(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112400022 B
(45)授权公告日 2023.06.30

(21)申请号 202080002761.4
(22)申请日 2020.02.18
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112400022 A
(43)申请公布日 2021.02.23
(66)本国优先权数据
PCT/CN2019/075406 2019.02.18 CN
PCT/CN2019/106320 2019.09.18 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2020/075698 2020.02.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/169022 EN 2020.08.27
(73)专利权人 百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司
地址 102609 北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地宝参南街12号院

(72)发明人 沈月雷 姚佳维 赵会珍 张雅博 刘丽丽 陆辉 黄淑文

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 杨琴
(51)Int.Cl.
C12N 15/85(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)

(56)对比文件
CN 103228130 A,2013.07.31
CN 104540383 A,2015.04.22
CN 107602696 A,2018.01.19
CN 104334732 A,2015.02.04
CN 104994729 A,2015.10.21
US 2014041067 A1,2014.02.06
CN 105308184 A,2016.02.03

审查员 张丽颖

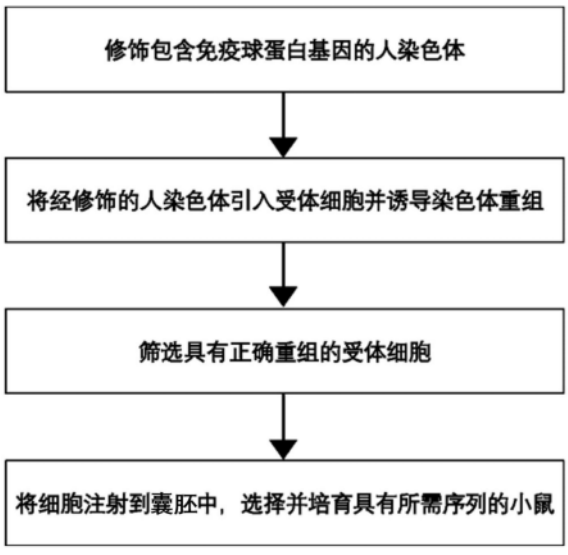
权利要求书4页 说明书67页
序列表14页 附图114页

(54)发明名称

具有人源化免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的非人动物

(57)摘要

提供了具有人源化重链免疫球蛋白基因座和/或人源化轻链免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的动物和细胞。



CN 112400022 B

1.一种产生经遗传修饰的非人动物的方法,其中,所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座包含人14号染色体重链免疫球蛋白基因座中的全部人IGHV基因、全部人IGHD基因和全部人IGHJ基因的连续人序列,其中所述人IGHV基因、所述人IGHD基因和所述人IGHJ基因可操作地连接并可进行VDJ重排;并且,

所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座包含破坏,所述破坏包括一个或多个内源IGHV基因、一个或多个内源IGHD基因和一个或多个内源IGHJ基因的缺失,并且包括至少500kb的连续内源序列的缺失;

其中,所述动物为小鼠,所述方法包括修饰细胞的基因组,所述修饰细胞的基因组包括:

修饰人染色体,所述经修饰的人染色体包含位于重链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点;

将所述经修饰的人染色体引入所述动物的细胞;以及

诱导所述经修饰的人染色体与内源染色体之间的重组,所述内源染色体包含位于重链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点,其中通过重组在一步替换中将人14号染色体重链免疫球蛋白基因座中的全部人IGHV基因、全部人IGHD基因和全部人IGHJ基因的连续人序列整合到所述内源染色体中。

2.如权利要求1所述的方法,其中在所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座的破坏包括从小鼠IGHV1-85基因开始至小鼠IGHJ4基因的连续序列的缺失。

3.如权利要求1所述的方法,其中所述动物包含一个或多个内源IGHM、IGHδ、IGHG3、IGHG1、IGHG2b、IGHG2a、IGHE和IGHA基因。

4.如权利要求1所述的方法,其中所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的人序列,其中所述未修饰的人序列至少为800kb。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHV1-2的未修饰的人序列。

6.如权利要求1所述的方法,其中所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHV6-1的未修饰的人序列。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHD1-1开始至人IGHJ6的未修饰的人序列。

8.如权利要求1所述的方法,其中所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82至人IGHJ6的未修饰的人序列。

9.如权利要求1所述的方法,其中所述动物对于所述重链免疫球蛋白基因座是纯合的。

10.如权利要求1所述的方法,其中所述动物对于所述重链免疫球蛋白基因座是杂合的。

11.如权利要求1所述的方法,其中所述动物进一步包含在内源轻链免疫球蛋白基因座中包含一个或多个人IGKV基因和一个或多个人IGKJ基因。

12.如权利要求1所述的方法,其中所述动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座包含破坏。

13.一种产生经遗传修饰的非人动物的方法,其中,所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座中包含人2号染色体的内源κ链免疫球蛋白基因座上的全部人IGKV基因和全部人IGKJ基因的连续人序列;并且,

所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座包含破坏,所述破坏包括一个或多个内源IGKV基因和一个或多个内源IGKJ基因的缺失,并且包含约或至少500kb的连续内源序列的缺失;

其中,所述动物为小鼠,所述方法包括修饰细胞的基因组,所述修饰细胞的基因组包括:

修饰人染色体,所述经修饰的人染色体包含位于轻链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点;

将所述经修饰的人染色体引入所述动物的细胞;以及

诱导所述经修饰的人染色体与内源染色体之间的重组,所述内源染色体包含位于轻链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点,其中通过重组在一步替换中将人2号染色体的内源κ链免疫球蛋白基因座上的全部人IGKV基因和全部人IGKJ基因的连续人序列整合到所述内源染色体中。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述动物包含源自人轻链免疫球蛋白基因座的从人IGKV3D-7开始至人IGKJ5的未修饰的连续人序列。

15.如权利要求13所述的方法,其中所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包括从小鼠IGKV2-137开始至小鼠IGKJ5的序列的缺失。

16.如权利要求13所述的方法,其中所述动物包含内源IGKC。

17.如权利要求13所述的方法,其中所述动物对于所述轻链免疫球蛋白基因座是纯合的。

18.如权利要求13所述的方法,其中所述动物对于所述轻链免疫球蛋白基因座是杂合的。

19.如权利要求13所述的方法,其中所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因。

20.如权利要求13所述的方法,其中所述动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座中包含破坏。

21.一种产生经遗传修饰的非人动物的方法,其中,所述动物是小鼠,所述动物的基因组的内源重链免疫球蛋白基因座包含:将从小鼠IGHV1-85基因开始至小鼠IGHJ4基因的连续序列替换为人14号染色体的内源重链免疫球蛋白基因座中的全部人IGHV基因、全部人IGHD基因和全部人IGHJ基因的连续人序列,其中所述人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因可操作地连接至一个或多个选自内源IGHM、IGHδ、IGHG、IGHE和IGHA基因的基因;

其中,所述方法包括修饰细胞的基因组,所述修饰细胞的基因组包括:

修饰人染色体,所述经修饰的人染色体包含位于重链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点;

将所述经修饰的人染色体引入所述动物的细胞;以及

诱导所述经修饰的人染色体与内源染色体之间的重组,所述内源染色体包含位于重链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点,其中通过重组在一步替换中将人14号染色体重链免疫球蛋白基因座中的全部人IGHV基因、全部人IGHD基因和全部人IGHJ基因的连续人序列整合到所述内源染色体中。

22.一种产生经遗传修饰的非人动物的方法,其中,所述动物是小鼠,所述动物的基因组的内源轻链免疫球蛋白基因座包含:将从小鼠IGKV2-137开始至小鼠IGKJ5的连续序列替

换为人2号染色体的内源κ链免疫球蛋白基因座上的全部人IGKV基因和全部人IGKJ基因的连续人序列,其中所述人IGKV和人IGKJ基因可操作地连接至内源IGKC基因;

其中,所述方法包括修饰细胞的基因组,所述修饰细胞的基因组包括:

修饰人染色体,所述经修饰的人染色体包含位于轻链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点;

将所述经修饰的人染色体引入所述动物的细胞;以及

诱导所述经修饰的人染色体与内源染色体之间的重组,所述内源染色体包含位于轻链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点,其中通过重组在一步替换中将人2号染色体的内源κ链免疫球蛋白基因座上的全部人IGKV基因和全部人IGKJ基因的连续人序列整合到所述内源染色体中。

23.如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述动物缺乏能够重排和形成编码内源重链可变结构域的核酸序列的内源免疫球蛋白重链可变结构域基因座。

24.如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述动物缺乏能够重排并形成编码内源轻链可变结构域的核酸序列的内源免疫球蛋白轻链可变结构域基因座。

25.如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述动物能产生人源化抗体。

26.一种制备与抗原特异性结合的嵌合抗体的方法,所述方法包括:

将经遗传修饰的非人动物暴露于所述抗原,所述动物由权利要求1-25任一项所述的方法产生;

从所述动物收集的细胞产生杂交瘤;以及

收集由所述杂交瘤产生的所述嵌合抗体。

27.如权利要求26所述的方法,其中所述方法还包括对所述杂交瘤的基因组进行测序。

28.一种修饰细胞的基因组的方法,所述方法包括:

修饰人染色体,所述经修饰的人染色体包含位于重链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点;

将所述经修饰的人染色体引入所述动物的细胞;以及

诱导所述经修饰的人染色体与内源染色体之间的重组,所述内源染色体包含位于重链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点,其中通过重组在一次替换中将人14号染色体重链免疫球蛋白基因座中的全部人IGHV基因、全部人IGHD基因和全部人IGHJ基因的连续人序列整合到所述内源染色体中。

29.如权利要求28所述的方法,所述方法还包括:

修饰人染色体,所述经修饰的人染色体包含位于轻链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点;

将所述经修饰的人染色体引入所述动物的细胞;以及

诱导所述经修饰的人染色体与内源染色体之间的重组,所述内源染色体包含位于轻链免疫球蛋白基因座可变区的两侧的两个外源重组位点,其中通过重组在一次替换中将人2号染色体的内源κ链免疫球蛋白基因座上的全部人IGKV基因和全部人IGKJ基因的连续人序列整合到所述内源染色体中。

30.一种制备与抗原特异性结合的抗体的方法,所述方法包括:

将经遗传修饰的非人动物暴露于所述抗原,所述动物由权利要求1-25任一项所述的方

法产生;

对细胞中编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸进行测序,所述细胞表达与所述抗原特异性结合的嵌合抗体(hybrid antibody);以及

在细胞中将编码所述人重链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人重链免疫球蛋白恒定区的核酸,以及将编码所述人轻链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人轻链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接。

31.一种制备与抗原特异性结合的抗体的方法,所述方法包括:

在细胞中获得编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸序列,所述细胞表达与所述抗原特异性结合的嵌合抗体(hybrid antibody),其中所述细胞通过将经遗传修饰的非人动物暴露于所述抗原而获得;将编码人重链免疫球蛋白可变区的所述核酸与编码人重链免疫球蛋白恒定区的核酸,以及将编码所述人轻链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人轻链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接;其中,所述动物由权利要求1-25任一项所述的方法产生;以及

在细胞中表达所述核酸,从而获得所述抗体。

32.一种获得编码与抗原特异性结合的抗体结合结构域的核酸的方法,所述方法包括

将经遗传修饰的非人动物暴露于所述抗原,所述动物由权利要求1-25任一项所述的方法产生;以及

对细胞中编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸进行测序,所述细胞表达与所述抗原特异性结合的嵌合抗体(hybrid antibody)。

33.一种获得样品的方法,所述方法包括:

将经遗传修饰的非人动物暴露于所述抗原,所述动物由权利要求1-25任一项所述的方法产生;以及

从所述动物收集所述样品。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述样品是脾组织、脾细胞或B细胞。

具有人源化免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的非人动物

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2019年2月18日提交的PCT/CN2019/075406和2019年9月18日提交的PCT/CN2019/106320的优先权。前述的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及具有人源化重链免疫球蛋白基因座和/或人源化轻链免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的动物和细胞。

[0004] 发明背景

[0005] 治疗性抗体是增长最快的治疗性化合物类别之一，其增长速度快于小分子药物的增长。这些治疗性抗体通常是人抗体或人源化抗体。人抗体或人源化抗体可通过啮齿动物抗体(例如，小鼠抗体)的人源化或通过使用噬菌体文库来产生。通过这些方法产生的抗体通常具有次优的结合亲和力和生物物理属性，导致制造困难和较差的药代动力学。特别地，人源化过程可能不利地影响结合亲和力，并将免疫原性表位引入抗体，并且使用噬菌体文库发现的抗体显示免疫球蛋白重链和轻链的有限多样性和非天然配对。经常需要迭代和耗时的实验来改善所述性质。在一些情况下，这些抗体在患者体内也可具有免疫原性，从而导致其效力随着时间的推移而减弱。

[0006] 产生完全人抗体的一种可能的方法是使用经工程化以表达人抗体谱系的转基因动物。转基因动物(诸如具有不同免疫球蛋白基因座的小鼠)的产生已允许在各种研究和开发应用中，例如在药物发现和对各种生物系统的基础研究中使用此类转基因动物。许多早期的转基因动物具有不完整的人抗体谱系，由于较低的V(D)J重组效率，抗体产量低于正常水平，具有可能引入免疫原性表位的内源抗体谱系，以及各种其它问题。需要高效且成本效益好的生产人抗体的方法，并且需要包含人源化免疫球蛋白基因座的非人动物，所述非人动物具有响应抗原以产生人源化抗体的能力。

发明内容

[0007] 本公开涉及具有人源化重链和轻链免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的动物和细胞。

[0008] 在一些方面，本公开涉及经遗传修饰的非人动物，其在内源重链免疫球蛋白基因座上包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因。在一些实施方案中，人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因可操作地连接，并且可以进行VDJ重排。

[0009] 在一些实施方案中，所述动物包含约或至少150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个或161个选自表1的人IGHV基因，约或至少20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个选自表2的人IGHD基因，以及约或至少5个、6个、7个、8个或9个选自表3的人IGHJ基因。在一些实施方案中，所述动物包含表1中除IGHV2-10、IGHV3-9和IGHV1-8外的全部人IGHV基因，表2中的全部人IGHD基因，以及表3中的全部人

IGHJ基因。在一些实施方案中，所述动物包含表1中除IGHV5-10-1和IGHV3-64D外的全部人IGHV基因、表2中的全部人IGHD基因和表3中的全部人IGHJ基因。在一些实施方案中，所述动物包含在人14号染色体上的内源重链免疫球蛋白基因座上的全部人IGHV基因、全部人IGHD基因和全部人IGHJ基因。在一些实施方案中，所述动物包含在人细胞(例如，体细胞、培养细胞、非免疫细胞、没有任何V(D)J重排的细胞)的人14号染色体的内源重链免疫球蛋白基因座上的全部人IGHV基因、全部人IGHD基因和全部人IGHJ基因。

[0010] 在一些实施方案中，所述动物包含在其内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏。

[0011] 在一些实施方案中，所述动物是小鼠，并且所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括表4中的一个或多个小鼠IGHV基因、表5中的一个或多个小鼠IGHD基因和/或表6中的一个或多个小鼠IGHJ基因的缺失。

[0012] 在一些实施方案中，所述动物是小鼠，并且所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括从小鼠IGHV1-85基因开始至小鼠IGHJ4基因的连续序列的缺失。

[0013] 在一些实施方案中，所述动物包含一个或多个内源IGHM、IGHδ、IGHG3、IGHG1、IGHG2b、IGHG2a、IGHE和IGHA基因。

[0014] 在一些实施方案中，所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的人序列。

[0015] 在一些实施方案中，所述未修饰的人序列约为或至少为10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb或1000kb。

[0016] 在一些实施方案中，所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGV1-2的未修饰的人序列。在一些实施方案中，所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHV6-1的未修饰的人序列。在一些实施方案中，所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHD1-1开始至人IGHJ6的未修饰的人序列。

[0017] 在一些实施方案中，所述动物包含源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHJ6的未修饰的人序列。

[0018] 在一些实施方案中，所述动物对于所述重链免疫球蛋白基因座是纯合的。在一些实施方案中，所述动物对于所述重链免疫球蛋白基因座是杂合的。

[0019] 在一些实施方案中，所述动物还包括在内源轻链免疫球蛋白基因座上包含一个或多个人IGKV基因和一个或多个人IGKJ基因。

[0020] 在一些实施方案中，所述动物包含在其内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。

[0021] 在一些实施方案中，所述动物是啮齿动物(例如，小鼠)。

[0022] 在一些方面，本公开涉及遗传修饰动物，所述遗传修饰动物在内源重链免疫球蛋白基因座上包含第一序列，所述第一序列包含一个或多个人IGHV基因；第二序列，其包含内源序列；以及第三序列，其包含一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因，其中所述第一序列、第二序列和第三序列可操作地连接。

[0023] 在一些实施方案中，所述第一序列包含选自表1的约或至少150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个或161个人IGHV基因。在一些实施方案中，所述第一序列包含选自表2的约或至少20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27

个人IGHD基因。

[0024] 在一些实施方案中,所述第一序列是源自人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的序列。在一些实施方案中,所述第一序列约为或至少为10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb或1000kb。

[0025] 在一些实施方案中,所述第二序列包含约为或至少为1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、11kb、12kb、13kb、14kb、15kb、16kb、17kb、18kb、19kb或20kb的内源序列。

[0026] 在一些实施方案中,所述第三序列包含选自表2的约或至少20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个人IGHD基因。在一些实施方案中,所述第三序列包含选自表3的约或至少5个、6个、7个、8个或9个人IGHJ基因。在一些实施方案中,所述第三序列包含表2中的全部人IGHD基因和表3中的全部人IGHJ基因。

[0027] 在一些实施方案中,所述第三序列是源自人重链免疫球蛋白基因座的未修饰序列。在一些实施方案中,所述第三序列约为或至少为10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb或100kb。

[0028] 在一些实施方案中,所述动物包含在其内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏。

[0029] 在一些实施方案中,所述动物是小鼠,并且所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括表4中的一个或多个小鼠IGHV基因、表5中的一个或多个小鼠IGHD基因和表6中的一个或多个小鼠IGHJ基因的缺失。

[0030] 在一些实施方案中,所述动物是小鼠,并且所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括从小鼠IGHV1-85开始至小鼠IGHJ4的序列的缺失。

[0031] 在一些实施方案中,所述动物包含选自IGHM、IGHδ、IGHG3、IGHG1、IGHG2b、IGHG2a、IGHE和IGHA基因的一个或多个内源基因。

[0032] 在一些实施方案中,所述动物对于所述重链免疫球蛋白基因座是纯合的。在一些实施方案中,所述动物对于所述重链免疫球蛋白基因座是杂合的。

[0033] 在一些实施方案中,所述动物还在内源轻链免疫球蛋白基因座上包含一个或多个人IGKV基因和一个或多个人IGKJ基因。

[0034] 在一些实施方案中,所述动物包含在其内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。

[0035] 在一些实施方案中,所述动物是啮齿动物(例如,小鼠)。

[0036] 在一些方面,本公开涉及经遗传修饰的非人动物,其在内源轻链免疫球蛋白基因座上包含一个或多个人IGKV基因和一个或多个人IGKJ基因。

[0037] 在一些实施方案中,所述动物包含表7中的约或至少65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个或76个人IGKV基因,和/或包含表8中的约或至少1个、2个、3个、4个或5个人IGKJ基因。

[0038] 在一些实施方案中,所述动物包含源自人轻链免疫球蛋白基因座的从人IGKV3D-7开始至人IGKJ5的未修饰的人序列。

[0039] 在一些实施方案中,所述动物包含在其内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。

[0040] 在一些实施方案中,所述动物是小鼠,并且所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包括表9中的一个或多个小鼠IGKV基因和表10中的一个或多个小鼠IGKJ基因的缺失。在一些实施方案中,所述动物包含人2号染色体的内源κ链免疫球蛋白基因座上的全

部人IGKV基因以及全部人IGKJ基因。在一些实施方案中，所述动物包含在人细胞(例如，体细胞、培养细胞、非免疫细胞、无任何V(D)J重排的细胞)的人2号染色体的内源重链免疫球蛋白基因座上的全部人IGKV基因和全部人IGKJ基因。

[0041] 在一些实施方案中，所述动物是小鼠，并且所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包括从小鼠IGKV2-137开始至小鼠IGKJ5的序列的缺失。

[0042] 在一些实施方案中，所述动物包含内源IGKC。

[0043] 在一些实施方案中，所述动物对于所述轻链免疫球蛋白基因座是纯合的。在一些实施方案中，所述动物对于所述轻链免疫球蛋白基因座是杂合的。

[0044] 在一些实施方案中，所述动物在内源重链免疫球蛋白基因座上还包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因。

[0045] 在一些实施方案中，所述动物包含在其内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。

[0046] 在一些实施方案中，所述动物是啮齿动物(例如，小鼠)。

[0047] 在一些方面，本公开涉及经遗传修饰的非人动物，其基因组包含内源重链免疫球蛋白基因座，该内源重链免疫球蛋白基因座包含：将一个或多个内源IGHV、内源IGHD和内源IGHJ基因替换为一个或多个人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因。在一些实施方案中，人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因可操作地连接至选自IGHM、IGHδ、IGHG、IGHE和IGHA基因的一个或多个内源基因。

[0048] 在一些实施方案中，一个或多个内源IGHV、内源IGHD和内源IGHJ基因被替换为表1中的约或至少150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个或161个人IGHV基因、表2中的约或至少20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个人IGHD基因和表3中的约或至少5个、6个、7个人IGHJ基因。

[0049] 在一些实施方案中，所述动物是小鼠，并且表4中的约或至少180个小鼠IGHV基因、表5中的全部小鼠IGHD基因和表6中的全部小鼠IGHJ基因被替换。

[0050] 在一些方面，本公开涉及经遗传修饰的非人动物，其基因组包含内源轻链免疫球蛋白基因座，该内源轻链免疫球蛋白基因座包含：一个或多个内源IGKV和内源IGKJ基因被替换为一个或多个人IGKV和人IGKJ基因。在一些实施方案中，所述人IGKV和人IGKJ基因可操作地连接至内源IGKC基因。

[0051] 在一些实施方案中，一个或多个内源IGKV和内源IGKJ基因被替换为表7中的约或至少65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个或76个人IGKV基因和表8中的约或至少1个、2个、3个、4个或5个人IGKJ基因。

[0052] 在一些实施方案中，所述动物是小鼠，并且表9中的全部小鼠IGKV基因和表10中的全部小鼠IGKJ基因被替换。

[0053] 在一些实施方案中，所述动物缺乏能够重排和形成编码内源重链可变结构域(例如，小鼠重链可变结构域)的核酸序列的内源免疫球蛋白重链可变结构域基因座。

[0054] 在一些实施方案中，所述动物缺乏能够重排和形成编码内源轻链可变结构域(例如，小鼠轻链可变结构域)的核酸序列的内源免疫球蛋白轻链可变结构域基因座。

[0055] 在一些实施方案中，所述动物可产生人源化抗体。

[0056] 在一些方面，本公开涉及从如本文所述动物获得的细胞。

[0057] 在一些实施方案中，所述细胞是表达嵌合免疫球蛋白重链的B细胞，所述嵌合免疫

球蛋白重链包含免疫球蛋白重链可变结构域，所述免疫球蛋白重链可变结构域源自一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因的重排。在一些实施方案中，所述免疫球蛋白重链可变结构域可操作地连接至非人重链恒定区。

[0058] 在一些实施方案中，所述细胞是表达嵌合免疫球蛋白轻链的B细胞，所述嵌合免疫球蛋白轻链包含免疫球蛋白轻链可变结构域，所述免疫球蛋白轻链可变结构域源自一个或多个人IGKV基因和一个或多个人IGKJ基因的重排，并且其中所述免疫球蛋白轻链可变结构域可操作地连接至非人轻链恒定区。

[0059] 在一些实施方案中，所述细胞是胚胎干(ES)细胞。

[0060] 在一些方面，本公开涉及制备与抗原特异性结合的嵌合抗体的方法，该方法包括将本文所述的动物暴露于抗原；由从所述动物收集的细胞产生杂交瘤；以及收集所述杂交瘤产生的所述嵌合抗体。在一些实施方案中，分离所述目标细胞并进行测序以确定重排的重链可变区和轻链可变区的序列。

[0061] 在一些实施方案中，该方法还包括对所述杂交瘤的基因组进行测序。

[0062] 在一些方面，本公开涉及修饰细胞的基因组的方法，该方法包括修饰人染色体；将经修饰的人染色体引入动物细胞；以及诱导经修饰的人染色体与内源染色体之间的重组，从而用一个或多个人基因替换一个或多个内源基因。

[0063] 在一些实施方案中，所述经修饰的人染色体包含两个或更多个外源重组位点。

[0064] 在一些实施方案中，所述内源染色体包含两个或更多个外源重组位点。

[0065] 在一些实施方案中，通过重组将选自表1的约或至少150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个或161个人IGHV基因、选自表2的约或至少20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个人IGHD基因以及选自表3的约或至少5、6、7、8或9个人IGHJ基因整合到所述内源染色体中。

[0066] 在一些实施方案中，通过重组将表7中的约或至少65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个或76个人IGKV基因和表8中的约或至少1个、2个、3个、4个或5个人IGKJ基因整合到所述内源染色体中。

[0067] 在一些实施方案中，通过重组将人序列整合到所述内源染色体中，并且所述人序列约为或至少为10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb或1000kb。

[0068] 一方面，本公开提供了制备与抗原特异性结合的抗体的方法。该方法包括在细胞中获得编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸序列，所述细胞表达与所述抗原特异性结合的嵌合抗体(hybrid antibody)，其中所述细胞通过将本文所述的动物暴露于所述抗原而获得；将编码人重链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人重链免疫球蛋白恒定区的核酸以及将编码人轻链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人轻链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接；以及在细胞中表达所述核酸，从而获得所述抗体。

[0069] 一方面，本公开提供了获得编码与抗原特异性结合的抗体结合结构域的核酸的方法。该方法包括将本文所述的动物暴露于所述抗原；以及对细胞中编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸进行测序，所述细胞表达与所述抗原特异性结合的嵌合抗体。

[0070] 一方面，本公开提供了获得样品的方法，该方法包括将本文所述的动物暴露于所述抗原；以及从所述动物收集样品。在一些实施方案中，所述样品是脾组织、脾细胞或B细

胞。

[0071] 一方面，本公开提供了制备与抗原特异性结合的抗体的方法。该方法包括将本文所述的动物暴露于所述抗原；在表达与所述抗原特异性结合的嵌合抗体的细胞中获得(例如通过测序)编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸序列；以及在细胞中将编码人重链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人重链免疫球蛋白恒定区的核酸以及将编码人轻链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人轻链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接。

[0072] 本公开还涉及所述非人哺乳动物的后代。

[0073] 在一些实施方案中，所述非人哺乳动物是啮齿动物。在一些实施方案中，所述非人哺乳动物是小鼠。

[0074] 本公开还提供了包含本文所述的靶向载体的细胞。

[0075] 本公开还涉及源自所述非人哺乳动物或其后代的细胞(例如，干细胞、胚胎干细胞、免疫细胞、B细胞、T细胞或杂交瘤)或细胞系或其原代细胞培养物。本公开还涉及源自所述非人哺乳动物或其后代的组织、器官或其培养物。

[0076] 本公开还涉及所述非人哺乳动物或其后代、通过本文所述的方法产生的动物模型在开发与免疫过程相关的产品、制造人抗体或用于药理学、免疫学、微生物学和医学研究的模型系统方面的用途。

[0077] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料；还可使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法和实例仅是说明性的，而不旨在是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献通过引用整体并入本文。如有冲突，以本说明书(包括定义)为准。

[0078] 根据下面的详细描述和附图以及权利要求，本发明的其它特征和有利方面将变得明显。

附图说明

[0079] 图1A是将人免疫球蛋白基因引入小鼠基因组的方法的流程图。

[0080] 图1B是用人免疫球蛋白重链可变区替换小鼠免疫球蛋白重链可变区的概述。

[0081] 图1C是用人免疫球蛋白轻链可变区替换小鼠免疫球蛋白轻链可变区的概述。

[0082] 图2是显示小鼠重链免疫球蛋白基因座的示意图。

[0083] 图3A是显示在向基因组中引入两个重组位点后小鼠重链免疫球蛋白基因座的示意图。

[0084] 图3B是显示在用靶向载体重组后小鼠重链免疫球蛋白基因座的示意图。

[0085] 图4显示了用于修饰小鼠重链免疫球蛋白基因座的打靶策略。

[0086] 图5A显示了使用mIgHV-5'loxP-L-GT-F/mIGHV-005-L-GT-R2引物对的PCR检测的结果。

[0087] 图5B显示了使用mIGHV-005-5'loxP-R-GT-F2/mIgHV-5'loxP-R-GT-R引物对的PCR检测的结果。

[0088] 图6A显示了使用mIGHV-3'lox-L-GT-F2/mIGHV-3'lox-L-GT-R2引物对的PCR检测的结果。

[0089] 图6B显示了使用mIGHV3'lox-R-GT-F2/mIGHV-3'lox-R-GT-R1引物对的PCR检测的结果。

[0090] 图7是突出了重链免疫球蛋白基因座(未按比例绘制)的人14号染色体的示意图。重链免疫球蛋白基因座有可变区(V_H,D_H,J_H)和恒定区(C_H)。V_H代表IGHV基因簇的区段,D_H代表IGHD基因簇的区段,JH代表IGHJ基因簇的区段,C_H代表表达恒定结构域的基因簇。

[0091] 图8是显示修饰后的人14号染色体的示意图。

[0092] 图9显示了用两个载体对人14号染色体进行的修饰。

[0093] 图10显示了经修饰的人14号染色体。

[0094] 图11显示了使用hIGHV-5'loxP-L-GT-F1和hIGHV-5'loxP-R-GT-R引物对对染色体hChr14-mut3上loxP位点301的PCR检测的结果。8-D7为阳性对照克隆。

[0095] 图12显示了染色体hChr14-mut3上loxP位点302的PCR检测的结果。8-D7是阴性对照克隆。

[0096] 图13是人14号染色体被修饰前细胞的荧光原位杂交(FISH)图像。

[0097] 图14是人14号染色体被修饰后的细胞的FISH图像。

[0098] 图15是显示经修饰的小鼠12号染色体的示意图。

[0099] 图16是显示Cre介导的重组的示意图,所述重组用相应的人基因组DNA序列替换小鼠重链可变区基因座。

[0100] 图17显示了使用M5-L引物对和M5-R引物对的PCR检测的结果。

[0101] 图18显示了使用M3引物对的PCR检测的结果。

[0102] 图19显示了使用H5-L引物对和H5-R引物对的PCR检测的结果。

[0103] 图20显示了使用H3-L引物对和H3-R引物对的PCR检测的结果。

[0104] 图21是FISH图像。白色箭头(1)和(2)表示小鼠12号染色体。白色箭头(3)表示由人特异性IGH断裂分离探针标记的人染色体片段。

[0105] 图22是显示Flp介导的重组的示意图。

[0106] 图23是显示小鼠轻链免疫球蛋白基因座的示意图。

[0107] 图24A是显示在基因组中引入两个重组位点后小鼠轻链免疫球蛋白基因座的示意图。

[0108] 图24B是显示用靶向载体重组后小鼠轻链免疫球蛋白基因座的示意图。

[0109] 图25是显示小鼠6号染色体的基因打靶策略的示意图。

[0110] 图26显示了使用IGKV-005-C-5G-L-GT-F/IGKV-005-C-5G-L-GT-R2引物对的PCR检测的结果。

[0111] 图27显示了使用IGKV-005-C-5G-R-GT-F1/IGKV-005-C-5G-R-GT-R引物对的PCR检测的结果。

[0112] 图28是突出显示轻链免疫球蛋白基因座的人2号染色体的示意图(未按比例绘制)。V_{HK}代表IGKV基因簇的区段,J_{HK}代表IGKJ基因簇的区段,C_{HK}代表IGKC基因。

[0113] 图29是显示经修饰的人2号染色体的示意图。

[0114] 图30是显示人2号染色体的基因打靶策略的示意图。

[0115] 图31显示了第一次重组(引入载体2702)后的PCR测定的结果。WT是野生型H9细胞。

[0116] 图32是FISH图像结果。白色箭头表示正确重组的经修饰的人2号染色体。

[0117] 图33显示了第二次重组(引入载体2701)后的PCR检测的结果。

[0118] 图34是显示Cre介导的重组的示意图,其中人轻链可变区基因组DNA序列被添加到相应的小鼠基因座。

[0119] 图35是荧光原位杂交(FISH)图像。箭头(1)和(3)表示小鼠6号染色体。箭头(2)表示由人特异性IGK断裂分离探针标记的人染色体片段。

[0120] 图36是显示Flp介导的重组的示意图。

[0121] 图37是显示14号染色体(14q32.33)上的人免疫球蛋白重链(IGH)基因座的示意图。

[0122] 图38是显示12号染色体(12F2)(品系C57BL/6)上的小鼠(Mus musculus)IGH基因座的示意图。

[0123] 图39是显示2号染色体(2p11.2)上的人免疫球蛋白κ链(IGK)基因座的示意图。

[0124] 图40是显示6号染色体(6C1)上的小鼠(Mus musculus)IGK基因座的示意图。

[0125] 图41列出了人重链免疫球蛋白基因座(IGH)的IMGT谱系。

[0126] 图42列出了小鼠IGH的IMGT谱系。

[0127] 图43列出了人κ链免疫球蛋白基因座(IGK)的IMGT谱系。

[0128] 图44列出了小鼠IGK的IMGT谱系。

[0129] 图45显示了在外周血中检测到的白细胞的百分比。

[0130] 图46显示了在脾细胞中检测到的白细胞的百分比。

[0131] 图47显示了在淋巴结中检测到的白细胞的百分比。

[0132] 图48显示了处于不同发育阶段的脾B细胞的百分比。

[0133] 图49显示了处于不同发育阶段的淋巴结B细胞的百分比。

[0134] 图50显示脾边缘区(MZ-B)和滤泡区(FO-B)的脾B细胞的百分比。

[0135] 图51A显示了从野生型小鼠获得的骨髓中处于不同发育阶段的B细胞的流式细胞术分析结果。1区表示原B细胞,2区表示前B细胞,3区表示未成熟B细胞。

[0136] 图51B显示从人源化重链杂合小鼠获得的骨髓中处于不同发育阶段的B细胞的流式细胞术分析结果。1区表示原前B细胞,2区表示前B细胞,3区表示未成熟B细胞。

[0137] 图51C显示从人源化重链纯合小鼠获得的骨髓中处于不同发育阶段的B细胞的流式细胞术分析结果。1区表示原B细胞,2区表示前B细胞,3区表示未成熟B细胞。

[0138] 图52显示了梯度稀释的小鼠血清中的IgA同种型水平。

[0139] 图53显示了梯度稀释的小鼠血清中的IgG1同种型水平。

[0140] 图54显示了梯度稀释的小鼠血清中的IgG2b同种型水平。

[0141] 图55显示了梯度稀释的小鼠血清中的IgG2c同种型水平。

[0142] 图56显示了梯度稀释的小鼠血清中的IgG3同种型水平。

[0143] 图57显示了梯度稀释的小鼠血清中的IgM同种型水平。

[0144] 图58显示了VJ重组后检测到的IGKV基因表达在个体小鼠中的分布。

[0145] 图59显示了用人BTLA免疫后野生型小鼠的流式细胞术结果。

[0146] 图60显示了人源化重链纯合小鼠经人BTLA免疫后的流式细胞术结果。

[0147] 图61显示了用犬PD-1(dPD-1)免疫后野生型小鼠的流式细胞术结果。

[0148] 图62显示了用犬PD-1(dPD-1)免疫后人源化重链纯合小鼠的流式细胞术结果。

[0149] 图63显示在用卵清蛋白(OVA)免疫后野生型小鼠(黑色柱;小鼠以1-5标记)和人源化重链纯合小鼠(灰色柱;小鼠以6-10标记)的ELISA结果概述。

[0150] 图64显示了人远端Vκ簇IGKV基因的列表和人近端Vκ簇IGKV基因的列表。

[0151] 图65A显示了未免疫的野生型小鼠和hVH/hVL小鼠的体重。

[0152] 图65B显示了未免疫的野生型小鼠和hVH/hVL的脾脏重量。

[0153] 图66显示了未免疫的野生型小鼠和hVH/hVL小鼠脾脏中免疫细胞的百分比。

[0154] 图67A显示了脾B细胞中过渡1型(T1,$B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}$),过渡2型(T2,$B220^{+}IgM^{+}IgD^{+}$)和成熟型(M,$B220^{+}IgM^{低}IgD^{+}$)B细胞群的百分比。脾B细胞来自未免疫的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0155] 图67B显示脾B细胞中边缘区(MZ)和滤泡(FO)B细胞群的百分比。脾B细胞来自未免疫的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0156] 图68A显示了骨髓B细胞中原B细胞($B220^{低}CD43^{高}IgM^{低}$)、前B细胞($B220^{低}CD43^{中}IgM^{低}$)和未成熟B细胞($B220^{高}CD43^{低}IgM^{高}$)群的百分比。骨髓B细胞来自未免疫的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0157] 图68B显示了骨髓B细胞中浆细胞($B220^{低}IgM^{-}IgD^{-}CD138^{-}$)和记忆B细胞($B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}CD38^{+}$)群的百分比。骨髓B细胞来自未免疫的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0158] 图68C显示脾B细胞中浆细胞($B220^{低}IgM^{-}IgD^{-}CD138^{-}$)和记忆B细胞($B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}CD38^{+}$)群的百分比。脾B细胞来自未免疫的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0159] 图69显示了未免疫的野生型或hVH/hVL小鼠中血清免疫球蛋白(Ig)亚型的浓度。Ig亚型浓度通过ELISA来定量测定。

[0160] 图70A显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中的IGHV利用率(频率＞1%)。

[0161] 图70B显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中的IGHV利用率((频率＜1%)。

[0162] 图70C显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中的IGHD利用率。

[0163] 图70D显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中的IGHJ利用率。

[0164] 图71A显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中的IGKV利用率(频率＞1%)。

[0165] 图71B显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中的IGKV利用率(频率＜1%)。

[0166] 图71C显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中的IGKJ利用率。

[0167] 图72是显示来自未免疫的hVH/hVL小鼠的重链CDR3氨基酸长度分布的直方图。

[0168] 图73显示了未免疫的hVH/hVL小鼠中重链CDR3上的氨基酸频率。

[0169] 图74显示了hVH/hVL小鼠HCDR3中半胱氨酸残基的的频率。

[0170] 图75A是来自未免疫的野生型小鼠的脾脏的组织学图像。

[0171] 图75B是来自未免疫的野生型小鼠的腹股沟淋巴结的组织学图像。

[0172] 图75C是来自未免疫的野生型小鼠的派尔集合淋巴结(Peyer′spatch)的组织学图像。

[0173] 图75D是来自未免疫的hVH/hVL小鼠的脾脏的组织学图像。

[0174] 图75E是来自未免疫的hVH/hVL小鼠的腹股沟淋巴结的组织学图像。

[0175] 图75F是来自未免疫的hVH/hVL小鼠的派尔集合淋巴结(Peyer′spatch)的组织学图像。

[0176] 图76A显示了在野生型和hVH/hVL小鼠中使用人BCMA(B细胞成熟抗原)作为抗原的

第二次和第三次免疫后的BCMA特异性抗体的滴度。

[0177] 图76B显示了在野生型和hVH/hVL小鼠中使用人IL4R(白细胞介素-4受体)作为抗原的第二次和第三次免疫后的IL4R特异性抗体的滴度。

[0178] 图76C显示了在野生型和hVH/hVL小鼠中使用人PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)作为抗原的第二次和第三次免疫后的PD-1特异性抗体的滴度。

[0179] 图76D显示了在野生型和hVH/hVL小鼠中使用人Siglec15(唾液酸结合Ig样凝集素15)作为抗原的第二次和第三次免疫后Siglec15特异性抗体的滴度。

[0180] 图76E显示了在野生型和hVH/hVL小鼠中使用人SIRPα(信号调节蛋白α)作为抗原的第二次和第三次免疫后的SIRPα特异性抗体的滴度。

[0181] 图77A显示了免疫后野生型小鼠和hVH/hVL小鼠的体重。

[0182] 图77B显示了免疫后野生型小鼠和hVH/hVL小鼠的脾脏重量。

[0183] 图78显示了免疫后野生型小鼠和hVH/hVL小鼠的脾脏中免疫细胞的百分比。

[0184] 图79A显示了脾B细胞中过渡1型(T1,$B220^{-}IgM^{+}IgD^{-}$)、过渡2型(T2,$B220^{+}IgM^{+}IgD^{+}$)和成熟型(M,$B220^{+}IgM^{低}IgD^{+}$)B细胞群的百分比。脾B细胞来自免疫后的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0185] 图79B显示脾B细胞中边缘区(MZ)和滤泡(FO)B细胞群的百分比。脾B细胞来自免疫后的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0186] 图80A显示了骨髓B细胞中原B细胞($B220^{低}CD43^{高}IgM^{低}$)、前B细胞($B220^{低}CD43^{中}IgM^{低}$)和未成熟B细胞($B220^{高}CD43^{低}IgM^{高}$)群的百分比。骨髓B细胞来自免疫后的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0187] 图80B显示了骨髓B细胞中浆细胞($B220^{低}IgM^{-}IgD^{-}CD138^{-}$)和记忆B细胞($B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}CD38^{+}$)群的百分比。骨髓B细胞来自免疫后的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0188] 图80C显示脾B细胞中浆细胞($B220^{低}IgM^{-}IgD^{-}CD138^{-}$)和记忆B细胞($B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}CD38^{+}$)群的百分比。脾B细胞来自免疫后的野生型或hVH/hVL小鼠。

[0189] 图81显示了未免疫的或第三次免疫后的野生型或hVH/hVL小鼠中的血清免疫球蛋白(Ig)亚型的浓度。Ig亚型浓度通过用ELISA测定。

[0190] 图82显示了未免疫的或免疫后的野生型或hVH/hVL小鼠中的血清总IgG浓度。IgG浓度通过ELISA测定。

具体实施方式

[0191] 本公开涉及具有人源化重链免疫球蛋白基因座和/或人源化轻链免疫球蛋白基因座(例如κ链基因座)的经遗传修饰的动物和细胞。

[0192] 可通过将人免疫球蛋白基因引入非人动物的基因组来产生经遗传修饰的动物,所述动物可表达人源化抗体或嵌合抗体的动物。图1A显示了产生人源化小鼠的方法。在一些实施方案中,该方法首先涉及修饰人染色体上的人免疫球蛋白区域。然后将该经修饰的人染色体引入小鼠受体细胞。然后通过直接替换(例如,在一步替换中)将人免疫球蛋白可变区引入小鼠基因组的相应区域。然后筛选受体细胞,优选不含人染色体的细胞。然后将细胞注射到囊胚中以制备嵌合动物(例如,小鼠)。可以进行后续育种以获得含有完整人源化免疫球蛋白基因座的动物。

[0193] 本文描述的转基因动物具有各种优势。例如，在一些情况下，本文所述的经遗传修饰的动物具有完整的人抗体谱系。因此，由这些动物产生的可变结构域可具有与人中的可变结构域的多样性非常相似的多样性。此外，因为人免疫球蛋白基因座上的整个序列(没有修饰或具有有限的修饰)被引入动物基因组，这些基因可以以与人中发生的非常相似的方式进行V(D)J重组。另外，由于有效的V(D)J重组，抗体可以非常有效的产生，并且具有与正常速率相似的速率。另外，因为内源IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和IGKJ基因与人基因之间可发生V(D)J重组，如果内源IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和IGKJ基因被整合到重排的重链VDJ区段或重排的轻链VJ区段中，则由该抗体谱系产生的抗体很可能在人中具有免疫原性表位。免疫原性可导致抗药物抗体的产生且可具有活性。此处，内源IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和IGKJ基因被有效删除。由该抗体谱系产生的抗体在人体内不太可能具有免疫原性。因此，抗体更适合用作人的治疗剂。因此，经遗传修饰的动物为产生人源化抗体提供了有利的平台。

[0194] 如本文中所用，术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的四条多肽链(两条重链和两条轻链)的免疫球蛋白分子。每条重链包含重链可变(VH)结构域和重链恒定区(CH)。每条轻链包含轻链可变(VL)结构域和轻链恒定区(CL)。VH和VL结构域可进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，散布有更保守的区域，称为框架区(FR)。每个VH和VL包含从氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重链CDR可缩写为HCDR1、HCDR2和HCDR3;轻链CDR可缩写为LCDR1、LCDR2和LCDR3)。术语“高亲和力”抗体是指相对于其靶表位的K_D约为10^{-9}M或更低(例如，约为或低于1×10^{-9}M、1×10^{-10}M、1×10^{-11}M或1×10^{-12}M)的抗体。在一些实施方案中，K_D可通过表面等离子体共振(例如BIACORE™)或ELISA来测量。

[0195] 如本文中所用，术语“抗原结合片段”是指全长抗体的一部分，其中该抗体的部分能够与抗原特异性结合。在一些实施方案中，抗原结合片段包含至少一个可变结构域(例如，重链的可变结构域或轻链的可变结构域)。抗体片段的非限制性实例包括例如Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段。

[0196] 如本文中所用，术语“人抗体”是指由存在于人体内的核酸(例如，重排的人免疫球蛋白重链或轻链基因座)编码的抗体。在一些实施方案中，从人收集人抗体或在人细胞培养物(例如，人杂交瘤细胞)中产生人抗体。在一些实施方案中，在非人细胞(例如，小鼠或仓鼠细胞系)中产生人抗体。在一些实施方案中，在细菌或酵母细胞中产生人抗体。在一些实施方案中，在含有未重排或重排的人免疫球蛋白基因座(例如，重链或轻链人免疫球蛋白基因座)的转基因非人动物(例如，小鼠)中产生人抗体。

[0197] 如本文中所用，术语“嵌合抗体”是指包含存在于至少两种不同抗体中的序列的抗体(例如，来自两种不同哺乳动物物种的抗体，例如人和小鼠的抗体)。嵌合抗体的非限制性实例是包含人抗体的可变结构域序列(例如，轻链和/或重链可变结构域序列的全部或部分)和非人抗体的恒定结构域的抗体。本文描述了嵌合抗体的其它实例，并且所述其它实例是本领域已知的。

[0198] 如本文中所用，术语“人源化抗体”是指包含源自非人(例如，小鼠)免疫球蛋白的序列，并且包含源自人免疫球蛋白的序列的非人抗体。

[0199] 如本文中所用，术语“单链抗体”是指能够与抗原特异性结合的包含至少两个免疫球蛋白可变结构域(例如，哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域)的单个多肽。

[0200] 如本文中所用,术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并用于描述动物、人或非人。本发明考虑了兽医和非兽医应用。人患者可以是成人或青少年(例如,18岁以下的人)。除了人以外,患者还包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔子、雪貂、猫、狗和灵长类动物。包括例如非人灵长类动物(例如,猴子、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔子)、兔子形目动物、猪(例如,猪、小型猪)、马科动物、犬科动物、猫科动物、牛类动物以及其它家养、农场和动物园动物。

[0201] 如本文中所用,当提及抗体时,短语“特异性结合(specifically binding)”和“特异性结合(specifically binds)”意指抗体与其靶分子相互作用优于与其它分子相互作用,因为所述相互作用取决于靶分子上特定结构(即,抗原决定簇或表位)的存在;换句话说,试剂识别包含特定结构的分子并与其结合,而不是一般的所有分子。与靶分子特异性结合的抗体可称为靶特异性抗体。

[0202] 如本文中所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换地用于指具有至少为两个氨基酸的任意长度的氨基酸聚合物。

[0203] 如本文中所用,术语“多核苷酸”、“核酸分子”和“核酸序列”在本文中可互换用于指具有至少两个核苷酸的任意长度的核苷酸的聚合物,包括但不限于DNA、RNA、DNA/RNA杂交体及其修饰形式。

[0204] 如本文中所用,术语“未修饰的人序列”是指源自人受试者、人细胞、培养的人细胞或人细胞系的序列,其中该序列与人受试者、人细胞、培养的人细胞或人细胞系的遗传序列相同。

[0205] 经遗传修饰的重链免疫球蛋白基因座

[0206] 重链免疫球蛋白基因座(也称为IGH或免疫球蛋白重链基因座)是染色体(例如,人14号染色体)上包含人抗体(或免疫球蛋白)重链基因的区域。

[0207] 这个区域代表重链基因座的种系组织。基因座包括V(可变的)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)区段。V区中的基因形成V基因簇(也称为IGHV基因簇)。D区中的基因形成D基因簇(也称为IGHD基因簇)。J区中的基因形成J基因簇(也称为IGHJ基因簇)。

[0208] 在B细胞发育过程中,DNA水平上的重组事件将单个D区段(也称为IGHD基因)与J区段(也称为IGHJ基因)连接起来;该部分重排的D-J区的融合的D-J外显子然后被连接至V区段(也称为IGHV基因)。然后含有融合的V-D-J外显子的重排的V-D-J区被转录并在RNA水平上融合至IGHM恒定区;该转录物编码μ重链。在发育的后期,B细胞产生V-D-J-Cμ-Cδ前信使RNA,该RNA被选择性剪接以编码μ或δ重链。淋巴结中的成熟B细胞经历转换重组,使得融合的V-D-J基因区段接近IGHG、IGHA或IGHE基因区段之一,并且每个细胞表达γ、α或ε重链。许多不同的IGHV基因与几个IGHJ基因的潜在重组提供了广泛的抗原识别。额外的多样性是通过连接多样性获得的,连接多样性是由末端脱氧核苷酸转移酶随机添加核苷酸和体细胞过度突变产生的,这发生在脾和淋巴结的B细胞成熟过程中。已知几个V、D、J和C区段不能编码蛋白,被认为是假基因区段(通常简称为假基因)。

[0209] 人重链免疫球蛋白基因座位于人14号染色体上。表1列出了IGHV基因及其在该基因座中的相对顺序。

[0210] 表1.人14号染色体上的IGHV基因列表

[0211]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHV(III)-82	1	IGHV3-57	42	IGHV3-36	83	IGHV3-23	124
IGHV7-81	2	IGHV7-56	43	IGHV3-35	84	IGHV(III)-22-2	125
IGHV4-80	3	IGHV4-55	44	IGHV7-34-1	85	IGHV(II)-22-1	126
IGHV3-79	4	IGHV3-54	45	IGHV4-34	86	IGHV3-22	127
IGHV(II)-78-1	5	IGHV(II)-53-1	46	IGHV3-33-2	87	IGHV3-21	128
IGHV5-78	6	IGHV3-53	47	IGHV(II)-33-1	88	IGHV(II)-20-1	129
IGHV7-77	7	IGHV3-52	48	IGHV3-33	89	IGHV3-20	130
IGHV(III)-76-1	8	IGHV(II)-51-2	49	GOLGA4P1 (Golgin)	90	IGHV3-19	131

[0212]

IGHV3-76	9	IGHV(III)-51-1	50	IGHV3-32	91	IGHV1-18	132
IGHV3-75	10	IGHV5-51	51	IGHV(II)-31-1	92	SLC20A1P2	133
IGHV(II)-74-1	11	IGHV3-50	52	IGHV4-31	93	IGHV1-17	134
IGHV3-74	12	IGHV(II)-49-1	53	IGHV3-30-52	94	IGHV(III)-16-1	135
IGHV3-73	13	IGHV3-49	54	IGHV(II)-30-51	95	IGHV3-16	136
IGHV3-72	14	IGHV3-48	55	IGHV3-30-5	96	IGHV(II)-15-1	137
IGHV3-71	15	IGHV(III)-47-1	56	IGHV3-30-42	97	IGHV3-15	138
IGHV2-70	16	IGHV3-47	57	IGHV(II)-30-41	98	IGHV1-14	139
IGHV1-69D	17	IGHV(II)-46-1	58	IGHV4-30-4	99	IGHV(III)-13-1	140
IGHV1-69-2	18	IGHV1-46	59	IGHV3-30-33	100	IGHV3-13	141
IGHV3-69-1	19	IGHV1-45	60	IGHV(II)-30-32	101	IGHV1-12	142
IGHV2-70D	20	IGHV(II)-44-2	61	IGHV3-30-3	102	IGHV(III)-11-1	143
IGHV1-69	21	IGHV(IV)-44-1	62	IGHV3-30-22	103	IGHV3-11	144
IGHV1-68	22	IGHV(III)-44	63	IGHV(II)-30-21	104	IGHV2-10	145
IGHV(III)-67-4	23	IGHV(II)-43-1	64	IGHV4-30-2	105	IGHV3-9	146
IGHV(III)-67-3	24	IGHV3-43	65	IGHV4-30-1	106	IGHV1-8	147
IGHV(III)-67-2	25	IGHV3-42	66	IGHV3-30-2	107	IGHV5-10-1	148
IGHV(II)-67-1	26	IGHV3-41	67	IGHV(II)-30-1	108	IGHV3-64D	149
SLC20A1P1 (GLVR1)	27	IGHV(II)-40-1	68	IGHV3-30	109	IGHV3-7	150
IGHV1-67	28	IGHV7-40	69	GOLGA4P2 (Golgin)	110	IGHV3-6	151
IGHV3-66	29	IGHV4-39	70	IGHV3-29	111	IGHV(III)-5-2	152
IGHV(II)-65-1	30	IGHV1-38-4	71	IGHV(II)-28-1	112	IGHV(III)-5-1	153
IGHV3-65	31	IGHV(III)-38-1D	72	IGHV4-28	113	IGHV2-5	154
IGHV3-64	32	IGHV3-38-3	73	IGHV7-27	114	IGHV7-4-1	155
GOLGA4P3 (Golgin)	33	IGHV(III)-44D	74	IGHV(II)-26-2	115	IGHV4-4	156
IGHV3-63	34	IGHV(II)-43-1D	75	IGHV(III)-26-1	116	IGHV1-3	157
IGHV(II)-62-1	35	IGHV3-43D	76	IGHV2-26	117	IGHV(III)-2-1	158
IGHV3-62	36	IGHV3-42D	77	IGHV(III)-25-1	118	IGHV1-2	159
IGHV4-61	37	IGHV7-40D	78	IGHV3-25	119		*
IGHV(II)-60-1	38	IGHV4-38-2	79	IGHV1-24	120		*
IGHV3-60	39	IGHV(III)-38-1	80	IGHV3-23D	121	IGHV(II)-1-1	162
IGHV4-59	40	IGHV3-38	81	IGHV(III)-22-2D	122	IGHV6-1	163
IGHV1-58	41	IGHV3-37	82	IGHV(II)-22-1D	123		*

[0213] RPS8P1、ADAM6和KIAA0125也位于该基因座。RPS8P1的相对顺序为160，ADAM6的相对顺序为161，KIAA0125的相对顺序为164。表2列出了人14号染色体上的全部IGHD基因及其相对顺序。表3列出了人14号染色体上全部的IGHJ基因及其相对顺序。免疫球蛋白恒定结构域的基因位于IGHV、IGHD和IGHJ基因之后。这些基因包括(如以下顺序所示)：免疫球蛋白重链恒定μ(IGHM)、免疫球蛋白重链恒定δ(IGHδ)、免疫球蛋白重链恒定γ3(IGHG3)、免疫球蛋白重链恒定γ1(IGHG1)、免疫球蛋白重链恒定εP1(假基因)(IGHEP1)、免疫球蛋白重链恒定α1(IGHA1)、免疫球蛋白重链恒定γP(非功能性)(IGHGP)、免疫球蛋白重链恒定γ2(IGHG2)、免疫球蛋白重链恒定γ4(IGHG4)、免疫球蛋白重链恒定ε(IGHE)和免疫球蛋白重链恒定α2(IGHA2)。这些基因和这些基因的顺序也显示在图37和图41中。

[0214] 表2.人14号染色体上的IGHD基因列表

[0215]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHD1-1	165	IGHD2-8	172	IGHD2-15	179	IGHD3-22	186
IGHD2-2	166	IGHD3-9	173	IGHD3-16	180	IGHD4-23	187
IGHD3-3	167	IGHD3-10	174	IGHD4-17	181	IGHD5-24	188
IGHD4-4	168	IGHD4-11	175	IGHD5-18	182	IGHD6-25	189
IGHD5-5	169	IGHD5-12	176	IGHD6-19	183	IGHD1-26	190
IGHD6-6	170	IGHD6-13	177	IGHD1-20	184		*
IGHD1-7	171	IGHD1-14	178	IGHD2-21	185	IGHD7-27	192

[0216] 表3.人14号染色体上的IGHJ基因列表

[0217]

基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHJ1P	191	IGHJ4	197
IGHJ1	193	IGHJ5	198
IGHJ2	194	IGHJ3P	199
IGHJ2P	195	IGHJ6	200
IGHJ3	196		

[0218] 小鼠重链免疫球蛋白基因座位于小鼠12号染色体上。表4列出了IGHV基因及其在该基因座中的相对顺序。

[0219] 表4.小鼠12号染色体上的IGHV基因列表

[0220]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHV1-86	1	IGHV1-51	50	IGHV15-2	99	IGHV4-1	148
IGHV1-85	2	IGHV1-50	51	IGHV1-8	100	IGHV14-1	149
IGHV1-84	3	IGHV8-5	52	IGHV10-4	101	IGHV7-2	150
IGHV1-83	4	IGHV1-49	53	IGHV1-7	102	IGHV7-1	151
IGHV1-82	5	IGHV1-48	54	IGHV1-6	103	IGHV5-19	152
IGHV1-81	6	IGHV8-4	55	IGHV10-3	104	IGHV2-9	153
IGHV1-80	7	IGHV8-3	56	IGHV1-5	105	IGHV2-8	154
IGHV1-79	8	IGHV1-47	57	IGHV10-2	106	IGHV5-18	155
IGHV1-78	9	IGHV1-46	58	IGHV1-4	107	IGHV5-17	156
IGHV1-77	10	IGHV1-45	59	IGHV1-3	108	IGHV5-16	157
IGHV8-16	11	IGHV1-44	60	IGHV10-1	109	IGHV5-15	158
IGHV1-76	12	IGHV1-43	61	IGHV1-2	110	IGHV2-7	159
IGHV8-15	13	IGHV1-42	62	IGHV8-2	111	IGHV2-6-8	160
IGHV1-75	14	IGHV1-41	63	IGHV6-7	112	IGHV2-9-1	161
IGHV8-14	15	IGHV1-40	64	IGHV6-6	113	IGHV5-12-4	162
IGHV1-74	16	IGHV1-39	65	IGHV6-5	114	IGHV5-9-1	163
IGHV1-73	17	IGHV1-38	66	IGHV6-4	115	IGHV2-6	164

[0221]

IGHV8-13	18	IGHV1-37	67	IGHV6-3	116	IGHV5-12	165
IGHV1-72	19	IGHV1-36	68	IGHV12-3	117	IGHV5-11	166
IGHV1-71	20	IGHV1-35	69	IGHV13-2	118	IGHV2-5	167
IGHV1-70	21	IGHV1-34	70	IGHV1-1	119	IGHV5-10	168
IGHV8-12	22	IGHV1-33	71	IGHV8-1	120	IGHV5-9	169
IGHV1-69	23	IGHV1-32	72	IGHV3-8	121	IGHV5-8	170
IGHV1-68	24	IGHV1-31	73	IGHV5-21	122	IGHV2-4	171
IGHV1-67	25	IGHV1-30	74	IGHV3-7	123	IGHV5-7	172
IGHV1-66	26	IGHV1-29	75	IGHV9-4	124	IGHV5-6	173
IGHV8-11	27	IGHV1-28	76	IGHV3-6	125	IGHV5-5	174
IGHV1-65	28	IGHV1-27	77	IGHV13-1	126	IGHV2-3	175
IGHV8-10	29	IGHV1-26	78	IGHV3-5	127	IGHV6-1	176
IGHV1-64	30	IGHV1-25	79	IGHV3-4	128	IGHV5-4	177
IGHV1-63	31	IGHV1-24	80	IGHV7-4	129	IGHV5-3	178
IGHV8-9	32	IGHV1-23	81	IGHV3-3	130	IGHV2-2	179
IGHV1-62-3	33	IGHV1-22	82	IGHV14-4	131	IGHV5-2	180
IGHV1-62-2	34	IGHV1-21	83	IGHV15-1	132	IGHV2-1	181
IGHV1-62-1	35	IGHV1-21-1	84	IGHV7-3	133	IGHV5-1	182
IGHV1-62	36	IGHV1-20	85	IGHV9-3	134		
IGHV1-61	37	IGHV1-19	86	IGHV12-2	135		
IGHV1-60	38	IGHV1-19-1	87	IGHV9-2	136		
IGHV1-59	39	IGHV1-18	88	IGHV12-1	137		
IGHV1-58	40	IGHV1-17	89	IGHV9-1	138		
IGHV8-8	41	IGHV1-17-1	90	IGHV6-2	139		
IGHV1-57	42	IGHV1-16	91	IGHV16-1	140		
IGHV8-7	43	IGHV1-15	92	IGHV14-3	141		
IGHV1-56	44	IGHV1-14	93	IGHV11-2	142		
IGHV1-55	45	IGHV1-13	94	IGHV3-2	143		
IGHV1-54	46	IGHV1-12	95	IGHV4-2	144		
IGHV8-6	47	IGHV1-11	96	IGHV14-2	145		
IGHV1-53	48	IGHV1-10	97	IGHV11-1	146		
IGHV1-52	49	IGHV1-9	98	IGHV3-1	147		

[0222] 表5列出了全部IGHD基因及其在小鼠12号染色体上的相对顺序。表6列出了全部IGHJ基因及其在小鼠12号染色体上的相对顺序。免疫球蛋白恒定结构域的基因位于IGHV、IGHD和IGHJ基因之后。这些基因包括(如以下顺序所示):免疫球蛋白重链恒定μ(IGHM)、免疫球蛋白重链恒定δ(IGHδ)、免疫球蛋白重链恒定γ3(IGHG3)、免疫球蛋白重链恒定γ1(IGHG1)、免疫球蛋白重链恒定γ2b(IGHG2b)、免疫球蛋白重链恒定γ2a(IGHG2a)、免疫球蛋白重链恒定ε(IGHE)和免疫球蛋白重链恒定α(IGHA)基因。这些基因和这些基因的顺序也示于图38和图42中。

[0223] 表5.小鼠12号染色体上的IGHD基因列表

[0224]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGHD5-1	183	IGHD2-5	191	IGHD5-5	198
IGHD3-1	184	IGHD5-3	192	IGHD2-8	199

[0225]

IGHD1-1	185	IGHD5-7	193	IGHD5-6	200
IGHD6-1	186	IGHD2-6	194	IGHD3-2	201
IGHD2-3	187	IGHD5-4	195	IGHD4-1	202
IGHD6-2	188	IGHD5-8	196		
IGHD2-4	189	IGHD2-7	197		

[0226] 表6.小鼠12号染色体上的IGHJ基因列表

[0227]

基因名称	顺序	基因名称	顺序

IGHJ1	203	IGHJ3	205
IGHJ2	204	IGHJ4	206

[0228] 本公开提供了经遗传修饰的非人动物，其包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因和/或一个或多个人IGHJ基因。在一些实施方案中，所述人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因可操作地连接在一起，并且可进行VDJ重排。在一些实施方案中，所述人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因位于内源重链免疫球蛋白基因座上。

[0229] 在一些实施方案中，所述动物包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个或161人IGHV基因(例如，如表1所示的基因)。

[0230] 在一些实施方案中，所述动物包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHV(III)-82、IGHV7-81、IGHV4-80、IGHV3-79、IGHV(II)-78-1、IGHV5-78、IGHV7-77、IGHV(III)-76-1、IGHV3-76和IGHV3-75的基因。

[0231] 在一些实施方案中，所述动物包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHV(III)-5-2、IGHV(III)-5-1、IGHV2-5、IGHV7-4-1、IGHV4-4、IGHV1-3、IGHV(III)-2-1、IGHV1-2、IGHV(II)-1-1和IGHV6-1的基因。

[0232] 在一些实施方案中，所述动物包含未修饰的人序列，所述未修饰的人序列包含起始于选自IGHV(III)-82、IGHV7-81、IGHV4-80、IGHV3-79、IGHV(II)-78-1、IGHV5-78、IGHV7-77、IGHV(III)-76-1、IGHV3-76和IGHV3-75的基因并终止于选自IGHV(III)-5-2、IGHV(III)-5-1、IGHV2-5、IGHV7-4-1、IGHV4-4、IGHV1-3、IGHV(III)-2-1、IGHV1-2、IGHV(II)-1-1和IGHV6-1的基因的序列。在一些实施方案中，所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHV1-2的部分。在一些实施方案中，所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHV(II)-1-1的部分。在一些实施方案中，所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHV-6-1的部分。

[0233] 在一些实施方案中，所述动物包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个或27个人IGHD基因(例如，如表2所示的基因)。在一些实施方案中，所述动物包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHD1-1、IGHD2-2、IGHD3-3、IGHD4-4、IGHD5-5、IGHD4-23、IGHD5-24、IGHD6-25、IGHD1-26和IGHD7-27的基因。

[0234] 在一些实施方案中，所述动物包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个人IGHJ基因(例如，表3所示的基因)。在一些实施方案中，所述动物包括1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个选自IGHJ1P、IGHJ1、IGHJ2、IGHJ2P、IGHJ3、IGHJ4、IGHJ5、IGHJ3P和IGHJ6的人IGHJ基因。

[0235] 在一些实施方案中，所述动物包含未修饰的人序列，所述未修饰的人序列包含始于选自IGHD1-1、IGHD2-2、IGHD3-3、IGHD4-4、IGHD5-5、IGHD4-23、IGHD5-24、IGHD6-25、IGHD1-26和IGHD7-27的基因并终止于选自IGHJ1P、IGHJ1、IGHJ2、IGHJ2P、IGHJ3、IGHJ4、IGHJ5、IGHJ3P和IGHJ6的基因的序列。在一些实施方案中，所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHD1-1开始至人IGHJ6的部分。

[0236] 在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从IGHD1-1开始至人IGHD7-27的部分。

[0237] 在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHJ1P开始至人IGHJ6的部分。在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHJ1开始至人IGHJ6的部分。

[0238] 在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(III)-82开始至人IGHJ6的部分。

[0239] 在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV1-2开始至人IGHJ6的部分。在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV(II)-1-1开始至人IGHJ6的部分。在一些实施方案中,所述未修饰的人序列源自始人重链免疫球蛋白基因座的从人IGHV6-1至人IGHJ6的部分。

[0240] 在一些实施方案中,所述动物可具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个未修饰的人序列。在一些实施方案中,所述未修饰的人序列具有约或至少10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb或1000kb的长度。

[0241] 在一些实施方案中,所述动物包含一个或多个选自免疫球蛋白重链恒定μ(IGHM)、免疫球蛋白重链恒定δ(IGHδ)、免疫球蛋白重链恒定γ3(IGHG3)、免疫球蛋白重链恒定γ1(IGHG1)、免疫球蛋白重链恒定γ2b(IGHG2b)、免疫球蛋白重链恒定γ2a(IGHG2a)、免疫球蛋白重链恒定ε(IGHE)和免疫球蛋白重链恒定α(IGHA)基因的内源基因。在一些实施方案中,这些内源基因可操作地连接在一起。在一些实施方案中,这些内源基因具有与在野生型动物中相同的顺序。在一些实施方案中,同种型转换(免疫球蛋白类转换)可在所述动物中发生。

[0242] 在一些实施方案中,所述IGHV基因、IGHD基因和/或IGHJ基因可操作地连接在一起。VDJ重组可发生在这些基因之间,并产生功能性抗体。在一些实施方案中,这些基因以与人重链免疫球蛋白基因座中的顺序相似的顺序排列。这种排列提供了各种有利方面,例如,这些基因的排列允许产生具有与人中的重链可变结构域的多样性非常相似的多样性的重链可变结构域。由于一些随机序列可在VDJ重组过程中被插入到序列中,因此在一些实施方案中,无修饰或只有最小修饰的完整人抗体谱系可以降低非人序列在VDJ重组过程中被插入的可能性。

[0243] 在一些实施方案中,所述IGHV基因、IGHD基因和/或IGHJ基因与一个或多个选自IGHM、IGHδ、IGHG3、IGHG1、IGHG2b、IGHG2a、IGHE和IGHA基因的基因(例如,全部基因)可操作地连接在一起。

[0244] 在一些实施方案中,所述动物包含在其内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中,所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括一个或多个内源IGHV基因、一个或多个内源IGHD基因和一个或多个内源IGHJ基因的缺失。

[0245] 在一些实施方案中,所述动物是小鼠。所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括至少或约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、171个、172个、173个、174个、175个、176个、177个、178个、179个、180个、181个或182个小鼠IGHV基

因(例如,如表4中所示的基因)的缺失。在一些实施方案中,所述破坏包括约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHV1-86,IGHV1-85,IGHV1-84,IGHV1-83,IGHV1-82,IGHV1-81,IGHV1-80,IGHV1-79,IGHV1-78和IGHV1-77的小鼠IGHV基因的缺失。在一些实施方案中,所述小鼠仍然包括约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHV1-86、IGHV1-85、IGHV1-84、IGHV1-83、IGHV1-82、IGHV1-81、IGHV1-80、IGHV1-79、IGHV1-78和IGHV1-77(例如,IGHV1-86)的小鼠IGHV基因。

[0246] 在一些实施方案中,所述破坏包括约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHV5-6、IGHV5-5、IGHV2-3、IGHV6-1、IGHV5-4、IGHV5-3、IGHV2-2、IGHV5-2、IGHV2-1和IGHV5-1的小鼠IGHV基因的缺失。在一些实施方案中,所述小鼠仍然包括约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHV5-6、IGHV5-5、IGHV2-3、IGHV6-1、IGHV5-4、IGHV5-3、IGHV2-2、IGHV5-2、IGHV2-1和IGHV5-1的小鼠IGHV基因的缺失。

[0247] 在一些实施方案中,所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括至少或约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个小鼠IGHD基因(例如,如表5所示的基因)的缺失。在一些实施方案中,所述破坏包括约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9或10个,所述基因选自IGHD5-1、IGHD3-1、IGHD1-1、IGHD6-1、IGHD2-3、IGHD2-7、IGHD2-8、IGHD5-6、IGHD3-2和IGHD4-1的小鼠IGHD基因的缺失。在一些实施方案中,所述小鼠仍然包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGHD5-1、IGHD3-1、IGHD1-1、IGHD6-1、IGHD2-3、IGHD2-7、IGHD2-8、IGHD5-6、IGHD3-2和IGHD4-1的小鼠IGHD基因。

[0248] 在一些实施方案中,所述破坏包括约或至少1、2、3或4个选自IGHJ1、IGHJ2、IGHJ3和IGHJ4的小鼠IGHJ基因的缺失。在一些实施方案中,所述小鼠仍包含约或至少1个、2个、3个或4个选自IGHJ1、IGHJ2、IGHJ3和IGHJ4的小鼠IGHJ基因。

[0249] 在一些实施方案中,所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括约或至少500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1000kb、1500kb、2000kb、2500kb或3000kb的内源序列的缺失。

[0250] 在一些实施方案中,所述删除的序列始于IGHV1-86至IGHJ4,始于GHV1-85至IGHJ4,始于IGHV1-84至IGHJ4,始于IGHV1-83至IGHJ4,或者始于IGHV1-82至IGHJ4(例如,始于IGHV1-85至IGHJ4)。

[0251] 在一些实施方案中,所述动物包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个序列,所述序列与人重链免疫球蛋白基因座中的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。在一些实施方案中,所述序列的长度约为或至少为10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1000kb、1500kb、2000kb、2500kb、3000kb或3500kb。在一些实施方案中,该序列从人IGHV(III)-82开始至IGHV1-2。在一些实施方案中,该序列从人IGHV7-81开始至IGHV1-2。在一些实施方案中,该序列从人IGHV(II)-1-1开始至IGHVJ6。在一些实施方案中,该序列从人IGHV6-1开始至IGHVJ6。

[0252] 所述人IGHV基因、人IGHD基因和人IGHJ基因可操作地连接在一起,并且可进行VDJ重排。在一些实施方案中,所述经修饰的小鼠具有完整的人IGHV、IGHD和IGHJ基因谱系(例

如,包括全部人IGHV、IGHD和IGHJ基因中的非假(non-pseudo)基因)。因此,所述经修饰的小鼠可产生完整的人抗体谱系。在一些实施方案中,在VDJ重组后,表15中的一个IGHV基因(例如IGHV3-21或IGHV3-74)构成了编码抗体重链可变区的序列。表15中的一个IGHD基因构成了编码抗体重链可变区的序列。表15中的一个IGHJ基因构成了编码抗体重链可变区的序列。在一些实施方案中,IGHV基因是IGHV3-21或IGHV3-74。

[0253] 在一些实施方案中,图70A和图70B中的一个IGHV基因(例如,IGHV3-30、IGHV3-33、IGHV4-39或IGHV4-34)构成了编码抗体重链可变区的序列。图70C中的一个IGHD基因(例如,IGHD6-19)构成了编码抗体重链可变区的序列。图70D中的一个IGHJ基因(例如,IGHJ4或IGHJ6)构成了编码抗体重链可变区的序列。在一些实施方案中,图71A和图71B中的一个IGKV基因(例如,IGKV4-1、IGKV1-33、IGKV2-30)构成了编码抗体轻链可变区的序列。图71C中的一个IGKJ基因(例如,IGKJ1、IGKJ2或IGKJ4)构成了编码抗体轻链可变区的序列。

[0254] 此外,在一些情况下,整个小鼠IGHV基因、IGHD基因和IGHJ基因(例如,包括全部非假基因)被敲除,并且重链可变区将不具有由源自小鼠的序列编码的任何序列,从而使人中的免疫原性最小化。

[0255] 经遗传修饰的κ轻链免疫球蛋白基因座

[0256] κ链免疫球蛋白基因座(也称为IGK或免疫球蛋白κ基因座)是染色体(例如,人2号染色体)上包含人抗体(或免疫球蛋白)轻链基因的区域。类似地,免疫球蛋白轻链基因也可以进行一系列重排,导致成熟免疫球蛋白轻链核酸(例如,κ链)的产生。

[0257] V区段(也称为IGKV基因)和J区段(也称为IGKJ基因)的连接产生了连续的外显子,其编码整个轻链可变结构域。在未重排的DNA中,V基因区段(或IGKV基因簇)位于离C区相对较远的位置。J基因区段(或IGKJ基因簇)位于C区附近。V区段与J基因区段的连接也使V基因接近C区序列。重排的V区的J基因区段仅通过一个内含子与C区序列分开。为了产生完整的免疫球蛋白轻链信使RNA,转录后通过RNA剪接将V区外显子连接至C区序列。

[0258] 人轻链免疫球蛋白基因座位于人2号染色体上。表7列出了IGKV基因及其在该基因座中的相对顺序。人的IGKV基因有几个不同的组,包括IGKV1基因(包括始于IGKV1的全部IGKV基因,也称为VκI)、IGKV2基因(包括始于IGKV2的全部IGKV基因,也称为VκII)、IGKV3基因(包括始于IGKV3的全部IGKV基因,也称为VκIII)、IGKV4基因(包括始于IGKV4的全部IGKV基因,也称为VκIV)、IGKV5基因(包括始于IGKV5的全部IGKV基因,也称为VκV)、IGKV6基因(包括始于IGKV6的全部IGKV基因,也称为VκVI)和IGKV7基因(包括始于IGKV7的全部IGKV基因,也称为VκVII)。

[0259] 人2号染色体中的这些IGKV基因也形成两个簇,近端的Vκ簇和远端的Vκ簇(图28)。两个簇中的序列相似,但不完全相同。这种序列的大区段复制发生在人谱系从与其它大型类人猿最近的共同祖先开始分化的时候。图64概述了每个簇中的相关IGVK基因。

[0260] 表7.人2号染色体上的IGKV基因列表

[0261]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGKV3D-7	1	IGKV3D-25	21	IGKV2-36	41	IGKV1-16	61
IGKV1D-8	2	IGKV2D-26	22	IGKV1-35	42	IGKV3-15	62
IGKV1D-43	3	IGKV1D-27	23	IGKV3-34	43	IGKV2-14	63
IGKV1D-42	4	IGKV2D-28	24	IGKV1-33	44	IGKV1-13	64
IGKV2D-10	5	IGKV2D-29	25	IGKV1-32	45	IGKV1-12	65
IGKV3D-11	6	IGKV2D-30	26	IGKV3-31	46	IGKV3-11	66
IGKV1D-12	7	IGKV3D-31	27	IGKV2-30	47	IGKV2-10	67
IGKV1D-13	8	IGKV1D-32	28	IGKV2-29	48	IGKV1-9	68
IGKV2D-14	9	IGKV1D-33	29	IGKV2-28	49	IGKV1-8	69
IGKV3D-15	10	IGKV3D-34	30	IGKV1-27	50	IGKV3-7	70
IGKV1D-16	11	IGKV1D-35	31	IGKV2-26	51	IGKV1-6	71
IGKV1D-17	12	IGKV2D-36	32	IGKV3-25	52	IGKV1-5	72
IGKV6D-41	13	IGKV1D-37	33	IGKV2-24	53	IGKV2-4	73
IGKV2D-18	14	IGKV2D-38	34	IGKV2-23	54	IGKV7-3	74
IGKV2D-19	15	IGKV1D-39	35	IGKV1-22	55	IGKV5-2	75

[0262]

IGKV3D-20	16	IGKV2D-40	36	IGKV6-21	56	IGKV4-1	76
IGKV6D-21	17	IGKV2-40	37	IGKV3-20	57		
IGKV1D-22	18	IGKV1-39	38	IGKV2-19	58		
IGKV2D-23	19	IGKV2-38	39	IGKV2-18	59		
IGKV2D-24	20	IGKV1-37	40	IGKV1-17	60		

[0263] 表8列出了全部IGKJ基因及其在人2号染色体上的相对顺序。编码轻链免疫球蛋白恒定结构域的免疫球蛋白κ恒定区(IGKC)基因位于IGKV和IGKJ基因之后。这些基因和这些基因的顺序也示于图39和图43中。

[0264] 表8.人2号染色体上的IGKJ基因列表

[0265]

基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGKJ1	77	IGKJ4	80
IGKJ2	78	IGKJ5	81
IGKJ3	79		

[0266] 小鼠轻链免疫球蛋白基因座位于小鼠6号染色体上。表9列出了IGKV基因及其在该基因座中的相对顺序。

[0267] 表9.小鼠染色体6上的IGKV基因列表

[0268]

