



(21)申請案號：108110132 (22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A01K67/027 (2006.01)
 C07K16/06 (2006.01) C12N5/12 (2006.01)
 C12N5/0783 (2010.01) C12N15/85 (2006.01)

(30)優先權：2018/03/24 美國 62/647,720
 2018/03/24 美國 62/647,724

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
 美國

(72)發明人：墨菲 安德魯 MURPHY, ANDREW J. (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

(56)參考文獻：

CN 104202971B	CN 107072184A
CN 107438622A	US 20070054262A1

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：40 項 圖式數：5 共 140 頁

(54)名稱

用於產生抗肽-MHC 複合物之治療性抗體的經基因修飾的非人類動物、其製法與用途

(57)摘要

一種非人類動物經基因修飾具有編碼人類或人類化 MHC 分子或相關分子(例如 $\beta 2$ 微球蛋白)之序列，且由該非人類動物表現該序列誘導對衍生該人類或人類 MHC 分子之對應人類 HLA 的耐受性。當對應人類 HLA 呈現針對該非人類動物具有抗原性的肽時，由此等非人類動物展現之該耐受性允許此等動物產生針對此類 HLA 之特異性抗體反應。特異性地靶向所關注之 pMHC 複合物而不結合於該 MHC 分子之此抗體反應可適用於靶向提供該相互作用之特異性的免疫突觸之組分的免疫治療模式中。

A non-human animal is genetically modified with sequence encoding a human or humanized MHC molecule or associated molecule, e.g., $\beta 2$ microglobulin, and expression of the sequence by the non-human animal induces tolerance to the corresponding human HLA from which the human or human MHC molecule is derived. The tolerance exhibited by these non-human animals allows these animals to generate specific antibody responses to the corresponding human HLA when such HLA is presenting a peptide that is antigenic to the non-human animal. Such an antibody response, which specifically targets a pMHC complex of interest without binding to the MHC molecule may be useful in immunotherapeutic modalities that target a component of the immunological synapse which provides the specificity of that interaction.

指定代表圖：

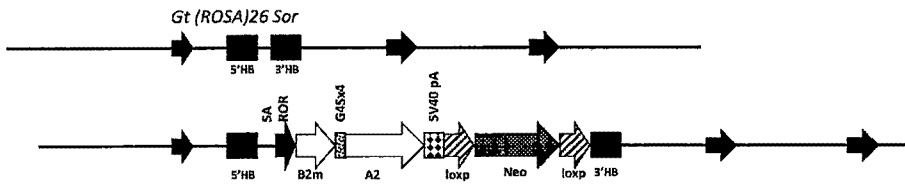


圖 2

發明摘要

- 【中文發明名稱】 用於產生抗肽-MHC複合物之治療性抗體的經基因修飾的非人類動物、其製法與用途
- 【英文發明名稱】 GENETICALLY MODIFIED NON-HUMAN ANIMALS FOR GENERATING THERAPEUTIC ANTIBODIES AGAINST PEPTIDE-MHC COMPLEXES, METHODS OF MAKING AND USES THEREOF

【中文】

一種非人類動物經基因修飾具有編碼人類或人類化 MHC 分子或相關分子(例如 $\beta 2$ 微球蛋白)之序列，且由該非人類動物表現該序列誘導對衍生該人類或人類 MHC 分子之對應人類 HLA 的耐受性。當對應人類 HLA 呈現針對該非人類動物具有抗原性的肽時，由此等非人類動物展現之該耐受性允許此等動物產生針對此類 HLA 之特異性抗體反應。特異性地靶向所關注之 pMHC 複合物而不結合於該 MHC 分子之此抗體反應可適用於靶向提供該相互作用之特異性的免疫突觸之組分的免疫治療模式中。

【英文】

A non-human animal is genetically modified with sequence encoding a human or humanized MHC molecule or associated molecule, e.g., $\beta 2$ microglobulin, and expression of the sequence by the non-human animal induces tolerance to the corresponding human HLA from which the human or human MHC molecule is derived. The tolerance exhibited by these non-human animals allows these animals to generate specific antibody responses to the corresponding human HLA when such HLA is presenting a peptide that is antigenic to the non-human animal. Such an antibody

response, which specifically targets a pMHC complex of interest without binding to the MHC molecule may be useful in immunotherapeutic modalities that target a component of the immunological synapse which provides the specificity of that interaction.

【指定代表圖】 圖2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於產生抗肽-MHC複合物之治療性抗體的經基因修飾的非人類動物、其製法與用途

【英文發明名稱】 GENETICALLY MODIFIED NON-HUMAN ANIMALS FOR GENERATING THERAPEUTIC ANTIBODIES AGAINST PEPTIDE-MHC COMPLEXES, METHODS OF MAKING AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本文中揭示經基因修飾之非人類動物(例如，嚙齒類動物(例如，大鼠、小鼠等))，其對人類(化)MHC 分子(例如，但不限於空人類(化)MHC 分子)或其肽結合部分(例如，MHC 分子之肽結合溝)耐受，以使得該非人類動物在其呈現對非人類動物而言為外源的肽(例如與對非人類動物而言為外源的肽複合)時(例如在其為肽/MHC (pMHC)複合物之部分時)可對人類(化) MHC 分子產生穩固的 B 細胞反應，其中該肽與該非人類動物係異源的。此類動物可適用於產生針對致病性 pMHC 複合物之治療性抗原結合蛋白，例如在人類 HLA 之背景中呈現的人類自身免疫原性肽。

【相關申請案】

【0002】 本申請案主張 2018 年 3 月 24 日申請之美國臨時專利申請案第 62/647,720 號及 2018 年 3 月 24 日申請之美國臨時專利申請案第 62/647,724 號之優先權權益，其中每一者皆以全文引用之方式併入本文中。

【先前技術】

【0003】 儘管 T 細胞在自適應抗感染或抗腫瘤反應中發揮重要作用，但其亦在不適應免疫反應，諸如自體免疫性及移植排斥反應中發

揮作用。一般而言，T 細胞介導之免疫反應涉及 T 細胞與抗原呈現細胞(APC)之間的緊密接觸。若干分子之配對涉及觸發 T 細胞活性之免疫突觸之形成，包括(但不限於) (a) T 細胞上之 T 細胞受體(TCR)，其特異性地結合於 APC 上之主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex; MHC)分子之肽結合溝中呈現的肽，及(b) (T 細胞上之)CD28，其與 APC 上之 B7 分子配對。TCR 連同 CD3 分子形成 TCR 複合物，且在 TCR 與肽 MHC (pMHC)複合物配對後，經由 CD3 發送信號。經由 T 細胞上之 TCR 複合物及 CD28 兩者之信號傳導使得 T 細胞活化。

【0004】 治療疾病之免疫治療途徑起作用以調節活體內 T 細胞活性，例如下調自體免疫及移植排斥反應等。然而，此類方法通常缺乏特異性，此係因為許多免疫療法藉由 TCR 複合物結合 CD3 及/或共刺激分子配對等靶向信號傳導。此類途徑通常產生非所需副作用，例如高度活化的免疫反應或全身性免疫抑止。因此，利用 TCR 與 pMHC 複合物之間的特有相互作用的治療可提供調節特異性 T 細胞活體內之活性的能力，且提供基於 T 細胞調節之新治療。

【發明內容】

【0005】 揭示經基因修飾且針對人類 HLA 分子及/或 $\beta 2$ 微球蛋白耐受以及能夠產生人類或人類化抗體之非人類動物(例如，哺乳動物，例如啮齒類動物，例如或小鼠)。(1)此等非人類動物對人類 HLA 分子之耐受性及(2)此等非人類動物提供人類化抗原結合蛋白之能力兩者使其能夠用作細胞分離的獨特平台，該平台可適用於例如同種異體反應之活體外研究，及/或用於產生特異性地結合於所關注之肽-MHC 複合物的人類或人類化抗原結合蛋白，該等抗原結合蛋白獨特地成為適用的治療劑。因此，本文亦提供製造且使用本文中揭示之非人類動物，及自其分離之細胞、組織、核酸及抗原結合蛋白的方法。

【0006】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包含(a)編碼人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列，及(b)(未)

重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座，視情況其中(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排，其中經基因修飾之非人類動物表現人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分，其中經基因修飾之非人類動物表現包含人類或人類化重鏈可變域及/或人類或人類化輕鏈可變域之免疫球蛋白，且其中非人類動物對人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分耐受以使得其在免疫接種抗原肽-MHC (pMHC)複合物時產生特異性 B 細胞反應，該抗原肽-MHC 複合物包含(i)與非人類動物異源的肽，其與(ii)衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子或其部分複合。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物進一步包含抗原肽-MHC (pMHC)複合物，該抗原肽-MHC 複合物包含與衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子締合的與非人類動物為異源之肽。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物進一步包含(c)抗原肽-MHC (pMHC)複合物，其包含(i)與非人類動物異源之肽，其與(ii)衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子或其部分締合；及(d)人類或人類化抗原結合蛋白，其特異性地結合抗原 pMHC 且不結合衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子。

【0007】 在一些具體例中，人類或人類化 MHC 分子選自由以下組成之群：人類或人類化 MHC I 類分子、人類或人類化 MHC II 類 α 分子、人類或人類化 MHC II 類 β 分子或其任何組合。在一些具體例中，人類或人類化 MHC 分子為人類或人類化 MHC I 類分子。在一些具體例中，人類或人類化 MHC 分子衍生自選自由以下組成之群的 HLA I 類分子：HLA-A 分子、HLA-B 分子、HLA-C 分子及其任何組合。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在其基因組中進一步包含編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列，視情況位於內源性 $\beta 2$ 微球蛋白基因座，其中非人類動物表現人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白以使得非人類動物本身或與人類或人類化 I 類分子締合對 $\beta 2$ 微球蛋白耐受。

【0008】 在一些具體例中，人類或人類化 MHC 分子為人類或人類化 MHC II 類分子，視情況其中人類或人類化 MHC 分子衍生自選自由以下組成之群的 HLA II 類分子之 α 及/或 β 鏈，或至少肽結合溝：HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR 分子及其任何組合。

【0009】 在一些具體例中，人類或 MHC 分子為人類 HLA 分子。在一些具體例中，非人類動物在內源性 MHC 基因座處包含編碼人類 HLA 分子之核苷酸序列，視情況其中核苷酸序列替換編碼內源性 MHC 分子之內源性核酸序列。在一些具體例中，非人類動物在異位基因座處包含編碼人類 HLA 分子之核苷酸序列。在一些具體例中，非人類動物在 ROSA26 基因座處包含編碼人類 HLA 分子之核苷酸序列。在一些具體例中，非人類動物對於內源性 MHC 基因座、異位基因座或 ROSA26 基因座處之核苷酸序列為純合的。在一些具體例中，非人類動物對於內源性 MHC 基因座、異位基因座或 ROSA26 基因座處之核苷酸序列為異型組合的。

【0010】 在一些具體例中，人類或人類化 MHC 分子為人類化(例如嵌合) MHC 分子。在一些具體例中，非人類動物在內源性 MHC 基因座處包含編碼嵌合 MHC 分子之核苷酸序列，視情況其中核苷酸序列替換編碼內源性 MHC 分子之內源性核酸序列。在一些具體例中，非人類動物在異位基因座處包含編碼嵌合 MHC 分子之核苷酸序列。在一些具體例中，非人類動物在 ROSA26 基因座處包含編碼嵌合 MHC 分子之核苷酸序列。在一些具體例中，非人類動物對於內源性 MHC 基因座、異位基因座或 ROSA26 基因座處之編碼嵌合 MHC 分子的核苷酸序列為純合的。在一些具體例中，非人類動物對於內源性 MHC 基因座、異位基因座或 ROSA26 基因座處之編碼嵌合 MHC 分子的核苷酸序列為異型組合的。

【0011】 在一些具體例中，核苷酸序列編碼嵌合人類/非人類 MHC 分子，該嵌合人類/非人類 MHC 分子包含可操作地連接至內源性 MHC 分子之跨膜及細胞質域的人類 HLA 分子之細胞外域。在一些具體例中，核苷酸序列編碼(i)嵌合人類/非人類 MHC I 類分子，其包含可

操作地連接至內源性非人類 MHC 類分子(諸如內源性鼠類 H-2K 多肽、內源性鼠類 H-2D 多肽或內源性鼠類 H-DL 多肽)之跨膜及細胞質域的選自由 HLA-A、HLA-B 及 HLA-C 組成之群的人類 MHC I 類分子之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 結構域；及/或(ii)嵌合人類/非人類 MHC II 類分子，其包含可操作地連接至內源性非人類 MHC II 類 α 分子(諸如內源性鼠類 H-2A α 多肽或內源性鼠類 H-2E α 多肽)之跨膜及細胞質的人類 HLA II 類 α 多肽之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域，及/或可操作地連接至內源性非人類 MHC II 類 β 分子(諸如內源性鼠類 H-2A α 多肽或內源性鼠類 H-2E α 多肽)跨膜及細胞質域的人類 HLA I 類 β 多肽之 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 結構域。

【0012】 在一些具體例中，編碼人類或人類化 MHC 分子之核苷酸序列不破壞內源性非人類 MHC 基因座。在一些具體例中，編碼人類或人類化 MHC 分子之核苷酸序列經整合至內源性 MHC 基因座外部的基因座中。在一些具體例中，此整合不破壞任何其他內源性基因之功能性。在一個具體例中，核苷酸序列置放於內源性 ROSA26 基因座中。

【0013】 在一些具體例中，非人類動物對於編碼人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列為異型組合的。

【0014】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性重鏈基因座處包含可操作連接至內源性重鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性重鏈基因座處包含可操作連接至內源性重鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)重鏈可變區。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性重鏈基因座處包含共同的重鏈編碼序列。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性重鏈基因座處包含可操作連接至內源性重鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性重鏈基因座處包含僅重鏈免疫球蛋白編碼序列。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性重鏈基因座處包含編碼雜合免疫球蛋白鏈之未經重排人類(化)雜合重鏈序列。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性輕鏈基因座處包含可操作連接至內源性輕鏈恆定區之未經

重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性輕鏈基因座處包含共同的輕鏈編碼序列。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性輕鏈基因座處包含可操作連接至內源性輕鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性輕鏈基因座處包含可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在內源性輕鏈基因座處包含可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之經重排人類(化)輕鏈可變區。

【0015】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包含功能性 ADAM6 基因，視情況其中功能性 ADAM6 基因為內源性 ADAM6 基因。

【0016】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物表現外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)基因。

【0017】 在一些具體例中，一種製造如前述技術項中任一項之經基因修飾之非人類動物的方法包含修飾非人類動物之基因組以包含(a)編碼人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列，及(b)(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座，視情況其中(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排，其中經基因修飾之非人類動物對人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分耐受以使得其在免疫接種肽-MHC 複合物時產生特異性 B 細胞反應，該肽-MHC 複合物包含(i)與非人類動物異源之肽，其與(ii)衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子或其部分複合，且能夠提供包含人類或人類化重鏈可變域及/或人類或人類化輕鏈可變域之人類或人類化抗原結合蛋白。在一些具體例中，該方法包含

(a)

(i) 將編碼人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列插入至第一異位基因座中，或

(ii) 在內源性非人類動物 MHC I 基因座處藉由編碼人類(化) MHC I 多肽之核苷酸序列替換編碼非人類動物 MHC I 多肽之核苷酸序列及/或在內源性非人類動物 MHC II 基因座處藉由編碼人類(化) MHC II 分子之核苷酸序列替換編碼非人類動物 MHC II 分子之核苷酸序列，

視情況其中人類(化) MHC I 分子包含人類 MHC I 之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 結構域及內源性非人類 MHC I 多肽之至少跨膜及細胞質域，

視情況其中人類(化) MHC II 分子包含人類 MHC II 之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 結構域及內源性嚙齒類動物 MHC II 多肽之至少跨膜及細胞質域，及

(b)

(i) 將(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座插入至第二異位基因座中或

(ii) 替換

(A) 在內源性非人類重鏈基因座處藉由未經重排人類免疫球蛋白可變(V_H)基因區段替換內源性非人類免疫球蛋白可變(V_H)基因區段，且視情況藉由未經重排人類免疫球蛋白多樣性(D_H)基因區段及/或未經重排人類免疫球蛋白連接(J_H)基因區段分別替換內源性非人類免疫球蛋白多樣性(D_H)及/或內源性非人類連接(J_H)基因區段，其中未經重排人類 V_H 及視情況選用之 D_H 及 J_H 基因區段可操作地連接至內源性重鏈恆定區基因序列，及/或

(B) 在內源性非人類輕鏈基因座處藉由視情況經重排以形成 V_L/J_L 基因序列之人類輕鏈可變(V_L)基因區段及人類輕鏈連接(J_L)基因區段替換內源性非人類輕鏈可變(V_L)基因區段及內源性非人類輕鏈連接(J_L)基因區段，其中該人類 V_L 及連接 J_L 基因區段可操作地連接至內源性輕鏈恆定區基因序列

其中(a)分別編碼非人類 MHC I 及/或非人類 MHC II 分子之核苷酸序列及(b) V_H 、 D_H 、 J_H 、 V_L 及 J_L 基因區段

(I) 藉由連續同源重組插入或替換在單一非人類胚胎幹(ES)細胞中或

(II) 在分別用於產生第一及第二非人類動物之第一及第二 ES 細胞中，且其中該方法進一步包含育種該第一及第二非人類動物。

【0018】 在一些具體例中，製造經基因修飾之非人類動物的方法包含向非人類動物投與抗原性 pMHC 複合物，該抗原性 pMHC 複合物包含與衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子締合的與非人類動物異源之肽。在一些具體例中，抗原性 pMHC 複合物連接至輔助 T 細胞抗原決定基。在一些具體例中，輔助 T 細胞抗原決定基包含 PADRE，例如，如 SEQ ID NO: 28 所闡述。

【0019】 在一些具體例中，一種產生特異性地結合所關注之抗原性 pMHC 複合物的抗原結合蛋白或編碼該抗原結合蛋白之核酸序列的方法，其包含將如本文所描述之經基因修飾之非人類動物保持在足以使該非人類動物建立針對所關注之抗原性 pMHC 複合物之免疫反應的條件下，其中所關注之抗原性 pMHC 複合物包含與該非人類動物異源且在衍生該人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 或其部分的背景中呈現之肽。在一些具體例中，該方法包含作為第一步驟使非人類動物免疫接種所關注之抗原性 pMHC 複合物，且視情況增強經免疫接種非人類動物之免疫反應，視情況其中免疫接種及/或增強包含向非人類動物投與連接至輔助 T 細胞抗原決定基(例如，PADRE (SEQ ID NO:28))的所關注之 pMHC 複合物。

【0020】 在一些具體例中，一種獲得編碼人類免疫球蛋白重鏈可變域及/或人類免疫球蛋白輕鏈可變域之核酸的方法包含：自如本文所描述之非人類動物分離包含重排人類免疫球蛋白可變區基因序列之核酸，該重排人類免疫球蛋白可變區基因序列編碼由非人類動物之淋巴細胞，或由該淋巴細胞產生之融合瘤表現的人類免疫球蛋白可變域，其中由淋巴細胞或由其產生之融合瘤表現的人類免疫球蛋白可變域與其同源可變域締合以形成對抗原性 pMHC 複合物具有特異性之抗原結合域。在一些具體例中，該方法進一步包含使非人類動物免疫接種所關注之抗原性 pMHC 複合物且在獲得核酸之前允許非人類動物建立針

對該抗原之免疫反應。在一些具體例中，所獲得之重排人類免疫球蛋白可變區基因序列包含至少一個體細胞超突變。

【0021】 在一些具體例中，本文中所描述之核酸包含可操作地連接至重排人類免疫球蛋白可變區基因序列之人類恆定區基因序列。在一些具體例中，人類重鏈恆定區基因序列包含在 pH 範圍介於 5.5 至 6.0 下增加 IgG 重鏈恆定區胺基酸序列之 CH₂-CH₃ 區與新生兒 Fc 受體 (FcRn) 之親和力的修飾，其中該修飾為選自由以下組成之群的 IgG 重鏈恆定區胺基酸序列中之突變：M428L、N434S、V259I、V308F、N434A、M252Y、S254T、T256E、T250Q、H433K、N434Y 及其組合。本文中亦描述例如用於表現編碼對抗原性 pMHC 複合物具有特異性之人類免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈之核酸的哺乳動物宿主細胞。

【0022】 在一些具體例中，一種獲得表現人類免疫球蛋白重鏈可變域及/或人類免疫球蛋白輕鏈可變域之細胞的方法包含自如本文所描述之非人類動物分離淋巴細胞，其中淋巴細胞表現形成針對抗原性 pMHC 複合物具有特異性之抗原結合域的人類免疫球蛋白可變域。在一些具體例中，該方法包含由經分離淋巴細胞產生融合瘤。

【0023】 在一些具體例中，如本文所描述之經分離細胞，例如生殖細胞、胚胎幹細胞、體細胞(例如，B 細胞)包含(a)編碼人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列，及(b)(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座。在一些具體例中，(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排。在一些具體例中，經分離細胞係根據本文中所描述之方法來獲得。

【0024】 在一些具體例中，一種製造人類免疫球蛋白可變域之活體外方法包含在細胞中表現包含重排人類免疫球蛋白可變區基因序列之第一核酸，該重排人類免疫球蛋白可變區基因序列編碼由如本文所描述之非人類動物之淋巴細胞，或由該淋巴細胞產生之融合瘤表現的人類免疫球蛋白可變域，其中由淋巴細胞或由其產生之融合瘤表現的

人類免疫球蛋白可變域與其同源可變域締合以形成對抗原性 pMHC 複合物具有特異性之抗原結合域。在一些具體例中，第一核酸進一步包含可操作地連接至重排人類免疫球蛋白可變區基因序列之人類免疫球蛋白恆定區基因序列。在一些具體例中，人類免疫球蛋白恆定區基因序列為重鏈恆定區基因序列且包含在 pH 範圍介於 5.5 至 6.0 下增加 IgG 重鏈恆定區胺基酸序列之 CH2-CH3 區與新生兒 Fc 受體(FcRn)之親和力的修飾，其中該修飾為選自由以下組成之群的 IgG 重鏈恆定區胺基酸序列中之突變：M428L、N434S、V259I、V308F、N434A、M252Y、S254T、T256E、T250Q、H433K、N434Y 及其組合。

【圖式簡單說明】

【0025】 圖 1A 至 1C 為本發明之例示性具體例，其提供嵌合 MHC I 及 MHC II 基因座之示意性圖示(未按比例)，例如，例如在內源性 H-2K 基因座處之嵌合 HLA-A2/H-2K 基因座(圖 1A)；例如在內源性 H-2E 基因座處之嵌合 HLA-DR2/H-2E(圖 1B)及例如在內源性 β 2M 基因座處之人類化 β 2M 基因座(圖 1C)。除非另外規定，否則人類序列描繪為空白形狀且小鼠序列描繪為填充形狀。條紋形狀表示除內源性基因座以外的衍生自不同小鼠品系之 H-2E 基因序列之外顯子 1 及其下游之內含子的部分。因此，在 Cre 介導之去除卡匣之前(圖 1C)及在 Cre 去除卡匣之後(圖 1A 及 1B)的 Floxed 新黴素磷酸轉移酶卡匣以標記之箭頭描繪。

【0026】 圖 2 提供編碼單鏈 MHC 分子(SEQ ID NO:23)之本發明之例示性轉基因(SEQ ID NO:22)之示意性圖示(未按比例)，該單鏈 MHC 分子包含在 ROSA26 (Gt(ROSA)26 Sor)基因座處與人類 β 2 微球蛋白(B2m)締合的成熟 HLA-A2 (A2)多肽之全長(例如，HLA-A2 之胺基酸 25-365)。除非另外規定，否則人類序列描繪為空白形狀，小鼠序列描繪為填充形狀，且既不為人類亦不為小鼠序列之序列以不同圖案描繪。填充箭頭指示內源性小鼠 ROSA26 基因座之外顯子。5'HB 及 3'HB：ROSA 26 基因中用於插入 B2m-G4Sx4-HLA-A2 轉基因(SEQ ID NO: 22)之同源性盒，該轉基因藉由同源重組編碼單鏈 HLA-A2 β 2M 複

合物(SEQ ID NO:23)。SA：共有剪接受體。ROR：小鼠 ROR 信號序列。G4Sx4：GGGS 連接子(SEQ ID NO:21)，SV40PA：來自 SV40 病毒之聚腺苷酸化信號。LoxP-New-LoxP：在 Cre 介導之去除卡匣之前的 floxed 新黴素磷酸轉移酶卡匣。

【0027】 圖 3 展示本發明之例示性具體例之結果，其中針對抗體結合 HLA-A 與人類 $\beta 2$ 微球蛋白締合作為單鏈 pMHC 複合物之肽結合溝中呈現的不相關或相關肽(肽 A (不相關)、肽 B (相關)或肽 C (不相關))的效價(y 軸)，測試來自測試小鼠(包含編碼人類化 MHC I 分子(HLA-A2/H-2K)、人類化 $\beta 2$ 微球蛋白、未經重排人類化免疫球蛋白重鏈基因座及人類化共同輕鏈基因座 V κ 1-39/J κ 的核苷酸序列；●)或免疫接種有編碼包含 HLA-A 與人類 $\beta 2$ 微球蛋白締合之肽結合溝中呈現之肽 B 之免疫原的核苷酸序列的對照小鼠(包含功能性(例如，鼠類) ADAM6 基因及人類化重鏈及輕鏈基因座；■)的血清。血清中之抗體結合個別 pMHC 複合物的效價計算為血清稀釋因子插入值，其中結合信號為背景的 2 倍。

【0028】 圖 4 展示本發明之例示性具體例的結果，其中針對抗體結合 HLA-A 與人類 $\beta 2$ 微球蛋白締合作為單鏈 pMHC 複合物之肽結合溝中呈現的不相關或相關肽(肽 A (不相關)、肽 B (相關)或肽 C (不相關))之效價(y 軸)，測試來自測試組小鼠(包含編碼人類化 MHC I 分子(HLA-A2/H-2K)、人類化 $\beta 2$ 微球蛋白、未經重排人類化免疫球蛋白重鏈基因座及人類化共同輕鏈基因座 V κ 1-39/J κ 的核苷酸序列；●)或免疫接種有包含 HLA-A 與人類 $\beta 2$ 微球蛋白締合之肽結合溝中呈現之肽 B 的單鏈 pMHC 複合物免疫原的對照組小鼠(包含功能性(例如，鼠類) ADAM6 基因及人類化重鏈及輕鏈基因座；■)的血清。血清中之抗體結合個別 pMHC 複合物的效價(y 軸)計算為血清稀釋因子插入值，其中結合信號為背景的 2 倍。

【0029】 圖 5 展示本發明之例示性具體例的結果，其中針對結合於 HLA-A 與人類 $\beta 2$ 微球蛋白締合作為單鏈 pMHC 複合物之肽結合溝中呈現的不相關或相關肽(肽 A (不相關)、肽 B (相關)或肽 C (不相

關))，測試來自測試組小鼠(包含編碼人類化 MHC I 分子(HLA-A2/H-2K)、人類化 $\beta 2$ 微球蛋白、未經重排人類化免疫球蛋白重鏈基因座及人類化共同輕鏈基因座 V κ 1-39/J κ 的核苷酸序列)的血清，該測試組小鼠免疫接種有包含 HLA-A 與人類 $\beta 2$ 微球蛋白締合之肽結合溝中呈現之肽 B 的免疫原且提供有包含 HLA-A 與人類 $\beta 2$ 微球蛋白締合之肽結合溝中呈現之肽 B 的其他重組多肽的輔助劑及輔助 T 細胞抗原決定基(PADRE)。血清中之抗體結合個別 pMHC 複合物的抗體效價(y 軸)計算為血清稀釋因子插入值，其中結合信號為背景的 2 倍。

【實施方式】

【0030】如本文中所展示，對人類 HLA 及人類 $\beta 2$ 微球蛋白分子未耐受但免疫接種有在 HLA 分子之背景中呈現之所關注之肽(亦即所關注之 pMHC 複合物)的對照組非人類動物誘發對所關注之 pMHC 複合物的抗體效價。圖 3 至 4 (正方形符號)。然而，非耐受且經免疫接種之對照組動物之血清亦包含對非人類動物未免疫之不相關 pMHC 複合物(例如，相同背景中呈現之不相關肽)之相當抗體效價，從而表明針對所關注之 pMHC 複合物所產生的反應不為特異性反應。參見，圖 3 至 4 (正方形符號)。

【0031】相比之下，對人類 HLA 及人類 $\beta 2$ 微球蛋白分子或至少其肽結合溝(例如，其胞外部分)耐受且免疫接種有衍生自人類 HLA 分子之所關注之 pMHC 複合物的非人類動物誘發相比於不相關 pMHC 複合物對所關注之 pMHC 複合物更大的抗體效價。參見，圖 3 至 5。因此，本文中展示對人類 HLA 及人類 $\beta 2$ 微球蛋白分子(或至少其肽結合溝(例如，其胞外部分))耐受之非人類動物提供用於產生對所關注之 pMHC 的特異性免疫反應的活體內平台，可自其中選擇一或多種主導化合物。此平台相比於涉及對所關注之 pMHC 產生非特異性免疫反應之非耐受動物的平台經改良。因此，本文提供經基因修飾以對人類 HLA 分子耐受之非人類動物，以使得在免疫接種有包含在人類 HLA 分

子之背景中呈現之所關注之肽的所關注之 pMHC 複合物時，該非人類動物能夠產生針對所關注之 pMHC 複合物之特異性 B 細胞反應。

【0032】 在例示性具體例中，非人類動物經基因修飾以對人類 HLA 分子、其部分及/或其單鏈衍生物耐受而對包含與非人類動物耐受之人類 HLA 分子締合之(例如，由人類 HLA 分子呈現之)抗原肽(例如，與經基因修飾之非人類動物異源的肽)的抗原肽-MHC (pMHC)複合物不耐受。由於非人類動物對此類抗原性 pMHC 複合物不耐受，所以如本文所揭示之經基因修飾之動物可適用於不僅分離對人類 HLA 分子、其部分及/或其單鏈衍生物不反應之免疫細胞(例如，用於活體外研究)，而且用於產生特異性地結合所關注之抗原性 pMHC 複合物的抗原結合蛋白，尤其人類或人類化抗原結合蛋白。此類特異性(人類或人類化)抗原結合蛋白可適用於治療人類疾病之療法中，例如預防在自體反應性 TCR 與包含自體反應性自體抗原之 pMHC 複合物之間形成免疫突觸(例如，預防及/或治療自體免疫性病、移植物抗宿主病、移植排斥等)、經病原體(例如，病毒)感染之靶向細胞及經由細胞表面上表現之 pMHC 複合物呈現病毒肽等。除描述非人類動物及製造對人類或人類化 HLA 分子、其部分及/或其單鏈衍生物耐受之此類非人類動物的方法以外，亦揭示向非人類動物投與抗原性 pMHC 複合物以產生抗 pMHC 抗體反應以及製造此類抗原性 pMHC 複合物的方法。

定義

【0033】 除非另外定義，本文中所使用之全部技術術語及科學術語具有所屬領域中具有通常知識者一般理解之相同意義。

【0034】 除非上下文另有明確規定，否則單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個指示物。因此，例如，對「方法」之引用包括一或多個方法，及/或本文中所描述之類型步驟及/或在閱讀本發明之後，其對於熟習本技藝者變得顯而易見。

【0035】術語「約」或「大致」包括在值之有意義的範圍內。由術語「約」或「大致」涵蓋之允許差異取決於研究下之特定系統，且可由本領域的一般技術者容易地理解。

【0036】術語「主要組織相容性複合物」及「MHC」涵蓋術語「人類白細胞抗原」或「HLA」（其中之後兩者通常保留用於人類 MHC 分子）、天然存在之 MHC 分子、MHC 分子之個別鏈（例如，MHC I 類 α （重鏈）鏈、 $\beta 2$ 微球蛋白、MHC II 類 α 鏈及 MHC II 類 β 鏈）、MHC 分子之此類鏈之個別子單元（例如，MHC I 類 α 鏈之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及/或 $\alpha 3$ 子單元、MHC II 類 α 鏈之 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 子單元、MHC II 類 β 鏈之 $\beta 1$ - $\beta 2$ 子單元）以及其部分（例如，肽結合部分，例如肽結合溝）、突變體及各種衍生物（包括融合體蛋白），其中此類部分、突變體及衍生物保持呈現由 T 細胞受體（TCR），例如抗原特異性 TCR 識別之抗原肽的能力。MHC I 類分子包含由可存放具有約 8-10 個胺基酸之肽的重鏈 α 鏈之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域形成的肽結合溝。儘管兩種類別之 MHC 結合肽內約 9 個胺基酸（例如，5 至 17 個胺基酸）之核心的事實，但 MHC II 類肽結合溝（II 類 MHC α 多肽之 $\alpha 1$ 結構域與 II 類 MHC β 多肽之 $\beta 1$ 結構域締合）之開放式性質允許更寬範圍之肽長度。結合 MHC II 類之肽的長度通常在 13 與 17 個胺基酸之間改變，但較短或較長長度不係不常見。因此，肽可在 MHC II 類肽結合溝內偏移，從而在任何指定時間改變哪個 9-聚體直接位於該溝內。本文中特定 MHC 變異體之習知標識。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包含編碼人類（化）MHC 分子之核苷酸，該人類（化）MHC 分子包含至少一個人類肽結合溝（例如，肽結合部分）且在其他具體例中，至少人類 HLA I 類/人類 $\beta 2$ 微球蛋白分子及/或人類 HLA II 類分子之細胞外域。

