



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01K 2207/15 (2020.02); A01K 2217/05 (2020.02); A01K 67/027 (2020.02); C07K 16/46 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2016119423, 22.06.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.06.2011

Дата регистрации:
25.06.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

22.06.2010 US 61/357,317;

22.06.2010 US 61/357,314

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2013102596 22.06.2010

(43) Дата публикации заявки: 07.11.2018 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 25.06.2020 Бюл. № 18

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Карпенко
Оксана Юрьевна

(72) Автор(ы):

МАКДОНАЛЬД Линн (US),

СТИВЕНС Шон (US),

ГУРЕР Джаган (US),

МЕРФИ Эндрю Дж. (US),

ХОСИАВА Каролина А. (US)

(73) Патентообладатель(и):

РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,

ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO0026373 A1, 11.05.2000. POPOV
A.V. A human immunoglobulin lambda locus is
similarly well expressed in mice and humans.J
Exp Med. 1999 May 17, 189(10): 1611-1620.
WO2009143472 A2, 26.11.2009. WO2008054606
A2, 08.05.2008. Б.ГЛИК. Молекулярная
биотехнология. Москва. Мир. 2002 г. Стр. 211-
212,429-433.

(54) МЫШИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ЛЕГКУЮ ЦЕПЬ С ВАРИАБЕЛЬНОЙ ОБЛАСТЬЮ λ ЧЕЛОВЕКА И КОНСТАНТНОЙ ОБЛАСТЬЮ МЫШИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан способ получения варибельной области легкой цепи λ человека, при этом способ включает: (а) иммунизацию генетически модифицированной мыши антигеном, причем геном зародышевой линии генетически модифицированной мыши содержит: один или несколько генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека, причем один или несколько генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека заменяют эндогенные генные сегменты V κ мыши и эндогенные генные сегменты J κ ; и причем один или несколько генных сегментов V λ человека и один или несколько

генных сегментов J λ человека функционально связаны с эндогенным геном константной (C κ) области легкой цепи к мыши; и

(b) выявление варибельной области легкой цепи λ человека, которая кодирует варибельный домен легкой цепи λ человека в антители, которое специфически связывается с антигеном и было выработано генетически модифицированной мышью, причем варибельная область легкой цепи λ человека происходит из генного сегмента V λ человека, из одного или нескольких генных сегментов V λ человека и генного сегмента J λ человека, из одного или нескольких генных сегментов J λ человека. Также описан способ получения варибельного домена легкой цепи λ

человека, включающий: (а) иммунизацию генетически модифицированной мыши антигеном, причем геном зародышевой линии генетически модифицированной мыши содержит: один или несколько генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека, причем один или несколько генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека заменяют эндогенные генные сегменты V κ мыши и эндогенные генные

сегменты J κ ; и причем один или несколько генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека функционально связаны с эндогенным геном С κ мыши; и (б) выявление переменного домена легкой цепи λ человека в антителе, которое специфически связывается с антигеном и было выработано генетически модифицированной мышью. 2 н. и 22 з.п. ф-лы, 13 ил., 8 табл., 7 пр.

R U 2 7 2 4 7 3 6 C 2 9 6 7 4 2 7

R U 2 7 2 4 7 3 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 5/073 (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A01K 2207/15 (2020.02); *A01K 2217/05* (2020.02); *A01K 67/027* (2020.02); *C07K 16/46* (2020.02)

(21)(22) Application: **2016119423, 22.06.2011**

(24) Effective date for property rights:
22.06.2011

Registration date:
25.06.2020

Priority:

(30) Convention priority:
22.06.2010 US 61/357,317;
22.06.2010 US 61/357,314

Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2013102596 22.06.2010

(43) Application published: **07.11.2018 Bull. № 31**(45) Date of publication: **25.06.2020 Bull. № 18**

Mail address:

119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Karpenko
Oksana Yurevna

(72) Inventor(s):

MACDONALD Lynn (US),
STEVENS Sean (US),
GURER Cagan (US),
MURPHY Andrew J. (US),
HOSIAWA Karolina A. (US)

(73) Proprietor(s):

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(US)

(54) **MICE EXPRESSING A LIGHT CHAIN WITH A HUMAN VARIABLE REGION λ AND A CONSTANT MOUSE REGION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: described is a method of producing a variable region of a λ human light chain, the method comprising: (a) immunising a genetically modified mouse with an antigen, wherein the genome of a germline mouse gene germ line comprises: one or more V λ human gene segments and one or more J λ human gene segments, wherein one or more V λ human gene segments and one or more J λ human gene segments substitute endogenous V κ mouse gene segments and endogenous J κ gene segments; and wherein one or more V λ human gene segments and one or more J λ human gene segments are operably linked to endogenous constant (C κ) mouse κ light chain region; and (b) detecting a variable region of the λ human light chain

which codes the variable λ light chain domain of a human in the antibody which specifically binds to the antigen and is generated by a genetically modified mouse, wherein the λ human light chain variable region is derived from a V λ human gene segment, from one or more V λ human gene segments and a J λ human gene segment, from one or more J λ human gene segments. Also described is a method of producing a variable domain of an λ human light chain, involving: (a) immunising a genetically modified mouse with an antigen, wherein the genetically modified mouse germline genome comprises: one or more V λ human gene segments and one or more J λ human gene segments, wherein one or more V λ human gene segments and one or more J λ human gene segments

substitute endogenous Vκ mouse gene segments and endogenous Jκ gene segments; and wherein one or more Vλ human gene segments and one or more Jλ human gene segments are operably linked to endogenous mouse Cκ gene; and (b) detecting a variable λ light chain domain of a human in the antibody which specifically

binds to the antigen and has been generated by a genetically modified mouse.
EFFECT: there are presented mice expressing a light chain with a λ human variable region and a constant mouse region.
24 cl, 13 dwg, 8 tbl, 7 ex

R U 2 7 2 2 4 7 3 6 C 2

R U 2 7 2 2 4 7 3 6 C 2

Область применения изобретения

Генетически модифицированные мыши, которые содержат вариабельную последовательность лямбда ($V\lambda$) легкой цепи мыши или человека, функционально связанную с константной областью легкой цепи мыши или человека (λ или каппа (κ)).

5 Генетически модифицированные мыши, которые экспрессируют эпитоп-связывающие белки, которые содержат легкую цепь иммуноглобулина, содержащую вариабельный домен, полученный из вариабельного лямбда ($hV\lambda$) генного сегмента человека, соединительного лямбда ($hJ\lambda$) генного сегмента человека, и константный домен легкой цепи (C_L) мыши. Генетически модифицированные мыши, содержащие вариабельную
10 последовательность нуклеиновой кислоты неперегруппированной легкой цепи лямбда (λ) иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи мыши. Мыши, допускающие перегруппировку и экспрессию химерной легкой цепи λ человека/ C_L мыши из эндогенного локуса легкой цепи, которые содержат замену всех генных сегментов вариабельной области эндогенной легкой цепи мыши на один или несколько генных
15 сегментов $hV\lambda$ и один или несколько генных сегментов $hJ\lambda$. Соматически видоизмененные антитела, содержащие домены $hV\lambda$ и домены C_L мыши.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Мыши, которые экспрессируют антитела, являющиеся полностью человеческими,
20 или частично человеческими и частично мышинными, известны в данной области. Например, описаны трансгенные мыши, которые экспрессируют полностью человеческие антитела из трансгенов, содержащих гены вариабельной области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина человека. Также известны генетически модифицированные мыши, которые содержат замену эндогенных генных сегментов
25 вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и генных сегментов вариабельной области легкой цепи (LCVR) каппа (κ) мыши на генные сегменты HCVR и LCVR человека, и которые продуцируют химерные антитела с химерной каппа-цепью человек/мышь.

Легкие цепи антител кодируются одним из двух отдельных локусов: каппа (κ) и лямбда (λ). Легкие цепи антител мыши главным образом являются к-типа. Соотношение
30 использования к и λ легкой цепи у человека составляет приблизительно 60:40, в то время как у мышей это соотношение составляет приблизительно 95:5. Несимметричное использование легких цепей к у мыши, по имеющимся данным, поддерживается у генетически модифицированных мышей, способных экспрессировать полностью или частично человеческие антитела. Таким образом, мыши, которые продуцируют
35 полностью или частично человеческие антитела, по-видимому, ограничены в использовании вариабельных лямбда.

В данной области существует необходимость в получении лямбда вариабельных областей, либо мыши, либо человека, для использования при получении эпитоп-связывающих белков. В данной области существует необходимость в мышах, которые
40 продуцируют полностью или частично человеческие антитела, где мыши проявляют повышенное использование вариабельных областей лямбда ($V\lambda$).

В данной области существует необходимость в мышах, которые продуцируют полностью или частично человеческие антитела, где мыши проявляют повышенное использование вариабельных областей лямбда ($V\lambda$).

Краткое описание изобретения

45 Изобретение относится к генетически модифицированным мышам, эмбрионам, клеткам, тканям, а также конструкциям нуклеиновых кислот для видоизменения мышей, и к способам и композициям для получения и использования их. Изобретение относится

к мышам и клеткам, которые продуцируют переменные области лямбда (λ) (человека или не относящиеся к человеческому роду) в связи с легкой цепью каппа (κ). Также изобретение относится к мышам и клеткам, которые продуцируют переменные области λ человека в связи с легкой цепью κ или λ , например, из эндогенного локуса легкой цепи мыши. Также изобретение относится к способам получения антител, которые содержат переменные области лямбда. Также изобретение относится к способам отбора тяжелых цепей, которые экспрессируются с родственными переменными областями лямбда.

Химерные и человеческие антиген-связывающие белки (например, антитела), и нуклеиновые кислоты, кодирующие их, обеспечены при условии, если содержат соматически видоизмененные переменные области, в том числе антитела, которые имеют легкие цепи, содержащие переменные домены, полученные из генного сегмента $V\lambda$ и $J\lambda$ человека, слитого с константным доменом легкой цепи мыши.

В одном из аспектов, изобретение относится к мышам, которая экспрессирует последовательность переменной области λ человека на легкой цепи, которая включает константную область мыши. В одном из аспектов изобретение относится к мышам, которая экспрессирует последовательность переменной области λ человека на легкой цепи, которая содержит константную область κ . В одном из аспектов изобретение относится к мышам, которая экспрессирует из эндогенного локуса легкой цепи мыши легкую цепь, которая содержит последовательность переменной области λ человека. В одном из аспектов изобретение относится к мышам, которая содержит перегруппированный ген легкой цепи, который содержит последовательность переменной области λ человека, связанную с последовательностью константной области мыши; в одном из вариантов осуществления последовательность константной области мыши представляет собой константную последовательность λ ; в одном из вариантов осуществления последовательность константной области мыши представляет собой константную последовательность κ .

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мышам, где мышь содержит неперегруппированный генный сегмент легкой цепи λ человека ($hV\lambda$) и J-сегмент λ человека ($hJ\lambda$). В одном из вариантов осуществления неперегруппированный $hV\lambda$ и $hJ\lambda$ находятся в локусе легкой цепи мыши. В одном из вариантов осуществления неперегруппированный $hV\lambda$ и неперегруппированный $hJ\lambda$ находятся в трансгене и функционально связаны с последовательностью константной области человека или мыши. В одном из вариантов осуществления неперегруппированный $hV\lambda$ и неперегруппированный $hJ\lambda$ находятся на эписоме. В одном из вариантов осуществления мышь способна продуцировать иммуноглобулин, который содержит легкую цепь, полученную из последовательности неперегруппированного $hV\lambda$ и последовательности $hJ\lambda$, и последовательности нуклеиновой кислоты константной области (C_L) легкой цепи мыши. Таким образом изобретение относится к способам и композициям для получения и использования генетически модифицированных мышей. Изобретение относится к антителам, которые содержат (a) переменный домен тяжелой цепи человека (hV_H), слитый с константной областью тяжелой цепи мыши, и (b) $V\lambda$ человека, слитый с доменом C_L мыши; в том числе, к антителам, в которых один или несколько переменных доменов соматически видоизменены, например, во время селекции антитела или иммунных клеток в мышам по данному изобретению. В одном из вариантов осуществления данные неперегруппированный $hV\lambda$ и неперегруппированный $hJ\lambda$ функционально связаны с

константной областью к (Ск) человека или мыши. В одном из вариантов осуществления данные неперегруппированный hVλ и неперегруппированный hJλ функционально связаны с константной областью λ (Сλ) человека или мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к мыши, содержащей в своей зародышевой линии, в эндогенном локусе легкой цепи мыши, последовательность 5
вариабельной области легкой цепи λ человека, где последовательность вариабельной области лямбда человека экспрессируется в легкой цепи, которая содержит последовательность гена константной области иммуноглобулина мыши.

В одном из вариантов осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши 10
представляет собой локус λ. В одном из вариантов осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус к.

В одном из вариантов осуществления мышь лишена эндогенной вариабельной последовательности легкой цепи в эндогенном локусе легкой цепи мыши.

В одном из вариантов осуществления все, или практически все, эндогенные генные 15
сегменты вариабельной области легкой цепи мыши заменены одним или несколькими генными сегментами вариабельной области λ человека.

В одном из вариантов осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи λ человека содержит последовательность Jλ человека. В одном из вариантов 20
осуществления, последовательность Jλ человека выбрана из группы, состоящей из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, и их комбинации.

В одном из вариантов осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи λ человека содержит фрагмент кластера А локуса легкой цепи человека. В конкретном варианте осуществления, фрагмент кластера А локуса легкой цепи λ 25
человека простирается от hVλ3-27 через hVλ3-1 включительно.

В одном из вариантов осуществления, последовательность вариабельной области легкой цепи λ человека содержит фрагмент кластера В локуса легкой цепи человека. В конкретном варианте осуществления, фрагмент кластера В локуса легкой цепи λ 30
человека простирается от hVλ5-52 через hVλ1-40 включительно.

В одном из вариантов осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи λ человека содержит геномный фрагмент кластера А и геномный фрагмент 35
кластера В. В одном из вариантов осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи λ человека содержит по меньшей мере один генный сегмент кластера А и по меньшей мере один генный сегмент кластера В.

В одном из вариантов осуществления более чем 10% интактного набора легкой цепи 40
мышь получено из по меньшей мере двух генных сегментов hVλ, отобранных из 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, и 9-49. В одном из вариантов осуществления более чем 20% интактного набора легкой цепи мышь получено из по меньшей мере трех генных сегментов hVλ, выбранных из 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, и 9-49. В одном из вариантов осуществления более чем 30% интактного набора легкой цепи мышь получено из по меньшей мере, трех 45
генных сегментов hVλ, выбранных из 2-8, 2-23, 1-40, 5-45, и 9-49.

В одном из аспектов изобретение относится к мыши, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит вариабельную последовательность λ человека, слитую с константной областью мыши, где мышь демонстрирует соотношение 50
использования к к использованию λ приблизительно 1:1.

В одном из вариантов осуществления легкая цепь иммуноглобулина экспрессируется 55
из эндогенного локуса легкой цепи мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к мыши, которая содержит последовательность вариабельной области легкой цепи λ (Vλ) и по меньшей мере одну 60
последовательность константной области легкой цепи λ (Cλ).

J-последовательность (J), прилегающую к последовательности константной области легкой цепи к мыши.

В одном из вариантов осуществления у мыши отсутствует функциональный генный сегмент V_к мыши и/или генный сегмент J_к мыши.

5 В одном из вариантов осуществления V_λ представляет собой V_λ человека (hV_λ), и J представляет собой J_λ человека (hJ_λ). В одном из вариантов осуществления данные hV_λ и hJ_λ представляют собой неперегруппированные генные сегменты.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит совокупность неперегруппированных генных сегментов hV_λ и по меньшей мере один генный сегмент hJ_λ. В конкретном варианте осуществления совокупность неперегруппированных генных сегментов hV_λ составляют по меньшей мере 12 генных сегментов, по меньшей мере 28 генных сегментов или по меньшей мере 40 генных сегментов.

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один генный сегмент hJ_λ выбран из группы, имеющей в своем составе J_λ1, J_λ2, J_λ3, J_λ7, и их комбинации.

15 В одном из вариантов осуществления эндогенный локус легкой цепи λ мыши делетирован полностью или частично.

В одном из вариантов осуществления последовательность константной области легкой цепи к мыши находится в эндогенном локусе легкой цепи к мыши.

В одном из вариантов осуществления, приблизительно от 10% приблизительно до 20 45% В-клеток мыши экспрессируют антитело, которое содержит легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой цепи λ (V_λ) человека и константный домен легкой цепи к (C_к) мыши.

В одном из вариантов осуществления вариабельный домен λ человека получен из перегруппированной последовательности hV_λ/hJ_λ, выбранной из группы, имеющей в своем составе 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 и 1-51/1.

В одном из вариантов осуществления мышь дополнительно содержит межгенную область V_к-J_к человека из локуса легкой цепи к человека, где межгенная область V_к-J_к человека сопряжена с последовательностью V_λ и последовательностью J. В конкретном варианте осуществления межгенная область V_к-J_к человека расположена между последовательностью V_λ и J-последовательностью.

В одном из аспектов изобретение относится к мыши, которая содержит (а) по меньшей мере от 12 до по меньшей мере 40 неперегруппированных генных сегментов вариабельной области легкой цепи λ человека и, по меньшей мере, один генный сегмент J_λ человека в эндогенном локусе легкой цепи мыши; (б) межгенную область V_к-J_к человека, расположенную между по меньшей мере от 12 до, по меньшей мере 40 генными сегментами вариабельной области легкой цепи человека, и по меньшей мере одной последовательностью J_λ человека; где мышь продуцирует антитело, содержащее легкую цепь, содержащую домен V_λ человека и домен C_к мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к мыши, которая экспрессирует антитело, содержащее легкую цепь, которая содержит вариабельную последовательность λ и константную последовательность к.

В одном из вариантов осуществления мышь демонстрирует использование к и использование λ в соотношении приблизительно 1:1.

В одном из вариантов осуществления популяция незрелых В-клеток, полученная из костного мозга мыши, демонстрирует использование к и использование λ в соотношении приблизительно 1:1.

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мыши, где мышь содержит неперегруппированные генные сегменты $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина, функционально связанные с локусом легкой цепи мыши, который содержит ген C_L мыши.

В одном из вариантов осуществления генные сегменты $V\lambda$ и/или $J\lambda$ представляют собой генные сегменты человека. В одном из вариантов генные сегменты $V\lambda$ и/или $J\lambda$ представляют собой генные сегменты мыши, и C_L представляет собой C_k мыши.

В одном из вариантов осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус легкой цепи k . В одном из вариантов осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус легкой цепи λ .

В одном из вариантов осуществления неперегруппированные генные сегменты $V\lambda$ и $J\lambda$ находятся в эндогенном локусе легкой цепи мыши.

В одном из вариантов осуществления неперегруппированные генные сегменты $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина находятся в трангене.

В одном из вариантов осуществления мышь дополнительно содержит замену одного или нескольких генных сегментов V , D , и/или J тяжелой цепи на один или более сегментов генов V , D и/или J человека в эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина мыши.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит неперегруппированный генный сегмент $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи k мыши, который содержит ген C_k мыши.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит неперегруппированный генный сегмент варибельной области легкой цепи λ ($V\lambda$) и J -генный сегмент λ ($J\lambda$) иммуноглобулина человека в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши, который содержит ген $C\lambda$ мыши.

В одном из вариантов осуществления локус варибельного гена легкой цепи («локус V_L ») содержит по меньшей мере один генный сегмент $V\lambda$ ($hV\lambda$) человека. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ ($hJ\lambda$) человека. В другом варианте осуществления локус V_L содержит до четырех генных сегментов $hJ\lambda$. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит сопредельную последовательность, содержащую геномную последовательность λ человека и k человека.

В одном из вариантов осуществления локус варибельного гена легкой цепи k («локус k ») содержит по меньшей мере один генный сегмент $V\lambda$ человека ($hV\lambda$). В одном из вариантов осуществления локус k содержит по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ человека ($hJ\lambda$). В одном из вариантов осуществления локус k содержит до четырех генных сегментов $hJ\lambda$. В одном из вариантов осуществления локус k содержит по меньшей мере один $hV\lambda$ и по меньшей мере один $hJ\lambda$, и лишен, или практически лишен, функционального генного сегмента области V_k , и лишен, или практически лишен, функционального генного сегмента области J_k . В одном из вариантов осуществления мышь не содержит функционального генного сегмента области V_k . В одном из вариантов осуществления мышь не содержит функционального генного сегмента области J_k .

В одном из вариантов осуществления локус варибельных генов легкой цепи λ («локус λ ») содержит по меньшей мере один генный сегмент $hV\lambda$. В одном из вариантов осуществления локус λ содержит по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ человека ($hJ\lambda$). В другом варианте осуществления локус λ содержит до четырех генных сегментов $hJ\lambda$.

В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит некоторое количество $hV\lambda$. В одном из вариантов осуществления совокупность $hV\lambda$ выбрана таким образом, чтобы приводить к экспрессии спектра вариабельной области легкой цепи λ , который воспроизводит приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%,
 5 приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% или приблизительно 90%, или более от использования $V\lambda$, наблюдаемого у человека. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит генные сегменты $hV\lambda$ 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21, и их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления $hV\lambda$ включают 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 и 3-12. В конкретном варианте осуществления локус V_L содержит смежную
 10 последовательность локуса легкой цепи λ человека, которая простирается от $V\lambda$ 3-12 до $V\lambda$ 3-1. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 $hV\lambda$. В конкретном варианте осуществления $hV\lambda$ включают
 15 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 и 3-12. В конкретном варианте осуществления локус V_L содержит смежную последовательность локуса λ человека, которая простирается от $V\lambda$ 3-12 до $V\lambda$ 3-1. В одном из вариантов осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе к. В конкретном

варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе к и эндогенный
 20 локус легкой цепи λ делетирован частично или полностью. В одном из вариантов осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе λ . В конкретном варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе λ и эндогенный локус к делетирован частично или полностью.

В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит 13-28 или более $hV\lambda$. В конкретном варианте осуществления $hV\lambda$ включают 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, и 3-27. В конкретном варианте осуществления локус к содержит смежную
 25 последовательность локуса λ человека, которая простирается от $V\lambda$ 3-27 до $V\lambda$ 3-1. В одном из вариантов осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе к. В конкретном варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе к и
 30 эндогенный локус легкой цепи λ делетирован частично или полностью. В другом варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе λ . В конкретном варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе λ и эндогенный локус
 35 к делетирован частично или полностью.

В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит 29-40 $hV\lambda$. В конкретном варианте осуществления локус к содержит прилегающую последовательность локуса λ человека, которая простирается от $V\lambda$ 3-29 до $V\lambda$ 3-1, и прилегающую
 40 последовательность локуса λ человека, которая простирается от $V\lambda$ 5-52 до $V\lambda$ 1-40. В конкретном варианте осуществления вся, или практически вся, последовательность между $hV\lambda$ 1-40 и $hV\lambda$ 3-29 в генетически модифицированной мыши состоит по существу из последовательности λ человека длиной приблизительно 959 п.о., встречающейся в
 45 природе (например, в человеческой популяции) в 5'-3' направлении генного сегмента $hV\lambda$ 1-40 (в прямом направлении 3'-нетранслируемой области), участок рестрикционного фермента (например, PI-SceI), за которым следует последовательность λ человека в 3'-5' направлении от генного сегмента $hV\lambda$ 3-29, длиной приблизительно 3431 п.о. встречающийся в природе. В одном из вариантов осуществления локус V_L находится

в эндогенном локусе к мышши. В конкретном варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе к мышши и эндогенный локус легкой цепи λ мышши делетирован частично или полностью. В другом варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе λ мышши. В конкретном варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе λ мышши и эндогенный локус к мышши делетирован частично или полностью.

В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один $hJ\lambda$. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит совокупность $hJ\lambda$. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, или 7 $hJ\lambda$. В определенном варианте осуществления локус V_L содержит четыре $hJ\lambda$. В определенном варианте осуществления данные четыре $hJ\lambda$ представляют собой $hJ\lambda 1$, $hJ\lambda 2$, $hJ\lambda 3$, и $hJ\lambda 7$. В одном из вариантов осуществления локус V_L представляет собой локус к. В

определенном варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе к и эндогенный локус легкой цепи λ делетирован частично или полностью. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит один $hJ\lambda$. В определенном варианте осуществления один $hJ\lambda$ представляет собой $hJ\lambda 1$. В одном из вариантов осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе к. В определенном варианте локус V_L находится в эндогенном локусе к и эндогенный локус легкой цепи λ делетирован частично или полностью. В другом варианте осуществления локус V_L находится в эндогенном локусе λ . В определенном варианте локус V_L находится в эндогенном локусе λ и эндогенный локус легкой цепи к делетирован частично или полностью.

В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один $hV\lambda$, по меньшей мере один $hJ\lambda$, и ген $С_k$ мышши. В одном из вариантов осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один $hV\lambda$, по меньшей мере один $hJ\lambda$, и ген $С_\lambda$ мышши. В определенном варианте осуществления ген $С_\lambda$ мышши представляет собой $С_\lambda 2$. В определенном варианте осуществления ген $С_\lambda$ мышши по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, или, по меньшей мере на 99% идентичен $С_\lambda 2$ мышши.

В одном из вариантов осуществления мышшь содержит замену в эндогенном локусе к мышши эндогенных генных сегментов V_k мышши на один или несколько генных сегментов $hV\lambda$, где генные сегменты $hV\lambda$ функционально связаны с эндогенной областью гена $С_k$ мышши, так что у мышши перегруппированы генные сегменты V_λ человека, и продуцируется обратная химерная легкая цепь иммуноглобулина, которая содержит домен V_λ человека и $С_k$ мышши. В одном из вариантов осуществления 90-100% неперегруппированных генных сегментов V_k мышши заменены на, по меньшей мере, один неперегруппированный генный сегмент $hV\lambda$. В определенном варианте осуществления все, или практически все, эндогенные генные сегменты V_k мышши заменены на, по меньшей мере, один неперегруппированный генный сегмент $hV\lambda$. В одном из вариантов осуществления замена составляет по меньшей мере 12, по меньшей мере 28 или по меньшей мере 40 неперегруппированных генных сегментов $hV\lambda$. В одном из вариантов осуществления замена происходит, по меньшей мере на 7 функциональных неперегруппированных генных сегментов $hV\lambda$, по меньшей мере, на 16 функциональных неперегруппированных генных сегментов $hV\lambda$, или, по меньшей мере, на 27 функциональных неперегруппированных генных сегментов $hV\lambda$. В одном из вариантов осуществления мышшь содержит замену всех генных сегментов J_k мышши на, по меньшей мере

мере, один неперегруппированный генный сегмент hJλ. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один неперегруппированный генный сегмент hJλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ4, Jλ5, Jλ6, Jλ7, и их комбинации. В определенном варианте осуществления один или несколько генных сегментов hVλ выбран из генных сегментов hVλ 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52 и их комбинации. В определенном варианте осуществления по меньшей мере один неперегруппированный генный сегмент hJλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, и их комбинации.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит замену эндогенных генных сегментов Vλ мыши в эндогенном локусе λ мыши на один или несколько генных сегментов Vλ человека в эндогенном локусе λ мыши, где данные генные сегменты hVλ функционально связаны с областью гена Cλ мыши, так что у мыши перегруппированы генные сегменты hVλ, и продуцируется обратная химерная легкая цепь иммуноглобулина, которая содержит домен hVλ и Cλ мыши. В определенном варианте осуществления ген Cλ мыши представляет собой Cλ2. В определенном варианте осуществления ген Cλ мыши, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или, по меньшей мере на 98% идентичен Cλ2 мыши. В одном из вариантов осуществления 90-100% неперегруппированных генных сегментов Vλ мыши заменены на, по меньшей мере, один неперегруппированный генный сегмент hVλ. В определенном варианте осуществления все, или практически все, эндогенные генные сегменты Vλ мыши заменены на, по меньшей мере, один неперегруппированный генный сегмент hVλ. В одном из вариантов осуществления замена составляет по меньшей мере 12, по меньшей мере 28 или по меньшей мере 40 неперегруппированных генных сегментов hVλ. В одном из вариантов осуществления замена происходит по меньшей мере на 7 функциональных неперегруппированных генных сегментов hVλ, по меньшей мере на 16 функциональных неперегруппированных генных сегментов hVλ или по меньшей мере на 27 функциональных неперегруппированных генных сегментов hVλ. В одном из вариантов осуществления мышь содержит замену всех генных сегментов Jλ мыши на по меньшей мере один неперегруппированный генный сегмент hJλ. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один неперегруппированный генный сегмент hJλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ4, Jλ5, Jλ6, Jλ7, и их комбинации. В определенном варианте осуществления один или несколько генных сегментов hVλ выбран из генных сегментов hVλ 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52, и их комбинации. В определенном варианте осуществления по меньшей мере один неперегруппированный генный сегмент hJλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7, и их комбинации.

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мыши, которая содержит последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека, расположенную в эндогенном локусе легкой цепи κ мыши.

В одном из вариантов осуществления последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека расположена в эндогенном локусе легкой цепи κ мыши, которая содержит генный сегмент hVλ и hJλ, и последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека расположена между генными сегментами hVλ и hJλ. В определенном варианте осуществления данные генные сегменты hVλ и hJλ способны к рекомбинации для формирования функционального вариабельного домена легкой цепи λ человека у мыши.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к мыши, которая содержит совокупность генных сегментов hVλ и один или несколько hJλ, и

последовательность межгенной области V κ -J κ человека расположена, относительно транскрипции, в 5'-3' направлении от самой проксимальной или 3' последовательности hV λ , и в 3'-5' направлении или 5' от первой последовательности hJ λ .

В одном из вариантов осуществления межгенная область V κ -J κ человека представляет собой область, расположенную приблизительно в 130 п.о. в 5'-3' направлении или 3' от генного сегмента V κ 4-1 человека, приблизительно в 130 п.о. в 5'-3' направлении от 3'-нетранслируемой области генного сегмента V κ 4-1 человека, и перекрывает приблизительно 600 п.о. в 3'-5' направлении или 5' от генного сегмента J κ 1 человека. В определенном варианте осуществления размер межгенной области V κ -J κ человека составляет приблизительно 22,8 т.п.о.. В одном из вариантов осуществления межгенная область V κ -J κ приблизительно на 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, или приблизительно на 95% или более, идентична межгенной области V κ -J κ человека, простирающейся от конца 3'-нетранслируемой области генного сегмента V κ 4-1 человека до приблизительно 600 п.о. в 3'-5' направлении генного сегмента J κ 1 человека. В одном из вариантов осуществления межгенная область V κ -J κ содержит последовательность SEQ ID NO: 100. В определенном варианте осуществления межгенная область V κ -J κ содержит функциональный фрагмент последовательности SEQ ID NO: 100. В определенном варианте осуществления межгенная область V κ -J κ представляет собой последовательность SEQ ID NO: 100.

В одном из аспектов изобретение относится к мыши, клеткам мышцы (например, эмбриональная стволовая клетка мышцы), эмбриону-мышь и тканям мышцы, которые содержат описанную последовательность межгенной области V κ -J κ человека, где последовательность межгенной области является эктопической. В определенном варианте осуществления эктопическая последовательность расположена в гуманизированном эндогенном локусе иммуноглобулина мышши.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит описанную последовательность межгенной области V κ -J κ человека. В одном из вариантов осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит направляющие плечи для нацеливания последовательности межгенной области V κ -J κ человека на locus легкой цепи мышши. В определенном варианте осуществления данные направляющие плечи нацеливают данную последовательность межгенной области V κ -J κ человека на модифицированный эндогенный locus к мышши, где нацеливание относится к положению между последовательностью hV λ и последовательностью hJ λ .

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мышши, где мышшь содержит не более, чем две аллели легкой цепи, где данные аллели легкой цепи содержат (а) неперегруппированный генный сегмент V λ и J λ иммуноглобулина человека в эндогенном локусе легкой цепи мышши, который содержит ген C λ мышши; и, (b) неперегруппированный генный сегмент V λ и J λ иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи мышши, который содержит ген C λ мышши.

В одном из вариантов осуществления эндогенный locus легкой цепи мышши представляет собой locus к. В другом варианте осуществления эндогенный locus легкой цепи мышши представляет собой locus λ .

В одном из вариантов осуществления не более двух аллелей легкой цепи выбрано из аллеля к и аллеля λ , двух аллелей к, и двух аллелей λ . В определенном варианте осуществления один из двух аллелей легкой цепи представляет собой аллель λ , который

содержит ген Сλ2.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит один функциональный локус легкой цепи иммуноглобулина и один нефункциональный локус легкой цепи иммуноглобулина, где функциональный локус легкой цепи содержит
5 неперегруппированный генный сегмент Vλ и Jλ иммуноглобулина человека в эндогенном локусе легкой цепи к мыши, который содержит ген Ск мыши.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит один функциональный локус легкой цепи иммуноглобулина и один нефункциональный локус легкой цепи иммуноглобулина, где функциональный локус легкой цепи содержит
10 неперегруппированный генный сегмент Vλ и Jλ иммуноглобулина человека в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши, который содержит ген Ск мыши. В одном из вариантов осуществления ген Сλ представляет собой Сλ2. В определенном варианте осуществления ген Сλ мыши по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98%
15 идентичен Сλ2 мыши.

В одном из вариантов осуществления мышь дополнительно содержит по меньшей мере один аллель тяжелой цепи иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один аллель тяжелой цепи иммуноглобулина содержит генный сегмент V_H человека, и генный сегмент D_H человека, и генный сегмент J_H в эндогенном локусе
20 тяжелой цепи мыши, который содержит ген тяжелой цепи человека, который экспрессирует тяжелую цепь человек/мышь. В определенном варианте осуществления мышь содержит два аллеля тяжелой цепи иммуноглобулина, и мышь экспрессирует тяжелую цепь человек/мышь.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит первый аллель легкой цепи, который содержит неперегруппированный hVκ и неперегруппированный hJκ в
25 эндогенном локусе к мыши, содержащем эндогенный ген Ск; и второй аллель легкой цепи, который содержит неперегруппированный hVλ и неперегруппированный hJλ в эндогенном локусе к мыши, содержащем эндогенный ген Ск. В определенном варианте осуществления первый и второй аллели легкой цепи являются единственными
30 функциональными аллелями легкой цепи генетически модифицированной мыши. В определенном варианте осуществления мышь содержит нефункциональный локус λ. В одном из вариантов осуществления генетически модифицированная мышь не экспрессирует легкую цепь, которая содержит константную область λ.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит первый аллель легкой цепи, который содержит неперегруппированный hVκ и неперегруппированный hJκ в
35 эндогенном локусе к мыши, содержащем эндогенный ген Ск; и второй аллель легкой цепи, который содержит неперегруппированный hVλ и неперегруппированный hJλ в эндогенном локусе λ мыши, содержащем эндогенный ген Сλ. В определенном варианте осуществления первый и второй аллели легкой цепи являются единственными
40 функциональными аллелями легкой цепи генетически модифицированной мыши. В одном из вариантов осуществления ген Сλ представляет собой Сλ2. В определенном варианте осуществления ген Сλ мыши, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98% идентичен Сλ2 мыши.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит шесть аллелей иммуноглобулина, где первый аллель содержит неперегруппированный генный сегмент Vλ и Jλ в эндогенном локусе легкой цепи к мыши, который содержит ген Ск мыши, второй аллель содержит неперегруппированный генный сегмент Vκ и Jκ

иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи к мыши, который содержит ген С_к мыши, третий аллель содержит неперегруппированный генный сегмент V_λ и J_λ иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши, который содержит ген С_λ мыши, четвертый и пятый аллели, каждый независимо друг от друга, содержат
 5 неперегруппированный генный сегмент V_H и D_H и J_H в эндогенном локусе тяжелой цепи мыши, который содержит ген тяжелой цепи мыши, и шестой аллель содержит либо (а) неперегруппированный генный сегмент V_λ и J_λ иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши, содержащем ген С_λ мыши, либо (b) локус λ, который является нефункциональным, либо (c) делецию всего или части локуса λ.