基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGKV2-137	1	IGKV2-95-1	51	IGKV13-57-1	101	IGKV6-14	151
IGKV1-136	2	IGKV10-95	52	IGKV4-57	102	IGKV6-13	152
IGKV1-135	3	IGKV10-94	53	IGKV13-56-1	103	IGKV3-12-1	153
	*	IGKV2-93-1	54	IGKV4-56	104	IGKV3-12	154
IGKV14-134-1	5	IGKV19-93	55	IGKV13-55-1	105	IGKV3-11	155
IGKV17-134	6	IGKV4-92	56	IGKV4-55	106	IGKV3-10	156
IGKV1-133	7	IGKV4-91	57	IGKV13-54-1	107	IGKV3-9	157
IGKV1-132	8	IGKV4-90	58	IGKV4-54	108	IGKV3-8	158
IGKV1-131	9	IGKV13-89-1	59	IGKV4-53	109	IGKV3-7	159
IGKV14-130	10	IGKV12-89	60	IGKV4-52	110	IGKV3-6	160
IGKV9-129	11	IGKV1-88	61	IGKV4-51	111	IGKV3-5	161
IGKV9-128	12	IGKV13-87	62	IGKV4-50	112	IGKV3-4	162
IGKV17-127	13	IGKV4-86	63	IGKV12-49	113	IGKV3-3	163
IGKV14-126-1	14	IGKV13-85	64	IGKV5-48	114	IGKV3-2	164
IGKV14-126	15	IGKV13-84	65	IGKV12-47	115	IGKV3-1	165
IGKV11-125	16	IGKV4-83	66	IGKV12-46	116		
IGKV9-124	17	IGKV13-82	67	IGKV5-45	117		
IGKV9-123	18	IGKV4-81	68	IGKV12-44	118		
IGKV1-122	19	IGKV13-80-1	69	IGKV5-43	119		
IGKV17-121	20	IGKV4-80	70	IGKV12-42	120		
IGKV9-120	21	IGKV4-79	71	IGKV12-41	121		
IGKV9-119	22	IGKV13-78-1	72	IGKV5-40-1	122		
IGKV14-118-2	23	IGKV4-78	73	IGKV12-40	123		
IGKV14-118-1	24	IGKV4-77	74	IGKV5-39	124		
IGKV11-118	25	IGKV13-76	75	IGKV12-38	125		
IGKV1-117	26	IGKV4-75	76	IGKV5-37	126		
IGKV2-116	27	IGKV13-74-1	77	IGKV18-36	127		

[0269]

IGKV1-115	28	IGKV4-74	78	IGKV1-35	128		
IGKV11-114	29	IGKV13-73-1	79	IGKV8-34	129		
IGKV2-113	30	IGKV4-73	80	IGKV7-33	130		
IGKV2-112	31	IGKV4-72	81	IGKV6-32	131		
IGKV14-111	32	IGKV13-71-1	82	IGKV8-31	132		
IGKV1-110	33	IGKV4-71	83	IGKV8-30	133		
IGKV2-109	34	IGKV4-70	84		*		
IGKV1-108	35	IGKV4-69	85	IGKV6-29	135		
IGKV2-107	36	IGKV4-68	86	IGKV8-28	136		
IGKV11-106	37	IGKV12-67	87	IGKV8-27	137		
IGKV2-105	38	IGKV12-66	88	IGKV8-26	138		
IGKV16-104	39	IGKV4-65	89	IGKV6-25	139		
IGKV15-103	40	IGKV13-64	90	IGKV8-24	140		
IGKV15-102	41	IGKV4-63	91	IGKV8-23-1	141		
IGKV20-101-2	42	IGKV13-62-1	92	IGKV6-23	142		
IGKV15-101-1	43	IGKV4-62	93	IGKV8-22	143		
IGKV15-101	44	IGKV13-61-1	94	IGKV8-21	144		
IGKV14-100	45	IGKV4-61	95	IGKV6-20	145		
IGKV1-99	46	IGKV4-59	96	IGKV8-19	146		
IGKV12-98	47	IGKV4-60	97	IGKV8-18	147		
IGKV15-97	48	IGKV4-58	98	IGKV6-17	148		
IGKV10-96	49	IGKV13-57-2	99	IGKV8-16	149		
IGKV2-95-2	50	IGKV4-57-1	100	IGKV6-15	150		

[0270] Gm9728和Amd-ps2也位于该基因座中。Gm9728的相对顺序是4，Amd-ps2的相对顺序是134。表10列出了全部IGKJ基因及其在小鼠6号染色体上的相对顺序。编码轻链免疫球蛋白恒定结构域的IGKC基因位于IGKV和IGKJ基因之后。这些基因和这些基因的顺序也示于图40和图44中。

[0271] 表10.小鼠6号染色体上的IGKJ基因列表

[0272]

基因名称	顺序	基因名称	顺序
IGKJ1	166	IGKJ4	169
IGKJ2	167	IGKJ5	170
IGKJ3	168		

[0273] 本公开提供了包含一个或多个人IGKV基因和/或一个或多个人IGKJ基因的经遗传修饰的非人动物。在一些实施方案中，所述人IGKV基因和人IGKJ基因可操作地连接在一起，并且可进行VJ重排。在一些实施方案中，所述人IGKV基因和人IGKJ基因位于内源轻链免疫球蛋白基因座中。

[0274] 在一些实施方案中，所述动物包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、30个、40个、50个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个或76个人IGKV基因(例如，如表7中所示的基因)。

[0275] 在一些实施方案中，所述动物包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGKV3D-7、IGKV1D-8、IGKV1D-43、IGKV1D-42、IGKV2D-10、IGKV3D-11、IGKV1D-12、IGKV1D-13、IGKV2D-14和IGKV3D-15的基因。

[0276] 在一些实施方案中，所述动物包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGKV2-10、IGKV1-9、IGKV1-8、IGKV3-7、IGKV1-6、IGKV1-5、IGKV2-4、IGKV7-3、IGKV5-2和IGKV4-1的基因。

[0277] 在一些实施方案中，所述动物包含大约或至少1个、2个、3个、4个或5个人IGKJ基因(例如，如表3所示的基因)。在一些实施方案中，动物包含1个、2个、3个、4个或5个选自IGKJ1、IGKJ2、IGKJ3、IGKJ4和IGKJ5的人IGKJ基因。

[0278] 在一些实施方案中，所述动物包含内源IGKC。在一些实施方案中，IGKV基因和/或IGKJ基因可操作地连接在一起。VJ重组可以发生在这些基因之间，并产生功能性抗体。在一些实施方案中，这些基因以与人轻链免疫球蛋白基因座中的顺序相似的顺序排列。这种排列提供了各种有利方面，例如，这些基因的排列允许产生具有与人中的轻链可变结构域的多样性非常相似的多样性的轻链可变结构域。

[0279] 在一些实施方案中，所述IGKV基因和/或IGKJ基因与IGKC基因(例如，内源IGKC基因)可操作地连接在一起。

[0280] 在一些实施方案中，所述动物包含在其内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中，所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包括一个或多个内源IGKV基因和一个或多个内源IGKJ基因的缺失。

[0281] 在一些实施方案中，所述动物是小鼠。所述动物的内源重链免疫球蛋白基因座中的破坏包括至少或约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、151个、152个、153个、154个、155个、156个、157个、158个、159个、160个、161个、162个或163个小鼠IGKV基因(例如，如表9所示的基因)的缺失。在一些实施方案中，所述破坏包括约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGKV2-137、IGKV1-136、IGKV1-135、IGKV14-134-1、IGKV17-134、IGKV1-133、IGKV1-132、IGKV1-131、IGKV14-130和IGKV9-129的小鼠IGKV基因的缺失。在一些实施方案中，所述小鼠仍然包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGKV2-137、IGKV1-136、IGKV1-135、IGKV14-134-1、IGKV17-134、IGKV1-

133、IGKV1-132、IGKV1-131、IGKV14-130和IGKV9-129的小鼠IGKV基因。

[0282] 在一些实施方案中，所述破坏包括约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGKV3-10、IGKV3-9、IGKV3-8、IGKV3-7、IGKV3-6、IGKV3-5、IGKV3-4、IGKV3-3、IGKV3-2和IGKV3-1的小鼠IGKV基因的缺失。在一些实施方案中，所述小鼠仍然包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个选自IGKV3-10、IGKV3-9、IGKV3-8、IGKV3-7、IGKV3-6、IGKV3-5、IGKV3-4、IGKV3-3、IGKV3-2和IGKV3-1的小鼠IGKV基因。

[0283] 在一些实施方案中，所述破坏包括约或至少1个、2个、3个、4个或5个选自IGKJ1、IGKJ2、IGKJ3、IGKJ4和IGKJ5的小鼠IGKJ基因的缺失。在一些实施方案中，所述小鼠仍然包含约或至少1个、2个、3个、4个或5个选自IGKJ1，IGKJ2，IGKJ3，IGKJ4和IGKJ5的小鼠IGKJ基因(例如，IGKJ5)。

[0284] 在一些实施方案中，所述动物的内源κ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包含约或至少500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1000kb、1500kb、2000kb、2500kb、3000kb或3500kb的内源序列的缺失。

[0285] 在一些实施方案中，所述删除的序列从IGKV2-137开始至IGKJ4，从IGKV1-136开始至IGKJ4，从IGKV1-135开始至IGKJ4，从IGKV2-137开始至IGKJ5，从IGKV1-136开始至IGKJ5，或者从IGKV1-135开始至IGKJ5(例如，从IGKV2-137至IGKJ5)。

[0286] 在一些实施方案中，所述动物包含约或至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个序列，所述序列与人轻链免疫球蛋白基因座中的序列具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性。在一些实施方案中，所述序列的长度约为或至少为10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1000kb、1500kb、2000kb、2500kb、3000kb或3500kb。

[0287] 在一些实施方案中，所述动物可具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个未修饰的人序列。在一些实施方案中，所述未修饰的人序列的长度约为或至少为10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、200kb、300kb、400kb、500kb、600kb、700kb、800kb、900kb、1000kb、1500kb、2000kb、2500kb、3000kb或3500kb。

[0288] 在一些实施方案中，所述序列从人IGKV3D-7开始至IGKJ5。在一些实施方案中，所述序列从人IGKV3D-7开始至IGKJ4。在一些实施方案中，所述序列从人IGKV1D-8开始至IGKJ5。在一些实施方案中，所述序列从人IGKV1D-8开始至IGKJ4。

[0289] 所述人IGKV基因和人IGKJ基因可操作地连接在一起，并且可进行VJ重排。在一些实施方案中，所述经修饰的小鼠具有完整的人IGKV和IGKJ基因谱系(例如，包括全部人IGKV和IGKJ基因中的非假(non-pseudo)基因)。因此，所述经修饰的小鼠可产生完整的人抗体谱系。在一些实施方案中，在VJ重组后，表16中的一个IGKV基因(例如，IGKV1D-43、IGKV1D-13、IGKV1D-16或IGKV1D-12)构成编码抗体轻链可变区的序列。一个人IGKJ基因构成编码抗体轻链可变区的序列。在一些实施方案中，IGKV基因是IGKV1D-43、IGKV1D-13、IGKV1D-16或IGKV1D-12。此外，在一些情况下，整个小鼠IGKV基因和IGKJ基因(均为非假基因)被敲除，轻链可变区将不具有任何由源自小鼠的序列编码的序列，从而使人中的免疫原性最小化。

[0290] 在一些实施方案中，所述人近侧Vκ簇IGKV基因包含在经修饰的染色体中。在一些实施方案中，所述人远端Vκ簇IGKV基因包含在经修饰的染色体中。在一些实施方案中，所述

人近侧Vκ簇IGKV基因和人远侧Vκ簇IGKV基因都包含在修饰的染色体中。

[0291] 经遗传修饰的λ轻链免疫球蛋白基因座

[0292] λ链免疫球蛋白基因座(也称为IGL或免疫球蛋白λ基因座)是染色体(例如,人22号染色体)上包含人抗体(或免疫球蛋白)轻链基因的区域。类似地,免疫球蛋白轻链基因也可进行一系列重排,导致成熟免疫球蛋白轻链核酸(例如,λ链)的产生。在健康的人个体中,血清中的总κ与λ比率约为2:1(测量完整的完全抗体),或者如果测量游离轻链,所述比率则为1:1.5。在小鼠中,总κ与λ的比率大致为9:1。

[0293] 在一些实施方案中,所述动物包含人λ链免疫球蛋白基因座。

[0294] 在一些实施方案中,所述动物包含在其内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中,所述动物的内源轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包括一个或多个内源IGLV基因、一个或多个内源IGLJ基因和/或一个或多个免疫球蛋白λ恒定(IGLC)基因(例如,IGLC1、IGLC2、IGLC3和IGLC4)的缺失。

[0295] 所述小鼠λ轻链免疫球蛋白基因座(IGL基因座)位于小鼠16号染色体上。表11列出了IGLV、IGLJ和IGLC基因及其在该基因座上的相对顺序。

[0296] 表11.小鼠IGL基因座上的基因列表

[0297]

IMGT 基因	染色体定位	染色体上的基因取向	NCBI 基因 ID	参考 GRCm38.p3 C57BL/6J	基因在序列中的位置
IGLV2	16A3 (11.93 cM)	REV	110612	NC_000082.6	19260403..19260844
IGLV3	16A3 (11.91 cM)	REV	404743	NC_000082.6	19241208..19241679
IGLJ2	16A3 (11.89 cM)	REV	404739	NC_000082.6	19200198..19200235
IGLC2	16A3 (11.89 cM)	REV	110786	NC_000082.6	19198536..19198852
IGLJ4	16A3 (11.89 cM)	REV	404742	NC_000082.6	19196495..19196536
IGLC4	16A3 (11.89 cM)	REV	404736	NC_000082.6	19194999..19195312
IGLV1	16A3 (11.82 cM)	REV	16142	NC_000082.6	19085017..19085460
IGLJ3	16A3 (11.81 cM)	REV	404740	NC_000082.6	19067041..19067078
IGLJ3P	16A3 (11.81 cM)	REV	404741	NC_000082.6	19066371..19066408
IGLC3	16A3 (11.81 cM)	REV	110787	NC_000082.6	19065365..19065681
IGLJ1	16A3 (11.81 cM)	REV	404737	NC_000082.6	19063225..19063262
IGLC1	16A3 (11.80 cM)	REV	110785	NC_000082.6	19061752..19062071

[0298] 所述动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包括至少或约1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11或12个小鼠IGLV、IGLJ和IGLC基因(例如,如表11所示的基因)的缺失。在一些实施方案中,所述缺失包括约或至少1个、2个、3个或4个选自IGLC1、IGLC2、IGLC3和IGLC4的小鼠IGKC基因。在一些实施方案中,所述破坏包括约或至少1个、2个或3个选自IGLV1、IGLV2和IGLV3的小鼠IGLV基因的缺失。在一些实施方案中,所述破坏包括约或至少1个、2个、3个、4个或5个选自IGLJ1、IGLJ2、IGLJ3、IGLJ3P和IGLJ4的小鼠IGLJ基因的缺失。

[0299] 在一些实施方案中,所述动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏包括约或至少10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、70kb、80kb、90kb、100kb、110kb、120kb、130kb、140kb、150kb、160kb、170kb、180kb、190kb、200kb、210kb、220kb、230kb、240kb、250kb、260kb、270kb、280kb、290kb、300kb、350kb、400kb、450kb、500kb或1000kb的核苷酸的缺失。在一些实施方案中,所述动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因中没有破坏。

[0300] 在一些实施方案中,所述删除的序列从IGLV2开始至IGLC1、从IGLV3开始至IGLC1或从IGLJ2开始至IGLC1。

[0301] 经遗传修饰的动物

[0302] 一方面,本公开提供了经遗传修饰的非人动物,其包含人源化重链免疫球蛋白基

因座和/或人源化轻链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,所述动物包含一个或多个人IGHV基因、一个或多个人IGHD基因、一个或多个人IGHJ基因、一个或多个人IGKV基因和/或一个或多个人IGKJ基因。在一些实施方案中,这些基因位于内源免疫球蛋白基因座中。

[0303] 在一些实施方案中,所述动物包含人λ链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,所述动物包含在动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座中的破坏。在一些实施方案中,所述动物在动物的内源λ轻链免疫球蛋白基因座中没有破坏。

[0304] 所述经遗传修饰的非人动物可以是各种动物,例如小鼠、大鼠、兔子、猪、牛(例如,母牛、公牛、水牛)、鹿、绵羊、山羊、鸡、猫、狗、雪貂、灵长类动物(例如,狨猴、恒河猴)。对于其中不容易获得合适的可经遗传修饰的胚胎干(ES)细胞的非人动物,可采用其它方法制备包含遗传修饰的非人动物。此类方法包括,例如,修饰非ES细胞基因组(例如,成纤维细胞或诱导多能细胞),并采用核移植将经修饰的基因组转移到合适的细胞,例如卵母细胞,并在合适的条件下在非人动物中孕育经修饰的细胞(例如,经修饰的卵母细胞),以形成胚胎。这些方法在本领域中是已知的,并且在例如Nagy等人"Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual(第3版),"Cold Spring Harbor Laboratory Press,2003(其通过引用整体并入本文)中进行了描述。因此,在各种实施方案中,人V、D和/或J区段可以可操作地连接至非人动物(例如,啮齿动物,小鼠、大鼠、仓鼠)恒定区基因序列。在B细胞发育过程中,这些重排的人V、D和/或J区段连接至非人动物免疫球蛋白恒定区。

[0305] 在一个方面,该动物是哺乳动物,例如,双足总科或鼠总科(Muroidea)的哺乳动物。在一些实施方案中,所述转基因动物是啮齿动物。啮齿动物可选自小鼠、大鼠和仓鼠。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的动物来自选自丽仓鼠科(Calomyscidae)(例如,鼠样仓鼠)、仓鼠科(Cricetidae)(例如,仓鼠、新世界大鼠和小鼠、田鼠)、鼠科(小鼠和大鼠、沙鼠、多刺小鼠(spiny mice)、鬚毛大鼠(crested rats))、马岛鼠科(Nesomyidae)(攀爬小鼠(climbing mice),岩石小鼠(rock mice)、白尾大鼠、马达加斯加大鼠和小鼠)、刺山鼠科(Platacanthomyidae)(例如多刺睡鼠(spiny dormice)),和齢鼠科(Spalacidae)(例如,鼹鼠、竹鼠和鼢鼠)的科。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的啮齿动物选自小鼠或大鼠(鼠科)、沙鼠、多刺小鼠和鬚毛大鼠。在一些实施方案中,所述非人动物是小鼠。

[0306] 在一些实施方案中,所述动物是C57背景的小鼠(例如,选自C57BL/A,C57BL/An,C57BL/GrFa,C57BL/KaLwN,C57BL/6,C57BL/6J,C57BL/6ByJ,C57BL/6NJ,C57BL/10,C57BL/10ScSn,C57BL/10Cr和C57BL/Ola的C57BL品系)。在一些实施方案中,所述小鼠是选自为129P1,129P2,129P3,129X1,129S1(例如,129S1/SV,129S1/SvIm),129S2,129S4,129S5,129S9/SvEvH,129S6(129/SvEvTac),129S7,129S8,129T1,129T2的品系的129品系。这些小鼠描述于,例如,Festing等人,Revised nomenclature for strain 129mice,Mammalian Genome 10:836(1999);Auerbach等人,Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines(2000),这两篇文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的小鼠是129品系与C57BL/6品系的杂交品系。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的小鼠是129品系的杂交品系或BL/6品系的杂交品系。在一些实施方案中,所述小鼠是BALB品系,例如BALB/c品系。在一些实施方案中,所述小鼠是BALB品系和另一种品系的杂交品系。在一些实施方案中,小鼠来自杂交品系(例如,50%BALB/c-50%12954/Sv;或50%C57BL/6-50%129)。

[0307] 在一些实施方案中，所述动物是大鼠。大鼠可选自Wistar大鼠、LEA品系、Sprague Dawley品系、Fischer品系、F344、F6和Dark Agouti。在一些实施方案中，所述大鼠品系是选自Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6和Dark Agouti的两种或更多种品系的杂交品系。

[0308] 所述动物可具有一种或多种其它遗传修饰和/或其它修饰，其适合于制造人源化动物的特定目的。

[0309] 包含内源非人免疫球蛋白基因座的修饰的经遗传修饰的非人动物。在一些实施方案中，所述修饰可包含编码人蛋白质的至少一部分(例如，与人重链可变结构域或轻链可变结构域序列具有至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性)的人核酸序列。尽管还提供了可包含本文所述修饰的经遗传修饰的细胞(例如，ES细胞、体细胞)，但在许多实施方案中，所述经遗传修饰的非人动物包含在动物种系中的内源基因座的修饰。

[0310] 经遗传修饰的动物可表达来自内源小鼠基因座的人源化抗体和/或嵌合抗体，其中一个或多个内源小鼠免疫球蛋白基因已经被人免疫球蛋白基因和/或核苷酸序列替换，所述核苷酸序列与人免疫球蛋白基因序列(例如，IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和/或IGKJ基因)具有至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性。在各种实施方案中，内源非人免疫球蛋白基因座被完整地或部分地修饰以包含人核酸序列。

[0311] 可对上述非人哺乳动物进行遗传、分子和行为分析。本公开还涉及由本公开提供的非人哺乳动物与相同基因型或其它基因型交配产生的后代。非人哺乳动物可以是本领域已知的任何非人动物，并且可用于本文所述的方法中。优选的非人哺乳动物是哺乳动物(例如，啮齿动物)。在一些实施方案中，非人哺乳动物是小鼠。

[0312] 本公开还提供了源自非人哺乳动物或其后代的细胞系或原代细胞培养物。基于细胞培养的模型可以通过例如以下方法制备。细胞培养物可通过从非人哺乳动物中分离而获得，或者细胞可从使用相同构建体和标准细胞转染技术建立的细胞培养物中获得。包含编码人或人源化免疫球蛋白的DNA序列的遗传构建体的整合情况可通过多种方法检测。

[0313] 有许多分析方法可用于检测外源DNA或对基因组DNA的修饰，包括核酸水平上的方法(包括使用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)或Southern印迹和原位杂交的mRNA定量方法)和蛋白质水平上的方法(包括组织化学、免疫印迹分析和体外结合研究)。另外，目标基因的表达水平可通过本领域技术人员熟知的ELISA技术进行定量。许多标准分析方法可用于完成定量测量。例如，转录水平可使用RT-PCR和杂交方法来测量，所述杂交方法包括RNA酶保护、Southern印迹分析、RNA点分析(RNA dot analysis)(RNAdot)分析。免疫组织化学染色、流式细胞术、蛋白质印迹分析也可用于评估人或人源化蛋白质的存在。

[0314] 抗体和抗原结合片段

[0315] 本公开提供了通过本文所述方法产生的抗体及其抗原结合片段(例如，人源化抗体或嵌合抗体)。

[0316] 一般来说，抗体(也称为免疫球蛋白)由两类多肽链(轻链和重链)组成。本公开的非限制性抗体可以是完整的、包含两条重链和两条轻链的四链免疫球蛋白抗体。抗体的重链可以是任何同种型(包括IgM、IgG、IgE、IgA或IgD)或亚类(包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、

IgG3、IgG4、IgE1、IgE2)等。轻链可以是κ轻链或λ轻链。抗体可包含两条相同的轻链拷贝和两条相同的重链拷贝。重链各自包含一个可变结构域(或可变区,V_H)和多个恒定结构域(或恒定区),通过它们的恒定区内的二硫键彼此结合,形成抗体的"茎"。轻链各自包含一个可变结构域(或可变区,V_L)和一个恒定结构域(或恒定区),每条轻链通过二硫键与一条重链结合。每条轻链的可变区与其所结合的重链的可变区对齐。轻链和重链的可变区均包含三个夹在更保守的框架区(FR)之间的高变区。

[0317] 这些高变区(被称为互补决定区(CDR)形成包含抗体的主要抗原结合表面的环。四个框架区主要采用β-折叠构象,CDR形成连接β-折叠结构的环,在一些情况下形成β-折叠结构的一部分。每条链中的CDR被框架区域保持在非常接近的位置,并且与来自另一条链的CDR一起,促成抗原结合区域的形成。

[0318] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定抗体的CDR区的方法是众所周知的,并且通常使用多种CDR的定义方式。Kabat定义基于序列可变性,而Chothia定义基于结构环区域的位置。这些方法和定义描述于,例如,Martin,"Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains,"Antibody engineering,Springer Berlin Heidelberg,2001.422-439;Abhinandan等人"Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains,"Molecular immunology 45.14(2008):3832-3839;Wu,T.T.和Kabat,E.A.(1970)J.Exp.Med.132:211-250;Martin等人,Methods Enzymol.203:121-53(1991);Morea等人,Biophys Chem.68(1-3):9-16(Oct.1997);Morea等人,J Mol Biol.275(2):269-94(Jan.1998);Chothia等人,Nature 342(6252):877-83(Dec.1989);Ponomarenko and Bourne,BMC Structural Biology 7:64(2007);;其中每一篇都通过引用整体并入本文。

[0319] CDR对识别抗原的表位很重要。如本文中所用,"表位"是能够被抗体的抗原结合结构域特异性结合的靶分子的最小部分。表位的最小尺寸可以是约三个、四个、五个、六个或七个氨基酸,但这些氨基酸不需要在抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可能取决于基于抗原的二级和三级结构的抗原三维构型。

[0320] 在一些实施方案中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,相异在于它们的恒定区,特别是它们的铰链和上部CH2结构域。IgG亚类的序列和差异在本领域中是已知的,并且描述于,例如,Vidarsson等人,"IgG subclasses and allotypes:from structure to effector functions."Frontiers in immunology 5(2014);Irani等人"Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases."Molecular immunology 67.2(2015):171-182;Shakib,Farouk,编辑The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation.Elsevier,2016;其中每一篇都通过引用整体并入本文。

[0321] 抗体还可以是源自任何物种(例如,人、啮齿动物、小鼠、大鼠、骆驼)的免疫球蛋白分子。本文公开的抗体还包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体以及包含与另一种多肽融合的免疫球蛋白结合结构域的嵌合抗体。术语"抗原结合结构域"或"抗原结合片段"是保留完整抗体的特异性结合活性的抗体的一部分,即,能够与完

整抗体的靶分子上的表位特异性结合的抗体的任何部分。其包括例如Fab、Fab'、F(ab')2和这些片段的变体。因此，在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段可以是，例如，scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、由抗体片段形成的多特异性抗体，以及包括为抗体结合结构域或与抗体结合结构域同源的结合结构域的任何多肽。抗原结合结构域的非限制性实例包括，例如，完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链、或来自完整抗体的重链或轻链的单个CDR。

[0322] 在一些实施方案中，抗原结合片段可形成嵌合抗原受体(CAR)的一部分。在一些实施方案中，嵌合抗原受体是如本文所述的单链可变区片段(scFv)与CD3-ζ的跨膜结构域和胞内域融合的融合体。

[0323] 在一些实施方案中，scFv具有一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域。在一些实施方案中，scFv具有两个重链可变结构域和两个轻链可变结构域。在一些实施方案中，scFv具有两个抗原结合区，所述两个抗原结合区可与各自的靶抗原结合。

[0324] 通过本文所述方法产生的抗体及其抗原结合片段(例如，人源化抗体或嵌合抗体)具有各种有利方面。在一些实施方案中，不需要进一步优化来获得期望的性质(例如，结合亲和力、热稳定性和/或有限聚集)。

[0325] 在一些实施方式中，所述抗体(或其抗原结合片段)以小于0.1s^{-1}、小于0.01s^{-1}、小于0.001s^{-1}、小于0.0001s^{-1}或小于0.00001s^{-1}的解离速率(koff)与靶特异性结合。在一些实施方案中，解离速率(koff)大于0.01s^{-1}、大于0.001s^{-1}、大于0.0001s^{-1}、大于0.00001s^{-1}或大于0.000001s^{-1}。

[0326] 在一些实施方案中，动力学缔合速率(kon)大于1 x 10^2/Ms、大于1 x 10^3/Ms、大于1 x 10^4/Ms、大于1 x 10^5/Ms或大于1 x 10^6/Ms。在一些实施方案中，动力学缔合速率(kon)小于1 x 10^5/Ms、小于1 x 10^6/Ms或小于1 x 10^7/Ms。

[0327] 亲和力可从动力学速率常数的商(KD＝koff/kon)中推导出来。在一些实施方案中，KD小于1 x 10^{-6}M、小于1 x 10^{-7}M、小于1 x 10^{-8}M、小于1 x 10^{-9}M或小于1 x 10^{-10}M。在一些实施方案中，KD小于50nM、40nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM。在一些实施方案中，KD大于1 x 10^{-7}M、大于1 x 10^{-8}M、大于1 x 10^{-9}M、大于1 x 10^{-10}M、大于1 x 10^{-11}M或大于1 x 10^{-12}M。在一些实施方案中，所述抗体以小于或等于约0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM的KD与靶标结合。

[0328] 在一些实施方案中，测定了热稳定性。本文所述的抗体或抗原结合片段的Tm可高于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。

[0329] 由于IgG可被描述为多结构域蛋白质，所以熔解曲线有时显示两个转变，或三个转变，以及第一变性温度Tm D1、第二变性温度Tm D2和任选的第三变性温度Tm D3。

[0330] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段的Tm D1高于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段的Tm D2高于60

℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段的Tm D3高于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。

[0331] 在一些实施方案中，Tm、Tm D1、Tm D2、Tm D3低于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。

[0332] 在一些实施方案中，当温度低于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃时，本文所述的抗体或抗原结合片段不形成聚集。

[0333] 产生经遗传修饰的动物的方法

[0334] 所述经遗传修饰的动物可通过将人免疫球蛋白基因引入非人动物的基因组中以生产能够表达人源化抗体或嵌合抗体的动物来产生。图1A显示了产生人源化动物的方法。在一些实施方案中，所述方法首先涉及修饰人染色体上的人免疫球蛋白基因座。然后将经修饰的人染色体引入小鼠受体细胞。然后通过直接替换将人免疫球蛋白可变区引入小鼠基因组的相应区域。然后，筛选受体细胞。在一些实施方案中，细胞不包含人染色体。然后将细胞注射到囊胚中，以制备嵌合小鼠。可以进行后续育种以获得含有完整人源化免疫球蛋白基因座的小鼠。

[0335] 其它几种技术也可用于产生经遗传修饰的动物，包括例如非同源末端接合(NHEJ)、同源重组(HR)、锌指核酸酶(ZFN)、基于转录激活因子样效应子的核酸酶(TALEN)和规律成族间隔短回文重复序列(CRISPR)-Cas系统。在一些实施方案中，使用同源重组。在一些实施方案中，将CRISPR-Cas9基因组编辑用于产生经遗传修饰的动物。这些基因组编辑技术中的许多基因组编辑技术在本领域中是已知的，并且描述于例如Yin等人，"Delivery technologies for genome editing，"Nature Reviews Drug Discovery 16.6(2017)：387-399，该文献通过引用整体并入本文。还提供了许多其它方法，所述方法可用于基因组编辑，例如，将经遗传修饰的细胞核微注射到去核卵母细胞中，并将去核卵母细胞与另一种经遗传修饰的细胞融合。

[0336] 遗传修饰过程可涉及通过同源重组用人序列替换内源序列。在一些实施方案中，靶位点上游和下游的切割(例如，通过锌指核酸酶、TALEN或CRISPR)可导致DNA双链断裂，并将同源重组用于将人序列替换内源序列。

[0337] 在一些实施方案中，用于产生经遗传修饰的人源化动物的方法可包括在内源基因座(或位点)处用人序列的相应区域替换核酸(例如，V、D、J区域或V、J区域)的步骤。该序列可包括IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和/或IGKJ基因的区域(例如，一部分或整个区域)。在一些实施方案中，替换由同源重组介导。在一些实施方案中，替换由Cre重组酶介导。

[0338] 图9显示了用于将功能性遗传元件添加到人染色体中的打靶策略。可在V区的上

游、J区与C区之间插入这些载体。

[0339] 在一些实施方案中，第一载体从5’至3’具有一个或多个下列序列：位于插入位点上游的DNA同源臂序列、PGK启动子、红色荧光蛋白报告基因(tdTomato)、FMDV(口蹄疫病毒)自裂解肽(2A)、zeomycin抗性基因(Zeo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列(PolyA；“PA”)、LoxP识别序列、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶的部分序列；“3’HygR”)和Flp识别靶标(“FRT”)、下游DNA同源臂序列和DTA基因。

[0340] 第二载体从5’至3’具有一个或多个下列序列：位于插入位点上游的DNA同源臂序列、LoxP识别序列、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因的部分序列(5’PuroR)、来自人延伸因子1α的哺乳动物表达启动子(EF-1a)、piggyBac转座酶基因序列(PBase)、内部核糖体进入位点(IRES)、卡那霉素抗性基因序列(Neo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列、位于插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0341] 可将这些载体整合到细胞的基因组中，并且可通过药物抗性标志物或其组合(例如，博莱霉素(Zeocin)、G418和/或嘌呤霉素)来选择细胞。在一些实施方案中，表达了转座酶，并且转座酶靶序列之间的遗传元件可以被删除。

[0342] 在一些实施方案中，这些载体被整合到已被修饰的人染色体中。在第一载体和第二载体被整合到基因组中之前，可以首先修改人染色体。在一些实施方案中，可根据需要在染色体的不同位置添加一个或多个另外的载体。在一些实施方案中，在C区与着丝粒(动粒)之间添加载体。第三载体从5’至3’可具有以下的一个或多个：插入位点上游的DNA同源臂序列、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因序列(PuroR)、胸苷激酶基因序列(TK)、LoxP识别序列、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因部分序列(5’PuroR)、哺乳动物表达启动子(EF-1a)、PBase、IRES、Neo、转录终止/多腺苷酸化信号序列、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。在一些实施方案中，可将这些载体插入可变基因区或恒定区。在一些实施方案中，可删除内源可变基因区或内源恒定区的一部分。在一些实施方案中，可删除染色体的大片段(例如，在恒定区与着丝粒之间)。也可以用Cre酶处理细胞，导致loxP位点的重组，从而去除人14号染色体上J区与着丝粒之间或人14号染色体上C区与着丝粒之间的基因组DNA序列。在一些实施方案中，可发生自发的染色体断裂。可选择具有所需染色体断裂的经修饰的人染色体进行实验。

[0343] 可从人细胞系、癌细胞、原代细胞培养物和/或人成纤维细胞中获得人染色体。在一些实施方案中，将第一载体引入人细胞，然后将所述细胞与受体细胞融合。然后将经修饰的染色体分离并引入到另一种合适的受体细胞中。选择具有所需抗性的细胞以获得仅包含一条人染色体的细胞。然后，将第二个载体引入细胞，通过抗性选择细胞。然后，如果需要，可以引入第三载体和/或第四载体。受体细胞可以是哺乳动物细胞、人细胞或小鼠细胞。在一些实施方案中，受体细胞是CHO细胞，或优选为A9细胞。在一些实施方案中，用荧光标记经修饰的染色体并分离所述染色体。并且通过染色体显微注射将经修饰的染色体注射到受体细胞中。在一些实施方案中，诱导供体细胞多核化它们的染色体。然后，迫使这些细胞核穿过细胞膜，以形成微细胞，可将所述微细胞与受体细胞融合。在一些实施方案中，还可使用微细胞介导的染色体转移。染色体操作技术描述于例如CN1200014A、CN109837307A、US20120093785A1和US2009253902；Kuroiwa等人″Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts.″

Nature Biotechnology 18.10(2000)):1086-1090;中国专利CN1717483A;Paulis,Marianna."Chromosome Transfer Via Cell Fusion."Methods in Molecular Biology 738(2011):57;Genes,Chromosomes&Cancer 14:126127(1995);Tomizuka等人"Functional expression and germline atransmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice."Nature Genetics 16.2(1997):133-143;Somatic Cell and Molecular Genetics,第13卷,第3期,1987,第279-284页;其中每一篇均通过引用整体并入本文。

[0344] 在一些实施方案中,可对小鼠染色体进行修饰。打靶策略如图4所示。第一载体可在插入位点的上游和下游具有DNA同源臂序列,以及具有LoxP序列。在一些实施方案中,第一载体从5'至3'具有一个或多个下列序列:插入位点上游的DNA同源臂序列、Flp识别靶(FRT)、CAG启动子、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶的部分序列;"5'HygR")、LoxP、FRT、5'PB转座子序列(PB5')、PGK启动子、蓝色荧光蛋白报告基因(BFP)、FMDV自裂解肽(2A)、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶;HygR)、3'PB转座子序列(PB3')、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0345] 第二载体可在插入位点的上游和下游具有DNA同源臂序列,以及具有LoxP序列。在一些实施方案中,第二载体从5'至3'具有一个或多个下列序列:插入位点上游的DNA同源臂序列、5'PB转座子序列(PB5')、PGK启动子、绿色荧光蛋白报告基因序列(EGFP)、FMDV自裂解肽(2A)、嘌呤霉素抗性基因序列(PuroR)、3'PB转座子序列(PB3')、Flp识别靶(FRT)、嘌呤霉素抗性基因部分序列(3'PuroR)、FMDV自裂解肽(2A)、DT受体(DTR)、LoxP识别序列、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0346] 图30显示了针对κ轻链免疫球蛋白基因座的类似打靶策略。首先可将两种载体整合到人染色体中。第一载体在插入位点的上游和下游具有DNA同源臂序列,以及具有LoxP识别序列。在一些实施方案中,第一载体从5'至3'具有一个或多个下列序列:位于插入位点上游的DNA同源臂序列、PGK启动子、tdTomato、FMDV自裂解肽(2A)、Bsr、转录终止/多腺苷酸化信号序列、LoxP识别序列、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶的部分序列;"3'HygR")、FRT、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0347] 第二载体在插入位点的上游和下游具有DNA同源臂序列,以及具有LoxP识别序列。在一些实施方案中,第二载体从5'至3'具有一个或多个下列序列:插入位点上游的DNA同源臂序列、LoxP识别序列、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因序列的一部分(5'PuroR)、EF-1a、PBase、IRES、Neo、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0348] 还可将LoxP识别序列添加到人染色体(例如,2号、14号、22号人染色体)。还可用Cre酶处理细胞,导致loxP位点的重组,从而去除基因组DNA序列。在一些实施方案中,自发的染色体断裂也可用于去除基因组DNA序列。

[0349] 小鼠轻链免疫球蛋白基因座的修饰可以直接进行。在一些实施方案中,将载体直接用于替换整个小鼠轻链免疫球蛋白可变区。在一些实施方案中,载体从5'到3'具有:插入位点上游的DNA同源臂序列、Flp识别靶(FRT)、来自人延伸因子1α的哺乳动物表达启动子(EF-1a)、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶的部分序列;"5'HygR")、Cre重组酶的LoxP识别序列、5'PB转座子序列(PB5')、蓝色荧光蛋白报告基因(BFP)、DT受体(DTR)、FMDV自裂解肽(2A)、卡那霉素抗性基因序列(Neo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列(PolyA;"PA")、3'

PB转座子序列(PB3')、嘌呤霉素抗性基因部分序列(3'PuroR)、FMDV自裂解肽(2A)、DT受体(DTR)、Cre重组酶的LoxP识别序列、插入位点下游的DNA同源臂序列以及DTA。

[0350] 小鼠免疫球蛋白可变区可通过置换(例如,同源重组或Cre介导的重组)被人免疫球蛋白可变区替换。在一些实施方案中,Cre重组可用于介导置换。在一些实施方案中,载体可将LoxP识别序列添加到人染色体中。可对小鼠染色体进行类似的修饰,其中可将两个LoxP识别序列添加到染色体上。例如,Cre重组酶可介导用人染色体上的V、J区置换小鼠染色体上的V、J区,或者用人染色体上的V、D、J区置换小鼠染色体上的V、D、J区。

[0351] 可进一步筛选细胞中不具有人染色体的细胞(例如,通过DT)。在一些情况下,未经DT筛选的细胞可包含重组人染色体片段,但这些片段很小,在小鼠细胞中不稳定(例如,Shinohara等人(2000)Chromosome Research,8:713-725),并且在细胞增殖过程中会自然消失。在一些实施方案中,经修饰的人染色体的大片段被删除,例如通过Cre介导的删除或通过自发的染色体断裂。

[0352] 5'末端同源臂和/或3'末端同源臂可具有期望的长度以促进同源重组。在一些实施方案中,同源臂约为或至少为1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb或50kb(例如,约3kb)。在一些实施方案中,同源臂小于1kb、2kb、3kb、4kb、5kb、6kb、7kb、8kb、9kb、10kb、20kb、30kb、40kb或50kb。

[0353] 在一些实施方案中,载体还可任选地包括报告蛋白,例如萤光素酶(例如,Gluc)或荧光蛋白(例如,EGFP、BFP等)。

[0354] 这些修饰可在不同的细胞中进行。在一些实施方案中,细胞是干细胞、胚胎干细胞或受精卵细胞。

[0355] 本公开还提供了建立人源化动物模型的方法,其包括以下步骤:

[0356] (a)基于本文所述的方法提供细胞(例如受精卵细胞);

[0357] (b)在液体培养基中培养细胞;

[0358] (c)将培养的细胞移植到受者雌性非人哺乳动物的输卵管或子宫中,使细胞在雌性非人哺乳动物的子宫中发育;

[0359] (d)在步骤(c)中鉴定怀孕雌性的后代经遗传修饰的人源化非人哺乳动物中的种系传播。

[0360] 在一些实施方案中,前述方法中的非人哺乳动物是小鼠(例如,C57小鼠、BALB/c小鼠或C57BL/6小鼠)。

[0361] 在一些实施方案中,步骤(c)中的非人哺乳动物是伪怀孕(或假怀孕)的雌性动物。

[0362] 在一些实施方案中,用于上述方法的受精卵是C57BL/6受精卵。也可用于本文所述方法的其它受精卵包括但不限于FVB/N受精卵、BALB/c受精卵、DBA/1受精卵和DBA/2受精卵。

[0363] 受精卵可来自任何非人动物,例如本文所述的任何非人动物。在一些实施方案中,受精卵细胞来自啮齿动物。可通过DNA的显微注射将基因构建体引入受精卵。例如,通过在显微注射后培养受精卵,可将培养的受精卵转移到假怀孕的非人动物中,然后所述动物生产非人哺乳动物,从而产生上述方法中提及的非人哺乳动物。

[0364] 还提供了包含本文所述核苷酸序列的细胞、组织和动物(例如,小鼠),以及表达来自内源非人基因座的人源化或嵌合抗体的细胞、组织和动物(例如,小鼠)。

[0365] 本公开还提供了各种靶向载体(例如,用于产生经遗传修饰动物的载体)。在一些实施方案中,载体可包含:a)与待改变区域的5'末端同源的DNA片段(5'同源臂);b)包含所需遗传元件(例如,LoxP识别位点、抗药性基因和/或报告基因等)的序列;和c)与待改变的区域的3'末端同源的第二DNA片段(3'同源臂)。本公开还涉及包含本文所述靶向载体的细胞。

[0366] 在一些实施方案中,所述细胞中的基因是杂合的。在一些实施方案中,所述细胞中的基因是纯合的。

[0367] 在一些实施方案中,所述非人哺乳动物细胞是小鼠细胞。在一些实施方案中,所述细胞是受精卵细胞。

[0368] 本公开还涉及产生具有两个或更多个人或嵌合基因的经遗传修饰的动物模型的方法。所述动物可包含一个或多个人或人源化免疫球蛋白基因座和编码另外的人或嵌合蛋白的序列。在一些实施方案中,所述另外的人或嵌合蛋白可以是程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)、B和T淋巴细胞相关蛋白(BTLA)、程序性细胞死亡蛋白1配体1(PD-L1)、CD27、CD28、CD47、CD137、CD154、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)、T细胞免疫球蛋白粘蛋白结构域3(T-cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3)(TIM-3)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)或TNF受体超家族成员4(TNFRSF4或OX40)。

[0369] 产生具有另外的人或嵌合基因(例如,人源化基因)的经遗传修饰动的物模型的方法可包括以下步骤:

[0370] (a)使用本文所述的方法获得经遗传修饰的非人动物;

[0371] (b)将所述经遗传修饰的非人动物与另一种经遗传修饰的非人动物交配,然后筛选后代以获得具有两个或更多个人或嵌合基因的经遗传修饰的非人动物。

[0372] 在一些实施方案中,在该方法的步骤(b)中,可将所述经遗传修饰的动物与具有人或嵌合PD-1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、PD-L1、CD27、CD28、CD47、CD137、CD154、TIGIT、TIM-3、GITR、SIRPa或OX40的经遗传修饰的非人动物交配。例如,在PCT/CN2017/090320、PCT/CN2017/099577、PCT/CN2017/099575、PCT/CN2017/099576、PCT/CN2017/099574、PCT/CN2017/106024、PCT/CN2017/110494、PCT/CN2017/110435、PCT/CN2017/120388、PCT/CN2018/081628、PCT/CN2018/081629(其中每一篇都通过引用整体并入本文)中描述了这些经遗传修饰的非人动物中的一些。

[0373] 在一些实施方案中,所述经遗传修饰的动物可具有人ADAM6基因、内源ADAM6基因或经修饰的ADAM6基因。ADAM6蛋白是ADAM蛋白家族的一员,其中ADAM是解整联蛋白和金属蛋白酶的缩写。通常在人IGHV基因IGHV 1-2与IGHV 6-1之间发现的人ADAM6基因是假基因(图37)。在小鼠中,存在两个ADAM6基因,ADAM6a和ADAM6b。它们位于小鼠IGHV与IGHD基因簇之间的基因间区域。小鼠ADAM6a位于小鼠IGHV5-1与小鼠IGHD5-1之间。小鼠ADAM6b位于小鼠IGHD3-1与小鼠IGHD1-1之间。因此,在一些实施方案中,所述经遗传修饰的动物可具有人ADAM6基因。在一些实施方案中,所述经遗传修饰的动物不具有内源ADAM6基因。

[0374] 在一些实施方案中,所述所述经遗传修饰的动物是小鼠。在一些实施方案中,所述小鼠被修饰成包括编码ADAM6蛋白(例如,ADAM6a或ADAM6b)的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述序列被放置在任何合适的位置。其可被置于基因间区域,或者基因组中任何合适的

位置。在一些实施方案中，所述核酸编码与小鼠ADAM6a基因(例如，NC_000078.6的113539230-113547024；SEQ ID NO:53)或小鼠ADAM6b基因(例如，NC_000078.6的113486188-113492125；SEQ ID NO:54)具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的序列。在一些实施方案中，所述核酸另外包括ADAM6a基因和ADAM6b基因的调控元件(例如，启动子)。

[0375] 在一些实施方案中，功能性小鼠ADAM6基因座可置于人IGHV基因簇的中间。在一些实施方案中，小鼠ADAM6基因座位于两个人IGHV基因之间。在一些实施方案中，人VH1-2与人VH(II)-1-1之间的人ADAM6假基因被小鼠ADAM6基因座替换。在一些实施方案中，在动物基因组中，ADAM6a基因和ADAM6b基因位于人IGHV1-2与人VH(II)-1-1之间。在一些实施方案中，小鼠ADAM6序列在人基因序列中的位置可接近人ADAM6假基因的位置，或者可接近小鼠ADAM6序列的位置(例如，在V-D基因间区域内)。在一些实施方案中，经遗传修饰的小鼠具有人源化重链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中，小鼠ADAM6a和小鼠ADAM6b位于人IGHV1-2与IGHV6-1基因之间。将小鼠ADAM6a和小鼠ADAM6b置于人IGHV1-2与IGHV6-1基因之间可有多种有利方面。例如，因为这些基因在相同的基因座替换了人ADAM6基因，所以人ADAM6基因的置换对VDJ重组的影响有限，并且小鼠ADAM6a和小鼠ADAM6b基因也可以正常发挥作用(如在与内源基因座相似的位置中)。

[0376] 因此，在一个方面，本公开提供了经遗传修饰的动物，其在内源重链免疫球蛋白基因座包含含有一个或多个人IGHV基因的第一序列；包含ADAM6基因的第二序列；以及包含一个或多个人IGHD基因和一个或多个人IGHJ基因的第三序列。在一些实施方案中，所述第一序列、第二序列和第三序列是可操作连接的。

[0377] 在一些实施方案中，所述第一序列包含表1中除IGHV2-10、IGHV3-9、IGHV1-8、IGHV(II)-1-1和IGHV6-1外的全部人IGHV基因。在一些实施方案中，所述第一序列包含表1中除IGHV5-10-1和IGHV3-64D、IGHV(II)-1-1和IGHV6-1外的全部人IGHV基因。在一些实施方案中，所述第一序列是源自人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的序列。

[0378] 在一些实施方案中，所述第二序列包含小鼠ADAM6a基因和小鼠ADAM6b基因之一或两者。在一些实施方案中，所述动物是能育的雄性小鼠。在一些实施方案中，所述第二序列不具有小鼠ADAM6a基因或小鼠ADAM6b基因。

[0379] 在一些实施方案中，所述第三序列包含表2中的全部人IGHD基因和表3中的全部人IGHJ基因。在一些实施方案中，所述第三序列包含人IGHV6-1。在一些实施方案中，所述第三序列包含人IGHV(II)-1-1。在一些实施方案中，所述第三序列是源自人重链免疫球蛋白基因座的未修饰的序列。

[0380] 在一些实施方案中，AMAM6a和/或ADAM6b是内源序列。在一些实施方案中，AMAM6a和/或ADAM6b不被替换，和/或位于其内源或天然位置。在一些实施方案中，重链可变区基因座中小鼠IGHV1-2之前的小鼠IGHV基因被人IGHV基因替换。在一些实施方案中，重链可变区基因座中小鼠IGHV6-1之后的小鼠IGHV、IGHD和IGHJ基因被一个或多个人IGHV基因、IGHD和/或IGHJ基因替换。

[0381] 因此，在一些实施方案中，可用人IGHV、IGHD和IGHJ基因替换小鼠IGHV、IGHD和IGHJ基因一次以上。在第一步中，用人IGHV基因替换在ADAM6a的5’侧选定数量的小鼠IGHV

基因(例如,表4中的全部小鼠IGHV基因)。在第二步中,用人IGHD和人IGHJ基因替换ADAM6b的3'侧的选定数量的小鼠IGHD和IGHJ基因(例如,表5中除IGHD5-1和IGHD3-1外的全部小鼠IGHD基因和表6中的全部IGHJ基因)。置换可通过同源重组或Cre介导的重组来进行。

[0382] 在一些实施方案中,所述小鼠不具有小鼠ADAM6a或ADAM6b基因。在一些实施方案中,所述小鼠具有人ADAM6基因。

[0383] 可使用各种方法来增强小鼠的生育力。在一些实施方案中,可将具有超数排卵的雌性小鼠用于交配。在一些实施方案中,可使用体外受精。可通过将血清促性腺激素和绒毛膜促性腺激素(例如,人或小鼠CG)注射到成熟的雌性小鼠中来诱导超数排卵。可处死成熟的雄性小鼠,分离其附睾尾。将附睾尾导的管切开以释放精子。接下来,可以处死超数排卵的成熟雌性小鼠并分离输卵管。卵丘-卵母细胞复合体(COC)可以从输卵管释放出来。接下来,可将精子悬浮液加入到COC并孵育以用于授精。可除去只含有一个原核的致病卵母细胞。孵育后,可将2细胞期的胚胎转移到受体雌性。增强小鼠生育力的方法是本领域已知的。

[0384] 本公开还提供了与本文所述的任何核苷酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的核酸序列,以及与本文所述任何氨基酸序列具有至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0385] 在一些实施方案中,本公开涉及编码本文所述任何肽的核苷酸序列,或由本文所述任何核苷酸序列编码的任何氨基酸序列。在一些实施方案中,所述核酸序列少于10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、500个或600个核苷酸。在一些实施方案中,所述氨基酸序列少于5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、250个、300个、350个或400个氨基酸残基。

[0386] 在一些实施方案中,所述氨基酸序列(i)包含氨基酸序列;或者(ii)由氨基酸序列组成,其中所述氨基酸序列是本文所述的任一种序列。

[0387] 在一些实施方案中,所述核酸序列(i)包含核酸序列;或者(ii)由核酸序列组成,其中所述核酸序列是本文所述的任一种序列。

[0388] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,为了最佳比较的目的,对序列进行比对(例如,为了最佳比对,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中引入缺口,并且为了比较的目的,可以忽略非同源序列)。出于比较目的而比对的参考序列的长度至少为参考序列长度的80%,在一些实施方案中至少为90%、95%或100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则该位置上的分子是相同的(如本文中所用,氨基酸或核酸的"同一性"相当于氨基酸或核酸的"同源性")。在考虑了为了两个序列的最佳比对而需要引入的缺口的数量和每个缺口的长度的情况下,两个序列之间的同一性百分比是所述序列共有的相同位置的数量的函数。为了本发明的目的,序列的比较

和两个序列之间同一性百分比的确定可使用Blossum 62评分矩阵,利用缺口罚分为12、缺口延伸罚分为4和移码缺口罚分为5来完成。

[0389] 具有相似物理化学性质的保守残基(例如亮氨酸和异亮氨酸)的百分比(同源性百分比)也可用于测量序列相似性。本领域已经定义了具有相似物理化学性质的氨基酸残基家族。这些家族包括例如具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。在许多情况下,同源性百分比高于同一性百分比。因此,本公开还提供了与本文所述的任何氨基酸序列具有1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性百分比的氨基酸序列,或编码这些氨基酸序列的核酸。

[0390] 使用经遗传修饰的动物的方法

[0391] 所述经遗传修饰的动物可用于产生能与靶标特异性结合的人源化或嵌合抗体。在一些实施方案中,可使用制备多克隆和单克隆抗体的标准技术,将靶标(例如,蛋白质或蛋白质的片段)用作免疫原以在这些动物中产生抗体。在一些实施方案中,将所述经遗传修饰的动物在允许所述动物产生特异于选定的抗原的抗体的条件下暴露于所述抗原一段时间。

[0392] 可通过多次注射(例如,皮下或腹膜内注射)抗原肽或蛋白质在动物体内产生多克隆抗体。在一些实施方案中,将抗原性肽或蛋白质与至少一种佐剂一起注射。在一些实施方案中,可将抗原性肽或蛋白质与在待免疫的物种中具有免疫原性的试剂缀合。可用抗原性肽或蛋白质注射动物超过一次(例如,两次、三次或四次)。

[0393] 可使用全长多肽或蛋白质,或者,可选地可将其抗原性肽片段用作免疫原。蛋白质的抗原性肽包含氨基酸序列的至少8个(例如,至少10个、15个、20个或30个)氨基酸残基,并含有蛋白质的表位,使得针对所述肽产生的抗体与蛋白质形成特异性免疫复合物。

[0394] 免疫原通常用于通过免疫合适的受试者(例如,本文所述的经遗传修饰动物)来制备抗体。合适的免疫原性制剂可包含例如重组表达的或化学合成的多肽(例如,蛋白质的片段)。所述制剂还可包含佐剂,诸如弗氏完全或不完全佐剂,或类似的免疫刺激剂。

[0395] 多克隆抗体可以如上所述通过用多肽或其抗原性肽(例如,蛋白质的部分)作为免疫原免疫合适的受试者来制备。可通过标准技术,诸如利用使用固定化多肽或肽的酶联免疫吸附测定(ELISA)随时间推移监测免疫受试者中的抗体滴度。如果需要,可从哺乳动物(例如,从血液)中分离抗体分子,并通过公知的技术(诸如蛋白G色谱的蛋白A)进一步纯化以获得IgG组分。在免疫后的适当时间,例如当特异性抗体滴度最高时,可从受试者获得产生抗体的细胞,并通过标准技术诸如最初由Kohler等人(Nature 256:495-497,1975)描述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,Immunol.Today 4:72,1983)、EBV-杂交瘤技术(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页,1985)或三源杂交瘤技术将其用于制备单克隆抗体。产生杂交瘤的技术是公知的(通常参见,Current Protocols in Immunology,1994,Coligan等人(编辑),John Wiley& Sons,Inc.,New York,NY)。产生单克隆抗体的杂交瘤细胞通过例如使用标准ELISA测定法

筛选杂交瘤培养上清液的结合目标多肽或表位的抗体的方式来检测。

[0396] 一方面，本公开提供了包含内源免疫球蛋白重链基因座的修饰的小鼠，其中该小鼠产生包含可操作地连接至重链恒定区基因序列的重排免疫球蛋白序列的B细胞。在一些实施方案中，可操作地连接至所述重链恒定区基因序列的所述重排免疫球蛋白序列包含人重链V、D和/或J序列。在一些实施方案中，所述重链恒定区基因序列包含选自CH1、铰链、CH2、CH3及其组合的人或小鼠重链序列。

[0397] 一方面，本公开提供了包含内源免疫球蛋白轻链(例如，κ或λ)基因座的修饰的小鼠，其中该小鼠产生包含可操作地连接到轻链恒定区基因序列的重排免疫球蛋白序列的B细胞。在一些实施方案中，可操作地连接至所述轻链恒定区基因序列的所述重排免疫球蛋白序列包含人轻链V和/或J序列。在一些实施方案中，所述轻链恒定区基因序列包含人或小鼠轻链恒定区。

[0398] 所述小鼠B细胞或脾细胞可包含例如可操作地连接至小鼠免疫球蛋白恒定区基因的重排非小鼠免疫球蛋白可变基因序列。确定编码人重链可变区和人轻链可变区的序列。所述序列可通过例如对目标杂交瘤或B细胞进行测序来确定。在一些实施方案中，使用单个B细胞筛选。其可筛选天然抗体谱系而无需杂交瘤融合和组合展示。例如，可将B细胞与一小组DNA条形编码的抗原混合，使得能够通过单细胞测序方案回收单个B细胞的一个或多个抗原条形码和B细胞受体(BCR)序列。

[0399] 可以例如通过将编码人重链可变区的序列可操作地连接至编码人重链恒定区的序列，和/或将编码人轻链可变区的序列可操作地连接至编码人轻链恒定区的序列，进一步修饰抗体以获得人源化抗体或人抗体。

[0400] 在一些实施方案中，如果小鼠表达与目标抗原非常相似的蛋白质，则可能难以在小鼠中引发免疫反应。这是因为在免疫细胞发育过程中，识别与自身来源肽结合的MHC分子的B细胞和T细胞被从免疫细胞的谱系中删除。在这些情况下，可进一步修饰人源化小鼠。可敲除小鼠中相应的基因，然后将小鼠暴露于目标抗原。因为小鼠对基因产物不进行阴性选择，所以小鼠可以产生容易与靶标特异性结合的抗体。

[0401] 本公开还提供了制备抗体、核酸、细胞、组织(例如，脾组织)的方法。在一些实施方案中，所述方法包括将本文所述的动物暴露于抗原。可从动物获得抗体(例如，嵌合抗体)、编码抗体的核酸、细胞和/或组织(例如，脾组织)。在一些实施方案中，编码人重链和轻链免疫球蛋白可变区的核酸可以例如通过测序来确定。在一些实施方案中，可将编码人重链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人重链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接。在一些实施方案中，可将编码人轻链免疫球蛋白可变区的核酸与编码人轻链免疫球蛋白恒定区的核酸可操作地连接。在一些实施方案中，培养含有本文所述的核酸的细胞并收集抗体。

[0402] 在一些实施方案中，小鼠免疫球蛋白V、D、J基因(例如，小鼠IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV或IGKJ基因)对重链和/或轻链可变区序列没有贡献。在一些实施方案中，由动物产生的重链和/或轻链可变区序列完全是人的，并且完全由人免疫球蛋白V、D、J基因(例如，人IGHV、IGHD、IGHJ、IGKV和IGKJ基因)贡献。

[0403] 本文所述的抗体或抗原结合片段的变体可通过将适当的核苷酸变化引入编码本文所述人抗体、人源化抗体或嵌合抗体或其抗原结合片段的DNA中，或通过肽合成来制备。此类变体包括，例如，组成抗体的抗原结合部位或抗原结合结构域的氨基酸序列内的残基

的缺失、插入或取代。在此类变体群中，一些抗体或抗原结合片段对靶蛋白的亲和力增加。可进行缺失、插入和/或组合的任何组合，以获得对靶标具有增加的结合亲和力的抗体或其抗原结合片段。引入抗体或抗原结合片段的氨基酸变化也可改变抗体或抗原结合片段的翻译后修饰或将新的翻译后修饰引入抗体或抗原结合片段，诸如改变(例如，增加或减少)糖基化位点的数量，改变糖基化位点的类型(例如，改变氨基酸序列，使得在细胞内酶的作用下不同的糖被连接到糖基化位点)，或引入新的糖基化位点。

[0404] 本文公开的抗体可源自任何动物物种，包括哺乳动物。天然抗体的非限制性实例包括源自人、灵长类动物(例如，猴子和猿)、牛、猪、马、绵羊、骆驼科动物(例如，骆驼和美洲驼)、鸡、山羊和啮齿动物(例如，大鼠、小鼠、仓鼠和兔子)(包括经遗传工程化以产生人抗体的转基因啮齿动物)的抗体。

[0405] 人抗体和人源化抗体包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区或者具有与源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区相同的氨基酸序列的抗体。人抗体可以例如在CDR中包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变)。

[0406] 可对抗体或抗原结合片段进行另外的修饰。例如，可将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区，从而允许在该区域中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可在体外和/或体内具有任何延长的半衰期。还可使用异双功能交联剂制备在体外和/或体内具有延长的半衰期的同二聚体抗体，所述用异双功能交联剂制备抗体的方法描述于例如Wolff等人(Cancer Res.53:2560-2565,1993)中。或者，抗体可被工程化成具有双Fc区(参见，例如，Stevenson等人，Anti-CancerDrug Design3:219-230,1989)。

[0407] 在一些实施方案中，可对抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可通过化学或酶促合成，或者通过酶促或化学裂解来产生。通过使抗体或抗体片段的目标氨基酸残基与能够与选定的侧链或N或C末端残基反应的有机衍生剂反应，将抗体或抗体片段的其它类型的共价修饰引入分子。

[0408] 实施例

[0409] 在以下实施例中进一步描述了本发明，所述实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0410] 实施例1:概述

[0411] 进行了将人免疫球蛋白基因引入小鼠基因组中以产生表达人源化抗体的小鼠的实验。图1A显示了产生人源化小鼠的方法。所述方法首先涉及修饰人染色体上的人免疫球蛋白区域。然后将经修饰的人染色体引入小鼠受体细胞。

[0412] 通过直接置换(例如，同源重组或Cre介导的重组)用人免疫球蛋白可变区替换了小鼠免疫球蛋白可变区。在一些情况下，可通过逐步的方法将人免疫球蛋白可变区引入小鼠基因组。然后，筛选正确替换的受体细胞。然后将细胞注射到囊胚中以制备嵌合小鼠。随后进行育种以获得含有完整的人免疫球蛋白可变区的小鼠。

[0413] 因为小鼠重链基因和两个轻链基因分别位于12号、6号和16号染色体上，所以可以分别制备含有人重链可变区或人轻链可变区的小鼠(图1B和图1C)。然后可将这些小鼠相互交配以获得既能表达人重链可变区又能表达人轻链可变区的小鼠。

[0414] 实施例2:小鼠重链免疫球蛋白基因座的修饰

[0415] 重链免疫球蛋白基因座位于小鼠12号染色体上。图2是显示小鼠重链免疫球蛋白基因座的示意图。在重链免疫球蛋白基因座的可变区两侧引入两个重组位点(1301,1302)，所得的经修饰的染色体如图3A-3B所示。其中一个是野生型loxP位点，另一个是异种特异性突变型lox位点(lox2272)。野生型loxP位点与异种特异性突变型lox位点之间不能发生重组。在小鼠胚胎干细胞中进行该修饰。打靶策略的概述如图4所示。载体(V1401)从5'至3'具有：插入位点上游的DNA同源臂序列、Flp识别靶标(FRT)、CAG启动子，潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶的部分序列；“5'HygR”)、LoxP(1301)、FRT、5'PB转座子序列(PB5')、PGK启动子、蓝色荧光蛋白报告基因(BFP)、FMDV自裂解肽(2A)、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶;HygR)、3'PB转座子序列(PB3')、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0416] 载体(V1402)从5'至3'具有：插入位点上游的DNA同源臂序列、5'PB转座子序列(PB5')、PGK启动子、绿色荧光蛋白报告基因序列(EGFP)、FMDV自裂解肽(2A)、嘌呤霉素抗性基因序列(PuroR)、3'PB转座子序列(PB3')、Flp识别靶标(FRT)、嘌呤霉素抗性基因部分序列(3'PuroR)、FMDV自裂解肽(2A)、DT受体(DTR)、LoxP识别序列(1302)、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0417] 将载体(V1401和V1402)引入小鼠胚胎干细胞。然后用潮霉素B和嘌呤霉素筛选细胞。通过PCR确认了外源基因整合到小鼠基因组中。结果如图5A-5B和图6A-6B所示。编号为030、035、036和037的克隆被确认为阳性。

[0418] 使用以下引物进行PCR测定：

[0419] mIgHV-5'loxP-L-GT-F:5'-gccaaggaatttaaaaggggattgaaagcaa-3'(SEQ ID NO:1)，

[0420] mIGHV-005-L-GT-R2:5'-gccctccatgtacagcttcatgtgc-3'(SEQ ID NO:2)；

[0421] mIGHV-005-5'loxP-R-GT-F2:5'-actgggcttgtcgagacagagaaag-3'(SEQ ID NO:3)，

[0422] mIgHV-5'loxP-R-GT-R:5'-ccacagcccgatctacttggctttt-3'(SEQ ID NO:4)；

[0423] mIGHV-3'lox-L-GT-F2:5'-gcaaggttttgactaagcggagcac-3'(SEQ ID NO:5)；

[0424] mIGHV-3'lox-L-GT-R2:5'-tgacgcatgtgttttatcggtctgt-3'(SEQ ID NO:6)；

[0425] mIGHV3'lox-R-GT-F2:5'-gtgcctgacacgtgctacgagattt-3'(SEQ ID NO:7)；

[0426] mIGHV-3'lox-R-GT-R1:5'-ttcaacaataagcagggccagaggg-3'(SEQ ID NO:8)；

[0427] 在这些引物当中，mIgHV-5'loxP-L-GT-F和mIgHV-5'loxP-R-GT-R位于小鼠染色体上，mIGHV-005-L-GT-R2和mIGHV-005-5'loxP-R-GT-F2位于载体1401上，mIGHV-3'lox-L-GT-F2和mIGHV-3'lox-R-GT-R1位于小鼠染色体上，mIGHV-3'lox-L-GT-R2和mIGHV3'lox-R-GT-F2位于载体1402上。

[0428] 实施例3:修饰人14号染色体

[0429] 本实验的目的是产生至少有两个重组位点的经修饰的人染色体。这两个重组位点被引入重链免疫球蛋白基因座可变区的两侧。

[0430] 重链免疫球蛋白基因座位于人14号染色体上。图7是突出显示重链免疫球蛋白基因座的人14号染色体的示意图。

[0431] 经修饰的人可变区如图8所示。图9显示了打靶策略的概述。如图9所示，301和302位点是重组位点。重组位点1301和重组位点301是相同的。重组位点1302和重组位点302是

相同的。

[0432] 进行了将载体插入人14号染色体的V区上游以及J区与C区之间的实验。第一个靶向载体(V401)从5’至3’具有:插入位点上游的DNA同源臂序列、PGK启动子、红色荧光蛋白报告基因(tdTomato)、来自FMDV(口蹄疫病毒)的自裂解肽(2A)、Zeocin抗性基因序列(Zeo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列(PolyA;“PA”)、Cre重组酶的LoxP识别序列(301)、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶的部分序列;“3’HygR”)和Flp识别靶标(“FRT”)、下游DNA同源臂序列和白喉毒素A亚单位(DTA)基因。

[0433] 第二载体(V402)从5’到3’具有以下序列:插入位点上游的DNA同源臂序列、Cre重组酶的LoxP识别序列(302)、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因的部分序列(5’PuroR)、来自人延伸因子1α的哺乳动物表达启动子(EF-1a)、piggyBac转座酶基因序列(PBase)、内部核糖体进入位点(IRES)、卡那霉素抗性基因序列(Neo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列(PolyA;“PA”)、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0434] 在一些实验中,将载体(V401,V402)引入细胞,并通过合适的药物抗性标记或其组合(Zeocin,G418)选择细胞。

[0435] 有许多方法可以将目标载体引入人染色体。人染色体可获自人细胞系、癌细胞、原代细胞培养物和/或人成纤维细胞。在一个实验中,将第一个载体引入染色体。可将经修饰的染色体添加到受体细胞中,然后可将第二载体插入到经修饰的染色体中。在一些实验中,首先将V401引入人细胞,然后用荧光标记染色体,随后分离染色体,然后通过显微注射将经修饰的染色体注射到受体细胞中。然后将V402引入细胞。在另一个实验中,选择人成纤维细胞并引入载体402。然后将人成纤维细胞与受体细胞(A9细胞或CHO细胞)融合。

[0436] 在一些实验中,可通过同源重组例如同时将一个或多个载体在所需位置插入人14号染色体。载体可包含抗药性标记(Zeocin,G418),然后筛选细胞。标记染色体,然后分离,然后通过染色体显微注射将经修饰的染色体注射到受体细胞中。

[0437] 在一些实验中,插入一个或多个另外的载体。可以根据需要将这些另外的载体插入在人14号染色体的不同位置。在一个实验中,第三个载体从5’至3’可具有下列序列:插入位点上游的DNA同源臂序列、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因序列(PuroR)、胸苷激酶基因序列(TK)、LoxP识别序列(302)、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因部分序列(5’PuroR)、来自人延伸因子1α的哺乳动物表达启动子(EF-1a)、piggyBac转座酶基因序列(PBase)、内部核糖体进入位点(IRES)、卡那霉素抗性基因序列(Neo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号(PolyA;“PA”)、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。将载体插入到C区内。

[0438] 在一个实验中,将第三个载体(V403)插入在C区与动粒之间。载体从5’至3’具有以下序列:插入位点上游的DNA同源臂序列、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因序列(PuroR)、胸苷激酶基因序列(TK)、LoxP识别序列(302)、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因部分序列(5’PuroR)、来自人延伸因子1α的哺乳动物表达启动子(EF-1a)、piggyBac转座酶基因序列(PBase)、内部核糖体进入位点(IRES)、卡那霉素抗性基因序列(Neo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列(PolyA;“PA”)、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0439] 在一个实验中,选择人成纤维细胞并引入载体402。然后将人成纤维细胞与受体细胞(A9细胞或CHO细胞)融合。将经修饰的染色体分离并引入到另一个合适的受体细胞中。然后通过G418抗性选择细胞以获得仅包含一条人染色体的细胞。然后,将载体401引入细胞,

并通过对Zeocin的抗性来选择细胞。之后，将载体403引入细胞中，并通过对嘌呤霉素的抗性来选择细胞。筛选后选择的阳性克隆用Cre酶处理。染色体技术描述于例如Kuroiwa等人"Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts."Nature Biotechnology 18.10(2000)):1086-1090;CN1200014A;CN109837307A;US20120093785A1;US2009253902;CN1717483A;Paulis,Marianna."Chromosome Transfer Via Cell Fusion."Methods in Molecular Biology738(2011):57;Genes,Chromosomes&Cancer 14:126127(1995);Tomizuka等人"Functional expression and germline atransmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice."Nature Genetics 16.2(1997):133-143;和Somatic Cell and Molecular Genetics,第13卷,第3期,1987,第279-284页,其中每一篇均通过引用整体并入本文。

[0440] 进行PCR以确认5'-末端重组位点301和3'-末端重组位点302存在于染色体上。没有随机插入的细胞通过Southern印迹证实，并通过荧光原位杂交(FISH)进行分析。

[0441] 图10显示了经修饰的人14号染色体。图11显示了染色体hChr14-mut3上loxP位点301的PCR鉴定结果。图12显示了染色体hChr14-mut3上loxP位点302的PCR鉴定结果。如图所示，12个克隆(编号为1-B2、1-B8、1-D6、1-D10、1-F11、1-G11、2-A2、3-E5、3-G5、3-H4、5-C3和6-F11)为阳性克隆。

[0442] 实验中使用了以下PCR引物：

[0443] hIGHV-5'loxP-L-GT-F1:5'-TCAAAGTCAATTTCCTCAGCGAGGCT-3'(SEQ ID NO:9)，

[0444] hIGHV-5'loxP-R-GT-R:5'-AGGGAGGGAATGGAATGAGGGTGAT-3'(SEQ ID NO:10)；

[0445] hIGHV-3'loxP-L-GT-F1:5'-CCATGTGACCCATTCGAGTGTCCTG-3'(SEQ ID NO:11)，

[0446] hIGHV-3'loxP-R-GT-R:5'-TTGTGAGGGCTCAAGTTCAGTGCAT-3'(SEQ ID NO:12)。

[0447] 使用阳性克隆和CCP14FISH探针(CytoTest Inc.,Rockville,MD,目录号CT-CCP014)进行FISH分析。克隆1-D10的表示性FISH图像如图13和图14所示。在图13中，白色箭头表示人14号染色体(在修饰之前)的全长。在图14中，白色箭头表示经修饰的人14号染色体片段。

[0448] 实施例4:将人染色体或片段引入小鼠ES细胞

[0449] 通过前述方法将实施例3中获得的经修饰的染色体引入实施例2中获得的细胞。然后通过G418筛选细胞。只选择仅含有一条人染色体的细胞。图15显示了经修饰的小鼠12号染色体。

[0450] 然后Cre重组酶介导人染色体hChr14-mut3上的V、D、J区对小鼠染色体mChr12-mut2上的V、D、J区的替换(图16)。人染色体DNA序列被重组位点1301与1302之间的序列替换。将潮霉素和嘌呤霉素用于筛选阳性细胞。在注射到小鼠囊胚中之前，通过DT进一步筛选细胞以获得不含人染色体的小鼠细胞。在一些情况下，将细胞直接注射到囊胚中，而无需进行DT筛选。

[0451] 对Cre重组后的细胞进行测试，以确认人基因序列已被整合到小鼠基因组中。PCR测定的结果如图17、图18、图19和图20所示。所有的PCR测定的结果显示，编号为1-B4、1-B10和2-A7的细胞具有正确的重组，并且1-B10细胞中的人染色体消失。将鼠染色体全涂染探针(Murine Whole Chromosome Painting Probes)(Cytocell Ltd,Cambridge,UK;目录号

AMP12R)和人特异性IGH断裂分离探针(Cytocell Ltd,Cambridge,UK;目录号LPH 014)用于通过FISH测试1-B10细胞。结果如图21所示,证实了人染色体片段存在于小鼠染色体中。这些引物如下表所示。

[0452] 表12

[0453]

编号.	引物		序列(5'-3')	产物大小 (bp)
1	M5-L	F	gccaaggaatttaaaaggggattgaaagcaa (SEQ ID NO: 13)	4227
		R	cgagagctgtggagagaaaggcaaa (SEQ ID NO: 14)	
2	M5-R	F	tatgtcctgcgggtaaatagctgcg (SEQ ID NO: 15)	3109
		R	agggagggaatggaatgagggtgat (SEQ ID NO: 16)	
3	M3	F	ccatgtgacccattcgagtgtcctg (SEQ ID NO: 17)	3738
		R	cttaccatttgcggtgcctggtttc (SEQ ID NO: 18)	
4	H5-L	F	tcaaagtcaatttcctcagcgaggct (SEQ ID NO: 19)	5329
		R	aggaattgtatcccataggctagcacgt (SEQ ID NO: 20)	
5	H5-R	F	gacgacgtgaccctgttcatcagc (SEQ ID NO: 21)	2863
		R	ccacagcccgatctacttggctttt (SEQ ID NO: 22)	
6	H3-L	F	gcaaggttttgactaagcggagcac (SEQ ID NO: 23)	4098
		R	cactagtctcgtgcagatggacagc (SEQ ID NO: 24)	
7	H3-R	F	gttagaagacttcctctgccctcgg (SEQ ID NO: 25)	8120

[0454]

		R	ttgtgagggctcaagttcagtgcat (SEQ ID NO: 26)	

[0455] 实施例5:产生包含人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠

[0456] 通过显微注射将阳性克隆细胞注射到BALB/c小鼠的囊胚中。根据例如A.Nagy等人,"Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual(第3版),"Cold Spring Harbor Laboratory Press,2003中描述的方法进行胚胎显微注射。然后将注射的受精卵转移到培养基中进行短时间培养,然后移植到受体小鼠的输卵管中以产生经遗传修饰的人源化小鼠(F0代)。然后将小鼠与背景为C57BL/6的小鼠交配。选择黑色后代与Flp工具小鼠交配(图22)。对从小鼠尾部获得的DNA进行PCR分析。将小鼠进一步与具有BALB/c背景的小鼠杂交数次(例如,至少5次),以获得具有BALB/c背景的人源化重链免疫球蛋白基因座杂合小鼠。

[0457] 为了证实小鼠表达人抗体重链,从嵌合鼠(F0代)和黑鼠(F1代)的小鼠中收集血液。提取RNA,并将其反转录以获得cDNA。使用下列PCR引物扩增序列,并对序列进行进一步测序。

[0458] 表13.PCR引物

[0459]

N 编号	引物		序列(5'-3')
1	VH1	F	CAGGTSCAGCTGGTRCAGTC (SEQ ID NO: 27)
		R	AGGGATCCAGAGTTCCAGGT (SEQ ID NO: 28)
2	VH2	F	CAGRTCACCTTGAAGGAGTC (SEQ ID NO: 29)
		R	AGGGATCCAGAGTTCCAGGT (SEQ ID NO: 28)
3	VH3	F	SAGGTGCAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO: 30)
		R	AGGGATCCAGAGTTCCAGGT (SEQ ID NO: 28)
4	VH4	F	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO: 31)
		R	AGGGATCCAGAGTTCCAGGT (SEQ ID NO: 28)
5	VH5	F	GARGTGCAGCTGGTGCAGTC (SEQ ID NO: 32)
		R	AGGGATCCAGAGTTCCAGGT (SEQ ID NO: 28)
6	VH6	F	CAGGTACAGCTGCAGCAGTC (SEQ ID NO: 33)
		R	AGGGATCCAGAGTTCCAGGT (SEQ ID NO: 28)

[0460] 实施例6:小鼠轻链免疫球蛋白基因座的修饰

[0461] 轻链免疫球蛋白基因座位于小鼠6号染色体上。图23是显示小鼠轻链免疫球蛋白基因座的示意图。在轻链免疫球蛋白基因座的可变区的两侧上引入两个重组位点,所得的经修饰的染色体如图24A-24B所示。详细的打靶策略如图25所示。

[0462] 在小鼠胚胎干细胞中进行该修饰。载体(V3901)从5'至3'具有:插入位点上游的DNA同源臂序列、Flp识别靶标(FRT)、来自人延伸因子1α的哺乳动物表达启动子(EF-1a)、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶的部分序列;"5'HygR")、Cre重组酶的LoxP识别序列(1101)、5'PB转座子序列(PB5')、蓝色荧光蛋白报告基因(BFP)、DT受体(DTR)、FMDV自裂解肽(2A)、卡那霉素抗性基因序列(Neo)、转录终止/多腺苷酸化信号序列(PolyA;"PA")、3'PB转座子序列(PB3')、嘌呤霉素抗性基因部分序列(3'PuroR)、FMDV自裂解肽(2A)、DT受体(DTR)、Cre重组酶的LoxP识别序列(1102)、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0463] 将载体(V3901)引入小鼠胚胎干细胞。通过相应的抗生素抗性基因标记或其组合来筛选细胞。通过PCR证实了载体V3901整合到小鼠基因组的正确位点。结果如图26-27所示。两个组合的PCR结果证实了编号为208、209、215、217和269的细胞是阳性克隆。

[0464] 使用以下引物进行PCR测定:

[0465] IGKV-005-C-5G-L-GT-F:5′-TCACACACTACAGCTTCCACCACAA-3′(SEQ ID NO:34);

[0466] IGKV-005-C-5G-L-GT-R2:5′-CGGGGAAAAGTCGACTCTAGAACGG-3′(SEQ ID NO:35);

[0467] IGKV-005-C-5G-R-GT-F1:5′-ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA-3′(SEQ ID NO:36);

[0468] IGKV-005-C-5G-R-GT-R:5′-GGCCTGGAAAACTCAGCTATCCTTT-3′(SEQ ID NO:37)。

[0469] 在这些引物中,IGKV-005-C-5G-L-GT-F and IGKV-005-C-5G-R-GT-R位于小鼠染色体上,IGKV-005-C-5G-L-GT-R2 and IGKV-005-C-5G-R-GT-F1位于载体V3901上。