【0037】術語「耐受」、「耐受性」、「耐受」及類似者係指動物（例如，如本文所揭示之經基因修飾之非人類動物）對受質建立免疫反應的不可能或減弱的能力。一般而言，動物對在胚胎發生期間及/或在出生時表現之其自身蛋白質或分子耐受、呈現耐受性、經歷耐受等，例如動物未能或不大可能對由其基因組（例如，其生殖系基因組）中表現的其

自身蛋白質或分子建立免疫反應。藉由對動物進行基因修飾以在其基因組(例如，生殖系基因組)中包含人類(化) MHC 分子，在表現「空白」人類(化) MHC 分子時，動物對該空白人類(化) MHC 分子變得耐受、呈現耐受性、經歷耐受等，如同該人類(化) MHC 分子為其自身蛋白質。在 HLA 分子、MHC 分子、人類(化) MHC 分子及類似者之背景中的「空白」包括經表現在其肽結合溝內不具有肽或具有對於表現 HLA 分子、MHC 分子、人類(化) MHC 分子及類似者之動物而言為內源性的肽的 HLA 分子、MHC 分子、人類(化) MHC 分子及類似者。舉例而言，空白 MHC 分子可包括動物中之由動物之基因組(例如，生殖系基因組)表現且呈現內源性動物自身蛋白質或其部分之人類(化) MHC 分子。

【0038】 非人類動物之基因組可視為「體細胞基因組」，例如，可為在非人類動物之體細胞中發現的基因組，或可視為「生殖系基因組」，例如，可為在非人類動物之生殖細胞中發現且傳遞至非人類動物之後代的基因組。熟習本技藝者將易於識別在生殖系基因組中未經重排能夠在非人類動物之體細胞(例如，B 細胞)中重排以形成編碼免疫球蛋白可變域之重排免疫球蛋白可變區基因座的免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈可變區基因位點。因此，例示性具體例中之未經重排重鏈及/或輕鏈基因座可發現於非人類動物之生殖系基因組中，且自其衍生之重排序列可發現於例如非人類動物之 B 細胞中。

【0039】 術語「非人類動物」及類似者係指任何非人類的脊椎生物。在一些具體例中，非人動物為圓口類動物、硬骨魚、軟骨魚(例如鯊魚或鱈)、兩棲動物、爬行動物、哺乳動物及鳥。在一些具體例中，非人類動物為哺乳類動物。在一些具體例中，非人類哺乳動物為靈長類動物、山羊、綿羊、豬、狗、牛或嚙齒類動物。在一些具體例中，非人類動物為嚙齒類動物，例如大鼠或小鼠。

【0040】 術語「人類化」、「嵌合」、「人類/非人類」及類似者係指來源為非人類且其部分已經對應人類分子之對應部分置換，以此方式使得經修飾之(例如，人類化、嵌合、人類/非人類等)分子保留其生物功能及/或保持執行所保留生物功能之結構的分子(例如，核酸、蛋白質

等)。人類化分子可考慮衍生自人類分子，其中該人類化分子由包含編碼人類分子(或其部分)之核酸序列的核苷酸編碼。相比之下，「人類」及類似者各別地涵蓋僅具有人類來源之分子，例如，人類核苷酸或僅包含人類核苷酸及胺基酸序列之蛋白質。術語「人類(化)」用以反映人類(化)分子可為(a)人類分子或(b)人類化分子。

【0041】 在一些具體例中，人類(化) MHC 分子包含，或非人類動物表現人類(化) MHC 分子且對其耐受，該人類(化) MHC 分子包含至少人類 HLA 分子之人類肽結合溝，其中該人類(化) MHC 分子保留在人類肽結合溝中呈現抗原的能力及/或該人類(化) MHC 分子保持人類 HLA 分子之人類肽結合溝的結構。在一些具體例中，人類(化) MHC 分子包含，或非人類動物表現人類(化) MHC 分子且對其耐受，該人類(化) MHC 分子包含至少人類 HLA 分子之人類細胞外域，其中該人類(化) MHC 分子保留呈現抗原之能力及/或該人類(化) MHC 分子保持允許肽結合溝形成的人類 HLA 分子之人類細胞外域的結構。在一些具體例中，人類(化) MHC 分子包含，或非人類動物表現人類(化) MHC 分子且對其耐受，該人類(化) MHC 分子包含人類 HLA I 類多肽之人類肽結合溝(例如，至少人類 HLA I 類多肽之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域，例如人類 HLA I 類多肽之胞外部分，例如至少全長成熟人類 HLA I 類多肽)，其中該人類(化) MHC I 類多肽保留呈現抗原之能力及/或在人類肽結合溝中呈現抗原所必需的結構。在一些具體例中，人類(化) MHC 分子包含，或非人類動物表現人類(化) MHC 分子且對其耐受，該人類(化) MHC 分子包含人類 HLA I 類多肽之人類肽結合溝(例如，至少人類 HLA I 類多肽之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域，例如人類 HLA I 類多肽之胞外部分，例如至少全長成熟人類 HLA I 類多肽)，其中該人類(化) MHC I 類分子保留呈現抗原之能力及/或在人類肽結合溝中呈現抗原所必需之結構，且其中該(化) MHC I 類分子進一步包含使 MHC I 類分子穩定之人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白。

【0042】 術語「抗原」係指在引入免疫勝任宿主中時由宿主之免疫系統識別且引發宿主之免疫反應的任何試劑(例如，蛋白質、肽、多

醣、醣蛋白、糖脂、核苷酸、其部分或其組合)。T 細胞受體識別在主要組織相容性複合體(MHC)作為免疫突觸之部分的背景中所呈現的肽。肽-MHC (pMHC)複合物藉由 TCR 識別,其中肽(抗原決定子)及 TCR 個體基因型提供相互作用之特異性。因此,術語「抗原」涵蓋在 MHC(例如肽-MHC 複合物,例如 pMHC 複合物)之背景中呈現的肽。MHC 上呈現之肽亦可稱作「抗原決定基」或「抗原決定子」。術語「肽」、「抗原決定子」、「抗原決定基」等不僅涵蓋由抗原呈現細胞(APC)自然呈現之彼等,而且可為任何所需肽,只要其例如在恰當地呈現至免疫系統之細胞時,藉由經基因修飾之非人類動物之免疫細胞識別即可。舉例而言,具有人工製備之胺基酸序列的肽亦可用作抗原決定基。

【0043】 「肽-MHC 複合物」、「pMHC 複合物」、「溝中肽(peptide-in-groove)」及類似者包括

(i) MHC 分子,例如人類及/或人類化(例如「人類(化)」) MHC 分子或其部分(例如,其肽結合溝,及例如其胞外部分),及

(ii) 抗原肽,

其中 MHC 分子及抗原肽以使得 pMHC 複合物可特異性地結合 T 細胞受體的方式經複合。pMHC 複合物涵蓋細胞表面表現之 pMHC 複合物及可溶性 pMHC 複合物。在例示性具體例中,其基因組(例如生殖系基因組)中包含編碼人類(化) MHC 分子或至少其人類肽結合溝之核苷酸序列的非人類動物對於空白人類(化) MHC 分子或其空白人類肽結合溝變得耐受。在向非人類動物投與抗原性 pMHC 複合物,包含與對於向其投與 pMHC 複合物之宿主非人類動物而言為外源的肽複合之人類(化) MHC 分子的複合物後,非人類動物能夠對抗原性 pMHC 複合物產生抗體反應。此類特異性抗原結合蛋白可隨後經分離且用作特異性調節與抗原性 pMHC 之特異性 T 細胞受體相互作用的治療劑。在例示性具體例中,包含與非人類動物耐受之 MHC 分子複合之肽(其對於投與 pMHC 複合物之宿主非人類動物而言為外源的)的可溶性 pMHC 複合物可不誘發 T 細胞免疫反應,此歸因於所投與之 pMHC 複合物之可溶性質。然而,此類可溶性 pMHC 複合物可仍視為抗原,因為其可誘發 B

細胞介導之免疫反應，該免疫反應產生特異性地結合可溶性 pMHC 複合物之抗原結合蛋白。

【0044】 片語「基因區段」或「區段」包括對可變(V)基因區段(例如，免疫球蛋白輕鏈可變(V_L)基因區段或免疫球蛋白重鏈可變(V_H)基因區段)、免疫球蛋白重鏈多樣性(D_H)基因區段或連接(J)基因區段，例如免疫球蛋白輕鏈連接(J_L)基因區段或免疫球蛋白重鏈連接(J_H)基因區段的引用，其包括在免疫球蛋白基因位點處可參與重排(由例如內源性重組酶介導)以形成重排輕鏈 V_L/J_L 或重排重鏈 V_H/D_H/J_H 序列的未經重排序列。除非另外指明，否則未經重排 V、D、及 J 區段包含根據 12/23 規則允許 V_L/J_L 重組或 V_H/D_H/J_H 重組之重組信號序列(RSS)。

【0045】 術語「抗原結合蛋白」、「免疫球蛋白」、「抗體(antibody/antibodies)」、「結合蛋白」及類似者係指單株抗體、多特異性抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單鏈 Fvs (scFv)、單鏈抗體、Fab 片段、F(ab')片段、二硫鍵連接之 Fvs (sdFv)、胞內抗體、微型抗體、雙功能抗體及抗個體基因型(anti-Id)抗體(包括例如 anti-Id 抗體至抗原特異性 TCR)，及以上各者中之任一者之抗原決定基結合片段。術語「抗體(antibody/antibodies)」亦係指共價雙功能抗體，諸如美國專利 申請 公開案 20070004909 中所揭示之彼等，該公開案以全文引用之方式併入本文中；及 Ig-DARTS，諸如美國專利 申請 公開案 20090060910 中所揭示之彼等，該公開案以全文引用之方式併入本文中。pMHC 結合蛋白係指特異性地結合 pMHC 複合物之抗原結合蛋白、免疫球蛋白、抗體或類似者。

【0046】 術語「特異性地結合」、「以特異性方式結合」、「抗原特異性」或類似者指示參與特異性結合之分子(1)能夠在生理條件下穩定地結合(例如締合)，例如形成分子間非共價鍵，且(2)不能在生理條件下與指定結合對外部的其他分子形成穩定地結合。因此，以特異性方式結合至 pMHC 複合物之抗原結合蛋白(例如，免疫球蛋白、抗體及類似者)指示 pMHC-結合蛋白與 pMHC 複合物形成穩定的分子間非共價

鍵。因此，特異性地結合，例如以特異性方式結合至包含與第一 MHC 分子複合之第一肽的特異性 pMHC 複合物之 pMHC-結合蛋白

(i) 在生理條件下不能穩定地結合至包含在第一 MHC 分子之內容比較中呈現之第二肽的 pMHC 複合物，其中第一及第二肽不相同，例如在與第一 MHC 分子之肽結合溝締合後呈現不同的個體基因型(構形結構)，

(ii) 可干擾(例如，阻斷)(a)特異性地識別在第一 MHC 分子之背景中呈現的第一肽之第一 TCR 與(b)包含第一肽及第一 MHC 分子之 pMHC 複合物之間的相互作用，但

(iii) 將不干擾(a)特異性地識別在第一 MHC 分子之背景中呈現的第二肽之第二 TCR 與(b)包含在第一 MHC 分子之背景中呈現的第二肽之 pMHC 複合物之間的相互作用，其中第一及第二肽不同，例如在與第一 MHC 分子之肽結合溝締合後呈現不同的個體基因型(構形結構)。特異性地結合包含第一肽及第一 MHC 分子之 pMHC 複合物的 pMHC 結合蛋白亦可或獨立地結合在第一 MHC 分子之背景中呈現第一肽的第一細胞但將不結合在第一 MHC 分子之背景中呈現第二肽的第二細胞，其中第一及第二肽不同，在與 MHC 分子之肽結合溝締合後呈現不同的個體基因型(構形結構)。特異性結合亦可由在低微莫耳至皮莫耳範圍中之平衡解離常數(K_D)表徵。高特異性可在低奈莫耳範圍中，其中極高的特異性在皮莫耳範圍中。用於判定兩個分子是否特異性結合之方法為此項技術中熟知的，且包括例如平衡透析、表面電漿子共振及類似者。

【0047】 「受試者」或「個體」或「動物」係指疾病之人類、獸醫學動物(例如，貓、狗、母牛、馬、綿羊、豬等)及實驗動物模型(例如，小鼠、大鼠)。在一個具體例中，個體為人類。

【0048】 本文所使用之術語「蛋白質」涵蓋所有類型的天然存在蛋白質及合成性蛋白質，包括具有所有長度之蛋白質片段、融合蛋白質及經修飾之蛋白質，包括(但不限於)糖蛋白，以及所有其他類型之經修飾之蛋白質(例如，由磷酸化、乙醯化、豆蔻醯化、棕櫚醯化、糖基

化、氧化、甲醯化、醯胺化、聚谷胺醯胺化(polyglutamylolation)、ADP-核糖基化、聚乙二醇化、生物素化等產生之蛋白質)。

【0049】 除非另外規定，否則術語「核酸」及「核苷酸」涵蓋 DNA 及 RNA 兩者。

【0050】 術語「效價」、「抗體效價」、「抗體之效價」或類似者係指抗體樣品(例如，自個體獲得之血清中)共用特徵(例如，同種型)的能力，以特異性或非特異性方式結合抗原的能力等。測定自個體收集之血清中的抗體效價的方法為此項技術中已知的。在一些具體例中，自個體收集之血清中的抗體效價經計算為血清稀釋因子插入值，其中結合信號為背景的 2 倍。在一些具體例中，表現人類(化) MHC 分子且對其耐受之非人類動物在免疫接種有所關注之 pMHC 複合物(例如，在衍生人類(化) MHC 分子之 HLA 分子的背景中所呈現的所關注之肽)時可或確實產生特異性反應(例如，特異性免疫反應，例如特異性 B 細胞反應，例如特異性抗體反應)。在一些具體例中，反應視為「特異性反應」或類似反應，其中非人類動物在免疫接種有所關注之 pMHC 複合物時產生對所關注之 pMHC 複合物的抗體效價，其大於對不相關 pMHC 複合物之抗體效價。在一些具體例中，反應視為特異性反應或類似反應，其中非人類動物在免疫接種有所關注之 pMHC 複合物時產生對所關注之 pMHC 複合物的抗體效價，其比對不相關 pMHC 複合物之抗體效價大至少 2 倍。在一些具體例中，反應視為特異性反應或類似反應，其中非人類動物在免疫接種有所關注之 pMHC 複合物時產生對所關注之 pMHC 複合物的抗體效價，其比對不相關 pMHC 複合物之抗體效價大至少 5 倍。在一些具體例中，反應視為特異性反應或類似反應，其中非人類動物在免疫接種有所關注之 pMHC 複合物時產生對所關注之 pMHC 複合物的抗體效價，其比對不相關 pMHC 複合物之抗體效價大至少 10 倍。在一些具體例中，反應視為特異性反應或類似反應，其中非人類動物在免疫接種有所關注之 pMHC 複合物時產生對所關注之 pMHC 複合物的抗體效價，其顯著地大於對不相關 pMHC 複合物之抗體效價。

【0051】術語「可操作地連接」或類似者係指其中所描述之組件處於允許其以其預期方式起作用的關係的並接。舉例而言，若未經重排可變區基因區段能夠重排以形成與恆定區基因締合表現作為抗原結合蛋白之多肽鏈的重排可變區基因，則未經重排可變區基因區段「可操作地連接」至相鄰恆定區基因。「可操作地連接」至編碼序列之控制序列係以編碼序列之表現在可與控制序列兼容之條件下達成之方式連結。「可操作地連接」序列包括與所關注之基因鄰接的表現控制序列以及反式或遠距離起作用以控制所關注之基因(或所關注之序列)的表現控制序列兩者。術語「表現控制序列」包括多核苷酸序列，其為影響與其連接的編碼序列之表現及加工所必需的。「表現控制序列」包括：適當的轉錄起始、終止、啟動子和增強子序列；有效的 RNA 加工信號，諸如剪接及多腺苷酸化信號；穩定細胞質 mRNA 的序列；增強轉譯效率的序列(亦即，Kozak 一致序列)；增強多肽穩定性的序列；以及當需要時，增強多肽分泌的序列。此種控制序列之性質根據宿主生物體而不同。舉例而言，在原核生物中，此類控制序列通常包括啟動子、核糖體結合位點及轉錄終止序列，而在真核生物中，此類控制序列通常包括啟動子及轉錄終止序列。術語「控制序列」意欲包括其存在對於表現及加工係必不可少的成分，且亦可包括其存在有利於例如前導序列及融合夥伴序列之額外成分。

【0052】術語「投與」及類似者係指且包括向個體或系統(例如，細胞、器官、組織、生物體或其相關組分或組分群)投與組合物。本領域技術人員將理解，投與途徑可根據例如投與組合物之個體或系統、組合物性質、投藥目的等而變化。舉例而言，在某些具體例中，對動物個體(例如，對人類或嚙齒類動物)之投藥可為支氣管(包括經由支氣管滴注)、口腔、腸內、皮間、動脈內、皮內、胃內、髓內、肌肉內、鼻內、腹膜內、鞘內、靜脈注射、心室內、黏膜、鼻腔、口腔、直腸、皮下、舌下、局部、氣管(包括經由氣管內滴注)、經皮、陰道，及/或玻璃體。在一些具體例中，投藥可包括間歇性給藥。在一些具體例中，投藥可包括連續給藥(例如，灌注)至少選定的一段時間。

【0053】術語「衍生自」當關於重排可變區基因使用時或「衍生自」未經重排可變區及/或未經重排可變區基因區段之可變域係指追蹤重排可變區基因或可變域之序列返回至一組未經重排可變區基因區段的能力，該組未經重排可變區基因區段經重排以形成表現可變域(適用時考慮剪接差異及體細胞突變)之重排可變區基因。舉例而言，已經歷體細胞突變之重排可變區基因不改變其衍生自未經重排可變區基因區段的事實。

【0054】術語「內源性基因座」或「內源性基因」係指在引入如本文所描述之破壞、缺失、替換、更改或修飾之前在親本或參考生物體中發現的遺傳性基因座。在一些具體例中，內源性基因座具有在自然界中發現的序列。在一些具體例中，內源性基因座為野生型基因座。在一些具體例中，內源性基因座為經工程改造之基因座。

【0055】術語「異源性」係指來自不同來源的試劑或實體。舉例而言，當關於存在於特定細胞或生物體中之多肽、基因或基因產物使用時，該術語闡明了相關的多肽、基因或基因產物：1)藉由人工改造；2)經由人工(例如，經由基因工程)引入細胞或生物體(或其前驅體)；及/或3)並非由相關細胞或生物體(例如，相關細胞類型或生物體類型)天然產生或存在於其中。「異源性」亦包括正常存在於特定天然細胞或生物體中，但已經改變或修飾，例如，藉由在非天然相關控制下的突變或置入，且在一些實施例中，為非內源性調控單元(例如，啟動子)的多肽、基因或基因產物。

【0056】

【0057】根據本揭示內容，在此項技術內可能採用習知分子生物學、微生物學及重組 DNA 技術。該等技術在文獻中完全解釋。參見，例如，Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (本文中之「Sambrook 等人, 1989」); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover 編, 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait 編, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames

及 S.J. Higgins 編，(1985)]；Transcription And Translation [B.D. Hames 及 S.J. Higgins 編，(1984)]；Animal Cell Culture [R.I. Freshney 編，(1986)]；Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]；B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)；Ausubel, F.M.等人 (編). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 1994，該等公開案中之每一者以全文引用之方式併入本文中。此等技術包括定點突變誘發，參見，例如 Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492 (1985)；美國專利第 5,071, 743 號；Fukuoka 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 357-360 (1999)；Kim and Maas, BioTech. 28: 196-198 (2000)；Parikh and Guengerich, BioTech. 24: 428-431 (1998)；Ray and Nickoloff, BioTech. 13: 342-346 (1992)；Wang 等人, BioTech. 19: 556-559 (1995)；Wang 及 Malcolm, BioTech. 26: 680-682 (1999)；Xu 及 Gong, BioTech. 26: 639-641 (1999)；美國專利第 5,789, 166 號及第 5,932, 419 號；Hogrefe, Strategies 14. 3: 74-75 (2001)；美國專利第 5,702,931 號、第 5,780,270 號及第 6,242,222 號；Angag and Schutz, Biotech. 30: 486-488 (2001)；Wang 及 Wilkinson, Biotech. 29: 976-978 (2000)；Kang 等人, Biotech. 20: 44-46 (1996), Ogel and McPherson, Protein Engineer. 5: 467-468 (1992)；Kirsch 及 Joly, Nucl. Acids. Res. 26: 1848-1850 (1998)；Rhem 及 Hancock, J. Bacteriol. 178: 3346-3349 (1996)；Boles 及 Miogsa, Curr. Genet. 28: 197-198 (1995)；Barrentino 等人, Nuc. Acids. Res. 22: 541-542 (1993)；Tessier 及 Thomas, Meths. Molec. Biol. 57: 229-237；以及 Pons 等人, Meth. Molec. Biol. 67: 209-218；該等公開案中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

使人類或人類化 MHC 分子耐受

【0058】在例示性具體例中，經基因修飾之非人類動物，例如哺乳動物，例如嚙齒類動物，例如大鼠或小鼠，表現至少一個空白人類或人類化 MHC 分子，或至少其空白人類肽結合溝且對其耐受，但可產生抗原結合蛋白，例如包含人類或人類化可變域之抗原結合蛋白，當

其與抗原，例如異源性肽複合時對人類(化)MHC 分子耐受。在一些具體例中，非人類動物對空白人類(化) MHC 分子之耐受藉由基因修飾非人類動物以在其基因組中包含編碼人類(化) MHC 分子或至少其人類肽結合溝之核苷酸序列來達成，以使得非人類動物表現人類(化) MHC 分子或至少其人類肽結合溝，作為空白人類(化) MHC 分子或其空白人類肽結合溝。經基因修飾以包含編碼人類(化) MHC 分子之核苷酸地相同動物可進一步修飾以包含表現人類或人類化抗原結合蛋白，例如具有人類或人類化可變域之抗原結合蛋白的人類化免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈基因座。

【0059】 MHC 分子通常分為兩種類別：I 類及 II 類 MHC 分子。MHC I 類分子為包含醣蛋白重鏈(在本文中亦稱作 α 鏈)之整合膜蛋白質，該 α 鏈具有三個細胞外域(亦即， $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$)及兩個胞內域(亦即，跨膜域(TM)及細胞質域(CYT))。重鏈與稱作 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2m$ 或 $\beta 2M$)之可溶性子單元非共價地締合。MHC II 類分子或 MHCII 類蛋白質為包含一個 α 鏈及一個 β 鏈非共價締合之異二聚體整合膜蛋白質。 α 鏈具有兩個細胞外域($\alpha 1$ 及 $\alpha 2$)，及兩個胞內域(TM 結構域及 CYT 結構域)。 β 鏈含有兩個細胞外域($\beta 1$ 及 $\beta 2$)，及兩個胞內域(TM 結構域及 CYT 結構域)。

【0060】 I 類及 II 類 MHC 分子之結構域組構形成 MHC 分子之抗原決定子結合位點，例如肽結合部分或肽結合溝。肽結合溝係指形成一空腔之 MHC 蛋白質的部分，在該空腔中可結合肽，例如抗原決定子。肽結合溝構形能夠在結合肽時經改變以實現對於 TCR 結合於肽-MHC (pMHC)複合物而言重要的胺基酸殘基之恰當對準。

【0061】 在一些具體例中，MHC 分子包括足以形成肽結合溝之 MHC 鏈的片段。舉例而言，I 類蛋白質之肽結合溝可包含能夠形成兩個 β 摺疊片及兩個 α 螺旋的重鏈之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域的部分。 $\beta 2$ 微球蛋白鏈之部分包含物使 MHC I 類分子穩定。儘管對於大多數版本之 MHCII 類分子， α 及 β 鏈之相互作用可在不存在肽之情況下發生，但 MHCI 類之兩個鏈分子不穩定直至結合溝填充有肽為止。II 類蛋白質之

肽結合溝可包含能夠形成兩個 β 摺疊片及兩個 α 螺旋之 $\alpha 1$ 及 $\beta 1$ 結構域的部分。 $\alpha 1$ 結構域之第一部分形成第一 β 摺疊片且 $\alpha 1$ 結構域之第二部分形成第一 α 螺旋。 $\beta 1$ 結構域之第一部分形成第二 β 摺疊片且 $\beta 1$ 結構域之第二部分形成第二 α 螺旋。具有接合於蛋白質之結合溝中之肽的 II 類蛋白質的 X 射線結晶學結構展示接合肽之一個或兩個端部可突出超出 MHC 蛋白質(Brown 等人, 第 33-39 頁, 1993, Nature, 第 364 卷, 以全文引用之方式併入本文中)。因此, II 類之 $\alpha 1$ 及 $\beta 1$ α 螺旋之端部形成開放式空腔以使得結合於結合溝之肽之端部未埋入空腔中。此外, II 類蛋白質之 X 射線結晶學結構展示 MHC β 鏈之 N 端端部以非結構化方式自 MHC 蛋白質之側面明顯地突出, 此係因為 β 鏈之前 4 個胺基酸殘基可不藉由 X 射線結晶學指定。

【0062】 許多人類及其他哺乳動物 MHC 為此項技術中熟知的。

【0063】 在一些具體例中, 非人類動物包含第一、第二及/或第三核苷酸序列中之至少一者, 其中之每一者編碼選自由以下組成之群的不同的人類或人類化 MHC 多肽: 人類或人類化 MHC II α 多肽、人類或人類化 MHC II β 多肽及人類或人類化 MHC I α 多肽; 非人類動物亦可包含人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白, 例如在彼等具體例中, 當其包含編碼人類或人類化 MHC I α 多肽之核苷酸序列時。在需要所有三種核苷酸序列或人類或人類化 MHC 多肽中之任一者以任何特定次序存在時, 本文中第一、第二及第三標示之用途不應理解為限制本文中所揭示之非人類動物。

【0064】 在各種具體例中, 本文提供一種經基因修飾之非人類動物, 例如哺乳動物, 例如嚙齒類動物(例如, 小鼠或大鼠), 該經基因修飾之非人類動物在其基因組中包含編碼人類或人類化 MHC I 多肽之核苷酸序列及/或編碼人類或人類化 MHC II 蛋白質, 或至少其人類肽結合溝的核苷酸序列。MHC I 核苷酸序列可編碼為完全人類之 MHC I 多肽(例如, 人類 HLA I 類分子), 或部分地為人類且部分地為非人類之人類化 MHC I 多肽(例如, 嵌合人類/非人類 MHC I 多肽), 且 MHC II 核苷酸序列可編碼為完全人類之 MHC II 蛋白質(例如, 人類 HLA II 類分

子)，或部分地為人類且部分地為非人類之人類化 MHCII 類蛋白質(例如，嵌合人類/非人類 MHC II 蛋白質，例如包含嵌合人類/非人類 MHC II α 及 β 多肽)。

【0065】 在本文中之實施例中，展示由內源性基因座表現嵌合人類/非人類 MHC I 分子(其包含可操作地連接至非人類 MHC I 分子之跨膜及細胞質域的人類 HLA 分子之人類胞外部分(包含人類肽結合域))的經基因修飾之動物對人類 HLA I 類分子為空白時之人類胞外部分(例如人類肽結合域)耐受，且能夠在人類肽結合域與抗原(例如，與非人類動物異源之肽)複合時產生針對其之特異性免疫反應。參見，例如，實施例。因此，在一些具體例中，非人類動物，例如嚙齒類動物，例如大鼠或小鼠，

(1) 例如由內源性 MHC 表現包含可操作地連接至(b)非人類 MHC I 分子之非人類跨膜及細胞質域的(a)人類 HLA 分子之至少一個人類肽結合溝，例如人類胞外部分的嵌合人類/非人類 MHC 分子，及

(2) 對人類 HLA 分子之至少胞外部分耐受。

【0066】 其基因組中(例如內源性基因座處)包含編碼嵌合人類/非人類 MHC I 多肽之核苷酸序列的經基因修飾之非人類動物揭示於美國專利第 9,591,835 號及第 9,615,550 號中，該等公開案中之每一者以全文引用之方式併入本文中。其基因組中(例如內源性基因座處)包含編碼人類化(例如嵌合人類/非人類) MHC II 多肽之核苷酸序列的經基因修飾之非人類動物揭示於美國專利第 8,847,005 號及第 9,043,996 號中，該等公開案中之每一者以全文引用之方式併入本文中。其基因組中(例如內源性基因座處)包含編碼人類化(例如嵌合人類/非人類) MHC I 多肽之核苷酸序列且其基因組中(例如內源性基因座處)包含編碼人類化(例如嵌合人類/非人類) MHC II 多肽之核苷酸序列的經基因修飾之非人類動物揭示於美國專利第 10,154,658 號中，該專利以全文引用之方式併入本文中。

【0067】 在各種具體例中，本文提供一種經基因修飾之非人類動物，在其基因組(例如其生殖系基因組中)中，例如在一或多個內源性 MHC 基因座處包含：

(i) 編碼嵌合人類/非人類 MHC I 多肽之第一核苷酸序列，該多肽包含可操作地連接至非人類部分之人類部分，該人類部分包含人類 MHC I 多肽之胞外部分(或其部分，例如一或多個細胞外域，例如肽結合溝)，該非人類部分包含非人類 MHC I 多肽(例如內源性 MHC I 多肽)之跨膜及細胞質域；及/或

(ii) 編碼包含可操作地連接至非人類部分之人類部分之嵌合人類/非人類 MHC II α 多肽的第二核苷酸序列，其中嵌合 MHC II α 多肽之人類部分包含人類 MHC II 類分子之 α 多肽之胞外部分(或其部分，例如一或多個細胞外域，例如 $\alpha 1$ 結構域)；及編碼包含可操作地連接至非人類部分之人類部分之嵌合人類/非人類 MHC II β 多肽的第三核苷酸序列，其中嵌合 MHC II β 多肽之人類部分包含人類 MHC II 類分子之 β 多肽之胞外部分(或其部分，例如一或多個細胞外域，例如至少 $\beta 1$ 個結構域)；

其中非人類動物表現嵌合人類/非人類 MHC I 及/或 MHC II 蛋白質且對嵌合人類/非人類 MHC I 及/或 MHC II 蛋白質耐受。在一個具體例中，第一、第二及/或第三核苷酸序列分別位於內源性非人類 MHC I、MHC II α 及 MHC II β 基因座處。在一個具體例中，其中非人類動物為小鼠，第一、第二及/或第三核苷酸序列位於染色體 17 上之內源性小鼠 MHC 基因座處。在一個具體例中，第一核苷酸序列位於內源性非人類 MHC I 基因座處。在一個具體例中，第二核苷酸序列位於內源性非人類 MHC II α 基因座處。在一個具體例中，第三核苷酸序列位於內源性非人類 MHC II β 基因座處。

【0068】 在一個具體例中，嵌合人類/非人類 MHC I 多肽包含可操作地連接至非人類部分之人類部分，其中人類部分包含人類 MHC I 多肽之至少肽結合溝。在一個具體例中，嵌合多肽之人類部分包含人類 MHC I 分子之胞外部分。在此具體例中，嵌合多肽之人類部分包含

人類 MHC I 分子之 α 鏈之細胞外域。在一個具體例中，嵌合多肽之人類部分包含人類 MHC I 分子之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域。在另一具體例中，嵌合多肽之人類部分包含人類 MHC I 分子之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 結構域。

【0069】 在一個具體例中，嵌合 MHC II β 多肽之人類部分及/或嵌合 MHC II α 多肽之人類部分分別包含人類 MHC II α 多肽及/或人類 MHC II β 多肽之肽結合域，例如人類 MHC II 蛋白質之 MHC II α 及 β 多肽。在一個具體例中，嵌合 MHC II α 及/或 β 多肽之人類部分分別包含人類 MHC II α 及/或 β 多肽之胞外部分，例如，人類 MHC II 蛋白質之 MHC II α 及 β 多肽。在一個具體例中，嵌合 MHC II α 多肽之人類部分包含人類 MHC II α 多肽之 $\alpha 1$ 結構域；在另一具體例中，嵌合 MHC II α 多肽之人類部分包含人類 MHC II α 多肽之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域。在一個具體例中，嵌合 MHC II β 多肽之人類部分包含人類 MHC II β 多肽之 $\beta 1$ 結構域；在另一具體例中，嵌合 MHC II β 多肽之人類部分包含人類 MHC II β 多肽之 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 結構域。

【0070】 在例示性具體實例中之非人類動物包含、表現嵌合人類/非人類 MHC 分子且對其耐受。在一個具體例中，其中人類部分分別包含人類 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 分子之胞外部分，人類部分可操作地連接至非人類，其中嵌合人類/非人類 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽之非人類部分分別包含內源性非人類(例如，嚙齒類動物例如小鼠、大鼠等) MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽之跨膜及/或細胞質域。因此，嵌合人類/非人類 MHC I 多肽之非人類部分可包含內源性非人類 MHC I 多肽之跨膜及/或細胞質域。嵌合 MHC II α 多肽之非人類部分可包含內源性非人類 MHC II α 多肽之跨膜及/或細胞質域。嵌合人類/非人類 MHC II β 多肽之非人類部分可包含內源性非人類 MHC II β 多肽之跨膜及/或細胞質域。在一個具體例中，非人類動物為小鼠，且嵌合 MHC I 多肽之非人類部分衍生自小鼠 H-2K 蛋白質。在一個具體例中，非人類動物為小鼠，且嵌合 MHC II α 及 β 多肽之非人類部分衍生自小鼠 H-2E 蛋白質。因此，嵌合 MHC I 多肽之非人類部分可包含衍生自小鼠 H-2K 之跨膜及細胞質域，且嵌合 MHC II α 及 β

多肽之非人類部分可包含衍生自小鼠 H-2E 蛋白質之跨膜及細胞質域。儘管特異性 H-2K 及 H-2E 序列涵蓋在實施例中，但任何適合之序列，例如多型變異體保守/非保守胺基酸取代等仍涵蓋於本文中。

