

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-516996
(P2024-516996A)

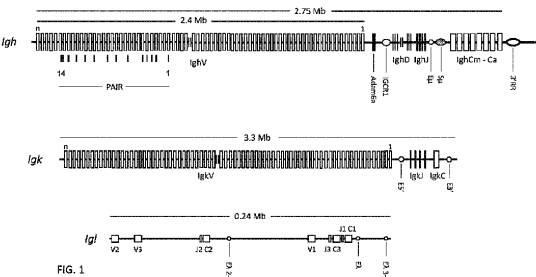
(43)公表日 令和6年4月18日(2024.4.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 0 1 K	67/0278(2024.01)	A 0 1 K	67/0278	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/0781(2010.01)	C 1 2 N	5/0781		4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	5/20 (2006.01)	C 1 2 N	5/20		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-567910(P2023-567910)	(71)出願人	518278007
(86)(22)出願日	令和4年5月4日(2022.5.4)		トリアニ・インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年12月22日(2023.12.22)		Trianni, Inc.
(86)国際出願番号	PCT/US2022/027622		アメリカ合衆国19801デラウェア州
(87)国際公開番号	WO2022/235759		ウィルミントン、オレンジ・ストリート
(87)国際公開日	令和4年11月10日(2022.11.10)		1209
(31)優先権主張番号	63/184,440	(74)代理人	100145403
(32)優先日	令和3年5月5日(2021.5.5)		弁理士 山尾 憲人
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子
		(72)発明者	ミュラー、ヴェルナー
			ドイツ50931ケルン、ヴォエンザム
			シュトラッセ9
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トランスジェニック哺乳動物およびその使用方法

(57)【要約】
ここに記載されるのは、治療ウマ抗体の開発のための、ウマ可変ドメインを有する免疫グロブリンを発現するトランスジェニック齧歯類を含む、ウマ可変ドメインを有する免疫グロブリンを発現するトランスジェニック哺乳動物である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

内因性齧歯類免疫グロブリン可変遺伝子座が欠失され、ウマ免疫グロブリン可変遺伝子コード配列および内因性齧歯類免疫グロブリン可変遺伝子座に基づく非コード制御配列を含む部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座で置き換えられているトランスジェニック齧歯類であって、ここで、トランスジェニック齧歯類の部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座が機能的であり、ウマ可変ドメインおよび齧歯類定常ドメインを含む免疫グロブリン鎖を発現する、トランスジェニック齧歯類。

【請求項 2】

部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がウマ V_H 、 D_H および J_H コード配列を含む、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

10

【請求項 3】

部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がウマカップ V_L および J_L コード配列、ウマラムダ V_L および J_L コード配列またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

【請求項 4】

部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がウマ V_H 、 D_H および J_H 、ウマカップ V_L および J_L コード配列、ウマラムダ V_L および J_L コード配列またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

【請求項 5】

齧歯類がマウスである、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

20

【請求項 6】

非コード制御配列が、個々の V 遺伝子セグメント、スプライス部位および $V(D)J$ 組み換えのための組み換えシグナル配列の前にプロモーターを含む、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

【請求項 7】

部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がさらに $A D A M 6$ 遺伝子を含む、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

【請求項 8】

部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がさらに $P a x - 5$ 活性化遺伝子間反復 ($P A I R$) 配列を含む、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

30

【請求項 9】

部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がさらに重鎖遺伝子間制御領域 1 からの $C T C F$ 結合部位を含む、請求項 1 のトランスジェニック齧歯類。

【請求項 10】

請求項 1～9 の何れかのトランスジェニック齧歯類からの B リンパ球系譜の細胞。

【請求項 11】

請求項 10 の B リンパ球系譜の細胞由来のハイブリドーマ細胞。

【請求項 12】

請求項 10 の B リンパ球系譜の細胞由来の不活化細胞。

40

【請求項 13】

請求項 10 の B リンパ球系譜の細胞、請求項 11 のハイブリドーマまたは請求項 12 の不活化細胞由来のウマ可変ドメインおよび齧歯類定常ドメインを含む、一部または完全免疫グロブリン分子。

【請求項 14】

請求項 1 のトランスジェニック齧歯類を産生する方法であって：

a) 齧歯類細胞のゲノムに、少なくとも 1 個の部位特異的リコンビナーゼの標的部位を内因性免疫グロブリン可変遺伝子座の上流および少なくとも 1 個の部位特異的リコンビナーゼの標的部位を内因性免疫グロブリン可変遺伝子座の下流に統合し、ここで、内因性免疫グロブリン可変遺伝子座は (i) V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメント、(ii) V_K および

50

J κ 遺伝子セグメント、(iii) V λ および J λ 遺伝子セグメント；または(iv) V λ および J λ 遺伝子セグメントおよび C λ 遺伝子を含むものであり；

b) 部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むベクターを提供し、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、各々がウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子コード配列および齧歯類非コード制御配列を含む部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントと、部位特異的リコンビナーゼの標的部位に隣接した部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座を含み、ここで、標的部位は工程 a) で齧歯類細胞に導入した標的部位の組み換えが可能であるものであり；

c) 細胞に工程 b) のベクターおよび標的部位を認識できる部位特異的リコンビナーゼを導入し；

d) 細胞のゲノムと部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座で組み換え事象を生じさせ、内因性免疫グロブリン可変遺伝子座の部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座での置き換えをもたらす；

e) 工程 d) で産生した部分的ウマ免疫グロブリン可変遺伝子座を含む細胞を選択し；そして

f) 部分的ウマ免疫グロブリン可変遺伝子座を含むトランスジェニック齧歯類の作製に細胞を使用する

ことを含む。

【請求項 15】

細胞が齧歯類胚幹 (ES) 細胞である、請求項 14 の方法。

【請求項 16】

細胞がマウス胚幹 (ES) 細胞である、請求項 15 の方法。

【請求項 17】

導入工程後および提供工程の前、第一セットの標的部位を認識するリコンビナーゼの導入により内因性免疫グロブリン可変遺伝子座を欠失する工程をさらに含み、ここで欠失工程は、齧歯類細胞のゲノムにおける互いに組み換えできない少なくとも 2 個の標的部位を残す、請求項 14 の方法。

【請求項 18】

ベクターがウマ V H 、D H および J H コード配列を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 19】

ベクターが κ または λ の V L および J L コード配列を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 20】

ベクターがさらに内因性宿主起源の V 遺伝子プロモーター、スプライス部位および組み換えシグナル配列を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 21】

ベクターがさらに A D A M 6 遺伝子を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 22】

ベクターがさらに P a x - 5 活性化遺伝子間反復要素を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 23】

ベクターがさらに重鎖遺伝子間制御領域 1 からの C T C F 結合部位を含む、請求項 14 の方法。

【請求項 24】

治療または診断用途のための抗体を産生する方法であって：

(i) ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にキメラ V H 、D および J H 免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも 1 個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラ V L および J L 可変遺伝子セグメントの各々の少なくとも 1 個を含む免疫グロブリン遺伝子座可変領域で置き換えられたトランスジェニック齧歯類の抗体産生細胞からクローン化されたウマ可変ドメインを有する抗体を発現させ、ここで各キメラ遺伝子セグメントはウマ V、D または J 免疫グロブリン可変領域コード配列および齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺

10

20

30

40

50

伝子セグメント配列を含むものであり；そして

(ii) ウマ可変ドメインを有する抗体を単離することを含み、ここで該抗体が治療または診断用途に適する、方法。

【請求項 25】

抗体がトランスジェニック齧歯類の B 細胞からクローン化される、請求項 24 の方法。

【請求項 26】

請求項 24 の方法により産生される、治療または診断抗体。

【請求項 27】

ウマ可変ドメインを有する治療または診断抗体を産生する方法であって：

(i) ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にキメラ V_H 、 D_H および J_H 免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも 1 個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラ V_L および J_L 可変遺伝子セグメントの各々の少なくとも 1 個を含む免疫グロブリン遺伝子座可変領域で置き換えられている、トランスジェニック齧歯類からの抗体産生細胞により発現される抗体のウマ可変ドメインをクローニングし、ここで各キメラ遺伝子セグメントはウマ V 、 D または J 免疫グロブリン可変領域コード配列および齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺伝子セグメント配列を含むものであり；そして

(ii) トランスジェニック齧歯類により発現される抗体のウマ可変ドメインを含む治療または診断抗体を産生することを含む、方法。

【請求項 28】

ウマ可変ドメインが、トランスジェニック齧歯類からの B 細胞により発現される抗体からクローン化される、請求項 27 の方法。

【請求項 29】

請求項 27 の方法により産生される、治療または診断抗体。

【請求項 30】

ウマ可変ドメインを含むモノクローナル抗体を産生する方法であって：

(i) ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にキメラ V_H 、 D_H および J_H 免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも 1 個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラ V_L および J_L 可変遺伝子セグメントの各々の少なくとも 1 個を含む免疫グロブリン遺伝子座可変領域で置き換えられている、トランスジェニック齧歯類から B 細胞を提供し、ここで各キメラ遺伝子セグメントは齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺伝子セグメント配列に包埋されたウマ V 、 D または J 免疫グロブリン可変領域コード配列を含むものであり；

(ii) B 細胞を不死化し；そして

(iii) 不死化 B 細胞または該抗体をコードする遺伝子により発現されるウマ可変ドメインを含むモノクローナル抗体を単離する

ことを含む、方法。

【請求項 31】

さらに

(iv) B 細胞により発現されるウマ可変ドメインをクローニングし；そして

(v) トランスジェニック齧歯類の B 細胞からクローン化したウマ可変ドメインを含む治療または診断抗体を産生する

ことを含む、請求項 30 の方法。

【請求項 32】

ウマ可変ドメインを含む抗体を産生する方法であって、ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にキメラ V_H 、 D_H および J_H 免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも 1 個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラ V_L および J_L 可変遺伝子セグメントの各々の

10

20

30

40

50

少なくとも1個を含む免疫グロブリン遺伝子座可変領域で置き換えられているトランスジェニック齧歯類を提供することを含み、ここで各キメラ遺伝子セグメントは齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺伝子セグメント配列に包埋されたウマV、DまたはJ免疫グロブリン可変領域コード配列を含み、ここでトランスジェニック齧歯類の免疫グロブリン遺伝子座はウマ可変ドメインを含む抗体を発現するものである、方法。

【請求項33】

トランスジェニック齧歯類または該抗体をコードする遺伝子により発現されるウマ可変領域を含む抗体を単離することをさらに含む、請求項32の方法。

【請求項34】

(i) 標的抗原に特異的な抗体を発現するトランスジェニック齧歯類からB細胞を得て；

(ii) B細胞を不死化し；そして

(iii) 不死化B細胞から標的抗原に特異的な抗体を単離する

ことをさらに含む、請求項32の方法。

【請求項35】

特定の抗原に特異的なB細胞からウマ可変領域をクローニングすることをさらに含む、請求項34の方法。

【請求項36】

B細胞からクローン化されたウマ可変領域を使用して、治療または診断抗体を産生することをさらに含む、請求項35の方法。

【請求項37】

請求項32の方法により産生された、治療または診断抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ウマモノクローナル抗体の産生のための抗原特異的抗体分泌細胞の産生が可能であるトランスジェニック哺乳動物を産生する方法を含む、免疫グロブリン分子の産生に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

以下の記載において、ある種の文献および方法を背景および前置きの目的で記載する。ここに含まれるもの、何れも先行技術の「承認」と解釈すべきではない。出願人は、ここに引用する文献および方法が、適応可能な法規条項の下に先行技術を構成しないことを、適宜証明する権利を明示的に保持する。

【0003】

抗体は、(i) 多様な分子形態の抗原を標的とできる非常に強い結合性質を示す、(ii) ヒトおよび動物の処置において忍容性が良好となる望ましい薬物動態を有する生理学的分子であるおよび(iii) 天然に感染因子を撃退する強力な免疫学的性質と関連するため、重要な生物学的医薬品として出現してきている。さらに、体内に本来存在しない事実上あらゆる外来物質に対する特異的抗体応答を容易に搭載できる、実験動物からの抗体の迅速な単離のための確立された技術が存在する。

【0004】

最も基本的な形態において、抗体は、各々同一軽(L)鎖と対合した2個の同一重(H)鎖を含む。H鎖およびL鎖両方のN末端は可変ドメイン(それぞれV_HおよびV_L)を含み、一体となって固有の抗原結合特異性を有する対合H-L鎖を提供する。

【0005】

抗体V_HおよびV_Lドメインをコードするエクソンは生殖細胞系列DNAに存在しない。その代わり、各V_Hエクソンは、免疫グロブリンH鎖遺伝子座に存在する無作為に選択されたV_H、DおよびJ_H遺伝子セグメントの組み換えにより産生され；同様に、個々の

10

20

30

40

50

V_Lエクソンは、軽鎖遺伝子座の無作為に選択されたV_LおよびJ_L遺伝子セグメントの染色体再配置により産生される。

【0006】

哺乳動物において、ゲノムは、典型的にH鎖を発現できる2個のアレル、カッパ(κ)L鎖を発現できる2個のアレルおよびラムダ(λ)L鎖を発現できる2個のアレルを含む(各親から1個のアレル)。免疫グロブリンH鎖遺伝子座に複数のV_H、DおよびJ_H遺伝子セグメントならびに免疫グロブリンκ(I G K)および免疫グロブリンλ(I G L)L鎖遺伝子座両方に複数のV_LおよびJ_L遺伝子セグメントがある(Collins and Watson (2018) Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements, Receptor Editing and the Development of a Self-Tolerant Antibody Repertoire. Front. Immunol. 9: 2249. (doi: 10.3389/fimmu.2018.02249))。

10

【0007】

重鎖遺伝子座において、種々の抗体クラス(アイソタイプ)を発現するためのエクソンも存在する。例えば、ウマ動物において、コードされるアイソタイプはI g M、I g D、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g G 5、I g G 6、I g G 7、I g EおよびI g Aである。多型バリエーション(アロタイプとも称する)もコードされるアイソタイプの中に存在し、アレルマーカーとして有用であり得る。ウマ動物において、多型バリエーションはI g M、I g G 3、I g G 4、I g G 7およびI g Eアロタイプに存在する。

【0008】

B細胞発達中、遺伝子再配列がまずH鎖可変遺伝子セグメントを含む2個の相同染色体の一方で起こる。プレB細胞において、得られたV_Hエクソンが、I g M H鎖(μ H鎖)発現のためにその後RNAレベルでC_μエクソンにスプライスされる。プレB細胞により合成されたμ H鎖の大部分は小胞体(E R)に保持され、最終的にμ H鎖の部分的に折り畳まれていないC_H1ドメインと常在E RシャペロンB i Pの間の非共有結合的相互作用のために分解される(Haas and Wabl, Nature, 306: 387-9, 1983; Bole et al., J Cell Biol. 102: 1558, 1986)。しかしながら、μ H鎖のごく一部は不変λ 5およびVプレBタンパク質を含むサロゲート軽鎖複合体と結合する。この結合はB i Pを押し付け、μ H鎖/λ 5/VプレB複合体が、I g α/βシグナル伝達分子ヘテロ二量体と共に、プレB細胞受容体(プレB C R)としてE Rを出て、分泌経路を通り原形質膜に輸送されることを可能とする。

20

30

【0009】

その後、V_L-J_L再配列が、機能的L鎖が形成されるときまで一方のL鎖アレルで生じ、その後、L鎖ポリペプチドがI g M H鎖ホモ二量体と結合して、未成熟B細胞表面で発現される完全機能的抗原特異的B細胞受容体(B C R)を形成し得る。

【0010】

未成熟B細胞は二次リンパ系臓器に遊走され、そこで成熟B細胞に分化され、これは同族抗原に応答でき、抗体分泌形質細胞および記憶B細胞に分化される。T細胞の助けにより、B細胞は抗体アイソタイプをI g MからI g G、I g AまたはI g Eに変えるアイソタイプスイッチングならびにV_HおよびV_Lエクソンのアミノ酸配列を変えることができる体細胞超変異を受け得る。これらの変異はV_HおよびV_Lエクソンに無作為に導入されるが、免疫化抗原に対する親和性が高いB細胞はより多くの抗原を取り込み、処理し、T濾胞性ヘルパー細胞に提示でき、故に、免疫化抗原に対する親和性が低いまたはないB細胞と比較して優先的に活性化される。その結果、体細胞性変異は相補性決定領域(C D R) 1、2および3に濃縮され、なぜなら、これらがV_HおよびV_Lドメインの抗原と相互作用する領域であるからである。

40

【0011】

種々のマウス免疫グロブリンをコードする遺伝子は大規模に特徴づけられている。例えば、BlankensteinおよびKrawinkelは、Eur. J. Immunol., 17: 1351-1357 (1987)でマウス可変重鎖領域を記載する。ウマ免疫グロブリン遺伝子(例えば、サラブレッド、Equus caballus、Twilight breedから)は構造的に特徴づけられている。Sun et

50

al. (Dev. Comp. Immunol. 34: 109 (2010))およびTalmadge et al. (Dev. Comp. Immunol. 1: 33 (2013); Dev. Comp. Immunol. 46: 171 (2014))は、ウマゲノムにおけるIg重およびラムダ軽鎖遺伝子を記載し、Walther, et al.は、Ig遺伝子座(Ig μ 、Ig κ およびIg λ)全ての分子特徴づけを記載する(Dev. Comp. Immunol. 3: 303 (2015))。

【0012】

トランスジェニック動物 — 例えば変更された免疫グロブリン遺伝子座を有するマウス — の産生により、種々の研究および開発応用、例えば、薬物開発および種々の生物系の基礎研究におけるこのようなトランスジェニック動物の使用が可能となっている。例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を担持するトランスジェニックマウスの産生は、国際出願WO90/10077およびWO90/04036に記載されている。WO90/04036は、統合ヒト免疫グロブリン「ミニ」遺伝子座を有するトランスジェニックマウスを記載する。WO90/10077は、トランスジェニック動物産生に使用する免疫グロブリンドミナント制御領域を含むベクターを記載する。

10

【0013】

マウス内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座を、薬物開発目的で一部または完全ヒト抗体を作るために、例えば、ヒト免疫グロブリン配列で修飾する、多数の方法が開発されている。このようなマウスの例は、例えば、米国特許7,145,056; 7,064,244; 7,041,871; 6,673,986; 6,596,541; 6,570,061; 6,162,963; 6,130,364; 6,091,001; 6,023,010; 5,593,598; 5,877,397; 5,874,299; 5,814,318; 5,789,650; 5,661,016; 5,612,205; および5,591,669に記載されるものを含む。

20

【0014】

薬物として機能する抗体の使用は、ヒト疾患の予防または治療に制限されない。ウマなどの家畜は、ヒトと同様の苦痛、例えば、癌、アトピー性皮膚炎および慢性疼痛に苦しむ。それぞれCD20、IgEおよび神経増殖因子をターゲティングするモノクローナル抗体は、これらの状態のいくつかの処置のためにすでに家畜で使用されている。しかしながら、臨床使用前に、マウスで作製したモノクローナル抗体は、レシピエントであるウマにおける有害免疫応答を予防するために、ウマ化されなければならない、すなわち、アミノ酸配列がマウスのものからウマのものに変えなければならない。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

前記に基づき、ウマにおける疾患の処置のためのウマ抗体を産生するための、効率的かつ費用対効果が高い方法が必要とされることは明らかである。より具体的に、抗原特異的ウマ免疫グロブリン、特にウマモノクローナル抗体の大規模産生ができるハイブリドーマを産生できる、小さく、繁殖が速い、非ウマ哺乳動物の産生に対する分野の要望がある。すなわち、ウマ抗体、例えば、ウマV領域を有する抗体を産生できるトランスジェニック非ヒト動物を産生する方法の改善が必要とされ続けている。

【課題を解決するための手段】

40

【0016】

発明の概要

この概要は、詳細な記載において下にさらに詳述する、単純化された形態の選択された概念を紹介するために提供する。この概要は請求する主題の鍵となるまたは必須の特性を同定することは意図されず、請求する主題の限定に使用することも意図されない。請求する主題の他の特性、詳細、有用性および利点は、添付する図面に説明され、添付する特許請求の範囲に定義される態様を含む下記の詳細な記載から明らかである。

【0017】

ここに記載されるのは、ウマ免疫グロブリン可変領域を有するマウス抗体を産生する方法である。ある態様において、トランスジェニック哺乳動物またはインビトロ細胞培養で

50

産生できるウマ可変領域を有する抗体が提供される。

【0018】

ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むゲノムを有する非ウマ哺乳動物細胞または非ウマ哺乳動物が提供される。ある態様において、異種遺伝子座は、ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子のコード配列および非ウマ哺乳動物宿主の内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座に基づく非コード配列を含む。ある態様において、非ウマ哺乳動物細胞または哺乳動物は、ウマ重(H)および軽(L)鎖可変領域および非ウマ哺乳動物宿主細胞または哺乳動物に内因性である定常領域を含むキメラB細胞受容体(BCR)または抗体を発現できる。ある態様において、トランスジェニック哺乳動物宿主細胞または哺乳動物は、内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座の一部または全てが除去されているゲノムを有する。

10

【0019】

非ウマ哺乳動物宿主でキメラウマモノクローナル抗体を産生するために、宿主ゲノムは、少なくとも1個のキメラウマ免疫グロブリンHまたはL鎖を発現する遺伝子座を有しなければならない。ある態様において、宿主ゲノムは、それぞれキメラウマ免疫グロブリンH鎖およびL鎖を発現する1個の重鎖遺伝子座および2個の軽鎖遺伝子座を含む。

【0020】

ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、非ウマ哺乳動物宿主の内因性V_H遺伝子座に存在するウマV_Hコード配列および非コード配列を含む。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_Hコード配列および非ウマ哺乳動物宿主の内因性V_H遺伝子座に存在する非コード制御または足場配列を含む。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマD_HおよびJ_H遺伝子セグメントコード配列および非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムの内因性D_HおよびJ_H遺伝子セグメントに存在する非コード配列を含む。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマD_HおよびJ_H遺伝子セグメントコード配列および非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムの内因性D_HおよびJ_H遺伝子セグメントに存在する非コード制御または足場配列を含む。

20

【0021】

他の態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_Lコード配列および非ウマ哺乳動物宿主の内因性V_L遺伝子座に存在する非コード配列を含む。他の態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_Lコード配列および非ウマ哺乳動物宿主の内因性V_L遺伝子座に存在する非コード制御または足場配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_Lコード配列およびウマJ_L遺伝子セグメントコード配列および非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムの内因性J_L遺伝子セグメントに存在する非コード配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_Lコード配列およびウマJ_L遺伝子セグメントコード配列および非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムの内因性J_L遺伝子セグメントに存在する非コード制御または足場配列を含む。

30

【0022】

ある態様において、非ウマ哺乳動物は齧歯類、例えば、マウスまたはラットである。

40

【0023】

ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含む非ウマ哺乳動物細胞を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は、a)非ウマ哺乳動物宿主細胞のゲノムに2以上のリコンビナーゼターゲティング部位を導入し、内因性免疫グロブリンV_H、D_HおよびJ_H遺伝子または内因性V_LおよびJ_L遺伝子を含むゲノム領域の少なくとも1部位上流および少なくとも1部位下流を統合し；そしてb)ウマV_H、D_HおよびJ_H遺伝子またはウマV_LおよびJ_L遺伝子コード配列を含む異種部分的ウマ免疫グロブリン可変遺伝子座および非ウマ哺乳動物宿主の内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座に存在する非コード配列に基づく非コード配列を、リコンビナーゼ介在カセット交換(RMCE)を介して非ウマ哺乳動物宿主細胞に導入することを含む。

50

【0024】

他の態様において、方法は、非ウマ哺乳動物宿主細胞にRMCEを介して異種部分的ウマ免疫グロブリン可変遺伝子座を導入する前に、2個の異種リコンビナーゼターゲティング部位と隣接している宿主動物のゲノムにおける内因性免疫グロブリン可変領域を欠失させることを含む。