[0470] 因此,两个重组位点被引入小鼠胚胎干细胞中的小鼠6号染色体中。

[0471] 实施例7:修饰人2号染色体

[0472] 人轻链免疫球蛋白基因座位于人2号染色体中。图28是突出显示轻链免疫球蛋白基因座的人2号染色体的示意图。

[0473] 在轻链免疫球蛋白基因座的可变区两侧引入了两个重组位点。将V_{HK}与着丝粒之间的区域删除,以获得更短的人工染色体用于后续实验。在6号染色体上的小鼠免疫球蛋白基因座的可变区中引入了相似的重组位点。然后将人染色体引入小鼠受体细胞,获得人源化

轻链免疫球蛋白基因座。

[0474] 经修饰的人染色体2如图29所示。打靶策略如图30所示。载体(V2701)从5’至3’具有:插入位点上游的DNA同源臂序列、PGK启动子、红色荧光蛋白报告基因序列(tdTomato)、FMDV自裂解肽(2A)、来自土曲霉(Aspergillus terreus)的杀稻瘟菌素S脱氨酶(Bsr)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列(PolyA;“PA”)、LoxP识别序列2601、潮霉素抗性基因(潮霉素磷酸转移酶部分序列;“3’HygR”、Flp识别靶标(FRT)、插入位点下游的DNA同源臂序列和白喉毒素A亚单位(DTA)。

[0475] 载体(V2702)从5’至3’具有:插入位点上游的DNA同源臂序列、LoxP识别序列2602、PGK启动子、嘌呤霉素抗性基因序列的一部分(5’PuroR)、EF-1a、PBase、IRES、卡那霉素抗性基因序列(Neo)、转录终止/多聚腺苷酸化信号序列(PolyA;“PA”)、插入位点下游的DNA同源臂序列和DTA。

[0476] 通过测序验证了载体(V2702)的序列。通过转染将载体引入人H9细胞。然后通过G418和乌本苷抗性筛选细胞。通过PCR证实了基因整合到人基因组中。结果如图31所示。编号为01、02、03和04的克隆被确认为阳性克隆。

[0477] 使用以下引物进行PCR测定:

[0478] 3’L-L-GT-F:5’-AAGGTGACTCTGCAATCAGCCTCTG-3’(SEQ ID NO:38),

[0479] 3’L-L-GT-R1:5’-TCATCTACAGCCACAACGTGAGCAG-3’(SEQ ID NO:39);

[0480] 3’L-R-GT-F1:5’-CCCATGTACAGGTTCCGCATGAACT-3’(SEQ ID NO:40),

[0481] 3’L-R-GT-R:5’-CTCCGTCCGCTTTTATTTCCCCTGT-3’(SEQ ID NO:41)。

[0482] 选择具有适于进一步实验的经修饰的染色体的细胞。通过染色体技术将经修饰的人染色体引入受体细胞。通过G418抗性对受体细胞A9细胞进行筛选。选择只包含一条人染色体的细胞用于进一步的基因编辑。

[0483] 在筛选过程中,图31中所示的编号为03的克隆具有正确的重组,并由人2号染色体计数探针(CCP2 FISH探针)(CytoTest Inc.,Rockville,MD,目录号CT-CCP002)标记。结果证实在细胞中存在经修饰的人2号染色体(图32)。

[0484] 然后将载体(V2701)进一步引入到细胞中。通过G418和杀稻瘟菌素S抗性筛选细胞。重组得到了PCR的证实。引物如下表所示。结果表明5-C3、1-H2、1-H9和1-G5为阳性克隆(图33)。

[0485] 表14

[0486]

编号	引物		序列(5’-3’)	产物大小 (bp)
1	hIgK3	F	GTTATAACACGGGGAGTGCGTGTGC (SEQ ID NO: 42)	4501
		R	GTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTG (SEQ ID NO: 43)	
2	hIgK4	F	GCAACGGCTACAATCAACAGCATCC (SEQ ID NO: 44)	3196
		R	TGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTC (SEQ ID NO: 45)	
3	hIgK1	F	AAGGTGACTCTGCAATCAGCCTCTG (SEQ ID NO: 46)	4623
		R	TCATCTACAGCCACAACGTGAGCAG (SEQ ID NO: 47)	
4	hIgK2	F	CCCATGTACAGGTTCCGCATGAACT (SEQ ID NO: 48)	4470
		R	CTCCGTCCGCTTTTATTTCCCCTGT (SEQ ID NO: 49)	

[0487] 实施例8:获得可产生人源化抗体的小鼠

[0488] 将小鼠胚胎干细胞和实施例7中获得的细胞融合,并将经修饰的人2号染色体引入实施例6中获得的小鼠胚胎干细胞。选择只含有一条经修饰的人2号染色体的小鼠ES细胞,

在Cre介导的重组(Cre介导的重组)后筛选细胞,如图34所示。对Cre重组后的细胞进行测试,以确认人基因序列已整合到小鼠基因组中。将小鼠染色体全涂染探针(Cytocell Ltd,Cambridge,UK;目录号AMP06G)和人特异性IGK断裂分离探针(CytocellLtd,Cambridge,UK;目录号LPH 034)用于通过荧光原位杂交来验证PCR确认的阳性克隆。结果显示在图35中,证实人染色体片段存在于小鼠染色体中。细胞被注入囊胚。可以获得含有人源化轻链免疫球蛋白基因座的小鼠。

[0489] 选择嵌合小鼠与C57BL/6小鼠交配,产生灰色和黑色后代(F1代)。对从黑色小鼠尾部获得的DNA进行PCR分析,并选择阳性F1代小鼠与Flp工具小鼠交配。图36显示了Flp介导的重组的示意图。通过该方法制备的小鼠含有C57BL/6背景。具有不同背景的小鼠可具有不同的有利方面,并且通过本文的方法制备的杂合或纯合小鼠可用于通过回交(例如,BALB/c小鼠具有体液免疫有利方面)几代来产生具有一些其它背景的小鼠,以获得具有期望背景的小鼠。

[0490] 选择几只小鼠,与BALB/c小鼠杂交数次,获得具有BALB/c背景的杂合小鼠。然后将杂合小鼠相互杂交以获得纯合子小鼠。

[0491] 将具有人源化轻链免疫球蛋白基因座的小鼠和具有人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠相互杂交,以获得同时具有人源化重链免疫球蛋白基因座和人源化轻链免疫球蛋白基因座的小鼠。

[0492] 实施例9:转基因小鼠中的B细胞发育

[0493] 进行实验以比较人源化小鼠和野生型小鼠的免疫系统。选择3只9-10周龄野生型(WT)、3只具有杂合的人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠和3只具有纯合的人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠。其中,与野生型小鼠相比,杂合小鼠和纯合小鼠具有相似的体重、外观和活力。获得这些小鼠的外周血、脾脏、淋巴结和骨髓组织,未发现明显的解剖变化(例如,三组小鼠的脾脏尺寸、形态和重量没有可观察到的差异)。进行流式细胞术以分析小鼠外周血、脾脏和淋巴结中的淋巴细胞群和分布(图45-47)以及脾脏、淋巴结和骨髓中的B细胞群(图48-50)。在结果中,白细胞包括:B细胞(例如,特征为CD45+、CD19+、TCR-)、T细胞和天然杀伤(NK)细胞(例如,特征为CD45+、TCR-和NK1.1+)。T细胞的特征为CD45+、CD19-、TCR+。CD4+T细胞(CD4)的特征为CD45+、CD19-、TCR+、CD4+、CD8-。CD8+ T细胞(CD8)的特征为CD45+、CD19-、TCR+、CD4-、CD8+。流式细胞术分析中仅包括完整的单个活的白细胞。

[0494] 淋巴结和脾脏中B细胞的发育阶段分为T1(过渡1型B细胞,特征为$B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}$)、T2(过渡型2B细胞,特征为$B220^{+}IgM^{+}IgD^{+}$)和成熟B细胞(特征为$B220^{+}IgM^{低}IgD^{+}$)。图45-47显示了不同组织样品中白细胞的百分比。图48-49显示了不同发育阶段的B细胞百分比。

[0495] 另外,还在脾脏边缘区(边缘区B细胞,MZ-B,特征为$B220^{+}CD21^{+}CD23^{-}$)和滤泡区(滤泡B细胞,称为FO-B,特征为$B220^{+}CD21^{低}CD23^{+}$)评估了B细胞的发育。图50显示脾边缘区(MZ-B)和滤泡区(FO-B)的脾B细胞百分比。

[0496] 根据不同的发育阶段,骨髓中的B细胞可分为原B细胞(特征为$B220^{低}CD43^{高}IgM^{低}$)、前B细胞(特征为$B220^{低}CD43^{中}IgM^{低}$)和未成熟B细胞(特征为$B220^{高}CD43^{低}IgM^{高}$)。图51A-51C显示了骨髓中不同发育阶段的B细胞的百分比。

[0497] 与野生型小鼠相比,人源化小鼠中的免疫细胞和B细胞的百分比相似,不同组间无统计学差异。在重链人源化杂合小鼠(杂合子)或纯合子小鼠(纯合子)中未观察到显著的B

细胞分化缺陷。

[0498] 实施例10:血清免疫球蛋白同种型分析

[0499] 另外,分析了上述实施例中未免疫的小鼠血清中各种免疫球蛋白的水平。小鼠包括WT小鼠、具有杂合的人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠和具有纯合的人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠。

[0500] 实验使用克隆分型系统-B6/C57J-HRP(Southern Biotech,目录号5300-05B)试剂盒来进行。首先,捕获抗体山羊抗小鼠Ig,人ads-UNLB用PBS(Solarbio,目录号P1020)稀释至10ug/mL。然后,将0.1mL稀释的抗体加入到酶联免疫吸附测定(ELISA)板的每个孔中,并在37℃孵育2小时。接下来,洗涤该板,并在4℃下封闭12小时用1%BSA(Cell Signaling,目录号9998)梯度稀释。血清样品。向每个孔中加入0.1mL稀释的样品,然后在37℃孵育1小时。将1%BSA加入到孔中作为空白对照。

[0501] 接下来,用含有0.05%吐温-20的PBS(Amresco,目录号M147)洗涤平板。加入缀合有辣根过氧化物酶的二抗(山羊抗小鼠IgA、IgG(1、2b、2c、3)、IgM)(用1%BSA稀释300倍,每孔0.1mL),并在37℃下与样品一起孵育1小时。接下来,洗涤板,并通过向每个孔中加入0.1mL TMB色原溶液(Beyotime Biotechnology,目录号P0209)来对平板进行显影。在室温下于黑暗中孵育8分钟后,向每个孔中加入0.1mL反应溶液(Beijing Dingguo Changsheng Biotechnology Co.LTD.,目录号EIA-0032)。使用微孔板读数器(Thermo MULTISKAN GO,Thermo Fisher Scientific)测量450nm和570nm处的光吸收,并计算标准OD值。

[0502] 结果显示,具有人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠能够产生IgA、IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3和IgM抗体同种型,并且与野生型小鼠相比,所述小鼠对于每种同种型具有相似的表达水平(图52-57)。这表明重链可变区基因区段的人源化对各种抗体同种型的抗体类别转换、表达或分泌没有显著的不利影响。

[0503] 实施例11:小鼠中人可变区基因区段的V(D)J重组

[0504] 通过下一代测序分析小鼠中重链可变区和轻链可变区的基因序列。

[0505] 选择一只未免疫(未暴露于特定抗原)的人源化重链纯合小鼠。从小鼠收集脾细胞用于提取RNA。使用5'RACE试剂盒(SMARTer RACE 5′/3′Kit,Takara Bio USA,Inc.,目录号634858)进行逆转录以获得cDNA。使用IgM恒定区特异性引物和5'RACE试剂盒的UPM引物对获得的cDNA进行PCR扩增,以获得重链可变区序列片段,然后测序。IgM恒定区特异性引物序列为5′-ccaagcttacgaggggaagacatttgggaa-3′(SEQ ID NO:50)。

[0506] 在另一个实验中,选择11只轻链人源化杂合小鼠,从眼眶采血提取RNA。通过上述方法逆转录后,将引物VKF1和IgKC-标签用于扩增VκI家族轻链基因,然后测序。使用了以下引物序列:

[0507] VKF1序列:5′-cataagatctcgmcatccrgwtgacccagt-3'(SEQ ID NO:51);

[0508] IgKC-标签引物序列:5′-ctaacactcattcctgttgaagctcttgac-3′(SEQ ID NO:52)。

[0509] 将测序结果与人免疫球蛋白序列通过NCBI Ig Blast工具进行比较,以鉴定V(D)J重组后人V_H、D_H、J_H和Vκ、Jκ基因的表达。在135个所分析的克隆中,初步结果检测到某些V_H、D_H基因区段和全部J_H基因片段的表达(表15)。这些基因区段中的一些位于人源化片段上的修饰位点附近,一些远离修饰位点。这表明,在用人免疫球蛋白重链序列替换内源染色体片段后,整合到小鼠中的人染色体片段上的人V_H、D_H和J_H基因可被重组以表达人重链。

[0510] 在源自人源化轻链杂合小鼠的441个克隆中检测到大多数Vκ I家族轻链基因(表16)。与重链检测结果相似,人源化片段上的这些基因中的一些位于非常接近修饰位点的位置,一些远离修饰位点。这表明在用人轻链免疫球蛋白可变区基因座替换内源轻链免疫球蛋白可变区基因座后,整合到小鼠基因组中的人Vκ和Jκ基因可被重组以表达具有人轻链可变区的轻链。对11只小鼠中的结果的进一步分析表明,检测到的IGKV基因的分布在所测试的小鼠中没有显著差异(图58)。

[0511] 表15.检测到的VDJ重组后表达的IGHV基因、IGHD基因和IGHJ的列表

[0512]

IGHV 基因	观察值(计数)
IGHV1-18	1
IGHV1-24	1
IGHV1-46	2
IGHV1-69	1
IGHV2-70	1
IGHV3-15	1
IGHV3-21	5
IGHV3-23	7
IGHV3-30	10
IGHV3-30-3	2
IGHV3-33	6
IGHV3-43	7
IGHV3-48	5
IGHV3-49	1
IGHV3-66	1
IGHV3-73	1
IGHV3-74	3
IGHV4-30-4	5
IGHV4-34	37
IGHV4-39	14
IGHV4-4	1
IGHV4-59	11
IGHV5-51	1
IGHV6-1	11

IGHD 基因	观察值(计数)
IGHD1-1	4
IGHD1-20	2
IGHD1-26	8
IGHD1-7	10
IGHD2-2	2
IGHD2-21	2
IGHD3-10	5
IGHD3-16	3
IGHD3-22	3
IGHD3-3	2
IGHD3-9	1
IGHD4-11	4
IGHD4-17	7
IGHD4-23	1
IGHD5-12	4
IGHD5-18	1
IGHD5-24	1
IGHD6-13	17
IGHD6-19	22
IGHD6-25	1
IGHD6-6	5
IGHD7-27	14

IGHJ 基因	观察值(计数)
IGHJ1	2
IGHJ2	16
IGHJ3	7
IGHJ4	55
IGHJ5	12
IGHJ6	43

[0513] 表16.检测到的VJ重组后表达的IGKV基因的列表

[0514]

基因名称	观察值(计数)
IGKV1D-43	9
IGKV1D-13	4
IGKV1D-16	9
IGKV1D-12	11
IGKV1-39	17
IGKV1-37	2
IGKV1-33	107
IGKV1-27	14
IGKV1-17	55
IGKV1-16	26
IGKV1-13	1
IGKV1-12	50
IGKV1-9	42
IGKV1-8	24
IGKV1-6	31

[0515]

IGKV1-5	31
IGKV4-1	8

[0516] 实施例12:人源化小鼠中的免疫和抗体产生

[0517] 随机选择5只野生型(WT)小鼠和5只人源化重链纯合小鼠(9-10周龄),并用外源抗原免疫。小鼠每两周重复免疫一次,共进行三次免疫。第二次免疫和第三次免疫后眼眶采血。收集血清,然后通过ELISA或FACS测定血清滴度,以确定和分析抗原特异性抗体反应。研究中使用了三种抗原,即hBTLA、dPD1和OVA(图59-63)。结果表明,第二次免疫后,大多数野生型(WT)和人源化重链纯合小鼠产生了抗原特异性抗体。第三次免疫后,抗体滴度增加至$1x10^4$至$1x10^5$。与野生型小鼠相比,人源化小鼠中的免疫效能测试结果基本相同,这表明小鼠中的人源化免疫球蛋白可变区基因座是有功能的,并且可产生抗原特异性抗体。

[0518] 实施例13:hVH/hVL小鼠中的B细胞发育

[0519] 将具有纯合人源化重链免疫球蛋白基因座的小鼠(人源化VH小鼠或hVH小鼠)和具有人源化轻链免疫球蛋白基因座的小鼠(人源化VL小鼠或hVL小鼠)相互杂交,以获得具有纯合人源化重链免疫球蛋白基因座和纯合人源化轻链免疫球蛋白基因座的小鼠(人源化VH/VL小鼠,或hVH/hVL小鼠)。hVH/hVL小鼠可用于体内产生人源化单克隆抗体。

[0520] 进行实验以比较未免疫的人源化VH/VL小鼠与未免疫的野生型小鼠的免疫系统。在野生型和hVH/hVL小鼠中测量体重和脾脏重量(图65A-65B)。在野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间未检测到平均体重和脾脏重量的显著差异。

[0521] 进行流式细胞术以分析小鼠脾脏中的淋巴细胞群和分布(图66)以及脾脏和骨髓中的B细胞群(图67A-67B、图68A-68C)。结果表明,在hVH/hVL小鼠中,脾脏中的B细胞、T细胞、NK细胞、CD4+ T细胞和CD8+ T细胞的百分比与野生型小鼠几乎完全相同。在结果中,白细胞包括:B细胞(例如,特征为CD45+、CD19+、TCR-)、T细胞和天然杀伤(NK)细胞(例如,特征为CD45+、TCR-和NK1.1+)。T细胞的特征为CD45+、CD19-、TCR+。CD4+ T细胞(CD4)的特征为CD45+、CD19-、TCR+、CD4+、CD8-。CD8+ T细胞(CD8)的特征为CD45+、CD19-、TCR+、CD4-、CD8+。流式细胞术分析中仅包括完整的单个活的白细胞。

[0522] 图67A显示了处于不同发育阶段的B细胞的百分比。脾脏中B细胞的发育阶段分为T1(过渡1型B细胞,特征为$B220^+IgM^+IgD^-$)、T2(过渡2型B细胞,特征为$B220^+IgM^+IgD^+$)和成熟

B细胞(特征为B220^{+}IgM^{低}IgD^{+})。另外,还在脾脏边缘区(边缘区B细胞,MZ-B,特征为B220^{+}CD21^{+}CD23^{-})和滤泡区(滤泡B细胞,称为FO-B,特征为B220^{+}CD21^{低}CD23^{+})评估了B细胞的发育。图67B显示脾边缘区(MZ-B)和滤泡区(FO-B)处的脾B细胞的百分比。野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间未观察到显著差异。

[0523] 图68A显示了骨髓中处于不同发育阶段的B细胞的百分比。通过流式细胞术分析了骨髓中的B细胞祖细胞。根据B220和CD43的表达水平,骨髓中的B细胞祖细胞可分为3个细胞群:原B细胞(特征为B220^{低}CD43^{高}IgM^{低})、前B细胞(特征为B220^{低}CD43^{中}IgM^{低})和未成熟B细胞(特征为B220^{高}CD43^{低}IgM^{高})。在野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间未观察到显著差异。

[0524] 另外,还通过流式细胞术评估骨髓或脾脏中的B细胞发育,以对浆细胞(B220^{低}IgM^{-}IgD^{-}CD138^{-})和记忆B细胞(B220^{+}IgM^{+}IgD^{-}CD38^{+})进行选择性染色(图68B-68C)。在野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间没有观察到显著差异。

[0525] 通过ELISA定量测量了hVH/hVL小鼠和野生型小鼠的血清中的不同免疫球蛋白(Ig)亚型。每组共选择六只小鼠。未观察到IgA、IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3和IgM水平的显著差异(图69)。

[0526] 这些实验表明hVH/hVL小鼠的免疫系统是有功能的,并且hVH/hVL小鼠中的人源化免疫球蛋白基因座可与小鼠免疫球蛋白恒定区适当地相互作用。

[0527] 实施例14:hVH/hVL小鼠中的种系利用率(germline usage)的分析

[0528] 分析了未免疫的hVH/hVL小鼠(无抗原刺激)中的重链IGHV、IGHD和IGHJ利用率。结果如图70A-70D所示。另外,还分析了κ链IGKV和IGKJ利用率。结果如图71A-71C所示。

[0529] 通过下一代测序(NGS)来确定未免疫的hVH/hVL小鼠中的种系利用率。例如,如图71C所示,IGKJ1、IGKJ2和IGKJ4在未免疫的hVH/hVL小鼠中频繁使用,而IGKJ3和IGKJ5较少被观察到。这种IGKJ种系使用模式与文献报道的人IGKJ种系使用情况一致。

[0530] 重链CDR3长度分布由来自未免疫的hVH/hVL小鼠(n=2)的脾细胞的免疫谱系的NGS测序确定。如图72所示,CDR3的中位长度为14个氨基酸。该结果与人免疫系统中人重链CDR3的中位长度一致。

[0531] 分析了重链CDR3(HCDR3)的每个位置处的氨基酸类型(图73)。观察到多种模式,包括酪氨酸使用频率的增加和DH2(IGHD2)种系家族使用的增加。这些模式与人HCDR3中的氨基酸组成相似。

[0532] 半胱氨酸残基可形成二硫键。人HCDR3可含有一个半胱氨酸残基或两个半胱氨酸残基,而小鼠HCDR3通常不含半胱氨酸。图74中的结果显示了含有半胱氨酸残基的hVH/hVL小鼠的HCDR3频率,并且该频率随着HCDR3长度的增加而增加。这一结果与人外周血单核细胞(PBMC)中HCDR3的多样性一致。

[0533] 实施例15:淋巴器官组织学分析

[0534] 用苏木精-伊红对来自未免疫的野生型小鼠或未免疫的hVH/hVL小鼠的脾脏、腹股沟淋巴结和派伊尔斑进行染色。代表性切片如图75A-75F所示。野生型(C57BL/6)小鼠和hVH/hVL小鼠表现出具有明显边界的滤泡的正常结构,并且未观察到组织形态学的显著差异。

[0535] 实施例16:hVH/hVL小鼠中的抗体产生

[0536] 在用BCMA、IL4R、PD-1、Siglec15和SIRPα抗原进行第二次和第三次免疫后,收集血

液并通过ELISA分析野生型(C57BL/6)小鼠和hVH/hVL小鼠的抗原特异性抗体滴度(图76A-76E)。结果表明,hVH/hVL小鼠可以产生与抗原特异性结合的抗体,并且野生型小鼠与hVH/hVL小鼠的免疫反应相似。

[0537] 实施例17:hVH/hVL小鼠中的B细胞发育

[0538] 进行实验以比较免疫后人源化VH/VL小鼠和野生型小鼠的免疫系统。在野生型小鼠和hVH/hVL小鼠中测量体重和脾脏重量(图77A-77B)。在野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间未检测到平均体重和脾脏重量的显著差异。

[0539] 进行流式细胞术以分析小鼠脾中的淋巴细胞群和分布(图78)以及脾脏和骨髓中的B细胞群(图79A-79B、图80A-80C)。

[0540] 图79A显示了脾脏中处于不同发育阶段的B细胞的百分比。另外,还在脾脏边缘区和滤泡区评估了B细胞的发育。图79B显示脾边缘区(MZ-B)和滤泡区(FO-B)处的脾B细胞的百分比。在野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间未观察到显著差异。

[0541] 图80A显示了骨髓中处于不同发育阶段的B细胞的百分比。通过流式细胞术分析骨髓中的B细胞祖细胞。在野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间未观察到显著差异。

[0542] 此外,还通过流式细胞术评估了骨髓或脾脏中的B细胞发育,以对浆细胞($B220^{低}IgM^-IgD^-CD138^-$)和记忆B细胞($B220^+IgM^+IgD^-CD38^+$)进行选择性染色(图80B-80C)。在野生型小鼠与hVH/hVL小鼠之间未观察到显著差异。

[0543] 通过ELISA定量测定了hVH/hVL小鼠和野生型小鼠的血清中的不同免疫球蛋白(Ig)亚型。每组共选择六只小鼠。未观察到IgA、IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3和IgM水平的显著差异(图81)。另外,通过ELISA定量测量了hVH/hVL小鼠和野生型小鼠的血清中的IgG总量。未观察到显著差异(图82)。

[0544] 其它实施方案

[0545] 应当理解,虽然已经结合本发明的详细描述描述了本发明,但前述描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其它方面、有利方面和修改在以下权利要求的范围内。

序列表

[0546]

<110> 北京百奥赛图基因生物技术有限公司

<120> 具有人源化免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的非人动物

<130> 1

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 1
gccaaggaat ttaaaagggg attgaaagca a 31

<210> 2
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 2
gccctccatg tacagcttca tgtgc 25

<210> 3
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 3
actgggcttg tcgagacaga gaaag 25

<210> 4
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 4
ccacagcccg atctacttgg ctttt 25

[0547] <210> 5
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 5
gcaaggtttt gactaagcgg agcac 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 6
tgacgcatgt gttttatcgg tctgt 25

<210> 7
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 7
gtgcctgaca cgtgctacga gattt 25

<210> 8

<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 8
ttcaacaata agcagggcca gaggg 25

<210> 9
<211> 26
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 9
tcaaagtcaa tttcctcagc gaggct 26

<210> 10
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 10
agggagggaa tggaatgagg gtgat 25

[0548]
<210> 11
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 11
ccatgtgacc cattcgagtg tcctg 25

<210> 12
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 12
ttgtgagggc tcaagttcag tgcat 25

<210> 13
<211> 31
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 13
gccaaggaat ttaaaagggg attgaaagca a 31

<210> 14
<211> 25

<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 14
cgagagctgt ggagagaaag gcaaa 25

<210> 15
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 15
tatgtcctgc gggtaaatag ctgcg 25

<210> 16
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 16
agggagggaa tggaatgagg gtgat 25

<210> 17
<211> 25
[0549] <212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 17
ccatgtgacc cattcgagtg tcctg 25

<210> 18
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 18
cttaccattt gcggtgcctg gtttc 25

<210> 19
<211> 26
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 19
tcaaagtcaa tttcctcagc gaggct 26

<210> 20
<211> 28
<212> DNA/RNA

<213> 人工序列

<400> 20
aggaattgta tcccataggc tagcacgt 28

<210> 21
<211> 24
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 21
gacgacgtga ccctgttcat cagc 24

<210> 22
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 22
ccacagcccg atctacttgg ctttt 25

<210> 23
<211> 25
<212> DNA/RNA
[0550] <213> 人工序列

<400> 23
gcaaggtttt gactaagcgg agcac 25

<210> 24
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 24
cactagtctc gtgcagatgg acagc 25

<210> 25
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 25
gttagaagac ttcctctgcc ctcgg 25

<210> 26
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 26
ttgtgagggc tcaagttcag tgcat 25

<210> 27
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 27
caggtscagc tggtrcagtc 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 28
agggatccag agttccaggt 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

[0551]

<400> 29
cagrtcacct tgaaggagtc 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 30
saggtgcagc tggtggagtc 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 31
caggtgcagc tgcaggagtc 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 32
gargtgcagc tggtgcagtc 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 33
caggtacagc tgcagcagtc 20

<210> 34
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 34
tcacacacta cagcttccac cacaa 25

<210> 35
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

[0552] <400> 35
cggggaaaag tcgactctag aacgg 25

<210> 36
<211> 26
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 36
actgcattct agttgtggtt tgtcca 26

<210> 37
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 37
ggcctggaaa actcagctat cctttt 25

<210> 38
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 38

aaggtgactc tgcaatcagc ctctg 25

<210> 39
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 39
tcatctacag ccacaacgtg agcag 25

<210> 40
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 40
cccatgtaca ggttccgcat gaact 25

<210> 41
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 41
[0553] ctccgtccgc ttttatttcc cctgt 25

<210> 42
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 42
gttataacac ggggagtgcg tgtgc 25

<210> 43
<211> 30
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 43
gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg 30

<210> 44
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 44
gcaacggcta caatcaacag catcc 25

<210> 45
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 45
tgggtctggg acagacttca ctctc 25

<210> 46
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 46
aaggtgactc tgcaatcagc ctctg 25

<210> 47
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 47
tcatctacag ccacaacgtg agcag 25

[0554]

<210> 48
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 48
cccatgtaca ggttccgcat gaact 25

<210> 49
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 49
ctccgtccgc ttttatttcc cctgt 25

<210> 50
<211> 31
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 50
ccaagcttac gagggggaag acatttggga a 31

<210> 51
<211> 30
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 51
cataagatct cgmcatccrg wtgacccagt 30

<210> 52
<211> 30
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 52
ctaacactca ttcctgttga agctcttgac 30

<210> 53
<211> 7795
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 53
gggatgacag attctctgtt cagtgcactc agggtctgcc tccacgagaa tcaccatgtc 60

[0555] ctttctcaag actgtgttct gtgcagtgcc ctgtcagtgg aaatctggag agcatgcttc 120

catgagcttg tgagtagtat atctagtaag ccatggcttt gtgttaatgg tgatgttcta 180

catatcagtt ctctggctta ataatgaggt gatgattcta tgttcctgta acgcttcctc 240

aactgggtcc taagtctttc ttcactccat ctattcctct aaggaatgat cctgaaaatc 300

ccatcacaaa ctataggaga tgggaaccat caaaaaacac agtgacaaag aggtgggaac 360

gcatcagggt tcaggaacca tattttaaaa agatatcgta aataacttct taaaagagat 420

atagacaaat ctccattaat acggagacca gaggcctaag gctaagaacc aatggtggct 480

caaggtctcc tgctacccga ggagcaaacg tagagcagtt tctaatgatt tatttaaaat 540

atagaatcaa aagtaccagt ttgcaatttt gaaagattta tttcagcaat gcaacaacat 600

caggtggtgc cgagtccaac acgtcttatg tcccatgata taaacaaagg ccatccagaa 660

ctgtggactg gagttctacc ttgtccccta atgacattca gatttttttt ccattctctt 720

tatcttagag gagacagggg gctaactcat tttacttgtc ctttgcttgt tcttgccaag 780

aacgtaaagc agcttgcaag tcttcaaacc taaatatctt agtaactcct acacgagtgg 840

caatgccaaa gagcagtgca acaaagagga agtaaatacg accaaagagt attcttaaat 900

[0556]

acactactgg ctctaggttc tgttttatta tgcgcctttg aaccggaggg gacccactgt 960

ctatgctccc actgtgtccc tcttctttgc actttggagg gctccaacca aaatggcaat 1020

ggcaattccg acgattgtta cacactcctc tgaaattgca tttttctggg gtgcagtcat 1080

aacccaaacg agataaactt ccattgcaag ctcctcgatc acagaactta ccccttgaac 1140

acggggtacc atgtctcacc aatccagcat ctgctgtttc tgtcccacga tgttcatcaa 1200

gcccaaagca ggtaacccca gagataaccg attgatggaa tgaaacatgt tcttgcaaaa 1260

atggaagatt ggtgacattg gtacactgca accttccaca cagcttgtcc tgatcagcac 1320

aagcattgaa tgtgaggctt tcttctgctc tagtacaatg cccaaatcga aaccgttgtt 1380

tgttgatgtc atagcactta atattagcat tcttagcact tacaccaaag atttccatgc 1440

attgtatgtt gcgatcagtg cagttacctt tatagcagta accctcttct gagcatggtg 1500

tcccatcttg cagataagtg tcatctgggc aaatgaactt agagccacta cagtactctg 1560

gaagatcaca tatgttctgg ataggtctgc agagtgtccc agaaggactg taagtgcaat 1620

ttgcacagca taattcttta tcacaaatgc taccaggtgt taacctgcaa tcatttccac 1680

agcagggatc tgaataacat gccttttggg agccacagtc acactgctca ttgttatcta 1740

ctttgaagtt tccacaaaac ttataagtca atgatgtatt ataataaaca tgacggtcat 1800

agaaaagaca tggcatcaga tcaggagtat taagtatgtt gcttatctct gcaagggaac 1860

aattgctgaa agcatctgtt aattgaggat ttttgaacat gatgcaggtg ttccttctct 1920

ggcagataca gtacccctca tcatgtttta ggcctaaact ccttccaaca cgattggtta 1980

ttataataga taaaaataaa ggatttcgac catgttgacc aagacaaatt agggctgagg 2040

gagaacatat actcctctca gctggattaa cagcatcatc tcctggcgaa ttcttgttaa 2100

ttatagctcc tgcatcaggc ctaaaatgag cataaaatac tctctcatag aaagtatgag 2160

cctgccctcc tggaactcga aaatcttgtg aaaatggatc agcctcggta tacacagtca 2220

tgagaaagac atagtaccgc atatgaagat tggtcagata ggtgtccatt aaactaatga 2280

ctttaaacaa atactcaaca gtagatgaaa gtttgtcacc tccagaagca ctatatacag 2340

aatgggttgc ttgaaagtgg ccttttatag cagctggatg tgtagcgtaa ttcttactag 2400

atagtctggg agctccatct gcatattcca atctggagga gggagaacct gtattatggc 2460

tccagtgctt ccatgcattc ataggccctg tgtcatcaga ctcagatact atctgagaaa 2520

caaggtgttc aaagctctgt gaatcattga ggggtttgat ttcataggta aggttatcca 2580

actttatgac ccctgacagg cccccataac aagtatccac agtgaccatg gattgcagga 2640

tcccctccag gtagccaata tagtaacaat ctacaggaaa aaaggggtac tccatctgta 2700

aggctccttg gtcatcttga gttgtcagca acaagtgtct gggccaaatg agtgtctttc 2760

tccgcaggtg gatgatatgt ctctggcccc gaaaacgcaa gctatacgag agcagtcttt 2820

gtgcttgaag tcctttggta tggtagatct ccttccgagg aataaccacc tccgatgaga 2880

tgtaacgcca agtgggatgg ccttgagaac accagactgg aaccaggagg agcagccaga 2940

gtgcaaatag caagaggagg accctgggga ccacaggtct ttccactagc ctcatgcccc 3000

aggtcagaga taacatcctg ggtggagcta actccctctg ctgtggccac tgcctggtct 3060

agaaaatact gacagaggac taaaaacctc ctcaggctcc caacctaagt ggttacccag 3120

acaactggag ttaggtaaca gtcactgggt gtggcaggaa ttgagtctga atgtgttagc 3180

tgaggttgag gttaaatatt gtcaaaaggg atgtctataa atgtgcctgg acaagaaaag 3240

tcagaagcag caaggagtgt ctctgacagg ctcaatcctt tcttttcttt ttttgaagtt 3300

caaaatatca tttccacgtg aatgtatttg gttcccagtg tgactctggg tctctttcta 3360

[0557] ggagtcaata tttctttata tcttggctca tgtttttcac agttgttcta acttcttgtt 3420

ttgttttgtt tgtttgtttg tttgaaagtt agaagtaaat actgtctata ttagcctttt 3480

agctataaat gattgttttt atttcttcta atcatgtttt gtttgagttt tggttaaact 3540

atttacaaat gagtttttt tttccttttg ggtgttgctc gaaagtttgg agctttctgt 3600

taatattgtg ttgttgtttc tccaatatta ttagacctga gaattctacc tgggtacctg 3660

tgaactccag aatttttaaa aattccatct cttgggaaca ttatctctga ccccgtctga 3720

ggccgaagtg gctgtccccc tccaaccttt agtatctttc tttcctgact attgggattt 3780

cttcaagcaa tcaggctgat gggttctcag cagtgagacc agtagactgt cggtatgaac 3840

gtcgaagagt ctgccacaca ctccgggttc atcaacagtg ctttcgcgtc tcttactttt 3900

gtagaaggaa atgcagcctc tgagttttct ccaagaaatc attgatgaaa gggtgaaaag 3960

atgggtatca cccggagttc atgacaagcc ctggctcaga cacgtgagca aggtctacag 4020

ccccaaagat aggctgccct gcaacatgta tttataagat aggagaaaaa aatgggtagt 4080

tggagggttg atcaacttac ttcctctcaa acatatatat ctcatctaag tgtgcagggg 4140

aaaactctgt agaactactg ggatacctgc tcacccccag gagcctcatg aataagtctc 4200

tgcttctgcc ttgtagccat gagcattact gcacctgata cccctgcagc ttcctaggga 4260

agagggagga agtgacttgg cccctgtctg gttaaggtaa gaggagataa atcccttctc 4320

attgattagg gtgagagggg tcatgtgctc tatcattggt gacccagttg ggacatgggt 4380

ttataccaaa gtcatcactc tgaggttctg tgtaccacca ggctgaactc ccatatccta 4440

catggacata ggacaacacc aagcagaagg aggttttagg actaaactga aggacagaga 4500

tgcggtttct aaacaactag ggagtgccag ggccagcctc tctaaccact ataggacact 4560

gtggagtctg gttacaaaga gagattactc aaggtcctta gcactgatta cagagcatat 4620

ctcagatgcc ttctgctgac cagatgtatc tttgcataat ctgcctatcc agattcagaa 4680

aattgatgcc acatagccaa gtggactttc aggaacagac gatttaaaaa caggcagaga 4740

gatgtgagag aaaggagaag gagagagaga agggagaggg agagaagaga gagggagacg 4800

gagaaggaaa gagggagaag gagaaggaga gaaggggcat ggacagaggg agggacagaa 4860

ggagagagga gatagagagg gggataagga agaagggagg gagggagaga gagagaaggc 4920

taagtctttc catacctggg tcccaatacc tcttataacc caagcacatg gtttcacata 4980

tcacaatgcg gttgggatat agataactgt aaatacttgt gaaaataatg gggctgagat 5040

ctggggtttt catgatagtt tcaaagtcac cgtactgact aaaaccttcc actggcccat 5100

[0558]

ctccagcttc ctaatctgag ggtatcaaat ttcccactaa gtgtgtttag aaagatctcc 5160

acctttttgc ccttgtcttc cagtgcccca cctacgttct ggtctcccac atctgatgtc 5220

ttctcagtga ttctggccct gcctgctcca cagctacaaa ccccttccta taatgagctc 5280

tgtgctgagc catcatcctg aatcaatcca ccttaagcag atgttttgct tatttttcct 5340

gtgtccatac tacagaggaa aggtaggcat gtagaagctg aagcatctca cctcattcca 5400

agcaccctca gtctctaaat gtgccccctt gtttccagaa gtgcaacctc aagcatcttt 5460

tattcattca tcttagaggg ccacatgtgc tgtagtgtta taagatgaaa tttaaagcat 5520

taattattcc taacaagcca attaaacaag ccaaaaacat tcatcagtca ttcccatgga 5580

acctctgaag catcttcctg ctctaacctt gggttttcca gggctgctct gggatcacag 5640

gagctgtcct gtctaccagc catataaagg cagacctatc agaattacac cagacttctc 5700

accatagact ataaaagcca gaatatcctg gacagatgtt atacagaaac taagagaaca 5760

caaatgccag cccaggctac tatacccagc aaaactctca attaccatcg atgaagaaac 5820

caagatattc cattacaagt ccaaatttac acaatatctt tccataaatc cagccctaca 5880

aaggatagca gatggaaaac tccaacacag gtaggaaaac tacaccctag aaagagcact 5940

aaagtaatca tctttcaaca cactcaaaag aagataacca cacaaacata attccacctc 6000

taacaacaaa aataaagtag gcaacaatca ctattcctta atatctcttt taacatcaat 6060

ggactcaatt ctccaataaa aagacataga ctaacagact gaatacataa acaggacaca 6120

gcattttgct gcataaagca aacacagcgt tacttttttt tttctaaatg acatttttta 6180

ttagatattg tctttattga catttcaaat gttatcccct ttcctggttt accctctgaa 6240

atcccctatc tcctcccct ccccctgctc accaatccac ccactcccac ttccaggccc 6300

tggcaatccc ctatatttgg gcatagagcc ttcacaggac caaggtactc tccttgcatt 6360

gatgaccaac tagtccattc tctgctacaa atgcagctag atctatgagt cccaccatgt 6420

tttcttttgt tggtggtttc atgccaggga gctcttggag tactgattgg ttcatattgt 6480

tgttctccct atggggttac aaaacccttc aacttcttgg gtcctttctc tggctgcctc 6540

attggggacc ttgtgcgaag tccaatggat gactgtgagc atccacttct gtatttgcca 6600

ggcactggca gagcctctca gaagacagct atatcaagat cctggcagca agctcttgtt 6660

ggtatccaca aaagtgtctg gtggttgtct atgggatgga tccccaaagg ggcagtctct 6720

ggatggtcat tccttcagtc tctgttccac actttgtctc tttaactcct tccatgacta 6780

[0559]

ttttattcct ccctctaaga aggaccgaag tattcatact ttggtcttcc ttcttgaaat 6840

tcatgtgttt tgtgaattgt atctttgata ttccgaactt ctgggctaat atccacttat 6900

cagtgagtga atatcatgtg tgttcttatg tgattgagtt acctcactca ggatgatatc 6960

ctccagaacc atccatttgt ctaagaattt aatgaattca ttgtttttaa tagctgagga 7020

gtactccatt gtgtaaatgt accacatttt ctgtacccat tgttctcttg agggacatct 7080

gggttcttta aagcttctgg acattaaata taaggctgct atggaaatag tggagaatgt 7140

gtccttatta catgttggag catcttctgg gtatatgccc aggagtgcta ttgctggatc 7200

ctctgatagt actatgtcca attttctgag gaactgccaa actgatttac agagtggttg 7260

taccagcttg caattccacc agcaatggag aaatgttccc cttcctccac atcctcacca 7320

acatctgctg tcacctcaat ttgttcttag tgattcagac aggtgtgagg tggaatatca 7380

gggttgtttg gcatttccct gatgactagt gatattgaaa aaaatttaa gtgtttctca 7440

gccattcagt attcttcagt tgagaattca ctgtttagct ctgtactcag gttttttaa 7500

tagggttatt tggttttctg gagtctaacg tcttgaattc tttctatata ttggatatta 7560

gccctctgtc atatttagga ttggtaaaga tctttcccaa tatgttggct gccttttgt 7620

gtcctttgcc ttacagaacc tttttaattt tatgaggtcc catttgctaa ttcttcattt 7680

tacagcacaa gccattggtg ttctgttcaa aaatctttcc ccctgaaccc tatcttcgag 7740

gatcttcccc actttctcct ctataagttt cagtgtctct attattgtgc tgagg 7795

<210> 54
<211> 5938
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列

<400> 54
tgatgtggga acgcttcagt gttcaggaac catatgattt atttaaaata tagaatcaaa 60

agtaccaatt tgcagttttg aaagatttat tccagtgtaa gcattagcaa tgcaccaaca 120

tcaggtgatt tctgaatcca acacgtctta tgtcctcatg atattaaaaa aaaaaaaagg 180

ccatccagaa ctgtgaactt gagttctacc ttgttcccta ctgacattca gattttcttt 240

tttgcattct ctttatctta caggagacag gaggggaggg ctaactcatt ttactttggc 300

ttgtcccttg ctggtccttg cccagaacgt aaagtagctt gcaagtcttc aaatctaaaa 360

atcttagtaa ctcctacacg agtggcaatg ccaaagagca gtgcaacaaa gaggaagtaa 420

[0560] atacgaccaa agagtattct taaatacacc actggctctt gtttttgttt tattgtgtgc 480

ctttgaactg gaggggaccc actgtctatg ctcccactta gtccctcttc tttgcactct 540

ggaggcttcc aaccaaaatg acaatggcaa ttccgatgat tgttacacac tcctctaaaa 600

ctgcattttt ctggggtgca gtcataaccc aaatgagata aacttccact gcaagctcct 660

tgatcacaga acttactttt ggagcagggg gtaccatgtc tcaccattcc agcatctgtt 720

gtttctgtcc cacgatgttc atcaagccca aagcaggtaa acccagagat aatcgattga 780

tggaatgaaa catgttcttg caaatatgga agattggtga cattggtaca ctgcaacctt 840

ccacacagct tgtcctgatc agcacaagca ttgaatgtga ggctttcttc tgctctagta 900

caatgcccaa atcgaaaccg ttgtttgttg atgtcatagc acttaatatt agcattctta 960

gcacttacac caaagatttc catgcattgt atgttgcgat cagtgcagtt acctttatag 1020

cagtaaccat cttctgagca tggtgtccca tcttgcagat aagtgtcatc tgggcaaatg 1080

tatttagtcc cattacagta ctctggaaga tcacatatgt tctggatagg tctgcagagt 1140

gtcccagaag gactgtaagt gcaatttgca cagcataatt ctttatcaca aatgctacca 1200

ggtgttaacc tgcaatcatt tccacagcag ggatctgaat aacatgcctt ttgggagcca 1260

cagtcacact gctcatcgtt atctactttg aagtttccac aaaacttata agtcaatgat 1320

gtattataat aaacatgacg gtcatagaaa agacatggca tcagaccagg agtattaagt 1380

atgttgctta tctctgcaag ggaacaattg ctgaaagcat ctgttaattg aggatgtctg 1440

aacataatgc aggtgttcct tctctggcag acacagtacc cctcatcata ttttaagcct 1500

aaactccttc caacacgatt ggttattata ggagataaaa ataaaggatt tcgatcatat 1560

ttaccaatac aaattagggc taaggaagaa catatactcc tctcagctgg attaacctgg 1620

ttatcttgtg gcccatactt attaagtaaa actcctgcat caggcttaaa tttattataa 1680

aagactgaca catagtaatt ataagccgac cctcctggaa ctgcaaactc aagtcgaaat 1740

ggatcagaat tggtgtacac agtcatgaga aagacatagt accgcatatg aagattggtc 1800

agataggtgt ccattaaact aatgacttga aacaaatacc caacagtaga tgaaagtttg 1860

tcacctgcag cagaattata tacagaattg gttgcttgaa agtggccttt tatagcagct 1920

ggatgtgtag cgtagttctt actagatatt ctgggagctc catctgcata ttccaatctg 1980

gaggagggag aacctgtatt atggctccag tgcttccatg cattcatagg ccctgtgtca 2040

tcagactcag atactatctg agaaacaagg tgttcaaagc tctgtgaatc attgaggggt 2100

ttgatttcat aggtaaggtc atctaacttc atgacccctg acaggccccc ataacaagta 2160

[0561]

tccacagtga ccatggattg tgggatcccc tccaggtagc caatatagta acaatctaca 2220

ggaaaaaagg ggtaatccat ctgtaaggct ccttggtcat cttgagttgt cagcaacaag 2280

tgtctgggcc aaatgagtgt ctttctccgc aggtggatga tatgtctctg gccccgaaaa 2340

tgcaagctat atgagagcag tctttgtgct tgaagtcctt tggtatggta gatctccttc 2400

cgaggaataa ccacctccga tgagatgtaa cgccaagtag gatggccttg agaacaccag 2460

actggaacca ggaggagcag ccagagtgca aatagcaaga ggaggaccct ggggaccaca 2520

ggtctttcca ctagcctcat gccccaggtc agagataaca tcctgggtgg agctaaatcc 2580

ctctgctgtg gccactgcct ggtctagaaa atactgacag aggactaaaa acctcctcag 2640

gctcccaacc taagtggtta cccagacaac tggagttagg taacagtcac tgggtgtggc 2700

aggaattgag tctgaatgtg ttagctgagg ttgaggttaa atattgtcaa aagggatgtc 2760

tataaatgtg cctggacaag aaaagtcaga agcagcaagg agtgtctctg acaggctcaa 2820

tcctttcttt tctttttttg aagttcaaaa tatcatttcc acgtgaatgt atttggttcc 2880

cagtgtgact ctgggtctct ttctaggagt caatatttct ttatatcttg gctcatgttt 2940

ctcacagttg ttctaatttc ttgttttgtt ttgtttgttt gtttgaacgt tagtagtaaa 3000

tactgtctat attagccttt tagctataaa tgattgtttt tatttcttct aatcatattt 3060

tgtttgagtt ttggttaaac tatttacaaa tgagtttttt ttttttcctt ttgggtgttg 3120

ctcgaaagtt tggagctttc tgttaatatt gtgttgttat ttttccaata ttattagacc 3180

tgagaattct atctgggtac ctgtgaactc tagaattttt aaaaattcca tctcttggga 3240

acattacctc tgaccccgtc tgaggccgaa gtggctgtcc ccctccaacc tttagtatct 3300

ttctttcctg actattggga tttcttcaag caatcaggct gatgggttct cagcagtgag 3360

accagtagac tgccggtatg aacgtcgaag agactgccac acactccagg ttcatcaaca 3420

gtgctttcgc gtctcttact tttgtagaag gaaaagcagc ctctgagtta tctccaagaa 3480

atcattaatg aaagagttaa aagatgggta tcacccggag ttcatgacaa gccctggctc 3540

agacacgtga gcaaggtcta cagccccaaa gataggctgc cctgcaacat gtatttataa 3600

gatagaagaa aaaaatgggt ggttggaggg ttgatcaact tacttcctct caaacatata 3660

tatctcatct aagtgtgcag gggaaaactc tgtaggacta ctgggattgt tattatcatt 3720

attattatta ttattattat tattattatt attattatta ttaacttaag gcattttatt 3780

agatattttc ttcatttagt tttcaaatgt tatccccgga acctcctata ctctctccct 3840

[0562]

gccctgctcc ccaacccacc cactcctaca tcctggccct ggcattcccc tatactgtgg 3900

cagatgatct tcgtaagacc aagagccttt cctcccattg atggcctact aggctatcct 3960

cttttacata tgcaactaga gtcacagctc tggggaggta ttgcttagtt catattgttt 4020

ttcctcctat agggttgcag atccctttag ctccttgggt actttctcta gctcctccat 4080

tgggggccct gtgttccatc caatagatga ctgtgagcat ccacttctgt atttgccagg 4140

tattggcatg gatcttactg caccttctga actctctaag cagctttcct ggtcacctcc 4200

aggagcctca tgaataagtc tctgcttccc ccttgtggct atgagcatta ctgcacctga 4260

tacaccctgc agcttcctag ggaagaggga ggaagtggct tggcccctgt ctggttaagg 4320

taagaggaga taaatccctt ctcatgaatt agggtgagaa gggtcatgtg ctctatcatt 4380

ggtgaccaac ttggggacat gggcttatac agtcatcact ctgaggctct gtgtaccacc 4440

agactgaact cccatatcct acatgcacat aggacaacac caagtagaag gaggttttag 4500

gactaaactg aaggacagag atggggtttc taaacaacta gggagtgcca gggccagcct 4560

ctctaaccac tataggacac tatggagtct ggttacaaag agagattact caaggtcctt 4620

agcactgatt acagagcata tctcagatgc cttctgctga ccagatgtat ctttgcataa 4680

tctgcctatc cagattcaga aaattgatgc cacatagcca agtggacttt caggaacaga 4740

cgatttaaaa acaggcagag agatgtgaga gaaaggagaa ggagagagag aagggagagg 4800

gagagaagag agagggagac ggagaaggaa agagggagaa ggagaaggag agaaggggca 4860

tggacagagg gagggacaga aggagagagg agatagagag ggggataagg aagaaaggag 4920

ggagggagag agagagaagg ctaagtcttt ccatacctgg gtcccaatac ctcttataac 4980

ccaagcacat ggtttcagat atcacaatgc ggttgggata tagataactg taaatacttg 5040

tgaaaataat ggggctgaga tctggggttt tcatgatagt ttcaaagtca ctgtactgac 5100

taaaaccttc cactggccca tctccagctt gttaatctga gggtatcaaa tttcccacta 5160

agtgtgttta gaaagatctc cacctttttg ccctagtctt ccagtgcccc acctacgttc 5220

tggtctccca catctgatgt cttctcagtg attctggccc tgcctgctcc acagctacaa 5280

[0563] acccccttcct ataatgagct ctgtgctgag ccatcatcct gaatcaatcc accttaagca 5340

gatgttttgc ttatttttcc tgtgtccata ctacagagga agggtaggca tgtagaagct 5400

gaggcatctc atctcactct aagcaccctc agtctctaaa tgtgcccctt tgtttccagc 5460

agttcagcct caagcatctt ttattcactc gtcttagagg gacacatgtg ctgtagtgtt 5520

ataagatgaa atttaaagca ttagttattc ccaacaagcc aattaaacaa gccaaaaaca 5580

ttcatcagtc attcccatgg aacctctgaa gcatcttcct gctctaacct tgagtttcct 5640

agggctgctg tgggatcaca ggagctgtcc tgtttaccag cctatcctgt cccacgggat 5700

tcagttatta gtgggtgcga gggggaccgc aaacctggaa gaaaatggga ttggaagaga 5760

aaagagaaac gaagaccaag tagatctttt cctatcaagg tcttcgttta ttaggctgag 5820

gtgcctggtg taaagcatgc atcgcgggga ataggaaggg gtcgaggggg aattttacaa 5880

agaacaaaga agcgggcatc tgctgacatg agggccgaag tcaggctcca ggcagcgg 5938

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 北京百奥赛图基因生物技术有限公司

[0003] <120> 具有人源化免疫球蛋白基因座的经遗传修饰的非人动物

[0004] <130> 1

[0005] <160> 54

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 31

[0009] <212> DNA/RNA

[0010] <213> 人工序列

[0011] <400> 1

[0012] gccaaggaat ttaaaagggg attgaaagca a 31

[0013] <210> 2

[0014] <211> 25

[0015] <212> DNA/RNA

[0016] <213> 人工序列

[0017] <400> 2

[0018] gccctccatg tacagcttca tgtgc 25

[0019] <210> 3

[0020] <211> 25

[0021] <212> DNA/RNA

[0022] <213> 人工序列

[0023] <400> 3

[0024] actgggcttg tcgagacaga gaaag 25

[0025] <210> 4

[0026] <211> 25

[0027] <212> DNA/RNA

[0028] <213> 人工序列

[0029] <400> 4

[0030] ccacagcccg atctacttgg ctttt 25

[0031] <210> 5

[0032] <211> 25

[0033] <212> DNA/RNA

[0034] <213> 人工序列

[0035] <400> 5

[0036] gcaaggtttt gactaagcgg agcac 25

[0037] <210> 6

[0038] <211> 25

[0039] <212> DNA/RNA

[0040] <213> 人工序列

[0041] <400> 6

[0042] tgacgcatgt gttttatcgg tctgt 25

[0043] <210> 7

[0044] <211> 25

[0045] <212> DNA/RNA

[0046] <213> 人工序列

[0047] <400> 7

[0048] gtgcctgaca cgtgctacga gattt 25

[0049] <210> 8

[0050] <211> 25

[0051] <212> DNA/RNA

[0052] <213> 人工序列

[0053] <400> 8

[0054] ttcaacaata agcagggcca gaggg 25

[0055] <210> 9

[0056] <211> 26

[0057] <212> DNA/RNA

[0058] <213> 人工序列

[0059] <400> 9

[0060] tcaaagtcaa tttcctcagc gaggct 26

[0061] <210> 10

[0062] <211> 25

[0063] <212> DNA/RNA

[0064] <213> 人工序列

[0065] <400> 10

[0066] agggagggaa tggaatgagg gtgat 25

[0067] <210> 11

[0068] <211> 25

[0069] <212> DNA/RNA

[0070] <213> 人工序列

[0071] <400> 11

[0072] ccatgtgacc cattcgagtg tcctg 25

[0073] <210> 12

[0074] <211> 25

[0075] <212> DNA/RNA

[0076] <213> 人工序列

[0077] <400> 12

[0078] ttgtgagggc tcaagttcag tgcat 25

[0079] <210> 13

[0080] <211> 31

[0081] <212> DNA/RNA

[0082] <213> 人工序列

[0083] <400> 13

[0084] gccaaggaat ttaaaagggg attgaaagca a 31

[0085] <210> 14

[0086] <211> 25

[0087] <212> DNA/RNA

[0088] <213> 人工序列

[0089] <400> 14

[0090] cgagagctgt ggagagaaag gcaaa 25

[0091] <210> 15

[0092] <211> 25

[0093] <212> DNA/RNA

[0094] <213> 人工序列

[0095] <400> 15

[0096] tatgtcctgc gggtaaatag ctgcg 25

[0097] <210> 16

[0098] <211> 25

[0099] <212> DNA/RNA

[0100] <213> 人工序列

[0101] <400> 16

[0102] agggagggaa tggaatgagg gtgat 25

[0103] <210> 17

[0104] <211> 25

[0105] <212> DNA/RNA

[0106] <213> 人工序列

[0107] <400> 17

[0108] ccatgtgacc cattcgagtg tcctg 25

[0109] <210> 18

[0110] <211> 25

[0111] <212> DNA/RNA

[0112] <213> 人工序列

[0113] <400> 18

[0114] cttaccattt gcggtgcctg gtttc 25

[0115] <210> 19

[0116] <211> 26

[0117] <212> DNA/RNA

[0118] <213> 人工序列

[0119] <400> 19

[0120] tcaaagtcaa tttcctcagc gaggct 26

[0121] <210> 20

[0122] <211> 28

[0123] <212> DNA/RNA

[0124] <213> 人工序列

[0125] <400> 20

[0126] aggaattgta tcccataggc tagcacgt 28

[0127] <210> 21

[0128] <211> 24

[0129] <212> DNA/RNA

[0130] <213> 人工序列

[0131] <400> 21

[0132] gacgacgtga ccctgttcat cagc 24

[0133] <210> 22

[0134] <211> 25

[0135] <212> DNA/RNA

[0136] <213> 人工序列

[0137] <400> 22

[0138] ccacagcccg atctacttgg ctttt 25

[0139] <210> 23

[0140] <211> 25

[0141] <212> DNA/RNA

[0142] <213> 人工序列

[0143] <400> 23

[0144] gcaaggtttt gactaagcgg agcac 25

[0145] <210> 24

[0146] <211> 25

[0147] <212> DNA/RNA

[0148] <213> 人工序列

[0149] <400> 24

[0150] cactagtctc gtgcagatgg acagc 25

[0151] <210> 25

[0152] <211> 25

[0153] <212> DNA/RNA

[0154] <213> 人工序列

[0155] <400> 25

[0156] gttagaagac ttcctctgcc ctcgg 25

[0157] <210> 26

[0158] <211> 25

[0159] <212> DNA/RNA

[0160] <213> 人工序列

[0161] <400> 26

[0162] ttgtgagggc tcaagttcag tgcat 25

[0163] <210> 27

[0164] <211> 20

[0165] <212> DNA/RNA

[0166] <213> 人工序列

[0167] <400> 27

[0168] caggtscagc tggtrcagtc 20

[0169] <210> 28

[0170] <211> 20

[0171] <212> DNA/RNA

[0172] <213> 人工序列

[0173] <400> 28

[0174] agggatccag agttccaggt 20

[0175] <210> 29

[0176] <211> 20

[0177] <212> DNA/RNA

[0178] <213> 人工序列

[0179] <400> 29

[0180] cagrtcacct tgaaggagtc 20

[0181] <210> 30

[0182] <211> 20

[0183] <212> DNA/RNA

[0184] <213> 人工序列

[0185] <400> 30

[0186] saggtgcagc tggtggagtc 20

[0187] <210> 31

[0188] <211> 20

[0189] <212> DNA/RNA

[0190] <213> 人工序列

[0191] <400> 31

[0192] caggtgcagc tgcaggagtc 20

[0193] <210> 32

[0194] <211> 20

[0195] <212> DNA/RNA

[0196] <213> 人工序列

[0197] <400> 32

[0198] gargtgcagc tggtgcagtc 20

[0199] <210> 33

[0200] <211> 20

[0201] <212> DNA/RNA

[0202] <213> 人工序列

[0203] <400> 33

[0204] caggtacagc tgcagcagtc 20

[0205] <210> 34

[0206] <211> 25

[0207] <212> DNA/RNA

[0208] <213> 人工序列

[0209] <400> 34

[0210] tcacacacta cagcttccac cacaa 25

[0211] <210> 35

[0212] <211> 25

[0213] <212> DNA/RNA

[0214] <213> 人工序列

[0215] <400> 35

[0216] cggggaaaag tcgactctag aacgg 25

[0217] <210> 36

[0218] <211> 26

[0219] <212> DNA/RNA

[0220] <213> 人工序列

[0221] <400> 36

[0222] actgcattct agttgtggtt tgtcca 26

[0223] <210> 37

[0224] <211> 25

[0225] <212> DNA/RNA

[0226] <213> 人工序列

[0227] <400> 37

[0228] ggcctggaaa actcagctat ccttt 25

[0229] <210> 38

[0230] <211> 25

[0231] <212> DNA/RNA

[0232] <213> 人工序列

[0233] <400> 38

[0234] aaggtgactc tgcaatcagc ctctg 25

[0235] <210> 39

[0236] <211> 25

[0237] <212> DNA/RNA

[0238] <213> 人工序列

[0239] <400> 39

[0240] tcatctacag ccacaacgtg agcag 25

[0241] <210> 40

[0242] <211> 25

[0243] <212> DNA/RNA

[0244] <213> 人工序列

[0245] <400> 40

[0246] cccatgtaca ggttccgcat gaact 25

[0247] <210> 41

[0248] <211> 25

[0249] <212> DNA/RNA

[0250] <213> 人工序列

[0251] <400> 41

[0252] ctccgtccgc ttttatttcc cctgt 25

[0253] <210> 42

[0254] <211> 25

[0255] <212> DNA/RNA

[0256] <213> 人工序列

[0257] <400> 42

[0258] gttataacac ggggagtgcg tgtgc 25

[0259] <210> 43

[0260] <211> 30

[0261] <212> DNA/RNA

[0262] <213> 人工序列

[0263] <400> 43

[0264] gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg 30

[0265] <210> 44

[0266] <211> 25

[0267] <212> DNA/RNA

[0268] <213> 人工序列

[0269] <400> 44

[0270] gcaacggcta caatcaacag catcc 25

[0271] <210> 45

[0272] <211> 25

[0273] <212> DNA/RNA

[0274] <213> 人工序列

[0275] <400> 45

[0276] tgggtctggg acagacttca ctctc 25

[0277] <210> 46

[0278] <211> 25

[0279] <212> DNA/RNA

[0280] <213> 人工序列

[0281] <400> 46

[0282] aaggtgactc tgcaatcagc ctctg 25

[0283] <210> 47

[0284] <211> 25

[0285] <212> DNA/RNA

[0286] <213> 人工序列

[0287] <400> 47

[0288] tcatctacag ccacaacgtg agcag 25

[0289] <210> 48

[0290] <211> 25

[0291] <212> DNA/RNA

[0292] <213> 人工序列

[0293] <400> 48

[0294] cccatgtaca ggttccgcat gaact 25

[0295] <210> 49

[0296] <211> 25

[0297] <212> DNA/RNA

[0298] <213> 人工序列

[0299] <400> 49

[0300] ctccgtccgc ttttatttcc cctgt 25

[0301] <210> 50

[0302] <211> 31

[0303] <212> DNA/RNA

[0304] <213> 人工序列

[0305] <400> 50

[0306] ccaagcttac gaggggggaag acatttggga a 31

[0307] <210> 51

[0308] <211> 30

[0309] <212> DNA/RNA

[0310] <213> 人工序列

[0311] <400> 51

[0312] cataagatct cgmcatccrg wtgacccagt 30

[0313] <210> 52

[0314] <211> 30

[0315] <212> DNA/RNA

[0316] <213> 人工序列

[0317] <400> 52

[0318] ctaacactca ttcctgttga agctcttgac 30

[0319] <210> 53

[0320] <211> 7795

[0321] <212> DNA/RNA

[0322] <213> 人工序列

[0323] <400> 53

[0324] gggatgacag attctctgtt cagtgcactc agggtctgcc tccacgagaa tcaccatgtc 60

[0325] ctttctcaag actgtgttct gtgcagtgcc ctgtcagtgg aaatctggag agcatgcttc 120

[0326] catgagcttg tgagtagtat atctagtaag ccatggcttt gtgttaatgg tgatgttcta 180

[0327] catatcagtt ctctggctta ataatgaggt gatgattcta tgttcctgta acgcttcctc 240

[0328] aactgggtcc taagtctttc ttcactccat ctattcctct aaggaatgat cctgaaaatc 300

[0329] ccatcacaaa ctataggaga tgggaaccat caaaaaacac agtgacaaag aggtgggaac 360

[0330] gcatcagggt tcaggaacca tattttaaaa agatatcgta aataacttct taaaagagat 420

[0331] atagacaaat ctccattaat acggagacca gaggcctaag gctaagaacc aatggtggct 480

[0332] caaggtctcc tgctacccga ggagcaaacg tagagcagtt tctaatgatt tatttaaaat 540

[0333] atagaatcaa aagtaccagt ttgcaatttt gaaagattta tttcagcaat gcaacaacat 600

[0334] caggtggtgc cgagtccaac acgtcttatg tcccatgata taaacaaagg ccatccagaa 660

[0335] ctgtggactg gagttctacc ttgtccccta atgacattca gatttttttt ccattctctt 720

[0336] tatcttagag gagacagggg gctaactcat tttacttgtc ctttgcttgt tcttgccaag 780

[0337] aacgtaaagc agcttgcaag tcttcaaacc taaatatctt agtaactcct acacgagtgg 840

[0338] caatgccaaa gagcagtgca acaaagagga agtaaatacg accaaagagt attcttaaat 900

[0339] acactactgg ctctaggttc tgttttatta tgcgcctttg aaccggaggg gacccactgt 960

[0340] ctatgctccc actgtgtccc tcttctttgc actttggagg gctccaacca aaatggcaat 1020

[0341] ggcaattccg acgattgtta cacactcctc tgaaattgca tttttctggg gtgcagtcat 1080

[0342] aacccaaacg agataaactt ccattgcaag ctcctcgatc acagaactta ccccttgaac 1140

[0343] acggggtacc atgtctcacc aatccagcat ctgctgtttc tgtcccacga tgttcatcaa 1200

[0344] gcccaaagca ggtaacccca gagataaccg attgatggaa tgaaacatgt tcttgcaaaa 1260

[0345] atggaagatt ggtgacattg gtacactgca accttccaca cagcttgtcc tgatcagcac 1320

[0346] aagcattgaa tgtgaggctt tcttctgctc tagtacaatg cccaaatcga aaccgttgtt 1380

[0347] tgttgatgtc atagcactta atattagcat tcttagcact tacaccaaag atttccatgc 1440

[0348] attgtatgtt gcgatcagtg cagttacctt tatagcagta accctcttct gagcatggtg 1500

[0349] tcccatcttg cagataagtg tcatctgggc aaatgaactt agagccacta cagtactctg 1560

[0350] gaagatcaca tatgttctgg ataggtctgc agagtgtccc agaaggactg taagtgcaat 1620

[0351] ttgcacagca taattcttta tcacaaatgc taccaggtgt taacctgcaa tcatttccac 1680

[0352] agcagggatc tgaataacat gccttttggg agccacagtc acactgctca ttgttatcta 1740

[0353] ctttgaagtt tccacaaaac ttataagtca atgatgtatt ataataaaca tgacggtcat 1800

[0354] agaaaagaca tggcatcaga tcaggagtat taagtatgtt gcttatctct gcaagggaac 1860

[0355] aattgctgaa agcatctgtt aattgaggat ttttgaacat gatgcaggtg ttccttctct 1920

[0356] ggcagataca gtacccctca tcatgtttta ggcctaaact ccttccaaca cgattggtta 1980

[0357] ttataataga taaaaataaa ggatttcgac catgttgacc aagacaaatt agggctgagg 2040

[0358] gagaacatat actcctctca gctggattaa cagcatcatc tcctggcgaa ttcttgttaa 2100

[0359] ttatagctcc tgcatcaggc ctaaaatgag cataaaatac tctctcatag aaagtatgag 2160

[0360] cctgccctcc tggaactcga aaatcttgtg aaaatggatc agcctcggta tacacagtca 2220

[0361] tgagaaagac atagtaccgc atatgaagat tggtcagata ggtgtccatt aaactaatga 2280

[0362] ctttaaacaa atactcaaca gtagatgaaa gtttgtcacc tccagaagca ctatatacag 2340

[0363] aatgggttgc ttgaaagtgg ccttttatag cagctggatg tgtagcgtaa ttcttactag 2400

[0364] atagtctggg agctccatct gcatattcca atctggagga gggagaacct gtattatggc 2460

[0365] tccagtgctt ccatgcattc ataggccctg tgtcatcaga ctcagatact atctgagaaa 2520

[0366] caaggtgttc aaagctctgt gaatcattga ggggtttgat ttcataggta aggttatcca 2580

[0367] actttatgac ccctgacagg ccccccataac aagtatccac agtgaccatg gattgcagga 2640

[0368] tcccctccag gtagccaata tagtaacaat ctacaggaaa aaaggggtac tccatctgta 2700

[0369] aggctccttg gtcatcttga gttgtcagca acaagtgtct gggccaaatg agtgtctttc 2760

[0370] tccgcaggtg gatgatatgt ctctggcccc gaaaacgcaa gctatacgag agcagtcttt 2820

[0371] gtgcttgaag tcctttggta tggtagatct ccttccgagg aataaccacc tccgatgaga 2880

[0372] tgtaacgcca agtgggatgg ccttgagaac accagactgg aaccaggagg agcagccaga 2940

[0373] gtgcaaatag caagaggagg accctgggga ccacaggtct ttccactagc ctcatgcccc 3000

[0374] aggtcagaga taacatcctg ggtggagcta actccctctg ctgtggccac tgcctggtct 3060

[0375] agaaaatact gacagaggac taaaaacctc ctcaggctcc caacctaagt ggttacccag 3120

[0376] acaactggag ttaggtaaca gtcactgggt gtggcaggaa ttgagtctga atgtgttagc 3180

[0377] tgaggttgag gttaaatatt gtcaaaaggg atgtctataa atgtgcctgg acaagaaaag 3240

[0378] tcagaagcag caaggagtgt ctctgacagg ctcaatcctt tcttttcttt ttttgaagtt 3300
[0379] caaaatatca tttccacgtg aatgtatttg gttcccagtg tgactctggg tctctttcta 3360
[0380] ggagtcaata tttctttata tcttggctca tgtttttcac agttgttcta acttcttgtt 3420
[0381] ttgttttgtt tgtttgtttg tttgaaagtt agaagtaaat actgtctata ttagcctttt 3480
[0382] agctataaat gattgttttt atttcttcta atcatgtttt gtttgagttt tggttaaact 3540
[0383] atttacaaat gagtttttt tttccttttg ggtgttgctc gaaagtttgg agctttctgt 3600
[0384] taatattgtg ttgttgtttc tccaatatta ttagacctga gaattctacc tgggtacctg 3660
[0385] tgaactccag aatttttaaa aattccatct cttgggaaca ttatctctga ccccgtctga 3720
[0386] ggccgaagtg gctgtccccc tccaaccttt agtatctttc tttcctgact attgggattt 3780
[0387] cttcaagcaa tcaggctgat gggttctcag cagtgagacc agtagactgt cggtatgaac 3840
[0388] gtcgaagagt ctgccacaca ctccgggttc atcaacagtg ctttcgcgtc tcttactttt 3900
[0389] gtagaaggaa atgcagcctc tgagttttct ccaagaaatc attgatgaaa gggtgaaaag 3960
[0390] atgggtatca cccggagttc atgacaagcc ctggctcaga cacgtgagca aggtctacag 4020
[0391] ccccaaagat aggctgccct gcaacatgta tttataagat aggagaaaaa aatgggtagt 4080
[0392] tggagggttg atcaacttac ttcctctcaa acatatatat ctcatctaag tgtgcagggg 4140
[0393] aaaactctgt agaactactg ggatacctgc tcacccccag gagcctcatg aataagtctc 4200
[0394] tgcttctgcc ttgtagccat gagcattact gcacctgata cccctgcagc ttcctaggga 4260
[0395] agagggagga agtgacttgg cccctgtctg gttaaggtaa gaggagataa atcccttctc 4320
[0396] attgattagg gtgagagggg tcatgtgctc tatcattggt gacccagttg ggacatgggt 4380
[0397] ttataccaaa gtcatcactc tgaggttctg tgtaccacca ggctgaactc ccatatccta 4440
[0398] catggacata ggacaacacc aagcagaagg aggttttagg actaaactga aggacagaga 4500
[0399] tgcggtttct aaacaactag ggagtgccag ggccagcctc tctaaccact ataggacact 4560
[0400] gtggagtctg gttacaaaga gagattactc aaggtcctta gcactgatta cagagcatat 4620
[0401] ctcagatgcc ttctgctgac cagatgtatc tttgcataat ctgcctatcc agattcagaa 4680
[0402] aattgatgcc acatagccaa gtggactttc aggaacagac gatttaaaaa caggcagaga 4740
[0403] gatgtgagag aaaggagaag gagagagaga agggagaggg agagaagaga gagggagacg 4800
[0404] gagaaggaaa gagggagaag gagaaggaga gaaggggcat ggacagaggg agggacagaa 4860
[0405] ggagagagga gatagagagg gggataagga agaagggagg gagggagaga gagagaaggc 4920
[0406] taagtctttc catacctggg tcccaatacc tcttataacc caagcacatg gtttcacata 4980
[0407] tcacaatgcg gttgggatat agataactgt aaatacttgt gaaaataatg gggctgagat 5040
[0408] ctggggtttt catgatagtt tcaaagtcac cgtactgact aaaaccttcc actggcccat 5100
[0409] ctccagcttc ctaatctgag ggtatcaaat ttcccactaa gtgtgtttag aaagatctcc 5160
[0410] acctttttgc ccttgtcttc cagtgcccca cctacgttct ggtctcccac atctgatgtc 5220
[0411] ttctcagtga ttctggccct gcctgctcca cagctacaaa ccccttccta taatgagctc 5280
[0412] tgtgctgagc catcatcctg aatcaatcca ccttaagcag atgttttgct tatttttcct 5340
[0413] gtgtccatac tacagaggaa aggtaggcat gtagaagctg aagcatctca cctcattcca 5400
[0414] agcaccctca gtctctaaat gtgccccctt gtttccagaa gtgcaacctc aagcatcttt 5460
[0415] tattcattca tcttagaggg ccacatgtgc tgtagtgtta taagatgaaa tttaaagcat 5520
[0416] taattattcc taacaagcca attaaacaag ccaaaaacat tcatcagtca ttcccatgga 5580
[0417] acctctgaag catcttcctg ctctaacctt gggttttcca gggctgctct gggatcacag 5640
[0418] gagctgtcct gtctaccagc catataaagg cagacctatc agaattacac cagacttctc 5700
[0419] accatagact ataaaagcca gaatatcctg gacagatgtt atacagaaac taagagaaca 5760

[0420] caaatgccag cccaggctac tatacccagc aaaactctca attaccatcg atgaagaaac 5820
[0421] caagatattc cattacaagt ccaaatttac acaatatctt tccataaatc cagccctaca 5880
[0422] aaggatagca gatggaaaac tccaacacag gtaggaaaac tacaccctag aaagagcact 5940
[0423] aaagtaatca tctttcaaca cactcaaaag aagataacca cacaaacata attccacctc 6000
[0424] taacaacaaa aataaagtag gcaacaatca ctattcctta atatctcttt taacatcaat 6060
[0425] ggactcaatt ctccaataaa aagacataga ctaacagact gaatacataa acaggacaca 6120
[0426] gcattttgct gcataaagca aacacagcgt tacttttttt tttctaaatg acatttttta 6180
[0427] ttagatattg tctttattga catttcaaat gttatcccct ttcctggttt accctctgaa 6240
[0428] atcccctatc tcctcccct ccccctgctc accaatccac ccactcccac ttccaggccc 6300
[0429] tggcaatccc ctatatttgg gcatagagcc ttcacaggac caaggtactc tccttgcatt 6360
[0430] gatgaccaac tagtccattc tctgctacaa atgcagctag atctatgagt cccaccatgt 6420
[0431] tttcttttgt tggtggtttc atgccaggga gctcttggag tactgattgg ttcatattgt 6480
[0432] tgttctccct atggggttac aaaacccttc aacttcttgg gtcctttctc tggctgcctc 6540
[0433] attggggacc ttgtgcgaag tccaatggat gactgtgagc atccacttct gtatttgcca 6600
[0434] ggcactggca gagcctctca gaagacagct atatcaagat cctggcagca agctcttgtt 6660
[0435] ggtatccaca aaagtgtctg gtggttgtct atgggatgga tccccaaagg ggcagtctct 6720
[0436] ggatggtcat tccttcagtc tctgttccac actttgtctc tttaactcct tccatgacta 6780
[0437] ttttattcct ccctctaaga aggaccgaag tattcatact ttggtcttcc ttcttgaaat 6840
[0438] tcatgtgttt tgtgaattgt atctttgata ttccgaactt ctgggctaat atccacttat 6900
[0439] cagtgagtga atatcatgtg tgttcttatg tgattgagtt acctcactca ggatgatatc 6960
[0440] ctccagaacc atccatttgt ctaagaattt aatgaattca ttgtttttaa tagctgagga 7020
[0441] gtactccatt gtgtaaatgt accacatttt ctgtacccat tgttctcttg agggacatct 7080
[0442] gggttcttta aagcttctgg acattaaata taaggctgct atggaaatag tggagaatgt 7140
[0443] gtccttatta catgttggag catcttctgg gtatatgccc aggagtgcta ttgctggatc 7200
[0444] ctctgatagt actatgtcca attttctgag gaactgccaa actgatttac agagtggttg 7260
[0445] taccagcttg caattccacc agcaatggag aaatgttccc cttcctccac atcctcacca 7320
[0446] acatctgctg tcacctcaat ttgttcttag tgattcagac aggtgtgagg tggaatatca 7380
[0447] gggttgtttg gcatttccct gatgactagt gatattgaaa aaaatttaa gtgtttctca 7440
[0448] gccattcagt attcttcagt tgagaattca ctgtttagct ctgtactcag gttttttaa 7500
[0449] tagggttatt tggttttctg gagtctaacg tcttgaattc tttctatata ttggatatta 7560
[0450] gccctctgtc atatttagga ttggtaaaga tctttcccaa tatgttggct gccttttgt 7620
[0451] gtcctttgcc ttacagaacc tttttaattt tatgaggtcc catttgctaa ttcttcattt 7680
[0452] tacagcacaa gccattggtg ttctgttcaa aaatctttcc ccctgaaccc tatcttcgag 7740
[0453] gatcttcccc actttctcct ctataagttt cagtgtctct attattgtgc tgagg 7795
[0454] <210> 54
[0455] <211> 5938
[0456] <212> DNA/RNA
[0457] <213> 人工序列
[0458] <400> 54
[0459] tgatgtggga acgcttcagt gttcaggaac catatgattt atttaaaata tagaatcaaa 60
[0460] agtaccaatt tgcagttttg aaagatttat tccagtgtaa gcattagcaa tgcaccaaca 120
[0461] tcaggtgatt tctgaatcca acacgtctta tgtcctcatg atattaaaaa aaaaaaaagg 180