10 В одном из вариантов осуществления первый аллель содержит неперегруппированные hV_λ и hJ_λ. В одном из вариантов осуществления второй аллель содержит неперегруппированные hV_κ и hJ_κ. В одном из вариантов осуществления третий аллель содержит неперегруппированные hV_λ и hJ_λ. В одном из вариантов осуществления четвертый и пятый аллели, каждый независимо друг от друга, содержат
 15 неперегруппированный hV_H и hD_H, и hJ_H. В одном из вариантов осуществления шестой аллель содержит эндогенный локус λ мыши, который делетирован полностью или частично.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит шесть аллелей иммуноглобулина, где первый аллель содержит неперегруппированный генный сегмент
 20 V_λ и J_λ в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши, который содержит ген С_λ мыши, второй аллель содержит неперегруппированный генный сегмент V_λ и J_λ иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши, который содержит ген С_λ мыши, третий аллель содержит неперегруппированный генный сегмент V_κ и J_κ иммуноглобулина в эндогенном локусе легкой цепи к мыши, который содержит ген С_к
 25 мыши, четвертый и пятый аллели, каждый независимо друг от друга, содержат неперегруппированный генный сегмент V_H и D_H, и J_H в эндогенном локусе тяжелой цепи мыши, который содержит ген тяжелой цепи мыши, и шестой аллель содержит либо (а) неперегруппированный генный сегмент V_κ и J_κ иммуноглобулина в эндогенном
 30 локусе легкой цепи к мыши, содержащем ген С_к мыши, либо (b) локус к, который является нефункциональным, либо (c) делецию одного или нескольких элементов локуса к.

В одном из вариантов осуществления первый аллель содержит неперегруппированные генные сегменты hV_λ и hJ_λ. В одном из вариантов осуществления второй аллель
 35 содержит неперегруппированные генные сегменты hV_λ и hJ_λ. В одном из вариантов осуществления третий аллель содержит неперегруппированные генные сегменты hV_κ и hJ_κ. В одном из вариантов осуществления четвертый и пятый аллели, каждый независимо друг от друга, содержит неперегруппированный генный сегмент hV_H и hD_H, и hJ_H. В одном из вариантов осуществления шестой аллель содержит эндогенный локус
 40 к мыши, который функционально отключен.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированная мышь содержит В-клетку, которая содержит перегруппированный ген антитела, содержащий
 45 перегруппированный домен hV_λ, функционально связанный с доменом С_L мыши. В одном из вариантов осуществления домен С_L мыши выбран из домена С_λ мыши и С_к мыши. В определенном варианте осуществления домен С_λ мыши получен из гена С_λ2. В определенном варианте осуществления домен С_λ мыши получен из домена С_λ, который, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98%

идентичен Сλ2 мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мыши, которая экспрессирует область Vλ в CL, который представляет собой Ск. В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мыши, которая экспрессирует область hVλ в С_L, выбранном из Ск человека, Сλ человека или Ск мыши. В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мыши, которая экспрессирует область hVλ в Ск мыши.

В одном из вариантов осуществления приблизительно 10-50% спленоцитов мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 9-28% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В определенном варианте осуществления приблизительно 23-34% спленоцитов мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 9-11% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В определенном варианте осуществления приблизительно 19-31% спленоцитов мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 9-17% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В определенном варианте осуществления приблизительно 21-38% спленоцитов мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 24-27% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В определенном варианте осуществления приблизительно 10-14% спленоцитов мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 9-13% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В определенном варианте осуществления приблизительно 31-48% спленоцитов мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 15-21% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши. В определенном варианте осуществления приблизительно 30-38% спленоцитов мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 33-48% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В одном из вариантов осуществления приблизительно 52-70% костного мозга мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 31-47% незрелые В-клетки (а именно, СВ19-положительные/В220-промежуточно положительные/IgM-положительные) экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В одном из вариантов осуществления приблизительно 60% костного мозга мыши представляют собой В-клетки (а именно, CD19-положительные), или которые приблизительно 38,3% незрелые В-клетки (а именно, СВ19-положительные/В220-промежуточно положительные/IgM-положительные) экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hVλ, слитый с доменом Ск мыши.

В одном из вариантов осуществления мышь экспрессирует антитело, содержащее легкую цепь, которая включает вариабельный домен, полученный из генного сегмента V человека и J человека, и константный домен, полученный из гена константной области мыши. В одном из вариантов осуществления ген константной области мыши

представляет собой ген Ск. В другом варианте осуществления ген константной области
 мышцы представляет собой ген Сл. В определенном варианте осуществления область
 Сл представляет собой Сл2. В определенном варианте осуществления ген Сл
 5 получен из гена Сл, который, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по
 меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или, по
 меньшей мере на 98% идентичен Сл2 мышцы. В определенном варианте осуществления
 антитело дополнительно содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен,
 полученный из генного сегмента V человека, генного сегмента D человека и генного
 10 сегмента J человека, и константный домен тяжелой цепи, полученный из гена
 константной области тяжелой цепи мышцы. В одном из вариантов осуществления ген
 константной области тяжелой цепи мышцы содержит последовательность шарнир-
 СН₂-СН₃ константного домена тяжелой цепи. В другом варианте осуществления ген
 константной области тяжелой цепи мышцы содержит последовательность СН₁-шарнир-
 15 СН₂-СН₃ константного домена тяжелой цепи. В другом варианте осуществления ген
 константной области тяжелой цепи мышцы содержит последовательность
 СН₁-СН₂-СН₃-СН₄ константного домена тяжелой цепи. В другом варианте осуществления
 ген константной области тяжелой цепи мышцы содержит последовательность
 СН₂-СН₃-СН₄ константного домена тяжелой цепи.

20 В одном из вариантов осуществления мышца экспрессирует антитело, содержащее
 легкую цепь, которая содержит перегруппированную последовательность Vλ-Jλ человека
 и последовательность Ск мышцы. В одном из вариантов осуществления
 перегруппированная последовательность Vλ-Jλ человека получена в результате
 25 перегруппировки генных сегментов hVλ, выбранных из генных сегментов 3-1, 4-3, 2-8,
 3-9, 3-10, 2-14, 3-19, 2-23, 3-25, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 9-49 и 1-51. В одном из
 вариантов осуществления перегруппированная последовательность Vλ-Jλ человека
 получена в результате перегруппировки генных сегментов hJλ, выбранных из генных
 сегментов Jλ1, Jλ2, Jλ3 и Jλ7.

30 В одном из вариантов осуществления мышца экспрессирует антитело, содержащее
 легкую цепь, которая содержит перегруппированную вариабельную область легкой
 цепи λ иммуноглобулина, содержащий последовательность VA/JA человека, выбранную
 из 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1,
 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-
 46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 и 1-51/1. В определенном варианте осуществления В-
 35 клетка экспрессирует антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи
 иммуноглобулина человека, слитый с константным доменом тяжелой цепи мышцы, и
 вариабельный домен легкой цепи λ иммуноглобулина человека, слитый с константным
 доменом легкой цепи κ мышцы.

40 В одном из аспектов изобретение относится к мышце, которая экспрессирует антитело,
 содержащее (а) тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи,
 полученный из неперегруппированного генного сегмента вариабельной области тяжелой
 цепи человека, где вариабельный домен тяжелой цепи слит с константной областью
 тяжелой цепи (С_H) мышцы; и (b) легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой
 45 цепи, полученный из неперегруппированных hVλ и hJλ, где вариабельный домен легкой
 цепи слит с областью С_L мышцы.

В одном из вариантов осуществления мышца содержит (i) локус тяжелой цепи, который
 содержит замену всех или практически всех эндогенных функциональных генных
 сегментов V, D и J мышцы на все, или практически все функциональные генные сегменты

V, D, и J человека, и ген C_H мыши, (ii) первый локус легкой цепи к, содержащий замену всех или практически всех функциональных эндогенных генных сегментов V_k и J_k на все, или практически все, или совокупность, функциональных генных сегментов hV_λ и hJ_λ , и ген C_k мыши, (iii) второй локус легкой цепи к, содержащий замену всех, или
 5 практически всех, функциональных эндогенных генных сегментов V_k и J_k мыши на все, или практически все, или совокупность, функциональных генных сегментов hV_k и hJ_k , и ген C_k мыши. В одном из вариантов осуществления мышь не экспрессирует антитело, которое содержит область C_λ . В одном из вариантов осуществления мышь содержит делецию гена C_λ и/или генного сегмента V_λ и/или генного сегмента J_λ . В
 10 одном из вариантов осуществления мышь содержит нефункциональный локус легкой цепи λ . В определенном варианте осуществления локус легкой цепи λ делетирован полностью или частично.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит (i) локус тяжелой цепи, который содержит замену всех или практически всех эндогенных функциональных генных
 15 сегментов V, D и J мыши на все, или практически все функциональные генные сегменты V, D, и J человека, и ген C_H мыши, (ii) первый локус легкой цепи λ , включающий замену всех или практически всех функциональных эндогенных генных сегментов V_λ и J_λ на все, или практически все, или совокупность, функциональных генных сегментов hV_λ и hJ_λ , и ген C_λ мыши, (iii) второй локус легкой цепи λ , содержащий замену всех, или
 20 практически всех, функциональных эндогенных генных сегментов V_λ и J_λ мыши на все, или практически все, или совокупность, функциональных генных сегментов hV_λ и hJ_λ , и ген C_λ мыши. В определенном варианте осуществления ген C_λ мыши представляет собой $C_{\lambda 2}$. В определенном варианте осуществления ген C_λ мыши получен из гена C_λ , который, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%,
 25 по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или, по меньшей мере на 98% идентичен $C_{\lambda 2}$ мыши.

В одном из вариантов осуществления мышь содержит делецию гена C_k и/или генного сегмента V_k и/или генного сегмента J_k . В одном из вариантов осуществления мышь
 30 содержит нефункциональный локус легкой цепи к.

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мышью, которая экспрессирует антитело, где более, чем 10%, более, чем 15%, более, чем 20%,
 более, чем 25%, более, чем 30%, более, чем 35%, более, чем 40%, более, чем 60%, более, чем 70%, более, чем 80%, или более, чем 90% общего количества антитела IgG,
 35 продуцируемого мышью, содержит вариабельный домен λ -происхождения, и где мышь экспрессирует антитела, содержащие вариабельный домен к-происхождения, слитый с областью C_k мыши. В определенном варианте осуществления приблизительно 15-40%, 20-40%, 25-40%, 30-40%, или 35-40% общего антитела, продуцируемого мышью, содержит вариабельный домен λ -происхождения.

В одном из вариантов осуществления вариабельный домен λ -происхождения получен из hV_λ и hJ_λ . В одном из вариантов осуществления вариабельный домен λ -происхождения
 40 находится на легкой цепи, которая включает область C_k мыши. В определенном варианте осуществления вариабельная область λ -происхождения находится на легкой цепи, которая содержит область C_λ мыши. В другом специфическом варианте осуществления область C_λ представляет собой область $C_{\lambda 2}$. В одном из вариантов осуществления вариабельный домен к-происхождения получен из hV_k и hJ_k , и в
 45 определенном варианте осуществления находится на легкой цепи, которая содержит область C_k мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, которая

содержит гомологичное плечо в 3'-5' направлении и гомологичное плечо в 5'-3' направлении, где данные гомологичные плечи в 3'-5' направлении и 5'-3' направлении нацеливают данную конструкцию на локус к мыши, и конструкция содержит функциональный неперегруппированный сегмент hVλ и функциональный

5 неперегруппированный сегмент hJλ, и селекционную или маркерную последовательность.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее плечо для нацеливания последовательности λ мыши в направлении 3'-5' Vλ2 мыши, селекционную кассету, фланкированную 5' и 3' участками распознавания рекомбиназ, и направляющее плечо для нацеливания последовательности λ мыши 3' Jλ2 мыши. В

10 одном из вариантов осуществления селекционная кассета представляет собой кассету Frt Hvg-ТК. В одном из вариантов осуществления 3' направляющее плечо содержит Cλ2, Jλ4, Cλ4, и энхансер 2.4 мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее

15 плечо для нацеливания локуса λ мыши в 5'-направлении относительно Vλ1, селекционную кассету, фланкированную 5' и 3' участками распознавания рекомбиназ, и направляющее плечо 3' для нацеливания последовательности λ мыши 3' относительно Cλ1 мыши. В одном из вариантов осуществления селекционная кассета представляет собой

20 неомициновую кассету, фланкированную lox-сайтами. В одном из вариантов осуществления 3' направляющее плечо содержит 3' энхансер λ мыши и 3' энхансер 3.1λ мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее

25 плечо для нацеливания локуса λ мыши в 5'-направлении относительно Vλ2, селекционную кассету, фланкированную 5' и 3' участками распознавания рекомбиназ, и направляющее плечо 3' для нацеливания последовательности λ мыши 3' относительно Jλ2 мыши и 5' относительно Cλ2. В одном из вариантов осуществления селекционная кассета представляет собой кассету Frt гигромицин-ТК. В одном из вариантов осуществления

30 3' направляющее плечо содержит генные сегменты Cλ2-Jλ4-Cλ4 и энхансер 2.4λ мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее

35 плечо для нацеливания локуса λ мыши в 5'-направлении относительно Vλ2, селекционную кассету, фланкированную 5' и 3' участками распознавания рекомбиназ, геномный фрагмент человека, содержащий смежную область локуса легкой цепи λ человека от hVλ3-12 в направлении 5'-3' до конца hJλ1, и направляющее плечо 3' для нацеливания

40 последовательности λ мыши 3' относительно Jλ2. В одном из вариантов осуществления селекционная кассета представляет собой Frt неомициновую кассету. В одном из вариантов осуществления 3'-направляющее плечо содержит генные сегменты Cλ2-Jλ4-Cλ4 мыши и энхансер 2.4λ мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, включающей смежную область локуса легкой цепи λ человека от hVλ3-12 в направлении 5'-3' до конца hJλ1.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК,

45 содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее плечо для нацеливания локуса λ мыши в 5'-направлении относительно Vλ2, селекционную кассету, фланкированную 5' и 3' участками распознавания рекомбиназ, и геномный фрагмент человека, содержащий смежную область локуса легкой цепи λ человека от

hVλ3-27 в направлении 5'-3' до конца hVλ2-8. В одном из вариантов осуществления селекционная кассета представляет собой Frt гигромициновую кассету. В одном из вариантов осуществления геномный фрагмент человека содержит 3' направляющее плечо. В определенном варианте осуществления 3' направляющее плечо содержит

5 приблизительно 53 т.п.о. локуса легкой цепи λ человека от hVλ3-12 в направлении 5'-3' до конца hVλ2-8.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей смежную область локуса легкой цепи λ человека от hVλ3-27 в направлении 5'-3' до конца hVλ3-12.

10 В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее плечо для нацеливания локуса λ мыши в 5'-направлении относительно Vλ2, селекционную кассету, фланкированную 5' и 3' участками распознавания рекомбиназ, первый геномный фрагмент человека, содержащий смежную область локуса легкой цепи λ человека от

15 hVλ5-52 в направлении 5'-3' до конца hVλ1-40, участок рестрикционного фермента и второй геномный фрагмент человека, содержащий смежную область локуса легкой цепи λ человека от hVλ3-29 в направлении 5'-3' до конца hVλ82K. В одном из вариантов осуществления селекционная кассета представляет собой Frt неомициновую кассету. В одном из вариантов осуществления участок фермента рестрикции представляет собой

20 участок для хоминг-эндонуклеазы. В определенном варианте осуществления хоминг-эндонуклеазой является PI-SceI. В одном из вариантов осуществления второй геномный фрагмент человека представляет собой 3' направляющее плечо. В определенном варианте осуществления 3' направляющее плечо содержит приблизительно 27 т.п.о. локуса легкой цепи λ человека от hVλ3-29 в 5'-3' направлении до конца hVλ82K.

25 В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей смежную область локуса легкой цепи λ человека от hVλ5-52 в направлении 5'-3' до конца hVλ1-40.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее

30 плечо для нацеливания локуса к мыши в 5'-направлении относительно эндогенных генных сегментов Vκ, два смежных участка распознавания рекомбиназ, и селекционную кассету 3' к смежным участкам распознавания рекомбиназ, и 3' направляющее плечо для нацеливания последовательности к мыши 5' относительно вариабельных генных сегментов легкой цепи κ. В одном из вариантов осуществления данные смежные участки

35 распознавания рекомбиназ находятся в противоположной ориентации относительно друг друга. В определенном варианте осуществления данные участки распознавания рекомбиназ являются разными. В другом определенном варианте осуществления и участками распознавания рекомбиназ являются участок loxP и участок lox511. В одном из вариантов осуществления селекционной кассетой является неомициновая кассета.

40 В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, направляющее плечо для нацеливания локуса к мыши в 5'-направлении относительно генных сегментов Jκ мыши, селекционную кассету, участки распознавания рекомбиназ 3' к селекционной кассете, и 3' направляющее плечо для нацеливания последовательности к мыши 5'

45 относительно генных сегментов Jκ мыши, и 5' к интронному энхансеру к мыши. В одном из вариантов осуществления селекционной кассетой является кассета гигромицин-ТК. В одном из вариантов осуществления участок распознавания рекомбиназы находится в той же ориентации относительно транскрипции, что и селекционная кассета. В

определенном варианте осуществления участком распознавания рекомбиназы является участок loxP.

В одном из аспектов изобретение относится к выделенной конструкции ДНК, содержащей в 5'-3' направлении относительно направления транскрипции, первый геномный фрагмент мыши, содержащий 5'-последовательность эндогенных генных сегментов V κ мыши, первый участок распознавания рекомбиназы, второй участок распознавания рекомбиназы и второй геномный фрагмент мыши, содержащий 3' последовательность эндогенных генных сегментов J κ мыши, и 5' интронного энхансера к мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мыши, где генетическая модификация содержит модификацию с одной или несколькими конструкциями ДНК, описанными ранее или в настоящем описании.

В одном из аспектов изобретение относится к применению выделенной конструкции ДНК для создания мыши, как описано описано описано в настоящем описании. В одном из аспектов изобретение относится к применению выделенной конструкции ДНК, как описано в настоящем описании, в способе получения антиген-связывающего белка.

В одном из аспектов изобретение относится к стволовой клетке не-человеческого происхождения, которая содержит направляющий вектор, содержащий конструкцию ДНК, как описано ранее и в настоящем описании.. В одном из аспектов изобретение относится к стволовой клетке не-человеческого происхождения, где стволовая клетка не-человеческого происхождения получена от мыши, описанной в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления стволовая клетка нечеловеческого происхождения представляет собой эмбриональную стволовую (ES) клетку. В определенном варианте осуществления ES-клетка представляет собой ES-клетку мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к применению нечеловеческой стволовой клетки, как описано в настоящем описании, для получения мыши, как описано в настоящем описании. В одном из аспектов изобретение относится к применению не-человеческой стволовой клетки, как описано в настоящем описании, для получения антиген-связывающего белка.

В одном из аспектов изобретение относится к эмбриону мыши, где эмбрион мыши содержит предусмотренную в настоящем описании генетическую модификацию. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к эмбриону-хозяину мыши, который содержит донорскую ES-клетку, где донорская ES-клетка включает описанную в настоящем описании генетическую модификацию. В одном из вариантов осуществления эмбрион мыши представляет собой эмбрион на стадии пре-морулы. В определенном варианте осуществления эмбрион на стадии пре-морулы представляет собой 4-клеточный эмбрион или 8-клеточный эмбрион. В другом специфическом варианте осуществления эмбрион мыши представляет собой бластоцисту.

В одном из аспектов изобретение относится к применению мышинового эмбриона, как описано в настоящем описании, для получения мыши, как описано в настоящем описании. В одном из аспектов изобретение относится к применению эмбриона мыши, как описано в настоящем описании, для получения антиген-связывающего белка.

В одном из аспектов изобретение относится к клетке, которая не является клеткой человека, где клетка, которая не является клеткой человека, содержит перегруппированную последовательность гена легкой цепи иммуноглобулина, полученной из генетически модифицированной мыши, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой В-клетку. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой гибридому. В одном

из вариантов осуществления клетка кодирует переменный домен легкой цепи иммуноглобулина и/или переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который соматически видоизменен.

В одном из аспектов изобретение относится к не-человеческой клетке, где не-человеческая клетка содержит перегруппированную последовательность гена легкой цепи иммуноглобулина, полученной из генетически модифицированной мыши, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой В-клетку. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой гибридому. В одном из вариантов осуществления клетка кодирует переменный домен легкой цепи иммуноглобулина и/или переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который соматически видоизменен.

В одном из аспектов изобретение относится к применению нечеловеческой клетки, как описано в настоящем описании, для получения мыши, как описано в настоящем описании. В одном из аспектов изобретение относится к использованию не-человеческой клетки, как описано в настоящем описании, для получения антиген-связывающего белка.

В одном из аспектов изобретение относится к В-клетке мыши, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит (а) переменную область, полученную из генного сегмента $hV\lambda$ и генного сегмента $hJ\lambda$; и, (b) ген C_L мыши. В одном из вариантов осуществления ген C_L мыши выбран из гена C_k и $C\lambda$. В определенном варианте осуществления ген $C\lambda$ представляет собой $C\lambda 2$. В определенном варианте осуществления ген $C\lambda$ мыши получен из гена $C\lambda$, который, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98% идентичен $C\lambda 2$ мыши. В одном из вариантов осуществления В-клетка мыши дополнительно экспрессирует родственную тяжелую цепь, которая содержит (с) переменную область, полученную из сегмента hV_H , hD_H , и (d) hJ_H . В одном из вариантов осуществления В-клетка не содержит перегруппированный ген λ . В другом варианте осуществления В-клетка не содержит перегруппированный ген κ .

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения антитела в генетически модифицированной мыши, включающему: (а) воздействие на генетически модифицированную мышь антигеном, где в геноме мышь содержится по меньшей мере один $hV\lambda$ и по меньшей мере один $hJ\lambda$ в эндогенном локусе легкой цепи, содержащем ген C_L мыши; (b) развитие у генетически модифицированной мыши иммунного ответа на антиген; и (с) выделение из организма мыши (b) антитела, которое специфически распознает антиген, или выделение из организма мыши (b) клетки, содержащей домен иммуноглобулина, который специфически распознает антиген, где антитело содержит легкую цепь, происходящую из $hV\lambda$, $hJ\lambda$, и гена мыши C_L . В определенном варианте осуществления ген C_L мыши представляет собой ген C_k мыши.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения антитела в генетически модифицированной мыши, включающему: (а) воздействие на генетически модифицированную мышь антигеном, где в геноме мышь содержится по меньшей мере один $hV\lambda$ в эндогенном локусе κ и, по меньшей мере один $hJ\lambda$ в эндогенном локусе κ , где локус κ содержит ген C_k мыши; (b) развитие у генетически модифицированной мыши иммунного ответа на антиген; и, (с) выделение из организма мыши (b) антитела, которое специфически распознает антиген, или выделение из организма мыши (b) клетки, содержащей домен иммуноглобулина, который

специфически распознает антиген, где антитело содержит легкую цепь, происходящую из hV λ , hJ λ , и гена мыши C λ .

В одном из вариантов осуществления константный ген легкой цепи к выбран из гена C κ человека и гена C κ мыши.

5 В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения антитела в генетически модифицированной мыши, включающему: (а) воздействие на генетически модифицированную мышь антигеном, где в геноме мыши содержится по меньшей мере один hV λ в локусе легкой цепи λ и по меньшей мере один J λ в локусе легкой цепи λ , где локус легкой цепи λ содержит ген C λ мыши; (б) развитие у генетически модифицированной мыши иммунного ответа на антиген; и, (с) выделение из организма мыши (б) антитела, которое специфически распознает антиген, или выделение из организма мыши (б) клетки, содержащей домен иммуноглобулина, который специфически распознает антиген, или выявление в мыши (В) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариabельный домен тяжелой и/или легкой цепи, который связывает антиген, где антитело содержит легкую цепь, происходящую из hV λ , hJ λ и гена C λ мыши.

В одном из вариантов осуществления константный ген легкой цепи λ выбран из гена C λ человека и гена C λ мыши. В одном из вариантов осуществления константный ген легкой цепи λ представляет собой ген C λ человека. В определенном варианте осуществления ген C λ человека выбран из C λ 1, C λ 2, C λ 3 и C λ 7. В одном из вариантов осуществления константный ген легкой цепи λ представляет собой ген C λ мыши. В определенном варианте осуществления ген C λ мыши выбран из C λ 1, C λ 2 и C λ 3. В более специфическом варианте осуществления ген C λ мыши представляет собой C λ 2. В другом специфическом варианте осуществления ген C λ происходит из гена C λ , который, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или, по меньшей мере на 98% идентичен C λ 2 мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения перегруппированного гена антитела в генетически модифицированной мыши, включающему: (а) воздействие на генетически модифицированную мышь антигеном, где генетическая модификация содержит hV λ и hJ λ в эндогенном локусе легкой цепи, где эндогенный локус легкой цепи содержит ген C λ мыши или его функциональный фрагмент; и, (б) выявление перегруппированного гена иммуноглобулина у указанной мыши, где перегруппированный ген иммуноглобулина содержит генный сегмент вариabельной области легкой цепи λ и ген C λ , или его функциональный фрагмент.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариabельную область тяжелой и/или легкой цепи мыши, где вариabельная область тяжелой и/или легкой цепи происходит из антитела, которое содержит V λ человека и C λ мыши.

В одном из вариантов осуществления ген C λ мыши, или его функциональный фрагмент, выбран из гена C λ человека и гена C λ мыши, или их функционального фрагмента.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения перегруппированного гена антитела в генетически модифицированной мыши, включающему: (а) воздействие на генетически модифицированную мышь антигеном, где генетическая модификация содержит hV λ и hJ λ в локусе легкой цепи к, где локус легкой цепи к содержит ген C κ мыши или его функциональный фрагмент; и, (б)

выявление перегруппированного гена иммуноглобулина у указанной мыши, где перегруппированный ген иммуноглобулина содержит генный сегмент варибельной области легкой цепи λ и ген С κ , или его функциональный фрагмент.

В одном из вариантов осуществления константный ген легкой цепи κ , или его функциональный фрагмент, выбран из гена С κ человека и гена С κ мыши, или их функционального фрагмента.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей варибельную область тяжелой и/или легкой цепи мыши, где варибельная область тяжелой и/или легкой цепи происходит из антитела, которое содержит V λ человека и С κ мыши.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения перегруппированного гена иммуноглобулина в генетически модифицированной мыши, включающему: (а) воздействие на генетически модифицированную мышь антигеном, где генетическая модификация включает hV λ и hJ λ в локусе легкой цепи λ мыши, где локус легкой цепи λ содержит ген С λ мыши или его функциональный фрагмент; и, (b) выявление перегруппированного гена иммуноглобулина у указанной мыши, где перегруппированный ген иммуноглобулина содержит генный сегмент варибельной области легкой цепи λ и ген С λ , или его функциональный фрагмент.

В одном из вариантов осуществления константный ген легкой цепи λ , или его функциональный фрагмент, выбран из гена С λ человека и гена С λ мыши, или их функционального фрагмента. В определенном варианте осуществления константный ген легкой цепи λ представляет собой ген С λ мыши, или его функциональный фрагмент.

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей варибельную область тяжелой и/или легкой цепи мыши, где варибельная область тяжелой и/или легкой цепи происходит из антитела, которое содержит V λ человека и С λ мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения антитела, включающему воздействие на мышь, как описано в настоящем описании, антигеном, обеспечение повышения иммунного ответа у мыши, который включает получение антитела, специфически связывающего антиген, выявление у мыши перегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь, и выявление у мыши перегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность варибельного домена родственной легкой цепи антитела, где антитело специфически связывается с антигеном, и использование последовательностей нуклеиновых кислот варибельных доменов тяжелой и легкой цепей, слитых с константными доменами человека, для получения необходимого антитела, где необходимое антитело содержит легкую цепь, содержащую домен V λ , слитый с доменом С λ . В одном из вариантов осуществления домен V λ является доменом человека, и домен С λ представляет собой домен С λ человека или мыши. В одном из вариантов осуществления домен V λ представляет собой домен мыши, и домен С λ представляет собой домен С κ человека или мыши.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения антитела, включающему воздействие на мышь, как описано в настоящем описании, антигеном, обеспечение у мыши повышения иммунного ответа, который включает получение антитела, специфически связывающего антиген, выявление у мыши перегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь, и выявление у мыши перегруппированной последовательности

нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность вариабельного домена родственной легкой цепи антитела, где антитело специфически связывается с антигеном, и использование последовательностей нуклеиновых кислот вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей, слитых с последовательностями нуклеиновых кислот константных доменов человека, для получения необходимого антитела, где антитело содержит легкую цепь, содержащую домен V_L , слитый с доменом C_k .

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения антитела, включающему воздействие на мышь, как описано в настоящем описании, антигеном, обеспечение повышения иммунного ответа у мыши, который включает получение антитела, специфически связывающего антиген, выявление у мыши перегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельный домен тяжелой цепи, и выявление у мыши перегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность вариабельного домена родственной легкой цепи антитела, где антитело специфически связывается с антигеном, и использование последовательностей нуклеиновых кислот, слитых с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующих константный домен тяжелой цепи человека и константный домен легкой цепи человека, для получения необходимого антитела, где антитело, которое специфически связывает антиген, содержит легкую цепь, которая содержит домен V_L человека, слитый с областью C_L мыши.

В одном из вариантов осуществления C_L мыши выбрана из C_{L1} , C_{L2} и C_{L3} . В определенном варианте осуществления область C_L мыши представляет собой C_{L2} .

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения последовательности перегруппированного гена вариабельной области легкой цепи антитела, включающему (а) воздействие на мышь, как описано в настоящем описании, антигеном; (b) обеспечение повышения у мыши иммунного ответа; (c) выявление у мыши клетки, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность перегруппированного домена V_L человека, слитого с доменом C_L мыши, где клетка также кодирует родственную тяжелую цепь, содержащую домен V_H человека и домен C_H мыши, и где клетка экспрессирует антитело, которое связывает антиген; (d) клонирование из клетки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей родственный домен V_H человека; и, (e) применение клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека, и клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей родственный домен V_H человека, для получения полностью человеческого антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения последовательности перегруппированного гена вариабельной области легкой цепи антитела, включающему (а) воздействие на мышь, как описано в настоящем описании, антигеном; (b) обеспечение повышения у мыши иммунного ответа; (c) выявление у мыши клетки, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность перегруппированного домена V_L человека, смежного в этой же молекуле нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей домен C_k мыши, где клетка также кодирует родственную тяжелую цепь, содержащую домен V_H человека и домен C_H мыши, и где клетка экспрессирует антитело, которое связывает антиген; (d) клонирование из клетки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека и последовательности нуклеиновой кислоты,

кодирующей родственный домен V_H человека; и, (е) применение клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека, и клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей родственный домен V_H человека, для получения полностью человеческого антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения последовательности перегруппированного гена варибельной области легкой цепи антитела, включающему (а) воздействие на мышь, как описано в настоящем описании, антигеном; (b) обеспечение повышения у мыши иммунного ответа; (с) выявление у мыши клетки, которая содержит ДНК, кодирующую последовательность перегруппированного домена V_L человека, слитую с доменом C_L мыши, где клетка также кодирует родственную тяжелую цепь, содержащую домен V_H человека и домен C_H мыши, и где клетка экспрессирует антитело, которое связывает антиген; (d) клонирование из клетки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей перегруппированный домен V_L человека, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей родственный домен V_H человека; и, (е) применение клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека, и клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей родственный домен V_H человека, для получения полностью человеческого антитела. В одном из вариантов осуществления домен C_L мыши представляет собой домен C_{L2} мыши. В определенном варианте осуществления домен C_L мыши получен из гена C_L , который, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 98% идентичен C_{L2} мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мышью, которая экспрессирует легкую цепь, происходящую из λ человека, слитую с эндогенной константной областью (CL) легкой цепи, где мышь, после иммунизации антигеном, продуцирует антитело, содержащее домен V_L человека, слитый с доменом C_L мыши. В одном из вариантов осуществления домен C_L мыши выбран из домена C_K и домена C_L . В одном из вариантов осуществления домен C_L мыши представляет собой домен C_K . В одном из вариантов осуществления домен C_L мыши представляет собой домен C_L . В определенном варианте осуществления домен C_L представляет собой C_{L2} . В определенном варианте осуществления домен C_L мыши происходит из гена C_L , который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен C_{L2} мыши.

В одном из аспектов изобретение относится к генетически модифицированной мышью, содержащей модифицированный эндогенный локус легкой цепи к или λ , как описано в настоящем описании, которая экспрессирует совокупность легких цепей λ иммуноглобулина, связанную с совокупностью тяжелых цепей иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь содержит последовательность человека. В различных вариантах осуществления последовательность человека выбрана из варибельной последовательности, C_{H1} , шарнира, C_{H2} , C_{H3} и их комбинации. В одном из вариантов осуществления совокупность легких цепей λ иммуноглобулина содержит последовательность человека. В различных вариантах осуществления последовательность человека выбрана из варибельной последовательности, константной последовательности и их комбинации. В одном из вариантов осуществления

мышь содержит "молчащий" эндогенный локус иммуноглобулина и экспрессирует тяжелую цепь и/или легкую цепь λ из трансгена или внехромосомной эписомы. В одном из вариантов осуществления мышь содержит замену в эндогенном локусе мышцы некоторых или всех эндогенных генных сегментов тяжелой цепи мышцы (а именно, V, D, J), и/или некоторых, или всех эндогенных константных последовательностей тяжелой цепи мышцы (например, C_H1, шарнир, C_H2, C_H3, или их комбинации), и/или некоторых или всех эндогенных последовательностей легкой цепи мышцы (например, V, J, константная, или их комбинации), на одну или несколько последовательностей иммуноглобулина человека.

В одном из аспектов изобретение относится к мышце, подходящей для получения антител, которые имеют легкую цепь, происходящую из λ человека, где все, или практически все антитела, полученные в мышце, экспрессируются с легкой цепью, происходящей из λ человека. В одном из вариантов осуществления легкая цепь, происходящая из λ человека, экспрессируется из эндогенного локуса легкой цепи. В одном из вариантов осуществления эндогенный локус легкой цепи представляет собой локус легкой цепи к. В определенном варианте осуществления локус легкой цепи к представляет собой локус легкой цепи к мышце.

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения легкой цепи λ -происхождения для антитела человека, включающему получение от мышцы, как описано в настоящем описании, последовательности легкой цепи и последовательности тяжелой цепи, и применение последовательности легкой цепи и последовательности тяжелой цепи при получении антитела человека.

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения антиген-связывающего белка, включающему воздействие на мышцу, как описано в настоящем описании, антигеном; обеспечение наращивания иммунного ответа у мышцы; и получение от мышцы антиген-связывающего белка, который связывает антиген, или получение от мышцы последовательности, которую используют для получения антиген-связывающего белка, который связывает антиген.

В одном из аспектов изобретение относится к клетке, полученной от мышцы, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления клетка выбрана из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной клетки, индуцированной плюрипотентной клетки, В-клетки и гибридомы.

В одном из аспектов изобретение относится к клетке, которая содержит генетическую модификацию, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой клетку мышцы. В одном из вариантов осуществления клетка выбрана из гибридомы и квадрогибридомы. В одном из вариантов осуществления клетка экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит вариативную последовательность λ человека, слитую с константной последовательностью мышцы. В определенном варианте осуществления константная последовательность мышцы представляет собой константную последовательность к мышце.

В одном из аспектов изобретение относится к ткани, полученная от мышцы, как описано в настоящем описании.

В одном из аспектов изобретение относится к применению мышцы или клетки, как описано в настоящем описании, для получения антиген-связывающего белка. В одном из вариантов осуществления антиген-связывающий белок представляет собой белок человека. В одном из вариантов осуществления белок человека представляет собой антитело человека.

В одном из аспектов изобретение относится к антиген-связывающему белку,

продуцированному мышью, клеткой, тканью, или способом, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления антиген-связывающий белок представляет собой белок человека. В одном из вариантов осуществления белок человека представляет собой антитело человека.

5 Любые из вариантов осуществления и аспектов, описанных в настоящем описании, могут быть использованы в сочетании друг с другом, если не указано иное или очевидно из контекста. Другие варианты осуществления будут очевидны специалисту в данной области из обзора последующего описания.

Краткое описание чертежей

10 На фиг. 1 представлена подробная иллюстрация, без соблюдения масштаба, локуса легкой цепи λ человека, включающего кластеры генных сегментов $V\lambda$ (A, B и C) и пары областей $J\lambda$ и $C\lambda$ (пары J-C).

На фиг. 2 представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, стратегии выбора мишени, используемой для инактивации эндогенного локуса легкой цепи λ 15 мыши.