【0025】

ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_H遺伝子セグメントコード配列、ウマD_HおよびJ_H遺伝子セグメントコード配列ならびに非ウマ哺乳動物宿主のゲノムにおける内因性D_H遺伝子セグメントの上流に存在する配列に基づきウマD_H遺伝子セグメントの上流に非コード制御または足場配列(ブレD配列、図1)を含む。ある態様において、上流足場配列は、雄の妊性と関係するAdam6(図1)などの非免疫グロブリン遺伝子を含む(Nishimura et al. Developmental Biol. 233(1): 204-213 (2011))。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、同じ染色体の内因性免疫グロブリンV_H遺伝子座の上流および内因性J_H遺伝子座の下流に予め導入されているリコンビナーゼターゲティング部位を使用して、宿主細胞に導入する。

【0026】

ある態様において、足場配列は、他の種からの天然に存在する核酸配列を含む。ある態様において、足場配列は他の種からの天然に存在する核酸配列に基づき設計でき、例えば、足場配列は、例えば、1以上の核酸置換、挿入、欠失または他の修飾により修飾されている他の種からの天然に存在する核酸配列を含み得る。ある態様において、足場配列は人工配列を含み得る。ある態様において、足場配列は、ウマゲノムの免疫グロブリン遺伝子座に存在する配列を、他の配列、例えば、他の種からの足場配列と組み合わせて含む。

【0027】

他の態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマ免疫グロブリンV_L遺伝子セグメントコード配列、ウマJ_L遺伝子セグメントコード配列および非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムの内因性L鎖遺伝子座に存在する非コード配列に基づく非コード配列を含む。ある態様において、非コード配列は制御または足場配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、同じ染色体の内因性免疫グロブリンV_L遺伝子座の上流および内因性J_L遺伝子座の下流に予め導入されているリコンビナーゼターゲティング部位を使用して、宿主細胞に導入される。

【0028】

ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は単一核酸として合成され、単一核酸領域として非ウマ哺乳動物宿主細胞に導入される。異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座はまた2以上の連続的セグメントとして合成され、別々のセグメントとして哺乳動物宿主細胞に導入され得る。異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座はまた、組み換え方法を使用して産生され、非ウマ哺乳動物宿主細胞に導入される前に単離もされ得る。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座は、イン・シリコで次のとおり産生され得る：マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子座のゲノム配列ならびにウマV_H、DおよびJ_Hコード配列を、例えば、アメリカ国立生物工学情報センターから得る。マウスV_H、DおよびJ_Hコード配列を、例えば、市販のソフトウェアを使用して、イン・シリコでウマV_H、DおよびJ_Hコード配列に置き換える。有利には、V_H、DおよびJ_Hコード配列を、介在マウス非コード配列をインタクトのまま置き換えることができる。同様に、部分的ウマ免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座は、イン・シリコで次のとおり産生され得る：マウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のゲノム配列ならびにウマV_LおよびJ_Lコード配列を、例えば、アメリカ国立生物工学情報センターから得る。マウスV_LおよびJ_Lコード配列を、例えば、市販のソフトウェアを使用して、イン・シリコでウマV_LおよびJ_Lコード配列に置き換える。同様に、V_LおよびJ_Lコード配列を、介在マウス非コード配列をインタクトのまま置き換えることができる。イン・シリコ配列に基づく部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むDNA配列を合成する方法は知られる。

【0029】

他の態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含む非ウマ哺乳動物細胞を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は、a)非ウマ哺乳動物宿主細胞のゲノムに互いに組み換えできない2以上の配列特異的組み換え部位を導入し、ここで少なくとも1個の組み換え部位を内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座の上流に導入し、少なくとも1個の組み換えを同じ内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座の下流に導入し；b)i)ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子コード配列およびii)宿主細胞ゲノムの内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座に基づく非コード制御または足場配列(ここで、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、宿主細胞の内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座と隣接している同じ2個の配列特異的組み換え部位と隣接している)を有する異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むベクターを提供し；c)宿主細胞に工程b)のベクターおよび2個のリコンビナーゼ部位を認識する部位特異的リコンビナーゼを導入し；d)細胞のゲノムと異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座の間で組み換え事象を生じさせ、内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座の異種部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座での置き換えをもたらすことを含む。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_H免疫グロブリン遺伝子セグメントコード配列およびi)ウマD_HおよびJ_H遺伝子セグメントコード配列、ii)非ウマ哺乳動物宿主のゲノムに内因性に存在する個々のV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントと隣接している非コード制御または足場配列およびiii)非ウマ哺乳動物宿主細胞の内因性ゲノムに基づくプレD配列を含む。ある態様において、リコンビナーゼターゲティング部位は、内因性免疫グロブリンV_H遺伝子座の上流および内因性J_H遺伝子座の下流に導入される。

10

20

【0030】

ある態様において、齧歯類内因性免疫グロブリン可変遺伝子座が欠失され、ウマ免疫グロブリン可変遺伝子コード配列および齧歯類内因性免疫グロブリン可変遺伝子座に基づく非コード制御または足場配列を含む異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座で置き換わっているゲノムを有するトランスジェニック齧歯類が提供される。ある態様において、トランスジェニック齧歯類の異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は機能的であり、ウマ可変ドメインおよび齧歯類定常ドメインを含む免疫グロブリン鎖を発現する。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_H、D_HおよびJ_Hコード配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマV_LおよびJ_Lコード配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマカッパ(κ)V_LおよびJ_Lコード配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマラムダ(λ)V_LおよびJ_Lコード配列を含む。ある態様において、トランスジェニック齧歯類からのBリンパ球系譜の細胞が提供される。ある態様において、Bリンパ球系譜の細胞から得たウマ可変ドメインおよび齧歯類定常ドメイン配列を含む免疫グロブリン分子の一部または全部が提供される。ある態様において、Bリンパ球系譜の細胞由来のハイブリドーマ細胞が提供される。ある態様において、ハイブリドーマ細胞由来のウマ可変ドメインおよび齧歯類定常ドメインを含む免疫グロブリン分子の一部または全部が提供される。ある態様において、Bリンパ球系譜の細胞由来の不死化細胞が提供される。ある態様において、不死化細胞由来のウマ可変ドメインおよび齧歯類定常ドメインを含む免疫グロブリン分子の一部または全部が提供される。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がウマV_LおよびJ_Lコード配列を含む、トランスジェニック齧歯類が提供される。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座がウマV_H、D_HおよびJ_Hコード配列を含む、トランスジェニック齧歯類が提供され。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマカッパ(κ)V_LおよびJ_Lコード配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマラムダ(λ)V_LおよびJ_Lコード配列を含む。ある態様において、齧歯類はマウスである。ある態様において、非コード制御配列は、内因性宿主の次の配列の1以上を含む：各V遺伝子セグメントの前のプロモーター、スプライス部位およびV(D)J組み換えのための組み換えシグナル配列。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン

30

40

50

ン遺伝子座はさらに内因性宿主の次の配列の1以上を含む：A D A M 6 遺伝子、P a x - 5 活性化遺伝子間反復 (P A I R) 配列および重鎖遺伝子間制御領域 1 (I G C R 1) からの C T C F 結合部位。

【 0 0 3 1 】

ある態様において、非ウマ哺乳動物細胞は哺乳動物細胞である。ある態様において、非ウマ哺乳動物細胞は哺乳動物胚幹 (E S) 細胞である。

【 0 0 3 2 】

ある態様において、非内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座が異種部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座に置き換わっているウマ哺乳動物細胞が選択および単離される。ある態様において、細胞は非ウマ哺乳動物 E S 細胞、例えば、齧歯類 E S 細胞である。ある態様において、少なくとも1個の単離非ウマ哺乳動物細胞を使用して、異種部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座を発現するトランスジェニック非ウマ哺乳動物を作る。ある態様において、少なくとも1個の単離非ウマ哺乳動物 E S 細胞を使用して、異種部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座を発現するトランスジェニック非ウマ哺乳動物を作る。

10

【 0 0 3 3 】

ある態様において、トランスジェニック齧歯類を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は、a) 部位特異的リコンビナーゼのための少なくとも1個の標的部位を齧歯類細胞のゲノムの内因性免疫グロブリン可変遺伝子座の上流および部位特異的リコンビナーゼの少なくとも1個の標的部位を内因性免疫グロブリン可変遺伝子座の下流に統合することを含む。ある態様において、内因性免疫グロブリン可変遺伝子座は、V_H、D_H および J_H 遺伝子セグメントを含む。ある態様において、内因性免疫グロブリン可変遺伝子座は、V_K および J_K 遺伝子セグメントを含む。ある態様において、内因性免疫グロブリン可変遺伝子座は、V_λ および J_λ 遺伝子セグメントを含む。ある態様において、内因性免疫グロブリン可変遺伝子座は、V_λ、J_λ 遺伝子セグメントおよび C_λ 遺伝子を含む。ある態様において、方法は、b) 異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むベクターを提供することを含む。ある態様において、該異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、キメラウマ免疫グロブリン遺伝子セグメントを含む。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子セグメントの各々は、ウマ免疫グロブリン可変遺伝子コード配列および齧歯類非コード制御または足場配列を含む。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン可変遺伝子座は、部位特異的リコンビナーゼの標的部位と隣接している。ある態様において、標的部位は、齧歯類細胞に導入された標的部位と組み換えられる。ある態様において、方法は、c) 齧歯類細胞にベクターおよび標的部位を認識できる部位特異的リコンビナーゼを導入することを含む。ある態様において、方法は、d) 細胞のゲノムと異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座の間で組み換え事象を生じさせることを含み、ここで内因性免疫グロブリン可変遺伝子座は異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座と置き換えられる。ある態様において、方法は、e) 工程 d) で産生された異種部分的ウマ免疫グロブリン可変遺伝子座を含む細胞を選択し；そして該細胞を使用して、異種部分的ウマ免疫グロブリン可変遺伝子座を含むトランスジェニック齧歯類を産生することを含む。ある態様において、細胞は齧歯類胚幹 (E S) 細胞である。ある態様において、細胞はマウス胚幹 (E S) 細胞である。

20

30

40

【 0 0 3 4 】

ある態様において、方法は、さらに、工程 a) の前かつ工程 b) の後、第一セットの標的部位を認識するリコンビナーゼの導入により、内因性免疫グロブリン可変遺伝子座を欠失する工程を含み、ここで欠失工程は、齧歯類細胞のゲノムにおいて互いに組み換えできない少なくとも1セットの標的部位をその場に残す。ある態様において、ベクターはウマ V_H、D_H および J_H コード配列を含む。ある態様において、ベクターはウマ V_L および J_L コード配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマカッパ (κ) V_L および J_L コード配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、ラムダ (λ) V_L および J_L コード配列を含む。ある態様において

50

、ベクターはさらに次の 1 以上を含む：プロモーター、スプライス部位および組み換えシグナル配列。

【0035】

ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座を含むトランスジェニック非ウマ哺乳動物を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は、a) 非ウマ哺乳動物宿主細胞のゲノムに、内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座に隣接し、互いに組み換えられない 1 以上の配列特異的組み換え部位を導入することを含む。ある態様において、方法は、b) i) ウマ可変領域遺伝子コード配列および ii) 内因性宿主免疫グロブリン可変領域遺伝子座に基づく非コード制御または足場配列を有する部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むベクターを提供することを含む。ある態様において、コードおよび非コード制御または足場配列は、a) の宿主細胞のゲノムに導入されるのと同じ配列特異的組み換え部位と隣接している。ある態様において、方法は、c) 細胞に工程 b) のベクターおよび 1 セットのリコンビナーゼ部位を認識できる部位特異的リコンビナーゼを導入することを含む。ある態様において、方法は、d) a) の細胞のゲノムと異種部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座の間で組み換え事象を生じさせることを含む。ある態様において、内因性免疫グロブリン可変領域遺伝子座は部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座に置き換わる。ある態様において、方法は、e) 部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含む細胞を選択し；そして f) 該細胞を使用して、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック哺乳動物を作ることを含む。

10

【0036】

ある態様において、トランスジェニック非ウマ哺乳動物は齧歯類、例えば、マウスまたはラットである。

20

【0037】

ある態様において、少なくとも 10^3 ライブラリーメンバーの多様性を含む免疫グロブリンライブラリー(レパートリーとも称する)が提供される。

【0038】

ある態様において、ここに記載する部分的ウマ抗体を含む抗体のレパートリーが提供される。ある態様において、レパートリーは、各々同じ標的抗原を特異的に認識する多様な抗体を含む。このようなレパートリーは、同じ抗体タイプまたは構造の抗体ライブラリーと称することができ、ここで、抗体は、例えば、同じエピトープを認識する親抗体の抗体バリエーションを産生するための抗原結合部位が異なる。ある態様において、抗体ライブラリーは親和性成熟または他に最適化された抗体バリエーションを含む。ある態様において、抗体ライブラリーは、標的抗原であるが、そのような標的抗原の異なるエピトープを特異的に認識する抗体を含む。

30

【0039】

ある態様において、抗体レパートリーをスクリーニングし、個々のライブラリーメンバーを、例えば、抗体産物を産生するための所望の構造または機能的性質に従い選択する。

【0040】

ある態様において、ここに記載する部分的ウマ抗体を含む、抗体のレパートリーが提供される。ある態様において、レパートリーは、異なる標的抗原を認識する多様な抗体を含む。ある態様において、レパートリーを、各々複数エピトープを含み得る多くの異なる標的抗原を有し得る、ウイルスまたは細菌を含むが、これらに限定されない多成分抗原での非ウマ哺乳動物の免疫化により得られる。

40

【0041】

ある態様において、レパートリーは、「免疫前レパートリー」とも称し得る、抗体のナイーブライブラリーである。ある態様において、免疫前レパートリーは、最近骨髄から出た、成熟しているが、抗原未経験 B 細胞により発現される。

【0042】

ある態様において、抗体のレパートリーは、各々異なる抗原結合部位により特徴づけられる、少なくとも約 10^3 抗体、例えば、少なくとも約 10^4 抗体、約 10^5 抗体、約 1

50

10^6 抗体または約 10^7 抗体を包含する多様性により特徴づけられ得る。

【0043】

ある態様において、ウマ可変領域遺伝子コード配列および宿主ゲノムの内因性非ウマ免疫グロブリン遺伝子座に基づく非コード制御または足場配列を有する異種免疫グロブリン可変領域遺伝子座を発現する、非ウマ哺乳動物細胞が提供される。ある態様において、非ウマ哺乳動物細胞は、完全ウマHまたはL鎖可変ドメインと共に完全ウマHまたはL鎖可変ドメインを含むキメラ抗体を発現する。

【0044】

ある態様において、ウマ可変領域遺伝子コード配列および宿主ゲノムの内因性非ウマ免疫グロブリン遺伝子座に基づく非コード制御または足場配列を有する異種免疫グロブリン可変領域遺伝子座を発現する、非ウマトランスジェニック哺乳動物が提供される。ある態様において、非ウマトランスジェニック哺乳動物は、完全ウマHまたはL鎖可変ドメインと共に完全ウマHまたはL鎖可変ドメインを含むキメラ抗体を発現する。

【0045】

ある態様において、完全ウマ可変配列を有する部分的ウマ抗体を発現できるトランスジェニック非ウマ哺乳動物からのB細胞が提供される。ある態様において、特定の抗原に特異的なモノクローナル抗体の源としての不死化B細胞が提供される。

【0046】

ある態様において、診断、予防および治療用途の抗体の産生または最適化に使用するための、B細胞からクローン化されるウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子配列が提供される。

【0047】

ある態様において、完全ウマ免疫グロブリン可変領域配列を有する部分的ウマモノクローナル抗体を産生できる非ウマハイブリドーマ細胞が提供される。

【0048】

ある態様において、H鎖およびL鎖免疫グロブリン可変ドメインをコードする V_H および V_L エクソンをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから除去し、 V_H および V_L エクソンをウマ定常領域を含むように修飾し、それにより、ウマに注射したとき免疫原性ではない完全ウマ抗体を作製する、方法が提供される。

【0049】

ある態様において、治療または診断用途のウマ抗体を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は：

(i)ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にキメラ V_H 、 D_H および J_H 免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラ V_L および J_L 可変遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個を含む異種免疫グロブリン遺伝子座可変領域に置き換えられているトランスジェニック齧歯類の抗体産生細胞からクローン化したウマ可変ドメインを有する抗体を発現させ、ここで各キメラ遺伝子セグメントはウマV、DまたはJ免疫グロブリン可変領域コード配列および齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺伝子セグメント配列を含み；そして

(ii)ウマ可変ドメインを有する抗体を単離することを含み、ここで該抗体は治療または診断用途に適する。

【0050】

ある態様において、抗体はトランスジェニック齧歯類のB細胞からクローン化される。ある態様において、齧歯類はマウスである。ある態様において、ここに記載する方法で産生した、治療または診断抗体が提供される。

【0051】

ある態様において、ウマ可変ドメインを有する治療または診断抗体を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は：

(i)ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン

10

20

30

40

50

ン重鎖遺伝子座にキメラV_H、D_HおよびJ_H免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラV_LおよびJ_L可変遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個を含む異種免疫グロブリン遺伝子座可変領域に置き換えられている、トランスジェニック齧歯類からの抗体産生細胞により発現される抗体のウマ可変ドメインをクローニングし、ここで各キメラ遺伝子セグメントはウマV、DまたはJ免疫グロブリン可変領域コード配列および齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺伝子セグメント配列を含み；そして

(ii) トランスジェニック齧歯類により発現される抗体のウマ可変ドメインを含む治療または診断抗体を産生することを含む。

【0052】

ある態様において、ウマ可変ドメインは、トランスジェニック齧歯類からのB細胞により発現される抗体からクローン化される。ある態様において、齧歯類はマウスである。ある態様において、ここに記載する方法により産生された、治療または診断抗体が提供される。

【0053】

ある態様において、ウマ可変ドメインを含むモノクローナル抗体を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は：

(i) ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にキメラV_H、DおよびJ_H免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラV_LおよびJ_L可変遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個を含む異種免疫グロブリン遺伝子座可変領域に置き換わっている、トランスジェニック齧歯類からのB細胞を提供し、ここで各キメラ遺伝子セグメントが齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺伝子セグメント配列に包埋されたウマV、DまたはJ免疫グロブリン可変領域コード配列を含み；

(ii) B細胞を不死化し；そして

(iii) 不死化B細胞により発現されるウマ可変ドメインを含むモノクローナル抗体または該抗体をコードする遺伝子を単離することを含む。

【0054】

ある態様において、方法は：

(iv) B細胞により発現されるウマ可変ドメインをクローニングし；そして

(v) トランスジェニック齧歯類のB細胞からクローン化したウマ可変ドメインを含む治療または診断抗体を産生することを含む。

【0055】

ある態様において、ウマ可変ドメインを含む抗体を産生する方法が提供される。ある態様において、方法は、ゲノムが、内因性齧歯類免疫グロブリン遺伝子座可変領域が欠失され、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にキメラV_H、D_HおよびJ_H免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個および／または免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にキメラV_LおよびJ_L可変遺伝子セグメントの各々の少なくとも1個を含む異種免疫グロブリン遺伝子座可変領域で置き換えられている、トランスジェニック齧歯類を提供することを含み、ここで各キメラ遺伝子セグメントが齧歯類免疫グロブリン可変領域非コード遺伝子セグメント配列に包埋されたウマV、DまたはJ免疫グロブリン可変領域コード配列を含み、ここで、トランスジェニック齧歯類の異種免疫グロブリン遺伝子座はウマ可変ドメインを含む抗体を発現する。

【0056】

ある態様において、方法は、トランスジェニック齧歯類により発現されるウマ可変領域を有する抗体または該抗体をコードする遺伝子の単離を含む。ある態様において、方法は、(i) 標的抗原に特異的な抗体を発現するトランスジェニック齧歯類からB細胞を得て；(ii) B細胞を不死化し；そして(iii) 不死化B細胞から標的抗原に特異的な抗体を単離することを含む。

10

20

30

40

50

【0057】

ある態様において、方法は、特定の抗原に特異的なB細胞からウマ可変領域をクローニングすることを含む。ある態様において、齧歯類はマウスである。ある態様において、方法は、B細胞からクローン化されたウマ可変領域を使用して、治療または診断抗体を産生することを含む。ある態様において、ここに記載する方法により産生された、治療または診断抗体が提供される。

【0058】

これらおよび他の態様を以下にさらに詳述する。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】図1は、染色体12のテロメア末端に位置するマウスIg h遺伝子座(上部)(V(Ig h V)、D(Ig h D)、J(Ig h J)およびC(Ig h C)遺伝子セグメントを含む)、染色体6に位置するIg k遺伝子座(中央)(V(Ig k V)、J(Ig k J)およびC(Ig k C)遺伝子セグメントを含む)および染色体16に位置するIg λ遺伝子座(下部)(Ig l V(V)、Ig l J(J)およびIg l C(C)遺伝子セグメントを含む)を示す。Ig h遺伝子座に、1)VDJ再配列における遠位VH遺伝子セグメントの利用を確実にするためのIg hルーピングに重要なシス制御配列であるPAIR配列、2)Adam6a雄の妊性を可能にする遺伝子、3)Ig h遺伝子座の順番通りの系譜特異的再配列を制御する部位を含む遺伝子間制御領域1(IGCR1)、4)Eμ、重鎖イントロニックエンハンサー、5)Sμ、スイッチ領域、6)アイソタイプスイッチングを制御するシス作用領域である3'制御領域(3'RR)も示される。Ig k遺伝子座に、5'(E5')および3'(E3')エンハンサーおよびIg λ遺伝子座に3個のエンハンサー、Eλ2-4、EλおよびEλ3-1も示される。

【0060】

【図2】図2は、非ウマ哺乳動物宿主細胞のゲノムにおけるH鎖可変領域遺伝子座の上流の領域に第一セットの配列特異的組み換え部位を導入するための、相同組み換えによるターゲティングの戦略を説明する模式図である。

【0061】

【図3】図3は、相同性ターゲティングベクターを介して非ウマ哺乳動物細胞のゲノムにおけるH鎖可変領域遺伝子座の下流の領域に第二セットの配列特異的組み換え部位を導入することを説明する模式図である。本図はまた内因性免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子座の欠失および非ウマ哺乳動物宿主細胞のゲノムからの選択可能マーカーも説明する。

【0062】

【図4】図4は、内因性免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子座を欠失するよう予め修飾されている非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムに異種部分的ウマ免疫グロブリンH鎖遺伝子座を導入するRMCE戦略を説明する模式図である。

【0063】

【図5】図5は、マウスゲノムの内因性免疫グロブリンκL鎖遺伝子座への異種部分的ウマ免疫グロブリンκL鎖可変領域遺伝子座の導入を説明する模式図である。

【0064】

【図6】図6Aおよび6Bは、マウスゲノムの内因性免疫グロブリンλL鎖遺伝子座への異種部分的ウマ免疫グロブリンλL鎖可変領域遺伝子座の導入を説明する模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0065】

定義

ここで使用する用語は、当業者により理解されている平易かつ通常の意味を有することが意図される。次の定義は、読者が本発明を理解する一助となることが意図されるが、特に示されない限り、このような用語を変更するまたはその他限定する意図はない。

【0066】

ここで使用する用語「遺伝子座」は、それぞれ、ゲノムに内因性であるかまたはゲノム

10

20

30

40

50

に統合されている(またはまさに統合される)染色体セグメントまたは核酸配列をいう。例えば、免疫グロブリン遺伝子座は、遺伝子の一部または全て(すなわち、 V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントまたは V_L および J_L 遺伝子セグメントならびに定常領域遺伝子)および免疫グロブリンHまたはL鎖ポリペプチドの発現を支持する介在非コード配列(すなわち、イントロン、エンハンサーなど)を含み得る。用語「遺伝子座」(例えば、免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子座)は、より大きな遺伝子座の特異的部分をいい得る(例えば、 V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントを含む免疫グロブリンH鎖遺伝子座の部分)。同様に、免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座は、より大きな遺伝子座の特異的部分をいい得る(例えば、 V_L および J_L 遺伝子セグメントを含む免疫グロブリンL鎖遺伝子座の部分)。

