合タンパク質の濃度、溶液のイオン強度、温度、結合にかける時間、ブロッキング剤（たとえば、血清アルブミン、乳カゼイン）の濃度等のような適当な結合条件は日常の技法を用いて技量のある熟練者によって最適化されてもよい。

【0176】

抗原に向けられた多数の抗原結合タンパク質をプロファイリングする方法は当該技術で周知であり、それには、日常の交差ブロッキングアッセイ、エピトープマッピング、アラニン走査変異体、ペプチドプロット（Reineke (2004), *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63）、ペプチド切断分析、エピトープ切断及びエピトープ抽出及び抗原の化学修飾（Tomer (2000), *Protein Science*: 9: 487-496）が挙げられるが、それらに限定されない。一般に、これらの方法には、抗原（または修飾された断片を含むその断片）の表面への固定化が含まれてもよい。

【0177】

一般に、抗原またはその断片を固定化する、それと結合する及び／または連結するのに好適な固形または半固形の支持体（及び抗体を固定するのに固形支持体を好適にする修飾）は当該技術で周知である。固形支持体の非限定例には、バイオセンサーチップアレイ、ビーズ（たとえば、ポリスチレンビーズ、磁化ビーズ）、マイクロウェルプレート等が挙げられる。従って、たとえば、シリカのシェルに内包されたCdSe-CdSのコアシェルのナノ結晶は抗原またはその断片へのカップリングのために容易に誘導体化することができる（Bruchez et al. (1998), *Science*, 281: 2013-2016）。同様に、高度に蛍光性の量子ドット（硫化亜鉛でキャップしたセレン化カドミウム）が超高感度の生物学的検出で使用するために生体分子に共有結合されている（Warren及びNie (1998) *Science*, 281: 2016-2018）。蛍光標識したビーズはLuminex and Quantum Dotから市販されている。加えて、パッド、フィルム、ナノウェル、または微小流体チャンネルも固形支持体としての役割を果たしてもよい。

【0178】

一部の実施形態では、抗原またはその断片（修飾されたその断片を含む）をフッ化ポリビニリデン、ニトロセルロース、アガロース及び／またはポリアクリルアミドのゲルパッドのような固形または半固形の表面上に固定してもよく、それと結合してもよく、または連結してもよい。アルデヒド、ポリリジンまたはホモ官能性クロスリンカーで活性化したガラススライドも使用されてもよい。一部の実施形態では、抗原（複数可）またはその断片（複数可）は三次元アレイ、たとえば、Mirzabekov et al., *Nucleic Acids Res*, 24(15): 2998-3004 (1996)にて記載された三次元のポリアクリルアミドのゲルパッドマイクロアレイにて配置されてもよい。好適な実施形態では、抗原（複数可）またはその断片（複数可）はバイオセンサーチ

10

20

30

40

50

ップの表面、ポリスチレンビーズ等に固定化されてもよい。

【0179】

抗原結合のための方法及び条件は当該技術で周知であり、本明細書でさらに記載される。当該技術で周知なのはまた、抗原/結合タンパク質の複合体を検出するための方法及び条件である。抗原/結合タンパク質の複合体の検出は定性的であってもよく及び/または定性的であってもよい。たとえば、セットにおける複数の(一般に多数の)結合タンパク質の結合も検出されてもよい。抗原結合タンパク質の複合体を検出する方法には、たとえば、ELISA、蛍光免疫アッセイ、ウエスタン及びドットプロット、免疫沈降、競合ポリペプチドを用いた競合アッセイ、及び焦点免疫アッセイ、表面プラスモン共鳴法(SPR)技術、多重検出アッセイ等が挙げられる。

10

【0180】

差別的抗原かく乱

好適な実施形態では、本明細書で開示されるようなプロファイリング法は、一連の独立した安定な変化を高分子に導入した後の該高分子に対する2つの結合タンパク質の応答パターン(たとえば、結合プロファイル)間の類似性の程度は、2つの結合タンパク質によって結合される高分子のエピトープ間の類似性の程度を反映するというプリンシパルにある程度に基づく。高分子にて変化がなされた後のそのような高分子の相互作用を評価することは、修飾支援型のプロファイリング(MAP)、抗原構造に基づく抗体のプロファイリング(ASAP)または差別的抗原かく乱(DAD)として当該技術で既知の方法である。DADは、各抗原結合タンパク質の結合プロファイルの化学的にまたは酵素的に修飾された抗原またはその断片への類似性に従って同じ抗原に向けられた多数の抗原結合タンパク質をカテゴリーに分類する方法である(その全体が参照によって本明細書に具体的に組み入れられる米国特許出願公開第2004/0101920号;またShi et al. (2006) J. Immunol. Methods, 314:9-20も参照のこと)。各カテゴリーは、別のカテゴリーによって表される結合特性(たとえば、エピトープ)とは明瞭に異なる、またはそれと部分的に重複する結合特性(たとえば、エピトープ)を反映してもよい。この技術によって、遺伝的に同一の抗原結合タンパク質の迅速な選別が可能になるので特徴付けを遺伝的に異なっている抗原結合タンパク質に集中させることができる。DADを用いて、本発明のV_L抗原結合タンパク質を、たとえば、典型的な抗体に対して覆い隠されているエピトープと結合するV_L抗原結合タンパク質を、従来の抗体と比べて独特の結合特性を示す抗原結合タンパク質のグループに選別してもよい。

20

30

【0181】

好ましくは、抗原タンパク質をバイオセンサーチップの表面またはポリスチレンビーズのいずれかに固定化してもよい。親和性に基づくバイオセンサーは、半導体エレクトロニクスと液相生物学の間での界面でシグナル変換因子として、たとえば、抗体、受容体、リガンド、酵素、糖質または核酸のような生体分子を採用する。これらの生体分子の相互作用の固有の認識特性は、高度な感度と選択性を持つバイオセンサーによって観察することができ、測定することができる(概説については、Baird及びMyszka(2001) J. Molecular Recognition, 14:261-268を参照のこと)。

40

【0182】

バイオセンサーを使用する利点には、リアルタイムでデータを回収する能力であり、したがって結合反応についての詳細な情報を迅速に提供することであり、第2に、相互作用している生体分子間の結合反応は、結合反応が観察されるために生体分子を、たとえば、蛍光標識または放射性標識で標識することを必要としない。最も確立されたバイオセンサーの機器及び技術は現在のところBiacore AB(Uppsala, Sweden)によって提供されている。Biacore機器(モデル1000、2000、及び3000)は完全に自動化された、96穴プレートから直接試料を受け入れることができる、センサーチップに基づくSPR装置である。これらの機器の1つに結合させると、チップと呼ばれるセンサー表面は個々に操作することができる、または一連の操作ができる4つ

50

の独立したフローセルに分割される。このフローセルの構成によって、緩衝液が連続してセンサー表面を通過することが可能になり、それによって検体溶液を緩衝液に交換する場合、時間のかかる洗浄ステップの必要性を軽減する。加えて、連続フロー系は、結合測定過程の持続時間の間、リガンドが一定の検体濃度に曝露されることを保証する。さらに、各センサーチップ上での4つのフローセルの可用性は、ユーザーが3つの異なる試料を固定化し、同じセンサーチップ内で参照表面を維持することを可能にする。Biacore 2000及び3000モデルは、4つのフローセル内すべてで同時に結合相互作用をモニタリングすることができる。順次の各表面への検体の送達はインラインでの参照減算及び改善されたデータの質を可能にする (Myszka (1999) J. Mol. Recogn. 12: 279 - 284; Rich et al. (2000) Curr. Opin. Biotechnol. 11: 54 - 71)。たとえば、Affinity SensorsによるIASYS (登録商標) 機器、Nippon Laser ElectronicsによるSPR670、Analytical µSystemsによるBio-Suplar II、及びTexas InstrumentsによるSPREET A (商標) のような他のバイオセンサーも本発明の方法を実践するのに使用することもできる。

10

20

30

40

50

【0183】

ポリスチレンビーズは、たとえば、多重LUMINEX (商標) 検出アッセイ (Luminex Corp., TX) のようなアッセイで処理されてもよい。LUMINEX (商標) の100までの異なる型のビーズによる多重アッセイを取り扱う能力のために、LUMINEX (商標) は種々の修飾を伴ったほぼ無限の抗原表面を提供し、結果的に抗原エピトープのプロファイリングにおける分解能を改善する。

【0184】

抗原構造の修飾または変化は、抗原タンパク質の特定のアミノ酸残基の側鎖を特に修飾する傾向がある化学処理、または酵素処理のいずれかによって達成されてもよい。修飾はすべて好ましくは、表面、たとえば、バイオセンサーの表面、ポリスチレンビーズ等に固定化される抗原上で行われてもよい。何らかの形で修飾された抗原を含む各表面またはビーズで多数の異なる型の抗原の修飾が実施されてもよい。通常、修飾されない抗原が固定化される適当な対照表面が検体に含まれてもよい。

【0185】

化学的な変化または修飾を達成するのに好適である化学物質の非限定例には、スクシンイミジルエステル及びその誘導体、1級アミン含有化合物、ヒドラジン及びカルボヒドラジン、遊離のアミノ酸、2~20の残基長を含有するホモ-及びヘテロ-オリゴペプチド、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (TCEP·HCl) / ヨードアセトアミド、N-エチル-N'- (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) / エタノールアミン、ヨードアセトアミド及びヒドラジン、p-ヒドロキシフェニルグリオキサル (HPG)、過酸化水素、N-プロモスクシンイミド、N-アセチルイミダゾール、テトラニトロメタン、アルサニル酸、塩化ダンシル、グルタルアルデヒド、ニンヒドリン、ピロ炭酸ジエチル (DEPC)、酢酸スルホスクシンイミジル (スルホ-NHS-酢酸)、ポリエチレングリコール5000 (PEG-5000)、及び7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸、スクシンイミジルエステルが挙げられる。技量のある熟練者は、さらに多くの他の化学物質がDADを実施するのに使用されてもよいことを認識するであろう。

【0186】

抗原の酵素的な変化または修飾を達成するのに好適である酵素、特にプロテアーゼの非限定例には、修飾されたブタトリプシン、エンドプロテイナーゼ Glu-C、エンドプロテイナーゼ Asp-N、キモトリプシン、エンドプロテイナーゼ Lys-C、及びエンドプロテイナーゼ Arg-C、ペプシン、パパイン、サーモリシン、スブチリシン、プロテアーゼ K、プロメライン、及びスルフヒドリル特異的プロテアーゼ (フィシン) が挙げられる。ここでも、技量のある熟練者は本発明の方法を実行するのに他のプロテアーゼが使

用されてもよいことを容易に認識するであろう。

【0187】

S P R 技術を用いて、各センサーチップの修飾されていない表面1つと3つの修飾された表面を含む表面すべてにて抗原結合タンパク質の複合体を同時に測定することを可能にする実験設定を用いて結合を共鳴単位 (R U) として測定してもよい。3つの修飾された表面それぞれからの結合応答の対照 (未修飾の) センサー表面に対する百分率として正規化された応答を算出してもよい。従って、それぞれ未修飾の表面と異なって修飾された3つの表面とを含有する別々に調製された3つのセンサーチップ上で各試料を流すことによって各試料の9つの応答データ (%) を回収してもよい。