На фиг. 3 представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, стратегии выбора мишени, используемой для инактивации эндогенного локуса легкой цепи к мыши.

На фиг. 4A представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, первичного 20 направленного вектора для нацеливания эндогенного локуса легкой цепи λ мыши с помощью последовательностей легкой цепи λ человека, включающих 12 генных сегментов $hV\lambda$ и генный сегмент $hJ\lambda 1$ (Направленный вектор 12/1- λ).

На фиг. 4B представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, четырех 25 первичных направленных векторов для нацеливания эндогенного локуса легкой цепи к мыши с помощью последовательностей легкой цепи λ человека, включающих 12 генных сегментов $hV\lambda$ и генный сегмент $hJ\lambda 1$ (Направленный вектор 12/1-к), 12 генных сегментов $hV\lambda$ и генные сегменты $hJ\lambda 1, 2, 3$ и 7 (Направленный вектор 12/4-к), 12 генных сегментов $hV\lambda$, геномную последовательность V_k-J_k человека и генный сегмент $hJ\lambda 1$ (Направленный вектор 12(к)1-к) и 12 генных сегментов $hV\lambda$, геномную 30 последовательность V_k-J_k и генные сегменты $hJ\lambda, 2, 3$ и 7 (Направленный вектор 12(к)4-к).

На фиг. 5A представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, стратегии выбора мишени для прогрессивной инсерции 40 генных сегментов $hV\lambda$ и единственного генного сегмента $hJ\lambda$ в локус легкой цепи λ мыши.

35 На фиг. 5B представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, стратегии выбора мишени для прогрессивной инсерции 40 генных сегментов $hV\lambda$ и единственного генного сегмента $hJ\lambda$ в локус к мыши.

На фиг. 6 представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, этапов 40 выбора мишени и молекулярной инженерии, применяемых при создании уникальных человеческих λ -к гибридных направленных векторов для конструирования гибридного локуса легкой цепи, содержащего межгенную последовательность к человека, совокупность генных сегментов $hJ\lambda$, или и то, и другое.

На фиг. 7A представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, структуры локуса для модифицированного локуса легкой цепи λ мыши, содержащего 40 генных сегментов $hV\lambda$ и единственный генный сегмент $hJ\lambda$, функционально связанных с эндогенным геном $C\lambda 2$.

На фиг. 7B представлена общая иллюстрация, без соблюдения масштаба, структуры локуса для четырех независимых, модифицированных локусов легкой цепи к мыши,

содержащих 40 генных сегментов hVλ и либо один, либо четыре генных сегмента hJλ с, или без, смежной геномной последовательностью Vκ-Jκ человека, функционально связанных с эндогенным геном Сκ.

На фиг. 8А представлены контурные изображения спленоцитов Igλ⁺ и Igκ⁺, селектированных на CD19⁺ от мыши дикого типа (WT), мыши, гомозиготной по 12 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам hJλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (12hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ) и мыши, гомозиготной по 40 генным сегментам hVλ и одному генному сегменту hJλ (40hVλ-1hJλ).

На фиг. 8В представлено общее количество В-клеток CD19⁺ в селезенках, полученных от мышей дикого типа (WT), мышей, гомозиготных по 12 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам hJλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (12hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и одному генному сегменту hJλ (40hVλ-1hJλ).

На фиг. 9А, на верхней панели, представлены контурные изображения спленоцитов, селектированных в синглетах, и окрашенных на В- и Т-клетки (CD19⁺ и CD3⁺, соответственно) от мыши дикого типа (WT) и мыши, гомозиготной по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). На нижней панели представлены контурные изображения спленоцитов, селектированных на CD19⁺ и окрашенных на экспрессию IgA⁺ и Igκ⁺ от мыши дикого типа (WT) и мыши, гомозиготной по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

На фиг. 9В представлено общее количество В-клеток CD19⁺, CD19⁺Igκ⁺ и CD19⁺Igλ⁺ в селезенках, полученных от мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

На фиг. 9С представлены контурные изображения спленоцитов, селектированных на CD19⁺, и окрашенных на иммуноглобулин D (IgD) и иммуноглобулин M (IgM) от мыши дикого типа (WT) и мыши, гомозиготной по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). Зрелые (72 для WT, 51 для 40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ) и промежуточные (13 для WT, 22 для 40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ) В-клетки показаны в каждом из контурных изображений.

На фиг. 9D представлено общее количество В-клеток CD19⁺, промежуточных В-клеток (CD19⁺IgM^{hi}IgD^{lo}) и зрелых В-клеток (CD19⁺IgM^{lo}IgD^{hi}) в селезенках, полученных от мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

На фиг. 10А, на верхней панели, представлены контурные изображения костного мозга, окрашенного на В- и Т-клетки (CD19⁺ и CD3⁺, соответственно), полученного от мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). На нижней панели представлены контурные изображения костного мозга, селектированного на CD19⁺ и окрашенного на skit⁺ и CD43⁺, полученного от мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем

генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). Про- и пре- В-клетки замечены в контурных изображениях на нижней панели.

На фиг. 10B представлено количество про- (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) и пре- (CD19⁺CD43⁻ckit⁻) В-клеток в костном мозге, собранном из бедренной кости мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

На фиг. 10C представлены контурные изображения костного мозга, селектированного в синглетах и окрашенного на иммуноглобулин M (IgM) и B220, полученного от мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ). Незрелые, зрелые, пре/про В-клетки замечены в каждом из контурных изображений.

На фиг. 10D представлено общее количество незрелых (B220^{int}IgM⁺) и зрелых (B220^{hi}IgM⁺) В-клеток в костном мозге, выделенном из бедренной кости мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

На фиг. 10E представлены контурные изображения костного мозга, селектированного на незрелых (B220^{int}IgM⁺) и зрелых (B220^{hi}IgM⁺) В-клетках, и окрашенного на экспрессию Igλ и Igκ, выделенного из бедренной кости мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hVλ и четырем генным сегментам Jλ, в том числе геномной последовательности Vκ-Jκ человека (40hVλ-Vκ-Jκ-4hJλ).

На фиг. 11 представлено выравнивание нуклеотидных последовательностей соединения Vλ-Jλ-Ск из восемнадцати независимых клонов ОТ-ПЦР, амплифицированных из РНК спленоцитов мышей, несущих последовательности генов легкой цепи λ человека в эндогенном локусе легкой цепи к мыши. A6=SEQ ID NO: 57; B6=SEQ ID NO: 58; F6=SEQ ID NO: 59; B7=SEQ ID NO: 60; E7=SEQ ID NO: 61; F7=SEQ ID NO: 62; C8=SEQ ID NO: 63; E12=SEQ ID NO: 64; 1-4=SEQ ID NO: 65; 1-20=SEQ ID NO: 66; 3B43=SEQ ID NO: 67; 5-8=SEQ ID NO: 68; 5-19=SEQ ID NO: 69; 1010=SEQ ID NO: 70; 11A1=SEQ ID NO: 71; 7A8=SEQ ID NO: 72; 3A3=SEQ ID NO: 73; 2-7=SEQ ID NO: 74. Основания, обозначенные строчными буквами, означают незародышевые основания, полученные либо в результате мутации, и/или N-дополнения во время рекомбинации. Консенсусные аминокислоты в пределах области рамки считывания 4 (FWR4), кодируемые нуклеотидной последовательностью hJλ1 и Ск мыши, указаны внизу данного выравнивания последовательностей.

На фиг. 12 представлено выравнивание нуклеотидной последовательностей соединения Vλ-Jλ-Ск из двенадцати независимых клонов ОТ-ПЦР, амплифицированных из РНК спленоцитов мышей, несущих последовательности генов легкой цепи λ человека, в том числе смежную геномную последовательность Vκ-Jκ человека в эндогенном локусе легкой цепи к мыши. 5-2=SEQ ID NO: 87; 2-5=SEQ ID NO: 88; 1-3=SEQ ID NO: 89; 4B-1=SEQ ID NO: 90; 3B-5=SEQ ID NO: 91; 7A-1=SEQ ID NO: 92; 5-1=SEQ ID NO: 93; 4A-1=SEQ ID NO: 94; 11A-1=SEQ ID NO: 95; 5-7=SEQ ID NO: 96; 5-4=SEQ ID NO: 97; 2-3=SEQ ID NO: 98. Основания, обозначенные строчными буквами, означают незародышевые основания, полученные либо в результате мутации, и/или N-дополнения во время рекомбинации. Консенсусные аминокислоты в пределах области рамки считывания 4 (FWR4), кодируемые нуклеотидной последовательностью каждого Jλ1 человека и Ск

мышь, указаны внизу данного выравнивания последовательностей.

На фиг. 13 представлено выравнивание нуклеотидной последовательностей соединения V λ -J λ -C κ из трех независимых клонов ОТ-ПЦР, амплифицированных из РНК спленоцитов мышей, несущих последовательности легкой цепи λ человека в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши. 2D1=SEQ ID NO: 101; 2D9=SEQ ID NO:102; 3E15=SEQ ID NO: 103. Основания, обозначенные строчными буквами, означают незародышевые основания, полученные либо в результате мутации, и/или N-дополнения во время рекомбинации. Консенсусные аминокислоты в пределах области рамки считывания 4 (FWR4), кодируемые нуклеотидной последовательностью hJ λ 1 и C λ 2 мыши, указаны внизу данного выравнивания последовательностей. Подробное описание изобретения

Несмотря на то, что характерные черты различных вариантов осуществления подробно обсуждены, описания специфических аспектов, вариантов осуществления и примеров не ограничивают сущность формулы изобретения; это является формулой изобретения, которая описывает объем настоящего изобретения. Все термины и фразы, используемые в описании включают значения, обыкновенно приписываемые им в данной области.

Термин «смежный» включает ссылку на нахождение в той же самой молекуле нуклеиновой кислоты, например, две последовательности нуклеиновых кислот являются «смежными», если они находятся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, но разделены другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, перегруппированная последовательность V(D)J является «смежной» с последовательностью гена константной области, хотя за конечным кодоном последовательности V(D)J не следует сразу же первый кодон последовательности константной области. В другом примере две последовательности генных сегментов V являются «смежными», если они находятся в одном и том же геномном фрагменте, несмотря на то что они могут быть разделены последовательностью, которая не кодирует кодон области V, например, они могут быть разделены регуляторной последовательностью, например, промотором или другой некодирующей последовательностью. В одном из вариантов осуществления смежная последовательность включает геномный фрагмент, который содержит геномные последовательности, распределенные как в геноме дикого типа.

Фраза «полученный из», когда используется в отношении вариативной области, «полученной из» указанного гена, или генного сегмента, включает возможность установить

последовательность до специфического неперегруппированного генного сегмента или генных сегментов, которые были перегруппированы для формирования гена, который экспрессирует вариативный домен (принимая во внимание, где применимо, различия сплайсинга и соматические мутации).

Используемый в настоящем описании термин «функциональный» в отношении генного сегмента вариативной области, или J-генного сегмента, относится к использованию в экспрессируемом спектре антител; например, среди генных сегментов человека являются функциональными V λ 3-1, 4-3, 2-8, и тому подобное, в то время как генные сегменты V λ 3-2, 3-4, 2-5, и тому подобное, являются нефункциональными.

«Локус тяжелой цепи» включает расположение на хромосоме, например, хромосоме мыши, где у мыши дикого типа обнаружены вариативная ДНК-последовательность тяжелой цепи (V_H), ДНК-последовательность реанжировки тяжелой цепи (D_H), соединительная ДНК-последовательность тяжелой цепи (J_H), и ДНК-последовательность

константной области (C_H) тяжелой цепи.

«Локус κ » включает положение на хромосоме, например, хромосоме мыши, в котором у мыши дикого типа обнаружены переменная ДНК-последовательность κ (V_κ), соединительная ДНК-последовательность κ (J_κ) и константная ДНК-последовательность κ (C_κ).

«Локус λ » включает положение на хромосоме, например, хромосоме мыши, в котором у мыши дикого типа обнаружены переменная ДНК-последовательность λ (V_λ), соединительная ДНК-последовательность λ (J_λ) и константная ДНК-последовательность λ (C_λ).

Термин «неперегруппированный» включает состояние локуса иммуноглобулина, когда генные сегменты V и генные сегменты J (для тяжелых цепей так же генные сегменты D) сохраняются в разрозненном состоянии, но их возможно соединить для образования перегруппированного гена V(D)J, который содержит отдельные V, (D), J из спектра V(D)J.

Мыши, экспрессирующие переменные домены λ человека

Ранее сообщалось о мышцах, которые экспрессируют антитела, являющиеся полностью человеческими, или частично человеческими и частично мышинными. Полученные методами генной инженерии мыши VELOCIMMUNE® содержат замену неперегруппированных генных сегментов V(D)J в эндогенных локусах мыши на генные сегменты V(D)J человека. Мыши VELOCIMMUNE® экспрессируют химерные антитела, имеющие переменные домены человека и константные домены мыши (см., например, патент США №7605237). Большинство других публикаций относятся к мышам, которые экспрессируют полностью человеческие антитела из полностью человеческих трансгенов в мышцах, которые имеют "молчащие" эндогенные локусы иммуноглобулина.

Легкие цепи антител кодируются одним из двух отдельных локусов: каппа (κ) и лямбда (λ). Легкие цепи антител мыши главным образом являются κ -типа. Мыши, которые продуцируют антитела мыши, и модифицированные мыши, которые продуцируют полностью человеческие, или химерные человек-мышь, антитела, демонстрируют смещение в использовании легкой цепи. У человека также наблюдается смещение в использовании легкой цепи, но не так четко выраженное, как у мышей; соотношение между использованием легких цепей κ и легких цепей λ у мышей составляет приблизительно 95:5, тогда как у человека это соотношение составляет приблизительно 60:40. Считается, что более выраженное смещение у мышей не оказывает значительного влияния на разнообразие антител, потому что у мышей переменный локус λ , прежде всего, не является настолько разнообразным. У человека дело обстоит иначе. У человека локус легкой цепи λ отличается большим разнообразием.

У человека локус легкой цепи λ имеет протяженность более 1000 т.п.о., и содержит свыше 80 генов, которые кодируют переменные (V) или соединительные (J) сегменты (фиг. 1). В пределах локуса легкой цепи λ человека более половины всех обнаруженных доменов V_λ кодируются генными сегментами 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, и 3-21. В целом, считают, что приблизительно 30, или около того, генных сегментов V_λ человека являются функциональными. Существуют семь генных сегментов J_λ , и только четыре из них рассматриваются как в целом функциональные генные сегменты J_λ - $J_{\lambda 1}$, $J_{\lambda 2}$, $J_{\lambda 3}$, и $J_{\lambda 7}$.

У человека локус легкой цепи λ по структуре похож на локус κ как мыши, так и человека, тем, что локус легкой цепи λ человека имеет несколько генных сегментов переменной области, которые способны рекомбинироваться для формирования функционального белка легкой цепи. Локус легкой цепи λ человека содержит

приблизительно 70 генных сегментов V и 7 пар генных сегментов Jλ-Сλ. По-видимому, только четыре из этих пар генных сегментов Jλ-Сλ являются функциональными. В некоторых аллелях пятая пара генных сегментов Jλ-Сλ, по некоторым сведениям, является псевдогеном (Сλ6). По-видимому, данные 70 генных сегментов Vλ содержат 38 функциональных генных сегментов. Данные 70 последовательностей Vλ расположены в трех кластерах, каждый из которых содержит различные члены определенных групп семейства генов V (кластеры А, В и С; фиг. 1). Это является потенциально богатым источником относительно неиспользованного разнообразия для получения антител с V-областями человека животными, не являющимися человеком.

В существенном контрасте, локус легкой цепи λ мыши содержит только два или три (в зависимости от штамма) генных сегмента области Vλ мыши (фиг. 2). По меньшей мере по этой причине выраженное к-смещение у мышей, как считается, не является чрезвычайно вредным для общего разнообразия антител.

Согласно опубликованным картам локуса легкой цепи λ мыши, локус состоит, по существу, из двух кластеров генных сегментов в пределах участка приблизительно 200 т.п.о. (фиг. 2). Данные два кластера включают два набора генов V, J, и С, которые способны к независимой перегруппировке: Vλ2-Jλ2-Сλ2-Jλ4-Сλ4 и Vλ1-Jλ3-Сλ3-Jλ1-Сλ1. Хотя было установлено, что Vλ2 рекомбинируется со всеми генными сегментами Jλ, Vλ1, по-видимому, рекомбинируется исключительно с Сλ1. Считается, что Сλ4

представляет собой псевдоген с дефектами участков сплайсинга.

Локус легкой цепи κ мыши является сильно отличается. Структура и количество генных сегментов, которые принимают участие в рекомбинационных событиях, приводящих к формированию функционального белка легкой цепи из локуса κ мыши, являются более сложными (фиг. 3). Таким образом, легкие цепи λ мыши не вносят большого вклада в разнообразие популяции антител у обычной мыши.

Использование богатого разнообразия локуса легкой цепи λ человека у мыши вероятно приведет к образованию, среди прочего, источника более полного спектра доменов V легкой цепи человека. В предыдущих попытках использовать это разнообразие использовали трансгены человека, содержащие фрагменты локуса легкой цепи λ человека, случайным образом введенные в геном мыши (См., например, патент США №6998514 и патент США №7435871). Мыши, содержащие эти случайным образом интегрированные трансгены, по имеющимся данным, экспрессируют полностью легкие цепи λ человека, однако, в некоторых случаях, один или оба эндогенных локуса легкой цепи остаются интактными. Эта ситуация является нежелательной, поскольку последовательности легкой цепи λ человека конкурируют с легкой цепью мыши (κ или λ) в экспрессируемом спектре антител мыши.

В отличие от этого, авторы настоящего изобретения описывают генетически модифицированных мышей, которые способны экспрессировать одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот легкой цепи λ непосредственно из локуса легкой цепи мыши, в том числе, посредством замены в эндогенном локусе легкой цепи мыши. Генетически модифицированные мыши, способные экспрессировать последовательности легкой цепи λ человека из эндогенного локуса, далее могут быть скрещены с мышами, которые содержат локус тяжелой цепи человека, и таким образом могут быть использованы для экспрессии антител, содержащих области V (тяжелые и легкие), которые являются полностью человеческими. В различных вариантах осуществления области V экспрессируются с константными областями мыши. В различных вариантах осуществления не присутствуют эндогенные генные сегменты иммуноглобулина мыши, и области V экспрессируются с константными областями

человека. Эти антитела могут оказаться полезными в многообразных практических применениях, и в диагностических, и в терапевтических.

Многочисленные преимущества могут быть реализованы для различных вариантов осуществления экспрессии связывающих белков, происходящих из генных сегментов V λ и J λ человека в мыши. Преимущества могут быть реализованы в результате помещения последовательностей λ человека в эндогенный локус легкой цепи, например, локус к или λ мыши. Антитела, продуцированные такими мышами, могут иметь легкие цепи, которые содержат домены V λ человека, слитые с областью C λ мыши, особенно, областью С κ или C λ мыши. Мыши также будут экспрессировать домены V λ человека, которые подходят для идентификации и клонирования для использования с областями C λ человека, особенно, областями С κ и/или C λ . Поскольку развитие В-клеток у таких мышей, в остальном, нормальное, возможно образование совместимых доменов V λ (в том числе, соматически видоизмененных доменов V λ) в рамках либо C λ , либо С κ области.

Описаны генетически модифицированные мыши, которые содержат неперегруппированный генный сегмент V λ в локусе легкой цепи к или λ иммуноглобулина. Описаны мыши, которые экспрессируют антитела, содержащие легкую цепь, имеющую домен V λ человека, слитый с областью С κ и/или C λ .

Стерильные транскрипты локуса легкой цепи к иммуноглобулина

Вариации характерных черт экспрессии последовательностей λ иммуноглобулина человека нашли свое отражение в различных вариантах генетически модифицированных мышей, способных к такой экспрессии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, данные генетически модифицированные мыши содержат определенную некодирующую последовательность (последовательности) из локуса человека. В одном из вариантов осуществления генетически модифицированная мышь содержит генные сегменты V λ и J λ человека в эндогенном локусе легкой цепи к, и дополнительно содержит геномный фрагмент легкой цепи к человека. В определенном варианте осуществления геномный фрагмент легкой цепи к человека представляет собой некодирующую последовательность, встречающуюся в природе между генным сегментом V κ человека и генным сегментом J κ человека.

Локусы легкой цепи к человека и мыши содержат последовательности, которые кодируют стерильные транскрипты, в которых отсутствуют либо стартовый кодон, либо открытая рамка считывания, и которые рассматриваются в качестве элементов, которые регулируют транскрипцию локусов легкой цепи к. Эти стерильные транскрипты происходят из межгенной

последовательности, расположенной в 5'-3' направлении, или 3', от наиболее проксимального генного сегмента V κ и в направлении 3'-5', или 5', от интронного энхансера легкой цепи к (E κ i), который находится в направлении 3'-5' гена константной области (С κ) легкой цепи к. Стерильные транскрипты возникают в результате перегруппировки межгенной последовательности для формирования сегмента V κ J κ 1, слитого с С κ .

Замена локуса легкой цепи к в направлении 3'-5' от гена С κ удалит межгенную область, кодирующую стерильные транскрипты. Следовательно, в различных вариантах осуществления, замена последовательности легкой цепи к мыши в направлении 3'-5' от гена С κ мыши на генные сегменты легкой цепи λ человека будет иметь своим результатом гуманизированный локус легкой цепи к мыши, который содержит генные сегменты V λ и J λ человека, но не межгенную область легкой цепи к, которая кодирует стерильные транскрипты.

Как описано в настоящем описании, гуманизация эндогенного локуса легкой цепи

к мыши с помощью генных сегментов легкой цепи λ человека, где посредством гуманизации удаляется межгенная область, приводит в результате к существенному снижению использования локуса легкой цепи κ , в сочетании со значительным повышением использования легкой цепи λ . Следовательно, несмотря на то, что

5 гуманизированная мышь, которая лишена межгенной области, является полезной тем, что может продуцировать антитела с переменными доменами легкой цепи человека (например, домены λ или κ человека), применимость локуса снижена.

Кроме того, описано гуманизация эндогенного локуса легкой цепи κ мыши с помощью генных сегментов $V\lambda$ и $J\lambda$ человека в сочетании с инсерцией межгенной области к

10 человека для получения локуса $V\lambda$, который содержит в отношении транскрипции, между конечным генным сегментом $V\lambda$ человека и первым генным сегментом $J\lambda$ человека, межгенную область κ ; который демонстрирует популяцию В-клеток с более высокой экспрессией, чем локус, в котором отсутствует межгенная область κ . Это наблюдение находится в согласии с гипотезой о том, что межгенная область -

15 непосредственно через стерильный транскрипт, или опосредованно, - подавляет использование из эндогенного локуса легкой цепи λ . В рамках такой гипотезы, включение межгенной области в результате приведет к снижению использования эндогенного локуса легкой цепи λ , оставляя мыши ограниченный выбор, но используя модифицированный локус (λ в κ) для получения антител.

В различных вариантах осуществления замена последовательности легкой цепи κ мыши в направлении 3'-5' от гена $S\kappa$ мыши на последовательность легкой цепи λ человека дополнительно содержит межгенную область легкой цепи κ человека, расположенную, в отношении транскрипции, между 3'-нетранслируемой областью

20 наиболее 3' генного сегмента $V\lambda$ и 5' по отношению к первому генному сегменту $J\lambda$ человека. Альтернативно, такая межгенная область может быть исключена из замены эндогенного локуса легкой цепи κ (в направлении 3'-5' от гена $S\kappa$ мыши) в результате создания делеции в эндогенном локусе легкой цепи λ . Таким же образом, в рамках этого варианта осуществления, мышь продуцирует антитела из эндогенного локуса легкой

25 цепи κ , содержащего последовательности легкой цепи λ человека.

30 Подходы к конструированию мышей для экспрессии доменов $V\lambda$ человека

Описаны различные подходы к получения генетически модифицированных мышей, которые продуцируют антитела, содержащие легкую цепь, которая включает домен $V\lambda$ человека, слитый с эндогенной областью C_L (например, $S\kappa$ или $C\lambda$). Описаны

35 генетические модификации, которые, в различных вариантах осуществления, включают делецию одного или обоих локусов эндогенной легкой цепи. Например, для удаления легких цепей λ мыши из эндогенного спектра антител можно осуществить делецию первого кластера гена $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ и замену, полностью или частично, генных сегментов $V\lambda$ - $J\lambda$ второго кластера гена на генные сегменты $V\lambda$ - $J\lambda$ человека. Также предусмотрены эмбрионы генетически модифицированных мышей, клетки, и направленные конструкции

40 для получения таких мышей, эмбрионов мышей и клеток.

Делеция одного эндогенного кластера гена $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ и замена генных сегментов $V\lambda$ - $J\lambda$ другого эндогенного кластера гена $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ задействуют относительно минимальное нарушение в ассоциации природной константной области антитела и функции у данного животного, в различных вариантах осуществления, поскольку эндогенные гены $C\lambda$

45 остаются интактными и, следовательно, сохраняют нормальную функциональность и способность к ассоциации с константной областью эндогенной тяжелой цепи. Таким образом, в таких вариантах осуществления модификация не затрагивает другие константные области эндогенной тяжелой цепи, находящиеся под воздействием

функциональных константных областей легкой цепи для сборки функциональной молекулы антитела, содержащей две тяжелые цепи и две легкие цепи. Более того, в различных вариантах осуществления модификация не затрагивает сборку функциональной мембраносвязанной молекулы антитела, с участием эндогенной тяжелой цепи и легкой цепи, например, домен hV λ , связанный с областью C λ мыши. Поскольку, по меньшей мере, один функциональный ген C λ сохраняется в эндогенном локусе, животные, содержащие замену генных сегментов V λ -J λ эндогенного кластера гена V λ -J λ -C λ на генные сегменты V λ -J λ человека, должны быть способны продуцировать нормальные легкие цепи λ , которые способны связывать антиген во время иммунного ответа через генные сегменты V λ -J λ , присутствующие в экспрессируемом спектре антител данного животного.

Схематическое изображение (без соблюдения масштаба) делетированного эндогенного кластера гена V λ -J λ -C λ мыши представлено на фиг. 2. Как показано на данном изображении, локус легкой цепи λ мыши упорядочен в два кластера гена, оба содержат функциональные генные сегменты, способные к рекомбинации для создания функциональной легкой цепи λ мыши. Эндогенный кластер генов V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1 мыши делетирован с помощью направленной конструкции (Направленный вектор 1) с неомициновой кассетой, фланкированной центрами рекомбинации. Другой эндогенный кластер генов (V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4) делетирован частично с помощью направленной конструкции (Направленный вектор 2) с гигромицин-тимидин киназной кассетой, фланкированной центрами рекомбинации. В этом втором случае нацеливания эндогенные генные сегменты C λ 2-J λ 4-C λ 4 сохраняются. Вторая направленная конструкция (направленный вектор 2) сконструирована с использованием участков рекомбинации, отличающихся от тех, которые используются в первой направленной конструкции (направленный вектор 1), там самым обеспечивается селективная делеция селекционной кассеты после успешного осуществления нацеливания. Полученный двусторонне-целевой локус является функционально выключенным, в котором не может продуцироваться эндогенная легкая цепь λ . Данный модифицированный локус можно использовать для инсерции генных сегментов V λ и J λ человека для получения эндогенного локуса λ мыши, содержащего генные сегменты V λ и J λ человека, посредством чего, после рекомбинации в модифицированном локусе, животное продуцирует легкие цепи λ , содержащие перегруппированные генные сегменты V λ и J λ человека, связанные с эндогенным генным сегментом C λ мыши.

Генетическое модифицирование мыши для получения эндогенных генных сегментов λ нефункциональными, в различных вариантах осуществления, приводит к получению мыши, которая продуцирует исключительно легкие цепи λ в своем спектре антител, что делает такую мышь подходящей для оценки роли легких цепей λ в иммунном ответе, и которые подходят для получения спектра антител, содержащих домены V κ , но не домены V λ .

Генетически модифицированную мышь, которая экспрессирует hV λ , связанный с геном C λ мыши, рекомбинированные в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши, можно получить, используя любой способ, известный в данной области. Схематическое изображение (без соблюдения масштаба) замены эндогенных генных сегментов V λ 2-V λ 3-J λ 2 мыши на генные сегменты V λ и J λ человека представлено на фиг. 4А. Как показано на данном изображении, эндогенный локус легкой цепи λ мыши, который был воссоздан нефункциональным, заменен с помощью направленной конструкции (направленный вектор 12/1- λ), которая включает неомициновую кассету, фланкированную участками рекомбинации. Генные сегменты V λ 2-V λ 3-J λ 2 заменены

на геномный фрагмент, содержащий последовательность λ человека, которая включает 12 генных сегментов hV λ и единственный генный сегмент hJ λ .

Таким образом, этот первый подход располагает один или несколько генных сегментов hV λ в эндогенном локусе легкой цепи λ , смежно с единственным генным сегментом hJ λ (фиг. 4А).

Дополнительные модификации в модифицированном эндогенном локусе легкой цепи λ могут быть обеспечены с использованием аналогичных технологий для инсерции большего числа генных сегментов hV λ . Например, на Фиг. 5А представлено схематическое изображение двух дополнительных направленных конструкций (направленные векторы +16- λ и +12- λ), использованных для прогрессивной вставки дополнительных генных сегментов hV λ человека. Как представлено на данном изображении, дополнительные геномные фрагменты, содержащие определенные генные сегменты hV λ человека, вставлены в модифицированный эндогенный локус легкой цепи λ на последовательных этапах, с использованием гомологии, обеспеченной предыдущей вставкой последовательностей легкой цепи λ человека. После рекомбинации с каждой проиллюстрированной направленной конструкцией, в последовательной манере, 28 дополнительных генных сегментов hV λ были встроены в модифицированный эндогенный локус легкой цепи λ . В результате этого создан химерный локус, который продуцирует белок легкой цепи λ , который содержит генные сегменты V λ -J λ человека, соединенные с геном C λ мыши.

Описанные выше способы вставки генных сегментов легкой цепи λ человека в локус λ мыши сохраняют энхансеры, расположенные в 5'-3' направлении от генных сегментов C λ 2-J λ 4-C λ 4 (обозначенные Enh2.4, Enh и Enh3.1 на фиг. 4А и фиг. 5А). Такой подход в результате приводит к единственному модифицированному аллелю в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши (фиг. 7А).

Изобретение также относится к композициям и способам получения мыши, которая экспрессирует легкую цепь, содержащую генные сегменты hV λ и J λ , функционально связанные с генным сегментом C λ мыши, в том числе к композициям и способам получения мыши, которая экспрессирует такие гены из эндогенного локуса легкой цепи λ мыши. Способы включают выборочное приведение в нефункциональное состояние одного эндогенного кластера гена V λ -J λ -C λ мыши (например, посредством направленной делеции), и применение генных сегментов hV λ и J λ в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши для экспрессии домена hV λ у мыши.

Альтернативно, во втором способе, генные сегменты легкой цепи λ человека могут быть расположены в эндогенном локусе легкой цепи κ . Генетическая модификация, в различных вариантах осуществления, включает делецию эндогенного локуса легкой цепи κ . Например, для того, чтобы удалить легкие цепи κ мыши из эндогенного спектра антител, может быть осуществлена делеция генных сегментов V κ и J κ мыши. Также предусмотрены генетически модифицированные эмбрионы мыши, клетки и направленные конструкции для получения мышей, эмбрионов мышей и клеток.

По изложенным выше причинам, делеция генных сегментов V κ и J κ мыши осуществляется с относительно минимальным ущербом. Схематическое изображение (без соблюдения масштаба) делетированных генных сегментов V κ и J κ мыши представлено на фиг. 3. Эндогенные генные сегменты V κ и J κ мыши удалены посредством опосредованной рекомбиназами делеции последовательностей мыши, расположенных между двумя точно расположенными направленными векторами, каждый из которых содержит сайт-специфические участки рекомбинации. Первый направленный вектор (направленный вектор J κ) используется в первом случае

нацеливания для удаления генных сегментов J κ мыши. Вторым направленным вектор (Направленный вектор V κ) используется во втором случае нацеливания для удаления последовательности, расположенной в 5'-направлении от наиболее удаленного генного сегмента V κ мыши. Оба направленных вектора содержат сайт-специфические участки рекомбинации, что делает возможным выборочное удаление обеих селекционных кассет и всех промежуточных последовательностей легкой цепи к мыши после успешного осуществления нацеливания на мишень. Полученный в результате делетированный локус является функционально "молчащим" в том смысле, что эндогенная легкая цепь к не может быть получена. Этот модифицированный локус можно использовать для инсерции генных сегментов hV λ и J λ для создания эндогенного локуса к мыши, содержащего генные сегменты hV λ и J λ , посредством чего, после рекомбинации в модифицированном локусе, животное продуцирует легкие цепи λ , содержащие перегруппированные генные сегменты hV λ и J λ , функционально связанные с эндогенным генным сегментом S κ мыши. Различные направленные векторы, содержащие последовательности легкой цепи λ человека, можно использовать в сочетании с этим делетированным локусом к мыши, для создания гибридного локуса легкой цепи, содержащего генные сегменты λ человека, функционально связанные с областью S κ мыши.

Таким образом, второй подход фиксирует один или несколько генных сегментов V λ человека, расположенных в локусе легкой цепи к мыши сопредельно с единственным генным сегментом J λ человека (направленный вектор 12/1-к, фиг. 4B).

В различных вариантах осуществления модификации данного подхода могут быть проведены для добавления генных сегментов и/или регуляторных последовательностей для оптимизации использования последовательностей легкой цепи λ человека из локуса легкой цепи к мыши в пределах спектра антител мыши.

В третьем подходе один или несколько генных сегментов hV λ расположены в локусе легкой цепи к мыши, смежном с четырьмя генными последовательностями hJ λ (направленный вектор 12/4-к, фиг. 4B).

В третьем подходе один или несколько генных сегментов hV λ расположены в локусе легкой цепи к мыши, смежном с межгенной последовательностью к человека и единственной генной последовательностью hJ λ (направленный вектор 12(к)1-к, фиг. 4B).

В четвертом способе один или несколько генных сегментов hV λ помещены в локус легкой цепи к мыши, смежный с межгенной последовательностью к человека и четырьмя генными последовательностями hJ λ (направленный вектор 12(к)4-к, фиг. 4B).

Все вышеописанные подходы вставки генных сегментов легкой цепи λ человека в локус к мыши сохраняют элемент интронного энхансера к в направлении 3'-5' от гена S κ (обозначенный E κ i, Фиг. 4B и Фиг. 5B) и 3' энхансер к в направлении 5'-3' от гена S κ (обозначен E κ 3', Фиг. 4B и Фиг. 5B). В результате данного подхода получают четыре отдельных модифицированных аллеля в эндогенном локусе легкой цепи к мыши (фиг. 7B).

В различных вариантах осуществления генетически модифицированная мышь содержит "нокаут" локус эндогенной легкой цепи λ мыши. В одном из вариантов осуществления локус легкой цепи λ выключен с помощью метода, в котором удаляется область, простирающаяся от V λ 2 до J λ 2, и область, простирающаяся от V λ 1 до S λ 1 (фиг. 2). Любые стратегии, в результате которых снижается или исключается способность эндогенного локуса легкой цепи λ экспрессировать эндогенные домены λ , подходят для использования с вариантами осуществления настоящего изобретения.

Антитела, содержащие домен лямбда, полученные от генетически модифицированных мышей

Мыши, содержащие последовательности λ человека либо в локусе легкой цепи к, либо в локусе легкой цепи λ , будут экспрессировать легкую цепь, которая содержит область hV λ , слитую с областью C λ (C κ или C λ) мыши. Эти мыши успешно скрещиваются с мышами, которые (а) содержат функционально "молчащий" локус легкой цепи (например, нокаут эндогенный локус легкой цепи к или λ мыши); (b) содержат эндогенный локус легкой цепи λ мыши, который содержит генные сегменты hV и hJ, функционально связанные с эндогенным геном C λ мыши; (с) содержат эндогенный локус легкой цепи к мыши, который включает генные сегменты hV κ и hJ κ , функционально связанные с эндогенным геном C κ мыши; и, (d) мышью, у которой один аллель к содержит hV κ и hJ κ ; другой аллель к содержит hV λ и hJ λ ; один аллель λ содержит hV λ и hJ λ , и другой аллель λ является молчащим или выключенным, или оба аллеля λ содержат hV λ и hJ λ ; и два аллеля тяжелой цепи, каждый из которых содержит hV H , hD H и hJ H .