10

【0067】

ここで使用する用語「免疫グロブリン可変領域遺伝子」は、それぞれ免疫グロブリンHまたはL鎖可変ドメインの部分をコードする、免疫グロブリン重鎖可変領域における V_H 、 D_H または J_H 遺伝子セグメントまたは免疫グロブリン軽鎖可変領域における V_L または J_L 遺伝子セグメントを含む、可変(V)、多様性(D)、連結(J)遺伝子セグメントをいう。ここで使用する用語「免疫グロブリン可変領域遺伝子座」は、 V_H 、 D_H または J_H 遺伝子セグメントまたは V_L または J_L 遺伝子セグメントおよび、例えば、非コード制御または足場配列を含む、介在非コード配列の集まりを含む、染色体セグメントまたは核酸鎖の一部または全体をいう。

【0068】

ここで使用する用語「遺伝子セグメント」は、免疫グロブリン分子の重鎖または軽鎖可変ドメインの一部をコードする核酸配列をいう。遺伝子セグメントはコードおよび非コード配列を含み得る。遺伝子セグメントのコード配列は、重鎖または軽鎖可変ドメインのリーダーペプチドおよびN末端部分などのポリペプチドに翻訳され得る核酸配列である。遺伝子セグメントの非コード配列は、プロモーター、5'非翻訳配列、リーダーペプチドのコード配列に介在するイントロン、組み換えシグナル配列(RSS)およびスプライス部位を含み得る、コード配列に隣接する配列である。免疫グロブリン重鎖(IGH)遺伝子座における遺伝子セグメントは、 V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメント(それぞれIGHV、IGHDおよびIGHJとも称する)を含む。免疫グロブリン κ および λ 軽鎖遺伝子座における軽鎖可変領域遺伝子セグメントは、 V_L および J_L 遺伝子セグメントといえることができる。 κ 軽鎖において、 V_L および J_L 遺伝子セグメントは V_κ および J_κ 遺伝子セグメントまたはIGKVおよびIGKJといえることができる。同様に、 λ 軽鎖において、 V_L および J_L 遺伝子セグメントは V_λ および J_λ 遺伝子セグメントまたはIGLVおよびIGLJといえることができる。

20

30

【0069】

重鎖定常領域は、 C_H またはIGHCといえることができる。IGHM、IGHD、IGHG1~7、IGHEまたはIGAをコードするウマにおける C_H 領域エクソンは、それぞれ、 C_μ 、 C_δ 、 $C_{1\sim7}$ 、 C_ϵ またはCといえることができる。同様に、免疫グロブリン κ または λ 定常領域は、それぞれ C_κ または C_λ ならびにIGKCまたはIGLCといえることができる。

40

【0070】

ここで使用する「部分的ウマ」は、ウマおよび非ウマ哺乳動物宿主両方のある遺伝子座に見られる配列に対応する配列を含む、核酸またはその発現タンパク質およびRNA産物をいう。ここで使用する「部分的ウマ」はまたウマおよび非ウマ哺乳動物両方からの核酸配列を含む免疫グロブリン遺伝子座をいう。ある態様において、「部分的ウマ」は、例えば、齧歯類、例えば、マウスからの核酸配列を含む、免疫グロブリン遺伝子座をいう。ある態様において、部分的ウマ核酸は、非ウマ哺乳動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座の非コード制御または足場配列に基づくウマ免疫グロブリンHまたはL鎖可変領域遺伝子セグメントおよび配列のコード配列をいう。

【0071】

50

用語「基づく」は、非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムの内因性非コード制御または足場配列に関連して使用するとき、哺乳動物宿主細胞ゲノムの対応する内因性遺伝子座に存在する非コード制御または足場配列をいう。ある態様において、用語「基づく」は、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座に存在する非コード制御または足場配列が、宿主哺乳動物の内因性遺伝子座の非コード制御または足場配列と相当高い程度の相同性を共有することを意味する。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座における非コード配列は、宿主哺乳動物の内因性遺伝子座に見られる対応する非コード配列と少なくとも約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%相同性を共有する。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座における非コード配列は、宿主哺乳動物の内因性遺伝子座に見られる対応する非コード配列と同じである。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座における非コード配列宿主哺乳動物の免疫グロブリン遺伝子座から保持される。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座における非コード配列宿主哺乳動物の内因性遺伝子座に存在する対応する非コード配列と同じである。ある態様において、ウマコード配列は、宿主哺乳動物の免疫グロブリン遺伝子座の非制御または足場配列に包埋される。ある態様において、非ウマ宿主動物はラットまたはマウスなどの齧歯類である。

10

20

30

40

50

【0072】

「キメラ」は、2種以上の動物からのヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列または2種以上の動物からのヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、例えば抗体をいう。「キメラ」免疫グロブリン遺伝子座は、2種以上の動物からの核酸配列を含む免疫グロブリン遺伝子座をいう。ある態様において、キメラ免疫グロブリン遺伝子座は、ウマ核酸配列およびマウス核酸配列を含む。ある態様において、キメラ免疫グロブリンは、2種以上の動物からのタンパク質配列を含む。ある態様において、キメラ免疫グロブリンは、ウマ配列およびマウス配列を含む。ある態様において、キメラ免疫グロブリンは、ウマ可変ドメインおよびマウス定常ドメインを含む。ある態様において、キメラ免疫グロブリン可変領域遺伝子座は、ウマV_H、D_HおよびJ_Hコード配列またはウマV_LおよびJ_Lコード配列および非ウマ非コード配列を含む。ある態様において、キメラ免疫グロブリン可変領域遺伝子座は、ウマV_H、D_HおよびJ_Hコード配列またはウマV_LおよびJ_Lコード配列およびマウス非コード配列を含む。

【0073】

ここで使用する「隣接する」は、参照配列の上流または下流である配列、例えば、ヌクレオチド配列をいう。ある態様において、隣接配列は、参照配列に近接する。ある態様において、1対の配列が、第一配列が参照配列の上流および第二配列が参照配列の下流であるように、参照配列に隣接する。

【0074】

「内因性」は、生物または細胞内に天然に存在する核酸配列またはポリペプチドをいう。

【0075】

「異種」は、生物または細胞内に天然に存在しない核酸配列またはポリペプチドをいう。

【0076】

「非コード制御配列」は、(i) V(D)J 組み換え、(ii) アイソタイプスイッチング、(iii) V(D)J 組み換え後の完全長免疫グロブリンHまたはL鎖の適切な発現または(iv) 例えば、膜および分泌形態の免疫グロブリンH鎖を産生するための選択的スプライシングに必須であることが知られる配列をいう。「非コード制御配列」は次の配列をさらに含み得る：CTCFおよびPAIR配列などのエンハンサーおよび遺伝子座制御配列(Proudhon, et al., Adv. Immunol. 128: 123-182 (2015))；各内因性V遺伝子セグメントの前のプロモーター；スプライス部位；イントロン；または各V、DまたはJ遺伝子セグメントに隣接する組み換えシグナル配列。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座の「非コード制御配列」は、非ウマ哺乳動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座宿主

細胞に見られる対応する非コード配列と少なくとも約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 % および最大約 100 % 相同性を有する。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座の「非コード制御配列」は、非ウマ哺乳動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座宿主細胞に見られる対応する非コード配列と同じ配列を有する。

【0077】

「足場配列」は、宿主細胞ゲノムの内因性免疫グロブリン遺伝子座に存在する遺伝子セグメントに介在する配列をいう。ある態様において、足場配列は、機能的非免疫グロブリン遺伝子の発現に必須の配列、例えば、ADAM6A または ADAM6B が間にある。ある態様において、足場配列は、他の種からの天然に存在する核酸配列を含み得る。ある態様において、足場配列は、他の種からの天然に存在する核酸配列に基づき、異種である。ある態様において、足場配列は人工配列を含み得る。ある態様において、足場配列は、ウマゲノムの免疫グロブリン遺伝子座に存在する配列を、他の配列、例えば、他の種からの足場配列と組み合わせて含む。用語「非コード制御または足場配列」は包括的意味であり、免疫グロブリン遺伝子座における非コード制御配列および足場配列両方をいい得る。

【0078】

「特異的に結合」は、抗体または免疫グロブリンが、該抗体または免疫グロブリンが他の抗原に結合するよりはるかに高い親和性で、特定の抗原のエピトープまたは抗原決定基に決定できる能力をいう。

【0079】

用語「相同性ターゲティングベクター」は、相同組み換えにより哺乳動物宿主細胞の内因性ゲノムを修飾するために使用される核酸配列をいう。相同性ターゲティングベクターは、例えば、非ウマ哺乳動物宿主のゲノムに存在する、修飾する遺伝子座に隣接する対応する内因性配列と相同性を有するターゲティング配列を含み得る。ある態様において、相同性ターゲティングベクターは、少なくとも 1 個の配列特異的組み換え部位を含む。ある態様において、相同性ターゲティングベクターは、非コード制御または足場配列を含む。ある態様において、相同性ターゲティングベクターは、1 以上の選択可能マーカー遺伝子を含む。ある態様において、相同性ターゲティングベクターを使用して、宿主細胞ゲノムの特定の領域に配列特異的組み換え部位を導入し得る。

【0080】

「部位特異的組み換え」または「配列特異的組み換え」は、2 個の適合性組み換え配列（「配列特異的組み換え部位」または「部位特異的組み換え配列」とも称する）間の DNA 再配列の過程をいう。部位特異的組み換えは、次の 3 事象の何れかを含み得る：a) 組み換え部位が隣接する予め選択した核酸の欠失；b) 組み換え部位が隣接する予め選択した核酸のヌクレオチド配列の反転および c) 異なる核酸鎖に位置する組み換え部位に近接する核酸配列の相互交換。この核酸セグメントの相互交換は、宿主細胞のゲノムに異種核酸配列を導入するためのターゲティング戦略として利用できることは理解される。

【0081】

用語「ターゲティング配列」は、修飾する免疫グロブリン遺伝子座の領域に隣接または近接する細胞のゲノムにおける DNA 配列と相同である配列である。隣接または近接配列は、遺伝子座自体内または宿主細胞のゲノムにおけるコード配列の上流もしくは下流であり得る。ターゲティング配列は、組み換え部位の配列などの宿主細胞ゲノムに挿入する配列がベクターのターゲティング配列に隣接するよう、宿主細胞、例えば、ES 細胞のトランスフェクトに使用できる組み換え DNA ベクターに挿入される。

【0082】

ここで使用する用語「部位特異的ターゲティングベクター」は、配列特異的組み換え部位、異種部分的ウマ遺伝子座および所望により選択可能マーカー遺伝子をコードする核酸を含むベクターをいう。ある態様において、「部位特異的ターゲティングベクター」を、リコンビナーゼ介在部位特異的組み換えを使用する宿主における内因性免疫グロブリン遺伝子座の修飾に使用する。ターゲティングベクターの組み換え部位は、修飾する免疫グロ

10

20

30

40

50

ブリン遺伝子座に近接する、宿主細胞のゲノム配列に挿入されている(例えば、相同性ターゲティングベクターにより)他の対応する組み換え部位との部位特異的組み換えに適する。免疫グロブリン遺伝子座の組み換え部位への異種部分的ウマ配列の組込みにより、内因性遺伝子座が異種部分的ウマ領域に置き換えられる。

【0083】

用語「導入遺伝子」は、ここでは、細胞および特に哺乳動物宿主動物の細胞のゲノムに人工的に挿入されているまたはまさに挿入される遺伝物質をいうために使用する。ここで使用する用語「導入遺伝子」は、部分的ウマ核酸、例えば、異種発現構築物またはターゲティングベクターの形態の部分的ウマ核酸をいう。

【0084】

「トランスジェニック動物」は、その細胞の一部としてまたは生殖系列DNAに安定に統合された(すなわち、その細胞の大部分のまたは全てのゲノム配列に)染色体外因子として存在する異種核酸配列を有する、非ウマ動物、通常哺乳動物をいう。本発明において、部分的ウマ核酸は、例えば、当分野で周知の方法による、宿主動物の胚または胚幹細胞の遺伝子操作により、このようなトランスジェニック動物の生殖系列に導入される。

【0085】

「ベクター」は、細胞の形質転換またはトランスフェクトに使用できる、自己複製性であろうがなかろうが、プラスミドおよびウイルスおよびあらゆるDNAまたはRNA分子をいう。

【0086】

発明の詳細な記載

ここに記載する技術の実施は、特に断らない限り、当技術を実施する当業者の技術の範囲内である、有機化学、ポリマーテクノロジー、分子生物学(組み換え技術を含む)、細胞生物学、生化学およびシーケンシングテクノロジーの慣用の技術および記載を用い得る。このような慣用の技術は、ポリマーアレイ合成、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよびライゲーションならびにラベルを使用するハイブリダイゼーションの検出を含む。適当な技術の具体的説明は、ここにおける実施例を参照して得られ得る。しかしながら、他の等価な慣用の方法も、当然使用できる。このような慣用の技術および記載は、Green, et al., Eds. (1999), *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series* (Vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), *Genetic Variation: A Laboratory Manual*; Dieffenbach and Veksler, Eds. (2007), *PCR Primer: A Laboratory Manual*; Bowtell and Sambrook (2003), *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual*; Mount (2004), *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*; Sambrook and Russell (2006), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; and Green and Sambrook (2012), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) *Biochemistry* (4th Ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London; Nelson and Cox (2000), *Lehninger, Principles of Biochemistry* 3.sup.rd Ed., W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.;およびBerg et al. (2002) *Biochemistry*, 5.sup.th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.などの標準的実験マニュアルに見ることができ、これら全て、引用により全ての目的で全体として本明細書に包含させる。

【0087】

ここでおよび添付する特許請求の範囲において、単数表現は、文脈から反することが示されない限り、複数を含む。故に、例えば、「遺伝子座」の記載は1以上の遺伝子座をいい、「方法」の記載は、当業者に知られる等価な工程および方法を含むなどである。

【0088】

ここで使用する用語「または」は、明示的に代替のみをいうかまたは代替が相互排他的である場合を除き、「および／または」を言い得る。用語「含み」、「含む」および「含

10

20

30

40

50

んで」は限定的ではない。

【0089】

他に定義しない限り、ここで使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。ここで使用する全ての刊行物は、ここに記載する発明と関連して使用し得るデバイス、製剤および方法を記載および開示する目的で、引用により本明細書に包含させる。

【0090】

値の範囲が提供されるとき、該範囲の上限と下限およびその記載する範囲内の任意の他の記載されるまたは介在する値の間の各介在する値が本発明に包含されることは理解される。これらの小さい範囲の上限および下限は、独立して、小さい範囲に含まれ得て、また本発明に含まれ、記載する範囲の任意の具体的に除外される範囲に付される。記載する範囲が一方または両方の限界を含むとき、この一方または両方を除く範囲も本発明に含まれる。

10

【0091】

以下の記載において、多くの具体的詳細が、本発明の徹底的な理解を提供するために示される。しかしながら、本発明は、これらの特定の詳細の1以上がなく実施され得ることは当業者には明らかである。他の場合、周知の特性および当業者に周知の方法は、本発明が曖昧になることを避けるために記載していない。

【0092】

液性免疫系において、多様な抗体レパートリーが、V(D)J組み換えと称される過程による、IgH(Ig h)およびIg L鎖遺伝子座の組み合わせおよび接合部多様性により産生される。発達中のB細胞において、生ずる第一組み換え事象は、重鎖遺伝子座の1個のDと1個のJ遺伝子セグメントの間であり、この2個の遺伝子セグメントの間のDNAが欠失する。このD-J組み換えの後、新たに形成されたDJ複合体の上流の領域からの1個のV遺伝子セグメントが連結され、再配列VDJエクソンが形成される。新たに産生されたVDJエクソンの組み換えVおよびD遺伝子セグメント間の他の全配列は、個々のB細胞のゲノムから欠失する。この再配列エクソンが、B細胞受容体(BCR)を形成するようL鎖ポリペプチドと結合した、H鎖ポリペプチドの可変領域としてB細胞表面に最終的に発現される。マウスおよびウマIg遺伝子座は、含む特性の数およびコード領域がどのようにV(D)J再配列により多様化されるかについて高度に複雑である；しかしながら、この複雑さは、各可変領域遺伝子セグメントの構造の基本的詳細にまで拡大されない。V、DおよびJ遺伝子セグメントは組成および機構は均一である。例えば、V遺伝子セグメントは、免疫グロブリン遺伝子座において、本質的に不変の連続的様式で配置された次の特性を有する：短転写プロモーター領域(<600bp長)、抗体鎖のシグナルペプチドの大部分をコードするエクソン；イントロン；抗体鎖のシグナルペプチドの小部分および抗体可変ドメインの大部分をコードするエクソンおよびV(D)J再配列に必要な3'組み換えシグナル配列。同様に、D遺伝子セグメントは次の特性を有する：5'組み換えシグナル配列、コード領域および3'組み換えシグナル配列。J遺伝子セグメントは次の特性を有する：5'組み換えシグナル配列、コード領域および3'スプライスドナー配列。

20

30

【0093】

ある態様において、ウマ可変領域コード配列および哺乳動物宿主ゲノムの免疫グロブリン遺伝子座に存在する非コード制御または足場配列、例えば、宿主哺乳動物がマウスであるときマウスゲノム非コード配列を含む、異種、部分的ウマ核酸配列を含む非ウマ哺乳動物細胞が提供される。

40

【0094】

ウマゲノムV_H領域は、ウマ染色体24の510kb領域にマッピングされた約50個のV_H、40個のD_Hおよび8個のJ_H遺伝子セグメントを含む。ラムダ(λ)コード領域はウマ染色体8にマッピングされ、約1310kbに及び、約144個のV_λ、7個のJ_λおよび7個のC_λ遺伝子を含み、一方カッパ(κ)コード領域はウマ染色体15にマッピングされ、約820kbに及び、約60個のV_κ、4個の機能的J_κおよび1個のC_κ遺

50

伝子を含む。異常な、特に高頻度の見かけ上非機能的なV遺伝子セグメントであるウマIg遺伝子座のいくつかの特性がある。例えば、50個のV_H遺伝子セグメントのうち12個が機能的である；33個はシュード遺伝子であり、5個はオープンリーディングフレーム(ORF)として分類され、これは、スプライシング部位、組み換えシグナル配列、制御配列に欠損を有するまたはVドメインの誤った折り畳みに至ると予測される高度に保存されたアミノ酸が変化したオープンリーディングフレームを有する可変遺伝子セグメントである。同様に、144個のV_λのうち27個および7個のJ_λ遺伝子セグメントのうち4個および60個のV_κ遺伝子セグメントの19個のみが機能的である。λ遺伝子座のゲノム構造も非定型である。ヒトおよびマウスにおいて、例えば、V_λ遺伝子セグメントのクラスター(I)、続いてJ_λ-C_λ遺伝子のクラスターがある。B細胞発達中、欠失再配列は、V_λ遺伝子セグメントの1個とJ_λ-C_λ遺伝子の1個の結合をもたらす。ウマにおいて、他方で、V_λ遺伝子セグメントのクラスター(I)、続いてJ_λ-C_λ遺伝子のクラスター、続いてV_λ遺伝子セグメントの別のクラスター(II)がある。配向に基づき、クラスターIIのV_λ遺伝子セグメントは反転V→J遺伝子再配列を受け、これは、欠失遺伝子再配列よりはるかに低頻度で起こり、組み換えV_λおよびJ_λ遺伝子セグメントを含むV_λエクソンを作製する。さらに、クラスターIIの34個のV_λ遺伝子セグメント中、25個はシュード遺伝子であり、2個はORFであるが、Walther et al. (Dev. Comp. Immunol. 3: 303 (2015))は、このクラスターで7個の機能的V_λ遺伝子セグメントを同定している。このコンテイング(NW_001867428.1)の配列の分析は、クラスターIIの7個の推定上機能的V_λ遺伝子セグメントはいずれも慣用のRSSを含まず、それによりウマλLCレパートリーにおいて使用される可能性はないことを示す。しかしながら、表1に示すとおり、これらV_λ遺伝子セグメント全7個がGenBankにおけるcDNAとして見られ、B細胞において再配列および発現される可能性がある。ある態様において、ここに記載する部分的ウマV_λ遺伝子座は、クラスターIおよびクラスターII両方からのV_λ遺伝子セグメントを含み得る。ある態様において、部分的ウマHおよびκおよびλL鎖遺伝子座において、全V_H、D_HおよびJ_Hセグメントおよび全V_LおよびJ_Lセグメントは、B細胞発達中の再配列およびトランスジェニックマウスの部分的ウマ抗体レパートリーへの貢献を促進するため、マウスRSSに隣接される。

10

20

30

40

50

【0095】

ヒトおよびマウスと同様、ウマは2タイプのIg軽鎖(κおよびλ)を発現する。しかしながら、κ対λ比は、これらの動物間で顕著に異なる。マウスにおいて、血清抗体における軽鎖の約96%はκタイプであり、一方ヒトにおけるκタイプは、IgL鎖の全集団のわずか66%を示す。対照的に、ウマにおけるL鎖レパートリーはλが優勢(95%)である。

【0096】

Igh、IgκまたはIgl遺伝子座に組み込まれた部分的ウマ核酸配列により、トランスジェニック動物がウマκまたはλ可変領域と対合するウマ重鎖可変領域を含む抗体を産生できる。部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座は、制御配列および宿主ゲノム(例えば、齧歯類)の介在配列内の他の要素を保持し、それにより、宿主における効率的抗体産生および抗原認識が促進される。

【0097】

ある態様において、合成または組み換えにより産生された、免疫グロブリンV_H、V_λまたはV_κ遺伝子座からのウマコード配列および非ウマ非コード制御または足場配列を含む部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座が提供される。

【0098】

ある態様において、合成H鎖DNAセグメントは次の配列の1以上を含む：雄の妊性に必要なADAM6遺伝子、Igh遺伝子座収縮に関与するPax-5活性化遺伝子間反復(PAIR)配列、正常VDJ再配列の制御に関与する重鎖遺伝子間制御領域1からのCTCF結合部位((Proudhon, et al., Adv. Immunol., 128: 123-182 (2015))またはそれらの組み合わせ。マウスIgh遺伝子座におけるこれら内因性非コード制御および

足場配列の位置は図 1 に記載し、これは、左から右に：約 100 個の機能的重鎖可変領域遺伝子セグメント(101)；PAIR、VDJ 組み換えのための Igh 遺伝子座収縮に参与する Pax-5 活性化遺伝子間反復(102)；Adam6a、雄の妊性に必要なディスインテグリンおよびメタロペプチダーゼドメイン 6A 遺伝子(103)；プレ D 領域、最も遠位の DH 遺伝子セグメント、Ighd-5 の 21609 bp フラグメント上流(104)；VH 遺伝子セグメント利用を制御する CTCF インスレーター部位を含む遺伝子間制御領域 1 (IGCR1)(106)；DH、多様性遺伝子セグメント(マウス系統に依存して 10~15)(105)；4 個の連結 JH 遺伝子セグメント(107)；Eμ、VDJ 組み換えに参与するイントロニックエンハンサー(108)；Sμ、アイソタイプスイッチングのための μ スイッチ領域(109)；8 個の重鎖定常領域遺伝子：Cμ、Cδ、Cγ3、Cγ1、Cγ2b、C2γa/c、Cε および Cα(110)；アイソタイプスイッチングおよび体細胞超変異を制御する 3' 制御領域(3' RR)(111)。図 1 は、Proudhon, et al., Adv. Immunol., 128: 123-182 (2015) から得た図の改変である。

10

【0099】

ある態様において、哺乳動物宿主細胞に統合する異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、既知ウマ VH 遺伝子セグメントの全てまたは相当数を含む。幾つかの例において、しかしながら、このような VH 遺伝子セグメントのサブセットの望ましいことがある。ある態様において、わずか 1 個のウマ VH コード配列が部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座に含まれ得る。