【0071】 在一個具體例中，嵌合人類/小鼠 MHC I 多肽之人類部分包含人類 MHC I(例如，人類 HLA-A、例如人類 HLA-A2，例如人類 HLA-A2.1)之肽結合域或細胞外域。人類 MHC I 之肽結合溝可包含 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域。可替代地，人類 MHC I 之肽結合溝可包含 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 結構域。在一個具體例中，人類 MHC I 之細胞外域包含人類 MHC I α 鏈之細胞外域。在一個具體例中，內源性小鼠 MHC I 基因座為 H 2K(例如，H-2Kb)基因座，且嵌合 MHC I 多肽之小鼠部分包含小鼠 H-2K(例如，H-2Kb)多肽之跨膜及細胞質域。因此，在一個具體例中，本發明之小鼠在其小鼠 MHC I 基因座處包含編碼嵌合人類/小鼠 MHC I 之核苷酸序列，其中嵌合多肽之人類部分包含人類 HLA-A2(例如，HLA-A2.1)多肽之細胞外域且小鼠部分包含小鼠 H-2K (例如，H-2Kb)多肽之跨膜及細胞質域(參見例如 SEQ ID NO: 24)，且小鼠表現嵌合人類/小鼠 HLA-A2/H-2K 蛋白質。在其他具體例中，嵌合 MHC I 多肽之小鼠部分可衍生自其他小鼠 MHC I，例如 H-2D、H-2L 等；且嵌合 MHC I 多肽之人類部分可衍生自其他人類 MHC I，例如 HLA-B、HLA-C 等。

【0072】 在一個具體例中，嵌合人類/小鼠 MHC II α 多肽之人類部分包含人類 MHC II α 肽結合或細胞外域且嵌合人類/小鼠 MHC II β 多肽之人類部分包含人類 MHC II β 肽結合或細胞外域。人類 MHC II α 多肽之肽結合域可包含 $\alpha 1$ 結構域且人類 MHC II β 多肽之肽結合域可包含 $\beta 1$ 結構域；因此，嵌合 MHC II 分子之肽結合域可包含人類 $\alpha 1$ 及 $\beta 1$ 結構域。人類 MHC II α 多肽之可包含 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域且人類 MHC II β 多肽之細胞外域可包含 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 結構域；因此，嵌合 MHC II 分子之細胞外域可包含人類 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 結構域。在一個具體例中，嵌合 MHC II 分子之小鼠部分包含小鼠 MHC II，例如小鼠 H-2E 之跨膜及胞溶質域(例如，小鼠 H-2E α 及 β 鏈之跨膜及胞溶質域)。因此，在一個具體例中，本發明之小鼠在其內源性小鼠 MHC II 基因座處包含編碼嵌合

人類/小鼠 MHC II α 之核苷酸序列，其中嵌合 MHC II α 多肽之人類部分包含衍生自人類 MHC II 之 α 鏈(例如，HLA-DR2 之 α 鏈)的細胞外域且小鼠部分包含衍生自小鼠 MHC II(例如，H-2E)之 α 鏈的跨膜及細胞質域；且小鼠在其內源性小鼠 MHC II 基因座處包含編碼嵌合人類/小鼠 MHC II β 之核苷酸序列，其中嵌合 MHC II β 多肽之人類部分包含衍生自人類 MHC II 之 β 鏈(例如，HLA-DR2 之 β 鏈)的細胞外域且小鼠部分包含衍生自小鼠 MHC II(例如，H-2E)之 β 鏈的跨膜及細胞質域；例如其中小鼠表現嵌合人類/小鼠 HLA-DR2/H-2E 蛋白質。在其他具體例中，嵌合 MHC II 蛋白質之小鼠部分可衍生自其他小鼠 MHC II，例如 H-2A 等；且嵌合 MHC II 之人類部分可衍生自其他人類 MHC II，例如 HLA-DQ 等。

【0073】 在一些具體例中，嵌合人類/非人類多肽可為以使得其包含人類或非人類前導(信號)序列。在一個具體例中，嵌合 MHC I 多肽包含內源性 MHC I 多肽之非人類前導序列。在一個具體例中，嵌合 MHC II α 多肽包含內源性 MHC II α 多肽之非人類前導序列。在一個具體例中，嵌合 MHC II β 多肽包含內源性 MHC II β 多肽之非人類前導序列。在一替代具體例中，嵌合 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽分別包含來自其他非人類動物(例如，其他嚙齒類動物或其他小鼠品系)之 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽之非人類前導序列。因此，編碼嵌合 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽之核苷酸序列分別可操作地連接至編碼非人類 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 前導序列之核苷酸序列。在又另一具體例中，嵌合 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽分別包含人類 MHC I、人類 MHC II α 及/或人類 MHC II β 多肽之人類前導序列(例如，分別人類 HLA-A2、人類 HLA-DR α 及/或人類 HLA-DR β 1*1501 之前導序列)。

【0074】 在一些具體例中，嵌合人類/非人類 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽在其人類部分中可分別包含人類 MHC I、人類 MHC II α 及/或人類 MHC II β 多肽之完全或實質上完全細胞外域。因此，人類部分可包含編碼人類 MHC I、人類 MHC II α 及/或人類 MHC II β 多肽

(例如，人類 HLA-A2、人類 HLA-DR α 及/或人類 HLA-DR β 1*1501)之細胞外域的胺基酸之至少 80%、至少 85%、至少 90%，例如 95%或更多。在一個實施例中，人類 MHC I、人類 MHC II α 及/或人類 MHC II β 多肽之實質上完全細胞外域不具有人類前導序列。在另一實施例中，嵌合人類/非人類 MHC I、嵌合人類/非人類 MHC II α 及/或嵌合人類/非人類 MHC II β 多肽包含人類前導序列。

【0075】 此外，在一些具體例中，嵌合 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽可分別可操作地連接至(例如，在其調節控制下經表現)內源性非人類啟動子及調節元件，例如小鼠 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 調節元件。此類排列將促使非人類動物中之嵌合 MHC I 及/或 MHC II 多肽之恰當表現，例如在非人類動物之免疫反應期間。

【0076】 儘管本文中所提供之實施例展示對由內源性 MHC 基因座表現之嵌合人類/非人類 MHC 分子之人類肽結合域的耐受，但此耐受亦在由異位基因座(資料未展示)表現人類 MHC 分子(或其功能性肽結合域)之非人類動物中發生。另外，由異位基因座表現空白人類 MHC 分子(或其空白肽結合域)且對其耐受之非人類動物能夠在非人類動物免疫接種與抗原肽(例如，與非人類動物異源之肽)(資料未展示)複合之人類 HLA 分子(或其肽結合域及/或其衍生物)時，產生針對衍生經表現人類 MHC 分子之人類 HLA 分子(或其肽結合域，或其衍生物)之特異性免疫反應。

【0077】 在不希望受限於理論的情況下，咸信非人類動物之耐受在表現人類或人類化 MHC 分子時發生。因此，人類或人類化 MHC 分子不必需由內源性基因座表現。因此，在各種具體例中，本文提供一種經基因修飾之非人類動物，其基因組中包含編碼人類(化) MHC I 多肽(或其部分及/或衍生物)之第一核苷酸序列、編碼人類(化) MHC II α 多肽(或其部分及/或衍生物)之第二核苷酸序列，及/或編碼人類(化) MHC II β 多肽(或其部分及/或衍生物)之第三核苷酸序列；其中非人類動物表現人類(化) MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽(或其部分及/或衍生物)且對人類(化)多肽或部分及/或衍生物耐受。在一個具體例

中，第一、第二及/或第三核苷酸序列確實不各別地破壞內源性非人類 MHC I、MHC II α 及 MHC II β 基因座，例如位於異位基因座，例如 ROSA26 基因座處。在一些具體例中，經基因修飾之小鼠在異位基因座，例如 ROSA26 基因座處包含編碼嵌合人類/小鼠 MHC I 之核苷酸序列，其中嵌合多肽之人類部分包含人類 HLA-A2 (例如，HLA-A2.1) 多肽之細胞外域且小鼠部分包含小鼠 H-2K (例如，H-2Kb) 多肽之跨膜及細胞質域(參見例如 SEQ ID NO: 24)，且小鼠表現嵌合人類/小鼠 HLA-A2/H-2K 蛋白質且對其耐受。

【0078】 此外，若來自異位基因座，則可表現完全人類 MHC 分子或其完全人類部分及/或衍生物。因此，在各種具體例中，本文提供一種經基因修飾之動物，其基因組中包含編碼完全人類 MHC I 多肽(或其完全人類部分及/或衍生物)之第一核苷酸序列、編碼完全人類 MHC II α 多肽(或其完全人類部分及/或衍生物)之第二核苷酸序列，及/或編碼完全人類 MHC II β 多肽(或其完全人類部分及/或衍生物)之第三核苷酸序列；其中非人類動物表現完全人類 MHC I、MHC II α 及/或 MHC II β 多肽或其完全人類部分及/或衍生物)且對多肽或其完全人類部分及/或衍生物耐受。在一個具體例中，第一、第二及/或第三核苷酸序列確實不各別地破壞內源性非人類 MHC I、MHC II α 及 MHC II β 基因座，視情況不破壞任何內源性基因座，例如位於異位基因座，例如 ROSA26 基因座處

【0079】 在一些具體例中，人類或人類化 MHC I 多肽可衍生自編碼或包含核苷酸序列之部分的核酸，例如人類或人類化 MHC I 多肽由編碼或包含核苷酸序列之部分的核酸編碼，該核苷酸序列編碼選自由以下組成之群的功能性人類 HLA 分子：HLA-A、HLA-B、HLA-E、HLA-F、HLA-G 及其組合。人類或人類化 MHC II α 或 β 多肽可衍生自由 HLA-DP、HLA-DQ 及 HLA-DR 基因座之編碼的功能性人類 HLA 分子之 α 或 β 多肽。一系列常用之 HLA 抗原及對偶基因描述於 Shankarkumar 等人，((2004) *The Human Leukocyte Antigen (HLA) System*, *Int. J. Hum. Genet.* 4(2):91-103)中，其以全文引用之方式併入本

文中。Shankarkumar 等人亦展示此項技術中所使用之 HLA 命名法之簡明解釋。關於 HLA 命名法及各種 HLA 對偶基因之額外資訊可見於 Holdsworth 等人，(2009) *The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and --DQ antigens*, *Tissue Antigens* 73:95-170，及 Marsh 等人，(2010) *Nomenclature for factors of the HLA system, 2010*, *Tissue Antigens* 75:291-455 之最近更新中，該等公開案中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，MHC I 或 MHC II 多肽可衍生自任何功能性人類 HLA-A、B、C、DR 或 DQ 分子。因此，在例示性具體例中，人類或人類化 MHC I 及/或 II 多肽可衍生自任何功能性人類 HLA 分子。在一些具體例中，在細胞表面上表現之所有 MHC I 及 MHC II 多肽包含衍生自人類 HLA 分子之部分。

【0080】 尤其受關注的係已知與多種人類疾病，例如人類自體免疫疾病相關之多型人類 HLA 對偶基因。實際上，已鑑別出 HLA 基因座中之特定多型性與類風濕性關節炎、I 型糖尿病、橋本氏甲狀腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、多發性硬化症、重症肌無力、格雷夫氏疾病 (Graves' disease)、全身性紅斑性狼瘡症、脂瀉病、克羅恩氏病 (Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎及其他自體免疫性病之發展相關。參見例如 Wong 及 Wen (2004) *What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes?*, *Diabetologia* 47:1476-87；Taneja 及 David (1998) *HLA Transgenic Mice as Humanized Mouse Models of Disease and Immunity*, *J. Clin. Invest.* 101:921-26；Bakker 等人，(2006), *A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC*, *Nature Genetics* 38:1166-72 及補充信息；及 International MHC and Autoimmunity Genetics Network (2009) *Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:18680-85，該等公開案中之每一者以全文引用之方式併入本文中。因此，在一些具

體例中，人類或人類化 MHC I 及/或 II 多肽可衍生自已知與特定疾病(例如自體免疫疾病)相關之人類 HLA 分子。

【0081】 在一個特定具體例中，人類或人類化 MHC I 多肽衍生自人類 HLA-A。在一個特定具體例中，HLA-A 多肽為 HLA-A2 多肽(例如，及 HLA-A2.1 多肽)。在一個具體例中，HLA-A 多肽為由 HLA-A*0201 對偶基因，例如 HLA-A*02:01:01:01 對偶基因編碼之多肽。HLA-A*0201 對偶基因常用於北美人群中。儘管本實施例描述此特定 HLA 序列，但任何適合之 HLA-A 序列亦涵蓋於本文中，例如人類群體中所展現之 HLA-A2 之多型變異體、具有一或多個保守性或非保守性胺基酸修飾之序列、因基因密碼之簡併而不同於本文例示性具體例中之序列的核苷酸序列等。

【0082】 在另一特定具體例中，人類或人類化 MHC I 多肽衍生自選自 HLA-B 及 HLA-C 的人類 MHC I。在一個具體例中，其衍生自 HLA-B，例如 HLA-B27。在另一具體例中，其衍生自 HLA-A3、HLA-B7、HLA-Cw6 等。

【0083】 在一個特定具體例中，人類或人類化 MHC II α 及 β 多肽衍生自人類 HLA-DR，例如 HLA-DR2。通常，HLA-DR α 鏈為單型，例如 HLA-DR 蛋白質之 α 鏈由 HLA-DRA 基因(例如，HLA-DR α *01 基因)編碼。在另一方面，HLA-DR β 鏈為多型。因此，HLA-DR2 包含由 HLA-DRA 基因編碼之 α 鏈及由 HLA-DR1 β *1501 基因編碼之 β 鏈。任何適合之 HLA-DR 序列涵蓋於本文中，例如人類群體中所展現之多型變異體、具有一或多個保守性或非保守性胺基酸修飾之序列等。

【0084】 在一些具體例中，人類或人類化 MHC II α 及/或 β 多肽可由已知與共同人類疾病相關之 HLA 對偶基因之核苷酸序列或其部分編碼。此類 HLA 對偶基因包括(但不限於)HLA-DRB1*0401、HLA-DRB1*0301、HLA-DQA1*0501、HLA-DQB1*0201、HLA-DRB1*1501、HLA-DRB1*1502、HLA-DQB1*0602、HLA-DQA1*0102、HLA-DQA1*0201、HLA-DQB1*0202、HLA-DQA1*0501 及其組合。對於 HLA 對偶基因/疾病相關性之總結，

參見 Bakker 等人，(2006)，同前文獻，其以全文引用之方式併入本文中。

【0085】 在其他具體例中，本發明之非人類動物，例如嚙齒類動物，例如大鼠或小鼠包含(例如，在內源性 $\beta 2$ 微球蛋白基因座)處編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列。 $\beta 2$ 微球蛋白或 MHC I 類蛋白質之輕鏈(亦縮寫為「 $\beta 2M$ 」)為主要起作用以使 MHC I α 鏈穩定的較小的(12 kDa)非糖基化蛋白質。人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白動物之產生詳細描述於美國專利第 9,615,550 號中，該專利以全文引用之方式併入本文中。

【0086】 在一些具體例中，編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之核苷酸序列可包含與僅人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之部分(例如，幫助使人類(化) MHC I 分子穩定的至少一部分)相對應的核苷酸殘基。在一些具體例中，編碼人類 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之包含全部人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因。可替代地，在一些具體例中，核苷酸序列可包含編碼人類 $\beta 2$ 微球蛋白蛋白質之胺基酸 21-119 中所闡述之胺基酸序列(亦即，與成熟人類 $\beta 2$ 微球蛋白相對應之胺基酸殘基)的核苷酸殘基。在一替代實施例中，核苷酸序列可包含編碼人類 $\beta 2$ 微球蛋白蛋白質之胺基酸 23-115 中所闡述之胺基酸序列(例如人類 $\beta 2$ 微球蛋白蛋白質之胺基酸 23-119 中所闡述之胺基酸序列)的核苷酸殘基。人類 $\beta 2$ 微球蛋白之核酸序列及胺基酸序列描述於中 Gussow 等人，(1987) *The $\beta 2$ -Microglobulin Gene. Primary Structure and Definition of the Transcriptional Unit, J. Immunol.* 139:3131-38 中，該文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0087】 因此，在一些具體例中，人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽可包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之胺基酸 23-115 中所闡述之胺基酸序列，例如人類 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之胺基酸 23-119 中所闡述之胺基酸序列，例如人類 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之胺基酸 21-119 中所闡述之胺基酸序列。可替代地，人類 $\beta 2$ 微球蛋白可包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之胺基酸 1-119。

【0088】 在一些具體例中，編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 至外顯子 4 中所闡述之核

核苷酸序列。可替代地，核苷酸序列包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4 中所闡述之核苷酸序列。在此具體例中，外顯子 2、3 及 4 中所闡述之核苷酸序列可操作地連接以允許基因之正常轉錄及轉譯。因此，在一個具體例中，人類序列包含與人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 至外顯子 4 相對應之核苷酸序列。在一特定具體例中，人類序列包含與人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 4 之後約 267 bp 的外顯子 2 相對應之核苷酸序列。在一特定具體例中，人類序列包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之約 2.8 kb。

【0089】 因此，在一些具體例中，人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽可由包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白之外顯子 2 至外顯子 4 中所闡述之核苷酸序列的核苷酸序列(例如，與人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 至外顯子 4 相對應的核苷酸序列)編碼。可替代地，在一些具體例中，多肽可由包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4 中所闡述之核苷酸序列的核苷酸序列編碼。在一特定具體例中，人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽由與人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 4 之後約 267 bp 的外顯子 2 相對應之核苷酸序列編碼。在另一特定具體例中，人類或人類化多肽由包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之約 2.8 kb 的核苷酸序列編碼。由於 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 4 含有 5'非轉譯區，所以人類或人類化多肽可由包含 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 及 3 的核苷酸序列編碼。

【0090】 另外，在一些具體例中，包含編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白蛋白質之核苷酸序列的非人類動物亦包含非人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 1 中所闡述之核苷酸序列。因此，在一特定具體例中，非人類動物在其基因組中包含編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列，其中核苷酸序列包含非人類 $\beta 2$ 微球蛋白之外顯子 1 及人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4。因此，人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽由非人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 1 及人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4(例如，人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 及 3)編碼。

【0091】 在一些具體例中，編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列位於內源性非人類動物 $\beta 2$ 微球蛋白基因座處。在一些具體例

中，人類 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列替換內源性非人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因座處之編碼內源性非人類 $\beta 2$ 微球蛋白的對應核苷酸序列。舉例而言，在一些具體例中，與人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 至外顯子 4 相對應的核苷酸序列替換內源性小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白基因座處之與小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 至外顯子 4 相對應的內源性小鼠序列(參見圖 1C)。在一些具體例中，包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4 中所闡述之核苷酸序列的核苷酸序列替換小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4 中所闡述之核苷酸序列等。

【0092】 在一些具體例中，編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列不破壞內源性非人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因座，例如位於異位基因座，例如 ROSA26 基因座處。

【0093】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在其基因組中在異位基因座(例如 ROSA26 基因座)處包含第一核苷酸序列及/或第二核苷酸序列，其中第一核苷酸序列編碼包含視情況與人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白(或其部分)可操作地連接(例如稠合)的 HLA I 類分子之功能性肽結合部分(例如，人類 MHC I 類分子之至少 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域)的單鏈多肽，且其中第二核苷酸序列編碼包含 HLA II 類分子之功能性肽結合部分(例如，人類 MHC II 類分子之至少 $\alpha 1$ 及 $\beta 1$ 結構域)的單鏈多肽。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包含例如異位基因座處之編碼單鏈多肽的第一核苷酸序列，該單鏈多肽包含與人類 $\beta 2$ 微球蛋白稠合的人類 HLA-A2 多肽(例如，全長成熟 HLA-A2 多肽)之至少功能性肽結合部分(參見例如，圖 2)。在一些具體例中，包含與人類 $\beta 2$ 微球蛋白稠合之人類 HLA-A2 多肽(例如，全長成熟 HLA-A2 多肽)之至少功能性肽結合部分的單鏈多肽包含 SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:23 所闡述之胺基酸序列。在一些具體例中，如本文所描述之經基因修飾之非人類動物在異位基因座(例如 ROSA26 基因座)處包含編碼人類(化) MHC I 類分子之核苷酸序列，該人類(化) MHC I 類分子包含與人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白稠合的人類 HLA-A2 分子之至少功能性肽結合部分，例如 SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22

所闡述之核苷酸序列或其簡併變異體。在一些具體例中，如本文所描述之經基因修飾之非人類動物在異位基因座(例如 ROSA26 基因座)處包含編碼嵌合 MHC 多肽，例如如 SEQ ID NO:24 所闡述之 HLA-A2/H2-K 多肽的核苷酸序列。

【0094】 一般技術者將理解儘管一些具體例包括特異性核苷酸及胺基酸序列以產生經基因工程改造之動物，但一或多個保守性或非保守胺基酸取代之序列，或因基因密碼之簡併而不同於本文中之具體例的序列亦考慮在本發明之範疇內。

【0095】 因此，在一些具體例中，提供表現人類(化) MHC I 類 α 多肽核酸序列之非人類動物，其中人類(化) MHC I 類 α 多肽核酸序列或其部分因基因密碼之簡併而與人類 MHC I 類 α 多肽核酸序列不同，但其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。在一特定具體例中，人類(化) MHC I 類 α 多肽核酸序列與本文例示之具體例之人類 MHC I 類 α 多肽核酸序列具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。在一個具體例中，經表現人類(化) MHC I 類 α 多肽序列包含一或多個保守取代。在一個具體例中，人類(化) MHC I 類 α 多肽序列包含一或多個非保守取代。

【0096】 另外，在一些具體例中，提供表現人類(化) β 2 微球蛋白序列之非人類動物，其中人類(化) β 2 微球蛋白序列或其部分因基因密碼之簡併而與人類 β 2 微球蛋白序列不同，但其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。在一特定具體例中，人類(化) β 2 微球蛋白序列與本文中例示之具體例之人類 β 2 微球蛋白序列具有至少 90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。在一個具體例中，人類(化) β 2 微球蛋白序列包含一或多個保守取代。在一個具體例中，人類(化) β 2 微球蛋白序列包含一或多個非保守取代。

【0097】 在一些具體例中，提供表現人類(化) MHC II 類 α 多肽核酸序列之非人類動物，其中人類(化) MHC II 類 α 多肽核酸序列或其部分因基因密碼之簡併而與人類 MHC I 類 α 多肽核酸序列不同，但其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。在一個具

體例中，經表現人類(化) MHC II 類 α 多肽序列包含一或多個保守取代。在一個具體例中，人類(化) MHC II 類 α 多肽序列包含一或多個非保守取代。

【0098】 在一些具體例中，提供表現人類(化) MHC II 類 β 多肽核酸序列之非人類動物，其中人類(化) MHC II 類 β 多肽核酸序列或其部分因基因密碼之簡併而與人類 MHC I 類 α 多肽核酸序列不同，但其具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。在一個具體例中，經表現人類(化) MHC II 類 α 多肽序列包含一或多個保守取代。在一個具體例中，人類(化) MHC II 類 α 多肽序列包含一或多個非保守取代。

【0099】 在一些具體例中，非人類動物對於第一、第二及/或第三核苷酸序列為異型組合的，其中之每一者編碼選自由以下組成之群的不同人類或人類化 MHC 多肽：人類或人類化 MHC II α 多肽、人類或人類化 MHC II β 多肽及人類或人類化 MHC I α 多肽，或其部分。在一些具體例中，非人類動物對於第一、第二及/或第三核苷酸序列為純合的，其中之每一者編碼選自由以下組成之群的不同人類或人類化 MHC 多肽：人類或人類化 MHC II α 多肽、人類或人類化 MHC II β 多肽及人類或人類化 MHC I α 多肽，或其部分。

人類或人類化 B 細胞免疫反應

【0100】 除包含第一、第二及/或第三核苷酸序列(其中之每一者編碼選自由以下組成之群的不同人類或人類化 MHC 多肽：人類或人類化 MHC II α 多肽、人類或人類化 MHC II β 多肽及人類或人類化 MHC I α 多肽，或其部分)以外之經基因修飾之非人類動物例如亦包含人類或人類化免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈基因座，以使得非人類動物能夠提供包含人類或人類化抗原結合域，例如人類或人類化可變域之人類或人類化抗原結合蛋白。

【0101】 包含人類可變區基因區段之免疫球蛋白基因座為此項技術中已知的且可發現於例如美國專利 第 5,633,425 號；第 5,770,429

號；第 5,814,318 號；第 6,075,181 號；第 6,114,598 號；第 6,150,584 號；第 6,998,514 號；第 7,795,494 號；第 7,910,798 號；第 8,232,449 號；第 8,502,018 號；第 8,697,940 號；第 8,703,485 號；第 8,754,287 號；第 8,791,323 號；第 8,809,051 號；第 8,907,157 號；第 9,035,128 號；第 9,145,588 號；第 9,206,263 號；第 9,447,177 號；第 9,551,124 號；第 9,580,491 號及第 9,475,559 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中，以及美國專利 公開案 第 20100146647 號；第 20110195454 號；第 20130167256 號；第 20130219535 號；第 20130326647 號；第 20130096287 號；及第 2015/0113668 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中，及 PCT 公開案 第 WO2007117410 號、第 WO2008151081 號、第 WO2009157771 號、第 WO2010039900、第 WO2011004192 號、第 WO2011123708 號及第 WO2014093908 號中，其中之每一者以引用之方式併入本文中。

【0102】 在一些具體例中，如本文所揭示之非人類動物包含除編碼人類或人類化 MHC 分子之核苷酸序列以外的經外源引入之完全人類免疫球蛋白轉基因，該轉基因能夠在小鼠之前驅體 B 細胞中重排(Alt 等人，1985，*Immunoglobulin genes in transgenic mice*，*Trends Genet*1:231-236；以全文引用之方式併入本文中)。在此等具體例中，完全人類免疫球蛋白轉基因可(隨機地)插入且內源性免疫球蛋白基因亦可剔除(Green 等人，1994，*Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs*，*Nat Genet* 7:13-21；Lonberg 等人，1994，*Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications*，*Nature* 368:856-859；Jakobovits 等人，2007，*From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice*，*Nat Biotechnol* 25:1134-1143；該等公開案中之每一者以全文引用之方式併入本文中)，例如其中內源性免疫球蛋白重鏈及 κ 輕鏈基因座例如藉由靶向刪除各內源性基因座之較小但關鍵的部分，接著引入人類免疫球蛋白基因座作為隨機整合的較大轉基因或袖珍染色體而失活

(Tomizuka 等人，2000, Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies, PNAS USA 97:722-727；以全文引用之方式併入本文中)。

【0103】 在一些具體例中，人類或人類化免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座分別位於內源性免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座處。先前已描述用於小鼠生殖系免疫球蛋白可變基因座經人類生殖系免疫球蛋白可變基因座之大規模原位基因替換同時保持小鼠產生後代之能力的方法。參見，例如，美國專利第 6,596,541 號及第 8,697,940 號，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。特定言之，描述小鼠重鏈及 κ 輕鏈免疫球蛋白可變基因兩者之六兆鹼基經其人類對應物精確替換同時保留完整的小鼠恆定區。因此，已形成其全部生殖系免疫球蛋白可變基因譜經等效人類生殖系免疫球蛋白可變序列精確替換同時保持小鼠恆定區的小鼠。人類可變區連接至小鼠恆定區以形成在生理學地適當層級上重排且表現的嵌合人類-小鼠免疫球蛋白基因座。所表現之抗體為「逆向嵌合體」，亦即，其包含人類可變區序列及小鼠恆定區序列。具有表現具有人類或人類化可變區之抗體的人類化免疫球蛋白可變區及小鼠恆定區的此等小鼠稱為 VELOCIMMUNE®小鼠。

【0104】 VELOCIMMUNE®人類化小鼠呈現基本上與野生型小鼠之全功能體液免疫系統不可區分的全功能體液免疫系統。其在 B 細胞發展之所有階段顯示正常的細胞群。其呈現正常的淋巴器官形態學。VELOCIMMUNE®小鼠之抗體序列正常的 V(D)J 重排及正常的體細胞超突變頻率。此等小鼠種之抗體群反映由正常的類別切換產生之同種型分佈(例如，正常的同種型順式切換)。使 VELOCIMMUNE®小鼠免疫產生穩固的體液免疫反應，該免疫反應產生大規模的適用作治療候選物的具有人類免疫球蛋白可變域之不同抗體譜系。此平台提供用於製造醫藥學上可接受之抗體及其他抗原結合蛋白的自然親和力成熟的人類免疫球蛋白可變區序列的充裕來源。亦展示甚至單一內源性 V_H 基因區段經人類 V_H 基因區段之替換可導致包含人類化免疫球蛋白

可變域之免疫反應。參見，例如，Tien 等人，(2016) Cell 166:1471-84；以全文引用之方式併入本文中。小鼠免疫球蛋白可變序列經人類免疫球蛋白可變序列之精確替換使得人類免疫球蛋白可變序列以允許製造 VELOCIMMUNE® 小鼠之逆向嵌合方式與內源性非人類恆定區基因序列可操作地連接。

【0105】 以逆向嵌合方式修飾之小鼠包括經修飾以在內源性免疫球蛋白基因座處包含人類(化)可變區(例如，包含(D)、J 及一或多個人類 V 區段)的小鼠，該人類(化)可變區可操作地連接至內源性恆定區，例如

(a) 在內源性重鏈基因座處：

(i) 未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區可操作連接至內源性重鏈恆定區，其中未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區包含複數個未經重排人類重鏈可變區 V_H 基因區段(例如，所有功能性人類未經重排人類 V_H 基因區段)、一或多個未經重排免疫球蛋白重鏈 D_H 基因區段及一或多個未經重排免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段，

視情況其中一或多個未經重排免疫球蛋白重鏈 D_H 基因區段及一或多個未經重排免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段為一或多個未經重排人類免疫球蛋白重鏈 D_H 基因區段(例如，所有功能性人類 D_H 基因區段)及/或一或多個未經重排人類免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段(例如，所有功能性人類 J_H 基因區段)；

(ii) 受限的未經重排人類(化)重鏈可變區可操作連接至內源性重鏈恆定區，其中受限的未經重排人類(化)重鏈可變區基本上由與一或多個未經重排免疫球蛋白 D_H 重鏈基因區段及一或多個未經重排免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段可操作地連接之單一未經重排人類重鏈可變區 V_H 基因區段組成，視情況其中一或多個未經重排免疫球蛋白 D_H 重鏈基因區段及一或多個未經重排免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段分別為一或多個未經重排人類免疫球蛋白重鏈基 D_H 因區段及/或一或多個未經重排人類免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段；

(iii) 包含重排人類(化)重鏈可變區序列之共同重鏈編碼序列可操作連接至內源性重鏈恆定區，其中重排人類(化)重鏈可變區序列包含與免疫球蛋白重鏈 D_H 基因區段重排之人類重鏈可變區 V_H 基因區段，其與免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段重排，

視情況其中免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段或免疫球蛋白重鏈 D_H 基因區段分別為人類免疫球蛋白重鏈 D_H 基因區段及/或人類免疫球蛋白重鏈 J_H 基因區段；

(iv) 經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區可操作連接至內源性重鏈恆定區，其中經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區包含未經重排免疫球蛋白重鏈可變基因序列，該未經重排免疫球蛋白重鏈可變基因序列在互補決定區 3 (CDR3)編碼序列中包含至少一個非組胺酸密碼子經組胺酸密碼子之取代或至少一個組胺酸密碼子之插入；

(v) 包含未經重排人類(化)重鏈可變區之僅重鏈免疫球蛋白編碼序列可操作連接至內源性重鏈恆定區，其中內源性重鏈恆定區包含(1)編碼與輕鏈締合之 IgM 同種型的完整內源性 IgM 基因及(2)缺少編碼功能性 CH1 結構域之序列的非 IgM 基因，例如 IgG 基因，其中非 IgM 基因編碼缺少 CH1 結構域之非 IgM 同種型，該 CH1 結構域能夠與輕鏈恆定域共價締合；或

(vi) 編碼雜合免疫球蛋白鏈之未經重排人類(化)雜合重鏈序列，其中未經重排人類(化)雜合重鏈序列包含未經重排人類輕鏈可變(V_L)及可操作連接至內源性重鏈恆定區之未經重排連接(J_L)基因區段，

視情況其中內源性重鏈恆定區包含(1)編碼與輕鏈締合之 IgM 同種型之完整內源性 IgM 基因及(2)缺少編碼功能性 CH1 結構域之序列的非 IgM 基因，例如 IgG 基因，其中非 IgM 基因編碼缺少 CH1 結構域之非 IgM 同種型，該 CH1 結構域能夠與輕鏈恆定域共價締合；

及/或

(b) 在內源性輕鏈基因座處：

(i) 未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區可操作連接至內源性輕鏈恆定區，其中未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區包含複數個未經重排人類輕鏈可變區 V_L 基因區段(例如，所有功能性人類未經重排人類 V_L 基因區段)及一或多個未經重排免疫球蛋白輕鏈 J_L 基因區段，

視情況其中一或多個未經重排免疫球蛋白輕鏈 J_L 基因區段為一或多個未經重排人類免疫球蛋白輕鏈 J_L 基因區段(例如，所有功能性人類 J_{HL} 基因區段)，