[0462] ccatccagaa ctgtgaactt gagttctacc ttgttcccta ctgacattca gattttcttt 240
[0463] tttgcattct ctttatctta caggagacag gaggggaggg ctaactcatt ttactttggc 300
[0464] ttgtcccttg ctggtccttg cccagaacgt aaagtagctt gcaagtcttc aaatctaaaa 360
[0465] atcttagtaa ctcctacacg agtggcaatg ccaaagagca gtgcaacaaa gaggaagtaa 420
[0466] atacgaccaa agagtattct taaatacacc actggctctt gtttttgttt tattgtgtgc 480
[0467] ctttgaactg gaggggaccc actgtctatg ctcccactta gtccctcttc tttgcactct 540
[0468] ggaggcttcc aaccaaaatg acaatggcaa ttccgatgat tgttacacac tcctctaaaa 600
[0469] ctgcattttt ctggggtgca gtcataaccc aaatgagata aacttccact gcaagctcct 660
[0470] tgatcacaga acttactttt ggagcagggg gtaccatgtc tcaccattcc agcatctgtt 720
[0471] gtttctgtcc cacgatgttc atcaagccca aagcaggtaa acccagagat aatcgattga 780
[0472] tggaatgaaa catgttcttg caaatatgga agattggtga cattggtaca ctgcaacctt 840
[0473] ccacacagct tgtcctgatc agcacaagca ttgaatgtga ggctttcttc tgctctagta 900
[0474] caatgcccaa atcgaaaccg ttgtttgttg atgtcatagc acttaatatt agcattctta 960
[0475] gcacttacac caaagatttc catgcattgt atgttgcgat cagtgcagtt acctttatag 1020
[0476] cagtaaccat cttctgagca tggtgtccca tcttgcagat aagtgtcatc tgggcaaatg 1080
[0477] tatttagtcc cattacagta ctctggaaga tcacatatgt tctggatagg tctgcagagt 1140
[0478] gtcccagaag gactgtaagt gcaatttgca cagcataatt ctttatcaca aatgctacca 1200
[0479] ggtgttaacc tgcaatcatt tccacagcag ggatctgaat aacatgcctt ttgggagcca 1260
[0480] cagtcacact gctcatcgtt atctactttg aagtttccac aaaacttata agtcaatgat 1320
[0481] gtattataat aaacatgacg gtcatagaaa agacatggca tcagaccagg agtattaagt 1380
[0482] atgttgctta tctctgcaag ggaacaattg ctgaaagcat ctgttaattg aggatgtctg 1440
[0483] aacataatgc aggtgttcct tctctggcag acacagtacc cctcatcata ttttaagcct 1500
[0484] aaactccttc caacacgatt ggttattata ggagataaaa ataaaggatt tcgatcatat 1560
[0485] ttaccaatac aaattagggc taaggaagaa catatactcc tctcagctgg attaacctgg 1620
[0486] ttatcttgtg gcccatactt attaagtaaa actcctgcat caggcttaaa tttattataa 1680
[0487] aagactgaca catagtaatt ataagccgac cctcctggaa ctgcaaactc aagtcgaaat 1740
[0488] ggatcagaat tggtgtacac agtcatgaga aagacatagt accgcatatg aagattggtc 1800
[0489] agataggtgt ccattaaact aatgacttga aacaaatacc caacagtaga tgaaagtttg 1860
[0490] tcacctgcag cagaattata tacagaattg gttgcttgaa agtggccttt tatagcagct 1920
[0491] ggatgtgtag cgtagttctt actagatatt ctgggagctc catctgcata ttccaatctg 1980
[0492] gaggagggag aacctgtatt atggctccag tgcttccatg cattcatagg ccctgtgtca 2040
[0493] tcagactcag atactatctg agaaacaagg tgttcaaagc tctgtgaatc attgaggggt 2100
[0494] ttgatttcat aggtaaggtc atctaacttc atgacccctg acaggccccc ataacaagta 2160
[0495] tccacagtga ccatggattg tgggatcccc tccaggtagc caatatagta acaatctaca 2220
[0496] ggaaaaaagg ggtaatccat ctgtaaggct ccttggtcat cttgagttgt cagcaacaag 2280
[0497] tgtctgggcc aaatgagtgt ctttctccgc aggtggatga tatgtctctg gccccgaaaa 2340
[0498] tgcaagctat atgagagcag tctttgtgct tgaagtcctt tggtatggta gatctccttc 2400
[0499] cgaggaataa ccacctccga tgagatgtaa cgccaagtag gatggccttg agaacaccag 2460
[0500] actggaacca ggaggagcag ccagagtgca aatagcaaga ggaggaccct ggggaccaca 2520
[0501] ggtctttcca ctagcctcat gccccaggtc agagataaca tcctgggtgg agctaaatcc 2580
[0502] ctctgctgtg gccactgcct ggtctagaaa atactgacag aggactaaaa acctcctcag 2640
[0503] gctcccaacc taagtggtta cccagacaac tggagttagg taacagtcac tgggtgtggc 2700

[0504] aggaattgag tctgaatgtg ttagctgagg ttgaggttaa atattgtcaa aagggatgtc 2760
[0505] tataaatgtg cctggacaag aaaagtcaga agcagcaagg agtgtctctg acaggctcaa 2820
[0506] tcctttcttt tctttttttg aagttcaaaa tatcatttcc acgtgaatgt atttggttcc 2880
[0507] cagtgtgact ctgggtctct ttctaggagt caatatttct ttatatcttg gctcatgttt 2940
[0508] ctcacagttg ttctaatttc ttgttttgtt ttgtttgttt gtttgaacgt tagtagtaaa 3000
[0509] tactgtctat attagccttt tagctataaa tgattgtttt tatttcttct aatcatattt 3060
[0510] tgtttgagtt ttggttaaac tatttacaaa tgagtttttt ttttttcctt ttgggtgttg 3120
[0511] ctcgaaagtt tggagctttc tgttaatatt gtgttgttat ttttccaata ttattagacc 3180
[0512] tgagaattct atctgggtac ctgtgaactc tagaattttt aaaaattcca tctcttggga 3240
[0513] acattacctc tgaccccgtc tgaggccgaa gtggctgtcc ccctccaacc tttagtatct 3300
[0514] ttctttcctg actattggga tttcttcaag caatcaggct gatgggttct cagcagtgag 3360
[0515] accagtagac tgccggtatg aacgtcgaag agactgccac acactccagg ttcatcaaca 3420
[0516] gtgctttcgc gtctcttact tttgtagaag gaaaagcagc ctctgagtta tctccaagaa 3480
[0517] atcattaatg aaagagttaa aagatgggta tcacccggag ttcatgacaa gccctggctc 3540
[0518] agacacgtga gcaaggtcta cagccccaaa gataggctgc cctgcaacat gtatttataa 3600
[0519] gatagaagaa aaaaatgggt ggttggaggg ttgatcaact tacttcctct caaacatata 3660
[0520] tatctcatct aagtgtgcag gggaaaactc tgtaggacta ctgggattgt tattatcatt 3720
[0521] attattatta ttattattat tattattatt attattatta ttaacttaag gcattttatt 3780
[0522] agatattttc ttcatttagt tttcaaatgt tatccccgga acctcctata ctctctccct 3840
[0523] gccctgctcc ccaacccacc cactcctaca tcctggccct ggcattcccc tatactgtgg 3900
[0524] cagatgatct tcgtaagacc aagagccttt cctcccattg atggcctact aggctatcct 3960
[0525] cttttacata tgcaactaga gtcacagctc tggggaggta ttgcttagtt catattgttt 4020
[0526] ttcctcctat agggttgcag atccctttag ctccttgggt actttctcta gctcctccat 4080
[0527] tgggggccct gtgttccatc caatagatga ctgtgagcat ccacttctgt atttgccagg 4140
[0528] tattggcatg gatcttactg caccttctga actctctaag cagctttcct ggtcacctcc 4200
[0529] aggagcctca tgaataagtc tctgcttccc ccttgtggct atgagcatta ctgcacctga 4260
[0530] tacaccctgc agcttcctag ggaagaggga ggaagtggct tggcccctgt ctggttaagg 4320
[0531] taagaggaga taaatccctt ctcatgaatt agggtgagaa gggtcatgtg ctctatcatt 4380
[0532] ggtgaccaac ttggggacat gggcttatac agtcatcact ctgaggctct gtgtaccacc 4440
[0533] agactgaact cccatatcct acatgcacat aggacaacac caagtagaag gaggttttag 4500
[0534] gactaaactg aaggacagag atggggtttc taaacaacta gggagtgcca gggccagcct 4560
[0535] ctctaaccac tataggacac tatggagtct ggttacaaag agagattact caaggtcctt 4620
[0536] agcactgatt acagagcata tctcagatgc cttctgctga ccagatgtat ctttgcataa 4680
[0537] tctgcctatc cagattcaga aaattgatgc cacatagcca agtggacttt caggaacaga 4740
[0538] cgatttaaaa acaggcagag agatgtgaga gaaaggagaa ggagagagag aagggagagg 4800
[0539] gagagaagag agagggagac ggagaaggaa agagggagaa ggagaaggag agaaggggca 4860
[0540] tggacagagg gagggacaga aggagagagg agatagagag ggggataagg aagaaaggag 4920
[0541] ggagggagag agagagaagg ctaagtcttt ccatacctgg gtcccaatac ctcttataac 4980
[0542] ccaagcacat ggtttcagat atcacaatgc ggttgggata tagataactg taaatacttg 5040
[0543] tgaaaataat ggggctgaga tctggggttt tcatgatagt ttcaaagtca ctgtactgac 5100
[0544] taaaaccttc cactggccca tctccagctt gttaatctga gggtatcaaa tttcccacta 5160
[0545] agtgtgttta gaaagatctc cacctttttg ccctagtctt ccagtgcccc acctacgttc 5220

[0546] tggtctccca catctgatgt cttctcagtg attctggccc tgcctgctcc acagctacaa 5280

[0547] acccccttcct ataatgagct ctgtgctgag ccatcatcct gaatcaatcc accttaagca 5340

[0548] gatgttttgc ttatttttcc tgtgtccata ctacagagga agggtaggca tgtagaagct 5400

[0549] gaggcatctc atctcactct aagcaccctc agtctctaaa tgtgcccctt tgtttccagc 5460

[0550] agttcagcct caagcatctt ttattcactc gtcttagagg gacacatgtg ctgtagtgtt 5520

[0551] ataagatgaa atttaaagca ttagttattc ccaacaagcc aattaaacaa gccaaaaaca 5580

[0552] ttcatcagtc attcccatgg aacctctgaa gcatcttcct gctctaacct tgagtttcct 5640

[0553] agggctgctg tgggatcaca ggagctgtcc tgtttaccag cctatcctgt cccacgggat 5700

[0554] tcagttatta gtgggtgcga gggggaccgc aaacctggaa gaaaatggga ttggaagaga 5760

[0555] aaagagaaac gaagaccaag tagatctttt cctatcaagg tcttcgttta ttaggctgag 5820

[0556] gtgcctggtg taaagcatgc atcgcgggga ataggaaggg gtcgaggggg aattttacaa 5880

[0557] agaacaaaga agcgggcatc tgctgacatg agggccgaag tcaggctcca ggcagcgg 5938

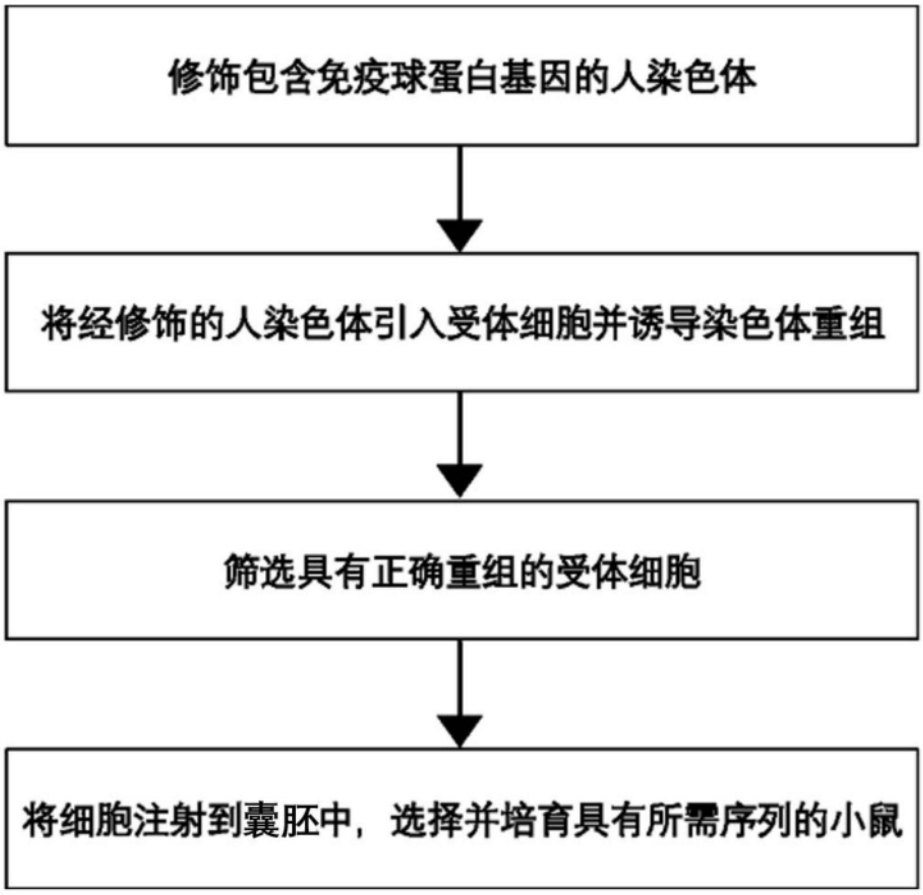

修饰包含免疫球蛋白基因的人染色体
将经修饰的人染色体引入受体细胞并诱导染色体重组
筛选具有正确重组的受体细胞
将细胞注射到囊胚中，选择并培育具有所需序列的小鼠

图1A

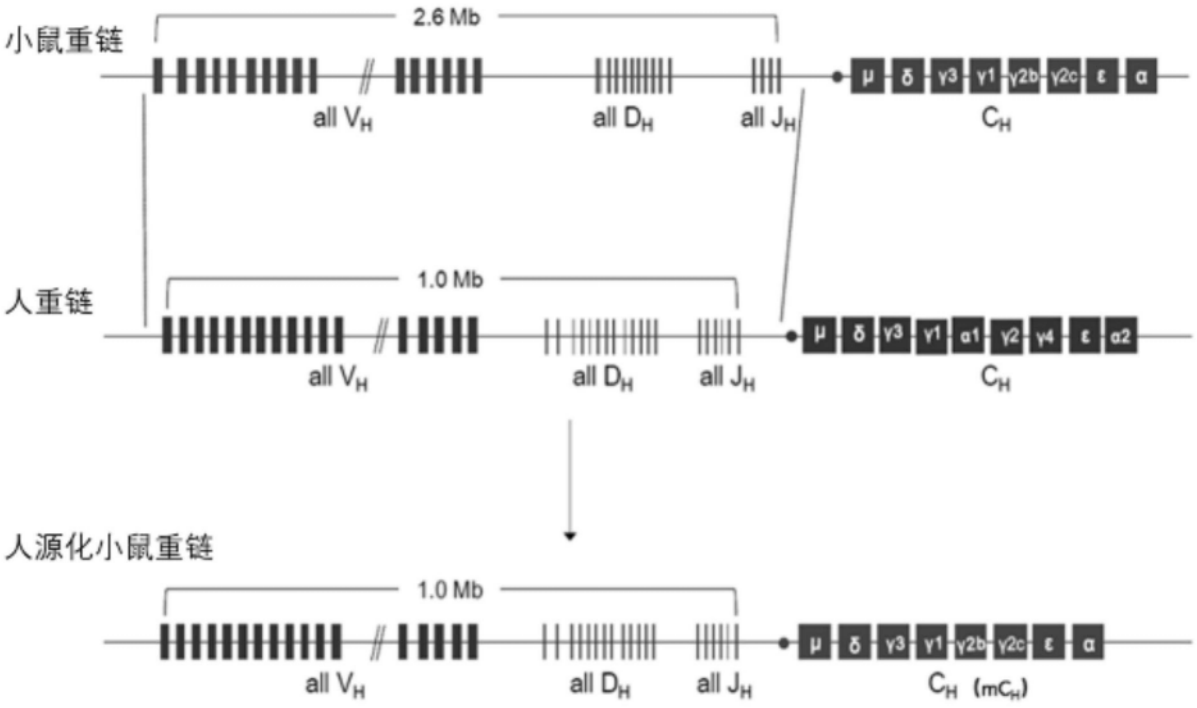

小鼠重链
2.6 Mb
all V_H
all D_H
all J_H
μ δ γ3 γ1 γ2b γ2c ε α
C_H
人重链
1.0 Mb
all V_H
all D_H
all J_H
μ δ γ3 γ1 α1 γ2 γ4 ε α2
C_H
人源化小鼠重链
1.0 Mb
all V_H
all D_H
all J_H
μ δ γ3 γ1 γ2b γ2c ε α
C_H (mC_H)

图1B

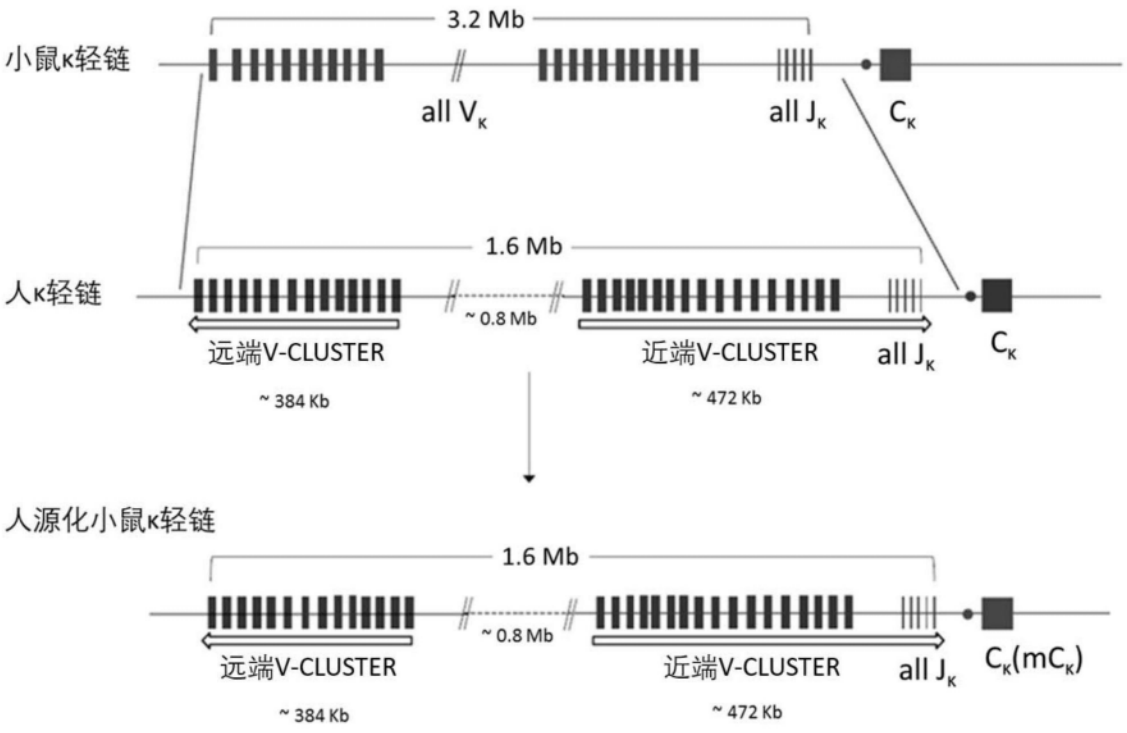

小鼠κ轻链
3.2 Mb
all $V_κ$
all $J_κ$
$C_κ$
人κ轻链
1.6 Mb
~ 0.8 Mb
远端V-CLUSTER
~ 384 Kb
近端V-CLUSTER
~ 472 Kb
all $J_κ$
$C_κ$
人源化小鼠κ轻链
1.6 Mb
~ 0.8 Mb
远端V-CLUSTER
~ 384 Kb
近端V-CLUSTER
~ 472 Kb
all $J_κ$
$C_κ$($mC_κ$)

图1C

mChr12
VM
DM
JM
CM

图2

mChr12-mut
1301
1302
VM
DM
JM
CM

图3A

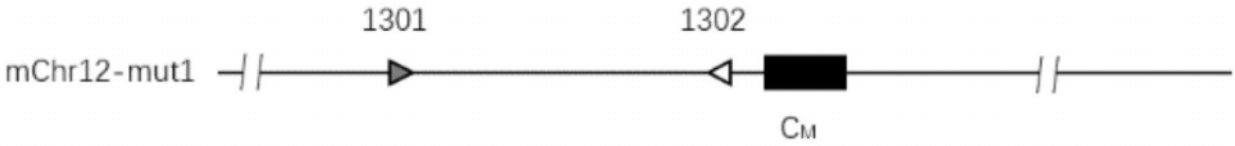

mChr12-mut1
1301
1302
CM

图3B

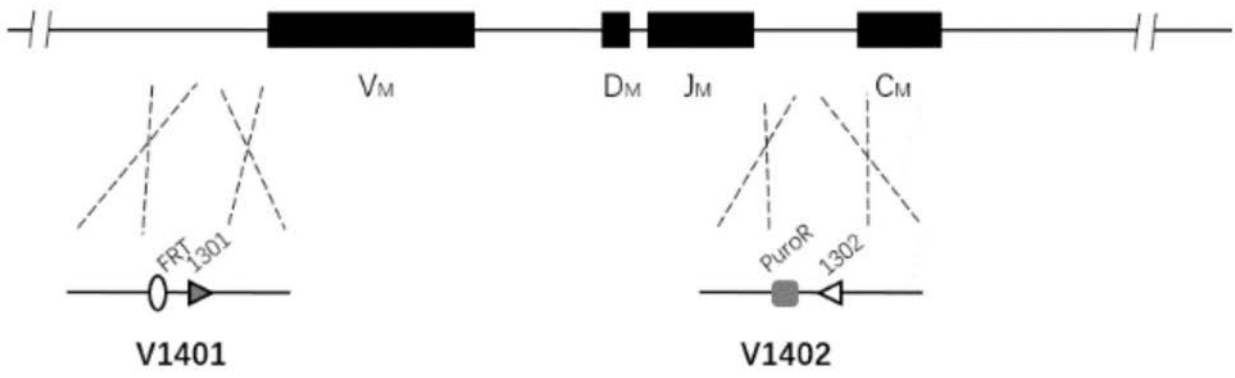

VM
DM
JM
CM
FRT
1301
PuroR
1302
V1401
V1402

图4

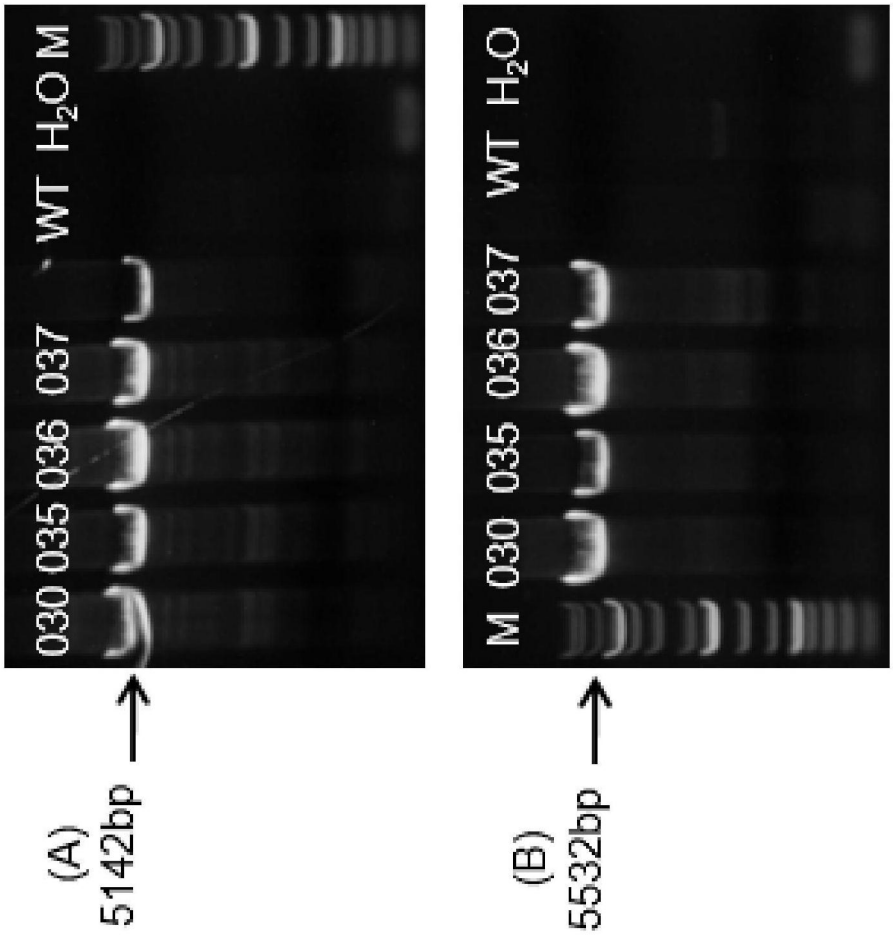

030 035 036 037 WT H2O M
(A)
5142bp
M 030 035 036 037 WT H2O
(B)
5532bp

图5A-5B

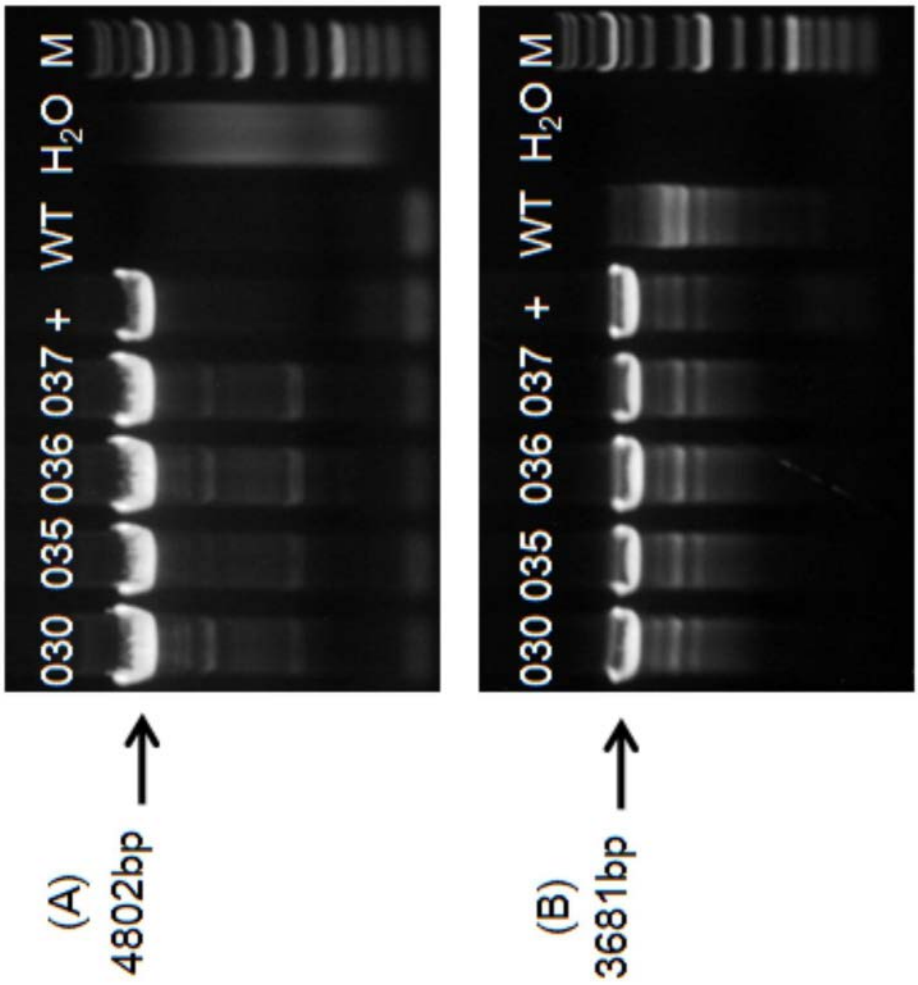

030 035 036 037 + WT H2O M
(A)
4802bp
030 035 036 037 + WT H2O M
(B)
3681bp

图6A-6B

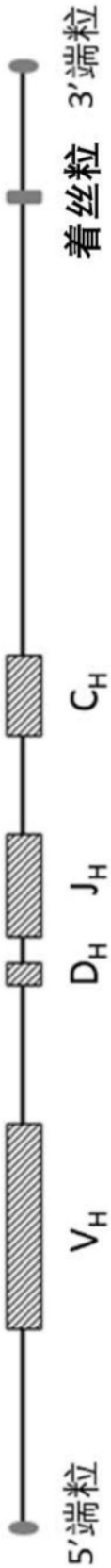


图7

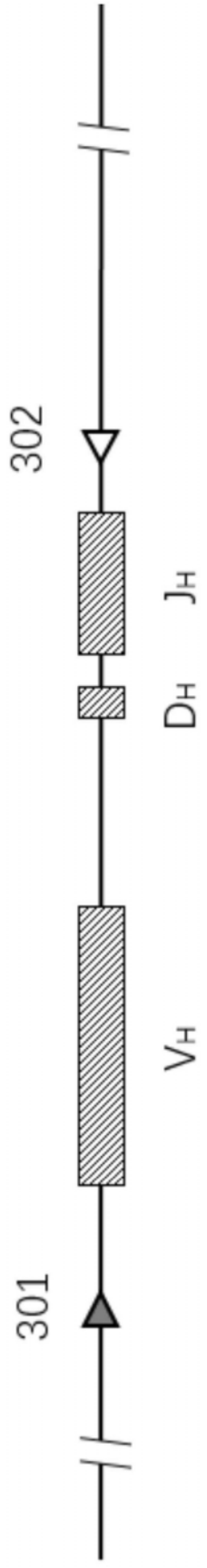


图8

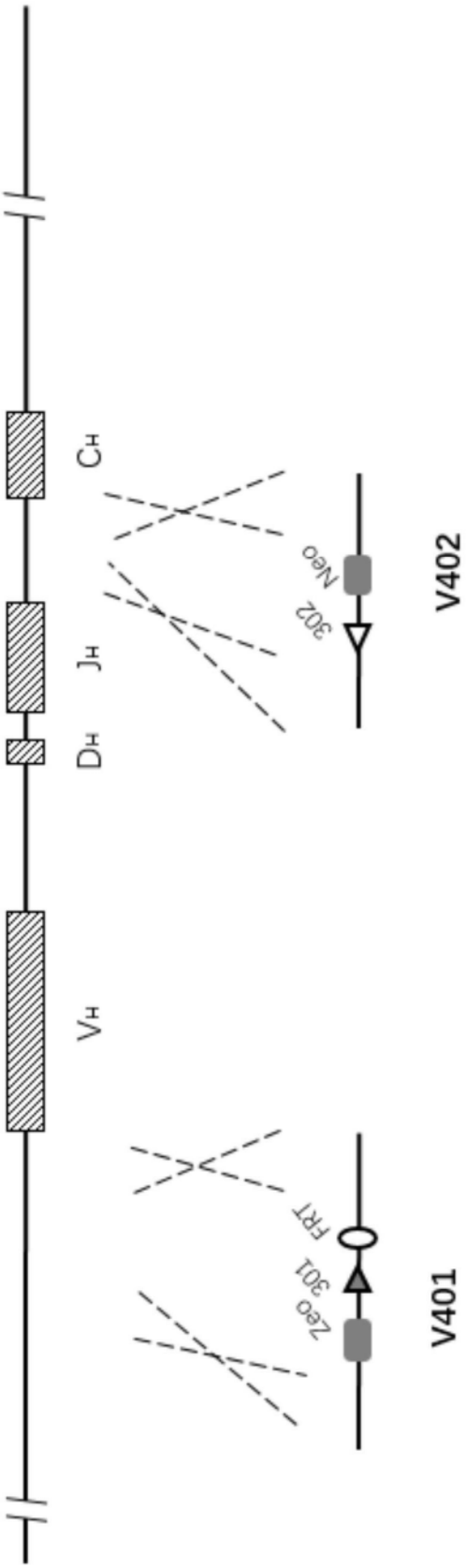


图9

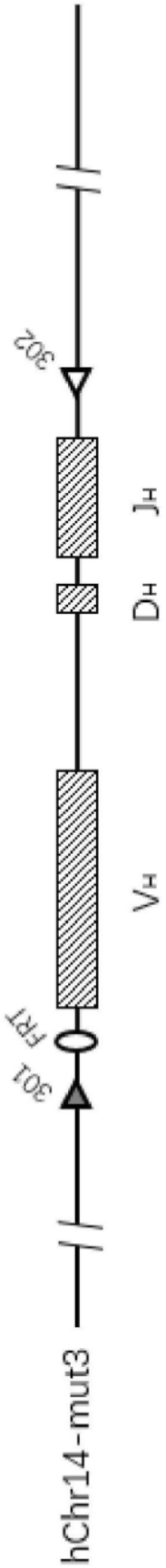


图10

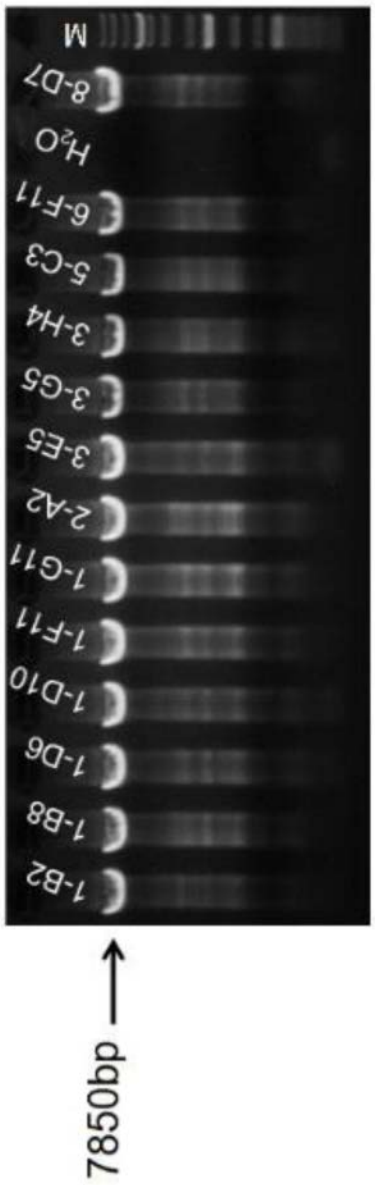

M
8-D7
H2O
6-F11
5-C3
3-H4
3-G5
3-E5
2-A2
1-G11
1-F11
1-D10
1-D6
1-B8
1-B2
7850bp

图11

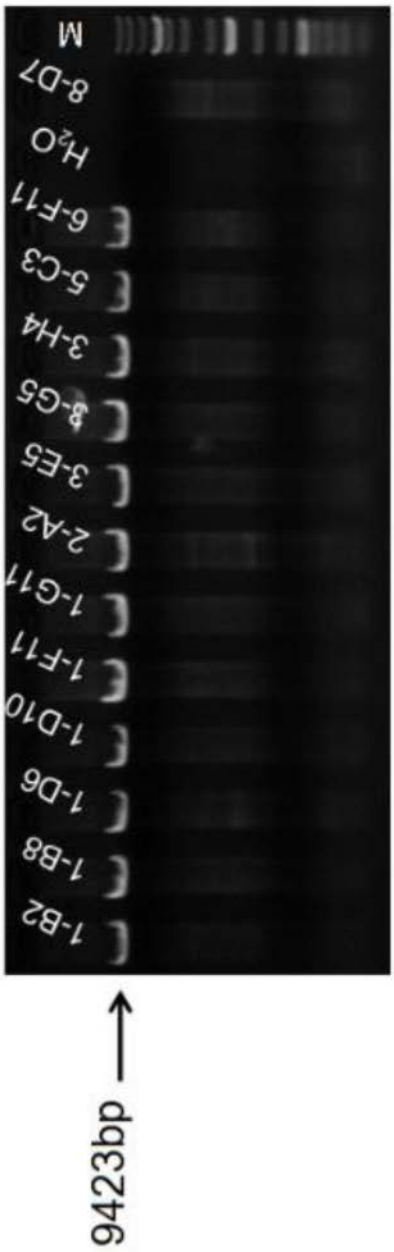

M
8-D7
H2O
6-F11
5-C3
3-H4
3-G5
3-E5
2-A2
1-G11
1-F11
1-D10
1-D6
1-B8
1-B2
9423bp

图12

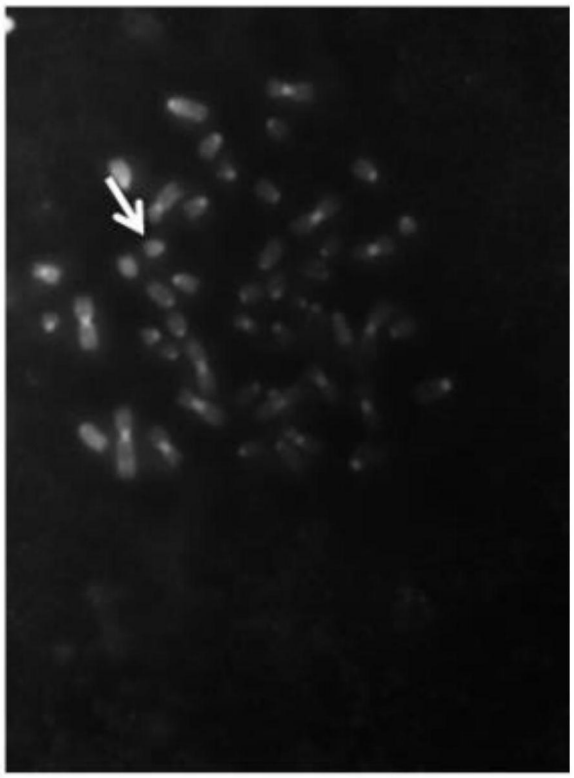


图13

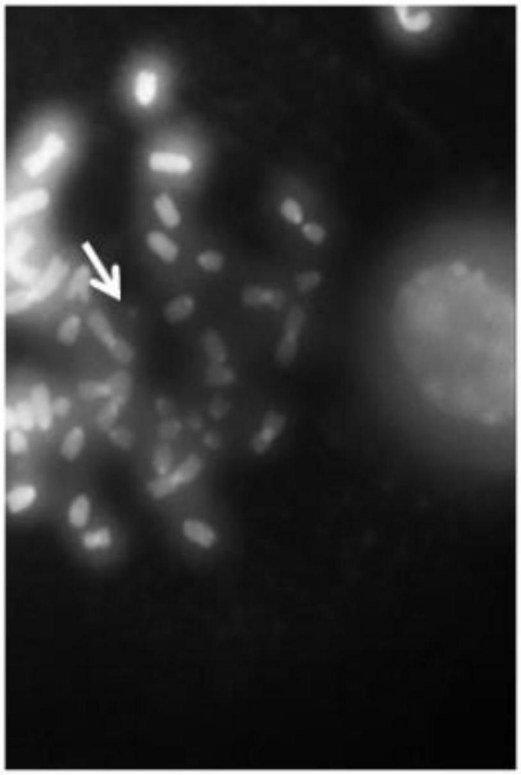


图14

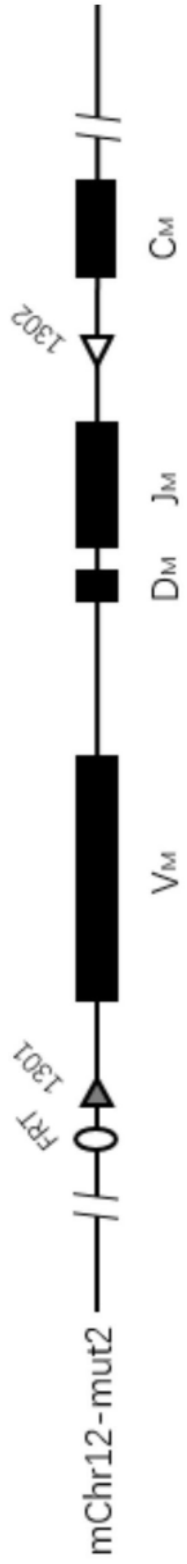


图15

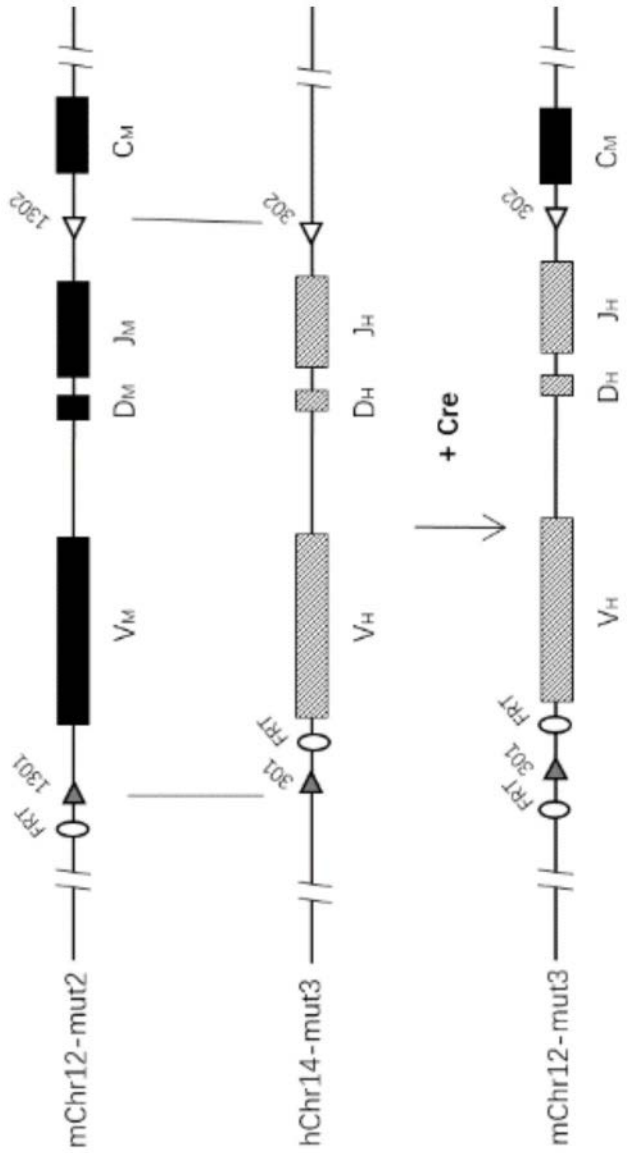

mChr12-mut2
hChr14-mut3
mChr12-mut3
+ Cre

图16

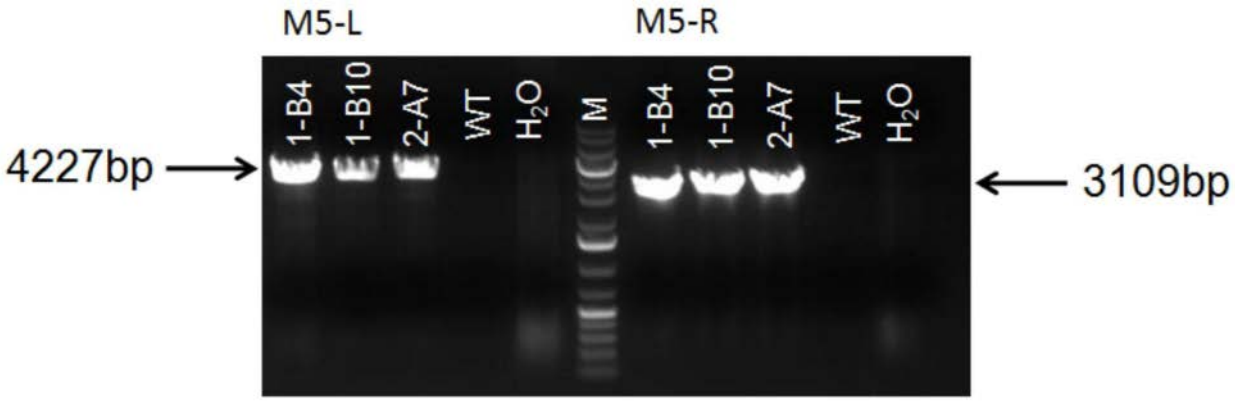

M5-L
M5-R
1-B4
1-B10
2-A7
WT
H2O
M
4227bp
3109bp

图17

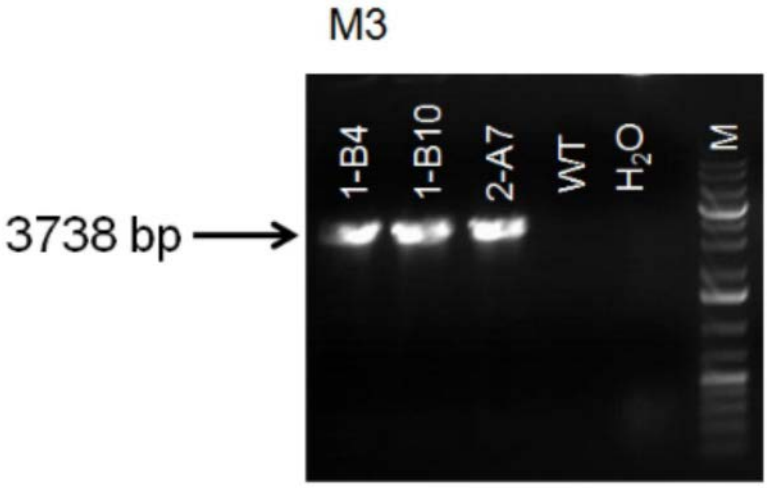

M3
3738 bp
1-B4
1-B10
2-A7
WT
H2O
M

图18

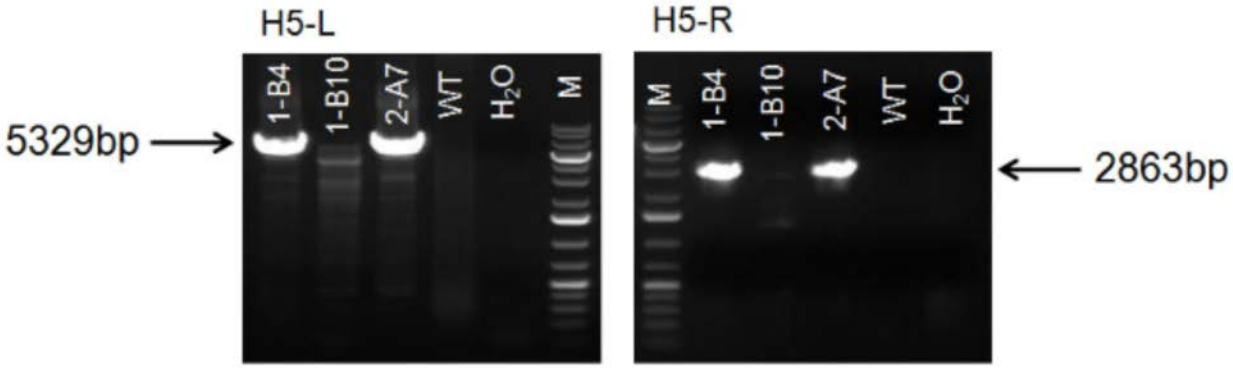

H5-L
H5-R
5329bp
2863bp
1-B4
1-B10
2-A7
WT
H2O
M

图19

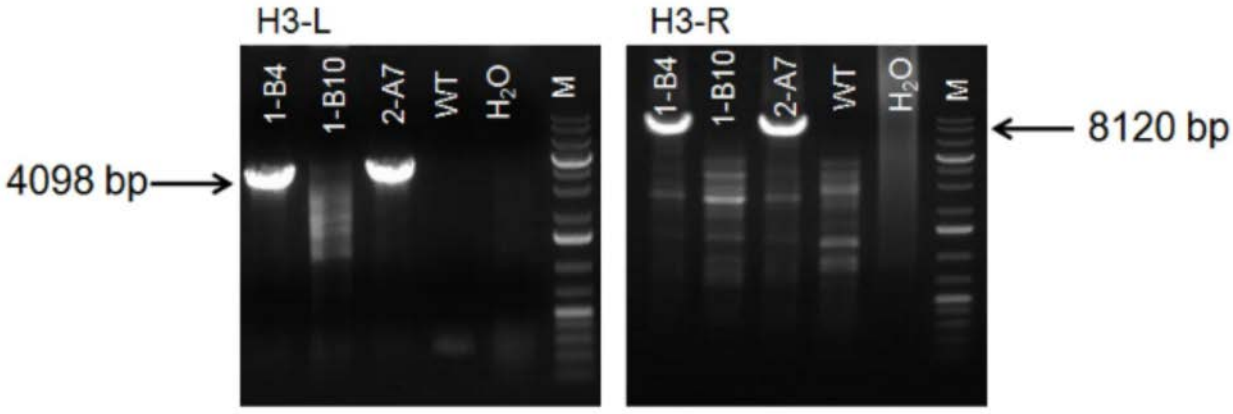

H3-L
H3-R
4098 bp
8120 bp
1-B4
1-B10
2-A7
WT
H2O
M

图20

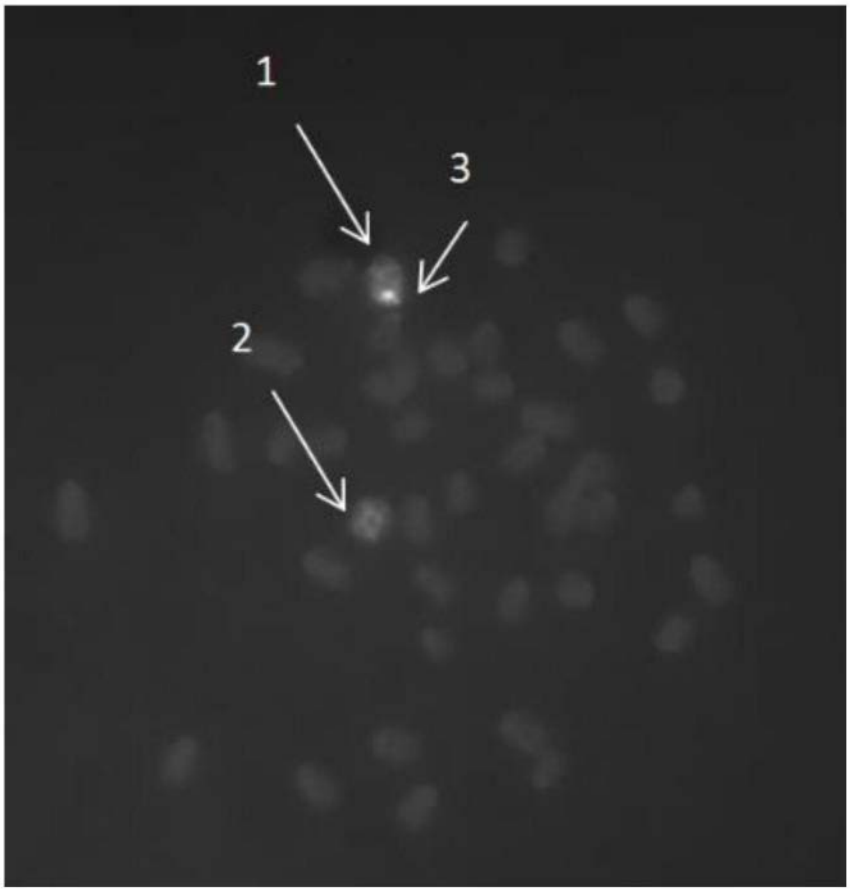


图21

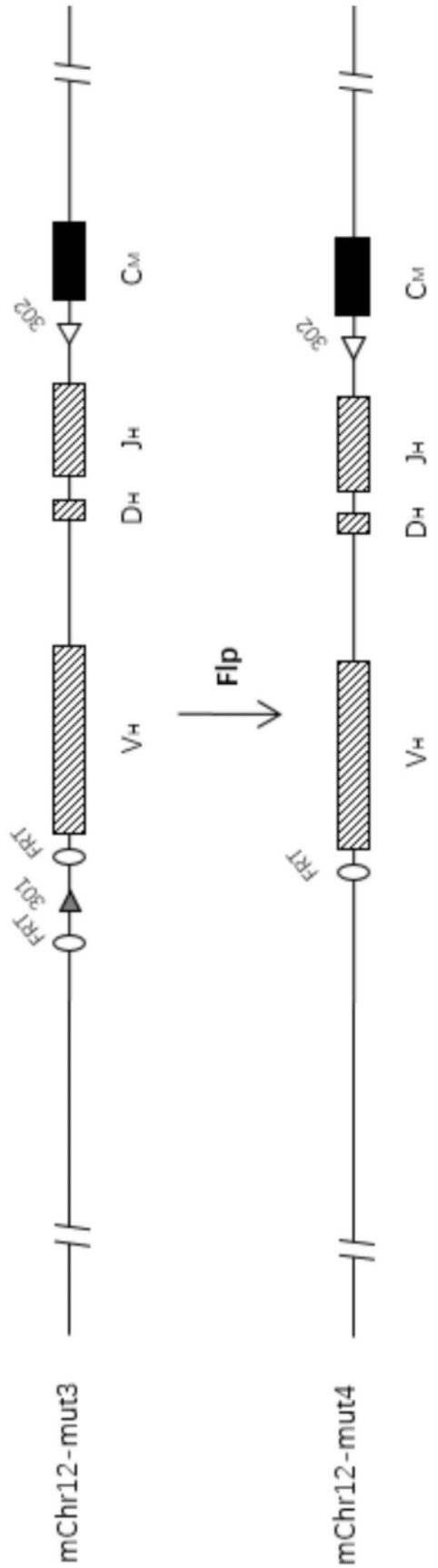


图22

图23

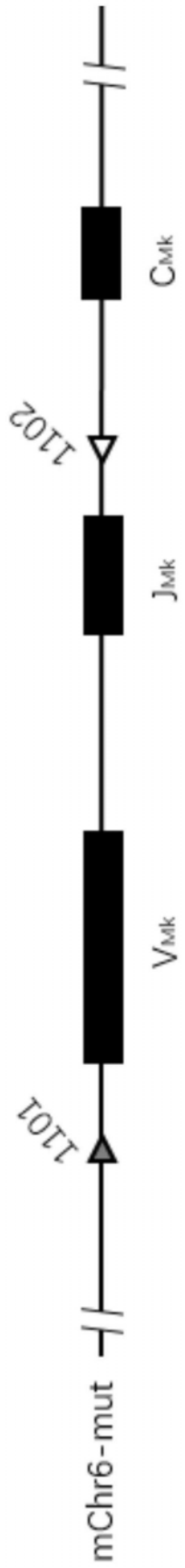


图24A

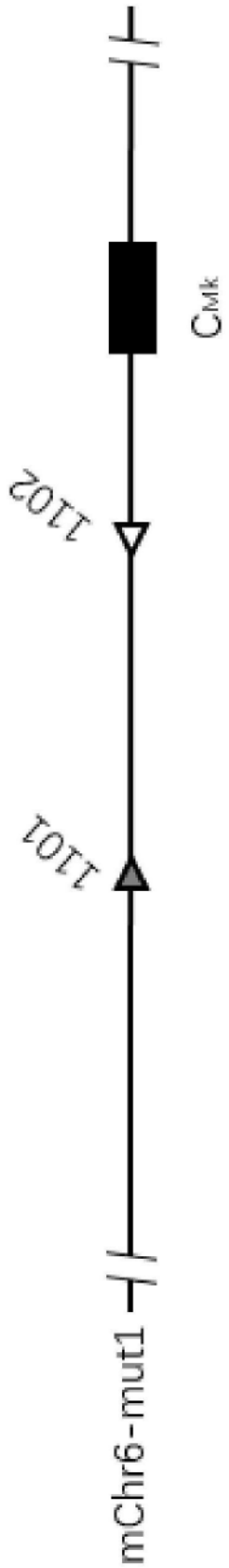


图24B

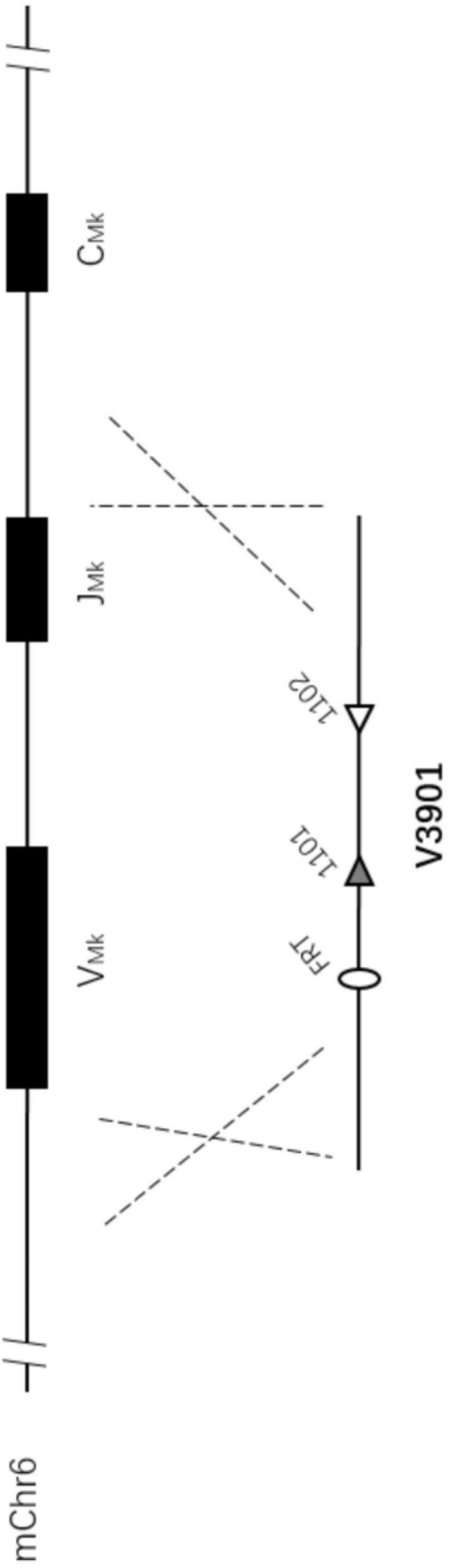


图25

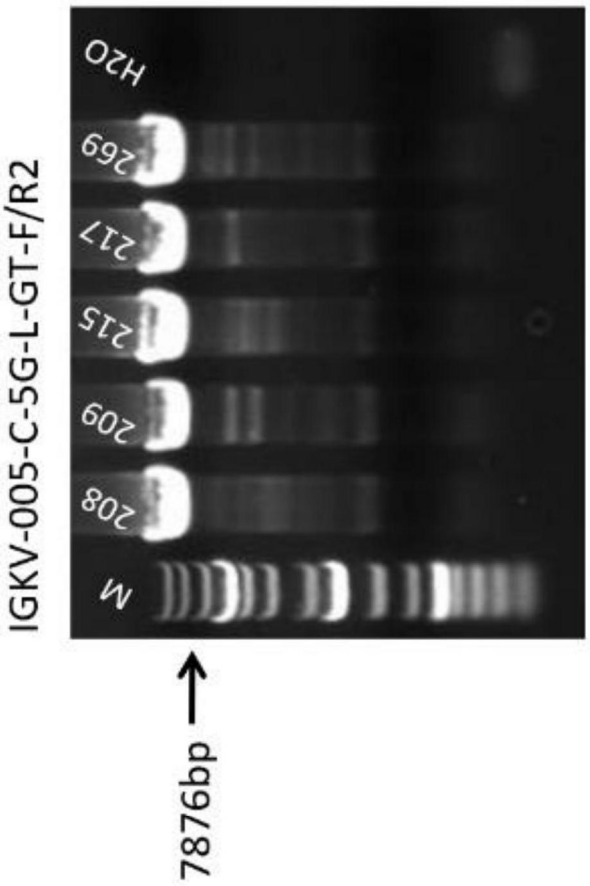


图26

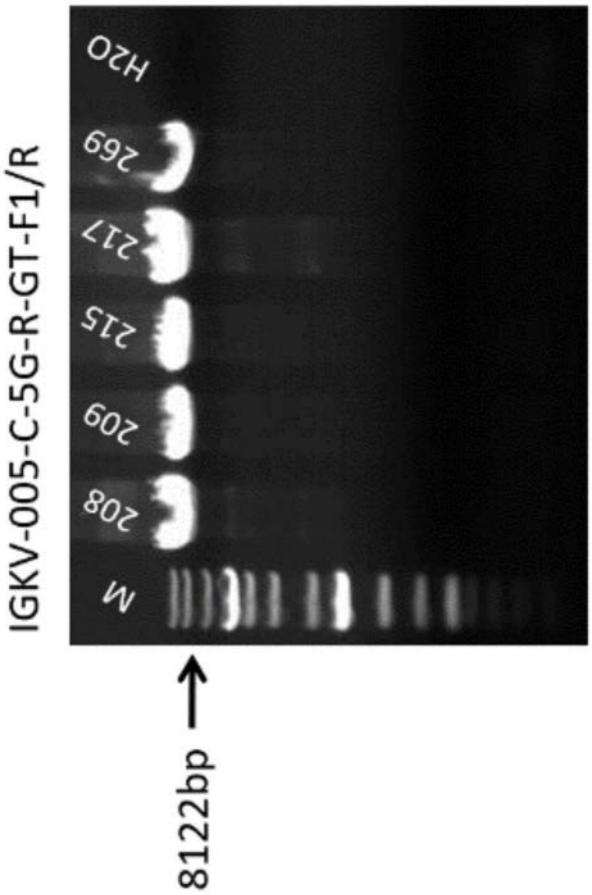


图27

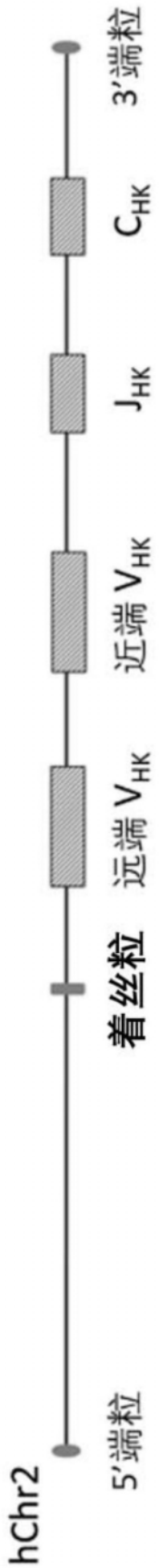


图28

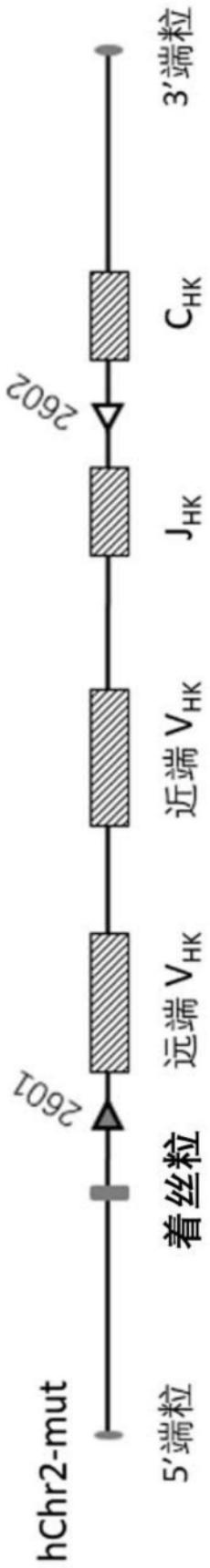


图29

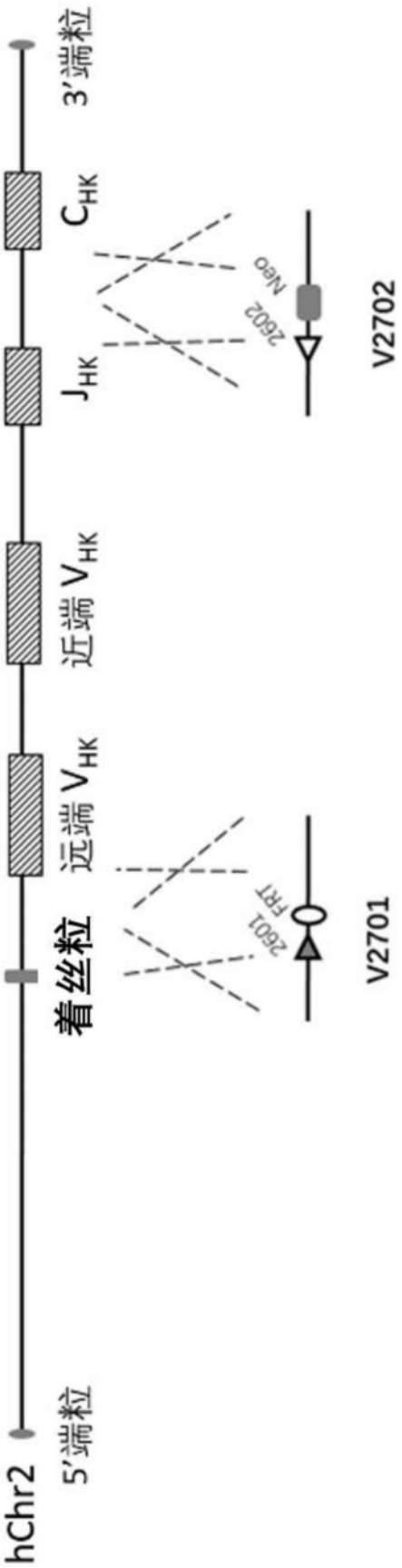

hChr2
5′端粒
着丝粒
远端 V_{HK}
近端 V_{HK}
J_{HK}
C_{HK}
3′端粒
2601
FRT
V2701
2602
Neo
V2702

图30

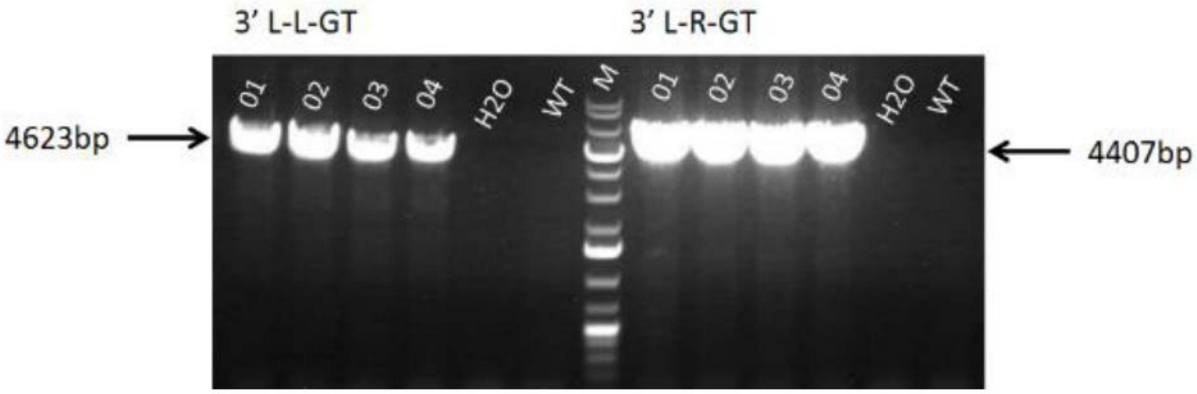


图31

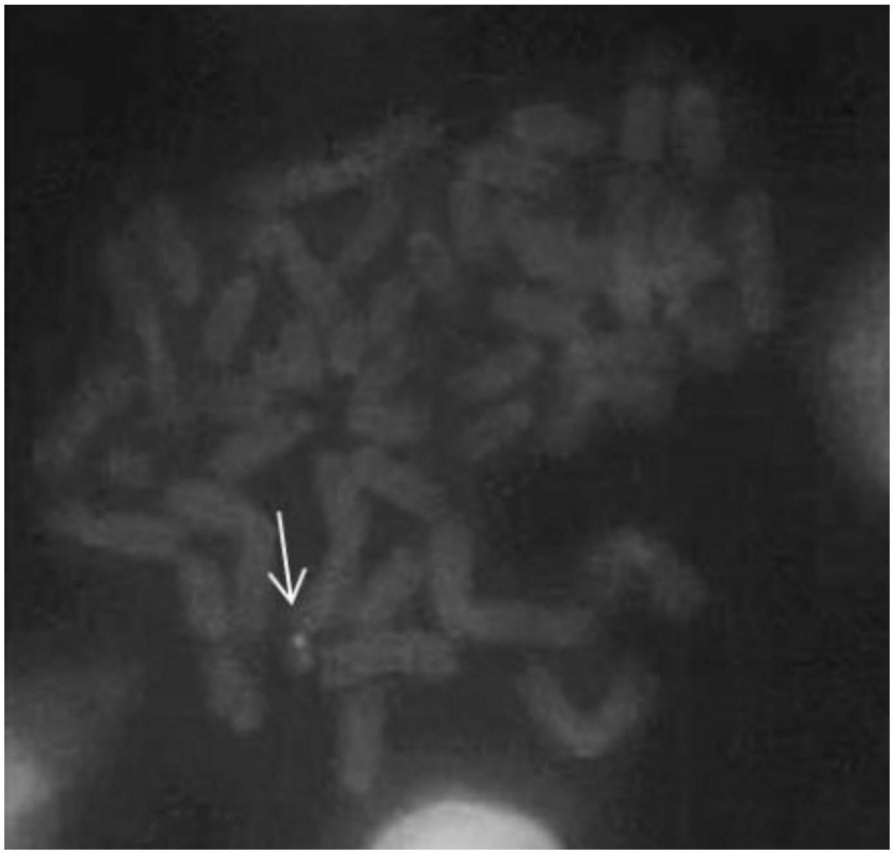


图32

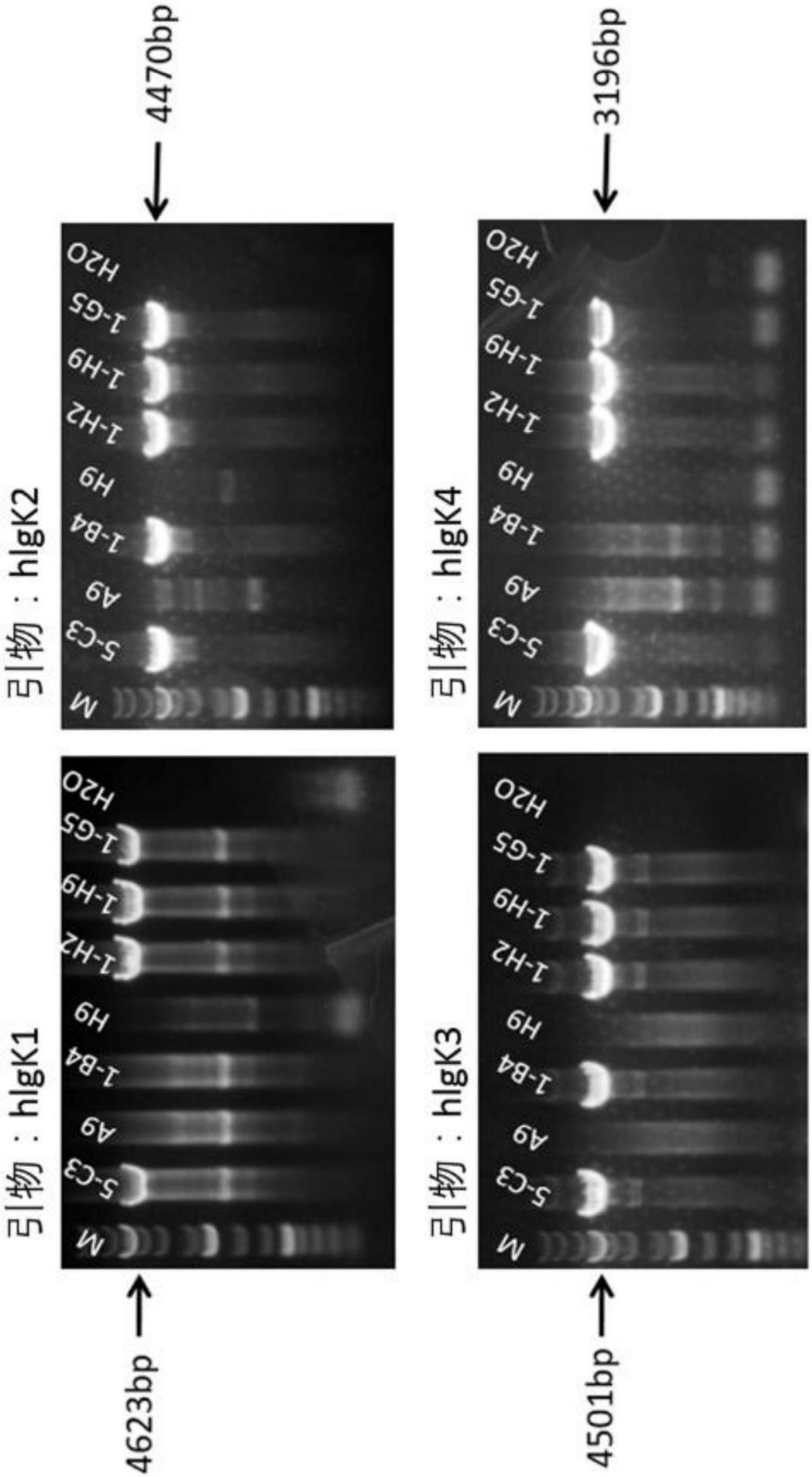

4470bp
3196bp
引物：hIgK2
引物：hIgK4
引物：hIgK1
引物：hIgK3
M
5-C3
A9
1-B4
H9
1-H2
1-H9
1-G5
H2O
4623bp
4501bp

图33

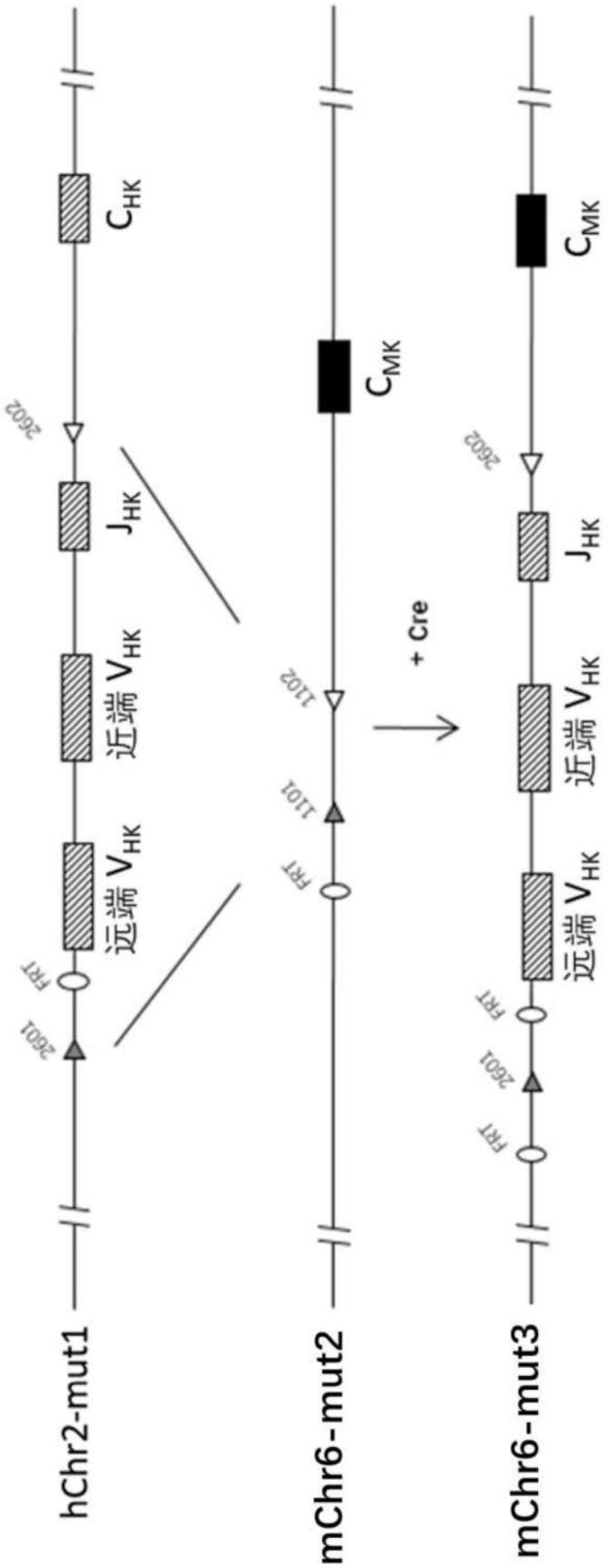

hChr2-mut1
mChr6-mut2
mChr6-mut3
+ Cre
C_{HK}
J_{HK}
近端 V_{HK}
远端 V_{HK}
C_{MK}
J_{HK}
近端 V_{HK}
远端 V_{HK}
C_{MK}
J_{HK}
近端 V_{HK}
远端 V_{HK}
2602
2601
FRT
1102
1101
FRT
2602
2601
FRT

图34

图35

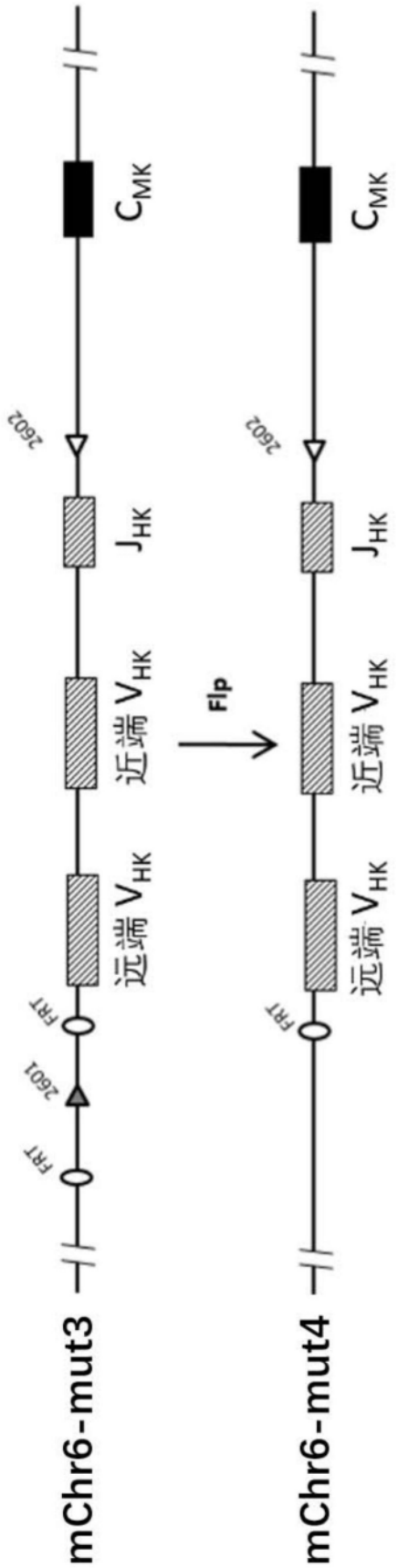

mChr6-mut3
FRT
2601
FRT
远端 V_{HK}
近端 V_{HK}
J_{HK}
2602
C_{MK}
Flp
mChr6-mut4
FRT
远端 V_{HK}
近端 V_{HK}
J_{HK}
2602
C_{MK}