【0100】

ある態様において、非ウマ哺乳動物または哺乳動物細胞は、ウマ VH、DH および JH 遺伝子コード配列を含む異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含む。ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、非ウマ哺乳動物宿主の内因性 Igh 遺伝子座に基づき、非コード制御および足場配列、例えば、プレ D 配列を含む。ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、完全組み換え V(D)J エクソンを含む。

20

【0101】

ある態様において、トランスジェニック非ウマ哺乳動物は、ウマ VH、DH および JH 遺伝子および齧歯類における介在(非コード制御または足場)配列に基づき、例えば、プレ D 領域を含む、介在配列を含む、異種、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含む、齧歯類、例えば、マウスである。ある態様において、トランスジェニック齧歯類は、さらに、それぞれウマ Vκ または Vλ コード配列およびウマ Jκ または Jλ コード配列および齧歯類の Igl 遺伝子座に存在する非コード制御または足場配列などの介在配列を含む、部分的ウマ Igl 遺伝子座を含む。

30

【0102】

ある態様において、マウスゲノムの内因性 VH 免疫グロブリン遺伝子座全体が欠失され、12 個の機能的ウマ VH 遺伝子セグメントおよびマウスゲノムの J558 VH 遺伝子座の非コード配列に置き換えられる。ある態様において、異種免疫グロブリン遺伝子座は、40 個のウマ DH および 8 個の JH 遺伝子セグメントを含む。ある態様において、異種免疫グロブリン遺伝子座は、マウスプレ D 領域を含む。ある態様において、ウマ VH、DH および JH コード配列は、齧歯類非コード配列に包埋される。

40

【0103】

ある態様において、相同組み換えおよび部位特異的組み換えの組み合わせを使用して、トランスジェニック細胞および動物が産生される。ある態様において、相同性ターゲティングベクターを使用して、内因性免疫グロブリン遺伝子座における所望の位置で哺乳動物宿主細胞ゲノムに配列特異的組み換え部位を導入する。ある態様において、配列特異的組み換え部位は、相同組み換えにより哺乳動物宿主細胞のゲノムに導入され、哺乳動物宿主細胞におけるあらゆる他の遺伝子の発現またはコード配列に影響しない。ある態様において、免疫グロブリン遺伝子が転写および翻訳されて抗体を産生する能力は、組み換え部位後も維持され、所望により、選択可能マーカー遺伝子などの任意の付加的配列が挿入される。しかしながら、ある場合、得られた抗体分子のアミノ酸配列が挿入により改変されて

50

いるが、抗体が所望の目的のための十分な機能性を保持するよう、他の異種配列を免疫グロブリン遺伝子座配列に挿入することが可能である。ある態様において、1以上の遺伝子多型が定常領域エクソンにおける内因性遺伝子座に導入され、それにより異なるIgアレールが区別できるようにアロタイプマーカーが提供される。

【0104】

ある態様において、相同性ターゲティングベクターを使用して、内因性免疫グロブリン遺伝子座内の配列を置き換え、配列特異的組み換え部位および1以上の選択可能マーカー遺伝子を宿主細胞ゲノムに挿入する。ここで使用する選択可能マーカー遺伝子は、相同組み換えを受けていない細胞またはターゲティングベクターの無作為組込みを担持する細胞の同定および排除に利用できることは当業者により理解される。

10

【0105】

相同組み換えの方法は知られ、各々引用によりその全体として本明細書に包含させる米国特許6,689,610; 6,204,061; 5,631,153; 5,627,059; 5,487,992; および5,464,764に記載のものを含む。

【0106】

部位／配列特異的組み換え

部位／配列特異的組み換えは、リコンビナーゼによる認識に必要な短い、特異的DNA配列が、組み換えが生じる部位のみである点で相同組み換えと異なる。特定のDNA鎖または染色体上のこれらの部位の配向により、これらの特異的配列を認識する特殊化リコンビナーゼがi) DNA切除またはii) DNA反転または回転を触媒する。部位特異的組み換えは、2個のDNA鎖間でも、これらの部位が同じ染色体に存在しないならば、起こり得る。各々リコンビナーゼおよびその同族認識部位を含むいくつかのバクテリオファージおよび酵母由来部位特異的組み換え系が真核生物細胞で働くことが示されており、バクテリオファージP1 Cre/lox系、酵母FLP-FRT系および部位特異的リコンビナーゼのチロシンファミリーのDre系を含むが、これらに限定されない。このような系および方法は、例えば米国特許7,422,889; 7,112,715; 6,956,146; 6,774,279; 5,677,177; 5,885,836; 5,654,182; および4,959,317に記載され; この各々引用により本明細書に包含させる。

20

【0107】

バクテリオファージラムダイнтеグラーゼ、HK2022インテグラーゼを含むが、これらに限定されない部位特異的リコンビナーゼのチロシンファミリーの他の系および、例えば、バクテリオファージphiC31およびR4Tp901インテグラーゼを含む、リコンビナーゼのセリンファミリーに属する系を使用できる。

30

【0108】

部位特異的組み換えが2個の異なるDNA鎖間であるため、部位特異的組み換えを使用して、リコンビナーゼ介在カセット交換(RMCE)と称される過程により、異種免疫グロブリン遺伝子座を宿主細胞ゲノムに導入できる。RMCE法は、リコンビナーゼタンパク質のための野生型および変異体配列特異的組み換え部位を使用して利用される。ある態様において、RMCEは負の選択を含む。例えば、標的とされる染色体遺伝子座は、一端は野生型LoxP部位および他端は変異体LoxP部位に隣接させ得る。同様に、ベクターは、一端は野生型LoxP部位および他端は変異体LoxP部位に隣接した異種宿主細胞ゲノムに挿入する配列を含み得る。ベクターがCreリコンビナーゼ存在下で宿主細胞にトランスフェクトされるとき、Creリコンビナーゼは、各DNA鎖の野生型LoxPおよび変異体LoxP部位が互いの組み換えに不適合性であるため、同じDNA鎖の切除反応の触媒ではなく、内因性DNA鎖とベクターのDNAの間のRMCEを触媒する。すなわち、1個のDNA鎖がLoxP部位が唯一他のDNA鎖のLoxP部位と組み換えられる; 同様に、1個のDNA鎖の変異LoxP部位が唯一他のDNA鎖の変異LoxP部位と組み換えられる。

40

【0109】

ある態様において、RMCEのための同じリコンビナーゼにより認識される配列特異的

50

組み換え部位のバリエーションが使用される。このような配列特異的組み換え部位バリエーションの例は、逆方向反復の組み合わせを含むまたは変異体スペーサー配列を伴う組み換え部位を含むものを含む。例えば、2クラスのバリエーションリコンビナーゼ部位が、安定なCre-loxP統合組み換えの設計に利用可能である。何れもCre認識配列における8bpスペーサー領域または13bp逆方向反復内の配列変異を探索する。lox511 (Hoess, et al., Nucleic Acids Res, 14: 2287-2300 (1986))、lox5171およびlox2272 (Lee and Saito, Gene, 216: 55-65 (1998))、m2、m3、m7およびm11 (Langer, et al., Nucleic Acids Res, 30: 3067-3077 (2002))などのスペーサー変異体は、それ自体容易に組み換えられるが、野生型部位との組み換え率は顕著に低減している。このクラスの変異体は、非相互作用Cre-lox組み換え部位および非相互作用FLP組み換え部位を使用するRMCEによるDNA挿入に利用されている (Baer and Bode, Curr Opin Biotechnol, 12: 473-480 (2001); Albert, et al., Plant J, 7: 649-659 (1995); Seibler and Bode, Biochemistry, 36: 1740-1747 (1997); Schlake and Bode, Biochemistry, 33: 12746-12751 (1994))。

10

【0110】

逆方向反復変異体は、別のクラスのバリエーションリコンビナーゼ部位である。例えば、loxP部位は、左逆方向反復(LE変異体)または右逆方向反復(RE変異体)で改変塩基を含み得る。LE変異体、lox71は、野生型配列がTACCGに変化している左逆方向反復の5bpを5'末端に有する (Araki, et al, Nucleic Acids Res, 25: 868-872 (1997))。同様に、RE変異体、lox66は、CGGTAに変化した5個の最も3'塩基を有する。逆方向反復変異体は、プラスミド挿入断片を、「ドナー」RE変異体を組み換える「標的」染色体loxP部位として指定されるLE変異体を有する染色体DNAに統合するために使用される。組み換え後、loxP部位は、挿入セグメントに隣接する、シスで位置する。組み換えの機構は、組み換え後、一方のloxP部位が、二重変異体であるようなものである(LEおよびRE両方の逆方向反復変異を含む)および他方が野生型 (Lee and Sadowski, Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 80: 1-42 (2005); Lee and Sadowski, J Mol Biol, 326: 397-412 (2003))。二重変異体は、Creリコンビナーゼにより認識されず、挿入セグメントが切除されない点で、野生型部位と十分に異なる。

20

30

【0111】

ある態様において、配列特異的組み換え部位は、抗体発現に使用する制御配列またはコード配列の妨害を回避するために、コードまたは制御配列ではなく、イントロンに導入される。

【0112】

配列特異的組み換え部位の導入は、慣用の相同組み換え技術により達成され得る。このような技術は、例えば、Green and Sambrook (2012) (Molecular cloning: a laboratory manual 4th ed. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press)およびNagy, A. (2003). (Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual, 3rd ed. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press)などの参考文献に記載されている。

40

【0113】

ゲノムへの特異的組み換えは、当分野で知られる正または負の選択のために設計されるベクターを使用して、促進され得る。置換反応を受けている細胞の同定を促進するために、適切な遺伝子マーカー系を使用でき、細胞を、例えば、選択組織培養培地の使用により選択する。ある態様において、異種配列、例えば、マーカー系または遺伝子の2点の末端のまたはそこに近接する核酸配列を、異種核酸を含む細胞の選択後除去できる。

【0114】

ある態様において、内因性免疫グロブリン遺伝子座が欠失されている細胞を、マーカー遺伝子を使用して正に選択でき、該マーカー遺伝子は、所望により組み換え事象後または

50

その結果として細胞から除去され得る。使用し得る正の選択系は、組み換え事象を介して結合するヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H P R T) などのマーカー遺伝子の2個の非機能的部分の使用に基づく。ある態様において、2個の非機能的部分は、内因性免疫グロブリン遺伝子座と異種免疫グロブリン遺伝子座の置き換えの成功により機能的に結合する。ある態様において、機能的に再構成されたマーカー遺伝子は、マーカー遺伝子が適切な部位特異的リコンビナーゼを使用してゲノムから切除できるよう、何れかの側でさらに配列特異的組み換え部位(置換反応に使用した配列特異的組み換え部位と異なる)に隣接する。他の態様において、細胞は、毒素または薬物への暴露により負に選択される。例えば、ターゲティング構築物が相同組み換えにより統合しておらず、ゲノムに無作為に統合している細胞は、単純ヘルペスウイルス-チミジンキナーゼ (H S V - T K) の発現を、H S V - T K 遺伝子が相同性領域外に位置するならば、維持する。このような細胞を、ガンシクロビルなどのヌクレオシドアナログを使用して、選択できる。

10

【0115】

ある態様において、リコンビナーゼは、精製タンパク質として提供される。ある態様において、組み換えは、宿主細胞に一過性にトランスフェクトされたまたは宿主細胞ゲノムに安定に統合されたベクター構築物から発現されるタンパク質として提供される。あるいは、異種免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック動物を、リコンビナーゼを発現する動物と交配させ得る。

20

【0116】

ある態様において、複数のラウンドのR M C Eを、部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座の非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムへの挿入に利用できるように、2以上のセットの配列特異的組み換え部位が、操作したゲノム内に含まれる。

【0117】

ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座が、C R I S P Rテクノロジーを使用して導入される。例えば、C R I S P R / C a s 9ゲノム編集系を標的化組み換えに使用できる(He, et al., Nuc. Acids Res., 44: e85, (2016))。

【0118】

トランスジェニック動物の産生

ある態様において、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック動物、例えば、齧歯類、例えば、マウスを作製する方法が提供される。

30

【0119】

ある態様において、トランスジェニック動物のゲノムは、トランスジェニック動物のB細胞が、細胞あたり1を超える機能的V Hドメインを発現するよう、すなわち、引用によりその開示を本明細書に包含する、2016年8月24日出願の"Enhanced Production of Immunoglobulins"なる名称のW O 2 0 1 7 0 / 3 5 2 5 2に記載のとおり細胞が二特異的抗体を産生するように、修飾される。

【0120】

ある態様において、トランスジェニック動物のゲノムは、トランスジェニック動物のB細胞が重鎖を含むが軽鎖がない抗体を発現する、すなわち、細胞が重鎖のみの抗体を産生するように、修飾される。

40

【0121】

ある態様において、宿主細胞は胚幹(E S)細胞であり、これはその後トランスジェニック哺乳動物の作製に使用され得る。ある態様において、方法は、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含む胚幹細胞を単離し、異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニック動物を使用するために、該E S細胞を使用することを含む。

【実施例】

【0122】

次の実施例は、当業者に本発明をどのように製造し、使用するか完全な開示および記載を提供するために示し、発明者らが彼らの発明と認識する範囲を限定する意図も、下記

50

実験が実施した全てのまたは唯一の実験であることを示すまたは含意する意図もない。ここに記載する本発明の精神または範囲から逸脱することなく、多数の改変または修飾を行い得ることは当業者に認識される。したがって、実施例は説明的と解釈されるべきであり、限定的ではない。

【0123】

使用する期間および数値(例えば、ベクター、量、温度など)については正確さを確保する努力をしているが、一定の実験誤差および逸脱は考慮されるべきである。特に断らない限り、部は重量であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧またはほぼ大気圧である。

【0124】

実施例は、組み換えの部位に隣接する5'ベクターおよび3'ベクター両方によるターゲティングおよびRMCEを介する合成DNAの導入を記載する。本明細書を読むことにより、5'ベクターターゲティングが最初に起こり、続いて、3'であり得るまたは3'ベクターターゲティングが最初に起こり、続いて5'ベクターであり得ることは当業者には明らかである。ある状況において、ターゲティングは、二重検出機構を用いて同時に実施され得る。ある異なる戦略を、適切に統合された5'または3'ベクターを有する細胞の選択のために各実施例で使用するが、このような戦略は、微細な変更をして、Igh、IgkまたはIgλ遺伝子座のターゲティングと互換性であることも明らかである。

【0125】

実施例1：非ウマ哺乳動物宿主細胞ゲノムの免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子座への異種部分的ウマ免疫グロブリン可変領域遺伝子座の導入

非哺乳動物ES細胞のゲノム遺伝子座への異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座の導入を説明する例示的方を図2～4に示す。図2は、内因性V_H遺伝子セグメントの上流(5')の部位特異的組み換え配列の導入のための方法を記載する。2個の異なるリコンビナーゼ認識部位(例えば、それぞれFlpおよびCreについてFRT(207)およびloxP(205))および各野生型カウンターパート／部位(すなわち、野生型FRT(207)および野生型loxP(205))と組み換えられる能力を欠く2個の異なる変異体部位(例えば、修飾変異体FRT(209)および変異体loxP(211))が隣接するピューロマイシンホスホトランスフェラーゼチミジンキナーゼ融合タンパク質(puro-TK)(203)を含む5'相同性ターゲティングベクター(201)が提供される。ターゲティングベクターは、細胞の負の選択に使用するジフテリア毒素受容体(DTR)cDNA(217)を含む。ターゲティングベクターはまた所望により緑色蛍光タンパク質(GFP)などの可視マーカーも含む(示していない)。領域213および215は、内因性非ウマV_H遺伝子セグメント(219)を含むゲノム領域の5'である内因性非ウマ遺伝子座における連続領域(229)の5'および3'部分とそれぞれ相同である。相同性ターゲティングベクター(201)は、内因性V_H遺伝子セグメント(219)、プレD領域(221)、D_H遺伝子セグメント(223)、J_H遺伝子セグメント(225)および免疫グロブリン定常遺伝子領域遺伝子(227)を含む免疫グロブリン遺伝子座(231)を有するES細胞に導入(202)される。相同性ターゲティングベクター(201)からの部位特異的組み換え配列およびDTR cDNAは、内因性マウスV_H遺伝子座の部位5'で非ウマゲノムと統合され(204)、233に説明されるゲノム構造をもたらす。

【0126】

マウス胚幹(ES)細胞(C57B1/6NTacマウス由来)を、既知方法に従い、5'ベクター(201)を用いるエレクトロポレーションによりトランスフェクトする。エレクトロポレーション前、ベクターDNAを、原核生物プラスミド配列またはそれと結合するポリリンカーのみを切断する希有切断制限酵素で線形化する。トランスフェクト細胞を播種し、約24時間後、5'ベクターがDNAに統合されている細胞の選択下におく。ゲノムに統合された5'ベクター(201)を有しないES細胞を、培養培地にピューロマイシンを含むことにより選択(死滅)できる；5'ベクター(201)がゲノムに安定に統合され、puro-TK遺伝子を構成的に発現するES細胞のみがピューロマイシンに耐性であ

10

20

30

40

50

る。

【0127】

薬物耐性ES細胞のコロニーを、約1週間後裸眼で見えるようになった後、プレートから物理的に抽出する。これら集めたコロニーを脱凝集させ、マイクロウェルプレートに再播種し、数日間培養する。その後、細胞のクローンの各々を、一部細胞をアーカイブとして凍結し、残りを分析目的のDNA単離に使用することができるよう分ける。5'ベクターの導入についての一次スクリーニング法は、サザンブロットイングまたは、サザンブロットイングなどの二次スクリーニング法での確認を伴うPCRで実施できる。

【0128】

ES細胞クローンからのDNAを、広く実施されている遺伝子ターゲティングアッセイ設計を使用するPCRによりスクリーニングする。このアッセイについて、PCRオリゴヌクレオチドプライマー配列の一方は5'ベクター(201)とゲノムDNAの間で同一性が共有されている領域外にマッピングされ、一方、他方は5'ベクター内、例えば、Puro-TK遺伝子(203)にマッピングされる。標準的設計により、これらのアッセイは、5'ターゲティングベクターと内因性マウスIgh遺伝子座の間の相同組み換えを受けたES細胞のクローンにのみ存在するDNAを検出する。

10

【0129】

サザンブロットアッセイを、プローブと消化物の組み合わせがクローンにおける標的化遺伝子座の構造を相同組み換えにより適切に修飾されたとして同定することを可能とするように選択した、3個のプローブおよび複数の制限酵素で消化したゲノムDNAを使用して、広く使用される方法に従い実施する。プローブの1個は、5'ターゲティングベクターとゲノムDNAの間で同一性が共有されている領域の5'側に隣接するDNA配列にマッピングされる；第二プローブは、同一性の領域の外側であるが、3'側にマッピングされる；そして第三プローブは、ベクターにおける2個のゲノム同一性のアーム間の新規DNA内、例えば、Puro-TK遺伝子(203)にマッピングされる。サザンブロットは、外部プローブの1個およびPuro-TKプローブにより検出される、Igh遺伝子座の、修飾配列に対応する、DNAの予測される、すなわち、5'ターゲティングベクターとの相同組み換えによる、制限酵素産生フラグメント部分を同定する。外部プローブは、相同染色体の免疫グロブリンIgh遺伝子座の非変異体コピーからの変異体フラグメントおよびまた野生型フラグメントを検出する。

20

30

【0130】

PCRおよびサザンブロット陽性クローンのES細胞核型を、マウスES細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。このような異常を有するクローンは、さらなる使用から除外する。サザンブロットデータに基づき予測されるゲノム構造を有し、核型分析に基づき検出可能な染色体異常を有しないES細胞クローンを、さらなる使用のために選択する。

【0131】

図3に示すとおり、HPRT-欠損ES細胞における正の選択に使用できる任意的ヒボキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)遺伝子(335)；ネオマイシン耐性遺伝子(337)；それぞれFlpおよびCreのためのリコンビナーゼ認識部位FRT(307)およびloxP(305)を含む、3'相同性ターゲティングベクター(301)が提供される。領域329および339は、内因性JH遺伝子セグメント(325)の下流および定常領域遺伝子(327)の上流である内因性マウス遺伝子座の連続領域(341)の5'および3'部分とそれぞれ相同である。相同性ターゲティングベクターを、内因性VH遺伝子セグメント(319)、ブレD領域(321)、D遺伝子セグメント(323)、JH遺伝子セグメント(325)および定常領域遺伝子(327)を含む修飾マウス免疫グロブリン遺伝子座(331)に導入する(302)。相同性ターゲティングベクターの部位特異的組み換え配列(307、305)、HPRT遺伝子(335)およびネオマイシン耐性遺伝子(337)を、内因性マウス定常領域遺伝子(327)の上流のマウスゲノムに統

40

50

合し(304)、333に説明されるゲノム構造をもたらす。

【0132】

3'ベクター(301)で修飾された許容されるクローンを、選択のためのピューロマイシンの代わりに、ネオマイシンまたはHPRT選択を選択する以外、5'ベクター(201)で使用したのと設計が本質的に同一である方法およびスクリーニングアッセイを使用して、同定する。PCRアッセイ、プローブおよび消化物も、3'ベクターによるゲノム領域修飾と適合するよう仕立てる。PCRおよびサザンブロット陽性クローンのES細胞核型を、マウスES細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。このような異常を有するクローンは、さらなる使用から除外する。

10

【0133】

3'および5'ベクター両方により変異されているES細胞、すなわち、両方の操作された変異を担持する二重に標的化された細胞のクローンを、ベクターターゲティングおよび分析後単離する。クローンは、相同染色体とは逆に、同じ染色体上の遺伝子ターゲティングに付されなければならない(すなわち、ターゲティングベクターにより作られた操作された変異は、別々の相同DNA鎖にトランスではなく、同じDNA鎖上にシスでなければならない)。シス配置のクローンを、ゲノム同一性のアームの間の2個の遺伝子ターゲティングベクター(303および337)に存在する新規DNAとハイブリダイズするプローブを使用する、中期スプレッドの蛍光イン・サイチュハイブリダイゼーションなどの分析法によりトランス配置のものと区別する。2タイプのクローンはまた、ターゲティングベクターがシスで統合されているならば、HPRT(335)およびネオマイシン耐性(337)遺伝子を欠失するCreリコンビナーゼを発現するベクターでトランスフェクトし、次いで各クローンからの細胞の一部をG418/ネオマイシンに対する耐性について試験する「同胞選択」スクリーニングによりクローンの薬物耐性表現型を分析することにより互いに区別できる。得られたシス由来クローンの大部分は、薬物に対する耐性を保持するトランス由来クローンとは対照的に、G418/ネオマイシンに感受性でもある。重鎖遺伝子座における操作した変異のシス配置を有する細胞の二重に標的化したクローンを、さらなる使用のために選択する。

20

【0134】

2個の組み換え部位が哺乳動物宿主細胞ゲノムに統合されたら、次いで、内因性免疫グロブリン遺伝子座を、ゲノムに統合された配列特異的組み換え部位に対応するリコンビナーゼの1個、例えば、FlpまたはCreの導入により組み換えに付す。FlpまたはCre(302)存在下、DTR遺伝子(317)、内因性Igh可変領域遺伝子座(319、323、325)、ブレD領域(321)およびHPRT(335)およびネオマイシン耐性(337)遺伝子を含む野生型FRTまたは野生型LoxP部位の間の全介在配列は欠失され、339に示すゲノム構造がもたらされる。方法は、そのホモログではなく、同じ染色体に生ずる第二ターゲティングに依存する(すなわち、トランスではなく、シス)。ターゲティングが意図するとおりシスで起こるならば、ジフテリア毒素に対する感受性を引き起こすDTR遺伝子(317)が宿主細胞ゲノムに不在である(欠失している)ため、細胞は培地に導入されたジフテリア毒素による負の選択に感受性ではない。同様に、第一または第二ターゲティングベクターの無作為組込みを担持するES細胞は、非欠失DTR遺伝子の存在により、ジフテリア毒素に感受性となる。