視情況其中內源性免疫球蛋白輕鏈基因座為內源性免疫球蛋白輕鏈 κ (κ)基因座，未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區包含人類可變 κ ($V\kappa$)及連接 κ ($J\kappa$)基因區段，且其中內源性輕鏈恆定區為內源性 κ 鏈恆定區序列及/或其中內源性免疫球蛋白輕鏈基因座為內源性免疫球蛋白輕鏈 λ (λ)、未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區包含人類可變 λ ($V\lambda$)及連接 λ ($J\lambda$)基因區段，且內源性輕鏈恆定區為內源性 λ 鏈恆定區序列，視情況其中內源性免疫球蛋白輕鏈 λ 基因座包含(a)一或多個人類 $V\lambda$ 基因區段、(b)一或多個人類 $J\lambda$ 基因區段，及(c)一或多個人類 $C\lambda$ 基因區段，其中(a)及(b)可操作地連接至(c)及嚙齒類動物免疫球蛋白輕鏈恆定 $C\lambda$) 基因區段，且其中內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座進一步包含：一或多個嚙齒類動物免疫球蛋白 λ 輕鏈強化子($E\lambda$)，及一或多個人類免疫球蛋白 λ 輕鏈強化子($E\lambda$)，視情況包含三個人類 $E\lambda$ ；

(ii) 包含重排人類(化)輕鏈可變區序列之共同輕鏈編碼序列可操作連接至內源性輕鏈恆定區，其中重排人類(化)輕鏈可變區序列包含與免疫球蛋白輕鏈 J_L 基因區段重排的人類輕鏈可變區 V_L 基因區段；

(iii) 受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區可操作連接至內源性輕鏈恆定區，其中受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區包含可操作地連接至一或多個未經重排人類免疫球蛋白輕鏈連接(J_L)基因

區段的不超過兩個未經重排人類免疫球蛋白輕鏈可變(V_L)基因區段；

(iv) 經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區可操作連接至內源性輕鏈恆定區，其中經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區包含未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變基因序列，該未經重排免疫球蛋白輕鏈可變基因序列在互補決定區 3 (CDR3)編碼序列中包含至少一個非組胺酸密碼子經組胺酸密碼子之取代或至少一個組胺酸密碼子之插入；或

(v) 經組胺酸修飾之重排人類(化)輕鏈可變區可操作連接至內源性輕鏈恆定區，其中經組胺酸修飾之重排人類(化)輕鏈可變區包含重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變基因序列，該重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變基因序列在互補決定區 3 (CDR3)編碼序列中包含至少一個非組胺酸密碼子經組胺酸密碼子之取代或至少一個組胺酸密碼子之插入，

視情況其中小鼠進一步包含

(i) 人類(化)免疫球蛋白重鏈基因座，其包含功能性 ADAM6 基因以使得小鼠展現非人類動物之野生型生育力；及/或

(ii) 用於增加抗原受體多樣性之外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)基因，視情況使得至少 10%之重排可變區基因包含非模板添加物，

在前文已描述。參見，例如，美國專利第 8,697,940 號；第 8,754,287 號；第 9,204,624 號；第 9,334,334 號；第 9,801,362 號；第 9,332,742 號；及第 9,516,868 號；及美國專利公開案 20110195454、20120021409、20120192300、20130045492、20150289489、20180125043、20180244804；PCT 公開案第 WO2017210586 號及第 WO2011163314 號；Lee 等人，(2014) *Nature Biotechnology* 32:356，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0106】 在一些具體例中，本發明包括經基因修飾之非人類動物，其基因組，例如生殖系基因組包含：

包含免疫球蛋白重鏈可變區之內源性免疫球蛋白基因座，該免疫球蛋白重鏈可變區包含人類 V_H 基因區段、人類 D_H 基因區段及人類 J_H 基因區段，其中免疫球蛋白重鏈可變區可操作地連接至恆定區，及/或

包含免疫球蛋白輕鏈可變區之內源性鏈基因座，該免疫球蛋白輕鏈可變區包含人類 V_L 基因區段及人類 J_L 基因區段，其中免疫球蛋白輕鏈可變區可操作地連接至恆定區。

【0107】 在一些具體例中，本發明包括經基因修飾之非人類動物，其基因組，例如生殖系基因組包含：

包含免疫球蛋白重鏈可變區之內源性免疫球蛋白重鏈基因座，該免疫球蛋白重鏈可變區包含人類 V_H 基因區段、人類 D_H 基因區段及人類 J_H 基因區段，其中免疫球蛋白重鏈可變區可操作地連接至恆定區，及/或

包含免疫球蛋白輕鏈可變區之內源性免疫球蛋白輕鏈基因座，該免疫球蛋白輕鏈可變區包含人類 V_L 基因區段及人類 J_L 基因區段，其中免疫球蛋白輕鏈可變區可操作地連接至恆定區。

【0108】 在一些具體例中，非人類動物，例如嚙齒類動物，例如大鼠或小鼠，除編碼人類或人類化 MHC 之核苷酸序列以外，在其基因組中包含：在內源性免疫球蛋白重鏈基因座處一或多個內源性 V_H 、 D_H 及 J_H 區段經一或多個人類 V_H 、 D_H 及 J_H 區段之替換，其中一或多個人類 V_H 、 D_H 及 J_H 區段可操作地連接至內源性免疫球蛋白重鏈基因；且視情況未經重排或重排人類 V_L 及人類 J_L 區段可操作地連接至例如在內源性非人類輕鏈基因座處的非人類(例如嚙齒類動物，例如小鼠或大鼠)或人類免疫球蛋白輕鏈恆定(C_L)區基因，以使得非人類動物對於人類或人類化 MHC 分子耐受且產生對免疫原(例如，抗原性 pMHC 複合物)起反應的逆向嵌合抗體。

【0109】 在某些具體例中，表現人類或人類化 MHC 分子且對其耐受的經基因修飾之非人類動物在其基因組(例如生殖系基因組)中亦包含含有免疫球蛋白可變區(其包含一或多個未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段)及免疫球蛋白恆定區(其包含免疫球蛋白恆定區基

因)之免疫球蛋白基因座(外源性或內源性)且其中一或多個未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段可操作地連接至免疫球蛋白恆定區基因。在一些具體例中，表現人類或人類化 MHC 分子且對其耐受的非人類動物在其基因組(例如生殖系基因組)中包含多個此類免疫球蛋白基因座。舉例而言，在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物在其基因組(例如生殖系基因組)中包含編碼人類或人類化 MHC 分子之核苷酸序列及一或多個免疫球蛋白基因座(包括經基因修飾之重排或未經重排免疫球蛋白基因座)以使得小鼠產生人類、人類化、部分人類及/或逆向嵌合(人類可變及非人類恆定區)抗體。

【0110】 一般而言，經基因修飾之免疫球蛋白基因座包含可操作地連接至免疫球蛋白恆定區的免疫球蛋白可變區(包含免疫球蛋白可變區基因區段)。在一些具體例中，經基因修飾之免疫球蛋白基因座包含可操作地連接至重鏈恆定區基因的一或多個人類未經重排免疫球蛋白重鏈可變區基因區段。在一些具體例中，經基因修飾之免疫球蛋白基因座包含可操作地連接至重鏈恆定區基因的人類未經重排免疫球蛋白輕鏈(例如 κ)基因區段，參見例如美國專利第 9,516,868 號，其以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，經基因修飾之免疫球蛋白基因座包含可操作地連接至 κ 鏈恆定區基因的人類未經重排免疫球蛋白重鏈可變區基因區段。在一些具體例中，經基因修飾之免疫球蛋白基因座包含可操作地連接至 κ 鏈恆定區基因的人類未經重排免疫球蛋白可變區 κ 基因區段。在一些具體例中，經基因修飾之免疫球蛋白基因座包含可操作地連接至 κ 鏈恆定區基因的人類未經重排免疫球蛋白可變區 λ 基因區段。在一些具體例中，經基因修飾之免疫球蛋白基因座包含可操作地連接至 λ 鏈恆定區基因的人類未經重排免疫球蛋白可變區 λ 基因區段。

【0111】 在某些具體例中，非人類動物在內源性重鏈基因座處包含可操作連接至內源性重鏈恆定區的未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區，其中免疫球蛋白可變區含有一或多個未經重排人類 Ig 重鏈可變區基因區段。在一些具體例中，一或多個未經重排人類 Ig 可變區

基因區段包含至少一個人類免疫球蛋白重鏈可變(V_H)區段、一或多個免疫球蛋白重鏈多樣性(D_H)區段(視情況一或多個未經重排人類 D_H 區段)及一或多個免疫球蛋白重鏈連接(J_H)區段(視情況一或多個未經重排人類 J_H 區段)。在一些具體例中，未經重排人類 Ig 可變區基因區段包含複數個未經重排人類 V_H 區段、一或多個未經重排 D_H 區段及一或多個未經重排(人類) J_H 區段。在一些具體例中，未經重排人類 Ig 可變區基因區段包含至少 3 個 V_H 基因區段、至少 18 個 V_H 基因區段、至少 20 個 V_H 基因區段、至少 30 個 V_H 基因區段、至少 40 個 V_H 基因區段、至少 50 個 V_H 基因區段、至少 60 個 V_H 基因區段、至少 70 個 V_H 基因區段，或至少 80 個 V_H 基因區段。在一些具體例中，未經重排人類 Ig 基因區段包括所有功能性人類 D_H 基因區段。在一些具體例中，未經重排人類 Ig 基因區段包括所有功能性人類 J_H 基因區段。提供包含 Ig 重鏈基因區段之例示性可變區，例如 Macdonald 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111 :5147-52 及補充信息中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0112】 在一些具體例中，本文中所提供之非人類動物在內源性重鏈基因座處包含可操作連接至包含至少一個非人類 IgM 基因之內源性重鏈恆定區的受限的未經重排人類(化)重鏈可變區，其中受限的未經重排人類(化)重鏈可變區之特徵在於單一人類 V_H 基因區段、複數個 D_H 基因區段(例如，人類 D_H 基因區段)及複數個 J_H 基因區段(例如人類 J_H 基因區段)，其中受限的免疫球蛋白重鏈基因座能夠重排且形成複數個不同的重排，其中各重排衍生自單一人類 V_H 基因區段、 D_H 區段中之一者及 J_H 區段中之一者，且其中各重排編碼不同的重鏈可變域(例如，如美國專利公開案第 20130096287 號中所描述，其以全文用之方式併入本文中)。在一些具體例中，單一人類 V_H 基因區段為 V_H1-2 或 V_H1-69 。

【0113】 在一些具體例中，非人類動物在內源性輕鏈基因座處包含可操作連接至內源性輕鏈恆定區的未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區。在一些具體例中，未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區含有未經重排人類 Ig κ 可變區基因區段。在一些具體例中，未經重排

人類(化)免疫球蛋白可變區包含複數個未經重排人類 V_{κ} 區段及一或多個未經重排人類 J_{κ} 區段。在一些具體例中，未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段包括所有人類 J_{κ} 區段。在一些具體例中，免疫球蛋白可變區基因區段包含四個 V_{κ} 功能性區段及所有人類 J_{κ} 區段。在一些具體例中，免疫球蛋白可變區基因區段包含 16 個功能性 V_{κ} 區段及所有人類 J_{κ} 區段(例如，所有功能性人類 V_{κ} 區段及 J_{κ} 區段)。在一些具體例中，未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段包含所有人類 V_{κ} 區段及所有人類 J_{κ} 區段。提供包含 $Ig \kappa$ 基因區段之例示性可變區，例如 Macdonald 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 :5147-52 及補充信息中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0114】 在一些具體例中，可操作連接至內源性輕鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區之特徵在於未經重排人類(化)輕鏈可變區包含不超過兩個人類 V_L 基因區段及複數個 J_L 基因區段(例如，雙輕鏈小鼠或 DLC，如美國專利案第 9,796,788 號中所描述，其以全文引用之方式併入本文中)。在一些具體例中， V_L 基因區段為 V_{κ} 基因區段。在一些具體例中， V_L 基因區段為 V_{λ} 基因區段。在一些具體例中， V_{κ} 基因區段為 $IGKV3-20$ 及 $IGKV1-39$ 。在一些具體例中，非人類動物包含恰好兩個未經重排人類 V_{κ} 基因區段及在小鼠之內源性 κ 輕鏈基因座處可操作地連接至小鼠輕鏈恆定區的五個未經重排人類 J_{κ} 基因區段，視情況其中恰好兩個未經重排人類 V_{κ} 基因區段為人類 $V_{\kappa}1-39$ 基因區段及人類 $V_{\kappa}3-20$ 基因區段，其中五個未經重排人類 J_{κ} 基因區段為人類 $J_{\kappa}1$ 基因區段、人類 $J_{\kappa}2$ 基因區段、人類 $J_{\kappa}3$ 基因區段、人類 $J_{\kappa}4$ 基因區段及人類 $J_{\kappa}5$ 基因區段，其中未經重排人類 κ 輕鏈基因區段能夠重排且編碼抗體之人類可變域，且視情況另外其中非人類動物不包含能夠重排以形成免疫球蛋白輕鏈可變區的內源性 V_{κ} 基因區段。

【0115】 在某些具體例中，可操作連接至內源性輕鏈恆定區的未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區含有未經重排人類 $Ig\lambda$ 可變區基因區段。在一些具體例中，未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段包含複數個人類 V_{λ} 區段及一或多個人類 J_{λ} 區段。在一些實施例中，

未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段包含一或多個人類 V λ 區段、一或多個人類 J λ 區段及一或多個人類 C λ 恆定區序列。在一些具體例中，未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段包含所有人類 V λ 區段。在一些具體例中，未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段包含所有人類 J λ 區段。提供包含 Ig λ 基因區段的例示性可變區，例如美國專利 第 9,035,128 號及第 6,998,514 號，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，可操作連接至內源性輕鏈恆定區的未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區包含(a)一或多個人類 V λ 基因區段、(b)一或多個人類 J λ 基因區段及(c)一或多個人類 C λ 基因區段，其中(a)及(b)可操作地連接至(c)及內源性(例如，嚙齒類動物) C λ 基因區段，且其中內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈進一步包含：一或多個嚙齒類動物免疫球蛋白 λ 輕鏈強化子(E λ)及一或多個人類免疫球蛋白 λ 輕鏈強化子(E λ)，視情況包含三個人類 E λ 。

【0116】 在某些具體例中，可操作連接至內源性輕鏈恆定區的未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區包含可操作地連接至內源性(例如，嚙齒類動物大鼠或小鼠) C κ 基因以使得非人類動物表現免疫球蛋白輕鏈的未經重排人類 Ig λ 可變區基因區段，該免疫球蛋白輕鏈包含衍生自與內源性 κ 恆定域耦合之 V λ 及 J λ 基因區段的人類 λ 可變域序列，參見例如美國專利第 9,226,484 號，其以全文引用之方式併入本文中。

【0117】 在一些具體例中，包含未經重排人類免疫球蛋白可變區基因區段之免疫球蛋白可變區亦包括人類免疫球蛋白可變區基因間序列。在一些具體例中，免疫球蛋白可變區包括非人類(例如，嚙齒類動物、大鼠小鼠) Ig 可變區基因間序列。在一些具體例中，基因間序列具有內源性物種來源。

【0118】 在一些具體例中，免疫球蛋白可變區為重排重鏈可變區(通用重鏈可變區或共同重鏈編碼序列)。在一些具體例中，重排 Ig 重鏈可變區基因為人類重排 Ig 重鏈可變區基因。例示性重排 Ig 重鏈可變區提供於美國專利公開案 第 20140245468 號及美國專利 第 9,204,624

號及第 9,930,871 號，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，包含通用重鏈可變區之非人類生物體用以產生雙特異性抗體。在一些具體例中，非人類動物在內源性免疫球蛋白重鏈基因座處包含共同重鏈編碼序列，例如可操作地連接至內源性免疫球蛋白恆定區基因序列之重排人類免疫球蛋白重鏈可變區核苷酸序列，例如可操作地連接至內源性重鏈恆定區基因序列之重排人類免疫球蛋白重鏈可變區核苷酸序列，其中重排重鏈可變區核苷酸序列編碼之 $V_H3-23/X_1X_2/J_H$ 序列，其中 X_1 為任何胺基酸，且 X_2 為任何胺基酸，其中非人類動物表現衍生自重排人類免疫球蛋白重鏈可變區核苷酸序列(例如， $V_H3-23/X_1X_2/J_H$ 基因)，例如連接至內源性重鏈恆定區基因序列，且視情況與人類免疫球蛋白輕鏈可變域同源的免疫球蛋白重鏈可變域。

【0119】 在一些具體例中，免疫球蛋白可變區為重排輕鏈可變區(通用輕鏈可變區)。在一些具體例中，重排 Ig 輕鏈可變區基因為人類重排 Ig 輕鏈可變區基因。例示性重排 Ig 輕鏈可變區提供於例如美國專利第 9,969,814 號；第 10,130,181 號及第 10,143,186 號及美國專利公開案第 20120021409 號、第 20120192300 號、第 20130045492 號、第 20130185821 號、第 20130302836 號及第 20150313193 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，包含通用輕鏈可變區之非人類生物體(「通用輕鏈」生物體)用以產生雙特異性抗體。在一些具體例中，共同輕鏈編碼序列包含可操作地連接至內源性輕鏈恆定區的單一重排人類免疫球蛋白輕鏈 V_K/J_K 序列，其中單一重排人類免疫球蛋白輕鏈 V_K/J_K 序列為(i)包含稠合至人類 J_K5 基因區段之人類 V_K1-39 基因區段之人類 V_K1-39/J_K5 序列，或(ii)包含稠合至人類 J_K1 基因區段之人類 V_K3-20 基因區段之人類 V_K3-20/J_K1 序列。

【0120】 在一些具體例中，免疫球蛋白可變區為包括經設計以將 pH 值依賴性結合特性引入至此類非人類生物體中所產生之抗體中的組胺酸密碼子之插入及/或替換的輕鏈及/或重鏈免疫球蛋白可變區。在此類具體例中之一些中，組胺酸密碼子經插入及/或替換在編碼 CDR3

之核酸序列。不同的此類輕鏈及/或重鏈免疫球蛋白基因座提供於美國專利第 9,301,510 號；第 9,334,334 號及第 9,801,362 號及美國專利申請公開案第 20140013456 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之重排人類(化)輕鏈可變區包含包含人類 V κ 及 J κ 區段序列的單一重排人類免疫球蛋白輕鏈可變區基因序列，視情況其中 V κ 區段序列衍生自人類 V κ 1-39 或 V κ 3-20 基因區段，且其中單一重排人類免疫球蛋白輕鏈可變區基因序列包含 V κ 區段序列之至少一個非組胺酸密碼子經在選自由以下組成之群的位置處表現的組胺酸密碼子之取代：105、106、107、108、109、111 及其組合(根據 IMGT 編號)。在一些具體例中，可操作連接至內源性重鏈恆定區的經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區包含未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變基因序列，該未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變基因序列在互補決定區 3 (CDR3)編碼序列中包含至少一個非組胺酸密碼子經組胺酸密碼子之取代或至少一個組胺酸密碼子之插入。在一些具體例中，未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變包含未經重排人類 V $_H$ 、未經重排人類 D $_H$ 或合成性 D $_H$ 及未經重排人類 J $_H$ 基因區段，視情況其中未經重排人類 D $_H$ 或合成性 D $_H$ 基因區段包含至少一個非組胺酸密碼子經組胺酸密碼子之取代或至少一個組胺酸密碼子之插入。在某些具體例中，可操作連接至內源性重鏈恆定區的經組胺酸修飾之未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區包含未經重排 V $_L$ 及未經重排 V $_L$ 基因區段。在一些具體例中，經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區包含不超過兩個未經重排人類 V $_L$ (例如，不超過兩個 V κ 基因區段)及一或多個未經重排人類 J $_L$ (例如，J κ)基因區段，其中不超過兩個人類 V $_L$ 基因區段中之每一者在 CDR3 編碼序列中包含至少一個非組胺酸密碼子經組胺酸密碼子之取代或至少一個組胺酸密碼子之插入。在一些具體例中，不超過兩個未經重排人類 V κ 基因區段為各自包含非組胺酸密碼子經組胺酸密碼子之一或多個取代的人類 V κ 1-39 及 V κ 3-20 基因區段，且其中人類 V κ 及 J κ 基因區段能夠重排且人類 V κ 及 J κ 基因區段編碼在選自由以

下組成之群的位置處包含一或多個組胺酸的人類輕鏈可變域：105、106、107、108、109、111 (根據 IGMT 編號)其組合，其中一或多個組胺酸衍生自一或多個取代。

【0121】 在一些具體例中，免疫球蛋白恆定區包含重鏈恆定區基因。在一些具體例中，重鏈恆定區基因為人類重鏈恆定區基因。在一些具體例中，重鏈恆定區基因具有內源性物種來源。在一些具體例中，重鏈恆定區基因為小鼠恆定區基因或大鼠恆定區基因。在一些具體例中，恆定區基因為人類及非人類序列之混合物。舉例而言，在一些具體例中，恆定區基因編碼人類 CH1 區域及非人類(例如，內源性物種來源，小鼠、大鼠) CH2 及/或 CH3 區域。在一些具體例中，重鏈恆定區基因為 C μ 、C δ 、C γ (C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4)、C α 或 C ϵ 恆定區基因。在一些具體例中，恆定區基因為內源性恆定區基因。在一些具體例中，恆定區基因編碼突變的 CH1 區域以使得非人類動物表現僅重鏈抗體(參見，例如美國專利第 8,754,287 號、美國專利申請公開案第 2015/0289489 號，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。在一些具體例中，例如在目標為產生製造雙特異性抗體之重鏈(例如，在通用或雙輕鏈生物體中)時，重鏈之 Fc 結構域包含修飾以促進重鏈雜二聚體形成及/或抑制重鏈均二聚體形成。此類修飾提供於例如美國專利第 5,731,168 號；第 5,807,706 號；第 5,821,333 號；第 7,642,228 號及第 8,679,785 號以及美國專利 公開案 第 2013/0195849 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0122】 在一些具體例中，免疫球蛋白恆定區包含輕鏈恆定區基因。在一些具體例中，輕鏈恆定區基因為 κ 恆定區基因。在一些具體例中，輕鏈恆定區基因為 λ 恆定區基因。在一些具體例中，輕鏈恆定區基因具有內源性物種來源。在一些具體例中，輕鏈恆定區基因為小鼠恆定區基因或大鼠恆定區基因。在一些具體例中，輕鏈恆定區基因為人類及非人類序列之混合物。

【0123】 在一些具體例中，包含人類可變區基因區段及可變區基因區段可操作地連接之免疫球蛋白恆定區基因的免疫球蛋白可變區位

於內源性免疫球蛋白基因座處。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白基因座為內源性重鏈基因座。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白基因座為內源性 κ 基因座。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白基因座為內源性 λ 基因座。在一些具體例中，人類可變區基因區段可操作地連接之恆定區基因為內源性恆定區基因。

【0124】 在一些具體例中，本文提供之非人類動物之基因組中的內源性免疫球蛋白基因座中之一或多者或一或多個內源性基因座之部分(例如，可變區及/或恆定區)失活。內源性免疫球蛋白可變區基因座及其部分可使用此項技術中已知之任何方法失活，該方法包括(但不限於)自生物體之基因組中刪除基因座或其部分、基因座或其部分經不同核酸序列之替換、基因座之部分逆轉及/或基因座之部分移位至非人類生物體之基因組中的其他位置。在一些具體例中，基因座之失活僅為部分失活。在一些具體例中，基因座之可變區失活但恆定區仍具有功能性(例如，此係因為其可操作地連接至非內源性可變區基因區段)。

【0125】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包括失活的內源性免疫球蛋白重鏈基因座。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白重鏈基因座或其部分藉由內源性重鏈基因座之內源性可變區之至少部分的刪除、替換、移位及/或逆轉來失活。在一些具體例中，經刪除、替換、移位及/或逆轉的內源性重鏈基因座之可變區之至少部分包含可變區之 J 區段。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白重鏈基因座或其部分藉由內源性重鏈基因座之內源性恆定區之至少部分的刪除、替換、移位及/或逆轉來失活。在一些具體例中，經刪除、替換、移位及/或逆轉的內源性重鏈基因座之恆定區之至少部分包含內源性恆定區之 O_{μ} 基因。

【0126】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包括失活的內源性免疫球蛋白 κ 鏈基因座。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白 κ 鏈基因座或其部分藉由內源性 κ 鏈基因座之內源性可變區之至少部分的刪除、替換、移位及/或逆轉來失活。在一些具體例中，經刪除、替換、移位及/或逆轉的內源性 κ 鏈基因座之可變區之至少部分包含可變

區之 J 區段。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白 κ 鏈基因座或其部分藉由內源性 κ 鏈基因座之內源性恆定區之至少部分的刪除、替換、移位及/或逆轉來失活。在一些具體例中，經刪除、替換、移位及/或逆轉的內源性 κ 鏈基因座之恆定區之至少部分包含內源性恆定區之 $C\kappa$ 基因。

【0127】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包括失活的內源性免疫球蛋白 λ 鏈基因座。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白 λ 鏈基因座或其部分藉由內源性 λ 鏈基因座之內源性可變區之至少部分的刪除、替換、移位及/或逆轉來失活。在一些具體例中，內源性 λ 鏈基因座中之至少一個 V-J -C 基因叢之至少部分經刪除、替換、移位及/或逆轉。在一些具體例中，內源性免疫球蛋白 λ 鏈基因座或其部分藉由內源性 λ 鏈基因座之內源性恆定區之至少部分的刪除、替換、移位及/或逆轉來失活。在一些具體例中，經刪除、替換、移位及/或逆轉的內源性 λ 鏈基因座之恆定區之至少部分包含內源性恆定區之 C 基因。

【0128】 在各種具體例中，免疫球蛋白基因座修飾並不影響非人類動物之生育力。在一些具體例中，重鏈基因座包含功能性，例如內源性 ADAM6a 基因、ADAM6b 基因或兩者，且基因修飾不影響內源性 ADAM6a 基因、ADAM6b 基因或兩者之表現及/或功能。在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物之基因組進一步包含異位的功能性，例如內源性 ADAM6a 基因、ADAM6b 基因或兩者。表現外源性 ADAM6a 及/或 ADAM6b 之例示性非人類動物描述於美國專利 第 8,642,835 號及第 8,697,940 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0129】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物進一步包含且表現用於增加抗原受體多樣性的外源性末端去氧核苷酸轉移酶 (TdT)。表現外源性 TdT 之例示性非人類動物描述於 PCT 公開案 WO 2017210586 中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0130】 在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物包含且表現編碼人類或人類化 MHC 分子之核苷酸序列，且表現具有人類可變域 (例如，衍生自重排人類可變區基因區段 (例如，由其編碼) 的人類可變

域)之抗體，但不具有特異性結合空白人類或人類化 MHC 的抗體。在一些具體例中，人類或人類化可變域為人類或人類化重鏈可變域。在一些具體例中，抗體為僅重鏈抗體。在一些具體例中，人類或人類化可變域為人類或人類化輕鏈可變域。在一些具體例中，藉由非人類動物產生之抗體具有人類或人類化重鏈可變域及人類或人類化輕鏈可變域兩者。在一些具體例中，抗體具有人類或人類化重鏈恆定域。在一些具體例中，抗體具有人類或人類化輕鏈恆定域。在一些具體例中，重鏈及/或輕鏈恆定域具有非人類來源。舉例而言，在一些具體例中，重鏈恆定域基因具有內源性物種來源。在一些具體例中，重鏈恆定域具有小鼠或大鼠來源。在一些具體例中，輕鏈恆定域具有內源性物種來源。在一些具體例中，輕鏈恆定域具有小鼠或大鼠來源。

非人類動物、組織及細胞

【0131】 在一些具體例中，本發明之經基因修飾之非人類動物可選自由組成之群：小鼠、大鼠、兔、豬、牛(例如，母牛、公牛、水牛)、鹿、綿羊、山羊、雞、貓、狗、雪貂、靈長類(例如，狒猴、恆河猴)。對於其中不容易獲得合適的可基因修飾之 ES 細胞的非人類動物，採用其他方法製備包含該基因修飾的非人類動物。此類方法包括，例如，修飾非 ES 細胞基因組(例如，纖維母細胞或誘導的多潛能細胞)且採用細胞核轉移技術將修飾之基因組轉移至合適的細胞(例如卵母細胞)中且在合適的條件下於非人類動物中孕育該經修飾細胞(例如，經修飾之卵母細胞)以形成胚胎。

【0132】 在一個具體例中，非人類動物為哺乳類動物。在一個具體例中，非人類動物為小型哺乳動物，例如跳鼠(Dipodoidea)或鼠類(Muroidea)超級家族。在一個具體例中，經基因修飾之動物為嚙齒類動物。在一個具體例中，嚙齒類動物選自於小鼠、大鼠及倉鼠。在一個具體例中，嚙齒類動物選自於鼠類超級家族。在一個具體例中，經基因修飾之動物來自選自以下的家族：倉鼠科(Calomyscidae) (例如，類似小鼠之倉鼠)、倉鼠科(Cricetidae) (例如，倉鼠、新世界大鼠及小鼠、

田鼠)、鼠科(Muridae) (真小鼠及大鼠、沙鼠、刺狀小鼠、冠毛大鼠)、非洲攀鼠亞科(Nesomyidae) (攀爬小鼠、岩攀鼠、有尾大鼠、馬達加斯加大鼠及小鼠)、刺山鼠科(Platacanthomyidae) (例如，多刺睡鼠)及鼯形鼠科(Spalacidae) (例如，鼯鼠、竹子大鼠及鼯鼠)。在一特定具體例中，經基因修飾之嚙齒類動物選自真小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、多刺小鼠及冠毛大鼠。在一個具體例中，經基因修飾之小鼠為來自鼠科 (Muridae) 家族之一成員。在一個具體例中，非人類動物為嚙齒類動物。在一特定具體例中，嚙齒類動物選自小鼠及大鼠。在一個具體例中，非人類動物為大鼠。在一個具體例中，非人類動物為小鼠。

【0133】 在一特定具體例中，非人類動物為嚙齒類動物，其為小鼠 C57BL 品系，選自於 C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr 及 C57BL/Ola。在另一具體例中，小鼠為選自由以下品系組成之群的 129 品系：129P1、129P2、129P3、129X1、129S1 (例如，129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6 (129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2 (參見，例如，Festing 等人 (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, *Mammalian Genome* 10:836，亦參見，Auerbach 等人 (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines)。在一個具體例中，經基因修飾之小鼠為前述 129 品系及前述 C57BL/6 品系之混合。在另一特定具體例中，小鼠為前述 129 品系之混合，或前述 BL/6 品系之混合。在一特定具體例中，混合中之 129 品系為 129S6 (129/SvEvTac)品系。在另一具體例中，小鼠為 BALB 品系，例如 BALB/c 品系。在又另一具體例中，小鼠為 BALB 品系及另一種上述品系之混合。如本文所提供之非人類動物可為衍生自前述品系之任何組合的小鼠。

【0134】 在最近十年間建立了大鼠 ES 細胞中之靶向修飾對偶基因之生殖系傳遞。參見，例如，美國專利 第 20140235933 號及第 20140310828 號；Tong 等人 (2010) *Nature* 467:211-215，Tong 等人

(2011) Nat Protoc. 6(6): doi:10.1038/nprot.2011.338，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。因此，在一個具體例中，大鼠選自 Wistar 大鼠、LEA 品系、Sprague Dawley 品系、Fischer 品系、F344、F6 及 Dark Agouti。在一個具體例中，大鼠品系為選自由 Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6 及 Dark Agouti 組成之群的兩種或更多種品系之混合。

【0135】 因此，在本發明之一個具體例中，提供經基因修飾之小鼠，其中小鼠例如在其基因組中(例如在其生殖系基因組中)包含：

(a) 編碼人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列，及

(b) (未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座，視情況其中(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排，

其中經基因修飾之非人類動物表現人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分，

其中經基因修飾之非人類動物表現包含人類或人類化重鏈可變域及/或人類或人類化輕鏈可變域之免疫球蛋白，及

其中非人類動物對人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分耐受以使得其在免疫接種抗原肽-MHC (pMHC)複合物時產生特異性 B 細胞反應，該複合物包含(i)對於非人類動物為異源之肽，其與(ii)衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子，或其部分複合。

【0136】 在一些具體例中，小鼠包含編碼第一完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC II α)之第一核苷酸序列，編碼第二完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC II β)，之第二核苷酸序列及/或編碼第三完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC I)之第三核苷酸序列，及視情況編碼人類或人類化 β 2 微球蛋白之 β 2 微球蛋白基因座，及

(a) 在內源性重鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區；

(ii) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)重鏈可變區；

(iii) 共同的重鏈編碼序列；

(iv) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區；

(v) 僅重鏈免疫球蛋白編碼序列；或

(vi) 編碼雜合免疫球蛋白鏈之未經重排人類(化)雜合重鏈序列；

及/或

(b) 在內源性輕鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區；

(ii) 共同的輕鏈編碼序列；

(iii) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區；

(iv) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區；

(v) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之重排人類(化)輕鏈可變區；

視情況其中小鼠進一步包含

(i) 包含功能性 ADAM6 基因之人類(化)免疫球蛋白重鏈基因座以使得小鼠展現野生型生育力；及/或

(ii) 用於增加抗原受體多樣性之外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)基因，視情況使得至少 10%之重排可變區基因包含非模板添加物。

【0137】 除了經基因修飾之動物(例如，啮齒類動物，例如小鼠或大鼠)以外，亦提供一種組織或細胞，其中組織或細胞衍生自一些具體例之非人類動物，例如其中組織或細胞包含(a)編碼第一完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC II α)之第一核苷酸序列、編碼第二完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC II β)之第二核苷酸序列及/或編碼第三完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC I)之第三核苷酸序列及視情況編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之 $\beta 2$ 微球蛋白基因座，及(b)其中當細胞不為 B 細胞時，(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座，視情況其中(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排。