图36

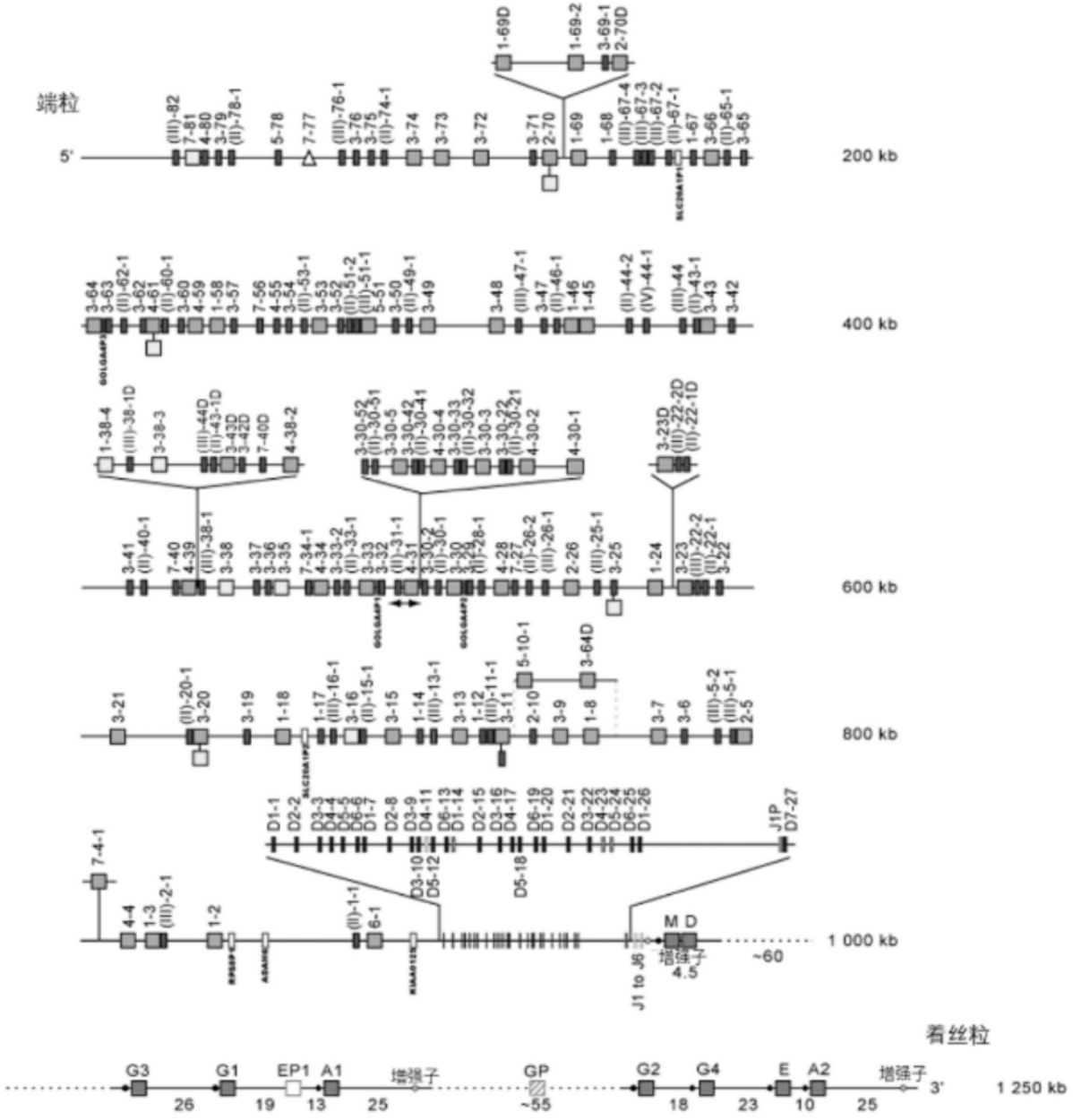

端粒
5'
200 kb
400 kb
600 kb
800 kb
1 000 kb
增强子
~60
看丝粒
G3
G1
EP1
A1
增强子
GP
G2
G4
E
A2
增强子
3'
1 250 kb
26
19
13
25
~55
18
23
10
25

图37

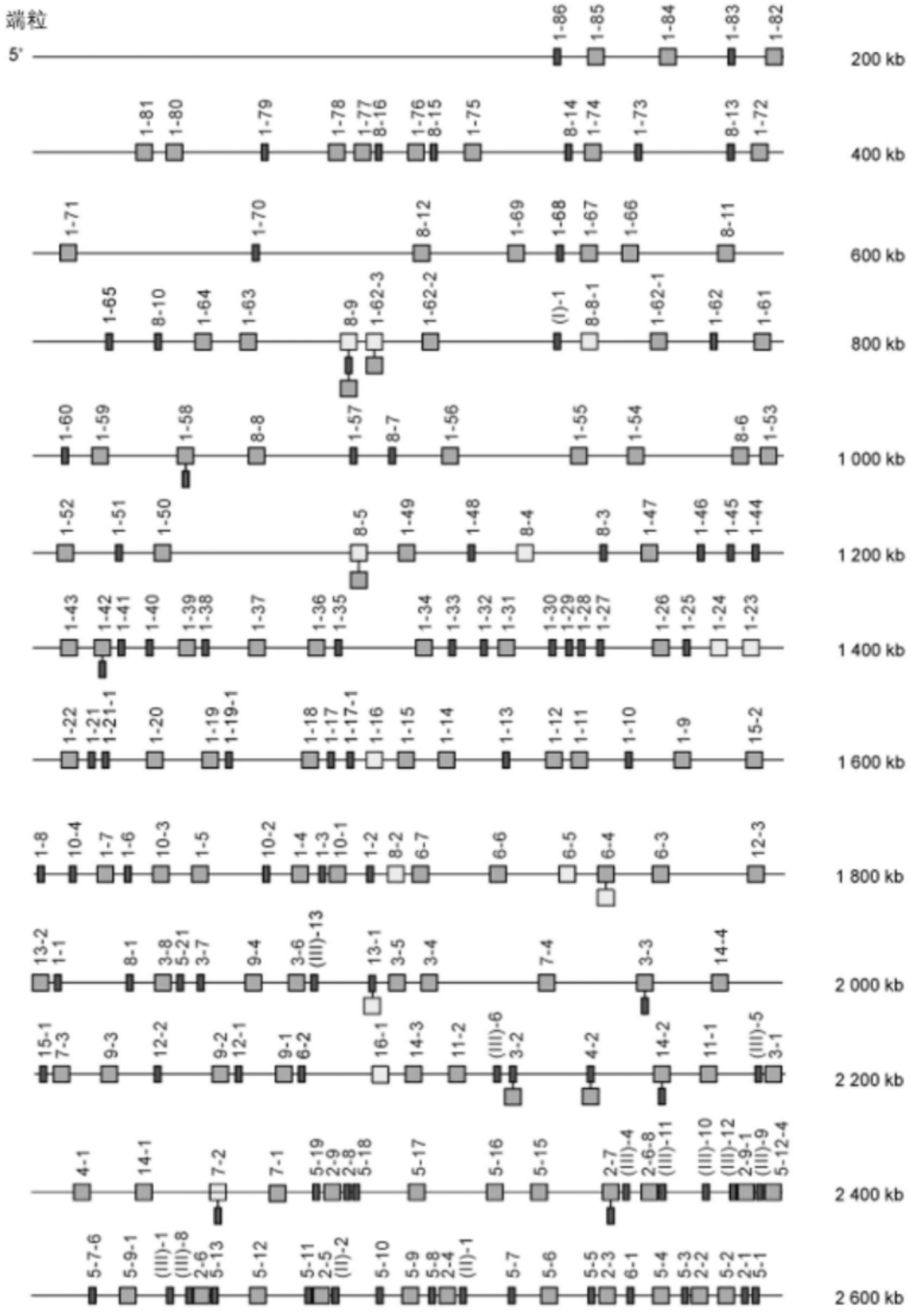

端粒
5'
200 kb
400 kb
600 kb
800 kb
1 000 kb
1 200 kb
1 400 kb
1 600 kb
1 800 kb
2 000 kb
2 200 kb
2 400 kb
2 600 kb

图38

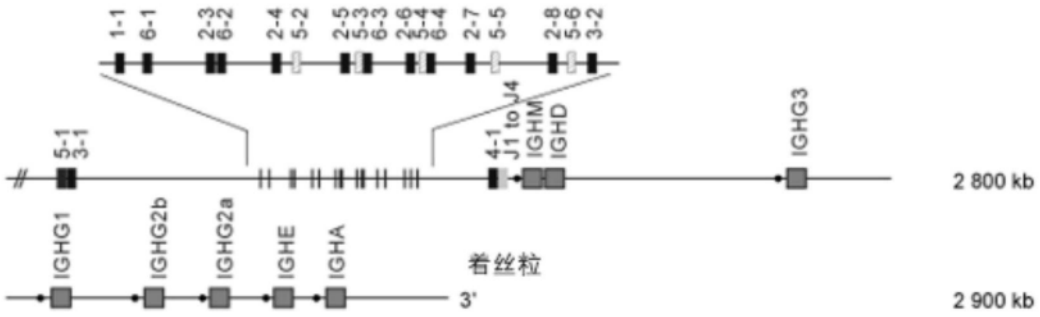

1-1
6-1
2-3
6-2
2-4
5-2
2-5
5-3
6-3
2-6
5-4
6-4
2-7
5-5
2-8
5-6
3-2
5-1
3-1
4-1
J1 to J4
IGHM
IGHD
IGHG3
2 800 kb
IGHG1
IGHG2b
IGHG2a
IGHE
IGHA
着丝粒
3'
2 900 kb

图38(续)

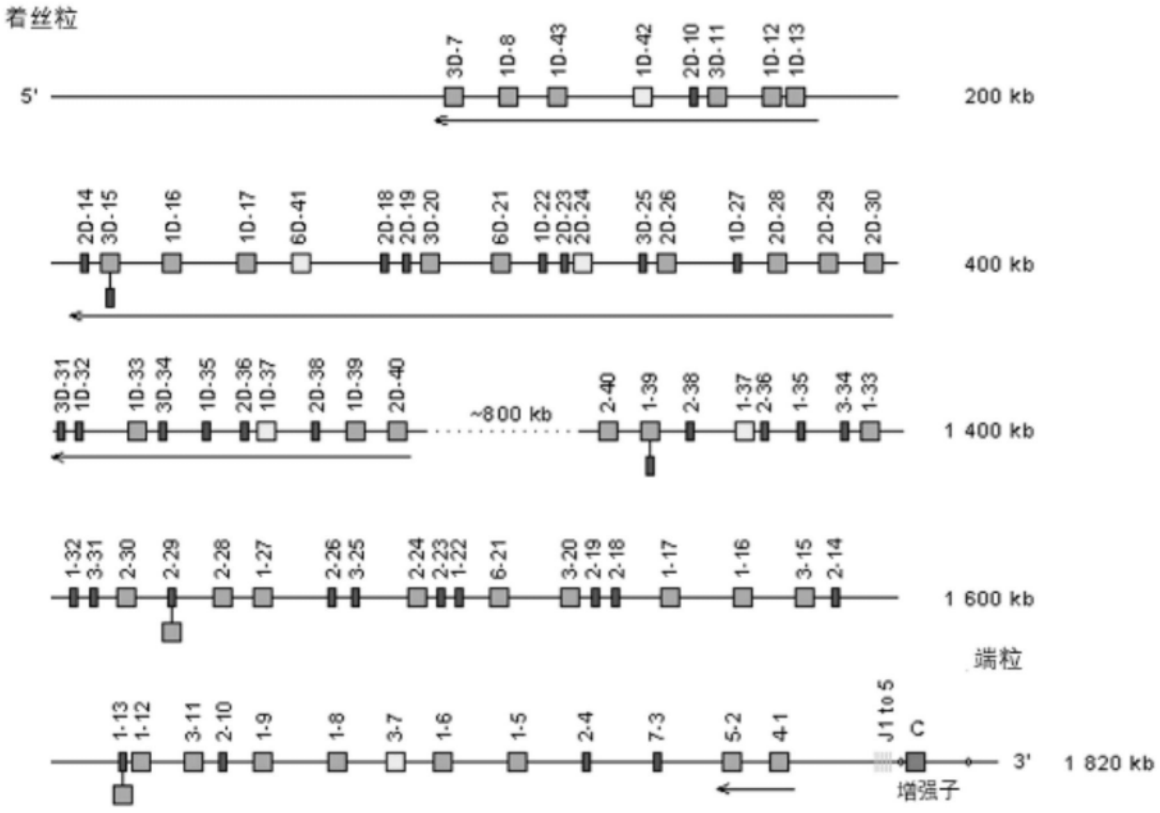

着丝粒
5'
3D-7
1D-8
1D-43
1D-42
2D-10
3D-11
1D-12
1D-13
200 kb
2D-14
3D-15
1D-16
1D-17
6D-41
2D-18
2D-19
3D-20
6D-21
1D-22
2D-23
2D-24
3D-25
2D-26
1D-27
2D-28
2D-29
2D-30
400 kb
3D-31
1D-32
1D-33
3D-34
1D-35
2D-36
1D-37
2D-38
1D-39
2D-40
~800 kb
2-40
1-39
2-38
1-37
2-36
1-35
3-34
1-33
1 400 kb
1-32
3-31
2-30
2-29
2-28
1-27
2-26
3-25
2-24
2-23
1-22
6-21
3-20
2-19
2-18
1-17
1-16
3-15
2-14
1 600 kb
端粒
1-13
1-12
3-11
2-10
1-9
1-8
3-7
1-6
1-5
2-4
7-3
5-2
4-1
J1 to 5
C
3'
1 820 kb
增强子

图39

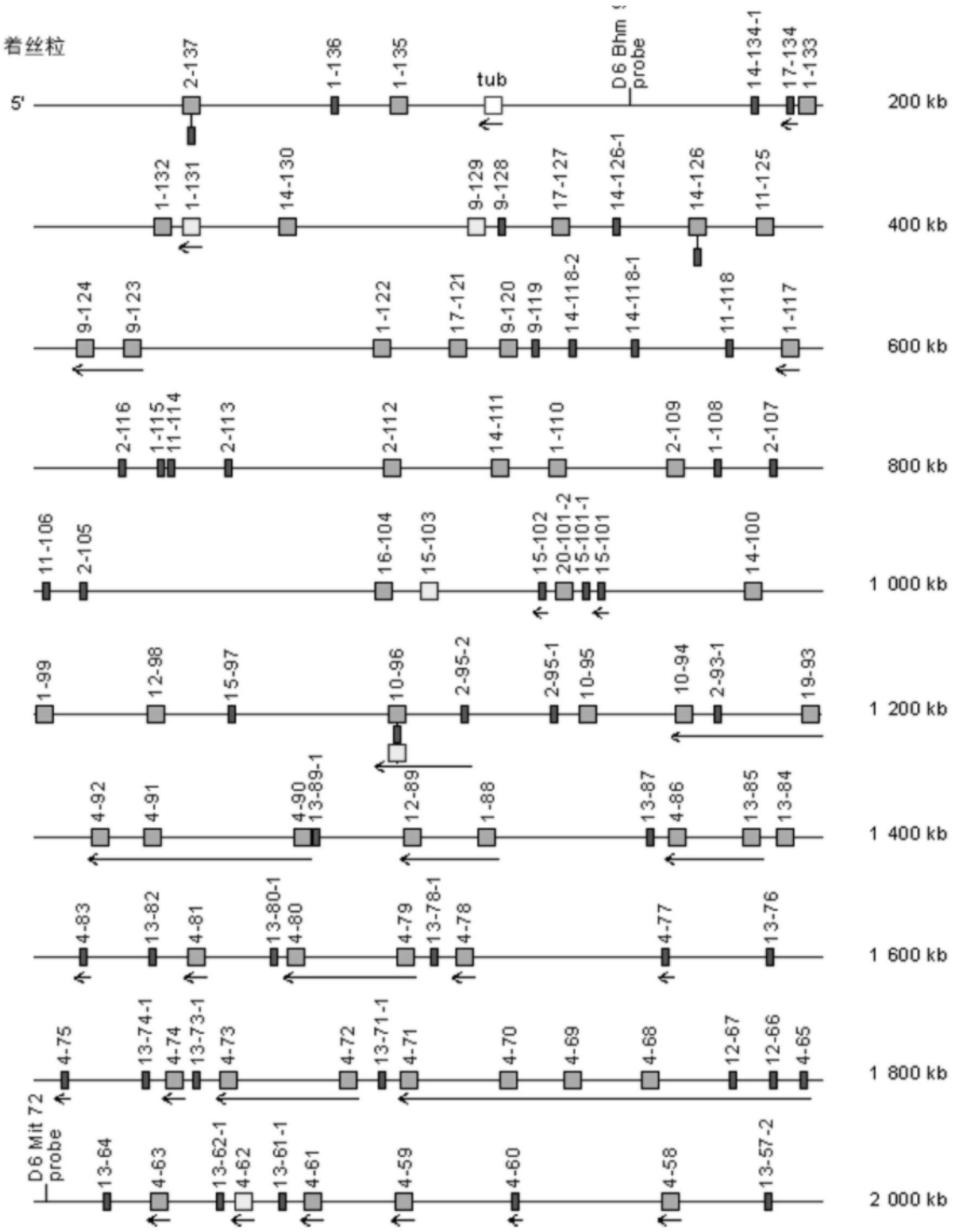

着丝粒
tub
D6 Bhm
probe
D6 Mit 72
probe
200 kb
400 kb
600 kb
800 kb
1 000 kb
1 200 kb
1 400 kb
1 600 kb
1 800 kb
2 000 kb

图40

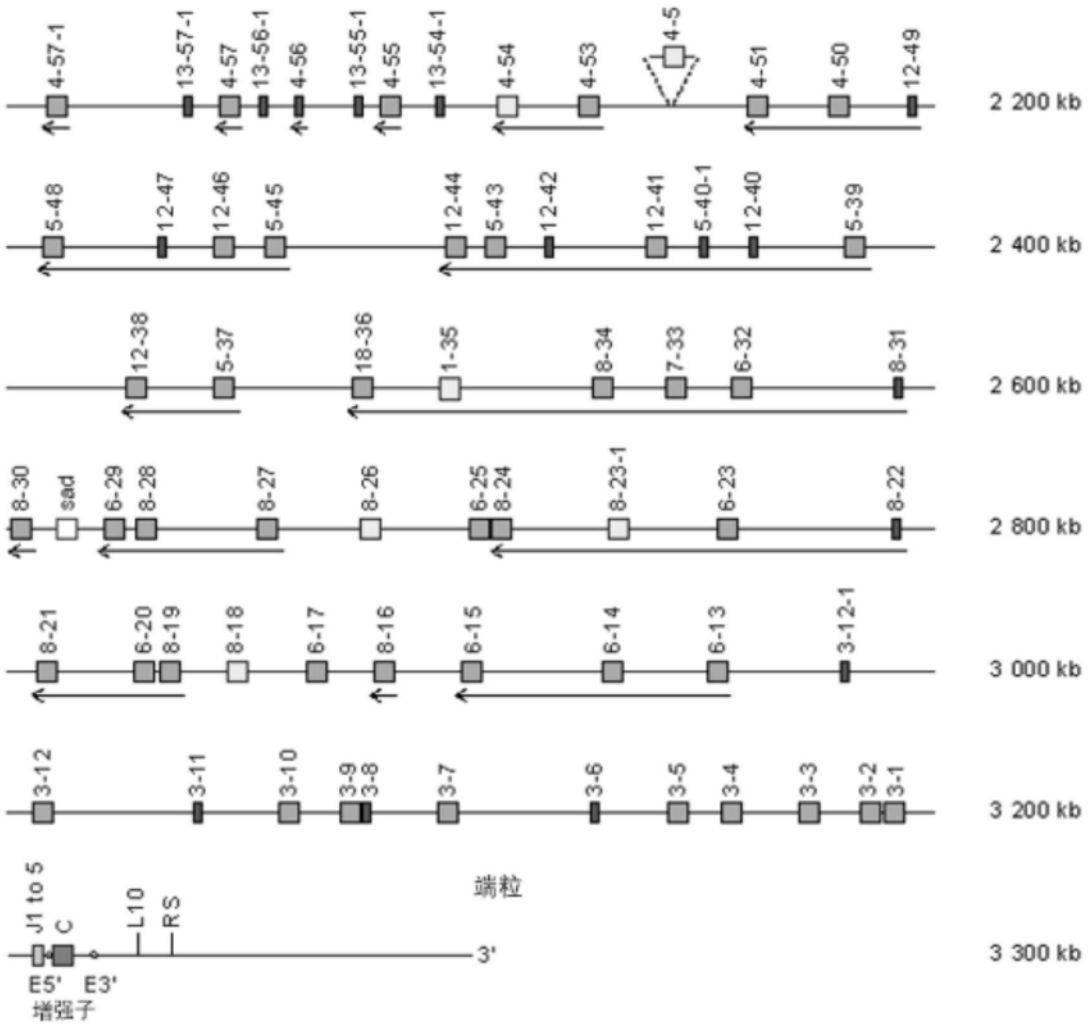

4-57-1
13-57-1
4-57
13-56-1
4-56
13-55-1
4-55
13-54-1
4-54
4-53
4-5
4-51
4-50
12-49
2 200 kb
5-48
12-47
12-46
5-45
12-44
5-43
12-42
12-41
5-40-1
12-40
5-39
2 400 kb
12-38
5-37
18-36
1-35
8-34
7-33
6-32
8-31
2 600 kb
8-30
sad
6-29
8-28
8-27
8-26
6-25
8-24
8-23-1
6-23
8-22
2 800 kb
8-21
6-20
8-19
8-18
6-17
8-16
6-15
6-14
6-13
3-12-1
3 000 kb
3-12
3-11
3-10
3-9
3-8
3-7
3-6
3-5
3-4
3-3
3-2
3-1
3 200 kb
J1 to 5
C
L10
RS
端粒
3'
E5'
E3'
增强子
3 300 kb

图40(续)

IMGT						NCBI		
基因	定位	方向 Orientation	基因座	位置	登录号	位置	基因在染色体上的位置	登录号	基因在序列中的位置
IGHA2	14q32.33	REV	IGH		J00221	1227..1618	105124322..105124713	NT_026437.11	87054322..87054713
IGHA2	14q32.33	REV	IGH		J00221	684..1004	105124936..105125256	NT_026437.11	87054936..87055256
IGHA2	14q32.33	REV	IGH		J00221	164..469	105125474..105125776	NT_026437.11	87055474..87055776
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	2540..2868	105137451..105137779	NT_026437.11	87067451..87067779
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	2133..2456	105137863..105138186	NT_026437.11	87067863..87068186
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	1726..2046	105138273..105138593	NT_026437.11	87068273..87068593
IGHE	14q32.33	REV	IGH		J00222	1210..1518	105138801..105139109	NT_026437.11	87068801..87069109
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	1481..1800	105161861..105162180	NT_026437.11	87091861..87092180
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	1054..1383	105162278..105162607	NT_026437.11	87092278..87092607
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	900..935	105162726..105162761	NT_026437.11	87092726..87092761
IGHG4	14q32.33	REV	IGH		K01316	216..509	105163154..105163447	NT_026437.11	87093154..87093447
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	1480..1799	105180588..105180907	NT_026437.11	87110588..87110907
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	1056..1382	105181005..105181331	NT_026437.11	87111005..87111331
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	902..937	105181450..105181485	NT_026437.11	87111450..87111485
IGHG2	14q32.33	REV	IGH		J00230	216..509	105181878..105182171	NT_026437.11	87111878..87112171
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	1474..1790	105205635..105205947	NT_026437.11	87135635..87135947
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	1047..1376	105206045..105206374	NT_026437.11	87136045..87136374
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	878..928	105206493..105206543	NT_026437.11	87136493..87136543
IGHGP	14q32.33	REV	IGH		X06766	195..488	105206933..105207226	NT_026437.11	87136933..87137226
IGHA1	14q32.33	REV	IGH		J00220	1244..1635	105244553..105244944	NT_026437.11	87174553..87174944
IGHA1	14q32.33	REV	IGH		J00220	662..1021	105245167..105245526	NT_026437.11	87175167..87175526
IGHA1	14q32.33	REV	IGH		J00220	142..447	105245741..105246046	NT_026437.11	87175741..87176046
IGHEP1	14q32.33	REV	IGH		J00223	849..1177	105259179..105259507	NT_026437.11	87189179..87189507
IGHEP1	14q32.33	REV	IGH		J00223	447..765	105259591..105259909	NT_026437.11	87189591..87189909
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	1481..1800	105278858..105279177	NT_026437.11	87208858..87209177
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	1055..1384	105279275..105279604	NT_026437.11	87209275..87209604
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	892..936	105279723..105279767	NT_026437.11	87209723..87209767
IGHG1	14q32.33	REV	IGH		J00228	210..503	105280159..105280452	NT_026437.11	87210159..87210452
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	2061..2380	105306622..105306941	NT_026437.11	87236622..87236941
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1634..1963	105307039..105307368	NT_026437.11	87237039..87237368
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1471..1515	105307487..105307531	NT_026437.11	87237487..87237531
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1283..1327	105307675..105307719	NT_026437.11	87237675..87237719
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	1095..1139	105307863..105307907	NT_026437.11	87237863..87237907

IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	901..951	105308051..105308101	NT_026437.11	87238051..87238101
IGHG3	14q32.33	REV	IGH		X03604	216..509	105308494..105308787	NT_026437.11	87238494..87238787
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02880	25..50	105375785..105375810	NT_026437.11	87305785..87305810
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02879	101..424	105377748..105378071	NT_026437.11	87307748..87308071
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02878	101..424	105378282..105378605	NT_026437.11	87308282..87308605
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02877	101..172	105379342..105379413	NT_026437.11	87309342..87309413
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02876	101..202	105382203..105382304	NT_026437.11	87312203..87312304
IGHD	14q32.33	REV	IGH		K02875	101..403	105382753..105383055	NT_026437.11	87312753..87313055
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	1708..2096	105391496..105391887	NT_026437.11	87321496..87321887
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	1212..1529	105392067..105392384	NT_026437.11	87322067..87322384
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	631..966	105392630..105392965	NT_026437.11	87322630..87322965
IGHM	14q32.33	REV	IGH		X14940	233..544	105393056..105393367	NT_026437.11	87323056..87323367
IGHJ6	14q32.33	REV	IGH	960175..960275	J00256	2909..3009	105400453..105400553	NT_026437.11	87330453..87330553
IGHJ3P	14q32.33	REV	IGH	959970..960057	J00256	2709..2797	105400671..105400758	NT_026437.11	87330671..87330758
IGHJ5	14q32.33	REV	IGH	959571..959659	J00256	2317..2404	105401084..105401156	NT_026437.11	87331069..87331141
IGHJ4	14q32.33	REV	IGH	959172..959258	J00256	1873..1959	105401470..105401556	NT_026437.11	87331470..87331556
IGHJ3	14q32.33	REV	IGH	958789..958886	J00256	1498..1586	105401865..105401930	NT_026437.11	87331842..87331907
IGHJ2P	14q32.33	REV	IGH	958583..958682	J00256	1284..1380	105402046..105402145	NT_026437.11	87332046..87332145
IGHJ2	14q32.33	REV	IGH	958184..958274	J00256	893..984	105402454..105402544	NT_026437.11	87332454..87332544
IGHJ1	14q32.33	REV	IGH	957977..958066	J00256	686..774	105402662..105402751	NT_026437.11	87332662..87332751
IGHD7-27	14q32.33	REV	IGH	957884..957950	J00256	592..659	105402781..105402845	NT_026437.11	87332778..87332842
IGHJ1P	14q32.33	REV	IGH	957759..957849	J00256	467..557	105402879..105402969	NT_026437.11	87332879..87332969
IGHD1-26	14q32.33	REV	IGH	942598..942673	X97051	72141..72216	105417909..105417984	NT_026437.11	87347909..87347984
IGHD6-25	14q32.33	REV	IGH	942095..942168	X97051	71638..71711	105418414..105418487	NT_026437.11	87348414..87348487
IGHD5-24	14q32.33	REV	IGH	939730..939805	X97051	69272..69347	105420778..105420853	NT_026437.11	87350778..87350853
IGHD4-23	14q32.33	REV	IGH	938765..938839	X97051	68306..68380	105421745..105421819	NT_026437.11	87351745..87351819
IGHD3-22	14q32.33	REV	IGH	937592..937678	X93616	2..88	105422906..105422992	NT_026437.11	87352906..87352992
IGHD2-21	14q32.33	REV	IGH	935075..935158	J00235	1..63	105425447..105425509	NT_026437.11	87355447..87355509
IGHD1-20	14q32.33	REV	IGH	932446..932518	X97051	61987..62059	105428066..105428138	NT_026437.11	87358066..87358138
IGHD6-19	14q32.33	REV	IGH	931934..932010	X97051	61475..61551	105428574..105428650	NT_026437.11	87358574..87358650
IGHD5-18	14q32.33	REV	IGH	930093..930168	X13972	2885..2960	105430417..105430492	NT_026437.11	87360417..87360492
IGHD4-17	14q32.33	REV	IGH	929131..929202	X97051	58671..58742	105431383..105431454	NT_026437.11	87361383..87361454
IGHD3-16	14q32.33	REV	IGH	927984..928076	X93614	2..94	105432511..105432601	NT_026437.11	87362511..87362601
IGHD2-15	14q32.33	REV	IGH	925668..925753	J00234	1..66	105434853..105434918	NT_026437.11	87364853..87364918
IGHD1-14	14q32.33	REV	IGH	923001..923073	X13972	14490..14562	105437513..105437585	NT_026437.11	87367513..87367585
IGHD6-13	14q32.33	REV	IGH	922493..922569	X13972	13983..14059	105438017..105438093	NT_026437.11	87368017..87368093
IGHD5-12	14q32.33	REV	IGH	920984..921062	X13972	12478..12556	105439524..105439602	NT_026437.11	87369524..87369602
IGHD4-11	14q32.33	REV	IGH	920024..920095	X13972	11522..11593	105440491..105440562	NT_026437.11	87370491..87370562
IGHD3-10	14q32.33	REV	IGH	919128..919214	X13972	10631..10717	105441372..105441458	NT_026437.11	87371372..87371458

IGHD3-9	14q32.33	REV	IGH	918944..919030	X13972	10447..10533	105441556..105441642	NT_026437.11	87371556..87371642
IGHD2-8	14q32.33	REV	IGH	916414..916500	X13972	7921..8007	105444086..105444172	NT_026437.11	87374086..87374172
IGHD1-7	14q32.33	REV	IGH	913731..913803	X13972	5238..5310	105446783..105446855	NT_026437.11	87376783..87376855
IGHD6-6	14q32.33	REV	IGH	913227..913300	X13972	4734..4807	105447287...105447359	NT_026437.11	87377286..87377358
IGHD5-5	14q32.33	REV	IGH	911378..911453	X97051	59633..59708	105449133..105449208	NT_026437.11	87379133..87379208
IGHD4-4	14q32.33	REV	IGH	910417..910488	X13972	1924..1995	105450098..105450169	NT_026437.11	87380098..87380169
IGHD3-3	14q32.33	REV	IGH	909265..909351	X13972	776..862	105451235..105451321	NT_026437.11	87381235..87381321
IGHD2-2	14q32.33	REV	IGH	906798..906884	J00232	1..66	105453723..105453788	NT_026437.11	87383723..87383788
IGHD1-1	14q32.33	REV	IGH	904136..904208	X97051	33686..33758	105456378..105456450	NT_026437.11	87386378..87386450
IGHV4-30-2	14q32.33	REV	IGH		L10089	1..297	105476885..105476952	NT_026437.11	87406660..87406727
IGHV4-4	14q32.33	REV	IGH	811002..811472	L10098	1..325	105476906..105476984	NT_026437.11	87406894..87406972
IGHV(II)-1-1	14q32.33	REV	IGH	878294..878475	AB019441	78294..78475	105482111..105482292	NT_026437.11	87412111..87412292
IGHV3-21	14q32.33	REV	IGH	597417..597909	AB019439	197417..197909	106282330..106282428	NT_026437.11	88211936..88212034
IGHV1-2	14q32.33	REV	IGH	836435..836911	X07448	126..603	105523675..105524151	NT_026437.11	87453675..87454151
IGHV3-41	14q32.33	REV	IGH	390047..390538	M99670	189..680	106119868..106120165	NT_026437.11	88049868..88050165
IGHV1-3	14q32.33	REV	IGH	817860..818336	X62109	21..497	105542250..105542726	NT_026437.11	87472250..87472726
IGHV4-59	14q32.33	REV	IGH	205856..206326	AB019438	1..291	106154301..106154591	NT_026437.11	88084301..88084591
IGHV2-5	14q32.33	REV	IGH	794964..795446	X62111	71..553	105565140..105565622	NT_026437.11	87495140..87495622
IGHV(III)-5-1	14q32.33	REV	IGH	793545..793643	AB019440	193545..193643	105566943..105567041	NT_026437.11	87496943..87497041
IGHV(III)-5-2	14q32.33	REV	IGH	787450..787749	AB019440	187450..187749	105572837..105573136	NT_026437.11	87502837..87503136
IGHV3-6	14q32.33	REV	IGH	777310..777803	M99650	13..506	105582783..105583276	NT_026437.11	87512783..87513276
IGHV3-7	14q32.33	REV	IGH	770688..771182	M99649	184..678	105589404..105589898	NT_026437.11	87519404..87519898
IGHV6-1	14q32.33	REV	IGH	883485..883971	J04097	337..823	105763091..105763163	NT_026437.11	87692677..87692749
IGHV3-9	14q32.33	REV	IGH	736812..737296	M99651	132..616	105623290..105623774	NT_026437.11	87553290..87553774
IGHV2-10	14q32.33	REV	IGH	729561..730040	M99647	71..550	105630549..105631025	NT_026437.11	87560549..87561025
IGHV3-11	14q32.33	REV	IGH	715861..716349	M99652	48..536	105644237..105644725	NT_026437.11	87574237..87574725
IGHV(III)-11-1	14q32.33	REV	IGH	712240..712656	AB019440	112240..112656	105647930..105648346	NT_026437.11	87577930..87578346
IGHV1-12	14q32.33	REV	IGH	710238..710527	X92210	191..628	105649911..105650348	NT_026437.11	87579911..87580348
IGHV3-13	14q32.33	REV	IGH	702954..703445	X92217	2..493	105657141..105657632	NT_026437.11	87587141..87587632
IGHV(III)-13-1	14q32.33	REV	IGH	690249..690586	AB019440	90249..90586	105670000..105670337	NT_026437.11	87600000..87600337
IGHV1-14	14q32.33	REV	IGH	686675..687009	AB019440	86675..87009	105673577..105673911	NT_026437.11	87603577..87603911
IGHV3-15	14q32.33	REV	IGH	678769..679269	X92216	2..502	105681317..105681817	NT_026437.11	87611317..87611817
IGHV(II)-15-1	14q32.33	REV	IGH	669050..669320	AB019440	69050..69320	105691266..105691536	NT_026437.11	87621266..87621536
IGHV3-16	14q32.33	REV	IGH	667196..667688	M99655	30..522	105692898..105693390	NT_026437.11	87622898..87623390
IGHV(III)-16-1	14q32.33	REV	IGH	661801..662105	AB019440	61801..62105	105698481..105698785	NT_026437.11	87628481..87628785
IGHV1-17	14q32.33	REV	IGH	658074..658549	M99640	45..521	105702037..105702512	NT_026437.11	87632037..87632512
IGHV1-18	14q32.33	REV	IGH	647544..648019	M99641	47..522	105712567..105713042	NT_026437.11	87642567..87643042
IGHV3-19	14q32.33	REV	IGH	635792..636211	M99656	211..630	105724375..105724794	NT_026437.11	87654375..87654794
IGHV3-20	14q32.33	REV	IGH	621508..622001	M99657	10..504	105738585..105739078	NT_026437.11	87668585..87669078

IGHV(II)-20-1	14q32.33	REV	IGH	619576..620076	AB019440	19576..20076	105740510..105741010	NT_026437.11	87670510..87671010
IGHV1-58	14q32.33	REV	IGH	210733..211209	M29809	151..627	106149377...106149853	NT_026437.11	88079377..88079853
IGHV3-22	14q32.33	REV	IGH	574720..575220	M99659	85..585	105785366..105785866	NT_026437.11	87715366..87715866
IGHV(II)-22-1	14q32.33	REV	IGH	569320..569588	AB019439	169320..169588	105790998..105791266	NT_026437.11	87720998..87721266
IGHV(III)-22-2	14q32.33	REV	IGH	568065..568262	AB019439	168065..168262	105792324..105792521	NT_026437.11	87722324..87722521
IGHV3-23	14q32.33	REV	IGH	563887..564381	M99660	10..504	105796205..105796699	NT_026437.11	87726205..87726699
IGHV1-24	14q32.33	REV	IGH	555962..556438	M99642	68..544	105804148..105804624	NT_026437.11	87734148..87734624
IGHV3-25	14q32.33	REV	IGH	543468..543960	M99661	78..570	105816626..105817118	NT_026437.11	87746626..87747118
IGHV(III)-25-1	14q32.33	REV	IGH	539140..539381	AB019439	139140..139381	105821205..105821446	NT_026437.11	87751205..87751446
IGHV2-26	14q32.33	REV	IGH	531449..531931	M99648	21..503	105828655..105829137	NT_026437.11	87758655..87759137
IGHV(III)-26-1	14q32.33	REV	IGH	523568..523874	AB019439	123568..123874	105836712..105837018	NT_026437.11	87766712..87767018
IGHV(II)-26-2	14q32.33	REV	IGH	518318..518630	AB019439	118318..118630	105841956..105842268	NT_026437.11	87771956..87772268
IGHV7-27	14q32.33	REV	IGH	515042..515455	M99643	65..526	105845083..105845544	NT_026437.11	87775083..87775544
IGHV4-31	14q32.33	REV	IGH	483897..484373	X05713	153..626	105851517..105851990	NT_026437.11	87781517..87781990
IGHV(II)-28-1	14q32.33	REV	IGH	503603..503855	AB019439	103603..103855	105856731..105856983	NT_026437.11	87786731..87786983
IGHV3-29	14q32.33	REV	IGH	501726..502222	AB019439	101726..102222	105858364..105858860	NT_026437.11	87788364..87788860
IGHV3-30	14q32.33	REV	IGH	498085..498577	M83134	1782..2274	105862009..105862501	NT_026437.11	87792009..87792501
IGHV(II)-30-1	14q32.33	REV	IGH	490666..490939	AB019439	90666..90939	105869647..105869920	NT_026437.11	87799647..87799920
IGHV3-30-2	14q32.33	REV	IGH	488784..489232	AB019439	88784..89232	105871354..105871802	NT_026437.11	87801354..87801802
IGHV4-28	14q32.33	REV	IGH	508596..509069	X05714	151..624	105549114..105549584	NT_026437.11	87479114..87479584
IGHV(II)-31-1	14q32.33	REV	IGH	478924..479232	AB019439	78924..79232	105881354..105881662	NT_026437.11	87811354..87811662
IGHV3-32	14q32.33	REV	IGH	477013..477509	AB019439	77013..77509	105883077..105883573	NT_026437.11	87813077..87813573
IGHV3-33	14q32.33	REV	IGH	473368..473860	AB019439	73368..73860	105886726..105887218	NT_026437.11	87816726..87817218
IGHV(II)-33-1	14q32.33	REV	IGH	465947..466220	AB019439	65947..66220	105894366..105894639	NT_026437.11	87824366..87824639
IGHV3-33-2	14q32.33	REV	IGH	464064..464512	AB019439	64064..64512	105896074..105896522	NT_026437.11	87826074..87826522
IGHV4-34	14q32.33	REV	IGH	459517..459988	AB019439	1..343	105900598..105900940	NT_026437.11	87830598..87830940
IGHV7-34-1	14q32.33	REV	IGH	455877..456349	AB019439	55877..56349	105904237..105904709	NT_026437.11	87834237..87834709
IGHV3-35	14q32.33	REV	IGH	443767..444259	M99666	140..632	105916327..105916819	NT_026437.11	87846327..87846819
IGHV3-36	14q32.33	REV	IGH	440399..440861	M99667	218..681	105919724..105920187	NT_026437.11	87849724..87850187
IGHV3-37	14q32.33	REV	IGH	436515..437003	M99668	10..489	105923586..105924071	NT_026437.11	87853586..87854071
IGHV3-38	14q32.33	REV	IGH	422685..423175	M99669	10..497	105937413..105937901	NT_026437.11	87867413..87867901
IGHV(III)-38-1	14q32.33	REV	IGH	415315..415645	AB019439	15315..15645	105944941..105945271	NT_026437.11	87874941..87875271
IGHV4-30-4	14q32.33	REV	IGH		Z14238	1..438	105876252..105876689	NT_026437.11	87806252..87806689
IGHV7-40	14q32.33	REV	IGH	408075..408316	M99644	164..497	105952270..105952592	NT_026437.11	87882270..87882592
IGHV(II)-40-1	14q32.33	REV	IGH	392620..392696	AB019438	192620..192696	105967890..105967966	NT_026437.11	87897890..87897966
IGHV3-30-3	14q32.33	REV	IGH		X92283	1..294	105970093..105970379	NT_026437.11	87900093..87900378
IGHV3-42	14q32.33	REV	IGH	369925..370362	M99671	1..461	105762906..105763129	NT_026437.11	87692869..87693089
IGHV3-43	14q32.33	REV	IGH	362897..363393	M99672	170..666	105997193..105997689	NT_026437.11	87927193..87927689
IGHV(II)-43-1	14q32.33	REV	IGH	360618..360826	AB019438	160618..160826	105999760..105999968	NT_026437.11	87929760..87929968

IGHV(III)-44	14q32.33	REV	IGH	355142..355318	M99673	62..511	106005056..106005444	NT_026437.11	87935056..87935444
IGHV(IV)-44-1	14q32.33	REV	IGH	343764..344231	AB019438	143764..144231	106016355..106016822	NT_026437.11	87946355..87946822
IGHV(II)-44-2	14q32.33	REV	IGH	339146..339382	AB019438	136146..139382	106021204..106024440	NT_026437.11	87951204..87954440
IGHV1-45	14q32.33	REV	IGH	326175..326651	X92209	2..478	106033935..106034411	NT_026437.11	87963935..87964411
IGHV1-46	14q32.33	REV	IGH	322057..322533	X92343	153..629	106038053..106038529	NT_026437.11	87968053..87968529
IGHV(II)-46-1	14q32.33	REV	IGH	317614..317771	AB019438	117614..117771	106042815..106042972	NT_026437.11	87972815..87972972
IGHV3-47	14q32.33	REV	IGH	314580..315074	Z18900	1..291	106045553..106045843	NT_026437.11	87975553..87975843
IGHV(III)-47-1	14q32.33	REV	IGH	302103..302406	AB019438	102103..102406	106058180..106058483	NT_026437.11	87988180..87988483
IGHV3-48	14q32.33	REV	IGH	295274..295768	M99675	174..668	106064818..106065312	NT_026437.11	87994818..87995312
IGHV3-49	14q32.33	REV	IGH	276144..276644	M99676	224..724	106083946..106084442	NT_026437.11	88013946..88014442
IGHV(II)-49-1	14q32.33	REV	IGH	268955..269225	AB019438	68955..69225	106091361..106091631	NT_026437.11	88021361..88021631
IGHV3-50	14q32.33	REV	IGH	266998..267453	M99677	10..283	106093318..106093588	NT_026437.11	88023316..88023585
IGHV5-51	14q32.33	REV	IGH	254379..254853	M99686	168..641	106105734..106106207	NT_026437.11	88035734..88036207
IGHV(III)-51-1	14q32.33	REV	IGH	249747..250053	AB019438	49747..50053	106110533..106110839	NT_026437.11	88040533..88040839
IGHV(II)-51-2	14q32.33	REV	IGH	248581..248843	AB019438	48581..48843	106111743..106112005	NT_026437.11	88041743..88042005
IGHV3-52	14q32.33	REV	IGH	246731..247220	M99678	212..701	106113366..106113855	NT_026437.11	88043366..88043855
IGHV3-53	14q32.33	REV	IGH	240421..240910	M99679	38..527	106282134..106282436	NT_026437.11	88212134..88212436
IGHV(II)-53-1	14q32.33	REV	IGH	233605..233874	AB019438	33605..33874	106126712..106126981	NT_026437.11	88056712..88056981
IGHV3-54	14q32.33	REV	IGH	231746..232232	M99680	147..631	106128356..106128840	NT_026437.11	88058356..88058840
IGHV4-55	14q32.33	REV	IGH	226980..227454	M99685	230..704	106133132..106133606	NT_026437.11	88063132..88063606
IGHV7-56	14q32.33	REV	IGH	223335..223808	M29810	136..429	106136958..106137251	NT_026437.11	88066958..88067251
IGHV3-57	14q32.33	REV	IGH	214314..214658	M29815	7..568	106146106..106146421	NT_026437.11	88076062..88076381
IGHV1-8	14q32.33	REV	IGH	750026..750503	M99637	58..535	105610083..105610560	NT_026437.11	87540083..87540560
IGHV4-39	14q32.33	REV	IGH	411486..411963	AB019439	1..328	105948662..105948989	NT_026437.11	87878662..87878989
IGHV3-60	14q32.33	REV	IGH	201883..202375	AB019438	1883..2375	106158211..106158703	NT_026437.11	88088211..88088703
IGHV(II)-60-1	14q32.33	REV	IGH	195563..195869	AB019437	195563..195831	106164755..106165023	NT_026437.11	88094755..88095023
IGHV4-61	14q32.33	REV	IGH	193980..194456	M29811	151..628	106166130..106166606	NT_026437.11	88096130..88096606
IGHV3-62	14q32.33	REV	IGH	189953..190447	AB019437	189953..190447	106170139..106170633	NT_026437.11	88100139..88100633
IGHV(II)-62-1	14q32.33	REV	IGH	182749..183060	AB019437	182749..183060	106177526..106177837	NT_026437.11	88107526..88107837
IGHV3-63	14q32.33	REV	IGH	180846..181313	M99681	10..506	106179251..106179740	NT_026437.11	88109251..88109740
IGHV3-64	14q32.33	REV	IGH	175347..175841	M99682	78..575	106184745..106185242	NT_026437.11	88114745..88115242
IGHV3-65	14q32.33	REV	IGH	166993..167487	Z27503	1..301	106193140..106193440	NT_026437.11	88123140..88123440
IGHV(III)-2-1	14q32.33	REV	IGH	821563..821903	AB019441	21563..21903	105538683..105539023	NT_026437.11	87468683..87469023
IGHV(II)-65-1	14q32.33	REV	IGH	161481..161753	AB019437	161481..161753	106198833..106199105	NT_026437.11	88128833..88129105
IGHV3-66	14q32.33	REV	IGH	158060..158549	X92218	2..491	106202037..106202526	NT_026437.11	88132037..88132526
IGHV1-67	14q32.33	REV	IGH	152482..152960	AB019437	1..434	106207626..106208059	NT_026437.11	88137626..88138059
IGHV(II)-67-1	14q32.33	REV	IGH	146982..147131	AB019437	146982..147131	106213455..106213604	NT_026437.11	88143455..88143604
IGHV(III)-67-2	14q32.33	REV	IGH	146324..146422	AB019437	146324..146422	106214164..106214262	NT_026437.11	88144164..88144262
IGHV(III)-67-3	14q32.33	REV	IGH	140636..140910	AB019437	140636..140910	106219676..106219950	NT_026437.11	88149676..88149950

IGHV(III)-67-4	14q32.33	REV	IGH	138127..138432	AB019437	138127..138432	106222154..106222459	NT_026437.11	88152154..88152459
IGHV1-68	14q32.33	REV	IGH	129238..129717	AB019437	129238..129717	106230869..106231348	NT_026437.11	88160869..88161348
IGHV1-69	14q32.33	REV	IGH	119174..119651	L22582	233..710	106240935..106241412	NT_026437.11	88170935..88171412
IGHV2-70	14q32.33	REV	IGH	110279..110761	L21969	1..444	106249864..106250307	NT_026437.11	88179864..88180307
IGHV3-71	14q32.33	REV	IGH	105684..106184	AB019437	105684..106184	106254402..106254902	NT_026437.11	88184402..88184902
IGHV3-72	14q32.33	REV	IGH	90150..90650	X92206	87..587	106269936..106270436	NT_026437.11	88199936..88200436
IGHV3-73	14q32.33	REV	IGH	78150..78650	X70197	1..300	105990226..105990526	NT_026437.11	87920226..87920526
IGHV3-74	14q32.33	REV	IGH	70412..70906	L33851	23..476	106289721..106290174	NT_026437.11	88219721..88220174
IGHV(II)-74-1	14q32.33	REV	IGH	59900..60068	AB019437	59900..60068	106300518..106300686	NT_026437.11	88230518..88230686
IGHV3-75	14q32.33	REV	IGH	57164..57672	Z27510	4..308	106302955..106303259	NT_026437.11	88232955..88233259
IGHV3-76	14q32.33	REV	IGH	53003..53492	AB019437	1..292	106307134..106307425	NT_026437.11	88237134..88237425
IGHV(III)-76-1	14q32.33	REV	IGH	49245..49551	AB019437	49245..49551	106311035..106311341	NT_026437.11	88241035..88241341
IGHV5-78	14q32.33	REV	IGH	29780..30228	X92213	592..1027	106330373..106330806	NT_026437.11	88260373..88260806
IGHV(II)-78-1	14q32.33	REV	IGH	15431..15744	AB019437	15431..15744	106344842..106345155	NT_026437.11	88274842..88275155
IGHV3-79	14q32.33	REV	IGH	13237..13688	AB019437	13237..13688	106346898..106347349	NT_026437.11	88276898..88277349
IGHV4-80	14q32.33	REV	IGH	8147..8547	AB019437	8147..8547	106352039..106352439	NT_026437.11	88282039..88282439
IGHV7-81	14q32.33	REV	IGH	6315..6790	AB019437	6315..6790	106353796..106354271	NT_026437.11	88283796..88284271
IGHV(III)-82	14q32.33	REV	IGH	1490..1781	AB019437	1490..1781	106358805..106359096	NT_026437.11	88288805..88289096

图41

IMGT 基因	染色体定位	方向 Orientation	NCBI 基因 ID	参照 GRCm38.p3 C57BL/6J	NCBI 基因在序列中的位置	方向顺序 Orientation sequence	MGI ID	MGI 代号
IGHV1-86	12F2 (62.59 cM)	REV	668599	NC_000078.6	116009659..116009954	-1	MGI:3645729	Ighv1-86
IGHV1-85	12F2 (62.59 cM)	REV	668597	NC_000078.6	116000028..116000321	-1	MGI:3645723	Ighv1-85
IGHV1-84	12F2 (62.59 cM)	REV	434609	NC_000078.6	115980702..115981134	-1	MGI:3644235	Ighv1-84
IGHV1-83	12F2 (62.59 cM)	REV	620140	NC_000078.6	115963817..115964109	-1	MGI:3648939	Ighv1-83
IGHV1-82	12F2 (62.59 cM)	REV	1.01E+08	NC_000078.6	115952538..115952831	-1	MGI:4439671	Ighv1-82
IGHV1-81	12F2 (62.59 cM)	REV	668591	NC_000078.6	115920279..115920572	-1	MGI:4439635	Ighv1-81
IGHV1-80	12F2 (62.59 cM)	REV	668589	NC_000078.6	115912344..115912637	-1	MGI:4439738	Ighv1-80
IGHV1-79	12F2 (62.59 cM)	REV	435331	NC_000078.6	115888096..115888389	-1	MGI:3648258	Ighv1-79
IGHV1-78	12F2 (62.59 cM)	REV	213570	NC_000078.6	115868773..115869066	-1	MGI:4439736	Ighv1-78
IGHV1-77	12F2 (62.59 cM)	REV	619994	NC_000078.6	115861867..115862160	-1	MGI:4439670	Ighv1-77
IGHV8-16	12F2 (62.59 cM)	REV	1.01E+08	NC_000078.6	115858008..115858301	-1	MGI:5434409	Ighv8-16
IGHV1-76	12F2 (62.59 cM)	REV	1.01E+08	NC_000078.6	115847881..115848174	-1	MGI:4439737	Ighv1-76
IGHV8-15	12F2 (62.59 cM)	REV	1.01E+08	NC_000078.6	115844016..115844309	-1	MGI:5434408	Ighv8-15
IGHV1-75	12F2 (62.59 cM)	REV	622728	NC_000078.6	115833950..115834243	-1	MGI:4439735	Ighv1-75
IGHV8-14	12F2 (62.59 cM)	REV	668582	NC_000078.6	115808427..115808727	-1	MGI:3648977	Ighv8-14
IGHV1-74	12F2 (62.59 cM)	REV	1.01E+08	NC_000078.6	115802690..115803080	-1	MGI:4439634	Ighv1-74
IGHV1-73	12F2 (62.59 cM)	REV	668577	NC_000078.6	115790593..115790887	-1	MGI:3645131	Ighv1-73
IGHV8-13	12F2 (62.59 cM)	REV	1.01E+08	NC_000078.6	115765335..115765635	-1	MGI:4439734	Ighv8-13
IGHV1-72	12F2 (62.59 cM)	REV	619916	NC_000078.6	115757984..115758277	-1	MGI:4439633	Ighv1-72
IGHV1-71	12F2 (62.59 cM)	REV	619886	NC_000078.6	115742205..115742506	-1	MGI:3643033	Ighv1-71
IGHV1-70	12F2 (62.59 cM)	REV	638634	NC_000078.6	115691889..115692182	-1	MGI:3644620	Ighv1-70
IGHV8-12	12F2 (62.59 cM)	REV	780960	NC_000078.6	115647945..115648245	-1	MGI:3642873	Ighv8-12
IGHV1-69	12F2 (62.59 cM)	REV	619833	NC_000078.6	115623203..115623595	-1	MGI:4439632	Ighv1-69
IGHV1-68	12F2 (62.59 cM)	REV	780959	NC_000078.6	115611340..115611633	-1	MGI:5009923	Ighv1-68

IGHV1-67	12F2 (62.59 cM)	REV	435328	NC_000078.6	115603940..115604233	-1	MGI:3645228	Ighv1-67
IGHV1-66	12F2 (62.59 cM)	REV	380824	NC_000078.6	115593110..115593403	-1	MGI:4439825	Ighv1-66
IGHV8-11	12F2 (62.59 cM)	REV	636462	NC_000078.6	115567149..115567449	-1	MGI:3644925	Ighv8-11
IGHV1-65	12F2 (62.58 cM)	REV	780958	NC_000078.6	115532055..115532347	-1	MGI:5009922	Ighv1-65
IGHV8-10	12F2 (62.58 cM)	REV	780957	NC_000078.6	115519340..115519640	-1	MGI:5009921	Ighv8-10
IGHV1-64	12F2 (62.58 cM)	REV	380823	NC_000078.6	115507587..115507977	-1	MGI:4439789	Ighv1-64
IGHV1-63	12F2 (62.58 cM)	REV	780956	NC_000078.6	115495625..115496058	-1	MGI:3642755	Ighv1-63
IGHV8-9	12F2 (62.57 cM)	REV	432709	NC_000078.6	115468331..115468632	-1	MGI:3644475	Ighv8-9
IGHV1-62-3	12F2 (62.57 cM)	REV	668549	NC_000078.6	115460999..115461431	-1	MGI:3648544	Ighv1-62-3
IGHV1-62-2	12F2 (62.57 cM)	REV	238448	NC_000078.6	115446417..115446710	-1	MGI:3644968	Ighv1-62-2
IGHV1-62-1	12F2 (62.55 cM)	REV	668544	NC_000078.6	115386707..115386988	-1	MGI:3704125	Ighv1-62-1
IGHV1-62	12F2 (62.55 cM)	REV	668542	NC_000078.6	115371986..115372278	-1	MGI:5009844	Ighv1-62
IGHV1-61	12F2 (62.55 cM)	REV	674018	NC_000078.6	115359140..115359433	-1	MGI:4439824	Ighv1-61
IGHV1-60	12F2 (62.55 cM)	REV	780940	NC_000078.6	115344537..115344830	-1	MGI:5009920	Ighv1-60
IGHV1-59	12F2 (62.54 cM)	REV	432708	NC_000078.6	115335057..115335513	-1	MGI:3644474	Ighv1-59
IGHV1-58	12F2 (62.54 cM)	REV	780939	NC_000078.6	115312166..115312597	-1	MGI:4439557	Ighv1-58
IGHV8-8	12F2 (62.54 cM)	REV	780938	NC_000078.6	115294066..115294362	-1	MGI:3815333	Ighv8-8
IGHV1-57	12F2 (62.53 cM)	REV	780937	NC_000078.6	115268424..115268715	-1	MGI:5009919	Ighv1-57
IGHV8-7	12F2 (62.53 cM)	REV	780936	NC_000078.6	115258139..115258432	-1	MGI:5009918	Ighv8-7
IGHV1-56	12F2 (62.53 cM)	REV	382695	NC_000078.6	115242802..115243095	-1	MGI:4439715	Ighv1-56
IGHV1-55	12F2 (62.52 cM)	REV	780932	NC_000078.6	115208137..115208527	-1	MGI:4439716	Ighv1-55
IGHV1-54	12F2 (62.52 cM)	REV	211331	NC_000078.6	115193675..115193968	-1	MGI:3647133	Ighv1-54
IGHV8-6	12F2 (62.51 cM)	REV	629930	NC_000078.6	115165777..115166077	-1	MGI:3645823	Ighv8-6
IGHV1-53	12F2 (62.51 cM)	REV	780931	NC_000078.6	115158445..115158835	-1	MGI:3576502	Ighv1-53
IGHV1-52	12F2 (62.51 cM)	REV	382696	NC_000078.6	115145487..115145780	-1	MGI:4439752	Ighv1-52
IGHV1-51	12F2 (62.51 cM)	REV	780930	NC_000078.6	115131375..115131668	-1	MGI:5009917	Ighv1-51
IGHV1-50	12F2 (62.5 cM)	REV	780929	NC_000078.6	115119748..115120041	-1	MGI:4439753	Ighv1-50
IGHV8-5	12F2 (62.49 cM)	REV	640506	NC_000078.6	115067560..115067860	-1	MGI:3645478	Ighv8-5
IGHV1-49	12F2 (62.49 cM)	REV	629925	NC_000078.6	115055223..115055516	-1	MGI:4439754	Ighv1-49

IGHV1-48	12F2 (62.49 cM)	REV	780928	NC_000078.6	115038227..115038520	-1	MGI:5009916	Ighv1-48
IGHV8-4	12F2 (62.48 cM)	REV	629919	NC_000078.6	115024026..115024318	-1	MGI:3646040	Ighv8-4
IGHV8-3	12F2 (62.48 cM)	REV	780927	NC_000078.6	115003418..115003712	-1	MGI:5009915	Ighv8-3
IGHV1-47	12F2 (62.48 cM)	REV	629915	NC_000078.6	114991108..114991401	-1	MGI:4439890	Ighv1-47
IGHV1-46	12F2 (62.48 cM)	REV	668522	NC_000078.6	114977693..114977986	-1	MGI:5009843	Ighv1-46
IGHV1-45	12F2 (62.47 cM)	REV	780894	NC_000078.6	114970055..114970348	-1	MGI:5009913	Ighv1-45
IGHV1-44	12F2 (62.47 cM)	REV	668521	NC_000078.6	114963380..114963674	-1	MGI:5009842	Ighv1-44
IGHV1-43	12F2 (62.47 cM)	REV	629908	NC_000078.6	114945950..114946243	-1	MGI:3704124	Ighv1-43
IGHV1-42	12F2 (62.47 cM)	REV	629906	NC_000078.6	114937154..114937544	-1	MGI:3704123	Ighv1-42
IGHV1-41	12F2 (62.47 cM)	REV	629904	NC_000078.6	114932371..114932664	-1	MGI:3649084	Ighv1-41
IGHV1-40	12F2 (62.47 cM)	REV	780892	NC_000078.6	114924941..114925233	-1	MGI:5009912	Ighv1-40
IGHV1-39	12F2 (62.46 cM)	REV	780891	NC_000078.6	114914599..114914892	-1	MGI:4439888	Ighv1-39
IGHV1-38	12F2 (62.46 cM)	REV	780890	NC_000078.6	114910011..114910303	-1	MGI:5009911	Ighv1-38
IGHV1-37	12F2 (62.46 cM)	REV	668517	NC_000078.6	114896238..114896531	-1	MGI:4439640	Ighv1-37
IGHV1-36	12F2 (62.46 cM)	REV	629897	NC_000078.6	114879888..114880181	-1	MGI:4439639	Ighv1-36
IGHV1-35	12F2 (62.46 cM)	REV	668515	NC_000078.6	114875302..114875597	-1	MGI:3644935	Ighv1-35
IGHV1-34	12F2 (62.45 cM)	REV	628614	NC_000078.6	114851190..114851483	-1	MGI:4439659	Ighv1-34
IGHV1-33	12F2 (62.45 cM)	REV	641247	NC_000078.6	114843693..114844083	-1	MGI:4439617	Ighv1-33
IGHV1-32	12F2 (62.45 cM)	REV	780888	NC_000078.6	114835223..114835516	-1	MGI:5009910	Ighv1-32
IGHV1-31	12F2 (62.45 cM)	REV	629893	NC_000078.6	114829264..114829557	-1	MGI:4439889	Ighv1-31
IGHV1-30	12F2 (62.44 cM)	REV	668511	NC_000078.6	114817099..114817390	-1	MGI:4937173	Ighv1-30
IGHV1-29	12F2 (62.44 cM)	REV	780887	NC_000078.6	114812321..114812605	-1	MGI:5009909	Ighv1-29
IGHV1-28	12F2 (62.44 cM)	REV	668510	NC_000078.6	114809421..114809714	-1	MGI:3644938	Ighv1-28
IGHV1-27	12F2 (62.44 cM)	REV	780886	NC_000078.6	114804616..114804909	-1	MGI:5009908	Ighv1-27
IGHV1-26	12F2 (62.44 cM)	REV	629884	NC_000078.6	114788372..114788665	-1	MGI:4439641	Ighv1-26
IGHV1-25	12F2 (62.44 cM)	REV	640497	NC_000078.6	114781409..114781702	-1	MGI:3648295	Ighv1-25
IGHV1-24	12F2 (62.44 cM)	REV	780885	NC_000078.6	114772928..114773221	-1	MGI:3815052	Ighv1-24
IGHV1-23	12F2 (62.43 cM)	REV	780884	NC_000078.6	114764450..114764743	-1	MGI:3815050	Ighv1-23
IGHV1-22	12F2 (62.43 cM)	REV	780883	NC_000078.6	114746273..114746566	-1	MGI:4439784	Ighv1-22

IGHV1-21	12F2 (62.43 cM)	REV	668499	NC_000078.6	114740383..114740840	-1	MGI:5009841	Ighv1-21
IGHV1-21-1	12F2 (62.43 cM)	REV	631595	NC_000078.6	114736245..114736538	-1	MGI:3645737	Ighv1-21-1
IGHV1-20	12F2 (62.43 cM)	REV	668497	NC_000078.6	114723772..114724065	-1	MGI:3644607	Ighv1-20
IGHV1-19	12F2 (62.42 cM)	REV	382692	NC_000078.6	114708648..114708941	-1	MGI:4439779	Ighv1-19
IGHV1-19-1	12F2 (62.42 cM)	REV	668493	NC_000078.6	114704147..114704440	-1	MGI:3644603	Ighv1-19-1
IGHV1-18	12F2 (62.42 cM)	REV	629871	NC_000078.6	114682632..114682925	-1	MGI:4439780	Ighv1-18
IGHV1-17	12F2 (62.42 cM)	REV	629869	NC_000078.6	114676749..114677042	-1	MGI:3647700	Ighv1-17
IGHV1-17-1	12F2 (62.42 cM)	REV	780926	NC_000078.6	114671968..114672262	-1	MGI:5009914	Ighv1-17-1
IGHV1-16	12F2 (62.42 cM)	REV	629866	NC_000078.6	114665872..114666165	-1	MGI:3647704	Ighv1-16
IGHV1-15	12F2 (62.41 cM)	REV	629865	NC_000078.6	114657353..114657646	-1	MGI:4439782	Ighv1-15
IGHV1-14	12F2 (62.41 cM)	REV	629863	NC_000078.6	114646572..114646865	-1	MGI:4439781	Ighv1-14
IGHV1-13	12F2 (62.41 cM)	REV	780865	NC_000078.6	114630680..114630973	-1	MGI:5009907	Ighv1-13
IGHV1-12	12F2 (62.41 cM)	REV	629860	NC_000078.6	114615850..114616143	-1	MGI:3646284	Ighv1-12
IGHV1-11	12F2 (62.41 cM)	REV	629859	NC_000078.6	114612244..114612536	-1	MGI:5009835	Ighv1-11
IGHV1-10	12F2 (62.40 cM)	REV	637050	NC_000078.6	114597878..114598175	-1	MGI:5009837	Ighv1-10
IGHV1-9	12F2 (62.40 cM)	REV	668478	NC_000078.6	114583569..114583862	-1	MGI:4439621	Ighv1-9
IGHV15-2	12F2 (62.40 cM)	REV	780864	NC_000078.6	114564578..114564874	-1	MGI:4947963	Ighv15-2
IGHV1-8	12F2 (62.39 cM)	REV	780863	NC_000078.6	114555610..114555902	-1	MGI:5009906	Ighv1-8
IGHV10-4	12F2 (62.39 cM)	REV	780862	NC_000078.6	114547258..114547556	-1	MGI:5009905	Ighv10-4
IGHV1-7	12F2 (62.39 cM)	REV	668474	NC_000078.6	114538495..114538788	-1	MGI:3704122	Ighv1-7
IGHV1-6	12F2 (62.39 cM)	REV	780861	NC_000078.6	114532972..114533264	-1	MGI:5009904	Ighv1-6
IGHV10-3	12F2 (62.39 cM)	REV	380809	NC_000078.6	114523441..114523887	-1	MGI:3648785	Ighv10-3
IGHV1-5	12F2 (62.39 cM)	REV	668469	NC_000078.6	114513330..114513623	-1	MGI:3704121	Ighv1-5
IGHV10-2	12F2 (62.38 cM)	REV	780860	NC_000078.6	114496003..114496300	-1	MGI:5009903	Ighv10-2
IGHV1-4	12F2 (62.38 cM)	REV	432702	NC_000078.6	114487136..114487429	-1	MGI:4439618	Ighv1-4
IGHV1-3	12F2 (62.38 cM)	REV	780859	NC_000078.6	114481615..114481916	-1	MGI:5009902	Ighv1-3
IGHV10-1	12F2 (62.38 cM)	REV	380808	NC_000078.6	114479007..114479451	-1	MGI:4439620	Ighv10-1
IGHV1-2	12F2 (62.38 cM)	REV	238428	NC_000078.6	114469075..114469371	-1	MGI:4439924	Ighv1-2
IGHV8-2	12F2 (62.38 cM)	REV	629849	NC_000078.6	114462290..114462589	-1	MGI:3647474	Ighv8-2

IGHV6-7	12F2 (62.38 cM)	REV	432701	NC_000078.6	114455626..114455925	-1	MGI:3644477	Ighv6-7
IGHV6-6	12F2 (62.37 cM)	REV	238427	NC_000078.6	114434788..114435087	-1	MGI:4439619	Ighv6-6
IGHV6-5	12F2 (62.37 cM)	REV	639510	NC_000078.6	114416596..114416895	-1	MGI:3647134	Ighv6-5
IGHV6-4	12F2 (62.37 cM)	REV	628398	NC_000078.6	114406474..114406773	-1	MGI:3704120	Ighv6-4
IGHV6-3	12F2 (62.36 cM)	REV	629845	NC_000078.6	114391712..114392010	-1	MGI:4439854	Ighv6-3
IGHV12-3	12F2 (62.36 cM)	REV	435321	NC_000078.6	114366526..114366819	-1	MGI:3646760	Ighv12-3
IGHV13-2	12F2 (62.36 cM)	REV	629842	NC_000078.6	114357761..114358060	-1	MGI:3705861	Ighv13-2
IGHV1-1	12F2 (62.36 cM)	REV	780834	NC_000078.6	114351705..114351995	-1	MGI:5009901	Ighv1-1
IGHV8-1	12F2 (62.35 cM)	REV	780833	NC_000078.6	114332796..114333086	-1	MGI:5009900	Ighv8-1
IGHV3-8	12F2 (62.35 cM)	REV	780831	NC_000078.6	114322376..114322666	-1	MGI:3645298	Ighv3-8
IGHV5-21	12F2 (62.35 cM)	REV	780832	NC_000078.6	114320030..114320324	-1	MGI:5009899	Ighv5-21
IGHV3-7	12F2 (62.35 cM)	REV	780830	NC_000078.6	114314186..114314479	-1	MGI:5009898	Ighv3-7
IGHV9-4	12F2 (62.34 cM)	REV	636260	NC_000078.6	114299961..114300254	-1	MGI:3646379	Ighv9-4
IGHV3-6	12F2 (62.34 cM)	REV	780829	NC_000078.6	114288152..114288447	-1	MGI:4439856	Ighv3-6
IGHV13-1	12F2 (62.33 cM)	REV	780828	NC_000078.6	114267607..114267906	-1	MGI:4439855	Ighv13-1
IGHV3-5	12F2 (62.33 cM)	REV	633457	NC_000078.6	114262652..114262950	-1	MGI:3648045	Ighv3-5
IGHV3-4	12F2 (62.33 cM)	REV	629833	NC_000078.6	114253617..114253915	-1	MGI:3644034	Ighv3-4
IGHV7-4	12F2 (62.32 cM)	REV	632654	NC_000078.6	114222788..114223254	-1	MGI:4439763	Ighv7-4
IGHV3-3	12F2 (62.31 cM)	REV	668438	NC_000078.6	114196439..114196875	-1	MGI:3643949	Ighv3-3
IGHV14-4	12F2 (62.30 cM)	REV	629826	NC_000078.6	114176438..114176867	-1	MGI:4439765	Ighv14-4
IGHV15-1	12F2 (62.30 cM)	REV	780827	NC_000078.6	114158025..114158315	-1	MGI:5009897	Ighv15-1
IGHV7-3	12F2 (62.30 cM)	REV	629822	NC_000078.6	114153180..114153644	-1	MGI:4439766	Ighv7-3
IGHV9-3	12F2 (62.29 cM)	REV	780825	NC_000078.6	114140692..114141122	-1	MGI:3642720	Ighv9-3
IGHV12-2	12F2 (62.29 cM)	REV	780824	NC_000078.6	114127533..114127984	-1	MGI:5009896	Ighv12-2
IGHV9-2	12F2 (62.28 cM)	REV	629818	NC_000078.6	114109001..114109430	-1	MGI:3643816	Ighv9-2
IGHV12-1	12F2 (62.28 cM)	REV	780823	NC_000078.6	114107259..114107563	-1	MGI:5295669	Ighv12-1
IGHV9-1	12F2 (62.28 cM)	REV	195180	NC_000078.6	114093928..114094221	-1	MGI:4439911	Ighv9-1
IGHV6-2	12F2 (62.28 cM)	REV	780822	NC_000078.6	114089387..114089681	-1	MGI:5009895	Ighv6-2
IGHV16-1	12F2 (62.27 cM)	REV	629812	NC_000078.6	114068828..114069126	-1	MGI:3643819	Ighv16-1

IGHV14-3	12F2 (62.27 cM)	REV	238418	NC_000078.6	114059845..114060273	-1	MGI:4439764	Ighv14-3
IGHV11-2	12F2 (62.27 cM)	REV	780818	NC_000078.6	114048241..114048704	-1	MGI:4947968	Ighv11-2
IGHV3-2	12F2 (62.26 cM)	REV	780817	NC_000078.6	114033803..114034097	-1	MGI:4439923	Ighv3-2
IGHV4-2	12F2 (62.26 cM)	REV	668423	NC_000078.6	114013144..114013439	-1	MGI:5009840	Ighv4-2
IGHV14-2	12F2 (62.25 cM)	REV	668421	NC_000078.6	113994469..113994898	-1	MGI:4439607	Ighv14-2
IGHV11-1	12F2 (62.25 cM)	REV	780804	NC_000078.6	113981879..113982174	-1	MGI:4439535	Ighv11-1
IGHV3-1	12F2 (62.24 cM)	REV	780803	NC_000078.6	113964390..113964683	-1	MGI:4439534	Ighv3-1
IGHV4-1	12F2 (62.24 cM)	REV	780802	NC_000078.6	113948284..113948577	-1	MGI:4439536	Ighv4-1
IGHV14-1	12F2 (62.23 cM)	REV	780801	NC_000078.6	113931953..113932246	-1	MGI:4439920	Ighv14-1
IGHV7-2	12F2 (62.23 cM)	REV	780800	NC_000078.6	113912025..113912483	-1	MGI:4439623	Ighv7-2
IGHV7-1	12F2 (62.22 cM)	REV	780799	NC_000078.6	113896408..113896946	-1	MGI:4439622	Ighv7-1
IGHV5-19	12F2 (62.22 cM)	REV	780798	NC_000078.6	113884761..113885342	-1	MGI:5009894	Ighv5-19
IGHV2-9	12F2 (62.22 cM)	REV	640046	NC_000078.6	113879097..113879388	-1	MGI:4439624	Ighv2-9
IGHV2-8	12F2 (62.22 cM)	REV	780797	NC_000078.6	113877361..113877659	-1	MGI:5009893	Ighv2-8
IGHV5-18	12F2 (62.22 cM)	REV	780796	NC_000078.6	113875772..113876239	-1	MGI:5009892	Ighv5-18
IGHV5-17	12F2 (62.21 cM)	REV	780794	NC_000078.6	113859149..113859442	-1	MGI:4439533	Ighv5-17
IGHV5-16	12F2 (62.21 cM)	REV	633568	NC_000078.6	113838528..113838821	-1	MGI:4439556	Ighv5-16
IGHV5-15	12F2 (62.20 cM)	REV	780792	NC_000078.6	113826648..113826941	-1	MGI:4439812	Ighv5-15
IGHV2-7	12F2 (62.20 cM)	REV	780793	NC_000078.6	113807314..113807747	-1	MGI:4439521	Ighv2-7
IGHV2-6-8	12F2 (62.19 cM)	REV	791090	NC_000078.6	113796138..113796430	-1	MGI:4439811	Ighv2-6-8
IGHV2-9-1	12F2 (62.18 cM)	REV	791089	NC_000078.6	113769857..113770142	-1	MGI:4439519	Ighv2-9-1
IGHV5-12-4	12F2 (62.18 cM)	REV	628098	NC_000078.6	113762251..113762544	-1	MGI:3645977	Ighv5-12-4
IGHV5-9-1	12F2 (62.17 cM)	REV	641178	NC_000078.6	113736113..113736406	-1	MGI:4439810	Ighv5-9-1
IGHV2-6	12F2 (62.17 cM)	REV	630486	NC_000078.6	113716672..113716962	-1	MGI:4439518	Ighv2-6
IGHV5-12	12F2 (62.16 cM)	REV	668395	NC_000078.6	113702126..113702419	-1	MGI:4439516	Ighv5-12
IGHV5-11	12F2 (62.16 cM)	REV	777784	NC_000078.6	113687229..113687505	-1	MGI:5009891	Ighv5-11
IGHV2-5	12F2 (62.16 cM)	REV	638605	NC_000078.6	113685482..113685774	-1	MGI:4439517	Ighv2-5
IGHV5-10	12F2 (62.16 cM)	REV	777783	NC_000078.6	113669673..113669968	-1	MGI:3642589	Ighv5-10
IGHV5-9	12F2 (62.15 cM)	REV	544896	NC_000078.6	113661771..113662228	-1	MGI:4439873	Ighv5-9

IGHV5-8	12F2 (62.15 cM)	REV	777782	NC_000078.6	113654967..113655245	-1	MGI:5009890	Ighv5-8
IGHV2-4	12F2 (62.15 cM)	REV	668389	NC_000078.6	113653291..113653583	-1	MGI:3643263	Ighv2-4
IGHV5-7	12F2 (62.14 cM)	REV	777781	NC_000078.6	113634686..113634981	-1	MGI:3642590	Ighv5-7
IGHV5-6	12F2 (62.14 cM)	REV	777780	NC_000078.6	113625508..113625801	-1	MGI:4439815	Ighv5-6
IGHV5-5	12F2 (62.14 cM)	REV	777779	NC_000078.6	113612965..113613442	-1	MGI:5009889	Ighv5-5
IGHV2-3	12F2 (62.14 cM)	REV	238412	NC_000078.6	113611184..113611476	-1	MGI:4439872	Ighv2-3
IGHV6-1	12F2 (62.14 cM)	REV	777689	NC_000078.6	113603460..113603928	-1	MGI:5009888	Ighv6-1
IGHV5-4	12F2 (62.13 cM)	REV	777688	NC_000078.6	113597448..113597741	-1	MGI:4439895	Ighv5-4
IGHV5-3	12F2 (62.13 cM)	REV	777687	NC_000078.6	113589967..113590243	-1	MGI:5009887	Ighv5-3
IGHV2-2	12F2 (62.13 cM)	REV	777686	NC_000078.6	113588267..113588700	-1	MGI:4439894	Ighv2-2
IGHV5-2	12F2 (62.13 cM)	REV	777685	NC_000078.6	113578504..113578990	-1	MGI:4439893	Ighv5-2
IGHV2-1	12F2 (62.13 cM)	REV	777684	NC_000078.6	113574247..113574540	-1	MGI:4936981	Ighv2-1
IGHV5-1	12F2 (62.13 cM)	REV	777683	NC_000078.6	113572929..113573222	-1	MGI:5009886	Ighv5-1
IGHD5-1	12F2 (62.11 cM)	REV	777682	NC_000078.6	113526800..113526809	-1	MGI:4937117	Ighd5-1
IGHD3-1	12F2 (62.11 cM)	REV	777681	NC_000078.6	113525313..113525329	-1	MGI:4439891	Ighd3-1
IGHD1-1	12F2 (62.10 cM)	REV	777657	NC_000078.6	113482170..113482192	-1	MGI:4439871	Ighd1-1
IGHD6-1	12F2 (62.10 cM)	REV	777680	NC_000078.6	113480143..113480171	-1	MGI:4937254	Ighd6-1
IGHD2-3	12F2 (62.10 cM)	REV	777679	NC_000078.6	113475400..113475416	-1	MGI:4439708	Ighd2-3
IGHD6-2	12F2 (62.10 cM)	REV	777678	NC_000078.6	113474875..113474903	-1	MGI:4937120	Ighd6-2
IGHD2-4	12F2 (62.10 cM)	REV	777677	NC_000078.6	113470694..113470710	-1	MGI:4439709	Ighd2-4
IGHD5-2	12F2 (62.10 cM)	REV	777676	NC_000078.6	113469426..113469435	-1	MGI:4936898	Ighd5-2
IGHD2-5	12F2 (62.10 cM)	REV	777675	NC_000078.6	113466027..113466043	-1	MGI:4439705	Ighd2-5
IGHD5-3	12F2 (62.10 cM)	REV	777674	NC_000078.6	113464761..113464770	-1	MGI:4937297	Ighd5-3
IGHD5-7	12F2 (62.10 cM)	REV	777673	NC_000078.6	113464524..113464552	-1	MGI:4936973	Ighd5-7
IGHD2-6	12F2 (62.10 cM)	REV	777672	NC_000078.6	113461369..113461385	-1	MGI:4439865	Ighd2-6
IGHD5-4	12F2 (62.10 cM)	REV	777670	NC_000078.6	113460101..113460110	-1	MGI:4937058	Ighd5-4
IGHD5-8	12F2 (62.10 cM)	REV	777669	NC_000078.6	113459864..113459892	-1	MGI:4937171	Ighd5-8
IGHD2-7	12F2 (62.10 cM)	REV	777667	NC_000078.6	113456720..113456736	-1	MGI:4439866	Ighd2-7
IGHD5-5	12F2 (62.10 cM)	REV	777665	NC_000078.6	113454942..113454951	-1	MGI:4937334	Ighd5-5