【0188】

好適な実施形態では、抗原はポリスチレンビーズに固定化されてもよい。当該技術で周知の方法に従って生成される未修飾及び未修飾の抗原を含むビーズ。たとえば、L U M I N E X (商標) 検出アッセイのような多重検出アッセイを用いて、抗原結合タンパク質の複合体が平均蛍光強度として測定されてもよく、正規化された応答が算出されてもよい。

【0189】

ビンゲ

特定の及び具体的な適用では、本発明は、抗原結合タンパク質、たとえば、V_L 抗原結合タンパク質及び典型的な抗体とそれらが向けられる抗原との間での相互作用を評価する方法を提供し、それは、同胞と呼ばれるメンバーが抗原に対して、たとえば、化学的にまたは酵素的に修飾された抗原に対して固有で類似の結合特性または結合プロファイルを示す機能グループ (クラスタまたはピンとも呼ばれる) に抗原結合タンパク質を選別する迅速な方法を可能にする。その結合特性または結合プロファイルの類似性に基づいてクラスタ化される結合タンパク質は、類似の結合特性を有する、たとえば、同一のエピトープまたは類似のエピトープと結合すると見なされる。それらのクラスタは任意で、マトリクス形式、または系統樹のような「樹状」形式、またはコンピュータ読み取り形式、または任意のデータ入力装置互換性形式で表示されてもよい。クラスタに関する情報はマトリクス、系統樹から、またはコンピュータまたは他の演算装置によって捕捉されてもよい。データの捕捉は視覚的、手動、自動またはそれらの組み合わせであってもよい。

【0190】

本明細書で使用されるとき、「ピン」という用語は、本発明の方法に従って修飾された / かく乱された抗原表面のパネルに類似する結合プロファイルを有すると特定された結合タンパク質のクラスタを指す名詞として使用されてもよい。「ビンゲする」という用語は、アッセイによって生じたデータの解析を含む、本発明の方法を実行することを指す動詞としても使用されてもよい。

【0191】

ビンゲは、本明細書に記載されるとき、1以上の結合特性に、たとえば、それらが認識するエピトープに基づいて結合タンパク質をグループ分けする方法である。さらに詳しくは、ビンゲは、エピトープ認識特性に基づいて結合タンパク質をクラスタ化し、異なる結合プロファイルを有する結合タンパク質のピンを特定するための演算プロセスと組み合わせた、様々な結合タンパク質のエピトープ認識特性を識別する方法及び系を含む。従って、実施形態には、本明細書で考察されるような結合タンパク質のエピトープ結合特性を測定するアッセイと、そのようなアッセイから生成されるデータを解析するプロセスが含まれる。

【0192】

ビンゲは、(1) 結合特性をグループ分けする、たとえば、視覚検査によって、示される各抗原結合を目盛り付きの棒 (たとえば、各修飾された抗原表面からの対照の百分率) として示す方法 ; (2) 各結合タンパク質のマトリクスの決定因子の値を算出し、算出された決定因子すべてをグループに選別する方法 (" C a l c u l u s - - O n e a n d S e v e r a l V a r i a b l e s " 6^t h E d i t i o n b y S a l a s a n d E i n a r , p p . 7 1 5 - 7 1 7 , 1 9 9 0 を参照のこと) ; または (3) 方

10

20

30

40

50

法によって生成された結合プロファイルのデータにパターン認識アルゴリズム及び関連する生物情報のソフトウェアを適用し、結合タンパク質を機能グループに分類する方法のいずれかによって達成されてもよい。

【0193】

一実施形態では、適当な統計ソフトウェアを用いて、抗原結合タンパク質の複合体について正規化された応答プロファイルをグループに組織化してもよい。グループ分けは、各応答マトリクスの決定因子を算出し、その後、決定因子をグループに選別することによって達成されてもよく、各グループの段階的なカラーバカラム（プロファイル）を視覚的に検査してグループ分けの結果を検証することによる場合もある。全体的な「グループ分けの過程」は生物情報のパターン認識またはデータマイニング計算のソフトウェアによって達成されてもよい。そのようなソフトウェアの非限定例には、J - e x p r e s s (D e N o v a , I n c . V a n c o u v e r , B r i t i s h C o l u m b i a)、S t a n f o r d G e n e C l u s t e r ソフトウェア (S t a n f o r d U n i v e r s i t y , C a l i f .)、S t a t S o f t o f S t a t i s t i c a のような DNA マイクロアレイ解析によって日常的に使用される市販のプログラム、または技量のある熟練者によって開発された市販ではない他の好適なプログラムが挙げられる。

10

【0194】

種々の技法を採用して上述のように生成されたプロファイルを視覚化してもよい。人間の観察者が意味のある比較を行うために、プロファイルが提示される空間は分かりやすくすべきである。高い次元の空間で意味のある傾向またはクラスを視覚化するのは難しい可能性はあるけれども、一実施形態は、特定のプロファイルに最も関連すると予想される二次元または三次元（結合特性）を含むが、同じ二次元または三次元の空間で他の潜在的に意味のある結合の特徴を見ることが可能でないかもしれない。

20

【0195】

種々の技法を用いてこの課題に対処してもよい。そのような技法は、個々の次元がデータの2以上の特徴を捕捉するさらに低い次元の空間を創り出す。そのような技法の例には、主成分分析（PCA）、線形及び非線形の識別分析、多次元スケーリング及び射影追跡法が挙げられる。特に好ましいアプローチにはPCAの使用が関与する。PCAは、データセットが多次元空間にて最大の変動を示すベクトル（次元）を決定する。第1の主成分はデータの最大の変動の方向を示す。第2の主成分はデータ等における2番目に最大の変動の方向を示す、等である。使用者は、そのデータを描くのに好適なだけ多くの主成分を選択することができる。通常、第1の1、2または3の主成分は人間の観察者に対してデータを提示するために選択される。主成分分析は、双方ともあらゆる目的で参照によって本明細書に組み入れられる Jackson, J. E. (1991), A User Guide to Principal Components. New York: John Wiley and Sons; 及び Jolliffe, I. T. (1986), Principal Component Analysis. New York: Springer-Verlag にてさらに完全に記載されている。

30

【0196】

主成分分析を行うための種々の市販のツールが利用可能である。PCAを行うための例となる統計計算のパッケージは、ワシントン州シアトルの Insightful Corporation (以前の MathSoft) またはミズーリ州セントルイスの Partek Corporation、たとえば、Partek Genomic Suite Software から入手可能であってもよい。主成分分析は単純な方法での定量的な結合プロファイルに適用することができる。しかしながら、それらを主成分分析に提示する前にプロファイルのデータセットを正規化することが一般に必要である。これは、プロファイルの個々の特徴を含む種々のスカラーが非常に異なるスケールで存在するためである。意味のあるPCA解析のためにこれら種々の特徴を比較可能なスケールにするには、データを正規化する変換を行ってもよい。好まれる一実施形態では、次元のそれぞれは、その次元に沿ったデータすべてを検討し、そのデータの平均値を差し引き、標準偏差で割

40

50

ることによって増減される。これは正規化のためにデータを効果的に増減する。

【0197】

好適な実施形態では、差別的抗原破壊から生成されたデータは以下の方法で正規化されてもよい。修飾された抗原表面（またはビーズセット）への抗原結合タンパク質の結合シグナルを未修飾の抗原表面（またはビーズセット）への同じ抗原結合タンパク質の結合シグナルで割ることによって生データを正規化してもよい。それに続いて、所与の表面（またはビーズセット）についてのすべての値をその表面（またはビーズセット）への結合タンパク質すべてからの平均値で割ってもよい。最終的に、2を底として対数を用いてすべての値を変換してもよい。

【0198】

別の実施形態では、結合プロファイルは、高処理能力競合結合タンパク質アッセイ、たとえば、多重競合抗体ビニング（MCAB）アッセイによって生成され、競合パターン認識（CPR）法を用いて、入力データを解析するが、その双方とも米国特許第8,568,992号（その全体が本明細書に組み入れられる）にて記載されている。

【0199】

結合プロファイル、たとえば、シグナル強度を正規化したら、種々の周知の演算法を用いて複雑なデータの根底にあるパターンを特定してもよい。大きな生物データセットの解析に有益であると判明している方法の1つは階層的クラスタ分析である。この方法を適用して、結合タンパク質が、その非類似性の値に基づいてネスト化したサブセットの厳格な階層に強制的に入れられてもよい。例示的な実施形態では、最低の非類似性の値を持つ結合タンパク質の対が先ず、一緒にグループ分けされる。これに次ぐ最小の非類似性（または平均の非類似性）の値を持つ結合タンパク質の対またはクラスタ（複数可）が次に一緒にグループ分けされる。この過程はクラスタ1つが残るまで繰り返して反復される。このようにして、他の結合タンパク質と比較されて結合タンパク質はその結合プロファイルがどれくらい類似するかに従ってグループ分けされる。一実施形態では、結合タンパク質は、枝の長さが2つの結合タンパク質の結合パターンの間での類似性の程度を表す系統樹（*dendrogram*）（「系統樹（*phylogenetic tree*）」と呼ばれることがある）にグループ分けされる。2つの結合タンパク質間の長い枝の長さは、それらが異なるエピトープに結合する可能性が高いことを示す。短い枝の長さは2つの結合タンパク質が同一エピトープについて競合する可能性が高いことを示す。

【0200】

本明細書で開示される方法に従って特定される機能グループは、同じ機能グループにおける結合タンパク質は独特のまたは異なる結合特性を共有するはずであるという原理に従って周知の方法を用いて検証されてもよい。一実施形態では、単一のピンにおける結合タンパク質の独特のまたは異なる結合特性は、抗原の同一エピトープ（複数可）と結合するそのピンの結合タンパク質または抗原の同一エピトープ（複数可）についての競合を生じ、その際、異なる機能グループを表す結合タンパク質は抗原の同一エピトープと結合するべきではなく、または抗原の同一エピトープ（複数可）について競合するべきではない。この実施形態では、ELISA、競合アッセイ、エピトープマッピングアッセイ、ペプチドアレイ等すべて、本明細書で決定されるピンを検証するために用いてもよい。

【0201】

ピンまたは機能グループは、ピンが少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%、及び最も好ましくは少なくとも99%のV_Lタンパク質を含む場合、すべてのまたは実質的にすべてのV_L抗原結合タンパク質を含む。一実施形態では、ピンは100%のV_L抗原結合タンパク質を含む。一実施形態では、十分な数の抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質及び従来の抗体が意味のある比較及びビニングのためにプロファイリングされる。一実施形態では、V_L抗原結合タンパク質を発現し、抗原で免疫されている非ヒト動物の血清におけるまたはそれから単離される結合タンパク質がプロファイリングされ、同じ抗原で免疫されている対照非ヒト動物の血清におけるまたはそれから単離される結合タンパク質の結合プロファイルと比較される。一実施形態で

10

20

30

40

50

は、免疫は、初めて非ヒト動物を抗原刺激する、たとえば、抗原を投与することと、非ヒト動物をある期間、たとえば、2～3日、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間等休ませることと、非ヒト動物に1回以上抗原を再投与することを含む。

【実施例】

【0202】

以下の非限定の実施例は、本明細書に記載される非ヒト動物をどのように作製し、使用し、その理解にどのように役立つのかについて完全な開示及び説明を当業者に提供するように示されるのであって、本発明者らが自身の発明と見なすものの範囲を限定することを意図するものではなく、以下の実験が実施されたすべてのまたは唯一の実験であることを示すことを意図するものでもない。実施例には、当業者に周知であろう従来の方法（分子クローニング法等）の詳細な説明は含まれない。使用された数（たとえば、量、温度等）に関して精度を保証するように努力を行ってきたが、一部の実験的な誤差及び偏差は考慮されるべきである。特に指示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧またはほぼ大気圧である。