30

40

【0135】

免疫グロブリン重鎖遺伝子座の2個の相同コピーの1個に配列欠失を担持するES細胞クローンを、Creリコンビナーゼ発現ベクターおよびマウス非コード配列に包埋されたウマV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントコード配列を含む部分的ウマ免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含むベクターで再トランスフェクトする。図4は、重鎖可変領域ドメインをコードする内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の一部が、内因性V_HおよびJ_H遺伝子座の間の介在配列を含み、欠失しているマウスゲノムへの、異種部分的ウマ免疫グロブリン重鎖遺伝子座の導入を説明する。非ウマ宿主ゲノムに挿入する部分的ウマ免疫グロブリ

50

ン遺伝子座を含む部位特異的ターゲティングベクター(441)を、RMCEにより宿主細胞の修飾ゲノム(439)に導入する(402)。部分的ウマV_H遺伝子座(419)、マウスブレD領域(421)、部分的ウマD_H遺伝子座(423)、部分的ウマJ_H遺伝子座(425)ならびにフランキング変異体FRT(409)、変異体LoxP(411)、野生型FRT(407)および野生型LoxP(405)部位を含む部位特異的ターゲティングベクター(441)をRMCEにより宿主細胞に導入する(402)。具体的に、部分的ウマV_H遺伝子座(419)は、内因性非ウマゲノムに存在する12個の機能的ウマV_H遺伝子セグメントコード配列および3'非ウマRSSおよび介在配列を含む；ブレD領域(421)は、内因性非ウマゲノムにおける上流に存在する21.6kb非ウマ配列を含む；D_H領域(423)は、非ウマRSSに隣接し、内因性非ウマD_H領域に存在する介在配列に包埋された40個のウマD_H遺伝子セグメントのコドンを含む；そしてJ_H遺伝子座(425)は、5'非ウマRSSを伴い、内因性非ウマゲノムに存在する介在配列に包埋された8個のウマJ_H遺伝子セグメントのコドンを含む。ある態様において、宿主細胞ゲノムのIgh遺伝子座は、図3に関連して記載するとおり、介在配列を含む全内因性V_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントを欠失するよう修飾される。この修飾の結果として、内因性非ウマIgh遺伝子座(439)は、上流に変異体FRT部位(409)および変異体LoxP部位(411)ならびに下流に野生型FRT(407)および野生型LoxP(405)が隣接するpur-TK融合遺伝子(403)と共に残る。適切なリコンビナーゼ(404)の導入により、部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座は、内因性マウス定常領域遺伝子(427)の上流のゲノムにlox5171(411)およびloxP(405)部位の間に統合され、443に説明されるDNA領域を作る。

10

20

【0136】

RMCEおよび部分的ウマIgh遺伝子座の組込みに付されていないES細胞はpur-TK融合遺伝子(403)を保持し、組織培養培地にガンシクロビルを添加することにより除去される。

【0137】

ウマV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントの配列は配列番号1～65に示す。

【0138】

異種部分的ウマ免疫グロブリン領域の組込みは、サザンブロッティングまたは、サザンブロッティングなどの二次スクリーニング法での確認を伴うPCRで検出できる。スクリーニング法は、挿入V_H、D_HまたはJ_H遺伝子座および介在配列の存在を検出するように設計される。PCRおよびサザンロット陽性クローンのES細胞核型を、マウスES細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。このような異常を有するクローンは、さらなる使用から除外する

30

【0139】

マウス重鎖遺伝子座に部分的ウマ免疫グロブリン重鎖可変領域(443)を担持するES細胞クローンを、標準法により系統DBA/2からのマウス胚盤胞に微量注入して、ES細胞由来キメラマウスを作製する。ES細胞由来の毛に対する寄与が最も高い雄性キメラマウスを、雌性マウスとの交配のために選択する。これらの交配による子孫を、部分的ウマ免疫グロブリン重鎖遺伝子座の存在について分析する。部分的ウマ免疫グロブリン重鎖遺伝子座を担持するマウスマウスのコロニーを確立するために使用する。

40

【0140】

実施例2：マウスゲノムの免疫グロブリンカップ鎖遺伝子座への異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座の導入

マウスIgκ遺伝子座の一部を部分的ウマIgκ遺伝子座に置き換える方法は、図5に示される。この方法は、マウスゲノムの内因性V_κ(515)およびJ_κ(519)領域遺伝子セグメントのクラスターの5'または3'に導入できるマウスゲノムへの第一部位特異的リコンビナーゼ認識配列の導入、続く第一配列特異的組み換え部位と組み合わせて、定常領域遺伝子(521)の上流のV_κおよびJ_κ遺伝子セグメントを含む遺伝子座全体に隣接

50

する、マウスゲノムへの第二部位特異的リコンビナーゼ認識配列の導入を含む。関連する部位特異的リコンビナーゼを使用して、隣接領域を欠失し、部分的ウマ免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座で置き換える。

【0141】

V_K(515)およびJ_K(519)遺伝子セグメントいずれかの側の部位特異的組み換え配列の導入に用いるターゲティングベクターも、リコンビナーゼによりなお効率的に認識されるが、非修飾部位と組み換えられないように修飾されている付加的部位特異的組み換え配列も含む。この部位は、V_KおよびJ_K遺伝子セグメントクラスター欠失後、異種免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座がRMC Eを介して修飾V_K遺伝子座に挿入される第二部位特異的組み換え事象に使用できるよう、ターゲティングベクターに配置される。この例では、異種免疫グロブリン軽鎖可変領域遺伝子座は、ウマV_KおよびJ_K遺伝子セグメントおよびマウスI_g_K可変領域非コード配列を含む合成核酸である。

10

【0142】

直前に概説した工程を達成するため2個の遺伝子ターゲティングベクターが構築される。ベクターの一方(503)は、最遠位V_K遺伝子セグメントの上流、遺伝子座の5'末端から採ったマウスゲノムDNA(525および541)を含む。他方のベクター(505)は、J_K遺伝子セグメント(519)の下流(3')および定常領域遺伝子(521)の上流の遺伝子座内から採ったマウスゲノムDNA(543および549)を含む。

【0143】

5'ベクター(503)の鍵となる特性は次のとおりである：ポリオーマウイルスからの2個の変異体転写エンハンサーに結合した修飾単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ遺伝子プロモーターの転写制御下にあるジフテリア毒素Aサブユニット(DTA)をコードする遺伝子(523)；カップ鎖遺伝子座における最遠位可変領域遺伝子の上流にマッピングされる6KbのマウスゲノムDNA(525)；F_LPリコンビナーゼのためのFRT認識配列(527)；マウスP_oL_r2_a遺伝子プロモーターを含むゲノムDNA片(529)；翻訳開始配列(535、「コザック」コンセンサス配列に包埋されたメチオニンコドン)；C_reリコンビナーゼのための変異_LoxP認識配列(_Lox5171)(531)；転写終結／ポリアデニル化配列(533)；C_reリコンビナーゼのための_LoxP認識配列(537)；マウスホスホグリセラートキナーゼ1遺伝子からのプロモーターの転写制御下の短縮形態のチミジンキナーゼ(p_u-TK)に融合したピューロマイシンに対する耐性を付与するタンパク質を含む融合タンパク質をコードする遺伝子(539)；ベクターにおける5'末端に6Kb配列にマッピングされ、天然関連配向で配置される2.5KbのマウスゲノムDNA(541)。

20

30

【0144】

3'ベクター(505)の鍵となる特性は次のとおりである：J_K(519)およびC_K(521)遺伝子座の間のイントロン内にマッピングされる6KbのマウスゲノムDNA(543)；マウスP_oL_r2_a遺伝子プロモーターの転写制御下にヒトヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H_PRT)をコードする遺伝子(545)；マウスホスホグリセラートキナーゼ1遺伝子プロモーター制御下のネオマイシン耐性遺伝子(547)；C_reリコンビナーゼのための_LoxP認識配列(537)；ベクターにおける5'末端に含まれる6Kb DNAフラグメントのゲノムのすぐ下流にマッピングされ、マウスゲノムにおけると同じ相対的方法で配向している2個のフラグメントを有する、3.6KbのマウスゲノムDNA(549)；ポリオーマウイルスからの2個の変異体転写エンハンサーに結合した修飾単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ遺伝子プロモーターの転写制御下のジフテリア毒素Aサブユニット(DTA)をコードする遺伝子(523)。

40

【0145】

C57B1／6NTacマウス由来のマウス胚幹(ES)細胞を、既知方法によりエレクトロポレーションにより3'ベクター(505)でトランスフェクトする。エレクトロポレーション前、ベクターDNAを、原核生物プラスミド配列またはそれと結合するポリリンカーのみを切断する希有切断制限酵素で線形化する。トランスフェクト細胞を播種し、約

50

24時間後、ネオマイシンアナログ薬物G418の使用により、DNAに3'ベクターが統合されている細胞の正の選択下におく。DNAにベクターが統合されているが、相同組み換えによるものではない、細胞についての負の選択もある。非相同組み換えは、遺伝子が発現されたとき細胞を殺すDTA遺伝子の保持をもたらし、一方DTA遺伝子は、マウスIgκ遺伝子座と相同性のベクターの領域外にあるため、相同組み換えにより欠失される。薬物耐性ES細胞のコロニーを、約1週間後、裸眼で可視になった後プレートから物理的に抽出する。これらの集めたコロニーを、脱凝集し、マイクロウェルプレートに再播種し、数日間培養する。その後、細胞のクローンの各々を、一部細胞をアーカイブとして凍結し、残りを分析目的のDNA単離に使用することができるよう分ける。

【0146】

ES細胞クローンからのDNAを、遺伝子ターゲティングアッセイを使用するPCRによりスクリーニングする。このアッセイについて、PCRオリゴヌクレオチドプライマー配列の一方は、3'ベクター(505)とゲノムDNA(501)の間で同一性が共有される領域外にマッピングされ、一方、他方は、ベクターの2個のゲノム同一性のアームの間の新規DNA内、例えば、HPRT(545)またはネオマイシン耐性(547)遺伝子にマッピングされる。これらのアッセイは、3'ベクター(505)および内因性マウスIgκ遺伝子座の間で相同組み換えに付されているトランスフェクト細胞由来のES細胞のクローンにのみ存在するDNA片を検出する。PCR陽性クローンを、拡大および続くサザンブロットアッセイを使用するさらなる分析のために選択する。

【0147】

サザンブロットアッセイを既知方法により実施する；プローブと消化物の組み合わせが、クローンにおける標的化遺伝子座の構造および相同組み換えにより適切に修飾されているか否かについての結論が導かれるよう選択した3個のプローブおよび複数の制限酵素で消化したゲノムDNAを含む。プローブの1個は3'カップターゲットベクター(505)およびゲノムDNAの間で同一性が共有される領域の5'側に隣接するDNA配列にマッピングされる；第二プローブも、同一性の領域の外側であるが、3'側にマッピングされる；第三プローブは、ベクターにおける2個のゲノム同一性のアームの間の新規DNA内、例えば、HPRT(545)またはネオマイシン耐性(547)遺伝子にマッピングされる。サザンブロットは、外部プローブの1個およびネオマイシン耐性またはHPRT遺伝子プローブにより検出される、カップ遺伝子座の、正しく、すなわち、3'カップターゲットベクター(505)との相同組み換えにより、変異された部分に対応するDNAの予測される制限酵素産生フラグメントを同定する。外部プローブは、相同染色体の免疫グロブリンカップ遺伝子座の非変異体コピーからの変異体フラグメントおよびまた野生型フラグメントも検出する。

【0148】

PCRおよびサザンブロット陽性クローンのES細胞核型を、マウスES細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。このような異常を有するクローンは、さらなる使用から除外する。サザンブロットデータに基づき予測される正確なゲノム構造を有すると判断される核型が正常なクローンを、さらなる使用のために選択する。

【0149】

次いで、許容されるクローンを、G418／ネオマイシン選択の代わりにピューロマイシン選択を使用し、プロトコルを5'ベクター(503)により修飾されたゲノム領域と適合するよう仕立てた以外、3'ベクター(505)で使用したのと設計が本質的に同一である方法およびスクリーニングアッセイを使用して、5'ベクター(503)で修飾する。5'ベクター(503)トランスフェクション実験の目標は、両3'ベクター(505)および5'ベクター(503)により予測される形態で変異されているES細胞、すなわち、両操作された変異を担持する二重に標的化された細胞のクローンの単離である。これらのクローンにおいて、Creリコンビナーゼは、2個のベクターによるカップ遺伝子座に導入されたloxP部位間で組み換え(502)を生じさせ、507に示すゲノムDNA配置をも

10

20

30

40

50

たらず。

【0150】

さらに、クローンは、相同染色体とは逆に、同じ染色体上の遺伝子ターゲティングに付されなければならない；すなわち、ターゲティングベクターにより作られた操作された変異は、別々の相同DNA鎖にトランスではなく、同じDNA鎖上にシスでなければならない。シス配置のクローンを、ゲノム同一性のアーム間の2個の遺伝子ターゲティングベクター(503および505)に存在する新規DNAとハイブリダイズするプローブを使用する、中期スプレッドの蛍光イン・サイチュハイブリダイゼーションなどの分析法によりトランス配置のものと区別する。2タイプのクローンはまた、ターゲティングベクターがシスで統合されているならば、p u-T k(539)、H P R T(545)およびネオマイシン耐性(547)遺伝子を欠失する、C r eリコンビナーゼを発現するベクターと互いに区別もでき、5'ベクター(503)により導入されたチミジンキナーゼ遺伝子に対するガンシクロビル選択で生存したコロニー数を比較し、生存クローンの薬物耐性表現型を、クローンからの細胞の一部をピューロマイシンまたはG418/ネオマイシンに対する耐性に対して試験する「同胞選択」スクリーニング法により分析できる。シス配置の変異を有する細胞は、トランス配置の細胞よりも約 10^3 ガンシクロビルにより耐性であるクローンをもたらすと予測される。得られたシス由来ガンシクロビル耐性クローンの大部分は、両薬物に対する耐性を保持するトランス由来ガンシクロビル耐性クローンとは対照的に、ピューロマイシンおよびG418/ネオマイシン両方にも感受性である。カップ鎖遺伝子座における操作された変異のシス配置を有する細胞のクローンを、さらなる使用のために選択する。

10

20

【0151】

細胞の二重標的化クローンをC r eリコンビナーゼ(502)を発現するベクターで一過性にトランスフェクトし、トランスフェクト細胞を、その後、上に要約する分析実験におけるとおり、ガンシクロビル選択下に置く。細胞のガンシクロビル耐性クローンを単離し、5'ベクター(503)および3'ベクター(505)により作られた2個の操作された変異の間の予測される欠失(507)の存在について、P C Rおよびサザンブロットにより分析する。これらのクローンにおいて、C r eリコンビナーゼは、2個のベクターによりカップ鎖遺伝子座に導入されたl o x P部位(537)の間で組み換えを生じさせる。L o x P部位が2個のベクターにおいて同じ相対的配向で配置されているため、組み換えは、2個のl o x P部位の間のゲノムインターバル全体を含むDNAの環の切除をもたらす。環は複製起点を含まず、故に有糸分裂中複製せず、よって、クローン増殖に付されるにつれて細胞のクローンから失われる。得られたクローンは、もともと2個のl o x P部位の間にあったDNAの欠失を有する。P C Rおよびサザンブロット陽性クローンのE S細胞核型を、マウスE S細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。このような異常を有するクローンは、さらなる使用から除外する。サザンブロットデータに基づき予測される正確なゲノム構造を有すると判断される核型が正常なクローンを、さらなる使用のために選択する。

30

【0152】

免疫グロブリンカップ鎖遺伝子座の2個の相同コピーの1個に配列の欠失を担持するE S細胞クローンを、V k(551)およびJ k(555)遺伝子セグメントを含む部分的ウマ免疫グロブリンカップ鎖遺伝子座を含むC r eリコンビナーゼ発現ベクターおよびベクター(509)で再トランスフェクトする(504)。ベクターの鍵となる特性は次のとおりである：l o x 5 1 7 1部位(531)；ネオマイシン耐性遺伝子オープンリーディングフレーム(547、イニシエーターメチオニンコドンが欠くが、インフレームであり、メチオニン開始コドン(535)の下流のl o x 5 1 7 1部位(531)における非中断オープンリーディングフレームと連続的である)；F R T部位(527)；各々3'側がマウスR S Sに隣接し、マウス非コード配列に包埋されているウマコード配列を含む19個のウマV k遺伝子セグメントのアレイ(551)；所望によりマウスカップ鎖遺伝子座におけるJカップ

40

50

領域遺伝子セグメントのクラスターのすぐ上流からの13.5KbゲノムDNA片(示していない); 5'側がマウスRSSに隣接し、マウス非コードDNAに包埋された4個のウマJκ領域遺伝子セグメントを含むDNA(555); lox5171部位(531)と逆相対配向のloxP部位(537)。

【0153】

ウマVκおよびJκ遺伝子コード領域の配列は配列番号66～86に示す。

【0154】

トランスフェクトESクローンを、部分的ウマ免疫グロブリンκ鎖遺伝子座を含むドナーDNA(509)が、それぞれ5'(503)および3'(505)ベクターにより配置されたlox5171(531)およびloxP(537)部位の間の、欠失内因性免疫グロブリンκ鎖遺伝子座に、全体的に統合されている、RMCEに付されている細胞のクローンを濃縮する、G418選択下に置く。RMCEに適切に付されている細胞のみが、プロモーター(529)ならびにその発現に必要なイニシエーターメチオニンコドン(535)がベクター(509)に存在せず、修飾宿主細胞Igκ遺伝子座(507)に予めすでに存在するため、ネオマイシン耐性遺伝子(547)を発現する能力を有する。509配列を使用して作製したDNA領域を511に説明する。FRT部位(527)間に位置する5'ベクター(503)からの残りの配列は、下記のとおりインビトロまたはインビボでFlp介在組み換え(506)により除去し、513に示す部分的ウマ免疫グロブリンκ鎖遺伝子座をもたらす。

【0155】

G418耐性ES細胞クローンをPCRおよびサザンブロットングで分析して、望まない再配列または欠失なく予測されるRMCE法に付されているか決定する。PCRおよびサザンブロット陽性クローンのES細胞核型を、マウスES細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。このような異常を有するクローンは、さらなる使用から除外する。サザンブロットデータに基づき予測される正確なゲノム構造を有すると判断される核型が正常なクローンを、さらなる使用のために選択する。

【0156】

内因性マウス免疫グロブリンκ鎖遺伝子座(513)に部分的ウマ免疫グロブリンκ鎖遺伝子座を担持するES細胞クローンを、標準法により系統DBA/2からのマウス胚盤胞に微量注入して、部分的ES細胞由来キメラマウスを作る。ES細胞由来の毛に対する寄与が最も高い雄性キメラマウスを、雌性マウスとの交配のために選択する。後輩に使用するために選択した雌性マウスは、C57B1/6NTac系統であり、また生殖細胞系列に発現され、5'ベクターからFRT隣接ネオマイシン耐性遺伝子(520)および他の要素を欠失するFlpリコンビナーゼをコードする導入遺伝子も担持する。これらの交配による子孫を、部分的ウマ免疫グロブリンκ鎖遺伝子座の存在およびネオマイシン耐性遺伝子喪失について分析する。部分的ウマ免疫グロブリンκ鎖遺伝子座を担持するマウスを、マウスのコロニーの確立に使用する。

【0157】

実施例1に記載のとおり産生した、部分的ウマ免疫グロブリン重鎖遺伝子座を担持するマウスを部分的ウマ免疫グロブリンκ鎖遺伝子座を担持するマウスと交配できる。これらの子孫は、次に、部分的ウマIgHおよび部分的ウマIgκ両方についてホモ接合型であるマウスを最終的に作るスキームで互いに交配する。このようなマウスは、ウマ可変ドメインおよびマウス定常ドメインを含む部分的ウマ重鎖を産生する。またウマκ鎖可変ドメインおよびマウスκ鎖定常ドメインを含む部分的ウマκ鎖タンパク質も産生する。これらのマウスから回収したモノクローナル抗体は、ウマκ鎖可変ドメインと対合したウマ重鎖可変ドメインを含む。

【0158】

ある態様において、部分的ウマIgHおよび部分的ウマIgκ両方がホモ接合型であるマウスを、実施例3で作った部分的ウマラムダ遺伝子座についてホモ接合型であるマウス

10

20

30

40

50

と交配させて、全3遺伝子座がホモ接合型のマウスを産生する。

【0159】

5'ベクター(503)およびIgκ遺伝子座を標的とするためにここで使用するその後の戦略を、IgH遺伝子座を標的とする別の戦略として、図2における5'ベクター(201)の代わりに使用できることを、当業者は認識する。この場合、5'ベクター(503)は、Igκ遺伝子座と相同のゲノムDNA領域(525および541)を、IgH遺伝子座と相同のゲノムDNA領域(図2における213および215)に置き換えるよう修飾される。

【0160】

実施例3：マウスゲノムの免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座における異種部分的ウマ免疫グロブリン遺伝子座の導入

マウスIgλ遺伝子座の一部を部分的ウマIgλ遺伝子座で置き換える方法は、図6Aおよび6Bに説明される。この方法は、Vλ2/Vλ3遺伝子セグメント(613)の上流およびCλ1遺伝子セグメントの下流両方(617の最も右の四角)およびEλエンハンサー(623)の上流または下流両方の内因性マウス免疫グロブリンラムダ遺伝子座と同一性を共有するターゲティングベクター(603)を含む相同組み換え法による、Vλ2/Vλ3遺伝子セグメント(613)、Jλ2/Cλ2遺伝子クラスター(615)およびVλ1-Jλ3/Cλ3-Jλ1/Cλ1遺伝子クラスター(617)を含む野生型マウス免疫グロブリンラムダ遺伝子座(601および図1、下部)から約200KbのDNAの欠失を含む。ベクターは、約200Kbの内因性マウスゲノムDNAを、RMCEにより異種免疫グロブリンラムダ遺伝子座を修飾Vλ遺伝子座に置き換えるその後の部位特異的組み換えを可能にするよう設計された配列に置き換える(604)。この例では、異種免疫グロブリンラムダ遺伝子座は、ウマIgλコード配列およびマウスIgλ非コード配列を含む合成核酸である。

【0161】

約200Kb欠失および部位特異的組み換え部位挿入を達成するための遺伝子ターゲティングベクター(603)の鍵となる特性は次のとおりである：ジフテリア毒素のAサブユニット(DTA、659)または単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子をコードする遺伝子などの負の選択遺伝子(示していない)；免疫グロブリンラムダ遺伝子座におけるマウスVλ2/Vλ3可変領域遺伝子セグメントの5'からの4KbのゲノムDNA(625)；FRT部位(627)；マウスPolr2a遺伝子プロモーターを含むゲノムDNA(629)；翻訳開始配列(「コザック」コンセンサス配列に包埋されたメチオニンコドン)(635)；Creリコンビナーゼのための変異loxP認識配列(loxx5171)(631)；転写終結/ポリアデニル化配列(633)；ピューロマイシンに対する耐性を付与するタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(637)、一方このオープンリーディングフレームは、Polr2aプロモーターおよびその隣の翻訳開始配列に対してアンチセンス鎖であり、それ自体の転写終結/ポリアデニル化配列が続く(633)；CreリコンビナーゼのためのloxP認識配列(639)；ピューロマイシン耐性遺伝子オープンリーディングフレームと同じアンチセンス鎖の翻訳開始配列(「コザック」コンセンサス配列に包埋されたメチオニンコドン)(635)；loxP部位(635)下流の開始コドンで翻訳が開始し、ピューロマイシンオープンリーディングフレームにloxP部位を介して戻り、全てそれに隣接するPolr2aプロモーターおよび翻訳開始配列に対してアンチセンス鎖である、ピューロマイシン耐性オープンリーディングフレームの転写を指示するよう配向されたニフトリベータアクチンプロモーターおよびサイトメガロウイルス早期エンハンサー要素(641)；Flpリコンビナーゼについての変異認識部位(643)；およびEλエンハンサー要素(623)を含むゲノムDNA(645)。