IGHD2-8	12F2 (62.10 cM)	REV	777664	NC_000078.6	113450851..113450867	-1	MGI:4439706	Ighd2-8
IGHD5-6	12F2 (62.10 cM)	REV	777663	NC_000078.6	113449588..113449597	-1	MGI:4937234	Ighd5-6
IGHD3-2	12F2 (62.10 cM)	REV	777662	NC_000078.6	113448214..113448229	-1	MGI:4439707	Ighd3-2
IGHD4-1	12F2 (62.10 cM)	REV	777661	NC_000078.6	113430528..113430538	-1	MGI:4439801	Ighd4-1
IGHJ1	12F2 (62.10 cM)	REV	777648	NC_000078.6	113429781..113429833	-1	MGI:4439802	Ighj1
IGHJ2	12F2 (62.10 cM)	REV	777654	NC_000078.6	113429468..113429515	-1	MGI:4439803	Ighj2
IGHJ3	12F2 (62.10 cM)	REV	777655	NC_000078.6	113429085..113429132	-1	MGI:4439767	Ighj3
IGHJ4	12F2 (62.10 cM)	REV	777656	NC_000078.6	113428514..113428567	-1	MGI:4439658	Ighj4
IGHM	12F2 (62.10 cM)	REV	16019	NC_000078.6	113418826..113422730	-1	MGI:96448	Ighm
IGHD	12F2 (62.10 cM)	REV	380797	NC_000078.6	113407535..113416324	-1	MGI:96447	Ighd
IGHG3	12F2 (62.10 cM)	REV	380795	NC_000078.6	113357442..113361232	-1	MGI:2144790	Ighg3
IGHG1	12F2 (62.10 cM)	REV	16017	NC_000078.6	113326544..113330523	-1	MGI:96446	Ighg1
IGHG2B	12F2 (62.10 cM)	REV	16016	NC_000078.6	113304314..113307933	-1	MGI:96445	Ighg2b
IGHG2C	12F2 (62.10 cM)	REV	404711	NC_000078.6	113287389..113288932	-1	MGI:2686979	Ighg2c
IGHE	12F2 (62.10 cM)	REV	380792	NC_000078.6	113269263..113273248	-1	MGI:2685746	Ighe
IGHA	12F2 (62.09 cM)	REV	238447	NC_000078.6	113256204..113260236	-1	MGI:96444	Igha

图42

IMGT							NCBI		
基因	定位	方向	基因座	位置	登录号	位置	基因在染色体中的位置	登录号	基因在序列中的位置
IGKC	2q11.2	REV	IGK		J00241	334..653	88937992..88938311	NT_022184.14	67900421..67900740
IGKJ5	2q11.2	REV	IGK	1714339..1714417	J00242	1536..1612	88941195..88941271	NT_022184.14	67903624..67903700
IGKJ4	2q11.2	REV	IGK	1714024..1714102	J00242	1221..1297	88941513..88941589	NT_022184.14	67903942..67904018
IGKJ3	2q11.2	REV	IGK	1713683..1713760	J00242	880..955	88941848..88941923	NT_022184.14	67904277..67904352
IGKJ2	2q11.2	REV	IGK	1713376..1713455	J00242	573..650	88942152..88942229	NT_022184.14	67904581..67904658
IGKJ1	2q11.2	REV	IGK	1713015..1713093	J00242	212..288	88942513..88942589	NT_022184.14	67904942..67905018
IGKV4-1	2q11.2	FWD	IGK	1688795..1689406	Z00023	98..709	88966203..88966814	NT_022184.14	67928632..67929243
IGKV5-2	2q11.2	FWD	IGK	1677164..1677682	X02485	304..822	88977926..88978445	NT_022184.14	67940355..67940874
IGKV7-3	2q11.2	REV	IGK	1659301..1659929	X12682	683..1281	88995711..88996309	NT_022184.14	67958140..67958738
IGKV2-4	2q11.2	REV	IGK	1642592..1643349	X72814	569..1296	89012284..89013011	NT_022184.14	67974713..67975440
IGKV1-5	2q11.2	REV	IGK	1627192..1627697	Z00001	297..802	89027904..89028409	NT_022184.14	67990333..67990838
IGKV1-6	2q11.2	REV	IGK	1608228..1608734	M64858	131..637	89046866..89047372	NT_022184.14	68009295..68009801
IGKV3-7	2q11.2	REV	IGK	1595982..1596528	X02725	134..680	89059072..89059618	NT_022184.14	68021501..68022047
IGKV1-8	2q11.2	REV	IGK	1582087..1582586	K02097	950..1427	89073041..89073518	NT_022184.14	68035470..68035947
IGKV1-9	2q11.2	REV	IGK	1564529..1565034	K02096	691..1168	89090592..89091069	NT_022184.14	68053021..68053498
IGKV2-10	2q11.2	REV	IGK	1554301..1555022	Z00012	121..814	89100604..89101297	NT_022184.14	68063033..68063726
IGKV3-11	2q11.2	REV	IGK	1547302..1547845	X01668	134..677	89107753..89108296	NT_022184.14	68070182..68070725
IGKV1-12	2q11.2	REV	IGK	1534288..1534792	V01577	1170..1674	89120806..89121310	NT_022184.14	68083235..68083739
IGKV1-13	2q11.2	REV	IGK	1528520..1529026	K02093	427..903	89126602..89127078	NT_022184.14	68089031..68089507
IGKV2-14	2q11.2	REV	IGK	1496203..1496996	X72810	191..956	89158630..89159395	NT_022184.14	68121059..68121824
IGKV3-15	2q11.2	REV	IGK	1489297..1489840	M23090	676..1219	89165758..89166301	NT_022184.14	68128187..68128730
IGKV1-16	2q11.2	REV	IGK	1474657..1475162	J00248	131..636	89180437..89180942	NT_022184.14	68142866..68143371
IGKV1-17	2q11.2	REV	IGK	1457171..1457676	X72808	397..902	89197918..89198423	NT_022184.14	68160347..68160852
IGKV2-18	2q11.2	REV	IGK	1445516..1446322	X63400	341..1117	89209304..89210080	NT_022184.14	68171733..68172509

IGKV2-19	2q11.2	REV	IGK	1439747..1440043	X12692	814..1080	89215579..89215845	NT_022184.14	68178008..68178274
IGKV3-20	2q11.2	REV	IGK	1431886..1432450	X12686	108..672	89223142..89223706	NT_022184.14	68185571..68186135
IGKV6-21	2q11.2	REV	IGK	1414698..1415279	X63399	507..1088	89240320..89240901	NT_022184.14	68202749..68203330
IGKV1-22	2q11.2	REV	IGK	1403796..1404293	X71885	2665..3132	89251344..89251811	NT_022184.14	68213773..68214240
IGKV2-23	2q11.2	REV	IGK	1401965..1403001	X71885	834..1549	89252927..89253642	NT_022184.14	68215356..68216071
IGKV2-24	2q11.2	REV	IGK	1397878..1398710	X12684	154..986	89256897..89257729	NT_022184.14	68219326..68220158
IGKV3-25	2q11.2	REV	IGK	1380742..1382545	X06583	636..2411	89273094..89274871	NT_022184.14	68235523..68237300
IGKV2-26	2q11.2	REV	IGK	1378180..1378960	X71884	505..1257	89276679..89277432	NT_022184.14	68239108..68239861
IGKV1-27	2q11.2	REV	IGK	1361116..1361620	X63398	323..827	89293993..89294497	NT_022184.14	68256422..68256926
IGKV2-28	2q11.2	REV	IGK	1352578..1353341	X63397	305..1068	89302264..89303027	NT_022184.14	68264693..68265456
IGKV2-29	2q11.2	REV	IGK	1340097..1340853	X63396	322..1078	89314751..89315507	NT_022184.14	68277180..68277936
IGKV2-30	2q11.2	REV	IGK	1329442..1330257	X63403	898..1713	89325349..89326164	NT_022184.14	68287778..68288593
IGKV3-31	2q11.2	REV	IGK	1322273..1322839	X71883	1839..2376	89332799..89333336	NT_022184.14	68295228..68295765
IGKV1-32	2q11.2	REV	IGK	1320994..1321488	X71883	560..1034	89334142..89334616	NT_022184.14	68296571..68297045
IGKV1-33	2q11.2	REV	IGK	1306433..1306937	M64856	131..635	89348843..89349347	NT_022184.14	68311272..68311776
IGKV3-34	2q11.2	REV	IGK	1299120..1299680	X71891	588..1120	89356128..89356660	NT_022184.14	68318557..68319089
IGKV1-35	2q11.2	REV	IGK	1287738..1288241	X71890	456..930	89367568..89368042	NT_022184.14	68329997..68330471
IGKV2-36	2q11.2	REV	IGK	1279452..1279685	X71889	144..377	89376096..89376329	NT_022184.14	68338525..68338758
IGKV1-37	2q11.2	REV	IGK	1277171..1277675	X59316	356..860	89378106..89378610	NT_022184.14	68340535..68341039
IGKV2-38	2q11.2	REV	IGK	1264765..1265034	X71888	580..819	89390775..89391014	NT_022184.14	68353204..68353443
IGKV1-39	2q11.2	REV	IGK	1254806..1255310	X59315	134..638	89400468..89400972	NT_022184.14	68362897..68363401
IGKV2-40	2q11.2	REV	IGK	1244063..1244826	X59314	889..1652	89411128..89411721	NT_022184.14	68373387..68373980
IGKV2D-36	2q11.2	FWD	IGK	387386..387619	X71893	2718..2951	89562873..89563106	NT_032994.5	1322..1555
IGKV1D-35	2q11.2	FWD	IGK	378827..379330	X71894	121..595	89571166..89571640	NT_032994.5	9615..10089
IGKV3D-34	2q11.2	FWD	IGK	367325..367885	X71895	588..1120	89582610..89583142	NT_032994.5	21059..21591
IGKV1D-33	2q11.2	FWD	IGK	360069..360573	M64855	131..635	89589921..89590425	NT_032994.5	28370..28874
IGKV1D-32	2q11.2	FWD	IGK	345540..346034	X71896	578..1052	89604539..89605013	NT_032994.5	42988..43462
IGKV3D-31	2q11.2	FWD	IGK	344188..344755	X71896	1857..2394	89605819..89606356	NT_032994.5	44268..44805
IGKV2D-30	2q11.2	FWD	IGK	336744..337559	X63402	507..1322	89613009..89613824	NT_032994.5	51458..52273

IGKV2D-29	2q11.2	FWD	IGK	326154..326911	M31952	324..1081	89623657..89624414	NT_032994.5	62106..62863
IGKV2D-28	2q11.2	FWD	IGK	313676..314439	X12691	304..1067	89636130..89636893	NT_032994.5	74579..75342
IGKV1D-27	2q11.2	FWD	IGK	305082..305587	Z00004	525..1030	89644980..89645485	NT_032994.5	83429..83934
IGKV2D-26	2q11.2	FWD	IGK	287726..288491	AP001216	30326..31106	89662063..89662843	NT_032994.5	100512..101292
IGKV3D-25	2q11.2	FWD	IGK	284165..285949	X71886	628..2412	89664611..89666397	NT_032994.5	103060..104846
IGKV2D-24	2q11.2	FWD	IGK	268793..269625	X63401	185..1017	89680942..89681774	NT_032994.5	119391..120223
IGKV2D-23	2q11.2	FWD	IGK	264526..265540	X71887	834..1839	89685026..89686031	NT_032994.5	123475..124480
IGKV1D-22	2q11.2	FWD	IGK	263213..263710	X71887	2664..3131	89686856..89687323	NT_032994.5	125305..125772
IGKV6D-21	2q11.2	FWD	IGK	252235..252816	X12683	378..959	89697749..89698330	NT_032994.5	136198..136779
IGKV3D-20	2q11.2	FWD	IGK	234918..235482	X12687	108..672	89715082..89715646	NT_032994.5	153531..154095
IGKV2D-19	2q11.2	FWD	IGK	227325..227621	X71882	433..699	89722943..89723209	NT_032994.5	161392..161658
IGKV2D-18	2q11.2	FWD	IGK	221028..221834	X63395	308..1084	89728733..89729509	NT_032994.5	167182..167958
IGKV6D-41	2q11.2	FWD	IGK	204147..204727	M27751	220..772	89745835..89746387	NT_032994.5	184284..184836
IGKV1D-17	2q11.2	FWD	IGK	191094..191599	X63392	986..1491	89758963..89759468	NT_032994.5	197412..197917
IGKV1D-16	2q11.2	FWD	IGK	173645..174150	K01323	131..636	89776410..89776915	NT_032994.5	214859..215364
IGKV3D-15	2q11.2	FWD	IGK	158967..159510	X72815	71..614	89791050..89791593	NT_032994.5	229499..230042
IGKV2D-14	2q11.2	FWD	IGK	151823..152616	X72811	221..986	89797944..89798709	NT_032994.5	236393..237158
IGKV1D-13	2q11.2	FWD	IGK	119800..120306	X17262	130..636	89830253..89830759	NT_032994.5	268702..269208
IGKV1D-12	2q11.2	FWD	IGK	114055..114538	X17263	131..607	89836021..89836497	NT_032994.5	274470..274946
IGKV3D-11	2q11.2	FWD	IGK	100971..101514	X17264	83..626	89849045..89849588	NT_032994.5	287494..288037
IGKV2D-10	2q11.2	FWD	IGK	93730..94523	X17265	122..887	89856036..89856801	NT_032994.5	294485..295250
IGKV1D-42	2q11.2	FWD	IGK	83687..84183	X72816	209..705	89866370..89866866	NT_032994.5	304819..305315
IGKV1D-43	2q11.2	FWD	IGK	63823..64328	X72817	150..655	89886225..89886730	NT_032994.5	324674..325179
IGKV1D-8	2q11.2	FWD	IGK	52970..53474	Z00008	305..781	89897079..89897555	NT_032994.5	335528..336004
IGKV3D-7	2q11.2	FWD	IGK	39007..39568	X72820	441..1002	89911009..89911570	NT_032994.5	349458..350019

图43

IMGT 基因	染色体定位	方向	NCBI 基因 ID	参照 GRCm38.p3 C57BL/6J	NCBI 基因在序列中的位置	方向顺序	MGI ID	MGI 代号
IGKV2-137	6C1 (30.89 cM)	FWD	692187	NC_000072.6	67555636..67556216	1	MGI:4439879	Igkv2-137
IGKV1-136	6C1 (30.90 cM)	FWD	692186	NC_000072.6	67593876..67594308	1	MGI:4947614	Igkv1-136
IGKV1-135	6C1 (30.91 cM)	FWD	243420	NC_000072.6	67609745..67610508	1	MGI:3819952	Igkv1-135
IGKV14-134-1	6C1 (30.94 cM)	REV	692185	NC_000072.6	67711174..67711628	-1	MGI:5009883	Igkv14-134-1
IGKV17-134	6C1 (30.94 cM)	REV	692184	NC_000072.6	67720729..67721225	-1	MGI:4936953	Igkv17-134
IGKV1-133	6C1 (30.95 cM)	FWD	628027	NC_000072.6	67724914..67725661	1	MGI:3648380	Igkv1-133
IGKV1-132	6C1 (30.96 cM)	FWD	243423	NC_000072.6	67759700..67760413	1	MGI:3648800	Igkv1-132
IGKV1-131	6C1 (30.96 cM)	REV	628056	NC_000072.6	67766036..67766772	-1	MGI:3645551	Igkv1-131
IGKV14-130	6C1 (30.97 cM)	FWD	628072	NC_000072.6	67791046..67791511	1	MGI:3645770	Igkv14-130
IGKV9-129	6C1 (30.98 cM)	FWD	692182	NC_000072.6	67839793..67840266	1	MGI:3525017	Igkv9-129
IGKV9-128	6C1 (30.99 cM)	FWD	692181	NC_000072.6	67847409..67847874	1	MGI:3809196	Igkv9-128
IGKV17-127	6C1 (30.99 cM)	FWD	243433	NC_000072.6	67861159..67861659	1	MGI:3646891	Igkv17-127
IGKV14-126-1	6C1 (30.99 cM)	FWD	692180	NC_000072.6	67876011..67876477	1	MGI:5009882	Igkv14-126-1
IGKV14-126	6C1 (31.00 cM)	FWD	628127	NC_000072.6	67896177..67896642	1	MGI:3643131	Igkv14-126
IGKV11-125	6C1 (31.01 cM)	FWD	243428	NC_000072.6	67913573..67914052	1	MGI:3642338	Igkv11-125
IGKV9-124	6C1 (31.02 cM)	REV	243431	NC_000072.6	67942076..67942540	-1	MGI:3646892	Igkv9-124
IGKV9-123	6C1 (31.02 cM)	REV	628144	NC_000072.6	67954230..67954690	-1	MGI:3643848	Igkv9-123
IGKV1-122	6C1 (31.04 cM)	FWD	434024	NC_000072.6	68016742..68017488	1	MGI:4439722	Igkv1-122
IGKV17-121	6C1 (31.05 cM)	FWD	667435	NC_000072.6	68036818..68037318	1	MGI:3647671	Igkv17-121
IGKV9-120	6C1 (31.05 cM)	FWD	434025	NC_000072.6	68049983..68050454	1	MGI:3647784	Igkv9-120
IGKV9-119	6C1 (31.05 cM)	FWD	692177	NC_000072.6	68056345..68056810	1	MGI:5009881	Igkv9-119
IGKV14-118-2	6C1 (31.06 cM)	FWD	692176	NC_000072.6	68066369..68066828	1	MGI:5009880	Igkv14-118-2
IGKV14-118-1	6C1 (31.06 cM)	FWD	692175	NC_000072.6	68082547..68083145	1	MGI:5009879	Igkv14-118-1
IGKV11-118	6C1 (31.07 cM)	FWD	692174	NC_000072.6	68105414..68105880	1	MGI:5009878	Igkv11-118
IGKV1-117	6C1 (31.06 cM)	FWD	16098	NC_000072.6	68121091..68121825	1	MGI:4439721	Igkv1-117

IGKV1-115	6C1 (31.09 cM)	FWD	628206	NC_000072.6	68160797..68161716	1	MGI:3644873	Igkv1-115
IGKV11-114	6C1 (31.09 cM)	FWD	692173	NC_000072.6	68164459..68164923	1	MGI:5009877	Igkv11-114
IGKV2-113	6C1 (31.09 cM)	FWD	692172	NC_000072.6	68178801..68179564	1	MGI:5009876	Igkv2-113
IGKV2-112	6C1 (31.11 cM)	FWD	381776	NC_000072.6	68219981..68220705	1	MGI:3644894	Igkv2-112
IGKV14-111	6C1 (31.12 cM)	FWD	545847	NC_000072.6	68256404..68256869	1	MGI:4439863	Igkv14-111
IGKV1-110	6C1 (31.12 cM)	FWD	381777	NC_000072.6	68270527..68271265	1	MGI:4439558	Igkv1-110
IGKV2-109	6C1 (31.13 cM)	FWD	628268	NC_000072.6	68302439..68303158	1	MGI:3642626	Igkv2-109
IGKV1-108	6C1 (31.13 cM)	FWD	628272	NC_000072.6	68312054..68312359	1	MGI:3644576	Igkv1-108
IGKV2-107	6C1 (31.14 cM)	FWD	628283	NC_000072.6	68326098..68326752	1	MGI:3645630	Igkv2-107
IGKV11-106	6C1 (31.14 cM)	FWD	628293	NC_000072.6	68339527..68339995	1	MGI:3648899	Igkv11-106
IGKV2-105	6C1 (31.15 cM)	FWD	692170	NC_000072.6	68348661..68349441	1	MGI:5009874	Igkv2-105
IGKV16-104	6C1 (31.17 cM)	FWD	381778	NC_000072.6	68425605..68426072	1	MGI:2685913	Igkv16-104
IGKV15-103	6C1 (31.18 cM)	FWD	692169	NC_000072.6	68437468..68437925	1	MGI:96513	Igkv15-103
IGKV15-102	6C1 (31.18 cM)	REV	692171	NC_000072.6	68466126..68466590	-1	MGI:5009875	Igkv15-102
IGKV20-101-2	6C1 (31.19 cM)	FWD	724035	NC_000072.6	68474888..68475098	1	MGI:5009884	Igkv20-101-2
IGKV15-101-1	6C1 (31.19 cM)	FWD	692167	NC_000072.6	68479082..68479573	1	MGI:5009872	Igkv15-101-1
IGKV15-101	6C1 (31.19 cM)	REV	692168	NC_000072.6	68481421..68481718	-1	MGI:5009873	Igkv15-101
IGKV14-100	6C1 (31.20 cM)	FWD	243439	NC_000072.6	68519012..68519477	1	MGI:4439559	Igkv14-100
IGKV1-99	6C1 (31.21 cM)	FWD	434028	NC_000072.6	68541658..68542422	1	MGI:4439724	Igkv1-99
IGKV12-98	6C1 (31.22 cM)	FWD	435900	NC_000072.6	68570763..68571235	1	MGI:4439560	Igkv12-98
IGKV15-97	6C1 (31.22 cM)	FWD	692166	NC_000072.6	68591380..68591832	1	MGI:5009871	Igkv15-97
IGKV10-96	6C1 (31.24 cM)	REV	692165	NC_000072.6	68631965..68632430	-1	MGI:4439561	Igkv10-96
IGKV2-95-2	6C1 (31.24 cM)	REV	692164	NC_000072.6	68647999..68648531	-1	MGI:4937167	Igkv2-95-2
IGKV2-95-1	6C1 (31.25 cM)	FWD	692163	NC_000072.6	68670752..68671335	1	MGI:5009870	Igkv2-95-1
IGKV10-95	6C1 (31.25 cM)	FWD	434031	NC_000072.6	68680379..68680848	1	MGI:3644598	Igkv10-95
IGKV10-94	6C1 (31.26 cM)	REV	667550	NC_000072.6	68704508..68704978	-1	MGI:3646140	Igkv10-94
IGKV2-93-1	6C1 (31.26 cM)	REV	692162	NC_000072.6	68712925..68713508	-1	MGI:5009869	Igkv2-93-1
IGKV19-93	6C1 (31.27 cM)	REV	692161	NC_000072.6	68736297..68736764	-1	MGI:107617	Igkv19-93
IGKV4-92	6C1 (31.28 cM)	REV	384410	NC_000072.6	68755038..68755593	-1	MGI:2686254	Igkv4-92

IGKV4-91	6C1 (31.28 cM)	REV	434033	NC_000072.6	68768555..68769103	-1	MGI:3642277	Igkv4-91
IGKV4-90	6C1 (31.29 cM)	REV	434034	NC_000072.6	68807180..68807708	-1	MGI:4439830	Igkv4-90
IGKV13-89-1	6C1 (31.29 cM)	FWD	692155	NC_000072.6	68810495..68810543	1	MGI:5009868	Igkv13-89-1
IGKV12-89	6C1 (31.29 cM)	REV	384411	NC_000072.6	68834846..68835307	-1	MGI:4439829	Igkv12-89
IGKV1-88	6C1 (31.31 cM)	REV	692154	NC_000072.6	68862265..68863031	-1	MGI:4439828	Igkv1-88
IGKV13-87	6C1 (31.32 cM)	FWD	692153	NC_000072.6	68902801..68903266	1	MGI:3779399	Igkv13-87
IGKV4-86	6C1 (31.33 cM)	REV	243451	NC_000072.6	68910411..68910938	-1	MGI:2685305	Igkv4-86
IGKV13-85	6C1 (31.33 cM)	REV	434036	NC_000072.6	68930269..68930734	-1	MGI:4439827	Igkv13-85
IGKV13-84	6C1 (31.34 cM)	FWD	692152	NC_000072.6	68939602..68940067	1	MGI:96514	Igkv13-84
IGKV4-83	6C1 (31.34 cM)	REV	692145	NC_000072.6	68961378..68962019	-1	MGI:5009867	Igkv4-83
IGKV13-82	6C1 (31.35 cM)	FWD	692144	NC_000072.6	68979198..68979663	1	MGI:5009866	Igkv13-82
IGKV4-81	6C1 (31.35 cM)	REV	243453	NC_000072.6	68990758..68991294	-1	MGI:2685306	Igkv4-81
IGKV13-80-1	6C1 (31.36 cM)	FWD	692143	NC_000072.6	69009143..69009513	1	MGI:5009865	Igkv13-80-1
IGKV4-80	6C1 (31.36 cM)	REV	545848	NC_000072.6	69016558..69017080	-1	MGI:4439653	Igkv4-80
IGKV4-79	6C1 (31.37 cM)	REV	213684	NC_000072.6	69042972..69043505	-1	MGI:2685040	Igkv4-79
IGKV13-78-1	6C1 (31.37 cM)	FWD	628498	NC_000072.6	69051444..69051794	1	MGI:3647961	Igkv13-78-1
IGKV4-78	6C1 (31.38 cM)	REV	545849	NC_000072.6	69059690..69060224	-1	MGI:3819775	Igkv4-78
IGKV4-77	6C1 (31.39 cM)	REV	667621	NC_000072.6	69110904..69111432	-1	MGI:3647937	Igkv4-77
IGKV13-76	6C1 (31.40 cM)	FWD	692142	NC_000072.6	69137866..69138332	1	MGI:5009864	Igkv13-76
IGKV4-75	6C1 (31.41 cM)	REV	692141	NC_000072.6	69156118..69156659	-1	MGI:5009863	Igkv4-75
IGKV13-74-1	6C1 (31.41 cM)	FWD	692140	NC_000072.6	69177416..69177787	1	MGI:5009862	Igkv13-74-1
IGKV4-74	6C1 (31.42 cM)	REV	236047	NC_000072.6	69184826..69185361	-1	MGI:3779447	Igkv4-74
IGKV13-73-1	6C1 (31.42 cM)	FWD	692139	NC_000072.6	69190073..69190282	1	MGI:5009861	Igkv13-73-1
IGKV4-73	6C1 (31.42 cM)	REV	628516	NC_000072.6	69197583..69198116	-1	MGI:3645825	Igkv4-73
IGKV4-72	6C1 (31.43 cM)	REV	385109	NC_000072.6	69226854..69227383	-1	MGI:2686345	Igkv4-72
IGKV13-71-1	6C1 (31.43 cM)	FWD	692138	NC_000072.6	69235927..69236158	1	MGI:5009860	Igkv13-71-1
IGKV4-71	6C1 (31.43 cM)	REV	434586	NC_000072.6	69243160..69243688	-1	MGI:4439654	Igkv4-71
IGKV4-70	6C1 (31.44 cM)	REV	385120	NC_000072.6	69267888..69268412	-1	MGI:2686348	Igkv4-70
IGKV4-69	6C1 (31.45 cM)	REV	628541	NC_000072.6	69283794..69284319	-1	MGI:3648668	Igkv4-69

IGKV4-68	6C1 (31.45 cM)	REV	384515	NC_000072.6	69304834..69305363	-1	MGI:2686265	Igkv4-68
IGKV12-67	6C1 (31.46 cM)	REV	628551	NC_000072.6	69324177..69324646	-1	MGI:3645399	Igkv12-67
IGKV12-66	6C1 (31.46 cM)	REV	692133	NC_000072.6	69334604..69335076	-1	MGI:5009859	Igkv12-66
IGKV4-65	6C1 (31.47 cM)	REV	667670	NC_000072.6	69342472..69343004	-1	MGI:3644339	Igkv4-65
IGKV13-64	6C1 (31.47 cM)	FWD	628564	NC_000072.6	69362722..69363187	1	MGI:5009834	Igkv13-64
IGKV4-63	6C1 (31.48 cM)	REV	628571	NC_000072.6	69377944..69378472	-1	MGI:3645235	Igkv4-63
IGKV13-62-1	6C1 (31.48 cM)	FWD	692119	NC_000072.6	69392439..69392815	1	MGI:5009858	Igkv13-62-1
IGKV4-62	6C1 (31.48 cM)	REV	636752	NC_000072.6	69399812..69400344	-1	MGI:3643587	Igkv4-62
IGKV13-61-1	6C1 (31.49 cM)	FWD	692118	NC_000072.6	69409499..69409875	1	MGI:5009857	Igkv13-61-1
IGKV4-61	6C1 (31.49 cM)	REV	546244	NC_000072.6	69416893..69417425	-1	MGI:4439819	Igkv4-61
IGKV4-59	6C1 (31.50 cM)	REV	667683	NC_000072.6	69438218..69438741	-1	MGI:3646808	Igkv4-59
IGKV4-60	6C1 (31.51 cM)	REV	385277	NC_000072.6	69463288..69463725	-1	MGI:3708737	Igkv4-60
IGKV4-58	6C1 (31.52 cM)	REV	381831	NC_000072.6	69500254..69500758	-1	MGI:2685923	Igkv4-58
IGKV13-57-2	6C1 (31.52 cM)	FWD	724106	NC_000072.6	69523739..69524016	1	MGI:5009885	Igkv13-57-2
IGKV4-57-1	6C1 (31.53 cM)	REV	384514	NC_000072.6	69544368..69544892	-1	MGI:2686264	Igkv4-57-1
IGKV13-57-1	6C1 (31.54 cM)	FWD	692114	NC_000072.6	69569737..69570109	1	MGI:5009856	Igkv13-57-1
IGKV4-57	6C1 (31.54 cM)	REV	235952	NC_000072.6	69575975..69576500	-1	MGI:2685035	Igkv4-57
IGKV13-56-1	6C1 (31.54 cM)	FWD	692113	NC_000072.6	69581244..69581452	1	MGI:5009855	Igkv13-56-1
IGKV4-56	6C1 (31.54 cM)	REV	619743	NC_000072.6	69587295..69587810	-1	MGI:4439916	Igkv4-56
IGKV13-55-1	6C1 (31.55 cM)	FWD	692112	NC_000072.6	69599886..69600262	1	MGI:5009854	Igkv13-55-1
IGKV4-55	6C1 (31.55 cM)	REV	385253	NC_000072.6	69607275..69607801	-1	MGI:2686370	Igkv4-55
IGKV13-54-1	6C1 (31.55 cM)	FWD	692105	NC_000072.6	69617048..69617423	1	MGI:5009853	Igkv13-54-1
IGKV4-54	6C1 (31.56 cM)	REV	385291	NC_000072.6	69631648..69632178	-1	MGI:5009821	Igkv4-54
IGKV4-53	6C1 (31.56 cM)	REV	546213	NC_000072.6	69648824..69649354	-1	MGI:2686266	Igkv4-53
IGKV4-51	6C1 (31.58 cM)	REV	619806	NC_000072.6	69681406..69681939	-1	MGI:5009829	Igkv4-51
IGKV4-50	6C1 (31.58 cM)	REV	381782	NC_000072.6	69700767..69701287	-1	MGI:2685915	Igkv4-50
IGKV12-49	6C1 (31.59 cM)	REV	619824	NC_000072.6	69716498..69716956	-1	MGI:5009830	Igkv12-49
IGKV5-48	6C1 (31.59 cM)	REV	619846	NC_000072.6	69726573..69727125	-1	MGI:3642817	Igkv5-48
IGKV12-47	6C1 (31.60 cM)	REV	434037	NC_000072.6	69750854..69751310	-1	MGI:3644595	Igkv12-47

IGKV12-46	6C1 (31.61 cM)	REV	692245	NC_000072.6	69764523..69764992	-1	MGI:4439773	Igkv12-46
IGKV5-45	6C1 (31.61 cM)	REV	545850	NC_000072.6	69775750..69776306	-1	MGI:4439774	Igkv5-45
IGKV12-44	6C1 (31.63 cM)	REV	545851	NC_000072.6	69814631..69815100	-1	MGI:4439775	Igkv12-44
IGKV5-43	6C1 (31.63 cM)	REV	381783	NC_000072.6	69823355..69823911	-1	MGI:4943320	Igkv5-43
IGKV12-42	6C1 (31.64 cM)	REV	677861	NC_000072.6	69834792..69835245	-1	MGI:5009852	Igkv12-42
IGKV12-41	6C1 (31.65 cM)	REV	619960	NC_000072.6	69858420..69858884	-1	MGI:4439772	Igkv12-41
IGKV5-40-1	6C1 (31.65 cM)	REV	619974	NC_000072.6	69868595..69869193	-1	MGI:5009831	Igkv5-40-1
IGKV12-40	6C1 (31.66 cM)	REV	435904	NC_000072.6	69879350..69879819	-1	MGI:3643951	Igkv12-40
IGKV5-39	6C1 (31.67 cM)	REV	620017	NC_000072.6	69900424..69900977	-1	MGI:2686255	Igkv5-39
IGKV12-38	6C1 (31.69 cM)	REV	620050	NC_000072.6	69943186..69943648	-1	MGI:4439614	Igkv12-38
IGKV5-37	6C1 (31.69 cM)	REV	384417	NC_000072.6	69963312..69963861	-1	MGI:2686256	Igkv5-37
IGKV18-36	6C1 (31.71 cM)	REV	620088	NC_000072.6	69992465..69992977	-1	MGI:4439613	Igkv18-36
IGKV1-35	6C1 (31.72 cM)	REV	620105	NC_000072.6	70010949..70011673	-1	MGI:4439612	Igkv1-35
IGKV8-34	6C1 (31.73 cM)	REV	620126	NC_000072.6	70044112..70044678	-1	MGI:4949914	Igkv8-34
IGKV7-33	6C1 (31.74 cM)	REV	243461	NC_000072.6	70058632..70059199	-1	MGI:3577282	Igkv7-33
IGKV6-32	6C1 (31.74 cM)	REV	434039	NC_000072.6	70074024..70074584	-1	MGI:3641634	Igkv6-32
IGKV8-31	6C1 (31.76 cM)	REV	546905	NC_000072.6	70105860..70106179	-1	MGI:3644798	Igkv8-31
IGKV8-30	6C1 (31.76 cM)	REV	384419	NC_000072.6	70117061..70117617	-1	MGI:3642250	Igkv8-30
IGKV6-29	6C1 (31.77 cM)	REV	620191	NC_000072.6	70138462..70139082	-1	MGI:4439616	Igkv6-29
IGKV8-28	6C1 (31.78 cM)	REV	434040	NC_000072.6	70143593..70144161	-1	MGI:3642251	Igkv8-28
IGKV8-27	6C1 (31.79 cM)	REV	434041	NC_000072.6	70171809..70172270	-1	MGI:4439868	Igkv8-27
IGKV8-26	6C1 (31.80 cM)	FWD	620240	NC_000072.6	70193228..70193797	1	MGI:4439869	Igkv8-26
IGKV6-25	6C1 (31.81 cM)	FWD	381784	NC_000072.6	70215433..70215957	1	MGI:4439867	Igkv6-25
IGKV8-24	6C1 (31.81 cM)	REV	677858	NC_000072.6	70216858..70217421	-1	MGI:4947958	Igkv8-24
IGKV8-23-1	6C1 (31.82 cM)	FWD	434685	NC_000072.6	70240427..70240710	1	MGI:4947960	Igkv8-23-1
IGKV6-23	6C1 (31.83 cM)	REV	637227	NC_000072.6	70260409..70260933	-1	MGI:3711980	Igkv6-23
IGKV8-22	6C1 (31.85 cM)	REV	620387	NC_000072.6	70297554..70298119	-1	MGI:5009833	Igkv8-22
IGKV8-21	6C1 (31.85 cM)	REV	620400	NC_000072.6	70314895..70315452	-1	MGI:1330840	Igkv8-21
IGKV6-20	6C1 (31.86 cM)	REV	108024	NC_000072.6	70335841..70336479	-1	MGI:1330836	Igkv6-20

IGKV8-19	6C1 (31.87 cM)	REV	232065	NC_000072.6	70340876..70341448	-1	MGI:1330844	Igkv8-19
IGKV8-18	6C1 (31.87 cM)	FWD	667859	NC_000072.6	70355877..70356445	1	MGI:1330845	Igkv8-18
IGKV6-17	6C1 (31.88 cM)	FWD	667865	NC_000072.6	70371469..70371993	1	MGI:1330833	Igkv6-17
IGKV8-16	6C1 (31.89 cM)	REV	640340	NC_000072.6	70386672..70387238	-1	MGI:1330843	Igkv8-16
IGKV6-15	6C1 (31.89 cM)	REV	108022	NC_000072.6	70406469..70406992	-1	MGI:1330831	Igkv6-15
IGKV6-14	6C1 (31.91 cM)	REV	667881	NC_000072.6	70434952..70435476	-1	MGI:1330830	Igkv6-14
IGKV6-13	6C1 (31.92 cM)	REV	667899	NC_000072.6	70457503..70458036	-1	MGI:1330829	Igkv6-13
IGKV3-12-1	6C1 (31.94 cM)	REV	667908	NC_000072.6	70497662..70498342	-1	MGI:3645632	Igkv3-12-1
IGKV3-12	6C1 (31.95 cM)	FWD	667914	NC_000072.6	70518250..70518849	1	MGI:1330815	Igkv3-12
IGKV3-11	6C1 (31.96 cM)	FWD	667917	NC_000072.6	70553274..70554440	1	MGI:1330820	Igkv3-11
IGKV3-10	6C1 (31.97 cM)	FWD	667924	NC_000072.6	70572633..70573230	1	MGI:1330821	Igkv3-10
IGKV3-9	6C1 (31.98 cM)	FWD	667928	NC_000072.6	70588189..70588777	1	MGI:1330856	Igkv3-9
IGKV3-8	6C1 (31.98 cM)	FWD	108010	NC_000072.6	70588871..70589452	1	MGI:1330857	Igkv3-8
IGKV3-7	6C1 (31.99 cM)	FWD	108005	NC_000072.6	70607437..70608036	1	MGI:1330852	Igkv3-7
IGKV3-6	6C1 (32.00 cM)	FWD	667936	NC_000072.6	70642405..70643565	1	MGI:1330853	Igkv3-6
IGKV3-5	6C1 (32.01 cM)	FWD	667940	NC_000072.6	70663298..70663895	1	MGI:1330854	Igkv3-5
IGKV3-4	6C1 (32.01 cM)	FWD	626347	NC_000072.6	70671789..70672377	1	MGI:1330855	Igkv3-4
IGKV3-3	6C1 (32.02 cM)	FWD	667946	NC_000072.6	70686946..70687534	1	MGI:1330849	Igkv3-3
IGKV3-2	6C1 (32.03 cM)	FWD	626583	NC_000072.6	70698468..70699067	1	MGI:1330850	Igkv3-2
IGKV3-1	6C1 (32.03 cM)	FWD	108004	NC_000072.6	70703578..70704177	1	MGI:1330851	Igkv3-1
IGKJ1	6C1 (32.04 cM)	FWD	110759	NC_000072.6	70722562..70722599	1	MGI:1316689	Igkj1
IGKJ2	6C1 (32.04 cM)	FWD	110760	NC_000072.6	70722916..70722954	1	MGI:1316690	Igkj2
IGKJ3	6C1 (32.04 cM)	FWD	110761	NC_000072.6	70723223..70723260	1	MGI:1316691	Igkj3
IGKJ4	6C1 (32.04 cM)	FWD	110762	NC_000072.6	70723548..70723585	1	MGI:1316692	Igkj4
IGKJ5	6C1 (32.04 cM)	FWD	110763	NC_000072.6	70723886..70723923	1	MGI:1316738	Igkj5
IGKC	6C1 (32.04 cM)	FWD	16071	NC_000072.6	70726435..70726754	1	MGI:96495	Igkc

图44

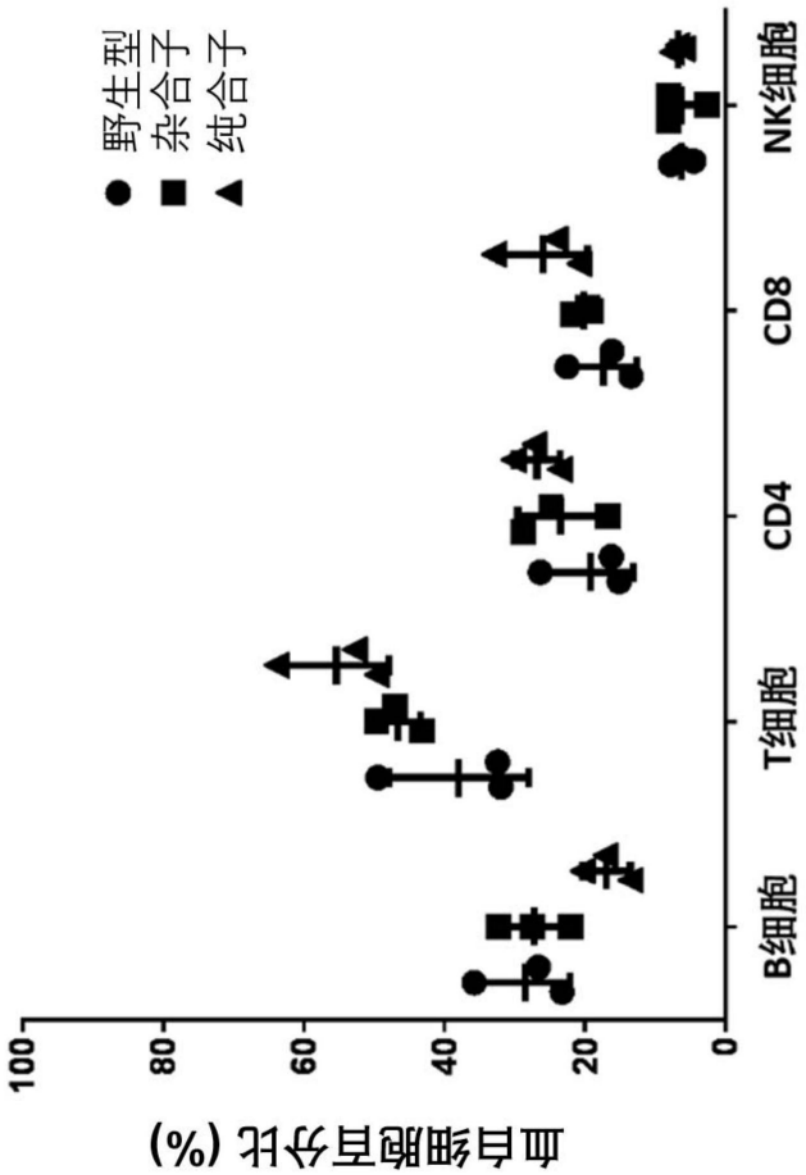


图45

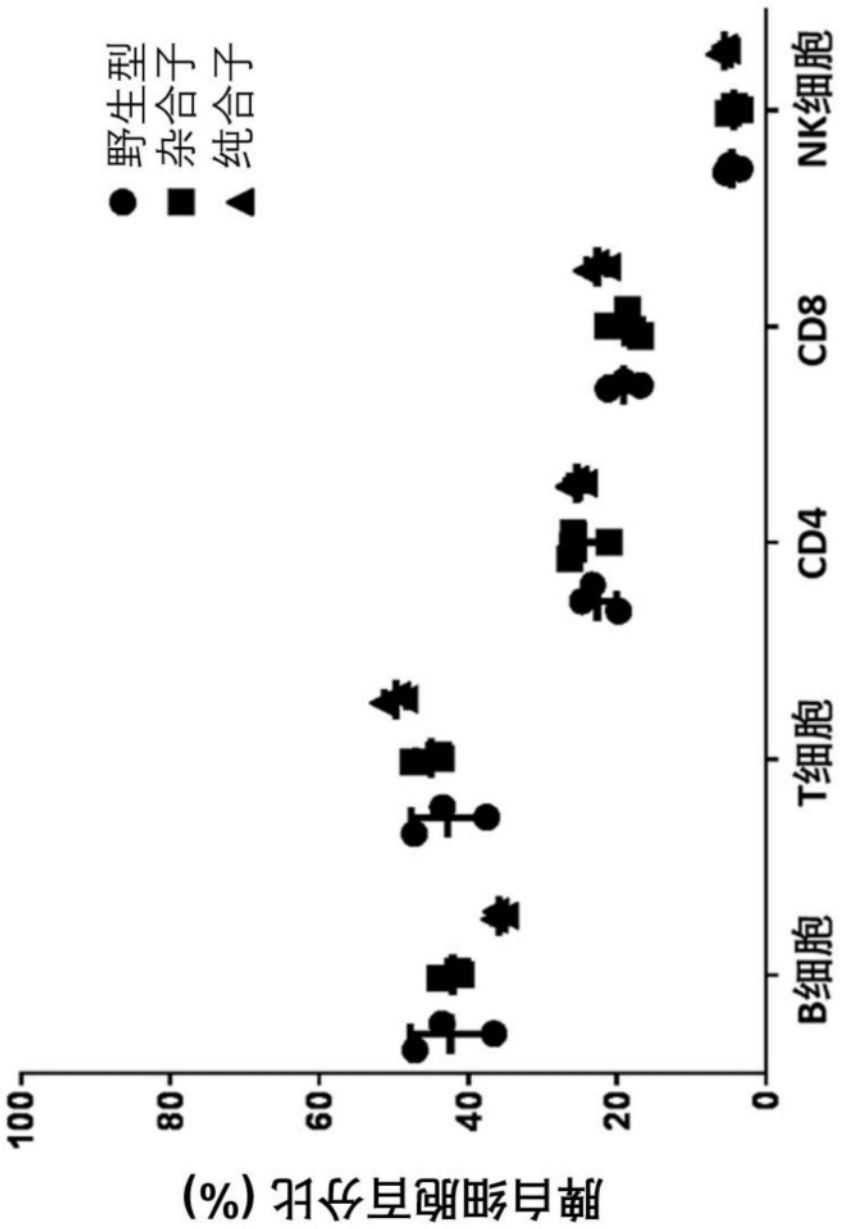


图46

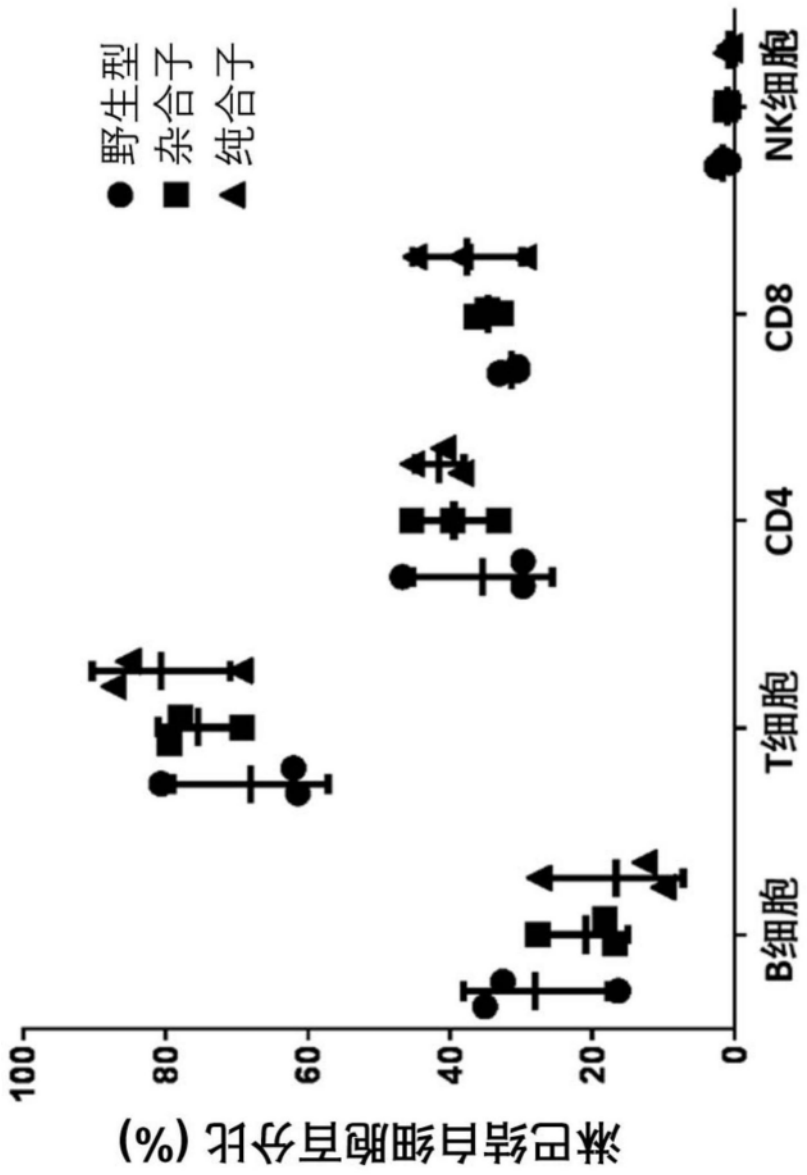


图47

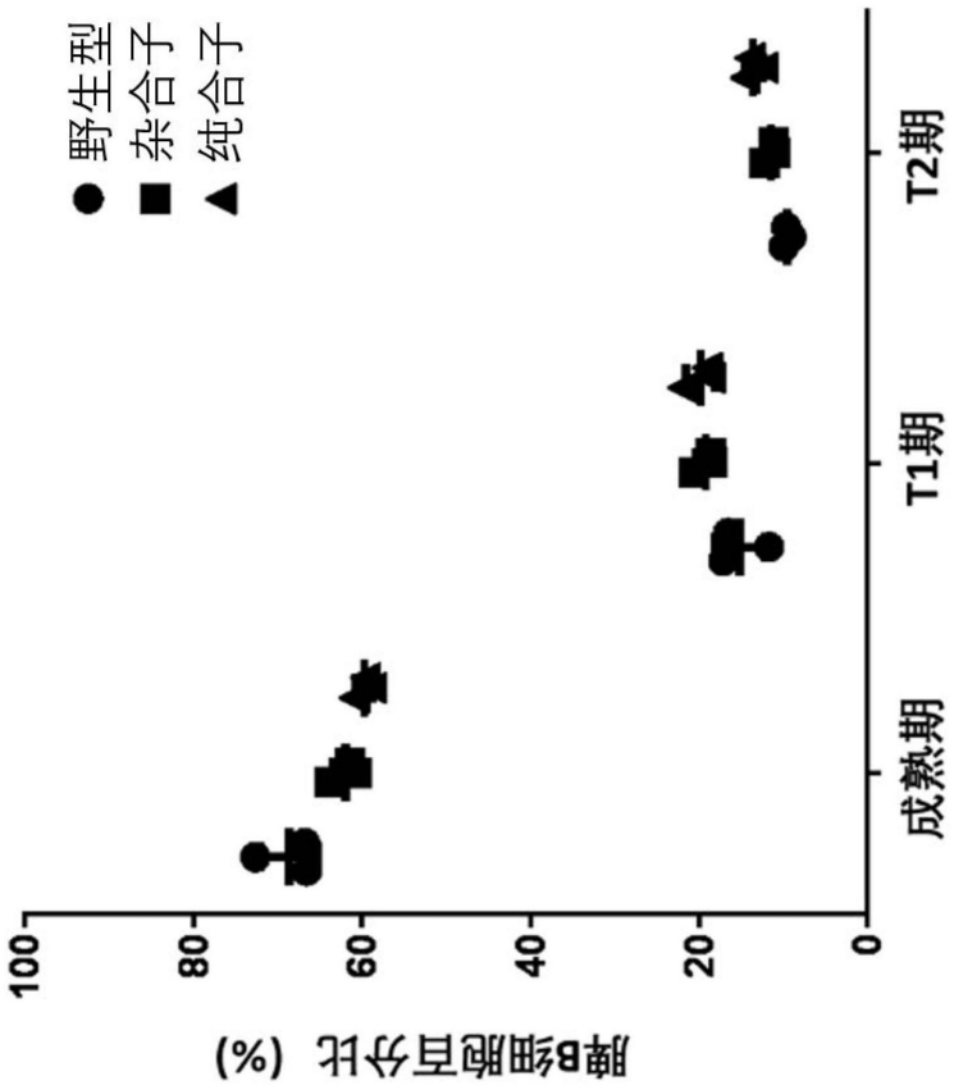


图48

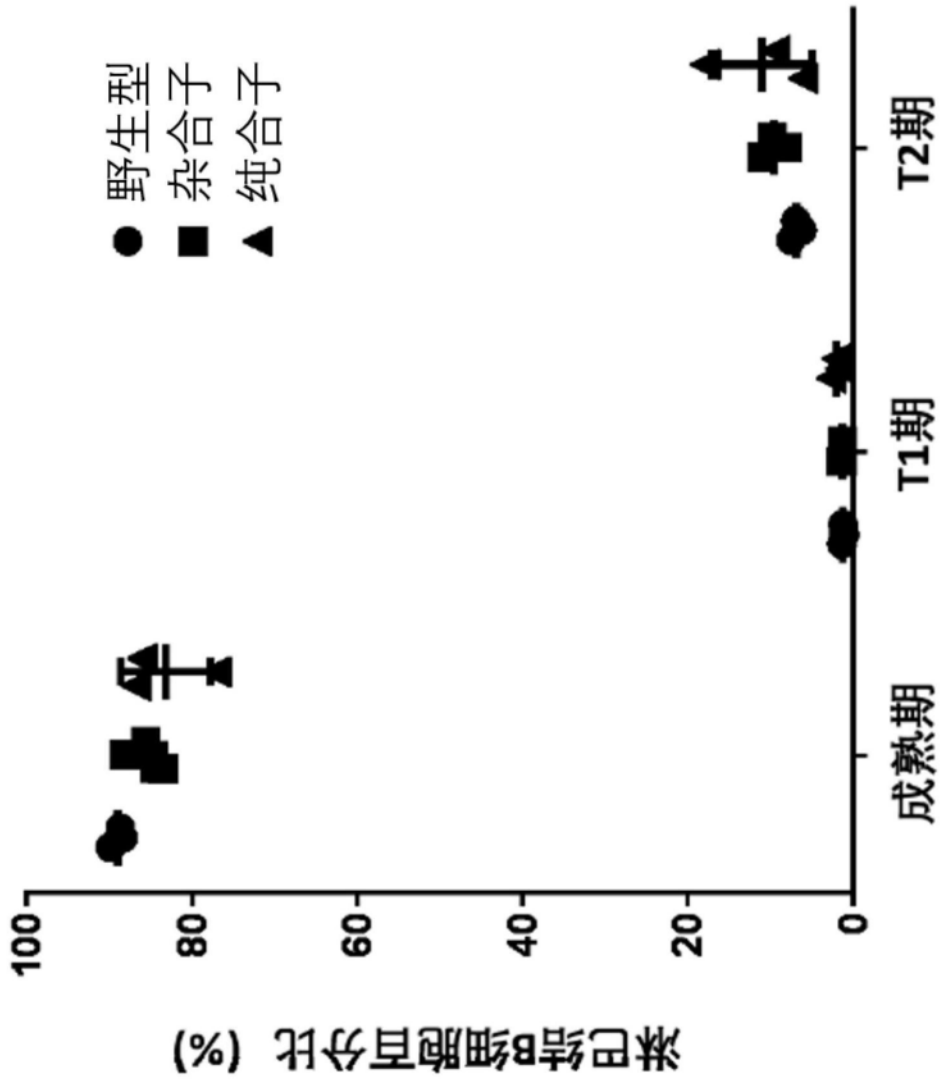


图49

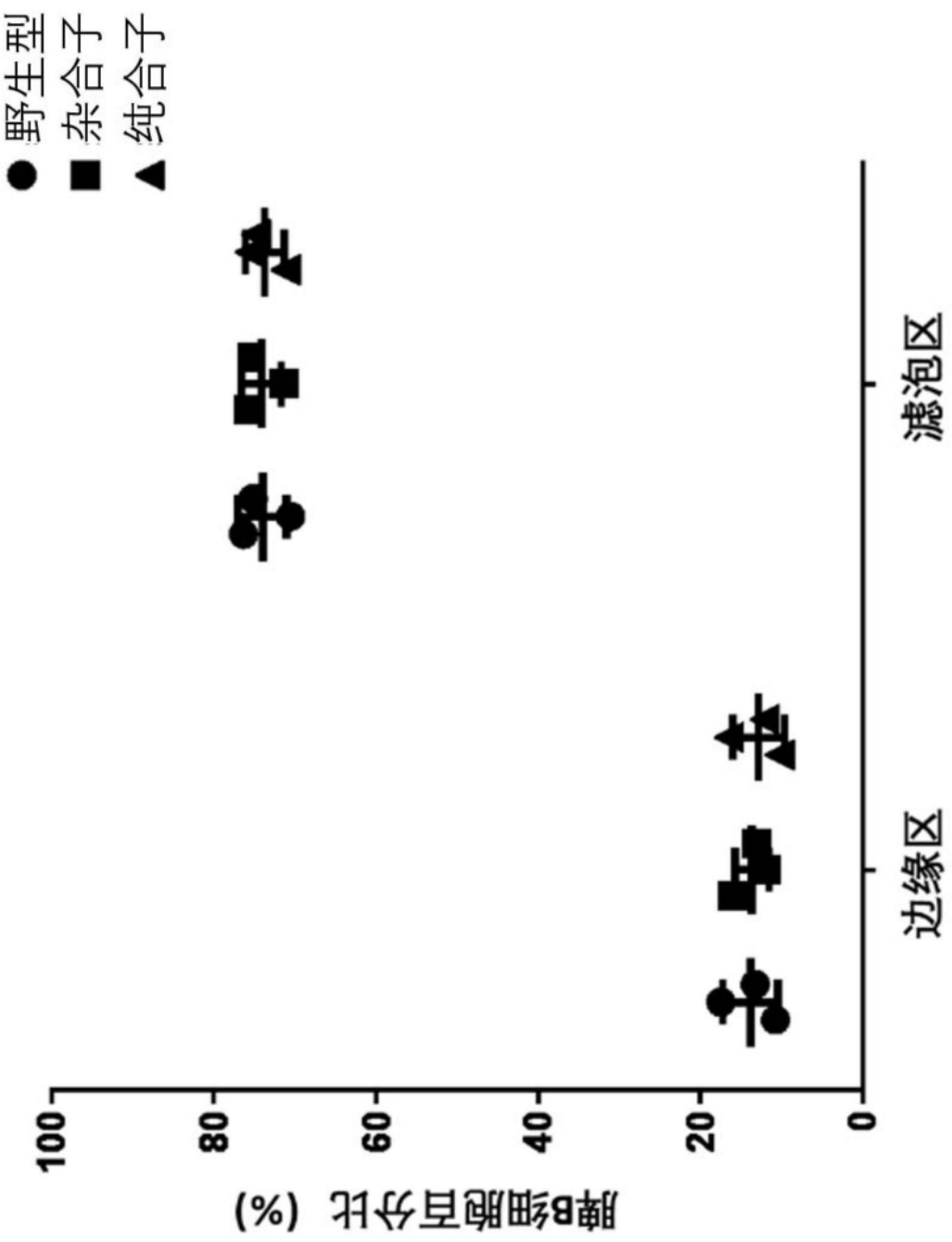


图50

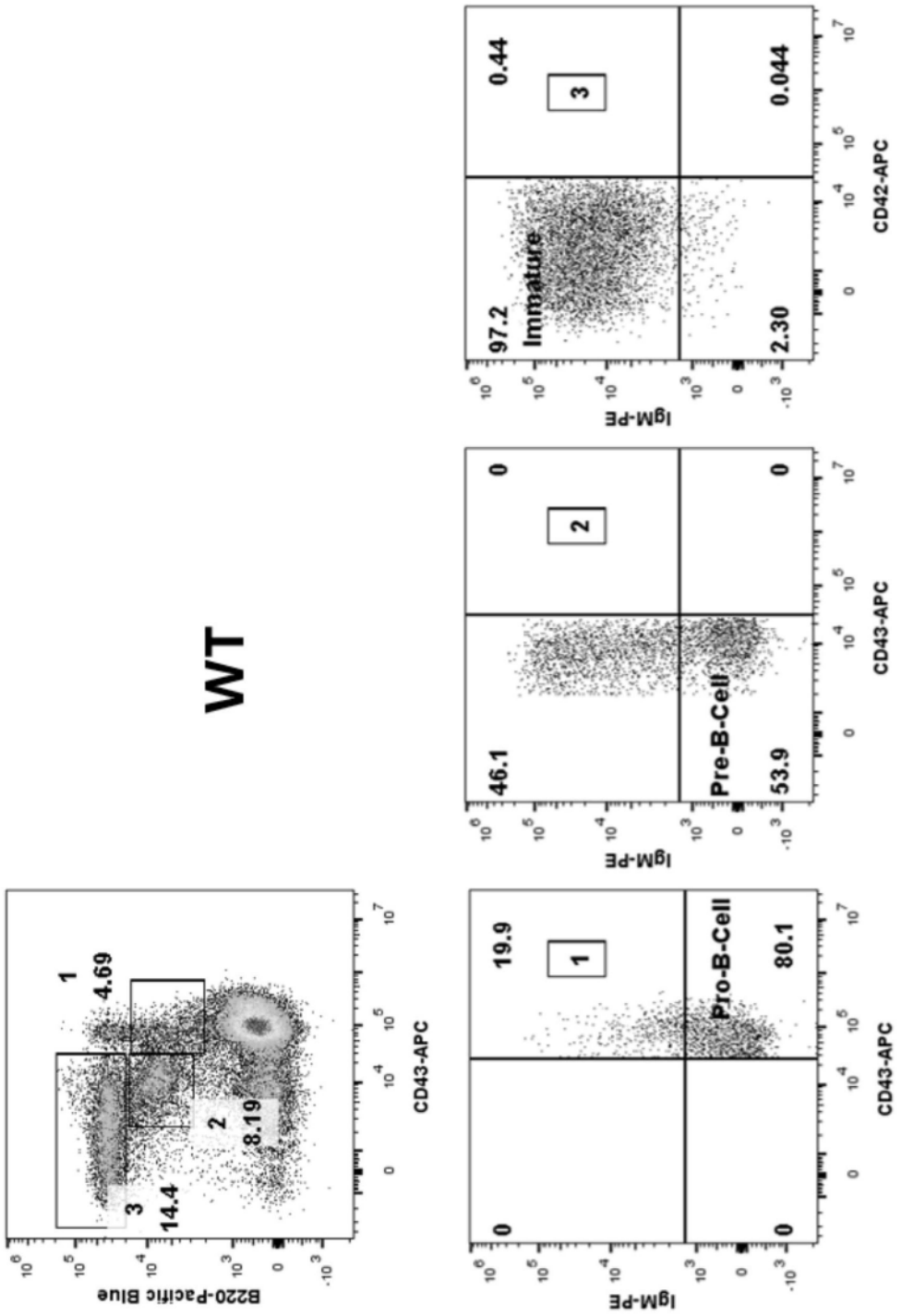

WT
B220-Pacific Blue
CD43-APC
IgM-PE
CD42-APC
1
2
3
4.69
14.4
8.19
19.9
80.1
46.1
53.9
97.2
2.30
0.44
0.044
0
Pro-B-Cell
Pre-B-Cell
Imature

图51A

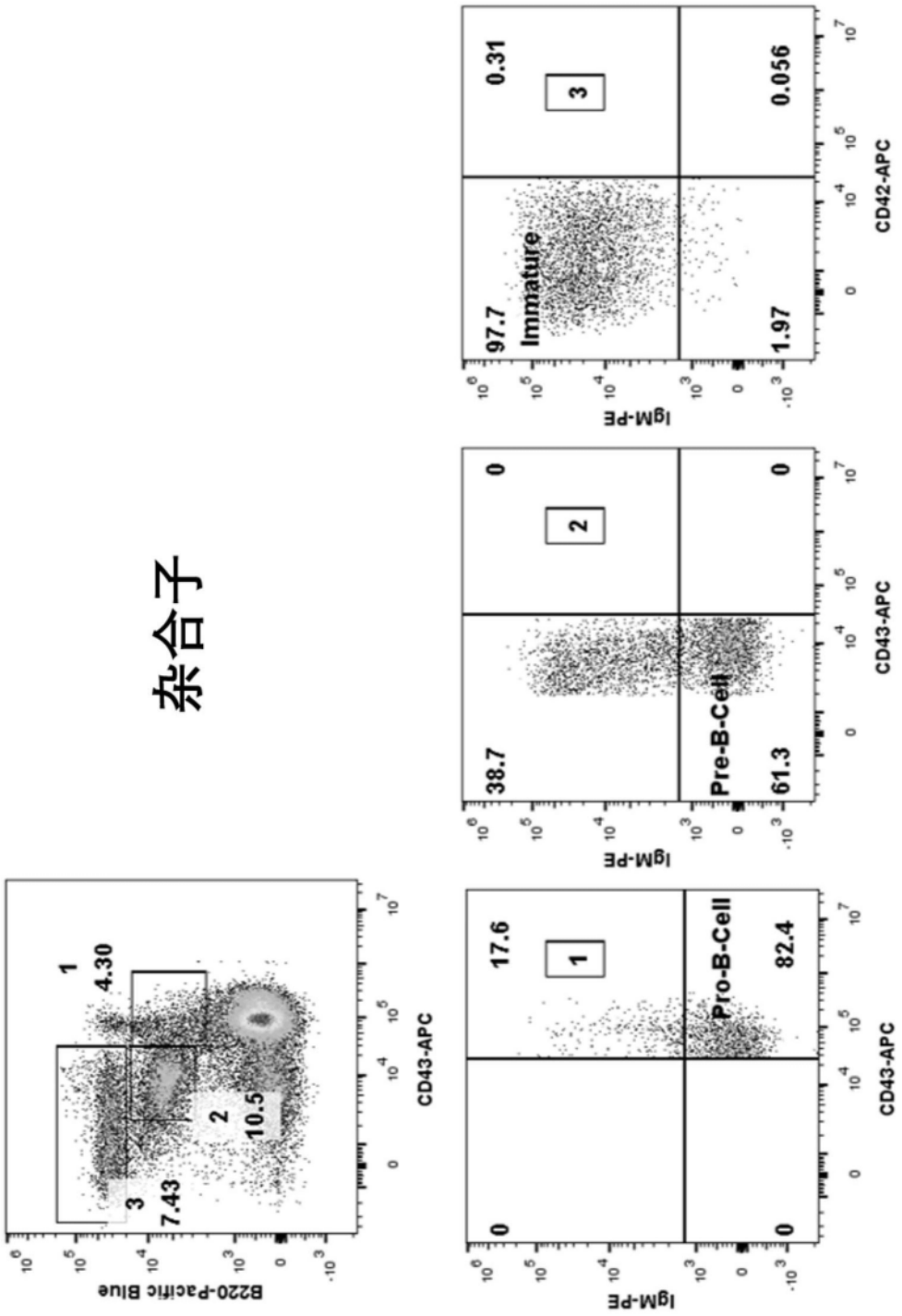

杂合子
B220-Pacific Blue
CD43-APC
IgM-PE
CD42-APC
1
4.30
2
10.5
3
7.43
17.6
82.4
Pro-B-Cell
38.7
61.3
Pre-B-Cell
97.7
Immature
1.97
0.31
0.056
0

图51B

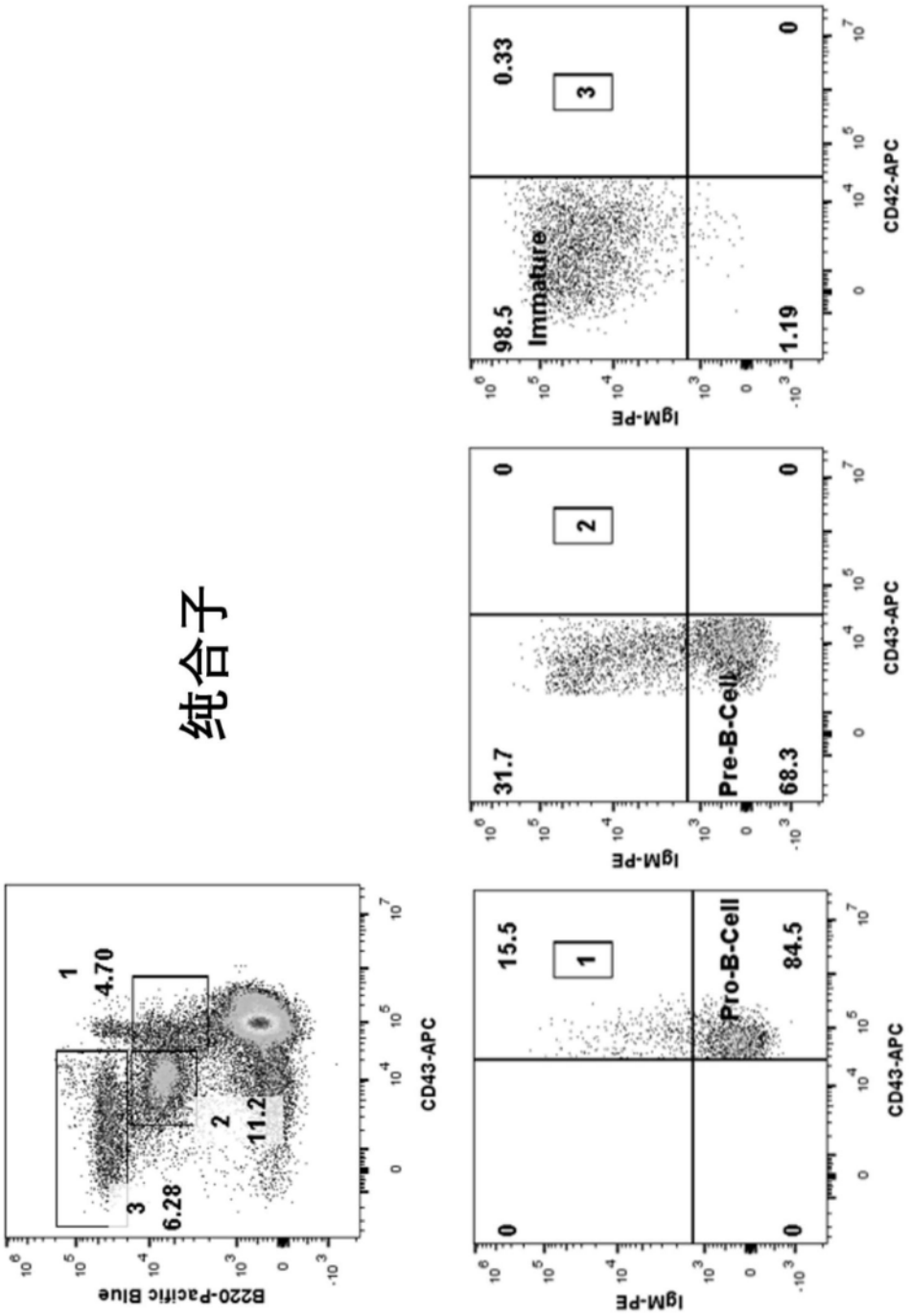

纯合子
B220-Pacific Blue
CD43-APC
1
4.70
2
11.2
3
6.28
IgM-PE
CD43-APC
15.5
1
Pro-B-Cell
84.5
0
0
0
IgM-PE
CD43-APC
0
2
31.7
Pre-B-Cell
68.3
0
0
IgM-PE
CD42-APC
0.33
3
98.5
Immature
1.19
0

图51C

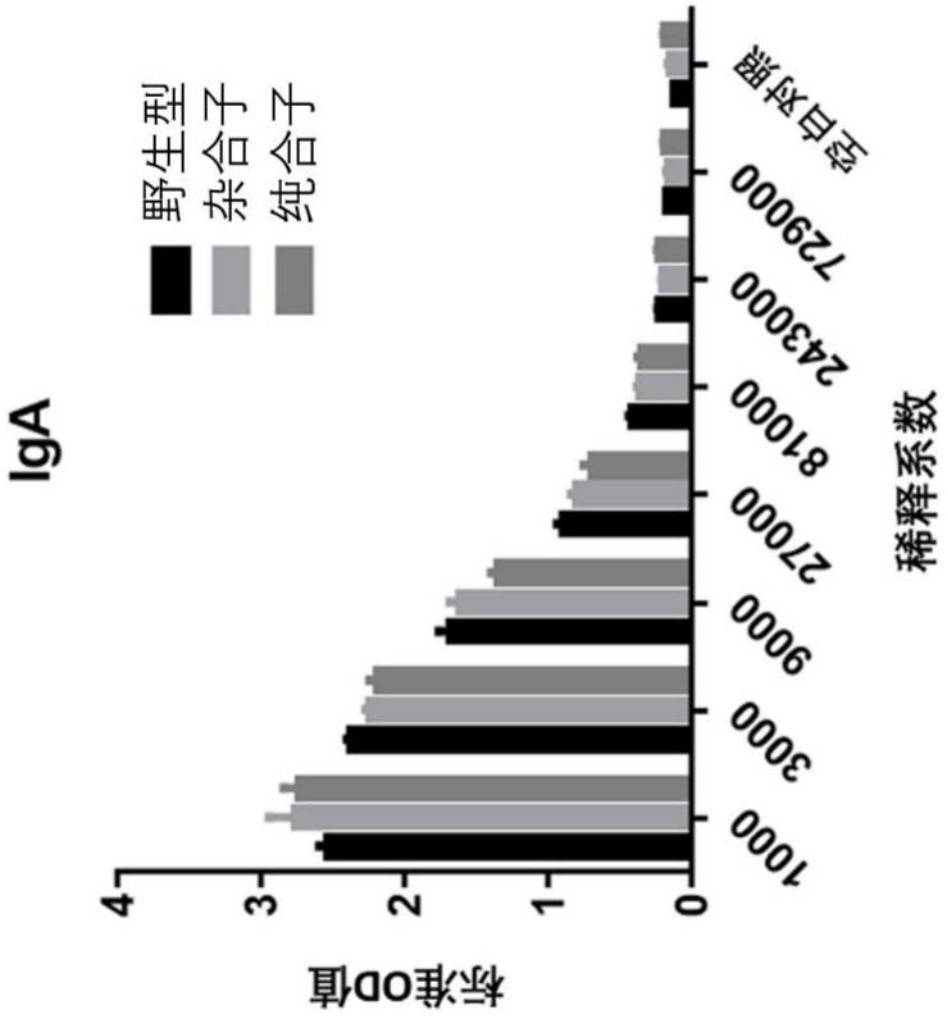

IgA
野生型
杂合子
纯合子
标准OD值
0
1
2
3
4
1000
3000
9000
27000
81000
243000
729000
空白对照
稀释系数

图52

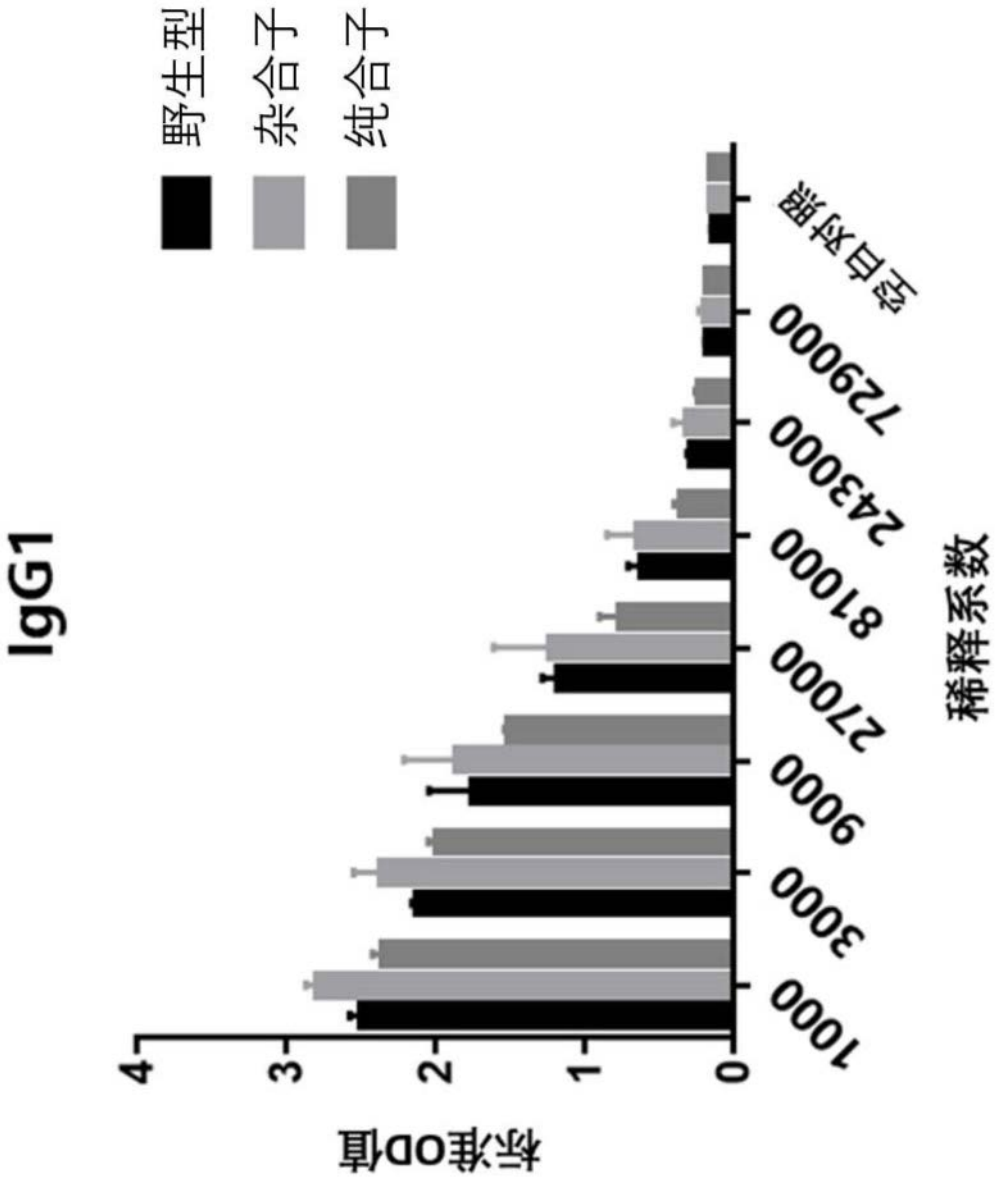

野生型
杂合子
纯合子
IgG1
标准OD值
0
1
2
3
4
稀释系数
1000
3000
9000
27000
81000
243000
729000
空白对照