【0138】 在一些具體例中，組織或細胞表現人類或人類化 MHC 分子及人類或人類化抗原結合蛋白及/或編碼人類或人類化抗原結合蛋白之一或多個可變域的核酸，其中抗原結合蛋白特異性地結合對於衍生該組織或細胞之非人類動物而言為抗原性的 pMHC 複合物，例如其中 pMHC 複合物包含與人類 MHC (或其部分)複合之抗原肽，非人類動物對於後者通常耐受。在一些具體例中，細胞為 B 細胞。在一些具體例中，細胞為融合瘤或四合瘤(quadroma)，衍生自非人類動物分離之 B 細胞之融合物，一些具體實例，及骨髓瘤細胞。在一些具體例中，組織為抗原結合蛋白或編碼其之核酸序列，其中抗原結合蛋白特異性地結合對於衍生抗原結合蛋白之非人類動物而言為抗原性的 pMHC 複合物，例如其中 pMHC 複合物包含與人類 MHC (或其部分)複合之抗原肽，相對於後者非人類動物通常耐受。

【0139】 除了經基因工程改造之非人類動物以外，亦提供非人類胚胎(例如，啮齒類動物，例如小鼠或大鼠胚胎)，其中非人類胚胎包含可用於產生例示性具體例中之非人類動物的供體 ES 細胞(例如，啮齒類動物，例如小鼠或大鼠)。在一個具體例中，非人類胚胎包含 ES 供體細胞，該細胞包含人類或人類化 MHC I (例如，MHC I α)核苷酸序列、人類或人類化 MHC II (例如，MHC II α 及/或 MHC II β)核苷酸序

列，(未)重排人類或人類化免疫球蛋白基因座(例如，重鏈及/或輕鏈可變基因座)，及/或人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白基因序列及宿主胚胎細胞。

【0140】 在一些具體例中，非人類動物(例如，嚙齒類動物，例如大鼠或小鼠)細胞或基因組可用於產生非人類動物，例如多能細胞、胚胎莖(ES)細胞、生殖細胞等，其中細胞或基因體包含

(a) 編碼人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列，及

(b) (未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座，視情況其中(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排，

以使所得經基因修飾之非人類動物表現人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分，

以使所得經基因修飾之非人類動物表現包含人類或人類化重鏈可變域及/或人類或人類化輕鏈可變域之免疫球蛋白，及

以使所得非人類動物對人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合部分耐受以使得其在免疫接種抗原肽-MHC (pMHC)複合物時產生特異性 B 細胞反應，該複合物包含(i)對於非人類動物為異源之肽，其與(ii)衍生人類或人類化 MHC 分子之人類 HLA 分子，或其部分複合。

【0141】 在一些例示性具體例中，細胞或基因體包含編碼第一完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC II α)之第一核苷酸序列，編碼第二完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC II β)，之第二核苷酸序列及/或編碼第三完全人類或嵌合人類/鼠類 MHC 多肽(例如，MHC I)之第三核苷酸序列，及視情況編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之 $\beta 2$ 微球蛋白基因座，及

(a) 在內源性重鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區；

(ii) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)重鏈可變區；

(iii) 共同的重鏈編碼序列；

(iv) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區；

(v) 僅重鏈免疫球蛋白編碼序列；或

(vi) 編碼雜合免疫球蛋白鏈之未經重排人類(化)雜合重鏈序列；

及/或

(b)在內源性輕鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區；

(ii) 共同的輕鏈編碼序列；

(iii) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區；

(iv) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區；

(v) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之重排人類(化)輕鏈可變區；

視情況其中細胞或基因體進一步包含

(i) 包含功能性 ADAM6 基因之人類(化)免疫球蛋白重鏈基因座以使得小鼠展現野生型生育力；及/或

(ii) 用於增加抗原受體多樣性之外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)基因，使得視情況至少 10%之重排可變區基因包含非模板添加物。

【0142】 儘管以下具體例描述一種經基因工程改造之動物，其基因體包含編碼小鼠 H-2K 蛋白質之核酸序列經編碼嵌合人類/小鼠 HLA-A2/H-2K 之核酸序列的替換，但熟悉本技藝者將理解類似的策略可用於引入其他人類(化) MHC I 及 II 基因(其他 HLA-A、HLA-B 及

HLA-C；及其他 HLA-DR、HLA-DP 及 HLA-DQ 基因，例如在內源性基因座或異位基因座出，例如在 ROSA26 基因座處)。亦提供在內源性 MHC 基因座處包含多個嵌合人類/非人類(例如，人類/啮齒類動物，例如人類/小鼠) MHC I 及 MHC II 基因的此類動物。此類嵌合 MHC I 及 MHC II 蛋白質之實施例描述於美國公開案第 20130111617 號、第 20130185819 號、第 20130185820 號及第 20140245467 號以及美國專利第 8,847,005 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0143】亦提供包含本發明之具體例之非人類動物之染色體或其片段的非人類細胞。在一個具體例中，非人類細胞包含本發明之非人類動物具體例之細胞核。在一個具體例中，非人類細胞包含由細胞核傳遞之染色體或其片段。

製造經基因修飾之非人類動物

【0144】亦提供一種製造經基因工程改造之非人類動物(例如，經基因工程改造之啮齒類動物，例如小鼠或大鼠)的方法。一般而言，該方法包含修飾非人類動物之基因體(例如生殖系基因體)以包含(a)編碼第一嵌合人類/非人類 MHC 多肽之第一核酸序列、編碼第二嵌合人類/非人類 MHC 多肽之第二核酸序列、編碼第三嵌合人類/非人類 MHC 多肽之第三核酸序列及/或編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之 $\beta 2$ 微球蛋白基因座及(b)編碼人類或人類化抗體之免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座。在一些具體例中，修飾包含靶向編碼內源性 MHC 多肽細胞外域、 $\beta 2$ 微球蛋白之全部或部分及免疫球蛋白可變區的序列且分別用人類 MHC 細胞外域、人類 $\beta 2$ 微球蛋白之全部或部分及人類免疫球蛋白可變區將其替換。

【0145】在一些具體例中，修飾可包含繁殖相同物種之動物(例如配種)。在其他具體例中，修飾包含在一或多個 ES 細胞中連續同源重組。在一些具體例中，ES 細胞衍生自經基因修飾以包含所需基因修飾中之一或多者(但並非所有)的非人類動物，且此類 ES 細胞中之同源重組完成了基因修飾。在其他具體例中，修飾可包含在 ES 細胞中之育種

及同源重組之組合，例如將動物育種至同一物種之另一(或更多)動物，其中非人類動物中之一些或全部可由經由單一同源重組或連續同源重組事件進行基因修飾之 ES 細胞產生，且其中一些 ES 細胞可自包含本文中揭示之基因修飾中之一或多者的非人類動物分離。在一些具體例中，修飾包含單一 ES 細胞中之連續同源重組。

【0146】 在一些具體例中，該方法利用使用 VELOCIGENE®技術製得之靶向構築體，將該建構引入至 ES 細胞中，且使用 VELOCIMOUSE®技術將靶向之 ES 細胞純系引入至小鼠胚胎中(參見例如美國專利案第 7,294,754 號及 Poueymirou 等人(2007) *Nature Biotech* 25:91-99，該等參考中之每一者以全文引用之方式併入本文中)。靶向構築體可包含靶向帶替換之內源序列的 5'及/或 3'同源臂、插入序列(替換內源序列)及一或多個選擇卡匣。選擇卡匣為插入至靶向構築體中以便於選擇已整合所關注之構築體的細胞(例如，ES 細胞)。多個合適的選擇卡匣為此項技術中已知的。通常，選擇卡匣能夠在特定抗生素(例如，Neo、Hyg、Pur、CM、SPEC 等)存在下進行陽性選擇。另外，選擇卡匣可側接重組位點，其允許在用重組酶處理之後刪除選擇卡匣。常用之重組位點為分別藉由 Cre 及 Flp 酶認識之 *loxP* 及 *Frt*，但其他亦為此項技術中已知的。選擇卡匣可位於編碼區外部之構築體中的任何地方。在一個具體例中，選擇卡匣位於人類 DNA 片段之 5'端處。在另一具體例中，選擇卡匣位於人類 DNA 片段之 3'端處。在另一具體例中，選擇卡匣位於人類 DNA 片段內。在另一具體例中，選擇卡匣位於人類 DNA 片段之內含子內。在另一具體例中，選擇卡匣位於人類及小鼠 DNA 片段之接合點處。F0 代小鼠基本上完全衍生自供體基因靶向之 ES 細胞，從而允許即時表現型分析。獨立攜帶人類或人類化 MHC I 類基因、人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白基因及/或人類或人類化 MHC II 類基因以及人類化免疫球蛋白基因座之 VELOCIMICE® (完全衍生自供體 ES 細胞之 F0 小鼠)藉由使用對偶基因分析之修飾進行基因型分析來鑑別(Valenzuela 等人，(2003) *High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis*,

Nature Biotech. 21(6):652-659，以全文引用之方式併入本文中)，該對偶基因分析檢測此等獨特基因序列之存在。由此方法產生之異型組合小鼠可育種至純合(homozygosity)。

【0147】 在一些具體例中，包含人類或人類化 MHC I、 $\beta 2$ 微球蛋白、MHC II 分子之非人類動物與同一物種之第二非人類動物育種，其中第二非人類動物包含未經重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座。舉例而言，包含人類或人類化 MHC I、 $\beta 2$ 微球蛋白、MHC II 分子之小鼠可育種至包含以下的第二小鼠

(a) 在內源性重鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區；

(ii) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)重鏈可變區；

(iii) 共同的重鏈編碼序列；

(iv) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區；

(v) 僅重鏈免疫球蛋白編碼序列；或

(vi) 編碼雜合免疫球蛋白鏈之未經重排人類(化)雜合重鏈序列；

及/或

(b) 在內源性輕鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區；

(ii) 共同的輕鏈編碼序列；

(iii) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區；

(iv) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區；

(v) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之重排人類(化)輕鏈可變區；

視情況其中第二小鼠進一步包含

(i) 包含功能性 ADAM6 基因之人類(化)免疫球蛋白重鏈基因座以使得小鼠展現野生型生育力；及/或

(ii) 用於增加抗原受體多樣性之外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)基因，使得視情況至少 10%之重排可變區基因包含非模板添加物。

【0148】 在另一具體例中，插入人類或人類化 MHC I、MHC II 及/或 $\beta 2$ 微球蛋白之構築體參與經基因修飾以包含未經重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座之非人類動物 ES 細胞中之同源重組(在內源性 MHC I、MHC II 及/或 $\beta 2$ 微球蛋白基因座處或在異位基因座處)。可替代地，用於插入之構築體包含未經重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座參與經基因修飾以包含編碼人類或人類化 MHC I、MHC II 及/或 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列地非人類動物 ES 細胞中的同源重組。在一個具體例中，用於用編碼嵌合人類/小鼠 MHC I、MHC II 及/或 $\beta 2$ 微球蛋白之核酸序列靶向及替換內源性 MHC I、MHC II 及/或 $\beta 2$ 微球蛋白序列的構築體；或用於插入單鏈 MHC I/ $\beta 2$ 微球蛋白及/或單鏈 MHC II 蛋白質之構築體參與 ES 細胞中之同源重組，該 ES 細胞亦可包含

(a) 在內源性重鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區；

(ii) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)重鏈可變區；

(iii) 共同的重鏈編碼序列；

(iv) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)重鏈可變區；

- (v) 僅重鏈免疫球蛋白編碼序列；或
 - (vi) 編碼雜合免疫球蛋白鏈之未經重排人類(化)雜合重鏈序列；
- 及/或
- (b) 在內源性輕鏈基因座處：
- (i) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之未經重排人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區；
 - (ii) 共同的輕鏈編碼序列；
 - (iii) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之受限的未經重排人類(化)輕鏈可變區；
 - (iv) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類(化)輕鏈可變區；
 - (v) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之重排人類(化)輕鏈可變區；

視情況其中 ES 細胞進一步包含

- (i) 包含功能性 ADAM6 基因之人類(花)免疫球蛋白重鏈基因座；及/或
- (ii) 用於增加抗原受體多樣性之外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)基因以使得。

【0149】 在本發明之各種具體例中，編碼嵌合人類/非人類 MHC I 及 MHC II 多肽之序列位於內源性非人類 MHC 基因座(例如，小鼠 H-2K 及/或 H-2E 基因座)處。在一個具體例中，此導致內源性 MHC 基因或其部分經編碼人類或人類化 MHC I 多肽之核酸序列的置入，例如替換。由於編碼 MHC I、MHC II α 及 MHC II β 多肽之核酸序列彼此鄰近位於染色體上，以在一個動物中實現 MHC I 及 MHC II 兩者之人類化的最大成效，若需要，應依序靶向 MHC I 及 MHC II 基因座。因此，本文中亦提供產生包含編碼嵌合人類/非人類 MHC I、MHC II α 及 MHC II β 多肽之核酸序列的經基因修飾之非人類動物的方法。

【0150】 因此，在一些具體例中，提供用於產生包含嵌合人類/非人類 MHC 之經基因修飾之動物的核苷酸構築體。在一個具體例中，核酸構築體包含：5'及 3'非人類同源臂、包含人類 MHC 基因序列(例如，人類 HLA-A2 或人類 HLA-DR 基因序列)之人類 DNA 片段及側接重組位點之選擇卡匣。在一個具體例中，人類 DNA 片段為包含人類 MHC 基因(例如，人類 HLA-A2 或 HLA-DR2 基因)之內含子及外顯子兩者的基因體片段。在一個具體例中，非人類同源臂與非人類 MHC 基因座(例如，MHC I 或 MHC II 基因座)同源。

【0151】 在一個具體例中，5'及 3'非人類同源臂包含在內源性非人類(例如，鼠類) MHC I 類或 II 類基因座之各別 5'及 3'位置處(例如，第一前導序列之 5'及小鼠 MHC I 基因之 $\alpha 3$ 外顯子之 3'或小鼠 H-2Ab1 基因之上游及小鼠 H-2Ea 基因之下游)的基因體序列。在一個具體例中，內源性 MHC I 類基因座選自小鼠 H-2K、H-2D 及 H-2L。在一特定具體例中，內源性 MHC I 類基因座為小鼠 H-2K。在一個具體例中，內源性 MHC II 基因座選自小鼠 H-2E 及 H-2A。在一個具體例中，經工程改造之 MHC II 構築體允許小鼠 H-2E 及 H-2A 基因兩者之替換。在一個具體例中，小鼠不會自其 H-2D 基因座表現功能性內源性 MHC 多肽。在一些具體例中，小鼠經工程改造以缺乏內源性 H-2D 基因座之全部或部分。在另一具體例中，小鼠不在細胞表面上表現任何功能性內源性 MHC I 及 MHC II 多肽。在一個具體例中，細胞表面上由小鼠表現之唯一 MHC I 及 MHC II 為嵌合人類/小鼠 MHC I 及 MHC II。

【0152】 本揭示亦提供製造其基因體包含編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之 $\beta 2$ 微球蛋白基因座的經基因工程改造之非人類動物(例如，經基因工程改造之嚙齒類動物，例如小鼠或大鼠)的方法。在一個具體例中，該方法產生經基因工程改造之嚙齒類動物，例如小鼠，其基因體在內源性 $\beta 2$ 微球蛋白基因座處包含編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之核苷酸序列在一些情況下，小鼠不會自內源性小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白基因座表現功能性小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白。

【0153】亦提供用於產生經基因工程改造之非人類動物的核苷酸構築體。在一些具體例中，核苷酸構築體可包含：5'及 3'非人類同源臂、包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白序列之人類 DNA 片段，及側接重組位點之選擇卡匣。在一個具體例中，人類 DNA 片段為包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之內含子及外顯子兩者的基因體片段。在一個具體例中，非人類同源臂與非人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因座同源。基因體片段可包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4。在一種情況下，基因體片段自 5'至 3'包含：人類 $\beta 2$ 微球蛋白序列之外顯子 2、內含子、外顯子 3、內含子及外顯子 4，其全部。選擇卡匣可位於 $\beta 2$ 微球蛋白編碼區外部之構築體中的任何地方，例如其可位於人類 $\beta 2$ 微球蛋白之外顯子 4 之 3'處。5'及 3'非人類同源臂可分別包含內源性非人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之基因體序列 5'及 3'。在另一具體例中，5'及 3'非人類同源臂分別包含內源性非人類基因之基因體序列外顯子 2 之 5'及外顯子 4 之 3'。

【0154】本發明之另一具體例係關於一種修飾非人類動物(例如，嚙齒類動物，例如小鼠或大鼠)之 $\beta 2$ 微球蛋白基因座以表現人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽的方法修飾非人類動物(例如小鼠)之 $\beta 2$ 微球蛋白基因座以表現人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽的一個方法包含在內源性 $\beta 2$ 微球蛋白基因座處用編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之核苷酸序列替換編碼小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列。在此類方法之一個具體例中，非人類動物，例如小鼠不會自內源性非人類，例如小鼠 $\beta 2$ 微球蛋白基因座表現功能性 $\beta 2$ 微球蛋白多肽。在一些特定具體例中，編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之核苷酸序列包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2 至 4 中所闡述之核苷酸序列。在其他具體例中，編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽之核苷酸序列包含人類 $\beta 2$ 微球蛋白基因之外顯子 2、3 及 4 中所闡述之核苷酸序列。

【0155】本揭示亦提供製造其基因體在異位基因座(例如 ROSA26 基因座)處包含編碼單鏈 $\beta 2$ 微球蛋白/MHC 複合物之序列的經基因工程改造之非人類動物(例如，經基因工程改造之嚙齒類動物，例如小鼠或大鼠)的方法，該複合物包含人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白及人類(化)

MHCI 類 α 多肽、人類(化) MHC I 類 α 多肽及/或人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白。在一個具體例中，該方法產生其基因體在不為內源性 MHC I 或 $\beta 2$ 微球蛋白基因座之內源性基因座(例如內源性 ROSA26 基因座)處包含編碼單鏈 $\beta 2$ 微球蛋白/MHC 複合物之核苷酸序列的經基因工程改造之啮齒類動物，例如大鼠或小鼠，該複合物包含人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白及人類(化) MHC 複合物、人類(化) MHC I 類 α 多肽及/或人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白。用於靶向 ROSA 基因座之方法為此項技術中熟知的。參見，例如，Stefano Casola, *Mouse Models for miRNA expression: the ROSA26 Locus*, in *Methods in Molecular Biology* vol. 667:145-163 (S. Monticelli ed. 2010)，其以全文引用之方式併入本文中。

【0156】亦提供用於產生經基因工程改造之非人類動物的核苷酸構築體。在一些具體例中，核苷酸構築體可包含：5'及 3'非人類同源臂、編碼包含人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白及人類(化) MHC I 類 α 多肽之單鏈 $\beta 2$ 微球蛋白/MHC 複合物(例如，SEQ ID NO:23 中所闡述之單鏈 $\beta 2$ 微球蛋白/HLA-A2 複合物)之核苷酸序列及側接重組位點之選擇卡匣。在一些具體例中，核苷酸構築體可包含：5'及 3'非人類同源臂、編碼人類(化) MHC I 類 α 多肽之核苷酸序列及側接重組位點之選擇卡匣。在一些具體例中，核苷酸構築體可包含：5'及 3'非人類同源臂、編碼人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列及側接重組位點之選擇卡匣。5'及 3'非人類同源臂可包含側接內源性 ROSA26 內含子之基因體序列。

【0157】在一些具體例中，經基因修飾之非人類動物(例如，小鼠)可包含編碼人類或人類化 MHC I;人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白;人類或人類化 MHC II (例如，MHC II α 及/或 MHC II β)；及人類或人類化免疫球蛋白重鏈及輕鏈之基因的一或兩個複本。因此，在一些具體例中，對於此等基因中之任一者或所有，非人類動物可為異型組合或純合。由於修飾非人類動物以包含人類或人類 MHC I、人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白；人類或人類化 MHC II (例如，MHC II α 及/或 MHC II β)之非限制性目的為使非人類動物對人類或人類化 MHC 分子耐受，所以不需要此等基因之純合性。因此，在一些具體例中，對於編碼人類或人類化 MHC

分子之核苷酸序列，非人類動物可為異型組合的。相比之下，由於修飾非人類動物之免疫球蛋白基因座之非限制目的為產生針對所關注之抗原性 pMHC 複合物的人類或人類化抗體，在一些具體例中，對於經修飾之免疫球蛋白基因座，非人類動物可為純合的。

【0158】 在完成基因靶向後，ES 細胞或經基因修飾之非人類動物經篩檢以證實所關注之外源性核苷酸序列之成功併入或外源性多肽之表現。多種技術為熟習本技藝者已知的，且包括(但不限於)南方墨點法、長 PCR、定量 PCR(例如，使用 TAQMAN®之即時 PCR)、螢光原位雜交、北方墨點法、流式細胞量測術、西方分析、免疫細胞化學、免疫組織化學等。在一個實施例中，攜帶所關注之基因修飾之非人類動物(例如，小鼠)可藉由使用對偶基因分析之修飾篩檢小鼠對偶基因之損耗及/或人類對偶基因之增量來鑑別，該對偶基因分析描述於 Valenzuela 等人.(2003)，同前文獻中。識別經基因修飾之動物中之特定核苷酸或胺基酸序列的其他分析為熟悉本技藝者已知的。

所關注之抗原肽-MHC 複合物

【0159】 本文中所描述之對 MHC 蛋白質耐受之小鼠經免疫接種有抗原肽-MHC 複合物以產生 pMHC 特異性抗原結合蛋白。在一些具體例中，適用作抗原肽-MHC (pMHC)複合物之部分的 MHC 包括天然存在之全長 MHC 以及 MHC 之個別鏈(例如，MHC I 類 α (重鏈)鏈、 β 2 微球蛋白、MHC II 類 α 鏈及 MHC II 類 β 鏈)、MHC 之此類鏈之個別子單元(例如，MHC I 類 α 鏈之 α 1- α 3 子單元、MHC II 類 α 鏈之 α 1- α 2 子單元、MHC II 類 β 鏈之 β 1- β 2 子單元)以及其片段、突變體及各種衍生物(包括融合蛋白質)，其中此類片段、突變體及衍生物保持呈現藉由抗原特異性 TCR 識別之抗原決定子的能力。

【0160】 天然存在之 MHC 由人類染色體 6 上之基因叢編碼。MHC 包括但不限於 HLA 特異性，諸如 A (例如，A1-A74)、B (例如，B 1-B77)、C (例如，C1-C11)、D (例如，D1-D26)、DR (例如，DR1-DR8)、DQ (例如，DQ1-DQ9)及 DP (例如，DP1-DP6)。HLA 特異性包括 A1、

A2、A3、A11、A23、A24、A28、A30、A33、B7、B8、B35、B44、B53、B60、B62、DR1、DR2、DR3、DR4、DR7、DR8 及 DR 11。

【0161】天然存在之 MHC I 類分子結合衍生自以蛋白分解方式分解之蛋白質(尤其由細胞內源性合成之蛋白質)的肽。由此獲得之較小肽經轉運至內質網中，其中該等肽在通過高基氏器(Golgi apparatus)導引之前與新生 MHC I 類分子締合且呈現於細胞表面上以藉由細胞毒性 T 淋巴細胞識別。

【0162】天然存在之 MHC I 類分子由與 $\beta 2$ 微球蛋白締合之 α (重)鏈組成。重鏈由子單元 $\alpha 1$ - $\alpha 3$ 組成。 $\beta 2$ 微球蛋白蛋白質與重鏈之 $\alpha 3$ 子單元相關。在某些具體例中， $\beta 2$ 微球蛋白及 $\alpha 3$ 子單元藉由共價結合來締合。在某些具體例中， $\beta 2$ 微球蛋白及 $\alpha 3$ 子單元非共價地締合。重鏈之 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 子單元摺疊以形成待呈現且藉由 TCR 識別之肽(例如抗原決定子)溝。

【0163】I 類分子通常與長度為約 8-9 個胺基酸(例如，7-11 個胺基酸)之肽締合(例如結合)。所有人類具有三種與六種之間不同的 I 類分子，該等分子可各自結合許多不同類型的肽。

【0164】在一些具體例中，pMHC 複合物包含(i) I 類 MHC 多肽或其片段、突變體或衍生物，及視情況，(ii) $\beta 2$ 微球蛋白多肽或其片段、突變體或衍生物。在一個特定具體例中，I 類 MHC 多肽藉由肽連接子與 $\beta 2$ 微球蛋白多肽締合(例如，連接)。

【0165】在一個特定具體例中，I 類 MHC 多肽為選自由以下組成之群的人類 I 類 MHC 多肽：HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F 及 HLA-G。在另一特定具體例中，I 類 MHC 多肽為選自由以下組成之群的鼠類 I 類 MHC 多肽：H-2K、H-2D、H-2L、H2-IA、H2-IB、H2-IJ、H2-IE 及 H2-IC。

【0166】在一些具體例中，抗原性 pMHC 複合物之 MHC I 類 α 重鏈為完全人類。在一些具體例中，抗原性 pMHC 複合物之 MHC I 類 α 重鏈為人類化。人類化 MHC I 類 α 重鏈描述於例如美國專利 公開案第 2013/0111617 號、第 2013/0185819 號及第 2014/0245467 號中。在一

些具體例中，MHC I 類 α 重鏈包含人類細胞外域(人類 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及/或 $\alpha 3$ 結構域)及其他物種之細胞質域。在一些具體例中，I 類 α 重鏈多肽為 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-K 或 HLA-L。在一些具體例中，HLA-A 序列可為 HLA-A*0201 序列。在各種具體例中，肽-MHC 可包括 MHC I 類重鏈之所有結構域。

【0167】 在一些具體例中，抗原性 pMHC 複合物包含 $\beta 2$ 微球蛋白。在一些具體例中， $\beta 2$ 微球蛋白為完全人類。在一些具體例中， $\beta 2$ 微球蛋白為人類化。人類化 $\beta 2$ 微球蛋白多肽描述於例如美國專利 公開案 第 2013/0111617 號及第 2013/0185819 號中，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0168】 在一些具體例中，抗原性 pMHC 複合物之 MHC I 類分子包含人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2m$ 或 B2M)多肽中及人類(化) MHC I 類 α 重鏈中之突變以使得雙硫鍵可形成於人類(化) B2M 與人類(化) MHC I 類 α 重鏈之間。在一些具體例中，雙硫鍵連接以下殘疾對中之一者：人類(化) B2M 殘基 12、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 236；人類(化) B2M 殘基 12、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 237；人類(化) B2M 殘基 8、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 234；人類(化) B2M 殘基 10、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 235；人類(化) B2M 殘基 24、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 236；人類(化) B2M 殘基 28、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 232；人類(化) B2M 殘基 98、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 192；人類(化) B2M 殘基 99、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 234；人類(化) B2M 殘基 3、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 120；人類(化) B2M 殘基 31、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 96；人類(化) B2M 殘基 53、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 35；人類(化) B2M 殘基 60、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 96；人類(化) B2M 殘基 60、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 122；人類(化) B2M 殘基 63、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 27；人類(化) B2M 殘基 Arg3、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Gly 120；人類(化) B2M 殘基 His31、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Gln96；人類(化) B2M 殘基 Asp53、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Arg35；人類(化) B2M 殘基

Trp60、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Gln96；人類(化) B2M 殘基 Trp60、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Asp 122；人類(化) B2M 殘基 Tyr63、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Tyr27；人類(化) B2M 殘基 Lys6、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Glu232；人類(化) B2M 殘基 Gln8、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Arg234；人類(化) B2M 殘基 Tyr 10、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Pro235；人類(化) B2M 殘基 Ser11、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Gln242；人類(化) B2M 殘基 Asn24、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Ala236；人類(化) B2M 殘基 Ser28、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Glu232；人類(化) B2M 殘基 Asp98、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 His 192；人類(化) B2M 殘基 Met99、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Arg234、及/或人類(化) B2M 殘基 Arg 12、人類(化) MHC I 類 α 重鏈殘基 Gly237。參見，例如，國際專利申請公開案 WO/2015195531，其以全文引用之方式併入本文中。

【0169】 在一些具體例中，抗原決定子胺基酸序列可為可與 MHC I 類分子締合，例如由 MHC I 類分子呈現之肽的胺基酸序列。在某些具體例中，序列可包含 6 至 20 個連續胺基酸。在某些具體例中，肽序列可為蛋白質片段之序列，其中蛋白質衍生自細胞蛋白質(諸如與自體免疫性病變相關聯之蛋白質)，例如為其部分，且其中肽可結合於 MHC I 類重鏈。

【0170】 在一些具體例中，MHC 之至少一個鏈與肽經締合為融合蛋白質。在一個具體例中，MHC 及肽藉由連接子序列締合。舉例而言，單鏈分子自胺基端至羧基端可包含抗原決定子、 $\beta 2$ 微球蛋白序列及 I 類 α (重)鏈序列。可替代地，單鏈分子自胺基端至羧基端可包含抗原決定子、I 類 α (重)鏈序列及 $\beta 2$ 微球蛋白序列。先前已描述 pMHC 複合物作為單鏈三聚體之產生及用途。參見，例如，美國專利第 8,895,020 號；美國專利第 8,992,937 號；Hansen 等人，(2010) *Trends Immunol.* 31:363-69；Truscott 等人，(2007) *J. Immunol.* 178:6280-89；Mitaksov 等人，(2007) *Chem Biol* 14:909-22，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。單鏈 pMHC 複合物可進一步包含胺基端處之信號

肽序列。在某些具體例中，在肽序列與 $\beta 2$ 微球蛋白序列之間可存在連接子序列。在某些具體例中，在 $\beta 2$ 微球蛋白序列與 I 類 α (重)鏈序列之間可存在連接子序列。單鏈分子可進一步包含胺基端處之信號肽序列，以及在肽序列與 $\beta 2$ 微球蛋白序列之間延伸的第一連接子序列及/或在 $\beta 2$ 微球蛋白序列與 I 類重鏈序列之間延伸的第二連接子序列。

【0171】 在一些具體例中，單鏈 pMHC 複合物可包含在肽配位體區段與 $\beta 2$ 微球蛋白區段之間的第一可撓性連接子。舉例而言，連接子可自肽配位體區段之羧基端延伸至 $\beta 2$ 微球蛋白區段之胺基端且將肽配位體區段之羧基端連接至 $\beta 2$ 微球蛋白區段之胺基端。在一些具體例中，連接子經構築以允許經肽配位體摺疊成產生功能性 MHC-抗原肽的結合溝。在一些具體例中，此連接子可包含至少 3 個胺基酸，高達約 15 個胺基酸(例如，20 個胺基酸)。在一些具體例中，單鏈分子可包含在 $\beta 2$ 微球蛋白與 MHC I 重鏈區段之間插入的第二可撓性連接子。舉例而言，連接子可自 $\beta 2$ 微球蛋白區段之羧基端延伸至 MHC I 重鏈區段之胺基端且將 $\beta 2$ 微球蛋白區段之羧基端連接至 MHC I 重鏈區段之胺基端。在某些具體例中， $\beta 2$ 微球蛋白及 MHC I 重鏈可摺疊成產生可在促進 T 細胞擴增中起作用之分子的結合溝。

【0172】 pMHC 複合物中所使用之合適連接子可具有多種合適長度中之任一者，諸如 1 個胺基酸(例如，Gly)至 20 個胺基酸、2 個胺基酸至 15 個胺基酸、3 個胺基酸至 12 個胺基酸，包括 4 個胺基酸至 10 個胺基酸、5 個胺基酸至 9 個胺基酸、6 個胺基酸至 8 個胺基酸或 7 個胺基酸至 8 個胺基酸，且可為 1、2、3、4、5、6 或 7 個胺基酸。例示性連接子包括甘胺酸聚合物(G)_n、甘胺酸-絲胺酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGGS) (SEQ ID NO: 1)及(GGGGS) (SEQ ID NO: 2)，其中 n 為至少一之整數)、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物及此項技術中已知之其他可撓性連接子。可以使用甘胺酸及甘胺酸-絲胺酸聚合物；Gly 及 Ser 均相對非結構化，且因此可以充當各組分之間的中性繫鏈。可使用甘胺酸聚合物；與甚至丙胺酸相比，甘胺酸顯著地獲得更多 phi-psi 空間，且與具有較長側鏈之殘基相比，受更少的限制(參見

Scheraga, Rev. Computational Chem. 1 1173-142 (1992), 其以全文引用之方式併入本文中)。例示性連接子可包含包括(但不限於)以下之胺基酸序列：GGSG (SEQ ID NO:3)、GGSGG (SEQ ID NO:4)、GSGSG (SEQ ID NO:5)、GSGGG (SEQ ID NO:6)、GGGSG (SEQ ID NO:7)、GSSSG (SEQ ID NO:8)、GCGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:9)、GCGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:10)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:11)、GGGASGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:12)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:13)或 GGGASGGGGGS (SEQ ID NO:14)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:15)、GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:16)、GCGGS (SEQ ID NO:21)及類似者。在一些具體例中，連接子多肽包括可與第二多肽中存在之半胱胺酸殘基形成雙硫鍵的半胱胺酸殘基。

【0173】 在某些具體例中，單鏈 pMHC 複合物可包含經由二硫橋鍵(亦即，兩個半胱胺酸之間的雙硫鍵)共價連接至 MHC I 類 α (重)鏈之肽。參見，例如美國專利第 8,992,937 號及第 8,895,020 號，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在某些具體例中，雙硫鍵包含定位於自抗原肽之羧基端延伸之連接子內的第一半胱胺酸及定位於 MHC I 類重鏈(例如，具有抗原肽之非共價結合位點的 MHC I 類 α (重)鏈)內的第二半胱胺酸。在某些具體例中，第二半胱胺酸可為 MHC I 類 α (重)鏈中之突變(添加或取代)。在某些具體例中，單鏈分子可包含一個相鄰多肽鏈以及二硫橋鍵。在某些具體例中，單鏈分子可包含經由作為唯一共價鍵之二硫橋鍵附接的兩個相鄰多肽鏈。在一些具體例中，連接序列可包含除半胱胺酸之外的至少一個胺基酸，包括一或多個甘胺酸、一或多個丙胺酸及/或一或多個絲胺酸。在一些具體例中，單鏈分子自 N 端至 C 端包含 MHC I 類肽(例如，抗原肽)、包含第一半胱胺酸之第一連接子、人類(化) $\beta 2$ 微球蛋白序列、第二連接子，及包含第二半胱胺酸之人類(化) MHC I 類重鏈序列，其中第一半胱胺酸及第二半胱胺酸包含二硫橋鍵。在一些具體例中，第二半胱胺酸為人類(化) MHC I 類重鏈之胺基酸之取代，其選自由以下組成之群：T80C、Y84C