10

【0203】

実施例1．操作された免疫グロブリン遺伝子座を有する非ヒト動物の生成

この実施例は、(a)免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖のV_L及びJ_Lの遺伝子断片を含む免疫グロブリン重鎖の遺伝子座と、(b)免疫グロブリン軽鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖のV_L及びJ_Lの遺伝子断片を含む免疫グロブリン軽鎖の遺伝子座とを含有するように非ヒト動物の免疫グロブリン遺伝子座を操作する例となる方法を説明する。

20

【0204】

マウスの免疫グロブリン重鎖の遺伝子座にヒトの軽鎖V及びJの遺伝子断片（たとえば、V_L及びJ_L）を挿入するための例となるターゲティングベクターの構築が以下に記載される。図2は、相同組換えを用いてマウスの免疫グロブリン重鎖の遺伝子座に挿入するための複数のヒト軽鎖の遺伝子断片を含有する例となる4つのターゲティングベクターを説明する。

【0205】

VELOCI GENE（登録商標）遺伝子操作技術（たとえば、米国特許第6,586,251号及びValenzuela, D. M., Murphy, A. J., Frenthewey, D., Gale, N. W., Economides, A. N., Auerbach, W., Poueymirou, W. T., Adams, N. C., Rojas, J., Yasenchak, J., Chernomorsky, R., Boucher, M., Elsassser, A. L., Esau, L., Zheng, J., Griffiths, J. A., Wang, X., Su, H., Xue, Y., Dominguez, M. G., Noguera, I., Torres, R., Macdonald, L. E., Stewart, A. F., DeChiara, T. M., Yancopoulos, G. D. (2003). High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotechnol. 21, 652-659を参照のこと）を用いて種々のターゲティング構築物を作製し、マウスのゲノムの細菌人工染色体（BAC）ライブラリを修飾した。マウスのBACのDNAを相同組換えによって修飾し、再構成されていないヒトV_L及びJ_L遺伝子断片のその後の挿入のために内在性のV_H、D_H及びJ_Hの遺伝子断片を欠失させてもよい。或いは、機能的な可変領域を形成する内在性の遺伝子断片の組換えが阻害されるように（たとえば、遺伝子断片の逆位またはかく乱によって）、内在性のV_H、D_H及びJ_Hの遺伝子断片をインタクトなまま残し、不活化してもよい。

30

40

【0206】

遺伝子操作されたマウスであって、そのゲノムが免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配

50

列に操作可能に連結された再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖 V_L 及び J_L の遺伝子断片を含む免疫グロブリン重鎖の遺伝子座を含有するマウス及びそれを作る方法は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2012-0096572A1号にて記載されている。図2に示すように、当該技術で認識される標準の分子技法を用いて、4つのターゲティングベクターを操作して不活化されたマウスの重鎖遺伝子座（たとえば、欠失した内在性の V_H 、 D_H 及び J_H の遺伝子断片）に40のヒト V 遺伝子断片及び5のヒト J 遺伝子断片を段階的に挿入した。表3は、マウス免疫グロブリン重鎖の遺伝子座に挿入するための種々のヒト軽鎖の遺伝子断片を含有する各ターゲティングベクターに含まれるヒトDNAのサイズを示す。任意の数のヒト V 及び J の遺伝子断片がターゲティングベクターに含まれてもよい。図2で示された例となるターゲティングベクターには、生殖細胞系列のヒト軽鎖遺伝子座の近位コンテグで天然に見いだされるヒト軽鎖遺伝子断片が含まれる（図1）。4つすべてのターゲティングベクターの段階的挿入の後の得られた内在性の重鎖遺伝子座を図2の下で示す。

【表3】

表3

ターゲティング ベクター	ヒト κ 配列のサイズ	加えたヒト κ 遺伝子断片	
		$V\kappa$	$J\kappa$
1	約110.5 kb	4-1, 5-2, 7-3, 2-4, 1-5, 1-6	1-5
2	約140 kb	3-7, 1-8, 1-9, 2-10, 3-11, 1-12, 1-13, 2-14, 3-15, 1-16	-
3	約161 kb	1-17, 2-18, 2-19, 3-20, 6-21, 1-22, 1-23, 2-24, 3-25, 2-26, 1-27, 2-28, 2-29, 2-30	-
4	約90 kb	3-31, 1-32, 1-33, 3-34, 1-35, 2-36, 1-37, 2-38, 1-39, 2-40	-

【0207】

類似のアプローチを用いて、マウス重鎖定常領域の背景でヒト軽鎖可変ドメインの他の組み合わせを構築してもよい。追加の軽鎖可変ドメインはヒトの V 及び J の遺伝子断片に由来してもよい。様々な数のヒトの V 及び J の遺伝子断片を含むヒトDNAを含む例となるターゲティングベクターを図3にて示す。

【0208】

ヒトの軽鎖遺伝子座は1,000kbにわたって伸び、可変(V)または連結(J)の断片をコードする80を超える遺伝子を含有する。公開された報告によれば、ヒトの軽鎖遺伝子座の70の V 遺伝子断片のうちで、30~38の範囲が機能的な遺伝子断片であると思われる。70の V 配列は3つのクラスタに配置され、そのすべてが異なる V 遺伝子ファミリー群の異なるメンバーを含有する(クラスタA、B及びC)。ヒトの軽鎖遺伝子座の範囲内では、観察される V ドメインすべての半分を超えるものが遺伝子断片1-40、1-44、2-8、2-14及び3-21によってコードされる。7の J 遺伝子断片があり、そのうちの4つ、 J_1 、 J_2 、 J_3 及び J_7 だけが一般に機能的な J 遺伝子断片と見なされる。幾つかの対立遺伝子では、第5の $J-C$ 遺伝子断片対は報告によれば偽遺伝子(C_6)である。本明細書に記載されるように、ハイブリッド重鎖遺伝子座への複数のヒト J 遺伝子断片の組み入れはデノボ合成によって構築されてもよい。このように、生殖細胞系列の構成で複数のヒト J 遺伝子断片を含有するゲノムの断片を複数のヒト V 遺伝子断片で操作して重鎖定常領域の背景で正常な $V-J$ 組換えを可能にする。複数の V 遺伝子断片を含む例となるターゲティングベクターを図3にて示す(ターゲティングベクター1')。

【0209】

重鎖定常領域との軽鎖可変ドメインの結合は、非ヒト動物にてヒトV_L領域を持つ独特のV_L抗原結合タンパク質を生成するための多様性の潜在的に豊富な供給源を表す。マウスにてヒト軽鎖遺伝子座（または上述のようなヒト遺伝子座）のこの多様性を活用することは、独特のハイブリッド重鎖の操作を結果的に生じ、遺伝子操作された動物の免疫レパートリーに対する別の次元の結合タンパク質を生じ、治療剤の生成のための次世代のプラットフォームとしてのその後の使用を生じる。

【0210】

上述のターゲティングベクターを用いてマウスの胚性幹（ES）細胞にエレクトロポレーションして、V_L抗原結合タンパク質（すなわち、マウスの重鎖定常領域に操作可能に連結されたヒトの軽鎖遺伝子断片）を発現するキメラマウスを創り出すための改変ES細胞を創出する。定量的PCRアッセイであるTAQMAN（登録商標）（Lie及びPetroopoulos, 1998. *Curr. Opin. Biotechnology*, 9: 43-48）によって、再構成されていないヒト軽鎖遺伝子断片の挿入を含有するES細胞が特定される。ヒト配列及び関連する選択カセットの挿入、マウス重鎖配列の喪失及び内在性重鎖遺伝子座に隣接するマウス配列の保持のために特異的なプライマーのセット及びプローブを設計する。

10

【0211】

ヒトの軽鎖遺伝子断片の挿入によって導入された任意の望ましくない選択カセットを取り除くために、リコンビナーゼを発現する構築物によってヒト軽鎖遺伝子断片（たとえば、V_L及びJ_L）を持つES細胞に形質移入することができる。任意で、リコンビナーゼを発現するマウスに交配することによって選択カセットが取り除かれてもよい（たとえば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるUS6,774,279）。任意で選択カセットはマウスにて保持される。

20

【0212】

上述の標的化されたES細胞をドナーES細胞として用い、VELOCIMOUSE（登録商標）法（たとえば、米国特許第7,294,754号及びPoueymirou, W.T., Auerbach, W., Friendewey, D., Hickey, J.F., Escaravage, J.M., Esau, L., Dore, A.T., Stevens, S., Adams, N.C., Dominguez, M.G., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., DeChiara, T.M., Valenzuela, D.M. (2007), F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat. Biotechnol*, 25, 91-99を参照のこと）によって8細胞期のマウス胚に導入する。マウスの免疫グロブリン重鎖の遺伝子座にてヒトの軽鎖遺伝子断片を独立して持つVELOCIMICE（登録商標）（ドナーES細胞に完全に由来するF0マウス）は、内在性の免疫グロブリン重鎖の遺伝子座での独特のヒト軽鎖遺伝子断片の存在を検出する対立遺伝子アッセイの改変（Valenzuela et al., 上記）を用いた遺伝子型決定によって特定される。仔の遺伝子型を決定し、V_L含有重鎖の発現を特徴付けるために、遺伝子操作された免疫グロブリン重鎖の遺伝子座についてヘテロ接合体またはホモ接合体の仔を選択する。

30

40

【0213】

マウスの重鎖の遺伝子座へのヒトの軽鎖遺伝子断片の導入は、さらにヒト軽鎖遺伝子断片によるマウス軽鎖遺伝子断片のin situ置換を含有する129S6/SvEvTacとC57BL/6NTacのヘテロ接合体胚に由来するF1 ES株（F1H4; Valenzuela et al., 2007, 上記）（たとえば、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第6,596,541号及び同第8,642,835号を参照のこと）にて実施した。

【0214】

重鎖の遺伝子座にて再構成されていないヒト免疫グロブリン軽鎖V_L及びJ_Lの遺伝子

50

断片を含有する遺伝子操作された重鎖の遺伝子座を含むマウス（KOHマウス：MAID 1713：40のヒトV 遺伝子断片及び5のヒトJ 遺伝子断片；MAID 1994：40のヒトV 遺伝子断片及び5のヒトJ 遺伝子断片、及び組み込まれたAdam6遺伝子）は上述のように生成された。手短には、KOHマウスにて、内在性の機能的な重鎖可変遺伝子断片すべてを欠失させ、40の再構成されていないヒトV 遺伝子断片と5の再構成されていないヒトJ 遺伝子断片で置き換え、それを免疫グロブリン重鎖定常領域の核酸配列に操作可能に連結した。

