



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2018128915, 15.03.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

16.03.2012 US 61/611,950;

16.03.2012 US 61/612,126;

13.12.2012 US 61/736,930;

20.03.2012 US 61/613,352

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:

2014141307 14.10.2014

(43) Дата публикации заявки: 18.02.2019 Бюл. №  
05

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский бульвар, д. 11,  
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк."

(71) Заявитель(и):

**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**МАКВИРТЕР Джон (US),  
МАКДОНАЛД Линн (US),  
МАРТИН Джоель Х. (US),  
МЕРФИ Эндрю Джей. (US)****(54) ОТЛИЧНЫЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА ЖИВОТНЫЕ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К  
pH ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ****(57) Формула изобретения**

1. Способ выделения вариабельного домена иммуноглобулина, содержащего аминокислоту гистидин, кодируемую из зародышевой линии животного и/или кодирующую ее нуклеиновую кислоту включающий:

выделение лимфоцита из генетически модифицированного грызуна, при этом грызун

(i) содержит в своей зародышевой линии локус иммуноглобулина, который содержит нереаранжированную последовательность вариабельного гена иммуноглобулина, содержащую в последовательности, кодирующей определяющую комплементарность область 3 (CDR3) замену по меньшей мере одного негистидинового кодона на гистидиновый кодон или вставку по меньшей мере одного гистидинового кодона, где замещенный или вставленный гистидиновый кодон не кодируется соответствующим генным сегментом дикого типа,

(ii) экспрессирует нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен иммуноглобулина, который содержит в определяющей комплементарность области 3 (CDR3) аминокислоту гистидин, полученную путем замены по меньшей мере одного негистидинового кодона или вставки по меньшей мере одного гистидинового кодона в нереаранжированную последовательность вариабельного гена иммуноглобулина, и

(iii) представляет собой крысу или мышь, и

(iv) при этом лимфоцит включает (1) антитело, которое содержит вариабельный

домен иммуноглобулина, содержащий в CDR3 аминокислоту гистидин, полученную путем замены или вставки гистидина и (2) нуклеиновую кислоту, содержащую реаранжированную переменную область гена, который кодирует переменный домен.

2. Способ по п.1, причем грызун содержит первый и второй переменный локус иммуноглобулина, причем по меньшей мере первый или второй переменный локус иммуноглобулина содержит неаранжированную последовательность переменной области гена иммуноглобулина, содержащую в последовательности, кодирующей определяющую комплементарность область 3 (CDR3) вставку по меньшей мере одного гистидинового кодона или замену по меньшей мере одного негистидинового кодона на гистидиновый кодон.

3. Способ по п.2, где как первый, так и второй переменный локус иммуноглобулина каждый содержат неаранжированную последовательность переменной области гена иммуноглобулина, содержащую в последовательности, кодирующей определяющую комплементарность область 3 (CDR3) замену по меньшей мере одного негистидинового кодона на гистидиновый кодон или вставку по меньшей мере одного гистидинового кодона.

4. Способ по п.2, где первый переменный локус иммуноглобулина содержит по меньшей мере функциональную часть неаранжированной последовательности переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую неаранжированные генные сегменты  $V_H$ ,  $D_H$  и  $J_H$ .

5. Способ по п.4, где неаранжированная переменная генная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина содержит по меньшей мере часть генной последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина человека, содержащую неаранжированные генные сегменты  $V_H$ ,  $D_H$  и  $J_H$ .

6. Способ по п.4, где неаранжированная переменная генная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой генную последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина человека, содержащую неаранжированные сегменты  $V$ , синтетический сегмент  $D$ , который содержит линкер, и сегмент  $J$  человека.

7. Способ по п.6, где синтетический сегмент  $D$  содержит по меньшей мере один гистидиновый кодон.

8. Способ по п.2, где второй переменный локус иммуноглобулина содержит по меньшей мере функциональную часть неаранжированной последовательности переменной области легкой цепи иммуноглобулина, содержащую неаранжированные сегменты  $V_L$  и  $J_L$ .