及 N86C (Y84C 係指成熟蛋白中位置 108 處的突變，其中成熟蛋白不具有信號序列。可替代地，當蛋白質仍包括 24 聚體信號序列時，位置反而稱為 Y108C)。

【0174】 在某些具體例中，若 pMHC 複合物包含在肽之 C 端與 $\beta 2$ 微球蛋白之間延伸之 Gly-Ser 連接子中的第一半胱胺酸及在近端重鏈位置中之第二半胱胺酸，則二硫橋鍵可連接 pMHC 複合物之 I 類溝槽中之抗原肽。

【0175】 在一些具體例中， $\beta 2$ 微球蛋白序列可包含全長(人類或非人類) $\beta 2$ 微球蛋白序列。在某些具體例中， $\beta 2$ 微球蛋白不具有前導肽序列。因此， $\beta 2$ 微球蛋白序列可包含約 99 個胺基酸，且可為人類 $\beta 2$ 微球蛋白序列(基因庫 AF072097.1)。

【0176】 在一些具體例中，pMHC 複合物包含與人類 $\beta 2$ 微球蛋白稠合之人類 HLA I 類分子。在一些具體例中，與人類 $\beta 2$ 微球蛋白稠合之人類 HLA I 類分子包含一或多個連接子，例如，連接 HLA 分子及 $\beta 2$ 微球蛋白之連接子及/或將肽連接至與人類 $\beta 2$ 微球蛋白稠合之人類 HLA I 類分子的連接子。在一些具體例中，編碼 pMHC 複合物之核苷酸序列可包含編碼人類 HLA 及 $\beta 2$ 微球蛋白之序列。在一些具體例中，編碼 pMHC 複合物之核苷酸序列可包含編碼人類 HLA 及 $\beta 2$ 微球蛋白以及一或多個連接子之序列。在一些具體例中，編碼 pMHC 複合物之核苷酸序列可包含編碼人類 HLA 及 $\beta 2$ 微球蛋白之序列及編碼標記物(例如，綠螢光蛋白質)或標籤(例如，c-myc、組胺酸標籤等)之序列。在一些具體例中，編碼 pMHC 複合物之核苷酸序列可包含編碼人類 HLA 及 $\beta 2$ 微球蛋白之序列、編碼連接子之序列及編碼標記物或標籤之序列。編碼例示性人類 HLA 及 $\beta 2$ 微球蛋白以及一或多個連接子之核苷酸序列之非限制性實例為如 SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:19 所闡述。自其編碼之胺基酸序列分別如 SEQ ID NO:18 及 SEQ ID NO:20 所闡述。

【0177】 所關注之肽可附接至 SEQ ID NO:18 及 SEQ ID NO:20 之 N 端 GCGGS 連接子序列(SEQ ID NO:21)，其中連接子之半胱胺酸

與人類 HLA-A2 多肽之 Y108C 胺基酸形成二硫橋鍵。因此，在一些具體例中，非人類動物經包含胺基酸序列之 pMHC 複合物免疫及/或增強，該胺基酸序列包含如 SEQ ID NO:18 所闡述之序列或如 SEQ ID NO:20 所闡述之序列。在一些具體例中，非人類動物免疫接種有編碼 pMHC 複合物之 DNA，其具有包含如 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 所闡述之序列的胺基酸序列。

【0178】 在一些具體例中，輔助 T 細胞抗原決定基，例如 PADRE 可連接至單鏈 pMHC 複合物之 C 端。參見，例如，美國專利第 6,413,935 號及 Alexander J.等人 (1994) *Immunity* 1:751-61，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，PADRE 直接連接至單鏈 pMHC 複合物之 C 端。在具體例中，PADRE 經由連接子連接至單鏈 pMHC 複合物之 C 端。在一些具體例中，本文中所描述之免疫接種方案包含向非人類動物投與在 C 端連接至 PADRE 之單鏈 pMHC 複合物。在一些具體例中，在 C 端連接至 PADRE 之單鏈 pMHC 複合物包含如 SEQ ID NO:25 所闡述之胺基酸序列。

【0179】 在一些具體例中，pMHC 複合物可為如以下中所揭示之彼複合物：美國專利第 4,478,82 號；第 6,011,146 號；第 8,895,020 號；第 8,992,937 號；WO 96/04314；Mottez 等人. *J. Exp. Med.* 181: 493-502, 1995；Madden 等人. *Cell* 70: 1035-1048, 1992；Matsumura 等人, *Science* 257: 927-934, 1992；Mage 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10658-10662, 1992；Toshitani 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 93: 236-240, 1996；Chung 等人, *J. Immunol.* 163:3699-3708, 1999；Uger and Barber, *J. Immunol.* 160: 1598-1605, 1998；Uger 等人, *J.Immunol.* 162, pp. 6024-6028, 1999；White 等人, *J. Immunol.* 162: 2671-2676, 1999，其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。

【0180】 在一些具體例中，pMHC 複合物包含 II 類 MHC 多肽或其片段、突變體或衍生物。在一個特定具體例中，MHC 包含 II 類 MHC 分子之 α 及 β 多肽或其片段、突變體或衍生物。在一個特定具體例中， α 及 β 多肽藉由肽連接子連接。在一個特定具體例中，MHC 包含選自

由以下組成之群的人類 II 類 MHC 分子之 α 及 β 多肽：HLA-DP、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DM 及 HLA-DO。

【0181】 MHC II 類分子通常由兩個多肽鏈 α 及 β 組成。該等鏈可來自 DP、DQ 或 DR 基因群。存在約 40 種已知的不同人類 MHC II 類分子。所有均具有相同的鹼基結構但其分子結構微妙地改變。MHC II 類分子結合長度為 13-18 個胺基酸之肽。

【0182】 在一些具體例中，抗原性 pMHC 複合物包含一或多個 MHC II 類 α 鏈。在一些具體例中，MHC II 類 α 鏈為完全人類。在一些具體例中，MHC II 類 α 鏈為為人類化。人類化 MHC II 類 α 鏈描述於例如美國專利 第 8,847,005 號及第 9,043,996 號及美國專利 公開案 第 2014/0245467 號中。在一些具體例中，人類化 MHC II 類 α 鏈多肽包含人類細胞外域及其他物種之細胞質域。在一些具體例中，II 類 α 鏈為 HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA、HLA-DQA 或 HLA-DRA。在一些具體例中，II 類 α 鏈多肽為人類化 HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA、HLA-DQA 及/或 HLA-DRA。

【0183】 在一些具體例中，病毒粒子包含一或多個 MHC II 類 β 鏈。在一些具體例中，MHC II 類 β 鏈為完全人類。在一些具體例中，MHC II 類 β 鏈多肽為人類化。人類化 MHC II 類 β 鏈多肽描述於例如美國專利 第 8,847,005 號及第 9,043,996 號及美國專利 公開案 第 2014/0245467 號中。在一些具體例中，人類化 MHC II 類 β 鏈包含人類細胞外域及其他物種之細胞質域。在一些具體例中，II 類 β 鏈為 HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB、HLA-DQB 或 HLA-DRB。在一些具體例中，II 類 β 鏈為人類化 HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB、HLA-DQB 及/或 HLA-DRB。

【0184】 在一些具體例中，抗原性 pMHC 複合物中所包含之抗原決定子(例如，肽)可包含能夠以使得 pMHC 複合物可以例如特異性方式結合於 TCR 之方式結合至 MHC 蛋白質的任何肽。

【0185】 實施例包括藉由水解製備之肽及最典型地經合成產生之肽，包括任意產生之肽、經特定設計之肽，及若干肽中胺基酸位置中之至少一些為保守性的且其餘位置為隨機的肽。

【0186】 在自然界中，藉由水解製備之肽在抗原與 MHC 蛋白質之結合之前經歷水解。I 類 MHC 通常呈現衍生自在細胞之細胞質中有效合成之蛋白質的肽。相比之下，II 類 MHC 通常呈現衍生自進入細胞之內吞路徑的外源性蛋白質或在 ER 中合成之蛋白質的肽。胞內遷移准許肽變成與 MHC 蛋白質締合。

【0187】 肽與 MHC 肽結合溝之結合可控制 MHC 及/或藉由 TCR 識別之肽胺基酸殘基，或藉由如本文所揭示之經基因修飾之動物產生之 pMHC-結合蛋白的空間排列。此類空間控制部分係由於肽與 MHC 蛋白質之間形成的氫鍵。基於肽如何結合於各種 MHC 之知識，可確定主要 MHC 錨定胺基酸及在不同肽之間改變的表面暴露胺基酸。在一些具體例中，MHC-結合肽之長度為 5 至 40 個胺基酸殘基，例如 6 至 30 個胺基酸殘基，例如 8 至 20 個胺基酸殘基，例如 9 至 11 個胺基酸殘基，包括長度為 5 與 40 個胺基酸之間的以整個整數遞增的任何尺寸肽(亦即，5、6、7、8、9...40)。雖然自然地 MHC II 類結合肽在約 9 至 40 個胺基酸之範圍內變化，但在幾乎所有情況下，肽可截短至 9 至 11 個胺基酸核心而不損耗 MHC 結合活性或 T 細胞識別。

【0188】 肽包括包含蛋白質之至少一部分，例如抗原決定子的肽，該蛋白質選自由以下組成之群：與自體免疫性病徵相關聯之人類自身蛋白質、感染物(例如，細菌、病毒或寄生生物體)之蛋白質、過敏原及腫瘤相關之蛋白質。在一個具體例中，pMHC 複合物包含與自體免疫性病徵相關聯之人類自身蛋白質之抗原決定子。在另一具體例中，pMHC 複合物包含過敏原之抗原決定子。在另一具體例中，pMHC 複合物包含細菌之抗原決定子。在另一具體例中，pMHC 複合物包含病毒之抗原決定子。在另一具體例中，pMHC 複合物包含寄生物之抗原決定子。

【0189】 經由可撓性連接子將肽附接至 MHC I 類或 MHC II 類分子具有確保肽在生物合成、轉運及呈現期間將佔據且保持與 MHC 締合的優勢。作為替代的途徑，在一些具體例中，MHC 及肽經單獨地表現。

特異性地結合所關注之抗原性 pMHC 複合物之抗原結合蛋白、核酸構築體、細胞及其製備方法

【0190】 在一個具體例中，提供編碼特異性地結合抗原性 pMHC 複合物之抗原結合域之可變域的核酸及表現該核酸之細胞。

【0191】 在一個具體例中，提供非人類動物之核酸序列製備用於製造人類治療劑之細胞株的用途。在一個具體例中，人類治療劑為包含人類抗原結合域及人類 Fc 區之結合蛋白。

【0192】 在一個具體例中，提供一種包含哺乳動物宿主細胞之表現系統，該宿主細胞包含編碼多肽之核酸，該多肽包含與人類 C_H 區稠合之體細胞突變之人類重鏈可變域；及/或編碼多肽之核酸，該多肽包含與人類 C_L 區稠合之經體細胞突變之人類輕鏈可變域，其中 V_H 及 V_L 結構域係同源的。

【0193】 在一個具體例中，合適的宿主細胞選自 B 細胞、融合瘤、四合瘤、CHO 細胞、COS 細胞、293 細胞、HeLa 細胞及表現病毒核酸序列之人類視網膜細胞(例如，PERC.6™細胞(Creative Biolabs))。

【0194】 在一個具體例中，提供一種用於製造結合蛋白之方法，自如本文所揭示之非人類動物分離細胞或核酸，其中細胞或核酸包含或編碼特異性地結合所關注之 pMHC 複合物之抗原結合蛋白質。在一些具體例中，該方法進一步包含選殖與編碼人類 C_H 或 C_L 區之基因同框以形成人類結合蛋白序列的編碼人類重鏈或輕鏈可變區序列之核苷酸序列(其可編碼經組胺酸修飾之人類重鏈可變域及/或經組胺酸修飾之人類輕鏈可變域，其亦可為或獨立地為通用輕鏈可變域)，且在合適細胞中表現人類結合蛋白序列。

【0195】 在一個具體例中，非人類動物已經所關注之 pMHC 複合物免疫接種，且人類抗原結合域特異性地結合(例如，具有在微莫耳、

奈莫耳或皮莫耳範圍中的 K_D)所關注之 pMHC 複合物之抗原決定基。在一個具體例中，編碼 V_H 及/或 V_L 結構域之核苷酸序列在非人類動物中經體細胞突變。

【0196】 在一個具體例中，提供一種用於製造結合所關注之 pMHC 複合物之抗原結合蛋白的方法，該方法包含

(1) 使非人類動物免疫接種有所關注之 pMHC 複合物，其中非人類動物在其基因體中包含

(i) 編碼人類(化) MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列，及

(ii) (未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座,以使得非人類動物能夠提供包含人類或人類化抗原結合域(例如，人類或人類化可變域)之抗原結合蛋白，

視情況其中(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排，

(2) 允許非人類動物建立針對所關注之 pMHC 複合物或連接至載體之所關注之 pMHC 複合物的免疫反應；

(3) 自經免疫非人類動物分離細胞(例如，淋巴細胞)，其中細胞包含編碼人類重鏈及輕鏈可變域之第一及第二免疫球蛋白可變區核酸序列(其中之每一者可獨立地為經組胺酸修飾且其中之輕鏈可變域可為共同的輕鏈可變域)，該人類重鏈及輕鏈可變域形成特異性地結合所關注之 pMHC 複合物的抗原結合域；

(4) 識別編碼免疫球蛋白重鏈及輕鏈可變域之免疫球蛋白重鏈及輕鏈可變區核酸序列，當免疫球蛋白重鏈及輕鏈可變域成對時特異性地結合所關注之 pMHC 複合物或連接至載體的所關注之 pMHC 複合物；及，

(5) 在適用於表現抗原結合蛋白之表現系統中表現(d)之核酸序列以便形成包含結合所關注之 pMHC 複合物的重鏈及輕鏈可變域之二聚體的抗原結合蛋白。

【0197】 在一個具體例中，提供一種用於製造結合所關注之 pMHC 複合物之抗原結合蛋白的方法，該方法包含

(1) 使非人類動物免疫接種有所關注之 pMHC 複合物，其中非人類動物在其基因體中包含

(i) 編碼人類(化) MHC 分子或至少其肽結合部分之核苷酸序列，及

(ii) (未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座，以使得非人類動物能夠提供包含人類或人類化抗原結合域(例如，人類或人類化可變域)之抗原結合蛋白，

視情況其中(未)重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或(未)重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座中之至少一者未經重排，

(2) 獲得編碼抗體之各別人類(化)免疫球蛋白重鏈可變域及/或人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變域的人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區序列及/或人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區序列，該抗體特異性地結合所關注之 pMHC，

(c) 利用人類(化)免疫球蛋白重鏈可變區序列及/或人類(化)免疫球蛋白輕鏈可變區序列以產生結合 pMHC 之抗體。

【0198】 在一些具體例中，細胞(諸如 B 細胞)自非人類動物(例如，自脾臟或淋巴結)回收。細胞可與骨髓瘤細胞株稠合以製備永生的融合瘤細胞株，且此類融合瘤細胞株經篩檢且選擇以識別產生含有雜合重鏈之抗體的融合瘤細胞株，該雜合重鏈對用於免疫之抗原具有特異性。

【0199】 在一個具體例中，免疫包含藉由所關注之 pMHC 複合物引發(例如，投與至)非人類動物，從而允許非人類動物靜置一段時間，

且藉由所關注之 pMHC 複合物使非人類動物再免疫(例如, 增強非人類動物之免疫反應)。在一些具體例中, 該方法包含同時輔助 T 細胞抗原決定基(例如, pan DR T 輔助抗原決定基(PADRE))使非人類動物免疫及/或增強非人類動物。參見, 例如, 美國專利第 6,413,935 號及 Alexander J.等人. (1994) *Immunity* 1:751-61, 其中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中, 該方法包含藉由所關注之 pMHC 複合物引發非人類動物且藉由連接至輔助 T 細胞抗原決定基(例如, PADRE)的所關注之 pMHC 複合物增強經免疫之動物。在一些具體例中, 該方法包含均藉由連接至輔助 T 細胞抗原決定基的所關注之 pMHC 複合物引發且增強非人類動物。在包含藉由 PADRE 引發及/或增強的具體例中, 非人類動物為包含 C57/Bl6 基因背景之小鼠, 例如選自以下之 C57BL 品系的小鼠: C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10C 及 C57BL/Ola; 或為前述 C57BL/6 品系及其他品系之混合, 例如 129、BALB 等。在一些具體例中, 在引發非人類動物與增強非人類動物之間的時間段為幾天、至少一週、至少兩週、至少三週、至少四週或至少一個月。

【0200】 在一個具體例中, 提供在非人類動物中製備之免疫球蛋白可變區(VR) (例如, 包含重排 $V_H/D_H/J_H$ 人類基因序列或重排人類 V_L/J_L 基因序列, 其可分別地且獨立地為經組胺酸修飾之重排人類 $V_H/D_H/J_H$ 基因序列或重排人類 V_L/J_L 基因序列, 且其中之後者亦可為或獨立地為共同的重排人類 V_L/J_L 基因序列)。在一個具體例中, 重排 $V_H/D_H/J_H$ 基因序列與一或多個人類重鏈恆定區序列(例如, 選自人類或小鼠 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 及其組合)耦合, 或重排 V_L/J_L 基因序列耦合至人類輕鏈恆定區序列。本文中亦提供在本發明之具體例之非人類動物中製備及/或由自其分離之核酸序列編碼的結合蛋白之免疫球蛋白可變域胺基酸序列。

【0201】 在一個具體例中，提供在本發明之具體例之非人類動物中製備，或衍生自本發明之具體例之小鼠中製備之序列的結合蛋白或其抗原結合片段(例如，Fab、F(ab)₂、scFv)。

雙特異性結合蛋白

【0202】 提供特異性地結合所關注之 pMHC 複合物的包含人類可變域之免疫球蛋白類結合蛋白。亦提供表現此類結合蛋白之細胞、製備其之小鼠及相關方法及組成物。

【0203】 在一些具體例中，結合蛋白及編碼其之核苷酸序列可用於製備多特異性結合蛋白，例如雙特異性結合蛋白。在此具體例中，包含第一重鏈可變域之第一多肽可與包含第二重鏈可變域之第二多肽締合。當第一重鏈可變域及第二重鏈可變域特異性地結合不同的抗原決定基時，可使用兩個重鏈可變域製備雙特異性結合分子。C_H 區可相同或不同。在一個具體例中，例如，C_H 區中之一者可經修飾以便消除蛋白質 A 結合決定子，而另一重鏈恆定區不經如此修飾(參見美國專利案第 8,586,713 B2 號，其以全文引用之方式併入本文中)。此特定排列簡化樂雙特異性結合蛋白自例如均二聚體之混合物(例如，第一或第二多肽之均二聚體)的分離。在一些具體例中，雙特異性 pMHC-結合蛋白可為相對於蛋白質 A 結合之異二聚體，且可包含

a. 第一多肽，自 N 端至 C 端包含：選擇性地結合第一抗原決定基之第一抗原決定基結合區、包含選自 IgG1、IgG2 及 IgG4 之人類 IgG 之第一 CH3 區的免疫球蛋白恆定區，其中第一 CH3 區結合於蛋白質 A；及

b. 第二多肽，自 N 端至 C 端包含：選擇性地結合第二抗原決定基之第二抗原決定基結合區、包含選自 IgG1、IgG2 及 IgG4 之人類 IgG 之第二 CH3 區的免疫球蛋白恆定區，其中第二 CH3 區包含減少或消除第二 CH3 區與蛋白質 A 之結合的修飾。在一些具體例中，修飾選自由以下組成之群：在 IMGT 外顯子編號系統中之(a) 95R 及(b) 95R 及 96F，或在 EU 編號系統中之(a') 435R 及(b') 435R 及 436F。在一些具體

例中，第二 C_{H3} 區進一步包含選自由以下組成之群的一至五個修飾：在 IMGT 外顯子編號系統中之 16E、18M、44S、52N、57M 及 82I，或在 EU 編號系統中之 356E、358M、384S、392N、397M 及 422I。

【0204】 在一個具體例中，方法及組成物用以製備雙特異性結合蛋白。在此具體例中，稠合至 C_H 區之第一 V_H 及稠合至 C_H 區之第二 V_H 各自獨立地與同一同種型之人類 IgG 序列框內選殖(例如，人類 IgG1、IgG2 或 IgG4)。第一 V_H 特異性地結合第一 pMHC 複合物，且第二 V_H 特異性地結合第二 pMHC 複合物。第一及第二抗原決定基可在不同 pMHC 上，或在相同 pMHC 複合物上。

【0205】 在一個具體例中，稠合至第一 V_H 之 C_H 區之 IgG 同種型及稠合第二 V_H 之 C_H 區之 IgG 同種型為相同同種型，但不同在於一種 IgG 同種型包含至少一個胺基酸取代。在一個具體例中，至少一個胺基酸取代致使攜帶取代之重鏈相比於不具有取代之重鏈不能或實質上不能結合蛋白質 A。

【0206】 在一個具體例中，第一 C_H 區包含選自 IgG1、IgG2 及 IgG4 之人類 IgG 之第一 C_{H3} 結構域；且第二 C_H 區包含選自 IgG1、IgG2 及 IgG4 之人類 IgG 之第二 C_{H3} 結構域，其中第二 C_{H3} 結構域包含減少消除第二 C_{H3} 結構域與蛋白質 A 之結合的修飾(參見美國專利 8,586,713 B2，其以全文引用之方式併入本文中)。

【0207】 在一個具體例中，第二 C_{H3} 結構域包含根據 EU 編號系統編號之 435R 修飾。在另一個具體例中，第二 C_{H3} 結構域進一步包含根據 EU 編號系統編號之 436F 修飾。

【0208】 在一個具體例中，第二 C_{H3} 結構域為人類 IgG1 之結構域，其包含選自由以下組成之群的修飾：根據 EU 編號系統編號之 D356E、L358M、N384S、K392N、V397M 及 V422I。

【0209】 在一個具體例中，第二 C_{H3} 結構域為人類 IgG2 之結構域，其包含選自由以下組成之群的修飾，根據 EU 編號系統編號之 N384S、K392N 及 V422I。

【0210】 在一個具體例中，第二 C_H3 結構域為人類 IgG4 之結構域，其包含選自由以下組成之群的修飾：根據 EU 編號系統編號之 Q355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q 及 V422I。

【0211】 在一個具體例中，結合蛋白包含具有如本文所述之一或多個修飾的 C_H 區，其中結合蛋白之恆定區在人類中為非免疫原性或實質上非免疫原性。在一特定具體例中，C_H 區包含在人類中並不呈現免疫原性抗原決定基的胺基酸序列。在另一特定具體例中，結合蛋白包含在野生型人類重鏈中未發現之 C_H 區及不包含產生 T 細胞抗原決定基之序列的 C_H 區。

【0212】 在一個具體例中，Fc 結構域可經修飾以具有經改變之 Fc 受體結合，其繼而影響效應子功能。包括 Fc 結構域之經工程改造之重鏈恆定區(C_H)可為嵌合的。因此，嵌合 C_H 區組合衍生自超過一種免疫球蛋白同種型之 C_H 結構域。舉例而言，嵌合 C_H 區包含衍生自人類 IgG1、人類 IgG2 或人類 IgG4 分子之 C_H3 結構域的部分或所有，以及衍生自人類 IgG1、人類 IgG2 或人類 IgG4 分子之 C_H2 結構域的部分或所有。嵌合 C_H 區亦可含有嵌合鉸鏈區。舉例而言，嵌合鉸鏈可包含衍生自人類 IgG1、人類 IgG2 或人類 IgG4 鉸鏈區之「上鉸鏈」胺基酸序列（根據 EU 編號之位置 216 至 227 之胺基酸殘基），以及衍生自人類 IgG1、人類 IgG2 或人類 IgG4 鉸鏈區之「下鉸鏈」序列（根據 EU 編號之位置 228 至 236 之胺基酸殘基）。在一個具體例中，嵌合鉸鏈區包含衍生自人類 IgG1 或人類 IgG4 上鉸鏈之胺基酸殘基及衍生自人類 IgG2 下鉸鏈之胺基酸殘基。

【0213】 對於特定治療劑，Fc 結構域可經工程改造以活化正常 Fc 效應子功能中之所有、一些或無一者，而不影響含有 Fc 之蛋白質之（例如抗體之）所需藥物動力學特性。包含嵌合 CH 區且具有經改變效應子功能的蛋白質之實施例參見美國專利第 9 359 437 號，其以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白包含包含重鏈恆定(CH)區之重組多肽，該重鏈恆定區自 N 端至 C 端包含 CH1 結構域、嵌合鉸鏈、CH2 結構域及 CH3 結構域，其中：(a)CH1 結構域包含

位置 212 至 215 (EU 編號)之胺基酸序列 DKKV 或 DKRV, (b)嵌合鉸鏈包含位置 216 至 227 (EU 編號)之人類 IgG1 或人類 IgG4 上鉸鏈胺基酸序列及位置 228 至 236 (EU 編號)之人類 IgG2 下鉸鏈胺基酸序列 PCPAPPVA (SEQ ID NO:29), (c) CH2 結構域包含位置 237 至 340 (EU 編號)之人類 IgG4 CH2 結構域胺基酸序列, 其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列, 及(d) CH3 結構域包含位置 341 至 447 (EU 編號)之人類 IgG1 或人類 IgG4CH3 結構域序列

【0214】 在一些具體例中, 雙特異性抗體可具有各自具有共同輕鏈作為其同源 V_L 結構域的第一 V_H 及第二 V_H 。

阻斷對內源性肽之耐受性

【0215】 使非人類動物(例如, 嚙齒類動物, 諸如小鼠或大鼠)免疫接種有抗原性 pMHC 以得到特異性 pMHC-結合蛋白係取決於非人類動物中之內源性蛋白質與異源蛋白質之間的序列差異, 該異源蛋白質經呈現以使非人類動物之免疫系統能夠將所關注之 pMHC 複合物識別為非自身(亦即, 外來)的。產生針對與自身 pMHC 具有高度同源性之 pMHC 的抗體可能由於對自身 pMHC 之免疫耐受性而係一個困難的任務。阻斷對與所關注之肽同源的自身肽之耐受性的方法為熟習本技藝者所熟知的, 參見例如, 美國公開案第 20170332610 號, 其以全文引用之方式併入本文中。在一些具體例中, 阻斷對內源性肽之耐受性的方法包含修飾本文中之非人類動物以包含與所關注之肽具有高度同源性之自身肽的刪除, 例如基因剔除突變。

醫藥組成物

【0216】 在某些具體例中, 本文提供一種含有與醫藥學上可接受之載劑一起調配之至少一種 pMHC-結合蛋白的組成物, 例如醫藥組成物。

【0217】 本文中所提供之醫藥組成物可專門調配以用於以固體或液態形式投藥, 包括適用於以下之彼等: (1)經口投藥, 例如大劑量

藥液(水性或非水性溶液或懸浮液)、錠劑，例如用於頰內、舌下及全身性吸收之彼等，施用至舌頭之大丸劑、粉末、顆粒劑、糊狀物；或(2)非經腸投藥，例如藉由以例如無菌溶液或懸浮液，或持續釋放調配物形式經皮下、肌內、靜脈內或硬膜外注射。

【0218】 在一些具體例中，本文中所提供之適用於非經腸投藥之醫藥組成物包含本發明之某些具體例之一或多種治療劑以及一或多種醫藥學上可接受之無菌等張水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳化液，或恰好在使用之前可復水至無菌可注射溶液或分散液中之無菌粉末，其可含有糖、醇、抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑、使調配物與預期既定接受者之血液等張之溶解物或懸浮劑或增稠劑。

【0219】 可用於本文中所提供之醫藥組成物中的合適水性及非水性攜帶者之實施例包括水、乙醇、多元醇(諸如但不限於丙三醇、丙二醇、聚乙二醇及類似者)及其合適混合物，植物油(諸如橄欖油)及可注射有機酯，諸如油酸乙酯。適當流動性可例如藉由使用包衣材料(諸如卵磷脂)、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持。

【0220】 在某些具體例中，組成物包含呈適合於所需劑量之 w/v 濃度的 pMHC-結合蛋白。pMHC-結合蛋白可以以下濃度存在於組成物中：至少 1 mg/mL、至少 5 mg/mL、至少 10 mg/mL、至少 15 mg/mL、至少 20 mg/mL、至少 25 mg/mL、至少 30 mg/mL、至少 35 mg/mL、至少 40 mg/mL、至少 45 mg/mL、至少 50 mg/mL、至少 55 mg/mL、至少 60 mg/mL、至少 65 mg/mL、至少 70 mg/mL、至少 75 mg/mL、至少 80 mg/mL、至少 85 mg/mL、至少 90 mg/mL、至少 95 mg/mL、至少 100 mg/mL、至少 105 mg/mL、至少 110 mg/mL、至少 115 mg/mL、至少 120 mg/mL、至少 125 mg/mL、至少 130 mg/mL、至少 135 mg/mL、至少 140 mg/mL、至少 150 mg/mL、至少 200 mg/mL、至少 250 mg/mL 或至少 300 mg/mL。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 1 mg/mL 至 300 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 5 mg/mL 至 250 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具

體例中，pMHC-結合蛋白質可以 10 mg/mL 至 200 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 15 mg/mL 至 150 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 20 mg/mL 至 140 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 25 mg/mL 至 135 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 30 mg/mL 至 130 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 35 mg/mL 至 125 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 40 mg/mL 至 120 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 45 mg/mL 至 115 mg/mL 之濃度存在於組成物中。在一些具體例中，pMHC-結合蛋白質可以 50 mg/mL 至 110 mg/mL 之濃度存在於組成物中。

【0221】 在一些具體例中，視待處理之特定指示所需要，組成物包含一或多種活性化合物，通常具有不有害地影響彼此之互補活性的彼等。此類額外活性化合物適宜以對預期目的有效之量存在於組合中。在一些具體例中，組成物藉由將 pMHC-結合蛋白與視情況選用之生理學上地可接受載劑、賦形劑或穩定劑混合來製備，包括(但不限於)緩衝劑、醣類、鹽類、界面活性劑、增溶劑、多元醇、稀釋劑、結合劑、穩定劑、鹽類、親油性溶劑、胺基酸、螯合劑、防腐劑或類似者(Goodman 及 Gilman 之 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第 12 版, L. Brunton, 等人及 Remington 之 *Pharmaceutical Sciences*, 第 16 版, Osol, A. 編. (1999)), 呈所需最終濃度之凍乾組成物或水溶液形式。可接受載劑、賦形劑或穩定劑以所採用之劑量及濃度對接受者而言為無毒的，且包括緩衝劑，諸如組胺酸、磷酸鹽、檸檬酸鹽、甘胺酸、乙酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨；苜索氯銨；苯酚；丁基或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於 10 至 15 個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠

或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包括海藻糖、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如 EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬複合物(例如，Zn-蛋白質複合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如 TWEEN、聚山梨醇酯 80、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。

【0222】 在一些具體例中，緩衝劑為組胺酸、檸檬酸鹽、磷酸鹽、甘胺酸或乙酸鹽。糖類賦形劑可為海藻糖、蔗糖、甘露醇、麥芽糖或棉子糖。界面活性劑可為聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 80 或普朗尼克 F68 (Pluronic F68)。鹽可為 NaCl、KCl、MgCl₂ 或 CaCl₂。

【0223】 在一些具體例中，組成物包含緩衝劑或 pH 調節劑以提供經改良 pH 對照。此類組成物可具有以下之 pH：在約 3.0 與約 9.0 之間、在約 4.0 與約 8.0 之間、在約 5.0 與約 8.0 之間、在約 5.0 與約 7.0 之間、在約 5.0 與約 6.5 之間、在約 5.5 與約 8.0 之間、在約 5.5 與約 7.0 之間或在約 5.5 與約 6.5 之間。在另一具體例中，此類組成物具有以下之 pH：約 3.0、約 3.5、約 4.0、約 4.5、約 5.0、約 5.1、約 5.2、約 5.3、約 5.4、約 5.5、約 5.6、約 5.7、約 5.8、約 5.9、約 6.0、約 6.1、約 6.2、約 6.3、約 6.4、約 6.5、約 6.6、約 6.7、約 6.8、約 6.9、約 7.0、約 7.5、約 8.0、約 8.5 或約 9.0。在一特定具體例中，組成物之 pH 為約 6.0。

【0224】 在一些具體例中，組成物包含緩衝劑或 pH 調節劑以提供經改良 pH 對照。此類組成物可具有以下之 pH：在 3.0 與 9.0 之間、在 4.0 與 8.0 之間、在 5.0 與 8.0 之間、在 5.0 與 7.0 之間、在 5.0 與 6.5 之間、在 5.5 與 8.0 之間、在 5.5 與 7.0 之間或在 5.5 與 6.5 之間。在另一具體例中，此類組成物具有以下之 pH：3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.5、8.0、8.5 或 9.0。在一特定具體例中，組成物之 pH 為 6.0。