【0162】

C57B1/6N Tacマウス由来のマウス胚幹(ES)細胞を、既知方法により、エレクトロポレーションによりターゲティングベクター(603)でトランスフェクトする(602)。相同組み換えは、内因性マウス免疫グロブリンラムダ遺伝子を、約200Kb領域

10

20

30

40

50

におけるターゲティングベクター(603)からの部位特異的組み換え部位に置き換え、(605)に説明するゲノムDNA配置をもたらす。

【0163】

エレクトロポレーション前、ベクターDNAを、原核生物プラスミド配列またはそれと結合するポリリンカーのみを切断する希有切断制限酵素で線形化する。トランスフェクト細胞を播種し、約24時間後、ピューロマイシンを使用する正の薬物選択下に置く。DNAにベクターが統合されているが、相同組み換えによるものではない、細胞についての負の選択もある。非相同組み換えは、遺伝子が発現されたとき細胞を殺すDTA遺伝子(659)の保持をもたらす、一方DTA遺伝子は、マウスIgλ遺伝子座と相同性のベクターの領域外にあるため、相同組み換えにより欠失される。薬物耐性ES細胞のコロニーを、1週間後裸眼で見えるようになったら、プレートから物理的に抽出する。これらの集めたコロニーを脱凝集し、マイクロウェルプレートに限界希釈で再播種し、数日間培養する。その後、細胞のクローンの各々を、一部細胞をアーカイブとして凍結し、残りを分析目的のDNA単離に使用することができるよう分ける。

10

【0164】

ES細胞クローンからのDNAを、既知遺伝子ターゲティングアッセイを使用するPCRによりスクリーニングする。これらのアッセイについて、PCRオリゴヌクレオチドプライマー配列の一方は、ターゲティングベクターとゲノムDNAの間で同一性が共有される領域の外にマッピングされ、一方、他方は、ベクターの2個のゲノム同一性のアームの間の新規DNA内、例えば、purO遺伝子(637)にマッピングされる。これらのアッセイは、ターゲティングベクター(603)および内因性DNA(601)の間で相同組み換えに付されているトランスフェクト細胞由来の細胞のクローンにのみ存在するDNA片を検出する。

20

【0165】

トランスフェクションからのPCR陽性クローンを、拡大および続くサザンブロットアッセイを使用するさらなる分析のために選択する。サザンブロットは、プローブと消化物の組み合わせが、ES細胞DNAが相同組み換えにより適切に修飾されているか否かの同定を可能とするように、3個のプローブおよび複数の制限酵素で消化したクローンからのゲノムDNAを含む。

【0166】

PCRおよびサザンブロット陽性のクローンのES細胞の核型を、マウスES細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。異常の証拠を示すクローンを、さらなる使用から除外する。サザンブロットデータに基づき予測される正確なゲノム構造を有すると判断される核型が正常なクローンを、さらなる使用のために選択する。

30

【0167】

免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座の2個の相同コピーの一方を欠失するES細胞クローンを、ウマVλおよびJλ領域遺伝子セグメントコード配列を含む部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座を含むベクター(607)と共にCreリコンビナーゼ発現ベクターで再トランスフェクトする(604)。このベクター(607)の鍵となる特性は次のとおりである：lox5171部位(631)；イニシエーターメチオニンコドンが欠くが、インフレームであり、lox5171部位における非中断オープンリーディングフレームと連続的であるネオマイシン耐性遺伝子オープンリーディングフレーム(647)(ダイアグラム605における631)；FRT部位(627)；各遺伝子セグメントが3'側がマウスRSSに隣接し、マウスラムダ非コード配列に包埋されているウマラムダコード配列を含む27個の機能的ウマラムダ可変領域遺伝子セグメントのアレイ(651)；Eλ2-4エンハンサー要素(図1)を含む、各単位がマウスラムダ遺伝子座からの非コード配列(655)内に包埋されたウマJλ遺伝子セグメントおよびマウスラムダ定常ドメイン遺伝子セグメントを含む、J-C単位のアレイ。ウマJλ遺伝子セグメントは、Jλ1、Jλ5、Jλ6およびJλ7をコードするものであり(他のJλ遺伝子セグメントはシュード遺

40

50

伝子である)、一方マウスラムダ定常ドメイン遺伝子セグメントは、C λ 1、C λ 2またはC λ 3またはそれらの組み合わせである; F λ pリコンビナーゼのための変異認識部位(643); 構築物における免疫グロブリン遺伝子セグメントコード情報に対してアンチセンス鎖に位置する、ハイグロマイシン耐性を付与するオープンリーディングフレーム(657); lox5171部位と逆相対配向のloxP部位(639)。

【0168】

RCMEは、RCMEベクターからの部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座(607)を修飾内因性マウスIg λ 遺伝子座に挿入し、609に示すゲノムDNA配置をもたらす。

【0169】

ウマV λ およびJ λ 遺伝子コード領域の配列は配列番号87~122に示す。

【0170】

トランスフェクトクローンを、部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖可変が、遺伝子ターゲティングベクターにより配置されたlox5171およびloxP部位の間の欠失内因性マウス免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座に統合される、RMC E法に付されている細胞のクローンを濃縮する、G418またはハイグロマイシン選択下に置く。ターゲティングベクター(603)からの残りの配列は、インビトロまたはインビボでのFLP介在組み換え(606)により除去し(下記参照)、611に示す最終部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座を得る。

【0171】

611部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座のある配置のより詳細な図は613であるが、単なる一例として提供する。他の配置およびウマV λ およびJ λ 遺伝子セグメントおよびマウスC λ 遺伝子セグメント数ならびにエンハンサー配列の位置および数も可能である。

【0172】

G418/ハイグロマイシン耐性ES細胞クローンをPCRおよびサザンブロットイングにより分析し、望まない再配列または欠失なく予測されるリコンビナーゼ介在カセット交換法に付されているか確認する。ES細胞のPCRおよびサザンブロット陽性のクローンの核型を、マウスES細胞において生ずる最も一般に起こる染色体異常を区別するために設計したイン・サイチュ蛍光ハイブリダイゼーション法を使用して、分析する。異常の証拠を示すクローンを、さらなる使用から除外する。サザンブロットデータに基づき予測される正確なゲノム構造を有すると判断される核型が正常なクローンを、さらなる使用のために選択する。

【0173】

マウス免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座に部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座(611)を担持するES細胞クローンを、既知方法により、系統DBA/2からのマウス胚盤胞に微量注入し、一部ES細胞由来キメラマウスを作る。ES細胞由来の毛に対する寄与が最も高い雄性キメラマウスを、雌性マウスとの交配のために選択する。ここで選択した雌性マウスは、生殖細胞系列で発現されるF λ pリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を担持し、FRT隣接選択可能マーカを欠失するC57B1/6NTac系統である。これらの交配による子孫を、部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座の存在およびRMC E工程で作ったFRT隣接ネオマイシン耐性遺伝子およびmFRT隣接ハイグロマイシン耐性遺伝子の喪失について分析する。部分的ウマ免疫グロブリンラムダ鎖遺伝子座を担持するマウスを、マウスのコロニーを確立するために使用する。

【0174】

ある態様において、部分的ウマ免疫グロブリン重鎖遺伝子座および部分的ウマ免疫グロブリンカップ軽鎖遺伝子座についてホモ接合型であるマウス(実施例1および2に記載のとおり)を、部分的ウマ免疫グロブリンラムダ軽鎖遺伝子座を担持するマウスと交配させる。このタイプの繁殖スキームから産生したマウスは、部分的ウマIg h 遺伝子座についてホモ接合型であり、部分的ウマIg k およびIg λ 遺伝子座についてホモ接合型である

10

20

30

40

50

。これらのマウスから回収したモノクローナル抗体は、ある場合ウマカッパ可変ドメインおよび他の場合ウマラムダ可変ドメインと対合したウマ重鎖可変ドメインを含む。

【表 1】

表1. クラスターIIIにおけるV λ 遺伝子セグメントはcDNAとして発現される

Vλ 遺伝子指定 ¹	Vλ 遺伝子指定 ²	対応するGenBank cDNA
Vλ 21	I G L V x S 6 4	K F 9 8 5 0 5 7 . 1
Vλ 22	I G L V 8 S 5	K F 9 8 5 1 1 1 . 1
Vλ 23	I G L V 8 S 6	K F 7 4 8 6 6 0
Vλ 24	I G L V 9 S 2	X M _ 0 1 4 8 3 5 9 1 4 ³
Vλ 25	I G L V 8 S 7	K F 9 8 5 0 5 9 . 1
Vλ 26	I G L V 8 S 8	K F 9 8 5 0 6 5 . 1
Vλ 27	I G L V 8 S 9	K F 9 8 5 0 6 5

10

¹ Nomenclature of Sun, et al. Dev. Comp. Immunol. 34: 1009(2010)

² Nomenclature of Walther, et al. Dev. Comp. Immunol. 53: 303(2015)

³ この cDNA は *E. asinus*、その他は *E. caballus* 由来

【 0 1 7 5 】

配列情報

20

注：(R C) は、配列が他の配列と比較して逆配向であることを示す、逆相補を意味する。

配列番号 1 : VH1 IGHV1-5*01

L1: ATGGACTGGAGCTGGAGCATCCTCTTCTTGGTGGCAGTGGCTGCAG

L2: GTGTCTCCTCC

VH: GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGGGCATCCGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACAGCTTCACTTATTACTCTATGAGCTGGG
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGACGGGATATATCTATCCTGAATAT
GATGCTATGGGCTACCCGCAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCAACATGACTGCGGACAA
GTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGTCTGGCATCTGAGGACACAGCCG
TGTATTACTGTGCAACAGA

30

配列番号 2 : VH2 IGHV4-11*01

L1: ATGAATCACCTGTGGTTCTTCCTCTTTCTGGTGGCCGCTCCTGCAT

L2: GTGTCCTGTCC

VH: CAGGTGCAACTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCT
GTCCCTCACCTGCCCTGTCTCTAGATTCCCTTTAACCAACCATCATGTACACTGGAC
CCACCAGGCTCCAGGAAAAGGGCTGGAGTGGCTTGGTGATTCAAGGAGTGGTGAAA
GCACATACTACAACCTTAACCTCTGAAGTCCCAACTCAGCATCCCCAGTGATACTTCC
AAAAGCCAAATTTATTTAACGCTGAACAGGCTGAGAGGCGATGACATGGCCATGTA
CTACTGTGCCAGAGA

40

配列番号 3 : VH3 IGHV4-17*02

L1: ATGAGACTCTTGTGTCTTCTCCTTTGCCTGGTGATGGCTCCCCAAG

L2: GAGTCCTGTCC

VH: CAGGTGAAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTCACAGACCCT
CTCCCTCACCTGCTCTGTGTCTGGAGTCTCCATCACAAAGCAGTGGTGA
CTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATGGGGTACATAAGTTAT
AGTGGTAGCGCTTACTACACCACATCCCTCAAGAGCCGACTCTCCATCTCCAGAGA
CACGTCCAAGGACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAGCTCCGTGACCACAGAGGACACGG
CCGTTTATTACTGTGCAAGTGA

配列番号 4 : VH4 IGHV4S1

50

L1: ATGAATCACCTGTGGTTCTTCCTCTTTCTGGTGGCCGCTCCTACAT

L2: GTGTCCTGTCC

VH: CAGGTGCAACTGAAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGATTATCTTTGAGCAGTAATGCTGTAGGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGGCTGGAGTGGGTGGTGTATATATGGTAGTGAA
AGTACATACTACAACCCAGCCCTGAAGTCCCGAGCCAGCATCACCAAGGACACCTC
AAAGAGCCAAGTTTATCTGACGCTGAACAGCCTGACAGGCGAAGACACGGCCGTCT
ATTACTGTGCAGGATG

配列番号 5 : VH5 IGHV4-29*02

L1: ATGAGTCACCTGTGGTTCTTCCTCTTTCTGGTGGCCGCTCCTACAT

L2: GTGTCCTGTCC

VH: CAGGTGCAACTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGATTATCTTTGAGCAGTTATGCTGTAGGCTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGAAAAGGGCTGGAATATGTTGGTGTATATATGGTAGTGCAA
GTGCAAACTACAACCCAGCCCTGAAGTCCCGAGCCAGCATCACCAAGGACACCTCA
AAGAGCCAAGTTTATCTGACGCTGAACAGCCTGACAGGCGAGGACACGGCCGTCTA
TTACTGTGCGAGA

配列番号 6 : VH6 IGHV1-41*01

L1: ATGGACTGGAGCTGGAGCATCCTCTTCTTGGTGGCAGTGGCTGCAG

L2: GTGTCTCCTCC

VH: GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCAGGGGCATCCGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACAGCTTCACTTATTACTCTATGAGCTGGG
TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGACTGGATGGGAGGGATCTTGCTTATAGTT
GATGATACAAGCTACACGCAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACTGCAGACAA
GTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGTCTGACATCCGAGGACACGGCCG
TGTATTACTGTGCAAAAGA

配列番号 7 : VH7 IGHV1-70*01

L1: ATGGGCTGGAGCTGGAGAATCCTCTTCTTGGTGGCAGTAGCTTCAG

L2: GTGTCTCCTCC

VH: GAGGGTCAGCTGGAACAGTCGGGGCCGGAGTTGAAGAAGCCTGGGTTCATCAGT
GAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCAGTAGCTATGCTGTGCACTGGG
TGCGACAGGCCAATGGAAAAGGGATTGAGTGGATGGGATCTATCTATGCTGAATAT
GATGATACAAGCTACGCACCGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACTGCGGACAA
GTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGTCTGACATCTGAGGACATGGCCG
TGTATTACTGTGCAACAGA

配列番号 8 : VH8 IGHV9-66*01

L1: ATGGCCCCTCTCCTGGTCATCTTCTGCCTGCTGGCTGCTCTCCACG

L2: GTGTCGAGGCT

VH: GAGGACCCTCTCGTGCAATGGGGAGGTGGAGTGGTGGTCTCCTCACAGACACT
CAGCCTCACCTGTGCCGCCTACAAACGCAAAGTTTCAGAATATTCCTGTGGTGGA
TTCGCCTTCTCCCAGGGAAGGGGTGGAGTGCCTAGGTGTGATCTGGGCTAAGGGG
GACACTCAGTGACAGCCCCACCTGCAGTCTCGAGTCAGCATCTCCAGGGACGCCAC
CAAGAACCAAGTGTTCTTACAGCTGAGCAGTGTGATGCCTGAGGATTCAGGCGTGT
ATTACTGTGCTCAAGA

配列番号 9 : VH9 IGHV4-65*02

L1: ATGAGACTCTTGTGTCTTCTCCTTTCTGGTGGCAGGCTCCCCAAG

L2: GAGTCCTGTCC

VH: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGCAGCCCTCACAGACCCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGAGGCTCCATCACAAGCAGCTATTCTAGCTGGA
GCTGGTTACGCCAGCCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTACATGGGGTACATATATTAT

10

20

30

40

50

GATGGTAGAACTTACTACAATCCTTCCTTCAAGAGCCGCACCTCCATCTCCAGAGA
CACCTCCAGGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAGCTCCGTGACCACCGAGGACGCGG
CCGTGTATTACTGTGCAAGAGA

配列番号 10 : VH10 IGHV2-63*01

L1: ATGGACACACTGTATCCCACCTCCTGCTGCTGACCATCCCTTCCT

L2: GGGCTCTGTCC

VH: CAGATCAGCCTGCAGGAGTCTGGTCCTGGGCTGCTGAAGCCCACCCAGACCCT
TACGCTGACCTGCTCCTTCTCTGGGTTCTCACTGACTACTTCTGATATTGGTGTGG
TTGGATGCGTCAACCCCTGGGAAGGCACTGGAGTGGCTCACCTATGTTTGGTGGA
CTGATGAAAAGCATTACAACCCATCTCTGAAGAGCCGGCTCACAAATCTCCAAGGAC
ACCTCCAAAAACCAGGTGATGCTGACAATGACCAGTTTGGACCCTCCAGACACAGC
CACATATTACTGTGTAAAGAGGG

10

配列番号 11 : VH11 IGHV4-59

L1: ATGAGGAGGCTGGGTCTTCTCCTTTTCCTGGTGACGGCTCCCCAAG

L2: GTGTCCTCTCC

VH: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCAGGCCAGACGAATCCCTCACAGACCCT
GTCCCTCACATGCACTGTCACTGGTTACTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGAAC
GGATCCGCCAGCCACCAAACAAAGGGCTGGAGTGGATGGGGAGCATAAGCTATAGT
GGTAGAACTAACTACAGCCCATCCCTCAGGAGCCGCATCACCATCTCCAGAGACAC
TTCCAAGAACCAGTTCTTGCTGCAGCTGAGCTCAGTAACCACTGAGGACACGGCCG
TGTATTACTGTGCGACAGA

20

配列番号 12 : VH12 IGHV4-55

L1: ATGAGGCTGTTGGGTCTTCTCCTTTGTCTTGTGACGGCTTACCAGG

L2: GTGTCCTGTCC

VH: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTCACAGACCCT
CTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGTTACTCCATCACCAGTGGTTACTACTGGAGCTG
GATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGAGGCTGGAGTGGATGGGCTCCATATATTATAGTG
GTAGCACTTACTACAGCCCATCCCTCAAGAGCCGCATCACCATCTCCACAGACACG
TCCCAGAACCAGTCCTCCCTGCAGCTGAGCTCCGTGACCACCAAGGACACAGCTGT
GTATTACTGTGCCAGAGA

30

I G H D

配列番号 13 : DH1 IGHD3-1

GTATTATTCTCCTGGATAGAGTAATTACAAC

配列番号 14 : DH2 IGHD4-2

T TACTATGGCTGGGGTAAC

配列番号 15 : DH3 IGHD2-3

ATGATGACTATGGTGATACTTTCTACTATACA

配列番号 16 : DH4 IGHD3-4

GTATTACTCTTCTGCATATGATTGTATCAAC

配列番号 17 : DH5 IGHD4-5

T TACTACAAC TATAACTAC

配列番号 18 : DH6 IGHD2-6

ATGGTTACTATAGTAGGAGTTGCTATACC

配列番号 19 : DH7 IGHD3-7

GGATTTACTGTTCTGGGTGCAGATGCTCGTTACAACCACAGCAA

配列番号 20 : DH8 IGHD4-8

TAACTACAGATATAGCTCC

配列番号 21 : DH9 IGHD2-9

ATGGTTACTATGCTAGTGGTTATGACTACA

配列番号 22 : DH10 IGHD3-10

40

50

GTATTACTCTTCTGCATATGCTTGTATCAAC

配列番号 2 3 : DH11 IGHD4-11

TAACTACGGTTATGGTTATGCTAC

配列番号 2 4 : DH12 IGHD2-12

ACTATAGTTATGGTAGTTACTATGCC

配列番号 2 5 : DH13 IGHD3-13

GTATGACTGTACTGGTCATGGATGTGTCTACATC

配列番号 2 6 : DH14 IGHD4-14

TAACTACTATGGTAGCAAC

配列番号 2 7 : DH15 IGHD2-15

ATGGTTACTATGGTAGTTACTACAGTAGTTACTATGCC

配列番号 2 8 : DH16 IGHD3-16

GTATTACTATTCTGGATATAATTATTACAAC

配列番号 2 9 : DH17 IGHD4-17

GCCACTGATATAGCTCC

配列番号 3 0 : DH18 IGHD2-18

ATGGTTACTATGCTGGTAGTTACTATGCC

配列番号 3 1 : DH19 IGHD3-19

GTGTGAATGTCCTGGGCATGGATGTTATTACGAC

配列番号 3 2 : DH20 IGHD4-20

TTCCTACCGATATAGCTCC

配列番号 3 3 : DH21 IGHD2-21

ACGGTTCCTATGCTGGTAGTTACTTATACTACA

配列番号 3 4 : DH22 IGHD3-22

GTATTACTATTCTGCATATGATTATTACAAC

配列番号 3 5 : DH23 IGHD2-23

ATGATTACTATGGTATTAGTGACTCCTACA

配列番号 3 6 : DH24 IGHD2-24

GTATTACTCTTTTGAATATGGTTATAACAAC

配列番号 3 7 : DH25 IGHD4-25

CTGCTATAGCAGCTATGCTTACTAC

配列番号 3 8 : DH26 IGHD2-26

ACTATGGTTATGGTGGTGCTTACTACTACA

配列番号 3 9 : DH27 IGHD3-27

GTATTACTATTCTGCATTTTCGTTATTACAAC

配列番号 4 0 : DH28 IGHD4-28

CTGCTATAGCAGCTATGCTTACTAC

配列番号 4 1 : DH29 IGHD2-29

ACAGTTACTATGGTGGTAGTTCCTGGTACTCC

配列番号 4 2 : DH30 IGHD3-30

GTATTACTATTCTGGACATGATTATTACAACCTCAGCGT

配列番号 4 3 : DH31 IGHD4-31

TTACGATGACGGATACTACAAC

配列番号 4 4 : DH32 IGHD1-32

GGTCCTGGGTACAGCTCC

配列番号 4 5 : DH33 IGHD7-33

AGATACTCCAGTGCTGGTTAC

配列番号 4 6 : DH34 IGHD6-34

CTACGGTAGCGGTTGGCC

配列番号 4 7 : DH35 IGHD4-35

10

20

30

40

50

TAACTATGGCTCCTATAATTACTAC

配列番号 48 : DH36 IGHD2-36

ATGATTATTATGGTGCTATTGACTACATAAC

配列番号 49 : DH37 IGHD3-37

TATGACAATTCTGTATATAGCTCTGACTACAGCAT

配列番号 50 : DH38 IGHD4-38

GGAGAAGAGTTGGAGTAAC

配列番号 51 : DH39 IGHD2-39

ACAGTTACTGGAGTAGTAGTTACTATGCC

配列番号 52 : DH40 IGHD3-40

GAATAACTATGCTACATATGATTATATCAAC

配列番号 53 : DH41 IGHD4-41

AACTGCTATGGTAACAAC

配列番号 54 : DH42 IGHD1-42

GGTACTTGGGTACAGCTCC

配列番号 55 : DH41 IGHD7-43

AGATACTCCAGTGTTGGTTAC

配列番号 56 : DH41 IGHD6-44

ATACGGTAGTGGTTGGCC

IGHJ

配列番号 57 : JH1 IGHJ1

CTTATGCTTACTTGCAGCACTGGGGCCACGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 58 : JH2 IGHJ2

GTCCTGGCACCTCGAGCACTGGGACCACGGCATCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 59 : JH3 IGHJ3

GTTATGGCTACGTGGATCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 60 : JH4 IGHJ4

ACTATTTTGGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 61 : JH5 IGHJ5

ACAACGAGTTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 62 : JH6 IGHJ6

ATTATTATGGTATAAACTACTGGGGCCAGGGCATCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 63 : JH7 IGHJ6-2

ATTATTATAATGCTATGGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 64 : JH8 IGHJ6-3*

ATTATTATGATATAGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

配列番号 65 : JH9 IGHJ6-4*

ATTATTATGATATAGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

* JH8 および JH9 は別の遺伝子セグメントであるが、同一配列を有する。

IGKV

配列番号 66 : IGKV2-48*01

L1: ATGAGGTTCTCTGCTCAGCTCCTGGGGTTGCTAATACTCTGGGTCCCAG

L2: GATCCACTGGG

VK: gacacagttttgacccagaccccaactctctctgtctgtcatccctggagagtcggcctcc
atctcttgcaagtctagtcagagcctcctacatggtaatggaaacacctatttgattgg
tacctgcagaagccaggccagtcctcttcagcgcctgatctctatggtttccaatcgggca
tctgggggtcccagacaggttcagtggcagcgggtctgggacagatttcaccccttataatc
agcaagttggaagctgaggatgttgagtttattactgcatgcaagctacacaaagtccc
cc