Антитела, которые содержат домены hV λ , экспрессируемые либо в области C κ , либо в области C λ , используют для получения полностью человеческих антител с помощью клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих домены hV λ в экспрессионные конструкции, которые несут гены, кодирующие C λ человека. Полученные экспрессионные конструкции трансфицируют в подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител, которые демонстрируют полностью человеческий домен hV λ , слитый с hC λ .

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предоставлены для того, чтобы описать, как получать и применять способы и композиции по настоящему изобретению, и они не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Если не оговорено иначе, температура указана в градусах по Цельсию и давление является близким к атмосферному.

Пример I

Делеция локусов легкой цепи иммуноглобулина мыши Различные конструкции направленного действия были созданы с помощью технологии VELOCIGENE® (см., например, патент США №6586251 и Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21 (6): 652-659) для модификации геномных библиотек Бактериальной Искусственной Хромосомы (BAC) мыши для того, чтобы инактивировать локусы легкой цепи к и λ мыши.

Делеция локуса легкой цепи λ мыши. ДНК клона RP23-135k15 BAC мыши (Invitrogen) была модифицирована посредством гомологичной рекомбинации для инактивации эндогенного локуса легкой цепи λ мыши в результате направленной делеции кластера гена V λ -J λ -C λ (фиг. 2).

Кратко, весь проксимальный кластер, содержащий генные сегменты V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1, был делетирован в ходе единственного случая нацеливания с использованием направленного вектора, содержащего неомициновую кассету, фланкированную Сайтами loxP, с 5' на гомологичное плечо мыши, содержащее 5'-последовательность генного сегмента V λ 1, и на 3' гомологичное плечо мыши, содержащим 3'-последовательность генного сегмента C λ 1 (фиг. 2, Направленный вектор 1).

Вторая нацеливающая конструкция была подготовлена для точной делеции дистального эндогенного кластера гена λ мыши, содержащего V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4, за

исключением того, что нацеливающая конструкция содержала 5' гомологичное плечо мыши, содержащее последовательность 5' генного сегмента V λ 2, и 3' гомологичное плечо мыши, которое содержало последовательность 5' к эндогенному генному сегменту C λ 2 (фиг. 2, направленный вектор 2). Таким образом, вторая нацеливающая конструкция точно удаляет V λ 2-J λ 2, оставляя C λ 2-J λ 4-C λ 4 интактным в эндогенном локусе λ мыши. Присутствие клеток ES, содержащих инактивированный эндогенный локус λ (как описано выше), было подтверждено с использованием способов кариотипирования и скрининга (например, TAQMAN®), известных в уровне техники. Затем, ДНК была выделена из модифицированных клеток ES и подвержена обработке рекомбиназой CRE, тем самым опосредуя делецию проксимальной направленной кассеты, содержащей маркерный ген неомицина, оставляя только единственный участок loxP в точке делеции (фиг. 2, внизу).

Делеция локуса легкой цепи к мыши. Несколько нацеливающих конструкций были созданы с использованием методов, аналогичных описанным выше, для модификации ДНК клонов ВАС мыши RP23-302g12 и RP23-254m04 (Invitrogen) посредством гомологичной рекомбинации для инактивации локуса легкой цепи к мыши в двухстадийном процессе (Фиг. 3).

Кратко, генные сегменты J κ (1-5) эндогенного локуса легкой цепи к мыши были удалены в ходе единственного случая нацеливания с использованием направленного вектора, содержащего гигромицин-тимидинкиназную кассету (hyg-TK), содержащую единственный сайт loxP 3' к кассете hyg-TK (фиг. 3, направленный вектор J κ).

Гомологичные плечи, использованные для создания этого направленного вектора, содержат геномную последовательность мыши 5' и 3' эндогенных генных сегментов J κ мыши. Во втором случае нацеливания второй направленный вектор был подготовлен для удаления части геномной последовательности мыши в направлении 3'-5' (5') к наиболее дистальному эндогенному генному сегменту V κ мыши (фиг. 3, направленный вектор V κ). Этот направленный вектор содержал инвертированный сайт lox511, сайт loxP и неомициновую кассету. Гомологичные плечи, использованные для создания этого направленного вектора, содержали геномную последовательность мыши в направлении 3'-5' от наиболее дистального генного сегмента V κ мыши. Направленные векторы использовали в последовательной манере (а именно, сначала J κ , затем V κ) в ДНК-мишени в клетках ES. Наличие ES, несущих двусторонне-нацеленную хромосому (а именно, единственный эндогенный локус к мыши, нацеленный обоими направленными векторами), было подтверждено с помощью методов кариотипирования и скрининга (например, Taqman™), известных в данной области. Затем ДНК выделяли из модифицированных клеток ES и подвергали обработке рекомбиназой Cre, тем самым опосредуя делецию эндогенных генных сегментов V κ мыши и обеих селективных кассет, оставляя два объединенных lox-сайта в противоположной ориентации относительно друг друга (фиг. 3, внизу; SEQ ID NO: 1).

Таким образом, два модифицированных эндогенных локуса легкой цепи (к и λ), содержащие интактный энхансер и константные области, были созданы для прогрессивной инсерции неперегруппированных генных сегментов эмбрионального типа λ человека в точно определенной манере с использованием направленных векторов, описанных ниже.

Пример II

Замена локусов легкой цепи мыши на мини-локус легкой цепи λ человека

Множественные направленные векторы были сконструированы для прогрессивной инсерции генных сегментов λ человека в эндогенные локусы легкой цепи к и λ мыши с

использованием методов, аналогичных описанным выше. Множественные независимые первичные модификации были проделаны с эндогенными локусами легкой цепи, каждая приводит к образованию химерного локуса легкой цепи, содержащего генные сегменты hV λ и J λ , оперативно связанные с константными генами и энхансерами легкой цепи

5 мыши.

Мини-локус λ человека, содержащий 12 генных сегментов V λ человека и один генный сегмент J λ человека. Серии первичных направленных векторов были сконструированы таким образом, чтобы содержать первые 12 последовательных генных сегментов V λ человека из кластера A и генный сегмент hJ λ 1, или четыре генных сегмента hJ λ , используя

10 клон ВАС человека, называемый RP11-729g4 (Invitrogen). На фиг. 4А и 4В представлены направленные векторы, которые были сконструированы для осуществления начальной инсерции генных сегментов легкой цепи λ человека в локусах легкой цепи λ и к мыши, соответственно.

Для первого комплекта первичных направленных векторов фрагмент ДНК, размером

15 124125 п.о., из клона ВАС 729g4, содержащий 12 генных сегментов hV λ и генный сегмент hJ λ 1, был сконструирован таким образом, чтобы содержать участок PI-SceI, 996 п.о. в направлении 5'-3' (3') от генного сегмента hJ λ 1, для лигирования 3' гомологичного плеча мыши. Два различных комплекта гомологичных плеч использовали для лигирования с этим фрагментом человека; один комплект гомологичных плеч содержал эндогенные

20 последовательности λ мыши из клона ВАС 135k15 (фиг. 4А), и другой комплект содержал эндогенную последовательность к 5' и 3' генных сегментов V κ и J κ мыши из клонов ВАС мыши RP23-302g12 и RP23-254m04, соответственно (фиг. 4В).

Для направленного вектора 12/1- λ (Фиг. 4А) был сконструирован сайт PI-SceI на 5'-конце ДНК-фрагмента размером 27847 п.о., содержащем C λ 2-J λ 4-C λ 4 мыши и энхансер

25 2.4 модифицированного локуса λ мыши, описанного в Примере 1. Фрагмент мыши, размером ~28 т.п.о., использовали в качестве 3' гомологичного плеча посредством лигирования с фрагментом λ человека размером ~124 т.п.о., что создавало 3'-соединение, содержащее от 5' до 3', генный сегмент hJ λ 1, 996 п.о. последовательности λ человека 3' от генного сегмента hJ λ 1, 1229 п.о. из последовательности λ мыши 5' к гену C λ 2 мыши,

30 ген мыши C λ 2 и оставшуюся часть мышинового фрагмента ~28 т.п.о. В направлении 3'-51 (5') от генного сегмента V λ 3-12 человека была дополнительная последовательность λ человека, размером 1456 п.о., до начала гомологичного плеча мыши 5', которая содержала 23792 п.о. геномной ДНК мыши, соответствующей последовательности 5' эндогенного локуса λ мыши. Между гомологичным плечом 5' и началом

35 последовательности λ человека находилась неомициновая кассета, фланкированная сайтами Frt.

Таким образом, направленный вектор 12/1- λ включал от 5' до 3', 5'-гомологичное плечо, содержащее ~24 т.п.о. геномной последовательности λ мыши 5' от эндогенного локуса λ , 5' сайт Frt, неомициновую кассету, 3' сайт Frt, ~123 т.п.о. геномной

40 последовательности λ человека, содержащий первые 12 последовательных генных сегмента hV λ и генный сегмент hJ λ 1, сайт PI-SceI, и 3' гомологичное плечо, содержащее ~28 т.п.о. геномной последовательности мыши, в том числе эндогенные генные сегменты C λ 2-J λ 4-C λ 4, последовательность энхансера 2.4 мыши и дополнительную геномную последовательность мыши в направлении 5'-3' (3') от энхансера 2.4 (фиг. 4А).

Аналогично, в направленном векторе 12/1- κ (Фиг. 4В) использовался тот же самый фрагмент λ человека размером ~124, за исключением того, что гомологичные плечи мыши, содержащие последовательность к мыши, были использованы так, чтобы нацеливание на эндогенный локус к могло быть достигнуто посредством гомологичной

рекомбинации. Таким образом, направленный вектор 12/1-к включал от 5' до 3', 5' гомологичное плечо, содержащее геномную последовательность мыши, размером ~23 т.п.о., 5' от эндогенного локуса к, сайт I-CeuI, 5' сайт Frt, неомициновую кассету, 3' сайт Frt, ~124 т.п.о. геномной последовательности λ человека, содержащей первые 12 последовательных генных сегмента hV λ и генный сегмент hJ λ 1, сайт PI-SceI, и 3' гомологичное плечо, содержащее ~28 т.п.о. геномной последовательности мыши, в том числе, эндогенный ген Ск мыши, Ек1 и Ек3' и дополнительную геномную последовательность мыши в направлении 5'-3' (3') от Ек3' (фиг. 4В, направленный вектор 12/1-к).

Гомологичная рекомбинация с любым из этих двух первичных направленных векторов приводит к образованию модифицированного локуса легкой цепи мыши (к или λ), содержащего 12 генных сегментов hV λ и генный сегмент hJ λ 1, функционально связанных с эндогенным константным геном легкой цепи мыши и энхансерами (Ск или С λ 2 и Ек1/Ек3', или Enh2.4/Enh3.1), что после рекомбинации, приводит к формированию химерной легкой цепи λ .

Мини-локус λ человека с 12 генными сегментами V λ человека и четырьмя генными сегментами J λ человека. В другом способе, для того, чтобы добавить разнообразия химерному локусу легкой цепи λ , был сконструирован третий направленный вектор для инсерции первых 12 последовательных генных сегментов V λ человека из кластера А, и генных сегментов hJ λ 1, 2, 3 и 7, в локус легкой цепи к мыши (Фиг. 4В, Направленный вектор 12/4-к). Сегмент ДНК, содержащий генные сегменты hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 и J λ 7, был создан посредством синтеза ДНК de novo (Integrated DNA Technologies), включая каждый генный сегмент J λ и геномную последовательность человека ~100 п.о. из обеих ближайших 5' и 3' областей каждого генного сегмента J λ . Участок PI-SceI был сконструирован на 3'-конце этого фрагмента ДНК размером ~1 т.п.о., и лигирован с кассетой устойчивости к хлорамфениколу. Гомологичные плечи с помощью ПЦР были амплифицированы из последовательности λ человека в положениях 5' и 3' относительно генного сегмента hJ λ 1 клона ВАС 729g4 человека. Гомологичную рекомбинацию с этим промежуточным направленным вектором осуществляли на модифицированном клоне ВАС 729g4, который ранее был намечен мишенью в направлении 3'-5' (5') от генного сегмента V λ 3-12 человека с помощью неомициновой кассеты, фланкированной участками Frt, который также содержал участок I-CeuI в 5'-положении относительно 5'-участка Frt. двухнацеленный клон ВАС 729g4 включал от 5' до 3', участок I-CeuI, 5' участок Frt, неомициновую кассету, 3' участок Frt, фрагмент размером ~123 т.п.о., содержащий первые 12 генных сегментов hV λ , фрагмент размером ~1 т.п.о., содержащий генные сегменты J λ 1, 2, 3 и 7 человека, участок PI-SceI, и кассету устойчивости к хлорамфениколу. Этот промежуточный направленный вектор был расщеплен совместно с помощью I-CeuI и PI-SceI, и последовательно лигирован в модифицированный клон ВАС мыши (описан выше) для создания третьего направленного вектора.

В результате этого лигирования получают третий направленный вектор для инсерции последовательностей λ человека в эндогенный локус легкой цепи к мыши, что включает от 5' до 3', 5' гомологичное плечо мыши, содержащее геномную последовательность размером ~23 т.п.о. 5' эндогенного локуса к мыши, участок I-CeuI, 5' участок Frt, неомициновую кассету, 3' участок Frt, фрагмент размером ~123 т.п.о., содержащий первые 12 генных сегментов hV λ , фрагмент размером ~1 т.п.о., содержащий генные сегменты hJ λ 1, 2, 3 и 7, участок PI-SceI и 3' гомологичное плечо, содержащее геномную последовательность мыши размером ~28 т.п.о., в том числе эндогенный ген Ск мыши, Ек1 и Ек3', и дополнительную эндогенную последовательность мыши в направлении

5'-3' (3') от Ек3' (Фиг. 4В, направленный вектор 12/4-к). В результате гомологичной рекомбинации с этим третьим направленным вектором получается модифицированный локус легкой цепи к мыши, содержащий 12 генных сегментов hVλ и четыре генных сегмента hJλ, функционально связанных с эндогенным геном Ск мыши, что, после

рекомбинации, приводит к формированию химерной легкой цепи λ человека/к мыши.

Мини-локус λ человека с интегрированной последовательностью легкой цепи к человека. Аналогичным образом, два дополнительных направленных вектора, похожих на сконструированные для осуществления первичной инсерции генных сегментов λ человека в эндогенный локус легкой цепи к (фиг. 4В, Направленный вектор 12/1-к и 12/4-к), были созданы для прогрессивной инсерции генных сегментов легкой цепи λ человека, с использованием сконструированных единственным образом направленных векторов, содержащих смежные геномные последовательности λ и к человека. Эти направленные векторы были сконструированы таким образом, чтобы включали геномную последовательность к человека размером ~23 т.п.о., по природе

15 расположенную между генными сегментами Vκ4-1 и Jκ1. Эта геномная последовательность к человека была специфически помещена в этих двух дополнительных направленных векторах между генными сегментами Vλ и Jλ человека (фиг. 4В, Направленные векторы 12(к)1-к и 12(к)4-к).

Оба направленных вектора, содержащих геномную последовательность к человека, были созданы с использованием модифицированного клона ВАС RP11-729g4, описанного выше (фиг. 6). Этот модифицированный клон ВАС был нацелен с помощью спектиномициновой селекционной кассеты, фланкированной Сайтами рестрикции NotI и AsiSI (фиг. 6, вверху слева). Гомологичная рекомбинация с использованием спектиномициновой кассеты приводит в результате к двусторонне нацеленному клону ВАС 729g4, который включает от 5' до 3', участок I-CeuI, 5' участок Frt, неомициновую кассету, 3' участок Frt, фрагмент размером ~123 т.п.о., содержащий первые 12 генных сегментов hVλ, сайт NotI приблизительно 200 п.о. в направлении 5'-3' (3') к девятичленной последовательности генного сегмента hVλ3-1, спектиномициновую кассету и AsiSI. Отдельный клон ВАС человека, содержащий последовательность к человека (CTD-2366j12) был нацелен два раза, независимо друг от друга, для конструкции сайтов рестрикции в участках между генными сегментами hVκ4-1 и hJκ1, для обеспечения последующего клонирования фрагмента размером ~23 т.п.о. для лигирования с генными сегментами hVλ, содержащимися в двусторонне нацеленном модифицированном клоне ВАС 729g4 (фиг. 6, вверху справа).

Кратко, размер клона ВАС 2366j12 составляет около 132 т.п.о., и он содержит генные сегменты hVκ 1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, геномную последовательность к человека в направлении 5'-3' от генных сегментов Vκ, генные сегменты hJκ 1-5, hCκ и приблизительно 20 т.п.о. дополнительной геномной последовательности локуса к человека. Этот клон сначала был нацелен с помощью направленного вектора, содержащего гигромициновую кассету, фланкированную участками Frt и участком NotI в направлении 5'-3 (3') от 3'-участка Frt. Гомологичные плечи для этого направленного вектора содержали геномную последовательность 5' и 3' генных сегментов Vκ человека в пределах клона ВАС, так что после гомологичной рекомбинации с этим направленным вектором, генные сегменты Vκ были удалены и участок NotI был сконструирован ~133 п.о. в направлении 5'-3' от генного сегмента hVκ4-1 (фиг. 6, вверху справа). Этот модифицированный клон ВАС 2366j12 был нацелен независимо двумя направленными векторами на 3'-конце для удаления генных сегментов hJκ с кассетой хлорамфеникола, которые также содержали либо генный сегмент hJλ1, участок PI-SceI и участок AsiSI,

или геномный фрагмент λ человека, содержащий четыре генных сегмента hJ λ (выше), участок PI-SceI и участок AsiSI (фиг. 6, вверху справа). Гомологичные плечи для этих двух похожих направленных векторов содержали последовательность 5' и 3' генных сегментов hJ κ . В результате гомологичной рекомбинации с этими вторыми

5 направленными векторами и модифицированным клоном ВАС 2366j12 образуется двусторонне нацеленный клон 2366j12, который включает от 5' до 3', 5'-участок Frt, гигромициновую кассету, 3'-участок Frt, участок NotI, 22800 п.о. геномного фрагмента локуса к человека, содержащего межгенную область между генными сегментами V κ 4-1 и J κ I, либо генный сегмент hJ λ 1, либо геномный фрагмент λ человека, содержащий hJ λ 1, JA2, JA3 и J λ 7, участок PI-SceI и кассету хлорамфеникола (фиг. 6, вверху справа). Два

10 последних направленных вектора для осуществления двух дополнительных модификаций, были получены в двух этапах лигирования с использованием двусторонне нацеленных клонов 729g4 и 2366j12.

Двусторонне нацеленные клоны 729g4 и 2366j12 были расщеплены с помощью NotI

15 и AsiSI, с образованием одного фрагмента, содержащего неомициновую кассету и генные сегменты hV λ , и другого фрагмента, содержащего ~23 т.п.о. геномного фрагмента локуса к человека, содержащего межгенную область между генными сегментами V κ 4-1 и J κ I, либо генный сегмент hJ λ 1, либо геномный фрагмент, содержащий генные сегменты hJ λ 1, JA2, JA3 и J λ 7, участок PI-SceI и кассету хлорамфеникола, соответственно. В

20 результате лигирования этих фрагментов получали два уникальных клон ВАС, содержащих от 5' до 3', генные сегменты hV λ , геномную последовательность к человека между генными сегментами V κ 4-1 и J κ 1, либо генный сегмент hJ λ 1, либо геномный фрагмент, содержащий генные сегменты hJ λ 1, JA2, JA3 и J λ 7, участок PI-SceI и кассету хлорамфеникола (фиг. 6, внизу). Эти новые клоны ВАС затем были расщеплены с

25 помощью I-CeuI и PI-SceI, для высвобождения уникальных фрагментов, содержащих неомициновую кассету в направлении 3'-5' и смежные последовательности λ и к человека, и лигированы в модифицированный клон ВАС 302g12 мыши, который содержал от 5'-3', геномную последовательность 5' эндогенного локуса к мыши, участок I-CeuI, 5' участок Frt, неомициновую кассету, 3' участок Frt, генные сегменты hV λ (от 3-12 до 3-

30 1), участок NotI ~200 п.о. в направлении 5'-3' от V λ 3-1, ~23 т.п.о. последовательности к человека, в природе обнаруженную между генными сегментами V κ 4-1 и J κ 1 человека, либо генный сегмент hJ λ 1 или геномный фрагмент, содержащий генные сегменты hJ λ 1, J λ 2, J λ 3 и J λ 7, E κ 1 мыши, ген Ск мыши и E κ 3' (фиг. 4, Направленные векторы 12hV λ -V κ J κ -hJ λ 1 и 12hV λ -V κ J κ 4hJ λ). Гомологичная рекомбинация с обоими этими

35 направленными векторами создает в результате два отдельных модифицированных локуса легкой цепи к мыши, содержащий 12 генных сегментов hV λ , геномную последовательность к человека, и либо один, либо четыре генных сегмента hJ λ , функционально связанных с эндогенным геном Ск мыши, что, после рекомбинации, приводит к формированию химерной легкой цепи λ человека/к мыши.

40 Пример III

Конструирование дополнительных генных сегментов V λ человека в мини-локусе легкой цепи λ человека

Дополнительные генные сегменты hV λ были добавлены независимо к каждой из первоначальных модификаций, описанных в Примере 2, с использованием аналогичных

45 направленных векторов и способов (фиг. 5А, Направленный вектор +16- λ , и фиг. 5В, Направленный вектор +16- κ).

Введение 16 дополнительных генных сегментов V λ человека. Расположенные в 3'-5' направлении (5') гомологичные плечи использовали при конструировании направленных

векторов для добавления 16 дополнительных генных сегментов hVλ к модифицированным локусам легкой цепи, описанным в Примере 2, содержащим 5' геномную последовательность мыши либо эндогенных локусов легкой цепи к, либо эндогенных локусов легкой цепи λ. 3' гомологичные плечи были одинаковыми для всех направленных векторов и содержали геномные последовательности человека, перекрывающиеся с 5'-концом последовательности λ человека модификаций, как описано в Примере 2.

Коротко, два направленных вектора были сконструированы для введения 16 дополнительных генных сегментов hVλ в модифицированные локусы легкой цепи мыши, описанные в Примере 2 (фиг. 5А и 5В, Направленный вектор +16-λ или +16-к). Фрагмент ДНК размером ~172 т.п.о. из клона ВАС RP11-761113 человека (Invitrogen), содержащий 21 последовательных генных сегментов hVλ из кластера А, был сконструирован с 5' гомологичным плечом, содержащим 5' геномную последовательность мыши либо эндогенных локусов легкой цепи к или λ мыши и 3' гомологичное плечо, содержащее геномную последовательность λ человека. 5' гомологичные плечи к или λ мыши, использованные в этих нацеливающих конструкциях, были теми же 5' гомологичными плечами, что и описанные в Примере 2 (фиг. 5А и 5В). 3' гомологичное плечо включало перекрывающийся участок 53057 п.о. геномной последовательности λ человека, соответствующей эквивалентному 5'-концу фрагмента размером ~123 т.п.о. геномной последовательности λ человека, описанной в Примере 2. Эти два направленных вектора содержали от 5' до 3', 5' гомологичное плечо мыши, содержащее либо ~23 т.п.о. геномной последовательности 5' эндогенного локуса легкой цепи к мыши, либо ~24 т.п.о. геномной последовательности мыши 5' эндогенного локуса легкой цепи λ, 5' участок Frt, гигромициновую кассету, 3' участок Frt и 171457 п.о. геномной последовательности λ человека, включающей 21 последовательных генных сегментов hVλ, ~53 т.п.о. которых перекрываются с 5'-концом последовательности λ человека, описанной в Примере 3 и выполняют функцию 3' гомологичного плеча для этой нацеливающей конструкции (фиг. 5А и 5В, Направленные векторы +16-λ или +16-к). В результате гомологичной рекомбинации с этими направленными векторами получают независимо модифицированные локусы легкой цепи к и λ мыши, каждый содержащий 28 генных сегментов hVλ и генный сегмент hJλ1, функционально связанные с эндогенными константными генами мыши (Ск или Сλ2), что после рекомбинации, приводит к формированию химерной легкой цепи.

Аналогичным образом, направленный вектор +16-к также использовали для введения 16 дополнительных генных сегментов hVλ в другие первичные модификации, описанные в Примере 2, которые объединяют множественные генные сегменты hJλ с, или без, интегрированной последовательностью к человека (Фиг. 4В). Гомологичная рекомбинация с этим направленным вектором в эндогенном локусе к мыши, содержащем другие первичные модификации, создает локусы легкой цепи к мыши, содержащие 28 генных сегментов hVλ и генные сегменты hJλ1, 2, 3 и 7 с, или без, геномной последовательностью Vк-Жк человека, функционально связанные с эндогенным геном Ск мыши, что после рекомбинации, приводит к формированию химерной легкой цепи λ-к.

Введение 12 дополнительных генных сегментов Vλ человека. Дополнительные генные сегменты hVλ были добавлены независимо в каждую из модификаций, описанных выше, с использованием аналогичных направленных векторов и методов. Конечные структуры локусов, полученные в результате гомологичной рекомбинации с направленными векторами, содержащие дополнительные генные сегменты hVλ, представлены на Фиг.

7А и 7В.

Кратко, направленный вектор был сконструирован для введения 12 дополнительных генных сегментов hVλ в модифицированные локусы легкой цепи κ и λ мыши, описанные выше (фиг. 5А и 5В, Направленные векторы +12-λ или +12-κ). Фрагмент ДНК размером 93674 п.о. из клона ВАС RP11-22118 человека (Invitrogen), содержащий 12 последовательных генных сегментов hVλ из кластера В, был сконструирован с 5' гомологичным плечом, содержащим геномную последовательность мыши 5' либо к эндогенным локусам легкой цепи κ, либо легкой цепи λ мыши, и 3' гомологичным плечом, содержащим геномную последовательность λ человека. 5' гомологичные плечи, использованные в этой нацеливающей конструкции, были такими же, как и 5' гомологичные плечи, использованные для добавления 16 генных сегментов hVλ, описанные выше (фиг. 5А и 5В). 3' гомологичное плечо было создано в результате конструирования участка PI-SceI ~3431 п.о. 5' к генному сегменту Vλ3-29Р человека, содержащему 27468 п.о. геномного фрагмента последовательности λ человека из клона ВАС RP11-76113 человека. Этот участок PI-SceI выполняет функцию точки лигирования для соединения фрагмента размером ~94 т.п.о. дополнительной последовательности λ человека с фрагментом размером ~27 т.п.о. последовательности λ человека, который перекрывается с 5'-концом последовательности λ человека в предыдущей модификации с использованием направленных векторов +16-λ или +16-κ (фиг. 5А и 5В). Эти два направленных вектора включали от 5' до 3', 5' гомологичное плечо, содержащее либо ~23 т.п.о. геномной последовательности мыши 5' от эндогенного локуса легкой цепи κ, или ~24 т.п.о. геномной последовательности мыши 5' от эндогенного локуса легкой цепи λ, 5' участок Frt, неомициновую кассету, 3' участок Frt и 121188 п.о. геномной последовательности λ человека, содержащей 16 генных сегментов hVλ и участок PI-SceI, ~27 т.п.о. которой перекрываются с 5'-концом последовательности λ человека из вставки 16 дополнительных генных сегментов hVλ, и выполняют функцию 3' гомологичного плеча для этой нацеливающей конструкции (фиг. 5А и 5В, Направленные векторы +12-λ или +12-κ). Гомологичная рекомбинация с этими направленными векторами независимо создает модифицированные локусы легкой цепи κ и λ мыши, содержащие 40 генных сегментов hVλ и генный сегмент Jλ1 человека, функционально связанных с эндогенными константными генами мыши (Сκ или Сλ2), что после рекомбинации приводит к формированию химерной легкой цепи (внизу фиг. 5А и 5В).

Аналогичным образом, направленный вектор +12-κ также использовали для введения 12 дополнительных генных сегментов hVλ в другие первичные модификации, которые объединяют множественные генные сегменты hJλ с, или без, интегрированной последовательностью κ человека (Фиг. 4В). Гомологичная рекомбинация с этим направленным вектором в эндогенном локусе κ мыши, содержащем другие модификации, создает локус легкой цепи κ мыши, содержащий 40 генных сегментов hVλ и генные сегменты hJλ1, 2, 3 и 7 с, или без, геномной последовательностью Vκ-Жκ, функционально связанные с эндогенным геном Сκ мыши, что, после рекомбинации, приводит к формированию химерной легкой цепи λ-κ.

Пример IV

Выявление клеток-мишеней ES, несущих генные сегменты легкой цепи λ человека ДНК целевого ВАС, созданного в соответствии с вышеприведенными Примерами, использовали для электропорации клеток ES мыши, для получения модифицированных клеток ES для создания химерных мышей, которые экспрессируют генные сегменты легкой цепи λ человека. Клетки ES, содержащие вставку неперегруппированных генных сегментов легкой цепи λ человека, были идентифицированы с помощью количественного

анализа TAQMAN®. Были разработаны специфические наборы праймеров и зондов для вставки последовательностей λ человека и соответствующих селекционных кассет (появление аллеля, GOA), утраты эндогенных последовательностей мыши и любых селекционных кассет (утрата аллеля, LOA) и сохранения фланкирующих последовательностей мыши (сохранение аллеля, AR). Для каждой дополнительной вставки последовательностей λ человека использовали дополнительные наборы праймеров и зондов, для подтверждения присутствия дополнительных последовательностей λ человека, а также предыдущие наборы праймеров и зондов, используемых для подтверждения сохранения ранее нацеленных последовательностей человека. В Таблице 1 представлены праймеры и соответствующие зонды, использованные в количественном ПЦР-анализе. В Таблице 2 представлены комбинации, использованные для подтверждения вставки каждого участка генных сегментов легкой цепи λ человека в клонах клеток ES.

Клетки ES, несущие генные сегменты легкой цепи λ человека, при желании трансфицированы с использованием конструкции, которая экспрессирует FLP с целью удаления Frt неомициновой кассеты, введенной посредством инсерции нацеливающей конструкции, содержащей генные сегменты V λ 5-52-V λ 1-40 (фиг. 5A и 5B). Неомициновую кассету при желании можно удалить посредством скрещивания с мышами, которые экспрессируют FLP рекомбиназу (например, патент США №6774279). При желании, неомициновую кассету можно оставить в мышах.

Таблица 1

праймер SEQ ID NO: зонд SEQ ID NO:

hL2F	2	hL2P	24
hL2R	3		
hL3F	4	hL3P	25
hL3R	5		
NeoF	6	NeoP	26
NeoR	7		
61hJ1F	8	61hJ1P	27
61hJ1R	9		
67hT1F	10	67hT1P	28
67hT1R	11		
67hT3F	12	67hT3P	29
67hT3R	13		
HygF	14	HygP	30
HygR	15		
MKD2F	16	MKD2P	31
MKD2R	17		
MKP8F	18	MKP8P	32
MKP8R	19		
MKP15F	20	MKP15P	33
MKP15R	21		
MK20F	22	—	—
MKP4R	23		
68h2F	34	68h2P	38
68h2R	35		
68h5F	36	68h5P	39
68h5R	37		
mL1F	75	mL1P	83
mL1R	76		
mL2F	77	mL2P	84
mL2R	78		
mL11F	79	mL11P	85
mL11R	80		

mL12F	81	mL12P	86
mL12R	82		

Таблица 2

Модификация	Анализ	Набор праймеров прямой/обратный	Зонд	Местоположение последовательности
Инсерция 12 hV λ и hJ λ 1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hV λ 3-12 – hV λ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	Последовательность hJ λ
		NeoF/NeoR	NeoP	Неомициновая кассета
	LOA	MK20F/MKP4R	—	Последовательность Lox511/loxP инактивированного локуса κ
		HygF/HygR	HygP	Гигромициновая кассета из инактивированного локуса λ
		mL1F/mL1R	mL1P	Кластер V λ 1-C λ 1 мышь
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Кластер V λ 2-C λ 2 мышь
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Последовательность мышь в 5' локусе V κ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Последовательность мышь в 3' локусе V κ
Инсерция 16 hV λ	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hV λ 3-27 – hV λ 3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	Гигромициновая кассета
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	Неомициновая кассета
		mL1F/mL1R	mL1P	Кластер V λ 1-C λ 1 мышь
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Кластер V λ 2-C λ 2 мышь
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hV λ 3-12 – hV λ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Последовательность мышь в 5' локусе V κ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Последовательность мышь в 3' локусе V κ

Инсерция 12 hVλ	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hVλ5-52 – hVλ1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	
		NeoF/NeoR	NeoP	Неомициновая кассета
	LOA	HygF/HygR	HygP	Гигромициновая кассета
		mL1F/mL1R	mL1P	Кластер Vλ1-Cλ1 мышь
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Кластер Vλ2-Cλ2 мышь
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hVλ3-27 – hVλ3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Последовательность мышь в 5' локусе Vκ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Последовательность мышь в 3' локусе Vκ

Пример V

Создание мышей, экспрессирующих легкие цепи λ человека из эндогенного локуса легкой цепи

Нацеленные клетки ES, описанные выше, использовали в качестве донорских клеток ES и вводили в эмбрион мыши на 8-клеточной стадии развития, используя метод VELOCIMOUSE® (см., например, патент США №7294754 и Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25 (1): 91-99.) VELOCIMICE® (Мыши поколения F0, полностью происходящие из клеток ES донора), независимо несущие генные сегменты λ человека, были выявлены в результате генотипирования с использованием модификации анализа аллелей (Valenzuela et al., выше), который выявляет присутствие уникальных генных сегментов λ человека (выше).

Соотношение использования легких цепей к/λ мышами, несущими генные сегменты легкой цепи λ человека. Мышей, гомозиготных по каждой из трех последовательных инсерций генных сегментов hVλ с единственным генным сегментом hJλ (фиг. 5B) и мышей, гомозиготных по первой инсерции генных сегментов hVλ либо с единственным генным сегментом hJλ, либо четырьмя генными сегментами Jλ человека, включая геномную последовательность Vκ-Jκ человека (фиг. 4B), анализировали на экспрессию легкой цепи к и λ в спленоцитах, используя способ проточной цитометрии.

Кратко, у мышей из групп (диапазон от трех до семи животных в группе) удаляли селезенки и измельчали их, используя стеклянные пластинки. После лизиса эритроцитов (RBC) с помощью лизирующего буфера ACK (Lonza Walkersville), спленоциты окрашивали флуоресцентным красителем конъюгированных антител, специфических для CD19 мышь (клон 1D3; BD Biosciences), CD3 мышь (17A2; Biolegend), Igκ мышь (187.1; BD Biosciences) и Igλ мышь (RML-42; Biolegend). Результат был получен с помощью проточного цитометра BD™ LSR II (BD Biosciences) и проведен анализ с использованием программного обеспечения FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). В Таблице 3 представлена средняя величина в процентах для экспрессии В-клеток (CD19⁺), легкой

цепи κ ($CD19^+Ig\kappa^+Ig\lambda^-$) и легкой цепи λ ($CD19^+Ig\kappa^-Ig\lambda^+$), наблюдаемой в спленоцитах, полученных от групп животных, несущих каждую генетическую модификацию.

В аналогичном эксперименте, В-клеточный состав в селезеночном компартменте, полученном от мышей, гомозиготных по первой инсерции 12 генных сегментов hV λ и четырех генных сегментов hJ λ , включающих геномную последовательность V κ -J κ человека, функционально связанную с геном С κ мыши (фиг. 4В, внизу), и от мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hV λ и одному генному сегменту hJ λ (фиг. 5В, внизу или фиг. 7В, вверху), был проанализирован на экспрессию Ig κ и Ig λ с использованием проточной цитометрии (как описано выше). На Фиг. 8А продемонстрирована экспрессия IgA и Ig κ в CD19 $^+$ В-клетках для репрезентативной мыши из каждой группы. Количество CD19 $^+$ В-клеток в селезенке также было зарегистрировано для каждой мыши (фиг. 8В).

В другом эксперименте, В-клеточные составы из селезеночного и костно-мозгового компартментов от мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hV λ и четырем генным сегментам hJ λ , включающим геномную последовательность V κ -J κ человека, функционально связанную с геном С κ мыши (Фиг. 7В, внизу) были проанализированы на предмет прогрессии на протяжении развития В-клеток с использованием проточной цитометрии различных маркеров клеточной поверхности.