【0225】 熟習此項技術者理解組成物之 pH 通常不應等於待用於組成物之特定 pMHC-結合蛋白之等電點。通常地，緩衝劑為由有機或無機酸或鹼製備之鹽。代表性緩衝劑包括(但不限於)有機酸鹽，諸如檸檬酸、抗壞血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、丁二酸、乙酸或鄰苯二甲酸之鹽；Tris、緩血酸胺氫氯酸鹽或磷酸鹽緩衝劑。另外，胺基酸組分亦可起緩衝作用。可用於組成物中作為緩衝劑之代表性胺基酸組分包括(但不限於)甘胺酸及組胺酸。在某些具體例中，緩衝劑係選自組胺酸、檸檬酸鹽、磷酸鹽、甘胺酸及乙酸鹽。在一特定具體例中，緩衝劑為組胺酸。在另一特定具體例中，緩衝劑為檸檬酸鹽。在又一特定具體例中，緩衝劑為甘胺酸。緩衝劑之純度應為至少 98%或至少 99%或至少 99.5 %。如本文中所使用，在組胺酸及甘胺酸之背景中的術語「純度」係指如此項技術中所理解的組胺酸或甘胺酸之化學純度，例如如 Merck Index，第 13 版，O'Neil 等人編，(Merck & Co., 2001)，其以全文引用之方式併入本文中。

【0226】 在某些具體例中，組成物包含組胺酸作為緩衝劑。在某些具體例中，組胺酸以以下濃度存在於組成物中：至少約 1 mM、至少約 5 mM、至少約 10 mM、至少約 20 mM、至少約 30 mM、至少約 40 mM、至少約 50 mM、至少約 75 mM、至少約 100 mM、至少約 150 mM 或至少約 200 mM 組胺酸。在另一個具體例中，組成物包含在約 1 mM 與約 200 mM 之間、在約 1 mM 與約 150 mM 之間、在約 1 mM 與約 100 mM 之間、在約 1 mM 與約 75 mM 之間、在約 10 mM 與約 200 mM 之間、在約 10 mM 與約 150 mM 之間、在約 10 mM 與約 100 mM 之間、在約 10 mM 與約 75 mM 之間、在約 10 mM 與約 50 mM 之間、在約 10 mM 與約 40 mM 之間、在約 10 mM 與約 30 mM 之間、在約 20 mM 與約 75 mM 之間、在約 20 mM 與約 50 mM 之間、在約 20 mM 與約 40 mM 之間，或在約 20 mM 與約 30 mM 之間的組胺酸。在另一具體例中，組成物包含約 1 mM、約 5 mM、約 10 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 60 mM、約 70 mM、約 80 mM、約 90 mM、約 100 mM、約 150 或約 200 mM 組胺

酸。在一特定具體例中，組成物可包含約 10 mM、約 25 mM 或無組胺酸。

【0227】 在某些具體例中，組成物包含組胺酸作為緩衝劑。在某些具體例中，組胺酸以以下濃度存在於組成物中：至少 1 mM、至少 5 mM、至少 10 mM、至少 20 mM、至少 30 mM、至少 40 mM、至少 50 mM、至少 75 mM、至少 100 mM、至少 150 mM 或至少 200 mM 組胺酸。在另一個具體例中，組成物包含在 1 mM 與 200 mM 之間、在 1 mM 與 150 mM 之間、在 1 mM 與 100 mM 之間、在 1 mM 與 75 mM 之間、在 10 mM 與 200 mM 之間、在 10 mM 與 150 mM 之間、在 10 mM 與 100 mM 之間、在 10 mM 與 75 mM 之間、在 10 mM 與 50 mM 之間、在 10 mM 與 40 mM 之間、在 10 mM 與 30 mM 之間、在 20 mM 與 75 mM 之間、在 20 mM 與 50 mM 之間、在 20 mM 與 40 mM 之間或在 20 mM 與 30 mM 之間的組胺酸。在另一具體例中，組成物包含 1 mM、5 mM、10 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、150 mM 或 200 mM 組胺酸。在一特定具體例中，組成物可包含 10 mM、25 mM 或無組胺酸。

【0228】 在一些具體例中，組成物包含碳水化合物賦形劑。碳水化合物賦形劑可充當例如黏度增強劑、穩定劑、膨化劑、增溶劑及/或其類似者。碳水化合物賦形劑按重量或體積計通常以以下存在：約 1% 至約 99% 之間，例如，在約 0.1% 至約 20% 之間、在約 0.1% 至約 15% 之間、在約 0.1% 至約 5% 之間、在約 1% 至約 20% 之間、在約 5% 至約 15% 之間、在約 8% 至約 10% 之間、在約 10% 與約 15% 之間、在約 15% 與約 20% 之間、在 0.1% 至 20% 之間、在 5% 至 15% 之間、在 8% 至 10% 之間、在 10% 與 15% 之間、在 15% 與 20% 之間、在約 0.1% 至約 5% 之間、在約 5% 至約 10% 之間或在約 15% 至約 20% 之間。在又其他特定具體例中，碳水化合物賦形劑以 1%，或以 1.5%，或以 2%，或以 2.5%，或以 3%，或以 4%，或以 5%，或以 10%，或以 15%，或以 20% 存在。

【0229】 在一些具體例中，組成物包含碳水化合物賦形劑。碳水化合物賦形劑可充當例如黏度增強劑、穩定劑、膨化劑、增溶劑及/或

其類似者。碳水化合物賦形劑通常按重量或體積計以以下存在：在 1% 至 99% 之間，例如在 0.1% 至 20% 之間、在 0.1% 至 15% 之間、在 0.1% 至 5% 之間、在 1% 至 20% 之間、在 5% 至 15% 之間、在 8% 至 10% 之間、在 10% 與 15% 之間、在 15% 與 20% 之間、在 0.1% 至 20% 之間、在 5% 至 15% 之間、在 8% 至 10% 之間、在 10% 與 15% 之間、在 15% 與 20% 之間、在 0.1% 至 5% 之間、在 5% 至 10% 之間或在 15% 至 20% 之間。在又其他特定具體例中，碳水化合物賦形劑以 1%，或以 1.5%，或以 2%，或以 2.5%，或以 3%，或以 4%，或以 5%，或以 10%，或以 15%，或以 20% 存在。

【0230】 在一些具體例中，組成物包含碳水化合物賦形劑。適用於組成物中之碳水化合物賦形劑包括(但不限於)：單醣，諸如果糖、麥芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖及其類似者；雙醣，諸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纖維二糖及其類似者；多醣，諸如棉子糖、松三糖、麥芽糊精、聚葡萄糖、澱粉及其類似者；及醛醣醇，諸如甘露糖醇、木糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)及其類似者。在某些具體例中，用於本文所提供之組成物中的碳水化合物賦形劑選自蔗糖、海藻糖、乳糖、甘露糖醇及棉子糖。在一特定具體例中，碳水化合物賦形劑為海藻糖。在另一特定具體例中，碳水化合物賦形劑為甘露糖醇。在又另一特定具體例中，碳水化合物賦形劑為蔗糖。在又一特定具體例中，碳水化合物賦形劑為棉子糖。碳水化合物賦形劑之純度應為至少 98% 或至少 99% 或至少 99.5%。

【0231】 在一些具體例中，組成物包含海藻糖。在某些具體例中，組成物包含至少約 1%、至少約 2%、至少約 4%、至少約 8%、至少約 20%、至少約 30% 或至少約 40% 海藻糖。在另一個具體例中，組成物包含在約 1% 與約 40% 之間、在約 1% 與約 30% 之間、在約 1% 與約 20% 之間、在約 2% 與約 40% 之間、在約 2% 與約 30% 之間、在約 2% 與約 20% 之間、在約 4% 與約 40% 之間、在約 4% 與約 30% 之間或在約 4% 與約 20% 之間的海藻糖。在另一具體例中，組成物包含約 1%、約 2%、

約 4%、約 6%、約 8%、約 15%、約 20%、約 30%或約 40%海藻糖。
在一特定具體例中，組成物包含約 4%、約 6%或約 15%海藻糖。

【0232】 在一些具體例中，組成物包含海藻糖。在某些具體例中，組成物包含至少 1%、至少 2%、至少 4%、至少 8%、至少 20%、至少 30%或至少 40%海藻糖。在另一具體例中，組成物包含在 1%與 40%之間、在 1%與 30%之間、在 1%與 20%之間、在 2%與 40%之間、在 2%與 30%之間、在 2%與 20%之間、在 4%與 40%之間、在 4%與 30%之間或在 4%與 20%之間的海藻糖。在另一具體例中，組成物包含 1%、2%、4%、6%、8%、15%、20%、30%或 40%海藻糖。在一特定具體例中，組成物包含 4%、6%或 15%海藻糖。

【0233】 在某些具體例中，組成物包含賦形劑。在一特定具體例中，組成物包含選自以下之至少一種賦形劑：糖類、鹽類、界面活性劑、胺基酸、多元醇、螯合劑、乳化劑及防腐劑。在某些具體例中，組成物包含鹽類，例如選自以下之鹽：NaCl、KCl、CaCl₂ 及 MgCl₂。在一特定具體例中，組成物包含 NaCl。

【0234】 在一些具體例中，組成物包含胺基酸，例如離胺酸、精胺酸、甘胺酸、組胺酸或胺基酸鹽。組成物可包含至少約 1 mM、至少約 10 mM、至少約 25 mM、至少約 50 mM、至少約 100 mM、至少約 150 mM、至少約 200 mM、至少約 250 mM、至少約 300 mM、至少約 350 mM 或至少約 400 mM 之胺基酸。在另一個具體例中，組成物可包含在約 1 mM 與約 100 mM 之間、在約 10 mM 與約 150 mM 之間、在約 25 mM 與約 250 mM 之間、在約 25 mM 與約 300 mM 之間、在約 25 mM 與約 350 mM 之間、在約 25 mM 與約 400 mM 之間、在約 50 mM 與約 250 mM 之間、在約 50 mM 與約 300 mM 之間、在約 50 mM 與約 350 mM 之間、在約 50 mM 與約 400 mM 之間、在約 100 mM 與約 250 mM 之間、在約 100 mM 與約 300 mM 之間、在約 100 mM 與約 400 mM 之間、在約 150 mM 與約 250 mM 之間、在約 150 mM 與約 300 mM 之間或在約 150 mM 與約 400 mM 之間的胺基酸。在另一具體例中，組成物包含約 1 mM、1.6 mM、25 mM、約 50 mM、約 100 mM、約 150 mM、

約 200 mM、約 250 mM、約 300 mM、約 350 mM 或約 400 mM 之胺基酸。

【0235】 在一些具體例中，組成物包含胺基酸，例如離胺酸、精胺酸、甘胺酸、組胺酸或胺基酸鹽。組成物可包含至少 1 mM、至少 10 mM、至少 25 mM、至少 50 mM、至少 100 mM、至少 150 mM、至少 200 mM、至少 250 mM、至少 300 mM、至少 350 mM 或至少 400 mM 之胺基酸。在另一個具體例中，組成物可包含在 1 mM 與 100 mM 之間、在 10 mM 與 150 mM 之間、在 25 mM 與 250 mM 之間、在 25 mM 與 300 mM 之間、在 25 mM 與 350 mM 之間、在 25 mM 與 400 mM 之間、在 50 mM 與 250 mM 之間、在 50 mM 與 300 mM 之間、在 50 mM 與 350 mM 之間、在 50 mM 與 400 mM 之間、在 100 mM 與 250 mM 之間、在 100 mM 與 300 mM 之間、在 100 mM 與 400 mM 之間、在 150 mM 與 250 mM 之間、在 150 mM 與 300 mM 之間或在 150 mM 與 400 mM 之間的胺基酸。在另一具體例中，組成物包含 1 mM、1.6 mM、25 mM、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM 或 400 mM 之胺基酸。

【0236】 在一些具體例中，組成物包含界面活性劑。如本文所使用之術語「界面活性劑」係指具有兩性結構之有機物質；亦即，其由具有相反溶解傾向之基團(典型地為油溶性烴鏈及水溶性離子基團)構成。界面活性劑可以根據表面活性部分之電荷分類成陰離子型、陽離子型及非離子型界面活性劑。界面活性劑在生物學材料之各種醫藥組成物及製劑中通常用作濕潤劑、乳化劑、溶解劑及分散劑。醫藥學上可接受之界面活性劑，如聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80)；泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆 188)；曲拉通(Triton)；辛基糖苷鈉；月桂基-磺基甜菜鹼、肉豆蔻基-磺基甜菜鹼、亞油醇基-磺基甜菜鹼或硬脂醯基-磺基甜菜鹼；月桂基-肌胺酸、肉豆蔻基-肌胺酸、亞油醇基-肌胺酸或硬脂醯基-肌胺酸；亞油醇基-甜菜鹼、肉豆蔻基-甜菜鹼或鯨蠟基-甜菜鹼；月桂醯胺基丙基-甜菜鹼、椰油醯胺基丙基-甜菜鹼、亞油醯胺基丙基-甜菜鹼、肉豆蔻醯胺基丙基-甜菜鹼、棕櫚醯胺

基丙基-甜菜鹼或異硬脂醯胺基丙基-甜菜鹼(例如月桂醯胺基丙基)；肉豆蔻醯胺基丙基-二甲胺、棕櫚醯胺丙基-二甲胺或異硬脂醯胺基丙基-二甲胺；甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油醇牛磺酸二鈉；及 MONAQUA®系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)；聚乙二醇、聚丙二醇，及乙二醇與丙二醇之共聚物(例如 PLURONICS® PF68 等)可視情況添加至組成物中以減小聚集。在某些具體例中，組成物包含聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60 或聚山梨醇酯 80。在使用泵或塑膠容器以投與組成物時，界面活性劑特別適用。醫藥學上可接受之界面活性劑之存在減輕蛋白質聚集之傾向。組成物可包含濃度範圍介於約 0.001%至約 1%，或約 0.001%至約 0.1%，或約 0.01%至約 0.1%之間的聚山梨醇酯。在其他特定具體例中，組成物包含濃度為 0.001%、或 0.002%，或 0.003%，或 0.004%，或 0.005%，或 0.006%，或 0.007%，或 0.008%，或 0.009%，或 0.01%，或 0.015%，或 0.02%之聚山梨醇酯。組成物可包含濃度範圍介於 0.001%至 1%，或 0.001%至 0.1%，或 0.01%至 0.1%之間的聚山梨醇酯。在其他特定具體例中，組成物包含濃度為 0.001%、或 0.002%，或 0.003%，或 0.004%，或 0.005%，或 0.006%，或 0.007%，或 0.008%，或 0.009%，或 0.01%，或 0.015%，或 0.02%之聚山梨醇酯。

【0237】 在一些具體例中，組成物包含其他賦形劑及/或添加劑，包括(但不限於)稀釋劑、結合劑、穩定劑、親油性溶劑、防腐劑、佐劑或類似者。醫藥學上可接受之賦形劑及/或添加劑可用於本文中所提供之組成物中。常用賦形劑/添加劑，諸如醫藥學上可接受之螯合劑(例如，但不限於 EDTA、DTPA 或 EGTA)可視情況添加至組成物中以減小聚集。在使用泵或塑膠容器以投與組成物時，此等添加劑特別適用。

【0238】 在一些具體例中，組合物含有防腐劑。防腐劑，諸如、間甲酚、對甲酚、鄰甲酚、氯甲酚、苯甲醇、苯汞基亞硝酸鹽、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化鎂(例如，但不限於六水合物)、對羥基苯甲酸烷基酯(甲基、乙基、丙基、丁基及類似者)、苯紮氯銨、苄索氯銨、脫氫乙酸鈉及硫柳汞，或其混合物可視情況以諸如在 0.001%至 5%之

間，或其中之任何範圍或值的任何適合之濃度添加至組成物中。用於組成物中之防腐劑濃度為足以產生微生物效應之濃度。此類濃度取決於所選擇之防腐劑且容易藉由熟悉本技藝者測定。

【0239】 在一些具體例中，組成物與人類血液等張，其中組成物具有與人類血液基本上相同的滲透壓。此類等張組成物將通常具有 250 mOSm 至 350 mOSm 之滲透壓。等張性可藉由例如使用蒸氣壓或冰冷凍型滲透計量測。組成物之張力藉由使用張力調節劑來調節。「張力調節劑」為可添加至組成物中以提供組成物之等張性的彼等醫藥學上可接受之惰性物質。適用於本文中所提供之組成物的張力調節劑包括(但不限於)醣類、鹽類及胺基酸。

【0240】 在某些具體例中，組成物為實質上不含內毒素及/或相關熱解物質的無熱原組成物。內毒素包括限制於微生物內且當微生物分解或死亡時經釋放之毒素。熱解物質亦包括來自細菌及其他微生物之外膜的誘導發熱的熱穩定物質。若向人類投與，則兩種此等物質均可導致發熱、低血壓及休克。由於潛在有害影響，必須自靜脈內投與醫藥藥物溶液去除即使低量之內毒素。食品與藥物管理局(「FDA」)已設定每劑量每公斤體重在一小時內用於靜脈內藥物應用之上限為 5 個內毒素單位 (EU) (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000))。當治療蛋白以數百或數千毫克/公斤體重投與時，在具有所關注之蛋白質(例如，抗體)的情況下，必須去除即使痕量之有害及危險的內毒素。在一些具體例中，組成物中之內毒素及熱原質含量小於 10 EU/mg，或小於 5 EU/mg，或小於 1 EU/mg，或小於 0.1 EU/mg，或小於 0.01 EU/mg，或小於 0.001 EU/mg。

【0241】 在一些具體例中，當用於活體內投藥時，醫藥組成物應為無菌的。組成物可藉由各種滅菌方法，包括無菌過濾、輻射等來滅菌。在某些具體例中，組成物經預滅菌 0.22 微米過濾器來過濾滅菌。用於注射之無菌組成物可根據習知醫藥實踐來調配，如「Remington: The Science & Practice of Pharmacy」，第 21 版，Lippincott Williams & Wilkins, (2005)中所描述，其以全文引用之方式併入本文中。

【0242】 包含 pMHC 結合蛋白(諸如本文中揭示之彼等)之組成物通常將以凍乾形式或以溶液稀釋儲存。預期包含 pMHC-結合蛋白之無菌組成物經置放於具有無菌接取口之容器(例如，具有允許擷取組成物之適配器，諸如可藉由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或瓶)中。在某些具體例中，組成物以預填充注射器提供。

【0243】 在某些具體例中，組成物為凍乾調配物。術語「凍乾」或「冷凍乾燥」包括物質已經受乾燥程序(諸如冷凍乾燥)之狀態，其中至少 50%之濕氣已經去除。

【0244】 不管所選擇之投藥途徑，本文中所提供之可以合適之水合形式使用的藥劑及/或本文中所提供之醫藥組成物藉由熟悉本技藝者已知之習知方法調配成醫藥學上可接受之劑型。

【0245】 雖然已參考多種具體例特別地展示且描述本發明，但熟習本技藝者將理解，可對本文所揭示之各種具體例做出形式及細節之改變，而不背離本發明之精神及範疇，且本文所揭示之各種具體例並不意欲充當對申請專利範圍之範疇的限制。

實施例

【0246】 提供以下實施例僅為達成說明性目的，且不意欲限制本發明之範疇。

實施例 1

【0247】 包含(1)人類或人類化 MHC I 基因座、人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白基因座及/或人類或人類化 MHC II 基因座(參見例如，此類人類化基因座之非限制性實施例的圖 1 至圖 2)及(2)人類化免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈基因座(參見例如，Macdonald 等人，(2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111 :5147-52；其以全文引用之方式併入本文中)的小鼠使用任一種或兩種育種技術及在 ES 細胞中連續同源重組來形成。此等小鼠表現人類或 MHC I/ $\beta 2$ 微球蛋白分子及/或人類或人類化 MHC II 分子且對其耐受。藉由包含對小鼠為抗原性之肽及小鼠耐受之人類或人類化 MHC 的所關注之肽-MHC (pMHC)複合物使小鼠免疫。另外及視

情況藉由所關注之 pMHC 複合物使小鼠增強，該增強劑亦視情況連接至輔助 T 細胞抗原決定基。由人類化免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈基因座表現之人類或人類化抗體自經免疫小鼠血清分離，且測試結合於 pMHC 複合物之特異性。

【0248】 產生具有 C57BL 背景且包含編碼與人類化 $\beta 2$ 微球蛋白締合之人類化 MHC I 分子(HLA-A2/H-2K)之核苷酸序列(參見例如圖 1A 及 1C，亦參見美國專利第 9,591,835 號及第 9,615,550 號，其中之每一者以全文引用之方式併入)、人類化免疫球蛋白重鏈基因座(參見例如 Macdonald (2014)，同前文獻)及人類化共同輕鏈基因座(參見例如美國專利第 10,143,186 號；10,130,081 及 9,969,814；美國專利公開案第 20120021409 號、第 20120192300 號、第 20130045492 號、第 20130185821 號、第 20130302836 號及第 20150313193 號，該等公開案之每一者以全文引用之方式併入)的測試小鼠。此等測試小鼠及包含功能性(例如，鼠類) ADAM6 基因(參見例如美國專利第 8,642,835 號及第 8,697,940 號；該等公開案之每一者以全文引用之方式併入)及人類化免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座之對照小鼠藉由包含在 HLA-A2/ $\beta 2m$ 分子之背景中呈現之異源肽(肽 B)的單鏈 pMHC 複合物免疫，其中免疫原以如 SEQ ID NO:26 所闡述之蛋白質免疫原形式(圖 4)，或編碼包含如 SEQ ID NO:27 所闡述之胺基酸序列之單鏈 pMHC 複合物的 DNA 形式(圖 3)投與。使用具有標準佐劑之 pMHC 複合物免疫原(圖 3 至 4) 或使用連接 T 輔助肽之 pMHC 複合物免疫原(PADRE; 圖 5)以不同時間間隔經由不同途徑使小鼠增強。免疫前血清係在免疫起始之前自小鼠收集。小鼠經週期性地抽血且檢定對各別抗原之抗血清效價。

【0249】 血清中針對 HLA-A2 之情況下所呈現之不相關(肽 A 或肽 C)及相關抗原的抗體效價使用 ELISA 來測定。九十六孔微量滴定盤(Thermo Scientific)經含抗 myc 抗體之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS, Irvine Scientific)以 5 $\mu\text{g/ml}$ 隔夜塗覆。盤用含有 0.05% Tween 20 PBS-T, Sigma-Aldrich)之磷酸鹽緩衝鹽水洗滌且在室溫下藉由含 250 μl 之 0.5%牛血清白蛋白(BSA, Sigma-Aldrich) 之 PBS 阻斷 1 小時。盤用

PBS-T 洗滌且塗覆有 2 $\mu\text{g/ml}$ 包含在 HLA-A2 之背景中所呈現之相關肽 B 或不相關抗原肽 A 或肽 C 的經 c-myc 標記之單鏈 pMHC 複合物。

【0250】 免疫前及免疫抗血清在 0.5% BSA-PBS 中連續稀釋三倍，且在室溫下添加至盤中 1 小時。洗滌盤且將山羊抗小鼠 IgG-Fc-辣根過氧化酶(HRP)共軛之次級抗體(Jackson Immunoresearch)添加至盤中並且在室溫下培育 1 小時。使用 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)/ H_2O_2 作為基質根據製造商所推薦之程序洗滌且研發盤且使用光譜儀 (Victor, Perkin Elmer)記錄 450 nm 處之吸光度。使用 Graphpad PRISM 軟體計算抗體效價。抗體效價經計算為血清稀釋因子插入值，其中結合信號為背景值的 2 倍。

【0251】 結合含有肽 B 之單鏈 pMHC 的抗體效價在對照小鼠經編碼 HLA-A 之背景中之肽 B 的 DNA 免疫原或包含其之蛋白質免疫原免疫時誘發，圖 3 至 4 該對照小鼠包括不對嵌合 HLA-A2/H-2K 多肽及/或人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白耐受的群組。然而，此等對照小鼠之血清亦包含針對 HLA-A 之背景中所呈現之不相關肽(肽 A 或肽 C)的抗體效價，該抗體效價類似於針對含有肽 B 之單鏈 pMHC 的抗體效價(圖 3 至 4)。因此，儘管非耐受動物能夠產生針對所關注之 pMHC 複合物的免疫反應，但此類免疫反應可歸因於針對含有肽 B 之單鏈 pMHC 及針對含有不相關肽之單鏈 pMHC 的相當抗體效價而考慮為非特異性免疫反應。

【0252】 相比之下，來自對人類(化) HLA-A 及 $\beta 2$ 微球蛋白分子耐受且藉由單鏈肽 B/HLA-A/ $\beta 2\text{M}$ 複合物免疫之小鼠的血清誘發針對含有肽 B 之單鏈 pMHC 的抗體效價。(圖 4) 針對包含肽 B 之 pMHC 複合物的抗體效價大於針對包含不相關肽 A 或 C 之 HLA-A/ $\beta 2\text{M}$ 複合物的抗體效價 (圖 4)。類似地，當編碼肽 B/HLA-A/ $\beta 2\text{M}$ 複合物之 DNA 用作免疫原時，觀測到針對相關肽 B 單鏈蛋白質(相比不相關 pMHC 複合物)之更高的抗體效價 (圖 3)。相比於針對不相關 pMHC 複合物之抗體效價，針對免疫原之更高效價亦在第三群組中誘發，其中測試小鼠經投與包含肽 B 之單鏈 pMHC 複合物的初免注射，接著單鏈包含連接

至 PADRE 輔助 T 細胞抗原決定基之肽 B 的 pMHC 複合物增強(圖 5)。另外，由 ROSA26 基因座表現單鏈 HLA-A2/β2M 多肽(SEQ ID NO:23)之小鼠(參見例如，圖 2)類似地針對空白 HLA-A2/β2M 分子耐受且在藉由 pMHC/肽 B 複合物蛋白質(在存在或不存在 PADRE 時)免疫並增強時，相比於針對呈現不相關肽之 pMHC 複合物的抗體效價，產生針對呈現肽 B 之 pMHC 複合物的更高抗體效價(資料未展示)。

實施例 2

【0253】 由除相應內源性基因座之外的基因座(例如，ROSA26 基因座)表現 MHC I 類、MHC II 類及/或 β2M 分子的小鼠針對空白 MHC I 類、MHC II 類及/或 β2M 分子耐受，且當與針對空白 MHC I 類、MHC II 類及/或 β2M 分子未耐受之小鼠相比時，產生針對免疫原(例如，編碼單鏈 pMHC 複合物之 DNA)更高的抗體效價。

【0254】 本文中之資料證實使非人類動物對人類 HLA I 類及人類 β2 微球蛋白分子或其部分耐受增強了相比於對人類 HLA I 類及人類 β2 微球蛋白分子未耐受之對照非人類動物，經修飾之非人類動物產生針對所關注之 pMHC 之特異性抗體反應的能力。

【符號說明】

無

【序列表】

【0255】 本說明書參考 2019 年 3 月 21 日形成且具有 38.8 千位元組之檔案大小的命名為「10116WO01_ST25」之 ascii.txt 檔案之電子形式提供的序列表，其內容以全文引用之方式併入。

序列表

<110> 美商再生元醫藥公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 用於產生抗肽-MHC複合物之治療性抗體的經基因修飾的非人類動物、其製法與用途

<130> 009108.116W01/10116W001

<140> TW 108110132
 <141> 2019-03-22

<150> 62/647,720
 <151> 2018-03-24

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子序列

<400> 1
 Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子序列

<400> 2
 Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工 序列

<220>
 <223> 連接子序列

<400> 3
 Gly Gly Ser Gly
 1

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 4

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 5

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 6

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子序列

<400> 7

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 8

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 9

Gly Cys Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 10

Gly Cys Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子序列

<400> 12

Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子序列

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子序列

<400> 14

Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子序列

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子序列

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 17
 <211> 1230
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GCGGS+G4Sx2-hB2m-G4Sx4-hHLA-A2 ecto Y108C

<400> 17
 ggatgicggag gtagtggggg aggtggctcc gggggagggg gatccataca gicggactcca 60
 aagatccagg tgtatagtcg ccaccccgca gagaatggaa agtccaactt ccttaactgt 120
 tatgtgagcg gatttcaccc ttcagacata gaggtagacc ttctgaaaaa cggagagaga 180
 atagagaagg tagagcatag tgatctttct ttttccaagg actggagctt ctacctctg 240
 tactataccg agtttacacc cactgagaag gatgagtacg catgccgcgt gaaccacgta 300
 accctttctc aaccaaagat tgtaaaatgg gacagagaca tgggtggcgg cggtagcggc 360
 gggggcggaa gicggcggagg aggctccgtt ggggggtggtt cagggtccca ttctatgaga 420
 tattttttta caagcgtgag ccggcctggg agggggggagc cccggtttat cgctgtgggg 480
 tacgtggatg ataactcaatt cgtgcggttc gactctgacg ccgcctcaca gicgatggag 540
 cctagggcac cctggattga acaggagggc ccggaatact gggacggcga aaccgcgaag 600
 gtaaaagcgc acagccagac gcataggggtg gatctgggca ccctgcgggg ctgttataac 660
 cagtcagagg ctggctcaca cactgtacag cggatgtatg gttgtgacgt cggttccgat 720
 tggagatttc ttcgcggcta ccaccaatac gcctacgatg gcaaggacta catcgcactg 780
 aaggaagatt tgagatcttg gaccgcggcg gatatggcag cacagactac caaacacaag 840
 tgggaagctg ctcatgtggc agaacagctc cgcgcctatc tggagggcac ttgcgtcgag 900
 tggttgcgga gatactgga gaatgggaaa gaaacactgc agcggaccga tgcacctaaa 960
 acacatatga cgcaccacgc tgtgtccgac cacgaggcaa cactccggtg ttgggcactc 1020
 agcttctacc ctgctgaaat aacgctgacc tggcagcgcg acggcgaaga tcagacgcag 1080
 gacacagagc ttgttgaaac tcgccctgct ggcgacggca ccttccaaaa atgggcagca 1140
 gtagtcgtcc cctccggaca ggaacagcgg tatacttgcc acgtgcagca tgaaggtctc 1200
 cccaagcccc tcaactctgag atgggagccg 1230

<210> 18
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GCGGS+G4Sx2-hB2m-G4Sx4-hHLA-A2 ecto Y108C

<400> 18

Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile
1 5 10 15

Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn
20 25 30

Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser
35 40 45

Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val
50 55 60

Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu
65 70 75 80

Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg
85 90 95

Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg
100 105 110

Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr
130 135 140

Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly
145 150 155 160

Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser
165 170 175

Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu
180 185 190

Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His
195 200 205

Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
210 215 220

Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp
225 230 235 240

Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
245 250 255

Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met
 260 265 270

Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu
 275 280 285

Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg
 290 295 300

Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys
 305 310 315 320

Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg
 325 330 335

Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln
 340 345 350

Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg
 355 360 365

Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro
 370 375 380

Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu
 385 390 395 400

Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro
 405 410

- <210> 19
- <211> 1511
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
 <223> GCGGS+G4Sx2-hB2m-G4Sx4-HLA-A2 Y108C (G4S)4

<400> 19
 ctccatcattggaacgctcggcatagtgaggatgctggggagggtggctccggg 60
 ggaggggggatccatacagcgactccaaagatccaggtgatagtcgcca cccgcagag 120
 aatggaaagtccaacttcttaactgttatgtgagcggat ttcacccttc agacatagag 180
 gtagaccttc tgaaaaacgg agagagaata gagaaggtag agcatagtga tctttctttt 240
 tccaaggact ggagcttcta cctcctgtac tataccgagt ttacaccac tgagaaggat 300
 gagtacgcat gccgcgtgaa ccacgtaacc ctttctcaac caaagattgt aaaatgggac 360

agagacatgg gtggcggcgg tagcggcggg ggcggaagcg gcggaggagg ctccggtggg 420
 ggtggttcag ggtcccattc tatgagatat ttttttaciaa gcgtgagccg gcctgggagg 480
 ggggagcccc ggtttatcgc tgtgggggtac gtggatgata ctcaattcgt gcggttcgac 540
 tctgacgccg cctcacagcg catggagcct agggcacctt ggattgaaca ggagggcccc 600
 gaatactggg acggcgaaac ccgcaaggta aaagcgcaca gccagacgca tagggtggat 660
 ctgggcaccc tgcggggctg ttataaccag tcagaggctg gctcacacac tgtacagcgg 720
 atgtatggtt gtgacgtcgg ttccgattgg agatttcttc gcggctacca ccaatacgcc 780
 tacgatggca aggactacat cgcactgaag gaagatttga gatcttggac cgcggcggat 840
 atggcagcac agactaccaa acacaagtgg gaagctgctc atgtggcaga acagctccgc 900
 gcctatctgg agggcacttg cgtcagtggt ttgcggagat acctggagaa tggaaaagaa 960
 aactgcagc ggaccgatgc acctaaaaca catatgacgc accacgctgt gtccgaccac 1020
 gaggcaacac tccggtgttg ggcactcagc ttctacctg ctgaaataac gctgacctgg 1080
 cagcgcgacg gcgaagatca gacgcaggac acagagcttg ttgaaactcg ccctgctggc 1140
 gacggcacct tccaaaaatg ggcagcagta gtcgtcccct ccggacagga acagcggtat 1200
 acttgccacg tgcagcatga aggtctcccc aagccccctca ctttgagatg ggagccctct 1260
 tctcaaccca cgtacctat tgttggcatt atcgtctggtc tgggtgctttt tggagccgtg 1320
 attactggag cagtgggtggc agctgtgatg tggagacgca agtcttctga taggaagggc 1380
 ggatcttatt cccaggctgc gtccagtac agcgcaccagg ggtcagatgt cagcctgacc 1440
 gcatgcaagg tgggtgggtgg aggatctggc ggcggcggaa gcggaggggg aggatccgga 1500
 ggaggcggct c 1511

<210> 20
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GCGGS+G4Sx2-hB2m-G4Sx4-HLA-A2 Y108C (G4S)4