配列番号 67 : IGKV2-46*01

10

20

30

40

50

L1: ATGAAATTCGCTAGTCAGCTCCTGGGGCTACTGATGCTCTGGATCCCAG

L2: GATCCAGTGCG

VK: gatgttggttgaccagactccactctccctgtctgtcgtccctggagagccggcctcc
atctcctgcaagtctagtcagagcctcaaataatagtgatgggaaaacctatttgattgg
ttcctacagaagccaggccagctctcaaagctcctgatctatttggtttccacccggtag
tctgggggtctcagacaggttcagtggcagcgatcagaagcagatttcacctgaaaatc
agcagagtggagcctgaggatgttggagctctattactgctttcaagctctatatgcttct
cc

配列番号 68 : IGKV2-45*01

L1: ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTGATGCTCTGGATCACAG

L2: GATCCAGTGGG

VK: GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGTCTGTCGTCCCTGGAGAGCC
GGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCAAACATAGTGATGGAAAAACCT
ATTTGTATTGGTTCCTACAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGTGCTTGATCTATTTG
GTTTCCACCCGGGTCTCTGGAGTCTCAGACAGGTTTCACTGGGAGCGGGTCAGAAAC
AGATTTTCAACCTGAAAATCAGCAGAGGGGAGCCTGAGGACGTTGGAGTCTATTACT
GTGTGCAAGCTCTATATGCTTCTCC

配列番号 69 : IGKV5-43*01

L1: ATGGGCTCCCAGGCTCAGCTCCTCAGCTTCCTGCTCCTCTGGATTTTTG

L2: ATACCAGGGCA

VK: GAAATAACAGTCACACAGTCTCCGGAATCCATGTTAGTGATTCCAGGAGACAA
AGTCATCATCACCTGCAAAGCCAGCCAAGACATTGGTGATGATGTGAACCTGGTATC
AATGGAAACCAGGAGAAGCTCCTAAGCTCATTATTAAAGAAGCTACTACTCTCTGG
TCTGGGGTTCCCTCTCGGTTTCACTGGCACTGTGCATGGAGTAGATTTTACCCTGAC
AATTGAGGACGTAAAATCTGAGGATGCTGCATATTATTTCTGTCTACAACATGATC
GTATACCTCT

配列番号 70 : IGKV2-39*01

L1: ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTGATGCTCTGGATCCCAG

L2: GATCCAGTGGG

VK: GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCGTCCCTGGAGAGCC
GGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTGCTGGATAGTGATGGAAAAACCT
ATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCGGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTATTCA
GTTTCCAACCGGGAAGTCTGGGATCTCAGACAGGTTTCACTGGCAGCGGGTCAGGAAC
AGATTTTCAACCTGAAAATCAGCAGAGTGAGGAGCCTGAGGATGTTGAAGTCTATTACT
GTGTGCAAGCTACACATGCTCCTCC

配列番号 71 : IGKV1-36*01

L1: ATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTCAGCCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAG

L2: GTGCCAGGTGT

VK: GAGATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCTCCCTGTCTGCATCTCTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCCAGGCCACTCAGGGCATTAACTTGGTTAGCCTGGTATC
AGCAGAAACCAGGGAAAGCTCTTAAGTTTCTGATCAGTAAGGCAACCATTTTGCAC
ACTGGCGTCTCTTCGAGGTTTCACTGGCAGTGGAACCTGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATGCTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATAAGA
GCAGCCCTCC

配列番号 72 : IGKV2-33*01

L1: ATGAAATTCCTTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGATCCCAG

L2: GATCCAGTGGG

VK: GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTCGTCCCTGGAGAGCT
GGCCTCCAACCTCATGCAGGTTTGTAGTCAGAGCCTCCTACATAGTAATGGAAACACCT
ATTTGCACTGGTTCCTGCAGAAGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGTCTGACCTATAGG

10

20

30

40

50

GTGTCCAACCGGAACTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCATTGGCAGCGGGTCAGGGAC
AGATTTTACACTTAAATCAGCAAGGTGGAGGCTGAAGATGGTGGAGTTTATTATT
GCTCCCAAGGTACACAAAGTCCCCC

配列番号 7 3 : IGKV2-28*01

L1: ATGAGGTTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTACTAATGCTCTGGATCCCAG

L2: GATCCAGTGGA

VK: GATATTGTGATGACCCAGACTCCCCTCTGCTTGGCCGTCACCTTGGGAGAGCC
AGTTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTCCGTAGTGATGACTACACCT
ATTTGGATTGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACGGCTGCTGATCTATGAG
GTTTCCAAGCTGGTCTCTGGAGTCTCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTTCAGGGAC
AGATTTACCCCTTCAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACT
GCATGCAAGGTTACAAAGACCTCC

10

配列番号 7 4 : IGKV4-18*01 (RC)

L1: ATGATGTCACTGACAAAGGTGTTTATGTCTTTGTTGCTCTGGGTCTCAA

L2: CTGCCTGTGGG

VK: GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGGCTCCTTGGCAGTGTCTCCAGGACAGAG
GGTCACCATTAGCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACTTAGACTGGTACC
AGCAAAAACCAGGAGAGGCTCCTATGCTGCTTATCTATGCGGCATCCAGCAGAGCA
TCTGGGGTCCCCGACAGATTCAGTGGCGGTGGATCTGGGACAGATTTTCGCTCTCAC
CATCAGCAGCCTCCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTTCACTGTCAGCAGCATTATAC
TAATCCTCCC

20

配列番号 7 5 : IGKV4-12*01 (RC)

L1: ATGATGTGGGAGACACAGGTCCTTATGTCCTTATTGCTCGGGGTCTCAG

L2: GTACCTTGGGG

VK: GACATCATGATGACCCAGTCTCCAGACTCCTTGGCAGTGTCTCTAGGAGAGAG
GGTCGACATGAAGTGACGGCCAGTCAGAGTGTTTACCACTACTTAGCCTGGTACC
AGCAAAAACCAGGACAGGCTCCTAAGCCCCCTCATCTACTCAGCATCTACCAGACCA
TCTGGGATCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAACTTCCAAGCTGAAGATGCGGCAGTTTTATTGCTGTGAGCAGTATTATG
GTAATCCTCC

30

配列番号 7 6 : IGKV4-9-1*01 (RC)

L1: ATGATGTCACAGACACAGGTCCTCTTGTGCGGTGTTTCTCTGGGTCTCAG

L2: GTGCCTGTGGG

VK: GACCTCGTGATGACGCAGTCTCCAGGCTCCTTGGCAGCGTCTCTAGGACAGAG
AGTCGAGATGAAGTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGACTGGTACC
AGCAGAAACCAGGACAGGCTCCTAAGCAGCTCATCTATGCTGCATCCAGCAGAGCG
TCTGGGGTCCCCGACCGATTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTATCAC
CATCAGCAGCCTCCAGGCTGAAGATCTGGCCATTTATTACTGTCAGCAGTATAATA
GTGCTCCTCC

配列番号 7 7 : IGKV4-9*01 (RC)

L1: ATGATGTCACAGACACAGGTCCTCTTGTGCGGTGTTTCTCTGGGTCTCAG

L2: GTGCCTGTGGG

VK: GACCTCGTGATGACGCAGTCTCCAGGCTCCTTGGCAGCGTCTCTAGGACAGAG
AGTCGAGATGAAGTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGACTGGTACC
AGCAGAAACCAGGACAGGCTCCTAAGCAGCTCATCTATGCTGCATCCAGCAGAGCG
TCTGGGGTCCCCGACCGATTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTATCAC
CATCAGCAGCCTCCAGGCTGAAGATCTGGCCATTTATTACTGTCAGCAGTATAATA
GTGCTCCTCC

40

配列番号 7 8 : IGKV4-8*01 (RC)

L1: ATGATGTTGCAGACACAGGTCCTTATAACCTTGTTGCTCTGGGTCTCAG

50

L2: GTGCCTGTGGG

VK: GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCTTGTCTGTGTCTGCAGGACAAAG
GGTCGACATGAAGTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAATGAGTTATCCTGGTACC
AGCAAAAACCAGGACAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTATGCAGCATCCAACAGAGCA
TCTGTGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCGGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGTAGCCTCCAGGCTGAAGATGTGGCCGTTTATTACTGTCTGCAGCATTATA
ATAATCCTCC

配列番号 79 : IGKV4-5-1*01 (RC)

L1: ATGATGTCGCTGACAAAGGTCCTTATATCTGTGTTGCTCTGGGTCTCAG

L2: GTGCCTGTGGG

VK: GACATCGTGTTGACCCAGTCTCCAGAGTCCTTGGCAGTGTCTCTAGGACAGAG
GGTCGAGATGAAGTGAAGGCCAGTCAGAGTGCTAGCAGCAACTTGGACTGGCACC
AGCACAAACCAGGACAGGCTCCTAAGCAGCTCATCTACAGAGCATCCAGCAGAGCG
TCTGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTCCAGGCTGAAGATGTGGCCGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATA
GTGCTCCTCC

10

配列番号 80 : IGKV5-5*01 (RC)

L1: ATGATGTCATGGACTCAGATCCTTATGTCCTTGTGCTCTGGGTCTCAG

L2: GTGCCTGTGGG

VK: GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCTTGGCAGTGTCTCTAGGACAGAG
AGTCGAGATGAAGTGAAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACTTAGACTGGTACC
AGCAAAAACCAGTAAAGGCTCCTAAGCTGCTCATCTATGCAGCATCCAGCAGAGCA
TCTGGGGTCCCCGACCGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTCCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTACTCCTGTCAGCAGCGTTATA
GTTCTCCTCC

20

配列番号 81 : IGKV4-2*01 (RC)

L1: ATGATGTCGCTGACACAGTTCCTTATATCTGTGTTGCTCTGGGTCTCAG

L2: GTGCCTGTGGG

VK: GACATCGTGATGACGCAGTCTCCAGACTCCTTGGCAGTGTCTCTAGGACAGAG
AGTCGAGATGAAGTGAAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTGGACTGGCACC
AGCACAAACCAGGACAGGCTCCTAAGCTGCTCATCTACAGAGCATCCAGCAGAGCG
TCTGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTCCAGGTTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTATGCAGTCTAATA
CTGCTCCTCC

30

配列番号 82 : IGKV4-1*01 (RC)

L1: ATGCTGACGCAGACGCAGGTCCTTATATCTGTGTTGCTCTGGGTCTCAG

L2: GAGCCTGTGGG

VK: GACGTCATGATGACCCAGTCTCCAGACTCCTTGGCAGCGTCTCTAGGACAGAG
AGTCGAGATGAAGTGAAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCTTGGTACC
AGCACAAACCAGGACAGGCTCCTAAGCGGCTCATCTATGCTGCATCCAGCAGAGCA
TCTGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGATGGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTCCAGGCTGAAGATGTGGCCATTTATTACTGTATGCAGCATTATA
ATAATCCTCC

40

IGKJ

配列番号 83 : IGKJ1*01

GTGGACGTTTCGGTGCCGGGACCAAGCTGGAAATCAAAC

配列番号 84 : IGKJ2*01

TATACACGTTTGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAA

配列番号 85 : IGKJ3*01

GTTCACTTTCGGCCAAGGGACCAAACTGGAGATCAAAC

50

配列番号 86 : IGKJ4*01

GCTTACGTTCTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC

注：ウマラムダ遺伝子座の配列はなお不完全である。下記配列は、完全ウマ I G L V および I G L J レパートリーを必ずしも記載していない。

IGLV

配列番号 87 : IGLV28 (RC)

L1: ATGGCCTGGTCCCCGCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG

VL:

TATCCTGGGCCCAGTCTGTGCTGACTCAGCCGGCCTCAGTGTCTGGGAACCTGGGC
CAGAGGGTCAACATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACACCAGGGATAATTATGT
GAACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACCGCCCCCAAACATCATCTATGAAAATA
GCAAAAGACCCTCCGGGACCCAGATCGAATCTCTGGCTCCAAGTCTGGAAACCCG
GCCTCCCTGACCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCA
GTCCTATGATGACAACCTGAATGCTCG

10

配列番号 88 : IGLV27

L1: ATGGCCTGGTCCCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG

VL: TCACTACTATCACTGCTGTAATAGGAACACAGTAATAATCGGCCTCGTCCTC
AGCCTGAAGCCCAGAGATGGTCAGGGTGGCTGTGTTGCCAGACTTGGAGCCAGAGA
ATCGATCTGGGACCCCTGAGGCTCGTTTGTATTACCATAGATGAGGGTTTTGGGG
GCTGTTCTCTGGGATCTGTTGGTACCAGCCACAGCACTATAACTATACCCGATGTT
GGAGCTGCTTCCAGAGCAGGAGATGGTGACTGTCTGGCCCAGGGTCCCAGACACTG
AGGCGGGCTGGGTCAGAGACTGGGCCCAGGATC

20

配列番号 89 : IGLV26

L1: ATGGCCTGGTCCCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG

VL: GATCCTGGGCCCAGTCTCTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGC
CAGACAGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGGTATAGTTATAG
TGCTGTGGGCTGGTACCAACAGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCATCTATG
GTAATAACAAACGAGCCTCAGGGGTCCCAGATCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACAGCCACCCTGACCATCTCTGGGCTTCAGGCTGAGGACGAGGCCGATTATTA
CTGTGGTTCTATTACAGCAGTGATAGTAGTGA

30

配列番号 90 : IGLV25

L1: ATGGCCTGGTGCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG

VL: GATCCTGGGCCCAGTCTGTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGC
CAGACAGTCACCATCACCTGCACTGGAAGCAGCTCCAACATAGTTGCTTATGTGGG
CTGGTACCAACAGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCATCTACGCTAATAACA
AACGAGCCTCAGGGGTCCCAGATCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCACAGCC
ACCCTGACCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCCGATTATTACTGTGGTAC
CTCTAGCAGCAGTGGTAGTAGTGA

配列番号 91 : IGLV24

L1: ATGTCCTGTACTCCTCTCCTCCTCGTGCTCCTCTCTCACTGCACAG

VL: GTTCCCTCTCCCAGCCTGTGCTGACCCAGCCTCCCTTCTTCTCTGCATCTCCTG
GAGCATCAGCCAGACTCACCTGCACCCTGAGCAGTGACATCAGTGTGACAGCTCT
CTCATATTCTGGTGCCAGCAGAAGCCAGGGAGCCCTCCCCGGTATCTCCTGAGTTT
CTACTCAGACTCAGTTAAGCACCAGGGCTCCGGGGTCCCCAGCCGCTTCTCTGGAT
CCAGAGACACCTCGGCCAATGCAGGGCTTCTGCTCATCTCTGGGCTCAAGGCTGAG
GACGAGGCTGACTATTACTGTGCTACAGCTGATAGCAGTGGGAGCAGCTCTGGTTA
CT

40

配列番号 92 : IGLV23

L1: ATGGCCTGGTCCCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG

VL: GATCCCGGGCCCAGTCTGTGACGCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGC

50

CAGACAGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGGAGTGGTCATGT
GTCCTGGTACCAACAGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACGCCTCATCTATTCTTCCG
CTAGCAGGGGCTTCCAGGGTCCCCGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCTGGCAACACA
GCCACCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGGTGAGGACGAGGCCGATTATTACTGTGG
TACATTGTACAGCAGTTGGAGTAGTGA

配列番号 9 3 : IGLV22

L1: ATGGCCTGGTCCCCTCTCCTCCTCACCCCTCATCGCTCTCTGCACAG
VL: GATCCTGGGCCCAGTCTCTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGC
CAGACAGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAGCATAGGTTCTTATATGGG
CTGGTACCAACAGATCCCAGGGACAGCCCCCAAACCCCTCATCTATGCTACTAACA
AACGAGCCTCAGGGGTCCCAGATCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACAGCC
ACCCTGACCATCTCTGGGCTTCAGGCTGAGGACGAGGCCGATTATTACTGTGGTTC
CTATTACAGCAGTGATAGTAGTGA

10

配列番号 9 4 : IGLV21

L1: ATGGCCTGGACAGTGCTTCTTCTCTGGCTCCTCACTTACAGCTCAG
VL: GGGCAGATTCTCAGGCTGTGGTGATCCAGGACCCATCATTCTCTGTGTCCCTA
GGGGGGACGGTCATACTGACCTGTGGCCTTAGAACTGGGTCAGTCTCTACCAGTAA
CTATCCTAGATGGTACCAGCAGACACCAGGCAAGGCTCCCCGTACACTCACCTACA
GCACAAACAACCGCCCCCTCTGGGATCCCTGAACGCTTCTCTGGATCCATCTCAGGA
AACAAAGCCGCCCTCACCATCACGGGGGGCCAGCCCGAGGACGAGGCCGACTATTA
CTGTGATCTGTATGTGGATCGTGGTGTTTC

20

配列番号 9 5 : IGLV20 (RC)

L1: ATGGCCTGGATGGTGCTTCTTCTCGGGCTCCTTTCTTACAGCTCAG
VL: GGGCGGATTCTCAGTCTGTGGTGACCCAGGAGCCATCACTCTCAGTGTCTTCA
GGAGGGACAGTCACACTCACCTGTGGCCTTAACCTCTGGGTCAGTCTCTTCCAGTAA
CCACCCAGCTGGCACCAAGCAAACCCAGGCCAGGCTCCCCGCACACTTATCTACT
ACACAAACACCCGTGCCTCTGGAGTCCCTAATCTCTTCTCTGGATCCATCTCCGGG
AACAGAGCCACCCTCACCATCACGGGGGGCCAGCGTGAGGACGAGGCCGACTATTA
CTGCGCTCTGTATACGGGTTAGTTACACTGA

配列番号 9 6 : IGLV19 (RC)

30

L1: ATGGCCTGGTCCCCTCTCCTCCTCACCCCTCATCGCTCTCTGCACAG
VL: GATCCTGGGCCCAGTCTGTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGC
CAGACAGTCACCATCTCCTGCACTGGAAGCATCTCCAACATAGGTGTTTATGTGGA
CTGGTACCAACAGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACCATCATCTATGCTACTAACA
AACAAACCCTCAGGGGTCCCAGATCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACAGCC
ACCCTGACCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTGGTAT
CTATGACAGCAGCCTGAGTAGTGA

IGLJ

注：IGVL 遺伝子セグメントはウマ IGLJ 遺伝子セグメントおよび IGLC 遺伝子の
上流および下流両方に存在する(示していない)。

40

配列番号 9 7 : IGLJ7

J7: TGCGATGGTCAGGTGGGTGCCTCCGCCGAATGCACCA

配列番号 9 8 : IGLJ6

J6: TGCGATGGTCAGGTGGGTGCCTCCGCCGAATGCACCA

配列番号 9 9 : IGLJ5

J5: TGCGATGGTCAGGTGGGTGCCTCCGCCGAATGCACCA

配列番号 1 0 0 : IGLJ4

J4: GCGATGGGTGAGGTGGGTGCCTCCGCCGAATACAGCACA

配列番号 1 0 1 : IGLJ3

J3: AGGACTATCAGCTGGGTCCCTCAGCTGAGCACAGGA

50

配列番号 1 0 2 : IGLJ2

J2: CTAGGACGGTCAGATGGGTACCTCCAGTGAACCTATGAA

配列番号 1 0 3 : IGLJ1

J1: CTAGGACGGTCAGATGGGTACCTCCAGTGAACCTATGAA

配列番号 1 0 4 : IGLV2 (RC)

L1: ATGGCCTGGACCCCTCTCCTGCTCCTCCTCACTCTCTGCACAG (RC)

VL: GCTCTGTGGCTTCTTCTATGCTGACTCAGCCACTTACCTTGTCCGTGGCCTTTG
GAAGCACAGTCACTATCACATGCCAGGGAGAGCTCCTAGACAGTTATTATGCTGAG
TGGTACCAGCAGAAGCCAGACCAGGCTCCCGTGCTGGTTCATATATTATGGAAGCAA
ACGTCCTTCGGGGATTTCTACCCGATTCTCTGGCTCCTACTCAAGCAAGATGGCCA
CCCTGACCCTCAGTGGGGCCTTGGCCGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGTG
TGGGACAGCAGTGGTAACCAGCC

10

配列番号 1 0 5 : IGLV3 (RC)

L1: ATGGCCTGGACCCCTTCTCCTGCTTCCCCTCCTCACTCTCTGCACAG

VL: GTTCTGTGACCACCTATGACTTGACGCAACCACACTCAACTTCGGTGGCCCTA
GGACAGACAGCGACAATCACCTGCTCTGGAGATAATCTCGAGGATGAATATGCTTA
CTGGTACCAGCAGAAGACAGGCCAGTCCCCTGCCCTGGTCATTTATAAGGATAGTG
AGCACCCCTCAGGGATCCCTGACCGGTTCTCTGGCTCAAACCTCAGGAAACACAGCC
ACGCTGACCATCAGAGGGGCCAAGACAGAGGACAAGGCTGACTATTACTGCCAATC
GTGGAGCAGTGCTAATGCT

20

配列番号 1 0 6 : IGLV4 (RC)

L1: ATGGCCTGGACCCCTCTCTTGTGTTGCCTTCCTCACTCTCTGCACAG

VL: GTCCTGTAGTCTCTTCTGAGGTGACTCAGCCAACTGCGGTGTCCGTGGCCTTG
GGACAGACAGCCTCCATCACCTGCCAGGGAAGCGACTTTGAAAATTATTATGCTAG
CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCAGTGCTGGTTCATCAATGCTAATAATG
AGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAACGATTCTCTGGGTCCAGTTCAGGAGAGACAGCT
ACGCTGACCATCAGTGGAGCCCACGCTGAGGACGAGGCCGACTATTACTGTCTGGC
AACAGATGCTTATGTTGCTGAAGCT

配列番号 1 0 7 : IGLV5 (RC)

L1: CTGTGCAGAGAGTGAGGAAGGCTAACAAGAGAGGGGTCCAGGCCAT

VL: AGCTTCATAATCAGAAGCATCTGCTGCCAGACAGTAATAGTCAGCCTCGTCCT
CAGCCTGGGCCCCGCTGATGGTCAGCGTGGCTGTGTCTCCTGAGCTGGAGCCAGAG
AATCGTTCAGGGATCCCTGAGGGCCGCTCATTACTAGCATCGATGACCAGCACAGG
GGCCTGGCCTGGCTTCTGCTGGTACCAGCTACCAACAAAACCTTTCAAAGTCGCCTC
CCTTGCAGGTGATGGTGGCCGTCTGTCCCAAGGCCACAGACACTGAAGATGGCTGA
GTCAGCTTAGAAGAGGCCACGGGAC

30

配列番号 1 0 8 : IGLV6 (RC)

L1: ATGGCCTGGACCCCTCTCTTGTAGCCTTCCTCACTCTCTGCACAG

VL: GTCCTATGGCCTCTTCGGAGGTGACTCAGCCATCTGCGGTGTCTGTGGCCTTG
GGACAGACAGCCACCCTCACCTGCCAGGGAGACTACTATGAAAGATATATTGTCAA
CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCACCTGTGCTGGTTCATCTATGCTAATAGTG
AGCGGCCCTCAGGAATCCCTGAACGATTCTCTGGCTCCAGCTCATTAGGCACATCC
ACGCTGACCATCAGCGGGGCCAGGCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGCC
AGCAGATGCTCATCGTTCTGAATCTGTCTCTATGGCCTCTTCGGAGGTGACTCAGCC
ATCTGCGGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGCCACCCTCACCTGCCAGGGAGACT
ACTATGAAAGATATATTGTCAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCACCTGTG
CTGGTCATCTATGCTAATAGTGAGCGGCCCTCAGGAATCCCTGAACGATTCTCTGG
CTCCAGCTCATTAGGCACATCCACGCTGACCATCAGCGGGGCCAGGCTGAGGATG
AGGCTGACTATTACTGTCAGCCAGCAGATGCTCATCGTTCTGAATCT