Кратко, две группы (N=3 в каждой, возраст 9-12 недель, самцы и самки) мышей дикого типа и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hV λ и четырем генным сегментам hJ λ , включающим геномную последовательность V κ -J κ человека, функционально связанную с геном С κ мыши, были безболезненно умерщвлены, и селезенки и костный мозг были собраны. Костный мозг был отобран из бедренных костей посредством промывания сильным напором струи полной среды RPMI (среда RPMI, дополненная фетальной телячьей сывороткой, пируватом натрия, Нерес, 2-меркаптоэтанолом, заменимыми аминокислотами и гентамицином). Эритроциты в препаратах селезенки и костного мозга были лизированы с помощью лизирующего буфера АСК (Lonza Walkersville), с последующим отмыванием с помощью полной среды RPMI. Клетки 1×10^6 инкубировали с анти-мышинными CD16/CD32 (2.4G2, BD Biosciences) на льду в течение 10 минут, с последующим мечением с помощью отобранной панели антител в течение 30 мин на льду.

Панель для костного мозга: анти-мышинное FITC-CD43 (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PeCy7-IgM (11/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD) и Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend).

Панель для костного мозга и селезенки: анти-мышинное FITC-Ig κ (187.1, BD), PE-Ig λ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (11/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26c.2a, BioLegend), Pacific Blue-CD3 (17A2, BioLegend), APC-B220 (RA3-6B2, eBioscience), APC-H7-CD19 (ID3, BD).

После окрашивания клетки отмывали и фиксировали в 2% формальдегиде. Получение было осуществлено с помощью проточного цитометра FACSCANTO IITM (BD Biosciences) и анализ был проведен с использованием программного обеспечения FLOWJOTM (Tree Star, Inc.). На фиг. 9А-9Д представлены результаты для селезеночного компартмента одной репрезентативной мыши из каждой группы. На фиг. 10А-10Е представлены результаты для костномозгового компартмента одной репрезентативной мыши из каждой группы. В Таблице 4 представлены средние величины в процентах для экспрессии В-клеток (CD19 $^+$), легкой цепи κ (CD19 $^+Ig\kappa^+Ig\lambda^-$) и легкой цепи λ (CD19 $^+Ig\kappa^-Ig\lambda^+$),

наблюдаемой в спленоцитах, полученных от групп животных, несущих различные генетические модификации. В Таблице 5 представлены средние величины в процентах для экспрессии В-клеток ($CD19^+$), зрелых В-клеток ($B220^{hi}IgM^+$), незрелых В-клеток ($B220^{int}IgM^+$), незрелых В-клеток, экспрессирующих легкую цепь κ ($B220^{int}IgM^+Ig\kappa^+$) и незрелых В-клеток, экспрессирующих легкую цепь λ ($B220^{int}IgM^+Ig\lambda^+$), наблюдаемую в костном мозге мышей дикого типа и мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам $hV\lambda$ и четырем генным сегментам $hJ\lambda$, включающим геномную последовательность $V\kappa$ - $J\kappa$ человека, функционально связанную с геном $S\kappa$ мыши. Этот эксперимент был повторен с дополнительной группой мышей, описанных выше, и были получены аналогичные результаты (данные не представлены).

Таблица 3

ГЕНОТИП	% В-клеток	% Igκ ⁺	% Igλ ⁺
Дикий тип	46.2	91.0	3.6
12 hVλ+hJλ1	28.3	10.4	62.5
12 hVλ-VκJκ-hJλ1	12.0	11.0	67.5
12 hVλ-VκJκ-4hJλ	41.8	17.2	68.4
28 hVλ+hJλ1	22.0	13.3	51.1
40 hVλ+hJλ1	28.2	24.3	53.0

Таблица 4

ГЕНОТИП	% В-клеток	% Igκ ⁺	% Igλ ⁺
Дикий тип	49.8	91.2	3.5
40 hVλ-VκJκ-4hJλ	33.3	41.6	43.1

Таблица 5

Генотип	% В клеток	% Зрелые В-клетки	% Незрелые В-клетки	% Незрелые В-клетки, Igκ ⁺	% Незрелые В-клетки, Igλ ⁺
Дикий тип	62.2	9.2	12.0	79.0	8.84
40hVλ- VκJκ-4hJλ	60.43	2.59	7.69	38.29	43.29

Использование гена Vλ человека у мышей, несущих генные сегменты легкой цепи λ человека. Проводили анализ мышей, гомозиготных по первой инсерции последовательностей λ человека (hVλ3-12-hVλ3-1 и hJλ1, фиг. 5B) и гомозиготных по третьей инсерции последовательностей λ человека (hVλ5-52-hVλ3-1 и hJλ1, Фиг. 5B), на использование генов легкой цепи λ человека, посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), с использованием РНК, выделенной из спленоцитов.

Кратко, собирали селезенки и заливали 10 мл RPMI-1640 (Sigma) с 5% HI-FBS в стерильных пакетах одноразового использования. Каждый пакет, содержащий одну селезенку, затем помещали в STOMACHER™ (Seward) и гомогенизировали в течение 30 секунд при средних установках. Гомогенизированные селезенки фильтровали с использованием 0,7 мкм клеточного фильтра и затем осаждали с помощью центрифуги (1000 об/мин в течение 10 минут) и эритроциты лизировали в течение трех минут в BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences). Спленициты разбавляли с помощью RPMI-1640 и снова центрифугировали, с последующим ресуспендированием в 1 мл PBS (Irvine Scientific). РНК выделяли из спленоцитов, используя стандартные методы, известные в данной области.

ОТ-ПЦР осуществляли на РНК спленоцитов с использованием праймеров, специфичных для генных сегментов hVλ человека и гена Ск мыши (Таблица 6). ПЦР-продукты очищали на геле и клонировали в вектор pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) и проводили секвенирование с использованием праймеров M13 Прямой (GTAAAACGACGGCCAG; SEQ ID NO: 55) и M13 Обратный (CAGGAAACAGCTATGAC; SEQ ID NO: 56), расположенных в пределах данного вектора в позициях, фланкирующих сайт клонирования. Восемьдесят четыре общих клон, полученные из первой и третьей инсерции последовательностей λ человека, были секвенированы для определения использования гена hVλ (Таблица 7). Нуклеотидная последовательность соединения hVλ-hJλ1-mCκ для отобранных клонов ОТ-ПЦР представлена на фиг. 11.

Аналогичным образом проводили анализ мышей, гомозиготных по третьей инсерции генных последовательностей легкой цепи λ человека (а именно, 40 генных сегментов hVλ и четырех генных сегментов hJλ, включая геномную последовательность Vκ-Jκ человека, Фиг. 7B, внизу), функционально связанных с эндогенным геном Ск мыши, на использование гена легкой цепи λ человека, посредством ОТ-ПЦР, с использованием РНК, выделенной из спленоцитов (как описано выше). Использование генных сегментов легкой цепи λ человека для 26 отобранных ОТ-ПЦР клонов представлено в Таблице 8. Нуклеотидная последовательность соединения hVλ-hJλ-mCκ для отобранных клонов ОТ-ПЦР представлена на фиг. 12.

Аналогичным образом проводили анализ мышей, гомозиготных по первой инсерции

генных сегментов легкой цепи λ человека (12 генных сегментов hV λ и hJ λ 1, фиг. 4А и фиг. 5А), функционально связанных с эндогенным геном С λ 2 мыши, на использование гена легкой цепи λ человека, посредством ОТ-ПЦР, с использованием РНК, выделенной из спленоцитов (как описано выше). Праймеры, специфичные для генных сегментов hV λ (Таблица 6) были спарены с одним из двух праймеров, специфичных для гена С λ 2 мыши; С λ 2-1 (SEQ ID NO: 104) или С λ 2-2 (SEQ ID NO: 105).

Множественные генные сегменты hV λ перегруппированные в h λ 1 наблюдали в клонах ОТ-ПЦР мышей, несущих генные сегменты легкой цепи λ человека в эндогенном локусе легкой цепи λ мыши. Нуклеотидная последовательность соединения hV λ -hJ λ -mС λ 2 для отобранных клонов ОТ-ПЦР представлена на Фиг. 13.

Таблица 6

5' - праймер hV λ	последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	40
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	41
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	42
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTSCT	43
VLL-3	ATGGCCTGGA YCSTCTCC	44
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	45
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	46
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	47
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CТАCTT	48
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	49
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	50
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	51
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	52
VLL-11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	53
3'-праймер С λ мыши	последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
mIgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	54

Таблица 7

Зарегистрированное
hVλ количество клонов

3-1	2
4-3	3
2-8	7
3-9	4
3-10	3
2-14	1
3-19	1
2-23	7
3-25	1
1-40	9
7-43	2
1-44	2
5-45	8
7-46	3
9-49	6
1-51	3

Таблица 8

клон	hVλ	hJλ
1-3	1-44	7
1-5	1-51	3
2-3	9-49	7
2-5	1-40	1
2-6	1-40	7
3b-5	3-1	7
4a-1	4-3	7
4a-5	4-3	7
4b-1	1-47	3
5-1	3-10	3
5-2	1-40	7
5-3	1-40	7
5-4	7-46	2
5-6	1-40	7
5-7	7-43	3
6-1	1-40	1
6-2	1-40	2
6-7	1-40	3
7a-1	3-10	7
7a-2	9-49	2
7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

На фиг. 11 представлена последовательность соединения hVλ-hJλ1-mCк для ОТ-ПЦР

клонов, полученных от мышей, несущих первую и вторую инсерцию генных сегментов hV λ с единственным генным сегментом hJ λ . Последовательности, представленные на Фиг. 11, демонстрируют уникальные перегруппировки, вовлекающие различные генные сегменты hV λ с hJ λ 1, рекомбинированные с геном Ск мыши. И гетерозиготные мыши, несущие единственный модифицированный эндогенный локус к, содержащий 12 генных сегментов hV λ и hJ λ 1, и гомозиготные мыши, несущие два модифицированных эндогенных локуса к, содержащие 40 генных сегментов hV λ и hJ λ 1, были в состоянии продуцировать генные сегменты λ человека, функционально связанные с геном Ск мыши, и продуцировать В-клетки, которые экспрессируют легкие цепи λ человека. Эти перегруппировки демонстрируют, что химерные локусы могут независимо перегруппировывать генные сегменты λ человека в нескольких независимых В-клетках в этих мышах. Кроме того, эти модификации локуса эндогенной легкой цепи к не воспроизводили никакие из генных сегментов hV λ нефункционально, или предохраняли химерный локус от многократной рекомбинации генного сегмента hV λ и hJ λ (J λ 1) во время развития В-клетки, о чем свидетельствуют 16 различных генных сегментов hV λ , которые наблюдали перегруппированными с hJ λ 1 (Таблица 7). Кроме того, эти мыши продуцировали функциональные антитела, содержащие перегруппированные генные сегменты V λ -J λ человека, функционально связанные с генами Ск мыши, как часть спектра эндогенной легкой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 12 представлена последовательность соединения hV λ -hJ λ -mCк для отобранных клонов ОТ-ПЦР, полученных от мышей, гомозиготных по 40 генным сегментам hV λ и четырем генным сегментам hJ λ , содержащим геномную последовательность Vк-Жк человека. Последовательности, представленные на Фиг. 12, демонстрируют дополнительные уникальные перегруппировки, затрагивающие множественные различные генные сегменты hV λ , охватывающие полностью химерный локус, с несколькими различными генными сегментами hJ λ , перегруппированными и функционально связанными с геном Ск мыши. Гомозиготные мыши, несущие модифицированные эндогенные локусы к, содержащие 40 генных сегментов hV λ и четыре генных сегмента hJ λ , также были способны продуцировать генные сегменты λ человека, функционально связанные с геном Ск мыши, и продуцировать В-клетки, которые экспрессируют легкие цепи λ человека. Эти перегруппировки дополнительно демонстрируют, что химерные локусы на всех стадиях были способны независимо перегруппировывать генные сегменты λ человека в множественных независимых В-клетках у этих мышей. Кроме того, эти дополнительные модификации в эндогенном локусе легкой цепи к демонстрируют, что каждая инсерция генных сегментов λ человека не приводила к образованию никаких нефункциональных генных сегментов hV λ и/или J λ , или предохраняла химерный локус от рекомбинации генных сегментов hV λ и J λ во время развития В-клетки, о чем свидетельствуют 12 различных генных сегментов hV λ , которые были обнаружены перегруппированными со всеми четырьмя генными сегментами hJ λ (Таблица 8) из 26 отобранных клонов ОТ-ПЦР. Кроме того, эти мыши также продуцировали функциональные антитела, содержащие перегруппированные генные сегменты V λ -J λ человека, функционально связанные с областями Ск мыши, как часть спектра эндогенной легкой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 13 представлена последовательность соединения hV λ -hJ λ -mC λ 2 для трех отдельных клонов ОТ-ПЦР, полученных от мышей, гомозиготных по 12 генным сегментам hV λ и генному сегменту hJ λ 1. Последовательности, представленные на фиг. 13, демонстрируют дополнительные уникальные перегруппировки, вовлекающие различные генные сегменты hV λ , охватывающие всю длину первой инсерции, с hJ λ 1,

перегруппированным и функционально связанным с геном Сλ2 мыши (2D1=Vλ2-8Jλ1; 2D9=Vλ3-10Jλ1; 3E15=Vλ3-1Jλ1). Один клон демонстрировал непродуктивную
 5 перегруппировку вследствие добавлений N к соединению hVλ-hJλ (2D1, Фиг. 13). Это не редкость при рекомбинации V(D)J, поскольку показано, что соединение генных
 сегментов во время рекомбинации является неточным. Хотя этот клон представляет
 собой непродуктивный рекомбинант, присутствующий в спектре легких цепей этих
 10 мышей, это является демонстрацией того, что генетический механизм, способствующий
 множественности J-сегментов среди генов антител, работает нормально у этих мышей
 и приводит в результате к образованию спектра антител, включающего легкие цепи с
 более значительным разнообразием.

Гомозиготные мыши, несущие модифицированные эндогенные локусы λ, содержащие
 12 генных сегментов hVλ и генный сегмент hJλ1, также были способны продуцировать
 генные сегменты λ человека, функционально связанные с эндогенным геном Сλ мыши,
 и продуцировать В-клетки, которые экспрессируют обратные химерные легкие цепи λ
 15 содержащие области hVλ, связанные с областями Сλ мыши. Эти перегруппировки
 дополнительно демонстрируют, что генные сегменты легкой цепи λ человека,
 помещенные в другой локус легкой цепи (а именно, локус λ) были способны независимо
 перегруппировывать генные сегменты λ человека в нескольких независимых В-клетках
 у этих мышей. Кроме того, модификации в эндогенном локусе легкой цепи λ
 20 демонстрируют, что инсерция генных сегментов λ человека не воспроизводит никаких
 нефункциональных генных сегментов hVλ и/или hJλ1, или предохраняет химерный локус
 от рекомбинации генных сегментов hVλ и hJλ1 во время развития В-клеток. Кроме того,
 эти мыши также продуцировали функциональные антитела, содержащие генные
 сегменты Vλ-Jλ человека, функционально связанные с областями Сλ мыши, как часть
 25 спектра эндогенной легкой цепи иммуноглобулина.

Как показано в этом Примере, мыши, несущие генные сегменты легкой цепи λ
 человека в эндогенных локусах легкой цепи κ и λ, способны к перегруппировке генных
 сегментов легкой цепи λ человека и экспрессии их в связи с областью Сκ и/или Сλ мыши,
 в качестве части нормального спектра антител мыши, поскольку функциональная
 30 легкая цепь требуется на различных контрольных точках в ходе развития В-клеток,
 как в селезенке, так и в костном мозге. Кроме того, ранние субпопуляции В-клеток
 (например, пре-, про- и промежуточные В-клетки) демонстрируют нормальный фенотип
 у этих мышей, в сравнении с однопаметными животными дикого типа (Фиг. 9D, 10А и
 10В). Наблюдали небольшой дефицит в костном мозге и периферических популяций В-
 35 клеток, что можно объяснить делецией субпопуляции самореактивных незрелых В-
 клеток и/или недостаточной ассоциацией легкой цепи λ человека с тяжелой цепью мыши.
 Тем не менее, использование Igκ/Igλ, наблюдаемое у этих мышей, демонстрирует
 ситуацию, которая больше похожа на экспрессию легкой цепи человека, чем таковую,
 наблюдаемую у мышей.

40 Пример VI

Разведение мышей, экспрессирующих легкие цепи λ человека из эндогенного локуса
 легкой цепи

Для оптимизации использования генных сегментов λ человека в эндогенном локусе
 легкой цепи мыши, мышей, несущих неперегруппированные генные сегменты λ человека,
 45 скрещивали с другими мышами, несущими делецию противоположного эндогенного
 локуса легкой цепи (либо κ, либо λ). Например, генные сегменты λ человека, помещенные
 в эндогенный локус κ, будут единственно функциональными генными сегментами
 легкой цепи, присутствующими у мыши, которая также несет делецию в эндогенном

локусе легкой цепи λ . Таким образом, полученное потомство будет экспрессировать только легкие цепи λ человека, как описано в вышеприведенных примерах. Размножение осуществляется с использованием стандартных технологий, принятых в данной области, и, альтернативно, коммерческими компаниями, например, The Jackson Laboratory.

- 5 Проводится скрининг пород мышей, несущих генные сегменты легких цепей λ человека в эндогенном локусе к и делецию эндогенного локуса легкой цепи λ , на наличие уникальных обратно-химерных (человека-мышь) легких цепей λ и отсутствие эндогенных легких цепей λ мыши.

- 10 Мышей, несущих неперегруппированный локус легкой цепи λ человека, также скрещивают с мышами, которые содержат замену эндогенного локуса варибельного гена тяжелой цепи мыши на локус варибельного гена тяжелой цепи человека (см. патент США №6596541, Regeneron Pharmaceuticals, созданная методами генной инженерии мышь VELOCIMMUNE®). Мышь VELOCIMMUNE® включает, отчасти, геном, содержащий варибельные области тяжелой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитела, содержащие варибельную область тяжелой цепи человека и константную область тяжелой цепи мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующая варибельные области тяжелых цепей антител, может быть выделена и функционально связана с ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи человека. ДНК затем может быть экспрессирована в клетках, способных к экспрессии полностью человеческой тяжелой цепи антитела. На основании соответствующего графика размножения, получены мыши, несущие замену эндогенного локуса тяжелой цепи мыши на локус тяжелой цепи человека, и неперегруппированный локус легкой цепи λ человека в эндогенном локусе легкой цепи к. Антитела, содержащие соматически измененные варибельные области тяжелой цепи человека и варибельные области легкой цепи λ человека, могут быть выделены после иммунизации представляющим интерес антигеном.

Пример VII

Продуцирование антител мышами, экспрессирующими тяжелые цепи человека и легкие цепи λ человека

- 30 После скрещивания мышей, которые содержат неперегруппированный локус легкой цепи λ человека, с различными породами, содержащими модификации и делеции других эндогенных локусов Ig (как описано выше), отобранных мышей иммунизировали представляющим интерес антигеном.

- В целом, мышь VELOCIMMUNE®, содержащую один из однократно перегруппированных областей легкой цепи зародышевой линии человека, сенсibilizировали антигеном, и лимфатические клетки (такие, как В-клетки) восстанавливали из сыворотки крови животных. Лимфатические клетки могут быть слиты с клеточной линией миеломы для получения бессмертных гибридных клеточных линий, и проводят скрининг и отбор таких гибридных клеточных линий для выявления гибридных клеточных линий, которые продуцируют антитела, содержащие тяжелую цепь человека и легкую цепь λ человека, которые являются специфическими для антигена, использованного для иммунизации. ДНК, кодирующая варибельные области тяжелых цепей и легких цепей λ , может быть выделена и связана с подходящими изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Вследствие наличия дополнительных генных сегментов hV λ , по сравнению с эндогенным локусом λ мыши, разнообразие спектра легких цепей резко возрастает и придает более высокое разнообразие антиген-специфическому спектру после иммунизации. Полученные клонированные последовательности антител могут быть в дальнейшем продуцированы

в клетке, такой как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующая антиген-специфические химерные антитела, или вариабельные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов (например, В-клеток).

- 5 Первоначально, высокоаффинные химерные антитела изолированы имеющими вариабельную область человека и константную область мыши. Как описано выше, антитела характеризуются и отбираются по требуемым характерным особенностям, включающим аффинность, селективность, эпитоп, и тому подобное. Константные области мыши заменяют на желаемую константную область человека для создания
- 10 полностью человеческого антитела, содержащего соматически видоизмененную тяжелую цепь человека и легкую цепь человека λ , полученную из неперегруппированного локуса легкой цепи λ человека по настоящему изобретению. Подходящие константные области человека включают, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, дикого типа или модифицированные.

15 СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 <120> МЫШИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ЛЕГКУЮ ЦЕПЬ С ВАРИАВЕЛЬНОЙ ОБЛАСТЬЮ λ ЧЕЛОВЕКА И КОНСТАН
- <130> 796A-WO
 <140> To be assigned
- 20 <141> Filed herewith
 <150> 61/357,314
 <151> 2010-06-22
 <150> 61/357,317
 <151> 2010-06-22
- 25 <160> 105
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 219
 <212> ДНК
- 30 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 1
- acttttcagaa tgttcttgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt 60
 35 atagtataca ttatacgaag ttattctaga cccccgggct cgataactat aacggtccta 120
 aggtagcgac tcgagataac ttcgtataat gtatgtcata cgaagttatc catggtaagc 180
 ttacgtggca tacagtggtca gattttctgt ttatcaagc 219
- <210> 2
 <211> 21
- 40 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 2
- 45 agctgaatgg aaacaaggca a 21
- <210> 3
 <211> 19
 <212> ДНК

	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 3	
5	ggagacaatg ccccagtga	19
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 4	
	tcccataggg ctaggatttc c	21
	<210> 5	
15	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
20	<400> 5	
	tccsstcaca ctgttcccc	19
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
25	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 6	
	ggtggagagg ctattcggc	19
30	<210> 7	
	<211> 17	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> синтетическая	
	<400> 7	
	gaacacggcg gcatcag	17
	<210> 8	
	<211> 21	
40	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 8	
45	tcaacctttc ccagcctgtc t	21
	<210> 9	
	<211> 24	
	<212> ДНК	

	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 9	
5	ccccagagag agaaaacaga tttt	24
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 10	
	ccctgggtgaa gcatgtttgc	20
	<210> 11	
15	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
20	<400> 11	
	tgtggcctgt ctgccttacg	20
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
25	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 12	
	casacstaga ccccggaagt c	21
30	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> синтетическая	
	<400> 13	
	tcgctttgcc agttgattct c	21
	<210> 14	
	<211> 17	
40	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 14	
45	tgcggccgat cttagcc	17
	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> ДНК	

	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 15	
5	ttgaccgatt ccttgcgg	18
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 16	
	gcaaacaaaa accactggcc	20
	<210> 17	
15	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
20	<400> 17	
	ggccacattc catgggttc	19
	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
25	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 18	
	ccatgactgg gcctctgtag ac	22
30	<210> 19	
	<211> 25	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> синтетическая	
	<400> 19	
	caagtcaggg tgctaattgct gtatc	25
	<210> 20	
	<211> 19	
40	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 20	
45	cacagcttgt gcagcctcc	19
	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> ДНК	

	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 21	
5	gggcactgga tacgatgtat gg	22
	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 22	
	tcataggtag gtctcagttt g	21
	<210> 23	
15	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
20	<400> 23	
	tgatctgcgc tgtttcatcc t	21
	<210> 24	
	<211> 31	
	<212> ДНК	
25	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 24	
	tgacatgaac catctgtttc tctctcgaca a	31
30	<210> 25	
	<211> 29	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> синтетическая	
	<400> 25	
	agagacgctc cgaggtcaag gtgctctag	29
	<210> 26	
	<211> 23	
40	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 26	
45	tgggcасаас agасаатсgg ctg	23
	<210> 27	
	<211> 16	
	<212> ДНК	

	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 27	
5	accctctgct gtccct	16
	<210> 28	
	<211> 26	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 28	
	ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa	26
	<210> 29	
15	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
20	<400> 29	
	tccacactgt cggctgggag ctca	24
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
25	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 30	
	acgagcgggt tcggccatt c	21
30	<210> 31	
	<211> 37	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> синтетическая	
	<400> 31	
	ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa	37
	<210> 32	
	<211> 27	
40	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 32	
45	tgccgcttat acaacactgc catctgc	27
	<210> 33	
	<211> 37	
	<212> ДНК	

	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 33	
5	agaagaagcc tgtactacag catccgtttt acagtca	37
	<210> 34	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 34	
	gggctacttg aggaccttgc t	21
	<210> 35	
15	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
20	<400> 35	
	gacagccctt acagagtttg gaa	23
	<210> 36	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
25	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 36	
	aagaccagga gctctgccta agt	23
30	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
35	<223> синтетическая	
	<400> 37	
	cccatcacga actgaagttg ag	22
	<210> 38	
	<211> 20	
40	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 38	
45	cagggcctcc atcccaggca	20
	<210> 39	
	<211> 28	
	<212> ДНК	

	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 39	
5	ccccagtgtg tgaatcactc taccctcc	28
	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 40	
	cctctcctcc tcaccctcct	20
	<210> 41	
15	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
20	<220>	
	<221> вариант	
	<222> (4) ... (4)	
	<223> r=a или g	
	<220>	
25	<221> вариант	
	<222> (9) ... (9)	
	<223> s=c или g	
	<220>	
	<221> вариант	
30	<222> 11, 12, 13	
	<223> y=c или t	
	<400> 41	
	atgrccdgst yyyctctcct	20
	<210> 42	
35	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
40	<400> 42	
	ctcctcactc agggcaca	18
	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
45	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<220>	

	<221> вариант	
	<222> (18)...(18)	
	<223> s=c или g	
	<400> 43	
5	atggcctggg ctctgctsct	20
	<210> 44	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
10	<220>	
	<223> синтетическая	
	<220>	
	<221> вариант	
	<222> (11)...(11)	
15	<223> y=c или t	
	<220>	
	<221> вариант	
	<222> (13)...(13)	
	<223> s=c или g	
20	<400> 44	
	atggcctgga ycsctctcc	19
	<210> 45	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
25	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<220>	
	<221> вариант	
30	<222> 11, 16, 18, 21	
	<223> y=c или t	
	<220>	
	<221> вариант	
	<222> (15)...(15)	
35	<223> r=a или g	
	<220>	
	<221> вариант	
	<222> (20)...(20)	
	<223> m=a или c	
40	<400> 45	
	tcaccatggc ytggrycycm ytc	23
	<210> 46	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
45	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 46	

	tcaccatggc ctgggtctcc tt	22
	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
5	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<220>	
	<221> вариант	
10	<222> (16)...(16)	
	<223> m=a или c	
	<220>	
	<221> вариант	
	<222> (19)...(19)	
15	<223> y=c или t	
	<400> 47	
	tcaccatggc ctggamtcyt ct	22
	<210> 48	
	<211> 26	
20	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 48	
25	tcaccatggc ctgggctcca ctactt	26
	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 49	
	tcaccatggc ctggactcct	20
	<210> 50	
35	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
40	<400> 50	
	tcaccatggc ctggatgatg ctt	23
	<210> 51	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
45	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 51	

	taaatatggc ctgggctcct ct	22
	<210> 52	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
5	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 52	
	tcaccatgcc ctgggctctg ct	22
10	<210> 53	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> синтетическая	
	<400> 53	
	tcaccatggc cctgactcct ct	22
	<210> 54	
	<211> 30	
20	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 54	
25	cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga	30
	<210> 55	
	<211> 16	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 55	
	gtaaaасgас ggссag	16
	<210> 56	
35	<211> 17	
	<212> ДНК	
	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
40	<400> 56	
	caggaасag ctatgас	17
	<210> 57	
	<211> 440	
	<212> ДНК	
45	<213> искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 57	

gggcctgggc tctgctgctc ctcaccctcc tctactcaggg cacagggtcc tgggcccagt 60
 ctgccctgac tcagcctccc tccgcgtccg ggtctccttg acagtcagtc accatctcct 120
 gcaactggaac cagcagtgac gttggtggtt ataactatgt ctcttggtac caacagcacc 180
 caggcaaaagc ccccaaaactc atgattttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtcccctg 240
 5 atcgctttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccct gaccgtctctc gggctccagg 300
 ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtcttcg 360
 gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420
 caccatccag taagcttggg 440
 <210> 58
 10 <211> 441
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 15 <400> 58
 atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
 tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctccttg gacagtcagt caccatctcc 120
 tgcactggaa ccagcagtgac cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaaaag ccccaaaact catgatattat gaggtcacta agcggccctc aggggtcccct 240
 20 gatcgcttctc ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
 gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtaagcttgg g 441
 <210> 59
 25 <211> 441
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 30 <400> 59
 atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
 tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctccttg gacagtcagt caccatctcc 120
 tgcactggaa ccagcagtgac cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaaaag ccccaaaact catgatattat gaggtcagta agcggccctc aggggtcccct 240
 35 gatcgcttctc ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
 gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtaagcttgg g 441
 <210> 60
 40 <211> 438
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 45 <400> 60
 atggcctggg ctctgctcct caccctcctc actcagggca cagggtcctg ggcccagtct 60
 gccctgactc agcctccctc cgcgtccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 120
 actggaacca gcagtgcagc tgggtggttat aactatgtct cctggtacca acagcaccca 180

ggcaaagccc ccaaactcat gatttatgag gtcagtaagc ggccctcagg ggtccctgat 240
cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gcctccctga ccgtctctgg gctccaggct 300
gaggatgagg ctgattatta ctgcagctca tatgcaggca gcaacaatta tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcacccg cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
5 ccatccagta agcttggg 438
<210> 61
<211> 438
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность
10 <220>
<223> синтетическая
<400> 61
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
15 tgcactggaa ccagcagtga cggtgggtgg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag cccccaact catgatattat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcacccg cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
20 ccatccagta agcttggg 438
<210> 62
<211> 441
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность
25 <220>
<223> синтетическая
<400> 62
atggcctggg ctctgctcct cctcaccctc ctactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
30 tgcactggaa ccagcagtga cggtgggtgg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag cccccaact catgatattat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgctcctagg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
35 ccaccatcca gtaagcttgg g 441
<210> 63
<211> 442
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность
40 <220>
<223> синтетическая
<400> 63
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctccgcgtcc gggctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
45 tgcactggaa ccagcagtga cggtgggtgg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag cccccaact catgatattat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa tttatgtctt 360

cggaactggg accaaggtca ccgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt 420
cccacatcc agtaagcttg gg 442
<210> 64
<211> 428
5 <212> ДНК
<213> искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
<400> 64
10 ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgctc tgcctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60
ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagttag cacagcacct 120
acaccatcga atggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaaggtta 180
agagtgatgg cagccacagc aagggggacg ggatccccga tgccttcag ggctccagtt 240
ctggggctga ccgtacctc accttctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300
15 actgtggaga gagccacacg attgatggcc aagtcggttg tgtcttcgga actgggacca 360
aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca ccatccagta 420
agcttggg 428
<210> 65
<211> 441
20 <212> ДНК
<213> искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
<400> 65
25 atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcatctact gcacagggtc ctggggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcaagtgtct gcgggcccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catcttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
30 ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatatga gcctgagtgc ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a 441
<210> 66
<211> 441
35 <212> ДНК
<213> искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
<400> 66
40 atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcatctact gcacagggtc ctggggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcaagtgtct gcgggcccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catcttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
45 ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggatatga gcctgagtgc ggcttttttt 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt a 441
<210> 67

<211> 345
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> синтетическая
 <400> 67
 cccgggcaga gggtcaccat ctcttggttct ggaagcagct ccaacatcgg aagtaatact 60
 gtaaaactggg accagcagct cccaggaacg gcccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120
 cagcggccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc 180
 10 ctggccatca gtgggctcca gtctgaggat gaggctgatt attactgtgc agcatgggat 240
 gacagcctga atgggttatgt cttcggaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300
 gctgcaccaа ctgtatccat cttcccacca tccagtgagc agtta 345
 <210> 68
 <211> 432
 15 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 68
 20 atggcctgga cccctctcct gctccccctc ctcaactttct gcacagtctc tgaggcctcc 60
 tatgagctga cacagccacc ctcggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120
 tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttattggg accagcagaa gtcaggccag 180
 gcccctgtgc tgggtcatcta tgaggacagc aaacgaccct ccgggatccc tgagagattc 240
 tctggctcca gctcagggac aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300
 25 gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggta atcatgtctt cggaactggg 360
 accaaggtca ccgtcctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
 agtgagcagt ta 432
 <210> 69
 <211> 426
 30 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 69
 35 atggcctgga ctctctctct tctgttcctc ctcaacttgc gcccagggtc caattcccag 60
 gctgtgggtga ctcaggagcc ctcaactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120
 tgttggtcca gcactggagc tgtcaccagt ggtcattatc cctactggtt ccagcagaag 180
 cctggccaag cccccaggac actgatattat gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240
 gcccggttct caggctccct ccttggggggc aaagctgccc tgaccctttc ggggtgcgcag 300
 40 cctgaggatg aggctgagta ttactgcttg ctctcctata gtggtgctta tgtcttcgga 360
 actgggacca aggtcacccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
 ccatcc 426
 <210> 70
 <211> 331
 45 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая

<400> 70
 agtgggtcctg ggacagacgg ccaggattac ctgtggggga aacaacattg gaagtaaaaa 60
 tgtgcactgg taccagcaga agccaggcca ggcccctgtg ctgggtcatct atagggataa 120
 caaccggccc tctgggatcc ctgagcgtatt ctctgggtcc aactcgggga acacggccac 180
 5 cctgaccatc agcagagccc aagccgggga tgaggctgac tattactgtc aggtgtggga 240
 cagcagcact tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc 300
 accaactgta tccatcttcc caccatccag t 331
 <210> 71
 <211> 417
 10 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 71
 15 actcctctcc tcctcctggt cctctctcac tgcacagggt ccctctcgca ggctgtgctg 60
 actcagccgt cttccctctc tgcctctcct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 120
 cgcagtggca tcaatgttgg tacctacagg atatactggt accagcagaa gccagggagt 180
 cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 240
 cccagccgct tctctggatc caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 300
 20 gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cagcgcttat 360
 gtcttcggaa ctgggaccaа ggtcaccgtc ctaggggctg atgctgcacc aactgta 417
 <210> 72
 <211> 393
 <212> ДНК
 25 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 72
 30 tttctgttcc tcctcacttg ctgcccaggg tccaattctc agactgtggt gactcaggag 60
 ccctcactga ctgtgtcccc aggagggaca gtactctca cctgtgcttc cagcactgga 120
 gcagtcacca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcaccagg 180
 gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tcctggaccc ctgcccgggt ctcagggtcc 240
 ctccctgggg gcaaagctgc cctgacactg tcagggtgtg agcctgagga cgaggctgag 300
 tattactgcc tgctctacta tgggtgtgct tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc 360
 35 gtccctagggg ctgatgctgc accaactgta tcc 393
 <210> 73
 <211> 417
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 73
 atggcctggg ctctgctgct cctcactctc ctactcagg acacagggtc ctgggcccag 60
 tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctctcctg gacagtcgat caccatctcc 120
 45 tgcactggaa ccagcagtga tggtgggagt tataaccttg tctcctggta ccaacagcac 180
 ccaggcaaaг cccccaaact catgatattat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240
 aatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300
 gctgaggacg aggctgatta ttactgctgc tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360

ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417
 <210> 74
 <211> 348
 <212> ДНК
 5 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 74
 cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 10 tcttgcaactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
 caccacaggca aagcccccaa actcatgatt tatgaggcca gtaatcggcc ctacaggggtt 180
 tctaatacgtc tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300
 ttcggaactg ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348
 15 <210> 75
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> синтетическая
 <400> 75
 аасаассгag ctccaggtgt 20
 <210> 76
 <211> 19
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 76
 30 agggcagcct tgtctccaa 19
 <210> 77
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 77
 cctgccagat tctcaggctc 20
 <210> 78
 40 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 45 <400> 78
 catcacaggg gcacagactg 20
 <210> 79
 <211> 19

	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
5	<400> 79	
	gatttgctga gggcagggt	19
	<210> 80	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
10	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 80	
	ccccaagtct gatccttcct t	21
15	<210> 81	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
20	<223> синтетическая	
	<400> 81	
	gctgaccaac gatcgacctaa	20
	<210> 82	
	<211> 19	
25	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 82	
30	taagcgccac actgcacct	19
	<210> 83	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
35	<220>	
	<223> синтетическая	
	<400> 83	
	cctgccagat tctcaggctc cctg	24
	<210> 84	
40	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> синтетическая	
45	<400> 84	
	ctgattggag acaaggctgc cct	23
	<210> 85	
	<211> 30	