9. Способ по п.8, где неаранжированная генная последовательность легкой цепи представляет собой неаранжированную генную последовательность легкой цепи человека, содержащую неаранжированные генные сегменты  $V_L/J_L$  человека.

10. Способ по п.2, где второй переменный локус иммуноглобулина содержит реаранжированную последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина, содержащую реаранжированную последовательность  $V_L/J_L$ .

11. Способ по п.10, где реаранжированная последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина представляет собой реаранжированную последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина человека, содержащую реаранжированную последовательность  $V_L/J_L$  человека.

12. Способ по п.1, дополнительно содержащий замену по меньшей мере одного негистидинового кодона на гистидиновый кодон и/или вставку по меньшей мере одного гистидинового кодона в последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует переменный домен иммуноглобулина, и вставленный или замещенный гистидин

A  
2  
0  
1  
8  
1  
2  
8  
9  
1  
5  
A  
R  
U

R  
U  
2  
0  
1  
8  
1  
2  
8  
9  
1  
5  
A

находится в области, выбранной из N-концевой области цепи иммуноглобулина, области петли 4 цепи иммуноглобулина, CDR1 тяжелой цепи иммуноглобулина, CDR2 тяжелой цепи иммуноглобулина, CDR1 легкой цепи иммуноглобулина, CDR2 легкой цепи иммуноглобулина и их комбинаций.

13. Способ по п.2, где по меньшей мере один из первого переменного локуса иммуноглобулина или второго переменного локуса иммуноглобулина функционально связан с эндогенной последовательностью нуклеиновой кислоты константной области грызуна в эндогенном локусе иммуноглобулина грызуна.

14. Способ по п.5, где нереаранжированная последовательность переменного гена тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая нереаранжированные сегменты  $V_H$ ,  $D_H$  и  $J_H$  человека, функционально связана с эндогенной последовательностью нуклеиновой кислоты константной области тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна.

15. Способ по п.12, где нереаранжированная последовательность переменного гена тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая нереаранжированные сегменты  $V_H$ ,  $D_H$  и  $J_H$  человека, функционально связана с эндогенной последовательностью нуклеиновой кислоты константной области тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна в эндогенном локусе иммуноглобулина грызуна.

16. Способ по п.8, где последовательность переменного гена легкой цепи иммуноглобулина, содержащая нереаранжированные сегменты  $V_L$  и  $J_L$  функционально связана с эндогенной последовательностью константной области легкой цепи иммуноглобулина грызуна.

17. Способ по п.16, где эндогенная последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина грызуна находится в эндогенном локусе иммуноглобулина грызуна.

18. Способ по п.1, где грызун представляет собой крысу.

19. Способ по п.1, где грызун представляет собой мышь.

20. Способ выделения переменного домена иммуноглобулина, содержащего аминокислоту гистидин, кодируемую из зародышевой линии животного и/или кодирующую ее нуклеиновую кислоту включающий:

выделение лимфоцита из генетически модифицированного грызуна, при этом грызун содержит:

(i) нереаранжированные сегменты  $V_H$ ,  $D_H$  и  $J_H$  человека, функционально связанные с геной последовательностью константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, причем один или несколько из сегментов  $V$ ,  $D$  и  $J$  содержат в последовательности, кодирующей определяющую комплементарность область 3 (CDR3) по меньшей мере одну замену негистидинового кодона на гистидиновый кодон или вставку по меньшей мере одного гистидинового кодона, где замещенный или вставленный гистидиновый кодон в одном или нескольких из сегментов  $V$ ,  $D$  и  $J$  нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека не кодируется соответствующим генным сегментом зародышевой линии человека; и

(ii) нереаранжированные сегменты  $V_L$  и  $J_L$  человека, функционально связанные с геной последовательностью константной области легкой цепи иммуноглобулина, причем один или несколько из сегментов  $V$  и  $J$  содержат в последовательности, кодирующей определяющую комплементарность область 3 (CDR3) по меньшей мере одну замену негистидинового кодона на гистидиновый кодон или по меньшей мере одну вставку гистидинового кодона, где замещенный или вставленный гистидиновый кодон в одном или нескольких из сегментов  $V$  и  $J$  нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи

иммуноглобулина человека не кодируется соответствующим генным сегментом зародышевой линии человека; и

причем грызун экспрессирует переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и переменный домен легкой цепи иммуноглобулина,

при этом один или оба переменных домена тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулина содержат гистидин в кодирующей определяющую комплементарность области 3 (CDR3), полученный путем замены или вставки гистидиновых кодонов в одном или нескольких из сегментов V, D и J неперестроенной последовательности нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека и/или в одном или нескольких из сегментов V и J неперестроенной последовательности нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи иммуноглобулина человека, соответственно,

при этом грызун представляет собой крысу или мышь, и

при этом лимфоцит включает (1) антитело, которое содержит переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и/или переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, содержащий в CDR3 аминокислоту гистидин, полученную путем замены или вставки гистидина и (2) нуклеиновую кислоту, содержащую перестроенную переменную область гена, который кодирует переменный домен.

21. Способ по п.20, причем грызун представляет собой крысу.

22. Способ по п.20, причем грызун представляет собой мышь.

23. Способ по п.20, причем неперестроенная последовательность нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека функционально связана с последовательностью константной области тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна.

24. Способ по п.23, где последовательность нуклеиновой кислоты константной области тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна, функционально связанная с неперестроенной последовательностью нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, находится в эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна в зародышевой линии грызуна.

25. Способ по п.20, где последовательность нуклеиновой кислоты константной области легкой цепи иммуноглобулина грызуна функционально связана с неперестроенной последовательностью нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

26. Способ по п.25, где последовательность нуклеиновой кислоты константной области легкой цепи иммуноглобулина грызуна, функционально связанная с неперестроенной последовательностью нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи иммуноглобулина человека, находится в эндогенном локусе иммуноглобулина грызуна в зародышевой линии грызуна.

27. Способ выделения переменного домена иммуноглобулина, содержащего аминокислоту гистидин, кодируемую из зародышевой линии животного и/или кодирующую ее нуклеиновую кислоту включающий:

выделение лимфоцита из генетически модифицированного грызуна, причем генетически модифицированный грызун содержит

неперестроенные сегменты V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> и J<sub>H</sub> человека, функционально связанные с генной последовательностью константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, причем один или несколько из неперестроенных сегментов V, D и J содержат в последовательности, кодирующей определяющую комплементарность область 3 (CDR3), по меньшей мере одну замену негистидинового кодона на гистидиновый кодон или вставку по меньшей мере одного гистидинового кодона, где замещенный или

A  
5  
1  
6  
8  
1  
2  
8  
9  
1  
5  
A  
R  
U

R  
U  
2  
0  
1  
8  
1  
2  
8  
9  
1  
5  
A

вставленный гистидиновый кодон в одном или нескольких из сегментов V, D и J нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека не кодируется соответствующим генным сегментом зародышевой линии человека; и

реаранжированную последовательность  $V_L/J_L$  человека, функционально связанную с генной последовательностью константной области легкой цепи иммуноглобулина, причем реаранжированная последовательность VJ содержит в определяющей комплементарности области 3 (CDR3) по меньшей мере одну замену негистидинового кодона на гистидиновый кодон или вставку по меньшей мере одного гистидинового кодона, где замещенный или вставленный гистидиновый кодон в реаранжированной последовательности VJ не кодируется соответствующим генным сегментом зародышевой линии человека;

причем грызун экспрессирует вариательный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и вариательный домен легкой цепи иммуноглобулина,

при этом один или оба вариательных домена тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулина, содержат в определяющей комплементарности области 3 (CDR3) гистидин, полученный путем замены или вставки по меньшей мере одного гистидинового кодона в один или несколько из сегментов V, D и J нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека и/или реаранжированной последовательности VJ, соответственно,

при этом грызун представляет собой крысу или мышь, и

при этом лимфоцит включает (1) антитело, которое содержит один или оба вариательных домена тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулина, содержит в определяющей комплементарности области 3 (CDR3) гистидин, полученный путем замены или вставки по меньшей мере одного гистидинового кодона в один или несколько из сегментов V, D и J нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека и/или реаранжированной последовательности VJ, соответственно (2) нуклеиновую кислоту, содержащую реаранжированную вариательную область гена, который кодирует вариательный домен.

