



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01K 67/0278 (2006.01); C07K 16/2866 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014127339, 17.12.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.12.2012

Дата регистрации:
15.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.12.2011 US 61/578,097

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2016 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 15.08.2018 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.07.2014

(86) Заявка РСТ:
US 2012/069981 (17.12.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/096142 (27.06.2013)

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11, этаж
3, "Гоулинз Интернэшнл Инк.", Кондаковой
Елене Владимировне

(72) Автор(ы):

МАКДОНАЛЬД Линн (US),
ГУРЕР Цаган (US),
ХОСИАВА Каролина А. (US),
СТИВЕНС Шон (US),
МЕРФИ Эндрю Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2011004192 A1, 13.01.2011. US
2006015957 A1, 19.01.2006. HAN C. et al.,
Comprehensive analysis of reproductive
ADAMs: relationship of ADAM4 and ADAM6
with an ADAM complex required for
fertilization in mice, Biol Reprod, 2009, vol.80,
N.5, pp.1001-1008. RU2236127 C2, 20.09.2004.

(54) МЫШИ С ГУМАНИЗИРОВАННОЙ ЛЕГКОЙ ЦЕПЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к мыши для получения последовательностей варибельной области иммуноглобулина человека, содержащей один или нескольких генных сегментов V_L, человека и один или несколько генных сегментов J_L, один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько генных сегментов J_H и эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, а

также клетке вышеуказанной мыши. Также раскрыто применение вышеуказанной клетки для получения антигенсвязывающего белка, для получения гибридомы, для получения квадromы, для получения полностью человеческого антитела и варибельных доменов антитела, а также применение вышеуказанной мыши для получения антигенсвязывающего белка. Изобретение также относится к способу получения антитела, которое связывается с представляющим интерес антигеном, с использованием вышеуказанной мыши. Изобретение позволяет эффективно

получать последовательности переменной
области иммуноглобулина человека. 13 н. и 52

з.п. ф-лы, 31 ил., 17 табл., 17 пр.

R U 2 6 6 4 1 8 1 C 2

R U 2 6 6 4 1 8 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A01K 67/0278 (2006.01); *C07K 16/2866* (2006.01)(21)(22) Application: **2014127339**, 17.12.2012(24) Effective date for property rights:
17.12.2012Registration date:
15.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:
20.12.2011 US 61/578,097

(43) Application published: 10.02.2016 Bull. № 4

(45) Date of publication: 15.08.2018 Bull. № 23

(85) Commencement of national phase: 21.07.2014

(86) PCT application:
US 2012/069981 (17.12.2012)(87) PCT publication:
WO 2013/096142 (27.06.2013)

Mail address:

119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, 11, etazh 3,
"Goulinz Interneshnl Ink.", Kondakovoj Elene
Vladimirovne

(72) Inventor(s):

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

(73) Proprietor(s):

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(US)(54) **HUMANISED LIGHT CHAIN MICE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry, in particular to a mouse for the production of human immunoglobulin variable region sequences comprising one or more human V_λ gene segments and one or more J_λ gene segments, one or more human V_H gene segments, one or more D_H human gene segments and one or more human J_H gene segments and an ectopic nucleic acid sequence that encodes the ADAM6 protein or functional fragment thereof, as well as the cell of said mouse. Also disclosed is the use of said cell for

producing an antigen-binding protein, for producing a hybridoma, for producing a quadroma, for producing a fully human antibody and variable domains of an antibody, and the use of said mouse to produce an antigen-binding protein. Invention also relates to a method for producing an antibody that binds to an antigen of interest using said mouse.

EFFECT: invention makes it possible to efficiently obtain the human immunoglobulin variable region sequences.

65 cl, 31 dwg, 17 tbl, 17 ex

Область техники

Генетически модифицированные отличные от человека фертильные животные, которые экспрессируют переменные последовательности λ легкой цепи иммуноглобулина человека, когнатные переменным последовательностям тяжелой цепи человека. Описаны генетически модифицированные мышцы, клетки, зародыши и ткани, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ADAM6a, функциональный в локусе ADAM6 мышцы, причем мышцы, клетки, зародыши и ткани содержат лямбда генные сегменты легкой цепи иммуноглобулина человека, которые способны к реаранжировке для образования функционального переменного домена легкой цепи иммуноглобулина. Модификации включают в себя относящиеся к человеку и/или гуманизированные локусы иммуноглобулина. Описаны мышцы, которые обладают функцией ADAM6, включая мышечные, которые содержат эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ADAM6. Описаны генетически модифицированные самцы мышей, которые содержат генетическую модификацию эндогенного локуса области V_H иммуноглобулина мышечной и которые дополнительно обладают активностью ADAM6, включая мышечные, которые содержат эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая восстанавливает фертильность самца мышечной.

Предусмотрены генетически модифицированные отличные от человека фертильные животные, которые содержат делецию или модификацию эндогенного гена ADAM6 или его гомолога или ортолога и которые содержат генетическую модификацию, которая полностью или частично восстанавливает функцию ADAM6 (или его гомолога или ортолога), причем отличные от человека животные экспрессируют λ переменную последовательность иммуноглобулина человека, ассоциированную с константной последовательностью λ или κ легкой цепи.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Фармацевтические применения антител в последних двух десятилетиях активизировали большое количество исследований в области получения антител, подходящих для применений в качестве терапевтических средств для людей. Ранее существующие терапевтические средства на основе антител, основанные на мышечных антителах, не были оптимальными в качестве терапевтических средств для людей, поскольку повторное введение мышечных антител людям приводит к проблемам в отношении иммуногенности, которые могут нарушать схемы длительного лечения. Разрабатывали решения, основанные на гуманизации мышечных антител, чтобы сделать их более похожими на антитела человека и менее похожими на антитела мышечной. Придерживались способов экспрессии последовательностей иммуноглобулина человека для применения в антителах, преимущественно основанных на *in vitro* экспрессии библиотек иммуноглобулина человека в фаге, бактериях или дрожжах. В конце концов, были предприняты попытки создания применимых антител человека из лимфоцитов человека *in vitro*, в организмах мышечной, которым пересадили гематопоетические клетки человека, и в организмах трансхромосомных или трансгенных мышечной с неспособными эндогенными локусами иммуноглобулина. У трансгенных мышечной, было необходимо инактивировать эндогенные гены иммуноглобулина мышечной так, чтобы случайным образом интегрированные полностью человеческие трансгены могли бы функционировать в качестве источника последовательностей иммуноглобулина, экспрессированных в организме мышечной. Такие мышцы могут производить антитела человека, подходящие для применения в качестве терапевтических средств для людей, но эти мышцы демонстрируют существенные проблемы в отношении их иммунной

системы. Эти проблемы (1) делают мышей непригодными для создания разнообразного в достаточной степени набора антител, (2) требуют применения решений для всестороннего переконструирования, (3) обеспечивают субоптимальный процесс селекции клонов, вероятно, вследствие несовместимости между элементами человека и мыши и (4) предоставляют этим мышам ненадежный источник больших и разнообразных популяций варьируемых последовательностей человека, нуждающихся в том, чтобы быть действительно применимыми для получения терапевтических средств для людей.

Трансгенные мыши, которые содержат трансгены полностью человеческих антител, содержат случайным образом вставленные трансгены, которые содержат нереаранжированные варьируемые последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина человека (последовательности V, D и J), соединенные с константными последовательностями тяжелой цепи человека, и нереаранжированные варьируемые последовательности легкой цепи иммуноглобулина человека (V и J), соединенные с константными последовательностями легкой цепи человека. Мыши, следовательно, создают реаранжированные гены антитела из локусов, отличных от эндогенных мышинных локусов, причем реаранжированные гены антитела являются полностью человеческими. Как правило, мыши содержат последовательности тяжелой цепи человека и последовательности легкой цепи человека, хотя также сообщалось о мышях по меньшей мере с несколькими последовательностями λ человека. Трансгенные мыши, как правило, содержат поврежденные и нефункциональные эндогенные локусы иммуноглобулина или нокауты эндогенных локусов иммуноглобулина, так чтобы мыши были неспособны к реаранжировке последовательностей антитела человека на эндогенном локусе иммуноглобулина мыши. Изменения у таких трансгенных мышей делают их менее чем оптимальными для создания достаточно разнообразного репертуара антител человека в организме мышей, вероятно, по меньшей мере частично вследствие субоптимального процесса селекции клонов, который обеспечивает контакт молекул полностью человеческих антител в пределах эндогенной системы селекции мыши.

В настоящей области техники остается потребность в получении улучшенных генетически модифицированных отличных от человека животных, которые применимы в создании последовательностей иммуноглобулина, включая последовательности антител человека, и которые применимы в создании достаточно разнообразного набора антител человека. Кроме того, остается необходимость в мышях, которые способны к реаранжировке генных сегментов иммуноглобулина для образования применимых реаранжированных генов иммуноглобулина, включая в себя варьируемые домены тяжелой цепи человека, которые являются когнатными варьируемым доменам λ человека или варьируемым доменам κ человека или которые способны к созданию белков из измененных локусов иммуноглобулина, включая в себя локусы, которые содержат достаточно разнообразную селекцию варьируемых последовательностей λ легкой цепи человека и/или варьируемых последовательностей κ легкой цепи человека. Существует потребность в отличных от человека животных, которые могут создавать варьируемые области антител как из сегментов κ человека, так и сегментов λ человека, причем сегменты κ человека и сегменты λ человека являются когнатными варьируемым доменам тяжелой цепи человека. Также существует необходимость в увеличенной частоте использования последовательностей λ человека у генетически модифицированных животных.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Описаны генетически модифицированные отличные от человека животные, которые содержат модификацию, которая снижает или устраняет активность гена ADAM6 или его гомолога или ортолога, причем модификация приводит к потере фертильности, и животные дополнительно содержат последовательность, которая кодирует активность,

5 взаимодополняющую или восстанавливающую утраченную или сниженную активность ADAM6 (или активность гомолога или ортолога), и отличные от человека животные дополнительно содержат модификации, которые позволяют им экспрессировать

10 варьируемые области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, которые являются когнатными варьируемым областям λ легкой цепи иммуноглобулина человека.

Согласно различным аспектам экспрессируются варьируемые области λ легкой цепи иммуноглобулина человека, слитые с константными областями λ или κ .

Согласно различным аспектам последовательность, которая кодирует активность ADAM6, является смежной с последовательностью иммуноглобулина человека. Согласно различным аспектам последовательность, которая кодирует активность ADAM6,

15 является смежной с не относящейся к человеку последовательностью иммуноглобулина. Согласно различным аспектам последовательность присутствует на той же хромосоме, что и эндогенный не относящийся к человеку locus тяжелой цепи иммуноглобулина отличного от человека животного. Согласно различным аспектам последовательность присутствует на другой хромосоме, чем locus тяжелой цепи иммуноглобулина отличного

20 от человека животного.

Описаны генетически модифицированные отличные от человека животные, которые содержат модификацию, которая поддерживает активность гена ADAM6 или его гомолога или ортолога, причем модификация включает в себя вставку одного или

25 нескольких генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека выше не относящейся к человеку константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, и отличные от человека животные дополнительно содержат модификации, которые позволяют им экспрессировать варьируемые области λ легкой цепи иммуноглобулина человека, когнатные варьируемым областям тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Согласно различным аспектам экспрессируются варьируемые области λ легкой цепи

30 иммуноглобулина человека, слитые с константными областями λ или κ .

Согласно различным аспектам вставку одного или нескольких генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека проводят 3' или ниже гена ADAM6 отличного от человека животного. Согласно различным аспектам вставку одного или нескольких генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека проводят таким способом,

35 чтобы ген(ы) ADAM6 отличного от человека животного не был(и) разрушен(ы), удален(ы) и/или функционально выключен(ы) так, чтобы активность ADAM6 отличного от человека животного находилась на таком же или сопоставимом уровне, как у отличного от человека животного, которое не содержит такой вставки. Иллюстративные разрывы, делеции и/или модификации функционального сайленсинга включают в себя любые

40 модификации, которые приводят к снижению, устранению и/или потере активности белка(ов) ADAM6, кодируемого(ых) геном(ами) ADAM6 отличного от человека животного.

Согласно одному аспекту предусмотрены конструкторы нуклеиновых кислот, клетки, зародыши, мыши и способы для получения мышей, которые содержат модификацию,

45 которая дает в результате нефункциональный эндогенный белок ADAM6 или ген ADAM6 мыши (например, нокаут или делецию в эндогенном гене ADAM6), причем мыши содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца

мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрены конструкторы нуклеиновой кислоты, клетки, зародыши, мыши и способы получения мышей, которые содержат модификацию эндогенного локуса иммуноглобулина мыши, причем мыши содержат белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши. Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус иммуноглобулина мыши представляет собой локус тяжелой цепи иммуноглобулина, и модификация снижает или устраняет активность ADAM6 клетки или ткани самца мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрены мыши, которые содержат эктопическую нуклеотидную последовательность, кодирующую ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент; также предусмотрены мыши, которые содержат эндогенную нуклеотидную последовательность, кодирующую ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или фрагмент, и по меньшей мере одну генетическую модификацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному аспекту предусмотрены способы получения мышей, которые содержат модификацию эндогенного локуса иммуноглобулина мыши, причем мыши содержат белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрены способы получения мышей, которые содержат генетическую модификацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, причем применение способов дает в результате самцов мышей, которые содержат модифицированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина (или его делецию), и самцы мышей способны производить потомство путем спаривания. Согласно одному варианту осуществления самцы мышей способны производить сперму, которая может проходить от матки мыши через яйцевод мыши для оплодотворения яйцеклетки мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрены способы получения мышей, которые содержат генетическую модификацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина и локуса легкой цепи иммуноглобулина, причем применение способов модификации локуса тяжелой цепи дает в результате самцов мышей, которые проявляют снижение фертильности, и мыши содержат генетическую модификацию, которая полностью или частично восстанавливает снижение фертильности. Согласно различным вариантам осуществления снижение фертильности характеризуется неспособностью спермы самцов мышей мигрировать от матки мыши через яйцевод мыши для оплодотворения яйцеклетки мыши. Согласно различным вариантам осуществления снижение фертильности характеризуется наличием спермы, которая проявляет *in vivo* нарушение миграции.

Согласно различным вариантам осуществления генетическая модификация, которая полностью или частично восстанавливает снижение фертильности, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши.

Согласно одному варианту осуществления генетическая модификация предусматривает замещение эндогенных переменных локусов тяжелой цепи иммуноглобулина переменными локусами тяжелой цепи иммуноглобулина другого вида (например, отличного от мыши вида). Согласно одному варианту осуществления генетическая модификация предусматривает вставку ортологичных переменных локусов тяжелой цепи иммуноглобулина в эндогенные переменные локусы тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления вид представляет собой человека. Согласно одному варианту осуществления генетическая модификация предусматривает делецию эндогенного переменного локуса тяжелой

цепи иммуноглобулина полностью или частично, причем делеция приводит к потере эндогенной функции ADAM6. Согласно конкретному варианту осуществления потеря эндогенной функции ADAM6 связана со снижением фертильности у самцов мышей.

Согласно одному варианту осуществления генетическая модификация предусматривает инактивацию эндогенного не относящегося к человеку варибельного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина полностью или частично, причем инактивация не приводит к потере эндогенной функции ADAM6. Инактивация может включать в себя замещение или делецию одного или нескольких эндогенных не относящихся к человеку генных сегментов, что дает в результате эндогенный не относящийся к человеку локус тяжелой цепи иммуноглобулина, который по существу является неспособным к реаранжировке для кодирования тяжелой цепи антитела, которое содержит эндогенные не относящиеся к человеку генные сегменты. Инактивация может включать в себя другие модификации, которые делают эндогенный локус тяжелой цепи иммуноглобулина неспособным к реаранжировке для кодирования тяжелой цепи антитела, причем модификация не включает в себя замещение или делецию эндогенных генных сегментов. Иллюстративные модификации включают в себя хромосомные вставки и/или транслокации, опосредованные молекулярными техниками, например, с использованием точного размещения сайтов сайт-специфической рекомбинации (например, технологии Cre-lox). Другие иллюстративные модификации включают в себя блокирование функциональной связи между не относящимися к человеку варибельными генными сегментами иммуноглобулина и не относящимися к человеку константными областями иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления генетическая модификация предусматривает вставку в геном отличного от человека животного фрагмента ДНК, содержащего один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько генных сегментов J_H человека другого вида (например, отличного от мыши вида), функционально связанных с одной или несколькими последовательностями константной области (например, геном IgM и/или IgG). Согласно одному варианту осуществления фрагмент ДНК способен подвергаться реаранжировке в геноме отличного от человека животного для образования последовательности, которая кодирует варибельный домен тяжелой цепи антитела. Согласно одному варианту осуществления вид представляет собой человека. Согласно одному варианту осуществления генетическая модификация предусматривает вставку одного или нескольких генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека ниже или 3' по отношению к эндогенному гену ADAM6 отличного от человека животного так, чтобы активность ADAM6 (например экспрессия и/или функция кодируемого белка) являлась одинаковой или сопоставимой с отличным от человека животным, которое не содержит вставку.

Согласно одному аспекту предусмотрены мыши, которые содержат модификацию, которая снижает или устраняет экспрессию ADAM6 мыши из эндогенного аллеля ADAM6 так, что самец мыши с модификацией проявляет сниженную фертильность (например, сильно сниженную способность производить потомство путем спаривания), или является по существу стерильным вследствие снижения или устранения эндогенной функции ADAM6, причем мыши дополнительно содержат эктопическую последовательность ADAM6 или ее гомолог или ортолог или функциональный фрагмент. Согласно одному аспекту модификация, которая снижает или устраняет экспрессию ADAM6 мыши, представляет собой модификацию (например, вставку, делецию, замещение и т.д.) в локусе иммуноглобулина мыши.

Согласно одному варианту осуществления снижение или потеря функции ADAM6 предусматривает неспособность или существенную неспособность мышцы производить сперму, которая может проходить от матки мышцы через яйцевод мышцы для оплодотворения яйцеклетки мышцы. Согласно конкретному варианту осуществления по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сперматозоидов, произведенных в объеме эякулята мышцы, являются неспособными пройти через яйцевод *in vivo* после копуляции и оплодотворить яйцеклетку мышцы.

Согласно одному варианту осуществления снижение или потеря функции ADAM6 предусматривает неспособность образования или существенную неспособность образования комплекса ADAM2 и/или ADAM3 и/или ADAM6 на поверхности сперматозоида мышцы. Согласно одному варианту осуществления потеря функции ADAM6 предусматривает существенную неспособность оплодотворить яйцеклетку мышцы путем копуляции с самкой мышцы.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая не содержит функциональный эндогенный ген ADAM6, и содержит белок (или эктопическую нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок), который предоставляет мышце функциональность ADAM6. Согласно одному варианту осуществления мышь представляет собой самца мышцы, и функциональность содержит усиленную фертильность по сравнению с мышью, которая не содержит функциональный эндогенный ген ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления белок кодируется геномной последовательностью, расположенной в пределах локуса иммуноглобулина в зародышевой линии мышцы. Согласно конкретному варианту осуществления локус иммуноглобулина представляет собой локус тяжелой цепи. Согласно другому конкретному варианту осуществления локус тяжелой цепи содержит по меньшей мере один генный сегмент V_H человека, по меньшей мере один генный сегмент D_H человека и по меньшей мере один генный сегмент J_H человека. Согласно одному варианту осуществления эктопический белок кодируется геномной последовательностью, расположенной в пределах не относящегося к иммуноглобулину локуса в зародышевой линии мышцы. Согласно одному варианту осуществления не относящийся к иммуноглобулину локус представляет собой транскрипционно активный локус. Согласно конкретному варианту осуществления транскрипционно активный локус представляет собой локус ROSA26. Согласно конкретному варианту осуществления транскрипционно активный локус ассоциирован с тканеспецифической экспрессией. Согласно одному варианту осуществления тканеспецифическая экспрессия присутствует в репродуктивных тканях. Согласно одному варианту осуществления белок кодируется геномной последовательностью, случайным образом вставленной в зародышевую линию мышцы.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит относящуюся к человеку или химерную относящуюся к человеку/мышце или химерную относящуюся к человеку/крысе (например, относящуюся к человеку переменную, относящуюся к мышце или крысе константную) легкую цепь и химерную относящуюся к человеку переменную/относящуюся к мышце или крысе константную тяжелую цепь. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит трансген, который содержит химерный ген относящейся к человеку переменной/относящейся к крысе или мышце константной легкой цепи, функционально связанный с транскрипционно активным промотором, например, промотором ROSA26. Согласно дополнительному конкретному варианту осуществления химерный трансген относящейся к человеку/мышце или крысы легкой цепи содержит реаранжированную последовательность переменной области легкой цепи человека в зародышевой линии мышцы.

Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность расположена в пределах локуса иммуноглобулина в зародышевой линии мыши. Согласно конкретному варианту осуществления локус иммуноглобулина представляет собой локус тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления локус тяжелой цепи содержит по меньшей мере один генный сегмент V_H человека, по меньшей мере один генный сегмент D_H человека и по меньшей мере один генный сегмент J_H человека. Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность расположена в пределах не относящегося к иммуноглобулину локуса в зародышевой линии мыши. Согласно одному варианту осуществления не относящийся к иммуноглобулину локус представляет собой транскрипционно активный локус. Согласно конкретному варианту осуществления транскрипционно активный локус представляет собой локус ROSA26. Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность размещена в виде вставленной случайным образом в зародышевую линию мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая не содержит функциональный эндогенный ген ADAM6, причем мышь содержит эктопическую нуклеотидную последовательность, которая взаимодополняет потерю функции ADAM6 мыши. Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность предоставляет мыши способность производить потомство, которое является сопоставимым с таковым у соответствующей мыши дикого типа, которая содержит функциональный эндогенный ген ADAM6. Согласно одному варианту осуществления последовательность предоставляет мыши способность образовывать комплекса ADAM2 и/или ADAM3 и/или ADAM6 на поверхности сперматозоида мыши. Согласно одному варианту осуществления последовательность предоставляет сперматозоиду мыши способность проходить от матки мыши через яйцевод мыши к яйцеклетке мыши для оплодотворения яйцеклетки.

Согласно одному варианту осуществления мышь, не содержащая функциональный эндогенный ген ADAM6 и содержащая эктопическую нуклеотидную последовательность, производит по меньшей мере приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% от числа пометов, которые производит мышь дикого типа мышь того же возраста и линии за шестимесячный период времени.

Согласно одному варианту осуществления мышь, не содержащая функциональный эндогенный ген ADAM6 и содержащая эктопическую нуклеотидную последовательность, производит больше по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, приблизительно в 2 раза, приблизительно в 2,5 раза, приблизительно в 3 раза, приблизительно в 4 раза, приблизительно в 6 раз, приблизительно в 7 раз, приблизительно в 8 раз или приблизительно в 10 раз или более потомства при разведении в течение шестимесячного периода времени, чем мышь такого же возраста и такой же или аналогичной линии, которая не содержит функциональный эндогенный ген ADAM6 и которая не содержит эктопическую нуклеотидную последовательность, которую разводят в течение по существу такого же периода времени и по существу при таких же условиях.

Согласно одному варианту осуществления мышь, не содержащая функциональный эндогенный ген ADAM6 и содержащая эктопическую нуклеотидную последовательность, производит в среднем по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 3 раза или в 4 раза большее число детенышей на помет за 4- или 6-месячный период разведения, чем мышь, которые не содержат функциональный эндогенный ген ADAM6 и которая не содержит эктопическую нуклеотидную последовательность, и которую разводят в течение такого

же периода времени.

Согласно одному варианту осуществления мышь, не содержащая функциональный эндогенный ген ADAM6 и содержащая эктопическую нуклеотидную последовательность, представляет собой самца мыши, и самец мыши производит сперму, которая будучи
 5 извлеченной из яйцеводов приблизительно через 5-6 часов после копуляции, отражает миграцию в яйцевоме, которая больше по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, в 100 раз, в 110 раз или в 120 раз или выше, чем у мыши, которая не
 10 содержит функциональный эндогенный ген ADAM6 и которая не содержит эктопическую нуклеотидную последовательность.

Согласно одному варианту осуществления мышь, не содержащая функциональный эндогенный ген ADAM6 и содержащая эктопическую нуклеотидную последовательность, при копуляции с самкой мыши образует сперму, которая способна к прохождению
 15 матки и попаданию и прохождению яйцевода в течение приблизительно 6 часов при результативности, которая приблизительно равна сперме мыши дикого типа.

Согласно одному варианту осуществления мышь, не содержащая функциональный эндогенный ген ADAM6 и содержащая эктопическую нуклеотидную последовательность, производит больше приблизительно в 1,5 раза, приблизительно в 2 раза, приблизительно
 20 в 3 раза или приблизительно в 4 раза или более пометов в сопоставимый период времени, чем мышь, которая не содержит функциональный ген ADAM6 и которая не содержит эктопическую нуклеотидную последовательность.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, содержащая в своей зародышевой линии не относящуюся к мыши последовательность нуклеиновой кислоты, которая
 25 кодирует белок иммуноглобулина, причем не относящаяся к мыши последовательность иммуноглобулина содержит вставку гена ADAM6 мыши или его гомолога или ортолога или функционального фрагмента. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к мыши последовательность иммуноглобулина содержит последовательность иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту
 30 осуществления последовательность содержит последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления последовательность содержит последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления последовательность содержит один или несколько генных сегментов V, один или несколько генных сегментов D и
 35 один или несколько генных сегментов J; согласно одному варианту осуществления последовательность содержит один или несколько генных сегментов V и один или несколько генных сегментов J. Согласно одному варианту осуществления один или несколько генных сегментов V, D и J или один или несколько генных сегментов V и J являются переаранжированными. Согласно одному варианту осуществления один или
 40 несколько генных сегментов V, D и J или один или несколько генных сегментов V и J являются реаранжированными. Согласно одному варианту осуществления после реаранжировки одного или нескольких генных сегментов V, D и J или одного или нескольких генных сегментов V и J мышь содержит в своем геноме по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген ADAM6 мыши или
 45 его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления после реаранжировки мышь содержит в своем геноме по меньшей мере две последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие ген ADAM6 мыши или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент. Согласно одному варианту

осуществления после реаранжировки мышь содержит в своем геноме по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ген ADAM6 мыши или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит ген ADAM6 или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент в В-клетке. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит ген ADAM6 или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент в клетке, не относящейся к В-клетке.

Согласно одному аспекту предусмотрены мыши, которые экспрессируют вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина человека или ее функциональный фрагмент из эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, причем мыши содержат активность ADAM6, которая является функциональной у самца мыши.

Согласно одному варианту осуществления самцы мышей содержат один немодифицированный эндогенный аллель ADAM6 или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент на эндогенном локусе ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления самцы мышей содержат эктопическую последовательность ADAM6 мыши или ее гомолог или ортолог или функциональный фрагмент, который кодирует белок, которые предоставляет функцию ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления самцы мышей содержат последовательность ADAM6 или ее гомолог или ортолог или функциональный фрагмент в положении в геноме мыши, которое приблизительно соответствует положению эндогенного аллеля ADAM6 мыши, например, 3' по отношению к последовательности генного сегмента V и 5' по отношению к первому генному сегменту D.

Согласно одному варианту осуществления самцы мышей содержат последовательность ADAM6 или ее гомолог или ортолог или функциональный фрагмент, фланкированный выше, ниже или выше и ниже (относительно направления транскрипции последовательности ADAM6) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельный генный сегмент иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления вариабельный генный сегмент иммуноглобулина представляет собой генный сегмент человека. Согласно одному варианту осуществления вариабельный генный сегмент иммуноглобулина представляет собой генный сегмент человека, и последовательность, кодирующая ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или фрагмент, функциональный у мыши, находится между генными сегментами V человека; согласно одному варианту осуществления мышь содержит два или более генных сегментов V человека, и последовательность находится в положении между последним генным сегментом V и предпоследним генным сегментом V; согласно одному варианту осуществления последовательность находится в положении после последнего генного сегмента V и первого генного сегмента D.

Согласно одному варианту осуществления самцы мышей содержат последовательность ADAM6 или ее гомолог или ортолог или функциональный фрагмент, который расположен в положении в эндогенном локусе иммуноглобулина, которое является таким же или по существу таким же, как и у самца мыши дикого типа. Согласно конкретному варианту осуществления эндогенный локус является неспособным кодировать вариабельную область тяжелой цепи антитела, причем вариабельная область содержит или происходит из эндогенного не относящегося к человеку генного сегмента. Согласно конкретному варианту осуществления эндогенный локус размещен в положении в геноме самца мыши, которое делает его неспособным кодировать вариабельную область тяжелой цепи антитела. Согласно различным вариантам осуществления самцы мышей содержат последовательность ADAM6, расположенную

на той же хромосоме, что и генные сегменты иммуноглобулина человека, и последовательность ADAM6 кодирует функциональный белок ADAM6.

Согласно одному аспекту предусмотрен самец мыши, который содержит нефункциональный эндогенный ген ADAM6 или делецию эндогенного гена ADAM6, в своей зародышевой линии; причем сперматозоиды мыши способны проходить яйцевод самки мыши и оплодотворять яйцеклетку.

Согласно одному аспекту предусмотрен самец мыши, который содержит функциональный эндогенный ген ADAM6 и модификацию эндогенного локуса иммуноглобулина тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления модификацию производят ниже, или 3', по отношению к эндогенному гену ADAM6. Согласно одному варианту осуществления модификация представляет собой замещение одного или нескольких эндогенных генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина одним или несколькими генными сегментами тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления модификация представляет собой вставку одного или нескольких генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека выше эндогенного гена константной области тяжелой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному аспекту предусмотрены мыши, которые содержат генетическую модификацию, которая снижает эндогенную функцию ADAM6 мыши, причем мышь содержит по меньшей мере некоторую функциональность ADAM6, обеспеченную либо эндогенным немодифицированным аллелем, который является функциональным полностью или частично (например, гетерозигота), либо экспрессией из эктопической последовательности, которая кодирует ADAM6 или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент, который является функциональным у самца мыши.

Согласно одному варианту осуществления мыши содержат функцию ADAM6, достаточную для предоставления самцам мышей способности производить потомство путем спаривания по сравнению с самцами мышей, у которых отсутствует функциональный ADAM6. Согласно одному варианту осуществления функция ADAM6 обеспечивается путем присутствия эктопической нуклеотидной последовательности, которая кодирует ADAM6 мыши или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления функция ADAM6 обеспечивается эндогенным геном ADAM6, присутствующим в эндогенном локусе иммуноглобулина, причем эндогенный локус иммуноглобулина является неспособным кодировать вариабельную область тяжелой цепи антитела. Гомологи или ортологи ADAM6 или его фрагменты, которые являются функциональными у самца мыши, включают в себя те, которые восстанавливают, полностью или частично, потерю способности производить потомство, наблюдаемую у самца мыши, у которого отсутствует достаточная эндогенная активность ADAM6 мыши, например, потеря способности, наблюдаемая у нокаутной в отношении ADAM6 мыши. В этом смысле нокаутные в отношении ADAM6 мыши включают в себя мышей, которые содержат эндогенный локус или его фрагмент, но который не является функциональным, т.е. который вообще не экспрессирует ADAM6 (ADAM6a и/или ADAM6b) или который экспрессирует ADAM6 (ADAM6a и/или ADAM6b) на уровне, недостаточном для поддержания по существу нормальной способности самца мыши дикого типа производить потомство. Потеря функции может быть обусловлена, например, модификацией в структурном гене локуса (т.е. в кодирующей области ADAM6a или ADAM6b) или в регуляторной области локуса (например, в последовательности 5' по отношению к гену ADAM6a или 3' по отношению к кодирующей области ADAM6a или ADAM6b, причем последовательность контролирует, полностью или частично, транскрипцию гена ADAM6, экспрессию РНК

ADAM6 или экспрессию белка ADAM6). Согласно различным вариантам осуществления его ортологи или гомологи или фрагменты, которые являются функциональными у самца мыши, являются такими, которые позволяют сперме самца мыши (или большинству сперматозоидов в эякуляте самца мыши) проходить яйцевод мыши и оплодотворять яйцеклетку мыши.

Согласно одному варианту осуществления самцы мышей, которые экспрессируют вариабельную область иммуноглобулина человека или ее функциональный фрагмент, содержат достаточную активность ADAM6 для предоставления самцам мышей способности производить потомство путем спаривания с самками мышей и согласно одному варианту осуществления самцы мышей проявляют способность производить потомство при спаривании с самками мышей, которое согласно одному варианту осуществления составляет по меньшей мере 25%, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 30%, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 40%, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 50%, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 60%, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 70%, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 80%, согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 90% и согласно одному варианту осуществления является приблизительно одинаковым по сравнению с потомством мышей с одним или двумя эндогенными немодифицированными аллелями ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления самцы мышей экспрессируют достаточный ADAM6 (или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент) для предоставления сперматозоиду от самцов мышей возможности проходить яйцевод самки мыши и оплодотворять яйцеклетку мыши.

Согласно одному варианту осуществления функциональность ADAM6 обеспечивается последовательностью нуклеиновой кислоты, которая является смежной с хромосомной последовательностью мыши (например, нуклеиновая кислота случайным образом интегрирована в хромосому мыши; или помещена в конкретное положение, например, путем нацеливания нуклеиновой кислоты в конкретное положение, например, с помощью опосредованной сайт-специфической рекомбиназой (например, Cre-опосредованной) вставки или гомологичной рекомбинации). Согласно одному варианту осуществления последовательность ADAM6 присутствует на нуклеиновой кислоте, которая расположена отдельно от хромосомы мыши (например, последовательность ADAM6 присутствует на эписоме, т.е. внехромосомно, например, в конструкте экспрессии, векторе, YAC, транскромосоме и т.д.).

Согласно одному аспекту предусмотрены генетически модифицированные мыши и клетки, которые содержат модификацию эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, причем мыши экспрессируют по меньшей мере часть последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина, например, по меньшей мере часть последовательности человека, причем мыши содержат активность ADAM6, которая является функциональной у самца мыши. Согласно одному варианту осуществления модификация снижает или устраняет активность ADAM6 мыши. Согласно одному варианту осуществления мышь модифицирована так, что оба аллеля, которые кодируют активность ADAM6, либо отсутствуют, либо экспрессируют ADAM6, который по существу не функционирует для поддержания нормального спаривания у самца мыши. Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления

модификация поддерживает активность ADAM6 мышцы и делает эндогенный локус тяжелой цепи иммуноглобулина неспособным кодировать варибельную область тяжелой цепи антитела. Согласно конкретному варианту осуществления модификация включает в себя хромосомные вставки и/или транслокации, которые делают эндогенные

5 варибельные генные сегменты тяжелой цепи иммуноглобулина неспособными к реаранжировке для кодирования варибельной области тяжелой цепи антитела, которая является функционально связанной с константной областью тяжелой цепи.

Согласно одному аспекту предусмотрены генетически модифицированные мышцы и клетки, которые содержат модификацию эндогенного локуса тяжелой цепи

10 иммуноглобулина, причем модификация снижает или устраняет активность ADAM6, экспрессированную из последовательности ADAM6 локуса, и причем мышцы содержат белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент. Согласно различным вариантам осуществления белок ADAM6 или его фрагмент кодируется эктопической последовательностью ADAM6. Согласно различным вариантам

15 осуществления белок ADAM6 или его фрагмент экспрессируется из эндогенного аллеля ADAM6. Согласно различным вариантам осуществления мышца содержит первый аллель тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит первую модификацию, которая снижает или устраняет экспрессию функционального ADAM6 из первого аллеля тяжелой цепи иммуноглобулина, и мышца содержит второй аллель тяжелой цепи

20 иммуноглобулина, который содержит вторую модификацию, которая по существу не снижает или не устраняет экспрессию функционального ADAM6 из второго аллеля тяжелой цепи иммуноглобулина.

Согласно различным вариантам осуществления модификация представляет собой вставку одного или нескольких генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина

25 человека выше, или 5', по отношению к эндогенному гену константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно различным вариантам осуществления модификация поддерживает эндогенный ген ADAM6, расположенный на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления вторая модификация расположена 3' (по отношению к направлению транскрипции генного сегмента V мышцы) последнего генного

30 сегмента V мышцы и расположена 5' (по отношению к направлению транскрипции константной последовательности) относящегося к мышце (или химерного относящегося к человеку/мышце) константного гена тяжелой цепи иммуноглобулина или его фрагмента (например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей относящийся к

35 человеку и/или относящийся к мышце: C_H1 и/или шарнир и/или C_H2 и/или C_H3).

Согласно одному варианту осуществления модификация находится на первом аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на первом локусе, который кодирует первый аллель ADAM6, и функция ADAM6 является результатом экспрессии эндогенного ADAM6 на

40 втором аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на втором локусе, который кодирует функциональный ADAM6, причем второй аллель тяжелой цепи иммуноглобулина содержит по меньшей мере одну модификацию генного сегмента V, D и/или J. Согласно конкретному варианту осуществления по меньшей мере одна модификация генного сегмента V, D и/или J представляет собой делецию, замещение генным сегментом V, D и/или J человека, замещение генным сегментом V, D и/или J верблюда, замещение

45 гуманизированным или камелизированным генным сегментом V, D и/или J, замещение последовательности тяжелой цепи последовательностью легкой цепи и их комбинацию. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна модификация представляет собой делецию одного или нескольких генных сегментов V, D и/или J

тяжелой цепи и замещение одного или нескольких генных сегментов V и/или J легкой цепи (например, генного сегмента V и/или J легкой цепи человека) на локусе тяжелой цепи.

Согласно одному варианту осуществления модификация находится на первом аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на первом локусе и втором аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на втором локусе, и функция ADAM6 является результатом экспрессии эктопического ADAM6 на не относящемся к иммуноглобулину локусе в зародышевой линии мыши. Согласно конкретному варианту осуществления не относящийся к иммуноглобулину локус представляет собой локус ROSA26. Согласно конкретному варианту осуществления не относящийся к иммуноглобулину локус является транскрипционно активным в репродуктивной ткани.

Согласно одному варианту осуществления модификация находится на первом аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на первом локусе и втором аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на втором локусе, и функция ADAM6 является результатом эндогенного гена ADAM6 в зародышевой линии мыши. Согласно конкретному варианту осуществления эндогенный ген ADAM6 находится рядом с генными сегментами иммуноглобулина мыши.

Согласно одному варианту осуществления модификация находится на первом аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на первом локусе и на втором аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на втором локусе, и функция ADAM6 является результатом экспрессии эктопической последовательности ADAM6 на первом аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления модификация находится на первом аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на первом локусе и на втором аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина на втором локусе, и функция или активность ADAM6 является результатом экспрессии эктопического ADAM6 на втором аллеле тяжелой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, содержащая гетерозиготный или гомозиготный нокаут ADAM6. Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит модифицированную последовательность иммуноглобулина, которая представляет собой относящуюся к человеку или гуманизированную последовательность иммуноглобулина, или относящуюся к верблюду или камелизированную последовательность иммуноглобулина человека или мыши. Согласно одному варианту осуществления модифицированная последовательность иммуноглобулина присутствует на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления модифицированная последовательность иммуноглобулина содержит последовательность варибельного гена тяжелой цепи человека на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления последовательность варибельного гена тяжелой цепи человека замещает эндогенную варибельную последовательность тяжелой цепи на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, неспособная к экспрессии функционального эндогенного ADAM6 мыши из эндогенного ADAM6 локуса мыши. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует ADAM6 или его функциональный фрагмент, который является функциональным у мыши. Согласно конкретному варианту осуществления эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок, который восстанавливает потерю способности производить потомство, проявляемую самцом мыши, который является гомозиготным в отношении

нокаута ADAM6. Согласно конкретному варианту осуществления эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок ADAM6 мышцы.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышца, которая не содержит функциональный эндогенный локус ADAM6, и которая содержит эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая предоставляет мышце функцию ADAM6. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит эндогенную последовательность ADAM6 мышцы или ее функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления эндогенная последовательность ADAM6 мышцы содержит кодирующую ADAM6a и ADAM6b последовательность, расположенную у мышцы дикого типа между наиболее 3' генным сегментом V тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина мышцы и наиболее 5' генным сегментом D тяжелой цепи (D_H) иммуноглобулина мышцы.

Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую ADAM6a мышцы или ее функциональный фрагмент и/или последовательность, кодирующую ADAM6b мышцы или ее функциональный фрагмент, причем ADAM6a и/или ADAM6b или их функциональный (е) фрагмент(ы) являе(ю)тся функционально связанным(и) с промотором. Согласно одному варианту осуществления промотор представляет собой промотор человека. Согласно одному варианту осуществления промотор представляет собой промотор ADAM6 мышцы. Согласно конкретному варианту осуществления промотор ADAM6 содержит последовательность, расположенную между первым кодоном первого гена ADAM6, ближайшего к наиболее 5' генному сегменту D_H мышцы и сигнальной последовательностью рекомбинации наиболее 5' генного сегмента D_H , причем направление 5' указано по отношению к направлению транскрипции генов иммуноглобулина мышцы. Согласно одному варианту осуществления промотор представляет собой вирусный промотор. Согласно конкретному варианту осуществления вирусный промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (CMV). Согласно одному варианту осуществления промотор представляет собой промотор убиквитина. Согласно одному варианту осуществления промотор представляет собой индуцируемый промотор. Согласно одному варианту осуществления индуцируемый промотор регулирует экспрессию в нерепродуктивных тканях. Согласно одному варианту осуществления индуцируемый промотор регулирует экспрессию в репродуктивных тканях. Согласно конкретному варианту осуществления экспрессия последовательностей ADAM6a мышцы и/или ADAM6b или их функционального(ых) фрагмента(ов) регулируется в зависимости от стадии развития индуцируемым промотором в репродуктивных тканях.

Согласно одному варианту осуществления ADAM6a мышцы и/или ADAM6b выбраны из ADAM6a согласно SEQ ID NO: 1 и/или ADAM6b последовательности SEQ ID NO: 2. Согласно одному варианту осуществления промотор ADAM6 мышцы представляет собой промотор согласно SEQ ID NO: 3. Согласно конкретному варианту осуществления промотор ADAM6 мышцы содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3 сразу выше (относительно направления транскрипции ADAM6a) первого кодона ADAM6a и продолжаясь до конца SEQ ID NO: 3 выше кодирующей области ADAM6. Согласно другому конкретному варианту осуществления промотор ADAM6 представляет собой фрагмент, продолжающийся от в пределах приблизительно 5 - приблизительно 20 нуклеотидов выше старт-кодона ADAM6a до приблизительно 0.5 т.п.н., 1 т.п.н., 2 т.п.н. или 3 т.п.н. или более выше старт-кодона ADAM6a.

Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 3 или ее фрагмент, который, будучи помещенным в мышь, которая является стерильной или которая характеризуется низкой фертильностью вследствие отсутствия ADAM6, улучшает фертильность или восстанавливает фертильность приблизительно до фертильности дикого типа. Согласно одному варианту осуществления SEQ ID NO: 3 или ее фрагмент предоставляет самцу мыши способность производить сперматозоид, который способен проходить яйцевод самки мыши для оплодотворения яйцеклетки мыши.

Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой любую последовательность, кодирующую ген ADAM6 или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент, который при введении и сохранении у мыши, дает уровень фертильности, который является таким же или сопоставимый с мышью дикого типа. Иллюстративный уровень фертильности может быть продемонстрирован способностью самца мыши производить сперматозоид, который способен проходить яйцевод самки мыши для оплодотворения яйцеклетки мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит делецию эндогенной нуклеотидной последовательности, которая кодирует белок ADAM6, замещение эндогенного генного сегмента V_H мыши генным сегментом V_H человека и эктопическую нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит локус тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит делецию эндогенной нуклеотидной последовательности локуса иммуноглобулина, которая содержит эндогенный ген ADAM6, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую один или несколько генных сегментов иммуноглобулина человека, и причем эктопическая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ADAM6 мыши находится в пределах или непосредственно прилегает к нуклеотидной последовательности, кодирующей один или несколько генных сегментов иммуноглобулина человека.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение всех или по существу всех эндогенных генных сегментов V_H нуклеотидной последовательностью, кодирующей один или несколько генных сегментов V_H человека, и эктопическая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ADAM6 мыши, находится в пределах или непосредственно прилегает к нуклеотидной последовательности, кодирующей один или несколько генных сегментов V_H человека. Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение одного или нескольких эндогенных генных сегментов D_H одним или несколькими генными сегментами D_H человека на эндогенном генном локусе D_H . Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение одного или нескольких эндогенных генных сегментов J_H одним или несколькими генными сегментами J_H человека на эндогенном генном локусе J_H . Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение всех или по существу всех эндогенных генных сегментов V_H , D_H и J_H и замещение на эндогенных генных локусах V_H , D_H и J_H генными сегментами V_H , D_H и J_H человека, причем мышь содержит эктопическую последовательность, кодирующую белок ADAM6 мыши. Согласно одному варианту осуществления мышь

содержит вставку генных сегментов V_H , D_H и J_H человека на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина, причем мышь содержит ген ADAM6, который является функциональным у мыши. Согласно конкретному варианту осуществления эктопическая последовательность, кодирующая мышь белок ADAM6, расположена между
 5 предпоследним наиболее 3' генным сегментом V_H из присутствующих генных сегментов V_H человека и последним 3' генным сегментом V_H из присутствующих генных сегментов V_H человека. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит делецию всех или по существу всех генных сегментов V_H мыши и замещение всеми или по
 10 существу всеми генными сегментами V_H человека, и эктопическая нуклеотидная последовательность, кодирующая мышь белок ADAM6, расположена ниже генного сегмента V_H1-2 человека и выше генного сегмента V_H6-1 человека.

Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит замещение всех или по существу всех эндогенных генных сегментов V_H нуклеотидной
 15 последовательностью, кодирующей один или несколько генных сегментов V_H человека, и эктопическая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок ADAM6 мыши, находится в пределах или непосредственно прилегает к нуклеотидной последовательности, кодирующей один или несколько генных сегментов V_H человека.

Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность, которая кодирует мышь белок ADAM6, присутствует на трансгене в геноме мыши. Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок ADAM6 мыши, присутствует
 20 внехромосомно у мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит модификацию эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, причем мышь экспрессирует В-клетку, которая содержит реаранжированную последовательность иммуноглобулина, функционально связанную с последовательностью гена константной области тяжелой цепи, и В-клетка содержит в своем геноме (например, на хромосоме В-клетки) ген,
 30 кодирующий ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши. Согласно одному варианту осуществления реаранжированная последовательность иммуноглобулина, функционально связанная с последовательностью гена константной области тяжелой цепи, содержит последовательность V, D и/или J тяжелой цепи человека; последовательность V, D и/
 35 или J тяжелой цепи мыши; последовательность V и/или J легкой цепи человека или мыши. Согласно одному варианту осуществления последовательность гена константной области тяжелой цепи содержит последовательность тяжелой цепи человека или мыши, выбранную из группы, состоящей из C_H1 , шарнира, C_H2 , C_H3 и их комбинации.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит функционально выключенный эндогенный варибельный генный локус тяжелой цепи иммуноглобулина, причем функция ADAM6 поддерживается у мыши, и дополнительно содержит вставку одного или нескольких генных сегментов иммуноглобулина человека выше или 5' от одного или нескольких константных областей тяжелой цепи мыши. Согласно одному
 40 варианту осуществления один или несколько генных сегментов иммуноглобулина человека включают в себя один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько генных сегментов J_H человека. Согласно конкретному варианту осуществления мышь дополнительно

содержит функционально выключенный эндогенный локус легкой цепи, причем мышь содержит активность ADAM6, которая является такой же или сопоставимой с мышью дикого типа, и дополнительно содержит вставку одного или нескольких генных сегментов λ легкой цепи человека выше или 5' от константной области легкой цепи

5 мыши. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты λ легкой цепи человека содержат 12 генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты λ легкой цепи человека содержат 12 генных сегментов V λ человека и четыре генных сегмента J λ человека. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты λ

10 легкой цепи человека содержат 28 генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты λ легкой цепи человека содержат 28 генных сегментов V λ человека и четыре генных сегмента J λ человека. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты λ легкой цепи человека содержат 40 генных сегментов V λ человека и один или несколько

15 генных сегментов J λ человека. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты λ легкой цепи человека содержат 40 генных сегментов V λ человека и четыре генных сегмента J λ человека. Согласно различным вариантам осуществления четыре генных сегмента J λ человека включают в себя J λ 1, J λ 2, J λ 3 и J λ 7. Согласно различным вариантам осуществления константная область легкой цепи мыши представляет собой

20 C κ мыши или C λ мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит функционально выключенный ген легкой цепи иммуноглобулина, и дополнительно содержит замещение одного или нескольких

25 эндогенных генных сегментов варибельная область тяжелой цепи иммуноглобулина одним или несколькими генными сегментами варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, причем мышь не содержит функциональный эндогенный локус ADAM6, и причем мышь содержит эктопическую нуклеотидную

последовательность, которая экспрессирует белок ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши.

30 Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая не содержит функциональный эндогенный локус или последовательность ADAM6 мыши и которая содержит эктопическую нуклеотидную последовательность, кодирующую локус ADAM6 мыши или функциональный фрагмент локуса или последовательности ADAM6 мыши, причем мышь способна спариваться с мышью противоположного пола, чтобы

35 производить потомство, которое содержит эктопический локус или последовательность ADAM6. Согласно одному варианту осуществления мышь представляет собой самца. Согласно одному варианту осуществления мышь представляет собой самку.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит генный сегмент варибельной области тяжелой цепи

40 иммуноглобулина человека на эндогенном генном локусе варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, мышь не содержит эндогенную функциональную последовательность ADAM6 на эндогенном генном локусе варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, и причем мышь содержит эктопическую

нуклеотидную последовательность, которая экспрессирует белок ADAM6 мыши или

45 его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши.

Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность, которая экспрессирует белок ADAM6 мыши, является

внехромосомной. Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность, которая экспрессирует белок ADAM6 мышцы, интегрирована на одном или нескольких локусах в геноме мышцы. Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько локусов включают в себя locus иммуноглобулина.

5 Согласно одному аспекту предусмотрена мышца, которая экспрессирует последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина из модифицированного эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мышцы, причем тяжелая цепь происходит из генного сегмента V человека, генного сегмента D человека и генного сегмента J человека, причем мышца содержит активность ADAM6, которая является функциональной
10 у мышцы.