【0215】

ホモ接合体VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウス（VI3：その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第8,642,835号及び同第8,502,018B2号）をホモ接合体KOHマウス（MAID 1713またはMAID 1994）と交配して修飾された軽鎖の対立遺伝子とKOHの対立遺伝子についてヘテロ接合体のマウスを作出した。この交配で生成されたF1ヘテロ接合体マウスを互いに交配して各対立遺伝子（MAID 1713HO 1242HO, MAID 1994HO 1242HO）についてホモ接合体のマウスを得た。そのようなマウスは、免疫グロブリンの構造に類似するが、そのような結合タンパク質が重鎖可変ドメインを欠くという点で異なる構造を有するV_L抗原結合タンパク質を発現する。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の遺伝子座における遺伝子操作された対立遺伝子の存在は上述の特異的なプローブやプライマーを用いたTAQMAN（商標）スクリーニング及び染色体分析によって確認した。ホモ接合体のKOHマウスは、内在性の可変重鎖V、D及びJの遺伝子断片すべてが欠失しているマウス重鎖遺伝子座への本明細書に記載されるような再構成されていないヒト軽鎖遺伝子断片（たとえば、ヒトV_L及びJ_L）の挿入と、マウスV_L及びJ_Lの遺伝子すべてが欠失しているマウスC_L（ ）軽鎖遺伝子座への再構成されていないヒト軽鎖遺伝子断片（たとえば、ヒトV_L及びJ_L）の挿入を含む。一部の実施形態では、KOHマウスはさらに、組み込まれたAdam6遺伝子を含む。

【0216】

マウスであって、そのゲノムが（i）40の再構成されていないヒトV_L及び5のJ_L遺伝子断片の挿入を、ヒトV_L及びJ_Lの遺伝子断片が内在性の重鎖定常領域に操作可能に連結されるように含有する免疫グロブリン重鎖対立遺伝子と、（ii）40の再構成されていないヒトV_L及び5のJ_L遺伝子断片の挿入を、ヒトV_L及びJ_Lの遺伝子断片が内在性の軽鎖定常領域に操作可能に連結されるように含有する免疫グロブリン軽鎖対立遺伝子とを含むマウスは、MAID 1713 / 1242「KOHマウス」と呼ばれる（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2012-0096572A1号を参照のこと）。それを有し、組み込まれたAdam6遺伝子を有するマウスは、MAID 1994 / 1242（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2013-0212719A1号を参照のこと）と呼ばれる。

【0217】

実施例2．V_L抗原結合タンパク質の生成及び特徴づけ

本実施例は、特異的に操作されて、（上述のように）免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含み、且つ重鎖可変ドメインを欠いている、免疫グロブリン様分子を発現するように遺伝子操作されたマウスから抗原結合タンパク質を作出することを記載する。本実施例は、小分子（たとえば、ステロイド及び天然物アルカロイド）に特異的で、（i）免疫グロブリン軽鎖定常ドメインに連結された免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをそれぞれ含む2つのポリペプチドと、（ii）免疫グロブリン重鎖定常ドメインに連結された免疫グロブリン軽鎖可変ドメインをそれぞれ含む2つのポリペプチドとを含有する例となる抗原結合タンパク質の生成を具体的に説明する。

【0218】

V_L抗原結合タンパク質は、遺伝子操作されたマウスであって、そのゲノムが、それぞれ内在性の重鎖及び軽鎖の定常領域に操作可能に連結された再構成されていないヒト軽鎖の遺伝子断片（たとえば、V_L及びJ_Lの遺伝子断片）をそれぞれ含有する免疫グロブリ

ンの重鎖及び軽鎖の遺伝子座を含むマウスから得られる。そのようなマウスは、野生型マウス及び/または対照の遺伝子操作されたマウスに比べて非タンパク質様の標的に対して抗原結合タンパク質を作るための頑強な生体内の系を提供する。

【0219】

免疫

一般に、本明細書で記載されるようなマウスを抗原に曝露し、その動物から（たとえば、脾臓またはリンパ節から）細胞（たとえば、B細胞）を回収する。細胞を骨髓腫細胞株と融合させて不死のハイブリドーマ細胞株を調製してもよく、そのようなハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、選択して、免疫に使用した抗原に特異的なハイブリッド重鎖を含有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を特定する。ハイブリッドの重鎖及び軽鎖のヒトV_H領域をコードするDNAを単離し、望ましい定常領域、たとえば、重鎖及び/または軽鎖に連結してもよい。マウス重鎖定常領域に融合されたヒトV_Hの遺伝子断片の存在に起因して、独特の抗体様のレパートリーが作出され、創り出された独特の抗体様の型の結果、免疫グロブリンのレパートアの多様性は劇的に増加する。これは、免疫の際、抗原に特異的なレパートリーに追加のレベルの多様性を付与する。得られたクローン化された配列はその後、CHO細胞のような細胞で産生されてもよい。或いは、抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質または可変ドメインをコードするDNAを抗原特異的なリンパ球から直接単離してもよい（たとえば、B細胞、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるUS7,582,298B2を参照のこと）。

10

【0220】

最初に、ヒトのV_H領域とマウスの定常領域を有する高親和性のV_L抗原結合タンパク質を単離する。上述のように、V_L抗原結合タンパク質を特徴づけし、親和性、選択性、エピトープ等を含む望ましい特性について選択する。マウスの定常領域を所望のヒトの定常領域で置き換えて、本発明の再構成されていないハイブリッド重鎖遺伝子座に由来する体細胞変異したヒトV_Hドメインを含有する独特の完全にヒトのV_L抗原結合タンパク質を生成してもよい。好適なヒト定常領域には、たとえば、野生型のまたは修飾したIgG1、またはIgG4または代わりにC_{H1}またはC_{H2}が挙げられる。

20

【0221】

KOHマウスの別々のコホートを天然物アルカロイド（抗原A）及びステロイド（抗原B）で別々に免疫した。「VI3」マウス（VELOCIIMMUNE（登録商標）ヒト化マウス、米国特許第8,642,835号及び同第8,502,018B2号を参照）及び「ULC」マウス（その出願は全体が参照によって本明細書に組み入れられるUS2011-0195454A1、US2012-0021409A1、US2012-0192300A1、US2013-0045492A1、US2013-0185821A1及びUS2013-0302836A1を参照）の別々のコホートも免疫し、同等の疫応答プロファイルを提供した。

30

【0222】

手短には、抗原AをKLHに結合させ、免疫原として使用してKOHマウス、VI3マウス及びULCマウスを免疫した。抗原Bについては、BSA複合体を免疫原として使用し、KOH及びVI3の系統を免疫した。最初の免疫に先立って、各マウスから免疫前血清を採取した。25µLの体積でアジュバントとしての10µgのCpGオリゴヌクレオチド（Invitrogen）と混合した最初の抗原刺激免疫のための2.35µgの複合体で足蹠（f.p.）注射を介して免疫原を投与した。その後、3、6、11、13、17、20日目に合計6回、アジュバントとして10µgのCpG及び25µgのAdju-Phos（Brenntag）と共に2.35µgの各免疫原で同じ経路を介してマウスに追加免疫をした。それぞれ4回目と6回目の追加免疫の後15日目と22日目にマウスから採血した。抗原AのKLH複合体に対する力価について抗血清をアッセイした。抗原Bについては、BSAに結合した抗原B及びBSAにて力価をアッセイした。KOHマウスについては、6回の追加免疫の完了後、マウスに4～5週間の休止期を与え、それに続いて、免疫原による4回のさらなる追加免疫を投与した。マウスから採血し、抗血清

40

50

の力価をアッセイした。

【0223】

所望の免疫応答が達成されると、脾細胞を採取し、マウスの骨髄腫細胞と融合させてこれらの生存能力を維持し、ハイブリドーマ細胞株を形成する。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、選択して抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質を産生する細胞株を特定する。この技法を用いて、幾つかの抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質（すなわち、マウス重鎖及び軽鎖の定常ドメインの背景にてヒトV_Hドメインを持つ結合タンパク質）が得られる。

【0224】

或いは、抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質は、その全体が参照によって具体的に本明細書に組み入れられる米国特許第7,582,298号に記載されているように、骨髄腫細胞に融合させることなく、抗原陽性B細胞から直接単離される。この方法を用いて、幾つかの完全にヒトの抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質（すなわち、ヒトV_Hドメインとヒト定常領域を持つ抗体）が得られた。

【0225】

抗血清の力価の測定

免疫原に対する血清の力価は標準のELISAによって測定した。以下はアッセイを詳細に記載する。リン酸緩衝化生理食塩水（PBS, Irvine Scientific）における抗原A（置換された芳香族天然物アルカロイド）または抗原B（ステロイド）のBSA複合体のいずれか2μg/mLで96穴マイクロタイタープレート（Thermo Scientific）を4に overnight コーティングした。翌日プレート洗浄器（Molecular Devices）を用いて、0.05%のTween 20を含有するリン酸緩衝化生理食塩水（PBS-T, Sigma-Aldrich）で4回プレートを洗浄した。次いで250μLのPBS中0.5%のウシ血清アルブミン（BSA, Sigma-Aldrich）でプレートをブロックし、室温で1時間インキュベートした。次いでPBS-Tで4回プレートを洗浄した。免疫したマウスの血清及び免疫前の血清を1:300または1:1000で希釈して0.5%BSA/PBSで3倍連続希釈し、ブロックしたプレートに2つ組で加え、次いで室温で1時間インキュベートした。最後の2つのウェルはブランクのままにして二次抗体の対照（バックグランド対照）として使用した。プレート洗浄器を用いて再びPBS-Tでプレートを4回洗浄した。次いで、ヤギ抗マウスIgG-Fc/西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）と結合した二次抗体（Jackson ImmunoResearch）を1:5000/1:10,000の希釈でプレートに加え、室温で1時間インキュベートした。次いでPBS-Tによってプレートを8回洗浄し、基質としてTMB/H₂O₂を用いて発色させた。基質を20分間インキュベートし、2Nの硫酸（H₂SO₄, VWR、カタログ番号BDH3500-1）または1Nのリン酸（JT Baker、カタログ番号7664-38-2）で反応を止めた。450nmにて分光光度計（Victor, Perkin Elmer）でプレートを読み取った。Graphpad Prismソフトウェアを用いて力価を算出した。

【0226】

注射した免疫原に対するマウスで誘導された免疫応答は力価として測定され、それは抗原結合の吸光度がバックグランドより2倍高い時の最高の血清希釈の逆数として定義される。免疫過程の終了時、KOHマウス及びVI3マウスは双方とも同等の高い力価を引き出した。

【0227】

Luminexによる結合タンパク質の特定

スクリーニングのための抗原結合ビーズを調製するために、pH6.2の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（J.T. Baker、カタログ番号4011-01）中の0.12mLのLuminexビーズ浮遊液（カルボキシル化マイクロスフェア、Luminex社）を、50mg/mLのEDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、Sigma、カタログ番号03449）15μL及び50mg/mLのスル

10

20

30

40

50

ホ - N H S (N - ヒドロキシスクシンイミド、P i e r c e、カタログ番号 2 4 5 1 0)
 1 5 μ L の添加とそれに続く室温での 1 0 分間のインキュベーションによって活性化した。そ
 れに続いて、5 0 m M の M E S 緩衝液、p H 5 (A C R O S、カタログ番号 3 2 7 7 6 5
 0 0 0) における 2 0 μ g / m L の B S A に結合した抗原 A (置換された芳香族天然物アル
 カロイド) 0 . 5 m L を活性化されたビーズに加え、1 級アミンカップリング反応を 2
 時間進め、ビーズ上の残りの反応基は、1 / 1 0 体積の 1 M トリス溶液、p H 8 (T e k
 n o v a、カタログ番号 T 1 0 8 0) の添加によってクエンチした。0 . 0 5 % T w e e
 n - 2 0 (C a l b i o c h e m、カタログ番号 6 5 5 2 0 5) を含有する P B S (L i
 f e T e c h n o l o g i e s、カタログ番号 1 4 1 9 0 - 1 4 4) でビーズを洗浄し
 、2 % w / v の B S A (S i g m a、カタログ番号 A 4 5 0 3) を含有する P B S 緩衝液
 にて保存した。同じ方法で、B S A タンパク質をカップリングした陰性対照のビーズのバ
 ッチも調製した。