图53

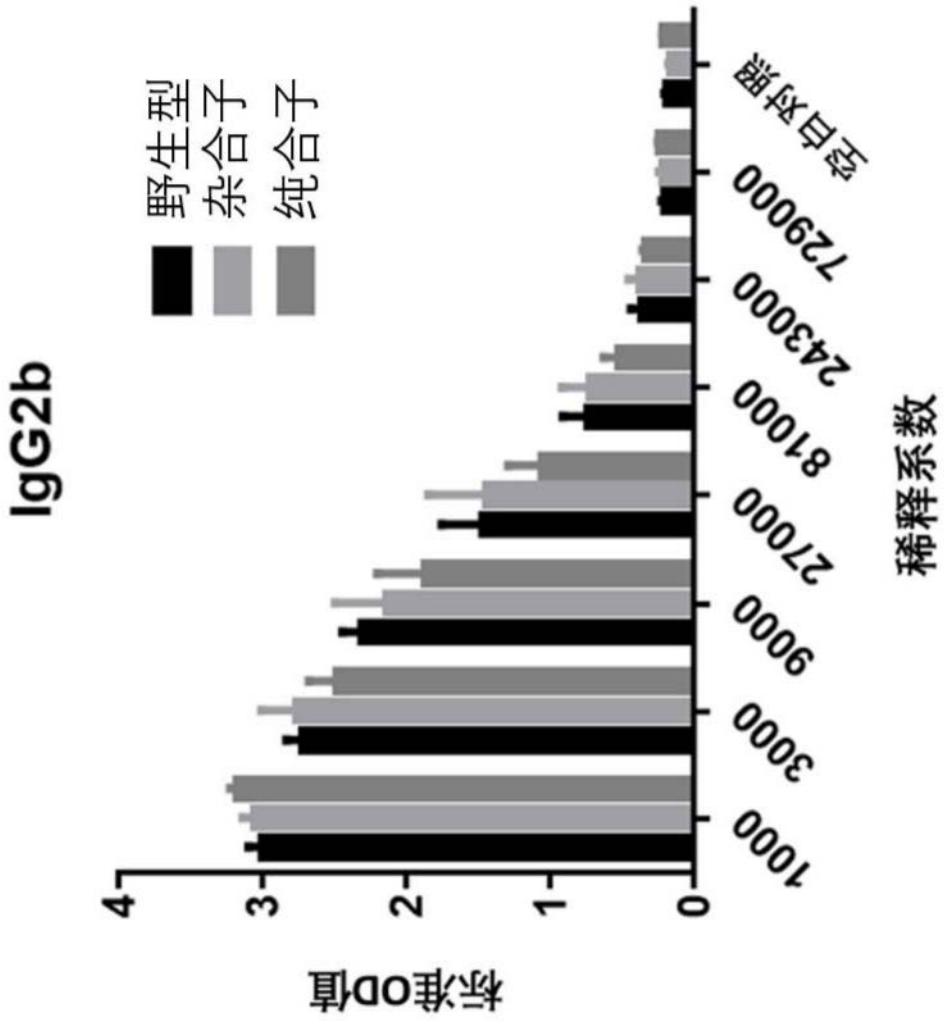

IgG2b
野生型
杂合子
纯合子
标准OD值
0
1
2
3
4
稀释系数
1000
3000
9000
27000
81000
243000
729000
空白对照

图54

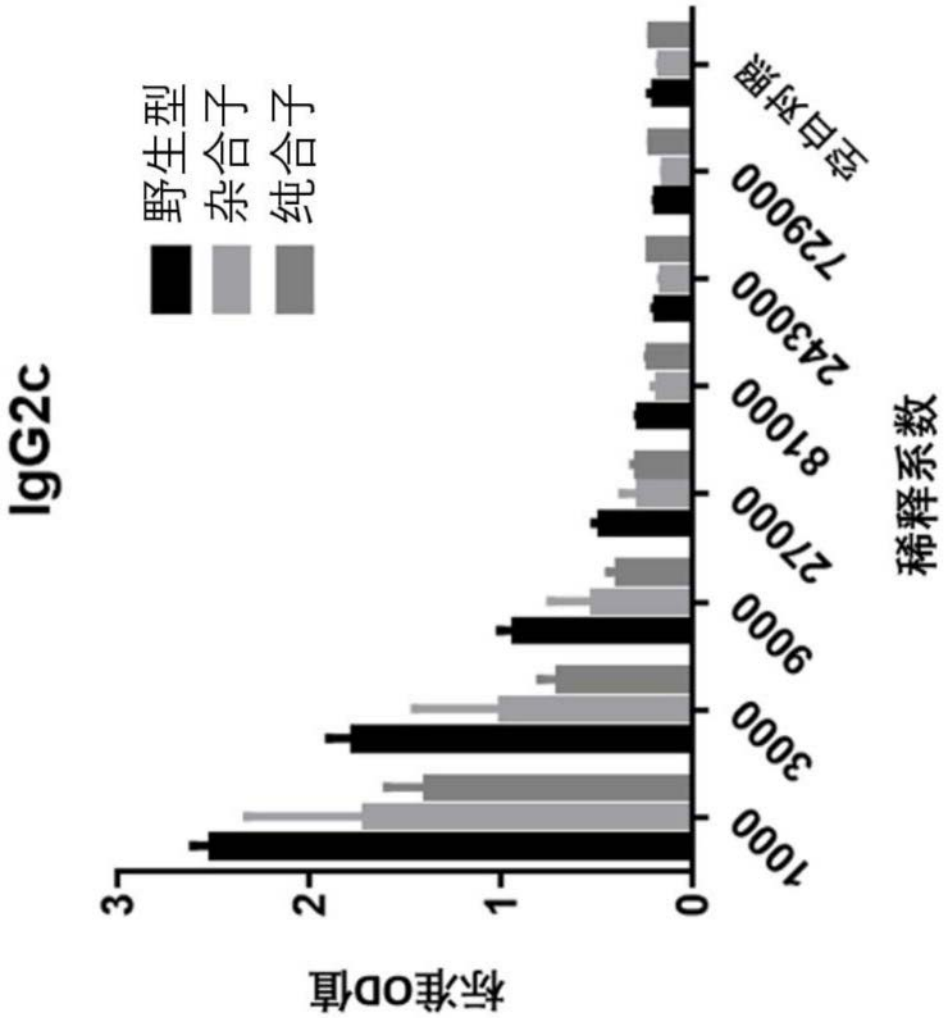

IgG2c
野生型
杂合子
纯合子
标准OD值
0
1
2
3
稀释系数
1000
3000
9000
27000
81000
243000
729000
空白对照

图55

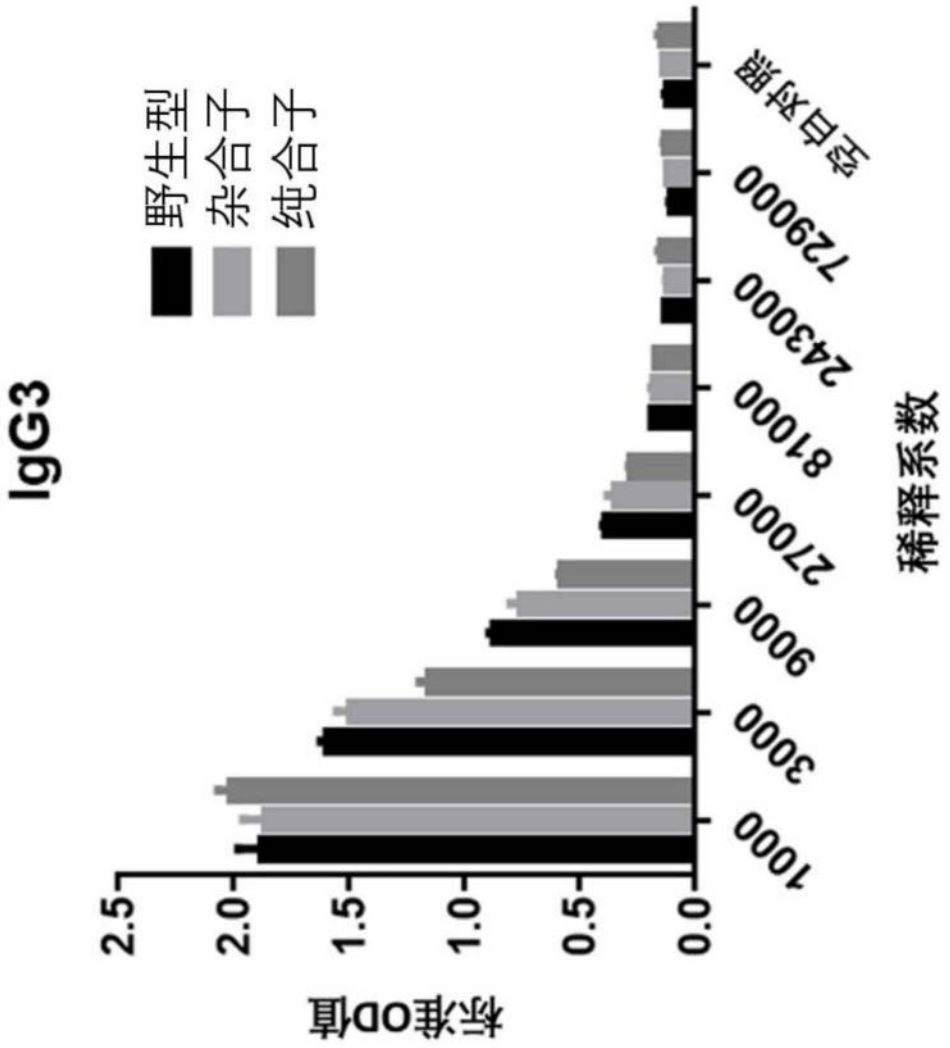

IgG3
野生型
杂合子
纯合子
标准OD值
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
稀释系数
1000
3000
9000
27000
81000
243000
729000
空白对照

图56

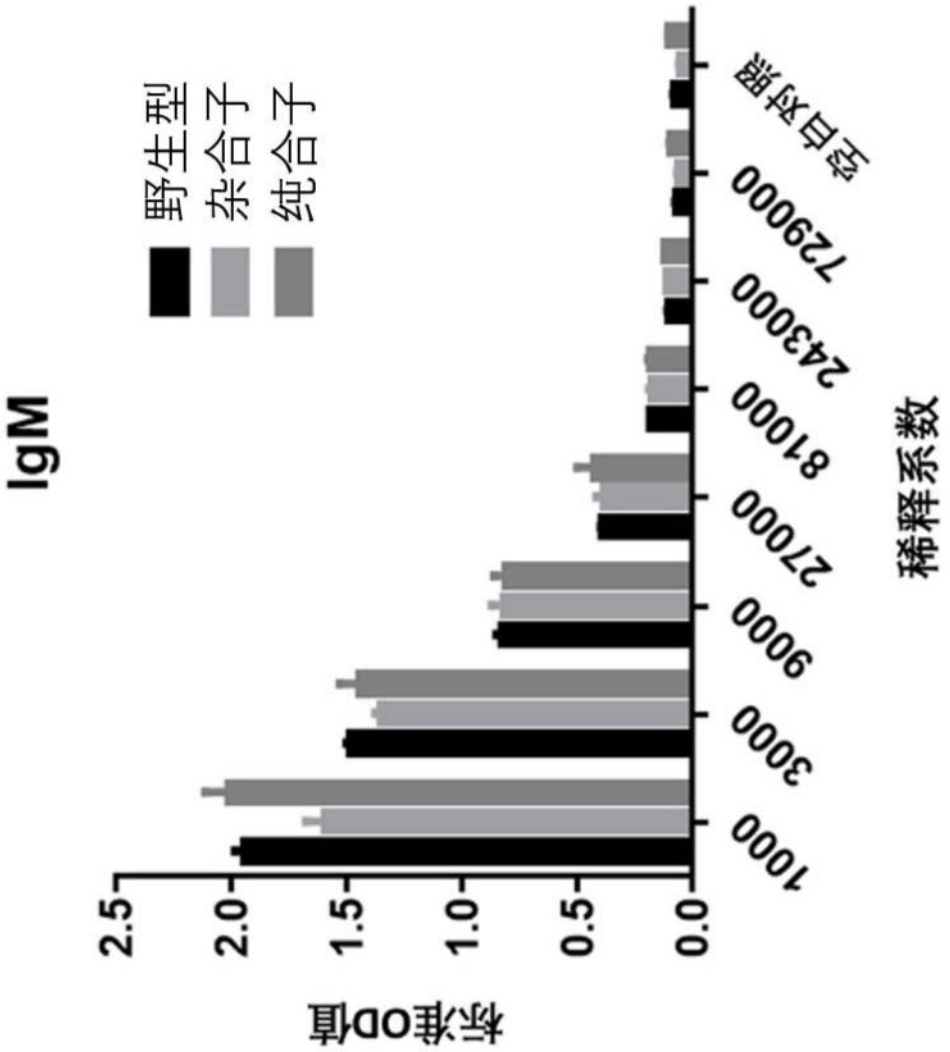

IgM
野生型
杂合子
纯合子
标准OD值
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
稀释系数
1000
3000
9000
27000
81000
243000
729000
空白对照

图57

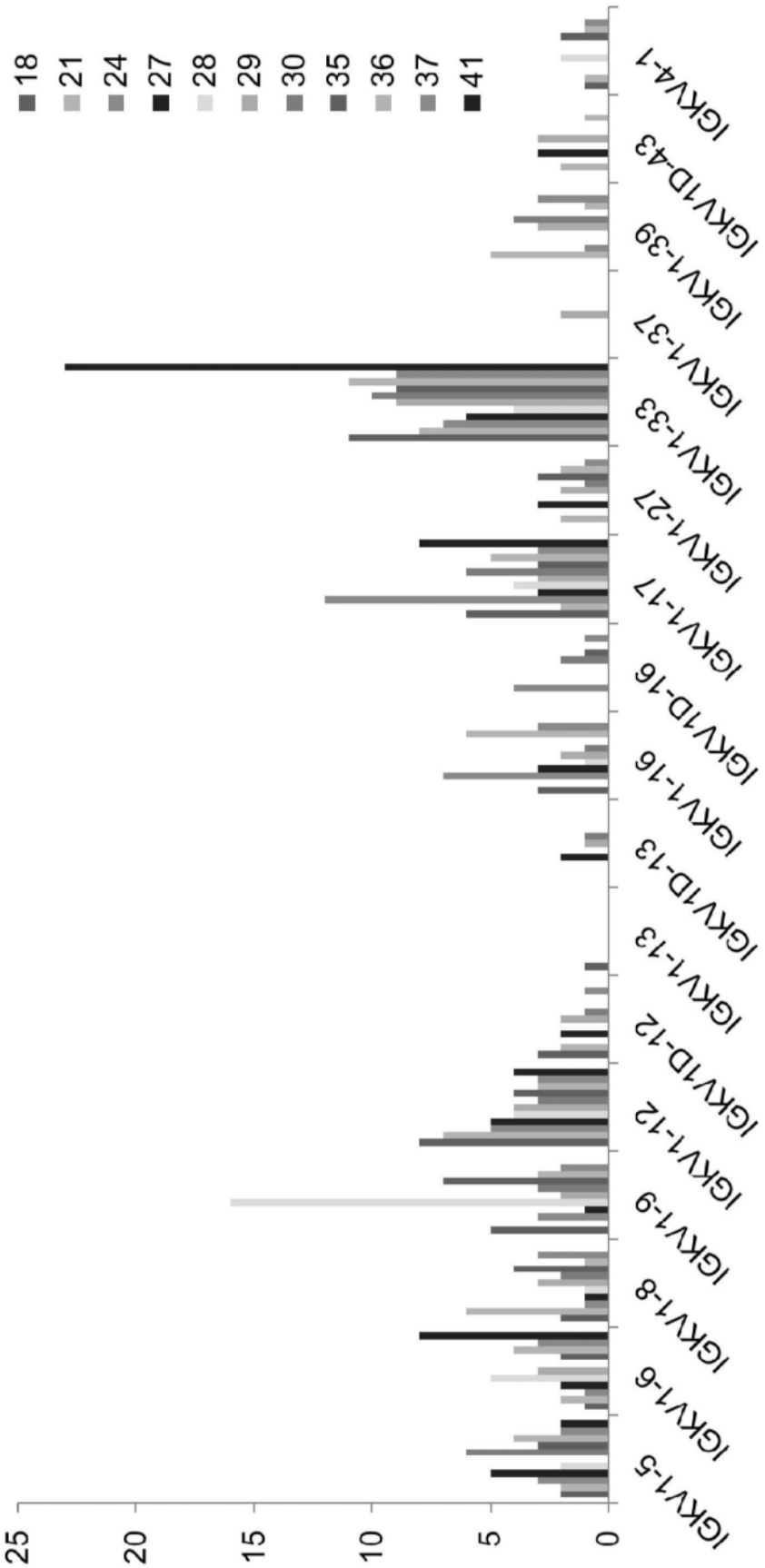

18
21
24
27
28
29
30
35
36
37
41
IGKV4-1
IGKV1D-43
IGKV1-39
IGKV1-37
IGKV1-33
IGKV1-27
IGKV1-17
IGKV1D-16
IGKV1-16
IGKV1D-13
IGKV1-13
IGKV1D-12
IGKV1-12
IGKV1-9
IGKV1-8
IGKV1-6
IGKV1-5
25
20
15
10
5
0

图58

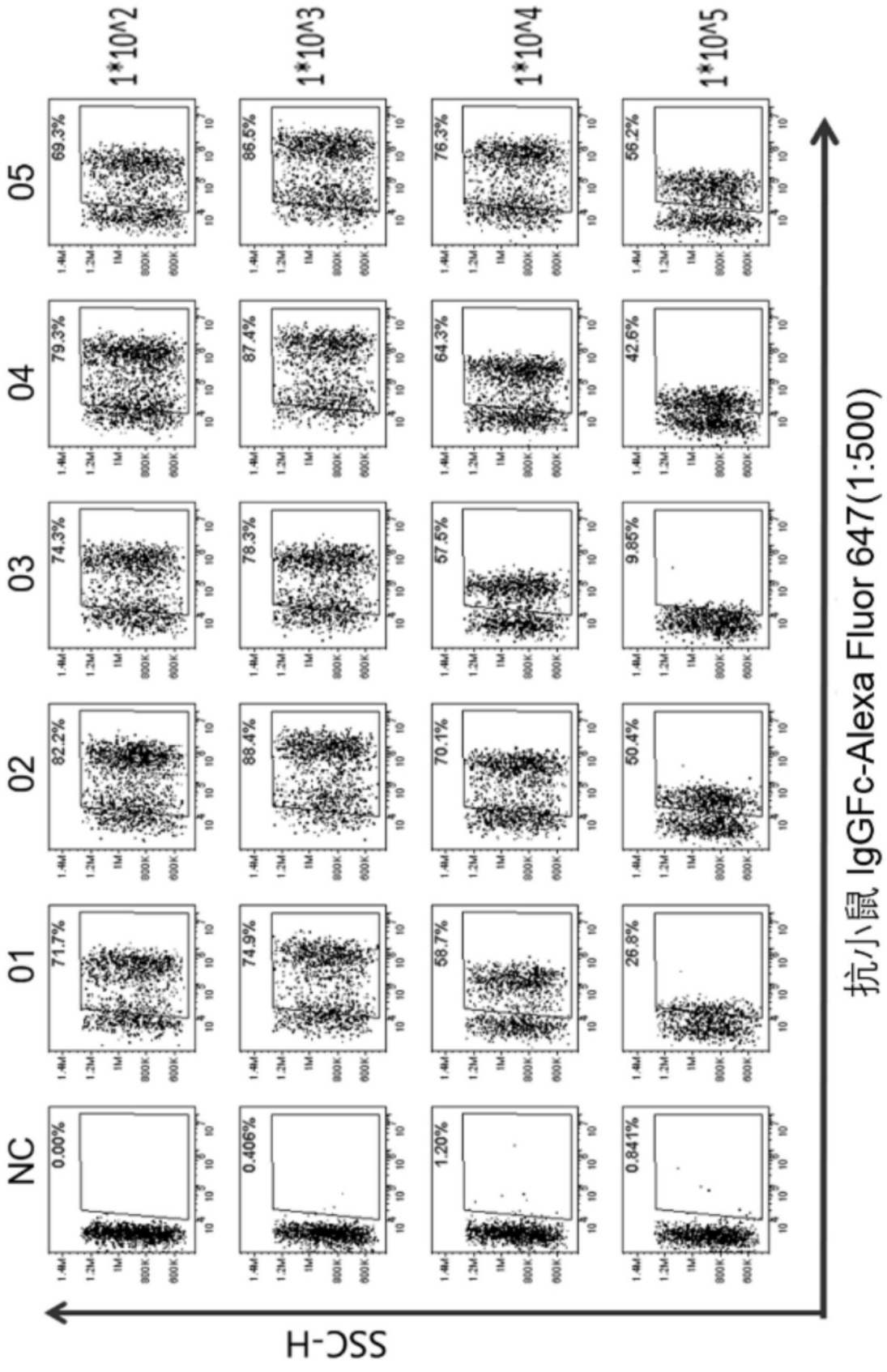

1*10^2
1*10^3
1*10^4
1*10^5
05
04
03
02
01
NC
69.3%
86.5%
76.3%
56.2%
79.3%
87.4%
64.3%
42.6%
74.3%
78.3%
57.5%
9.85%
82.2%
88.4%
70.1%
50.4%
71.7%
74.9%
58.7%
26.8%
0.00%
0.406%
1.20%
0.841%
SSC-H
抗小鼠 IgGFc-Alexa Fluor 647(1:500)

图59

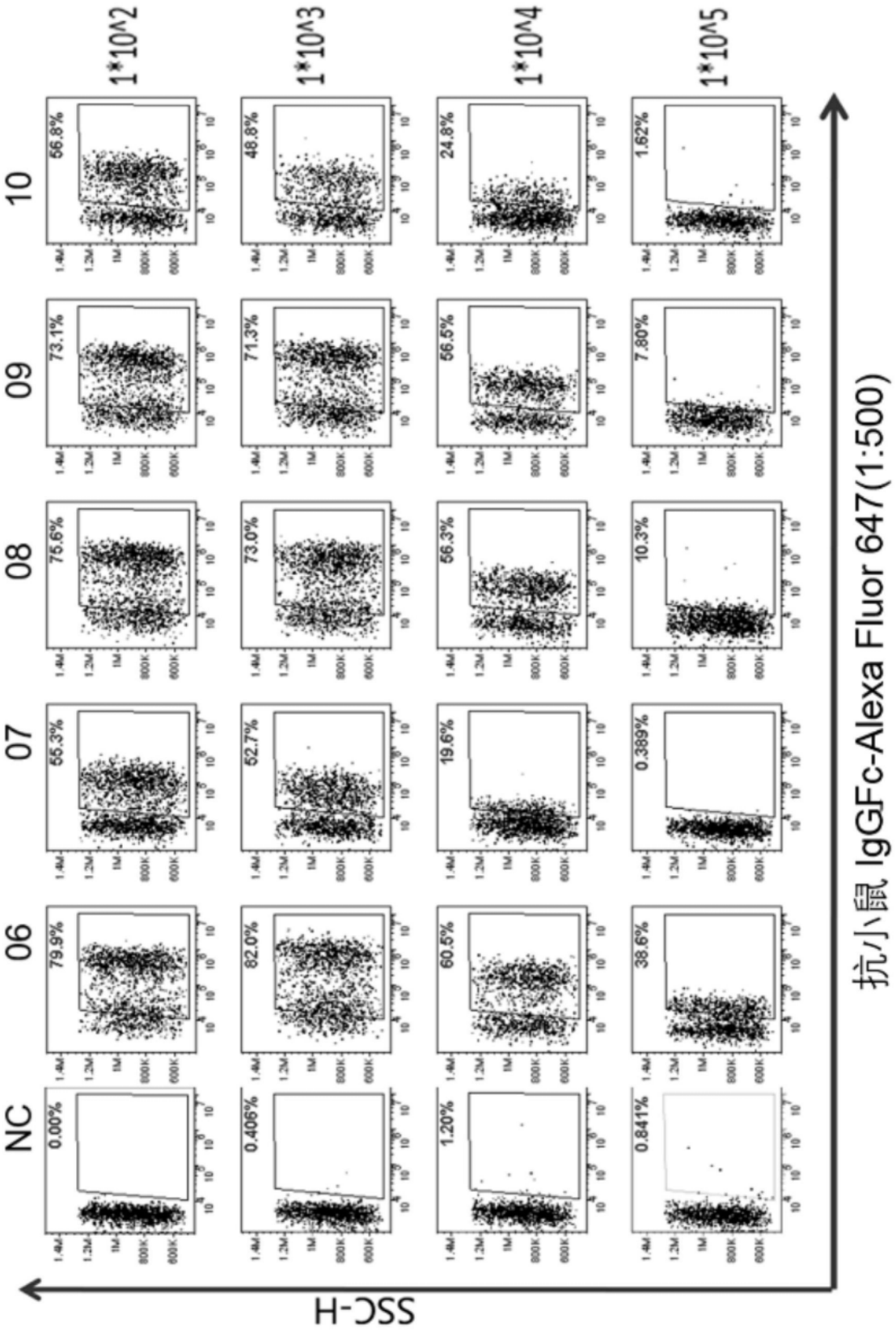

1*10^2
1*10^3
1*10^4
1*10^5
10
09
08
07
06
NC
56.8%
48.8%
24.8%
1.62%
73.1%
71.3%
56.5%
7.80%
75.6%
73.0%
56.3%
10.3%
55.3%
52.7%
19.6%
0.389%
79.9%
82.0%
60.5%
38.6%
0.00%
0.406%
1.20%
0.841%
SSC-H
抗小鼠 IgGFc-Alexa Fluor 647(1:500)

图60

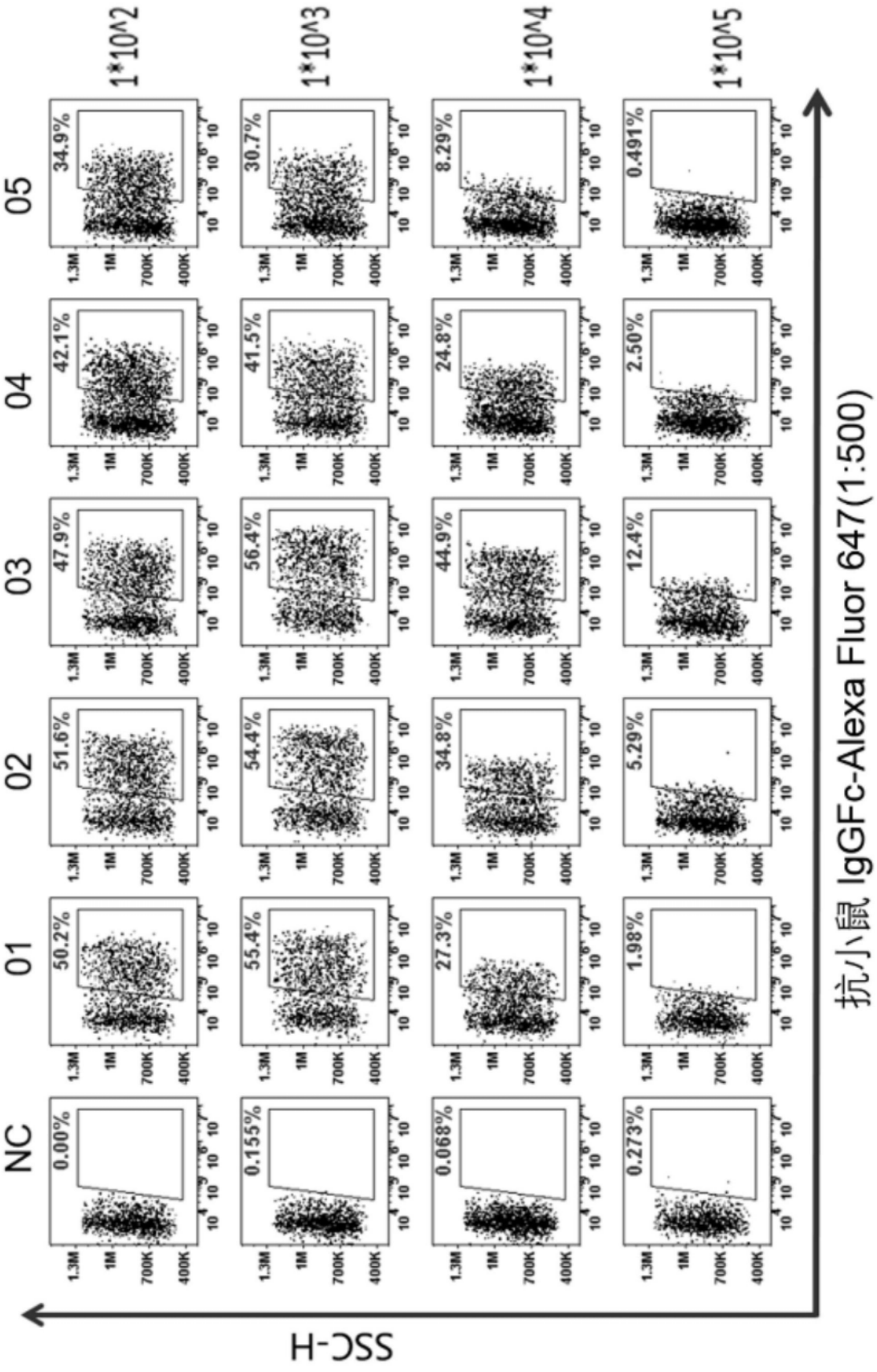

NC
01
02
03
04
05
1*10^2
1*10^3
1*10^4
1*10^5
0.00%
50.2%
51.6%
47.9%
42.1%
34.9%
0.155%
55.4%
54.4%
56.4%
41.5%
30.7%
0.068%
27.3%
34.8%
44.9%
24.8%
8.29%
0.273%
1.98%
5.29%
12.4%
2.50%
0.491%
1.3M
1M
700K
400K
SSC-H
抗小鼠 IgGFc-Alexa Fluor 647(1:500)

图61

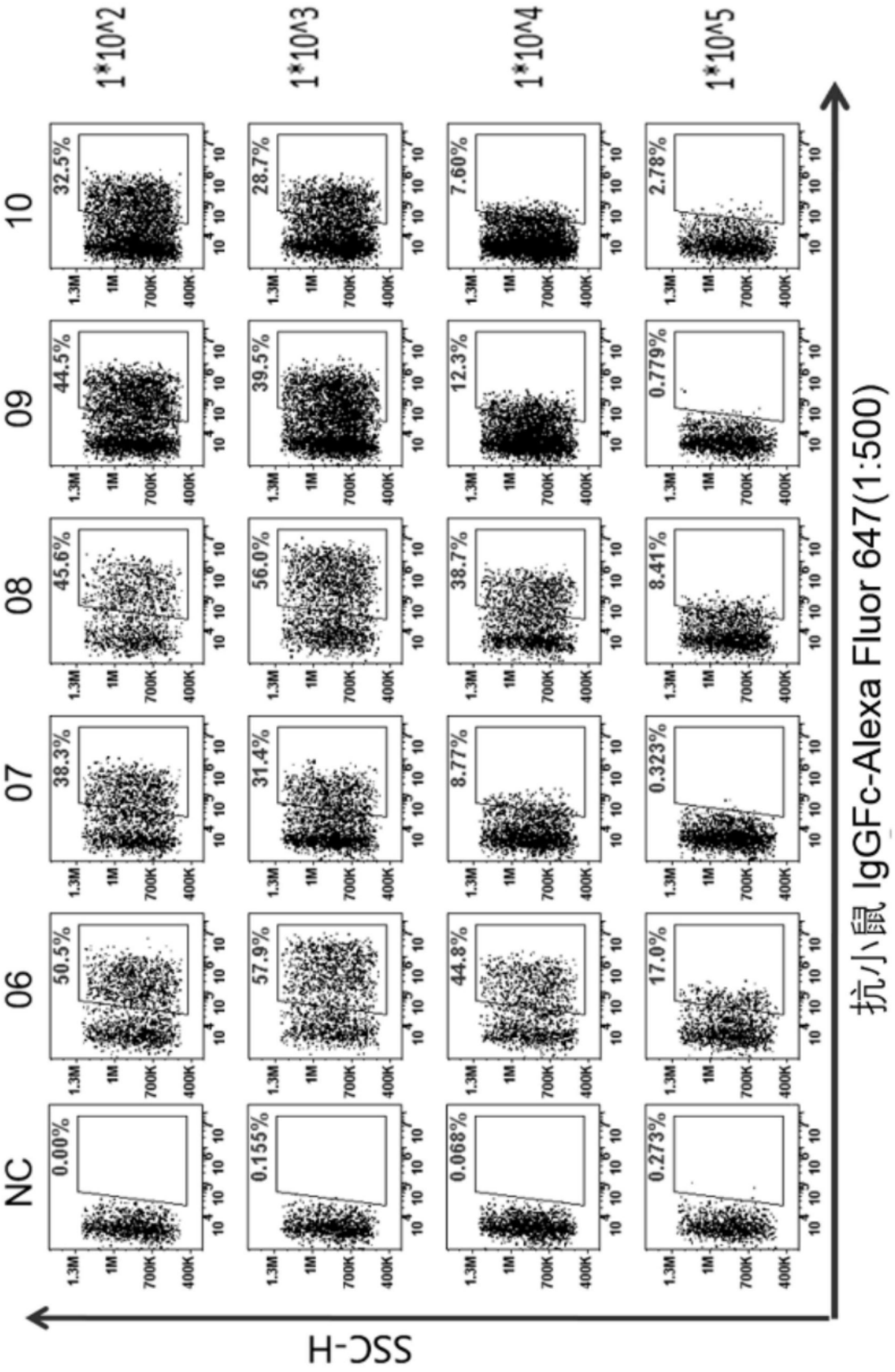

1*10^2
1*10^3
1*10^4
1*10^5
10
09
08
07
06
NC
32.5%
28.7%
7.60%
2.78%
44.5%
39.5%
12.3%
0.779%
45.6%
56.0%
38.7%
8.41%
38.3%
31.4%
8.77%
0.323%
50.5%
57.9%
44.8%
17.0%
0.00%
0.155%
0.068%
0.273%
1.3M
1M
700K
400K
SSC-H
抗小鼠 IgGFc-Alexa Fluor 647(1:500)

图62

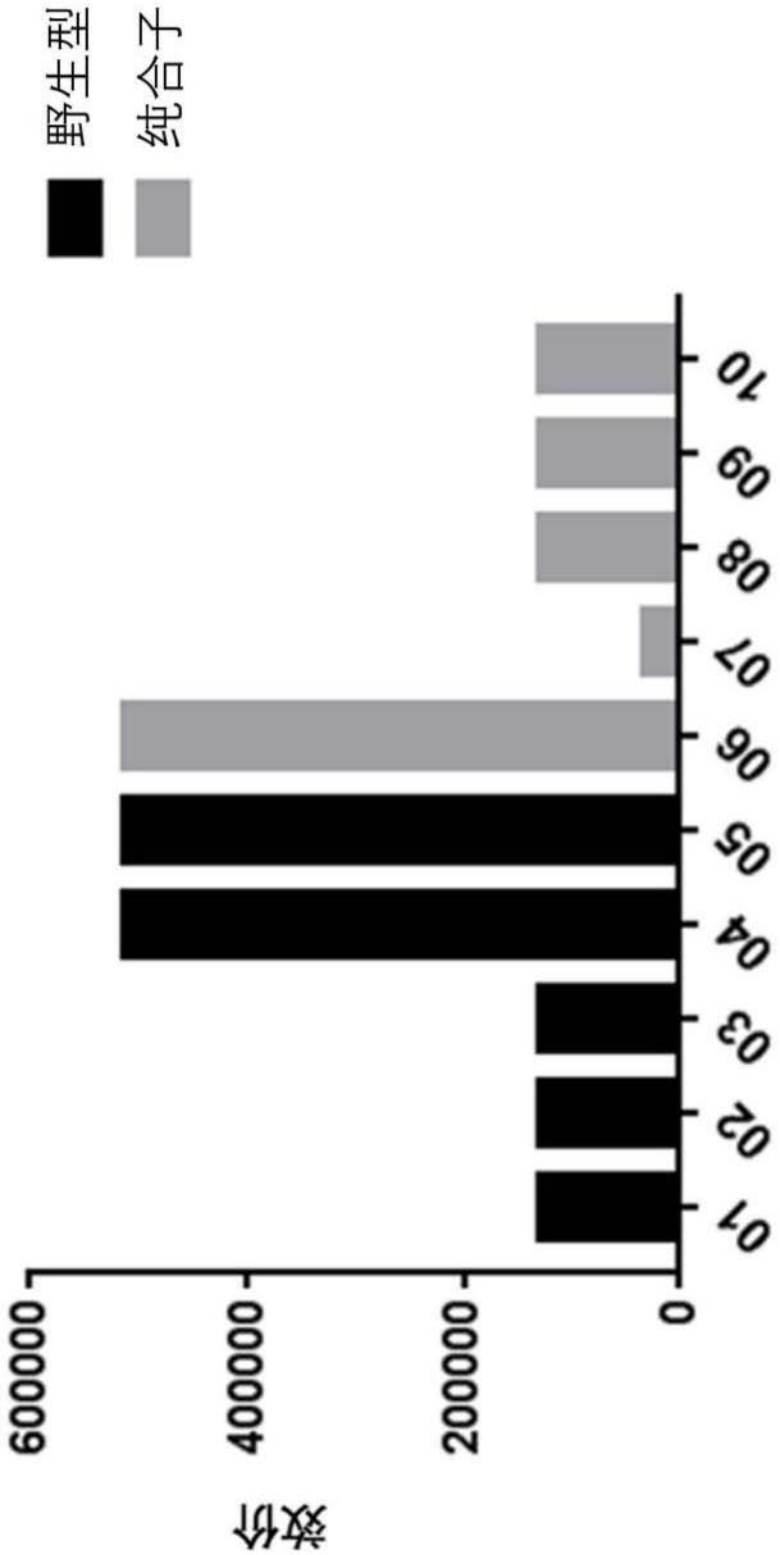


图63

近端 V-CLUSTER 从 3' (列顶部) 到 5' (列底部)	远端 V-CLUSTER 从 3' (列底部) to 5' (列顶部)
IGKV4-1	
IGKV5-2	
IGKV7-3	
IGKV2-4	
IGKV1-5	
IGKV1-6	
IGKV3-7	IGKV3D-7
IGKV1-8	IGKV1D-8
	IGKV1D-43
	IGKV1D-42
IGKV1-9	
IGKV2-10	IGKV2D-10
IGKV3-11	IGKV3D-11
IGKV1-12	IGKV1D-12
IGKV1-13	IGKV1D-13
IGKV2-14	IGKV2D-14
IGKV3-15	IGKV3D-15
IGKV1-16	IGKV1D-16
IGKV1-17	IGKV1D-17
	IGKV6D-41
IGKV2-18	IGKV2D-18
IGKV2-19	IGKV2D-19
IGKV3-20	IGKV3D-20
IGKV6-21	IGKV6D-21
IGKV1-22	IGKV1D-22
IGKV2-23	IGKV2D-23
IGKV2-24	IGKV2D-24
IGKV3-25	IGKV3D-25
IGKV2-26	IGKV2D-26
IGKV1-27	IGKV1D-27
IGKV2-28	IGKV2D-28
IGKV2-29	IGKV2D-29
IGKV2-30	IGKV2D-30
IGKV3-31	IGKV3D-31
IGKV1-32	IGKV1D-32
IGKV1-33	IGKV1D-33
IGKV3-34	IGKV3D-34
IGKV1-35	IGKV1D-35
IGKV2-36	IGKV2D-36
IGKV1-37	IGKV1D-37
IGKV2-38	IGKV2D-38
IGKV1-39	IGKV1D-39
IGKV2-40	IGKV2D-40

图64

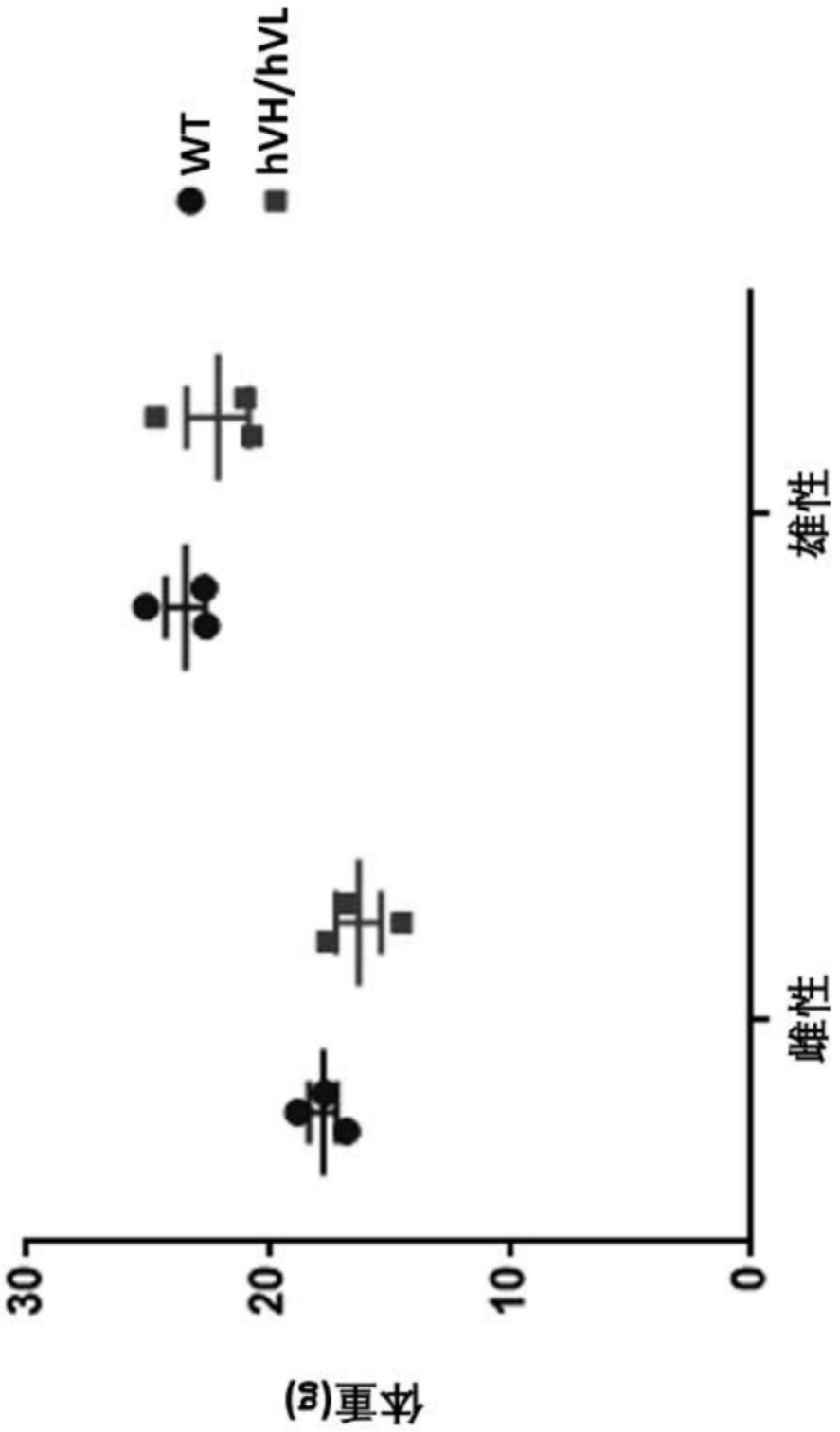


图65A

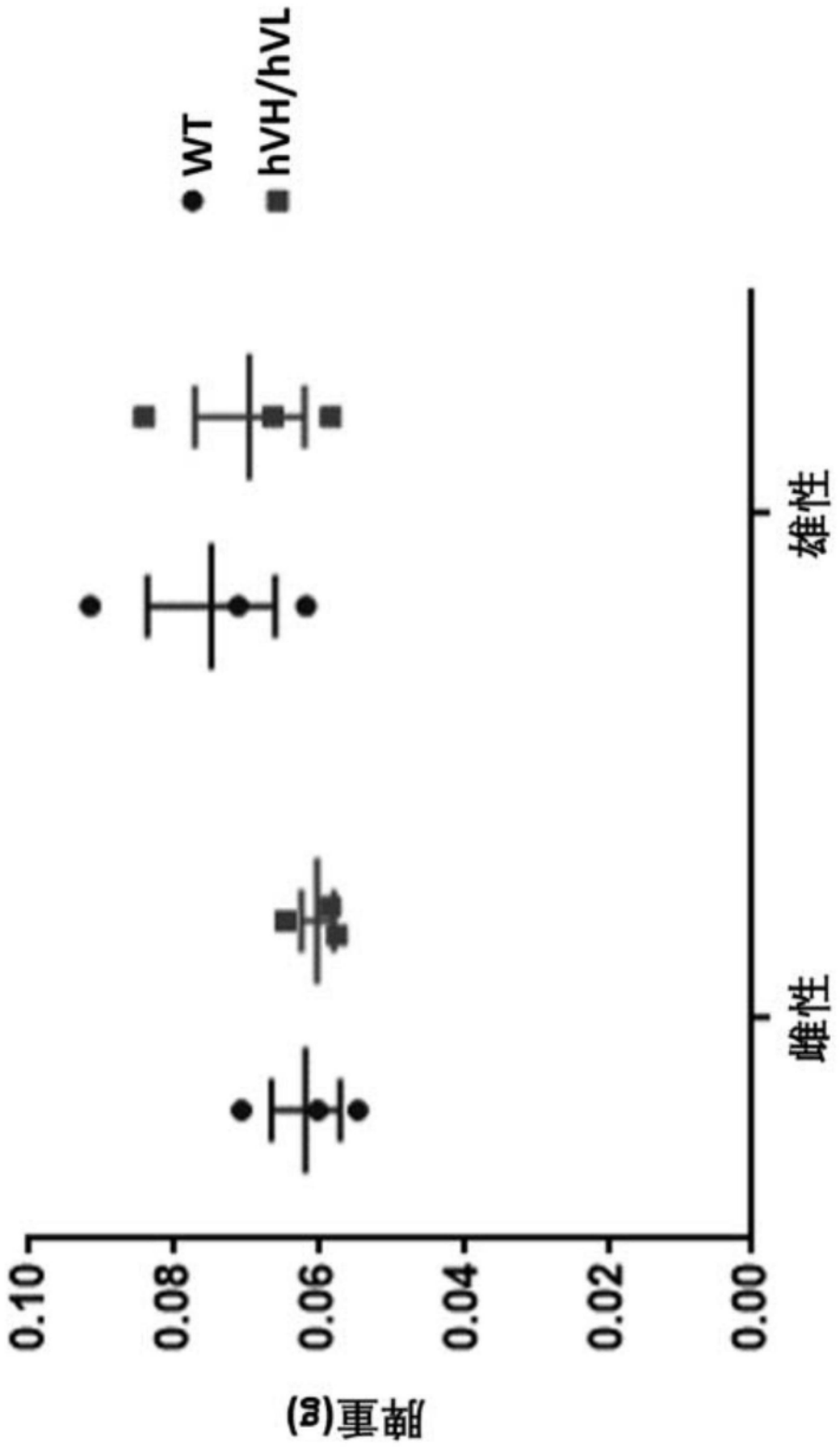


图65B

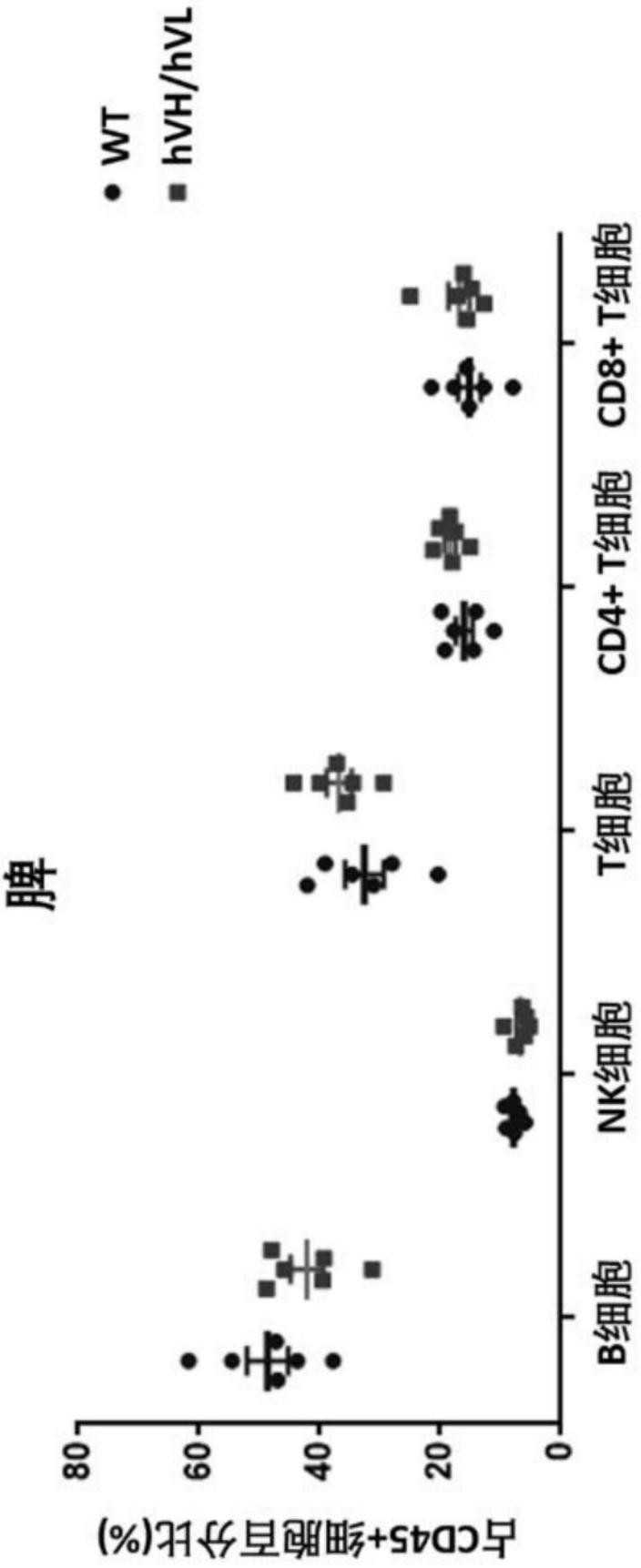

WT
hVH/hVL
脾
占CD45+细胞百分比(%)
0
20
40
60
80
B细胞
NK细胞
T细胞
CD4+ T细胞
CD8+ T细胞

图66

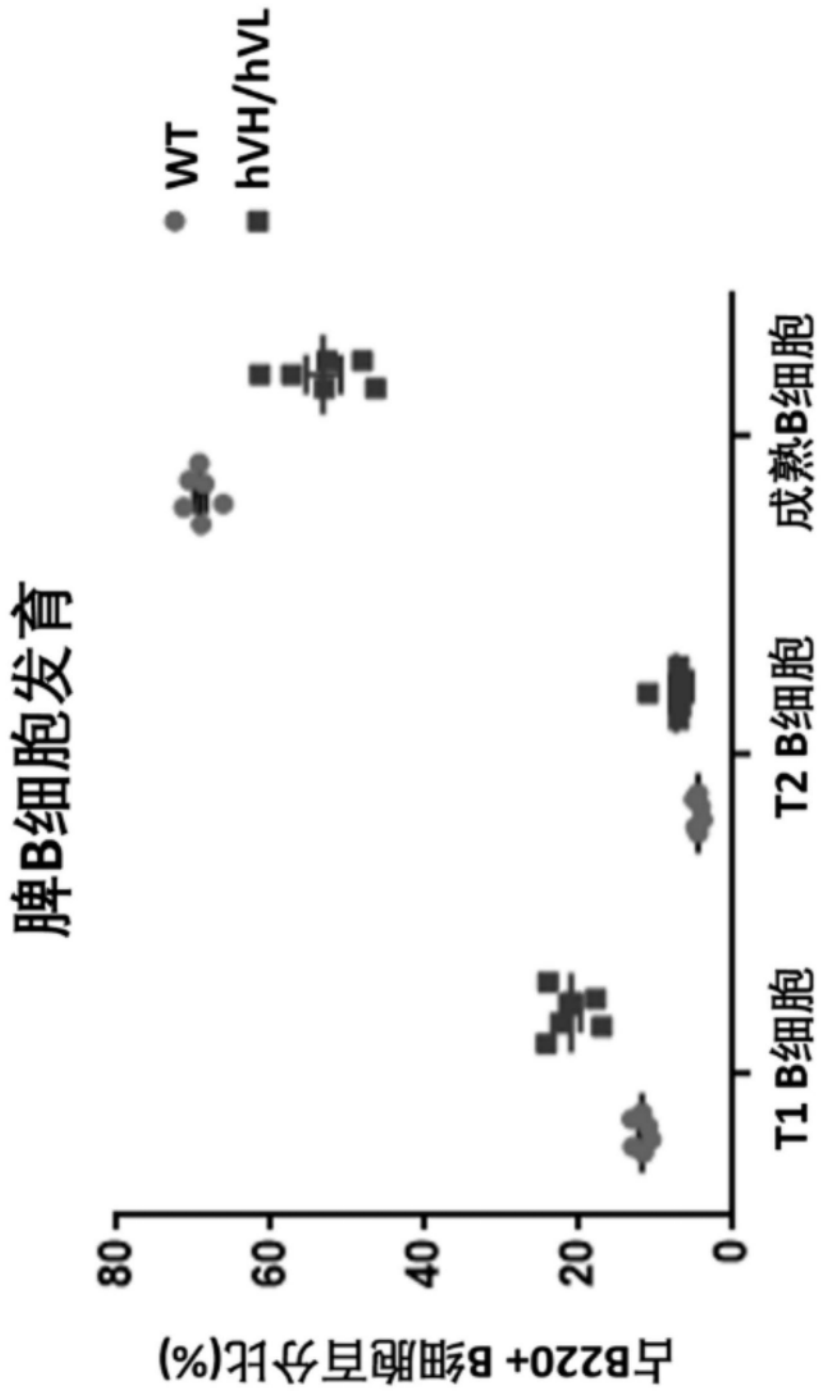


图67A

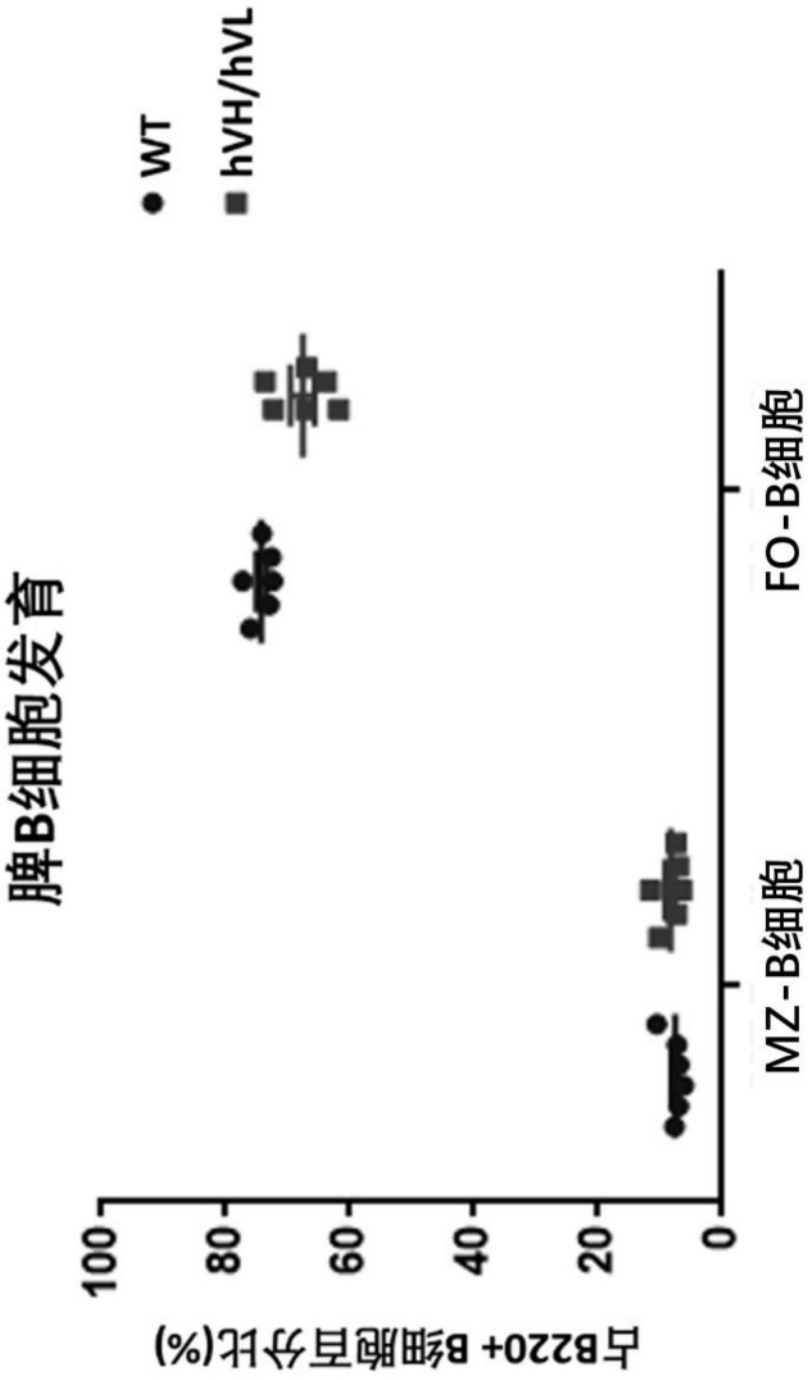


图67B

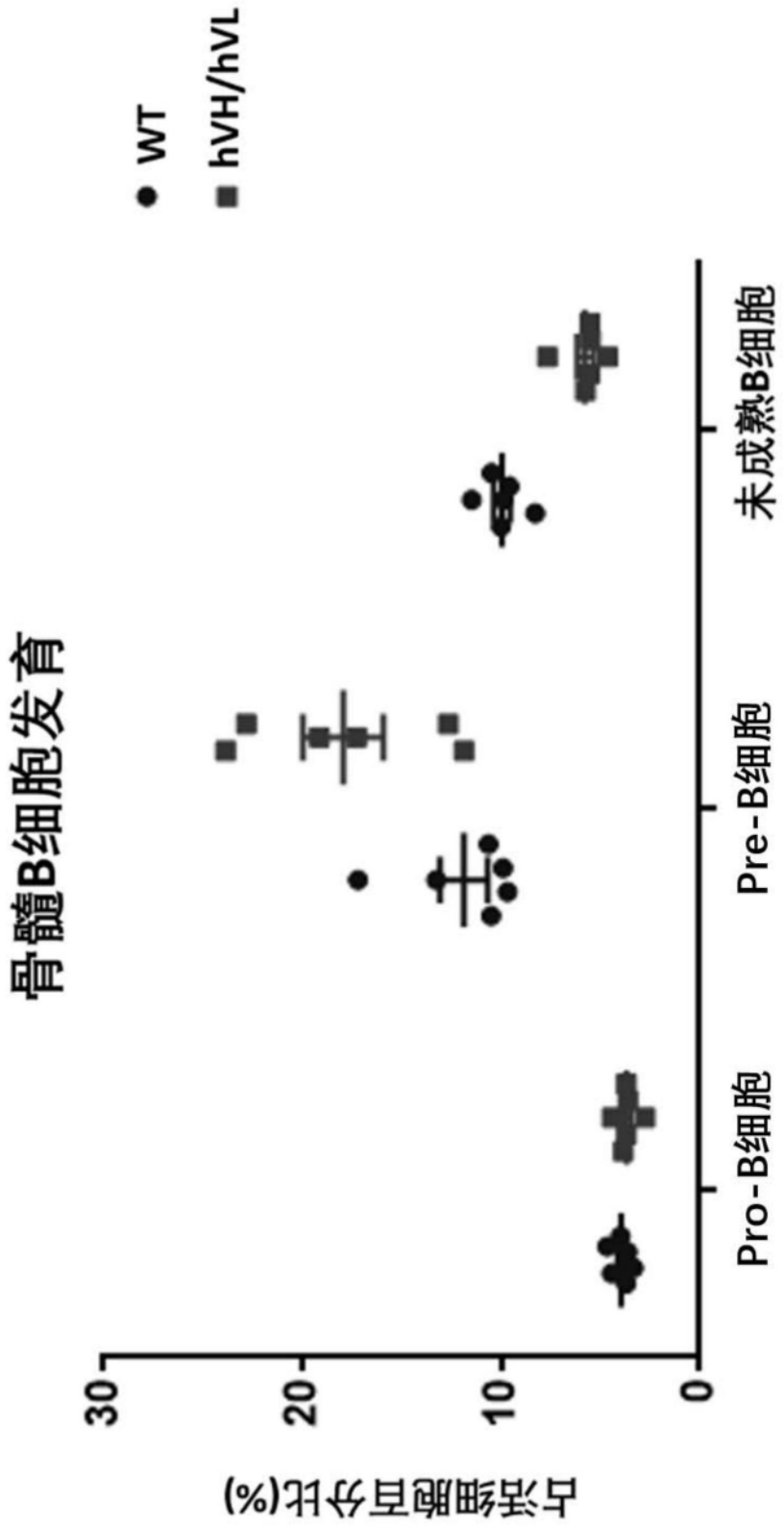


图68A

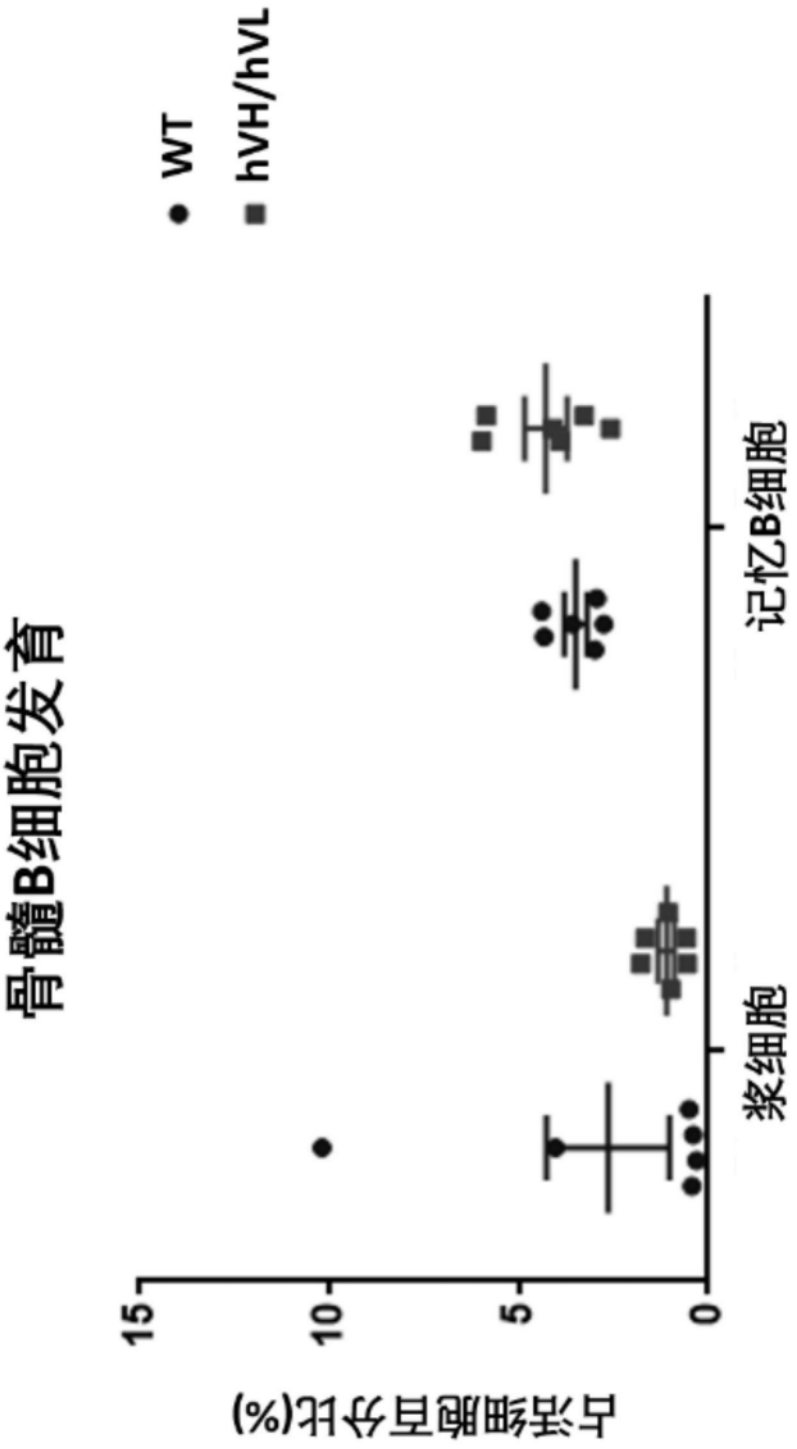


图68B

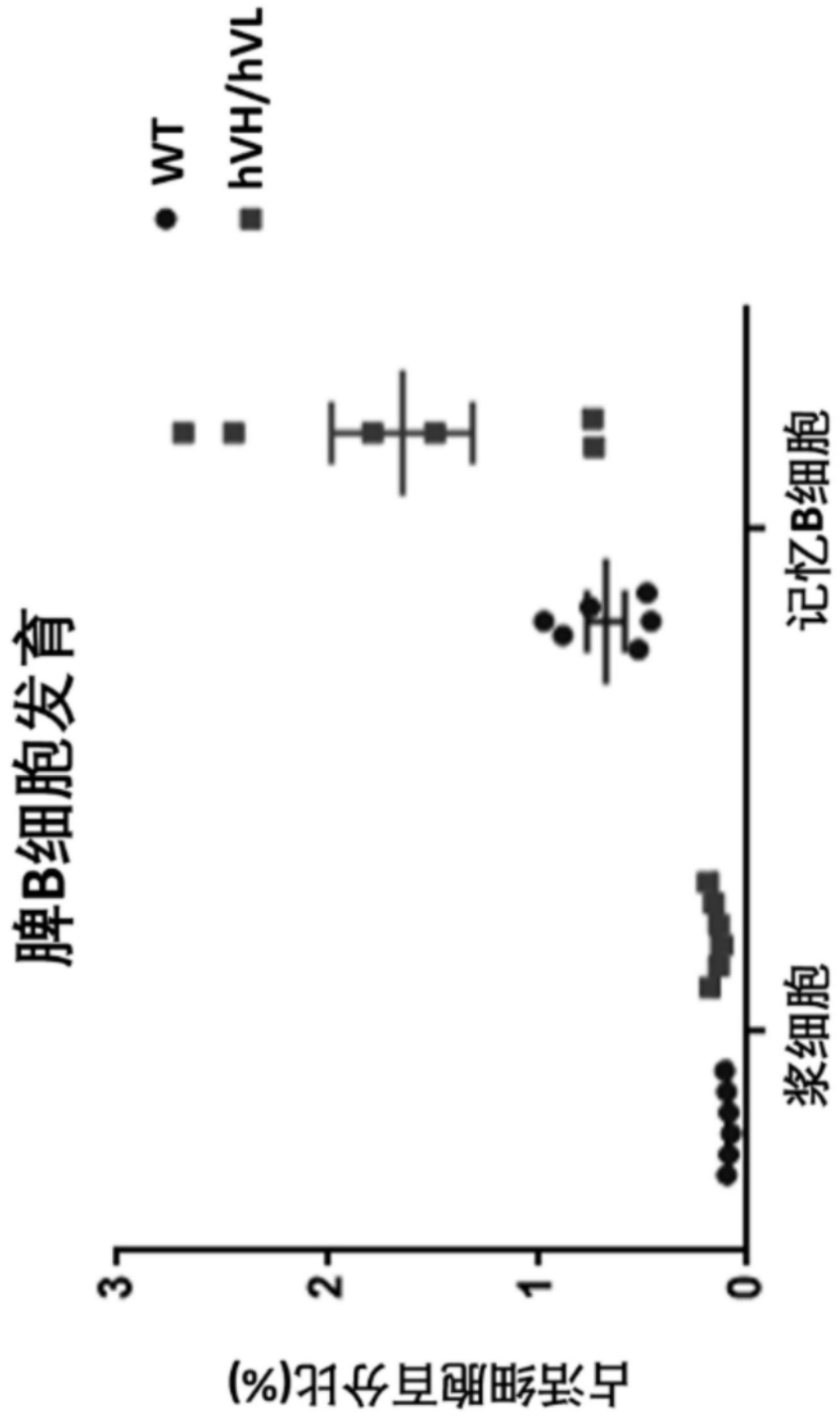


图68C

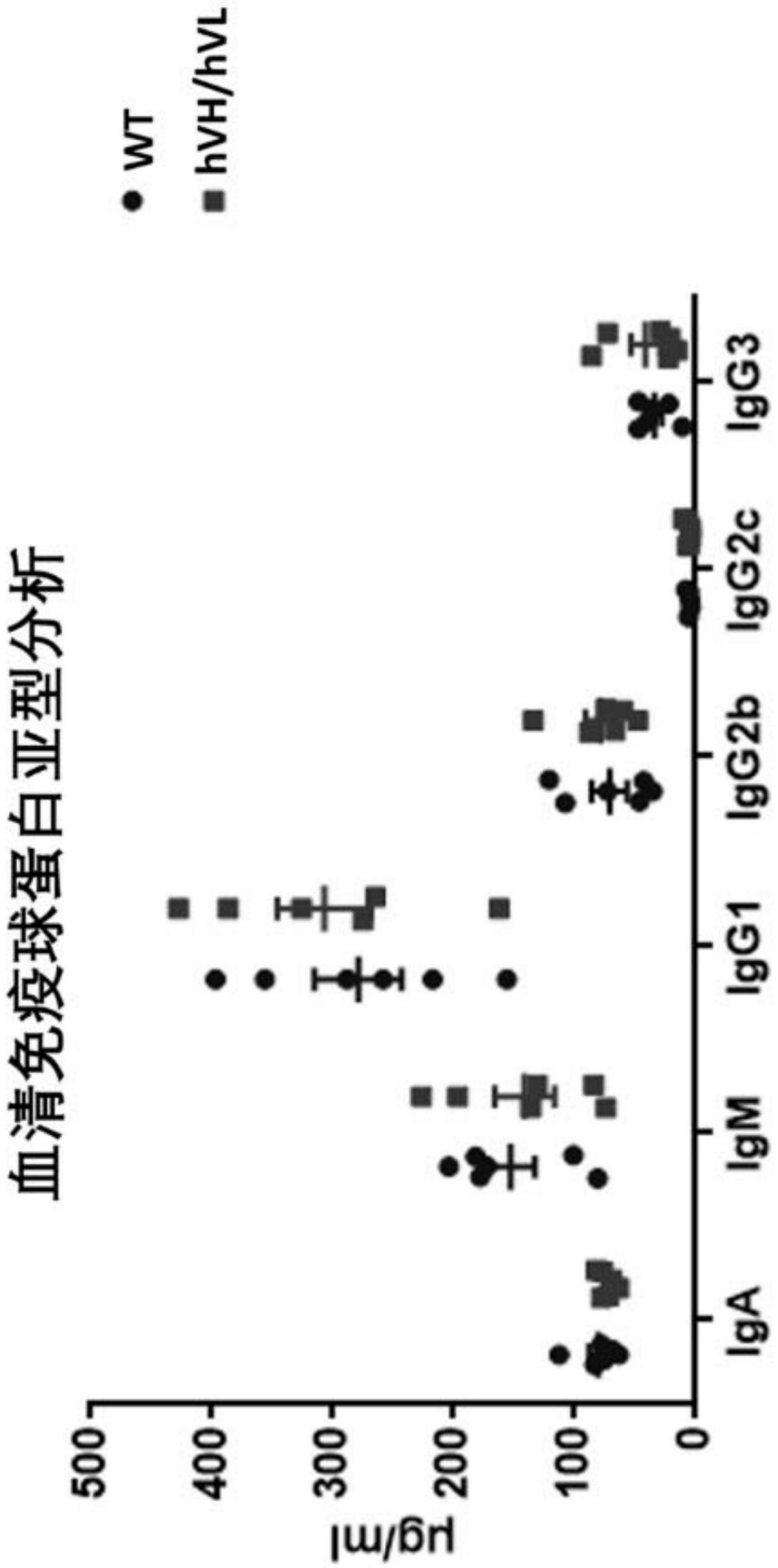

血清免疫球蛋白亚型分析
WT
hVH/hVL
μg/ml
500
400
300
200
100
0
IgA
IgM
IgG1
IgG2b
IgG2c
IgG3

图69

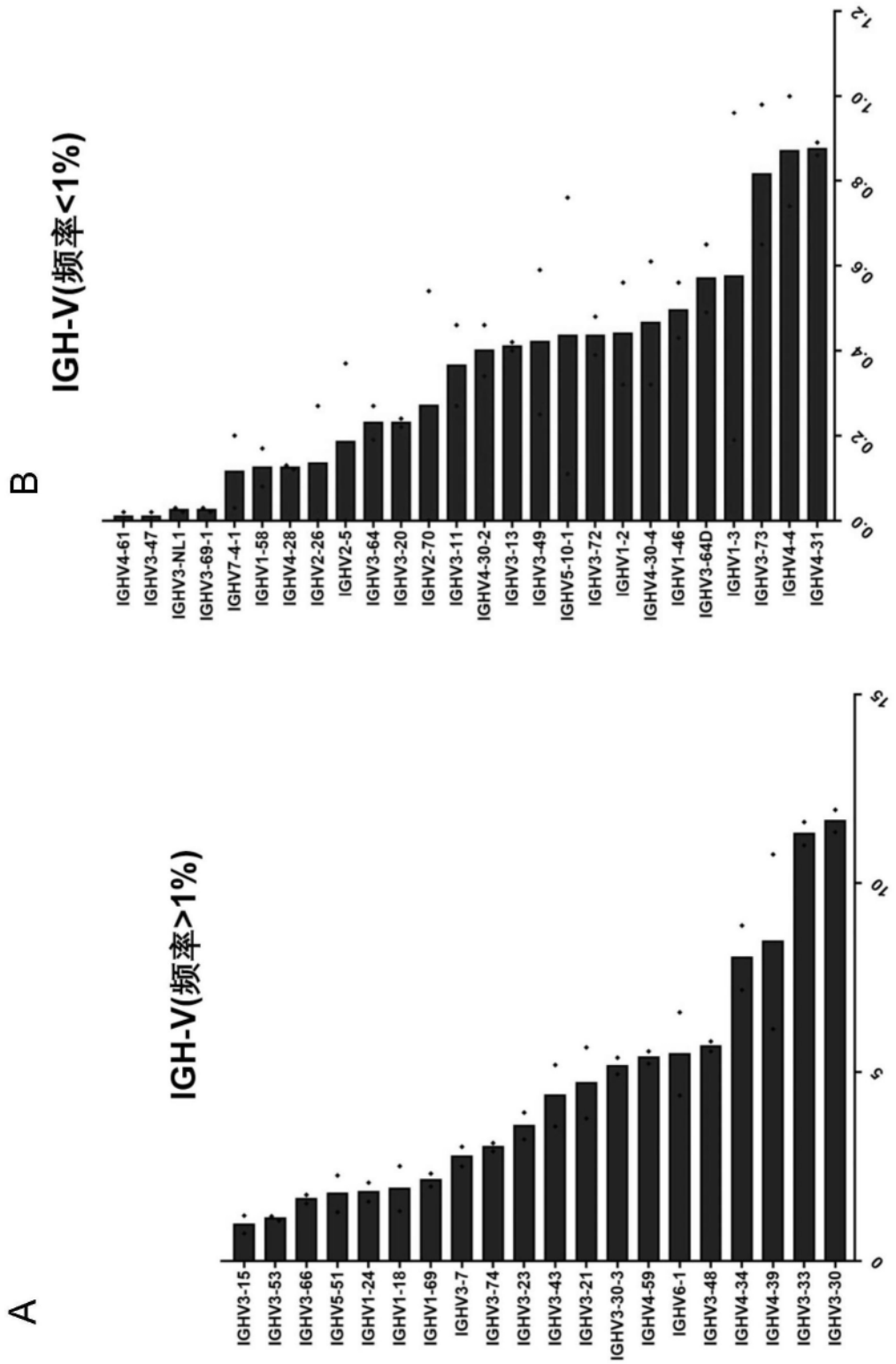

A
IGH-V(频率>1%)
IGHV3-15
IGHV3-53
IGHV3-66
IGHV5-51
IGHV1-24
IGHV1-18
IGHV1-69
IGHV3-7
IGHV3-74
IGHV3-23
IGHV3-43
IGHV3-21
IGHV3-30-3
IGHV4-59
IGHV6-1
IGHV3-48
IGHV4-34
IGHV4-39
IGHV3-33
IGHV3-30
0
5
10
15
B
IGH-V(频率<1%)
IGHV4-61
IGHV3-47
IGHV3-NL1
IGHV3-69-1
IGHV7-4-1
IGHV1-58
IGHV4-28
IGHV2-26
IGHV2-5
IGHV3-64
IGHV3-20
IGHV2-70
IGHV3-11
IGHV4-30-2
IGHV3-13
IGHV3-49
IGHV5-10-1
IGHV3-72
IGHV1-2
IGHV4-30-4
IGHV1-46
IGHV3-64D
IGHV1-3
IGHV3-73
IGHV4-4
IGHV4-31
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2

图70A-70B

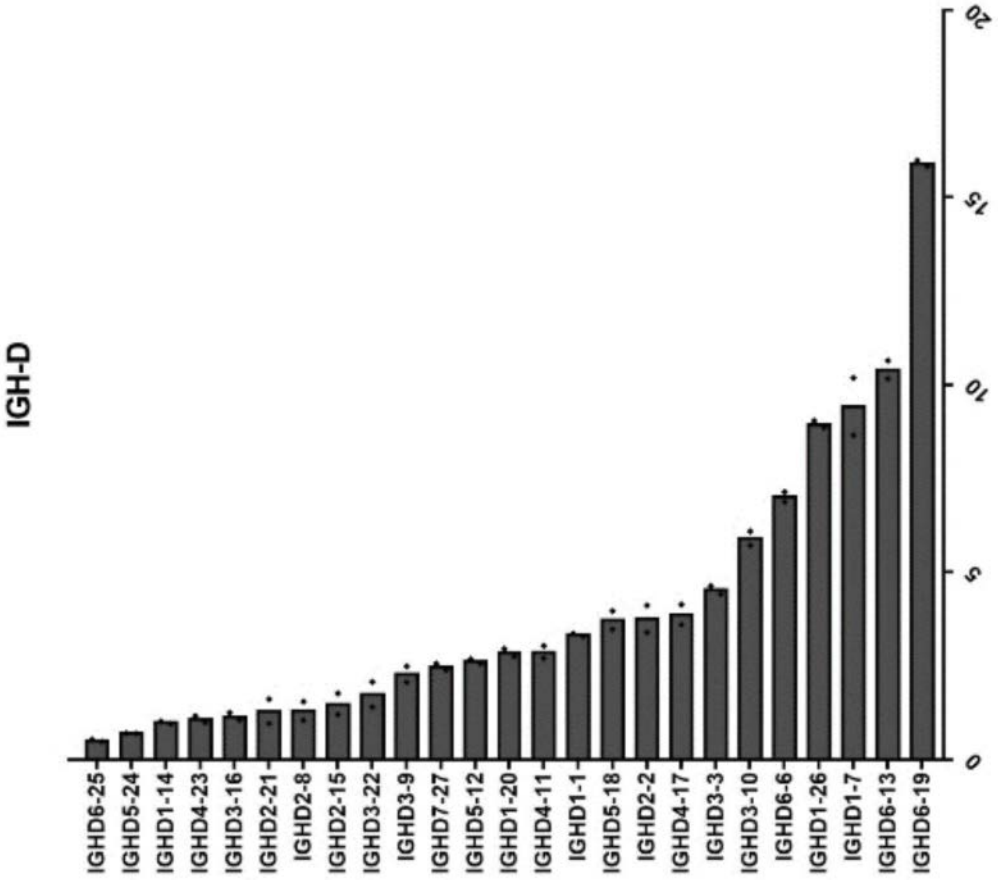

IGH-D
0
5
10
15
20
IGHD6-25
IGHD5-24
IGHD1-14
IGHD4-23
IGHD3-16
IGHD2-21
IGHD2-8
IGHD2-15
IGHD3-22
IGHD3-9
IGHD7-27
IGHD5-12
IGHD1-20
IGHD4-11
IGHD1-1
IGHD5-18
IGHD2-2
IGHD4-17
IGHD3-3
IGHD3-10
IGHD6-6
IGHD1-26
IGHD1-7
IGHD6-13
IGHD6-19