Согласно одному варианту осуществления мышца содержит множество генных сегментов V человека, множество генных сегментов D и множество генных сегментов J. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты D представляют собой генные сегменты D человека. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты
15 J представляют собой генные сегменты J человека. Согласно одному варианту осуществления мышца дополнительно содержит гуманизованную последовательность константной области тяжелой цепи, причем гуманизация предусматривает замещение последовательности, выбранной из C_H1, шарнира, C_H2, C_H3 и их комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления тяжелая цепь происходит из генного сегмента
20 V человека, генного сегмента D человека, генного сегмента J человека, последовательности C_H1 человека, шарнирной последовательности человека или мышцы, последовательности C_H2 мышцы и последовательности C_H3 мышцы. Согласно другому конкретному варианту осуществления мышца дополнительно содержит константную
25 последовательность легкой цепи человека.

Согласно одному варианту осуществления мышца содержит ген ADAM6, который фланкирован 5' и 3' эндогенными генными сегментами тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления эндогенные генные сегменты тяжелой цепи иммуноглобулина являются неспособными кодировать тяжелую цепь антитела.
30 Согласно конкретному варианту осуществления ген ADAM6 мышцы находится в положении, которое является таким же, как и у мышцы дикого типа, и эндогенные переменные генные локусы тяжелой цепи иммуноглобулина мышцы являются неспособными к реаранжировке, чтобы кодировать тяжелую цепь антитела.

Согласно одному варианту осуществления генный сегмент V фланкирован 5' (относительно направления транскрипции генного сегмента V) последовательностью, кодирующей активность ADAM6, которая является функциональной у мышцы.
35

Согласно одному варианту осуществления генный сегмент V фланкирован 3' (относительно направления транскрипции генного сегмента V) последовательностью, кодирующей активность ADAM6, которая является функциональной у мышцы.

40 Согласно одному варианту осуществления генный сегмент D фланкирован 5' (относительно направления транскрипции генного сегмента D) последовательностью, кодирующей активность ADAM6, которая является функциональной у мышцы.

Согласно одному варианту осуществления активность ADAM6, которая является функциональной у мышцы, является результатом экспрессии нуклеотидной
45 последовательности, расположенной 5' по отношению к наиболее 5' генному сегменту D и 3' по отношению к наиболее 3' генному сегменту V (относительно направления транскрипции генного сегмента V) модифицированного эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мышцы.

Согласно одному варианту осуществления активность ADAM6, которая является функциональной у мыши, является результатом экспрессии нуклеотидной последовательности, расположенной между двумя генными сегментами V человека в модифицированном эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно одному варианту осуществления два генных сегмента V человека представляют собой генный сегмент V_H1-2 человека и генный сегмент V_H6-1 человека.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность содержит последовательность, выбранную из последовательности ADAM6b мыши или ее функционального фрагмента, последовательности ADAM6a мыши или ее функционального фрагмента и их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность между двумя генными сегментами V человека расположена в противоположной ориентации транскрипции по отношению к генным сегментам V человека. Согласно конкретному варианту осуществления нуклеотидная последовательность кодирует, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции генов ADAM6, и за последовательностью ADAM6a следует последовательность ADAM6b.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение последовательности псевдогена ADAM6 человека между V генными сегментами V_H1-2 и V_H6-1 человека последовательностью ADAM6 мыши или ее функциональным фрагментом.

Согласно одному варианту осуществления последовательность, кодирующая активность ADAM6, которая является функциональной у мыши, представляет собой последовательность ADAM6 мыши или ее функциональный фрагмент.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит эндогенный генный сегмент DFL16.1 мыши (например, у мыши, гетерозиготной в отношении модифицированного эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши) или генный сегмент DH1-1 человека. Согласно одному варианту осуществления генный сегмент D тяжелой цепи иммуноглобулина, экспрессированной мышью, происходит из эндогенного генного сегмента DFL16.1 мыши или генного сегмента D_H1-1 человека.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ADAM6 мыши (или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент) в содержащей ДНК клетке нереоаранжированной В-клеточной линии, но не содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ADAM6 мыши (или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент) в В-клетке, которая содержит реаранжированные локусы иммуноглобулина, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ADAM6 мыши (или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент) находится в геноме в положении, которое отличается от положения, в котором ген ADAM6 мыши встречается у мыши дикого типа. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ADAM6 мыши (или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент), присутствует во всех или по существу всех содержащих ДНК клетках, которые не происходят из реаранжированной В-клеточной линии; согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты присутствует в зародышевых клетках мыши, но не в хромосоме реаранжированной В-клетки.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ADAM6 мыши (или его гомолог

или ортолог или функциональный фрагмент), во всех или по существу всех содержащих ДНК клетках, включая в себя В-клетки, которые содержат реаранжированные локусы иммуноглобулина, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ADAM6 мыши (или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент) находится в геноме в положении, которое отличается от положения, в котором ген ADAM6 мыши встречается у мыши дикого типа. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ADAM6 мыши (или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент), находится на нуклеиновой кислоте, которая является смежной с реаранжированным локусом иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления нуклеиновая кислота, которая является смежной с реаранжированным локусом иммуноглобулина, представляет собой хромосому. Согласно одному варианту осуществления хромосома представляет собой хромосому, которая встречается у мыши дикого типа, и хромосома содержит модификацию локуса иммуноглобулина мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит В-клетку, которая содержит в своем геноме последовательность ADAM6 или ее ортолог или гомолог. Согласно одному варианту осуществления последовательность ADAM6 или ее ортолог или гомолог находится на локусе тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления последовательность ADAM6 или ее ортолог или гомолог находится на локусе, который не является локусом иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления последовательность ADAM6 находится на трансгене, которым управляет гетерологичный промотор. Согласно конкретному варианту осуществления гетерологичный промотор представляет собой не относящийся к иммуноглобулину промотор. Согласно конкретному варианту осуществления В-клетка экспрессирует белок ADAM6 или его ортолог или гомолог.

Согласно одному варианту осуществления 90% или более В-клеток мыши содержат ген, кодирующий белок ADAM6 или его ортолог или его гомолог или его фрагмент, который является функциональной у мыши. Согласно конкретному варианту осуществления мышь представляет собой самца мыши.

Согласно одному варианту осуществления геном В-клетки содержит первый аллель и второй аллель, содержащий последовательность ADAM6 или ее ортолог или гомолог. Согласно одному варианту осуществления геном В-клетки содержит первый аллель, но не второй аллель, содержащий последовательность ADAM6 или ее ортолог или гомолог.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит модификацию на одном или нескольких эндогенных аллелях тяжелой цепи иммуноглобулина, причем модификация сохраняет один или несколько эндогенных аллелей ADAM6, и мышь дополнительно содержит вставку одного или нескольких генных сегментов V λ человека и одного или нескольких генных сегментов J λ человека выше константной области легкой цепи мыши. Согласно различным вариантам осуществления константная область легкой цепи мыши представляет собой С κ мыши или С λ мыши.

Согласно одному варианту осуществления модификация делает мышь неспособной экспрессировать функциональную тяжелую цепь, которая содержит реаранжированные эндогенные генные сегменты тяжелой цепи по меньшей мере из одного аллеля тяжелой цепи и сохраняет эндогенный аллель ADAM6, расположенный в пределах по меньшей мере одного эндогенного аллеля тяжелой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления мыши являются неспособными экспрессировать функциональную тяжелую цепь, которая содержит реаранжированные

эндогенные генные сегменты тяжелой цепи по меньшей мере из одного из эндогенных аллелей тяжелой цепи иммуноглобулина, и мыши экспрессируют белок ADAM6 из эндогенного аллеля ADAM6. Согласно конкретному варианту осуществления мыши являются неспособными экспрессировать функциональную тяжелую цепь, которая

5 содержит реаранжированные эндогенные генные сегменты тяжелой цепи из двух эндогенных аллелей тяжелой цепи иммуноглобулина, и мыши экспрессируют белок ADAM6 из одного или нескольких эндогенных аллелей ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления мыши являются неспособными экспрессировать функциональную тяжелую цепь из каждого эндогенного аллеля тяжелой

10 цепи, и мыши содержат функциональный аллель ADAM6, расположенный в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или 120 или более миллионов пар нуклеотидов выше (относительно направления транскрипции локуса тяжелой цепи мыши) последовательности константной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно конкретному варианту осуществления функциональный аллель ADAM6

15 находится на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина (например, в межгенной V-D области, между двумя генными сегментами V, между генным сегментом V и D, между генным сегментом D и J и т.д.). Согласно конкретному варианту осуществления функциональный аллель ADAM6 расположен в пределах 90-100 т.п.н. межгенной последовательности между последним генным сегментом V мыши и первым

20 генным сегментом D мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит модификацию на одном или нескольких эндогенных аллелях ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления модификация делает мышь неспособной экспрессировать функциональный белок ADAM6 по меньшей мере из одного из одного

25 или нескольких эндогенных аллелей ADAM6. Согласно конкретному варианту осуществления мышь является неспособной экспрессировать функциональный белок ADAM6 из каждого из эндогенных аллелей ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления мыши являются неспособными экспрессировать функциональный белок ADAM6 из каждого эндогенного аллеля

30 ADAM6, и мыши содержат эктопическую последовательность ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления мыши являются неспособными экспрессировать функциональный белок ADAM6 из каждого эндогенного аллеля ADAM6, и мыши содержат эктопическую последовательность ADAM6, расположенную в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или 120 или более т.п.н.

35 выше (относительно направления транскрипции локуса тяжелой цепи мыши) последовательности константной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно конкретному варианту осуществления эктопическая последовательность ADAM6 находится на эндогенном локусе тяжелой цепи (например, в межгенной области V-D, между двумя генными сегментами V, между генным сегментом V и D, между

40 генным сегментом D и J и т.д.). Согласно конкретному варианту осуществления эктопическая последовательность ADAM6 расположена в пределах 90-100 т.п.н. межгенной последовательности между последним генным сегментом V мыши и первым генным сегментом D мыши. Согласно другому конкретному варианту осуществления эндогенную 90-100 т.п.н. межгенную последовательность V-D удаляют, и эктопическая

45 последовательность ADAM6 расположена между последним генным сегментом V и первым генным сегментом D.

Согласно одному аспекту предусмотрен стерильный самец мыши, причем мышь содержит делецию двух или более эндогенных аллелей ADAM6. Согласно одному

аспекту предусмотрена самка мыши, которая представляет собой носителя признака мужской стерильности, причем самка мыши содержит в своей зародышевой линии нефункциональный аллель ADAM6 или нокаут эндогенного аллеля ADAM6.

5 Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, содержащая эндогенный генный сегмент V, D и/или J тяжелой цепи иммуноглобулина, который является неспособным к реаранжировке, чтобы кодировать тяжелую цепь антитела, причем большинство В-клеток мыши содержат функциональный ген ADAM6. Согласно различным вариантам осуществления большинство В-клеток мыши дополнительно содержат один или
10 несколько генных сегментов V λ человека и один или несколько генных сегментов J λ человека выше константной области легкой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно одному варианту осуществления константная область легкой цепи иммуноглобулина мыши выбрана из С κ мыши или С λ мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит интактные эндогенные генные сегменты V, D и J тяжелой цепи иммуноглобулина, которые являются
15 неспособными к реаранжировке, чтобы кодировать функциональную тяжелую цепь антитела. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит по меньшей мере один и до 89 генных сегментов V, по меньшей мере один и до 13 генных сегментов D, по меньшей мере один и до четырех генных сегментов J и их комбинацию; причем по меньшей мере один и до 89 генных сегментов V, по меньшей мере один и до 13 генных
20 сегментов D, по меньшей мере один и до четырех генных сегментов J являются неспособными к реаранжировке, чтобы кодировать вариабельную область тяжелой цепи антитела. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит функциональный ген ADAM6, расположенный в пределах интактных эндогенных генных сегментов V, D и J тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту
25 осуществления мышь содержит эндогенный локус тяжелой цепи, который включает в себя эндогенный локус ADAM6, причем эндогенный локус тяжелой цепи содержит 89 генных сегментов V, 13 генных сегментов D и четыре генных сегмента J, причем эндогенные генные сегменты тяжелой цепи являются неспособными к реаранжировке, чтобы кодировать вариабельную область тяжелой цепи антитела, и локус ADAM6
30 кодирует белок ADAM6, который является функциональным у мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая не содержит эндогенный генный сегмент V, D и J тяжелой цепи иммуноглобулина, причем большинство В-клеток мыши содержат последовательность ADAM6 или ее ортолог или гомолог. Согласно
35 одному варианту осуществления большинство В-клеток мыши экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую лямбда вариабельный домен человека и эндогенную константную область легкой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления мышь не содержит эндогенные генные сегменты тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранные из двух или более генных сегментов V, двух или более генных сегментов D, двух или более генных сегментов J и
40 их комбинации. Согласно одному варианту осуществления мышь не содержит генные сегменты тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранные по меньшей мере из одного и до 89 генных сегментов V, по меньшей мере одного и до 13 генных сегментов D, по меньшей мере одного и до четырех генных сегментов J и их комбинации. Согласно одному варианту осуществления мышь не содержит геномный фрагмент ДНК из
45 хромосомы 12, содержащей приблизительно три миллиона пар нуклеотидов эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления мышь не содержит все функциональные эндогенные генные сегменты V, D и J тяжелой цепи. Согласно конкретному варианту осуществления мышь не содержит 89 генных

сегментов V_H , 13 генных сегментов D_H и четыре генных сегмента J_H .

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, причем мышь содержит геном в зародышевой линии, содержащий модификацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, причем модификация локуса тяжелой цепи иммуноглобулина содержит замещение
 5 одной или нескольких последовательностей вариабельной области иммуноглобулина мыши одной или несколькими не относящимися к мыши последовательностями вариабельной области иммуноглобулина, и причем мышь содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок ADAM6 мыши. Согласно предпочтительному варианту осуществления последовательности D_H и J_H и по меньшей мере 3, по меньшей
 10 мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 40, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 80 последовательностей V_H локуса тяжелой цепи иммуноглобулина замещают не относящимися к мыши последовательностями вариабельной области иммуноглобулина. Согласно дополнительному предпочтительному варианту осуществления последовательности D_H , J_H и все последовательности V_H локуса тяжелой цепи
 15 иммуноглобулина замещают не относящимися к мыши последовательностями вариабельной области иммуноглобулина. Не относящиеся к мыши последовательности вариабельной области иммуноглобулина могут являться переаранжированными. Согласно предпочтительному варианту осуществления не относящиеся к мыши последовательности вариабельной области иммуноглобулина содержат целые
 20 неаранжированные области D_H и J_H и по меньшей мере 3, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 40, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 80 неаранжированных последовательностей V_H отличного от мыши вида. Согласно дополнительному предпочтительному варианту осуществления не относящийся к мыши последовательности вариабельной области иммуноглобулина содержат целую
 25 вариабельную область, включающую в себя все области V_H , D_H и J_H отличного от мыши вида. Отличный от мыши вид может представлять собой *Homo sapiens* и не относящиеся к мыши последовательности вариабельной области иммуноглобулина могут представлять собой последовательности человека.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая экспрессирует антитело, которое содержит по меньшей мере один вариабельный домен человека /не относящийся к человеку полипептид константного домена иммуноглобулина, причем мышь
 30 экспрессирует белок ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог из локуса, отличного от локуса иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления белок ADAM6 или его ортолог или гомолог экспрессируется в В-клетке мыши, причем В-клетка содержит реаранжированную последовательность иммуноглобулина, которая содержит вариабельную
 35 последовательность человека и не относящуюся к человеку константную последовательность.

Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку константная последовательность представляет собой последовательность грызуна. Согласно одному варианту осуществления грызун выбран из мыши, крысы и хомяка.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения стерильного самца мыши, предусматривающий приведение эндогенного аллеля ADAM6 донорной ES клетки в
 45 нефункциональное состояние (или нокаут указанного аллеля), введение донорной ES клетки в зародыш-хозяин, вынашивание зародыша-хозяина в суррогатной матери и предоставление возможности суррогатной матери родить потомство, происходящее полностью или частично из донорной ES клетки. Согласно одному варианту

осуществления способ дополнительно предусматривает скрещивание потомства для получения стерильного самца мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения мыши с представляющей интерес генетической модификацией, причем мышь является стерильной, причем способ предусматривает стадии (a) получения представляющей интерес генетической модификации в геноме; (b) модификации генома для нокаута эндогенного аллеля ADAM6 или приведения эндогенного аллеля ADAM6 в нефункциональное состояние; и (c) использования генома в получении мыши. Согласно различным вариантам осуществления геном происходит из ES клетки или используется в эксперименте ядерного транспорта.

Согласно одному аспекту предусмотрена полученная с использованием нацеливающего вектора мышь, нуклеотидный конструкт или клетка, описанные в настоящем документе.

Согласно одному аспекту предусмотрено потомство скрещивания описанной в настоящем документе мыши со второй мышью, которая представляет собой мышь дикого типа или генетически модифицированную мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ поддержания линии мыши, причем линия мыши содержит замещение последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина мыши одной или несколькими гетерологичными последовательностями тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления одна или несколько гетерологичных последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина представляют собой последовательности тяжелой цепи человека.

Согласно одному варианту осуществления линия мыши содержит делецию одного или нескольких генных сегментов V_H , D_H и/или J_H мыши. Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и/или один или несколько генных сегментов J_H человека. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 40, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 80 сегментов V_H человека, по меньшей мере 27 человека генных сегментов D_H и по меньшей мере шесть генных сегментов J_H . Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 40, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 80 сегментов V_H человека, по меньшей мере 27 генных сегментов D_H человека и по меньшей мере шесть генных сегментов J_H функционально связаны с геном константной области. Согласно одному варианту осуществления ген константной области представляет собой ген константной области мыши. Согласно одному варианту осуществления ген константной области содержит последовательность гена константной области мыши, выбранную из C_H1 , шарнира, C_H2 , C_H3 и/или C_H4 или их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает получение самца мыши, гетерозиготного в отношении замещения последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, и скрещивание гетерозиготного самца мыши с самкой мыши дикого типа или самкой мыши, которая является гомозиготной или гетерозиготной в отношении последовательности тяжелой цепи человека. Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает сохранение линии путем повторного скрещивания гетерозиготных самцов с самками, которые являются самками дикого типа или гомозиготными или гетерозиготными в отношении последовательности

тяжелой цепи человека.

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает получение клеток от самцов или самок мышей, гомозиготных или гетерозиготных в отношении последовательности тяжелой цепи человека, и использование этих клеток в качестве донорных клеток или ядер из них в качестве донорных ядер и использование клеток или ядер для получения генетически модифицированных животных с использованием клеток-хозяев и/или вынашивания клеток и/или ядер в суррогатных материнских особях.

Согласно одному варианту осуществления только самцов мышей, которые являются гетерозиготными в отношении замещения на локусе тяжелой цепи, скрещивают с самками мышей. Согласно конкретному варианту осуществления самки мышей являются гомозиготными, гетерозиготными или дикого типа по отношению к замещенному локусу тяжелой цепи.

Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение переменных последовательностей λ и/или к легкой цепи на эндогенном локусе легкой цепи иммуноглобулина гетерологичными последовательностями легкой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления гетерологичные последовательности легкой цепи иммуноглобулина представляют собой переменные последовательности λ и/или к легкой цепи иммуноглобулина человека.

Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит трансген в локусе, отличном от эндогенного локуса иммуноглобулина, причем трансген содержит последовательность, кодирующую реаранжированную или нереаранжированную гетерологичную последовательность λ или к легкой цепи (например, нереаранжированную V_L и нереаранжированную J_L или реаранжированную VJ), функционально связанную (для нереаранжированной) или слитую (для реаранжированной) с последовательностью константной области легкой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления гетерологичная последовательность λ или к легкой цепи относится к человеку. Согласно одному варианту осуществления последовательность константной области выбрана из грызуна, человека и отличного от человека примата. Согласно одному варианту осуществления последовательность константной области выбрана из мыши, крысы и хомяка. Согласно одному варианту осуществления трансген содержит не относящийся к иммуноглобулину промотор, который управляет экспрессией последовательностей легкой цепи. Согласно конкретному варианту осуществления промотор представляет собой транскрипционно активный промотор. Согласно конкретному варианту осуществления промотор представляет собой промотор ROSA26.

Согласно одному аспекту предусмотрен конструктор нуклеиновой кислоты, содержащий вышележащее гомологичное плечо и нижележащее гомологичное плечо, причем вышележащее гомологичное плечо содержит последовательность, которая идентична или по существу идентична последовательности переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, нижележащее гомологичное плечо содержит последовательность, которая идентична или по существу идентична последовательности переменной области иммуноглобулина человека или мыши, и между вышележащим и нижележащим гомологичными плечами расположена последовательность, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок ADAM6 мыши. Согласно конкретному варианту осуществления последовательность, кодирующая ген ADAM6 мыши, функционально связана с промотором мыши, с которым ADAM6 мыши связан у мыши дикого типа.

Согласно одному аспекту предусмотрен нацеливающий вектор, содержащий (a)

нуклеотидную последовательность, которая идентична или по существу идентична нуклеотидной последовательности генного сегмента варибельной области человека; и (b) нуклеотидную последовательность, кодирующую ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у мыши.

5 Согласно одному варианту осуществления нацеливающий вектор дополнительно содержит промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей ADAM6 мыши. Согласно конкретному варианту осуществления промотор представляет собой промотор ADAM6 мыши.

10 Согласно одному аспекту предусмотрен нуклеотидный конструкт для модификации варибельного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, причем конструкт содержит по меньшей мере один сайт распознавания сайт-специфической рекомбиназы и последовательность, кодирующую белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у мыши.

15 Согласно одному аспекту предусмотрены клетки мыши и зародыши мыши, включая в себя без ограничения ES клетки, плюрипотентные клетки и индуцированные плюрипотентные клетки, которые содержат описанные в настоящем документе генетические модификации. Предусмотрены клетки, которые представляют собой XX, и клетки, которые представляют собой XY. Также предусмотрены клетки, которые содержат ядро, содержащее модификацию, описанную в настоящем документе, 20 например, модификацию, введенную в клетку путем пронуклеарной инъекции. Также предусмотрены клетки, зародыши и мыши, которые содержат введенный с помощью вируса ген ADAM6, например, клетки, зародыши и мыши, содержащие конструкт трансдукции, содержащий ген ADAM6, который является функциональным у мыши.

25 Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная клетка мыши, причем клетка не содержит функциональный эндогенный локус ADAM6 мыши и клетка содержит эктопическую нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок ADAM6 мыши или его функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления клетка дополнительно содержит модификацию эндогенной 30 последовательности варибельного гена тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления модификация эндогенной последовательности варибельного гена тяжелой цепи иммуноглобулина содержит делецию, выбранную из делеции генного сегмента V_H мыши, делеции генного сегмента D_H мыши, делеции генного сегмента J_H мыши и их комбинации. Согласно конкретному варианту 35 осуществления мышь содержит замещение одной или нескольких последовательностей V_H, D_H и/или J_H иммуноглобулина мыши последовательностью иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека выбрана из V_H человека, V_L человека, D_H человека, J_H человека, J_L человека и их комбинации.

40 Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой тотипотентную клетку, плюрипотентную клетку или индуцированную плюрипотентную клетку. Согласно конкретному варианту осуществления клетка представляет собой ES клетку мыши.

45 Согласно одному аспекту предусмотрена В-клетка мыши, причем В-клетка мыши содержит реаранжированный ген тяжелой цепи иммуноглобулина, причем В-клетка содержит на хромосоме В-клетки последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши. Согласно одному варианту осуществления

В-клетка мышцы содержит два аллеля последовательности нуклеиновой кислоты.

Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты находится на молекуле нуклеиновой кислоты (например, хромосоме В-клетки) которая является смежной с реаранжированным локусом тяжелой цепи иммуноглобулина мышцы.

5 Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты находится на молекуле нуклеиновой кислоты (например, хромосоме В-клетки), которая находится на расстоянии от молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит реаранжированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина мышцы.

10 Согласно одному варианту осуществления В-клетка мышцы содержит реаранжированный не относящуюся к мышце последовательность вариабельного гена иммуноглобулина, функционально связанную с геном константной области иммуноглобулина мышцы или человека, причем В-клетка содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мышцы.

15 Согласно одному аспекту предусмотрена соматическая клетка мышцы, содержащая хромосому, которая содержит модифицированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ADAM6 мышцы или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мышцы. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты
20 находится на той же хромосоме, что и модифицированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления нуклеиновая кислота находится на другой хромосоме, чем модифицированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления соматическая клетка содержит одну копию последовательности нуклеиновой кислоты. Согласно одному
25 варианту осуществления соматическая клетка содержит по меньшей мере две копии последовательности нуклеиновой кислоты. Согласно конкретному варианту осуществления соматическая клетка представляет собой В-клетку. Согласно конкретному варианту осуществления клетка представляет собой зародышевую клетку. Согласно конкретному варианту осуществления клетка представляет собой стволовую
30 клетку.

Согласно одному аспекту предусмотрена зародышевая клетка мышцы, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ADAM6 мышцы (или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент) на хромосоме зародышевой клетки, причем последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ADAM6 мышцы (или его гомолог
35 или ортолог или функциональный фрагмент) находится в положении в хромосоме, которое отличается от положения в хромосоме зародышевой клетки мышцы дикого типа. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты находится на локусе иммуноглобулина мышцы. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты находится на той же
40 хромосоме зародышевой клетки, что и локус иммуноглобулина мышцы. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты находится на другой хромосоме зародышевой клетки, чем локус иммуноглобулина мышцы. Согласно одному варианту осуществления локус иммуноглобулина мышцы содержит замещение по меньшей мере одной последовательности иммуноглобулина мышцы по меньшей мере одной не
45 относящейся к мышце последовательностью иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления по меньшей мере одна не относящаяся к мышце последовательность иммуноглобулина представляет собой последовательность иммуноглобулина человека.

Согласно одному аспекту предусмотрена плюрипотентная, индуцированная плюрипотентная или тотипотентная клетка, полученная от описанной в настоящем документе мыши. Согласно конкретному варианту осуществления клетка представляет собой эмбриональную стволовую (ES) клетку мыши.

5 Согласно одному аспекту предусмотрена клетка или ткань, полученная от описанной в настоящем документе мыши. Согласно одному варианту осуществления клетка или ткань получена из селезенки, лимфатического узла или костного мозга мыши, описанной в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой В-клетку. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой
10 эмбриональную стволовую клетку. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой зародышевую клетку.

Согласно одному варианту осуществления ткань выбрана из соединительной, мышечной, нервной и эпителиальной ткани. Согласно конкретному варианту осуществления ткань представляет собой репродуктивную ткань.

15 Согласно одному варианту осуществления клетку и/или ткань, полученную от мыши, описанной в настоящем документе, выделяют для применения в одном или нескольких анализах *ex vivo*. Согласно различным вариантам осуществления один или несколько анализов *ex vivo* включают в себя измерения физических, термических, электрических, механических или оптических свойств, хирургическую процедуру, измерения
20 взаимодействий различных типов ткани, разработку техник получения изображений или их комбинацию.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение клетки или ткани, полученной от описанной в настоящем документе мыши для получения антитела. Согласно одному аспекту предусмотрено применение клетки или ткани, полученной от описанной в
25 настоящем документе мыши для получения гибридомы или квадromы.

Согласно одному аспекту предусмотрена не относящаяся к человеку клетка, содержащая хромосому или ее фрагмент описанного в настоящем документе отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к
30 человеку клетка содержит ядро описанного в настоящем документе отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку клетка содержит хромосому или ее фрагмент как результат ядерного транспорта.

Согласно одному аспекту предусмотрено ядро, полученное из мыши, описанной в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления ядро происходит из
35 диплоидной клетки, которая не является В-клеткой.

Согласно одному аспекту предусмотрена нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область иммуноглобулина, образованного у описанной в настоящем документе мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена аминокислотная последовательность
40 переменных область тяжелой цепи иммуноглобулина или легкой цепи иммуноглобулина антитела, образованного у описанного в настоящем документе мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена нуклеотидная последовательность
45 переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина или легкой цепи иммуноглобулина, кодирующая переменную область антитела, образованного у описанной в настоящем документе мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab, F(ab)₂, scFv), образованный у описанной в настоящем

документе мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения генетически модифицированной мыши, предусматривающий замещение одного или нескольких генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина выше (относительно транскрипции генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина) эндогенного локуса ADAM6 мыши одним или несколькими генными сегментами тяжелой цепи иммуноглобулина человека, и замещение одного или нескольких генных сегментов иммуноглобулина ниже (относительно транскрипции генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина) локуса ADAM6 мыши одним или несколькими генными сегментами тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления один или несколько генных сегментов иммуноглобулина человека, замещающие один или несколько эндогенных генных сегментов иммуноглобулина выше эндогенного локуса ADAM6 мыши, включают в себя генные сегменты V. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты иммуноглобулина человека, замещающие один или несколько эндогенных генных сегментов иммуноглобулина выше эндогенного локуса ADAM6 мыши, включают в себя генные сегменты V и D. Согласно одному варианту осуществления один или несколько генных сегментов иммуноглобулина человека, замещающие один или несколько эндогенных генных сегментов иммуноглобулина ниже эндогенного локуса ADAM6 мыши, включают в себя генные сегменты J. Согласно одному варианту осуществления один или несколько генных сегментов иммуноглобулина человека, замещающих один или несколько эндогенных генных сегментов иммуноглобулина ниже эндогенного локуса ADAM6 мыши, включают в себя генные сегменты V, D и J.

Согласно одному варианту осуществления один или несколько генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина выше и/или ниже гена ADAM6 замещают в плюрипотентной, индуцированной плюрипотентной или тотипотентной клетке для получения генетически модифицированной клетки-предшественника; генетически модифицированную клетку-предшественник вводят хозяину; и хозяина, содержащего генетически модифицированную клетку-предшественник, вынашивают для получения мыши, содержащей геном, полученный из генетически модифицированной клетки-предшественника. Согласно одному варианту осуществления хозяин представляет собой зародыш. Согласно конкретному варианту осуществления хозяин выбран из пре-морулы мыши (например, 8- или 4-клеточная стадия), тетраплоидного зародыша, агрегата эмбриональных клеток или бластоцисты.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения генетически модифицированной мыши, предусматривающий замещение нуклеотидной последовательности мыши, которая содержит нуклеотидную последовательность генного сегмента иммуноглобулина мыши и ADAM6 мыши (или его ортолога или гомолога или фрагмента, функционального у самца мыши) последовательностью, содержащей генный сегмент иммуноглобулина человека для образования первого химерного локуса, затем вставку последовательности, содержащей кодирующую ADAM6 мыши последовательность (или последовательность, кодирующую его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент), в последовательность, содержащую генный сегмент иммуноглобулина человека для образования второго химерного локуса.

Согласно одному варианту осуществления второй химерный локус содержит

вариабельный генный сегмент тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления второй химерный локус содержит вариабельный генный сегмент легкой цепи (V_L) иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления второй химерный локус содержит генный сегмент V_H человека или генный сегмент V_L человека, функционально связанный с генным сегментом D_H человека и генным сегментом J_H человека. Согласно дополнительному конкретному варианту осуществления второй химерный локус функционально связан с третьим химерным локусом, который содержит последовательность C_H1 человека или C_H1 человека и шарнирную последовательность человека, слитые с последовательностью C_H2+C_H3 мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение мыши, которая содержит эктопическую нуклеотидную последовательность, содержащую локус или последовательность ADAM6 мыши для получения фертильного самца мыши, причем применение предусматривает спаривание мыши, содержащей эктопическую нуклеотидную последовательность, которая содержит локус или последовательность ADAM6 мыши, с мышью, которая не содержит функциональный эндогенный локус или последовательность ADAM6 мыши, и получение потомства, которое представляет собой самку, способную производить потомство, содержащее эктопический локус или последовательность ADAM6, или которое представляет собой самца, который содержит эктопический локус или последовательность ADAM6, и самец проявляет фертильность, которая является приблизительно такой же, как и фертильность, проявляемая самцом мыши дикого типа.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для получения нуклеотидной последовательности вариабельной области иммуноглобулина.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для получения полностью человеческого Fab или полностью человеческого $F(ab)_2$.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для получения иммортализованной клеточной линии.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для получения гибридомы или квадromы.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для получения фаговой библиотеки, содержащей вариабельные области тяжелой цепи человека и вариабельные области легкой цепи человека.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для создания последовательности вариабельной области для получения антитела человека, предусматривающее (a) иммунизацию описанной в настоящем документе мыши представляющим интерес антигеном, (b) выделение лимфоцита из иммунизированной мыши согласно (a), (c) воздействие на лимфоцит одного или нескольких меченых антител, (d) идентификацию лимфоцита, который способен связываться с представляющим интерес антигеном, и (e) амплификацию одной или нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты вариабельной области из лимфоцита, тем самым создавая последовательность вариабельной области.

Согласно одному варианту осуществления лимфоцит получен из селезенки мыши. Согласно одному варианту осуществления лимфоцит получен из лимфатического узла

мышы. Согласно одному варианту осуществления лимфоцит получен из костного мозга мышы.

Согласно одному варианту осуществления меченое антитело представляет собой конъюгированное с флуорофором антитело. Согласно одному варианту осуществления 5 одно или несколько конъюгированных с флуорофором антител выбраны из IgM, IgG и/или их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления лимфоцит представляет собой В-клетку.

Согласно одному варианту осуществления один или несколько последовательность 10 переменных области нуклеиновой кислоты содержит последовательность переменных области тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления одна или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты переменных области содержат последовательность переменных области легкой цепи. Согласно конкретному варианту осуществления последовательность переменных области легкой цепи представляет собой последовательность переменных области к легкой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления один или несколько последовательностей 15 нуклеиновой кислоты переменных области содержит последовательность переменных области тяжелой цепи и к легкой цепи.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрено применение описанной в настоящем документе мышы для создания последовательности переменных области 20 тяжелой и к легкой цепи для получения антитела человека, предусматривающее (a) иммунизацию описанной в настоящем документе мышы представляющим интерес антигеном, (b) выделение селезенки из иммунизированной мышы согласно (a), (c) воздействие на В-лимфоциты из селезенки одного или нескольких меченых антител, (d) идентификацию В-лимфоцита согласно (c), который способен связываться с 25 представляющим интерес антигеном, и (e) амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты переменных области тяжелой цепи и последовательности нуклеиновой кислоты переменных области легкой цепи из В-лимфоцита, тем самым создавая последовательности переменных области тяжелой цепи и к легкой цепи.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрено применение описанной 30 в настоящем документе мышы для создания последовательности переменных области тяжелой и к легкой цепи для получения антитела человека, предусматривающее (a) иммунизацию описанной в настоящем документе мышы представляющим интерес антигеном, (b) выделение одного или нескольких лимфатических узлов из иммунизированной мышы согласно (a), (c) воздействие на В-лимфоциты из одного или 35 нескольких лимфатических узлов одного или нескольких меченых антител, (d) идентификацию В-лимфоцита согласно (c), который способен связываться с представляющим интерес антигеном, и (e) амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты переменных области тяжелой цепи и последовательности нуклеиновой кислоты переменных области к легкой цепи из В-лимфоцита, тем самым 40 создавая последовательности переменных области тяжелой цепи и к легкой цепи.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрено применение описанной в настоящем документе мышы для создания последовательности переменных области 45 тяжелой и к легкой цепи для получения антитела человека, предусматривающее (a) иммунизацию описанной в настоящем документе мышы представляющим интерес антигеном, (b) выделение костного мозга из иммунизированной мышы согласно (a), (c) воздействие на В-лимфоциты из костного мозга одного или нескольких меченых антител, (d) идентификацию В-лимфоцита согласно (c), который способен связываться с представляющим интерес антигеном, и (e) амплификацию последовательности

нуклеиновой кислоты вариабельной области тяжелой цепи и последовательности нуклеиновой кислоты вариабельной области к легкой цепи из В-лимфоцита, тем самым создавая последовательности вариабельной области тяжелой цепи и к легкой цепи.

Согласно различным вариантам осуществления одно или несколько меченых антител
5 выбраны из IgM, IgG и/или их комбинации.

Согласно различным вариантам осуществления предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для создания последовательности вариабельной области тяжелой и к легкой цепи для получения антитела человека, дополнительно предусматривающее слияние амплифицированных последовательностей вариабельной
10 области тяжелой и легкой цепи с последовательностями константной области тяжелой и легкой цепи человека, экспрессию слитых последовательностей тяжелой и легкой цепи в клетке и выделение экспрессированных последовательностей тяжелой и легкой цепи, тем самым создавая антитело человека.

Согласно различным вариантам осуществления константные области тяжелой цепи
15 человека выбраны из IgM, IgD, IgA, IgE и IgG. Согласно различным конкретным вариантам осуществления IgG выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Согласно различным вариантам осуществления константная область тяжелой цепи человека содержит C_H1, шарнир, C_H2, C_H3, C_H4 или их комбинацию. Согласно различным вариантам

осуществления константная область легкой цепи представляет собой к константную
20 область иммуноглобулина. Согласно различным вариантам осуществления клетка выбрана из клетки HeLa, клетки DU145, клетки Lncap, клетки MCF-7, клетки MDA-MB-438, клетки PC3, клетки T47D, клетки THP-1, клетки U87, клетки SHSY5Y (нейробластома человека), клетки Saos-2, клетки Vero, клетки CHO, клетки GH3, клетки PC12, ретикулярной клетки человека (например, клетки PER.C6™) и клетки MC3T3. Согласно
25 конкретному варианту осуществления клетка представляет собой клетку CHO.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ создания обратного химерного относящегося к грызуну-человеку антитела, специфического к представляющему интерес
30 антигену, предусматривающий стадии иммунизации описанной в настоящем документе мыши антигеном, выделение по меньшей мере одной клетки из мыши, производящей обратное химерное относящееся к мыши - относящееся к человеку антитело, специфическое к антигену, культивирование по меньшей мере одной клетки, производящей обратное химерное относящееся в мыши - относящееся к человеку антитело, специфическое к антигену, и получение указанного антитела.

Согласно одному варианту осуществления обратное химерное относящееся в мыши-
35 человеку антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи человека, слитый с константным геном тяжелой цепи мыши или крысы, и вариабельный домен легкой цепи человека, слитый с константным геном легкой цепи мыши или крысы или человека.

Согласно одному варианту осуществления культивирование по меньшей мере одной
40 клетки, производящей обратное химерное относящееся к грызуну - относящееся к человеку антитело, специфическое к антигену, проводят по меньшей мере на одной гибридной клетке, созданной по меньшей мере из одной клетки, выделенной из мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ создания полностью человеческого антитела, специфического к представляющему интерес антигену, предусматривающий
45 стадии иммунизации описанной в настоящем документе мыши антигеном, выделение по меньшей мере одной клетки из мыши, производящей обратное химерное относящееся к грызуну - относящееся к человеку антитело, специфическое к антигену, создание по меньшей мере одной клетки, производящей полностью человеческое антитело, полученное из обратного химерного относящегося к грызуну - относящегося к человеку

антитела, специфического к антигену, и культивирование по меньшей мере одной клетки, производящей полностью человеческое антитело, и получение указанного полностью человеческого антитела.

Согласно различным вариантам осуществления по меньшей мере одна клетка, выделенная из мыши, производящей обратное химерное относящееся к грызуну - относящееся к человеку антитело, специфическое к антигену, представляет собой спленоцит или В-клетку.

Согласно различным вариантам осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

Согласно различным вариантам осуществления иммунизацию представляющим интерес антигеном проводят с помощью белка, ДНК, комбинации ДНК и белка или клеток, экспрессирующих антиген.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную область иммуноглобулина или ее фрагмент. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты применяют для получения антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента. Согласно одному варианту осуществления мышь применяют для получения антигенсвязывающего белка, выбранного из антитела, мультиспецифического антитела (например, биспецифического антитела), scFv, биспецифического scFv, диатела, триатела, тетратела, V-NAR, V_{HH}, V_L, F(ab), F(ab)₂, DVD (т.е. антигенсвязывающего белка с двойным вариабельным доменом), SVD (т.е. антигенсвязывающего белка с одним вариабельным доменом) или биспецифического проводника Т-клеток (BiTE).

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для введения эктопической последовательности ADAM6 в организм мыши, которая не содержит функциональную эндогенную последовательность ADAM6 мыши, причем применение предусматривает спаривание описанной в настоящем документе мыши с мышью, которая не содержит функциональную эндогенную последовательность ADAM6 мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение генетического материала из описанной в настоящем документе мыши для получения мыши, содержащей эктопическую последовательность ADAM6. Согласно одному варианту осуществления применение предусматривает ядерный транспорт с использованием ядра клетки описанной в настоящем документе мыши. Согласно одному варианту осуществления применение предусматривает клонирование клетки описанной в настоящем документе мыши для получения животного, полученного из клетки. Согласно одному варианту осуществления применение предусматривает использование спермы или яйцеклетки описанной в настоящем документе мыши с способе получения мыши, содержащей эктопическую последовательность ADAM6.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения фертильного самца мыши, содержащего модифицированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина, предусматривающий оплодотворение первой зародышевой клетки мыши, которая содержит модификацию эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, второй зародышевой клеткой мыши, которая содержит ген ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши; образование оплодотворенной клетки; предоставление возможности оплодотворенной клетке развиться в зародыш; и вынашивание зародыша в суррогатной матери для получения мыши.

Согласно одному варианту осуществления оплодотворение достигается путем спаривания самца мыши и самки мыши. Согласно одному варианту осуществления самка мыши содержит ген ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления самец мыши содержит ген ADAM6 или его ортолог или гомолог или фрагмент.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент соответствующего белка ADAM6, для восстановления или усиления фертильности мыши с геномом, содержащим модификацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, причем модификация снижает или устраняет эндогенную функцию ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты интегрирована в геном мыши в эктопическом положении. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты интегрирована в геном мыши на эндогенном локусе иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления эндогенный locus иммуноглобулина представляет собой locus тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты интегрирована в геном мыши в положении, отличном от эндогенного локуса иммуноглобулина.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе мыши для получения лекарственного средства (например, антигенсвязывающего белка) или для получения последовательности, кодирующей вариативную последовательность лекарственного средства (например, антигенсвязывающего белка), для лечения заболевания или нарушения человека.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная клетка мыши, причем клетка является неспособной экспрессировать тяжелую цепь, содержащую реаранжированные эндогенные генные сегменты тяжелой цепи иммуноглобулина, и клетка содержит функциональный ген ADAM6, который кодирует белок ADAM6 мыши или его функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления клетка дополнительно содержит вставку генных сегментов иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления генные сегменты иммуноглобулина человека представляют собой генные сегменты тяжелой цепи, которые функционально связаны с константными областями тяжелой цепи мыши так, чтобы при реаранжировке кодировать функциональную тяжелую цепь антитела, которое содержит вариативную область человека.

Предусмотрены генетически модифицированные отличные от человека животные, зародыши, клетки, ткани, а также конструкторы нуклеиновой кислоты для модификации отличных от человека животных и способы и композиции для их получения и применения. Предусмотрены животные и клетки, которые производят лямбда (λ) вариативные области (относящиеся к человеку или не относящиеся к человеку), ассоциированные с каппа (κ) легкой цепью, причем животные и клетки содержат модификацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, которая устраняет или снижает активность белка ADAM6 или его гомолога или ортолога, причем животные дополнительно содержат генетическую модификацию, которая полностью или частично восстанавливает активность ADAM6 (или активность его гомолога или ортолога). Предусмотрены мыши, которые являются фертильными и экспрессируют вариативный домен λ человека, когнатный вариативному домену тяжелой цепи человека, причем вариативный домен λ человека экспрессируется у мыши смежно с константной

областью λ или κ , и согласно различным вариантам осуществления варибельная область λ или κ представляет собой эндогенную (например, относящуюся к мыши или крысе) константную область. Также предусмотрены мыши и клетки, которые образуют λ варибельные области человека, ассоциированные с κ или λ легкой цепью, например, из эндогенного локуса легкой цепи мыши. Также предусмотрены способы получения антител, которые содержат лямбда варибельные области. Также предусмотрены способы отбора тяжелых цепей, которые экспрессируются с когнатными лямбда варибельными областями.

Предусмотрены химерные и относящие к человеку антигенсвязывающие белки (например, антитела) и нуклеиновые кислоты, кодирующие их, которые содержат соматически мутированные варибельные области, включая в себя антитела, которые содержат легкие цепи, содержащие варибельный домен, происходящий из генного сегмента $V\lambda$ человека и генного сегмента $J\lambda$ человека, слитые с константным доменом легкой цепи мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая экспрессирует последовательность λ варибельной области человека на легкой цепи, которая содержит константную область мыши. Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая экспрессирует последовательность λ варибельной области человека на легкой цепи, который содержит константную область κ . Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая экспрессирует из эндогенного локуса легкой цепи мыши легкую цепь, которая содержит последовательность λ варибельной области человека. Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит реаранжированный ген легкой цепи, который содержит λ варибельную последовательность человека, соединенные с последовательностью константной области мыши; согласно одному варианту осуществления последовательность константной области мыши представляет собой константную последовательность λ ; согласно одному варианту осуществления последовательность константной области мыши представляет собой константную последовательность κ .

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит нереаранжированный варибельный генный сегмент λ легкой цепи человека ($hV\lambda$) и соединяющий генный сегмент λ человека ($hJ\lambda$). Согласно одному варианту осуществления нереаранжированный $hV\lambda$ и $hJ\lambda$ находятся на локусе легкой цепи мыши. Согласно одному варианту осуществления нереаранжированный $hV\lambda$ и нереаранжированный $hJ\lambda$ находятся на трангене и функционально связаны с последовательностью константной области человека или мыши. Согласно одному варианту осуществления нереаранжированный $hV\lambda$ и нереаранжированный $hJ\lambda$ находятся на эписоме. Согласно одному варианту осуществления мышь способна производить иммуноглобулин, который содержит легкую цепь, которые происходят из нереаранжированной последовательности $hV\lambda$ и последовательности $hJ\lambda$ и последовательности нуклеиновой кислоты константной области легкой цепи мыши (C_L). Также предусмотрены способы и композиции для получения и применения генетически модифицированных мышей. Предусмотрены антитела, которые содержат (а) варибельный домен тяжелой цепи человека (hV_H), слитый с константной областью тяжелой цепи мыши, и (b) V_L человека, слитый с доменом C_L мыши; включая в себя случай, когда один или несколько варибельных доменов соматически мутированы, например, в ходе отбора антитела или иммунной клетки у мыши согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления нереаранжированный $hV\lambda$ и

нереаранжированный hJλ функционально связаны с константной областью κ (Cκ) человека или мыши. Согласно одному варианту осуществления нереаранжированный hVλ и нереаранжированный hJλ функционально связаны с константной областью λ (Cλ) человека или мыши.

5 Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит в своей зародышевой линии, на эндогенном локусе легкой цепи мыши последовательность вариабельной области λ легкой цепи человека, причем лямбда последовательность вариабельной области человека экспрессируется в легкой цепи, которая содержит последовательность гена константной области иммуноглобулина мыши.

10 Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус λ. Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус κ.

Согласно одному варианту осуществления мышь не содержит эндогенную вариабельную последовательность легкой цепи на эндогенном локусе легкой цепи
15 мыши.

Согласно одному варианту осуществления все или по существу все эндогенные генные сегменты вариабельной области легкой цепи мыши замещают одним или несколькими генными сегментами вариабельной области λ человека.

Согласно одному варианту осуществления последовательность вариабельной области λ легкой цепи человека содержит последовательность Jλ человека. Согласно одному варианту осуществления последовательность Jλ человека выбрана из группы, состоящей из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7 и их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления последовательность вариабельной области λ легкой цепи человека содержит фрагмент кластера A локуса легкой цепи человека.
25 Согласно конкретному варианту осуществления фрагмент кластера A локуса λ легкой цепи человека продолжается от hVλ3-27 до hVλ3-1.

Согласно одному варианту осуществления последовательность вариабельной области λ легкой цепи человека содержит фрагмент кластера B локуса легкой цепи человека. Согласно конкретному варианту осуществления фрагмент кластера B локуса λ легкой
30 цепи человека продолжается от hVλ5-52 до hVλ1-40.

Согласно одному варианту осуществления последовательность вариабельной области λ легкой цепи человека содержит геномный фрагмент кластера A и геномный фрагмент кластера B. Согласно одному варианту осуществления последовательность вариабельной области λ легкой цепи человека содержит по меньшей мере один генный сегмент кластера
35 A и по меньшей мере один генный сегмент кластера B.

Согласно одному варианту осуществления больше 10% нативного репертуара легкой цепи мыши происходит по меньшей мере из двух генных сегментов hVλ, выбранных из 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 и 9-49. Согласно одному варианту осуществления больше 20% нативного репертуара легкой цепи мыши происходит по меньшей мере из трех генных
40 сегментов hVλ, выбранных из 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 и 9-49. Согласно одному варианту осуществления больше 30% нативного репертуара легкой цепи мыши происходит по меньшей мере из четырех генных сегментов hVλ, выбранных из 2-8, 2-23, 1-40, 5-45 и 9-49.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит λ вариабельную последовательность человека, слитую с константной областью мыши, причем мышь проявляет соотношение частоты использования κ к частоте использования λ, составляющее приблизительно 1:1.

Согласно одному варианту осуществления легкая цепь иммуноглобулина

экспрессируется из эндогенного локуса легкой цепи мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит последовательность вариабельной области λ легкой цепи ($V\lambda$) и по меньшей мере одну последовательность J (J), смежную с последовательностью константной области легкой цепи мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь не содержит функциональный генный сегмент $V\kappa$ мыши и/или генный сегмент $J\kappa$ мыши.

Согласно одному варианту осуществления $V\lambda$ представляет собой $V\lambda$ человека ($hV\lambda$) и J представляет собой $J\lambda$ человека ($hJ\lambda$). Согласно одному варианту осуществления $hV\lambda$ и $hJ\lambda$ представляют собой нереаранжированные генные сегменты.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит множество нереаранжированных генных сегментов $hV\lambda$ и по меньшей мере один генный сегмент $hJ\lambda$. Согласно конкретному варианту осуществления множество нереаранжированных генных сегментов $hV\lambda$ составляет по меньшей мере 12 генных сегментов, по меньшей мере 28 генных сегментов или по меньшей мере 40 генных сегментов.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один генный сегмент $hJ\lambda$ выбран из группы, состоящей из $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$ и их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус λ легкой цепи мыши удаляют полностью или частично.

Согласно одному варианту осуществления последовательность константной области к легкой цепи мыши находится на эндогенном локусе легкой цепи мыши.

Согласно одному варианту осуществления приблизительно 10% - приблизительно 45% В-клеток мыши экспрессируют антитело, которое содержит легкую цепь, содержащую вариабельный домен λ легкой цепи ($V\lambda$) человека и константный домен к легкой цепи мыши ($C\kappa$).

Согласно одному варианту осуществления вариабельный домен λ человека происходит из реаранжированной последовательности $hV\lambda/hJ\lambda$, выбранной из группы, состоящей из 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 и 1-51/1.

Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит межгенную область $V\kappa$ - $J\kappa$ человека из локуса к легкой цепи человека, причем межгенная область $V\kappa$ - $J\kappa$ человека является смежной с последовательностью $V\lambda$ и последовательностью J. Согласно конкретному варианту осуществления межгенная область $V\kappa$ - $J\kappa$ человека расположена между последовательностью $V\lambda$ и последовательностью J.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая содержит (a) по меньшей мере 12 - по меньшей мере 40 нереаранжированных генных сегментов вариабельной области λ легкой цепи человека и по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ человека на эндогенном локусе легкой цепи мыши; (b) межгенную последовательность $V\kappa$ - $J\kappa$ человека, расположенную между по меньшей мере 12 - по меньшей мере 40 генными сегментами вариабельной области легкой цепи человека и по меньшей мере одной последовательностью $J\lambda$ человека; причем мышь экспрессирует антитело, которое содержит легкую цепь, содержащую домен $V\lambda$ человека и домен $C\kappa$ мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая экспрессирует антитело, содержащее легкую цепь, которая содержит вариабельную последовательность λ и константную последовательность κ .

Согласно одному варианту осуществления мышь проявляет соотношение частоты использования κ к частоте использования λ , составляющее приблизительно 1:1.

Согласно одному варианту осуществления популяция незрелых В-клеток, полученных из костного мозга мыши, проявляет соотношение частоты использования к к частоте использования λ , составляющее приблизительно 1:1.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит нереаранжированный генный сегмент $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина, функционально связанный с локусом легкой цепи мыши, который содержит ген C_L мыши.

Согласно одному варианту осуществления генные сегменты $V\lambda$ и/или $J\lambda$ представляют собой генные сегменты человека. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты $V\lambda$ и/или $J\lambda$ представляют собой генные сегменты мыши, и C_L представляет собой C_k мыши.

Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус к легкой цепи. Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус λ легкой цепи.

Согласно одному варианту осуществления нереаранжированные генные сегменты $V\lambda$ и $J\lambda$ находятся на эндогенном локусе легкой цепи мыши.

Согласно одному варианту осуществления нереаранжированные генные сегменты $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина находятся на трансгене.

Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение одного или нескольких генных сегментов V, D и/или J тяжелой цепи одним или несколькими генными сегментами V, D и/или J человека на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит нереаранжированный генный сегмент $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина на эндогенном локусе к легкой цепи мыши, который содержит ген C_k мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит нереаранжированный переменный генный сегмент λ легкой цепи ($V\lambda$) иммуноглобулина человека и λ соединяющий генный сегмент ($J\lambda$) на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши, который содержит ген $C\lambda$ мыши.

Согласно одному варианту осуществления переменный генный локус легкой цепи ("локус V_L ") содержит по меньшей мере один генный сегмент $V\lambda$ человека ($hV\lambda$).

Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ человека ($hJ\lambda$). Согласно другому варианту осуществления локус V_L содержит до четырех генных сегментов $hJ\lambda$. Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит смежную последовательность, содержащую геномную последовательность λ человека и геномную последовательность к человека.

Согласно одному варианту осуществления переменный генный локус к легкой цепи ("локус к") содержит по меньшей мере один генный сегмент $V\lambda$ человека ($hV\lambda$).

Согласно одному варианту осуществления локус к содержит по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ человека ($hJ\lambda$). Согласно одному варианту осуществления локус к содержит до четырех генных сегментов $hJ\lambda$. Согласно одному варианту осуществления локус к содержит по меньшей мере один $hV\lambda$ и по меньшей мере один $hJ\lambda$ и не содержит или по существу не содержит функциональный генный сегмент V_k области и не содержит или по существу не содержит функциональный генный сегмент J_k области. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит ни одного функционального генного сегмента V_k области. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит ни одного функционального генного сегмента J_k области.

Согласно одному варианту осуществления вариабельный генный локус λ легкой цепи ("локус λ ") содержит по меньшей мере один генный сегмент $hV\lambda$. Согласно одному варианту осуществления локус λ содержит по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ человека ($hJ\lambda$). Согласно другому варианту осуществления локус λ содержит до четырех

5 генных сегментов $hJ\lambda$. Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит множество $hV\lambda$.

Согласно одному варианту осуществления множество $hV\lambda$ выбирают так, чтобы получить в результате экспрессию репертуара вариабельной области λ легкой цепи, которая отражает приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%,

10 приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% или приблизительно 90% или более частоты использования $V\lambda$, наблюдаемой у человека. Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит генные сегменты $hV\lambda$ 1-40, 1-44, 2-8, 2-14, 3-21 и их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления $hV\lambda$ включают в себя 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 и 3-12. Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L содержит смежную последовательность локус λ легкой цепи человека, которая охватывает от $V\lambda 3-12$ до $V\lambda 3-1$. Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит по

15 меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 $hV\lambda$. Согласно конкретному варианту осуществления $hV\lambda$ включают в себя 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11 и 3-12. Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L содержит смежную последовательность λ локуса человека, которая охватывает от $V\lambda 3-12$ до $V\lambda 3-1$. Согласно одному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к. Согласно конкретному

25 варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к, и эндогенный локус λ легкой цепи удаляют частично или полностью. Согласно одному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ . Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ , и эндогенный локус к удаляют частично или полностью.

30 Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит 13-28 или более $hV\lambda$. Согласно конкретному варианту осуществления $hV\lambda$ включают в себя 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25 и 3-27. Согласно конкретному варианту осуществления локус к содержит смежную последовательность локуса λ человека, которая охватывает от $V\lambda 3-27$ до $V\lambda 3-1$. Согласно одному варианту осуществления локус V_L находится на

35 эндогенном локусе к. Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к, и эндогенный локус λ легкой цепи удаляют частично или полностью. Согласно другому варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ . Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ , и эндогенный локус к удаляют частично или полностью.

Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит 29-40 $hV\lambda$. Согласно конкретному варианту осуществления локус к содержит смежную последовательность локуса λ человека, которая охватывает от $V\lambda 3-29$ до $V\lambda 3-1$, и смежную

45 последовательность локуса λ человека, которая охватывает от $V\lambda 5-52$ до $V\lambda 1-40$. Согласно конкретному варианту осуществления вся или по существу вся последовательность между $hV\lambda 1-40$ и $hV\lambda 3-29$ у генетически модифицированной мыши состоит по существу из последовательности λ человека приблизительно из 959 п.н.,

встречающейся в природе (например, в человеческой популяции) ниже генного сегмента hV λ 1-40 (ниже 3' нетранслируемой части), сайта фермента рестрикции (например, P1-SceI), за которым следует λ последовательность человека приблизительно из 3431 п.н. выше генного сегмента hV λ 3-29, встречающегося в природе. Согласно одному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к мыши. Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к мыши, и эндогенный локус λ легкой цепи мыши удаляют частично или полностью. Согласно другому варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ мыши. Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ мыши, и эндогенный локус к мыши удаляют частично или полностью.

Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один hJ λ . Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит множество hJ λ . Согласно одному варианту осуществления V_L локус содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 hJ λ . Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L содержит четыре hJ λ . Согласно конкретному варианту осуществления четыре hJ λ представляют собой hJ λ 1, hJ λ 2, hJ λ 3 и hJ λ 7. Согласно одному варианту осуществления локус V_L представляет собой локус к. Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к, и эндогенный локус λ легкой цепи удаляют частично или полностью. Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит один hJ λ . Согласно конкретному варианту осуществления один hJ λ представляет собой hJ λ 1. Согласно одному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к. Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе к, и эндогенный локус λ легкой цепи удаляют частично или полностью. Согласно другому варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ . Согласно конкретному варианту осуществления локус V_L находится на эндогенном локусе λ , и эндогенный локус к удаляют частично или полностью.

Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один hV λ , по меньшей мере один hJ λ и ген С κ мыши. Согласно одному варианту осуществления локус V_L содержит по меньшей мере один hV λ , по меньшей мере один hJ λ и ген С λ мыши. Согласно конкретному варианту осуществления ген С λ мыши представляет собой С λ 2. Согласно конкретному варианту осуществления ген С λ мыши по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентичен С λ 2 мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение на эндогенном локусе к мыши эндогенных генных сегментов V κ мыши одним или несколькими генными сегментами hV λ , причем генные сегменты V κ функционально связаны с эндогенным геном области С κ мыши, так что мышь реаранжирует генные сегменты V λ человека и экспрессирует обратную химерную легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит домен V λ человека и С κ мыши. Согласно одному варианту осуществления 90-100% нереаранжированных генных сегментов V κ мыши замещают по меньшей мере одним нереаранжированным генным сегментом hV λ . Согласно конкретному варианту осуществления все или по существу все эндогенные генные сегменты V κ мыши замещают

по меньшей мере одним нереаранжированным генным сегментом hVλ. Согласно одному варианту осуществления замещение происходит с помощью по меньшей мере 12, по меньшей мере 28 или по меньшей мере 40 нереаранжированных генных сегментов hVλ.

Согласно одному варианту осуществления замещение происходит с помощью по меньшей мере 7 функциональных нереаранжированных генных сегментов hVλ, по меньшей мере 16 функциональных нереаранжированных генных сегментов hVλ или по меньшей мере 27 функциональных нереаранжированных генных сегментов hVλ.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение всех генных сегментов Jκ мыши по меньшей мере одним нереаранжированным генным сегментом hJλ. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один нереаранжированный генный сегмент Jλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ4, Jλ5, Jλδ, Jλ7 и их комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов hVλ выбраны из генного сегмента hVλ 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52 и их комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления по меньшей мере один нереаранжированный генный сегмент hJλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7 и их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение эндогенных генных сегментов Vλ мыши на эндогенном локусе λ мыши одним или несколькими генными сегментами Vλ человека на эндогенном локусе λ мыши, причем генные сегменты hVλ функционально связаны с геном области Cλ мыши, так что мышь реаранжирует генные сегменты hVλ и экспрессирует обратную химерную легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит домен hVλ и Cλ мыши. Согласно конкретному варианту осуществления ген Cλ мыши представляет собой Cλ2. Согласно конкретному варианту осуществления ген Cλ мыши по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен Cλ2 мыши. Согласно одному варианту осуществления 90-100% нереаранжированных генных сегментов Vλ мыши замещают по меньшей мере одним нереаранжированным генным сегментом hVλ. Согласно конкретному варианту осуществления все или по существу все эндогенные генные сегменты Vλ мыши замещают по меньшей мере одним нереаранжированным генным сегментом hVλ. Согласно одному варианту осуществления замещение происходит с помощью по меньшей мере 12, по меньшей мере 28 или по меньшей мере 40 нереаранжированных генных сегментов hVλ. Согласно одному варианту осуществления замещение происходит с помощью по меньшей мере 7 функциональных нереаранжированных генных сегментов hVλ, по меньшей мере 16 функциональных нереаранжированных генных сегментов hVλ или по меньшей мере 27 функциональных нереаранжированных генных сегментов hVλ. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение всех генных сегментов Jλ мыши по меньшей мере одним нереаранжированным генным сегментом hJλ. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один нереаранжированный генный сегмент hJλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ4, Jλ5, Jλ6, Jλ7 и их комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов hVλ выбраны из генного сегмента hVλ 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-11, 3-12, 2-14, 3-16, 2-18, 3-19, 3-21, 3-22, 2-23, 3-25, 3-27, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 5-48, 9-49, 1-50, 1-51, 5-52 и их комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления по меньшей мере один нереаранжированный генный сегмент hJλ выбран из Jλ1, Jλ2, Jλ3, Jλ7 и их комбинации.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь,

которая содержит последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека, расположенную на эндогенном локусе к легкой цепи мыши.

Согласно одному варианту осуществления последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека находится на эндогенном локусе к легкой цепи мыши, который содержит генный сегмент hVλ и Jλ, и последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека расположена между генными сегментами hVλ и hJλ. Согласно конкретному варианту осуществления генные сегменты hVλ и hJλ способны к рекомбинации для образования функционального варибельного домена λ легкой цепи человека у мыши.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрена мышь, которая содержит множество hVλ и один или несколько hJλ, и последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека расположена, относительно транскрипции, ниже проксимальной или наиболее 3' последовательности hVλ и выше или 5' от первой последовательности hJλ.

Согласно одному варианту осуществления межгенная область Vκ-Jκ человека представляет собой область, расположенную приблизительно 130 п.н. ниже или 3' от генного сегмента Vκ4-1 человека, приблизительно 130 п.н. ниже от 3' нетранслируемой области генного сегмента Vκ4-1 человека, и охватывает приблизительно 600 п.н. выше или 5' от генного сегмента Jκ1 человека. Согласно конкретному варианту осуществления размер межгенной области Vκ-Jκ человека составляет приблизительно 22,8 т.п.н.

Согласно одному варианту осуществления межгенная область Vκ-Jκ приблизительно на 90% или более, на 91% или более, на 92% или более, на 93% или более, на 94% или более или приблизительно на 95% или более идентична межгенной области Vκ-Jκ человека, продолжающейся от конца 3' нетранслируемой области генного сегмента Vκ4-1 человека до приблизительно 600 п.н. выше генного сегмента Jκ1 человека.

Согласно одному варианту осуществления межгенная область Vκ-Jκ содержит SEQ ID NO: 158. Согласно конкретному варианту осуществления межгенная область Vκ-Jκ содержит функциональный фрагмент SEQ ID NO: 158. Согласно конкретному варианту осуществления межгенная область Vκ-Jκ представляет собой SEQ ID NO: 158.

Согласно одному аспекту предусмотрено отличное от человека животное, не относящаяся к человеку клетка (например, ES клетка или плюрипотентная клетка), не относящийся к человеку зародыш или не относящаяся к человеку ткань, которые содержат указанную последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека, причем последовательность межгенная область является эктопической. Согласно конкретному варианту осуществления эктопическая последовательность расположена на гуманизированном эндогенном не относящемся к человеку локусе иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное выбрано из мыши, крысы, хомяка, козы, коровы, овцы и отличного от человека примата.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструктор нуклеиновой кислоты, который содержит указанную последовательность межгенной области Vκ-Jκ человека. Согласно одному варианту осуществления конструктор нуклеиновой кислоты содержит нацеливающие плечи для нацеливания последовательности межгенной области Vκ-Jκ человека на локус легкой цепи мыши. Согласно конкретному варианту осуществления локус легкой цепи мыши представляет собой локус κ. Согласно конкретному варианту осуществления нацеливающие плечи нацеливают межгенную область Vκ-Jκ человека на модифицированный эндогенный локус κ мыши, причем нацеливание происходит в положение между последовательностью hVλ и последовательностью hJλ.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, причем мышь содержит не более двух аллелей легкой цепи, причем аллели легкой цепи содержат (а) нереаранжированный генный сегмент Vλ и Jλ иммуноглобулина человека

на эндогенном локусе легкой цепи мыши, который содержит ген C_L мыши; и (b) нереаранжированный генный сегмент V_L и J_L иммуноглобулина на эндогенном локусе легкой цепи мыши, который содержит ген C_L мыши.

Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус κ . Согласно другому варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи мыши представляет собой локус λ .

Согласно одному варианту осуществления не более двух аллелей легкой цепи выбраны из аллеля κ и аллеля λ , двух аллелей κ и двух аллелей λ . Согласно конкретному варианту осуществления один из двух аллелей легкой цепи представляет собой аллель λ , который содержит ген $C\lambda 2$.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит один функциональный локус легкой цепи иммуноглобулина и один нефункциональный локус легкой цепи, причем функциональный локус легкой цепи содержит нереаранжированный генный сегмент $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина человека на эндогенном локусе κ легкой цепи мыши, который содержит ген $C\kappa$ мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит один функциональный локус легкой цепи иммуноглобулина и один нефункциональный локус легкой цепи, причем функциональный локус легкой цепи содержит нереаранжированный генный сегмент $V\lambda$ и $J\lambda$ иммуноглобулина человека на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши, который содержит ген $C\lambda$ мыши. Согласно одному варианту осуществления ген $C\lambda$ представляет собой $C\lambda 2$. Согласно конкретному варианту осуществления ген $C\lambda$ мыши по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен $C\lambda 2$ мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит по меньшей мере один аллель тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один аллель тяжелой цепи иммуноглобулина содержит генный сегмент V_H человека, генный сегмент D_H человека и генный сегмент J_H человека на эндогенном локусе тяжелой цепи мыши, который содержит ген тяжелой цепи человека, который экспрессирует относящуюся к человеку/мышь тяжелую цепь. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит два аллеля тяжелой цепи иммуноглобулина, и мышь экспрессирует относящуюся к человеку/мышь тяжелую цепь.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит первый аллель легкой цепи, который содержит нереаранжированный $hV\lambda$ и нереаранжированный $hJ\lambda$, на эндогенном локусе κ мыши, который содержит эндогенный ген $C\kappa$; и второй аллель легкой цепи, который содержит нереаранжированный $hV\lambda$ и нереаранжированный $hJ\lambda$, на эндогенном локусе κ мыши, который содержит эндогенный ген $C\kappa$. Согласно конкретному варианту осуществления первый и второй аллели легкой цепи представляют собой только функциональные аллели легкой цепи генетически модифицированной мыши. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит нефункциональный локус λ . Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированная мышь не экспрессирует легкую цепь, которая содержит константную область λ .

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит первый аллель легкой цепи, который содержит нереаранжированный $hV\lambda$ и нереаранжированный $hJ\lambda$, на эндогенном локусе κ мыши, который содержит эндогенный ген $C\kappa$; и второй аллель

легкой цепи, который содержит нереаранжированный hV λ и нереаранжированный hJ λ , на эндогенном локусе λ мыши, который содержит эндогенный ген C λ . Согласно конкретному варианту осуществления первый и второй аллели легкой цепи представляют собой только функциональные аллели легкой цепи генетически модифицированной мыши. Согласно одному варианту осуществления эндогенный ген C λ представляет собой C λ 2. Согласно конкретному варианту осуществления ген C λ мыши по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен C λ 2 мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит шесть аллелей иммуноглобулина, причем первый аллель содержит нереаранжированный генный сегмент V λ и J λ иммуноглобулина на эндогенном локусе к легкой цепи мыши, который содержит ген C κ мыши, второй содержит нереаранжированный генный сегмент V κ и J κ иммуноглобулина на эндогенном локусе к легкой цепи мыши, который содержит ген C κ мыши, третий содержит нереаранжированный генный сегмент V λ и J λ иммуноглобулина на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши, который содержит ген C λ мыши, каждый из четвертого и пятого независимо содержат нереаранжированный генный сегмент V H и D H и J H на эндогенном локусе тяжелой цепи мыши, который содержит ген тяжелой цепи мыши, и шестой содержит или (а) нереаранжированный генный сегмент V λ и J λ иммуноглобулина на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши, который содержит ген C λ мыши, (b) локус λ , который является нефункциональным, или (c) полную или частичную делецию локуса λ .

Согласно одному варианту осуществления первый аллель содержит нереаранжированный hV λ и hJ λ . Согласно одному варианту осуществления второй аллель содержит нереаранжированный hV κ и hJ κ . Согласно одному варианту осуществления третий аллель содержит нереаранжированный hV λ и hJ λ . Согласно одному варианту осуществления каждый из четвертого и пятого независимо содержат нереаранжированный hV H и hD H и hJ H . Согласно одному варианту осуществления шестой аллель содержит эндогенный локус λ мыши, который полностью или частично удаляют.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит шесть аллелей иммуноглобулина, причем первый аллель содержит нереаранжированный генный сегмент V λ и J λ иммуноглобулина на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши, который содержит ген C λ мыши, второй содержит нереаранжированный генный сегмент V λ и J λ иммуноглобулина на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши, который содержит ген C λ мыши, третий содержит нереаранжированный генный сегмент V κ и J κ иммуноглобулина на эндогенном локусе к легкой цепи мыши, который содержит ген C κ мыши, каждый из четвертого и пятого независимо содержат нереаранжированный генный сегмент V H и D H и J H на эндогенном локусе тяжелой цепи мыши, который содержит ген тяжелой цепи мыши, и шестой содержит или (а) нереаранжированный генный сегмент V κ и J κ иммуноглобулина на эндогенном локусе к легкой цепи мыши, который содержит ген C κ мыши, (b) локус κ , который является нефункциональным, или (c) делецию одного или нескольких элементов локуса κ .

Согласно одному варианту осуществления первый аллель содержит нереаранжированный генный сегмент hV λ и hJ λ . Согласно одному варианту осуществления второй аллель содержит нереаранжированный генный сегмент hV λ и hJ λ . Согласно одному варианту осуществления третий аллель содержит нереаранжированный генный сегмент hV κ и hJ κ . Согласно одному варианту

осуществления каждый из четвертого и пятого независимо содержат
 ререаранжированный генный сегмент hV_H и hD_H и hJ_H . Согласно одному варианту
 осуществления шестой аллель содержит эндогенный локус κ мыши, который является
 функционально выключенным.

5 Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированная мышь
 содержит В-клетку, которая содержит ререаранжированный ген антитела, содержащий
 ререаранжированный домен hV_L , функционально связанный с доменом C_L мыши. Согласно
 одному варианту осуществления домен C_L мыши выбран из домена C_{κ} мыши и домена
 10 C_L мыши. Согласно конкретному варианту осуществления домен C_L мыши происходит
 из гена C_{L2} . Согласно конкретному варианту осуществления домен C_L мыши происходит
 из домена C_L , который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей
 мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере
 на 98% идентичен C_{L2} мыши.

15 Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь,
 которая экспрессирует область V_L на C_L , которая представляет собой C_{κ} . Согласно
 одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, которая
 экспрессирует область hV_L на C_L , выбранной из C_{κ} человека, C_L человека или C_{κ} мыши.
 Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, которая
 20 экспрессирует область hV_L на C_{κ} мыши.

Согласно одному варианту осуществления приблизительно 10-50% спленоцитов
 мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), из которых
 приблизительно 9-28% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую
 домен hV_L , слитый с доменом C_{κ} мыши.

25 Согласно конкретному варианту осуществления приблизительно 23-34% спленоцитов
 мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), из которых
 приблизительно 9-11% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую
 домен hV_L , слитый с доменом C_{κ} мыши.

Согласно конкретному варианту осуществления приблизительно 19-31% спленоцитов
 30 мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), которых 9-17%
 экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hV_L , слитый с
 доменом C_{κ} мыши.

Согласно конкретному варианту осуществления приблизительно 21-38% спленоцитов
 мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), из которых
 35 приблизительно 24-27% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую
 домен hV_L , слитый с доменом C_{κ} мыши.

Согласно конкретному варианту осуществления приблизительно 10-14% спленоцитов
 мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), из которых
 приблизительно 9-13% экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую
 40 домен hV_L , слитый с доменом C_{κ} мыши.

Согласно конкретному варианту осуществления приблизительно 31-48% спленоцитов
 мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), из которых
 приблизительно 15-21% из них экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина,
 содержащую домен hV_L , слитый с доменом C_{κ} мыши. Согласно конкретному варианту
 45 осуществления приблизительно 30-38% спленоцитов мыши представляют собой В-
 клетки (т.е. CD19-положительные), из которых приблизительно 33-48% экспрессируют
 легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hV_L , слитый с доменом C_{κ} мыши.

Согласно одному варианту осуществления приблизительно 52-70% клеток костного

мозга мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), из которых приблизительно 31-47% незрелых В-клеток (т.е. CD19-положительных/B220-промежуточных положительных/IgM-положительных) экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hV λ , слитый с доменом С κ мыши.

5 Согласно одному варианту осуществления приблизительно 60% клеток костного мозга мыши представляют собой В-клетки (т.е. CD19-положительные), из которых приблизительно 38,3% незрелых В-клеток (т.е. CD19-положительных/B220-промежуточных положительных/IgM-положительных) экспрессируют легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен hV λ , слитый с доменом С κ мыши.

10 Согласно одному варианту осуществления мышь экспрессирует антитело, содержащее легкую цепь, которая содержит вариабельный домен, происходящий из генного сегмента V человека и J человека, и константный домен, происходящий из гена константной области мыши. Согласно одному варианту осуществления ген константной области мыши представляет собой ген С κ . Согласно другому варианту осуществления ген константной области мыши представляет собой ген С λ . Согласно конкретному варианту осуществления область С λ представляет собой С λ 2. Согласно конкретному варианту осуществления ген С λ мыши происходит из гена С λ , который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен С λ 2 мыши. Согласно конкретному варианту осуществления антитело дополнительно содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен, происходящий из генного сегмента V человека, D человека и J человека, и константный домен тяжелой цепи, происходящий из гена константной области тяжелой цепи мыши. Согласно одному варианту осуществления ген константной области тяжелой цепи мыши содержит последовательность шарнир-С H 2-С H 3

25 константного домена тяжелой цепи. Согласно другому варианту осуществления ген константной области тяжелой цепи мыши содержит последовательность С H 1-шарнир-С H 2-С H 3 константного домена тяжелой цепи. Согласно другому варианту осуществления ген константной области тяжелой цепи мыши содержит последовательность С H 1-С H 2-С H 3-С H 4 константного домена тяжелой цепи. Согласно другому варианту осуществления ген константной области тяжелой цепи мыши содержит последовательность С H 2-С H 3-С H 4 константного домена тяжелой цепи.

30

Согласно одному варианту осуществления мышь экспрессирует антитело, содержащее легкую цепь, которая содержит реаранжированную последовательность V λ -J λ человека

35 и последовательность С κ мыши. Согласно одному варианту осуществления реаранжированная последовательность V λ -J λ человека происходит из реаранжировки генных сегментов hV λ , выбранных из генного сегмента 3-1, 4-3, 2-8, 3-9, 3-10, 2-14, 3-19, 2-23, 3-25, 1-40, 7-43, 1-44, 5-45, 7-46, 1-47, 9-49 и 1-51. Согласно одному варианту осуществления реаранжированная последовательность V λ -J λ человека происходит из

40 реаранжировки генных сегментов hJ λ , выбранных из генного сегмента J λ 1, J λ 2, J λ 3 и J λ 7.

Согласно одному варианту осуществления мышь экспрессирует антитело, содержащее легкую цепь, которая содержит реаранжированную вариабельную область λ легкой цепи иммуноглобулина, содержащую последовательность V λ /J λ человека выбранная

45 из 3-1/1, 3-1/7, 4-3/1, 4-3/7, 2-8/1, 3-9/1, 3-10/1, 3-10/3, 3-10/7, 2-14/1, 3-19/1, 2-23/1, 3-25/1, 1-40/1, 1-40/2, 1-40/3, 1-40/7, 7-43/1, 7-43/3, 1-44/1, 1-44/7, 5-45/1, 5-45/2, 5-45/7, 7-46/1, 7-46/2, 7-46/7, 9-49/1, 9-49/2, 9-49/7 и 1-51/1. Согласно конкретному варианту осуществления В-клетка экспрессирует антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи

иммуноглобулина человека, слитый с константным доменом тяжелой цепи мыши, и переменный домен λ легкой цепи иммуноглобулина человека, слитый с константным доменом κ легкой цепи мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена мышь, которая экспрессирует антитело, содержащее (а) тяжелую цепь, содержащую переменный домен тяжелой цепи, происходящий из неаранжированного генного сегмента переменной области тяжелой цепи человека, причем переменный домен тяжелой цепи слит с константной (C_H) областью тяжелой цепи мыши; и (б) легкую цепь, содержащую переменный домен легкой цепи, происходящий из неаранжированного $hV\lambda$ и $hJ\lambda$, причем переменный домен легкой цепи слит с областью C_L мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит (i) локус тяжелой цепи, который содержит замещение всех или по существу всех функциональных эндогенных генных сегментов V, D и J мыши всеми или по существу всеми функциональными генными сегментами V, D и J человека, ген C_H мыши, (ii) первый локус κ легкой цепи, содержащий замещение всех или по существу всех функциональных эндогенных генных сегментов V_k и J_k мыши всеми, по существу всеми или множеством функциональных генных сегментов $hV\lambda$ и $hJ\lambda$, и ген C_L мыши, (iii) второй локус λ легкой цепи, содержащий замещение всех или по существу всех функциональных эндогенных генных сегментов V_k и J_k мыши всеми, по существу всеми или множеством функциональных генных сегментов hV_k и hJ_k , и ген C_k мыши. Согласно одному варианту осуществления мышь не экспрессирует антитело, которое содержит область C_L . Согласно одному варианту осуществления мышь содержит делецию гена C_L и/или генного сегмента $V\lambda$ и/или $J\lambda$. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит нефункциональный локус λ легкой цепи. Согласно конкретному варианту осуществления локус λ легкой цепи удаляют полностью или частично.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит (i) локус тяжелой цепи, который содержит замещение всех или по существу всех функциональных эндогенных генных сегментов V, D и J мыши всеми или по существу всеми функциональными генными сегментами V, D и J человека, ген C_H мыши, (ii) первый локус λ легкой цепи, содержащий замещение всех или по существу всех функциональных эндогенных генных сегментов $V\lambda$ и $J\lambda$ мыши всеми, по существу всеми или множеством функциональных генных сегментов $hV\lambda$ и $hJ\lambda$, и ген C_L мыши, (iii) второй локус λ легкой цепи, содержащий замещение всех или по существу всех функциональных эндогенных генных сегментов $V\lambda$ и $J\lambda$ мыши всеми, по существу всеми или множеством функциональных генных сегментов $hV\lambda$ и $hJ\lambda$, и ген C_L мыши. Согласно конкретному варианту осуществления ген C_L мыши представляет собой C_{L2} . Согласно конкретному варианту осуществления ген C_L мыши происходит из гена C_L , который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен C_{L2} мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит делецию гена C_k и/или генного сегмента V_k и/или J_k . Согласно одному варианту осуществления мышь содержит нефункциональный локус κ легкой цепи.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, которая экспрессирует антитело, причем больше чем 10%, больше чем 15%, больше чем 20%, больше чем 25%, больше чем 30%, больше чем 35%, больше чем 40%, больше чем 60%, больше чем 70%, больше чем 80% или более чем 90% от общего количества производимых мышью антител IgG содержит происходящий из λ переменный домен,

и причем мышь экспрессирует антитела, содержащие происходящий из λ переменный домен, слитый с областью С_к мышь. Согласно конкретным вариантам осуществления приблизительно 15-40%, 20-40%, 25-40%, 30-40% или 35-40% от общего количества производимого мышью антитела содержит происходящий из λ переменный домен.

5 Согласно одному варианту осуществления происходящий из λ переменный домен происходит из hV λ и hJ λ . Согласно одному варианту осуществления происходящий из λ переменный домен находится в легкой цепи, которая содержит область С_к мышь. Согласно конкретному варианту осуществления происходящий из λ переменные область находится в легкой цепи, которая содержит область С_л мышь. Согласно другому конкретному варианту осуществления область С_л представляет собой область С_{л2}.
10 Согласно одному варианту осуществления происходящий из λ переменный домен происходит из hV_к и hJ_к, и согласно конкретному варианту осуществления находится в легкой цепи, которая содержит область С_к мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, который
15 содержит вышележащее гомологичное плечо и нижележащее гомологичное плечо, причем вышележащее и нижележащее гомологичные плечи нацеливают конструкт на λ locus мышь, и конструкт содержит функциональный ререаранжированный сегмент hV λ и функциональный ререаранжированный сегмент hJ λ , и селективную или маркерную последовательность.

20 Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, нацеливающее плечо для нацеливания последовательности λ мышь выше V λ 2 мышь, кассету селекции, фланкированной 5' и 3' сайтами распознавания рекомбиназы, и нацеливающее плечо для нацеливания последовательности λ мышь 3' по отношению к J λ 2 мышь. Согласно
25 одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой фланкированную F_{rt} кассету Hyg-ТК. Согласно одному варианту осуществления 3' нацеливающее плечо содержит С_{л2}, J λ 4, С_{л4} мышь, и энхансер 2.4 мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, нацеливающие плечо для
30 нацеливания локуса λ мышь 5' по отношению к V λ 1, кассету селекции, фланкированной 5' и 3' сайтами распознавания рекомбиназы, и 3' нацеливающие плечо для нацеливания последовательности λ мышь 3' по отношению к мышь С_{л1}. Согласно одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой фланкированную lox кассету неомицина. Согласно одному варианту осуществления 3' нацеливающее плечо содержит
35 энхансер λ 3' мышь и λ 3' энхансер 3.1 мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции нацеливающее плечо для нацеливания локуса λ мышь 5' по отношению к V λ 2, кассету селекции, фланкированной 5' и 3' сайтами распознавания рекомбиназы, и 3' нацеливающее плечо для нацеливания
40 последовательности λ мышь 3' по отношению к J λ 2 мышь и 5' по отношению к С_{л2} мышь. Согласно одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой фланкированную F_{rt} кассету гигромицина-ТК. Согласно одному варианту осуществления 3' нацеливающее плечо содержит генные сегменты С_{л2}-J λ 4-С_{л4} мышь и λ энхансер 2.4 мышь.

45 Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, нацеливающее плечо для нацеливания локуса λ мышь 5' по отношению к V λ 2, кассету селекции, фланкированную 5' и 3' сайтами распознавания рекомбиназы, геномный фрагмент человека, содержащий

смежную область локуса λ легкой цепи человека из hV λ 3-12 ниже по отношению к концу hJ λ 1 и 3' нацеливающее плечо для нацеливания последовательности λ мыши 3' по отношению к J λ 2 мыши. Согласно одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой фланкированную Frt кассету неомицина. Согласно одному варианту осуществления 3' нацеливающее плечо содержит генные сегменты C λ 2-J λ 4-C λ 4 мыши и λ энхансер 2.4 мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий смежную область локуса λ легкой цепи человека из hV λ 3-12 ниже по отношению к концу hJ λ 1.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, нацеливающее плечо для нацеливания локуса λ мыши 5' по отношению к V λ 2, кассету селекции, фланкированную 5' и 3' сайтами распознавания рекомбиназы, и геномный фрагмент человека, содержащий смежную область локуса λ легкой цепи человека из hV λ 3-27 ниже по отношению к концу hV λ 2-8. Согласно одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой фланкированную Frt кассету гигромицина. Согласно одному варианту осуществления геномный фрагмент человека содержит 3' нацеливающее плечо. Согласно конкретному варианту осуществления 3' нацеливающее плечо содержит приблизительно 53 т.п.н. локуса λ легкой цепи человека из hV λ 3-12 ниже по отношению к концу hV λ 2-8.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий смежную область локуса λ легкой цепи человека из hV λ 3-27 ниже по отношению к концу hV λ 3-12.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, нацеливающее плечо для нацеливания локуса λ мыши 5' по отношению к V λ 2, кассету селекции, фланкированную 5' и 3' сайтами распознавания рекомбиназы, первый геномный фрагмент человека, содержащий смежную область локуса λ легкой цепи человека из hV λ 5-52 ниже по отношению к концу hV λ 1-40, сайт фермента рестрикции и второй геномный фрагмент человека, содержащий смежную область локуса λ легкой цепи человека из hV λ 3-29 ниже по отношению к концу hV λ 82K. Согласно одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой фланкированную Frt кассету неомицина. Согласно одному варианту осуществления сайт фермента рестрикции представляет собой сайт хоминг-эндонуклеазы. Согласно конкретному варианту осуществления хоминг-эндонуклеаза представляет собой PI-SceI. Согласно одному варианту осуществления второй геномный фрагмент человека представляет собой 3' нацеливающее плечо. Согласно конкретному варианту осуществления 3' нацеливающее плечо содержит приблизительно 27 т.п.н. локуса λ легкой цепи человека из hV λ 3-29 ниже по отношению к концу hV λ 82K.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий смежную область локуса λ легкой цепи человека из hV λ 5-52 ниже по отношению к концу hV λ 1-40.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, нацеливающее плечо для нацеливания локуса κ мыши 5' по отношению к эндогенным генным сегментам V κ , два расположенных рядом сайта распознавания рекомбиназы, кассету селекции 3' по отношению к расположенным рядом сайтам распознавания рекомбиназы и 3' нацеливающее плечо для нацеливания последовательности κ мыши 5' по отношению к переменным генным сегментам κ легкой цепи. Согласно одному варианту осуществления расположенные рядом сайты распознавания рекомбиназы находятся в

противоположной ориентации по отношению друг к другу. Согласно конкретному варианту осуществления сайты распознавания рекомбиназы являются различными. Согласно другому конкретному варианту осуществления сайты распознавания рекомбиназы представляет собой сайт *loxP* и сайт *lox511*. Согласно одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой кассету неомицина.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, нацеливающее плечо для нацеливания локуса к мыши 5' по отношению к генным сегментам *Jκ* мыши, кассету селекции, сайт распознавания рекомбиназы 3' по отношению к кассете селекции и 3' нацеливающее плечо для нацеливания последовательности к мыши 3' по отношению к генным сегментам *Jκ* мыши и 5' по отношению к интронному энхансеру к мыши. Согласно одному варианту осуществления кассета селекции представляет собой кассету гигромицина-ТК. Согласно одному варианту осуществления сайт распознавания рекомбиназы расположен в том же направлении относительно транскрипции, что и кассета селекции. Согласно конкретному варианту осуществления сайт распознавания рекомбиназы представляет собой сайт *loxP*.

Согласно одному аспекту предусмотрен выделенный конструкт ДНК, содержащий, в направлении 5'-3' относительно направления транскрипции, первый геномный фрагмент мыши, содержащий последовательность 5' от эндогенных генных сегментов *Vκ* мыши, первый сайт распознавания рекомбиназы, второй сайт распознавания рекомбиназы и второй геномный фрагмент мыши, содержащий последовательность 3' от эндогенных генных сегментов *Jκ* мыши и 5' от интронного энхансера к мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена генетически модифицированная мышь, причем генетическая модификация предусматривает модификацию с помощью одного или нескольких описанных выше или в настоящем документе конструктов ДНК.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение выделенного конструкта ДНК для получения описанной в настоящем документе мыши. Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанного в настоящем документе выделенного конструкта ДНК в способе получения антигенсвязывающего белка.

Согласно одному аспекту предусмотрена не относящаяся к человеку стволовая клетка, которая содержит нацеливающий вектор, который содержит описанный выше и в настоящем документе ДНК конструкт. Согласно одному аспекту предусмотрена не относящаяся к человеку стволовая клетка, причем не относящаяся к человеку стволовая клетка происходит от описанной в настоящем документе мыши.

Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую (ES) клетку. Согласно конкретному варианту осуществления ES клетка представляет собой ES клетку мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе не относящейся к человеку стволовой клетки для получения описанной в настоящем документе мыши. Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе не относящейся к человеку стволовой клетки для получения антигенсвязывающего белка.

Согласно одному аспекту предусмотрен зародыш мыши, причем зародыш мыши содержит предусмотренную в настоящем документе генетическую модификацию.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен зародыш мыши-хозяин, который содержит донорную ES клетку, причем донорная ES клетка содержит описанную в настоящем документе генетическую модификацию. Согласно одному варианту осуществления зародыш мыши представляет собой зародыш на стадии пре-

морулы. Согласно конкретному варианту осуществления зародыш на стадии преморулы представляет собой зародыш на стадии 4 клеток или зародыш на стадии 8 клеток. Согласно другому конкретному варианту осуществления зародыш мыши представляет собой бластоцисту.

5 Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанного в настоящем документе зародыша мыши для получения описанной в настоящем документе мыши. Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанного в настоящем документе зародыша мыши для получения антигенсвязывающего белка.

10 Согласно одному аспекту предусмотрена не относящаяся к человеку клетка, причем не относящаяся к человеку клетка содержит реаранжированную последовательность гена легкой цепи иммуноглобулина, происходящую от описанной в настоящем документе генетически модифицированной мыши. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой В-клетку. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой гибридому. Согласно одному варианту осуществления клетка кодирует вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина и/или вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который является соматически мутированным.

15 Согласно одному аспекту предусмотрена не относящаяся к человеку клетка, причем не относящаяся к человеку клетка содержит реаранжированную последовательность гена легкой цепи иммуноглобулина, происходящую от описанной в настоящем документе генетически модифицированной мыши. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой В-клетку. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой гибридому. Согласно одному варианту осуществления клетка кодирует вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина и/или вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который является соматически мутированным.

20 Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе не относящейся к человеку клетки для получения описанного в настоящем документе отличного от человека животного. Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанной в настоящем документе не относящейся к человеку клетки для получения антигенсвязывающего белка. Согласно одному варианту осуществления 25 отличное от человека животное выбрано из мыши, крысы, хомяка, овцы, козы, коровы и отличного от человека примата.

Согласно одному аспекту предусмотрена В-клетка мыши, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит (а) вариабельную область, происходящую из генного сегмента $hV\lambda$ и генного сегмента $hJ\lambda$; и (б) ген C_L мыши.

35 Согласно одному варианту осуществления ген C_L мыши выбран из гена Sc и Sl .

Согласно конкретному варианту осуществления ген Sl представляет собой $Sl2$. Согласно конкретному варианту осуществления ген Sl мыши происходит из гена Sl , который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% 40 идентичен $Sl2$ мыши. Согласно одному варианту осуществления В-клетка мыши дополнительно экспрессирует когнатную тяжелую цепь, которая содержит (с) вариабельную область, происходящую из hV_H , hD_H и (d) сегмент hJ_H . Согласно одному варианту осуществления В-клетка не содержит реаранжированный ген λ . Согласно другому варианту осуществления В-клетка не содержит реаранжированный ген κ .

45 Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения антитела в генетически модифицированном отличном от человека животном, предусматривающий: (а) воздействие на генетически модифицированное отличное от человека животное антигена,

причем животное содержит геном, содержащий по меньшей мере один $hV\lambda$ и по меньшей мере один $hJ\lambda$ на эндогенном локусе легкой цепи, причем эндогенный локус легкой цепи содержит не относящийся к человеку ген C_L ; (b) предоставление возможности генетически модифицированному животному развивать иммунный ответ на антиген; и (c) выделение из животного согласно (b) антитела, которое специфически распознает антиген, или выделение из животного согласно (b) клетки, содержащей домен иммуноглобулина, который специфически распознает антиген, причем антитело содержит легкую цепь, происходящую из $hV\lambda$, $hJ\lambda$ и гена C_L животного. Согласно конкретному варианту осуществления не относящийся к человеку ген C_L представляет собой ген C_k мыши. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное выбрано из мыши, крысы, хомяка, кролика, овцы, козы, коровы и отличного от человека примата.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения антитела в генетически модифицированном отличном от человека животном, предусматривающий: (a) воздействие на генетически модифицированного животного антигена, причем животное содержит геном, содержащий по меньшей мере один $hV\lambda$ на эндогенном локусе k и по меньшей мере один $hJ\lambda$ на локусе k , причем локус k содержит не относящийся к человеку ген C_k ; (b) предоставление возможности генетически модифицированному животному развивать иммунный ответ на антиген; и (c) выделение из животного согласно (b) антитела, которое специфически распознает антиген, или выделение из мыши согласно (b) клетки, содержащей домен иммуноглобулина, который специфически распознает антиген, причем антитело содержит легкую цепь, происходящую из $hV\lambda$, $hJ\lambda$ и не относящегося к человеку гена C_k .

Согласно одному варианту осуществления константный ген k легкой цепи выбран из гена C_k человека и гена C_k мыши.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения антитела в генетически модифицированном отличном от человека животном, предусматривающий: (a) воздействие на генетически модифицированного отличного от человека животного антигена, причем животное содержит геном, содержащий по меньшей мере один $hV\lambda$ на локусе λ легкой цепи и по меньшей мере один $J\lambda$ на локусе λ легкой цепи, причем локус λ легкой цепи содержит не относящийся к человеку ген C_λ ; (b) предоставление возможности генетически модифицированному животному развивать иммунный ответ на антиген; и (c) выделение из животного согласно (b) антитела, которое специфически распознает антиген, или выделение из животного согласно (b) клетки, содержащей домен иммуноглобулина, который специфически распознает антиген, или идентификацию в животном согласно (b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариативный домен тяжелой и/или легкой цепи, который связывает антиген, причем антитело содержит легкую цепь, происходящую из $hV\lambda$, $hJ\lambda$ и не относящегося к человеку гена C_λ . Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное выбрано из мыши, крысы, хомяка, овцы, козы, коровы и отличного от человека примата.

Согласно одному варианту осуществления константный ген λ легкой цепи выбран из гена C_λ человека и не относящегося к человеку гена C_λ . Согласно одному варианту осуществления константный ген λ легкой цепи представляет собой ген C_λ человека. Согласно конкретному варианту осуществления ген C_λ человека выбран из $C_{\lambda 1}$, $C_{\lambda 2}$, $C_{\lambda 3}$ и $C_{\lambda 7}$. Согласно одному варианту осуществления константный ген λ легкой цепи

представляет собой ген Сλ мыши или крысы. Согласно конкретному варианту осуществления ген Сλ мыши выбран из Сλ1, Сλ2 и Сλ3. Согласно более конкретному варианту осуществления ген Сλ мыши представляет собой Сλ2. Согласно другому конкретному варианту осуществления ген Сλ мыши происходит из гена Сλ, который

5 по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен Сλ2 мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения реаранжированного гена антитела в генетически модифицированном отличном от человека животном,

10 предусматривающий: (а) воздействие на генетически модифицированное отличное от человека животное антигена, причем генетическая модификация предусматривает hVλ и hJλ на эндогенном локусе легкой цепи, причем эндогенный локус легкой цепи содержит не относящийся к человеку ген С_L или его функциональный фрагмент; и (b)

15 идентификацию реаранжированного гена иммуноглобулина у указанного отличного от человека животного, причем реаранжированный ген иммуноглобулина содержит генный сегмент варибельной области λ легкой цепи и ген С_L или его функциональный фрагмент.

Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей варибельную

20 область тяжелой и/или легкой цепи из животного, причем варибельная область тяжелой и/или легкой цепи происходит из антитела, которое содержит Vλ человека и С_L мыши.

Согласно одному варианту осуществления ген С_L мыши или его функциональный фрагмент выбран из гена С_L человека и гена С_L мыши или его функционального

25 фрагмента.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения реаранжированного гена антитела в генетически модифицированном отличном от человека животном, предусматривающий: (а) воздействие на генетически модифицированное отличное от человека животное антигена, причем генетическая

30 модификация предусматривает hVλ и hJλ на локусе к легкой цепи, причем локус к легкой цепи содержит не относящийся к человеку ген С_κ или его функциональный фрагмент; и (b) идентификацию реаранжированного гена иммуноглобулина у указанного животного, причем реаранжированный ген иммуноглобулина содержит генный сегмент варибельной области λ легкой цепи и ген С_κ или его функциональный фрагмент.

35 Согласно одному варианту осуществления константный ген к легкой цепи или его функциональный фрагмент выбран из гена С_κ человека и не относящегося к человеку (например, относящегося к мыши или крысе) гена С_κ или его функционального фрагмента.

Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей варибельную

40 область тяжелой и/или легкой цепи из животного, причем варибельная область тяжелой и/или легкой цепи происходит из антитела, которое содержит Vλ человека и не относящийся к человеку (например, относящийся мыши или крысе) С_κ.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения реаранжированного гена антитела в генетически модифицированном отличном от человека животном, предусматривающий: (а) воздействие на генетически модифицированное отличное от человека животное антигена, причем генетическая

45 модификация предусматривает hVλ и hJλ на не относящемся к человеку локусе λ легкой

цепи, причем локус λ легкой цепи содержит не относящийся к человеку ген $C\lambda$ или его функциональный фрагмент; и (b) идентификацию реаранжированного гена иммуноглобулина у указанного животного, причем реаранжированный ген иммуноглобулина содержит генный сегмент варибельной области λ легкой цепи и $C\lambda$ ген или его функциональный фрагмент.

Согласно одному варианту осуществления константный ген λ легкой цепи или его функциональный фрагмент выбран из гена $C\lambda$ человека и гена $C\lambda$ мыши или крысы, или его функционального фрагмента. Согласно конкретному варианту осуществления константный ген λ легкой цепи представляет собой ген $C\lambda$ мыши или крысы или его функциональный фрагмент.

Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает клонирование кодирующей варибельную область тяжелой и/или легкой цепи последовательности нуклеиновой кислоты из животного, причем варибельная область тяжелой и/или легкой цепи происходит из антитела, которое содержит $V\lambda$ человека и не относящийся к человеку (например, относящийся к мыши или крысе) Sc .

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения антитела, предусматривающий воздействие на описанное в настоящем документе отличное от человека животное антигена, предоставление возможности животному развить иммунный ответ, который включает в себя создание антитела, которое специфически связывает антиген, идентификацию реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты у животного, которая кодирует тяжелую цепь, и реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты у животного, которая кодирует когнатную последовательность варибельного домена легкой цепи антитела, причем антитело специфически связывает антиген, и применение последовательностей нуклеиновой кислоты варибельных доменов тяжелой и легкой цепи, слитых с константными доменами человека для получения требуемого антитела, причем требуемое антитело содержит легкую цепь, которая содержит домен $V\lambda$, слитый с домен C_L . Согласно одному варианту осуществления домен $V\lambda$ представляет собой домен человека и домен C_L представляет собой домен $C\lambda$ человека или мыши или крысы. Согласно одному варианту осуществления домен $V\lambda$ представляет собой домен мыши или крысы и домен C_L представляет собой домен Sc человека или мыши.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения антитела, предусматривающий воздействие на описанное в настоящем документе отличное от человека животное антигена, предоставление возможности животному развить иммунный ответ, который предусматривает образование антитела, которое специфически связывает антиген, идентификацию реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты у мыши, которая кодирует тяжелую цепь, и реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты у животного, которая кодирует когнатную последовательность варибельного домена легкой цепи антитела, причем антитело специфически связывает антиген, и использование последовательностей нуклеиновой кислоты варибельных доменов тяжелой и легкой цепи, слитых с последовательностями нуклеиновой кислоты константных доменов человека, для получения требуемого антитела, причем требуемое антитело содержит легкую цепь, которая содержит домен $V\lambda$, слитый с доменом Sc .

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения антитела, предусматривающий воздействие на описанное в настоящем документе отличное от человека животное антигена, предоставление возможности животному развить

иммунный ответ, который предусматривает образование антитела, которое специфически связывает антиген, идентификацию реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты у животного, которая кодирует переменный домен тяжелой цепи, и реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует когнатную последовательность переменного домена легкой цепи антитела, причем антитело специфически связывает антиген, и использование последовательностей нуклеиновой кислоты, слитых с последовательностями нуклеиновой кислоты, которые кодируют константный домен тяжелой цепи человека и константный домен легкой цепи человека, для получения антитела, происходящего из последовательностей человека, причем антитело, которое специфически связывает антиген, содержит легкую цепь, которая содержит домен V_L человека, слитый с не относящейся к человеку (например, относящейся к мыши или крысе) областью C_L .