【 0 2 2 8 】

結合タンパク質をスクリーニングするために、3 0 0 0 の抗原 A - B S A ビーズを含有
 する 7 5 μ L のアリコートを用いて 9 6 穴フィルタープレート (M i l l i p o r e、カタログ
 番号 M S B V N 1 2 5 0) の事前に水和した各ウェルに分配した。各結合タンパク質試料
 (2 5 μ L) を各ウェルに加え、プレート振盪器上でプレートを 4 にて一晩インキュベ
 ートした。2 日目の朝、真空マニホールドを用いて 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を含有す
 る P B S 緩衝液 (P B S - T) でビーズを洗浄し、P B S - T 中の 0 . 1 m L の 1 . 2 5
 μ g / m L の R - フニコエリスリンと結合したヤギ抗ヒト I g 抗体 (S o u t h e r n
 B i o t e c h、カタログ番号 2 0 6 3 - 0 9) と共にビーズを室温で 3 0 分間インキュ
 ベートすることによって、ビーズに結合したタンパク質を検出した。次いでビーズを洗
 浄し、0 . 1 5 m L の P B S - T に懸濁させ、L u m i n e x フローサイトメトリーに基
 づいたアナライザで中央値蛍光強度 (M F I) を測定した。同様の方法で、B S A に結合
 した抗原 B (ステロイド) ビーズを調製し、結合タンパク質を含有する試料をスクリー
 ングした。

【 0 2 2 9 】

相対的な結合動態

スクリーニングの開始の前に、2 0 0 n M のビオチン標識した抗原と共に 5 0 n M のニ
 ュートラアビジンを少なくとも 2 4 時間、事前インキュベーションした。小分子へのニュ
 ートラアビジンのタグ付けは、小分子の全体重量を増やすことによって結合タンパク質の粗精
 製上清の高処理能力親和性スクリーニングの感度を向上させた。最初に抗ヒト F c または
 抗マウス F c に特異的な抗体が固定化された B i a c o r e センサーの表面を用いて粗精
 製馴化培地から抗体を捕捉した。次いで小分子 / ニュートラアビジンの溶液を結合タンパ
 ク質が捕捉された表面上に 2 分間注入し、その後、1 0 分間、結合した複合体を解離させ
 た。実験はランニング緩衝液として H B S T を用い、2 5 で実施した。

【 0 2 3 0 】

図 4 は、K O H マウス及び V E L O C I M M U N E (登録商標) ヒト化マウスから得ら
 れた抗原陽性抗体 (すなわち、V_L 抗原結合タンパク質) の総数 (左) 及び百分率 (右)
 を示す。図 5 は、K O H マウス及び V E L O C I M M U N E (登録商標) ヒト化マウスか
 ら得られた抗原 B に対する抗体の例となる結合動態を示す。

【 0 2 3 1 】

結果は、V E L O C I M M U N E (登録商標) ヒト化マウス (V I 3) が 5 2 8 の結合
 タンパク質試料のうち抗原 A ビーズで 1 0 0 0 超の M F I を有する 1 0 の結合タンパク質
 試料を生じること示した。抗原 B ビーズについては、V E L O C I M M U N E (登録商
 標) ヒト化マウス (V I 3) は、3 5 0 のうちたった 2 の結合タンパク質試料が 1 0 0 0
 を上回る M F I を有することを示した。それに対して、K O H マウスは 5 2 8 のうちの 4
 5 3 の試料が抗原 A ビーズで 1 0 0 0 超の M F I を有することを示した。抗原 B ビーズで
 は、K O H マウスは 3 3 9 のうち 7 4 の試料が 1 0 0 0 超の M F I を有することを示した
 。抗原陽性の試料はすべて陰性対照の B S A ビーズに最小限のまたは無視できる結合 (た

10

20

30

40

50

例えば、MFI約118)を示した。

【0232】

ヒトの 遺伝子断片の使用

本発明に従ってマウスで産生された抗抗原Aまたは抗抗原BのV_L抗原結合タンパク質をさらに特徴づけるために、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるUS2007/028094A1にて記載されたものから適合させた方法を用いて、ヒトVドメイン(V_L抗原結合タンパク質の重鎖及び軽鎖の双方に由来する)をコードする核酸をクローニングし、配列決定した。抗体の核酸配列及び予測されたアミノ酸配列から、抗原Aまたは抗原B(上記に記載された)で免疫したマウスから得られた、選択され及び精製されたV_L抗原結合タンパク質のハイブリッド重鎖可変領域について、遺伝子使用を特定した。表4は、選択された抗抗原AのV_L抗原結合タンパク質に由来するヒトのV及びJの遺伝子断片の使用を示す。表5は、選択された抗抗原BのV_L抗原結合タンパク質に由来するヒトV及びJの遺伝子断片の使用を示す。

10

【0233】

遺伝子使用のデータは、本発明に係るマウスが小さな抗原に対して独特のハイブリッド重鎖可変領域を生成することができ、それは免疫グロブリンの重鎖遺伝子座における種々のヒトV及びJの遺伝子断片に由来することを示している。ヒトV及びJの遺伝子断片の使用はさらに、その遺伝子座の範囲内でならびに軽鎖V及びJの遺伝子断片との比較において多様で変化に富んだ再構成を明らかにしている。さらに、ハイブリッドの重鎖と軽鎖の間での遺伝子断片の使用において多様性は明らかである。

20

【表 4】

表 4

V _L タンパク質	ハイブリッド重鎖		軽鎖	
	V _K	J _K	V _K	J _K
1	3-20	4	4-1	2
2	3-20	4	1-5	2
3	4-1	1	4-1	3
4	4-1	1	3-20	3
5	1-5	5	3-20	1
6	3-20	4	1-5	2
7	4-1	1	3-20	2
8	3-20	4	1-5	2
9	4-1	1	3-20	3
10	4-1	1	3-20	3
11	1-33	1	1-33	3
12	4-1	1	3-20	3
13	4-1	1	3-20	3
14	4-1	1	3-20	2
15	3-20	3	4-1	1
16	1-33	1	3-20	3
17	3-20	3	4-1	1
18	4-1	1	3-20	1
19	4-1	1	3-20	3
20	4-1	1	3-20	3
21	4-1	1	3-20	3
22	4-1	1	3-20	3
23	1-33	3	3-20	5

10

20

30

【表 5】

表 5

V _L タンパク質	ハイブリッド重鎖		軽鎖	
	V _K	J _K	V _K	J _K
24	1-5	3	3-20	3
25	3-15	5	1-39	3
26	1-5	4	3-20	2
27	1-5	4	3-20	3
28	1-5	5	3-20	2
29	1-5	3	3-20	2
30	4-1	3	3-20	2
31	4-1	1	3-20	2
32	1-5	4	3-20	1
33	1-5	5	3-20	1
34	4-1	1	3-20	2

10

20

【0234】

親和性の測定

選択された抗原 B に特異的な及び精製された V_L 抗原結合タンパク質の上清についての平衡解離定数 (K_D) は、BIACORE (商標) 2000 機器 (GE Healthcare) を用いた SPR (表面プラズモン共鳴) によって測定した。データはすべて試料緩衝液及びランニング緩衝液として DPBS + 0.1% DMSO を用いて 25 で得られた。

【0235】

手短には、標準のアミンカップリング化学反応を用いて、高密度のプロテイン A で予め誘導体化した CM5 センサーチップの表面に各精製した V_L 抗原結合タンパク質を置いた。捕捉ステップの間に、5 μL / 分の流速で合計 3 ~ 4 分間、プロテイン A 表面にわたり、精製した抗抗原 B の V_L 抗原結合タンパク質を注入した。捕捉ステップには、ランニング緩衝液または検体の 270 μM ~ 13.7 nM の 3 倍希釈濃度範囲のストック溶液での流速 100 μL / 分での 1.5 分間の注入が続いた。捕捉された精製 V_L 抗原結合タンパク質からの抗原の解離を少なくとも 5 分間モニターした。10 mM、pH 1.5 のグリシンの短時間の注入によって捕捉された精製 V_L 抗原結合タンパク質を取り除いた。検体のセンサーグラムから緩衝液注入のセンサーグラムを差し引くことによりセンサーグラムすべてを二重参照し、それによって捕捉表面からの精製 V_L 抗原結合タンパク質の解離が原因で生じるアーチファクトを除いた。Biacore T100 評価ソフトウェア v 2.1 を用いて各精製 V_L 抗原結合タンパク質の結合データを物質移行による 1:1 の結合モデルに適合させた。表 6 は、抗原 B に特異的な市販の抗体、11 の抗原 B に特異的な精製 V_L 抗原結合タンパク質、及び対照 V I 3 動物から得た 3 つの対照抗体についての結合データを提供する。

30

40

【表 6】

表 6

V _L タンパク質/ モノクローナル抗体	ka	kd	KD	t1/2 (秒)
市販のモノク ローナル抗体	1.03E+06	5.85E-02	56.9nM	12
V _L タンパク質 1	4.82E+06	4.58E-02	9.49nM	15
V _L タンパク質 2	6.40E+05	7.43E-03	11.6nM	93
V _L タンパク質 3	IC	IC	IC	IC
V _L タンパク質 4	1.35E+06	5.98E-03	4.4nM	116
V _L タンパク質 5	1.19E+06	7.11E-03	6.0nM	97
V _L タンパク質 6	8.50E+05	7.41E-03	8.7nM	94
V _L タンパク質 7	NB	NB	NB	NB
V _L タンパク質 8	1.01E+06	4.46E-03	4.4nM	156
V _L タンパク質 9	1.04E+05	2.02E-01	1.93uM	3
V _L タンパク質 10	2.42E+06	8.10E-02	33.4nM	9
V _L タンパク質 11			≥270uM	
対照モノク ローナル抗体 1	NB	NB	NB	NB
対照モノク ローナル抗体 2			≥270uM	
対照モノク ローナル抗体 3	定常状態		6.3uM	

10

20

40

50

IC = 低シグナルのために結論の出ない 1 : 1 結合適合解析

NB = 結合しなかった

【 0 2 3 6 】

11の抗抗原Bの精製V_L抗原結合タンパク質の結合親和性は様々であったが、すべて約4.4nM~1.93μMの範囲でのKDを示した。とりわけ、11のうち7のV_L抗原結合タンパク質は約10nM以下のKDを示した。それに対して、市販の抗体は約57nMの抗原Aに対する結合親和性を有し、対照動物から単離された3つの抗体はいずれもナノモル範囲でのKDを示さなかった。低ナノモル範囲でのKDを示す精製V_L抗原結合タンパク質についてのT^{1/2}の測定値は15~156秒の間で変化した。特定の理論に束縛されることを望まないが、表6で示した精製V_L抗原結合タンパク質の結合プロファイルにおける変動、及び特に精製V_L抗原結合タンパク質の一部による低親和性または結合の欠如は、担体に連結された時のみ存在する抗原Aのエピトープを1以上のV_L抗原結合タンパク質が認識する結果であり得る。にもかかわらず、精製抗体を用いた親和性のデータは、高親和性である、クローン選択された、体細胞変異した、高効率で小分子と結合することができ、したがって治療上適切な、重鎖及び軽鎖の定常領域に連結された再構成されたヒト軽鎖可変ドメインの組み合わせ関係(表4に記載された)から生じるV_L抗原結合タンパク質に一致する。