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 5 <400> 85
 ccttcataact cttgcatcct cccttctcca 30
 <210> 86
 <211> 35
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 86
 ttccttctct tctgtgactc aattatattgt ggaca 35
 15 <210> 87
 <211> 159
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> синтетическая
 <400> 87
 tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg caccggctg 120
 accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 25 <210> 88
 <211> 159
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> синтетическая
 <400> 88
 tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggctc 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 35 <210> 89
 <211> 159
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> синтетическая
 <400> 89
 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catgggatga cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg 120
 accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 45 <210> 90
 <211> 159
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> синтетическая
 <400> 90
 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat 60
 5 tactgtgcag catgggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 <210> 91
 <211> 153
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 91
 tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccgggggatga ggctgactat 60
 15 tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcacca gctgaccgcc 120
 ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153
 <210> 92
 <211> 156
 <212> ДНК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 92
 tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
 25 tactgttact caacagacag cagtggtaat gctgtgttcg gaggaggcac ccagctgacc 120
 gccctcgggg ctgatgctgc accaactgta tccatc 156
 <210> 93
 <211> 159
 <212> ДНК
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 93
 tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
 35 tactgttact caacagacag cagtggtaat catagggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 <210> 94
 <211> 159
 <212> ДНК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 94
 tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 45 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 <210> 95
 <211> 159

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая

5 <400> 95
 gatgcttcgg ccaatgcagg gattttactc atctctgggc tccagtctga ggatgaggct 60
 gactattact gtatgatttg gcacagcagc gctgtggtat tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
 <210> 96

10 <211> 153
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая

15 <400> 96
 cttgggggca aagctgccct gacactgtca ggtgtgcagc ctgaggacga ggctgagtat 60
 tactgcctgc tctactatgg tgggtgctcg gtgttcggcg gagggacca gctgaccgtc 120
 ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153
 <210> 97

20 <211> 153
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая

25 <400> 97
 cttgggggca aagctgccct gaccctttcg ggtgctcagc ctgaggatga ggctgagtat 60
 tactgcttgc tctcctatag tgggtgctga gtattcggcg gagggacca gctgaccgtc 120
 ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153
 <210> 98

30 <211> 165
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая

35 <400> 98
 tcaggcctga atcggtacct gaccatcaag aacatccagg aagaggatga gaggtagtac 60
 cactgtgggg cagaccatgg cagtgggagc aacttcgtgt ctgtgttcgg aggaggcacc 120
 cagctgaccg cctcgggggc tgatgctgca ccaactgtat ccatc 165
 <210> 99

40 <211> 164
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> синтетическая

45 <400> 99
 tctggcacgt cagccaccct gggcatcacc ggactccaga ctggggacga ggccgattat 60
 tactgcggaa catgggtag cagcctgagt gctggccccg ggtgttcggc ggagggacca 120
 agctgaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catc 164

<210> 100
 <211> 22800
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> синтетическая
 <400> 100

```

aagctcctaaa actacaaaact gctgaaagat ctaatgacta ggacagccta gtaattttca 60
taggggcata aatgtgaaac gccttggtgca tcgtagaaga aagcagaaga gaaagcattc 120
10 ccaattttctt aactgccttt tacctatatatt aatcagtaat atactggctt ttacctctgt 180
taatcataat aaacaaattc tcaataaatt ttatcgatac tcttcaatgc ctgctcagca 240
acatttttccg aaggcagctc aagatatataa ataactcata agggccaacc tcctattgca 300
gcattcttttg ggatttaacc agttttcccaa gactcttttc acaatgttaa gatgttagaa 360
atagatccaa aactaggtga tatatcccct agtaaaactg tgaggtcaaa cttgtctggc 420
15 taatgcttcc atttaaaaaat ttctctttct tgatccttca ttgtatgtac acaataaatc 480
aggggaaaaac tttaactgag tgaatcaaag tattctcatt attataatag gagcttcaca 540
cacacacaaa aaaatcaatt ctattactct cagcctcagt tcctaaagcc aagttaaagt 600
cctgttctaa gatcattgtt gcatgaccat atgtattcca ggtctaactt aaactgtgga 660
taaatacccag caggacatta gagatttttg tgagagtaag catataggat tcagggttta 720
20 tgagcttttag atttttcttg tcaaaatgaa tgagagttgc catatctaaa aattattccc 780
agataaataa aattcactac ctagaattaa tttatgcata taagtagaaa tgctatctcc 840
ctttttacca tccaaagtgg aaagcctcat ggaactagaa attaatatta gaaaaatcag 900
ttaataaaag tatgtcattt catcaattca ataagttata atagcaaaaa accataataa 960
attatcactt aaatgtcaat acatttataa actatggtag ataaatagga tattgaatag 1020
25 ccattgatgc tcctgatgaa aattagcagg cagtgataaa tgataaatat gaagcacatg 1080
tcaataaata aaataagttt tatgtaattt aggagaaaaa ggtgataatg acacaaaatg 1140
tgaattatgg atgcatctat aaaattcttt gtacatttgt gaattgtaa tatttatctt 1200
agagacatta ttactttgta tatgttccat ttgtcacct atatgtccca gtctccttac 1260
aaatgctatg gccaaagaaa taggcataca tacatccttt gcaggctgag gcaggaaaaa 1320
30 gatcttacgg aattttccag tctatccttt atctgtataa gcaacttaag aggccatgtg 1380
ctccaaatgg tgcaaataca agatggtaga gcctctgtct gcctggatcc ttgagtggct 1440
gcatggagca gagcaccttt ctggccctgg tgaagattgt agcatgagca agatataagc 1500
atgtgttgga gctaggccat gagatttggt gcagtggtag aacctaccct attatggaaa 1560
atataaatac acaaaacaga aaagagagag agaagtgaga gaagactgtg agagaagtgc 1620
35 atgagagaag actgtgtttt gttcatttcc tataatccta tatcaccatg ggatcctgtg 1680
ccttctgggtg atcaaactaa tgttctacag ctccaaagaa gaatgctgc ctaacgtctc 1740
cattccaatg acctagagac taaaagccaa aaagaacctt agaaattatc tattgcattc 1800
tttgatgtaa ggaaatatct tagagggcac agatagaaat atcttaaccc aggtcactta 1860
gttcgtggca gagctgaggc taaaaccagg ccttttgact cctaattttg tgctctttac 1920
40 accttctcac atcatttctc caaccctaaag tctagcagaa aaggctaaaa taagatatat 1980
gcatagattt gctattataa gtccatgtac ttcctcagac gctttaagat ggggcttctc 2040
atggttcaca ataagcagca gagggaagtg aataactatc ttcgtctccc ctactgctat 2100
ttgtgcagtt tgaagcttat ctcttaaadc atgttttctt ctctgtagta atactacaac 2160
ttgtgccttt tatgtgtgta taaattttta tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220
45 aaatggacac tccaaaaaga tggtcaataa ggttacatgg cttcacattg cccctctac 2280
accatcttgt ggagctacac attcacctca ccaaaatttg agaaaaataa tcaagaaaat 2340
gactctcact agcagtgaga ccaagtcctat aagcactaat gtcacagtg cacactgcag 2400
cctcatgctg ccaagcatgt tttgggcgta tccctggact gggttggtga catgatcaaa 2460

```

ggtacatTTTT ccacctgcat agcccccattcc tggatctata gccttccttg tgtctttgtg 2520
 aacaacctag tgtgaactca aagtatgaga cagatctcaa ttaatttaga aagtttattt 2580
 tcccaagatt aaggacaagc ccatgataaa gcctccagag gtcctgatat atgtgcccaa 2640
 ggggggtcggg gcacagcttg gtgttatata ttttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700
 5 tgtagaagat gtgcatcgct ttgggtctgga aaggtgtgac aactcaaggc aggggaagggg 2760
 gcttcctgct ggggttgcat tgttttgagt ctctgatcag ctttcacat gtgaaaggca 2820
 ggtagagaaa tagtcattta tgccttagtc tggcttattg aaacagtagg gcagaagaag 2880
 cattgcatat gcatttgtct gaagtgaaca gagggatgac tttgagctct gtcctttctt 2940
 tgtccacaag gaattacctt gtgggcaaatt tgtgaggag gtatgtagct tttttttctt 3000
 10 tgtagctatc ttatttagga ataaaatggg aggcagggtt gcctgatgca attcccagct 3060
 tgactttccc ttttggttta gtgatttttg gggctcctgag gtttattttt tctttcacat 3120
 tagtataact acttttcttt ttctaattcc ttttctactt gtatgtgtta cagctgactt 3180
 atgttacttg caaaaagaat tctgactaat gcaccatctg actagaaggc agggttcttc 3240
 gatgataacg aatcctccag aatctagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgtc 3300
 15 ttcttgggga atttctcatg gcaatgaatg gcaactggcc aaaggattta tgaccagact 3360
 gagctctctt ttatctattc tgttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacagg 3420
 gacactgggt tctaagttct agggttaaac agtccactcc caggcccacc acaccatacc 3480
 ctctgacat ctggtgaaca gcaataaaat tgtttcttat tctgaaaatc ctccaatact 3540
 tccaccatcc ccaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaac 3600
 20 acaatatcca ttatattatt cttggccttt gagatacctt acaaaacaaa tacaaaaaaa 3660
 gtcccaattt aacatctttt aataatcttt acaaaacaga acacatctcc tttcttgata 3720
 atagtcaaga ggctcagtgg caactgtggt gaaaagtgtc agattctggt catgtttcaa 3780
 aggtagaaaa aatagaattt gttaacatat tggatgtgag gcgtgggaga aacgtgaaat 3840
 caagggtggt gcaagtgttt aacctgagca actagagaat ttggaaggac attttctgag 3900
 25 atggggaagg caggcgggaa tcagggatta gagttgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960
 tgctagacct ctaattggca atatcccttg gacaggtgga tgaatatgctg tgattctgga 4020
 gttcgggaaa tagtccgggt ggagatgcaa atttgggaaa caggcgagg ttactagcaa 4080
 tgagttaaat caatgaaggc aggctgggac ctggcaggta acccaacaag tagaggtcga 4140
 agagatgaga agaaaacagc acaggagact tagaagcagt ggtcaggagg aaggagtga 4200
 30 accaagaaag tgatgtccca gagccaacaa aataaggatt tcttttctgt ttacaaatgt 4260
 aaaattaaaa ggtttaataa aaagaaaatt tacttttatg gttggttgtt attaagtgg 4320
 ccaaacactg tctcctattt gtagaatcag aactctctca tggcagtaga aaatttgga 4380
 agttactttt taaaagggtg gtgcaactgct gccctttgct ggtcaagttt atgcaactga 4440
 aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctcttttaaa atagctcagg ctgtacaagc 4500
 35 tagaaagaac ctgcgaagat attccttcca acatttgcat ttgacttatg ggaagtgcag 4560
 gttcagccag aaaagttgtg tgcaaggccg tttatgtaag tttatcagac ctgattctta 4620
 cggctcttcc cattgtttcg agcctccctt ccattcactt cccgctcata cgcgaccaag 4680
 tataggacag gagtagttat tctgcacttt atagcagctc cactgtctgg cactctgatg 4740
 ttctttaatt acaagcttta tgacagtgat tctcaacctg ctccactgcc tccacctagt 4800
 40 ggcagaaaga agaaaatgtg tgtaactcgg gagtctctgg tctgaaagct ccgggggtatc 4860
 atttcttcaa agtcttgagc ttgtttttgt ttgtatttat ttatttattt gtttttagaga 4920
 caagggtctcg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980
 gtgaataaag agatatcagt aatgactgtt ttatattgtg gctgtagcgc attcgaggga 5040
 taattcgatt ctgttctgct ttcgaaatgca tggctcactg taacctccaa ctcccgggct 5100
 45 caagcgatcc tcctacctca gcttctccag tagttgagct tgatttattt taaagtttca 5160
 taaaattttg gcatttcttt ccacaatatg gccatgtgtg ctttactata aaatattttc 5220
 atcacaaaat ttacatcgct ggaaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caaccaaga 5280
 aagcagaaca gactcaaatt atcccttaaa tcccccttaa ccacaaatat aaaacagtcc 5340

gtgactgggc gtgttggtt acacctgtaa tcccagcact ttgggaggcc aaggcgggtg 5400
 gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atggtgaaac cccgtcccta 5460
 ttaaaaatac aaaattattc aggagttgtg gcaggcagtt gtaatcccag ctacttggga 5520
 ggctgaggca ggagaatcac ttgaacccag gaggtggagg ttgtagttag ccaagattgt 5580
 5 gccagtgcac tccagcctgg gcaacagagc gagacttcca tcttaaaaaa aaaaaattaa 5640
 gtaaataaaa tataaaaaaa taaagcagtc cctattgata tctctttatt cactaaatca 5700
 acctggaatt gacctgaatt ctgatttttt tttcatcatg gattttttgc attaatattg 5760
 attgttttaa tattgcatta aaatattatt tatcttgact actgagtttg cgggacctcc 5820
 ttaaaattta tgaccaaggc aatgcctcac tctctgcct taccataatc tgggccacat 5880
 10 atcaggggct ccaatagcaa gcaacatgac ttttgaacag ctaagacttc tctcttctact 5940
 gtgaagacca gatggggcct gcaaacagtg taacctctac atgaaaatgc acgagattcc 6000
 aactacaacc aggcacaaaa gactctgatg gtgaagtcac agccctccaa gtcccaactt 6060
 cctgaaggga aagagcacc ccaagtctga ccagaggcca gagtcataac gaagatggaa 6120
 tgtgagcttg acatagaagg ggtggttagc cctggctcag taatgaagag gctttcgggc 6180
 15 ctgaaggaag agctcagcac attcaaagat tagaaggagg gtcccagtc taggagcagg 6240
 gaaggagaga aggcccaata agaaacacag acaggaggga ggggtcagg caagatcata 6300
 ctggaaacaa ctagagagct aataaaaagtc acagtgccca gtccccacat ggaccagact 6360
 cttcggaatc tctaggcac aatttgaggc ccagtagttt tcaaagtctt ccagaagatt 6420
 ctatgcacac cagccaaggg tgggaaccac aggtgttggc ctagggatca tgacaatgag 6480
 20 tttctaagtg caataagaaa cctccagaga gtttaagcag ggaataaatt tgatttgttt 6540
 cttgtttgtg atttttaaa atcagttctg ttactgtgtg taagacaata atccagaaaa 6600
 tctgttgctc atgaaccaca tatctgtaaa tttgcttccc ctgtaactgg atctaaccac 6660
 caaaaattag tacttactaa gaaattacat gcccagggac tatgctaagt aattcataaa 6720
 cactatttta tttactctc acagcaagtt tataagagaa acgttattat ttccacattt 6780
 25 cggatgagaa atttgaggct tggggaaagt taagtaattt acctaattgc acaccagtt 6840
 cataagatgc agagttaaga ttctaattct gtgtctaagt tgatgctcca tcaaacacac 6900
 cagcctcca actaggaagc aacatgctgg ccagaggatg ctgtcatcaa gtttacagaa 6960
 tggtagatg tctaggcaca gatgaataaa tcaacatgtt ggtttgcaat agaattgaatc 7020
 tatccagctc tgaatttgca tccaagggtt tgtgagcaca caagtctaaa agtgtggcct 7080
 30 cagctctgct aacttcatca aggtgaatac ctaggaggcc accctctgag accaccagat 7140
 ggacagtcca ccatctgttt acagatggta aagccacata ccagctttgc catctgatgt 7200
 tctctattca cattcaacat ttatacaaga aatagtcata tggatccttt tcaatagaca 7260
 gtactgggga aattgaattg ccatatgcag aagaatggaa ctgacctct atctctcacc 7320
 aaatacaaaa gttaactcaa gacagattaa agacttacat ataagacctg taactacaaa 7380
 35 aacactagaa gaaaacctag ggaaaatgct tctggaatta atctaggtga agaactcagg 7440
 actaagatat caaaagcaca agcaccacaaa caaaaataga caaacaggac ttaattaaac 7500
 tagaacgctt ctgaacagca agagaaataa tcaatagagt gaacagataa tctgcagaat 7560
 gggtagaaat atttgcaaac tatgcatcct acagggaat aatgtccaga atttagaagg 7620
 aactcaaaac attcaacaac aacagcaaaa taaccccacc aaaaaagtgg gcaaaggaca 7680
 40 tgaatagaca tttttcaaaa gaaggtatat gatatggttt ggctctgtgt ctccaccag 7740
 atctcacctt aaattgtaat aatccccaca tatcatggga gagaccgggt gggaggtaat 7800
 tgaatcatgg gggcagggtt gtcccatgct gttctcatga tactgaataa gtcctatgag 7860
 atctgatgat tttataaagg ggagttcccc tgcacacact ctcttgctg cctccatgta 7920
 atatgtgcct ttgcttctcc tttgccttct gccatgattg tgaggcctct ccagccatat 7980
 45 ggaactgagt caattaaacc actttttctt tgtaaattac ccaatcttg gtatgtcttt 8040
 attagcagca taagaacaga ctaatacagt gtacaaatgg ccaagaagcg taaaaaac 8100
 aaaatgctca aatcactaat cactagagaa tcgcaagtta aaaccacaat gagatattat 8160
 cttacagcag tcagaatgcc tattattaaa acaccacaaa ataacatgtt ggcaaggatg 8220

cagagaaaaag ggaataactta cacattatta gtgggaatgt aaactagtagt agcttctgtg 8280
 gaaaacacta tggagatttc tcaaagaact agaaatagaa ctacatgtg gttcagcaat 8340
 accacaactg ggtatctacc caaagggaaa taaattatta tataaaaaag atatctgcac 8400
 tcacttgttt attgcagcac tattcacaat agcaaagata tggaatcaac ccaagtgtcc 8460
 5 atcaacagat gattggataa agaaaacgtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat 8520
 acacatacca caatgaaata ctattcagct ataaagaaaa gaatgaaatc atgtcttttg 8580
 cagcaatgtg gttggaactg gaggccatta tcttaagtgg ataattcaaa aacagaaggt 8640
 caaatgtcac atgttctcac ttataagtgg gagctaaatg atgtgtacac atggacatag 8700
 agtgtggtat gataaacact ggagattgag atgggtggaa ggggtggaagg aggttgagt 8760
 10 atgagaaaaat actaaatgga tacaatatac atgattcagg cgatagatac actaaaagcc 8820
 cagacttcac cactacacag tatagctatg tagcaaaatt gcacctgtat tgcttaaatt 8880
 tatacaagta aaaaaaagat cgtacgaatt ctgtttttta ttctctatga aattactact 8940
 gagagtatta tccaatgccg tttctatgca gtgccccaa tattatccat ttagcagctc 9000
 ctatgcaatg cccaagata gaaattgtct tcaactttta tcccaggaaa accttcagtc 9060
 15 acacgtagaa actagaaatt tttcccctag atgaaaagta tgtaacataa cacattatct 9120
 tcatttagtc ggtttccaag aagctcagaa ccagatttta tgttcaatca aaaactgctt 9180
 attttaagtg aggtttactg aggtataaat tacaataaaa gccacctttt cgtgtatatt 9240
 tctataagtt ttggcaaatg catagctgtg taaccacaac cacattcaag atataggaca 9300
 agtccctcat cctttaaagt tcctttatgc cccttccttc accccagccc ttggcaacca 9360
 20 ctgggttttg tctgatccaa tcgtttgcct cttcctgaat gtcagtataa tagagccatg 9420
 caatgtgaag ccttttgagt ctggctttgt tcacttgttc acttaggaga atgcatttga 9480
 gattcatctt tgctgtttcg tgtagcacta gttcactgtc tattgttgag tagtattcca 9540
 ttgtgtggat atgccacaga ttgtttatct agttaacaat ttaaagccat ttggtcattt 9600
 ctaattttta gctgctaaga ataaagtgtc tgtaagcttt ccaatgcagg ttttgtgtg 9660
 25 aactcaggat ttcatctgcg ttgggtaaat tcctagcttt gggactgtg agtcatctgg 9720
 taggtgtatg ttgaacttta taagaaaactg ccaaactgtt ttccaaagtt gctgtgctct 9780
 tttgcactcc catcagcagt gaatgagggg tccacttgct cgagcctagt attttaactt 9840
 cactatatac cttctttgat gacatatcct ttcaaatttt tggcaagtt tttattgggg 9900
 tgttgttact atggactgtg agagtcttt gtatattctg catatgattt ttttctcaca 9960
 30 tttgtgtttt atgaatatgt tctcccaatg tgtggcgcct tttattttct taacgtgcca 10020
 tgtgaagagc agaagttaa ttttatgatg tccaaattat ctttttttct tttctttttt 10080
 agatcaaaat aggggtctat tttgattacc actgttattt tatctccatt tgattttcga 10140
 tttttatttt tatttttcta atttcattgt aaatttttaa ttaaacccaa atattctagg 10200
 ggaaagaggc aagataaaaa tagtctaact tgggcataaa ttttagagtc atattctctt 10260
 35 gccagaaaag gaaactagct ctcttacatt gattgtttta tttcagacgt cactacttta 10320
 tgaggatgcc caaattatgg gctttaaaaa atatatatcc aaacaggggt tcagaaagaa 10380
 taactaatat gtccacaaca acacaaaaaa tgattccacc ataagtttgc ccagtgcacg 10440
 ggtctatatt attttctata tatcaaatc tacaactggg tcttaaagct actgtacata 10500
 acctaagtta aaatattagg tattagttga taagacattt tatcatctat gaaatgttgc 10560
 40 ctgttgatcat agttagagaa tcttttaaaa tatggagcta tttcataga ttaaactatg 10620
 ccagttaaaa gttgggtaaa aagaactaca gaataatatt tatgtttatc gtgtaagggt 10680
 ttaaagcaaa ctccaagtca ttttcatcaa tgaaatcaat aaggttttgc aaatatatat 10740
 gtatgaaaat actgatttaa aatgcaaata aggggagagt ttgagagaga gagagagacc 10800
 aaatgatttt ataattctag taagtttata ggtttatggg gtttttacgt acttttctac 10860
 45 ccaacttgct tataagactt taatgaatca cttagaattt ttaaaataat ttattattac 10920
 tctgtacctg ttctttactc tgcaaatctt accttgccct tttgtctaaa agcaataaaa 10980
 tctgacctgg tttatatcgt atcattgatt ttgttactta gcaagcacag tgatccatta 11040
 ggcctatgta ggctcatggg ttatacaaca ctgccatctg ctgacagagt gtgacagtca 11100

cagtcagcaa cacgagacca ctttatttttc atttttagtg tttatagaaa tatgaatata 11160
 cacaaatagt ataatgaacc ctaagcttca caaattaaca ttttgctaatt cttgttttcaa 11220
 ctaccgcctc cccctcatc caattactct gttctctcac ctctcacac acagacactg 11280
 gcagtatttt tcagccaatc attaatatcgt tgccaactga taaggacttt taaaaaaciaa 11340
 5 ccaccattcc attatgattc ccagcataat tgagagtaat tccctaatat ccaataccca 11400
 ttttctattc caatttcctt gattgtcttt aaactgtttt taccctaagt ttgctttaa 11460
 caaagtccag gtctgtttaa acatatgggt aagttttacc caaacccaaa taaataaata 11520
 aataaataaa taaataacct attttttcca attccaggga atagtgaag agggtaaagt 11580
 ccattattta gaaacataaa tcacatcata ggactagaat tatcttgaag tcaaaattga 11640
 10 agactgaaaa tggaaaagaa aggtatagac taaacttatt taaaaacttc aatgcagaac 11700
 tctaagagaa gatattagaa agttgtacca gcattcatta ttcagtattc atcagtattc 11760
 actcagctat atgtagttga aatctaacta gaggagcttg atcagataaa gagatacatt 11820
 tttctcacca aggcggactc tggaggcagg tgggttcagag ctagacagct gctgcaggac 11880
 ccaggtcctt tccctgcctg ctctccact ctagcttggt actttcatcc tgcaagatgg 11940
 15 gtgtttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtgg 12000
 gcctctgtcc atcaagcaaa atttttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060
 aacagtccta actgcaaaga agctgaggaa ttagattttt ggctgggaca ctgttgccct 12120
 gtaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaaga ttgaaaactc 12180
 ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tgggcatacc ttaaaaacag 12240
 20 gcaattcaca acagatgaga cccaatagc caataaacat ttttaaattg tcaacctcat 12300
 gagtgatcag aaaacacaaa tatgtatttt aaaccacaaa taaaatacaa tgtattgacc 12360
 atttgagtgg aaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag gatgtagagt 12420
 gaggaaactc catggaggac ctatcattgc aaatgtggga atgaaactta atacacgaat 12480
 ttgaggccaa tttgtaaatt gaaaaatgcg cacaccctgc aaccaagtac cccttgcaat 12540
 25 atttttgaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaatcatg caatatgtga cttttatact 12600
 cagcataatg cccctcagat ccattgaagt catgtgtatc aacagctcac tttttttttt 12660
 ttaatttttt ttagagacag agtctcactc tgtcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720
 tcataactct ctctagcagc ctcgaaactcc tgggctcaag catcctcctg cctcagcctc 12780
 ccaagtagct aggactacag gcatgggaca caacacacag ctaatttttt taaatttttt 12840
 30 ttagagacat ggtctcacta tgttgcttac gctggtctca aactcctagg tcaagcgatt 12900
 ctcccacctc tacttcacaa agtgctgtag gtatgtagggt atggattgta ggtatgaacc 12960
 accgtgcca actcactact ttttattact aattattcca tgggatggat gtaccgcagt 13020
 ttgtttttacc attaatctat tgtaggacat tttgactgat tccagttttt ttttaataca 13080
 aataaaacca ctatgaatag ttgtgtattg tatacgtttt tgtgctaagt tttcattttt 13140
 35 ctgggataag ttttcatttc tttgggcttt tactgtatcc ttgatattat aatatgttac 13200
 atcttcagtt ttattctatt caatatataa tcttttattt tcttgaaat ctcccatgga 13260
 ttgttttagaa gtgtgtttgt ttgtttccaa gggtttgga tttttcccat ttttttcta 13320
 ttatcgattt ccagtttgat tccagggtgt cagagaacac acttcatgtg atttcagttc 13380
 tattaatttt gttgaggttt gttacatggc ccagtatatg gcaatttttg tatatgttcc 13440
 40 atgagcactt gaaaagaatg cgaattctgc tgggtgctgt tggagttttc cagcaatgtt 13500
 gatttatgat ctactcatt gatggtggtg ttgagtttga tgtgttctta cgatggcagc 13560
 tttaacattc ttgtcaggta attctaactc ctctgtcatg tcagtattag cgcctcttaa 13620
 ctgtctcatc aaagctgaga ttttcctggt tcccctggtt cctgttggga tgtgtggttt 13680
 tcaattgaaa tctggacttt ggagtattgt gttatgaggc tttggatctc atttaaaactc 13740
 45 atctcagcga atttcctctc ttgccactca ggaaggagaa gttgggtgtt tgaatggagc 13800
 agagccgtta ctgcctaaga attgttttac tgggcttccc ctttctttct ctttgacta 13860
 gagagagcca gctttttatt agggctttat gtttttctgg gcctgttgggt gtttctgggt 13920
 tgacaaactt ctccagaacc aagtctggaa tggatgaggc aaaaagaaac cccgtggaat 13980

	gcactgctgg	gtcgtctcctt	gggtcccaat	gttcctaact	ggtctgcctt	cttctctcca	14040
	gcttccagag	tcttcataag	tttgctttac	gtacaatgtc	cgggggtttt	actttacttg	14100
	agagaaatag	gtaaaagtaa	ttctactcca	tcttttcagga	agcaaaagcc	cccttggtgta	14160
	tttttttaaa	ctttcaaaaa	caaaacaaaa	ggcagctgca	acagtaaaga	agctagtaac	14220
5	acccttggtg	ggaaattcaa	gtccaaatac	acatttttaag	tttggctagc	cagtgagaac	14280
	atcagaatag	ttcagggtttt	aaacaaattt	atattttatga	ttatgcatat	actaaaagct	14340
	gaaggcattct	tatatattact	aagcacctat	tttgttcttg	ttaaaaagac	agaattccat	14400
	tccctaggaa	atttgacctg	gcagctggag	ctgatccacc	tggccactag	agcacagagc	14460
	agggagagta	gtagccctgc	cccagccacc	cctcaagaca	ggattctttc	tctgggaact	14520
10	gtaggtaaca	ctaaatcggt	ctggaacaca	acaacgaaag	aagaaaggaa	agagaaagaa	14580
	agaaagggaag	aaagagagag	agaagggaag	aagggaaggga	gggaagggaag	gaaggggaag	14640
	ggaagggaat	ggaagggaag	gaagggaagg	aaagggaagg	agggaaggga	agagggaagg	14700
	aggaaggaaa	ggaaagggaag	gaagggaagg	ggaaagaaaa	aaagaaagaa	agaagaaaga	14760
	aagaaagaca	agaaagaaag	aaagaaagaa	agaaagggga	aagaaagaa	agaggaaaga	14820
15	aagagaaaga	aagaaaagaa	agaaaaggaaa	gaaaagagaaa	gaaagaaaaa	gaaagagaaa	14880
	gaaagagaaa	gacaagaaag	aaaaaggaaa	gaaaagaaag	agaaagaaaa	gaaagaaagg	14940
	aaagaaagag	aaagaaagaa	aaagaaagaa	agaaaagaag	aaagagaaag	aaagaaagaa	15000
	aaagaaagaa	agaaagaaag	aaagaaaaag	aaaaagaaag	gagaaaatga	cagcaattac	15060
	ttttgcaaca	acctaataata	agtttttttaa	aagttaaata	ttctgttcca	tgcattgctg	15120
20	gataccttat	aaataacagg	gcacccctatg	acctgaattt	cccaaattat	gagttgaggg	15180
	tttgaactag	ttttaaaaaa	caaggaggcc	aggcgactg	gctcatgcct	gtaatccag	15240
	cactttggga	ggctgaggca	ggtggatcac	gaggtcagga	gctcgagacc	agccttacca	15300
	acatagtga	acaccgcctc	tactaaaaaat	acaaaaatta	gccgggcgtg	atggtgcgca	15360
	cctgtaattct	cagctactca	gcaggctgag	gcaggagaat	cgcttgaacc	cagaaggcgg	15420
25	aggttgcagt	gagccaagat	cacagcattg	cactccagcc	tgggcgacag	agggagactc	15480
	cgtcttcaaa	aaaaaaaaaa	aagacaaggga	atctgtaaaa	caggcactgg	aagtatatgc	15540
	acttttattt	tcattctatg	ctatccgatg	cctactgcta	tttcccttca	tatttaacct	15600
	ccaacagctg	catttttgctc	cctccagacc	acctgattgg	agctcacgtg	ctcccacaca	15660
	gtacctccaa	ccagagagag	tcgagtccca	cagaaaggcg	taacaatcac	cagtaatttt	15720
30	gcacttattt	tacattgtgc	cttgatacag	agtactcaat	gaatgctctt	tgaatcatat	15780
	ttaataaata	tgtgtatttg	ggattgtagc	atattgcagc	tacctggata	tataatttaa	15840
	ttagaaaaaa	aattttgtgt	ggctcaatca	acaaacgact	tttctctctc	tctctttctc	15900
	tttctccctc	tctctctctt	tcttctcagt	tgatgttgct	ggagttcagt	gttgtgcaga	15960
	tggcagtgac	aatgcccag	ggcacatgag	atatgataaa	aggccctga	agaagggtga	16020
35	gaaccagtta	tcttatgaaa	ttttccagag	tgggtactgg	atctctcctg	tctggcacca	16080
	tgctggcctc	agcccaaggg	gaatttcctt	ccagagacag	agggcagtga	ttgaggtggg	16140
	gagacagatc	gtaacactga	gacttacatg	aggacaccaa	acagaaaaaa	ggtggcaagt	16200
	atagaaaatt	ctttcttctg	gacagtcttc	tctgttctaa	cttcagcaaa	attctcccc	16260
	cagtggatgc	tattgcacaa	ccctacatat	gctatgtttt	ttcctataca	cacttaccta	16320
40	tgataaaatg	cattaattag	tcacagtaag	aggtaacaa	caataactag	taataaaaata	16380
	gaacaattca	gtaaaataag	agttacttga	gcacaaacac	taggatatca	tgacagtcaa	16440
	tctgatgacc	aagagggtga	ctaagcatct	aaacaggagg	gtaagtgtag	acagcatgga	16500
	gacgtggac	aaagggtatga	ttcagtccca	ggctgggtatg	gagcggaagg	gcatgatatg	16560
	tcatcacgct	actaaggcac	acaattttaa	atgagtaaat	tcttatttct	agaaatttct	16620
45	ttttaaatatt	ttcagactac	agttgcctac	aggttaactga	aacccagaa	agcaaaattg	16680
	ttgataagga	ggtactactg	tacatcgctc	tttgaaccaa	ctttatcatt	tgctagtata	16740
	tacatatata	cctacatata	tacatatata	catacttgca	cacacctata	tgtatacgta	16800
	cacacacaca	cacgcacaca	cacacactca	catctactaa	tgtagaata	agtttgctaa	16860

	ataagatgca	caacttggtta	atgtcctaca	gagcaataaaa	accataagca	ttgggggttat	16920
	cttttctact	agataaaaaat	ccattatcat	tttcataaaag	ttttctttac	attaacatct	16980
	aacttttgca	atctagtttt	taatcatcat	aaataggaag	caaatgaact	gtttctctag	17040
	tgaatcaaat	atccttgaaa	acatacatag	tcatcttttt	ggtttatttt	tatttttaga	17100
5	taaattattt	aaagttttta	ataatttaac	attcacaata	gtttgtgact	gtatattttg	17160
	acttggtcct	tcaaacttaa	tttgtacttt	tatgtatcgt	gcttacctca	attttttatt	17220
	cacttttcct	aaactttgct	ggattgggtt	attatttttg	tctatttctt	ttccttctag	17280
	tggtttggga	gggtttttta	aatcccatta	ctattgaatg	cctattaact	tgcccccttt	17340
	ttctttcaat	ctctattccc	acggcctgaa	gcatgagggc	caagctgtct	gtaaccagca	17400
10	gagagatgac	ccagggtgta	ttccactctc	cactgtccac	ctatcaccat	tcccagcccc	17460
	atagctctga	agtacggcct	ttctggggct	ctgtggggaa	aactagaact	ggctgcttca	17520
	aggacacctc	ctgtttttgc	aatggaaaaa	atgtttctaa	attccagttt	ctctatgaat	17580
	tcaatgacat	ggttttaaate	tctgtggtgt	tcttcaaagt	tttttcttct	aataggacct	17640
	ctcatgattc	tccaaccacg	aaataaaattc	attatcattt	ttatatttct	tctgtcattg	17700
15	caaaggagggt	tttgaaaagag	tggaggacgc	gctaataaac	tcaaaaatcc	acactattcc	17760
	ttgtttccat	ctgttgttca	ttcattgttt	ccattggcct	gtccgcctcc	tatcctcctt	17820
	cttagacttg	gagctctagc	ctcagccagg	atagggaaaa	gagagatcag	actgttactt	17880
	tgtctatgta	gaaaaggaag	acataagaaa	ctccattttg	atctgtatcc	tgaacaattg	17940
	ttttgccttg	agatgctgtt	aatctgtaac	tttagcccca	accttgtgct	cacagaaaca	18000
20	tgtgttgtat	ggaatcaaga	tttaagggat	ctagggctgt	gcagaatgtg	ccttggttaac	18060
	aacatgttta	caggcagtat	gcttggtaaa	agtcatcgcc	attctccatt	ctcgattaac	18120
	taggggcaca	gtgcactgcg	gaaagccgca	gggacctctg	cccaggaaaa	ctgggtattg	18180
	tccaaggttt	ctccccactg	agacagcctg	agatatggcc	ttgcgggatg	ggaaagatct	18240
	gaccgtcccc	cagcctgaca	cccgtgaagg	gtctgcgctg	aggaggatta	gtaaaaagagg	18300
25	aaggcctctt	gcggttgaga	taagagggaag	ccctctgtct	cctgcatgcc	cctgggaacg	18360
	gcatgtctca	gtgtaaaaacc	tgattgtaca	ttcgttctat	tctgagatag	gagaaaaaccg	18420
	ctctgtggct	ggaggcgaga	tatgctggcg	gcaatgctgc	tctgttggtc	tttactacac	18480
	tgagatgttt	gggtgagaga	agcataaaatc	tggcctacgt	gcacatccag	gcatagtacc	18540
	ttcccttgaa	tttacttggt	acacagattc	ctttgctcac	atgttttctt	gctgaccttc	18600
30	tccccactat	caccctgttc	tcctgccgca	ttccccttgc	tgaggtagtg	aaaatagtaa	18660
	tcaataaata	ctgagggaac	tcagagaccg	gtgccagcgc	gggtcctccg	tatgctgagt	18720
	gacggtccct	tgggcccact	gttccttctc	tatactttgt	ctctgtgtct	tatttctttt	18780
	ctcagtctct	cgtcccacct	gacgagaaat	accacaggt	gtggaggggc	tggacacccc	18840
	ttcgagccag	gattatcagg	gcatttgggg	gtctgcaaaa	ctaagcccca	actcatcgat	18900
35	ttcacaactt	catccagagc	cagcctgaac	agtagttgcc	catgatttct	atgccttaat	18960
	acgagaagag	aacatagggg	ctgggtgcca	agtaggtaga	caggaggggc	agggaaactct	19020
	aagacagagc	ttgaggggct	cattcctctt	gcaaaatgaa	acaaaaacca	cagcactgaa	19080
	tatgtaaatc	tcggtggctg	aaccctcct	aggatagtaa	gccctgacac	aattgctgct	19140
	atcttctctt	tctctcaagg	aagtcaaaaa	acacctgcag	ccttactgtc	cccttggaag	19200
40	caagatgaac	atctacattt	tctaaagtgg	gacaagaatc	tctgttcata	tttatgtccc	19260
	atgcatttgc	acgtggcccg	acaaaggact	ttgcttctgc	cagcacatct	gtcttcagat	19320
	atgagaggaa	acagacacaa	cctggaggcg	gcaaagaagc	agctctttct	caagtgcact	19380
	cctctatctc	cctacttcct	ggctaattgg	gcagccttga	tccttgggaa	tccaggacag	19440
	atatccactc	gtgacaaaact	agctggaaga	atgacaacca	atcaggttcc	aagcaccact	19500
45	ggatgtgaac	cacagaattt	cctcctctcc	ttgtggaatg	tcagcttacg	tctgacaaaa	19560
	aatgtaaaac	tgagagagtt	acaatcttaa	ggaggagtca	agctaaagca	gaaagaatca	19620
	cctactctgg	actccagcat	gactgctgag	ctcaaatata	tatagagaga	gaaagaacca	19680
	caaacttgaa	gatggatatc	agctacagac	tttcctgagt	caggtaggga	aatggccatc	19740