Согласно одному варианту осуществления область C_L относится к мыши и согласно одному варианту осуществления выбрана из C_{L1} , C_{L2} и C_{L3} . Согласно конкретному варианту осуществления область C_L мыши представляет собой C_{L2} .

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения реаранжированной последовательности гена переменной области легкой цепи антитела, предусматривающий (a) воздействие на описанное в настоящем документе отличное от человека животное антигена; (b) предоставление возможности животному развить иммунный ответ; (c) идентификацию клетки у животного, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует реаранжированную последовательность домена V_L человека, слитую с не относящимся к человеку доменом C_L , причем клетка также кодирует когнатную тяжелую цепь, содержащую домен V_H человека и не относящийся к человеку домен C_H , и причем клетка экспрессирует антитело, которое связывает антиген; (d) клонирование из клетки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей когнатный домен V_H человека; и (e) применение клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека, и клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей когнатный домен V_H человека, для получения полностью человеческого антитела.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное и не относящиеся к человеку домены выбраны из доменов мыши и крысы.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения реаранжированной последовательности гена переменной области легкой цепи антитела, предусматривающий (a) воздействие на описанное в настоящем раскрытии отличное от человека животное антигена; (b) предоставление возможности животному развить иммунный ответ; (c) идентификацию клетки у животного, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует реаранжированную последовательность домена V_L человека, смежную на той же молекуле нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей домен C_L отличного от человека животного, причем клетка также кодирует когнатную тяжелую цепь, содержащую домен V_H человека и домен C_H отличного от человека животного, и причем клетка экспрессирует антитело, которое связывает антиген; (d) клонирование из клетки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей когнатный домен V_H человека; и (e) применение клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека, и клонированной последовательности нуклеиновой кислоты,

кодирующей когнатный домен V_H человека, для получения полностью человеческого антитела.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ получения реаранжированной последовательности гена варибельной области легкой цепи антитела, предусматривающий (a) воздействие на описанное в настоящем документе отличное от человека животное антигена; (b) предоставление возможности животному развить иммунный ответ на антиген; (c) идентификацию клетки у животного, которая содержит ДНК, которая кодирует реаранжированную последовательность домена V_L человека, слитую с не относящимся к человеку доменом C_L животного, причем клетка также кодирует когнатную тяжелую цепь, содержащую домен V_H человека и не относящийся к человеку домен C_L животного, и причем клетка экспрессирует антитело, которое связывает антиген; (d) клонирование из клетки последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей реаранжированный домен V_L человека, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей когнатный домен V_H человека; и (e) применение клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен V_L человека, и клонированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей когнатный домен V_H человека, для получения полностью человеческого антитела.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь, и C_L домен представляет собой C_{L2} мыши. Согласно конкретному варианту осуществления домен C_L мыши происходит из гена C_L , который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен C_{L2} мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрено генетически модифицированное отличное от человека животное, которое экспрессирует происходящую из λ легкую цепь человека, слитую с эндогенной константной областью легкой цепи (C_L), причем животное, при иммунизации антигеном, производит антитело, содержащее домен V_L человека, слитый с не относящимся к человеку доменом C_L животного. Согласно одному варианту осуществления не относящийся к человеку домен C_L выбран из домена C_K и домена C_L . Согласно одному варианту осуществления домен C_L представляет собой домен C_K . Согласно одному варианту осуществления животное представляет собой мышь. Согласно одному варианту осуществления домен C_L мыши представляет собой домен C_L . Согласно конкретному варианту осуществления домен C_L представляет собой C_{L2} . Согласно конкретному варианту осуществления домен C_L мыши происходит из гена C_L , который по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен C_{L2} мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрено генетически модифицированное отличное от человека животное, содержащее описанный в настоящем документе модифицированный эндогенный локус к или λ легкой цепи, которое экспрессирует множество λ легких цепей иммуноглобулина, связанных с множеством тяжелых цепей иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления тяжелая цепь содержит последовательность человека. Согласно различным вариантам осуществления последовательность человека выбрана из варибельной последовательности, C_{H1} , шарнира, C_{H2} , C_{H3} и их комбинации. Согласно одному варианту осуществления множество λ легких цепей иммуноглобулина содержит последовательность человека. Согласно различным вариантам осуществления последовательность человека выбрана

из вариабельной последовательности, константной последовательности и их комбинации. Согласно одному варианту осуществления животное содержит недееспособный эндогенный локус иммуноглобулина и экспрессирует тяжелую цепь и/или λ легкую цепь из трансгена или внехромосомной эписомы. Согласно одному варианту осуществления животное содержит замещение на эндогенном (не относящемся к человеку) локусе некоторых или всех эндогенных не относящихся к человеку генных сегментов тяжелой цепи (т.е. V, D, J), и/или некоторых или всех эндогенных не относящихся к человеку константных последовательностей тяжелой цепи (например, C_H1, шарнира, C_H2, C_H3 или их комбинации), и/или некоторых или всех эндогенных не относящихся к человеку последовательностей легкой цепи (например, V, J, константной или их комбинации) одной или несколькими последовательностями иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрено отличное от человека животное, подходящие для получения антител, которые содержат происходящую из λ легкую цепь человека, причем все или по существу все антитела, произведенные в отличном от человека животном, экспрессируются с происходящей из λ легкой цепью человека. Согласно одному варианту осуществления происходящая из λ легкая цепь человека экспрессируется из эндогенного локуса легкой цепи. Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи представляет собой локус к легкой цепи. Согласно конкретному варианту осуществления животное представляет собой мышь, и локус к легкой цепи представляет собой локус к легкой цепи мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения происходящей из λ легкой цепи для антитела человека, предусматривающий получение от описанного в настоящем документе отличного от человека животного последовательности легкой цепи и последовательности тяжелой цепи, и применение последовательности легкой цепи и последовательности тяжелой цепи в получении антитела человека.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения антигенсвязывающего белка, предусматривающий воздействие на описанное в настоящем документе отличное от человека животное антигена; предоставление возможности отличному от человека животному развить иммунный ответ; и получение от отличного от человека животного антигенсвязывающего белка, который связывает антиген, или получение от отличного от человека животного последовательности, подлежащей использованию в получении антигенсвязывающего белка, который связывает антиген.

Согласно одному аспекту предусмотрена клетка, происходящая из описанного в настоящем документе отличного от человека животного (например, мыши или крысы). Согласно одному варианту осуществления клетка выбрана из эмбриональной стволовой клетки, плюрипотентной клетки, индуцированной плюрипотентной клетки, В-клетки и гибридомы.

Согласно одному аспекту предусмотрена клетка, которая содержит описанную в настоящем документе генетическую модификацию. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой клетку мыши. Согласно одному варианту осуществления клетка выбрана из гибридомы и квадромы. Согласно одному варианту осуществления клетка экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит вариабельную последовательность λ человека, слитую с константной последовательностью мыши. Согласно конкретному варианту осуществления константная последовательность мыши представляет собой константную последовательность к мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрена ткань, полученная от описанного в настоящем документе отличного от человека животного.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение отличного от человека животного или клетки, описанных в настоящем документе, для получения антигенсвязывающего белка. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой белок человека. Согласно одному варианту осуществления белок человека представляет собой антитело человека.

Согласно одному аспекту предусмотрен антигенсвязывающий белок, произведенный отличным от человека животным, клеткой, тканью или способом, описанными в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой белок человека. Согласно одному варианту осуществления белок человека представляет собой антитело человека.

Любой из описанных в настоящем документе вариантов осуществления и аспектов может использоваться в сочетании друг с другом, если иное не указано или не очевидно из контекста. Другие варианты осуществления станут очевидными специалистам в настоящей области техники при рассмотрении последующего описания

Краткое описание фигур

На **фиг. 1А** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, прямого геномного замещения приблизительно трех миллионов пар нуклеотидов (Mb) варибельного генного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши (закрашенные обозначения) приблизительно одним миллионом пар нуклеотидов (Mb) варибельного генного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина человека (незакрашенные обозначения).

На **фиг. 1В** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, прямого геномного замещения приблизительно трех миллионов пар нуклеотидов (Mb) варибельного генного локуса к легкой цепи иммуноглобулина мыши (закрашенные обозначения) приблизительно 0,5 миллиона пар нуклеотидов (Mb) первым, или проксимальным, из двух почти идентичных повторов варибельного генного локуса к легкой цепи иммуноглобулина человека (незакрашенные обозначения).

На **фиг. 2А** показано подробное изображение, без соблюдения масштаба, трех начальных стадий (А-С) прямого геномного замещения варибельного генного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, которое приводит к делеции всех генных сегментов V_H , D_H и J_H мыши и замещению тремя генными сегментами V_H человека, всеми генными сегментами D_H и J_H человека. Нацеливающий вектор для первой вставки генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека показан ($3hV_H$ BACvec) с 67 т.п.н. 5' гомологичным плечом мыши, кассетой селекции (незакрашенный прямоугольник), сайтом сайт-специфической рекомбинации (незакрашенный треугольник), 145 т.п.н. геномным фрагментом человека и 8 т.п.н. 3' гомологичным плечом мыши. Показаны генные сегменты иммуноглобулина человека (незакрашенные обозначения) и мыши (закрашенные обозначения), дополнительные кассеты селекции (незакрашенные прямоугольники) и сайты сайт-специфической рекомбинации (незакрашенные треугольники), вставленные из последующих нацеливающих векторов.

На **фиг. 2В** показано подробное изображение, без соблюдения масштаба, шести дополнительных стадий (D-I) прямого геномного замещения варибельного генного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, которое приводит к вставке 77 дополнительных генных сегментов V_H человека и удалению последней кассеты селекции. Нацеливающий вектор для вставки дополнительных генных сегментов V_H человека ($18hV_H$ BACvec) в начальную вставку генных сегментов тяжелой цепи человека

(гибридный аллель 3hV_H-CRE) показан с 20 т.п.н. 5' гомологичным плечом мыши, кассетой селекции (незакрашенный прямоугольник), 196 т.п.н. геномным фрагментом человека и 62 т.п.н. гомологичным плечом человека, которое перекрывается с 5' концом начальной вставки генных сегментов тяжелой цепи человека, которая показана с сайтом сайт-специфической рекомбинации (незакрашенный треугольник), расположенном с 5' по отношению к генным сегментам человека. Показаны генные сегменты иммуноглобулина человека (незакрашенные обозначения) и мыши (закрашенные обозначения) и дополнительные кассеты селекции (незакрашенные прямоугольники), вставленные с помощью последующих нацеливающих векторов.

На **фиг. 2С** показано подробное изображение, без соблюдения масштаба, трех начальных стадий (А-С) прямого геномного замещения варибельного генного локуса к легкой цепи иммуноглобулина мыши, которое приводит к делеции всех генных сегментов V_κ и J_κ мыши (гибридный аллель Igκ-CRE). Показаны кассеты селекции (незакрашенные прямоугольники) и сайты сайт-специфической рекомбинации (незакрашенные треугольники), вставленные из нацеливающих векторов.

На **фиг. 2D** показано подробное изображение, без соблюдения масштаба, пяти дополнительных стадий (D-H) прямого геномного замещения варибельного генного локуса к легкой цепи иммуноглобулина мыши, которое приводит к вставке всех генных сегментов V_κ и J_κ человека в проксимальный повтор и делеции последней кассеты селекции (гибридный аллель 40hV_κΔHug). Показаны генные сегменты иммуноглобулина человека (незакрашенные обозначения) и мыши (закрашенные обозначения) и дополнительные кассеты селекции (незакрашенные прямоугольники), вставленные последующими нацеливающими векторами.

На **фиг. 3А** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, стратегии скрининга, включающей в себя положения праймеров/зондов количественной ПЦР (кПЦР) в отношении вставки генных последовательностей тяжелой цепи человека и потери генных последовательностей тяжелой цепи мыши в нацеленных эмбриональных стволовых (ES) клетках. Стратегия скрининга в ES клетках и мышцах в отношении первой вставки гена тяжелой области человека показана с наборами праймеров/зондов кПЦР для удаленной области (зонды "потери" С и D), вставленной области (зонды "hIgH" G и H) и фланкирующих областей (зонды "удерживания" А, В, Е и F) на немодифицированной мышшиной хромосоме (вверху) и точно нацеленной хромосоме (внизу).

На **фиг. 3В** показан репрезентативный расчет наблюдаемого числа копий зонда в родительских и модифицированных ES клетках для первой вставки генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Наблюдаемое число копий зонда для зондов А-F рассчитывали как $2/2\Delta\Delta Ct$. $\Delta\Delta Ct$ рассчитывают как $ave[\Delta Ct(\text{образец}) - med\Delta Ct(\text{контроль})]$, где ΔCt представляет собой разницу в Ct между исследуемым и эталонным зондами (между 4 и 6 эталонными зондами в зависимости от анализа). Термин $med\Delta Ct$ (контроль) представляет собой срединное значение ΔCt многочисленных (>60) ненацеленных образцов ДНК из родительских ES клеток. Каждый клон модифицированных ES клеток анализировали в шести параллельных испытаниях. Для расчета значений числа копий IgH зондов G и H в родительских ES клетках принимали, что эти зонды характеризуются числом копий, равным 1 в модифицированных ES клетках, и максимальный Ct, равный 35, использовали, даже если не наблюдалось никакой амплификации.

На **фиг. 3С** показан репрезентативный расчет значений числа копий для четырех мышей каждого генотипа, рассчитанный аналогичным образом, используя только

зонды D и H. Мыши дикого типа: WT мыши; мыши, гетерозиготные в отношении первой вставки генных сегментов иммуноглобулина человека: HET мыши; мыши, гомозиготные в отношении первой вставки генных сегментов иммуноглобулина человека: Номо мыши.

5 На **фиг. 4А** показано подробное изображение, без соблюдения масштаба, трех стадий, используемых для конструкции $3hV_H$ BACvec с помощью бактериальная гомологичной рекомбинации (BHR). Показаны генные сегменты иммуноглобулина человека (незакрашенные обозначения) и мыши (закрашенные обозначения), кассеты селекции (незакрашенные прямоугольники) и сайты сайт-специфической рекомбинации (незакрашенные треугольники), вставленные из нацеливающих векторов.

10 На **фиг. 4В** показан гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) трех клонов BAC (B1, B2 и B3) после обработки NotI. Маркеры M1, M2 и M3 представляют собой маркеры низкого диапазона, среднего диапазона и лямбда лэддера PFGE, соответственно (New England BioLabs, Ипсвич, Массачусетс).

15 На **фиг. 5А** показано схематическое изображение, без соблюдения масштаба, последовательных модификаций локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши с помощью возрастающих количеств генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Гомозиготных мышей получали из каждой из трех различных стадий гуманизации тяжелой цепи. Незакрашенные обозначения отображают последовательность человека; закрашенные обозначения отображают последовательность мыши.

20 На **фиг. 5В** показано схематическое изображение, без соблюдения масштаба, последовательных модификаций локуса к легкой цепи иммуноглобулина мыши с помощью возрастающих количеств генных сегментов к легкой цепи иммуноглобулина человека. Гомозиготных мышей получали из каждой из трех различных стадий гуманизации к легкой цепи. Незакрашенные обозначения отображают последовательность человека; закрашенные обозначения отображают последовательность мыши.

25 На **фиг. 6** показаны точечные диаграммы FACS популяций В-клеток у мышей дикого типа и гуманизированных мышей VELOCIMMUNE®. Клетки из селезенки (верхний ряд, третий ряд сверху и нижний ряд) или пахового лимфатического узла (второй ряд сверху) мышей дикого типа (wt) или VELOCIMMUNE® 1 (V1), VELOCIMMUNE® 2 (V2) или VELOCIMMUNE® 3 (V3) окрашивали в отношении экспрессирующих поверхностный IgM В-клеток (верхний ряд, и второй ряд сверху), поверхностный иммуноглобулин, содержащий или к или λ легкие цепи (третий ряд сверху) или поверхностный IgM специфических гаплотипов (нижний ряд), и популяции разделяли с помощью FACS.

30 На **фиг. 7А** показаны репрезентативные последовательности CDR3 тяжелой цепи выбранных произвольно антител VELOCIMMUNE® около участка соединения V_H - D_H - J_H (CDR3), демонстрирующие множественность сегментов J и нуклеотидные вставки. Последовательности CDR3 тяжелой цепи группируются согласно частоте использования генного сегмента D_H , зародышевая линия которого приведена над каждой группой жирным шрифтом. Генные сегменты V_H для каждой последовательности CDR3 тяжелой цепи указаны в скобках на 5' конце каждой последовательности (например, 3-72 представляет собой V_H 3-72 человека). Генные сегменты J_H для каждой CDR3 тяжелой цепи указаны в скобках на 3' конце каждой последовательности (например, 3 представляет собой J_H 3 человека). SEQ ID NO для каждой представленной последовательности являются следующими, приведенными сверху вниз: SEQ ID NO:

21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39.

5 На **фиг. 7В** показаны репрезентативные последовательности CDR3 легкой цепи выбранных произвольно антител VELOCIMMUNE® около участка соединения V_κ-J_κ (CDR3), демонстрирующие множественность сегментов J и нуклеотидные вставки. Генные сегменты V_κ для каждой последовательности CDR3 легкой цепи указаны в скобках на 5' конце каждой последовательности (например, 1-6 представляет собой
10 V_κ1-6 человека). Генные сегменты J_κ для каждой CDR3 легкой цепи указаны в скобках на 3' конце каждой последовательности (например, 1 представляет собой J_κ1 человека). SEQ ID NO для каждой представленной последовательности являются следующими, приведенными сверху вниз: SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48; SEQ
15 ID NO: 49; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 53; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58.

На **фиг. 8** показаны частоты соматических гипермутаций тяжелых и легких цепей антител VELOCIMMUNE®, подсчитанные (после выравнивания с совпадающими зародышевыми последовательностями) как процент измененных последовательностей
20 на каждом нуклеотидном (NT; левая колонка) или аминокислотном положении (AA; правая колонка) среди наборов из 38 (неиммунизированный IgM), 28 (неиммунизированный IgG), 32 (неиммунизированная Igκ из IgG), 36 (иммунизированный IgG) или 36 (иммунизированная Igκ из IgG) последовательностей. Заштрихованные столбики указывают на положения CDR.

25 На **фиг. 9А** показаны уровни иммуноглобулина в сыворотке для изотипов IgM и IgG у мышей дикого типа (белые столбики) или VELOCIMMUNE® (окрашенные столбики).

На **фиг. 9В** показаны уровни иммуноглобулина в сыворотке для изотипа IgA у мышей дикого типа (белые столбики) или VELOCIMMUNE® (окрашенные столбики).

30 На **фиг. 9С** показаны уровни иммуноглобулина в сыворотке для изотипа IgE у мышей дикого типа (белые столбики) или VELOCIMMUNE® (окрашенные столбики).

На **фиг. 10А** показаны титры антигенспецифических IgG к рецептору интерлейкина-6 в сыворотке семи мышей VELOCIMMUNE® (VI) и пяти мышей дикого типа (WT) после двух (кровапускание 1) или трех (кровапускание 2) циклов иммунизации с помощью эктодомена рецептора IL-6R.

35 На **фиг. 10В** показаны титры специфических изотипов IgG, специфических к рецептору IL-6R от семи мышей VELOCIMMUNE® (VI) и пяти мышей дикого типа (WT).

На **фиг. 11А** показано распределение аффинности моноклональных антител к рецептору интерлейкина-6, образованных у мышей VELOCIMMUNE®.

40 На **фиг. 11В** показано антиген-специфическое блокирование моноклональных антител к рецептору интерлейкина-6, образованных у мышей VELOCIMMUNE® (VI) и мышей дикого типа (WT).

На **фиг. 12** показано схематическое изображение, без соблюдения масштаба, генов ADAM6a и ADAM6b мыши на локусе тяжелой цепи иммуноглобулина мыши.

45 Нацеливающий вектор (нацеливающий вектор mADAM6), используемый для вставки ADAM6a и ADAM6b мыши в гуманизированный эндогенный локус тяжелой цепи, показан с кассетой селекции (HYG: гигромицин), фланкированной сайтами сайт-специфической рекомбинации (Frt), включающих в себя сконструированные сайты рестрикции на 5' и 3' концах.

На **фиг. 13** показано схематическое изображение, без соблюдения масштаба, псевдогена ADAM6 человека (hADAM6Ψ), расположенного между переменными генными сегментами 1-2 (V_H1-2) и 6-1 (V_H6-1) тяжелой цепи человека. Нацеливающий вектор для бактериальной гомологичной рекомбинации нацеливающий вектор (hADAM6Ψ) для делеции псевдогена ADAM6 человека и вставки уникальных сайтов рестрикции на locus тяжелой цепи человека показан с кассетой селекции (NEO: неомицин), фланкированной сайтами сайт-специфической рекомбинации (loxP), включающих в себя сконструированные сайты рестрикции на 5' и 3' концах. Показано изображение, без соблюдения масштаба, полученного нацеленного гуманизированного локуса тяжелой цепи, содержащего геномный фрагмент, который кодирует гены ADAM6a и ADAM6b мыши, включающего в себя кассету селекции, фланкированную сайтами сайт-специфической рекомбинации.

На **фиг. 14A** показаны контурные графики FACS лимфоцитов, дающих сигнал выше порогового значения на синглетах в отношении поверхностной экспрессии IgM и B220 в костном мозге мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих вставленный геномный фрагмент мыши, содержащий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+} A6^{res}\kappa^{+/+}$). Процентное отношение незрелых ($B220^{int}IgM^{+}$) и зрелых ($B220^{high}IgM^{+}$) В-клеток указано на каждом контурном графике.

На **фиг. 14B** показано общее количество незрелых ($B220^{int}IgM^{+}$) и зрелых ($B220^{high}IgM^{+}$) В-клеток в костном мозге, выделенном из бедренных костей мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+} A6^{res}\kappa^{+/+}$).

На **фиг. 15A** показаны контурные графики FACS дающих сигнал $CD19^{+}$ выше порогового значения В-клеток в отношении поверхностной экспрессии c-kit и CD43 в костном мозге мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$), и мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+} A6^{res}\kappa^{+/+}$). Процентное отношение про-В ($CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$) и пре-В ($CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$) клеток указано в верхнем правом и нижнем левом квадрантах, соответственно, каждого контурного графика.

На **фиг. 15B** показано общее количество про-В-клеток ($CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$) и пре-В-клеток ($CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$) в костном мозге, выделенном из бедренных костей мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, содержащий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+} A6^{res}\kappa^{+/+}$).

На **фиг. 16А** показаны контурные графики FACS лимфоцитов гейтированных по синглетам в отношении поверхностной экспрессии CD19 и CD43 в костном мозге мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$). Процентное отношение незрелых В ($CD19^+CD43^-$), пре-В ($CD19^+CD43^{int}$) и про-В ($CD19^+CD43^+$) клеток указано на каждом контурном графике.

На **фиг. 16В** показаны гистограммы незрелых В ($CD19^+CD43^-$) и пре-В ($CD19^+CD43^{int}$) клеток в костном мозге мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$).

На **фиг. 17А** показаны контурные графики FACS лимфоцитов гейтированных по синглетам в отношении поверхностной экспрессии CD19 и CD3 в спленоцитах мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$). Процентное отношение В ($CD19^+CD3^-$) и Т ($CD19^-CD3^+$) клеток указано на каждом контурном графике.

На **фиг. 17В** показаны контурные графики FACS гейтированных по $CD19^+$ В-клеток в отношении поверхностной экспрессии Ig λ и Ig κ легких цепей в селезенке мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$). Процентное отношение Ig λ^+ (верхний левый квадрант) и Ig κ^+ (нижний правый квадрант) В-клеток указан на каждом контурном графике.

На **фиг. 17С** показано общее количество $CD19^+$ В-клеток в селезенке мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+}A6^{res}\kappa^{+/+}$).

На **фиг. 18А** показаны контурные графики FACS дающих сигнал $CD19^+$ выше порогового значения В-клеток в отношении поверхностной экспрессии IgD и IgM в селезенке мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/\kappa^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши,

кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+}A6^{res}k^{+/+}$). Процентное отношение зрелых В-клеток ($CD19^{+}IgD^{high}IgM^{int}$) указано на каждом контурном графике. Стрелка на правом контурном графике иллюстрирует процесс созревания В-клеток по отношению к поверхностной экспрессии IgM и IgD.

На **фиг. 18В** показано общее количество В-клеток в селезенке мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека ($H^{+/+}/k^{+/+}$) и мышей, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6 мыши ($H^{+/+}A6^{res}k^{+/+}$) в ходе созревания от $CD19^{+}IgM^{high}IgD^{int}$ до $CD19^{+}IgM^{int}IgD^{high}$.

На **фиг. 19** показано подробное изображение, без соблюдения масштаба, локуса λ легкой цепи человека, включающего в себя кластеры генных сегментов V λ (A, B и C) и пары областей J λ и C λ (пары J-C).

На **фиг. 20** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, стратегии нацеливания, используемой для инактивации эндогенного локуса λ легкой цепи мыши.

На **фиг. 21** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, стратегии нацеливания, используемой для инактивации эндогенного локуса к легкой цепи мыши.

На **фиг. 22А** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, исходного нацеливающего вектора для нацеливания на эндогенный локус λ легкой цепи мыши с последовательностями λ легкой цепи человека, включая в себя 12 генных сегментов hV λ и 1 генный сегмент hJ λ (нацеливающие вектор 12/1- λ).

На **фиг. 22В** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, четырех исходных нацеливающих векторов для нацеливания на эндогенный локус к легкой цепи мыши с последовательностями λ легкой цепи человека, включая в себя 12 генных сегментов hV λ и 1 генный сегмент hJ λ (12/1-к нацеливающий вектор), 12 генных сегментов hV λ и 1, 2, 3 и 7 генных сегментов hJ λ (12/4-к нацеливающий вектор), 12 генных сегментов hV λ , геномную последовательность V κ -J κ человека и 1 генный сегмент hJ λ (12(κ)1-к нацеливающий вектор) и 12 генных сегментов hV λ , геномную последовательность V κ -J κ человека и 1, 2, 3 и 7 генных сегментов hJ λ (12(κ)4-к нацеливающий вектор).

На **фиг. 23А** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, стратегии нацеливания для поэтапной вставки 40 генных сегментов hV λ и одного генного сегмента hJ λ в локус λ легкой цепи мыши.

На **фиг. 23В** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, стратегии нацеливания для поэтапной вставки 40 генных сегментов hV λ и одного генного сегмента hJ λ в локус к мыши.

На **фиг. 24** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, стадий нацеливания и молекулярного конструирования, используемых для получения уникальных человека λ -к гибридных нацеливающих векторов для конструирования гибридного локуса легкой цепи, содержащего к межгенную последовательность человека, множественные генные сегменты hJ λ или и то и другое.

На **фиг. 25А** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, структуры локуса для модифицированного локуса λ легкой цепи мыши, содержащего 40 генных сегментов hV λ и один генный сегмент hJ λ , функционально связанный с эндогенным геном C λ 2.

На **фиг. 25В** показано общее изображение, без соблюдения масштаба, структуры локуса для четырех независимых модифицированных локусов к легкой цепи мыши, содержащих 40 генных сегментов hV λ и или один, или четыре генных сегментов hJ λ со

или смежной геномной последовательностью Vκ-Jκ человека или без нее, функционально связанной с эндогенным геном Cκ.

На **фиг. 26А** показаны контурные графики $Ig\lambda^+$ и $Ig\kappa^+$ спленоцитов, гейтированных по $CD19^+$ из мышцы дикого типа (WT), мышцы, гомозиготной в отношении 12 hVλ и четырех hJλ генных сегментов, включая в себя геномная последовательность Vκ-Jκ человека (12hVλ-VκJκ-4hJλ), и мышцы, гомозиготной в отношении 40 hVλ и одного hJλ генного сегмента (40hVλ-1hJλ).

На **фиг. 26В** показано общее количество $CD19^+$ В-клеток в собранных селезенках от мышей дикого типа (WT), мышей, гомозиготных в отношении 12 hVλ и четырех генных сегментов hJλ, включая в себя геномную последовательность человека Vκ-Jκ (12hVλ-VκJκ-4hJλ) и мышей, гомозиготных в отношении 40 hVλ и одного hJλ генного сегмента (40hVλ-1hJλ).

На **фиг. 27А**, на верхней панели, показаны контурные графики спленоцитов, гейтированных по синглетам и окрашенных в отношении В- и Т-клеток ($CD19^+$ и $CD3^+$, соответственно) от мышцы дикого типа (WT) и мышцы, гомозиготной в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ). На нижней панели показаны контурные графики спленоцитов, гейтированных по $CD19^+$ и окрашенных в отношении экспрессии $Ig\lambda^+$ и $Ig\kappa^+$ от мышцы дикого типа (WT) и мышцы, гомозиготной в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

На **фиг. 27В** показано общее количество $CD19^+$, $CD19Ig\kappa^+$ и $CD19^+Ig\lambda^+$ В-клеток в собранных селезенках от мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

На **фиг. 27С** показаны контурные графики спленоцитов, гейтированных по $CD19^+$ и окрашенных в отношении иммуноглобулина D (IgD) и иммуноглобулина М (IgM) от мышцы дикого типа (WT) и мышцы, гомозиготной в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ). Зрелые В-клетки (72 для WT, 51 для 40hVλ-VκJκ-4hJλ) и переходные В-клетки (13 для WT, 22 для 40hVλ-VκJκ-4hJλ) отмечали на каждом контурном графике.

На **фиг. 27D** показано общее количество $CD19^+$ В-клеток, переходных В-клеток ($CD19IgM^{hi}IgD^{lo}$) и зрелых В-клеток ($CD19^+IgM^{lo}IgD^{hi}$) в собранных селезенках от мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

На **фиг. 28А**, на верхней панели, показаны контурные графики костного мозга, окрашенного в отношении В- и Т-клеток ($CD19^+$ и $CD3^+$, соответственно) от мышцы дикого типа (WT) и мышцы, гомозиготной в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ). На нижней панели показаны контурные графики костного мозга, гейтированного по $CD19^+$ и окрашенного в отношении $skit^+$ и $CD43^+$ от мышцы дикого типа (WT) и мышцы, гомозиготной в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ). Про- и пре-В-клетки

отмечены на контурных графиках на нижней панели.

На **фиг. 28B** показано количество про-(CD19⁺CD43⁺ckit⁺) и пре-(CD19⁺CD43⁻ckit⁻) В-клеток в костном мозге, собранном из бедренных костей мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

На **фиг. 28C** показаны контурные графики костного мозга, гейтированного по синглетам, окрашенного в отношении иммуноглобулина М (IgM) и B220 от мыши дикого типа (WT) и мыши, гомозиготной в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ). Незрелые, зрелые и про/пре-В-клетки отмечены на каждом из контурных графиков.

На **фиг. 28D** показано общее количество незрелых (B220^{int}IgM⁺) и зрелых (B220^{hi}IgM⁺) В-клеток в костном мозге, выделенном из бедренных костей мышей дикого типа (WT) и мышей, гомозиготных в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

На **фиг. 28E** показаны контурные графики костного мозга, гейтированного по незрелым (B220^{int}IgM⁺) и зрелым (B220^{hi}IgM⁺) В-клеткам, окрашенного в отношении экспрессия Igλ и Igκ, выделенного из бедренных костей мыши дикого типа (WT) и мыши, гомозиготной в отношении 40 hVλ и четырех Jλ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность Vκ-Jκ человека (40hVλ-VκJκ-4hJλ).

На **фиг. 29** показано выравнивание нуклеотидных последовательностей участка соединения Vλ-Jλ-Ск 18 независимых клонов ОТ-ПЦР, амплифицированных из РНК спленоцита мышей, содержащих генные последовательности λ легкой цепи человека на эндогенном локусе к легкой цепи мыши. A6 = SEQ ID NO: 115; B6 = SEQ ID NO: 116; F6 = SEQ ID NO: 117; B7 = SEQ ID NO: 118; E7 = SEQ ID NO: 119; F7 = SEQ ID NO: 120; C8 = SEQ ID NO: 121; E12 = SEQ ID NO: 122; 1-4 = SEQ ID NO: 123; 1-20 = SEQ ID NO: 124; 3B43 = SEQ ID NO: 125; 5-8 = SEQ ID NO: 126; 5-19 = SEQ ID NO: 127; 1010 = SEQ ID NO: 128; 11A1 = SEQ ID NO: 129; 7A8 = SEQ ID NO: 130; 3A3 = SEQ ID NO: 131; 2-7 = SEQ ID NO: 132. Обозначенные строчными буквами основания обозначают не относящиеся к зародышевой линии основания, являющиеся результатом или мутации, и/или N-вставки в ходе рекомбинации. Консенсусные аминокислоты в пределах каркасной области 4 (FWR4), кодируемой нуклеотидной последовательностью 1 hJλ и Сκ мыши, отмечены внизу выравнивания последовательностей.

На **фиг. 30** показано выравнивание нуклеотидных последовательностей участка соединения Vλ-Jλ-Ск 12 независимых клонов ОТ-ПЦР, амплифицированных из РНК спленоцитов мышей, содержащих генные последовательности λ легкой цепи человека, включая в себя смежную геномную последовательность Vκ-Jκ человека, на эндогенном локусе к легкой цепи мыши. 5-2 = SEQ ID NO: 145; 2-5 = SEQ ID NO: 146; 1-3 = SEQ ID NO: 147; 4B-1 = SEQ ID NO: 148; 3B-5 = SEQ ID NO: 149; 7A-1 = SEQ ID NO: 150; 5-1 = SEQ ID NO: 151; 4A-1 = SEQ ID NO: 152; 11A-1 = SEQ ID NO: 153; 5-7 = SEQ ID NO: 154; 5-4 = SEQ ID NO: 155; 2-3 = SEQ ID NO: 156. Обозначенные строчными буквами основания обозначают не относящиеся к зародышевой линии основания, являющиеся результатом или мутации, и/или N-вставки в ходе рекомбинации. Консенсусные аминокислоты в пределах каркасной области 4 (FWR4), кодируемой нуклеотидной последовательностью каждого Jλ человека и Сκ мыши, отмечены внизу выравнивания последовательностей.

На **фиг. 31** показано выравнивание нуклеотидных последовательностей участка соединения Vλ-Jλ-Ск 3 независимых клонов ОТ-ПЦР, амплифицированных из РНК

спленоцитов мышей, содержащих генные последовательности λ легкой цепи человека на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши. 2D1 = SEQ ID NO: 159; 2D9 = SEQ ID NO: 160; 3E15 = SEQ ID NO: 161. Обозначенные строчными буквами основания обозначают не относящиеся к зародышевой линии основания, являющиеся результатом или мутации, и/или N-вставки в ходе рекомбинации. Консенсусные аминокислоты в пределах каркасной области 4 (FWR4), кодируемой нуклеотидной последовательностью 1 hJ λ и C λ 2 мыши, отмечены внизу выравнивания последовательностей.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Кроме того, следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не предусматривается для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения определяется его формулой.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе термины и фразы, включают в себя те значения, которые подразумеваются под терминами и фразами в настоящей области техники, если иное прямо не указано или явно не следует из контекста, в котором используется термин или фраза. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при испытании настоящего изобретения, теперь будут описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящий документ посредством ссылки.

Фраза "существенный" или "по существу" при использовании для обозначения количества генных сегментов (например, "по существу все" генные сегменты V) включает в себя как функциональные, так и нефункциональные генные сегменты и включает в себя, согласно различным вариантам осуществления, например, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более всех генных сегментов; согласно различным вариантам осуществления фраза "по существу все" генные сегменты включает в себя, например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% функциональных (т.е. не относящихся к псевдогенам) генных сегментов.

Термин "замещение" включает в себя помещение последовательности ДНК в геном клетки таким образом, чтобы заменить последовательность в пределах генома гетерологичной последовательностью (например, последовательностью человека у мыши) на локусе геномной последовательности. Помещенная таким образом последовательность ДНК может включать в себя одну или несколько регуляторных последовательностей, которые представляют собой часть исходной ДНК, используемой для получения помещенной таким образом последовательности (например, промоторы, энхансеры, 5'- или 3'-нетранслируемые области, соответствующие последовательности сигналов рекомбинации и т.д.). Например, согласно различным вариантам осуществления замещение представляет собой замену эндогенной последовательности гетерологичной последовательностью, что приводит к производству генного продукта из помещенной таким образом последовательности ДНК (содержащей гетерологичную последовательность), но не экспрессии эндогенной последовательности; замещение эндогенной геномной последовательности последовательностью ДНК, которая кодирует белок, который характеризуется аналогичной функцией, что и белок, кодируемый эндогенной геномной последовательностью (например, эндогенная геномная последовательность кодирует ген или домен иммуноглобулина, и фрагмент ДНК

кодирует один или несколько генов или доменов иммуноглобулина человека). Согласно различным вариантам осуществления эндогенный ген или его фрагмент заменяют соответствующим геном человека или его фрагментом. Соответствующий ген человека или его фрагмент представляет собой ген человека или фрагмент, который представляет собой ортолог, гомолог или по существу идентичный или такой же по структуре и/или функции, как эндогенный ген или его фрагмент, который заменен.

Термин "смежный" включает в себя ссылку на расположение на одной молекуле нуклеиновой кислоты, например, две последовательности нуклеиновой кислоты являются "смежными", если они располагаются на одной молекуле нуклеиновой кислоты, но прерываются другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, реаранжированная последовательность V(D)J является "смежной" с генной последовательностью константной области, хотя за последним кодоном последовательности V(D)J не сразу следует первый кодон последовательности константной области. Согласно другому примеру, две последовательности генного сегмента V являются "смежными", если они находятся на одном геномном фрагменте, хотя они могут быть разделены последовательностью, которая не кодирует кодон области V, например, они могут быть разделены регуляторной последовательностью, например, промотором или другой некодирующей последовательностью. Согласно одному варианту осуществления смежная последовательность включает в себя геномный фрагмент, который содержит геномные последовательности, расположенные так, как они встречаются в геноме дикого типа.

Фраза "происходящий из" при использовании в отношении вариабельной области, "происходящей из" указанного гена или генного сегмента, включает в себя способность установить для последовательности конкретный нереаранжированный генный сегмент или генные сегменты, которые были реаранжированы для образования гена, который экспрессирует вариабельный домен (учитывая при необходимости отличия в отношении сплайсинга и соматические мутации).

Фраза "функциональный" при использовании в отношении генного сегмента вариабельной области или соединяющего генного сегмента относится к частоте использования в экспрессируемом репертуаре антитела; например, у людей генные сегменты V λ 3-1, 4-3, 2-8 и т.д. являются функциональными, тогда как генные сегменты V λ 3-2, 3-4, 2-5 и т.д. являются нефункциональными.

"Локус тяжелой цепи" включает в себя положение на хромосоме, например, хромосоме мыши, в котором у мыши дикого типа встречаются последовательности ДНК вариабельной области тяжелой цепи (V_H), дополнительной области тяжелой цепи (D_H), соединяющей области тяжелой цепи (J_H) и константной области тяжелой цепи (C_H).

"Локус κ " включает в себя положение на хромосоме, например, хромосоме мыши, в котором у мыши дикого типа встречаются последовательности ДНК κ вариабельной (V κ), κ соединяющей (J κ) и κ константной (C κ) области.

"Локус λ " включает в себя положение на хромосоме, например, хромосоме мыши, в котором у мыши дикого типа встречаются последовательности ДНК λ вариабельной (V λ), λ соединяющей (J λ) и λ константной (C λ) области.

Термин "клетка" при использовании в отношении экспрессии последовательности включает в себя любую клетку, которая является подходящей для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают в себя клетки прокариот и эукариот (одноклеточных или многоклеточных), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т.д.), клетки микобактерий, клетки грибов, дрожжевые клетки (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P.*

pastoris, *P. methanolica* и т.д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, инфицированные бакуловирусом клетки насекомых, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки отличных от человека животных, клетки человека или такие слияния клеток, как, например, гибридомы или квадромы. Согласно некоторым вариантам осуществления

5 клетка представляет собой клетку человека, мартышки, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), ретинальная клетка, Vero, CV1, почечная клетка (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa,

10 HepG2, VV138, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальная), CV-1, U937, 3T3, клетка L, клетка C127, SP2/0, NS-O, MMT 060562, клетка Сертоли, клетка BRL 3A, клетка HT1080, клетка миеломы, опухолевая клетка и клеточная линия, происходящая из вышеупомянутой клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления клетка содержит один или несколько вирусных генов,

15 например, ретинальная клетка, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

Фраза "определяющая комплементарность область", или термин "CDR", включает в себя аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулина организма, которая в норме (т.е. у

20 животного дикого типа) находится между двумя каркасными областями в варибельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или Т-клеточного рецептора). CDR может кодироваться, например, зародышевой последовательностью или реаранжированной или нереаранжированной последовательностью, и, например, наивной или зрелой В-клеткой или Т-клеткой. В

25 некоторых обстоятельствах (например, для CDR3), CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, зародышевыми последовательностями), которые не являются смежными (например, в нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты), но являются смежными в последовательности нуклеиновой кислоты В-клетки, например, в результате сплайсинга или соединения

30 последовательностей (например, V-D-J рекомбинации для образования CDR3 тяжелой цепи).

Фраза "генный сегмент" или "сегмент" включает в себя ссылку на генный сегмент иммуноглобулина V (легкий или тяжелый) или D или J (легкий или тяжелый), который включает в себя нереаранжированные последовательности на локусах иммуноглобулина

35 (например, у людей и мышей), которые могут участвовать в реаранжировке (опосредованной, например, эндогенными рекомбиназами) для образования реаранжированной последовательности V/J или V/D/J. Если не указано иное, сегменты V, D и J содержат сигнальные последовательности рекомбинации (RSS), которые обеспечивают рекомбинацию V/J или рекомбинацию V/D/J согласно правилу 12/23.

40 Если не указано иное, сегменты дополнительно содержат последовательности, с которыми они связаны в природе, или их функциональные эквиваленты (например, для V сегментов промотор(ы) и лидер(ы)).

Термин "нереаранжированный" включает в себя состояние локуса иммуноглобулина, при котором генные сегменты V и генные сегменты J (для тяжелых цепей, а также

45 генные сегменты D) сохраняются отдельно, но они способны быть объединенными для образования реаранжированного гена V(D)J, который содержит один V,(D),J из репертуара V(D)J.

Фраза "микромольный диапазон" подразумевает 1-999 микромоль; фраза

"наномолярный диапазон" подразумевает 1-999 наномоль; фраза "пикомолярный диапазон" подразумевает 1-999 пикомоль.

Подразумевается, что термин "отличные от человека животные" включает в себя любые отличные от человека животные, такие как круглоротые, костные рыбы, такие хрящевые рыбы, как акулы и ромбовые скаты, амфибии, рептилии, млекопитающие и птицы. Подходящие отличные от человека животные включают в себя млекопитающих. Подходящие млекопитающие включают в себя отличных от человека приматов, коз, овец, свиней, собак, коров и грызунов. Подходящие отличные от человека животные выбраны из семейства грызунов, включающего в себя крысу и мышь. Согласно одному варианту осуществления отличные от человека животные представляют собой мышей.

Мышь в качестве генетической модели была значительно усовершенствована с помощью трансгенных технологий и технологий нокаута, которые предоставили возможность для изучения эффектов направленной избыточной экспрессии или делеции специфических генов. Несмотря на все свои преимущества, мышь все еще демонстрирует генетические затруднения, которые делают ее несовершенной моделью для заболеваний человека и несовершенной платформой для испытания или получения терапевтических средств для людей. Во-первых, несмотря на то, что приблизительно 99% генов человека имеют мышинный гомолог (Waterston, R.H., *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.), потенциальные терапевтические средства зачастую не дают перекрестной реакции или дают неадекватную перекрестную реакцию с мышинными ортологами предполагаемых мишеней человека. Для устранения этой проблемы выбранные целевые гены могут быть "гуманизированы", то есть ген мыши может быть устранен и замещен соответствующей ортологичной генной последовательностью человека (например, патенты США №№6586251, 6596541 и 7105348, включенные в настоящий документ посредством ссылки). Изначально, попытки гуманизировать мышинные гены с помощью стратегии "генный нокаут вместе с трансгенной гуманизацией" предусматривали скрещивание мыши, несущей делецию (т.е., нокаут) эндогенного гена, с мышью, несущей интегрированный в произвольном порядке трансген человека (смотрите, например, Bril, W.S., *et al.* (2006). Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution. *Thromb Haemost* 95, 341-347; Homanics, G.E., *et al.* (2006). Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease. *BMC Med Genet* 7, 33; Jamsai, D., *et al.* (2006). A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/beta-thalassemia. *Genomics* 88(3):309-15; Pan, Q., *et al.* (2006). Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gammadelta-deficient mice. *Mol Immunol* 43, 1741-1750). Но эти попытки затруднялись ограничениями в размере; традиционные технологии генного нокаута были недостаточными для прямого замещения больших мышинных генов их большими геномными эквивалентами человека. Простой подход прямого гомологичного замещения, при котором эндогенный мышинный ген напрямую замещается эквивалентным геном человека в том же точном генетическом положении гена мыши (т.е., на эндогенном мышинном локусе), редко предпринимался вследствие технических сложностей. До настоящего времени попытки прямого замещения предусматривали усложненные и трудные процедуры, таким образом, ограничивая длину генетического материала, с который могли быть произведены манипуляции, и точность, с которой эти манипуляции могли быть произведены.

Экзогенно введенные трансгены иммуноглобулина человека перестраиваются в

предшественниках В-клеток у мышей (Alt, F.W., Blackwell, T.K., and Yancopoulos, G.D. (1985). Immunoglobulin genes in transgenic mice. *Trends Genet* 1, 231-236). Это открытие использовалось в конструировании мышей с использованием генного нокаута вместе с трансгенным подходом для экспрессии антител человека (Green, L.L. *et al.* (1994).

- 5 Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet* 7, 13-21; Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23, 1117-1125; Lonberg, N., *et al.* (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856-859; Jakobovits, A., *et al.* (2007). From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 25, 1134-1143). Эндогенные локусы тяжелой цепи и к легкой цепи иммуноглобулина мыши инактивировали у этих мышей путем направленной делеции небольших, но критически важных частей каждого
- 10 эндогенного локуса с последующим введением генных локусов иммуноглобулина человека в виде описанных выше случайным образом интегрированных больших трансгенов или минихромосом (Tomizuka, K., *et al.* (2000). Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 722-727). Такие мыши представляли важное преимущество в генной инженерии; выделенные из них полностью человеческие моноклональные антитела давали в результате перспективные
- 15 терапевтические средства для лечения различных заболеваний человека (Gibson, T.B., *et al.* (2006). Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6, 29-31; Jakobovits *et al.*, 2007; Kim, Y.H., *et al.* (2007). Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two Phase II studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 109(11):
- 25 4655-62; Lonberg, 2005; Maker, A.V., *et al.* (2005). Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann Surg Oncol* 12, 1005-1016; McClung, M.R., Lewiecki, E.M. *et al.* (2006). Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354, 821-831). Но, как обсуждалось выше, эти мыши проявляют нарушенное развитие В-клеток
- 30 и иммунологические дефициты по сравнению с мышами дикого типа. Такие проблемы потенциально ограничивают способность мышей обеспечивать сильный гуморальный ответ и, следовательно, образовывать полностью человеческие антитела к некоторым антигенам. Недостаточности могут быть обусловлены следующим: (1) неэффективная функциональность вследствие введения случайным образом трансгенов
- 35 иммуноглобулина человека и полученная в результате неправильная экспрессия вследствие отсутствия контролирующих элементов против хода транскрипции и по ее ходу (Garrett, F.E., *et al.* (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25, 1511-1525; Manis, J.P., *et al.* (2003). Elucidation of
- 40 a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region. *Mol Immunol* 39, 753-760; Pawlitzky, I., *et al.* (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse IgH locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J Immunol* 176, 6839-6851); (2) неэффективные межвидовые взаимодействия между константными доменами человека и мышинными компонентами
- 45 В-клеточного рецепторного сигнального комплекса на клеточной поверхности, которые могут ослаблять сигнальные процессы, необходимые для нормального созревания, пролиферации и выживания В-клеток (Hombach, J., *et al.* (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343, 760-762); и (3) неэффективные

межвидовые взаимодействия между растворимыми иммуноглобулинами человека и мышинными Fc рецепторами, которые могут снижать аффинную селекцию (Rao, S.P., *et al.* (2002). Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells. *J Immunol* 169, 1859-1868) и концентрации иммуноглобулинов в сыворотке (Brambell, F.W., *et al.* (1964). A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature* 203, 1352-1354; Junghans, R.P., and Anderson, C.L. (1996). The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5512-5516; Rao *et al.*, 2002; Hjelm, F., *et al.* (2006). Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scand J Immunol* 64, 177-184; Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96, 179-204). Эти дефициты можно корректировать с помощью гуманизации *in situ* только вариабельных областей локусов иммуноглобулина мыши в пределах их естественных положений на эндогенных локусах тяжелых и легких цепей. Это будет действительно давать в результате мышей, которые образуют обратные химерные антитела (т.е. V человека: C мыши), которые будут способны к нормальным взаимодействиям и селекции в мышинном окружении на основании сохранения константных областей мыши. Более того, такие обратные химерные антитела легко реформатируются в полностью человеческие антитела для терапевтических целей.

Генетически модифицированные животные, которые содержат замещение на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина гетерологичными (например, от другого вида) последовательностями иммуноглобулина, могут быть получены в сочетании с замещениями на эндогенных локусах легкой цепи иммуноглобулина или в сочетании с трансгенами легкой цепи иммуноглобулина (например, химерными трансгенами легкой цепи иммуноглобулина или полностью человеческими полностью мышинными и т.д.). Вид, из которого происходят гетерологичные последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина, может изменяться в широком диапазоне; как и в случае последовательностей легкой цепи иммуноглобулина, используемых в замещениях последовательности легкой цепи иммуноглобулина или трансгенов легкой цепи иммуноглобулина.

Последовательности нуклеиновой кислоты вариабельной области иммуноглобулина, например, сегменты V, D и/или J согласно различным вариантам осуществления получены от человека или отличного от человека животного. Отличные от человека животные, подходящие для предоставления сегментов V, D и/или J, включают в себя, например, костных рыб, таких хрящевых рыб, как акулы и ромбовидные скаты, амфибий, рептилий, млекопитающих, птиц (например, куриц). Отличные от человека животные включают в себя, например, млекопитающих. Млекопитающие включают в себя, например, отличных от человека приматов, коз, овец, свиней, собак, крупный рогатый скот (например, корову, быка, буйвола), оленя, верблюдов, хорьков и грызунов и отличных от человека приматов (например, шимпанзе, орангутанов, горилл, игрунок, макак-резусов, бабуинов). Подходящие отличные от человека животные выбраны из семейства грызунов, включающего в себя крыс, мышей и хомяков. Согласно одному варианту осуществления отличные от человека животные представляют собой мышей. Из контекста ясно, что различные отличные от человека животные могут быть использованы в качестве источника вариабельных доменов или генных сегментов вариабельной области (например, акулы, ромбовидные скаты, млекопитающие (например, верблюды, такие грызуны, как мыши и крысы).