【 0 2 3 7 】

実施例3：結合特性のプロファイリング
免疫

R & D Systemsから購入したヒトの分泌性糖タンパク質(抗原C)でKOHマウスのコホートを別々に免疫した。「Adam6/VI3」(VELOCIMMUNE(登録商標)ヒト化マウス(組み込まれたAdam6遺伝子を有する米国特許第8,642,835号及び同第8,502,018B2号を参照)、「ULC」マウス(US2011-0195454A1、US2012-0021409A1、US2012-0192300A1、US2013-0045492A1、US2013-0185821A1及

びUS2013-0302836A1を参照；その適用はその全体が参照によって本明細書に組み入れられる）、及び野生型Balb/cマウスの別々のコホートも免疫して同等の免疫応答プロファイルを提供した。

【0238】

ハプテンに結合した抗原Cを免疫原として用いてKOHマウス、Adam6/VI3マウス、ULCマウス及びBalb/cマウスを免疫した。免疫の開始に先立ってマウスから免疫前の血清を採取した。25µLの体積にて足蹠(f.p.)注射を介してアジュバントとしての10µgのCpGオリゴヌクレオチド(Invitrogen)と混合した最初の抗原刺激免疫用の2.35µgの複合体で免疫原を投与した。その後、3、6、11、13、17、20日目に合計6回、アジュバントとして10µgのCpG及び25µgのAdj-Phos(Brenntag)と共に2.35µgの各免疫原で同じ経路を介してマウスを追加免疫した。それぞれ4回目と6回目の追加免疫の後15日目と22日目にマウスから採血した。抗原Cのハプテン複合体に対する抗体力価について抗血清をアッセイした。KOHマウスについては、6回の追加免疫の完了後、マウスに4~5週間の休止期を与え、それに続いて免疫原による4回のさらなる追加免疫を投与した。マウスから採血し、抗血清力価をアッセイした。

10

【0239】

ビーズ上の抗原Cの調製及び修飾

スクリーニング用の抗原と結合したビーズを調製するために、pH6.2の0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(J.T.Baker、カタログ番号4011-01)中の0.12mLのLuminoxビーズ懸濁液(カルボキシル化マイクロスフェア、Luminox社)を、50mg/mLのEDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、Sigma、カタログ番号03449)15µL及び50mg/mLのスルホ-NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド、Pierce、カタログ番号24510)15µLの添加とそれに続く室温での10分間のインキュベーションによって活性化した。それに続いて、50mMのMES緩衝液、pH5(ACROS、カタログ番号327765000)における20µg/mLの抗原C0.5mLを活性化されたビーズに加え、1級アミンカップリング反応を2時間進め、ビーズ上の残りの反応基は、1/10体積の1Mトリス溶液、pH8(Teknova、カタログ番号T1080)の添加によってクエンチした。0.05%Tween-20(Calbiochem、カタログ番号655205)を含有するPBS(Life Technologies、カタログ番号14190-144)でビーズを洗浄し、2%w/vのBSA(Sigma、カタログ番号A4503)を含有するPBS緩衝液にて保存した。同じ方法で、陰性対照のビーズのバッチも調製した。

20

30

【0240】

抗原Cに結合させた19のビーズセットを以下の差別的抗原かく乱試薬：トリプシン、Glu-C、Asp-N、キモトリプシン、Lys-C、Arg-C、ペプシン、スルホ-NHS酢酸、EDC/エタノールアミン、TCEP/ヨードアセトアミド、PEG-5000、パパイン、サーモリシン、スブチリシン、プロテアーゼK、プロメライン、フィシン、及びH1193または7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸、スクシンイミジルエステルのもので個々に処理した。化学処理は、リン酸緩衝液(PBS)に新しく溶解した10mMの反応化学物質にてビーズセットを室温で90分間インキュベーションすることを含んだ。タンパク質分解処理は、PBSまたは他の推奨された緩衝液に新しく溶解した10~100mgの酵素にてビーズセットを室温で90分間インキュベーションすることを含んだ。追加の1つのビーズセットをPBSにて室温で90分間インキュベーションし、このビーズセットに結合させた抗原Cは未修飾のままだった。上記のインキュベーションの後、0.05%Tween20を含有するPBS(PBS-T)でビーズセットを洗浄し、5%BSAと0.02%アジ化ナトリウムを伴ったPBSにて保存した。

40

【0241】

結合タンパク質をスクリーニングするために、上述のような19の修飾された抗原ビー

50

ズ及び未修飾の対照抗原ビーズをプールした。96穴フィルタープレート(Millipore、カタログ番号MSBVN1250)の事前に水和させた各ウェルに3000のビーズを含有する75 μ Lのアリコート分配した。各抗体試料(25 μ L)を各ウェルに加え、プレート振盪器上で4にてプレートを一晩インキュベートした。2日目の朝、真空マニホールドを用いてPBS-Tでビーズを洗浄し、PBS-T中の0.2mLの1.25 μ g/mLのR-フィコエリスリンと結合したヤギ抗マウスまたはヒトIgG抗体と共にビーズを室温で45分間インキュベートすることによってビーズに結合した抗体を検出した。次いでビーズを洗浄し、0.2mLのPBS-Tに懸濁させ、Luminex蛍光分光光度計で中央値蛍光強度(MFI)を測定した。結合データを上述のような生物情報データ解析に供した。

10

【0242】

図6は、差別的抗原かく乱のエピトープのプロファイリングデータに基づいた736の抗原C結合タンパク質のクラスタの2D PCA表示を提供する。長方形により強調されたのは調べた従来の抗体とエピトープ結合の特徴を共有しない独特のエピトープのクラスタである。この独特のエピトープのピンのメンバーは、1以上の重鎖定常領域の遺伝子によってコードされた重鎖領域に操作可能に融合された1以上の軽鎖可変領域の遺伝子断片によってコードされた可変領域を有するハイブリッド免疫グロブリン鎖をコードする免疫グロブリン遺伝子座を含むマウスにて生成されたV_L抗原結合タンパク質である。

【0243】

バイオセンサー表面上の修飾された抗原Cの調製

20

標準のNHS/EDC介在性のアミンカップリング法によって分泌性糖タンパク質である抗原CをCM5バイオセンサーチップの表面に結合させる。各フローセルの表面に結合される抗原Cの量は3000~10,000RUの間である。込み合い効果を最小限にするために、好ましい結合密度は5000RU前後である。注意を払ってほぼ同一量の抗原Cを4つのフローセルすべてに結合させ、3つの修飾されたフローセルのシグナルと未修飾の対照フローセルの表面への結合の間で公平な比較を行うことができるようにする。

【0244】

6つの配列決定グレードのタンパク質分解酵素：第1のバイオセンサーチップのフローセル2、3、及び4を修飾するトリプシン、エンドプロテイナーゼGlu-C及びエンドプロテイナーゼAsp-N、並びに第2のバイオセンサーチップのフローセル2、3、及び4を修飾するキモトリプシン、エンドプロテイナーゼLys-C及びエンドプロテイナーゼArg-Cを用いて結合された各抗原C表面を修飾する。Biacore2000を2 μ L/分の流速で単一フローセルモードに設定し、0.1MのTris-HCl、pH8.0中の200 μ g/mLのトリプシン60 μ Lをフローセル2に注入する。典型的なタンパク質分解消化のプロファイルとして下向きに曲がるセンサーグラムが観察されてもよく、それはトリプシンがトリプシン消化可能な塊を特異的に除いていることを示している。安定な表面が形成されるまで同じ用量の酵素を繰り返しフローセルに注入する。トリプシン消化がフローセル2で完了すると、トリプシンと同じ緩衝液中の50 μ g/mLのエンドプロテイナーゼGlu-C60 μ Lをフローセル3に注入する。再び、安定な表面が形成されるまで同じ用量の酵素を繰り返し同じフローセルに注入する。同様の方法で、同じ緩衝液中の50 μ g/mLのエンドプロテイナーゼAsp-N60 μ Lをフローセル4に注入して安定なエンドAsp-Nで修飾した表面を創り出す。酵素処理の終了時にBiacore2000を全フローセルモードに設定する。再生緩衝液を4つの抗原Cの表面全体にわたって流し、安定な最終的な機能する表面を生成する。

30

40

【0245】

修飾された免疫グロブリン遺伝子座を有する非ヒト動物及び実施例2に記載されたような対照動物にて生成された抗原Cに特異的な結合タンパク質、ならびに抗原Cに特異的な、予め特徴づけられた市販の抗体を新しい96穴マイクロタイタープレートに移し、75 μ Lの2 \times 希釈緩衝液(20mMのHepes、pH7.4、300mMのNaCl、0.01%のP-20、40mg/mLのCMDX)と混合する。2 \times 希釈緩衝液と混合し

50

た適切な対照培地を陰性対照として使用する。

【0246】

各結合タンパク質試料を4つのフローセルすべてに注入し、各フローセルからの結合シグナル(RU)を注入の終了時に記録し、表面を再生する。各抗体試料についての結合/再生のサイクルはBiacoreの製造元によって提供される自動化Wizardプログラムによって制御される。

【0247】

同一量の抗原Cを含有する第2のチップのフローセル2、3及び4は、第1のチップの調製で上述されたのと同様の方法でそれぞれ、キモトリプシン、エンドプロテイナーゼLys-C及びエンドプロテイナーゼArg-Cによって消化される。同じセットの結合タンパク質試料を4つのフローセルすべてに注入し、その結合シグナル(RU)を第1のチップと同様の方法で回収する。

10

【0248】

標準のアルデヒドカップリングプロトコール(BIA Applications Handbook, 4.5)によって第3のCM5チップの4つのフローセルすべてに同一量の抗原Cを結合させる。各フローセル表面に結合される抗原Cの量は3000~10,000RUの間であるが、込み合い効果を最小限とするのに好適なカップリング量は5000RU前後である。構造を変性させることなく抗原Cのリジンのアミンを修飾するために、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)に溶解した5mMのスルホ-NHS-酢酸を5µL/分で20分間、フローセル2に注入する。抗原Cの任意のグルタミン酸残基及びアスパラギン酸残基の任意のカルボン酸基をその構造を変性させることなく修飾するために、H₂Oに溶解した200mMのEDCを同じ流速で7分間フローセル3に注入し、その後H₂Oに溶解した50mMのヒドラジンを7分間注入する。抗原Cの変性処理については、0.1MのTris-HCl、pH8.0に溶解した100mMのTCEPを同じ流速で20分間フローセル4に注入し、その後、0.1MのTris-HCl、pH8.0に溶解した100mMのヨードアセトアミドを注入する。処理の終了時、Biacore 2000を全フローセルモードに設定する。再生緩衝液を4つの抗原C表面すべてに3回注入して安定な最終的な機能する表面を生成する。

20

【0249】

9の修飾された抗原Cの表面及び3の未修飾の抗原Cの表面を含有する3つの別々のチップの結合データが回収される場合、9の修飾された抗原Cの表面に対する各結合タンパク質の9の応答RU値のすべては未修飾対照の値への応答比に変換される。調べた結合タンパク質調製物すべての応答データは上記で記載されたような生物情報データ解析に供される。