<400> 20

Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn
 20 25 30

Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser
 35 40 45

Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val
 50 55 60
 Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg
 85 90 95
 Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg
 100 105 110
 Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr
 130 135 140
 Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser
 165 170 175
 Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu
 180 185 190
 Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His
 195 200 205
 Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
 210 215 220
 Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp
 225 230 235 240
 Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
 245 250 255
 Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met
 260 265 270
 Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu
 275 280 285

Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg
 290 295 300

Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys
 305 310 315 320

Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg
 325 330 335

Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln
 340 345 350

Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg
 355 360 365

Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro
 370 375 380

Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu
 385 390 395 400

Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile
 405 410 415

Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile
 420 425 430

Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp
 435 440 445

Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln
 450 455 460

Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val Gly Gly Gly Gly Ser
 465 470 475 480

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 485 490

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> G4S連接子

<400> 21

Gly Cys Gly Gly Ser
1 5

<210> 22
<211> 1470
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mRORss-B2m-G4Sx4-HLA-A2

<400> 22
atgcacagac ctagacgtcg tggaaactcgt ccacctccac tggcactgct cgctgctctc 60
ctcctggctg cacgtggtgc tgatgcaata cagcggactc caaagatcca ggtgtatagt 120
cgccaccccg cagagaatgg aaagtccaac ttccttaact gttatgtgag cggatttcac 180
ccttcagaca tagaggtaga cttctgaaa aacggagaga gaatagagaa ggtagagcat 240
agtgatcttt ctttttccaa ggactgggagc ttctacctcc tgtactatac cgagtttaca 300
cccactgaga aggatgagta cgcattgccg gtgaaccacg taacccttcc tcaaccaaaag 360
attgtaaaat gggacagaga catgggtggc ggcggttagcg gcgggggcgg aagcggcggg 420
ggaggctccg gtgggggtgg ttcagggtcc cattctatga gatatttttt tacaagcgtg 480
agccggcctg ggagggggga gccccggttt atcgctgtgg ggtacgtgga tgatactcaa 540
ttcgtgcggt tegactctga cgcgcctca cagcgcattg agcctagggc accctggatt 600
gaacaggagg gcccggaata ctgggacggc gaaaccgca aggtaaaagc gcacagccag 660
acgcataggg tggatctggg caccttgcgg ggctattata accagtcaga ggctggctca 720
cacactgtac agcggatgta tggttgtgac gtcggttccg attggagatt tcttcgcggc 780
taccaccaat acgcctacga tggcaaggac tacatcgac tgaaggaaga tttgagatct 840
tggaccgagg cggatatggc agcacagact accaaacaca agtgggaagc tgctcatgtg 900
gcagaacagc tccgcgccta tctggagggc acttgcgtcg agtggttgcg gagataacctg 960
gagaatggga aagaaacact gcagcggacc gatgcacctt aaacacatat gacgcaccac 1020
gctgtgtccg accacgaggc aacactccgg tgttggggcac tcagcttcta ccctgctgaa 1080
ataacgctga cctggcagcg cgacggcgaa gatcagacgc aggacacaga gcttgttgaa 1140
actcgccctg ctggcgacgg caccttccaa aatggggcag cagtagtcgt cccctccgga 1200
caggaacagc ggtatacttg ccacgtgcag catgaaggtc tcccgaagcc cctcactttg 1260
agatgggagc cctcttctca acccagatc cctattgttg gcattatcgc tggctctggtg 1320
ctttttggag ccgtgattac tggagcagtg gtggcagctg tgatgtggag acgcaagtct 1380
tctgatagga agggcggatc ttattcccag gctgcgtcca gtgacagcgc ccaggggtca 1440
gatgtcagcc tgaccgcatg caaggtgtaa 1470

<210> 23
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mRORss-B2m-G4Sx4-HLA-A2

<400> 23

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Ile Gln Arg
 20 25 30

Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys
 35 40 45

Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile
 50 55 60

Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His
 65 70 75 80

Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr
 85 90 95

Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn
 100 105 110

His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val
 145 150 155 160

Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val
 165 170 175

Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg
 180 185 190

Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp
 195 200 205

Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val
210 215 220

Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser
225 230 235 240

His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg
245 250 255

Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile
260 265 270

Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala
275 280 285

Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu
290 295 300

Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu
305 310 315 320

Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His
325 330 335

Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp
340 345 350

Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp
355 360 365

Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala
370 375 380

Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly
385 390 395 400

Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys
405 410 415

Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile
420 425 430

Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly
435 440 445

Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys
450 455 460

Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser
465 470 475 480

Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
485

<210> 24
<211> 372
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合人類HLA-A2/小鼠H2-K

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(24)

<400> 24

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30

Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
35 40 45

Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
50 55 60

Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
65 70 75 80

Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln
85 90 95

Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
100 105 110

Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly
115 120 125

Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
130 135 140

Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
145 150 155 160

Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val
165 170 175

Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
180 185 190

Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
195 200 205

Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
210 215 220

Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
225 230 235 240

Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
245 250 255

Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
260 265 270

Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285

Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Thr
290 295 300

Val Ser Asn Met Ala Thr Val Ala Val Leu Val Val Leu Gly Ala Ala
305 310 315 320

Ile Val Thr Gly Ala Val Val Ala Phe Val Met Lys Met Arg Arg Arg
325 330 335

Asn Thr Gly Gly Lys Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Ala Pro Gly Ser Gln
340 345 350

Thr Ser Asp Leu Ser Leu Pro Asp Cys Lys Val Met Val His Asp Pro
355 360 365

His Ser Leu Ala
370

<210> 25

<211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GCCGS-G4Sx2-hB2m-G4Sx4-HLA-A*02:01 ecto
 (Y108C)-PADRE-myc-myc-6his

<400> 25

Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn
 20 25 30

Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser
 35 40 45

Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val
 50 55 60

Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg
 85 90 95

Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg
 100 105 110

Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr
 130 135 140

Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser
 165 170 175

Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu
 180 185 190

Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His
 195 200 205

Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
210 215 220

Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp
225 230 235 240

Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
245 250 255

Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met
260 265 270

Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu
275 280 285

Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg
290 295 300

Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys
305 310 315 320

Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg
325 330 335

Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln
340 345 350

Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg
355 360 365

Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro
370 375 380

Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu
385 390 395 400

Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ala Lys Phe Val Ala Ala
405 410 415

Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
420 425 430

Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His
435 440 445

His His His
450

<210> 26
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GCGGS-G4Sx2-hB2m-G4Sx4-HLA-A*02:01 ecto (Y108C)-myc-myc-6his
 <400> 26

Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn
 20 25 30

Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser
 35 40 45

Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val
 50 55 60

Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg
 85 90 95

Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg
 100 105 110

Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr
 130 135 140

Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser
 165 170 175

Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu
 180 185 190

Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His
 195 200 205

Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
210 215 220

Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp
225 230 235 240

Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
245 250 255

Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met
260 265 270

Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu
275 280 285

Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg
290 295 300

Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys
305 310 315 320

Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg
325 330 335

Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln
340 345 350

Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg
355 360 365

Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro
370 375 380

Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu
385 390 395 400

Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
405 410 415

Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
420 425 430

His His His His His His
435

<210> 27
 <211> 733
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GCCGS-G4Sx2-hB2m-G4Sx4-HLA-A*02:01 full length (Y108C)-G4Sx4-eGFP

<400> 27

Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn
 20 25 30

Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser
 35 40 45

Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val
 50 55 60

Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg
 85 90 95

Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg
 100 105 110

Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr
 130 135 140

Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser
 165 170 175

Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu
 180 185 190

Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His
 195 200 205

Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala
210 215 220

Gly Ser His Thr Val Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp
225 230 235 240

Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp
245 250 255

Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met
260 265 270

Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu
275 280 285

Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg
290 295 300

Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys
305 310 315 320

Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg
325 330 335

Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln
340 345 350

Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg
355 360 365

Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro
370 375 380

Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu
385 390 395 400

Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile
405 410 415

Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile
420 425 430

Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp
435 440 445

Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln
450 455 460

Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val Gly Gly Gly Gly Ser
465 470 475 480

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val
485 490 495

Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
500 505 510

Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
515 520 525

Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr
530 535 540

Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr
545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
565 570 575

Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
580 585 590

Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
595 600 605

Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp
610 615 620

Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
625 630 635 640

Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
645 650 655

Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
660 665 670

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val
675 680 685

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys
690 695 700

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr
 705 710 715 720

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 725 730

<210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PADRE

<400> 28

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 29

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 1 5

申請專利範圍

【第1項】一種製造經基因修飾之嚙齒類動物的方法，其包含：

(1) 修飾嚙齒類動物之基因體以包含：

(a) 編碼包含至少 HLA 分子的人類肽結合溝之人類或人類化 MHC 分子或至少其人類肽結合溝之核苷酸序列，及

(b) 未經重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座，以及

(2) 向該嚙齒類動物投與抗原性 pMHC 複合物，該抗原性 pMHC 複合物包含與該 HLA 分子或至少其人類肽結合溝締合之嚙齒類動物異源之肽，其中該經基因修飾之嚙齒類動物係：

A. 對該人類或人類化 MHC 分子或至少其人類肽結合溝耐受，以使得其在免疫接種該 pMHC 複合物時產生特異性 B 細胞反應，其產生人類或人類化抗體，該抗體係(A)特異性結合抗原性 pMHC 複合物，該 pMHC 複合物包含(i)與該經基因修飾之嚙齒類動物異源之肽，其與(ii)該 HLA 分子或至少其人類肽結合溝複合，及(B)不結合衍生該人類肽結合溝之空白 HLA 分子，且

B. 能夠由 B 細胞表現該人類或人類化抗體，該抗體包含：

(i) 人類或人類化重鏈可變域，其由該未經重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座所形成之重排重鏈可變區基因座所表現；及/或

(ii) 人類或人類化輕鏈可變域，其由該未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座所形成之重排輕鏈可變區基因座所表現，及

其中該嚙齒類動物為大鼠或小鼠。

【第2項】如請求項1之方法，其中該人類或人類化MHC分子選自由以下組成之群：人類或人類化MHC I類分子、人類或人類化MHC II類 α 分子、人類或人類化MHC II類 β 分子，或其任何組合，及/或

其中該經基因修飾之嚙齒類動物包含：

(a) 在內源性重鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之未經重排人類或人類化免

疫球蛋白重鏈可變區；

(ii) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之受限的未經重排人類或人類化重鏈可變區；

(iii) 共同的重鏈編碼序列；

(iv) 可操作連接至內源性重鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類或人類化重鏈可變區；

(v) 僅重鏈免疫球蛋白編碼序列；或

(vi) 編碼雜合免疫球蛋白鏈之未經重排人類或人類化雜合重鏈序列；

及/或

(b) 在內源性輕鏈基因座處：

(i) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈可變區；

(ii) 共同的輕鏈編碼序列；

(iii) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之受限的未經重排人類或人類化輕鏈可變區；

(iv) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之未經重排人類或人類化輕鏈可變區；或

(v) 可操作連接至內源性輕鏈恆定區之經組胺酸修飾之經重排人類或人類化輕鏈可變區。

【第3項】 如請求項1之方法，其中該經基因修飾之嚙齒類動物：

(i) 進一步包含功能性ADAM6基因，及/或

(ii) 進一步表現外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)基因。

【第4項】 如請求項3之方法，其中在(i)中，該功能性ADAM6基因為內源性ADAM6基因。

【第5項】 如請求項1之方法，其中該人類或人類化MHC分子為人類或人類化MHC I類分子。

【第6項】 如請求項5之方法，其中該人類肽結合溝衍生自選自由以下組成之群的HLA I類分子：HLA-A分子、HLA-B分子及HLA-C分子。

【第7項】如請求項5之方法，其中該經基因修飾之嚙齒類動物在其基因體中進一步包含編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列。

【第8項】如請求項7之方法，其中該編碼人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白之核苷酸序列係在內源性 $\beta 2$ 微球蛋白基因座處，其中該經基因修飾之嚙齒類動物表現該人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白，使得該經基因修飾之嚙齒類動物本身或與該人類或人類化MHC I類分子締合而對該人類或人類化 $\beta 2$ 微球蛋白耐受。

【第9項】如請求項1之方法，其中該人類或人類化MHC分子為人類或人類化MHC II類分子。

【第10項】如請求項9之方法，其中該人類或人類化MHC II類分子之人類肽結合溝衍生自選自由以下組成之群的HLA II類分子的 α 鏈及/或 β 鏈：HLA-DP分子、HLA-DQ分子及HLA-DR分子。

【第11項】如請求項1之方法，其中編碼該人類或人類化MHC分子或至少其人類肽結合溝之核苷酸序列係編碼完全人類MHC分子。

【第12項】如請求項11之方法，其中該編碼完全人類MHC分子之核苷酸序列係編碼人類MHC分子不破壞內源性嚙齒類動物MHC基因座。

【第13項】如請求項12之方法，其中該編碼完全人類MHC分子之核苷酸序列置放於內源性ROSA26基因座中。

【第14項】如請求項1之方法，其中編碼該人類或人類化MHC分子或至少該人類肽結合溝之核苷酸序列編碼包含可操作地連接至內源性MHC分子之跨膜及細胞質域的HLA分子之細胞外域的嵌合人類/嚙齒類動物MHC分子。

【第15項】如請求項14之方法，其中編碼該人類或人類化MHC分子或至少該人類肽結合溝之核苷酸序列係編碼：

(i) 嵌合人類/嚙齒類動物MHC I類分子，其包含選自由HLA-A、HLA-B及HLA-C組成之群的HLA I類分子之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 結構域，該HLA I類分子可操作地連接至內源性嚙齒類動物MHC I類分子之跨膜及細胞質域，及/或

(ii) 嵌合人類/嚙齒類動物MHC II類分子，其包含HLA II類 α 分子之 $\alpha 1$

結構域及 $\alpha 2$ 結構域，及/或 HLA I 類 β 分子之 $\beta 1$ 結構域及 $\beta 2$ 結構域，該 HLA II 類 α 分子可操作地連接至內源性嚙齒類動物 MHC II 類 α 分子之跨膜及細胞質域，該 HLA I 類 β 分子可操作地連接至內源性嚙齒類動物 MHC II 類 β 分子之跨膜及細胞質域。

【第16項】如請求項15之方法，其中在(i)中，該內源性嚙齒類動物MHC I類分子選自由以下組成之群：內源性鼠類H-2K多肽、內源性鼠類H-2D多肽及內源性鼠類H-DL多肽。

【第17項】如請求項15之方法，其中在(ii)中：

- (i) 該內源性嚙齒類動物MHC II類 α 分子為內源性鼠類H-2A α 多肽或內源性鼠類H-2E α 多肽；及/或
- (ii) 該內源性嚙齒類動物MHC II類 β 分子為內源性鼠類H-2A β 多肽或內源性鼠類H-2E β 多肽。

【第18項】如請求項1之方法，其中該經基因修飾之嚙齒類動物對於編碼人類或人類化MHC分子或至少其肽結合溝之該核苷酸序列為異型組合的。

【第19項】如請求項1之方法，其中該經基因修飾之嚙齒類動物為小鼠。

【第20項】如請求項1之方法，其中該方法包含：

(a)

(1) 將編碼該人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合溝之核苷酸序列插入至第一異位基因座中，或

(2)

(A) 在內源性嚙齒類動物 MHC I 基因座處，以編碼人類或人類化 MHC I 多肽之核苷酸序列來替換編碼嚙齒類動物 MHC I 多肽之核苷酸序列，以形成編碼該人類或人類化 MHC 分子之核苷酸序列，及/或

(B) 在內源性嚙齒類動物 MHC II 基因座處，以編碼人類或人類化 MHC II 分子之核苷酸序列來替換編碼嚙齒類動物 MHC II 分子之核苷酸序列，及

(b)

(i) 將未經重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座插入至第二異位基因座中，或

(ii)

(A) 在內源性嚙齒類動物重鏈基因座處，以未經重排人類免疫球蛋白可變(V_H)基因區段來替換內源性嚙齒類動物免疫球蛋白可變(V_H)基因區段，其中該未經重排人類 V_H 基因區段可操作地連接至內源性重鏈恆定區基因序列，及/或

(B) 在內源性嚙齒類動物輕鏈基因座處，以人類輕鏈可變(V_L)基因區段及人類輕鏈連接(J_L)基因區段來替換內源性嚙齒類動物輕鏈可變(V_L)基因區段及內源性嚙齒類動物輕鏈連接(J_L)基因區段， 其中

(A) (a)(1) 編碼該人類或人類化 MHC 分子或至少其肽結合溝之核苷酸序列及(b)(i)未經重排人類或人類化免疫球蛋白重鏈基因座及/或未經重排人類或人類化免疫球蛋白輕鏈基因座係：

(I) 藉由連續同源重組插入在單一嚙齒類動物胚胎幹(ES)細胞中；或

(II) 插入第一及第二 ES 細胞中，其中該第一及第二 ES 細胞分別用於產生第一及第二經基因修飾之嚙齒類動物；或

(B)(a)(2) 編碼該嚙齒類動物 MHC I 多肽之核苷酸序列及/或編碼嚙齒類動物 MHC II 多肽之核苷酸序列及(b)(ii)該內源性嚙齒類動物 V_H 基因區段及/或 V_L 及 J_L 基因區段係：

(I) 藉由連續同源重組插入在單一嚙齒類動物胚胎幹(ES)細胞中；或

(II) 插入第一及第二 ES 細胞中，其中該第一及第二 ES 細胞分別用於產生第一及第二經基因修飾之嚙齒類動物。

【第21項】 如請求項20之方法，其中在(b)(ii)(A)中，該方法進一步包含在內源性嚙齒類動物重鏈基因座處以未經重排人類免疫球蛋白多樣性(D_H)基因區段及/或未經重排人類免疫球蛋白連接(J_H)基因區段來分別替換內源性嚙齒類動物免疫球蛋白多樣性(D_H)及/或內源性非人類連接(J_H)基因區段，其中該未經重排 D_H 基因區段及未經重排 J_H 基因區段可操作地連接至該內源性重鏈恆定區基因序列。

【第22項】 如請求項20之方法，其中在(b)(ii)(B)中，該人類 V_L 基因區段

及該人類 J_L 基因區段經重排以形成 V_L/J_L 基因序列，其中該人類 V_L 及連接 J_L 基因區段可操作地連接至內源性輕鏈恆定區基因序列。

【第23項】如請求項1之方法，其中該抗原性pMHC複合物連接至輔助T細胞抗原決定基。

【第24項】如請求項23之方法，其中該輔助T細胞抗原決定基為PADRE。

【第25項】如請求項24之方法，其中該PADRE輔助T細胞抗原決定基包含SEQ ID NO: 28所述之胺基酸序列。

【第26項】如請求項20之方法，其中在(a)(2)中，該人類化MHC I分子包含HLA I類分子之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 結構域及內源性嚙齒類動物MHC I多肽之至少跨膜及細胞質域，及/或其中該人類化MHC II分子包含HLA II類分子之 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 結構域及內源性嚙齒類動物MHC II多肽之至少跨膜及細胞質域。

【第27項】如請求項20之方法，其中該方法進一步包含靶向編碼內源性MHC多肽細胞外域、 $\beta 2$ 微球蛋白及內源性免疫球蛋白可變區的序列且分別用人類MHC細胞外域、人類 $\beta 2$ 微球蛋白及人類免疫球蛋白可變區將其替換。

【第28項】一種產生特異性地結合所關注之抗原性pMHC複合物的人類或人類化抗體的方法，其包含將根據如請求項1至27中任一項之方法所製造的經基因修飾之嚙齒類動物保持在足以使該經基因修飾之嚙齒類動物建立針對該所關注之抗原性pMHC複合物之免疫反應的條件下，其中該所關注之抗原性pMHC複合物包含與該經基因修飾之嚙齒類動物異源且在該人類HLA分子或至少其人類肽結合溝的背景中呈現之肽。

【第29項】一種產生編碼特異性地結合所關注之抗原性pMHC複合物的人類或人類化抗體之核酸序列的方法，其包含將根據如請求項1至27中任一項之方法所製造的經基因修飾之嚙齒類動物保持在足以使該經基因修飾之嚙齒類動物建立針對該所關注之抗原性pMHC複合物之免疫反應的條件下，其中該所關注之抗原性pMHC複合物包含與該經基因修飾之嚙齒類動物異源且在該人類HLA分子或至少其人類肽結合溝的背景中呈現之肽。

【第30項】如請求項28或29之方法，其進一步包含作為第一步驟使該經基因修飾之嚙齒類動物免疫接種該所關注之抗原性pMHC複合物。

【第31項】如請求項28或29之方法，其進一步包含增強經免疫接種之經基因修飾之嚙齒類動物之免疫反應。

【第32項】如請求項28或29之方法，其進一步包含以連接至包含PADRE之輔助T細胞抗原決定基的該所關注之pMHC複合物免疫接種及/或增強該經基因修飾之嚙齒類動物。

【第33項】一種獲得編碼人類免疫球蛋白重鏈可變域及/或人類免疫球蛋白輕鏈可變域之核酸的方法，其包含：

自根據如請求項 1 至 27 中任一項之方法所製造的經基因修飾之嚙齒類動物分離包含重排人類免疫球蛋白可變區基因序列之核酸，該基因序列編碼由該經基因修飾之嚙齒類動物之淋巴細胞，或由該淋巴細胞產生之融合瘤表現的人類免疫球蛋白可變域，

其中由該淋巴細胞或由其產生之融合瘤表現的該人類免疫球蛋白可變域與其同源可變域締合以形成針對該抗原性 pMHC 複合物具有特異性之抗原結合域。

【第34項】一種獲得表現人類免疫球蛋白重鏈可變域及/或人類免疫球蛋白輕鏈可變域之細胞的方法，其包含：

自根據如請求項 1 至 27 中任一項之方法所製造的經基因修飾之嚙齒類動物分離淋巴細胞，

其中該淋巴細胞表現形成對該抗原性 pMHC 複合物具有特異性之抗原結合域的人類免疫球蛋白可變域。

【第35項】如請求項34之方法，其進一步包含自該經分離淋巴細胞產生融合瘤。

【第36項】一種經分離之淋巴細胞，其係根據如請求項34之方法所獲得。

【第37項】一種融合瘤，其係根據如請求項35之方法所產生。

【第38項】一種活體外製造人類免疫球蛋白可變域之方法，其包含：在細胞中表現包含重排人類免疫球蛋白可變區基因序列之第一核酸，

該基因序列編碼由根據請求項 1 至 27 中任一項之方法所製造的經基因修飾之嚙齒類動物之淋巴細胞，或由該淋巴細胞產生之融合瘤表現的人類免疫球蛋白可變域，

其中由該淋巴細胞或由其產生之融合瘤表現的該人類免疫球蛋白可變域與其同源可變域締合以形成針對該抗原性 pMHC 複合物具有特異性之抗原結合域。

【第39項】如請求項38之方法，其中該第一核酸進一步包含可操作地連接至該重排人類免疫球蛋白可變區基因序列之人類免疫球蛋白恆定區基因序列。

【第40項】如請求項39之方法，其中該人類免疫球蛋白恆定區基因序列為重鏈恆定區基因序列且包含在pH範圍介於5.5至6.0下增加IgG重鏈恆定區胺基酸序列之C_H2-C_H3區與新生兒Fc受體(FcRn)之親和力的修飾，其中該修飾為選自由以下組成之群的該IgG重鏈恆定區胺基酸序列中之突變：

M428L、N434S、V259I、V308F、N434A、M252Y、S254T、T256E、T250Q、H433K、N434Y及其組合。

圖式

圖 1A 嵌合 HLA-A2/H-2K 基因座

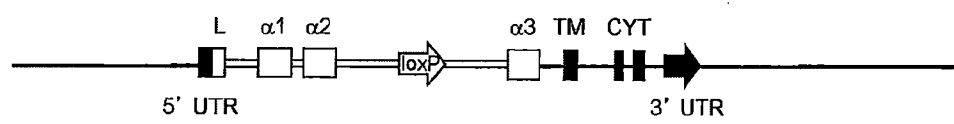


圖 1B 嵌合 HLA-DR2/H2-E 基因座

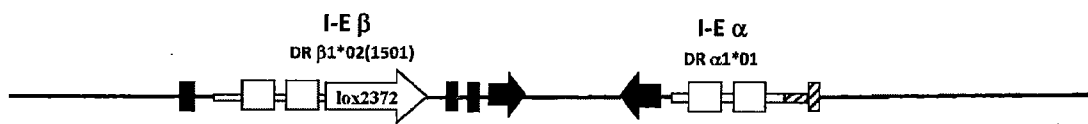
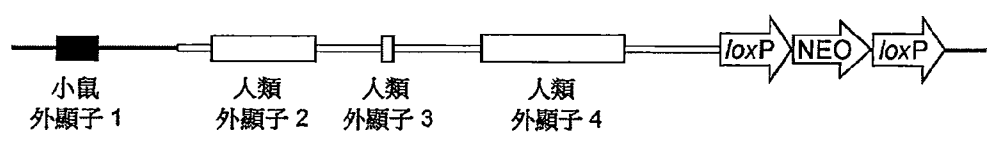


圖 1C 人類化 β2m 基因座



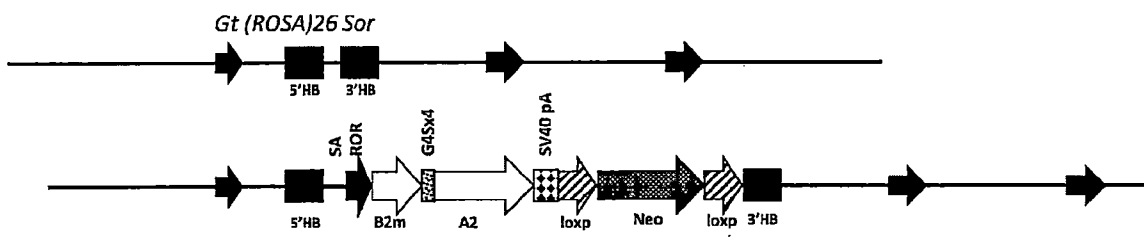


圖 2

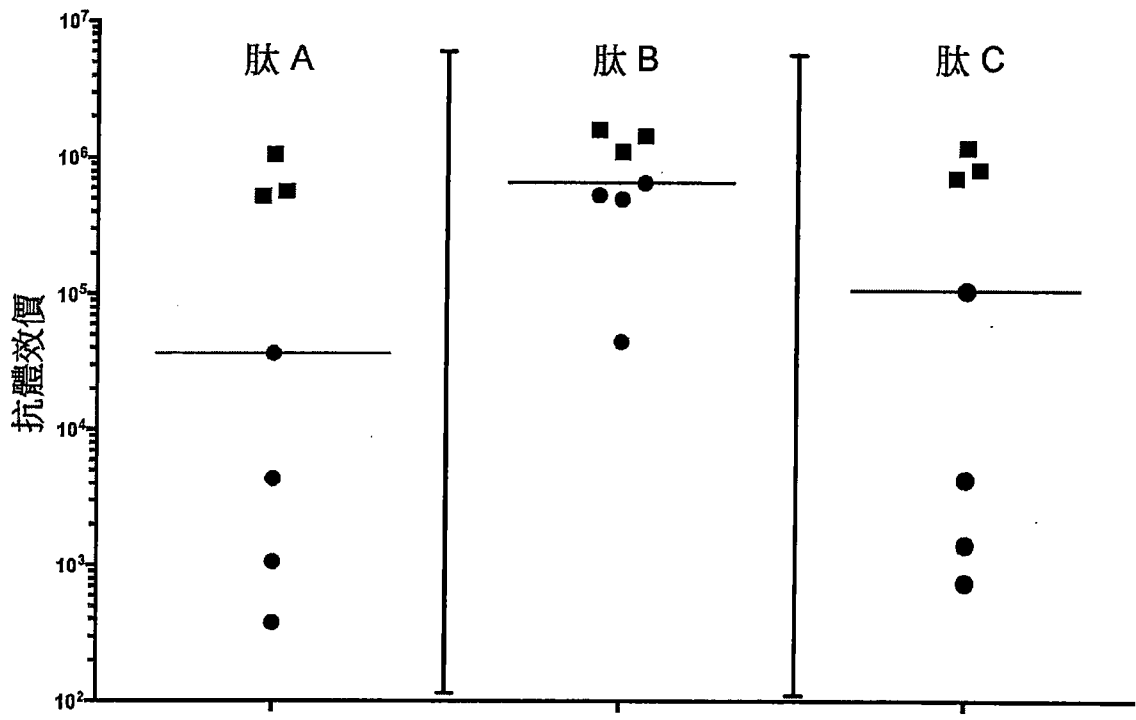


圖 3

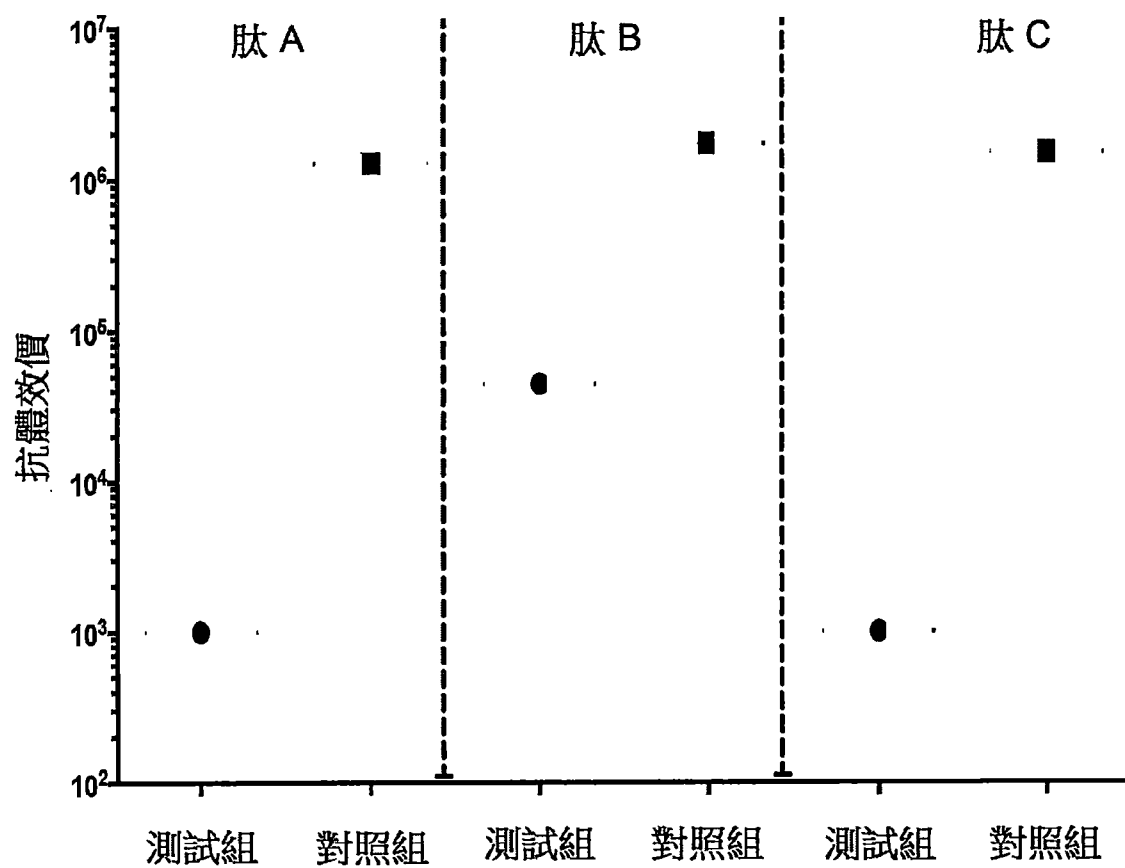


圖 4

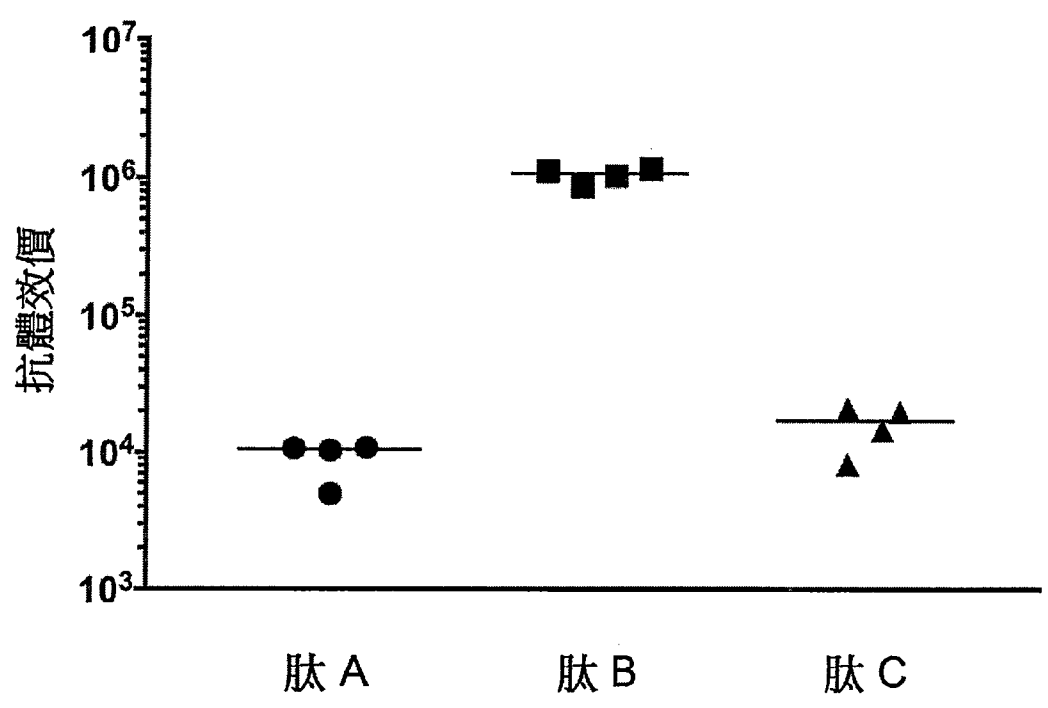


圖 5