Согласно контексту отличные от человека животные также используются в качестве источника последовательностей константной области для применения вместе с

вариабельными последовательностями или сегментами, например, константные последовательности грызуна могут использоваться в трансгенах, функционально связанных с относящимися к человеку или не относящимися к человеку вариабельными последовательностями (например, вариабельные последовательности человека или отличного от человека примата, функционально связанные, например, с константными последовательностями грызуна, например, мыши или крысы или хомяка). Таким образом, согласно различным вариантам осуществления сегменты V, D и/или J человека функционально связаны с генными последовательностями константной области грызуна (например, мыши или крысы или хомяка). Согласно некоторым вариантам осуществления сегменты V, D и/или J человека (или одного или нескольких реаранжированных генов VDJ или VJ) функционально связаны или слиты с генной последовательностью константной области мыши, крысы или хомяка, например, в трансгене, интегрированном в локус, который не является эндогенным локусом иммуноглобулина.

Согласно конкретному варианту осуществления предусмотрена мышь, которая содержит замещение генных сегментов V_H , D_H и J_H на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина одним или несколькими сегментами V_H , D_H и J_H человека, причем один или несколько сегментов V_H , D_H и J_H человека функционально связаны с эндогенным константным геном тяжелой цепи иммуноглобулина; причем мышь содержит трансген на локусе, отличном от эндогенного локуса иммуноглобулина, причем трансген содержит нереаранжированный или реаранжированный сегмент V_L человека и J_L человека, функционально связанный с константной областью мыши или крысы или человека.

Согласно конкретному варианту осуществления предусмотрена мышь, которая содержит вставку одного или нескольких генных сегментов V_H , D_H и J_H человека на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления вставка находится выше эндогенного константного гена тяжелой цепи иммуноглобулина; согласно одному варианту осуществления вставка находится ниже эндогенного вариабельного (V) генного сегмента; согласно одному варианту осуществления вставка находится ниже эндогенного дополнительного (D) генного сегмента; согласно одному варианту осуществления вставка находится ниже эндогенного соединяющего (J) генного сегмента. Согласно различным вариантам осуществления вставка находится так, что один или несколько генных сегментов V_H , D_H и J_H человека расположены в функциональной связи с одним или несколькими эндогенными константными генами тяжелой цепи.

Описан способ для большого генетического замещения *in situ* зародышевых вариабельных генных локусов иммуноглобулина мыши зародышевыми вариабельными генными локусами иммуноглобулина человека при сохранении способности мышей производить потомство. В частности, описано точное замещение шести миллионов пар нуклеотидов вариабельных генных локусов как тяжелой цепи, так и к легкой цепи иммуноглобулина мыши их эквивалентами человека при сохранении константных областей мыши интактными. В результате были образованы мыши, которые содержат точное замещение их полного зародышевого репертуара вариабельной области иммуноглобулина эквивалентными зародышевыми последовательностями вариабельной области иммуноглобулина человека при сохранении константных областей мыши. Вариабельные области человека соединяют с константными областями мыши для образования химерных человеческо-мышинных иммуноглобулиновых локусов, которые

перестраиваются и экспрессируются на физиологически приемлемых уровнях.

Экспрессированные антитела представляют собой "обратные химеры", т.е. они содержат последовательности вариабельной области человека и последовательности константной области мыши. Эти мыши, характеризующиеся гуманизированными вариабельными областями иммуноглобулина, которые экспрессируют антитела, содержащие вариабельные области человека и константные области мыши, имеют название мыши VELCOIMMUNE®.

Гуманизированные мыши VELOCIMMUNE® проявляют полностью функциональную гуморальную иммунную систему, которая по существу неотличима от таковой у мышей дикого типа. Они проявляют нормальные клеточные популяции на всех стадиях развития В-клеток. Они проявляют нормальную морфологию лимфоидных органов.

Последовательности антител мышей VELOCIMMUNE® проявляют нормальную реаранжировку V(D)J и нормальные показатели частоты соматической гипермутации. Популяции антител у этих мышей отражают распределения изотипов, которые являются

результатом нормального переключения класса (например, нормального *цис*-переключения изотипа). Иммунизация мышей VELOCIMMUNE® приводит к устойчивым гуморальным иммунным ответам, которые образуют большие, разнообразные репертуары антител, содержащих вариабельные домены иммуноглобулина человека, подходящие в качестве кандидатов терапевтических средств. Эта платформа предоставляет обильный источник последовательностей вариабельной области иммуноглобулина человека естественным образом созревшей аффинности для получения фармацевтически приемлемых антител и других связывающих антиген белков.

Это представляет собой точное замещение последовательностей вариабельной области иммуноглобулина мыши последовательностями вариабельной области иммуноглобулина человека, которое обеспечивает возможность получения мышей VELOCIMMUNE®. Даже точное замещение эндогенных последовательностей иммуноглобулина мыши на локусах тяжелых и легких цепей эквивалентными последовательностями иммуноглобулина человека с помощью последовательной рекомбинационной инженерии очень больших интервалов последовательностей иммуноглобулина человека может представлять определенные проблемы вследствие дивергентной эволюции локусов иммуноглобулина между мышью и человеком.

Например, межгенные последовательности, разбросанные в пределах локусов иммуноглобулина, не идентичны между мышами и людьми и в некоторых

обстоятельствах могут не быть функционально эквивалентными. Различия между мышами и людьми в их локусах иммуноглобулина может все еще приводить к аномалиям у гуманизированных мышей, в частности, при гуманизации или манипуляции с определенными частями эндогенных локусов тяжелой цепи иммуноглобулина мыши.

Некоторые модификации на локусах тяжелой цепи иммуноглобулина мыши являются вредными. Вредные модификации могут включать в себя, например, потерю способности модифицированных мышей спариваться и производить потомство. Согласно различным вариантам осуществления конструирование последовательностей иммуноглобулина человека в геноме мыши включает в себя способы, которые сохраняют эндогенные последовательности, которые при отсутствии у модифицированных линий мышей являются вредными. Иллюстративные неблагоприятные эффекты могут включать в себя неспособность воспроизводить модифицированные линии, потерю функции жизненно важных генов, неспособность экспрессировать полипептиды и т.д. Такие неблагоприятные эффекты могут быть напрямую или косвенно связаны с модификацией,

разработанной в геноме мыши.

Проводили точное, крупномасштабное замещение *in situ* шести миллионов пар нуклеотидов вариабельных областей локусов тяжелых и легких цепей иммуноглобулина мыши (V_H-D_H-J_H и V_κ-J_κ) соответствующими геномными последовательностями

человека, составляющими 1,4 миллиона пар нуклеотидов при сохранении фланкирующих последовательностей мыши интактными и функциональными в пределах гибридных локусов, включающих в себя все гены константной цепи мыши и области транскрипционного контроля локуса (фиг. 1А и фиг. 1В). В частности, генные последовательности V_H, D_H, J_H, V_κ и J_κ человека вводили посредством поэтапной вставки 13 химерных основанных на ВАС нацеливающих векторов, несущих перекрывающиеся фрагменты зародышевых вариабельных локусов человека, в мышинные ES клетки с использованием технологии генетической инженерии VELOCIGENE® (смотрите, например, патент США №6586251 и Valenzuela, D.M. *et al.* (2003). High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat Biotechnol 21, 652-659).

Гуманизация генов иммуноглобулина мыши представляет наибольшую генетическую модификацию мышинового генома к настоящему времени. Наряду с тем что предыдущие попытки с интегрированными случайным образом трансгенами иммуноглобулина человека оказались в некоторой степени успешными (как обсуждалось выше), прямое замещение генов иммуноглобулина мыши их эквивалентами человека значительно увеличивает результативность, с которой полностью человеческие антитела могут быть эффективно образованы у нормальных в других отношениях мышей. Кроме того, такие мыши проявляют значительно увеличенное разнообразие полностью человеческих антител, которые могут быть получены после иммунизации фактически любым антигеном, по сравнению с мышами, несущими недееспособные эндогенные локусы и трансгены полностью человеческих антител. Многочисленные варианты замещенных, гуманизированных локусов проявляют полностью нормальные уровни зрелых и незрелых В-клеток, в отличие от мышей с интегрированными случайным образом трансгенами человека, которые проявляют значительно уменьшенные популяции В-клеток на различных стадиях дифференциации. Наряду с тем что попытки по увеличению числа генных сегментов человека у гуманизированных трансгенных мышей снизили такие дефекты, расширенные иммуноглобулиновые репертуары не скорректировали в общей сложности снижения в популяциях В-клеток по сравнению с мышами дикого типа.

Несмотря на то, что близкая к дикому типу гуморальная иммунная функция, наблюдаемая у мышей с замещенными локусами иммуноглобулина (т.е. у мышей VELOCIMMUNE®), существуют другие обнаруживаемые при использовании прямого замещения иммуноглобулина сложности, которые не встречаются в некоторых подходах, которые используют интегрированные случайным образом трансгены. Различия в генетическом составе иммуноглобулиновых локусов между мышами и людьми привело к открытию последовательностей, преимущественных для размножения мышей с замещенными иммуноглобулиновыми генными сегментами. В частности, гены ADAM мыши, расположенные в пределах эндогенного локуса иммуноглобулина, оптимально присутствуют у мышей с замещенными иммуноглобулиновыми локусами вследствие их роли в фертильности.

Положение в геноме и функция ADAM6 мыши

Самцы мышей, у которых отсутствует способность экспрессировать какой-либо функциональный белок ADAM6, неожиданно проявляют дефект в способности мышей

спариваться и давать потомство. Мыши утрачивают способность экспрессировать функциональный белок ADAM6 посредством замещения всех или по существу всех генных сегментов варибельной области иммуноглобулина мыши генными сегментами варибельной области человека. Потеря функции ADAM6 происходит, поскольку локус ADAM6 расположен в пределах области эндогенного генного локуса варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, проксимального к 3' концу локуса генного сегмента V_H, который находится выше генных сегментов D_H. Разведение мышей, являющихся гомозиготными в отношении замещения всех или по существу всех эндогенных варибельных генных сегментов тяжелой цепи мыши генными сегментами варибельной области тяжелой цепи человека, как правило, представляет собой трудоемкий подход для спаривания самцов и самок, каждый из которых являются гомозиготными в отношении замещения, и ожидания продуктивного спаривания. Частота и размер успешных пометов являются низкими. Вместо этого, самцы, гетерозиготные в отношении замещения, использовались для спаривания с самками, гомозиготными в отношении замещения, для получения потомства, которое является гетерозиготным в отношении замещения, затем выводом из него гомозиготную мышь. Авторы настоящего изобретения показали, что вероятной причиной потери фертильности у самцов мышей является отсутствие у гомозиготных самцов мышей функционального белка ADAM6.

Согласно различным аспектам самцы мышей, которые содержат поврежденный (т.е. нефункциональный или незначительно функциональный) ген ADAM6, проявляют снижение или устранение фертильности. Поскольку у мышей (и других грызунов) ген ADAM6 расположен в локусе тяжелой цепи иммуноглобулина, авторы настоящего изобретения определили, что для того чтобы воспроизвести мышей или создать и поддержать линию мышей, которые содержат замещенный локус тяжелой цепи иммуноглобулина, использовали различные модифицированные схемы скрещивания или размножения. Низкая фертильность, или стерильность, самцов мышей, гомозиготных в отношении замещения эндогенного варибельного генного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина затрудняет поддержание такой модификации в линии мыши. Согласно различным вариантам осуществления сохранение линии предусматривает устранение проблем со стерильностью, которые проявляют самцы мышей, гомозиготные в отношении замещения.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ поддержания линии описанной в настоящем документе мыши. Линия мыши может не содержать эктопическую последовательность ADAM6, и согласно различным вариантам осуществления линия мыши является гомозиготным или гетерозиготным в отношении нокаута (например, функционального нокаута) ADAM6.

Линия мыши содержит модификацию эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, которая приводит к снижению или потере фертильности у самца мыши. Согласно одному варианту осуществления модификация предусматривает делецию регуляторной области и/или кодирующей области гена ADAM6. Согласно конкретному варианту осуществления модификация предусматривает модификацию эндогенного гена ADAM6 (регуляторной и/или кодирующей области), которая снижает или устраняет фертильность самца мыши, который содержит модификацию; согласно конкретному варианту осуществления модификация снижает или устраняет фертильность самца мыши, который является гомозиготным в отношении модификации.

Согласно одному варианту осуществления линия мыши является гомозиготным или гетерозиготным в отношении нокаута (например, функционального нокаута) или

делеции гена ADAM6.

Согласно одному варианту осуществления линию мыши поддерживают путем выделения из мыши, которая является гомозиготной или гетерозиготной в отношении модификации, клетки, и использование донорной клетки в зародыше-хозяине и

вынашивание зародыша-хозяина и донорной клетки в суррогатной матери и получение от суррогатной матери потомства, которое содержит генетическую модификацию. Согласно одному варианту осуществления донорная клетка представляет собой ES клетку. Согласно одному варианту осуществления донорная клетка представляет собой плюрипотентную клетку, например, индуцированную плюрипотентную клетку.

Согласно одному варианту осуществления линию мыши поддерживают путем выделения из мыши, которая является гомозиготной или гетерозиготной в отношении модификации, последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей модификацию, и введение последовательности нуклеиновой кислоты в ядро-хозяина и вынашивание клетки, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты и ядро-хозяина в подходящем животном. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты вводят в зародыш из ооцита-хозяина.

Согласно одному варианту осуществления линию мыши поддерживают путем выделения из мыши, которая является гомозиготной или гетерозиготной в отношении модификации, ядра и введение ядра в клетку-хозяина, и вынашивание ядра и клетки-хозяина в подходящем животном для получения потомства, которое является гомозиготным или гетерозиготным в отношении модификации.

Согласно одному варианту осуществления линию мыши поддерживают путем использования оплодотворения *in vitro* (IVF) самки мыши (дикого типа, гомозиготной в отношении модификации или гетерозиготной в отношении модификации), используя сперму от самца мыши, содержащего генетическую модификацию. Согласно одному варианту осуществления самец мыши является гетерозиготным в отношении генетической модификации. Согласно одному варианту осуществления самец мыши является гомозиготным в отношении генетической модификации.

Согласно одному варианту осуществления линию мыши поддерживают путем скрещивания самца мыши, который является гетерозиготным в отношении генетической модификации, с самкой мыши для получения потомства, которое содержит генетическую модификацию, идентификации мужского и женского потомства, содержащего генетическую модификацию, и использования самца, который является гетерозиготным в отношении генетической модификации, в скрещивании с самкой, которая относится к дикому типу, является гомозиготной или гетерозиготной в отношении генетической модификации, для получения потомства, содержащего генетическую модификацию. Согласно одному варианту осуществления стадию скрещивания самца, гетерозиготного в отношении генетической модификации, с самкой дикого типа, самкой, гетерозиготной в отношении генетической модификации, или самкой, гомозиготной в отношении генетической модификации, повторяют для поддержания генетической модификации в линии мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ поддержания линии мыши, который предусматривает замещение эндогенного вариабельного генного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина одним или несколькими последовательностями тяжелой цепи иммуноглобулина человека, предусматривая скрещивание линии мыши так, чтобы создать гетерозиготных самцов мышей, причем гетерозиготных самцов мышей скрещивают для поддержания генетической модификации в линии. Согласно конкретному варианту осуществления линию не поддерживают путем какого-либо

скрещивания гомозиготного самца с самкой дикого типа или самкой, гомозиготной или гетерозиготной в отношении генетической модификации.

Белок ADAM6 представляет собой представителя семейства ADAM белков, где ADAM представляет собой сокращение англ. A Disintegrin And Metalloprotease (дизинтегрин и металлопротеаза). Семейство белков ADAM является большим и разнообразным, с различными функциями, включая в себя клеточную адгезию. Некоторые представители семейства ADAM вовлечены в сперматогенез и оплодотворение. Например, ADAM2 кодирует субъединицу белка фертилина, который вовлечен во взаимодействия сперматозоидов и яйцеклетки. ADAM3, или циритестин, оказывается необходимым для связывания сперматозоида с вителлиновым слоем. Отсутствие или ADAM2, или ADAM3 приводит к стерильности. Предположили, что ADAM2, ADAM3 и ADAM6 формируют комплекс на поверхности мышинных сперматозоидов.

Ген ADAM6 человека, в норме встречающийся между V_H генными сегментами V_H1-2 и V_H6-1 человека, по-видимому, является псевдогеном (фигура 12). У мышей существует два гена ADAM6 - ADAM6a и ADAM6b - которые встречаются в межгенной области между генными сегментами V_H и D_H мыши, и у мыши ADAM6a и ADAM6b гены ориентированы в транскрипционной ориентации, противоположной ориентации транскрипции окружающих иммуноглобулиновых генных сегментов (фиг. 12). У мышей функциональный локус ADAM6 очевидно необходим для нормального оплодотворения. Функциональный локус или последовательность ADAM6, затем относится к локусу или последовательности ADAM6, которая может дополнить или восстановить резко сниженное оплодотворение, демонстрируемое самцами мышей с утраченными или нефункциональными эндогенными локусами ADAM6.

Положение межгенной последовательности у мышей, которая кодирует ADAM6a и ADAM6b, делает межгенную последовательность подверженной модификации при модификации эндогенной тяжелой цепи мыши. Когда генные сегменты V_H подвергаются делеции или замещаются или когда генные сегменты D_H подвергаются делеции или замещаются, существует высокая вероятность того, что полученная мышь будет проявлять тяжелую недостаточность фертильности. Для компенсации этой недостаточности мышь модифицируют, чтобы включить в нее нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, который будет дополнять потерю активности ADAM6 вследствие модификации эндогенного локуса ADAM6 мыши. Согласно различным вариантам осуществления дополняющая нуклеотидная последовательность представляет собой такую, которая кодирует мышинный ADAM6a, мышинный ADAM6b или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент, который восстанавливает недостаточность фертильности. Альтернативно, могут использоваться подходящие способы для сохранения эндогенного локуса ADAM6, при этом делая эндогенные последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина, фланкирующие локус ADAM6 мыши, неспособными к реаранжировке, чтобы кодировать функциональную эндогенную переменную область тяжелой цепи. Иллюстративные альтернативные способы включают в себя манипуляцию с большими частями хромосом мыши, которые располагают эндогенные локусы переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина таким образом, что они являются неспособными к реаранжировке, чтобы кодировать функциональную переменную область тяжелой цепи, которая функционально связана с эндогенным константным геном тяжелой цепи. Согласно различным вариантам осуществления способы предусматривают вставки и/или транслокации хромосомных фрагментов мыши, содержащих эндогенные генные

сегменты тяжелой цепи иммуноглобулина.

Нуклеотидная последовательность, которая восстанавливает фертильность, может быть расположена в любом подходящем положении. Она может быть расположена в межгенной области или в любом подходящем положении в геноме (т.е. эктопически).

5 Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность может быть введена в трансген, который случайным образом интегрирован в геном мыши. Согласно одному варианту осуществления последовательность может храниться эписомно, то есть на отдельной нуклеиновой кислоте, а не на хромосоме мыши. Подходящие положения предусматривают положения, которые являются

10 транскрипционно пермиссивными или активными, например, локус ROSA26 (Zambrowicz et al., 1997, *PNAS USA* 94:3789-3794), локус BT-5 (Michael et al., 1999, *Mech. Dev.* 85:35-47), или локус Oct4 (Wallace et al., 2000, *Nucleic Acids Res.* 28:1455-1464). Нацеливание нуклеотидных последовательностей на транскрипционно активные локусы описаны, например, в патенте США №7473557, включенный посредством ссылки в настоящий

15 документ.

Альтернативно нуклеотидная последовательность, которая восстанавливает фертильность, может быть соединена с индуцируемым промотором так, чтобы облегчать оптимальную экспрессию в соответствующих клетках и/или тканях, например, репродуктивных тканях. Иллюстративные индуцируемые промоторы включают в себя

20 промоторы, активируемые физическими (например, промотор теплового шока) и/или химическими средствами (например, IPTG или тетрациклином).

Кроме того, экспрессия нуклеотидной последовательности может быть ассоциирована с другими генами так, чтобы достичь экспрессии на конкретной стадии развития или в специфических тканях. Такая экспрессия может быть достигнута путем помещения

25 нуклеотидной последовательности в функциональной связи с промотором гена, экспрессируемого на конкретной стадии развития. Например, последовательности иммуноглобулина от одного вида, сконструированные в геноме вида-хозяина, помещают в функциональной связи с промоторной последовательностью гена CD19 (специфический для В-клеток ген) от вида-хозяина. Достигается специфическая для В-клеток экспрессия

30 на точно определенных стадиях развития при экспрессии иммуноглобулинов.

Еще один способ достижения устойчивой экспрессии вставленной нуклеотидной последовательности предусматривает использование конститутивного промотора. Иллюстративные конститутивные промоторы включают в себя SV40, CV, UBC, EF1A, PGK и CAGG. Аналогичным образом, требуемая нуклеотидная последовательность

35 располагают в функциональной связи с выбранным конститутивным промотором, что обеспечивает высокий уровень экспрессии белка(ов), кодируемого(ых) нуклеотидной последовательностью.

Предусматривается, что термин "эктопический" включает в себя перемещение или размещение в положении, которое в норме не встречается в природе (например,

40 размещение последовательности нуклеиновой кислоты в положении, которое не является аналогичным положением, в котором последовательность нуклеиновой кислоты встречается у мыши дикого типа). Термин согласно различным вариантам осуществления используется в том смысле, что его объект находится за пределами его нормального, или правильного, положения. Например, фраза "эктопическая

45 нуклеотидная последовательность, кодирующая..." относится к нуклеотидной последовательности, которая находится в положении, в котором она не встречается в норме у мыши. Например, в случае эктопической нуклеотидной последовательности, кодирующей белок ADAM6 мыши (или ее ортолога или гомолога или фрагмента,

который обеспечивает такое же или сходное улучшение фертильности у самцов мышей), последовательность может быть расположена в положении в геноме мыши, которое отличается от встречающегося в норме у мыши дикого типа. В таких случаях, новые участки соединения последовательности для последовательности мыши будут создаваться путем помещения последовательности в положение в геноме мыши, отличное от такового у мыши дикого типа. Функциональный гомолог или ортолог ADAM6 мыши представляет собой последовательность, которая обеспечивает восстановление потери фертильности (например, потери способности самца мыши давать потомство путем спаривания), которая наблюдается у мыши ADAM6^{-/-}.

Функциональные гомологи или ортологи предусматривают белки, которые характеризуются по меньшей мере приблизительно 89% идентичности или более, например, до 99% идентичности, с аминокислотной последовательностью ADAM6a и/или с аминокислотной последовательностью ADAM6b, и которые могут дополнять или восстанавливать способность успешно спариваться у мыши, характеризующейся фенотипом, который содержит делецию или нокаут ADAM6a и/или ADAM6b.

Эктопическое положение может находиться где-либо (например, как в случае случайной вставки трансгена, содержащего последовательность ADAM6 мыши), или может находиться, например, в положении, которое приблизительно соответствует (но не является точно таким же как) его расположение у мыши дикого типа (например, в модифицированном эндогенном локусе иммуноглобулина мыши, но или выше, или ниже в отношении хода транскрипции от его естественного положения, например, в пределах модифицированного локуса иммуноглобулина, но между различными генными сегментами, или в другом положении в V-D межгенной последовательности мыши). Один пример эктопического размещения представляет собой поддержание положения, встречающегося в норме у мышей дикого типа в пределах эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, при этом делая окружающие эндогенные генные сегменты тяжелой цепи неспособными к реаранжировке, чтобы кодировать функциональную тяжелую цепь, содержащую эндогенную константную область тяжелой цепи. Согласно описанному примеру, это можно осуществить путем инверсии хромосомного фрагмента, содержащего эндогенные вариабельные локусы тяжелой цепи иммуноглобулина, например с использованием сконструированных сайтов сайт-специфической рекомбинации, помещенных в положениях, фланкирующих локус вариабельной области. Таким образом, при рекомбинации эндогенные локусы вариабельной области тяжелой цепи помещаются на большом расстоянии от эндогенных генов константной области тяжелой цепи, тем самым предотвращая реаранжировку для кодирования функциональной тяжелой цепи, содержащей эндогенную константную область тяжелой цепи. Другие иллюстративные способы для достижения функционального сайленсинга эндогенного вариабельного генного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина при сохранении функционального локуса ADAM6 будут очевидными специалистам в настоящей области техники при прочтении настоящего раскрытия и/или в комбинации со способами, известными в настоящей области техники. При таком размещении эндогенного локуса тяжелой цепи эндогенные гены ADAM6 сохраняются, и эндогенный локус тяжелой цепи иммуноглобулина является функционально выключенным.

Другой пример эктопического размещения представляет собой размещение в пределах гуманизированного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, мышь, содержащая замещение одного или нескольких эндогенных генных сегментов V_H генными сегментами V_H человека, причем замещение удаляет эндогенную

последовательность ADAM6, может быть сконструирована так, чтобы содержать последовательность ADAM6 мышцы, расположенную в пределах последовательности, которая содержит генные сегменты V_H человека. Полученная модификация будет образовывать (эктопическую) последовательность ADAM6 мышцы в пределах генной последовательности человека, и (эктопическое) размещение последовательности ADAM6 мышцы в пределах генной последовательности человека может приблизительно соответствовать положению псевдогена ADAM6 человека (т.е., между двумя сегментами V) или может приблизительно соответствовать положению последовательности ADAM6 мышцы (т.е. в пределах V-D межгенной области). Полученные участки соединения последовательности, созданные соединением (эктопической) последовательности ADAM6 мышцы в пределах или рядом с генной последовательностью человека (например, генной последовательностью иммуноглобулина) в зародышевой линии мышцы, будут новыми по сравнению с таким же или аналогичным положением в геноме мышцы дикого типа.

Согласно различным вариантам осуществления предусмотрены отличные от человека животные, у которых отсутствует ADAM6 или его ортолог или гомолог, причем отсутствие делает отличного от человека животного стерильным или по существу снижает фертильность отличного от человека животного. Согласно различным вариантам осуществления отсутствие ADAM6 или его ортолога или гомолога обусловлено модификацией эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина. Существенное снижение фертильности, например, представляет собой снижение фертильности (например, частоты скрещивания, количества детенышей на помёт, количества помётов в год и т.д.) приблизительно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% или больше. Согласно различным вариантам осуществления отличным от человека животным добавляют ген ADAM6 мышцы или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент, который является функциональным у самца отличного от человека животного, причем добавленный ген ADAM6 или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент восстанавливает снижение фертильности полностью или существенную ее часть. Восстановление существенной части фертильности представляет собой, например, такое восстановление фертильности, что отличное от человека животное проявляет фертильность, которая составляет по меньшей мере 70%, 80% или 90% или больше по сравнению с немодифицированным (т.е. животное без модификации гена ADAM6 или его ортолога или гомолога) локусом тяжелой цепи.

Последовательность, которая обеспечивает генетически модифицированное животное (т.е. животное, которое не содержит функциональный ADAM6 или его ортолог или гомолог, вследствие, например, модификации локуса тяжелой цепи иммуноглобулина), согласно различным вариантам осуществления выбрана из гена ADAM6 или его ортолога или гомолога. Например, у мышцы потеря функции ADAM6 восстанавливается путем добавления согласно одному варианту осуществления гена ADAM6 мышцы.

Согласно одному варианту осуществления потеря функции ADAM6 у мышцы восстанавливается путем добавления ортолога или гомолога близкородственных видов по отношению к мышце, например, грызуна, например, мышцы другой линии или вида, крысы любого вида, грызуна; причем добавление мышцы ортолога или гомолога восстанавливает потерю фертильности вследствие потери функции ADAM6 или потери гена ADAM6. Ортологи и гомологи из других видов согласно различным вариантам осуществления выбраны из филогенетически родственного вида и согласно различным вариантам осуществления проявляют процентную идентичность по отношению к эндогенному ADAM6 (или ортологу), которая составляет приблизительно 80% или

более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 96% или более, или 97% или более; и которые восстанавливают связанную с ADAM6 или (у не относящихся к мыши) связанную с ортологом ADAM6 потерю фертильности. Например, у генетически модифицированного самца крысы, у которого отсутствует функция ADAM6 (например, крыса с эндогенной вариабельной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, замещенной вариабельной областью тяжелой цепи иммуноглобулина человека, или нокаут у крысы области тяжелой цепи иммуноглобулина), потеря фертильности у крысы восстанавливается путем добавления ADAM6 крысы или согласно некоторым вариантам осуществления ортолога ADAM6 крысы (например, ортолога ADAM6 от другой линии или вида крысы или согласно одному варианту осуществления от мыши).

Таким образом, согласно различным вариантам осуществления генетически модифицированные животные, которые не проявляют фертильности или снижение фертильности вследствие модификации последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок ADAM6 (или его ортолог или гомолог) или регуляторной области, функционально связанной с последовательностью нуклеиновой кислоты, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая взаимодействует или восстанавливает потерю фертильности, если последовательность нуклеиновой кислоты, которая взаимодействует или восстанавливает потерю фертильности, происходит от другой линии того же вида или из филогенетически родственного вида. Согласно различным вариантам осуществления взаимодействующая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой ADAM6, его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент. Согласно различным вариантам осуществления взаимодействующий ортолог ADAM6 или его гомолог или функциональный фрагмент происходит от отличного от человека животного, которое является близкородственным генетически модифицированному животному с нарушением фертильности. Например, если генетически модифицированное животное представляет собой мышь конкретной линии, ортолог ADAM6 или его гомолог или функциональный фрагмент может быть получен от мыши другой линии или мыши родственного вида. Согласно одному варианту осуществления если генетически модифицированное животное, содержащее нарушение фертильности, происходит из отряда Rodentia, то ортолог ADAM6 или его гомолог или функциональный фрагмент происходит от другого животного отряда Rodentia. Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное, содержащее нарушение фертильности, происходит из подотряда Myomorpha (например, тушканчики, полутушканчики, мышевидные хомяки, хомяки, крысы и мыши Нового Света, полевки, истинные мыши и крысы, карликовые песчанки, иглистые мыши, косматые хомяки, рипидомисы, скалистые хомячки, белохвостые крысы, мадагаскарские крысы и мыши, колючие соневидные хомяки, слепыши, бамбуковые крысы, цокоры), и ортолог ADAM6 или его гомолог или функциональный фрагмент выбран из животного отряда Rodentia или подотряда Myomorpha.

Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное происходит из надсемейства Dipodoidea, и ортолог ADAM6 или его гомолог или функциональный фрагмент происходит из надсемейства Muroidea. Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное происходит из надсемейства Muroidea, и ортолог ADAM6 или его гомолог или функциональный фрагмент происходит из надсемейства Dipodoidea.

Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное представляет собой грызуна. Согласно одному варианту осуществления грызун выбран из надсемейства Muroidea, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от другого вида

в пределах надсемейства Muroidea. Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное происходит из семейства, выбранного из Calomyscidae (например, мышевидные хомяки), Cricetidae (например, хомяк, крысы и мыши Нового Света, полевки), Muridae (настоящие мыши и крысы, карликовые песчанки, иглистые мыши, косматые хомяки), Nesomyidae (рипидомисы, скалистые хомячки, белохвостые крысы, мадагаскарские крысы и мыши), Platacanthomyidae (например, колючие соневидные хомяки), и Spalacidae (например, слепыши, бамбуковые крысы и цокоры); и ортолог или гомолог ADAM6 выбран из другого вида того же семейства. Согласно конкретному варианту осуществления генетически модифицированный грызун выбран из настоящей мыши или крысы (семейство Muridae), и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от вида, выбранного из карликовой песчанки, иглистой мыши, косматого хомяка. Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированная мышь происходит из представителя семейства Muridae, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от другого вида семейства Muridae. Согласно конкретному варианту осуществления генетически модифицированный грызун представляет собой мышь семейства Muridae, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от крысы, карликовой песчанки, иглистой мыши, косматого хомяка семейства Muridae.

Согласно различным вариантам осуществления один или несколько ортологов ADAM6 грызуна или их гомологов или функциональных фрагментов грызуна в семействе восстанавливает фертильность генетически модифицированного грызуна того же семейства, который не содержит ортолог или гомолог ADAM6 (например, Cricetidae (например, хомяки, крысы и мыши Нового Света, полевки); Muridae (например, настоящие мыши и крысы, карликовые песчанки, иглистые мыши, косматые хомяки)).

Согласно различным вариантам осуществления ортологи ADAM6, их гомологи и фрагменты оценивают в отношении функциональности путем определения того, восстанавливает ли ортолог, гомолог или фрагмент фертильность генетически модифицированного самца отличного от человека животного, у которого отсутствует активность ADAM6 (например, грызуна, например, мыши или крысы, которая содержит нокаут ADAM6 или его ортолога). Согласно различным вариантам осуществления функциональность определяют как способность спермы генетически модифицированного животного, у которого отсутствует эндогенный ADAM6 или его ортолог или гомолог, проходить яйцевод и оплодотворять яйцеклетку того же вида генетически модифицированного животного.

Согласно различным аспектам могут быть получены мыши, которые содержат делеции или замещения эндогенного локуса вариабельной области тяжелой цепи или его частей, которые содержат эктопическую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, обеспечивающий сходные улучшения фертильности ADAM6 мыши (например, его ортолог или гомолог или фрагмент, который является функциональным у самца мыши). Эктопическая нуклеотидная последовательность может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который представляет собой гомолог или ортолог ADAM6 (или их фрагмент) другой линии или другого вида, например, другого вида грызунов, и которая обеспечивает улучшение фертильности, например, увеличенное количество пометов в течение определенного периода времени и/или увеличенное количество детенышей на помет и/или способность сперматозоида самца мыши проходить через яйцевод мыши для оплодотворения яйцеклетки мыши.

Согласно одному варианту осуществления ADAM6 представляет собой гомолог или ортолог, которые по меньшей мере на 89%-99% идентичен белку ADAM6 мыши (например, по меньшей мере на 89%-99% идентичен ADAM6а мыши или ADAM6b

мышь). Согласно одному варианту осуществления эктопическая нуклеотидная последовательность кодирует один или несколько белков, независимо выбранных из белка, по меньшей мере на 89% идентичного ADAM6a мыши, белка, по меньшей мере на 89% идентичного ADAM6b мыши, и их комбинации. Согласно одному варианту осуществления гомолог или ортолог представляет собой белок крысы, хомяка, мыши или морской свинки, который является или модифицирован, чтобы быть приблизительно на 89% или более идентичным ADAM6a мыши и/или ADAM6b мыши. Согласно одному варианту осуществления гомолог или ортолог является или по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен ADAM6a мыши и/или ADAM6b мыши.

Согласно одному аспекту предусмотрены отличные от человека животные, причем отличные от человека животные содержат (а) вставку одного или нескольких генных сегментов V λ и J λ человека выше не относящейся к человеку константной области легкой цепи иммуноглобулина, (б) вставку одного или нескольких генных сегментов V μ человека, одного или нескольких генных сегментов D μ человека и одного или нескольких генных сегментов J μ человека выше не относящейся к человеку константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, и (с) нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления не относящиеся к человеку константные области тяжелой и/или легкой цепи представляют собой константные области грызун (например, выбранные из константных областей мыши, крысы или хомяка). Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку константная область легкой цепи представляет собой константную область грызуна. Согласно конкретному варианту осуществления константная область легкой цепи представляет собой область С κ мыши или область С κ крысы. Согласно конкретному варианту осуществления константная область легкой цепи представляет собой область С λ мыши или область С κ крысы. Подходящие отличные от человека животные включают в себя грызунов, например, мышей, крыс и хомяков. Согласно одному варианту осуществления грызун представляет собой мышь или крысу.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное содержит по меньшей мере 12 - по меньшей мере 40 генных сегментов V λ человека и по меньшей мере один генный сегмент J λ человека. Согласно конкретному варианту осуществления отличное от человека животное содержит 12 генных сегментов V λ человека и по меньшей мере один генный сегмент J λ человека. Согласно конкретному варианту осуществления отличное от человека животное содержит 28 генных сегментов V λ человека и по меньшей мере один генный сегмент J λ человека. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное содержит 40 генных сегментов V λ человека и по меньшей мере один генный сегмент J λ человека. Согласно различным вариантам осуществления по меньшей мере один генный сегмент J λ человека выбран из J λ 1, J λ 2, J λ 3 и J λ 7. Согласно конкретному варианту осуществления отличное от человека животное содержит по меньшей мере четыре генных сегмента J λ человека. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере четыре генных сегмента J λ человека содержат по меньшей мере J λ 1, J λ 2, J λ 3 и J λ 7.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, является эктопической у отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент (который является функциональным у отличного от человека

животного), присутствует в том же положении по сравнению с не относящимся к человеку локусом ADAM6 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь, и нуклеотидная последовательность кодирует белок ADAM6 мыши или его функциональный фрагмент и присутствует в эктопическом положении в геноме отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь, и нуклеотидная последовательность кодирует белок ADAM6 мыши или его функциональный фрагмент и присутствует в пределах генных сегментов иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления генные сегменты иммуноглобулина представляют собой генные сегменты тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты тяжелой цепи относятся к человеку. Согласно одному варианту осуществления генные сегменты тяжелой цепи представляют собой эндогенные генные сегменты тяжелой цепи отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления мышь содержит эктопическую смежную последовательность, содержащую один или несколько эндогенных нереаранжированных генных сегментов тяжелой цепи, и последовательность ADAM6 находится в пределах эктопической смежной последовательности.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное не содержит эндогенный генный сегмент V_L и/или J_L иммуноглобулина на эндогенном локусе легкой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное содержит эндогенные генные сегменты V_L и/или J_L иммуноглобулина, которые являются неспособными к реаранжировке для образования домена V_L иммуноглобулина у отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления все или по существу все эндогенные генные сегменты V_k и J_k иммуноглобулина замещают одним или несколькими генными сегментами V_λ и J_λ человека. Согласно одному варианту осуществления все или по существу все эндогенные генные сегменты V_λ и J_λ иммуноглобулина замещают одним или несколькими генными сегментами V_λ и J_λ человека. Согласно одному варианту осуществления все или по существу все эндогенные генные сегменты V_L и J_L иммуноглобулина являются интактными у отличного от человека животного, и отличное от человека животное содержит один или несколько генных сегментов V_λ человека и один или несколько генных сегментов J_λ человека, вставленных между эндогенными генными сегментами V_L и/или J_L иммуноглобулина и эндогенной константной областью легкой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления интактные эндогенные генные сегменты V_L и J_L иммуноглобулина становятся неспособными к реаранжировке для образования домена V_L антитела у отличного от человека животного. Согласно различным вариантам осуществления эндогенный локус легкой цепи иммуноглобулина отличного от человека животного представляет собой локус к легкой цепи иммуноглобулина. Согласно различным вариантам осуществления эндогенный локус легкой цепи иммуноглобулина отличного от человека животного представляет собой локус λ легкой цепи иммуноглобулина. Согласно различным вариантам осуществления эндогенные генные сегменты V_L и J_L иммуноглобулина представляют собой генные сегменты V_k и J_k . Согласно различным вариантам осуществления эндогенные генные сегменты V_L и J_L иммуноглобулина представляют собой генные сегменты V_λ и J_λ .

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное

дополнительно содержит межгенную область V_κ-J_κ человека из локуса κ легкой цепи человека, причем межгенная область V_κ-J_κ человека является смежной с одним или несколькими генными сегментами V_λ и J_λ человека. Согласно конкретному варианту осуществления межгенная область V_κ-J_κ человека расположена между генным сегментом V_λ человека и генным сегментом J_λ человека.

Согласно одному аспекту предусмотрены клетки и/или ткани, происходящий из отличных от человека животных, описанных в настоящем документе, причем клетки и/или ткани содержат (а) вставку одного или нескольких генных сегментов V_λ и J_λ человека выше не относящейся к человеку константной области легкой цепи иммуноглобулина, (b) вставку одного или нескольких генных сегментов V_H человека, одного или нескольких генных сегментов D_H человека и одного или нескольких генных сегментов J_H человека выше не относящейся к человеку константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, и (с) нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления не относящиеся к человеку константные области тяжелой и/или легкой цепи представляют собой константные области мыши. Согласно одному варианту осуществления не относящиеся к человеку константные области тяжелой и/или легкой цепи представляют собой константные области крысы. Согласно одному варианту осуществления не относящиеся к человеку константные области тяжелой и/или легкой цепи представляют собой константные области хомяка.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, является эктопической в клетке и/или ткани. Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, присутствует в таком же положении по сравнению с не относящимся к человеку локусом ADAM6 дикого типа. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку клетка и/или ткань происходит от мыши, и нуклеотидная последовательность кодирует белок ADAM6 мыши или его функциональный фрагмент и присутствует в эктопическом положении. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку клетка и/или ткань происходит от мыши, и нуклеотидная последовательность кодирует белок ADAM6 мыши или его функциональный фрагмент и присутствует в пределах генных сегментов иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления генные сегменты иммуноглобулина представляют собой генные сегменты тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления смежная последовательность эндогенных генных сегментов тяжелой цепи размещена эктопически у отличного от человека животного, причем смежная последовательность эктопически размещенных эндогенных генных сегментов тяжелой цепи содержит ген ADAM6, который является функциональным у мыши (например, у самца мыши).

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанного в настоящем документе отличного от человека животного для получения антигенсвязывающего белка, причем отличное от человека животное экспрессирует (а) антитело, которое содержит (i) легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит домен V_λ человека и не относящуюся к человеку константную область легкой цепи и (ii) тяжелую цепь иммуноглобулина, которая содержит домен V_H человека и не относящуюся к человеку константную область; и (b) белок ADAM6 или его функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок является относящимся к человеку. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное

представляет собой грызуна, и не относящиеся к человеку константные области представляют собой константные области грызуна. Согласно конкретному варианту осуществления грызун представляет собой мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрена не относящаяся к человеку клетка или ткань, происходящая от описанного в настоящем документе отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку клетка или ткань содержит один или несколько генных сегментов $V\lambda$ иммуноглобулина человека и по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ иммуноглобулина человека, смежный с не относящимся к человеку геном константной области легкой цепи иммуноглобулина, и один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько генных сегментов J_H человека, смежных с не относящимся к человеку геном константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, причем клетка или ткань экспрессирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления не относящийся к человеку ген константной области легкой цепи представляет собой $S\kappa$ мыши или $S\lambda$ мыши.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, является эктопической. Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность, которая кодирует ADAM6 белок или ее функциональный фрагмент, расположена в положении, которое является таким же, как и в не относящейся к человеку клетке дикого типа. Согласно различным вариантам осуществления не относящаяся к человеку клетка представляет собой В-клетку мыши. Согласно различным вариантам осуществления не относящаяся к человеку клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку.

Согласно одному варианту осуществления ткань происходит из селезенки, костного мозга или лимфатического узла отличного от человека животного.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение клетки или ткани, происходящей от описанного в настоящем документе отличного от человека животного для получения гибридомы или квадromы.

Согласно одному аспекту предусмотрена не относящаяся к человеку клетка, содержащая описанный в настоящем документе модифицированный геном, причем не относящаяся к человеку клетка представляет собой ооцит, зародыш-хозяин или слияние клетки от описанного в настоящем документе отличного от человека животного и клетки от другого отличного от человека животного.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение клетки или ткани, происходящей от описанного в настоящем документе отличного от человека животного для получения полностью человеческого антитела. Согласно одному варианту осуществления полностью человеческое антитело содержит домен V_H человека и домен $V\lambda$ человека, выделенный из описанного в настоящем документе отличного от человека животного.

Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения антитела, которое связывается с представляющим интерес антигеном, причем способ предусматривает (а) воздействие на описанное в настоящем документе отличное от человека животное представляющего интерес антигена, (b) выделение одного или нескольких В-лимфоцитов отличного от человека животного, причем один или несколько В-лимфоцитов экспрессируют антитело, которые связывает представляющий интерес антиген, и (с) идентификацию последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую

цепь иммуноглобулина антитела, которое связывает рассматриваемый представляющий интерес антиген, причем легкая цепь иммуноглобулина содержит домен V λ человека и не относящийся к человеку константный домен легкой цепи, и (d) использование последовательности нуклеиновой кислоты согласно (с) с последовательностью нуклеиновой кислоты константной области легкой цепи иммуноглобулина человека для получения антитела человека, которое связывает представляющий интерес антиген.

Согласно одному варианту осуществления не относящийся к человеку константная домен легкой цепи представляет собой С κ мыши. Согласно одному варианту осуществления не относящийся к человеку константный домен легкой цепи представляет собой С λ мыши. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрен фертильный самец мыши, содержащий модификацию на локусе тяжелой цепи иммуноглобулина, причем фертильный самец мыши содержит эктопическую последовательность ADAM6, которая является функциональной у самца мыши.

Эктопический ADAM6 у мышей с гуманизированной тяжелой цепью

Разработки в области нацеленного воздействия на гены, например, разработка бактериальных искусственных хромосом (BAC), в настоящее время обеспечивают возможность рекомбинации относительно больших геномных фрагментов.

Конструирование BAC предоставила возможность получения больших делеций и больших вставок в ES клетки мыши.

Мыши, которые производят человеческие антитела, были доступны уже в течение определенного времени. Хотя они представляют собой важный прогресс в разработке человеческих терапевтических антител, эти мыши проявляют ряд значительных нарушений, которые ограничивают их применимость. Например, они проявляют нарушенное развитие В-клеток. Нарушенное развитие может быть обусловлено разнообразными различиями между трансгенными мышами и мышами дикого типа.

Существует вероятность, что человеческие антитела не взаимодействуют оптимально с рецепторами пре-В-клеток или В-клеток мыши на поверхности клеток мыши, которые передают сигнал к созреванию, пролиферации или выживанию в ходе клональной селекции. Полностью человеческие антитела могут не взаимодействовать оптимально с Fc рецепторной системой мыши; мыши экспрессируют Fc рецепторы, которые не проявляют соответствия один к одному с Fc рецепторами человека. В конце концов, различные мыши, которые производят полностью человеческие антитела, не включают в себя все истинные мышинные последовательности, например, нижележащие энхансерные элементы и другие контролирующие элементы локуса, которые могут быть необходимы для развития В-клеток дикого типа.

Мыши, которые производят полностью человеческие антитела, как правило, содержат эндогенные локусы иммуноглобулина, которые являются некоторым образом недееспособными, и человеческие трансгены, которые содержат переменные и константные генные сегменты иммуноглобулина, вводят в случайное положение в геноме мыши. При условии, что эндогенный локус является достаточно недееспособным, так чтобы не реаранжировать генные сегменты для образования функционального гена иммуноглобулина, цель получения полностью человеческих антител в такой мыши может быть достигнута, хотя и с нарушенным развитием В-клеток.

Несмотря на принуждение производить полностью человеческие антитела из человеческого трансгенного локуса, образование человеческих антител у мыши является очевидно затрудненным процессом. У некоторых мышей процесс является настолько

затрудненным, что приводит к формированию химерных человеческих переменных/ мышинных константных тяжелых цепей (но не легких цепей) посредством механизма *транс*-переключения. С помощью этого механизма, транскрипты, которые кодируют полностью человеческие антитела, подвергаются переключению изотипа в

5 *транс*-конфигурации из изотипа человека на изотип мыши. Процесс происходит в *транс*-конфигурации, поскольку полностью человеческий трансген расположен в отдалении от эндогенного локуса, который сохраняет неповрежденную копию генной константной области тяжелой цепи мыши. Хотя у таких мышей *транс*-переключение очевидно выражено, явление остается недостаточным для восстановления развития В-
10 клеток, которое остается фактически нарушенным. В любом случае, *транс*-переключенные антитела, произведенные у таких мышей, сохраняют полностью человеческие легкие цепи, поскольку явление *транс*-переключения, очевидно, не происходит в отношении легких цепей; *транс*-переключение, вероятно, основано на переключении последовательностей в используемых эндогенных локусах (хотя и по-
15 другому) в переключении нормального изотипа в *цис*-конфигурации. Таким образом, даже когда мыши, сконструированные для получения полностью человеческих антител, выбирают механизм *транс*-переключения для образования антител с константными областями мыши, стратегия остается все еще недостаточной для восстановления нормального развития В-клеток.

20 Первоочередной задачей в получении основанных на антителах терапевтических средств для людей состоит в получении достаточно большого разнообразия последовательностей переменной области иммуноглобулина человека для выявления применимых переменных доменов, которые специфически распознают конкретные эпитопы и связывают их с необходимой аффинностью, как правило, но не всегда, с
25 высокой аффинностью. Перед разработкой мышей VELOCIMMUNE® (описанных в настоящем документе), не существовало ни одного указания на то, что мыши, экспрессирующие переменные области человека с константными областями мыши, будут проявлять какие-либо значительные отличия от мышей, которые образуют человеческие антитела из трансгена. Это предположение, тем не менее, было
30 неправильным.

Гуманизированные мыши VELOCIMMUNE®, которые содержат точное замещение переменных областей иммуноглобулина мыши переменными областями иммуноглобулина человека на эндогенных локусах мыши, проявляют удивительное и существенное сходство с мышами дикого типа по отношению к развитию В-клеток. В
35 удивительном и замечательном развитии мыши VELOCIMMUNE® проявили по существу нормальный ответ дикого типа на иммунизацию, который отличался только в одном существенном аспекте от мышей дикого типа мыши - переменные области, образованные в ответ на иммунизацию, являются полностью человеческими.