28. Способ по п.27, где грызун представляет собой крысу.

29. Способ по п.27, где грызун представляет собой мышь.

30. Способ по п.27, где нереаранжированная последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека функционально связана с последовательностью константной области тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна.

31. Способ по п.30, где последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна, функционально связанная с нереаранжированной последовательностью нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, находится в эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина грызуна в зародышевой линии грызуна.

32. Способ по п.31, где последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина грызуна функционально связана с реаранжированной последовательностью нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи иммуноглобулина человека.

33. Способ по п.32, где последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина грызуна, функционально связанная с реаранжированной последовательностью нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи иммуноглобулина человека, расположена в эндогенном локусе легкой цепи

RU 2018128915 A

RU 2018128915 A

иммуноглобулина грызуна в зародышевой линии грызуна.

34. Способ по п. 1 для получения переменных областей тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулина, имеющих аминокислоту гистидин, кодируемую из зародышевой линии генетически модифицированного грызуна, причем грызун содержит популяцию В-клеток, которая характеризуется повышенным наличием остатков гистидина в цепях иммуноглобулина в популяции В-клеток, по сравнению с грызуном дикого типа, при этом повышенное количество остатков гистидина кодируются за счет замены или вставки гистидиновых кодонов, которые не кодируются соответствующими генными последовательностями.

35. Способ по п.34, где повышение представляет собой повышение приблизительно в 2-4 раза.

36. Способ по п.34, где повышение представляет собой повышение приблизительно в 2-10 раз.

37. Способ по п. 1 для получения переменных областей, имеющих аминокислоту гистидин, кодируемую из зародышевой линии генетически модифицированного грызуна, который экспрессирует цепи иммуноглобулина, которые содержат гистидины, кодируемые заменами и/или вставками в эндогенные последовательности иммуноглобулина зародышевой линии грызуна.

38. Способ по п.1, где последовательность переменной области иммуноглобулина в переменной локусе иммуноглобулина содержит 2, 3, 4 или 5 гистидинов, которые представляют собой замены гистидиновым кодоном негистидинового кодона и/или вставки гистидиновых кодонов.

39. Способ по п.5, где перестроенная последовательность переменного гена тяжелой цепи иммуноглобулина содержит генные сегменты D, которые инвертированы по отношению к направлению ориентации генной последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина.

40. Способ по любому из пп. 1-39 дополнительно содержащий стадию получения гибридомы из собранных лимфоцитов.

41. Способ по любому из пп. 1-40 дополнительно содержащий в качестве последних стадии:

получение из собранного лимфоцита или полученной из него гибридомы первой нуклеотидной последовательности, которая кодирует переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который сохраняет по меньшей мере одну аминокислоту гистидин, полученную путем замены или вставки гистидинового кодона в геном зародышевой линии и/или второй нуклеотидной последовательности, которая кодирует переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, который сохраняет по меньшей мере одну аминокислоту гистидин, полученную путем замены или вставки гистидинового кодона в геном зародышевой линии; и

экспрессию в клетке первой нуклеиновой кислоты, функционально связанной с геном константной области тяжелой цепи человека и/или второй нуклеиновой кислоты, функционально связанной с геном константной области легкой цепи человека,

где первая нуклеиновая кислота содержит последовательность, идентичную или по существу идентичную первой нуклеотидной последовательности, и

где вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, идентичную или по существу идентичную второй нуклеотидной последовательности.

42. Гибридома, полученная способом по п.40.

43. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, идентичную или по существу идентичную первой нуклеотидной последовательности или второй нуклеотидной последовательности, полученной способом по п.41.

44. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.41.

45. Варибельный домен иммуноглобулина, произведенный клеткой, полученной по любому из пп.1-39, гибридомой по п.40 или клеткой по п.44.

46. Лимфоцит, выделенный способом по любому из пп.1-39.

R U 2 0 1 8 1 2 8 9 1 5 A

R U 2 0 1 8 1 2 8 9 1 5 A