40

配列番号 1 0 9 : IGLV7 (RC)

50

L1: ATGGCCTGGACCCCTCTCTTGTAGCCTTCCTCTCTCTCTGCACAG
VL: GTCCTGTTGTCTCTTCTGCAGTGA CT CAGCCATCTGAGGTGTCCGTGGCCTTG
GGACAGAGAGCCACCCTCACCTGCCAGGGAAGCAACTTTGAATTTTTTCTCCTAG
CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTACTGCTCATCAATATTAATAATG
AGCGCCACTCAGGGATCCCTGAACGATTCTCCGGCTCCAGCTCAGGAGACACGTCC
ACACTGACCATCAGTGGGGCCCAGGCTGAGGACGAGGCTGACTATTACTGTCTGGC
AGTAGATGCTCTTAGTTCTGAAACT

配列番号 1 1 0 : IGLV8 (RC)

L1: ATGGCCTGGACACTTCTCCTTCTCCCTCTCCTCACTCTCTGCACAG
VL: GTTCTGTGGCCCCTTCTGAGCTGA CT CAGTTAACTGTGGTGTCTGTGGCCTTG
GCACAGACAGCCAGGGTCACCTGCCAGGGAGAGAGACCAAAAAGTGTCTATGCTGG
CTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTATGGGTCATCTATAGTAAAAACA
ATTGGACCACAGGCACACCTGAACAATTCTCTGCCTCTGACTCAGGGGACACAGCC
ACCCTGACCATCAGTGGGGTCCAGGTTGAGGGCGAGACTGACTATTACTGTGGGGT
AAGTGTTGGAAGTGGGAGCAGCTGGCAGTCACT

10

配列番号 1 1 1 : IGLV9 (RC)

L1: ATGGCCTGGACCCCTCTCCTGCTCCCTCTCCTCACTCTCTGCACAG
VL: GTTCTGTGTCCTCTTCTGAGCTTACTCAGTCTACTGCAGTGTCA TTTTCCTTGG
GACAGACAGCCACCATCACCTGCCAGGGAGAAACCTAAGAAGCCACTATGCTAGC
TGGTACCAGAAGAATCCAGGACAGGCCCTGTATTGGTAATATATGGTAATAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCTGCCCGATTTTCCAGCTCCTACTCAGAGGACACAGGCA
CCCTGACCATCAGTGGGGTCCAGATAGAGGATGAGGCTGACTATTACTGCCAATCA
TTGGGCAGTGATTATGCT

20

配列番号 1 1 2 : IGLV10 (RC)

L1: ATGGCCTGGGCTCTGTTCCCTCATCACCTCCTCACTCAGGGGCACAG
VL: GGTCCTGGGGCCAGTCTGCCCTGGTTCAGCCTTCTTCGGTGTCCGTGGCTCTA
GGACAGTCGGTCACCATCTCCTGTGCTGGAAGCAGCAGTGACATTGGGTATTATAA
CTCTATTTCTGTTACCAACAGCACCCAGGCACAACCCCAAAGCTGCTGATTTACT
ATACCAATAAGAAGCACTCAGGGATCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGG
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGAGTATTA
CTGTTGCTCATATGCAGGCAGTGGCAATTTA

30

配列番号 1 1 3 : IGLV11 (RC)

L1: ATGGCCTGGACTCTGCTCCTTCTCACCTCCTCACTCAGGGGTACAG
VL: GGTCCTGGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCGTCAGTGTCCGGGGCTCTA
GGACAGTCGGTCACCATCTCCTGTGCTGGAAGCAGCAGTGACATTGGGGGTTATAA
TGCTGTCAGCTGGTTACAACAGCACCCGGGCACAGCCCCCAAAGTTCTGATTTATA
GTGTGAATACTCGGGCCTCAGGGATCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGTTGAGGACGAGGCTGATTATTA
CTGTTACTCGCTTGTGAGTGTTACACTTTC

配列番号 1 1 4 : IGLV12 (RC)

L1: ATGGCCTGGGCTCTGCTCCTCATCAGCCTCTTCACTCAGGGGCACAG
VL: GGTCCTGGGGCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCGTCAGTGTCCGGGACTCTG
GGACAGTCGGTCACCATCTCCTGTGCTGGAAGCAGCAGCAACATTGGGAGTTATAA
CTATGTTTCTGTTACCAACAGCACCCGGGCACAGCCCCCAAACCTCATTATTA
GTGCCAGTTCTCGAGCCTCAGGGATCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGG
AACACGGCCTCTCTGACCATCTCGGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCCGATTATTA
CTGTAGCTCATATATCAATGCTGATCCTTATC

40

配列番号 1 1 5 : IGLV13 (RC)

L1: ATGGCCTGGGCTCTGCTCCTCATCACCTCCTCACTCAGGGGCACAG
VL: GTAATTGTAAGTGGCAACATACGCGTGACAGTAATAATCAGCCTCGTCCTCAG

50

CCTGGAGCCCAGAGATGGTCAGGGACATCGTGTTGCCAGACGTGGAGCCGGAGAAG
CGATCAGGGATCCCTGAGGCCCGATTATTCCCATTATAAATGAGGAGTTTGGGGGC
TGTGCCTGGGTGCTGTTGGTACCAGGAAATATATTTATAAGATCCCGTGCTTCCAG
CACAGGTGATGGTGACCGACTGTCCCAGAGTCCCGGAGACTGACGCAGGCTGAGTC
AGGGCAGACTGCGCCCAGGACC

配列番号 1 1 6 : IGLV14 (RC)

L1: ATGGCCTGGGTGCCACTCCTGCTCACACTTCTGGCTCACTGCACAG
VL: GGTCCACTTCACAGGATGTGGTGATTCAAGGAAATCTTCACTGATCACAACTCCT
GGGGGAACAGTCACACTCACCTGTGGCTCAAGTGCTGGGGCTGTACCTCCAATAA
TTATGCCAACTGGGTCCAAGAGAAGCCCTATCAGGGACGCCAGGGTCTAATAGGTG
GTACTAGCAACAGGGTCTCAGGGGGTCCCTGCCCGATTCTCTGGCTCCCTGCGCTT
GGGAACAAGGCCGCCCTCACTATCATGGGGGCCAGCCAGAGGACGAGGACGAGTG
TACTGTGCTCTGTGGTTTCAGCAACCATTTTC

10

配列番号 1 1 7 : IGLV15 (RC)

L1: ATGGCCTGGTCCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG
VL: GATCCTGGGCCCAGTCTCTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGC
CAGACAGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGGTATAGTTATAG
TGCTGTGGGCTGGTACCAACAGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACCCTCATCTATG
GTAATAACAAACGAGCCTCAGGGGTCCCAGATCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACAGCCACCCTGACCATCTCTGGGGTCCAGGCTGAGGACGAGGCCGATTATTA
CTGCTCAGCAGGAGACAGCAGTGGTAGTAGTGA

20

配列番号 1 1 8 : IGLV16 (RC)

L1: ATGGCCTGGACTCCTCTCATCCTCATGCTCCTGTCTCACTGCACAG
VL: GTTCCCTCTCCCAGCCTGTGCTGACCCAGCCACCCTCCCTCTCTGCATCTCCTG
GAACATCAGCCAGACTCACCTGCGCCCTGAGCAGTGATGTCAGTGTTAGCAGCTCT
CTCATATTCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGCCCTCCGGGGTATCTTCTGAGTTT
CTACTCAGACTCAGTTAAGCACCCAGGGCTCCGGGGTCCCCAGCCACTTCTCTGGAT
CCAAAGACACCTCGTCCAATGCAGGGCTTCTGCTCATCTCTGGGCTCGAGGCTGAG
GACGAGGCTGACTATTACTGTGCTACAGCTGATAGCAGTGGGATCAGCTCTGGTTA
CT

30

配列番号 1 1 9 : IGLV17 (RC)

L1: ATGGCCTGGTCCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG
VL: GATCCTGGGCCCAGTCTGTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGC
CAGACAGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGGTATAGTTATAG
TTATGTGGGCTGGTTCCAACAGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACCCTCATCTATG
GTAATAACAAACGAGCCTCAGGGGTCCCAGATCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACAGCCACCCTGACCATCTCTGGGGTCCAGGCTGAGGACGAGGCCGATTATTA
CTGTGGTTTCCTATGACAGCAGCAGTAGTAGTGA

配列番号 1 2 0 : IGLV18 (RC)

L1: ATGGCCTGGTCCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG
L2: TCCCGGGCCCAGTCTGTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGCCA
GACAGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGGAGTGGTCATGTGT
CCTGGTACCAACAGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACGCCTCATCTATTCTTCCACT
AATAGGGCTTCTGGGGTCCCCGACCGATTCTCTGGCTCCAGGTCTGGCAACACAGC
CACCTGACCATCTCTGGGGTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTGGTA
CATTGTACAGCAGTTGGAGTAATGA

40

配列番号 1 2 1 : IGLV19 (RC)

L1: ATGGCCTGGTCCCCTCTCCTCCTCACCTCATCGCTCTCTGCACAG
LV: CAGTCTGTGACTCAGCCCGCCTCAGTGTCTGGGACCCTGGGCCAGACAGTCAC
CATCTCCTGCACTGGAAGCATCTCCAACATAGGTGTTTATGTGGACTGGTACCAAC

50

AGATCCCAGGAACAGCCCCCAAACCATCATCTATGCTACTAACAACAACCCCTCA
GGGGTCCCAGATCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACAGCCACCCTGACCAT
CACTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTGGTATCTATGACAGCA
GCCTGAGTAGTGA

配列番号 1 2 2 : IGLV20 (RC)

L1: ATGGCCTGGATGGTGCTTCTTCTCGGGCTCCTTTCTTACAGCTCAG
VL: GGGCGGATTCTCAGTCTGTGGTGACCCAGGAGCCATCACTCTCAGTGTCTTCA
GGAGGGACAGTCACACTCACCTGTGGCCTTAACTCTGGGTCAGTCTCTTCCAGTAA
CCACCCCAGCTGGCACCAGCAAACCCCAGGCCAGGCTCCCCGCACACTTATCTACT
ACACAAACACCCGTGCCTCTGGAGTCCCTAATCTCTTCTCTGGATCCATCTCCGGG
AACAGAGCCACCCTCACCATCACGGGGGCCAGCGTGAGGACGAGGCCGACTATTA
CTGCGCTCTGTATACGGGTTAGTTACACTGA

10

【 0 1 7 6 】

プレDJ

これは、I g h d - 5 D h 遺伝子の 2 1 6 0 9 bp フラグメント上流である。プレ D J 配列は、Mus musculus 系統 C 5 7 B L / 6 J 染色体 1 2 で見られる、アセンブリ：G R C m 3 8 . p 4、アノテーション 1 0 6、配列 I D : N C _ 0 0 0 0 7 8 . 6

配列全体は、下記 2 個の 1 0 0 bp 配列の間にある：

N C _ 0 0 0 0 7 8 . 6 の 1 1 3 5 2 6 9 0 5 ~ 1 1 3 5 2 7 0 0 4 位に対応する I g h d - 5 D h 遺伝子セグメントの上流：

20

ATTTCTGTACCTGATCTATGTCAATATCTGTACCATGGCTCTAGCAGAGATGAAAT
ATGAGACAGTCTGATGTCATGTGGCCATGCCTGGTCCAGACTTG (配列番号 1 2 3)

N C _ 0 0 0 0 7 8 . 6 の 1 1 3 5 4 8 4 1 5 ~ 1 1 3 5 4 8 5 1 4 位に対応する A d a m 6 a 遺伝子の 2 kb 上流：

GTCAATCAGCAGAAATCCATCATACATGAGACAAAGTTATAATCAAGAAATGTTGC
CCATAGGAAACAGAGGATATCTCTAGCACTCAGAGACTGAGCAC (配列番号 1 2 4)

【 0 1 7 7 】

A d a m 6 a

A d a m 6 a (ディスインテグリンおよびメタロペプチダーゼドメイン 6 A) は、雄の妊性に関与する遺伝子である。A d a m 6 a 配列は、Mus musculus 系統 C 5 7 B L / 6 J 染色体 1 2 に見られる、アセンブリ：G R C m 3 8 . p 4、アノテーションリリース 1 0 6、配列 I D : 1 1 3 5 4 3 9 0 8 ~ 1 1 3 5 4 6 4 1 4 位は N C _ 0 0 0 0 7 8 . 6。A d a m 6 a 配列 I D : OTTMUSG00000051592 (VEGA)

30

40

50

【図面】
【図 1】

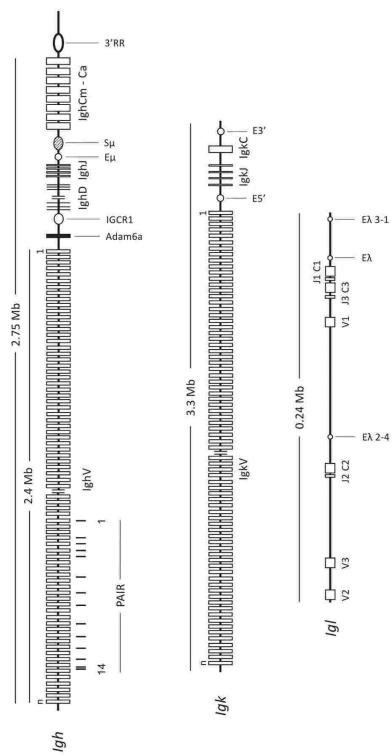


FIG. 1

【図 2】

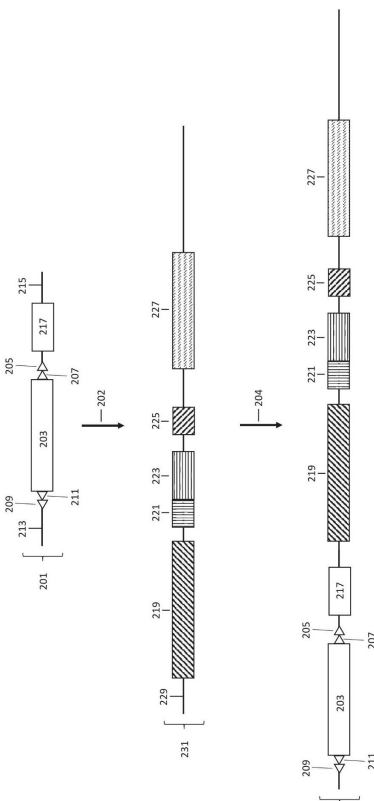


FIG. 2

【図 3】

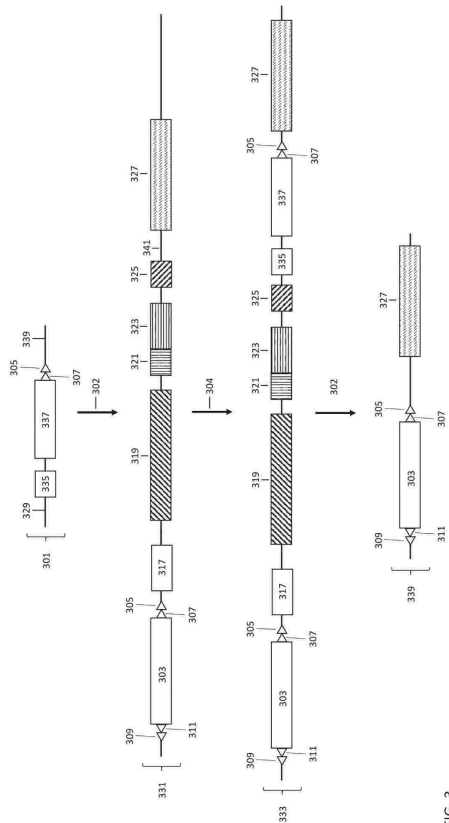


FIG. 3

【図 4】

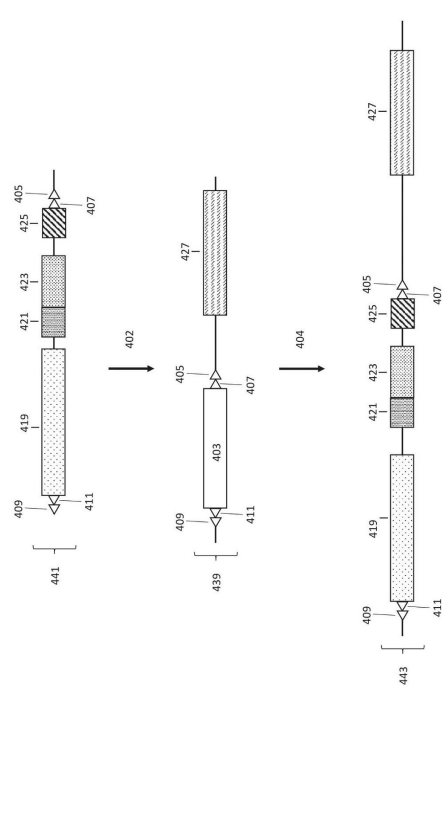


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図 5】

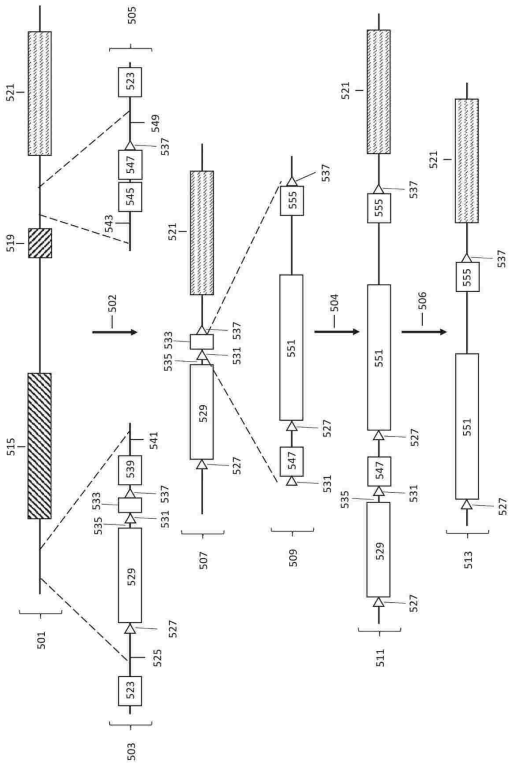


FIG. 5

【図 6 A】

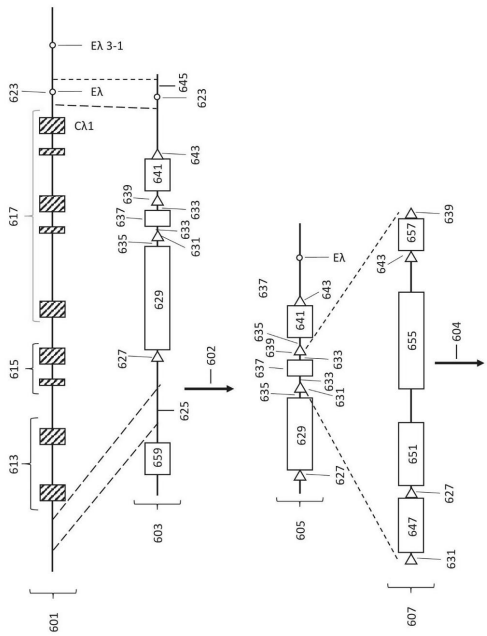


FIG. 6A

【図 6 B】

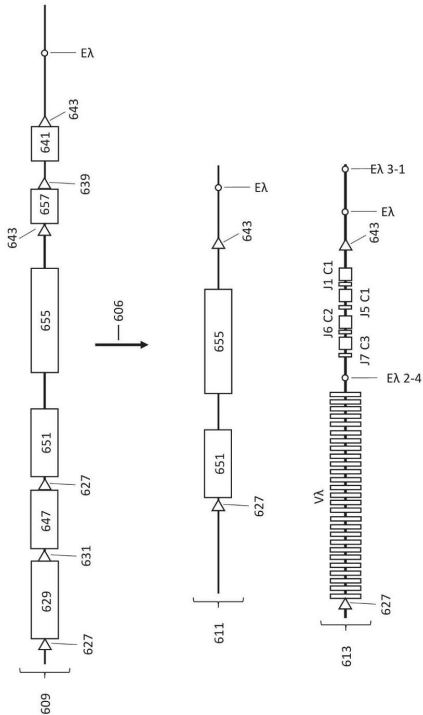


FIG. 6B

10

20

30

40

50

【配列表】

2024516996000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2022/027622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01K67/027 C07K16/46 A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 561 352 A (GENOME RES LTD [GB]) 17 October 2018 (2018-10-17) page 11; claims 1-11 -----	1-37
Y	GB 2 528 811 A (NVIP PTY LTD) 3 February 2016 (2016-02-03) claim all; example 2 -----	1-37
Y	CA 3 144 958 A1 (TRIANNI INC [US]) 7 January 2021 (2021-01-07) examples 1-8 -----	1-37
Y	US 2021/000087 A1 (DUONG BAO [US] ET AL) 7 January 2021 (2021-01-07) claim all; examples 1-10 -----	1-37
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 August 2022

Date of mailing of the international search report

25/08/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trommsdorff, Marion

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/027622
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/027622

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WAGNER BETTINA ET AL: "The Complete Map of the Ig Heavy Chain Constant Gene Region Reveals Evidence for Seven IgG Isotypes and for IgD in the Horse", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 173, no. 5, 20 August 2004 (2004-08-20), pages 3230-3242, XP055949856, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.173.5.3230 material and methods; figure 4 -----	1-37
Y	WALTHER STEFANIE ET AL: "Equine immunoglobulins and organization of immunoglobulin genes", DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY, vol. 53, no. 2, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 303-319, XP055949965, US ISSN: 0145-305X, DOI: 10.1016/j.dci.2015.07.017 figures 1-3 -----	1-37
A	JUAN C. ALMAGRO ET AL: "Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 8, 4 January 2018 (2018-01-04), XP055713257, DOI: 10.3389/fimmu.2017.01751 the whole document -----	1-37
A	WAGNER B. ET AL: "Monoclonal equine IgM and IgG immunoglobulins", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, vol. 47, no. 1-2, 1 July 1995 (1995-07-01), pages 1-12, XP055949722, AMSTERDAM, NL ISSN: 0165-2427, DOI: 10.1016/0165-2427(94)05381-2 the whole document -----	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/027622

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2561352	A	17-10-2018	BR 112019021252 A2 CA 3059513 A1 CN 111031789 A EP 3609319 A1 GB 2561352 A JP 2020512840 A US 2020056202 A1 WO 2018189520 A1	12-05-2020 18-10-2018 17-04-2020 19-02-2020 17-10-2018 30-04-2020 20-02-2020 18-10-2018
GB 2528811	A	03-02-2016	NONE	
CA 3144958	A1	07-01-2021	AU 2020298458 A1 CA 3144958 A1 CN 114554841 A EP 3993623 A1 IL 289469 A KR 20220025839 A WO 2021003152 A1	20-01-2022 07-01-2021 27-05-2022 11-05-2022 01-02-2022 03-03-2022 07-01-2021
US 2021000087	A1	07-01-2021	AU 2020299569 A1 CA 3144956 A1 CN 114502725 A EP 3993622 A1 IL 289473 A KR 20220025838 A US 2021000087 A1 WO 2021003149 A1	20-01-2022 07-01-2021 13-05-2022 11-05-2022 01-02-2022 03-03-2022 07-01-2021 07-01-2021

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 N 5/0735(2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 0 0

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 バロウズ, ピーター
アメリカ合衆国 3 5 2 2 2 アラバマ州バーミングラム、リンウッド・ドライブ 4 5 1 2
- (72)発明者 ドゥオン, バオ
アメリカ合衆国 9 4 0 4 4 カリフォルニア州パシフィカ、デスビオ・コート 2 8
- (72)発明者 ヴァプル, マティアス
アメリカ合衆国 9 4 1 2 2 カリフォルニア州サンフランシスコ、フィフス・アベニュー 1 5 1 5
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA91X AA92X AB01 AC14 BA02 BA03 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74