Мыши VELOCIMMUNE® содержат точное, крупномасштабное замещение
40 зародышевых переменных областей тяжелой цепи иммуноглобулина мыши (IgH) и легкой цепи иммуноглобулина (например, к легкой цепи, Igk) соответствующими переменными областями иммуноглобулина человека на эндогенных локусах. В общем, приблизительно шесть миллионов пар нуклеотидов мышинных локусов замещают приблизительно 1,5 миллиона пар нуклеотидов геномной последовательности человека.
45 Это точное замещение дает в результате мышь с гибридными локусами иммуноглобулина, которая образует тяжелые и легкие цепи, которые содержатся переменные области человека и константную область мыши. Точное замещение сегментов V_H-D_H-J_H и V_k-J_k мыши оставляет фланкирующие мышинные

последовательности интактными функциональными на гибридных локусах иммуноглобулина. Гуморальная иммунная система мыши функционирует как система у мыши дикого типа. Развитие В-клеток не затруднено каким-либо существенным образом, и у мыши при антигенной сенсибилизации образуется богатое разнообразие

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

Мыши VELOCIMMUNE® являются возможными, поскольку иммуноглобулиновые генные сегменты тяжелых и легких цепей реаранжируются подобным образом у людей и мышей, что не означает, что их локусы являются одинаковыми или даже приблизительно таковы - ясно, что они не такие. Тем не менее, локусы являются достаточно сходными, чтобы гуманизация переменного генного локуса тяжелой цепи могла осуществиться путем замещения приблизительно трех миллионов пар нуклеотидов смежной мышью последовательности, которая содержит все генные сегменты V_H , D_H и J_H , приблизительно одним миллионом оснований смежной геномной последовательности человека, охватывающей, в сущности, эквивалентную последовательность из локуса иммуноглобулина человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное замещение определенных генных последовательностей константной области мыши генными последовательностями человека (например, замещение последовательности C_H1 мыши последовательностью C_H1 человека и замещение последовательность C_L мыши последовательностью C_L человека) дает в результате мышей с гибридными локусами иммуноглобулина, которые образуют антитела, содержащие переменные области человека и частично константные области человека, подходящие, например, для образования полностью человеческих фрагментов антител, например, полностью человеческих Fab. Мыши с гибридными локусами иммуноглобулина проявляют нормальную реаранжировку переменных генных сегментов, нормальную соматическую гипермутацию и нормальное переключение класса. Эти мыши проявляют гуморальную иммунную систему, которая неотличима от мышей дикого типа, и демонстрируют нормальные клеточные популяции на всех стадиях развития В-клеток и нормальные структуры лимфатических органов - даже когда если у мышей отсутствует полный репертуар переменных генных сегментов человека. Иммунизация указанных мышей приводит к устойчивым гуморальным ответам, которые проявляют широкое разнообразие использования переменных генных сегментов.

Точное замещение зародышевых генных сегментов переменной области мыши обеспечивают получение мышей, которые содержат частично человеческие локусы иммуноглобулина. Поскольку частично человеческие локусы иммуноглобулина нормально реаранжируются, гипермутируют и подвергаются переключению класса, частично человеческие локусы иммуноглобулина образуют у мыши антитела, которые содержат переменные области человека. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют переменные области, могут быть установлены и клонированы, затем слиты (например, в системе *in vitro*) с любыми предпочтительными последовательностями, например, любым изотипом иммуноглобулина, подходящим для конкретного применения, давая в результате антитело или антигенсвязывающий белок, происходящий полностью из последовательностей человека.

Крупномасштабную гуманизацию с помощью способов рекомбинационных инженерии использовали для модификации мышинных эмбриональных стволовых (ES) клеток для точного замещения до трех миллионов пар нуклеотидов локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, который содержал по существу все генные сегменты

V_H , D_H и J_H мыши, эквивалентными генными сегментами человека, составляющими до одного миллиона пар нуклеотидов геномной последовательности человека, содержащей несколько или по существу все генные сегменты V_H , D_H и J_H человека. Составляющий до 0,5 миллиона пар нуклеотидов сегмент генома человека, содержащий один из двух повторов, кодирующих по существу все генные сегменты V_k и J_k человека использовали для замещения сегмента локуса к легкой цепи иммуноглобулина мыши размером 3 миллиона пар нуклеотидов, содержащего по существу все генные сегменты V_k и J_k мыши.

Мыши с такими замещенными иммуноглобулиновыми локусами могут содержать разрыв или делецию эндогенного локуса ADAM6 мыши, который в норме встречается между расположенным наиболее 3' генным сегментом V_H и наиболее 5' генным сегментом D_H на локусе тяжелой цепи иммуноглобулина мыши. Разрыв в этой области может привести к снижению или подавлению функциональности эндогенного локуса ADAM6 мыши. Если наиболее 3' генные сегменты V_H репертуара тяжелой цепи человека используют в замещении, межгенная область, содержащая псевдоген, который, по-видимому, является псевдоген ADAM6 человека, присутствует между этими генными сегментами V_H , т.е. между V_H1-2 и V_H1-6 человека. Тем не менее самцы мышей, которые содержат эту межгенную последовательность человека, проявляют снижение фертильности.

Описываются мыши, которые содержат описанные выше замещенные локусы, и которые также содержат эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую мышиный ADAM6, причем мыши проявляют по существу нормальную фертильность. Согласно одному варианту осуществления эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность ADAM6a мыши и/или ADAM6b мыши или ее функциональные фрагменты, расположенные между генным сегментом V_H1-2 человека и генным сегментом V_H6-1 человека на модифицированном эндогенном локусе тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO: 3, расположенную между V_H1-2 и V_H1-6 человека на модифицированном эндогенном локусе тяжелой цепи. Направление транскрипции генов ADAM6 SEQ ID NO: 3 является противоположным по отношению к направлению транскрипции окружающих генных сегментов V_H человека. Хотя примеры в настоящем документе демонстрируют восстановление фертильности путем размещения эктопической последовательности между указанными генными сегментами V_H человека, специалистам в настоящей области будет понятно, что размещение эктопической последовательности на любом подходящем транскрипционно пермиссивном локусе в мышинном геноме (или даже внехромосомно), как предполагается, приведет к подобному восстановлению фертильности у самца мыши.

Явление дополнения у мыши, у которой отсутствует функциональный локус ADAM6, с помощью эктопической последовательности, которая содержит ген ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент, представляет собой общий способ, который является применимым для восстановления любых мышей с нефункциональными или минимально функциональными эндогенными локусами ADAM6. Таким образом, фертильность большого количества мышей, которые содержат разрушающую ADAM6 модификацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, может быть восстановлена с помощью композиций и способов по настоящему изобретению.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает мышей с широким разнообразием модификаций локусов тяжелой цепи иммуноглобулина, которые нарушают функцию эндогенного ADAM6. Некоторые (не ограничивающие) примеры представлены в настоящем описании. В дополнение к описанным мышам

5 VELOCIMMUNE® относящиеся к ADAM6 композиции и способы могут использоваться в многочисленных применениях, например, при модификации локуса тяжелой цепи разнообразными путями.

Согласно одному аспекту предусматривается мышь, которая содержит эктопическую последовательность ADAM6, которая кодирует функциональный белок ADAM6 (или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент), замещение всех или по

10 существу всех V_H генных сегментов мыши одним или несколькими V_H генными сегментами человека, замещение всех или по существу всех генных сегментов D_H и генных сегментов J_H мыши генными сегментами D_H человека и генными сегментами J_H человека; причем у мыши отсутствует C_H1 и/или шарнирная область. Согласно

15 одному варианту осуществления мышь производит связывающий один вариабельный домен белок, который представляет собой димер иммуноглобулиновых цепей, выбранный из следующего: (a) V_H человека - C_H1 мыши - C_H2 мыши - C_H3 мыши; (b) V_H человека - шарнир мыши - C_H2 мыши - C_H3 мыши; и, (c) V_H человека - C_H2 мыши - C_H3

20 мышши.

Согласно одному аспекту нуклеотидная последовательность, которая восстанавливает фертильность, расположена в пределах последовательности вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека (например, между генными сегментами V_H1-2 и V_H1-6 человека) у мыши, которая содержит замещение

25 одного или нескольких вариабельных генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина мыши (mV_H , mD_H и/или mJ_H) одним или несколькими вариабельными генными сегментами тяжелой цепи иммуноглобулина человека (hV_H , hD_H и/или hJ_H), и мышь дополнительно содержит замещение одного или нескольких вариабельных генных

30 сегментов к легкой цепи иммуноглобулина мыши (mV_K , mJ_K) одним или несколькими вариабельными генными сегментами к легкой цепи иммуноглобулина человека (hV_K и/или hJ_K). Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность расположена между генным сегментом V_H1-2 человека и генным сегментом V_H1-6 человека у мыши VELOCIMMUNE® (патенты США №6596541 и 7105348, включенные

35 в настоящий документ посредством ссылки). Согласно одному варианту осуществления модифицированная таким образом мышь VELOCIMMUNE® содержит замещение всеми или по существу всеми вариабельными генными сегментами тяжелой цепи иммуноглобулина человека (всеми hV_H , hD_H и hJ_H) и всеми или по существу всеми

40 вариабельными генными сегментами к легкой цепи иммуноглобулина человека (hV_K и hJ_K).

Согласно одному варианту осуществления один или несколько вариабельных генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина мыши содержат приблизительно три миллиона пар нуклеотидов локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно

45 одному варианту осуществления один или несколько вариабельных генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина мыши содержат по меньшей мере 89 генных сегментов V_H , по меньшей мере 13 генных сегментов D_H , по меньшей мере четыре генных сегмента J_H или их комбинацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно одному

варианту осуществления один или несколько переменных генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека содержат приблизительно один миллион пар нуклеотидов локуса тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления один или несколько переменных генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина человека содержат по меньшей мере 80 генных сегментов V_H , по меньшей мере 27 генных сегментов D_H , по меньшей мере шесть генных сегментов J_H или их комбинацию локуса тяжелой цепи иммуноглобулина человека.

Согласно одному варианту осуществления один или несколько переменных генных сегментов к легкой цепи иммуноглобулина мыши содержат приблизительно три миллиона пар нуклеотидов локуса к легкой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно одному варианту осуществления один или несколько переменных генных сегментов к легкой цепи иммуноглобулина мыши содержат по меньшей мере 137 генных сегментов V_k , по меньшей мере пять генных сегментов J_k или их комбинацию локуса к легкой цепи иммуноглобулина мыши. Согласно одному варианту осуществления один или несколько переменных генных сегментов к легкой цепи иммуноглобулина человека содержат приблизительно 0,5 миллиона пар нуклеотидов локуса к легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько переменных генных сегментов к легкой цепи иммуноглобулина человека содержат проксимальный повтор (по отношению к константной области к иммуноглобулина) локуса к легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления один или несколько переменных генных сегментов к легкой цепи иммуноглобулина человека содержат по меньшей мере 40 генных сегментов V_k , по меньшей мере пять генных сегментов J_k или их комбинацию локуса к легкой цепи иммуноглобулина человека.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотидная последовательность расположена между двумя генными сегментами иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления два генных сегмента иммуноглобулина человека представляют собой генные сегменты тяжелой цепи.

Согласно одному аспекту функциональный локус ADAM6 мыши (или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент) присутствует в окружении генных сегментов мыши, которые присутствуют на эндогенном локусе переменной области тяжелой цепи мыши, причем указанный локус является неспособным к реаранжировке, чтобы кодировать функциональную тяжелую цепь, содержащую эндогенную константную область тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус тяжелой цепи мыши содержит по меньшей мере один и до 89 генных сегментов V_H , по меньшей мере один и до 13 генных сегментов D_H , по меньшей мере один и до четырех генных сегментов J_H и их комбинацию. Согласно различным вариантам осуществления функциональный локус ADAM6 мыши (или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент) кодирует один или несколько белков ADAM6, которые являются функциональными у мыши, причем один или несколько белков ADAM6 содержат SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или их комбинацию.

Согласно одному аспекту функциональный локус ADAM6 мыши (или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент) присутствует в окружении генных сегментов V_H человека, которые замещают эндогенные генные сегменты V_H мыши. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 89 генных сегментов V_H мыши удаляют и замещают одним или несколькими генными сегментами V_H человека,

и локус ADAM6 мыши присутствует непосредственно рядом с 3' концом генных сегментов V_H человека, или между двумя генными сегментами V_H человека. Согласно конкретному варианту осуществления локус ADAM6 мыши присутствует между двумя генными сегментами V_H в пределах приблизительно 20 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н., или kb) - приблизительно 40 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) от 3'-конца вставленных генных сегментов V_H человека. Согласно конкретному варианту осуществления локус ADAM6 мыши присутствует между двумя генными сегментами V_H в пределах приблизительно 29 т.п.н. - приблизительно 31 т.п.н. от 3' конца вставленных генных сегментов V_H человека. Согласно конкретному варианту осуществления локус ADAM6 мыши присутствует в пределах приблизительно 30 т.п.н. от 3'-конца вставленных человека V_H генные сегменты. Согласно конкретному варианту осуществления локус ADAM6 мыши присутствует в пределах приблизительно 30184 п.н. от 3' конца вставленных генных сегментов V_H человека. Согласно конкретному варианту осуществления замещение включает в себя генные сегменты V_H человека V_{H1-2} и V_{H6-1} , и локус ADAM6 мыши присутствует ниже генного сегмента V_{H1-2} и выше генного сегмента V_{H6-1} . Согласно конкретному варианту осуществления локус ADAM6 мыши присутствует между генным сегментом V_{H1-2} человека и генным сегментом V_{H6-1} человека, причем 5' - конец локуса ADAM6 мыши расположен приблизительно на 13848 п.н. от 3' конца генного сегмента V_{H1-2} человека, и 3' - конец локуса ADAM6 расположен приблизительно на 29737 п.н. 5' от генного сегмента V_{H6-1} человека. Согласно конкретному варианту осуществления локус ADAM6 мыши содержит SEQ ID NO: 3 или его фрагмент, который обеспечивает функцию ADAM6 в клетках мыши. Согласно конкретному варианту осуществления расположение генных сегментов V_H человека после этого является следующим (сверху вниз относительно направления транскрипции генных сегментов V_H человека): V_{H1-2} человека - локус ADAM6 мыши - V_{H6-1} человека. Согласно конкретному варианту осуществления псевдоген ADAM6 между V_{H1-2} человека и V_{H6-1} человека замещен локусом ADAM6 мыши. Согласно одному варианту осуществления ориентация одного или нескольких из мышинового ADAM6a и мышинового ADAM6b локуса ADAM6 мыши является противоположной относительно направления транскрипции по сравнению с ориентацией генных сегментов V_H человека.

Альтернативно, локус ADAM6 мыши расположен в межгенной области между наиболее 3' генным сегментом V_H человека и наиболее 5' генным сегментом D_H . Это может иметь место независимо от того, является ли наиболее 5' сегмент D_H мышинным или человеческим.

Аналогично, мышь, модифицированная с помощью одного или нескольких генных сегментов V_L человека (например, сегментов V_K или V_λ), замещающих все или по существу все эндогенные V_H генные сегменты мыши, может быть модифицирована так, чтобы или сохранять эндогенный локус ADAM6 мыши, как описано выше, например, путем использования нацеливающего вектора, характеризующегося расположенным ниже гомологичным плечом, которое содержит локус ADAM6 мыши или его функциональный фрагмент, или замещать поврежденный локус ADAM6 мыши эктопической последовательностью, расположенной между двумя генными сегментами V_L человека или между генными сегментами V_L человека и генным сегментом D_H (либо

человека, либо мыши, например, $V_{\lambda+m/hD_H}$), или генным сегментом J (либо человека, либо мыши, например, $V_{\kappa+J_H}$). Согласно одному варианту осуществления замещение предусматривает два или более генных сегментов V_L человека, и локус ADAM6 мыши
 5 или его функциональный фрагмент расположен между двумя наиболее 3' генными сегментами V_L . Согласно конкретному варианту осуществления расположение генных сегментов V_L человека после этого является следующим (сверху вниз относительно направления транскрипции генных сегментов человека): $V_L 3'-1$ человека - локус ADAM6
 10 мыши - $V_L 3'$ человека. Согласно одному варианту осуществления ориентация одного или нескольких из мышинового ADAM6a и мышинового ADAM6b локуса ADAM6 мыши является противоположной относительно направления транскрипции по сравнению с ориентацией V_L генных сегментов человека. Альтернативно, локус ADAM6 мыши расположен в межгенной области между наиболее 3' генным сегментом V_L человека и
 15 наиболее 5' генным сегментом D_H . Это может иметь место независимо от того, является ли наиболее 5' сегмент D_H мышинным или человеческим.

Согласно одному аспекту предусматривается мышь с замещением одного или нескольких эндогенных генных сегментов V_H мыши, и которая содержит по меньшей
 20 мере один эндогенный генный сегмент D_H мыши. У такой мыши модификация эндогенных генных сегментов V_H мыши может содержать модификацию одного или нескольких из наиболее 3' генных сегментов V_H , но не наиболее 5' генный сегмент D_H , причем нужно быть внимательным, чтобы модификация одного или нескольких наиболее
 25 3' V_H генных сегментов не разрушила эндогенный локус ADAM6 мыши или не сделала его нефункциональным. Например, согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение всех или по существу всех эндогенных V_H генных сегментов мыши одним или несколькими генными сегментами V_H человека, и мышь содержит один или
 30 несколько эндогенных генных сегментов D_H и функциональный эндогенный локус ADAM6 мыши.

Согласно другому варианту осуществления мышь содержит модификацию эндогенных наиболее 3' генных сегментов V_H мыши, и модификацию одного или нескольких
 35 эндогенных генных сегментов D_H мыши, и модификацию проводят так, чтобы сохранить целостность эндогенного локуса ADAM6 мыши до такой степени, чтобы эндогенный ADAM6 локус оставался функциональным. Согласно одному примеру такую модификацию выполняют в две стадии: (1) замещение наиболее 3' эндогенных генных сегментов V_H мыши одним или несколькими генными сегментами V_H человека с использованием нацеливающего вектора с вышележащим гомологичным плечом и
 40 нижележащим гомологичным плечом, причем нижележащее гомологичное плечо содержит весь или часть функционального локуса ADAM6 мыши; (2) затем замещение и эндогенного генного сегмента D_H мыши с помощью нацеливающего вектора, содержащего вышележащее гомологичное плечо, которое содержит весь или функциональную часть локуса ADAM6 мыши.

Согласно различным аспектам использование мышей, которые содержат эктопическую последовательность, которая кодирует белок ADAM6 мыши или его ортолог или гомолог или функциональные гомолог, является применимым, если
 45 модификации нарушают функцию эндогенного ADAM6 мыши. Вероятность разрушения

функции эндогенного ADAM6 мыши является высокой при осуществлении модификаций в отношении локусов иммуноглобулина мыши, в частности, при модификации переменных областей тяжелой цепи иммуноглобулина мыши и окружающих последовательностей. Следовательно, такие мыши представляют конкретное преимущество при получении мышей с локусами тяжелой цепи иммуноглобулина, которые подвергнуты делеции полностью или частично, которые являются гуманизированными полностью или частично или замещенными (например, V_k или V_l последовательностями) полностью или частично. Способы получения генетических модификаций, описанных для мышей, описанных ниже, известны специалистам в 5 настоящей области техники.

Мыши, содержащие эктопическую последовательность, кодирующую белок ADAM6 мыши или по существу идентичный или сходный белок, который обеспечивает улучшения фертильности белка ADAM6 мыши, являются особенно применимыми в связи с модификациями относительно переменной генной локуса тяжелой цепи 15 иммуноглобулина мыши, которые разрушают или подвергают делеции эндогенную последовательность ADAM6 мыши. Несмотря на то, что изначально описаны в связи с мышами, которые экспрессируют антитела с переменными областями человека и константными областями мыши, такие мыши применимы в отношении любых генетических модификаций, которые нарушают эндогенные гены ADAM6 мыши.

Специалистам в настоящей области понятно, что это охватывает широкое разнообразие генетически модифицированных мышей, которые содержат модификации переменных генных локусов тяжелой цепи иммуноглобулина мыши. Они предусматривают, например, мышей с делецией или замещением всех или части генных сегментов тяжелой цепи иммуноглобулина мыши, независимо от других модификаций. Не ограничивающие 25 примеры описаны ниже.

Согласно некоторым аспектам предусматриваются генетически модифицированные мыши, которые содержат эктопический ген ADAM6 мыши, грызуна или другого животного (или ортолог или гомолог или фрагмент), функциональный у мыши, и один или несколько генных сегментов переменной и/или константной области 30 иммуноглобулина человека. Согласно различным вариантам осуществления другие ортологи или гомологи или фрагменты гена ADAM6, функциональные у мыши, могут включать в себя последовательности от коров, собак, примата, кролика или другие не относящиеся к человеку последовательности.

Согласно одному аспекту предусматривается мышь, которая содержит эктопическую последовательность ADAM6, которая кодирует функциональный белок ADAM6, замещение всех или по существу всех генных сегментов V_H мыши одним или несколькими V_H генными сегментами человека; замещение всех или по существу всех генных сегментов D_H мыши одним или несколькими генными сегментами D_H человека; и 40 замещение всех или по существу всех генных сегментов J_H мыши одним или несколькими генными сегментами J_H человека.

Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение нуклеотидной последовательности C_H1 мыши нуклеотидной последовательностью C_H1 человека. Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение шарнирной нуклеотидной последовательности мыши шарнирной нуклеотидной последовательностью человека. Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение переменной локуса легкой цепи иммуноглобулина (V_L и J_L) переменным локусом легкой цепи иммуноглобулина

человека. Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит замещение нуклеотидной последовательности константной области легкой цепи иммуноглобулина мышь нуклеотидной последовательностью константной области легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления V_L , J_L и C_L представляют собой последовательности к легкой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит последовательность константной области иммуноглобулина C_{H2} мышь и C_{H3} мышь, слитую с шарнирной последовательностью человека и последовательностью C_{H1} человека, так что локусы иммуноглобулина мышь реаранжируются для образования гена, который кодирует связывающий белок, содержащий (а) тяжелую цепь, которая содержит переменную область человека, область C_{H1} человека, шарнирную область человека и область C_{H2} мышь и область C_{H3} мышь; и (б) ген, который кодирует легкую цепь иммуноглобулина, которая содержит переменный домен человека и константную область человека.

Согласно одному аспекту предусматривается мышь, которая содержит эктопическую последовательность ADAM6, которая кодирует функциональный белок ADAM6, замещение всех или по существу всех генных сегментов V_H мышь одним или несколькими генными сегментами V_L человека, и необязательно замещение всех или по существу всех генных сегментов D_H и/или генных сегментов J_H одним или несколькими генными сегментами D_H человека и/или генными сегментами J_H человека, или необязательно замещение всех или по существу всех генных сегментов D_H и генных сегментов J_H одним или несколькими генными сегментами J_L человека.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит замещение всех или по существу всех генных сегментов V_H , D_H и J_H мышь одним или несколькими V_L , одним или несколькими D_H и одним или несколькими генными сегментами J (например, J_k или J_λ), причем генные сегменты функционально связаны с эндогенной шарнирной областью мышь, причем мышь образует реаранжированный ген цепи иммуноглобулина, который содержит, от 5' к 3' в направлении транскрипции, V_L человека - D_H человека или мышь - J человека или мышь - шарнир мышь - C_{H2} мышь - C_{H3} мышь. Согласно одному варианту осуществления J область представляет собой J_k область человека. Согласно одному варианту осуществления J область представляет собой J_H область человека. Согласно одному варианту осуществления J область представляет собой J_λ область человека. Согласно одному варианту осуществления V_L область человека выбрана из V_λ области человека и V_k области человека.

Согласно конкретным вариантам осуществления мышь экспрессирует антитело с одним переменным доменом, содержащее константную область мышь или человека и переменную область, происходящую из V_k человека, D_H человека и J_k человека; V_k человека, D_H человека и J_H человека; V_λ человека, D_H человека и J_λ человека; V_λ человека, D_H человека и J_H человека; V_k человека, D_H человека и J_λ человека; V_λ человека, D_H человека и J_k человека. Согласно конкретному варианту осуществления, последовательности распознавания рекомбинации модифицируют так, чтобы обеспечить осуществление продуктивных реаранжировок между указанными генными сегментами V , D и J или между указанными генными сегментами V и J .

Согласно одному аспекту предусматривается мышь, которая содержит эктопическую последовательность ADAM6, которая кодирует функциональный белок ADAM6 (или

его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент), замещение всех или по существу всех генных сегментов V_H мыши одним или несколькими V_L генными сегментами человека, замещение всех или по существу всех генных сегментов D_H и генных сегментов J_H мыши генными сегментами J_L человека; причем у мыши отсутствует C_H1 и/или шарнирная область.

Согласно одному варианту осуществления у мыши отсутствует последовательность, кодирующая домен C_H1 . Согласно одному варианту осуществления у мыши отсутствует последовательность, кодирующая шарнирную область. Согласно одному варианту осуществления у мыши отсутствует последовательность, кодирующая домен C_H1 и шарнирную область.

Согласно конкретному варианту осуществления мышь экспрессирует связывающий белок, который содержит переменный домен легкой цепи (λ или κ) иммуноглобулина человека, слитый с доменом C_H2 мыши, который прикреплен к домену C_H3 мыши.

Согласно одному аспекту предусматривается мышь, которая содержит эктопическую последовательность ADAM6, которая кодирует функциональный белок ADAM6 (или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент), замещение всех или по существу всех генных сегментов V_H мыши одним или несколькими генными сегментами V_L человека, замещение всех или по существу всех генных сегментов D_H и J_H мыши генными сегментами J_L человека.

Согласно одному варианту осуществления мышь содержит делецию генной последовательности константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, кодирующей область C_H1 , шарнирную область, C_H1 и шарнирную область или область C_H1 и шарнирную область и область C_H2 .

Согласно одному варианту осуществления мышь образует связывающий один переменный домен белок, содержащий гомодимер, выбранный из следующего: (a) V_L человека - C_H1 мыши - C_H2 мыши - C_H3 мыши; (b) V_L человека - шарнир мыши - C_H2 мыши - C_H3 мыши; (c) V_L человека - C_H2 мыши - C_H3 мыши.

Согласно одному аспекту предусматривается мышь с недееспособным эндогенным локусом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащая недееспособный или удаленный эндогенный локус ADAM6 мыши, причем мышь содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая экспрессирует химерное антитело человека или мыши или человеческое/мышинное или другое химерное антитело. Согласно одному варианту осуществления последовательность нуклеиновой кислоты присутствует на интегрированном трансгене, который интегрирован случайным образом в геном мыши.

Согласно одному варианту осуществления мышь дополнительно содержит недееспособный эндогенный локус легкой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи иммуноглобулина выбран из локуса каппа (κ) и лямбда (λ) легкой цепи. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит недееспособный эндогенный локус κ легкой цепи и недееспособный локус λ легкой цепи, причем мышь экспрессирует антитело, которое содержит переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека и домен легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления домен легкой цепи иммуноглобулина человека выбран из домена κ легкой цепи человека и домена λ легкой цепи человека. Согласно конкретному варианту осуществления мышь содержит недееспособный эндогенный локус κ легкой цепи, причем мышь экспрессирует

антитело, которое содержит относящуюся к человеку/мышь (т.е. относящуюся к человеку переменную/относящуюся к мышь константную) тяжелую цепь иммуноглобулина и относящуюся к человеку/мышь легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен V λ человека. Согласно одному варианту осуществления относящаяся к человеку/мышь легкая цепь иммуноглобулина содержит C κ мышь. Согласно одному варианту осуществления относящаяся к человеку/мышь легкая цепь иммуноглобулина содержит C λ мышь. Согласно конкретному варианту осуществления C λ мышь представляет собой C λ 2.

Согласно одному аспекту предусмотрено генетически модифицированное животное, которое экспрессирует химерное антитело и экспрессирует белок ADAM6 или его ортолог или гомолог, который является функциональным у генетически модифицированного животного.

Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное выбрано из мышь и крысы. Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное представляет собой мышь, и белок ADAM6 или его ортолог или гомолог происходит от линии мышь, которая представляет собой линию, отличную от генетически модифицированного животного. Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное представляет собой грызуна семейства Cricetidae (например, хомяк, крыса или мышь Нового Света, полевка), и ортолог или гомолог белка ADAM6 происходит от грызуна семейства Muridae (например, настоящая мышь или крыса, карликовая песчанка, иглистая мышь, косматый хомяк). Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированное животное представляет собой грызуна семейства Muridae, и ортолог или гомолог белка ADAM6 происходит от грызуна семейства Cricetidae.

Согласно одному варианту осуществления химерное антитело содержит переменный домен человека и последовательность константной области грызуна. Согласно одному варианту осуществления грызун выбран из грызуна семейства Cricetidae и грызуна семейства Muridae, согласно конкретному варианту осуществления грызун семейства Cricetidae и семейство Muridae представляет собой мышь. Согласно конкретному варианту осуществления грызун семейства Cricetidae и семейства Muridae представляет собой крысу. Согласно одному варианту осуществления химерный антитело содержит переменный домен человека и константный домен от животного, выбранного из мышь или крысы; согласно конкретному варианту осуществления мышь или крыса выбрана из семейства Cricetidae и семейства Muridae. Согласно одному варианту осуществления химерное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи человека, переменный домен легкой цепи человека и последовательность константной области, происходящую от грызуна, выбранного из мышь и крысы, причем переменный домен тяжелой цепи человека и легкая цепь человека являются когнатными. Согласно конкретному варианту осуществления когнатный предусматривает, что переменные домены тяжелой цепи человека и легкой цепи человека происходят из одной В-клетки, которая экспрессирует переменный домен легкой цепи человека и переменный домен тяжелой цепи человека вместе, и переменные домены представляются вместе на поверхности отдельной В-клетки.

Согласно одному варианту осуществления химерное антитело экспрессируется из локуса иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления переменный домен тяжелой цепи химерного антитела экспрессируется из реаранжированного эндогенного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления переменный домен легкой цепи химерного антитела экспрессируется

из реаранжированного эндогенного локуса легкой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления вариабельный домен тяжелой цепи химерного антитела и/или вариабельный домен легкой цепи химерного антитела экспрессируется из реаранжированного трансгена (например, реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты, происходящей из нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты, интегрированной в геном животного в локус, отличный от эндогенного локуса иммуноглобулина). Согласно одному варианту осуществления вариабельный домен легкой цепи химерного антитела экспрессируется из реаранжированного трансгена (например, реаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты, происходящей из нереаранжированной последовательности нуклеиновой кислоты, интегрированной в геном животного в локус, отличный от эндогенного локуса иммуноглобулина).

Согласно конкретному варианту осуществления трансген экспрессируется из транскрипционно активного локуса, например, локуса ROSA26, например, мышинного (например, относящегося к мыши) локуса ROSA26.

Согласно одному аспекту предусмотрено отличное от человека животное, содержащее гуманизированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина, причем гуманизированный локус тяжелой цепи иммуноглобулина содержит не относящуюся к человеку последовательность ADAM6 или ее ортолог или гомолог.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой грызуна, выбранного из мыши, крысы и хомяка.

Согласно одному варианту осуществления не относящийся к человеку ортолог или гомолог ADAM6 представляет собой последовательность, которая является ортологичной и/или гомологичной последовательности ADAM6 мыши, причем ортолог или гомолог является функциональным у отличного от человека животного.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное выбрано из мыши, крысы и хомяка, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от отличного от человека животного, выбранного из мыши, крысы и хомяка. Согласно конкретному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от животного, которое выбрано из другого вида мыши, крысы и хомяка. Согласно конкретному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой крысу, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от грызуна, который выбран из другого вида крысы, мыши и хомяка. Согласно конкретному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой хомяка, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от грызуна, который выбран из другого вида хомяка, мыши и крысы.

Согласно конкретному варианту осуществления отличное от человека животное происходит из подотряда *Myomorpha*, и последовательность ADAM6 происходит от животного, выбранного из грызуна надсемейства *Dipodoidea* и грызуна надсемейства *Muroidea*. Согласно конкретному варианту осуществления грызун представляет собой мышь надсемейства *Muroidea*, и ортолог или гомолог ADAM6 происходит от мыши или крысы или хомяка надсемейства *Muroidea*.

Согласно одному варианту осуществления гуманизированный локус тяжелой цепи содержит один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько генных сегментов J_H человека.

Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько

генных сегментов J_H человека функционально связаны с одним или несколькими генами константной области человека, являющихся химерными и/или относящихся к грызуну (например, мыши или крысе). Согласно одному варианту осуществления гены константной области являются относящимися к мыши. Согласно одному варианту осуществления гены константной области являются относящимися к крысе. Согласно одному варианту осуществления гены константной области являются относящимися к хомяку. Согласно одному варианту осуществления гены константной области содержат последовательность, выбранную из шарнира, C_H2 , C_H3 и их комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления гены константной области содержат шарнир, последовательность C_H2 и C_H3 .

Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку последовательность ADAM6 является смежной с последовательностью тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку последовательность ADAM6 расположена в пределах последовательности тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина человека содержит генный сегмент V, D и/или J.

Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку последовательность ADAM6 расположена рядом с генным сегментом V. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку последовательность ADAM6 расположена между двумя генными сегментами V. Согласно одному варианту осуществления не относящаяся к человеку последовательность ADAM6 расположена рядом между генным сегментом V и генным сегментом D. Согласно одному варианту осуществления последовательность ADAM6 мыши расположена между генным сегментом V и генным сегментом J. Согласно одному варианту осуществления последовательность ADAM6 мыши расположена рядом между генным сегментом D и генным сегментом J.

Согласно одному аспекту предусмотрено генетически модифицированное отличное от человека животное, содержащее B-клетку, которая экспрессирует домен V_H человека, когнатный домену V_L человека из локуса иммуноглобулина, причем отличное от человека животное экспрессирует не относящийся к иммуноглобулину не относящийся к человеку белок из локуса иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления не относящийся к иммуноглобулину не относящийся к человеку белок представляет собой белок ADAM. Согласно конкретному варианту осуществления белок ADAM представляет собой белок ADAM6 или его гомолог или ортолог или функциональный фрагмент.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой грызуна (например, мышь или крысу). Согласно одному варианту осуществления грызун происходит из семейства Muridae. Согласно одному варианту осуществления грызун происходит из подсемейства Murinae. Согласно конкретному варианту осуществления грызун подсемейства Murinae выбран из мыши и крысы.

Согласно одному варианту осуществления не относящийся к иммуноглобулину не относящийся к человеку белок представляет собой белок грызуна. Согласно одному варианту осуществления грызун происходит из семейства Muridae. Согласно одному варианту осуществления грызун происходит из подсемейства Murinae. Согласно конкретному варианту осуществления грызун выбран из мыши, крысы и хомяка.

Согласно одному варианту осуществления домены V_H и V_L человека прикреплены

напрямую или через линкер к последовательности константного домена иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления последовательность константного домена содержит последовательность, выбранную из шарнира, C_{H2} , C_{H3} и их комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления домен V_L человека
 5 выбран из домена V_K или V_L .

Согласно одному аспекту предусмотрено генетически модифицированное отличное от человека животное, содержащее в своей зародышевой линии последовательность иммуноглобулина человека, причем сперма самца отличного от человека животного
 10 характеризуется нарушением миграции *in vivo*. Согласно одному варианту осуществления нарушение миграции *in vivo* предусматривает неспособность спермы самца отличного от человека животного мигрировать из матки через яйцевод самки отличного от человека животного того же вида. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное не содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует
 15 белок ADAM6 или его функциональный фрагмент. Согласно конкретному варианту осуществления белок ADAM6 или его функциональный фрагмент включает в себя белок ADAM6a и/или ADAM6b или его функциональные фрагменты. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой грызуна. Согласно конкретному варианту осуществления грызун выбран из мыши, крысы и хомяка.

Согласно одному аспекту предусмотрено отличное от человека животное, содержащее последовательность иммуноглобулина человека, смежную с не относящейся к человеку последовательностью, которая кодирует белок ADAM6 или его ортолог или гомолог или функциональный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой грызуна. Согласно конкретному варианту
 20 осуществления грызун выбран из мыши, крысы и хомяка.

Согласно одному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека представляет собой последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина
 30 содержит один или несколько генных сегментов V_H . Согласно одному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека содержит один или несколько генных сегментов D_H . Согласно одному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека содержит один или несколько генных сегментов J_H . Согласно одному варианту осуществления последовательность
 35 иммуноглобулина человека содержит один или несколько генных сегментов V_H , один или несколько генных сегментов D_H и один или несколько генных сегментов J_H .

Согласно одному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина содержит один или несколько генных сегментов V_H , которые характеризуются высокой частотой встречаемости в природных репертуарах человека. Согласно конкретному
 40 варианту осуществления один или несколько генных сегментов V_H содержат не более двух генных сегментов V_H , не более трех генных сегментов V_H , не более четырех генных сегментов V_H , не более пяти генных сегментов V_H , не более шести генных сегментов V_H , не более семи генных сегментов V_H , не более восьми генных сегментов V_H , не более
 45 девяти генных сегментов V_H , не более 10 генных сегментов V_H , не более 11 генных сегментов V_H , не более 12 генных сегментов V_H , не более 13 генных сегментов V_H , не более 14 генных сегментов V_H , не более 15 генных сегментов V_H , не более 16 генных

сегментов V_H , не более 17 генных сегментов V_H , не более 18 генных сегментов V_H , не более 19 генных сегментов V_H , не более 20 генных сегментов V_H , не более 21 генных сегментов V_H , не более 22 генных сегментов V_H или не более 23 генных сегментов V_H .

Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов V_H содержат пять генных сегментов V_H . Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов V_H содержат 10 генных сегментов V_H . Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов V_H содержат 15 генных сегментов V_H . Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов V_H содержат 20 генных сегментов V_H .

Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H6-1} , V_{H1-2} , V_{H1-3} , V_{H2-5} , V_{H3-7} , V_{H1-8} , V_{H3-9} , V_{H3-11} , V_{H3-13} , V_{H3-15} , V_{H3-16} , V_{H1-18} , V_{H3-20} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H1-24} , V_{H2-26} , V_{H4-28} , V_{H3-30} , V_{H4-31} , V_{H3-33} , V_{H4-34} , V_{H3-35} , V_{H3-38} , V_{H4-39} , V_{H3-43} , V_{H1-45} , V_{H1-46} , V_{H3-48} , V_{H3-49} , V_{H5-51} , V_{H3-53} , V_{H1-58} , V_{H4-59} , V_{H4-61} , V_{H3-64} , V_{H3-66} , V_{H1-69} , V_{H2-70} , V_{H3-72} , V_{H3-73} и V_{H3-74} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H1-2} , V_{H1-8} , V_{H1-18} , V_{H1-46} , V_{H1-69} , V_{H3-7} , V_{H3-9} , V_{H3-11} , V_{H3-13} , V_{H3-15} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-33} , V_{H3-43} , V_{H3-48} , V_{H4-31} , V_{H4-34} , V_{H4-39} , V_{H4-59} , V_{H5-51} и V_{H6-1} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H1-18} , V_{H1-46} , V_{H1-69} , V_{H3-7} , V_{H3-11} , V_{H3-15} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-33} , V_{H3-48} , V_{H4-34} , V_{H4-39} , V_{H4-59} и V_{H5-51} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H1-18} , V_{H1-69} , V_{H3-7} , V_{H3-11} , V_{H3-15} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-43} , V_{H3-48} , V_{H4-39} , V_{H4-59} и V_{H5-51} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H1-18} , V_{H3-11} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H4-39} и V_{H4-59} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H1-18} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} и V_{H4-39} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H1-18} , V_{H3-23} и V_{H4-39} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H3-21} , V_{H3-23} и V_{H3-30} . Согласно различным вариантам осуществления генные сегменты V_H выбраны из V_{H3-23} , V_{H3-30} и V_{H4-39} .

Согласно конкретному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 18 генных сегментов V_H , 27 генных сегментов D_H и шесть генных сегментов J_H . Согласно конкретному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 39 генных сегментов V_H , 27 генных сегментов D_H и шесть генных сегментов J_H . Согласно конкретному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 80 генных сегментов V_H , 27 генных сегментов D_H и шесть генных сегментов J_H .

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное представляет собой мышь, и мышь содержит замещение эндогенных мыши генных сегментов V_H одним или несколькими генными сегментами V_H человека, причем генные

сегменты V_H человека функционально связаны с геном области C_H мыши так, что мышшь реарранжирует генные сегменты V_H человека и экспрессирует обратную химерную тяжелую цепь иммуноглобулина, которая содержит домен V_H человека и C_H мыши.

5 Согласно одному варианту осуществления 90-100% неарранжированных генных сегментов V_H мыши замещают по меньшей мере одним неарранжированным генным сегментом V_H человека. Согласно конкретному варианту осуществления все или по существу все эндогенные генные сегменты V_H мыши замещают по меньшей мере одним неарранжированным генным сегментом V_H человека. Согласно одному варианту
10 осуществления замещение проводят с помощью по меньшей мере 19, по меньшей мере 39 или по меньшей мере 80 или 81 неарранжированного генного сегмента V_H человека. Согласно одному варианту осуществления замещение проводят с помощью по меньшей мере 12 функциональных неарранжированных генных сегментов V_H человека, по
15 меньшей мере 25 функциональных неарранжированных генных сегментов V_H человека или по меньшей мере 43 функциональных неарранжированных генных сегментов V_H человека. Согласно одному варианту осуществления мышшь содержит замещение всех сегментов D_H и J_H мыши по меньшей мере одним неарранжированным сегментом D_H человека и по меньшей мере одним неарранжированным сегментом J_H человека.
20

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один неарранжированный сегмент D_H человека выбран из 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, 7-27 и их комбинации. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один неарранжированный сегмент J_H человека выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6 и их
25 комбинации. Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов V_H человека выбраны из генного сегмента V_H человека 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 и их комбинации.

Согласно различным вариантам осуществления последовательность
30 иммуноглобулина человека находится в функциональной связи с константной областью в зародышевой линии отличного от человека животного (например, грызуна, например, мыши, крысы или хомяка). Согласно одному варианту осуществления константная область представляет собой константную область человека, химерную относящуюся
35 к человеку/мышь или химерную относящуюся к человеку/крысе или химерную относящуюся к человеку/хомяку константную область, константную область мыши, крысы или хомяка. Согласно одному варианту осуществления константная область представляет собой константную область грызуна (например, мыши или крысы или хомяка). Согласно конкретному варианту осуществления грызун представляет собой мышшь или крысу. Согласно различным вариантам осуществления константная область
40 содержит по меньшей мере домен C_H2 и домен C_H3 .

Согласно одному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека тяжелой цепи расположена на локусе тяжелой цепи иммуноглобулина в зародышевой линии отличного от человека животного (например, грызуна, например,
45 мыши или крысы или хомяка). Согласно одному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина человека тяжелой цепи расположена на не относящемся к тяжелой цепи иммуноглобулина локусе в зародышевой линии отличного от человека животного, причем не относящийся к тяжелой цепи иммуноглобулина

локус представляет собой транскрипционно активный локус. Согласно конкретному варианту осуществления не относящийся к тяжелой цепи иммуноглобулина локус представляет собой локус ROSA26.

Согласно различным аспектам отличное от человека животное дополнительно
 5 содержит последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека (например, одну или несколько нереаранжированных последовательностей легкой цепи V и J, или одну или несколько реаранжированных последовательностей VJ) в зародышевой линии отличного от человека животного. Согласно конкретному варианту осуществления последовательность иммуноглобулина легкой цепи представляет собой
 10 последовательность λ легкой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека содержит один или несколько генных сегментов V λ . Согласно одному варианту осуществления последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека содержит один или несколько генных сегментов J λ . Согласно одному варианту осуществления
 15 последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека содержит один или несколько генных сегментов V λ и один или несколько генных сегментов J λ .

Согласно конкретному варианту осуществления последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 12 генных сегментов V λ и один генный сегмент J λ . Согласно конкретному варианту осуществления последовательность
 20 легкой цепи иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 12 генных сегментов V λ и четыре генных сегмента J λ .

Согласно конкретному варианту осуществления последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 28 генных сегментов V λ и один генный сегмент J λ . Согласно конкретному варианту осуществления последовательность
 25 легкой цепи иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 28 генных сегментов V λ и четыре генных сегмента J λ .

Согласно конкретному варианту осуществления последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 40 генных сегментов V λ и один генный сегмент J λ . Согласно конкретному варианту осуществления последовательность
 30 легкой цепи иммуноглобулина человека содержит по меньшей мере 40 генных сегментов V и четыре генных сегмента J λ .

Согласно различным вариантам осуществления последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека находится в функциональной связи с константной областью в зародышевой линии отличного от человека животного (например, грызуна, например,
 35 мыши или крысы или хомяка). Согласно одному варианту осуществления константная область представляет собой константную область человека, химерную относящуюся к человеку/грызуну, константную область мыши, крысы или хомяка. Согласно конкретному варианту осуществления константная область представляет собой константную область мыши или крысы. Согласно конкретному варианту осуществления
 40 константная область представляет собой константную область к мыши (mC κ) или к константную область крысы (rC κ). Согласно конкретному варианту осуществления константная область представляет собой λ константную область мыши (mC λ) область или константную область λ крысы (rC λ). Согласно одному варианту осуществления область C λ 2 мыши представляет собой область C λ мыши.

Согласно одному варианту осуществления последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека расположена на локусе легкой цепи иммуноглобулина в зародышевой линии отличного от человека животного. Согласно конкретному варианту осуществления локус легкой цепи иммуноглобулина в зародышевой линии отличного

от человека животного представляет собой локус к легкой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления локус легкой цепи иммуноглобулина в зародышевой линии отличного от человека животного представляет собой локус λ легкой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления

5 последовательность легкой цепи иммуноглобулина человека расположена на не относящемся к легкой цепи иммуноглобулина локусе в зародышевой линии отличного от человека животного, который является транскрипционно активным. Согласно конкретному варианту осуществления не относящийся к иммуноглобулину локус представляет собой локус ROSA26.

10 Согласно одному аспекту предусмотрен способ получения антитела человека, причем антитело человека содержит переменные домены, происходящие из одной или нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты переменной области, кодируемых в клетке описанного в настоящем документе отличного от человека животного.

15 Согласно одному аспекту предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, который содержит антитело или фрагмент антитела, который происходит из одной или нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты переменной области, выделенных из описанного в настоящем документе отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления полипептид представляет собой

20 антитело. Согласно одному варианту осуществления полипептид представляет собой только тяжелую цепь антитела. Согласно одному варианту осуществления полипептид представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (например, scFv).

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанного в настоящем документе отличного от человека животного для получения антитела. Согласно

25 различным вариантам осуществления антитело содержит один или несколько переменных доменов, которые происходят из одной или нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты переменной области, выделенных из отличного от человека животного. Согласно конкретному варианту осуществления последовательности нуклеиновой кислоты переменной области содержат генные

30 сегменты тяжелой цепи иммуноглобулина. Согласно конкретному варианту осуществления последовательности нуклеиновой кислоты переменной области содержат генные сегменты легкой цепи иммуноглобулина.

Мыши, экспрессирующие переменные домены λ человека

Генетически модифицированных отличных от человека животных (например, мыши,

35 крысы и т.д.), содержащих модификацию, которая снижает фертильность вследствие потери активности белка ADAM (например, зависимой от ADAM6) могут скрещивать с описанными в настоящем документе не относящимися к человеку животными, которые содержат переменные последовательности λ человека на эндогенных не относящихся к человеку или относящихся к человеку (например, трансгенных) генов константной

40 области легкой цепи. Например, такие отличные от человека животные, как мыши или крысы, которые содержат поврежденный ген ADAM6 (или удаленный ген ADAM6), например, животные с гуманизированными локусами тяжелой цепи иммуноглобулина, комбинируют с мышами, которые содержат локус легкой цепи (эндогенный или трансгенный), который содержит сегменты λ человека и сегменты JL, соединенные с

45 генами константной области легкой цепи человека или не относящимися к человеку (например, эндогенными относящимися к мышам или крысам) генами константной области легкой цепи, причем отличные от человека животные содержат активность, которая восстанавливает зависимость от ADAM фертильность. Генетическая модификация,

которая восстанавливает зависимую ADAM фертильность, может находиться либо у отличного от человека животного, например, у мыши с гуманизированной тяжелой цепью, либо у мыши с гуманизированными λ переменными сегментами. Потомство содержит гены, которые происходят из гуманизированной тяжелой цепи (т.е. приводят к экспрессии переменного домена тяжелой цепи человека) и гуманизированного локуса легкой цепи (т.е. приводят к экспрессии переменного домена λ легкой цепи человека, слитого с относящейся к человеку или не относящейся к человеку областью λ или κ), причем животные проявляют фертильность, которая является повышенной по сравнению с мышью, которая не содержит активность ADAM6 или активность ортолога или гомолога ADAM6.

Генетически сконструированные мыши VELOCIMMUNE® содержат замещение нереаранжированных генных сегментов V(D)J на эндогенных локусах мыши генными сегментами V(D)J человека. Мыши VELOCIMMUNE® экспрессируют химерные антитела с переменными доменами человека и константными доменами мыши (смотрите, например, патент США №7605237). Большинство других работ относятся к мышам, которые экспрессируют полностью человеческие антитела из полностью человеческих трансгенов у мышей, которых содержат недееспособные эндогенные локусы иммуноглобулина.

Легкие цепи антител кодируются одним из двух отдельных локусов: каппа (κ) и лямбда (λ). Легкие цепи антител мыши преимущественно относятся к типу κ . Мыши, которые образуют мышинные антитела, и модифицированные мыши, которые образуют полностью человеческие или химерные относящиеся к человеку-мышь антитела, проявляют смещение в частоте использования легкой цепи. Для людей также характерно смещение частоты использования легких цепей, но не такая выраженная, чем у мышей; соотношение к легким цепям к λ легким цепям у мышей составляет приблизительно 95:5, тогда как у людей соотношение составляет приблизительно 60:40. Как полагают, более выраженное смещение у мышей не оказывает существенного влияния на разнообразие антител, поскольку, во-первых, у мышей переменный локус λ не является настолько разнообразным. Это не характерно для людей. Локus λ легкой цепи человека является очень разнообразным.

Локus λ легкой цепи человека охватывает свыше 1000 т.п.н. и содержит свыше 80 генов, которые кодируют переменные (V) или соединяющие (J) сегменты (фиг. 19). В пределах локуса λ легкой цепи человека свыше половины всех наблюдаемых доменов V λ кодируются генными сегментами 1-40, 1-44, 2-8, 2-14 и 3-21. В общем, полагают, что приблизительно 30 или около этого из генных сегментов V λ человека являются функциональными. Существуют семь генных сегментов J λ , только четыре из которых рассматривают в качестве функциональных генных сегментов J λ - J λ 1, J λ 2, J λ 3 и J λ 7.

Локus λ легкой цепи у людей аналогичен по структуре локусу λ как мышей, так и людей в том, что локus λ легкой цепи человека содержит несколько генных сегментов переменной области, которые способны к рекомбинации для образования функционального белка легкой цепи. Локus λ легкой цепи человека содержит приблизительно 70 генных сегментов V λ и 7 пар генных сегментов J λ -C λ . Только четыре из этих пар генных сегментов J λ -C λ оказываются функциональными. В некоторых аллелях пятая пара генных сегментов J λ -C λ , по имеющимся данным, представляет собой псевдоген (C λ 6). По-видимому, 70 генных сегментов V λ содержат 38 функциональных генных сегментов. 70 последовательностей V λ организованы в три кластера, все из которых содержат различных представителей отдельных групп генного семейства V (кластеры A, B и C; фиг. 19). Это представляет собой потенциально богатый

источник относительно неиспользованного разнообразия для создания антител с областями V человека у отличных от человека животных.

В разительно контрасте от вышеизложенного, локус λ легкой цепи мыши содержит только два или три (в зависимости от линии) генных сегмента V λ области мыши (фиг. 20). По меньшей мере по этой причине, сильное смещение к κ у мышей, как полагают, не причиняет особенного ущерба общему разнообразию антител.