图70C

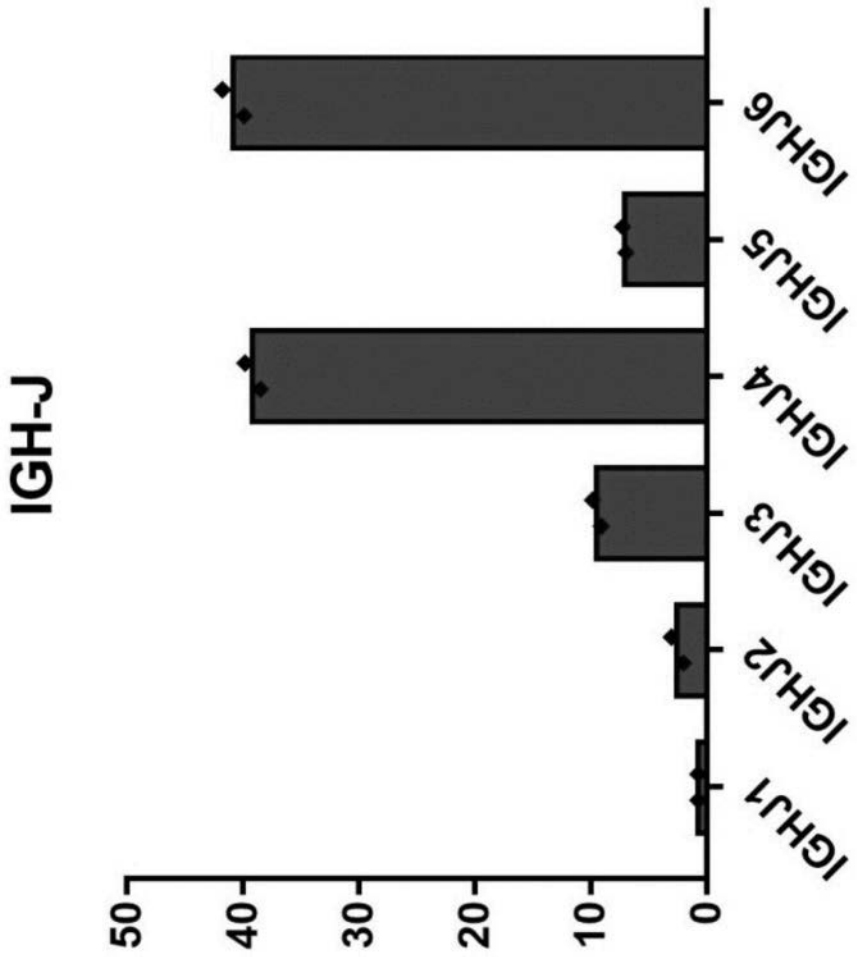


图70D

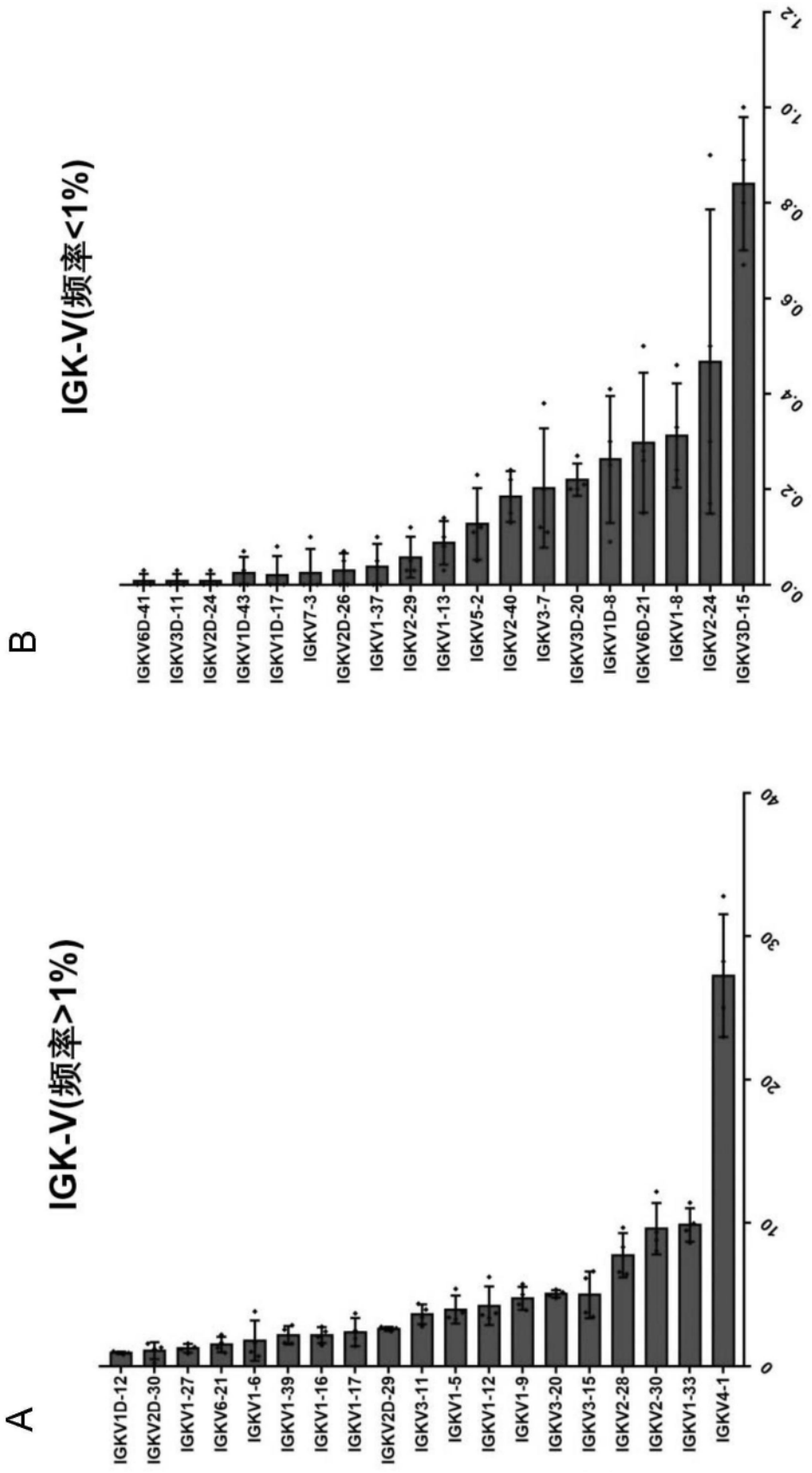

A
IGK-V(频率>1%)
IGKV1D-12
IGKV2D-30
IGKV1-27
IGKV6-21
IGKV1-6
IGKV1-39
IGKV1-16
IGKV1-17
IGKV2D-29
IGKV3-11
IGKV1-5
IGKV1-12
IGKV1-9
IGKV3-20
IGKV3-15
IGKV2-28
IGKV2-30
IGKV1-33
IGKV4-1
0
10
20
30
40
B
IGK-V(频率<1%)
IGKV6D-41
IGKV3D-11
IGKV2D-24
IGKV1D-43
IGKV1D-17
IGKV7-3
IGKV2D-26
IGKV1-37
IGKV2-29
IGKV1-13
IGKV5-2
IGKV2-40
IGKV3-7
IGKV3D-20
IGKV1D-8
IGKV6D-21
IGKV1-8
IGKV2-24
IGKV3D-15
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2

图71A-71B

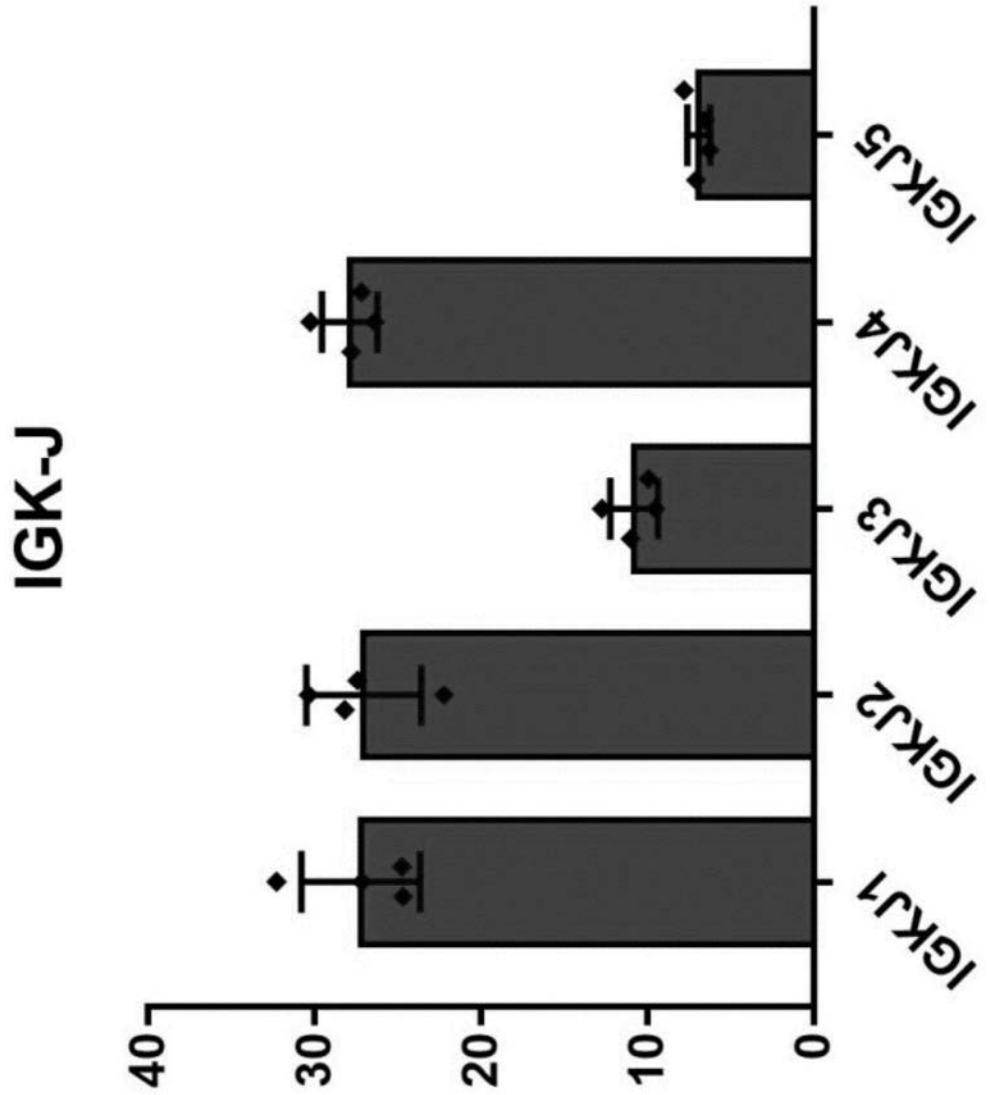


图71C

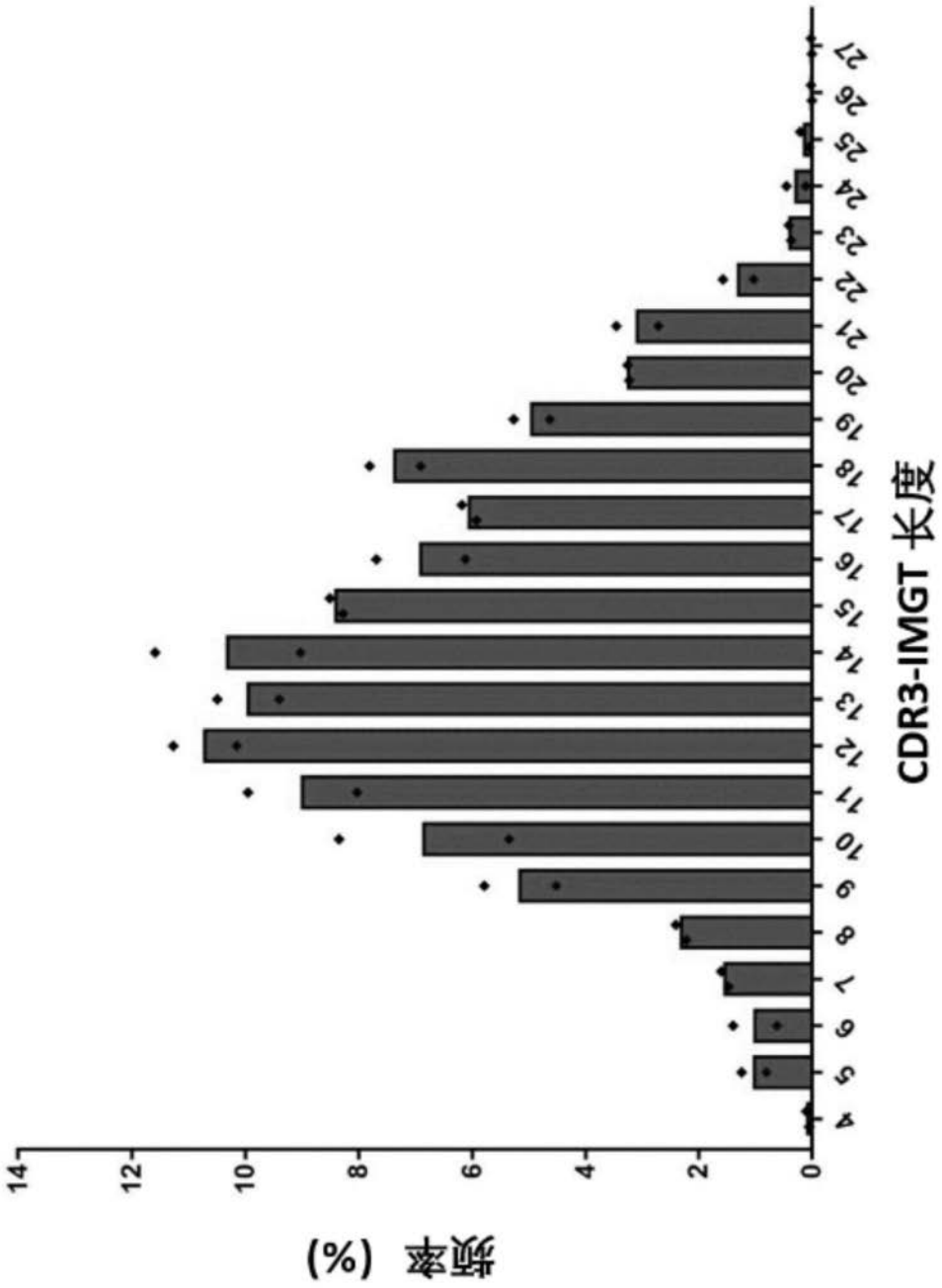

CDR3-IMGT 长度
频率 (%)
0
2
4
6
8
10
12
14
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

图72

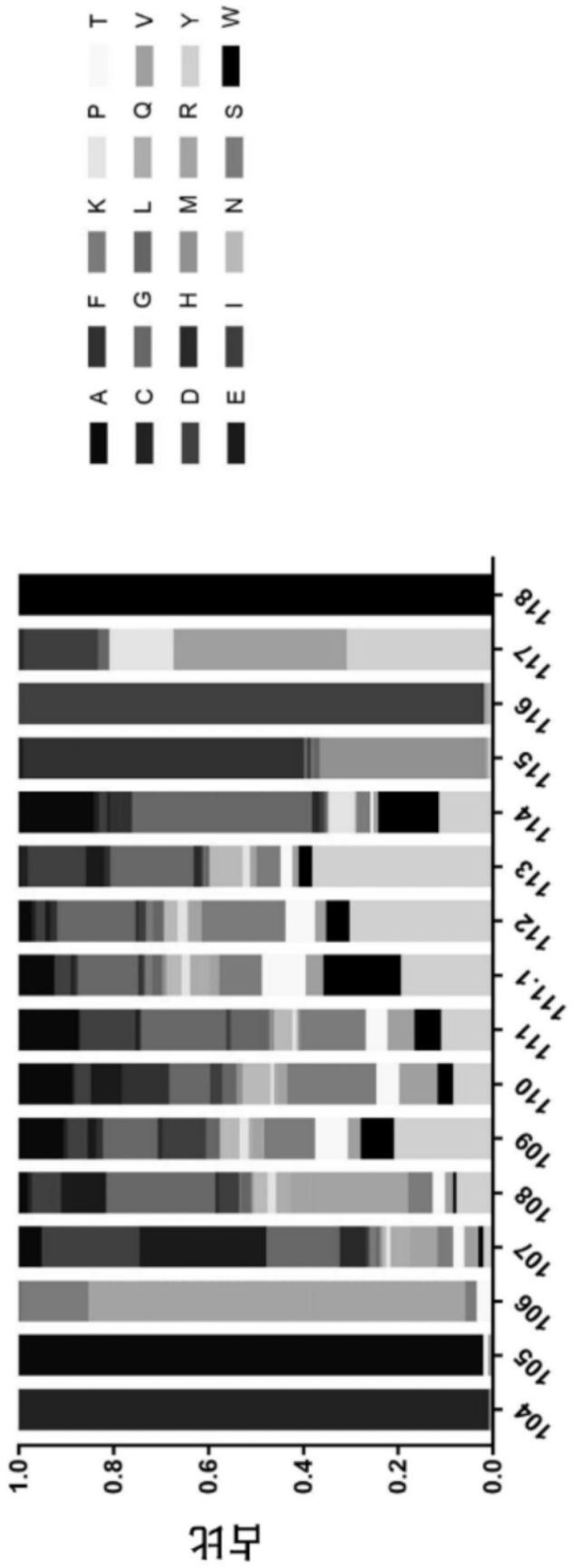

T V Y W
P Q R S
K L M N
F G H I
A C D E
104 105 106 107 108 109 110 111 111.1 112 113 114 115 116 117 118
1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0.0
占比

图73

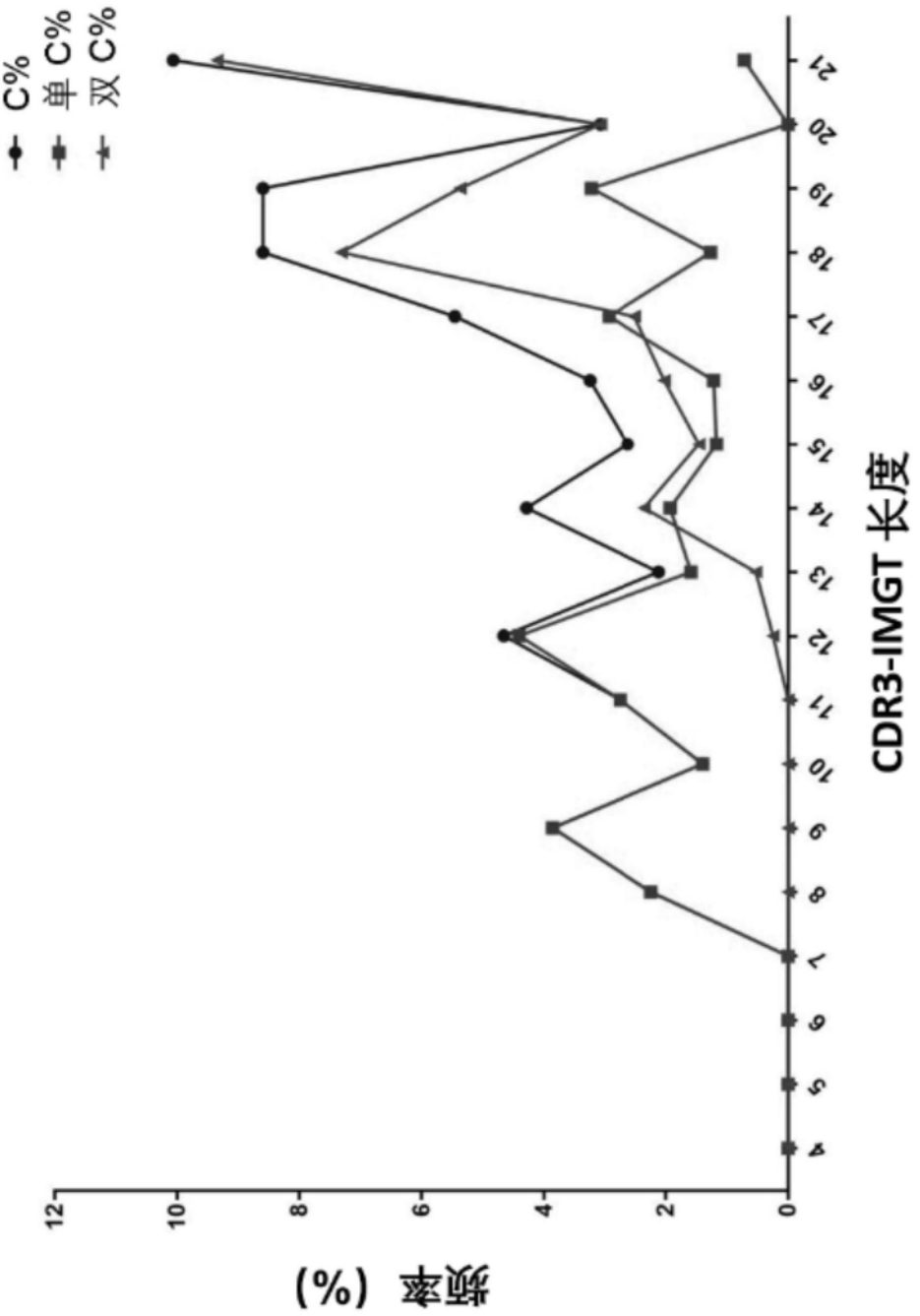

C%
单 C%
双 C%
CDR3-IMGT 长度
频率 (%)
0
2
4
6
8
10
12
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

图74

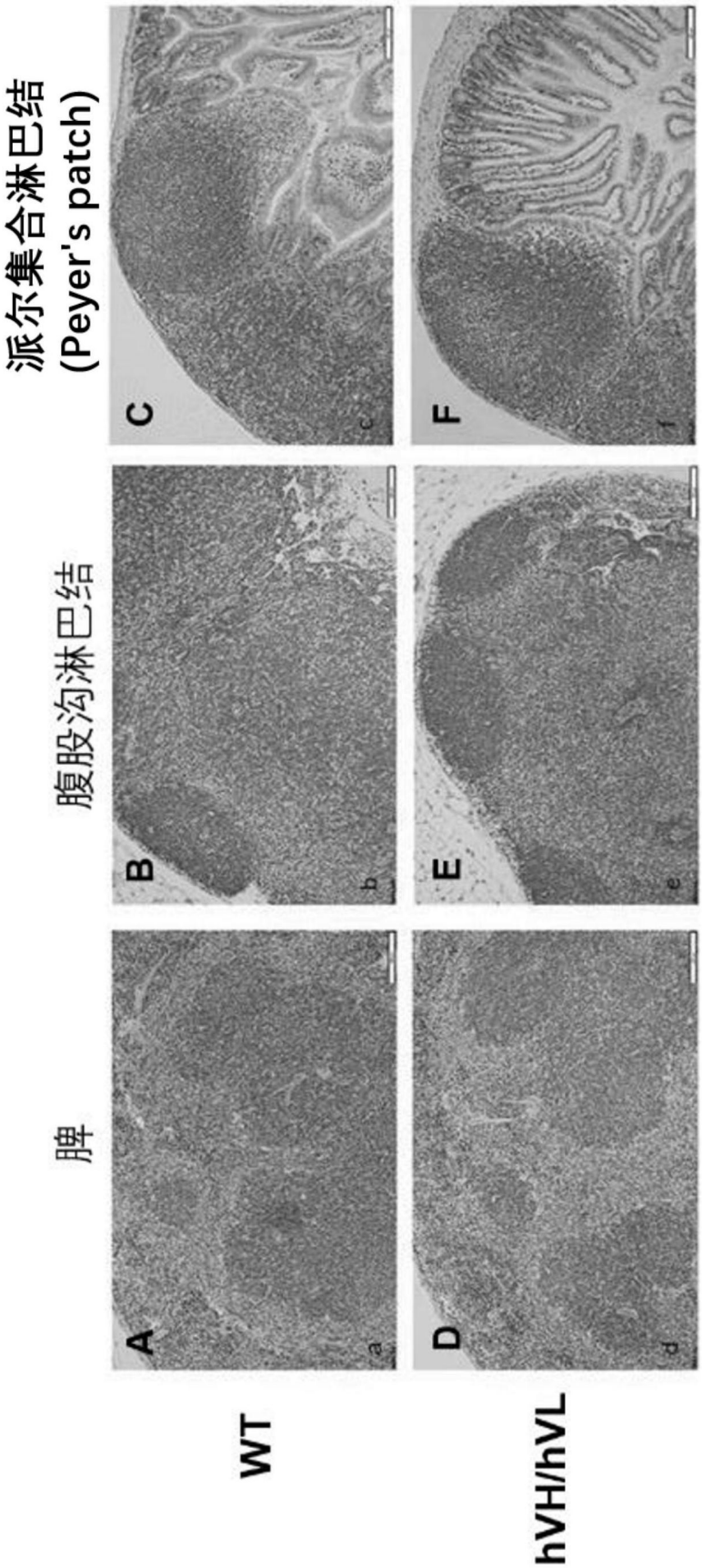


图75A-75F

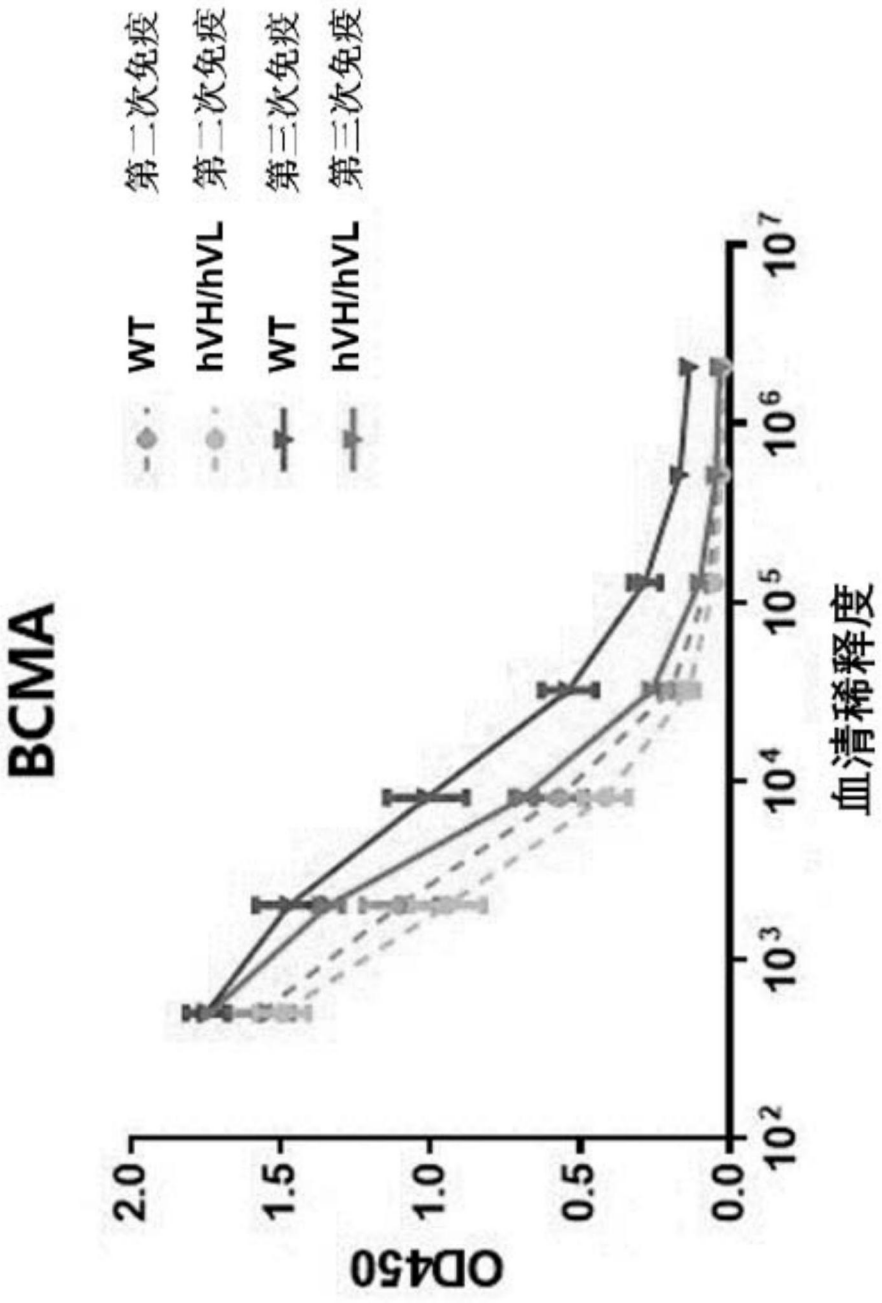

BCMA
第二次免疫
WT
第二次免疫
hVH/hVL
第三次免疫
WT
第三次免疫
hVH/hVL
OD450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
血清稀释度

图76A

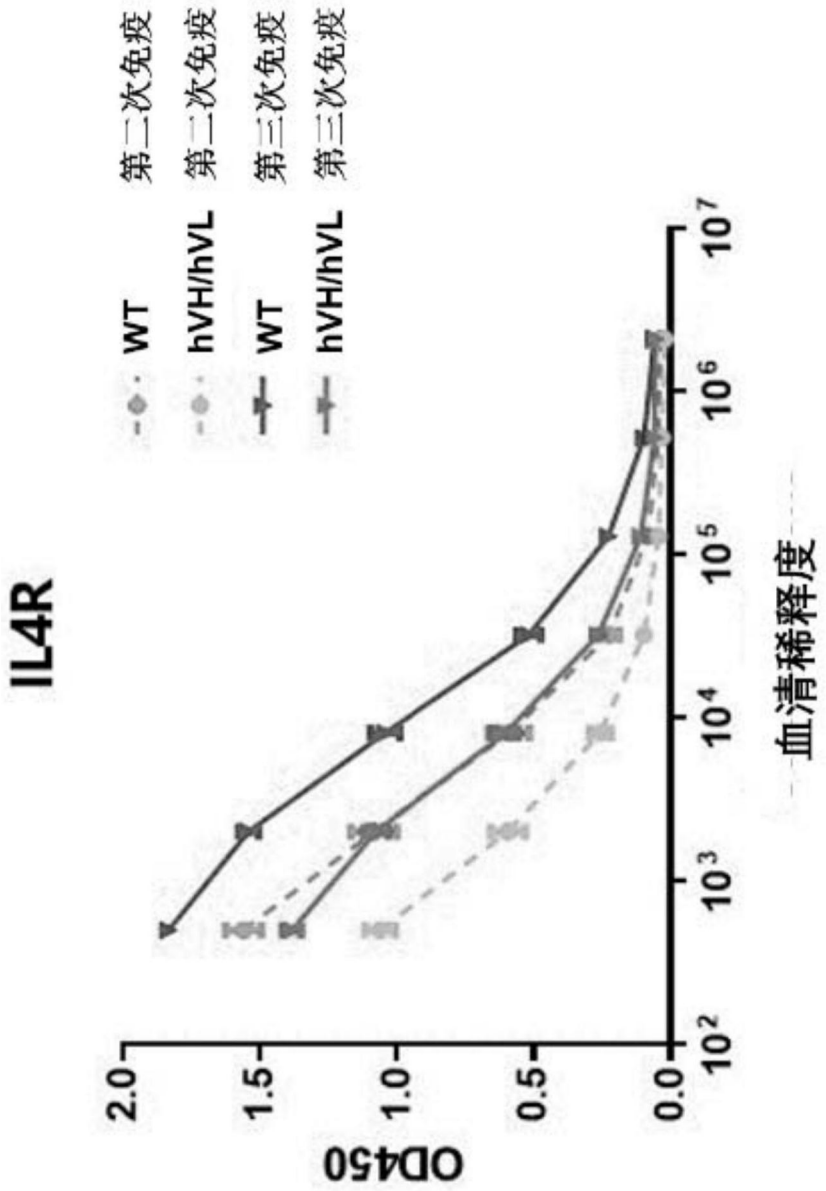

IL4R
第二次免疫
WT
第二次免疫
hVH/hVL
第三次免疫
WT
第三次免疫
hVH/hVL
OD450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
血清稀释度

图76B

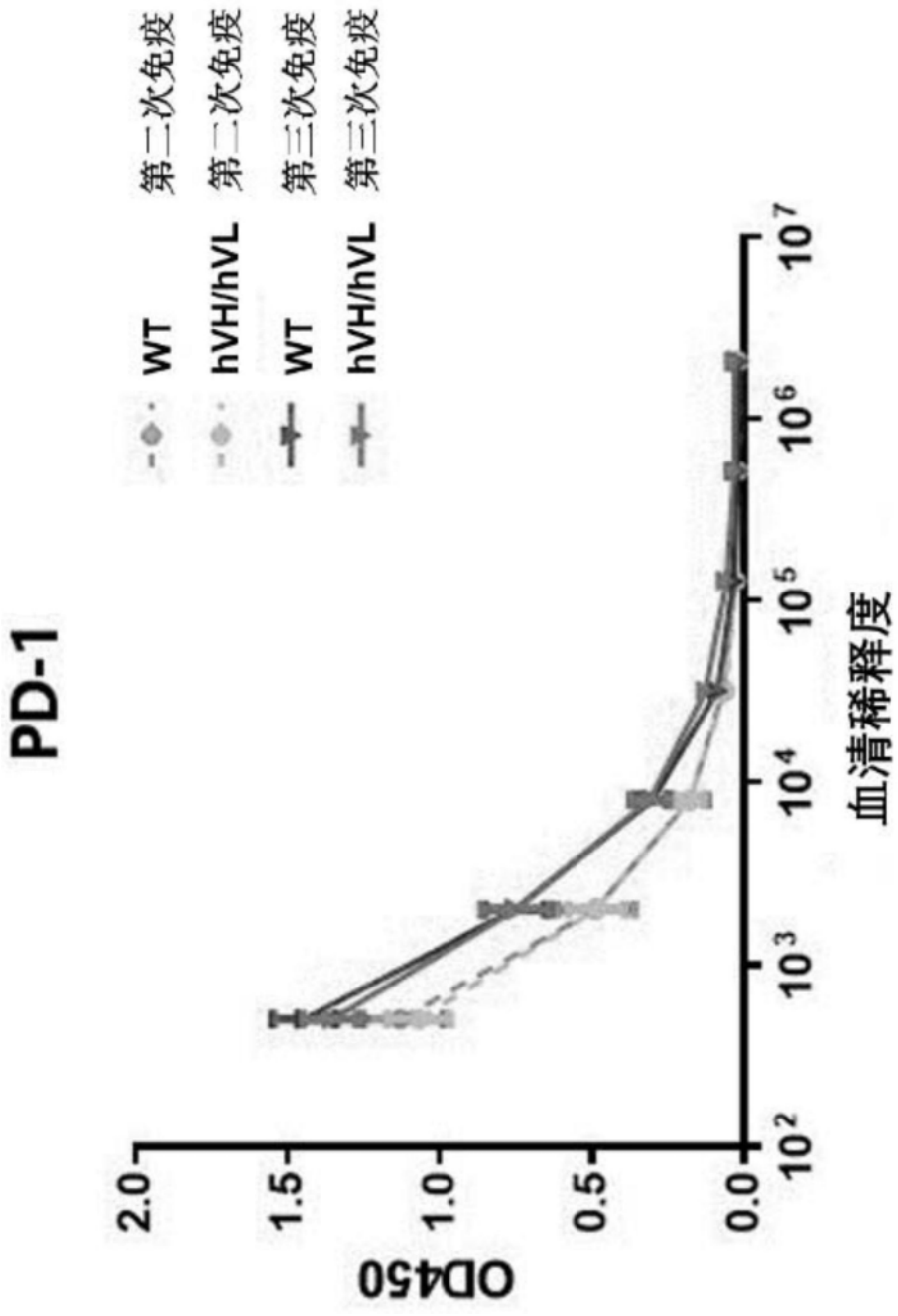

PD-1
第二次免疫
第二次免疫
第三次免疫
第三次免疫
WT
hVH/hVL
WT
hVH/hVL
OD450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
血清稀释度

图76C

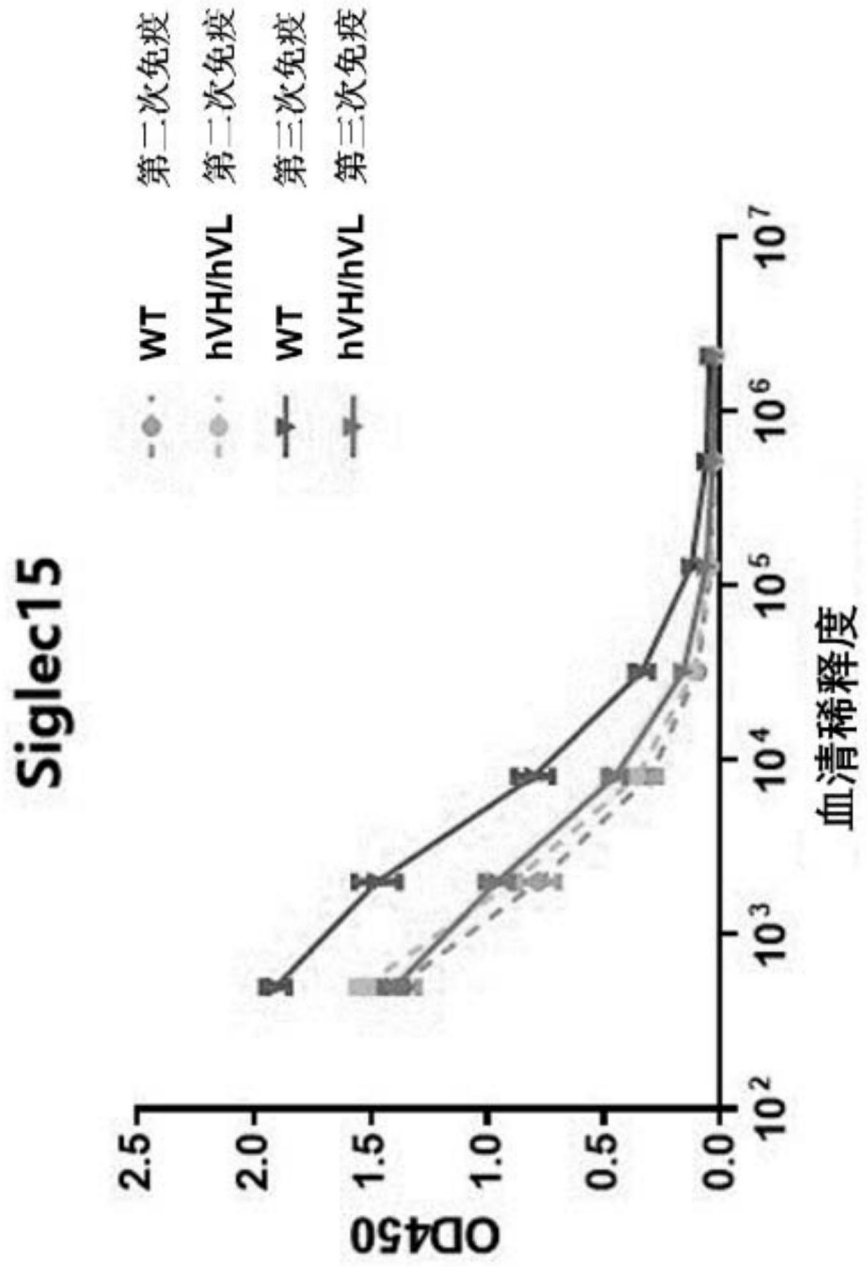

Siglec15
第二次免疫
WT
hVH/hVL
第三次免疫
WT
hVH/hVL
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
血清稀释度

图76D

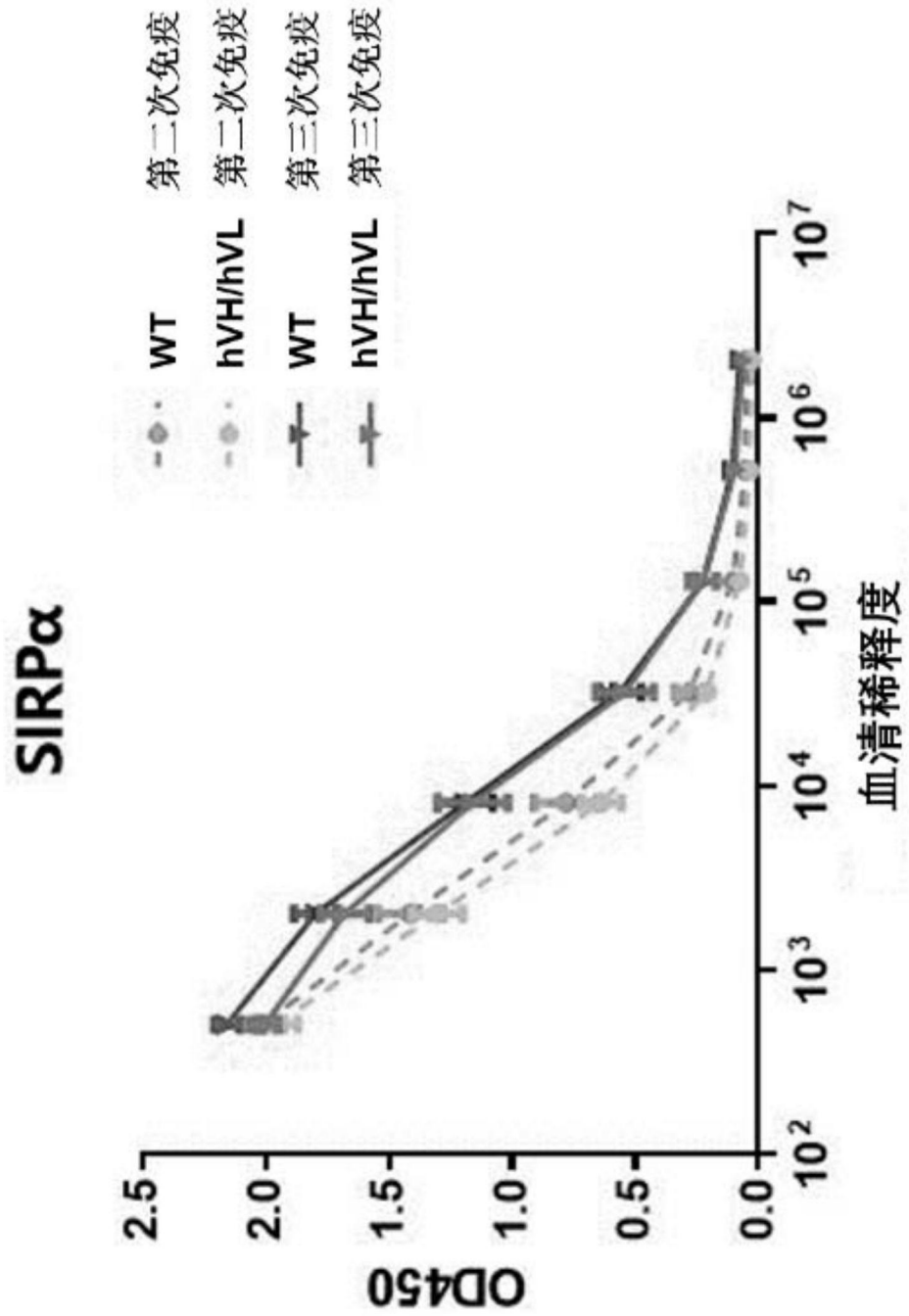

SIRPα
WT 第二次免疫
hVH/hVL 第二次免疫
WT 第三次免疫
hVH/hVL 第三次免疫
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
血清稀释度

图76E

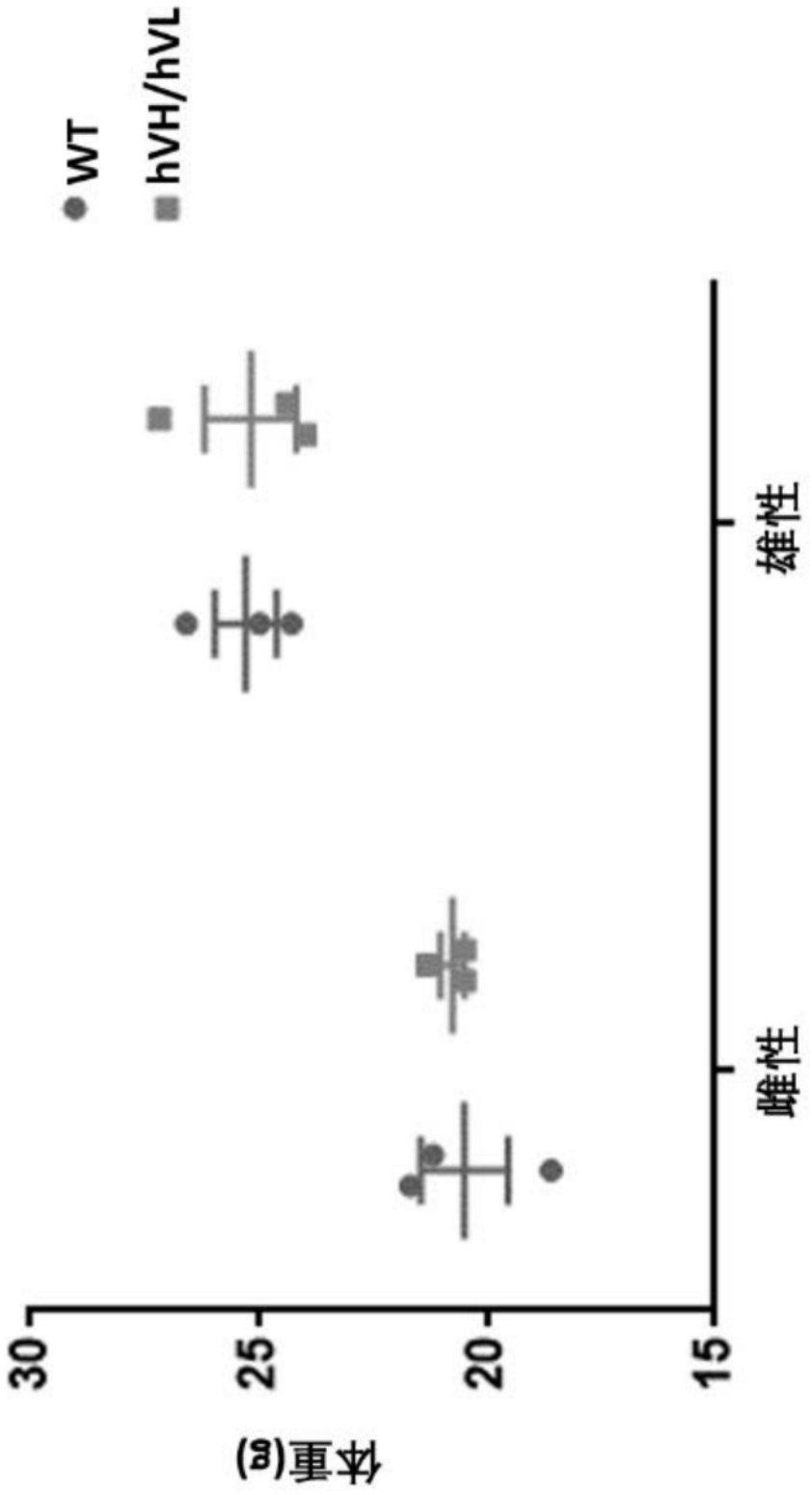


图77A

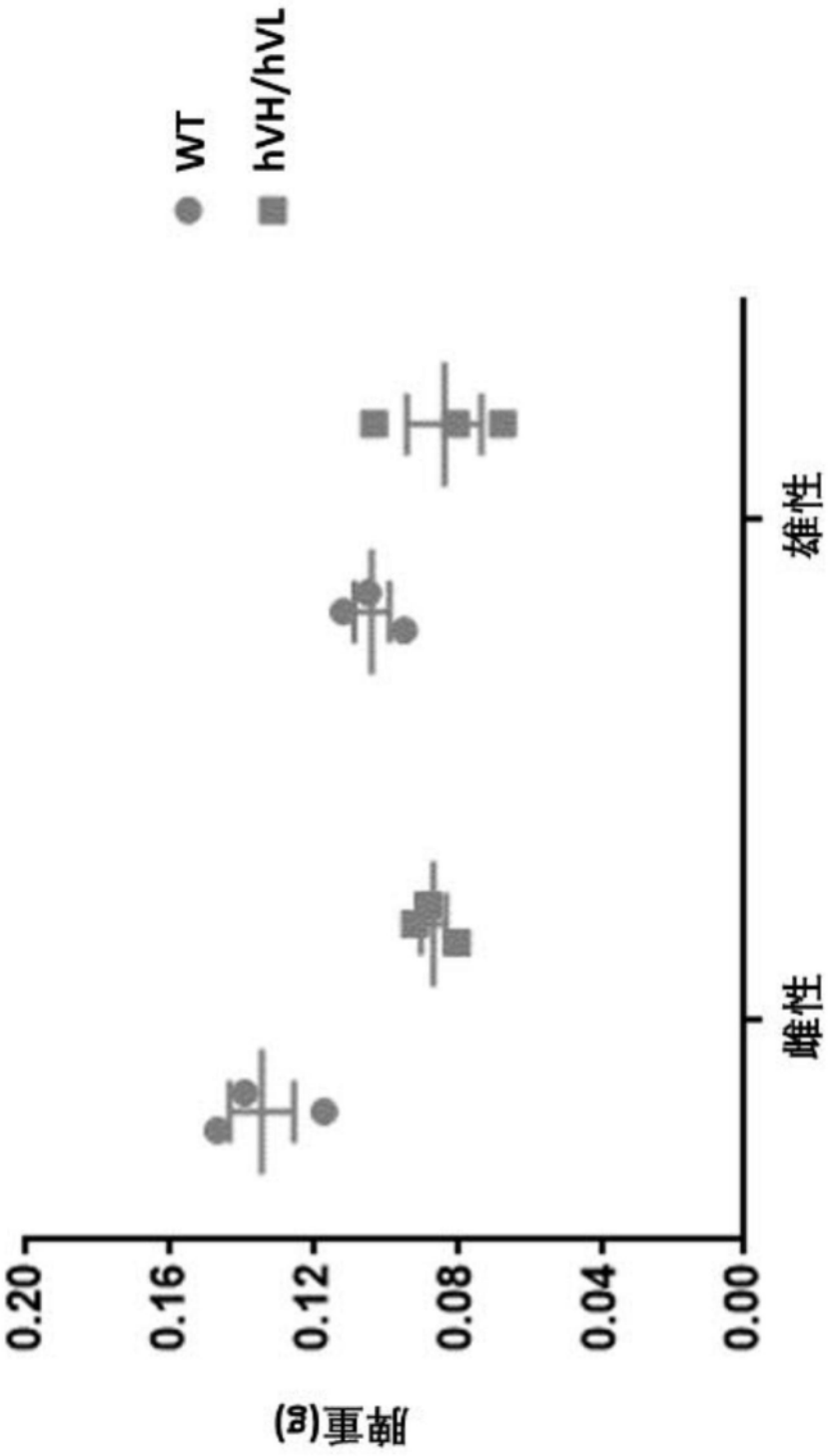


图77B

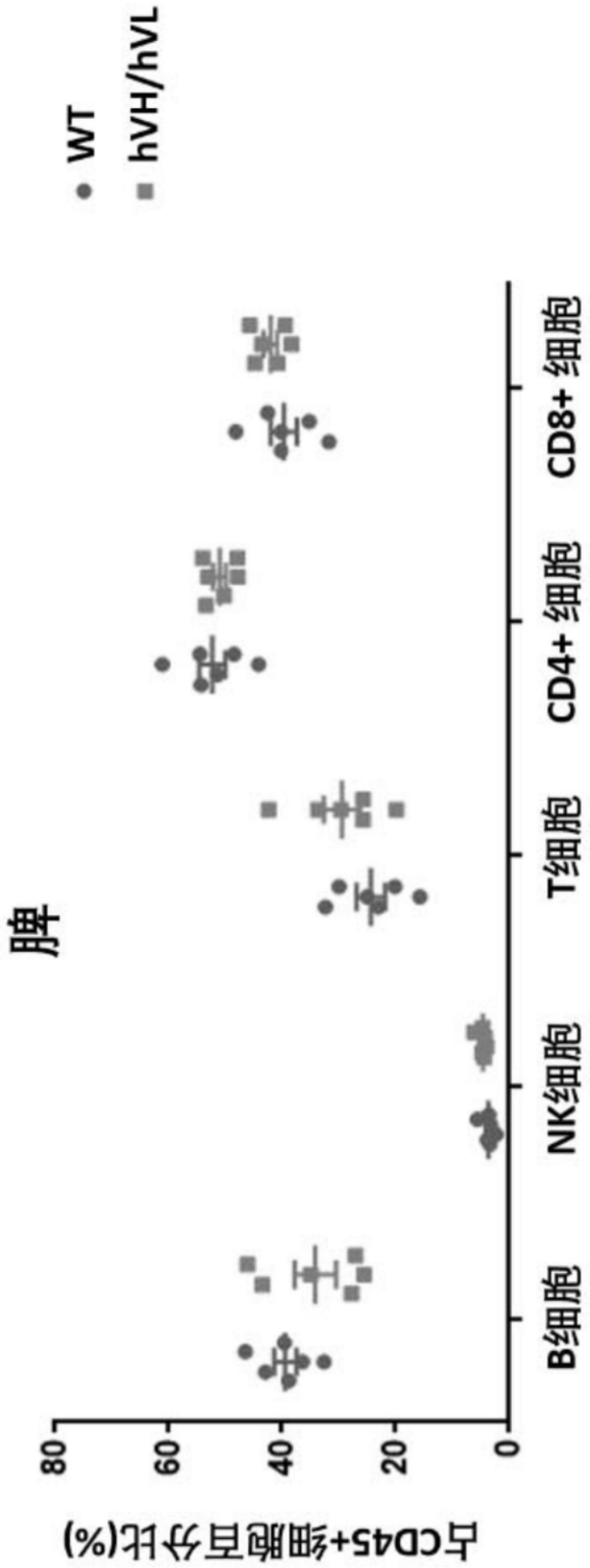


图78

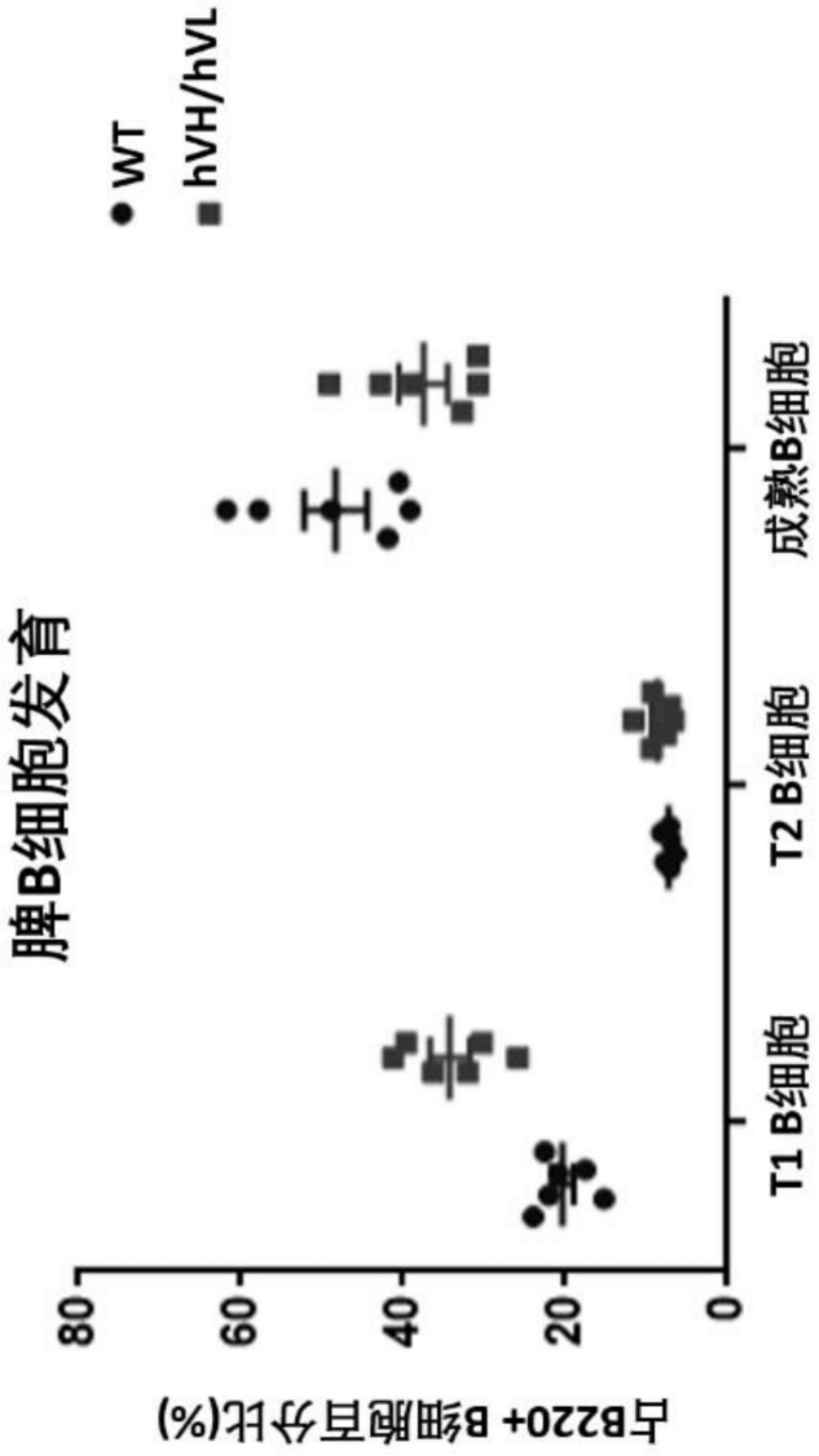


图79A

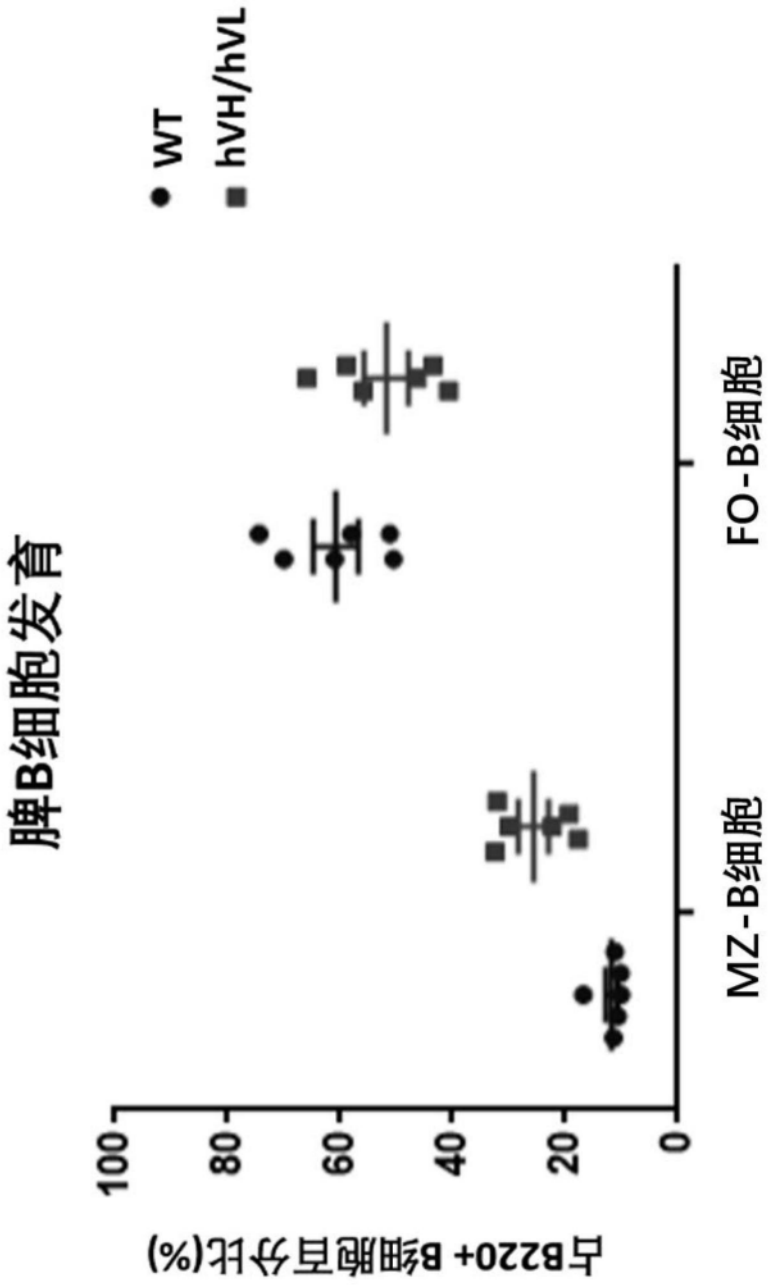


图79B

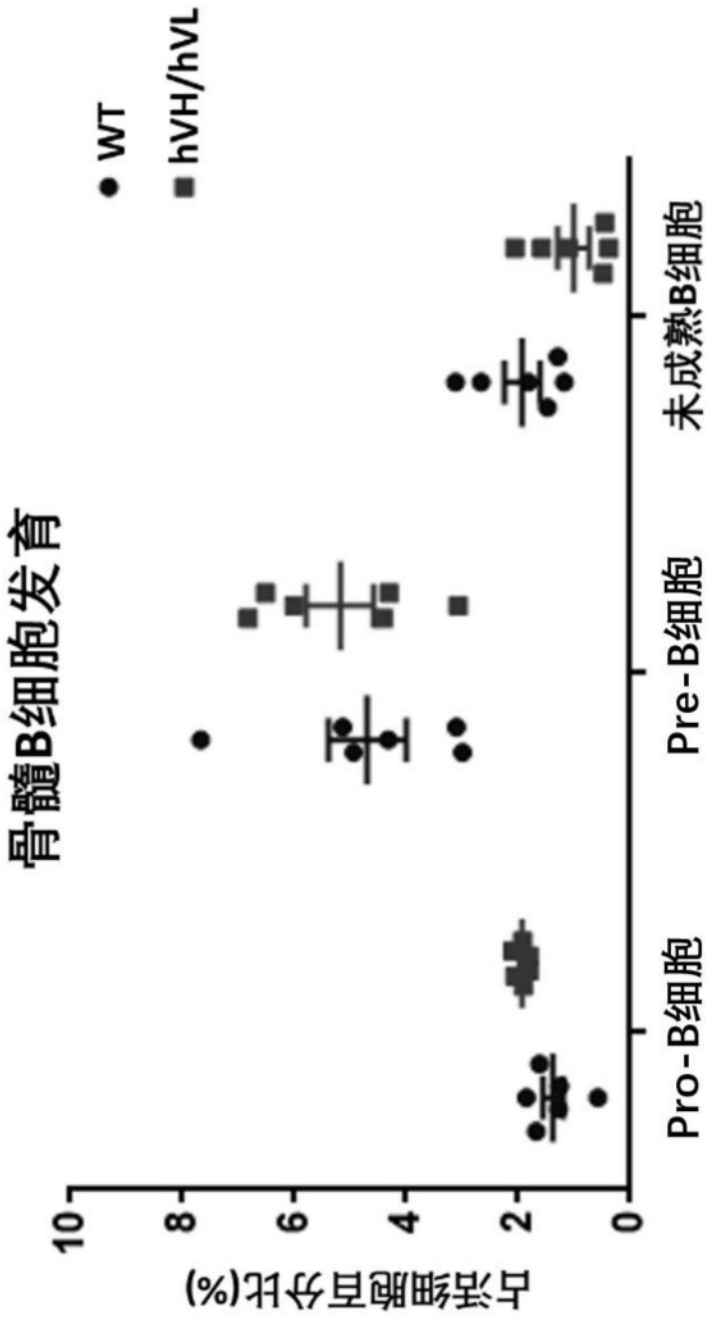


图80A

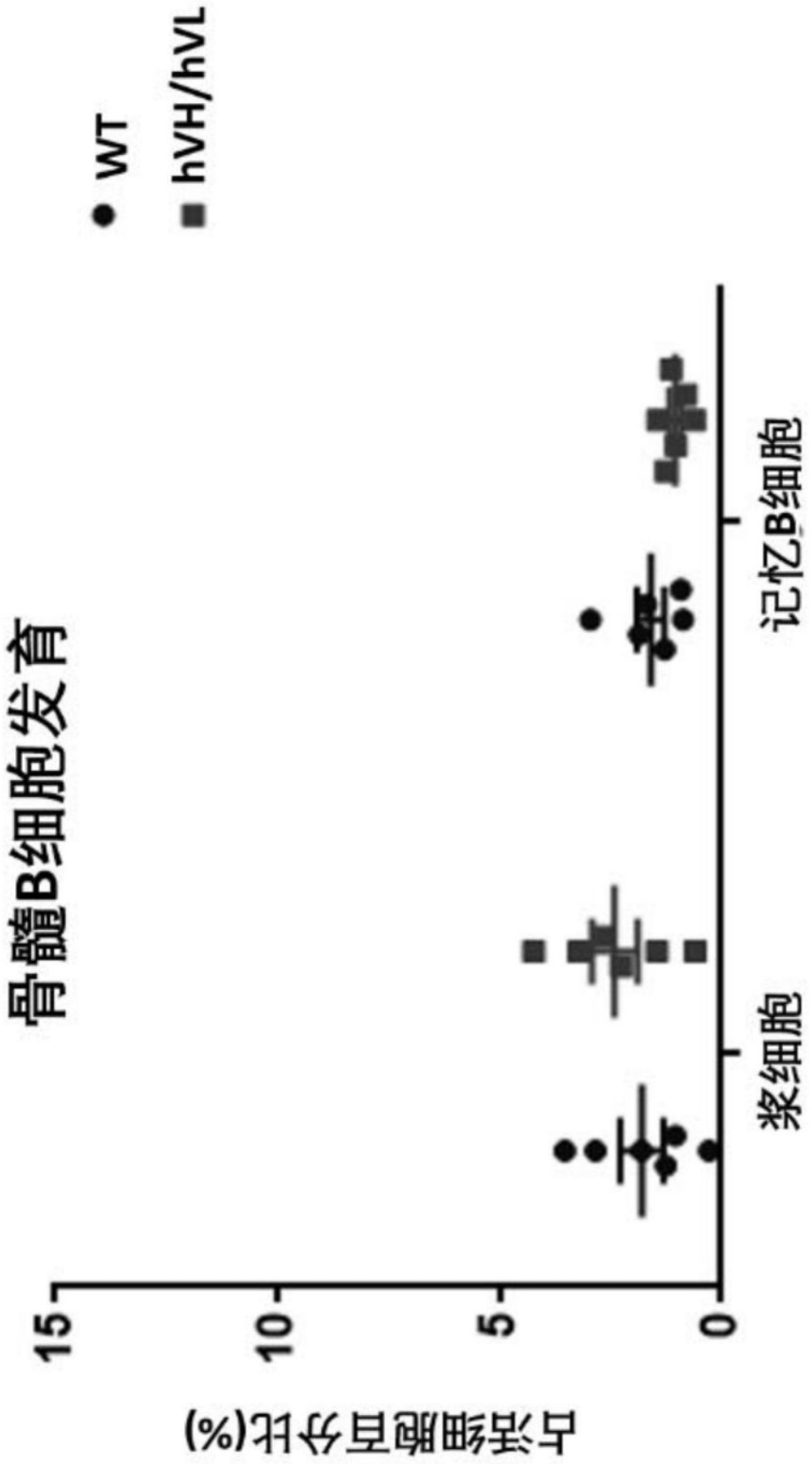


图80B

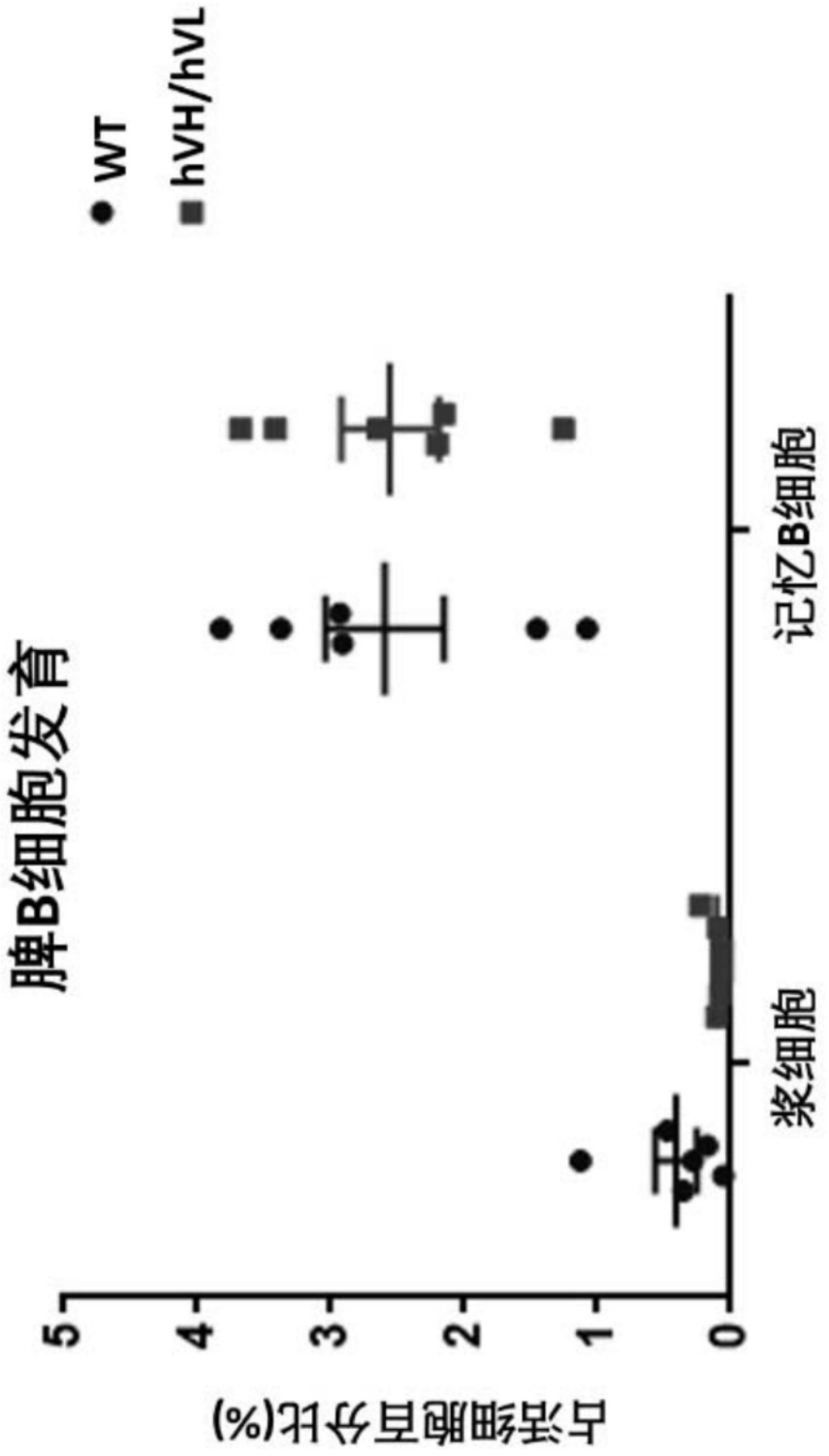


图80C

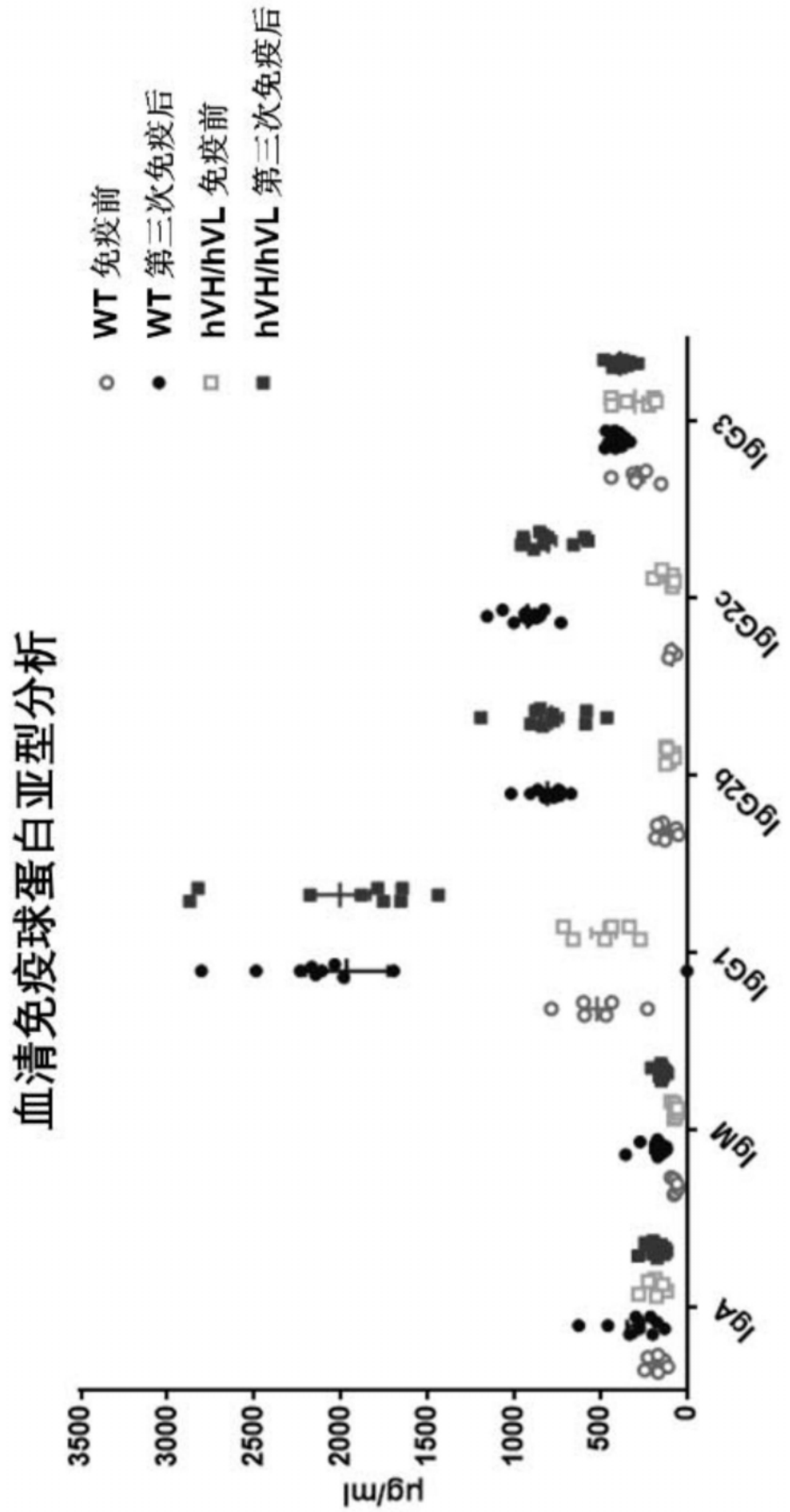

血清免疫球蛋白亚型分析
WT 免疫前
WT 第三次免疫后
hVH/hVL 免疫前
hVH/hVL 第三次免疫后
μg/ml
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IgA
IgM
IgG1
IgG2b
IgG2c
IgG3

图81

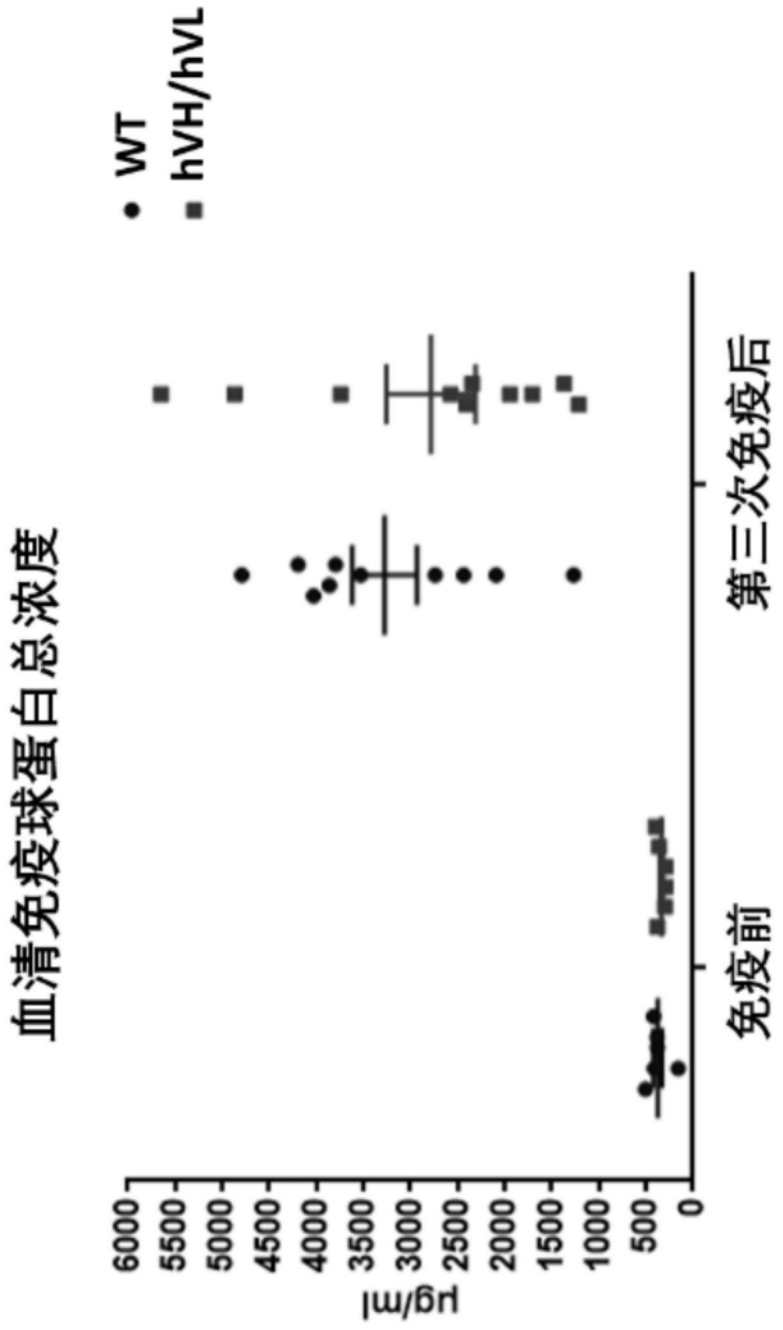

血清免疫球蛋白总浓度
WT
hVH/hVL
μg/ml
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
免疫前
第三次免疫后

图82