30

【0250】

エピトープのクラスタ分布の結果は典型的なパターン認識(非管理の)表示法によって示される。そのような表示法の1つは、結合タンパク質のクラスタ関係を樹状配置で説明する階層木(デンドログラム)である。階層木では、エピトープを共有する可能性のある結合タンパク質は相対的に短い「アーム」によって連結され、エピトープを共有しないものは相対的に長い「アーム」により連結されるであろう。

40

【0251】

エピトープマッピングによる結合タンパク質クラスタの検証

DADによって決定されるような2つの異なる機能グループ(またはクラスタまたはピン)に由来する結合タンパク質は、ELISA、競合アッセイ等のような他の方法によって検証することができる。エピトープマッピングのアッセイは通常BiacoreまたはOctetの機器によって実施される。2つの異なる機能グループに由来する抗体は同一エピトープと相互作用しないはずである。従って、一方のクラスタに由来する第1の抗体の固定化された抗原への結合は、異なるクラスタに由来する第2の抗体の結合を有意な程度には妨害しないはずである。逆に、同一クラスタに由来する抗体はそれらの抗原に結合する際、互いにほぼ完全な競合を示すはずである。

50

【0252】

DADを用いて特定された機能グループは、抗原Cの一次配列に由来するペプチドアレイによっても検証される。抗原Cの配列全体を網羅する抗原Cに由来するペプチドまたは重複するペプチドは、PVD膜上にドットアレイとして調製される、または典型的なタンパク質マイクロアレイのスライド上にプリントされる。異なる機能グループを示す結合タンパク質または同一機能グループに由来する結合タンパク質をペプチドアレイと共にインキュベートし、その後、標準のドットプロットまたはタンパク質アレイ結合を行い、染色手順を行う。同一エピトープを認識する、同一機能グループに由来する結合タンパク質は、ペプチドアレイのシートまたはスライド上で同一の、または、ほぼ同一の結合パターンを示すはずである。逆に、抗原C上の異なるエピトープを認識する、異なる機能グループに由来する結合タンパク質はペプチドアレイに対して異なる結合パターンを示すはずである。

10

【0253】

実施例4．小分子に特異的なV_L結合タンパク質の評価

実施例1～3で開示されたような抗原A、抗原B及び抗原Cに対して生成されたV_L結合タンパク質を構造的特徴について評価した。特に、抗原A（アルカロイド小分子；n = 132）、抗原B（ステロイド小分子；n = 87）または抗原C（糖タンパク質高分子；n = 61）に特異的なV_L結合タンパク質のハイブリッド鎖及び軽鎖のCDR3の長さを決定した。表7は、抗原A、抗原Bまたは抗原Cに特異的なV_L結合タンパク質に由来する6、7、8、9、10、11または12のCDR3のアミノ酸の長さを有するハイブリッド鎖の数を示す。表8は同じV_L結合タンパク質に由来する7、8、9または10のCDR3のアミノ酸の長さを有する軽鎖の数を示す。図7は棒グラフ形式でこのデータを提供する。

20

【表7】

表7

CDR3の長さ	抗原A	抗原B	抗原C	合計
6	3	38		41
7	2		6	8
8	1			1
9	31	17		48
10	94		45	139
11	1	30	10	41
12		2		2

30

【表8】

表8

CDR3の長さ	抗原A	抗原B	抗原C	合計
7	2		1	3
8	9	1	1	11
9	98	86	48	232
10	23		11	34

40

【0254】

V_L結合タンパク質の軽鎖におけるCDR3の長さは抗原特異性にかかわらず、一貫して約9アミノ酸であった。それに対して、評価されたV_L結合タンパク質のハイブリッド鎖におけるCDR3の長さは、特に小分子に特異的なV_L結合タンパク質についてさらに可変性であった。糖タンパク質である抗原Cに特異的なV_L結合タンパク質のハイブリッド鎖は約10～11アミノ酸長のCDR3の長さを有し、いくつかは10未満のアミノ酸を有した。それに対して、小分子、たとえば、抗原Aまたは抗原Bに特異的なV_L結合タ

50

ンパク質に由来するハイブリッド鎖のCDR3は10未満のアミノ酸長である可能性が高い。抗原Bに特異的なV_L結合タンパク質の半分弱(約40%)は6アミノ酸のCDR3の長さを有した。

【0255】

総合すれば、これらの実施例は、本明細書で記載されるようなV_L抗原結合タンパク質を産生するように遺伝子操作された非ヒト動物、たとえば、特に齧歯類及びマウスが、通常の抗体によって示されない結合特性、たとえば、従来抗体による結合に上手く適合していない小分子上の新規のパラトープまたは結合表面の使用を多分介して高親和性で小分子と結合する能力を示す抗原特異的なV_L抗原結合タンパク質の効率的な生成のための頑強な生体内の系を提供することを明らかにしている。

10

【0256】

同等物

本発明の少なくとも一実施形態の幾つかの態様をこうして記載したが、種々の変更、改変及び改善が容易に当業者に想到することが当業者によって十分に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、本発明の精神及び範囲内にあることが意図される。従って、前述の記載及び図面は例示のみの目的であり、本発明は後に続くクレームによって詳細に記載される。

【0257】

本発明のいずれもの実施形態または態様は、具体的な除外が明細書に記されるかどうかにかかわらず、クレームから明白に除外できることも理解されるべきである。

20

【0258】

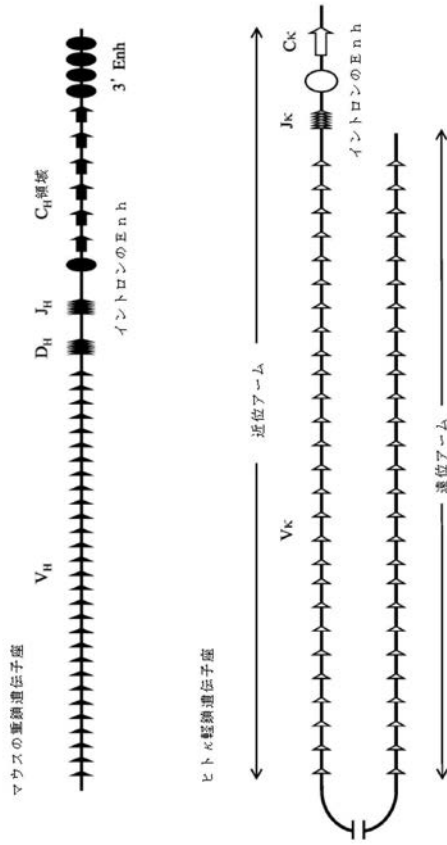
当業者は、本明細書で記載されるアッセイまたは他のプロセスで得られた値に起因する典型的な標準偏差または標準誤差を十分に理解するであろう。

【0259】

本発明の背景を記載するのに及びその実践に関する追加の詳細を提供するのに本明細書で参照される出版物、ウェブサイト及び他の参照資料は参照によって本明細書に組み入れられる。