Согласно опубликованным картам локуса λ легкой цепи мыши, локус состоит по существу из двух кластеров генных сегментов в пределах отрезка, составляющего приблизительно 200 т.п.н. (фиг. 20). Два кластера содержат два набора генов V, J и C, которые способны к независимой реаранжировке: V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4 и V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1. Хотя было обнаружено, что V λ 2 рекомбинируется со всеми генными сегментами J λ , оказывается, что исключительно V λ 1 рекомбинируется с C λ 1. Полагают, что C λ 4 представляет собой псевдоген с дефектными сайтами сплайсинга.

Локус κ легкой цепи мыши разительно отличается от вышеизложенного. Структура и количество генных сегментов, которые участвуют в событиях рекомбинации, приводящих к образованию функционального белка легкой цепи из локуса κ мыши, являются намного более сложными (фиг. 21). Таким образом, легкие цепи λ мыши не вносят большой вклад в разнообразие популяции антител у типичной мыши.

Использование богатого разнообразия локуса λ легкой цепи человека у мышей, вероятно, даст в результате, среди прочего, источник более полного репертуара человека доменов V легкой цепи. В предыдущих попытках освоить это разнообразие использовали трансгены человека, содержащие большие количества локусов λ легкой цепи человека, случайным образом встроенных в геном мыши (смотрите, например, патенты США №№6998514 и 7435871). Сообщают, что мыши, содержащие эти случайным образом интегрированные трансгены, экспрессируют полностью человеческие λ легкие цепи, тем не менее, в некоторых случаях, один или оба эндогенных локусов легкой цепи остаются интактными. Эта ситуация является нежелательной, поскольку последовательности легкой цепи человека конкурируют с легкой цепью (κ или λ) мыши в экспрессируемом репертуаре антител мыши.

Напротив, авторы настоящего изобретения описывают генетически модифицированных мышей, которые способны экспрессировать одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты λ легкой цепи напрямую из локуса легкой цепи мыши, включая в себя использование замещения на эндогенном локусе легкой цепи мыши. Генетически модифицированных мышей, способных экспрессировать последовательности λ легкой цепи человека из эндогенного локуса, могут дополнительно скрестить с мышами, которые содержат локус тяжелой цепи человека и, таким образом, использовать для экспрессии антител, содержащих области V (тяжелые и легкие), которые являются полностью человеческими. Согласно различным вариантам осуществления области V экспрессируются с константными областями мышей. Согласно различным вариантам осуществления эндогенные генные сегменты иммуноглобулина мыши отсутствуют, и области V экспрессируются с константными областями человека. Эти антитела нашли бы применимыми в многочисленных применениях, как диагностических, так и терапевтических.

Многие преимущества могут быть достигнуты для различных вариантов осуществления экспрессии связывающих белков, происходящих из генных сегментов V λ и J λ человека у мышей. Преимущества могут осуществляться путем помещения последовательностей λ человека на эндогенный локус легкой цепи, например, локус κ или λ мыши. Антитела, полученные от таких мышей, могут содержать легкие цепи,

которые содержат домены $V\lambda$ человека, слитые с областью C_L мыши, в частности, областью Sc или Sl мыши. Мыши также будут экспрессировать домены $V\lambda$ человека, которые являются подходящими для идентификации и клонирования для применения с областями C_L человека, в частности, областями Sc или Sl . Поскольку развитие В-клеток у таких мышей является в остальном нормальным, возможно создать совместимые домены $V\lambda$ (включающие в себя соматически мутированные домены $V\lambda$), ассоциированные или с Sl , или с Sc областями.

Описаны генетически модифицированные мыши, которые содержат нереаранжированный генный сегмент $V\lambda$ на локусе k или λ легкой цепи иммуноглобулина. Описаны мыши, которые экспрессируют антитела, которые содержат легкую цепь с доменом $V\lambda$ человека, слитым с областью Sc или Sl .

Согласно одному аспекту описано генетически модифицированное отличное от человека животное, которое содержит (1) один или несколько нереаранжированных генных сегментов $V\lambda$ человека и один или несколько нереаранжированных генных сегментов $J\lambda$ человека на эндогенном локусе легкой цепи иммуноглобулина отличного от человека животного, (2) один или несколько генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько генных сегментов J_H человека на эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина отличного от человека животного, причем отличное от человека животное способно экспрессировать белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, причем белок ADAM6 является функциональным у самца отличного от человека животного. Согласно одному аспекту описано генетически модифицированное отличное от человека животное, которое экспрессирует антитела, содержащие тяжелые цепи, которые содержат домены V_H человека и не относящиеся к человеку константные области тяжелой цепи и легкие цепи, которые содержат домены $V\lambda$ человека и не относящиеся к человеку константные области легкой цепи, причем отличные от человека животные способны экспрессировать белок ADAM6 или его функциональный фрагмент. Согласно различным вариантам осуществления отличное от человека животное представляет собой грызуна. Согласно одному варианту осуществления грызун представляет собой мышь или крысу.

Согласно одному варианту осуществления не относящийся к человеку константный домен легкой цепи представляет собой домен Sc или Sl . Согласно одному варианту осуществления белок ADAM6 или его функциональный фрагмент кодируется эктопической последовательностью в зародышевой линии мыши. Согласно одному варианту осуществления белок ADAM6 или его функциональный фрагмент кодируется эндогенной последовательностью отличного от человека животного.

Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи отличного от человека животного представляет собой локус λ легкой цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту осуществления эндогенный локус легкой цепи отличного от человека животного представляет собой локус k легкой цепи иммуноглобулина.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное не содержит эндогенный генный сегмент V_L и/или J_L на эндогенном локусе легкой цепи. Согласно конкретному варианту осуществления генный сегмент V_L и/или J_L представляют собой генный сегмент V_k и/или J_k . Согласно конкретному варианту осуществления генный сегмент V_L и/или J_L представляют собой генный сегмент $V\lambda$ и/или $J\lambda$.

Согласно одному варианту осуществления генные сегменты V_L и J_L отличного от

человека животного замещают одним или несколькими генными сегментами $V\lambda$ человека и одним или несколькими генными сегментами $J\lambda$ человека. Согласно конкретному варианту осуществления генные сегменты V_L и J_L отличного от человека животного представляют собой генные сегменты κ . Согласно конкретному варианту осуществления генные сегменты V_L и J_L отличного от человека животного представляют собой генные сегменты λ .

Согласно одному варианту осуществления один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека происходят из фрагмента кластера А локуса λ легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления фрагмент кластера А расположен от $V\lambda 3-27$ человека до $V\lambda 3-1$ человека. Согласно конкретному варианту осуществления фрагмент кластера А продолжается от $V\lambda 3-12$ человека до $J\lambda 1$ человека. Согласно одному варианту осуществления один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека происходят из фрагмента кластера В локуса λ легкой цепи иммуноглобулина человека. Согласно конкретному варианту осуществления фрагмент кластера В продолжается от $V\lambda 5-52$ человека до $V\lambda 1-40$ человека. Согласно конкретному варианту осуществления один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека происходят из фрагмента кластера А и из фрагмента кластера В описанного в настоящем документе локуса λ легкой цепи иммуноглобулина человека.

Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное содержит по меньшей мере 12 генных сегментов $V\lambda$ человека. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное содержит по меньшей мере 28 генных сегментов $V\lambda$ человека. Согласно одному варианту осуществления отличное от человека животное содержит по меньшей мере 40 генных сегментов $V\lambda$ человека.

Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один генный сегмент $J\lambda$ человека выбран из группы, состоящей из $J\lambda 1$, $J\lambda 2$, $J\lambda 3$, $J\lambda 7$ и их комбинации.

Согласно одному аспекту предусмотрен самец фертильного отличного от человека животного, причем фертильное отличное от человека животное экспрессирует (1) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую домен $V\lambda$ человека или домен $V\kappa$ человека, и (2) тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую домен V_H человека, причем самец отличного от человека животного содержит модифицированный локус варибельной области тяжелой цепи и эктопический ген ADAM6, который является функциональным у самца отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления самец отличное от человека животное представляет собой мышь.

Согласно одному аспекту предусмотрено применение описанного в настоящем документе отличного от человека животного для получения антигенсвязывающего белка. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок является относящимся к человеку. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий белок содержит домен V_H человека и/или домен $V\lambda$ человека, происходящий от описанного в настоящем документе отличного от человека животного.

Согласно одному аспекту предусмотрена клетка или ткань, происходящая от описанного в настоящем документе отличного от человека животного. Согласно одному варианту осуществления ткань происходит из селезенки, костного мозга или лимфатического узла. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой В-клетку. Согласно одному варианту осуществления клетка представляет собой эмбриональную стволовую (ES) клетку. Согласно одному варианту осуществления

клетка представляет собой зародышевую клетку.

Согласно одному аспекту предусмотрен ооцит, содержащий диплоидный геном описанного в настоящем документе генетически модифицированного отличного от человека животного.

5 **Стерильные транскрипты локуса к легкой цепи иммуноглобулина**

Вариации на тему экспрессии последовательностей λ иммуноглобулина человека у мышей отражены в различных вариантах осуществления генетически модифицированных мышей, способных к такой экспрессии. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления генетически модифицированные мыши содержат определенную(ые) не кодирующую(ие) последовательность(и) из локуса человека. Согласно одному варианту осуществления генетически модифицированная мышь содержит генные сегменты V λ и J λ человека на эндогенном локусе к легкой цепи, и дополнительно содержит геномный фрагмент к легкой цепи человека. Согласно конкретному варианту осуществления геномный фрагмент к легкой цепи человека представляет собой не кодирующую последовательность, встречающуюся в природе между генным сегментом V κ человека и генным сегментом J κ человека.

Локусы к легкой цепи человека и мышь содержат последовательности, которые кодируют стерильные транскрипты, у которых отсутствуют либо старт-кодон, либо открытая рамка считывания, и которые рассматривают в качестве элементов, которые регулируют транскрипцию локусов к легкой цепи. Эти стерильные транскрипты происходят из межгенной последовательности, расположенной ниже или 3' от наиболее проксимального генного сегмента V κ и выше или 5' от интронного энхансера к легкой цепи (E κ i), который расположен выше гена константной области к легкой цепи (C κ). Стерильные транскрипты происходят из реаранжировки межгенной последовательности для образования сегмента V κ J κ 1, слитого с C κ .

Замещение локуса к легкой цепи выше гена C κ будет удалять межгенную область, кодирующую стерильные транскрипты. Следовательно, согласно различным вариантам осуществления замещение последовательности к легкой цепи мыши выше гена C κ мыши генными сегментами λ легкой цепи человека будет давать в результате гуманизированный локус к легкой цепи мыши, который содержит генные сегменты V λ и J λ человека, но не межгенную область к легкой цепи, которая кодирует стерильные транскрипты.

Как описано в настоящем документе, гуманизация эндогенного локуса к легкой цепи мыши генными сегментами λ легкой цепи человека, причем гуманизация удаляет межгенную область, приводит к сильному снижению в частоте использования локуса к легкой цепи наряду со значительным повышением частоты использования λ легкой цепи. Следовательно, хотя гуманизированная мышь, у которой отсутствует межгенная область, является применимой в том, что она может производить антитела с переменными доменами легкой цепи человека (например, доменами λ или κ человека), частота использования из локуса снижается.

Кроме того, описана гуманизация эндогенного локуса к легкой цепи мыши с помощью генных сегментов V λ и J λ человека совместно со вставкой межгенной области к человека для создания локуса V λ , который содержит, относительно транскрипции, между последним генным сегментом V λ человека и первым генным сегментом J λ человека, межгенную область κ ; которая проявляет популяцию В-клеток с повышенной экспрессией по сравнению с локусом, который не содержит межгенную область κ . Это наблюдение согласуется с гипотезой о том, что межгенная область - напрямую через стерильный транскрипт или опосредованно - подавляет частоту использования из

эндогенного локуса λ легкой цепи. В свете этой гипотезы, введение межгенной области будет приводить к снижению частоты использования эндогенного локуса λ легкой цепи, оставляя мыши ограниченный выбор использовать модифицированный (λ в к) локус для образования антител.

5 Согласно различным вариантам осуществления замещение последовательности к легкой цепи мыши выше гена S_{κ} мыши последовательностью λ легкой цепи человека дополнительно содержит межгенную область к легкой цепи человека, расположенную, относительно транскрипции, между 3' - нетранслируемой областью от наиболее 3' генного сегмента V_{λ} и 5' по отношению к первому генному сегменту J_{λ} человека.

10 Альтернативно, такая межгенная область может быть исключена из замещенного эндогенного локуса к легкой цепи (выше гена S_{κ} мыши) путем введения делеции в эндогенный локус λ легкой цепи. Аналогично, согласно настоящему варианту осуществления мышь образует антитела из эндогенного локуса к легкой цепи, содержащего последовательности λ легкой цепи человека.

15 Подходы к конструированию мышей для экспрессии доменов V_{λ} человека

Описаны различные подходы для получения генетически модифицированных мышей, которые образуют антитела, содержащие легкую цепь, которая содержит домен V_{λ} человека, слитый с эндогенной областью C_L (например S_{κ} или C_{λ}). Описаны генетические модификации, которые согласно различным вариантам осуществления
20 содержат делецию одного или обоих эндогенных локусов легкой цепи. Например, для удаления λ легких цепей мыши из репертуара эндогенных антител может быть произведена делеция первого генного кластера V_{λ} - J_{λ} - C_{λ} и замещение, полностью или частично, генных сегментов V_{λ} - J_{λ} второго генного кластера генными сегментами V_{λ} - J_{λ} человека. Также предусмотрены генетически модифицированные зародыши мыши,
25 клетки и нацеливающие конструкторы для получения мышей, зародышей мышей и клеток.

Делеция одного эндогенного генного кластера V_{λ} - J_{λ} - C_{λ} и замещение генных сегментов V_{λ} - J_{λ} другого эндогенного генного кластера V_{λ} - J_{λ} - C_{λ} использует относительно минимальное нарушение природной ассоциации и функции константной области антитела у животного согласно различным вариантам осуществления, поскольку
30 эндогенные гены C_{λ} остаются интактными и, следовательно, сохраняют нормальную функциональность и способность ассоциироваться с константной областью эндогенной тяжелой цепи. Таким образом, согласно таким вариантам осуществления модификация не оказывает воздействия на другие эндогенные константные области тяжелой цепи, находящиеся в зависимости от функциональных константных областей легкой цепи
35 для сборки функциональной молекулы антитела, содержащей две тяжелые цепи и две легкие цепи. Кроме того, согласно различным вариантам осуществления модификация не оказывает воздействия на сборку функциональной мембраносвязанной молекулы антитела, включающей в себя эндогенную тяжелую цепь и легкую цепь, например, домен hV_{λ} , соединенный с областью C_{λ} мыши. Поскольку по меньшей мере один
40 функциональный ген C_{λ} сохраняется на эндогенном локусе, животные, содержащие замещение генных сегментов V_{λ} - J_{λ} эндогенного генного кластера V_{λ} - J_{λ} - C_{λ} генными сегментами V_{λ} - J_{λ} человека, должны быть способными получить нормальные λ легкие цепи, которые способны связывать антиген в ходе иммунного ответа посредством генных сегментов V_{λ} - J_{λ} человека, присутствующих в экспрессированном репертуаре
45 антител животного.

Схематическое изображение (без соблюдения масштаба) удаленного эндогенного генного кластера V_{λ} - J_{λ} - C_{λ} мыши представлено на фиг. 20. Как показано, локус λ легкой цепи мыши организован в два генных кластера, оба из которых содержат

функциональные генные сегменты, способные рекомбинироваться для образования функциональной λ легкой цепи мыши. Эндогенный генный кластер V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1 мыши удаляют с помощью нацеливающего конструкта (нацеливающий вектор 1) с неомициновой кассетой, фланкированной сайтами рекомбинации. Другой эндогенный

5 генный кластер (V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4) удаляют частично с помощью нацеливающего конструкта (нацеливающий вектор 2) с кассетой гиромидина-тимидинкиназы, фланкированной сайтами рекомбинации. В этом втором событии нацеленного воздействия сохраняют эндогенные генные сегменты C λ 2-J λ 4-C λ 4. Второй нацеливающий

10 конструкт (нацеливающий вектор 2) конструируют с использованием сайтов рекомбинации, которые отличаются от таковых в первом нацеливающем конструкте (нацеливающий вектор 1), тем самым предоставляя возможность для селективной делеции кассеты селекции после достижения успешного нацеленного воздействия. Полученный дважды нацеленный локус является функционально выключенным в том, что эндогенная λ легкая цепь не может быть произведена. Этот модифицированный

15 локус может использоваться для вставки генных сегментов V λ и J λ человека для создания эндогенного локуса λ мыши, содержащего генные сегменты V λ и J λ человека, посредством чего при рекомбинации на модифицированном локусе животное производит λ легкие цепи, содержащие реаранжированные генные сегменты V λ и J λ человека, соединенные с эндогенным генным сегментом C λ мыши.

20 Генетически модифицируя мышь для того, чтобы сделать эндогенные генные сегменты λ нефункциональными согласно различным вариантам осуществления приводит в результате к мыши, которая проявляет исключительно λ легкие цепи в своем репертуаре антител, делая мышь применимой для оценки роли λ легких цепей в иммунном ответе, и применимой для получения репертуара антител, содержащих домены V κ , но не домены

25 V λ .

Генетически модифицированная мышь, которая экспрессирует hV λ , соединенный с геном C λ мыши, рекомбинирующий на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши, может быть получена любым способом, известным в настоящей области техники.

Схематическое изображение (без соблюдения масштаба) замещения эндогенных генных

30 сегментов V λ 2-V λ 3-J λ 2 мыши генными сегментами V λ и J λ человека представлено на фиг. 22A. Как показано, эндогенный локус λ легкой цепи мыши, который был сделан нефункциональным, замещают с помощью нацеливающего конструкта (12/1- λ нацеливающего вектора), который включает в себя кассету неомицина, фланкированную сайтами рекомбинации. Генные сегменты V λ 2-V λ 3-J λ 2 замещают геномным фрагментом,

35 содержащим последовательность λ человека, которая включает в себя 12 генных сегментов hV λ и один генный сегмент hJ λ .

Таким образом, этот первый подход помещает один или несколько генных сегментов hV λ на эндогенный локус λ легкой цепи смежно с одним генным сегментом J λ (фиг. 22A).

40 Дополнительные модификации в модифицированном эндогенном локусе λ легкой цепи могут быть достигнуты с использованием аналогичных техник, чтобы вставить больше генных сегментов hV λ . Например, схематические изображения двух дополнительных нацеливающих конструктов (+16- λ и +12- λ нацеливающие векторы), используемых для последовательной вставки дополнительных генных сегментов hV λ

45 человека представлены на фиг. 23A. Как показано, дополнительные геномные фрагменты, содержащие конкретные генные сегменты hV λ человека, вставляют в модифицированный эндогенный локус λ легкой цепи в течение последовательных стадий с использованием гомологии, обеспеченной предыдущей вставкой последовательностей

λ легкой цепи человека. При рекомбинации с каждым проиллюстрированным нацеливающим конструктором последовательным образом 28 дополнительных генных сегментов hVλ вставляют в модифицированный эндогенный локус λ легкой цепи. Это создает химерный локус, который производит белок λ легкой цепи, который содержит

5 генные сегменты Vλ-Jλ человека, соединенные с геном Cλ мыши.

Описанные выше подходы для вставки генных сегментов λ легкой цепи человека на локус λ мыши сохраняют энхансеры, расположенные ниже генных сегментов Cλ2-Jλ4-Cλ4 (обозначенные Энхансер 2.4, Энхансер и Энхансер 3.1 на фиг. 22А и фиг. 23А).

Этот подход дает в результате один модифицированный аллель на эндогенном локусе

10 λ легкой цепи мыши (фиг. 25А).

Предусмотрены композиции и способы получения мыши, которая экспрессирует легкую цепь, содержащую генные сегменты hVλ и Jλ, функционально связанные с генным сегментом мыши Cλ, включая в себя композиции и способ получения мыши, которая экспрессирует такие гены из эндогенного локуса λ легкой цепи мыши. Способы

15 включают в себя селективное приведение одного эндогенного генного кластера Vλ-Jλ-Cλ мыши в нефункциональное состояние (например, путем нацеленной делеции), и использование генных сегментов hVλ и Jλ на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши для экспрессии домена hVλ у мыши.

Альтернативно, во втором подходе генные сегменты λ легкой цепи человека могут

20 быть расположены на эндогенном локусе к легкой цепи. Генетическая модификация согласно различным вариантам осуществления содержит делецию эндогенного локуса к легкой цепи. Например, для удаления к легких цепей мыши из эндогенного репертуара антител может быть произведена делеция генных сегментов Vκ и Jκ мыши. Также предусмотрены генетически модифицированные зародыши мыши, клетки и

25 нацеливающие конструкторы для получения мышей, зародышей мышей и клеток.

Для указанных выше целей делеция генных сегментов Vκ и Jκ мыши использует относительно минимальное нарушение. Схематическое изображение (без соблюдения

масштаба) удаленных генных сегментов Vκ и Jκ мыши представлено на фиг. 21.

Эндогенные генные сегменты Vκ и Jκ мыши удаляют посредством опосредованной

30 рекомбиназой делеции положения последовательностей мышей, между двумя точно расположенными нацеливающими векторами, каждый из которых использует сайты сайт-специфической рекомбинации. Первый нацеливающий вектор (Jκ нацеливающий вектор) используют в первом событии нацеленного воздействия для удаления генных сегментов Jκ мыши. Второй нацеливающий вектор (Vκ нацеливающий вектор)

35 используют во втором последующем событии нацеленного воздействия для удаления последовательности, расположенной 5' от наиболее дистального генного сегмента Vκ мыши. Оба нацеливающих вектора содержат сайты сайт-специфической рекомбинации, тем самым предоставляя возможность для селективной делеции обеих кассет селекции и всех промежуточных последовательностей к легкой цепи мыши после достижения

40 успешного нацеленного воздействия. Полученный удаленный локус является функционально выключенным в том, что не может быть произведена никакая эндогенная к легкой цепи. Этот модифицированный локус может использоваться для вставки генных сегментов hVλ и Jλ для создания эндогенного локуса к мыши, содержащего генные сегменты hVλ и Jλ, посредством чего при рекомбинации на

45 модифицированном локусе животное производит λ легкие цепи, содержащие реаранжированные генные сегменты hVλ и Jλ, функционально связанные с эндогенным генным сегментом Cκ мыши. Различные нацеливающие векторы, содержащие последовательности λ легкой цепи человека могут использоваться в сочетании с этим

удаленным локусом к мыши для создания гибридного локуса легкой цепи, содержащего генные сегменты λ человека, функционально связанные с областью С_к мыши.

Таким образом, второй подход помещает один или несколько генных сегментов V λ человека на локус к легкой цепи мыши смежно с одним генным сегментом J λ человека (12/1-к нацеливающий вектор, фиг. 22В).

Согласно различным вариантам осуществления могут быть произведены модификации в этом подходе для добавления генных сегментов и/или регуляторных последовательностей для оптимизации частоты использования последовательностей λ легкой цепи человека из локуса к мыши в репертуаре антител мыши.

Согласно третьему подходу один или несколько генных сегментов hV λ размещают на локусе к легкой цепи мыши смежно с четырьмя генными последовательностями hJ λ (12/4-к нацеливающий вектор на фиг. 22В).

Согласно третьему подходу один или несколько генных сегментов hV λ размещают на локусе к легкой цепи мыши смежно с межгенной последовательностью к человека и одной генной последовательностью hJ λ (12(к)1-к нацеливающий вектор, фиг. 22В).

Согласно четвертому подходу один или несколько генных сегментов hV λ размещают на локусе к легкой цепи мыши смежно с межгенной последовательностью к человека и четырьмя генными последовательностями hJ λ (12(к)4-к нацеливающий вектор фиг. 22В).

Все описанные выше подходы для вставки генных сегментов λ легкой цепи человека на локус к мыши сохраняют интронный энхансерный элемент к выше гена С_к (обозначенный как Е_{к1}, фиг. 22В и фиг. 23В) и 3' к энхансер ниже гена С_к (обозначенный как Е_{к3'}, фиг. 22В и фиг. 23В). Подходы дают в результате четыре отдельных модифицированных аллеля на эндогенном локусе к легкой цепи мыши (фиг. 25В).

Согласно различным вариантам осуществления генетически модифицированная мышь содержит нокаут эндогенного локуса λ легкой цепи мыши. Согласно одному варианту осуществления локус λ легкой цепи нокаутируют с помощью стратегии, которая удаляет область, расположенную от V λ 2 до J λ 2, и область, расположенную от V λ 1 до С λ 1 (фиг. 20). Любая стратегия, которая снижает или устраняет способность эндогенного локуса λ легкой цепи экспрессировать эндогенные λ домены, является подходящей для применения в соответствии с вариантами осуществления настоящего раскрытия.

Антитела с лямбда-доменом от генетически модифицированных мышей

Мыши, содержащие последовательности λ человека либо на локусе к легкой цепи мыши, либо на локусе λ легкой цепи мыши, будут экспрессировать легкую цепь, которая содержит область hV λ , слитую с областью С_L мыши (С_к или С_L). Их предпочтительно скрещивают с мышами, которые (а) содержат функционально выключенный локус легкой цепи (например, нокаут эндогенного локуса к или λ легкой цепи); мыши (b) содержат эндогенный локус λ легкой цепи мыши, который содержит генные сегменты hV λ и hJ λ , функционально связанные с эндогенным геном С_L мыши; (с) содержат эндогенный локус к легкой цепи мыши, который содержит генные сегменты hV_к и hV_к, функционально связанные с эндогенным геном С_к мыши; и, (d) мышью, у которой один аллель к содержит hV_к и hV_к; другой аллель к, содержащий hV λ и hV λ ; один аллель λ , содержащий hV λ и hV λ и один аллель λ , выключенный или нокаутированный, или оба аллеля λ , содержащие hV λ и hJ λ ; и два аллеля тяжелой цепи, каждый из которых содержат hV_H, hD_H и hJ_H.

Антитела, которые содержат домены hV λ , экспрессированные в ассоциации либо с С_к, либо с С_L, использовали для получения полностью человеческих антител путем

клонирования нуклеиновых кислот, кодирующих домены hV λ в конструкции экспрессии, которые несут гены, кодирующие C λ человека. Полученные конструкции экспрессии трансфектируют в подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител, которые проявляют полный домен hV λ , слитый с hC λ .

5 ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предусмотрены для описания получения и применения способов и композиций согласно настоящему изобретению, и не предусмотрены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают как свое изобретение. Если не указано иное, температура указана в градусах Цельсия и давление равно или

10 Пример 1. Гуманизация генов иммуноглобулина мыши

Бактериальные искусственные хромосомы (BAC) человека и мыши использовали для конструирования 13 различных основанных на BAC нацеливающих векторов (BACves) для гуманизации локусов тяжелой цепи и к легкой цепи иммуноглобулина

15 мыши. На таблицах 1 и 2 представлены подробные описания стадий, проведенных для конструкции всех BACves, используемых для гуманизации локусов тяжелой цепи и к легкой цепи иммуноглобулина мыши, соответственно.

Определение BAC человека и мыши. BAC мыши, которые охватывают 5' и 3' концы локусов тяжелой цепи и к легкой цепи иммуноглобулина, определяли путем гибридизации

20 фильтров, на которые точечно наносили библиотеку BAC, или путем скрининга с помощью ПЦР пулов ДНК библиотеки BAC мыши. Фильтры гибридизировали при стандартных условиях с использованием зондов, которые соответствовали представляющим интерес областям. Пулы библиотеки подвергали скринингу путем ПЦР с использованием пар уникальных праймеров, которые фланкируют целевую

25 представляющую интерес область. Дополнительную ПЦР с использованием тех же праймеров проводили для деконволюции данной лунки и выделения соответствующей представляющей интерес BAC. Как фильтры BAC, так и пулы библиотеки создавали из ES клеток 129 SvJ мыши (Incyte Genomics/Invitrogen). BAC человека, которые охватывают все целые локусы тяжелой цепи и к легкой цепи иммуноглобулина

30 определяли или с помощью гибридизации фильтров, на которые точечно наносили библиотеку BAC (библиотеки Caltech B, C или D и библиотека RPCI-11, Research Genetics/Invitrogen) посредством скрининга пулов библиотеки BAC человека (библиотека Caltech, Invitrogen) с помощью основанного на ПЦР способа или с использованием баз данных концевых последовательностей BAC (библиотека Caltech D, TIGR).

35 Конструкция BACves с помощью бактериальной гомологичной рекомбинации и лигирования. Бактериальную гомологичную рекомбинацию (BHR) проводили, как описано (Valenzuela et al., 2003; Zhang, Y., Buchholz, F., Muylers, J.P., and Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nat Genet 20, 123-128). В большинстве случаев линейные фрагменты создавали путем лигирования

40 полученных с помощью ПЦР гомологичных фрагментов с клонированными кассетами с последующим выделением с использованием геля продуктов лигирования и электропорации в BHR-компетентные бактерии, содержащие целевую BAC. После селекции на чашках Петри с соответствующим антибиотиком, правильно рекомбинированные BAC определяли с помощью ПЦР в обоих новых участках

45 соединения с последующим рестрикционным анализом на гелях в пульсирующем поле (Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75) и выборочной проверкой с помощью ПЦР с использованием праймеров, распределенных в последовательностях человека.

3hV_H ВАС_{вес} конструировали с использованием трех последовательных стадий ВНР для начальной стадии гуманизации локуса тяжелой цепи иммуноглобулина (фиг. 4А и таблица 1). На первой стадии (стадия 1) кассету вводили в родительскую ВАС человека выше против хода транскрипции от генного сегмента V_H1-3 человека, который содержит

5 область гомологии с локусом тяжелой цепи иммуноглобулина мыши (HВ1), ген, который обеспечивает устойчивость к канамицину у бактерий и устойчивость к G418 у клеток животных (kanR) и сайт сайт-специфической рекомбинации (например, loxP). На второй

10 стадии (стадия 2), вторую кассету вводили сразу ниже по ходу транскрипции от последнего J_H сегмента, который содержит вторую область гомологии с локусом тяжелой цепи иммуноглобулина мыши (HВ2) и ген, который обеспечивает устойчивость бактерий к спектиномицину (specR). Эта вторая стадия предусматривала делецию последовательностей локуса тяжелой цепи иммуноглобулина человека ниже по ходу транскрипции от J_H6 и ген устойчивости к хлорамфениколу из вектора ВАС (cmR). На

15 третьей стадии (стадия 3) дважды модифицированную ВАС человека (В1) затем линеаризировали с использованием сайтов ICeuI, которые добавляли в ходе первых двух стадий и интегрировали в ВАС мыши (В2) с помощью ВНР через две области гомологии (HВ1 и HВ2). Отборы по чувствительности к лекарственным средствам для первой (cm/kan), второй (spec/kan) и третьей (cm/kan) стадий разрабатывали так, чтобы

20 они были специфическими для необходимых продуктов. Модифицированные клоны ВАС анализировала с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) после обработки рестрикционных ферментов для определения приемлемой конструкции (фиг. 4В).

Аналогичным образом, 12 дополнительных ВАС_{вес} сконструировали для гуманизации

25 локусов тяжелой цепи и к легкой цепи. В некоторых случаях лигирование ВАС проводили вместо ВНР для сочетания двух больших ВАС посредством введения редких сайтов рестрикции в оба родительских ВАС_{вес} с помощью ВНР наряду с точным размещением селективируемых маркеров. Это обеспечивает выживание необходимого продукта лигирования при селекции с помощью маркерных комбинаций специфических

30 лекарственных средств. Рекомбинантные ВАС, полученные путем лигирования после обработки с помощью редких рестрикционных ферментов, определяли и подвергали скринингу способом, аналогичным для ВАС, полученных с помощью ВНР (как описано выше).

ТАБЛИЦА 1

BACvec	Стадия	Описание	Способ
3hV _H	1	Вставить гомологичный фрагмент мыши выше против хода транскрипции в проксимальный BAC CTD-2572o2 человека	BHR
	2	Вставить гомологичный фрагмент мыши ниже по ходу транскрипции в проксимальный BAC CTD-2572o2 человека	BHR
	3	Вставить 3hV _H /27hD _H /9hJ _H в проксимальный BAC CT7-302a07 мыши для создания 3hV _H BACvec	BHR
DC	1	Вставить кассету на дистальный конец локуса IgH мыши с использованием BAC CT7-253i20 мыши	BHR
18hV _H	1	Вставить маркер specR на нижележащий конец вставки 3hV _H с использованием BAC CTD-2572o2 человека	BHR
	2	Вставить сайты ICeuI и Not, фланкирующих ригор на вышележащий конец вставки 3hV _H	BHR
	3	Вставить сайт Not на нижележащий конец Rel2-408p02 BAC (≈10 т.п.н. ниже по ходу транскрипции V _H 2-5)	BHR
	4	Вставить сайт I-CeuI на вышележащий конец Rel2-408p02 BAC (≈23 т.п.н. выше против хода транскрипции V _H 1-18)	BHR
	5	Лигировать 184 т.п.н. фрагмент из стадии 4 в 153 т.п.н. вектор из стадии 2	Лигирование
	6	Отрегулировать гомологию человека из CTD-2572o2 BAC, удаляя ≈85 т.п.н. и оставляя 65 т.п.н. гомологии с 3hV _H	BHR
	7	Вставить кассету и сайт Not на дистальный конец локуса IgH мыши в CT7-253i20 BAC	BHR
	8	Субклонировать дистальное гомологичное плечо мыши для вставки выше против хода транскрипции из BAC человека	Лигирование

	9	Вставить 20 т.п.н. плеча мыши выше против хода транскрипции Rel2-408p02	BHR
	10	Поменять кассету селекции с hygR на neoR для создания 18hV _H BACvec	BHR
5	39hV _H	1 Вставить сайты ICeul и PISceI, фланкирующие hygR, в дистальный конец BAC CTD-2534n10 человека	BHR
10		2 Вставить CmR на проксимальный конец CTD-2534n10 BAC для обеспечения селекции для лигирования с RP11-72n10 BAC	BHR
		3 Вставить сайт PISceI в RP11-72n10 BAC для лигирования с CTD-2534n10 BAC	BHR
15		4 Вставить сайты ICeul и AscI, фланкирующие puoR, на дистальный конец RP11-72n10 BAC	BHR
		5 Лигировать 161 т.п.н. фрагмент из конструктора стадии 4 в конструктор стадии 2, замещая hygR	Лигирование
20		6 Вставить сайт neoR и AscI на проксимальный конец дистального гомологичного плеча мыши с использованием CT7-253i20 BAC	BHR
		7 Вставить сайт specR и ICeul на дистальный конец дистального гомологичного плеча мыши	BHR
25		8 Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши со вставкой человека из стадии 5	Лигирование
		9 Поменять кассету селекции с neo на hyg с использованием UbCp и pA в качестве гомологичных фрагментов для создания 39hV _H BACvec	BHR
30	53hV _H	1 Вставить specR на проксимальный конец CTD-3074b5 BAC человека	BHR
		2 Вставить сайт AscI на дистальный конец CTD-3074b5 BAC человека	BHR
		3 Вставить сайт hygR и AscI на проксимальный конец дистального гомологичного плеча мыши с использованием CT7-253i20 BAC	BHR
35		4 Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши с конструктором из стадии 2	Лигирование
		5 Поменять кассету селекции с hyg на neo с использованием UbCp и pA в качестве гомологичных фрагментов для создания 53hV _H BACvec	BHR
40	70hV _H	1 Вставить сайты PISceI и ICeul, фланкирующие spec, на дистальный конец CTD-2195p5 BAC человека	BHR
		2 Вставить сайт ICeul на проксимальный конец RP11-926p12 BAC для лигирования с CTD-2195p5 BAC	BHR
45		3 Вставить сайты PISceI и AscI на дистальный конец RP11-926p12 BAC для лигирования плеча мыши	BHR

5	4	Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши с конструктором из стадии 3	Лигирова ние
	5	Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши и hlgH фрагмент из RP11-926p12 BAC с CTD-2195p5 BAC для создания 70 hV _H BACvec	Лигирова ние
10	1	Вставить сайты ICeul и AscI, фланкирующие hygR, на дистальный конец CTD-2313e3 BAC	BHR
	2	Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши с CTD-2313e3 BAC человека из стадии 1 для создания 80hV _H BACvec	Лигирова ние

ТАБЛИЦА 2

ВАСvec	Ста дия	Описание	Способ
Igk-PC	1	Вставить сайт loxP в интрон J-C мыши с использованием CT7-254m04 BAC	BHR
Igk-DC	1	Вставить сайт loxP на дистальный конец локус IgK мыши с использованием CT7-302g12 BAC	BHR
6hV _K	1	Вставить сайт PISceI ≈400 п.н. ниже по ходу транскрипции от hJκ5 in CTD-2366j12 BAC	BHR
	2	Вставить сайты ICeul и AscI, фланкирующие hygR, на дистальный конец CTD-2366j12 BAC	BHR
	3	Вставить сайты ICeul и PISceI, фланкирующие puoR, ≈xx п.н. ниже по ходу транскрипции от mJκx с использованием CT7-254m04 BAC	BHR
	4	Вставить hIgVκ/Jκ выше против хода транскрипции от Enhκ/Cκ мыши с использованием конструктора из стадии 3	Лигиров ание
	5	Заменить cmR в конструкторе стадии 4 с помощью specR	BHR
	6	Вставить кассету селекции Neo на дистальный конец локуса Igk мыши с использованием CT7-302g12 BAC	BHR
	7	Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши выше против хода транскрипции вставки человека в конструкторе стадии 6 для создания 6hV _K BACvec	Лигиров ание
16hV _K	1	Вставить NeoR на дистальный конец RP11-1061b13 BAC	BHR
	2	Заменить cmR в конструкторе стадии 1 с помощью specR	BHR
	3	Вставить кассету селекции Hvg на дистальный конец локуса мыши Igk с использованием CT7-302g12 BAC	BHR
	4	Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши выше против хода транскрипции вставки человека из конструктора стадии 2 для создания 16hV _K BACvec	Лигиров ание
30hV _K	1	Вставить HvgR на дистальный конец RP11-99g6 BAC	BHR
	2	Заменить cmR в конструкторе стадии 1 с помощью specR	BHR

5	3	Вставить кассету селекции Neo на дистальный конец локуса Igk мыши с использованием CT7-302g12 BAC	BHR
	4	Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши выше против хода транскрипции вставки человека из конструкта стадии 2 для создания 30hV _κ BACvec	Лигирование
10	1	Вставить NeoR на дистальный конец локуса hIgH в CTD-2559d6 BAC	BHR
	2	Заменить cmR в конструкте стадии 1 с помощью specR	BHR
	3	Лигировать дистальное гомологичное плечо мыши выше против хода транскрипции локуса hIgH в конструкте стадии 2 для создания 40hV _κ BACvec	Лигирование

Модификация эмбриональных стволовых (ES) клеток и создание мышей. Нацеленное воздействие на ES клетки (F1H4) проводили с использованием способа генной инженерии VELOCIGENE®, как описано (Valenzuela *et al.*, 2003). Получение мышей из модифицированных ES клеток либо с помощью инъекции бластоцисты (Valenzuela *et al.*, 2003), либо инъекции 8 клеток (Poueymirou *et al.*, 2007) соответствовало описанному. Нацеленные ES клетки и мышей подтверждали с помощью скрининга ДНК из ES клеток или мышей с помощью уникальных наборов зондов и праймеров в основанном на ПЦР анализе (например, фиг. 3А, 3В и 3С). Все исследования на мышах проводились под наблюдением и были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Regeneron (IACUC).

Анализ кариотипа и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Анализ кариотипа проводили с помощью Coriell Cell Repositories (Coriell Institute for Medical Research, Камден, Нью-Джерси). FISH проводили на нацеленных ES клетках, как описано (Valenzuela *et al.*, 2003). Зонды, соответствующие либо ДНК BAC мыши, либо ДНК BAC человека, метили с помощью ник-трансляции (Invitrogen) с помощью флуоресцентно меченых dUTP нуклеотидов оранжевого или зеленого спектра (Vysis).

Вариабельный генный locus тяжелой цепи иммуноглобулина. Гуманизацию вариабельной области локуса тяжелой цепи выполняли за девять последовательных стадий путем прямого замещения приблизительно трех миллионов пар нуклеотидов (Mb) смежной геномной последовательности мыши, содержащей все генные сегменты V_H, D_H и J_H, приблизительно одной Mb смежной геномной последовательности человека, содержащей эквивалентные генные сегменты человека (фиг. 1А и таблица 1) с использованием VELOCIGENE® технология генной инженерии (смотрите, например, патент США №6586251 и Valenzuela *et al.*, 2003).

Интрон между генными сегментами J_H и генами константной области (интрон J-C) содержит транскрипционный энхансер (Neuberger, M.S. (1983) Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *Embo J* 2, 1373-1378), за которым следует область простых повторов, необходимых для рекомбинации в ходе переключения изотипа (Kataoka, T, Kawakami, T., Takahashi, N., and Honjo, T. (1980). Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 919-923). Участок соединения между областью V_H-D_H-J_H человека и C_H областью мыши (проксимальный участок соединения) выбирали для сохранения интронного энхансера тяжелой цепи мыши и переключения домена для сохранения как эффективной экспрессии, так и переключения класса гуманизированного локуса тяжелой цепи у мыши. Определение точного положения нуклеотидов этого и

последующих участков соединения во всех замещениях было возможным путем использования способа генной инженерии VELOCIGENE® (*ранее*), который использовал бактериальную гомологичную рекомбинацию, управляемую синтезированными олигонуклеотидами. Таким образом, проксимальный участок соединения располагали приблизительно на 200 п.н. ниже по ходу транскрипции от последнего генного сегмента J_H и дистальный участок соединения располагали на несколько сотен выше против хода транскрипции от наиболее 5' генного сегмента V_H локуса человека и приблизительно на 9 т.п.н. ниже по ходу транскрипции от генного сегмента V_H1-86 мыши, также известного как J558.55. Генный сегмент V_H1-86 (J558.55) мыши представляет собой наиболее дистальный вариабельный генный сегмент тяжелой цепи, который, как сообщается, представляет собой псевдоген у C57BL/6 мышей, но является потенциально активным, хотя и со слабой последовательностью RSS, в нацеленном 129 аллеле. Дистальный конец локуса тяжелой цепи мыши, как сообщается, может содержать контрольные элементы, которые регулируют экспрессию и/или реаранжировку локуса (Pawlitzky *et al.*, 2006).

Первую вставку последовательности ДНК иммуноглобулина человека в мышь осуществляли с использованием 144 т.п.н. проксимального конца локуса тяжелой цепи человека, содержащего 3 V_H, все 27 D_H и 9 J_H генных сегментов человека, вставленных в проксимальный конец локус IgH мыши, с сопутствующей 16,6 т.п.н. делецией геномной последовательности мыши с использованием приблизительно 75 т.п.н. гомологичных плечей мыши (стадия А, фиг. 2А; таблицы 1 и 3, 3hV_H). Эту большую 144 т.п.н. вставку и сопутствующую 16,6 т.п.н. делецию проводили в одной стадии (стадия А), которая происходила с частотой, составляющей 0,2% (таблица 3). Правильно нацеленные ES клетки подсчитывали с помощью анализа потери нативного аллеля (LONA) (Valenzuela *et al.*, 2003) с использованием зондов в пределах удаленной последовательности мыши и фланкирующих ее и в пределах вставленной последовательности человека, и целостность большой вставки человека подтверждали с использованием множественных зондов, охватывающих всю вставку (фиг. 3А, 3В и 3С). Поскольку предполагали много циклов последовательного нацеленного воздействия на ES клетки, нацеленные ES клеточные клоны на этой и всех последующих стадиях подвергали кариотипическому анализу (*ранее*) и только те клоны, которые показывали нормальные кариотипы меньшей мере в 17 из 20 выборок использовали для последующих стадий.

Нацеленные ES клетки из стадии А подвергали повторному нацеленному воздействию с помощью BAC_{ves}, который производил 19 т.п.н. делецию на дистальном конце локуса тяжелой цепи (стадия В, фиг. 2А). BAC_{ves} стадии В содержал ген устойчивости к гигромицину (*hyg*) в отличие от гена устойчивости к неомицину (*neo*), содержащегося на BAC_{ves} стадии А. Гены устойчивости из двух BAC_{ves} разработали так, чтобы при успешном нацеленном воздействии на одну и ту же хромосому, приблизительно три Mb вариабельного генного локуса тяжелой цепи мыши, содержащего все генные сегменты V_H мыши, отличные от V_H1-86 и все генные сегменты D_H, отличные от DQ52, а также два гена устойчивости, фланкировали с помощью сайтов *loxP*; DQ52 и все генные сегменты J_H цепи мыши удаляли на стадии А. ES клеточные клоны, дважды нацеленные на одну и ту же хромосому, определяли, приводя проксимальную кассету 3hV_H к гомозиготности в клетках с высоким содержанием G418 (Mortensen, R.M. *et al.* (1992) Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol Cell Biol* 12:2391-239) и следуя направлению дистальной кассеты *hyg*. Сегменты мыши

размером до четырех Mb, модифицированные таким образом, чтобы фланкироваться сайтами loxP, успешно удаляли в ES клетках путем временной экспрессии CRE рекомбиназы с высокими показателями результативности (до $\approx 11\%$) даже при отсутствии селекции по чувствительности к лекарственным средствам (Zheng, B., *et al.* (2000).

Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. Mol Cell Biol 20:648-655). Сходным образом, авторы настоящего изобретения осуществили трех Mb делецию у 8% ES клеточных клонов после временной экспрессии CRE (стадия С, фиг. 2А; таблица 3). Делецию оценивали с помощью анализа LONA с использованием зондов на любом конце удаленной последовательности мыши, а также потерю neo и hug и появление продукта ПЦР в точке делеции, содержащей единственный оставшийся сайт loxP. Более того, делецию подтверждали путем флуоресцентной гибридизации *in situ* (данные не показаны).

Остаток вариабельной области тяжелой цепи человека добавляли к аллелю 3hV_H в серии из 5 стадий с использованием способа генной инженерии VELOCIGENE® (стадии Е-Н, фиг. 2В), причем каждая стадия включала в себя точную вставку до 210 т.п.н. генных последовательностей человека. Для каждой стадии проксимальный конец каждого нового ВАСves разрабатывали так, чтобы он перекрывал наиболее дистальные последовательности человека предыдущей стадии и дистальный конец каждого нового ВАСves содержал такую же дистальную область гомологии мыши, как использовалась на стадии А. ВАСves из стадий D, F и H содержали кассеты селекции neo, тогда как ВАСves из стадий E и G содержали кассеты селекции hug, таким образом, селекции чередовали между G418 и гигромицином. Нацеленное воздействие на стадии D анализировали с помощью потери уникального продукта ПЦР в дистальном сайте loxP гибридного аллеля 3hV_H. Нацеленное воздействие для стадий E-I анализировали с помощью потери предыдущей кассеты селекции. На конечной стадии (стадия I, фиг. 2В) кассету селекции neo, фланкированную сайтами Frt (McLeod, M. *et al.* (1986) Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the Saccharomyces cerevisiae plasmid 2 microns circle. Mol Cell Biol 6, 3357-3367), удаляли с помощью временной экспрессии FLPe (Buchholz, F. *et al.* (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. Nat Biotechnol 16, 657-662). Последовательности человека из ВАСves для стадий D, E и G получали из двух родительских ВАС человека каждый, тогда как таковые из стадий F и H были из одних ВАС. Сохранение последовательностей человека подтверждали на каждой стадии с использованием множественных зондов, охватывающих вставленные последовательности человека (как описано выше, например, фиг. 3А, 3В и 3С). Только клоны с нормальным кариотипом и зародышевый потенциал переносили далее в каждой стадии. ES клетки из конечной стадии все еще были способны вносить вклад в зародышевую линию после девяти последовательных манипуляций (таблица 3). Мыши, гомозиготные в отношении каждого из аллелей тяжелой цепи были жизнеспособны, казались здоровыми и демонстрировали по существу гуморальную иммунную систему дикого типа (смотрите пример 3).

ТАБЛИЦА 3

Гибридный аллель	Последовательность человека	Нацеливающий конструкт	Результативность нацеливающего воздействия	% частоты использования	Общий V _H	Функциональный V _H
------------------	-----------------------------	------------------------	--	-------------------------	----------------------	-------------------------------

я

3hV _H	144 т.п.н.	240 т.п.н.	0,2%	5	3	3
3hV _H /D C	144 т.п.н.	110 т.п.н.	0.1%	5	3	3
3hV _H - CRE	144 т.п.н.	-	8%	5	3	3
18hV _H	340 т.п.н.	272 т.п.н.	0,1%	25	18	12
39hV _H	550 т.п.н.	282 т.п.н.	0,2%	60	39	25
53hV _H	655 т.п.н.	186 т.п.н.	0,4%	65	53	29
70hV _H	850 т.п.н.	238 т.п.н.	0,5%	90	70	39
80hV _H	940 т.п.н.	124 т.п.н.	0,2%	100	80	43
80hV _H d Neo	940 т.п.н.	-	2,6%	100	80	43

Вариабельный генный локус к легкой цепи иммуноглобулина. Вариабельную область к легкой цепи гуманизировали в ходе восьми последовательных стадий путем прямого замещения приблизительно трех Mb последовательности мыши, содержащей все генные сегменты V_κ и J_κ приблизительно 0,5 Mb последовательности человека, содержащей проксимальные генные сегменты V_κ и J_κ человека способом, сходным с таковым для тяжелой цепи (фиг. 1В; таблицы 2 и 4).

Вариабельная область локуса к легкой цепи человека содержит два почти идентичных 400 т.п.н. повтора, разделенных 800 т.п.н. спейсером (Weichhold, G.M. *et al.* (1993) The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity, Genomics 16:503-511). Поскольку повторы являются настолько сходными, почти все разнообразие локусов может быть воспроизведено у мышей путем использования проксимального повтора. Кроме того, сообщалось об естественном аллеле человека локуса к легкой цепи, утратившем дистальный повтор (Schaible, G. *et al.* (1993) The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals, Hum Genet 91:261-267). Авторы настоящего изобретения заменили приблизительно три Mb вариабельной генной последовательности к легкой цепи мыши приблизительно 0,5 Mb вариабельной генной последовательности к легкой цепи человека для эффективного замещения всех генных сегментов V_κ и J_κ мыши проксимальными V_κ человека и всеми генными сегментами J_κ человека (фиг. 2С и 2D; таблицы 2 и 4). В отличие от описанного в примере 1 для локуса тяжелой цепи способа целую генную область V_κ мыши, содержащую все генные сегменты V_κ и J_κ, удаляли с помощью трехстадийного способа перед добавлением какой-либо последовательности человека. Вначале, кассету нео вводили на проксимальный конец вариабельной области (стадия А, фиг. 2С). Далее, кассету *hug* вставляли на дистальный конец к локуса (стадия В, фиг. 2С). Сайты loxP снова размещали в пределах каждой кассета селекции так, чтобы обработка CRE вызывала делецию оставшихся 3 Mb области V_κ мыши вместе с обоими генами устойчивости (стадия С, фиг. 2С).