	cctcaaacct	tgcaaaaggc	aaacttatgc	catttgtgtcc	tctgacatac	tgggtgatgt	19800
	actgtatggt	actgatgtga	ggggaacttc	ctaaattggc	tagtaaatta	tgccaaataa	19860
	aaagcaaaaa	tgataatttct	tgaaatgtta	catctgagga	acattgctaa	aataatttat	19920
	cagtagtttt	caggatgatt	tatagatgtg	cattgaagtgt	tgtacttgtg	ctctctctct	19980
5	cctctctctc	tctcttttct	tcctctctct	cgctctttct	ctccttgccc	ccctccctcc	20040
	ctgactttcc	ttcctgtccc	ctccacagca	gtttatatatt	tttttctgat	aatctaactt	20100
	tgctgagggg	tcaatgtaaa	gcaccttcag	tgatgagtta	ggtggaatgt	tccccaagaa	20160
	attctatttc	cagcactctt	ttacatgaaa	tccaagaagc	tctcagacta	tcttactgac	20220
	accttgccct	tcctcaacag	atcaatctta	tcaatgtcca	tcacagatat	tttgtagaac	20280
10	gggtggatcct	ggcagagtct	cacagatgct	tctgagacaa	catttgcttt	caaaaaatga	20340
	accacacaca	tcctaaagat	ctcagccact	tcccatgttt	cattttgtgt	tacagcaaac	20400
	atcacacaaa	tcatttcctac	agatcaccac	tgcatgtgat	caataaaata	gtttttgcaa	20460
	caatgggtact	tatgataatc	atctttttatt	gtttacaaat	actgctttac	aatagttatt	20520
	cggttgcact	gttcatatta	gattttccaat	tagctcactt	aggaacataa	gtccctcgaa	20580
15	cagctcagtc	atcttttttca	ttcctgtttc	tatcccctac	atctctttcc	tttgagacag	20640
	actatctcct	acactgaaac	aggaaagctt	ttaccttttt	ggcatgcttg	atttaaagat	20700
	tatagaaaag	tatttgacaa	agaaaactca	cacatgtgtg	tacatatctt	ttaaaaagtt	20760
	atgtttatgc	attgcacagg	aatatcgaga	atgctaatag	gcaatgtcag	agtttactgt	20820
	ttttcaaaat	tagtacagtt	ttattatttc	taaaaactat	aaaatgaata	tattcacatc	20880
20	accatacaga	agagtaggag	gagatggcat	aaagtgtcat	tgttcctcct	ctgcaatccc	20940
	aggagataac	taccaagcac	aattttatgtc	ttttaaaatt	cagcccgtat	ttatatacat	21000
	atatattcaa	tgtagatggg	atcatgatata	ctcaccacac	atactcttca	gtgacctgca	21060
	ttttcacaaa	caccttccac	gtaactatat	agaagtctac	gtcttcccct	taatgtctgc	21120
	tttgtgtctac	attgtaaaagc	tctagcacag	tttaacccaa	ctcctattaa	tgaggatttt	21180
25	agttattttt	cactctttta	acaatatttc	catgtgtagt	cttatacata	cgtctgtaca	21240
	cacttatccc	agtctaagga	gttcctttta	ccttccccc	tcccagcatt	ccctgtcacg	21300
	cttgttgctt	ccgttgagtg	actttactcc	tggagtataa	tctgcgtata	gttcagttaa	21360
	aaacatggga	tctgagttta	ggtcacagct	ctgccactta	ctgccataag	ccagttcctt	21420
	gacctctctg	ccctcaagtt	tttgccacta	caaagtaggg	gataatatta	gttcctagtt	21480
30	catagagtct	tgggaataat	taaatgtgat	gatccatgta	caatgtctgg	cacttagtaa	21540
	gtgctcaata	aatgtcaccc	tttatgattg	gtattgctgt	tatgtctgca	gagaaaatca	21600
	ctttgtgtcc	cctttaaaaa	aggactatgc	ccttggtcag	ctattttgca	cattaaattt	21660
	cacttgccaa	tattaactct	ccacctctaa	cttgatccct	ctccttcctc	atcttctggt	21720
	gagaccaa	gctaattctg	ctattcaagg	caactagcaa	agctgccagt	gacagaatca	21780
35	aataaaccta	cccctaattct	ttagaattgt	agttatgatt	tctgttgtaa	aagttactgt	21840
	tgtggcagtc	agtattagtc	tttgggtctat	gatagcatct	ctgatctatt	attgaytttc	21900
	aattakgtat	ttttttttat	ttattctgaa	aatgtttgtt	aagcatttgc	taagtaaaga	21960
	tactggackg	agcctcccaa	atacagggca	aataaaacat	caaacagctt	ataatttaga	22020
	agggtagaag	agaatctgaa	agcaggtaaa	aataaacagg	cactcggctg	ggcgcggtgg	22080
40	ctcacgcctg	taatcccagc	actttgggag	gccgaggtgg	gcggatcacg	aggtcaggag	22140
	atcgagacca	tcctggctaa	cacggtgaaa	ccccgtctct	actaaaaata	caaaaaatta	22200
	gcgaggcggtg	gtggcgggcg	ccttttagtcc	cagctagtgc	ggaggctgag	gcaggagaat	22260
	ggtgtgaacc	cgggaggcgg	agcttgacgt	gagccaagat	cgcaccactg	cactccagcc	22320
	tgggygacag	agcgagactc	cgtctcaaaa	aaaataaata	aataaaataa	aaaataatta	22380
45	ggtactctag	gcccagtgac	ctgtctctgt	actctgtaaa	ttcagggtcac	ctgctcaggg	22440
	ctaactctgag	agaagggtctc	tcttcagttg	aattttgaaa	gacaatttagc	agttcacaag	22500
	ctaaccacag	tggacaaaga	tggtcccaag	cagagggagt	gcttggtgaaa	gctggaggcc	22560
	atagaaaaac	tctaaggagt	gtagggagggt	gggagtaatg	tatggaaggg	gtggagatgg	22620

aagggttaaga gagatacaag gctgcaaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aataactgaaa 22680
aggtcttcag tgttggtgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740
ggcagctcca aagatggcat gcgcctggtc cagctcagta agagctgagc tcttcctgtg 22800
<210> 101
5 <211> 154
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
10 <400> 101
tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaaggtcac 120
cgctcctagg cagcccaagt ccactcccac tctc 154
<210> 102
15 <211> 156
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
20 <400> 102
tcagggacaа tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
accgtcctag gtcagcccaa gtccactccc actctc 156
<210> 103
25 <211> 150
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
30 <400> 103
tctgggaaca cagccactct gaccatcagc gggacccagg ctatggatga ggctgactat 60
tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcc gtcttcggaa ctgggaccaа ggtcaccgtc 120
ctagggtcagc ccaagtccac tcccactctc 150
<210> 104
35 <211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
40 <400> 104
aggtggaaac acggtgagag t 21
<210> 105
<211> 21
<212> ДНК
45 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> синтетическая
<400> 105

(57) Формула изобретения

1. Способ получения вариабельной области легкой цепи λ человека, при этом способ

5 включает:

(а) иммунизацию генетически модифицированной мыши антигеном, причем геном зародышевой линии генетически модифицированной мыши содержит:

один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека и один или несколько генных сегментов $J\lambda$ человека,

10 причем один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека и один или несколько генных сегментов $J\lambda$ человека заменяют эндогенные генные сегменты $V\kappa$ мыши и эндогенные генные сегменты $J\kappa$; и

причем один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека и один или несколько генных сегментов $J\lambda$ человека функционально связаны с эндогенным геном константной

15 (Ск) области легкой цепи κ мыши; и

(б) выявление вариабельной области легкой цепи λ человека, которая кодирует вариабельный домен легкой цепи λ человека в антителе, которое специфически связывается с антигеном и было выработано генетически модифицированной мышью, причем вариабельная область легкой цепи λ человека происходит из генного сегмента

20 $V\lambda$ человека, из одного или нескольких генных сегментов $V\lambda$ человека и генного сегмента $J\lambda$ человека, из одного или нескольких генных сегментов $J\lambda$ человека.

2. Способ по п. 1, включающий выделение В-клетки генетически модифицированной мыши и амплификацию вариабельной области легкой цепи λ из В-клетки генетически модифицированной мыши.

25 3. Способ по п. 1 или 2, в котором один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека и один или несколько генных сегментов $J\lambda$ человека являются неперегруппированными генными сегментами.

4. Способ по п. 1 или 2, в котором один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека включают по меньшей мере 12 генных сегментов $V\lambda$ человека.

30 5. Способ по п. 1 или 2, в котором один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека включают по меньшей мере 28 генных сегментов $V\lambda$ человека.

6. Способ по п. 1 или 2, в котором один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека включают по меньшей мере 40 генных сегментов $V\lambda$ человека.

7. Способ по п. 1 или 2, в котором один или несколько генных сегментов $J\lambda$ человека

35 включают $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$ человека или их комбинацию.

8. Способ по п. 1 или 2, в котором эндогенный локус легкой цепи λ , иммуноглобулина мыши делетирован полностью или частично.

9. Способ по п. 1 или 2, в котором от 10% до 45% В-клеток генетически модифицированной мыши экспрессируют антитело, которое содержит легкую цепь

40 иммуноглобулина, содержащую вариабельный домен легкой цепи λ человека и домен Ск мыши.

10. Способ по п. 9, в котором вариабельный домен легкой цепи λ человека происходит из перегруппированного $hV\lambda/hJ\lambda$, который представляет собой $V\lambda 3-1/J\lambda 1$, $V\lambda 3-1/J\lambda 7$, $V\lambda 4-3/J\lambda 1$, $V\lambda 4-3/J\lambda 7$, $V\lambda 2-8/J\lambda 1$, $V\lambda 3-9/J\lambda 1$, $V\lambda 3-10/J\lambda 1$, $V\lambda 3-10/J\lambda 3$, $V\lambda 3-10/J\lambda 7$, $V\lambda 2-14/J\lambda 1$, $V\lambda 3-19/J\lambda 1$, $V\lambda 2-23/J\lambda 1$, $V\lambda 3-25/J\lambda 1$, $V\lambda 1-40/J\lambda 1$, $V\lambda 1-40/J\lambda 2$, $V\lambda 1-40/J\lambda 3$, $V\lambda 1-40/J\lambda 7$, $V\lambda 7-43/J\lambda 1$, $V\lambda 7-43/J\lambda 3$, $V\lambda 1-44/J\lambda 1$, $V\lambda 1-44/J\lambda 7$, $V\lambda 5-45/J\lambda 1$, $V\lambda 5-45/J\lambda 2$, $V\lambda 5-45/J\lambda 7$, $V\lambda 7-48/J\lambda 1$, $V\lambda 7-46/J\lambda 2$, $V\lambda 7-48/J\lambda 7$, $V\lambda 9-49/J\lambda 1$, $V\lambda 9-49/J\lambda 2$, $V\lambda 9-49/J\lambda 7$ или $V\lambda 1-51/J\lambda 1$.

11. Способ по п. 1 или 2, в котором геном зародышевой линии генетически

модифицированной мыши дополнительно содержит межгенную область V_κ-J_κ человека из локуса легкой цепи к иммуноглобулина человека, где межгенная область V_κ-J_κ человека сопряжена с генным сегментом V_λ человека и генным сегментом J_λ человека.

12. Способ по п. 11, в котором межгенная область V_κ-J_κ человека расположена между генным сегментом V_λ человека и генным сегментом J_λ человека.

13. Способ получения вариабельного домена легкой цепи λ человека, включающий:

(а) иммунизацию генетически модифицированной мыши антигеном, причем геном зародышевой линии генетически модифицированной мыши содержит:

один или несколько генных сегментов V_λ человека и один или несколько генных сегментов J_λ человека,

причем один или несколько генных сегментов V_λ человека и один или несколько генных сегментов J_λ человека заменяют эндогенные генные сегменты V_κ мыши и эндогенные генные сегменты J_κ; и

причем один или несколько генных сегментов V_λ человека и один или несколько генных сегментов J_λ человека функционально связаны с эндогенным геном S_κ мыши; и

(b) выявление вариабельного домена легкой цепи λ человека в антителе, которое специфически связывается с антигеном и было выработано генетически модифицированной мышью.

14. Способ по п. 13, в котором выявление вариабельного домена легкой цепи λ человека включает выявление последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельный домен легкой цепи λ человека.

15. Способ по п. 13 или 14, в котором один или несколько генных сегментов V_λ человека и один или несколько генных сегментов J_λ человека являются

неперегруппированными генными сегментами.

16. Способ по п. 13 или 14, в котором один или несколько генных сегментов V_λ человека включают по меньшей мере 12 генных сегментов V_λ человека.

17. Способ по п. 13 или 14, в котором один или несколько генных сегментов V_λ человека включают по меньшей мере 28 генных сегментов V_λ человека.

18. Способ по п. 13 или 14, в котором один или несколько генных сегментов V_λ человека включают по меньшей мере 40 генных сегментов V_λ человека.

19. Способ по п. 13 или 14, в котором один или несколько генных сегментов J_λ человека включают J_λ1, J_λ2, J_λ3, J_λ7 человека или их комбинацию.

20. Способ по п. 13 или 14, в котором эндогенный локус легкой цепи λ

иммуноглобулина мыши делетирован полностью или частично.

21. Способ по п. 13 или 14, в котором от 10% до 45% В-клеток генетически модифицированной мыши экспрессируют антитело, которое содержит легкую цепь иммуноглобулина, содержащую вариабельный домен легкой цепи λ человека и домен S_κ мыши.

22. Способ по п. 21, в котором вариабельный домен легкой цепи λ человека происходит из перегруппированного hV_λ/hJ_λ, который представляет собой V_λ3-1/J_λ1, V_λ3-1/J_λ7, V_λ4-3/J_λ1, V_λ4-3/J_λ7, V_λ2-8/J_λ1, V_λ3-9/J_λ1, V_λ3-10/J_λ1, V_λ3-10/J_λ3, V_λ3-10/J_λ7, V_λ2-14/J_λ1, V_λ3-19/J_λ1, V_λ2-23/J_λ1, V_λ3-25/J_λ1, V_λ1-40/J_λ1, V_λ1-40/J_λ2, V_λ1-40/J_λ3, V_λ1-40/J_λ7, V_λ7-43/J_λ1, V_λ7-43/J_λ3, V_λ1-44/J_λ1, V_λ1-44/J_λ7, V_λ5-45/J_λ1, V_λ5-45/J_λ2, V_λ5-45/J_λ7, V_λ7-48/J_λ1, V_λ7-46/J_λ2, V_λ7-48/J_λ7, V_λ9-49/J_λ1, V_λ9-49/J_λ2, V_λ9-49/J_λ7 или V_λ1-51/J_λ1.

23. Способ по п. 13 или 14, в котором геном зародышевой линии генетически модифицированной мыши дополнительно содержит межгенную область V_κ-J_κ человека из локуса легкой цепи к иммуноглобулина человека, где межгенная область V_κ-J_κ

человека сопряжена с генным сегментом $V\lambda$ человека и генным сегментом $J\lambda$ человека.

24. Способ по п. 23, в котором межгенная область $V\kappa$ - $J\kappa$ человека расположена между генным сегментом $V\lambda$ человека и генным сегментом $J\lambda$ человека.