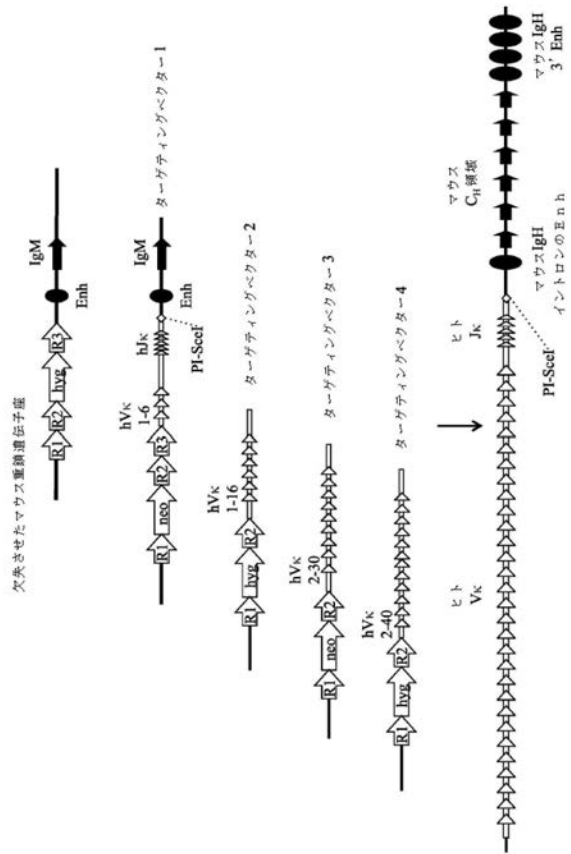
【 図 1 】

【 図 1 】



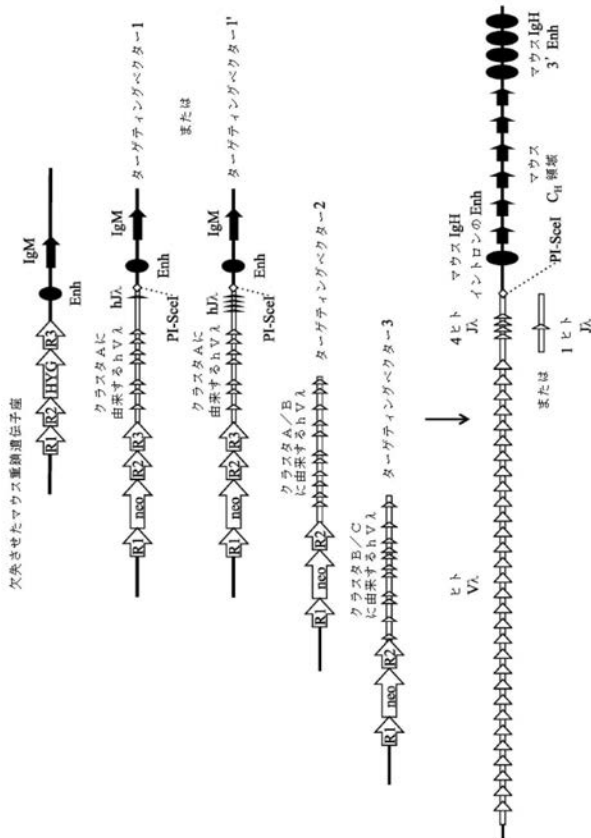
【 図 2 】

【 図 2 】



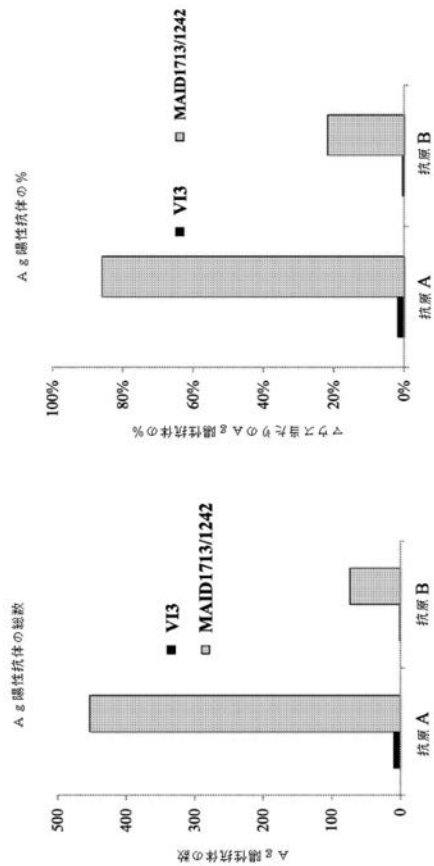
【 図 3 】

【 図 3 】



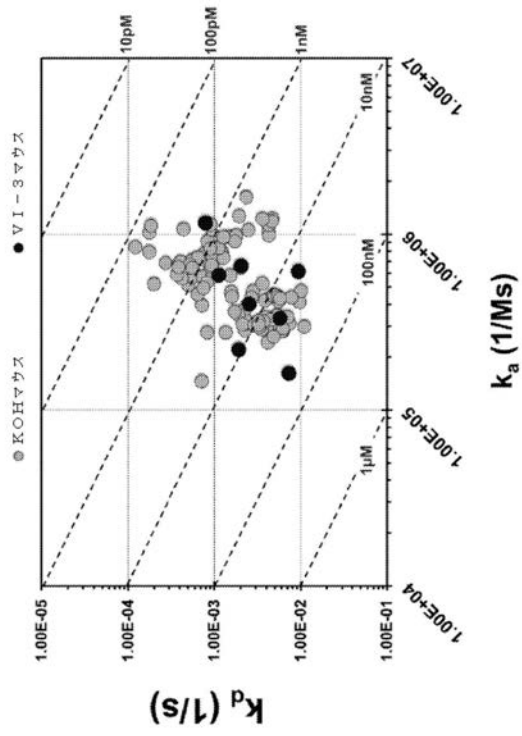
【 図 4 】

【 図 4 】



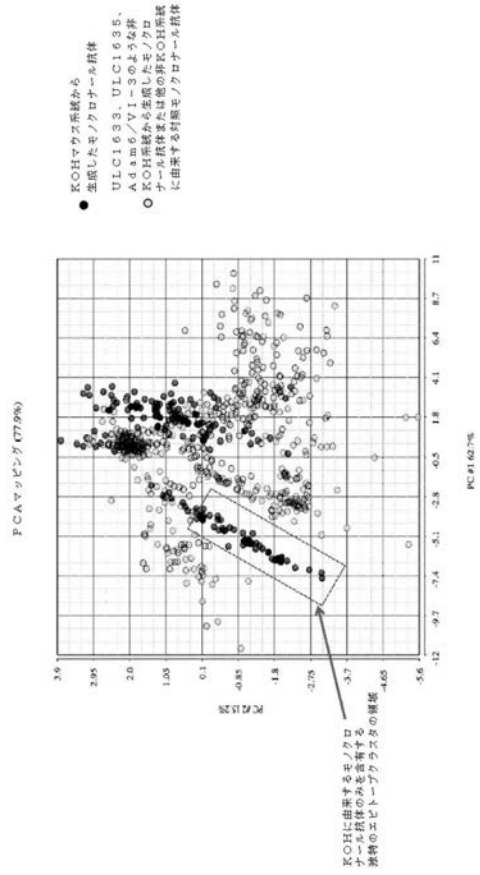
【 図 5 】

【 図 5 】



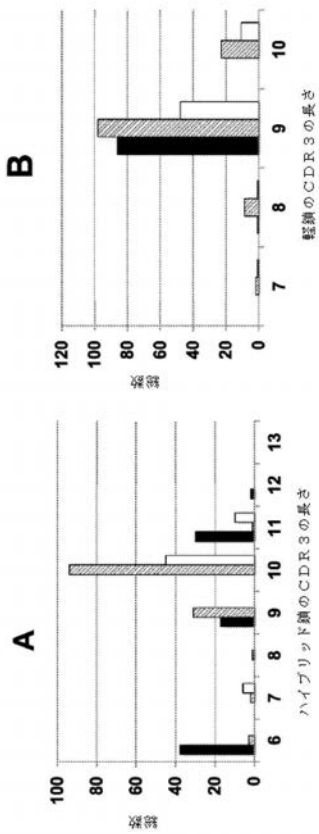
【 図 6 】

【 図 6 】



【 図 7 】

【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/021884

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/44 A01K67/00 C12N15/13 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A01K		
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) EP0-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOSHE GAVISH ET AL: "Comparison of the fine specificity of anti-dinitrophenyl-combining site composed of either VL dimer or VL and VH of protein 315", BIOCHEMISTRY, vol. 16, no. 14, 1 July 1977 (1977-07-01), pages 3154-3159, XP055197694, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00633a018	1-3, 19
Y	page 3157 - page 3158; tables 1,2 abstract ----- -/--	3-10
<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 :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 30 September 2015		Date of mailing of the international search report 13/10/2015
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 Saame, Tina

5

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/021884**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/021884

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/018764 A1 (REGENERON PHARMA [US]; MACDONALD LYNN [US]; STEVENS SEAN [US]; GURER C) 9 February 2012 (2012-02-09) cited in the application	11-31
Y	paragraphs [0011], [0020], [0077]; claims 1, 8, 11, 12, 15-18.; example 5 abstract	3-10
A	----- CHANG C-H ET AL: "NOVEL ARRANGEMENT OF IMMUNOGLOBULIN VARIABLE DOMAINS X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS OF THE LAMBDA-CHAIN DIMER BENCE-JONES PROTEIN LOC", BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 24, no. 18, 1 January 1985 (1985-01-01), pages 4890-4897, XP009056415, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/BI00339A025 the whole document	1-10
X	----- JUAN C ALMAGRO: "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, HEYDEN & SON LTD., LONDON, GB, vol. 17, no. 2, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 132-143, XP008147555, ISSN: 0952-3499, DOI: DOI: 10.1002/JMR.659 [retrieved on 2004-02-25] figure 1	19
X	----- WO 2012/116927 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; BOSSENMAIER BIRGIT [DE]; KETTENBERGER HUBERT []) 7 September 2012 (2012-09-07) figure 1	23-31
X	----- WO 2012/116926 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; BOSSENMAIER BIRGIT [DE]; KETTENBERGER HUBERT []) 7 September 2012 (2012-09-07) figure 1	23-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/021884

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012018764 A1	09-02-2012	AU 2011285919 A1	28-02-2013
		CA 2807282 A1	09-02-2012
		CN 103154255 A	12-06-2013
		EP 2601298 A1	12-06-2013
		JP 2013535213 A	12-09-2013
		KR 20130100277 A	10-09-2013
		NZ 606824 A	29-05-2015
		RU 2013109068 A	10-09-2014
		SG 187673 A1	28-03-2013
		US 2012096572 A1	19-04-2012
		US 2014130193 A1	08-05-2014
		US 2014130194 A1	08-05-2014
		WO 2012018764 A1	09-02-2012
WO 2012116927 A1	07-09-2012	AR 085403 A1	25-09-2013
		CA 2824824 A1	07-09-2012
		CN 103403025 A	20-11-2013
		EP 2681240 A1	08-01-2014
		JP 2014509199 A	17-04-2014
		KR 20130135896 A	11-12-2013
		RU 2013141078 A	10-04-2015
		US 2012237507 A1	20-09-2012
		WO 2012116927 A1	07-09-2012
		WO 2012116926 A1	07-09-2012
CA 2825081 A1	07-09-2012		
CN 103502271 A	08-01-2014		
EP 2681239 A1	08-01-2014		
JP 5764677 B2	19-08-2015		
JP 2014509198 A	17-04-2014		
KR 20130111638 A	10-10-2013		
RU 2013141077 A	10-04-2015		
US 2012237506 A1	20-09-2012		
WO 2012116926 A1	07-09-2012		

International Application No. PCT/ US2015/ 021884

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10

An antigen-binding protein comprising a first and a second immunoglobulin light chain variable domain wherein the first and the second immunoglobulin light chain variable domains are associated to form a binding pocket that specifically binds a small molecule;

2. claims: 11-22

A method of producing a VL antigen binding protein that specifically binds a small molecule comprising the step(s) of (a) immunizing a genetically modified non-human animal with the small molecule wherein the genetically modified non-human animal comprises (i) unrearranged human immunoglobulin VL and JL gene segments operably linked to a non-human CH nucleic acid sequence and (ii) unrearranged human immunoglobulin VL and JL gene segments operably linked to a non-human CL nucleic acid sequence and (b) isolating a cell or VL antigen binding protein from the animal; hybridomas produced from such cells; nucleic acids encoding variable domains of VL antigen binding proteins obtained by such a method; the genetically modified non-human animal used in said method;

3. claims: 23-31

A method of comparing the binding characteristics of conventional antibodies with VL antigen binding proteins wherein the VL antigen binding proteins comprise a hybrid immunoglobulin chain comprising a variable domain derived from one or more light chain variable region gene segments and a constant domain derived from one or more heavy chain constant region gene segments;

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)		C 0 7 K 16/46		
G 0 1 N 33/531 (2006.01)		G 0 1 N 33/531	A	

(81)指定国 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, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, NE, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 バブ, ロバート
 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 ミル リバー
 ロード 777, 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 ラフィク, アシク
 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 ミル リバー
 ロード 777, 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 ファン, タミー ティー.
 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 ミル リバー
 ロード 777, 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 シー, エアガング
 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 ミル リバー
 ロード 777, 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 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
 ロード 777, 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 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
 ロード 777, 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) 4B065 AA90X AA90Y AB02 BA02 BA08 CA25
 4H045 AA11 AA20 BA41 CA40 DA75 FA72 FA74

专利名称(译)	VL抗原结合蛋白显示出不同的结合特性		
公开(公告)号	JP2017510273A	公开(公告)日	2017-04-13
申请号	JP2016558391	申请日	2015-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	再生元医药公司		
申请(专利权)人(译)	Regeneron公司制药公司		
[标]发明人	バブロバート ラフィクアシク ファンタミーティー シーエアガング マクドナルドリン マーフィーアンドリュージェイ		
发明人	バブ, ロバート ラフィク, アシク ファン, タミー ティー. シー, エアガング マクドナルド, リン マーフィー, アンドリュージェイ.		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 C12N5/10 C12N5/12 C07K16/00 C07K16/46 G01N33/531		
CPC分类号	A01K67/0278 A01K2217/072 A01K2227/105 A01K2267/01 C07K16/00 C07K16/44 C07K2317/21 C07K2317/515 C07K2317/569 C07K2317/62 C07K2317/92 C12N15/8509 G01N33/6854 A01K67/0275 C07K2317/20		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C12N5/10 C12N5/12 C07K16/00 C07K16/46 G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/968896 2014-03-21 US 62/079078 2014-11-13 US 62/088117 2014-12-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了制备, 鉴定, 分离和/或制备结合蛋白的方法, 所述蛋白含有免疫球蛋白轻链可变结构域, 包括与重链恒定区融合的体细胞高变化轻链可变结构域。还提供了对小分子特异的示例性结合蛋白。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 6 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/12 (2006.01)	C 1 2 N 5/12	
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-558391 (P2016-558391)	(71) 出願人	597160510
(86) (22) 出願日	平成27年3月20日 (2015.3.20)		
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月21日 (2016.9.21)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/021884		
(87) 国際公開番号	W02015/143406		
(87) 国際公開日	平成27年9月24日 (2015.9.24)		
(31) 優先権主張番号	61/968,896		
(32) 優先日	平成26年3月21日 (2014.3.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	62/079,078		
(32) 優先日	平成26年11月13日 (2014.11.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀敏 100113413
(31) 優先権主張番号	62/088,117		
(32) 優先日	平成26年12月5日 (2014.12.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】異なる結合特性を示すV L抗原結合タンパク質