5

10

15

20

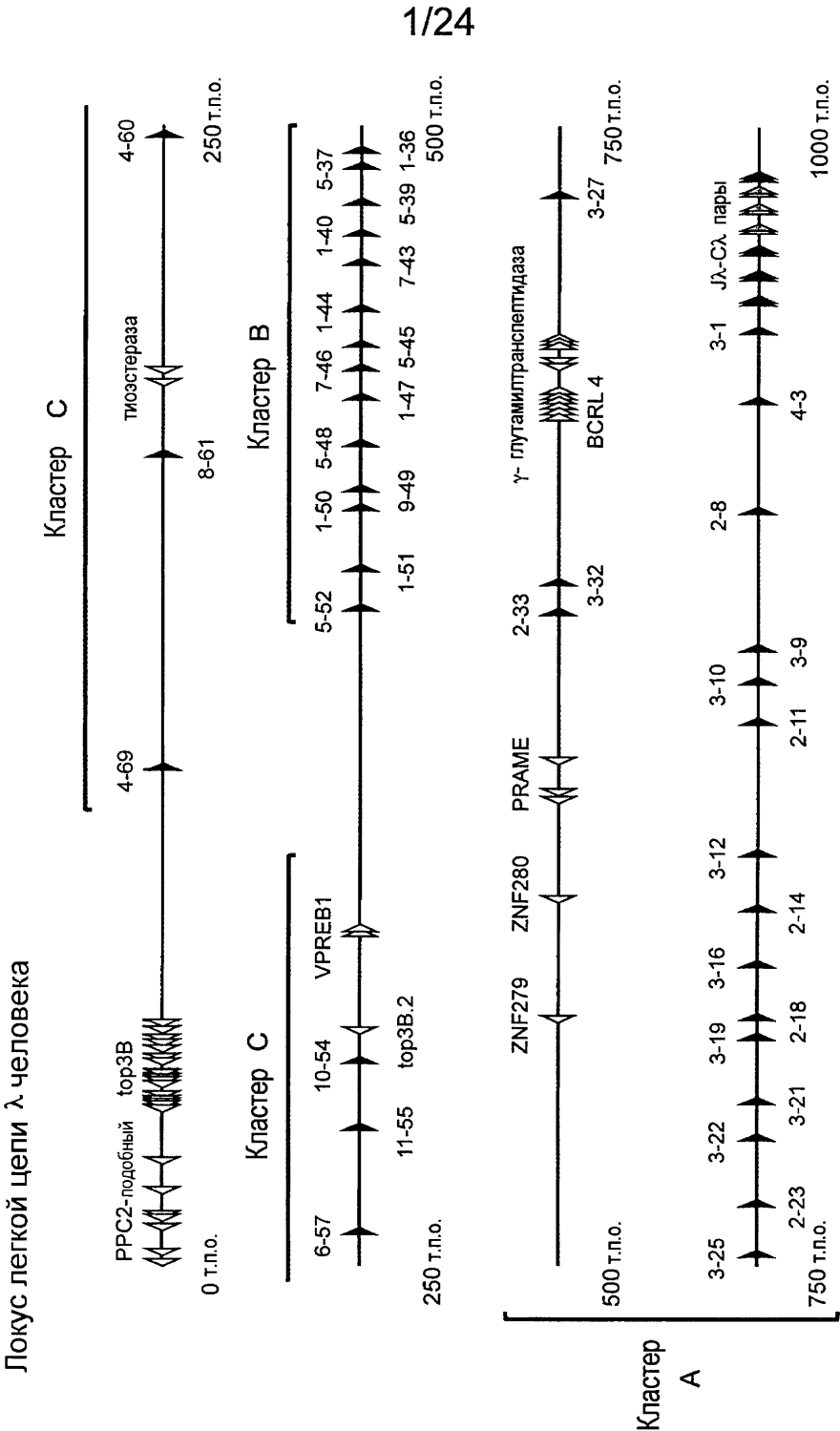
25

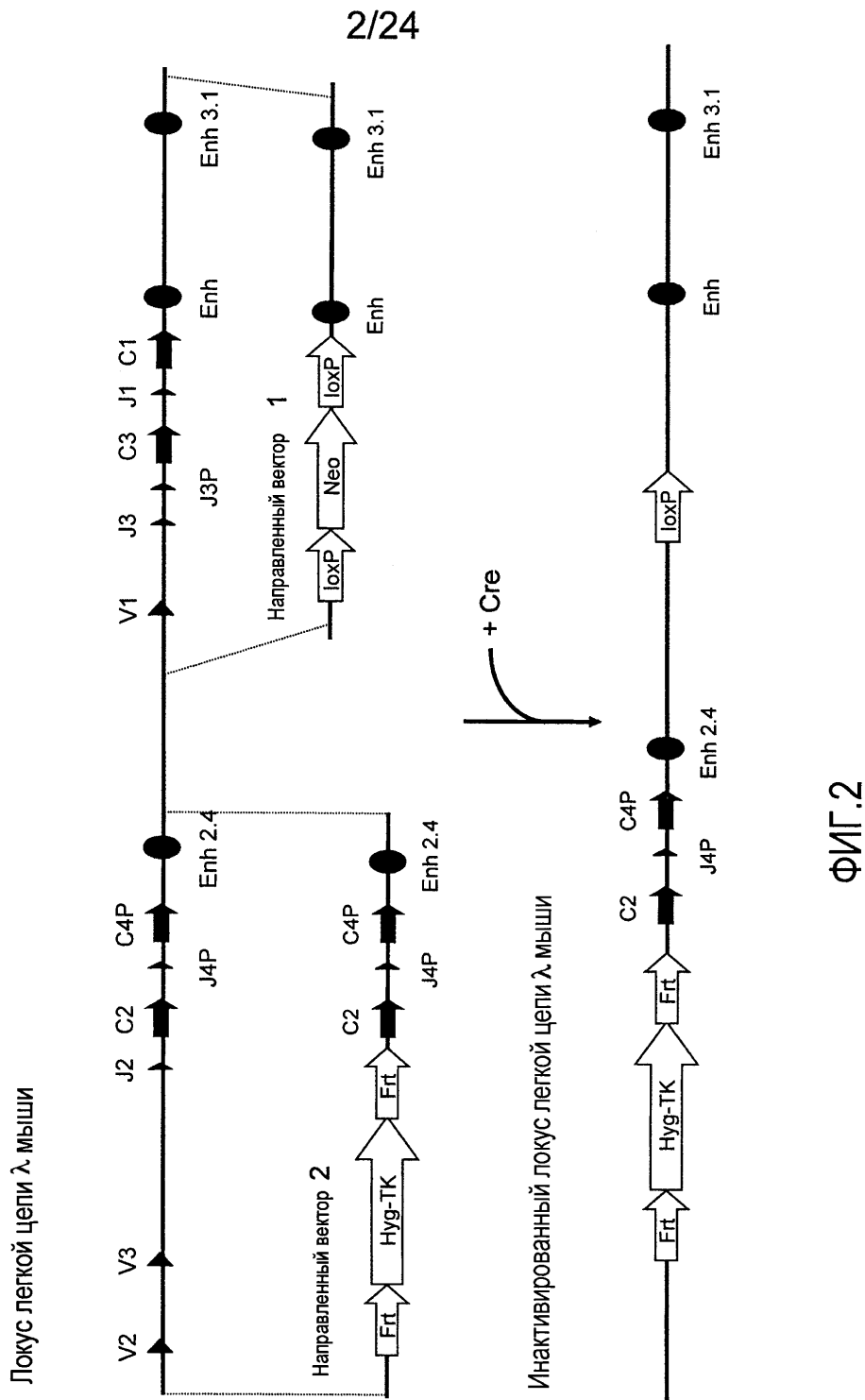
30

35

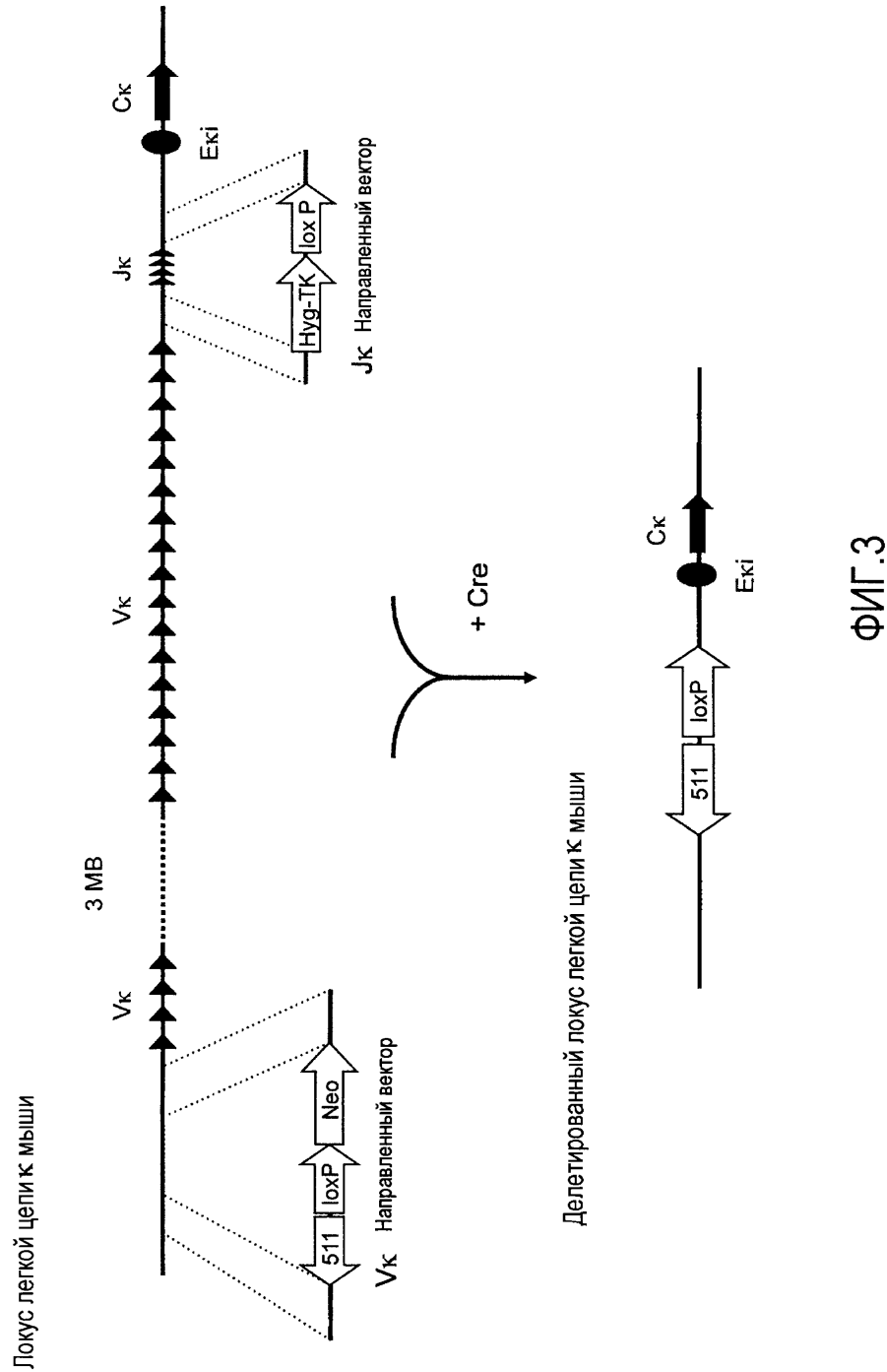
40

45

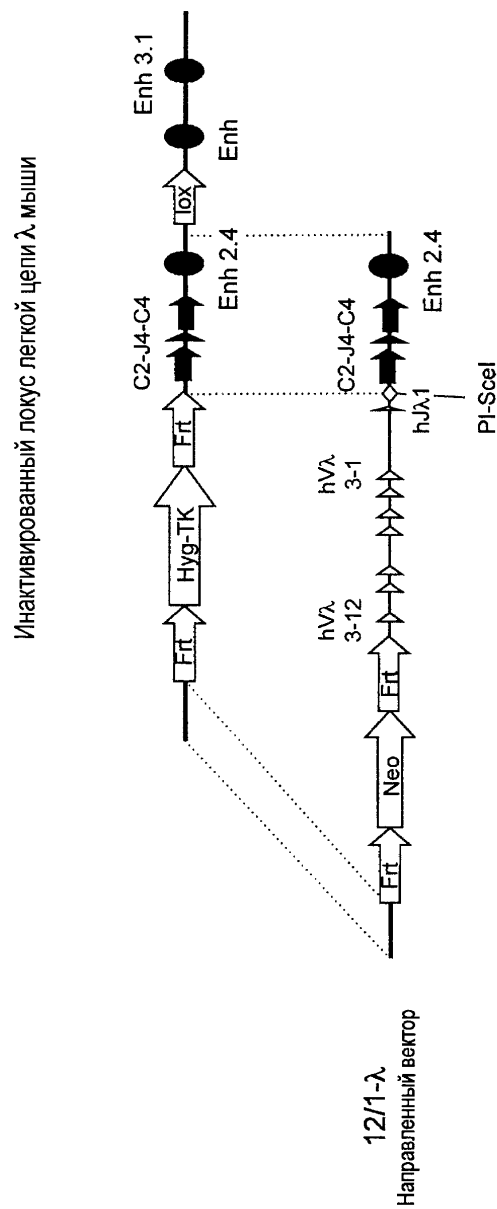




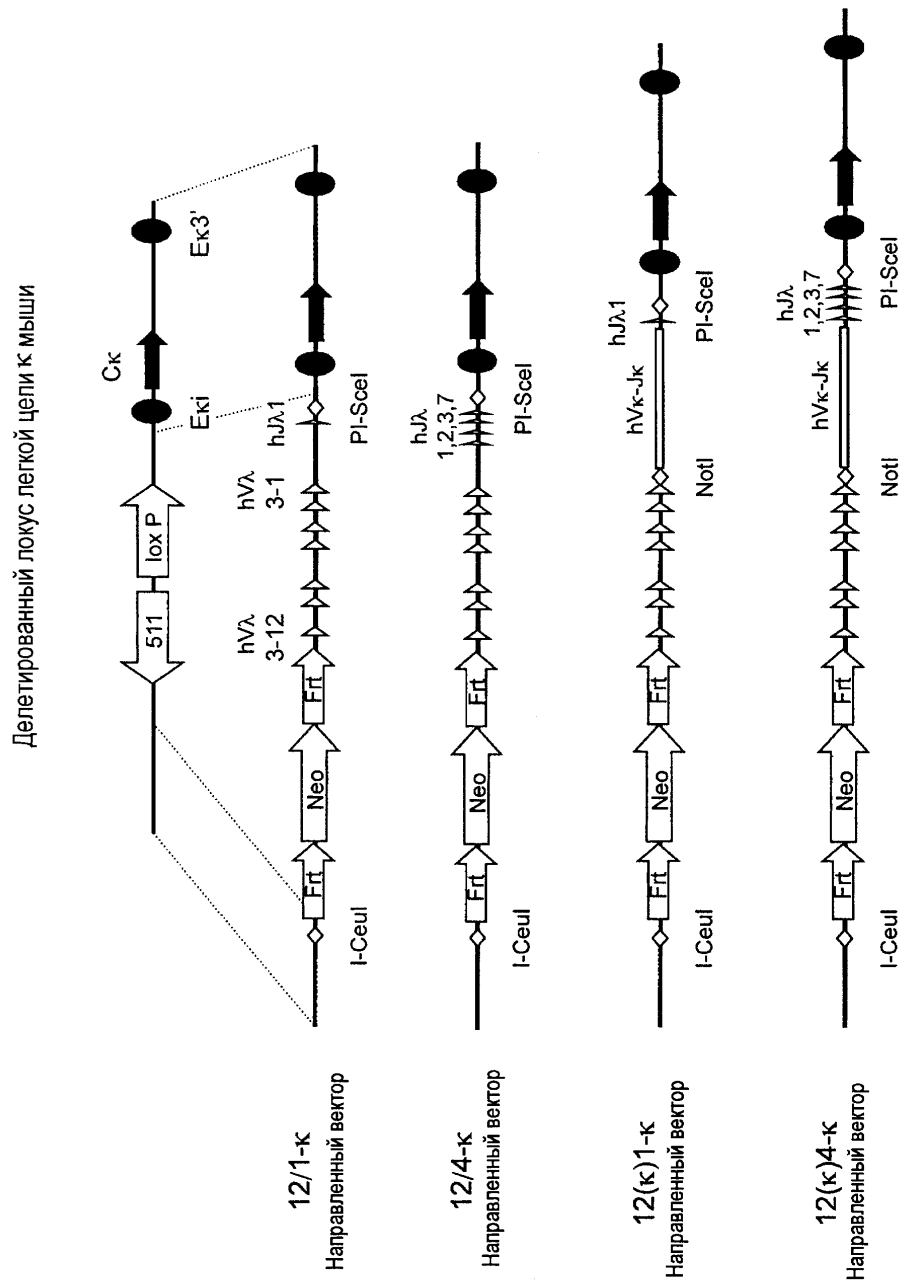
3/24



4/24

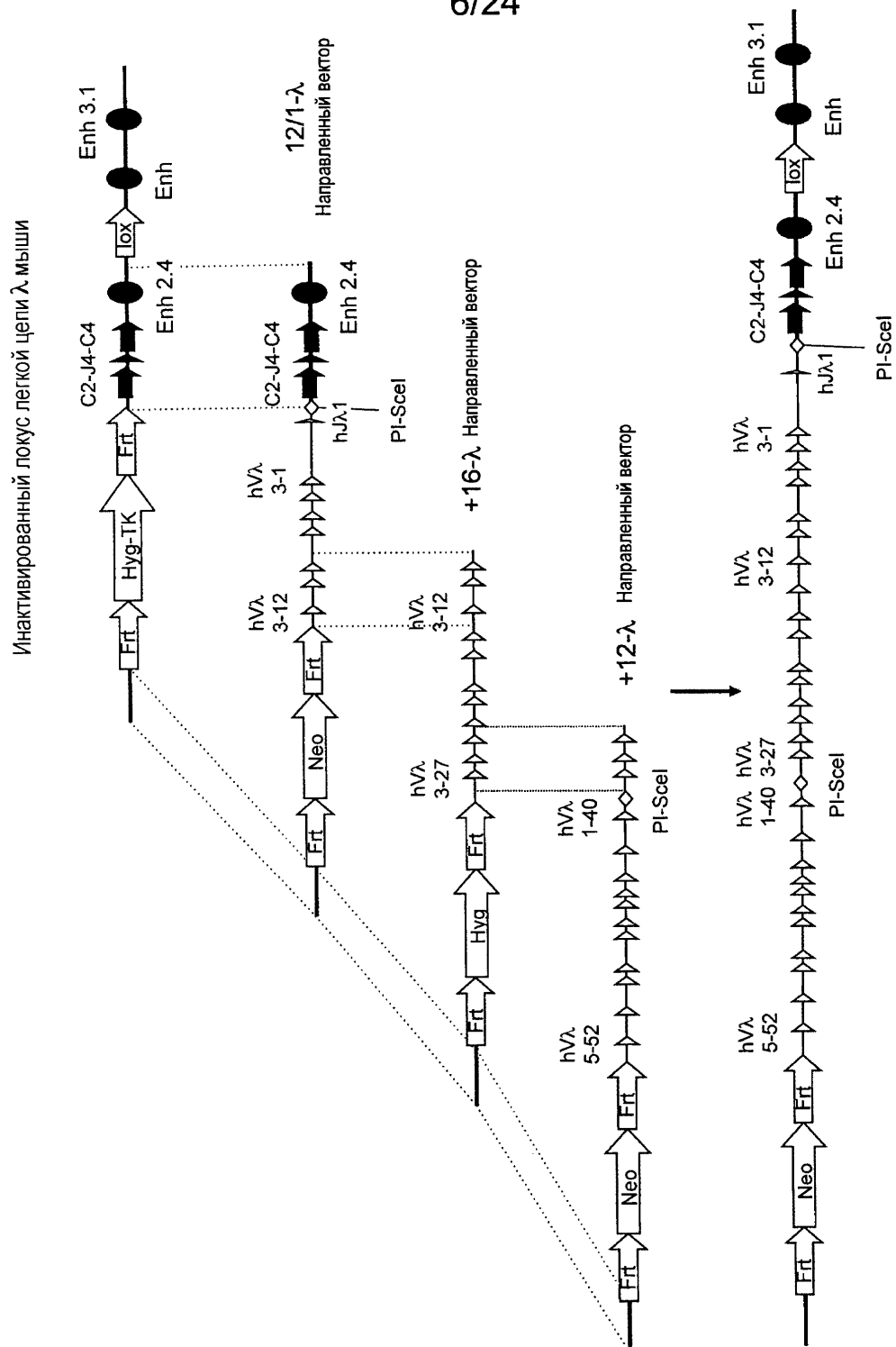


ФИГ. 4А



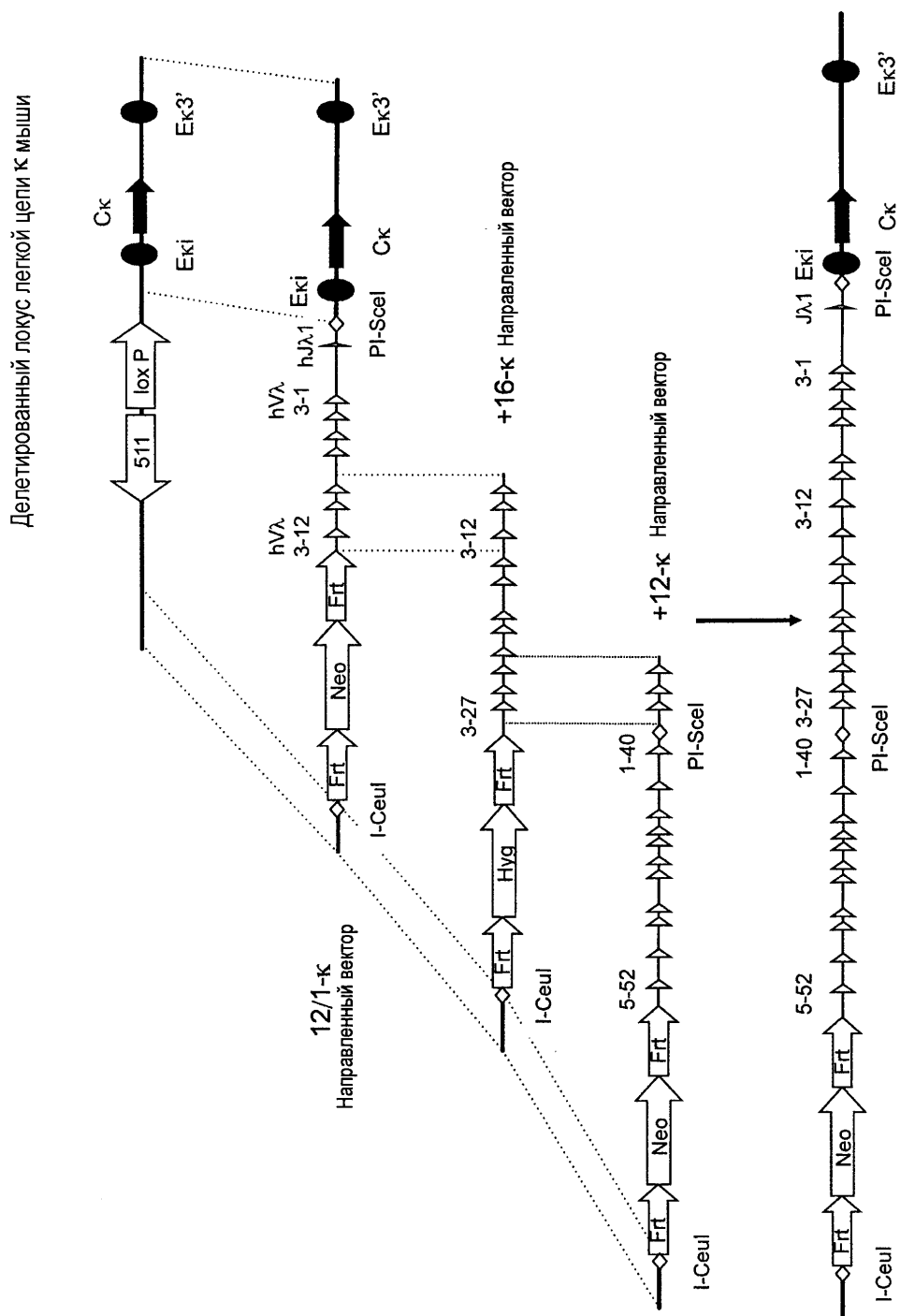
ΦΙΓ.4Β

6/24



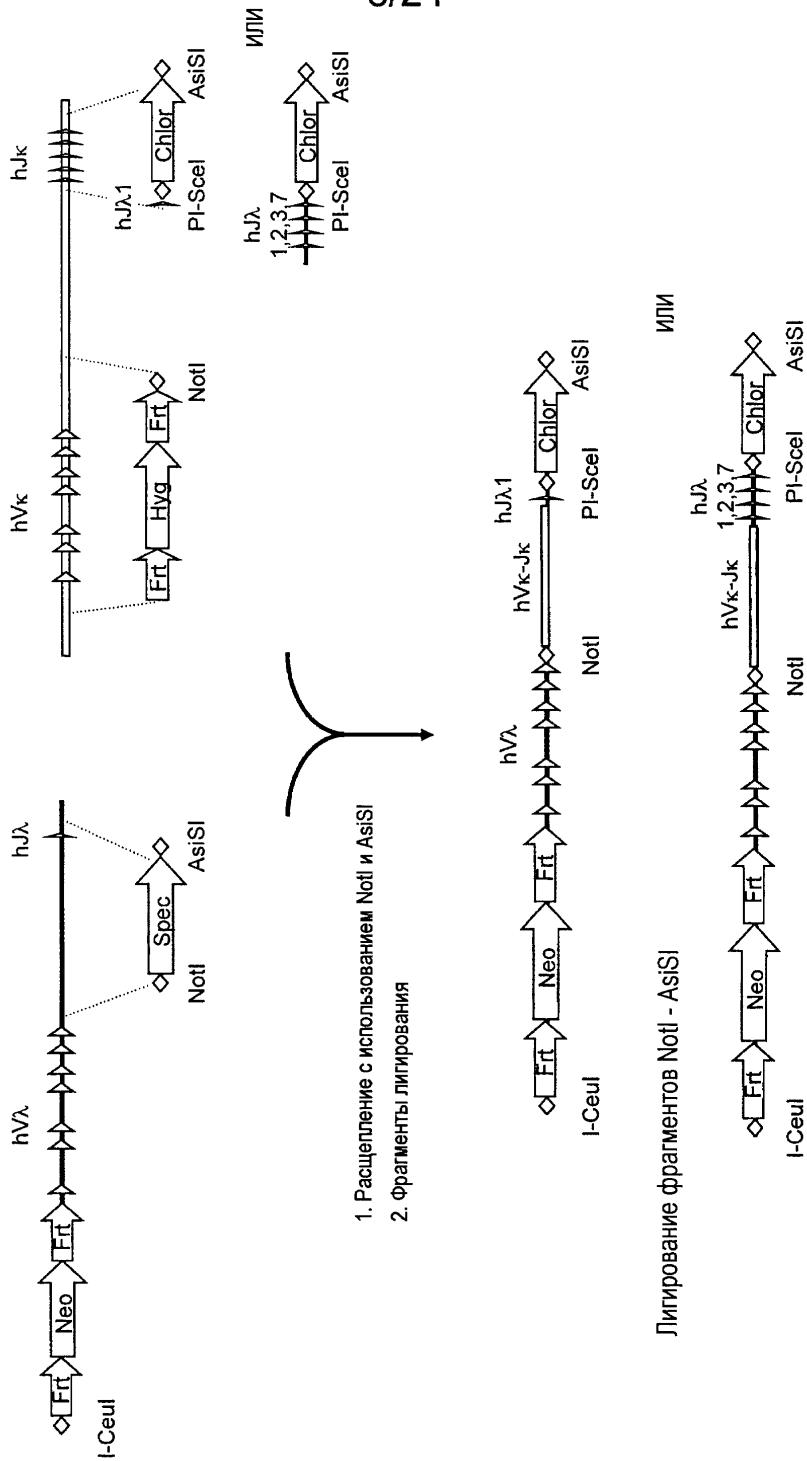
ΦΙΓ.5Α

7/24

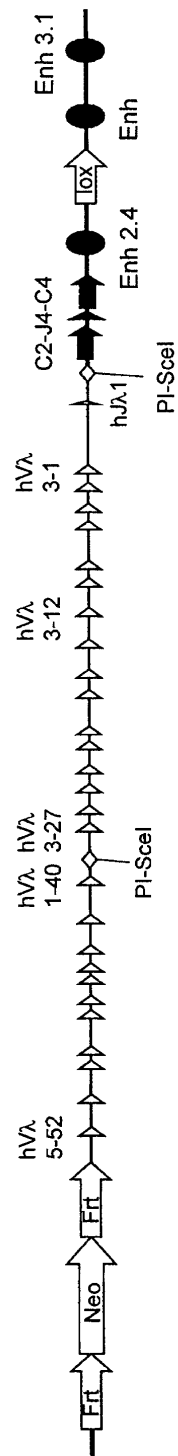


ФИГ.5В

8/24

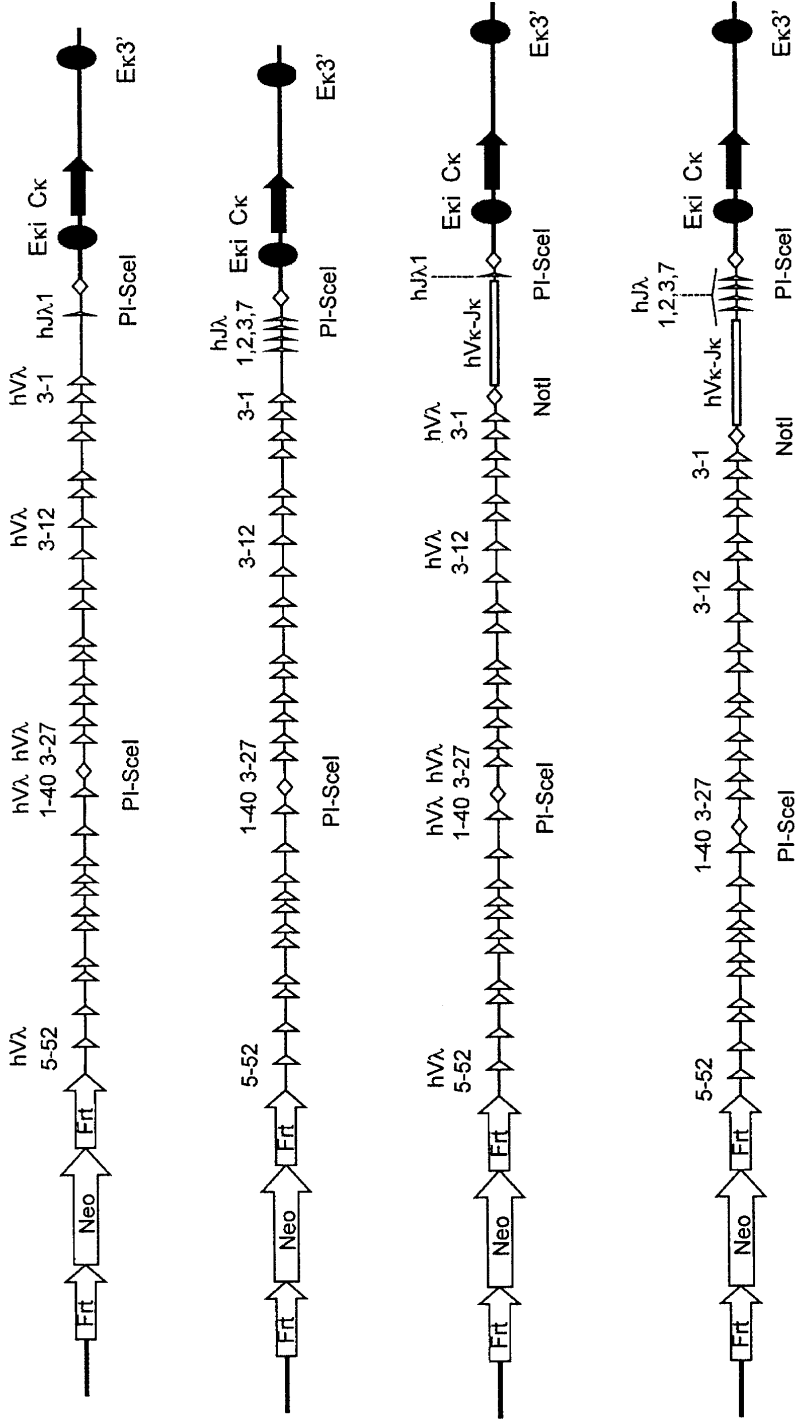


ФИГ.6



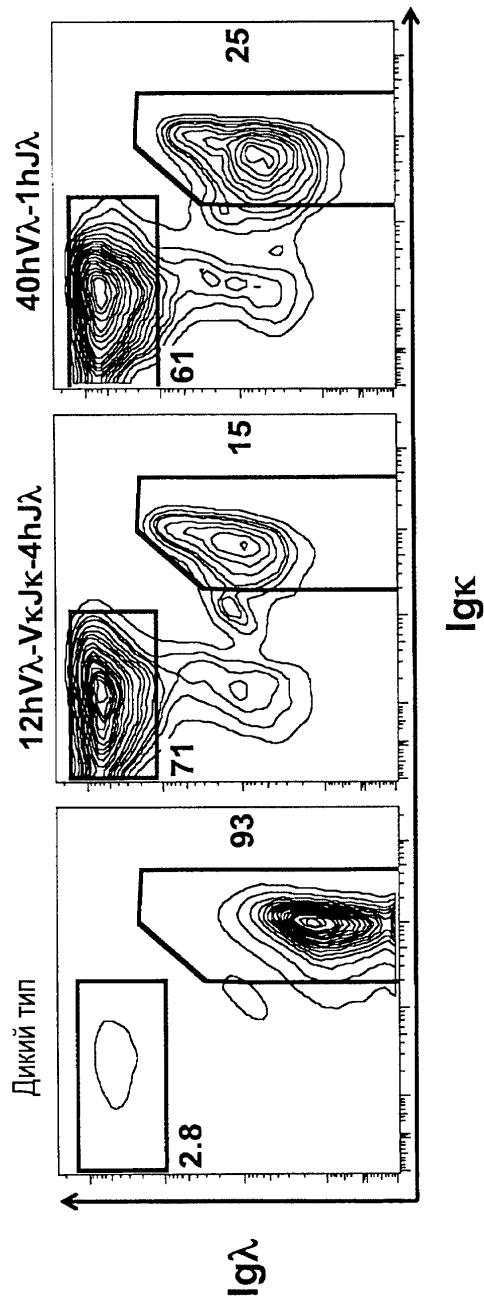
ΦΙΓ.7Α

10/24



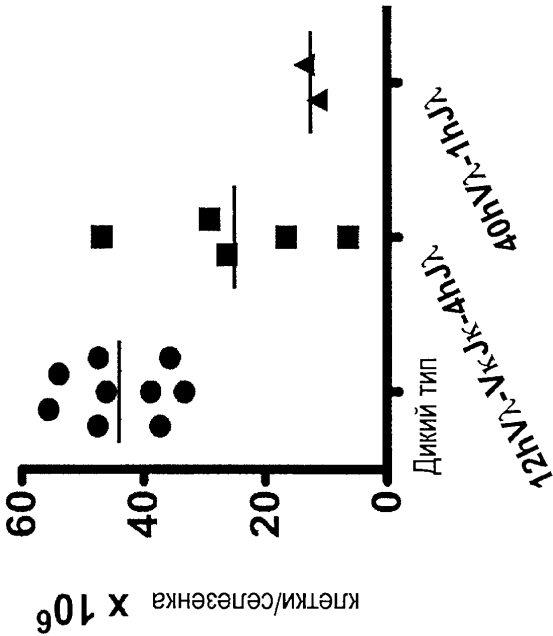
ФИГ.7В

11/24



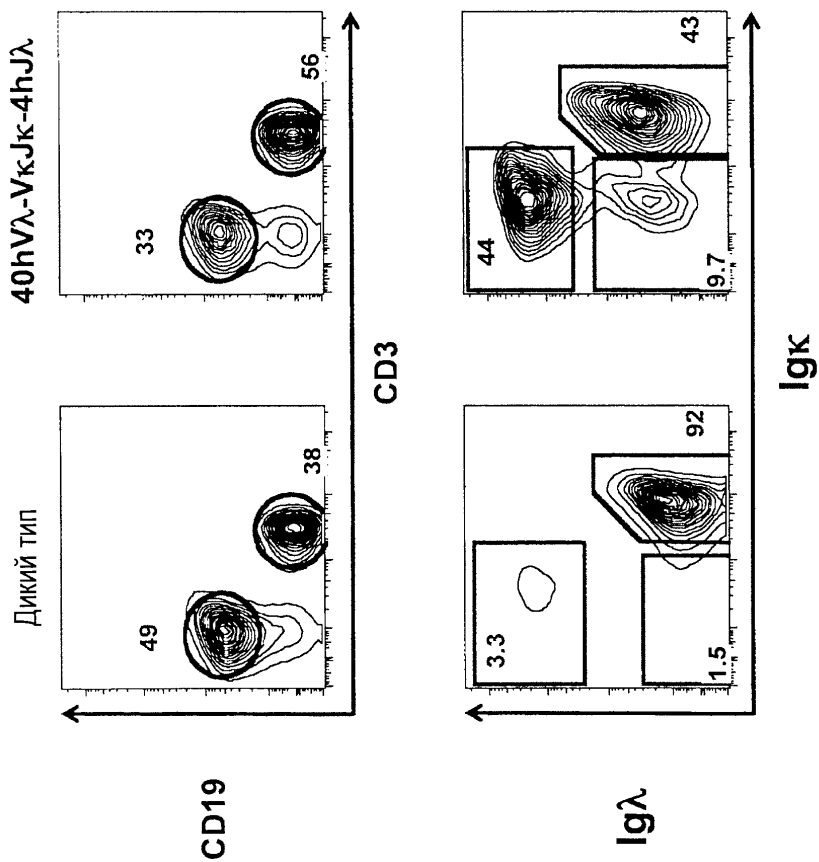
ФИГ.8А

12/24

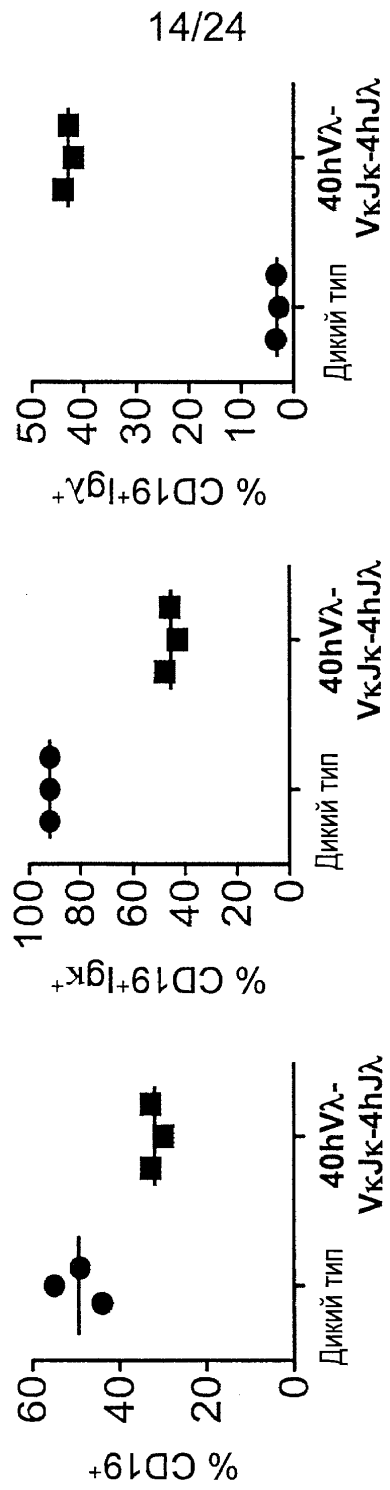


ФИГ.8В

13/24

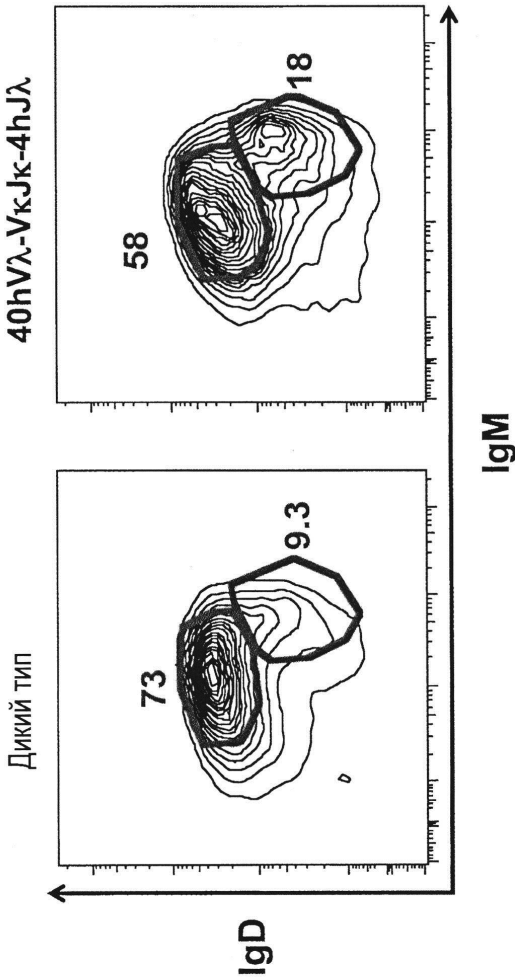


ФИГ.9А



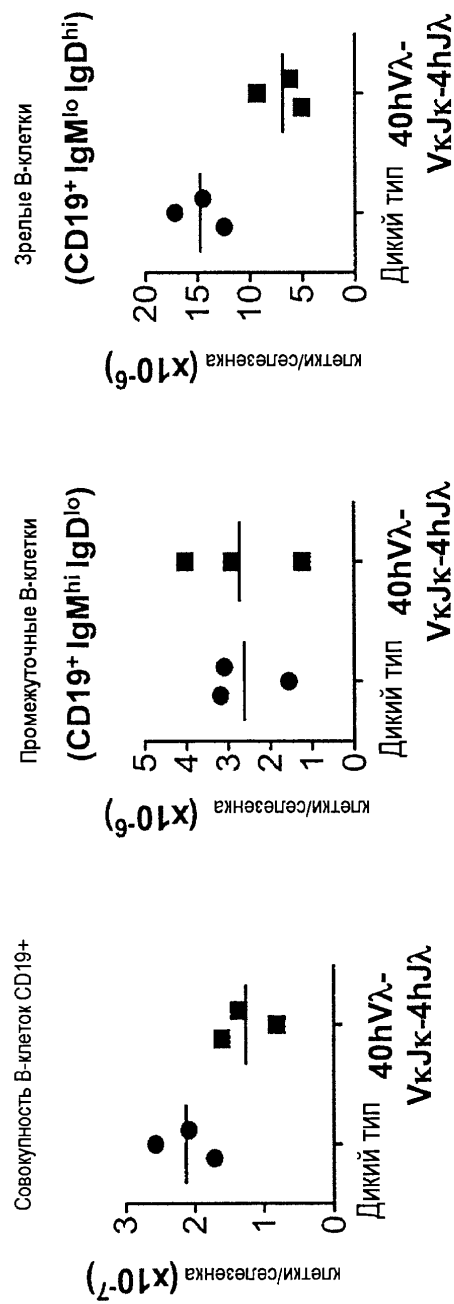
ФИГ.9В

15/24



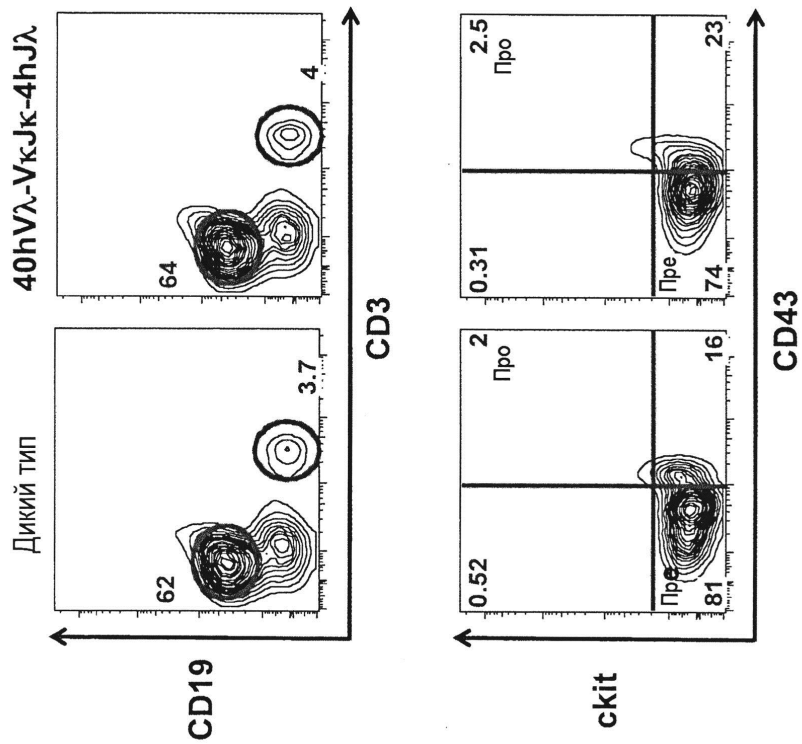
ФИГ.9С

16/24



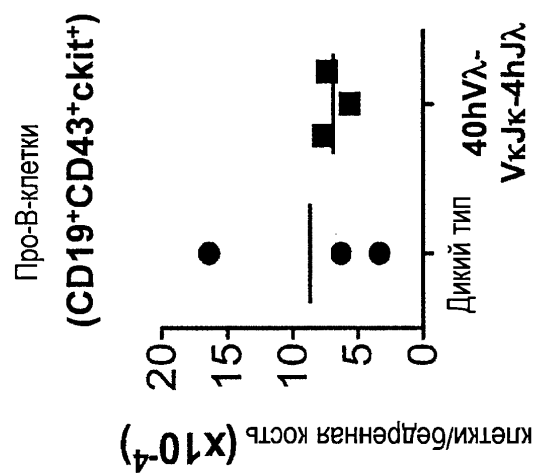
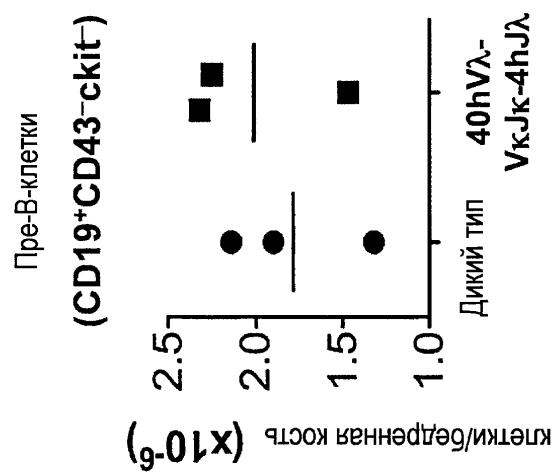
ФИГ.9D

17/24



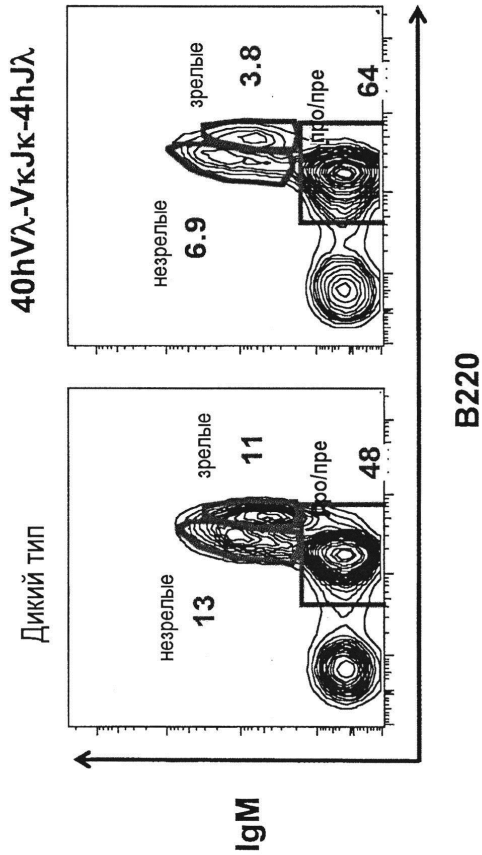
ФИГ.10А

18/24



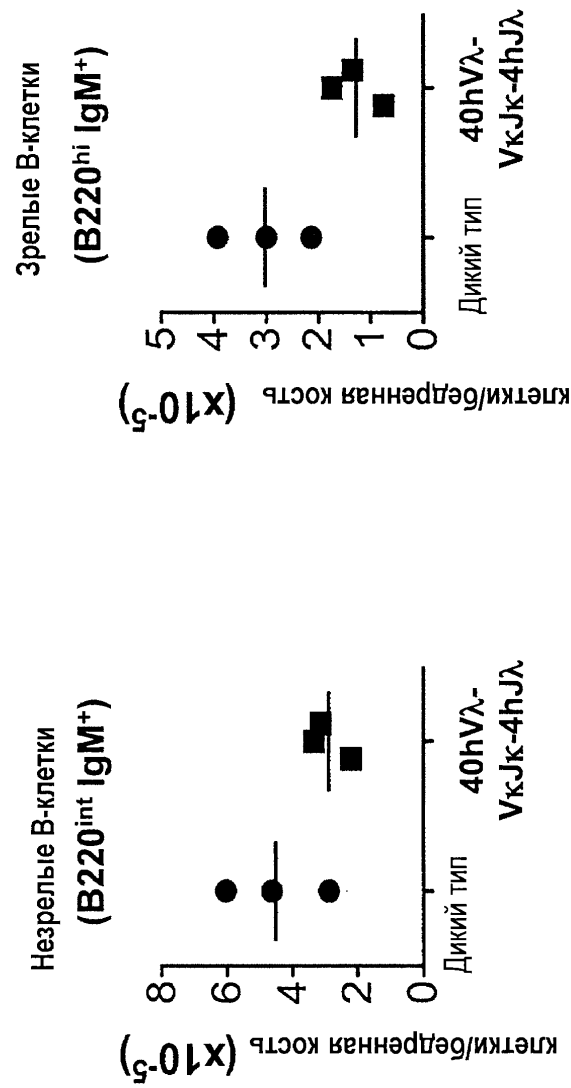
ФИГ.10В

19/24



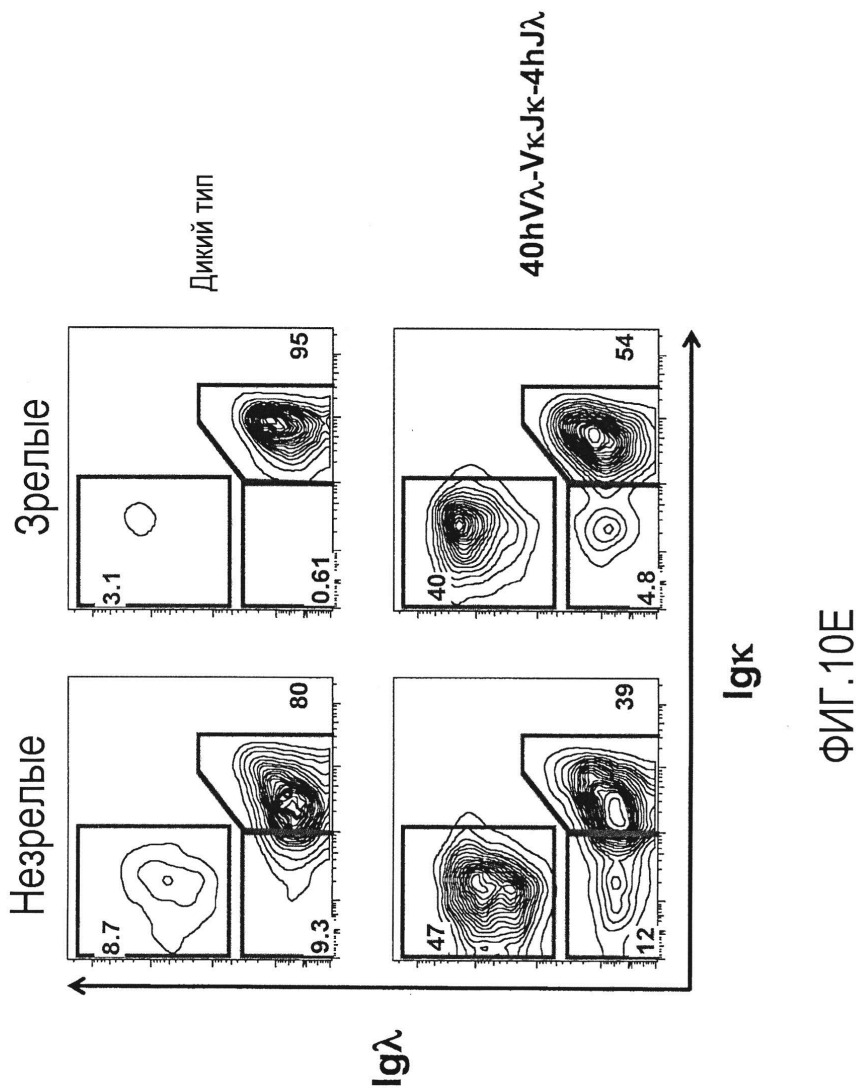
ФИГ.10С

20/24



ФИГ.10D

21/24



3' Vλ человека	λλ1 человека	5' Cκ мыши
A6	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
B6	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
F6	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
B7	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
E7	GCAACAAT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
F7	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
C8	GCAACAATT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
E12	CAAGTCGGTT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
1-4	TGAGTGCT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
1-20	TGAGTGCg	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
3B43	CTGAATGGT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
5-8	AGTGGTAAT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
5-19	AGTGGTGCT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
1010	AGCAGCACT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
11A1	AGCAGCGCT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
7A8	GGTGGTGCT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
3A3	AGTAGCACT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
2-7	AGCAGCACT	GGGCTGATGCTGCACCAAACTGATCCATCTTC
FWR4	F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F	

ФИГ.11

23/24

	3' Vλ человека	JA человека	5' Cκ мыши
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTCCGAGGAGGACCCCGGTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTCCGAGAGGACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTCCGAGGAGGACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCCGAGGAGGACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACCTGGGACCAAGTCAACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATGGTGGTGGCTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGGCTCGa	GTATTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGGTGT	CTGTGTTCCGAGGAGGACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWR4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

ФИГ.12

24/24

	3' Vλ человека	Јλ.1 человека	5' Cλ.2 мыши
2D1	GCAGGCAGCAACAATTGa	aGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCCACTCTC
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCCACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCC	GTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCAACCGTCCTAG	GTCAGCCCCAAGTCCACTCCCCACTCTC
FWR4		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

ФИГ.13