Геномный фрагмент человека размером приблизительно 480 т.п.н., содержащий целую вариабельную область к легкой цепи иммуноглобулина, вставляли в ходе четырех последовательных стадий (фиг. 2D; таблицы 2 и 4), причем до 150 т.п.н. последовательности к легкой цепи иммуноглобулина человека вставляли за одну стадию с использованием способов, сходных с таковыми, используемыми для тяжелой цепи (смотрите пример 1). Последний ген устойчивости к гигромицину удаляли с помощью временной экспрессии FLP_e. Как и в случае тяжелой цепи, нацеленные ES клеточные

клоны оценивали в отношении целостности полной вставки человека, нормального кариотипа и зародышевого потенциала после каждой стадии. Получали мышей, гомозиготных в отношении каждого из аллелей к легкой цепи, и было обнаружено, что они являлись здоровыми и имели нормальный внешний вид.

ТАБЛИЦА 4

Гибридный аллель	Последовательность человека	Нацеливающий конструкт	Результативность нацеливающего воздействия	% частоты использования	Общий V _к	Функциональный V _к
Igκ-PC	0	132 т.п.н.	1,1%	-	-	-
Igκ-PC/DC	0	90 т.п.н.	0,4%	-	-	-
Igκ-CRE	0	-	1%	-	-	-
6hV _κ	110 т.п.н.	122 т.п.н.	0,3%	14	6	4
16hV _κ	240 т.п.н.	203 т.п.н.	0,4%	47	16	11
30hV _κ	390 т.п.н.	193 т.п.н.	0,1%	70	30	18
40hV _κ	480 т.п.н.	185 т.п.н.	0,2%	100	40	25
40hV _κ d Hyg	480 т.п.н.	-	0,7%	100	40	25

Пример 2. Получение полностью гуманизированных мышей с помощью комбинации множественных гуманизированных аллелей иммуноглобулина

В нескольких местах ES клетки, несущие часть вариабельных репертуаров тяжелой цепи или к легкой цепи иммуноглобулина человека, как описано в примере 1, подвергали микроинъекции и полученных мышей скрещивали для получения множественных вариантов мышей VELOCIMMUNE® с возрастающим количеством фракций зародышевых репертуаров иммуноглобулина человека (таблица 5; фиг. 5A и 5B). Мыши VELOCIMMUNE® 1 (V1) обладают 18 генными сегментами V_H человека и всеми генными сегментами D_H и J_H человека, комбинированными с 16 человек генными сегментами V_κ и всеми генными сегментами J_κ человека. Мыши VELOCIMMUNE® 2 (V2) и VELOCIMMUNE® (V3) характеризуются увеличенными вариабельными репертуарами, включая в себя в общем 39 V_H и 30 V_κ, и 80 V_H и 40 V_κ, соответственно. Поскольку геномные области, кодирующие генные сегменты V_H, D_H и J_H мыши, и генные сегменты V_κ и J_κ, полностью замещали, антитела, производимые любым вариантом мышей VELOCIMMUNE®, содержат вариабельные области человека, связанные с константными областями мыши. Локусы λ легкой цепи мыши остаются интактными во всех вариантах мышей VELOCIMMUNE® и служат в качестве средства сравнения результативности экспрессии различных гуманизированных локусов к легкой цепи VELOCIMMUNE®.

Мышей, дважды гомозиготных в отношении обеих гуманизаций тяжелой цепи и к легкой цепи иммуноглобулина, получали из подгруппы описанных в примере 1 аллелей. Все генотипы, наблюдаемые в течение курса скрещивания для получения дважды гомозиготных мышей, возникали приблизительно в менделевских пропорциях. Мужское потомство, гомозиготное в отношении каждого из аллелей тяжелой цепи человека,

показало сниженную фертильность. Сниженная фертильность являлась результатом потери активности ADAM6 мыши. Вариабельный генный локус тяжелой цепи мыши содержит два включенных в него функциональных гена ADAM6 (ADAM6a и ADAM6b). В ходе гуманизации вариабельного генного локуса тяжелой цепи мыши вставленная геномная последовательность человека содержала псевдоген ADAM6. ADAM6 мыши может быть необходимым для фертильности, и, таким образом, отсутствие генов ADAM6 мыши в гуманизированных вариабельных генных локусах тяжелой цепи может привести к сниженной фертильности у этих мышей, несмотря на присутствие псевдогена человека. В примерах 7-9 описано точное замещение удаленных генов ADAM6 мыши обратно в гуманизированный вариабельный генный локус тяжелой цепи, и восстановление уровня фертильности дикого типа у мышей с гуманизированным локусом тяжелой цепи иммуноглобулина.

ТАБЛИЦА 5

Вариант мыши VELOCIMMUNE®	Тяжелая цепь			к легкая цепь		
	V _H человека	Аллель	Ген 5' V _H	V _K человека	Аллель	Ген 5' V _K
V1	18	18hV _H	V _H 1- 18	16	16hV _K	V _K 1- 16
V2	39	39hV _H	V _H 4- 39	30	30hV _K	V _K 2- 29
V3	80	80hV _H	V _H 3- 74	40	40hV _K	V _K 2- 40

Пример 3. Популяции лимфоцитов у мышей с гуманизированными генами иммуноглобулина

Популяции зрелых В-клеток у трех различных вариантов мышей VELOCIMMUNE® оценивали с помощью проточной цитометрии.

Кратко, клеточные суспензии из костного мозга, селезенки и тимуса получали с использованием стандартных способов. Клетки ресуспендировали в концентрации 5×10^5 клеток/мл в буфере для окрашивания для FACS BD Pharmingen, блокировали с помощью антитела к CD16/32 мыши (BD Pharmingen), окрашивали с помощью пригодного коктейля антител и фиксировали с помощью BD Cytotfix™, все согласно инструкциям производителей. Последние клеточные осадки ресуспендировали в 0,5 мл буфера для окрашивания и анализировали с использованием программного обеспечения BD FACSCALIBUR™ и BD CELLQUEST PRO™. Все антитела (BD Pharmingen) получали в массовом разведении/коктейле и добавляли до конечной концентрации $0,5 \text{ мг}/10^5$ клеток. Коктейли антител для окрашивания костного мозга (A-D) были следующими:

A: антитело к IgM^b-FITC мыши, антитело к IgM^a-PE мыши, антитело к CD45R(B220)-APC мыши; B: антитело к CD43(S7)-PE мыши, антитело к CD45R(B220)-APC мыши; C: антитело к CD24(HSA)-PE мыши; антитело к CD45R(B220)-APC мыши; D: антитело к BP-1-PE мыши, антитело к CD45R(B220)-APC мыши. Коктейли антител для окрашивания селезенки и паховых лимфатических узлов (E-H) были следующими: E: антитело к IgM^b-FITC мыши, антитело к IgM^a-PE мыши, антитело к CD45R(B220)-APC мыши; F: антитело к Ig, $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ легкая цепь-FITC мыши, антитело к Igк легкая цепь-PE мыши, антитело к CD45R(B220)-APC мыши; G: антитело к Ly6G/C-FITC мыши, антитело к CD49b(DX5)-PE мыши, антитело к CD11b-APC мыши; H: антитело к CD4(L3T4)-FITC

мышь, антитело к CD45R(B220)-PE мышь, антитело к CD8a-APC мышь. Результаты показаны на фиг. 6.

Лимфоциты, выделенные из селезенки или лимфатического узла гомозиготных мышей VELOCIMMUNE®, окрашивали в отношении поверхностной экспрессии маркеров B220 и IgM и анализировали с использованием проточной цитометрии (фиг. 6). Размеры популяций B220⁺ IgM⁺ зрелых В-клеток во всех вариантах исследованных мышей VELOCIMMUNE® были фактически идентичны таковым у мышей дикого типа, независимо от числа генных сегментов V_H, которые они содержали. Кроме того, мыши, содержащие гомозиготные гибридные гуманизированные локусы тяжелой цепи иммуноглобулина, даже таковые только с 3 V_H генными сегментами, но нормальными локусами легкой цепи иммуноглобулина мышь или мышь, содержащие гомозиготные гибридные гуманизированные локусы легкой цепи с нормальными локусами тяжелой цепи иммуноглобулина мышь также содержали нормальные количества клеток B220⁺ IgM⁺ в их периферических компартментах (не показано). Эти результаты показывают, что химерные локусы с переменными генными сегментами человека и константными областями мышь могут полностью заполнить компартмент зрелых В-клеток. Кроме того, число переменных генных сегментов на локусах или тяжелой цепи, или легкой цепи и, таким образом, теоретическое разнообразие репертуара антител, не коррелирует со способностью создавать популяции дикого типа зрелых В-клеток. Напротив, мыши с интегрированными случайным образом полностью человеческими иммуноглобулиновыми трансгенами и инактивированными локусами иммуноглобулина мышь характеризуются сниженными количествами В-клеток в этих компартментах, причем тяжесть дефицита зависит от числа включенных в трансген переменных генных сегментов (Green, L.L., and Jakobovits, A. (1998) Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes, J Exp Med 188:483-495). Это показывает, что стратегия "*in situ* генетической гуманизации" приводит к функциональному результату, фундаментально отличному от интегрированных случайным образом трансгенов, полученных с помощью "генного нокаута вместе с трансгенным подходом".

Исключение аллеля и выбор локуса. Способность сохранять исключение аллеля исследовали у мышей, гетерозиготных в отношении различных вариантов гуманизированного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина.

Гуманизацию локусов иммуноглобулина проводили в ES линии F1 (F1H4 (Valenzuela *et al.*, 2003)), происходящей из гетерозиготных эмбрионов 129S6/SvEvTac и C57BL/6NTac. Зародышевые генные последовательности переменной области тяжелой цепи человек подвергают нацеленному воздействию на 129S6 аллель, который несет гаплотип IgM^a, тогда как немодифицированный аллель C57BL/6N мышь несет гаплотип IgM^b. Эти аллельные формы IgM могут быть дифференцированы с помощью проточной цитометрии с использованием антител, специфических к полиморфизмам, обнаруженным в аллелях IgM^a или IgM^b. Как показано на фиг. 6 (нижний ряд), В-клетки, определенные у мышей, гетерозиготных в отношении каждого варианта гуманизированного локуса тяжелой цепи, экспрессируют только один аллель, или IgM^a (гуманизированный аллель), или IgM^b (аллель дикого типа). Это показывает, что механизмы, вовлеченные в исключение аллеля, являются интактными у мышей VELOCIMMUNE®. Кроме того, относительное количество В-клеток, положительных в отношении гуманизированного

аллеля (IgM^a) приблизительно пропорционально числу присутствующих генных сегментов V_H. Гуманизированный локус иммуноглобулина экспрессируется приблизительно в 30% В-клеток у гетерозиготных мышей VELOCIMMUNE® 1, которые содержат 18 генных сегментов V_H человека, и в 50% В-клеток у гетерозиготных мышей VELOCIMMUNE® 2 и 3 (не показано), с 39 и 80 генными сегментами V_H человека, соответственно. В частности, отношение клеток, экспрессирующих гуманизированный аллель мыши, к аллелю дикого типа (0,5 для мышей VELOCIMMUNE® 1 и 0,9 для мышей VELOCIMMUNE® 2) является больше, чем отношение числа вариабельных генных сегментов, содержащихся в гуманизированных локусах, к локусам дикого типа (0,2 для мышей VELOCIMMUNE® 1 и 0,4 для мышей VELOCIMMUNE® 2). Это может показывать, что вероятность выбора аллеля является промежуточной между случайным выбором одной или другой хромосомы и случайным выбором RSS любого конкретного V сегмента. Кроме того, может иметь место фракция В-клеток, но не все, в которой один аллель становится доступным для рекомбинации, завершает процесс и прекращает рекомбинацию до того, как другой аллель становится доступным. Кроме того, даже распределение клеток, которые содержат поверхностный IgM (sIgM), происходящий или из гибридного гуманизированного локуса тяжелой цепи, или локуса тяжелой цепи мыши дикого типа, является доказательством того, что гибридный локус функционирует на нормальном уровне. В отличие от этого, интегрированные случайным образом трансгены иммуноглобулина человека слабо конкурируют с локусами иммуноглобулина мыши дикого типа (Bruggemann, M., *et al.* (1989) A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. PNAS 86, 6709-6713; Green *et al.* (1994); Tuaillon, N. *et al.* (1993) Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in mu and gamma transcripts, Proc Natl Acad Sci USA 90:3720-3724). Это дополнительно демонстрирует, что произведенные мышами VELOCIMMUNE® иммуноглобулины являются функционально отличными от таковых, произведенных интегрированными случайным образом трансгенами у мышей, полученных с помощью "генного нокаута вместе с трансгенным подходом".

Полиморфизмы областей Ск являются недоступными в 129S6 или C57BL/6N для исследования исключения аллеля гуманизированных локусов к легкой цепи по сравнению с негуманизированными локусами. Тем не менее, все мыши VELOCIMMUNE® обладают локусами λ легкой цепи мыши дикого типа, следовательно, возможно наблюдать, может ли реаранжировка и экспрессия гуманизированных локусов к легкой цепи предотвратить экспрессию λ легкой цепи мыши. Отношение числа клеток, экспрессирующих гуманизированную к легкую цепь, к числу клеток, экспрессирующих λ легкую цепь мыши, было относительно неизменным у мышей VELOCIMMUNE® по сравнению с мышами дикого типа, независимо от числа генных сегментов V_k человека, вставленных на локус к легкой цепи (фиг. 6, третий ряд сверху). Кроме того, не наблюдалось увеличение числа дважды положительных (κ и λ) клеток, указывая на то, что продуктивная рекомбинация в гибридных локусах к легкой цепи приводит к соответствующему подавлению рекомбинации локусов λ легкой цепи мыши. В отличие от этого, мыши, содержащие интегрированные случайным образом трансгены к легкой цепи с инактивированными локусами к легкой цепи мыши - но локусами λ легкой цепи мыши дикого типа - проявляют сильно увеличенные соотношения λ/κ (Jakobovits, 1998), косвенно указывая на то, что введенные трансгены к легкой цепи не функционируют правильным образом у таких мышей. Это дополнительно демонстрирует другой функциональный результат, наблюдаемый в иммуноглобулинах, произведенных мышами

VELOCIMMUNE® по сравнению с таковыми, произведенными мышами, полученными с помощью "генного нокаута вместе с трансгенным подходом".

Развитие В-клеток. Поскольку популяции зрелых В-клеток у мышей VELOCIMMUNE® сходны с таковыми у мышей дикого типа (описано выше), возможно, что дефекты в ранней дифференциации В-клеток компенсируются путем распространения популяций зрелых В-клеток. Различные стадии дифференциации В-клеток исследовали путем анализа популяций В-клеток с использованием проточной цитометрии. На таблице 6 представлено отношение фракции клеток в каждой В-клеточной родословной, определенной с помощью FACs, с использованием специфических маркеров клеточной поверхности, у мышей VELOCIMMUNE® по сравнению с одноплетными животными дикого типа.

Развитие ранних В-клеток происходит в костном мозге, и различные стадии дифференциации В-клеток характеризуются изменениями в типах и уровнях экспрессии маркеров клеточной поверхности. Эти различия в поверхностной экспрессии коррелируют с молекулярными изменениями, происходящими на локусах иммуноглобулина внутри клетки. Для перехода от про-В к пре-В-клетке необходима успешная реаранжировка и экспрессия функционального белка тяжелой цепи, наряду с тем, что переход от пре-В к стадии зрелых В-клеток регулируется правильной реаранжировкой и экспрессией κ или λ легкой цепи. Таким образом, неэффективный переход между стадиями В-клеточной дифференциации можно обнаружить с помощью изменений в относительных популяциях В-клеток на данной стадии.

ТАБЛИЦА 6

Вариант мышей	Костный мозг				Селезенка	
	про-В	пре-В	Незрелые	Зрелые	Созревающие	Зрелые
	CD43 ^{hi}	CD24 ^{hi}	B220 ^{lo}	B220 ^{hi}	B220 ^{hi}	B220 ^{hi}
	B220 ^{lo}	B220 ^{lo}	IgM ⁺	IgM ⁺	IgM ⁺	IgM ⁺
V1	1,1	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0
V2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
V3	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1

Не наблюдалось никаких значительных дефектов в В-клеточной дифференциации у любой из мышей VELOCIMMUNE®. По-видимому, введение генных сегментов тяжелой цепи человека не оказывает воздействия на переход от про-В к пре-В, и введение генных сегментов к легкой цепи человека не оказывает воздействия на переход от пре-В к В-клеткам у мышей VELOCIMMUNE®. Это демонстрирует, что "обратные химерные" молекулы иммуноглобулина, содержащие переменные области человека и константные области мыши, функционируют нормально в контексте передачи сигналов В-клетками и корецепторных молекул, приводя к подходящей В-клеточной дифференциации в мышинном окружении. В отличие от этого, баланс между различными популяциями в ходе В-клеточной дифференциации нарушается до определенной степени у мышей, которые содержат интегрированный случайным образом трансген иммуноглобулина и инактивированные эндогенные локусы тяжелой цепи или к легкой цепи (Green and Jakobovits, 1998).

Пример 4. Репертуар переменных генов у мышей с гуманизированным иммуноглобулином

Частоту использования переменных генных сегментов человека в репертуаре

гуманизированных антител мышей VELOCIMMUNE® анализировали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) переменных областей человека из множественных источников, включающих в себя спленоциты и клетки гибридомы. Определяли последовательность переменной области, частота использования генного сегмента, соматическая гипермутация и множественность сегментов J реаранжированных генных сегментов переменной области.

Кратко, общую РНК экстрагировали из 1×10^7 - 2×10^7 спленоцитов или приблизительно 10^4 - 10^5 гибридомных клеток с использованием TRIZOL™ (Invitrogen) или мининабора Qiagen RNEASY™ (Qiagen) и праймировали с помощью специфических маркеров константной области мыши с использованием SUPERScript™ III системы одностадийной ОТ-ПЦР (Invitrogen). Реакции проводили с 2-5 мкл РНК из каждого образца с использованием вышеупомянутых 3' специфических маркеров константной области, спаренных с объединенными лидерными праймерами для каждого семейства переменных областей человека как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи, отдельно. Объемы реагентов и праймеров и условия ОТ-ПЦР/ПЦР обеспечивали согласно инструкциям производителя. Последовательности праймеров были основаны на множественных источниках (Wang, X. and Stollar, B.D. (2000) Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR, J Immunol Methods 244:217-225; наборы Ig-праймеров, Novagen). В соответствующих случаях вложенные вторичные ПЦР реакции проводили с объединенными специфическими в отношении семейства каркасными праймерами и таким же 3' специфическим праймером константной области иммуноглобулина мыши, используемым в первичной реакции. Аликвоты (5 мкл) из каждой реакции анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле и продукты реакции очищали от агарозы с использованием набора для экстракции из геля MONTAGE™ (Millipore). Очищенные продукты клонировали с использованием ТОРО™ ТА клонирующей системы (Invitrogen) и трансформировали в клетки DH10β *E. coli* путем электропорации. Отдельные клоны выбирали из каждой реакции трансформации и выращивали в 2 мл бульонных культур Лурия-Бертани с селекцией по чувствительности к антибиотику в течение ночи при 37°C. Плазмидную ДНК очищали от бактериальных культур с помощью основанного на использовании набора подхода (Qiagen).

Частота использования переменных генов иммуноглобулина. Плазмидную ДНК клонов как тяжелой цепи, так и легкой цепи секвенировали или с T7, или с M13 обратными праймерами на генетическом анализаторе ABI 3100 (Applied Biosystems). Необработанные данные о последовательностях вносили в SEQUENCHER™ (версия 4.5, Gene Codes). Каждую последовательность собирали в контиги и выравнивали с последовательностями иммуноглобулина человека с использованием IMGT V-Quest (Brochet, X, Lefranc, M.P., and Giudicelli, V. (2008). IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. Nucleic Acids Res 36, W503-508) поисковой функции для определения частоты использования сегментов V_H, D_H, J_H и V_κ, J_κ человека. Последовательности сравнивали с зародышевыми последовательностями для анализа соматической гипермутации и рекомбинации участков соединения.

Мышей получали из ES клеток, содержащих начальную модификацию тяжелой цепи (гибридный аллель 3hV_H-CRE, нижняя часть фиг. 2A) с помощью RAG комплементации (Chen, J. *et al.* (1993) RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development, Proc Natl Acad Sci USA 90:4528-4532), и кДНК получали из РНК спленоцита. кДНК амплифицировали с использованием наборов праймеров (описанных

выше), специфических к предсказанной мРНК химерной тяжелой цепи, которая будет возникать путем V(D)J рекомбинации в пределах вставленных генных сегментов человек и последующего сплайсинга с константными доменами либо IgM, либо IgG мыши.

Последовательности, происходящие из этих клонов кДНК (не показаны),

демонстрировали, что правильная V(D)J рекомбинация происходила в пределах генных последовательностей варибельной области человека, что реаранжированные генные сегменты V(D)J человека правильно сплайсировались в рамке считывания с константными доменами мыши и что произошла рекомбинация переключения класса. Проводили дополнительный анализ последовательности продуктов мРНК последующих гибридных локусов иммуноглобулина

В сходном эксперименте В-клетки из неиммунизированных мышей дикого типа и мышей VELOCIMMUNE® разделяли с помощью проточной цитометрии на основании поверхностной экспрессии B220 и IgM или IgG. Клетки B220⁺ IgM⁺ или поверхностный IgG⁺ (sIgG⁺) объединяли и получали последовательности V_H и V_K на основании ОТ-ПЦР амплификации и клонирования (описано выше). Регистрировали частоту использования репрезентативных генов в наборе амплифицированных с помощью ОТ-ПЦР кДНК из неиммунизированных мышей VELOCIMMUNE® 1 (таблица 7) и мышей VELOCIMMUNE® 3 (таблица 8) (* дефектная RSS; † отсутствие или псевдоген).

ТАБЛИЦА 7

V _H	Наблюдаемое значение	D _H	Наблюдаемое значение	V _K	Наблюдаемое значение
1-18	3	1-1	1	1-16	2
1-17P	0	2-2	2	3-15	1
3-16*	0	3-3	4	1-12	5
3-15	13	4-4	0	3-11	1
3-13	9	5-5	0	1-9	5
3-11	6	5-18	4	1-8	2
3-9	8	6-6	5	3-7*	0
1-8	6	1-7	7	1-6	5
3-7	2	2-8	0	1-5	8
2-5	2	3-9	4	5-2	6
1-3	0	3-10	2	4-1	8
1-2	11	4-11	1		
6-1	5	5-12	1		
				Жк	Наблюдаемое значение
		6-13	3	1	12
Жн	Наблюдаемое значение	1-14	0	2	10
1	2	2-15	0	3	5
2	1	3-16	1	4	10
3	8	4-17	0	5	0

4	33
5	5
6	16

6-19	2
1-20	2
2-21	1
3-22	0
4-23	2
5-24	1
6-25	1
1-26	6
7-27	10

ТАБЛИЦА 8

Vн	Наблюдаемое значение	Dн	Наблюдаемое значение	Vк	Наблюдаемое значение
7-81†	0	1-1	7	2-40	1
3-74†	0	2-2	8	1-39	34
3-73	1	3-3	9	1-37	2
3-72	2	4-4	4	1-33	35
2-70	2	5-5	6	2-30	8
1-69	3	5-18	6	2-29	2
3-66	1	6-6	29	2-28	7
3-64	1	1-7	30	1-27	5
4-61	1	2-8	4	2-24	7
4-59	10	3-9	8	6-21*	3
1-58	0	3-10	10	3-20	10
3-53	0	4-11	4	1-17	13
5-51	5	5-12	5	1-16	10
3-49	2	6-13	17	3-15	13
3-48	7	1-14	2	1-12	13
1-46	1	2-15	3	3-11	13
1-45	0	3-16	4	1-9	11
3-43	10	4-17	3	1-8	1
4-39	4	6-19	8	3-7*	0
3-38*	0	1-20	3	1-6	6
3-35*	0	2-21	1	1-5	7
4-34	8	3-22	5	5-2	0
3-33	14	4-23	2	4-1	21
4-31	4	5-24	2		

5

3-30	13
4-28	0
2-26	0
1-24	3
3-23	18

10

3-21	0
3-20	0
1-18	4
1-17P	1
3-16*	0

15

3-15	13
3-13	6
3-11	5
3-9	31
1-8	7
3-7	11
2-5	1
1-3	0
1-2	6
6-1	9

20

6-25	2
1-26	17
7-27	7

25

Жн Наблюдаемое значение	
1	2
2	8
3	26
4	95
5	11
6	58

Жк Наблюдаемое значение	
1	50
2	37
3	28
4	64
5	22

Как показано в таблицах 7 и 8, используются почти все функциональные генные сегменты V_H , D_H , J_H , V_k и J_k человека. Из функциональных вариативных генных сегментов, описанных, но не обнаруженных у мышей VELOCIMMUNE® в настоящем эксперименте, сообщалось, что некоторые содержат дефектные сигнальные последовательности рекомбинации (RSS) и, таким образом, как предполагают, не будут экспрессироваться (Feeney, A.J. (2000) Factors that influence formation of B cell repertoire. Immunol Res 21:195-202). Анализ некоторых других наборов последовательностей иммуноглобулина из различных мышей VELOCIMMUNE®, выделенных как из нативных, так иммунизированных репертуаров, показал использование этих генных сегментов, хотя и с более низкими показателями частоты (данные не показаны). Сводные данные о частоте использования генов показали, что все функциональные генные сегменты V_H , D_H , J_H , V_k и J_k человека, содержащиеся у мышей VELOCIMMUNE®, наблюдались как в нативных, так и в иммунизированных репертуарах (данные не показаны). Хотя генный сегмент V_H7-81 человека определили в анализе последовательностей локуса тяжелой цепи человека (Matsuda, F. *et al.* (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, J Exp Med 188:2151-2162), он не присутствует у мышей VELOCIMMUNE®, что подтверждается путем повторного секвенирования полного генома мыши VELOCIMMUNE® 3.

Известно, что последовательности тяжелых и легких цепей антител демонстрируют исключительную вариативность, особенно в коротких полипептидных сегментах в пределах реаранжированного вариативного домена. Эти области, известные как

гипервариабельные области или определяющие комплементарность области (CDR) образуют сайт связывания для антигена в структуре молекулы антитела. Промежуточные полипептидные последовательности называются каркасные области (FR). Существуют три CDR (CDR1, CDR2, CDR3) и 4 FR (FR1, FR2, FR3, FR4) как в тяжелых, так и легких цепях. Одна CDR, CDR3, является уникальной в том, что эта CDR образуется путем рекомбинации как генных сегментов V_H , D_H и J_H , так и V_k и J_k и создает значительное количество разнообразия репертуаров до того, как встретиться антиген. Это соединение является неточным вследствие как нуклеотидных делеций посредством экзонуклеазной активности, так и не кодируемых матрицей вставок посредством терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) и, таким образом, обеспечивает возможность появления новых последовательностей в результате процесса рекомбинации. Хотя FR могут демонстрировать существенную соматическую мутацию вследствие высокой частоты мутирования вариабельной области целиком, вариабельность, тем не менее, не распределена равномерно по вариабельной области. CDR представляют собой сконцентрированные и локализованные области высокой вариабельности на поверхности молекулы антитела, которые обеспечивают связывание антигена. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи выбранных антител из мышей VELOCIMMUNE® около участка соединения CDR3, демонстрирующего множественность сегментов J, показаны на фиг. 7А и 7В, соответственно.

Как показано на фиг. 7А, не кодируемые матрицей нуклеотидные вставки (N-вставки) наблюдаются как на соединении V_H-D_H , так и D_H-J_H в антителах из мышей VELOCIMMUNE®, указывая на полноценную функцию TdT с сегментами человека. Концы сегментов V_H , D_H и J_H относительно их зародышевых эквивалентов показывают, что также имела место экзонуклеазная активность. В отличие от локуса тяжелой цепи, реаранжировки к легкой цепи человека проявляют немного или отсутствие вставок TdT на CDR3, которая сформирована путем рекомбинации сегментов V_k и J_k (фиг. 7В). Это предполагают вследствие отсутствия экспрессии TdT у мышей в ходе реаранжировок легкой цепи на переходе от пре-В к В-клетке. Разнообразие, наблюдаемое в CDR3 реаранжированных областей V_k человека, вводится преимущественно посредством экзонуклеазной активности в ходе события рекомбинации.

Соматическая гипермутация. Дополнительное разнообразие добавляют к вариабельным областям реаранжированных генов иммуноглобулина в ходе реакции в зародышевом центре с помощью процесса, имеющего название соматическая гипермутация. В-клетки, экспрессирующие соматически мутированные вариабельные области, конкурируют с другими В-клетками за доступ к антигену, представленному фолликулярными дендритными клетками. В-клетки с более высокой аффинностью к антигену будут продолжать развиваться и будут подвергаться переключению класса перед выходом на периферию. Таким образом, В-клетки, экспрессирующие переключенные изотипы, как правило, встретились с антигеном и подверглись реакциям в зародышевом центре и будут характеризоваться увеличенными количествами мутаций относительно наивных В-клеток. Более того, предполагают, что последовательности вариабельной области из преимущественно наивных $sIgM^+$ В-клеток будут характеризоваться относительно меньшим количеством мутаций, чем вариабельные последовательности из $sIgG^+$ В-клеток, которые подверглись антигензависимой селекции.

Последовательности из случайных клонов V_H или V_k из $sIgM^+$ или $sIgG^+$ В-клеток из неиммунизированных мышей VELOCIMMUNE® или $sIgG^+$ В-клеток из

иммунизированных мышей сравнивали с их зародышевыми вариabельными генными сегментами и комментировали изменения относительно зародышевой последовательности. Полученные нуклеотидные последовательности подвергали трансляции *in silico* и также комментировали мутации, приводящие к изменениям аминокислот. Данные собирали от всех вариabельных областей и рассчитывали процентное изменение в данном положении (фиг. 8).

Как показано на фиг. 8, вариabельные области тяжелой цепи человека, происходящие из sIgG⁺ В-клеток из неиммунизированных мышей VELOCIMMUNE®, проявляют намного больше нуклеотидов относительно sIgM⁺ В-клеток из тех же пулов спленоцитов, и вариabельные области тяжелой цепи, происходящие из иммунизированных мышей, проявляют даже больше изменений. Число изменений увеличивается в определяющих комплементарность областях (CDR) по отношению к каркасным областям, что указывает на антигензависимую селекцию. Соответствующие аминокислотные последовательности из вариabельных областей тяжелой цепи человека также проявляют значительно большие количества мутаций в IgG по сравнению с IgM и даже больше в иммунизированном IgG. Эти мутации вновь оказываются более частыми в CDR по сравнению с каркасными последовательностями, указывая на то, что антитела были антигензависимыми *in vivo*. Сходное увеличение числа нуклеотидных и аминокислотных мутаций наблюдают в последовательностях V_κ, происходящих из IgG⁺ В-клеток из иммунизированных мышей.

Частота использования гена и соматическая гипермутация, наблюдаемые у мышей VELOCIMMUNE®, показывают, что по существу все присутствующие генные сегменты способны к реаранжировке для образования полностью функциональных обратных химерных антител у этих мышей. Более того, антитела VELOCIMMUNE® участвуют в полной мере в иммунной системе мыши, подвергаясь аффинной селекции и созреванию для создания полностью зрелых человеческих антител, которые могут эффективно нейтрализовать их целевой антиген. Мыши VELOCIMMUNE® способны развивать устойчивые иммунные ответы на многочисленные классы антигенов, что приводит к использованию широкого диапазона человеческих антител, которые характеризуются высокой аффинностью, а также являются подходящими для терапевтического применения (данные не показаны).

Пример 5. Анализ лимфоидной структуры и сывороточных изотипов

Макроструктуры селезенки, паховых лимфатических узлов, пейеровых бляшек и тимуса тканевых образцов из мышей дикого типа или мышей VELOCIMMUNE®, окрашенные с помощью H&E, исследовали с помощью световой микроскопии. Уровни изотипов иммуноглобулина в сыворотке, собранной от мышей дикого типа и мышей VELOCIMMUNE®, анализировали с использованием технологии LUMINEX™.

Структура лимфоидных органов. Структура и функция лимфоидных тканей частично зависит от правильного развития гематopoэтических клеток. Нарушение развития или функции В-клеток могут проявляться в виде изменения в структуре лимфоидных тканей. При анализе окрашенных тканевых срезов не установили никакого значительного различия во внешнем виде вторичных лимфоидных органов между мышами дикого типа и мышами VELOCIMMUNE® (данные не показаны).

Уровни иммуноглобулина в сыворотке. Уровень экспрессии каждого изотипа является сходным у мышей дикого типа и мышей VELOCIMMUNE® (фиг. 9А, 9В и 9С). Это демонстрирует, что гуманизация вариabельных генных сегментов не оказывала какого-либо очевидного неблагоприятного действия на переключение класса или экспрессию

и секрецию иммуноглобулина и, следовательно, очевидно сохраняет все эндогенные последовательности мышья, необходимые для этих функций.

Пример 6. Иммунизация и продукция антител у мышья с гуманизированными иммуноглобулинами

Различные варианты мышья VELOCIMMUNE® иммунизировали антигеном для исследования гуморального ответа на сенсибилизацию чужеродным антигеном.

Иммунизация и развитие гибридомы. Мышья VELOCIMMUNE® и мышья дикого типа можно иммунизировать антигеном в форме белка, ДНК, комбинации ДНК и белка или клеток, экспрессирующих антиген. Животным, как правило, проводят повторную иммунизацию каждые три недели, в общем, в течение двух-трех раз. После каждой повторной иммунизации антигеном образцы сыворотки от каждого животного собирают и анализируют в отношении ответов антигенспецифических антител с помощью определения сывороточного титра. Перед слиянием мышья получали конечную дозу предшествующей слиянию повторной иммунизации 5 мкг белка или ДНК, при необходимости, посредством интраперитонеальной и/или внутривенной инъекций. Спленоциты собирают и проводят их слияние с Ag8.653 миеломными клетками в камере электрослияния согласно рекомендуемому производителем протоколу (Cyto Pulse Sciences Inc., Глен-Бурни, Мериленд). Через десять дней культивации гибридомы подвергают скринингу относительно антигенной специфичности с использованием анализа ELISA (Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York). Альтернативно, антигенспецифические В-клетки выделяют непосредственно из иммунизированных мышья VELOCIMMUNE® и подвергают скринингу с использованием стандартных техник, включающих в себя описанные в настоящем документе, для получения человеческих антител, специфических к представляющему интерес антигену.

Определения сывороточного титра. Для мониторинга ответа сыворотки животного на антиген образцы сыворотки собирают через приблизительно 10 дней после каждой повторной иммунизации и титры определяют с использованием антиген-специфического анализа ELISA. Кратко, Nunc MAXISORP™ 96-луночные планшеты покрывают 2 мкг/мл антигена в течение ночи при 4°C и блокируют с помощью бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Сент-Луис, Миссури). Обеспечивают связывание образцов сыворотки в серийных 3-кратных разведениях с планшетами в течение одного часа при комнатной температуре. Планшеты затем отмывают с помощью PBS, содержащего 0,05% Tween-20 и связанный IgG определяют с использованием конъюгированного с HRP козьего антитела к Fc мышья (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Вест Гров, Пенсильвания) для общего титра IgG, или меченных биотином специфических к изотипу или специфических к легким цепям поликлональных антител (SouthernBiotech Inc.) для специфических к изотипу титров, соответственно. Для меченных биотином антител после отмывки планшета добавляют конъюгированный с HRP стрептавидин (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Все планшеты проявляют с использованием таких колориметрических субстратов, как BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния). После остановки реакции с помощью 1 М фосфорной кислоты, регистрируют показатели оптического поглощения при 450 нм и данные анализируют с использованием программного обеспечения PRISM™ от Graph Pad. Разведения, необходимые для получения сигнала, превышающего в два раза фоновый уровень, определяют как титр.

Согласно одному эксперименту мышья VELOCIMMUNE® иммунизировали рецептором интерлейкина-6 человека (hIL-6R). Репрезентативный набор сывороточных

титров для мышей VELOCIMMUNE® и мышей дикого типа, иммунизированных hIL-6R, показан на фиг. 10A и 10B.

Мыши VELOCIMMUNE® и мыши дикого типа развивали сильные ответы в отношении IL-6R со сходными диапазонами титров (фиг. 10A). Некоторые мыши из когорт мышей VELOCIMMUNE® и мышей дикого типа достигали максимального ответа после одной иммунизации антигена. Эти результаты показывают, что сила иммунного ответа и кинетические параметры в отношении этого антигена были сходными у мышей VELOCIMMUNE® и мышей дикого типа. Эти ответы антигенспецифических антител дополнительно анализировали для исследования конкретных изотипов антигенспецифических антител, обнаруженных в сыворотках. Как группы мышей VELOCIMMUNE®, так и группы дикого типа преимущественно развивают ответ IgG1 (фиг. 10B), указывая на то, что переключение класса в ходе гуморального ответа является сходным у мышей каждого типа.

Определение аффинности связывания антитела с антигеном в растворе. Основанный на ELISA анализ конкуренции в растворе, как правило, разрабатывают для определения аффинность связывания антитела с антигеном.

Кратко, антитела в кондиционированной среде предварительно смешивают с серийными разведениями антигенного белка в диапазоне от 0-10 мг/мл. Растворы смеси антитела и антигена затем инкубируют в течение двух-четырех часов при комнатной температуре для достижения равновесных состояний связывания. Количества свободного антитела в смесях затем измеряют с использованием количественного сэндвич-анализа ELISA. 96-луночные планшеты MAXISORB™ (VWR, Вест-Честер, Пенсильвания) покрывают 1 мкг/мл антигенного белка в растворе PBS в течение ночи при 4°C с последующим BSA неспецифическим блокированием. Растворы смеси антител с антигенами затем переносят на эти планшеты с последующей часовой инкубацией. Планшеты затем отмывают буфером отмывки и связанные с планшетом антитела обнаруживают с помощью реагента конъюгированного с HRP козьего поликлонального антитела к IgG мыши (Jackson Immuno Research Lab) и проявляют с использованием таких колориметрических субстратов, как BD OPTeia™ (BD Biosciences Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния). После остановки реакции с помощью 1 М фосфорной кислоты, регистрируют показатели оптического поглощения при 450 нм и данные анализируют с использованием программного обеспечения PRISM™ от Graph Pad. Зависимость сигналов от концентраций антигена в растворе анализируют с помощью анализа согласия в отношении 4 параметров и выражали как IC₅₀, концентрация антигена, необходимая для достижения 50% снижения сигнала от образцов антител без присутствия антигена в растворе.

Согласно одному эксперименту мышей VELOCIMMUNE® иммунизировали с помощью hIL-6R (как описано выше). На фиг. 11A и 11B показан репрезентативный набор измерений аффинности для антител к hIL6R из мышей VELOCIMMUNE® и мышей дикого типа.

После получения иммунизированными мышами третьей повторной иммунизации антигеном сывороточные титры определяют с помощью ELISA. Спленоциты выделяют из выбранных когорт мышей дикого типа и мышей VELOCIMMUNE® и проводили слияние с Ag8.653 миеломными клетками для образования гибридом и выращивали при условиях селекции (как описано выше). Обнаружили, что из 671 образованных анти-IL-6R гибридом 236 экспрессируют антиген-специфические антитела. Среды, собранные из положительных в отношении антигена лунок, использовали для определения аффинности антител в отношении связывания с антигеном с использованием

анализа конкуренции в растворе ELISA. Антитела, полученные из мышей VELOCIMMUNE®, проявляют широкий диапазон аффинности в связывании с антигеном в растворе (фиг. 11A). Более того, обнаружили, что 49 из 236 анти-IL-6R гибридом препятствуют связыванию IL-6 с рецептором в биологическом анализе *in vitro* (данные не показаны). Более того, эти 49 анти-IL-6R блокирующие антитела проявляли диапазон высоких аффинностей в растворе, сходный с таковым у блокирующих антител, полученных в параллельной иммунизации мышей дикого типа (фиг. 11B)

Пример 7. Конструкция нацеливающего вектора ADAM6 мыши

Нацеливающий вектор для вставки генов ADAM6a и ADAM6b мыши в гуманизированный локус тяжелой цепи конструировали с использованием технологии генной инженерии VELOCIGENE® (ранее) для модификации бактериальной искусственной хромосомы (BAC) 929d24, полученной от Dr. Fred Alt (Гарвардский университет). ДНК 929d24 BAC конструировали так, чтобы она содержала геномные фрагменты, содержащие гены ADAM6a и ADAM6b мыши и кассету гигромицина для направленной делеции псевдогена ADAM6 человека (hADAM6Ψ), расположенного между генными сегментами V_H1-2 и V_H6-1 человека гуманизированного локуса тяжелой цепи (фиг. 12).

Во-первых, геномный фрагмент, содержащий ген ADAM6b мыши, ~800 п.н. последовательности против хода транскрипции (5') и ~4800 п.н. последовательности по ходу транскрипции (3'), субклонировали из клона 929d24 BAC. Второй геномный фрагмент, содержащий ген ADAM6a мыши, ~300 п.н. последовательности против хода транскрипции (5') и ~3400 п.н. последовательности по ходу транскрипции (3'), отдельно субклонировали из клона 929d24 BAC. Два геномных фрагмента, содержащие гены ADAM6b и ADAM6a мыши, лигировали с кассетой гигромицина, фланкированной Frt сайтами рекомбинации для создания нацеливающего вектора (нацеливающий вектор ADAM6 мыши, фигура 20; SEQ ID NO: 3). Различные сайты рестрикционных ферментов конструировали на 5' конце нацеливающего вектора после гена ADAM6b мыши и на 3' конце после гена ADAM6a мыши (фиг. 12, снизу) для лигирования в гуманизированный локус тяжелой цепи.

Отдельную модификацию проводили в отношении BAC - клона, содержащего замещение локуса тяжелой цепи мыши локусом тяжелой цепи человек, содержащим псевдоген ADAM6 человек, расположенный между генными сегментами V_H1-2 и V_H6-1 человека гуманизированного локуса для последующего лигирования нацеливающего вектора ADAM6 мыши (фиг. 13).

Кратко, кассету неомицина, фланкированную сайтами рекомбинации *IoxP*, конструировали так, чтобы она содержала гомологичные плечи, содержащие геномную последовательность человека в положениях 3' от генного сегмента V_H1-2 человека (5' по отношению к hADAM6Ψ) и 5' от генного сегмента V_H6-1 человека (3' по отношению к hADAM6Ψ; смотрите среднюю часть фиг. 13). Расположение сайта вставки этого нацеливающего конструктора находилось приблизительно 1,3 т.п.н. 5' и ~350 п.н. 3' от псевдогена ADAM6 человек. Нацеливающий конструктор также содержал такие же сайты рестрикции, как нацеливающий вектор ADAM6 мыши для обеспечения последующего BAC - лигирования между модифицированными BAC - клоном, содержащим делецию псевдогена ADAM6 человека и нацеливающего вектора ADAM6 мыши.

После обработки BAC - ДНК, полученной из обоих конструкторов, геномные фрагменты лигировали вместе для конструирования сконструированного BAC - клона, содержащего гуманизированный локус тяжелой цепи, содержащий эктопически

расположенную геномную последовательность, содержащую нуклеотидные последовательности ADAM6a и ADAM6b мышцы. Конечный нацеливающий конструктор для делеции гена ADAM6 человека в пределах гуманизированного локуса тяжелой цепи и вставки последовательностей ADAM6a и ADAM6b мышцы в ES клетки, содержащие, в направлении 5'-3', 5' геномный фрагмент, содержащий ~13 т.п.н. геномной последовательности человека 3' от генного сегмента V_H1-2 человек, ~800 п.н. геномной последовательности мышцы ниже по ходу транскрипции от гена ADAM6b мышцы, ген ADAM6b мышцы, ~4800 п.н. геномной последовательности выше против хода транскрипции от гена ADAM6b мышцы, 5' сайт Frt, кассету гигромицина, сайт 3' Frt, ~300 п.н. геномной последовательности мышцы ниже по ходу транскрипции от гена ADAM6a мышцы, ген ADAM6a мышцы, ~3400 п.н. геномной последовательности мышцы выше против хода транскрипции от гена ADAM6a мышцы и 3' геномный фрагмент, содержащий ~30 т.п.н. геномной последовательности человека 5' от генного сегмента V_H6-1 человека (нижняя часть фиг. 13).

Сконструированный ВАС - клон (описанный выше) использовали для электропорации ES клеток мышцы, которые содержали гуманизированный локус тяжелой цепи для создания модифицированных ES клеток, содержащих геномную последовательность мышцы, расположенную эктопически, которая содержит последовательности ADAM6a и ADAM6b мышцы в пределах гуманизированного локуса тяжелой цепи. Положительные ES клетки, содержащие эктопический геномный фрагмент мышцы в пределах гуманизированного локуса тяжелой цепи определяли с помощью анализа количественной ПЦР с использованием зондов TAQMAN™ (Lie, Y.S. and Petropoulos, C.J. (1998) Advances in quantitative PCR technology: 5'nuclease assays. Curr Opin Biotechnol 9(1):43-48). Вышележащие и нижележащие области за пределами модифицированной части гуманизированного локуса тяжелой цепи подтверждали с помощью ПЦР с использованием праймеров и зондов, расположенных в пределах модифицированной области для подтверждения присутствия эктопической геномной последовательности мышцы в пределах гуманизированного локуса тяжелой цепи, а также кассеты гигромицина. Нуклеотидная последовательность в вышележащей точке вставки включала в себя следующее, что показывает геномную последовательность тяжелой цепи человека, расположенная выше против хода транскрипции от точки вставки, и сайт рестрикции I-Sce I (содержащийся в скобках ниже), смежно соединенные с геномной последовательностью мышцы, присутствующей в точке вставки: (CCAGCTTCAT TAGTAATCGT TCATCTGTGG TAAAAAGGCA GGATTTGAAG CGATGGAAGA TGGGAGTACG GGGCGTTGGA AGACAAAGTG CCACACAGCG CAGCCTTCGT CTAGACCCCC GGGCTAACTA TAACGGTCCT AAGGTAGCGA G) GGGATGACAG ATTCTCTGTT CAGTGCACTC AGGGTCTGCC TCCACGAGAA TCACCATGCC STTTCTCAAG ACTGTGTTCT GTGCAGTGCC CTGTCAGTGG (SEQ ID NO: 4).

Нуклеотидная последовательность в нижележащей точке вставки на 3' конце нацеленной области включала в себя следующее, что показывает геномную последовательность мышцы и сайт рестрикции PI-Sce I (содержащийся в скобках ниже), смежно соединенные с геномной последовательностью тяжелой цепи человека ниже по ходу транскрипции от точки вставки: (AGGGGTCGAG GGGGAATTTT ACAAAGAACA AAGAAGCGGG CATCTGCTGA CATGAGGGCC GAAGTCAGGC TCCAGGCAGC GGGAGCTCCA CCGCGGTGGC GCCATTTTCAT TACCTCTTTC TCCGCACCCG ACATAGATAAAGCTT) ATCCCCCACC AAGCAAATCC CCCTACCTGG GGCCGAGCTT CCCGTATGTG GGAAAATGAA TCCCTGAGGT CGATTGCTGC ATGCAATGAA ATTCAACTAG (SEQ ID NO: 5).

Описанные выше нацеленные ES клетки использовали в качестве донорных ES клеток и вводили в эмбрион мыши на стадии 8 клеток с помощью способа генной инженерии мыши VELOCIMOUSE® (смотрите, например, патенты США №№76598442, 7576259, 7294754). Мышей, несущих гуманизированный локус тяжелой цепи, содержащий эктопическую геномную последовательность мыши, содержащую последовательности ADAM6a и ADAM6b мыши, определяли путем генотипирования с использованием модификации анализа аллелей (Valenzuela *et al.*, 2003), в котором обнаруживали присутствие генов ADAM6a и ADAM6b мыши в гуманизированном локусе тяжелой цепи.

Мышей, несущих гуманизированный локус тяжелой цепи, который содержит гены ADAM6a и ADAM6b мыши, скрещивали с FLPe делеторным штаммом мышей (смотрите, например, Rodríguez, C.I. *et al.* (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-*loxP*. Nature Genetics 25:139-140) для удаления любой фланкированной Frt кассеты гигромицина, введенной с помощью нацеливающего вектора, которые удаляют, например, на стадии ES клетки или в эмбрионе. Необязательно, кассету гигромицина оставляют у мышей.

Детенышей генотируют и детеныша, гетерозиготного в отношении гуманизированного локуса тяжелой цепи, содержащего эктопический геномный фрагмент мыши, который содержит последовательности ADAM6a и ADAM6b мыши, выбирают для определения характеристик экспрессии и фертильности гена ADAM6 мыши.

Пример 8. Определение характеристик мышей с восстановленным ADAM6

Проточная цитометрия. Трех мышей в возрасте 25 недель, гомозиготных в отношении переменных генных локусов тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека (H/к), и трех мышей в возрасте 18-20 недель, гомозиготных в отношении тяжелой цепи человека и к легкой цепи человека, содержащих эктопический геномный фрагмент мыши, кодирующий гены ADAM6a и ADAM6b мыши в обоих аллелях локуса тяжелой цепи человека (H/к-А6), умерщвляли для определения и анализа клеточных популяций лимфоцитов с помощью FACs на BD LSR II системе (BD Bioscience). Лимфоциты выделяли путем гейтирования в отношении специфических клеточных родословных и анализировали в отношении прохождения через различные стадии развития В-клеток. Собранные от животных ткани предусматривали кровь, селезенку и костный мозг. Кровь собирали в пробирки BD microtainer с EDTA (BD Biosciences). Костный мозг собирали из бедренных костей с помощью промывки полной средой RPMI, дополненной фетальной телячьей сывороткой, пируватом натрия, HEPES, 2-меркаптоэтанолом, заменимыми аминокислотами и гентамицином. Эритроциты из препаратов крови, селезенки и костного мозга лизировали с помощью лизирующего буфера на основе хлорида аммония (например, лизирующий буфер ACK) с последующей отмывкой полной средой RPMI.

Для окрашивания клеточных популяций 1×10^6 клеток из различных источников ткани инкубировали с антителом к CD16/CD32 мыши (2,4G2, BD Biosciences) на льду в течение 10 минут с последующим мечением одним или комбинацией следующих коктейлей антител в течение 30 мин на льду.

Костный мозг: антитело к FITC-CD43 мыши (1B11, BioLegend), PE-ckit (2B8, BioLegend), PerCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5,5-IgD (11-26c,2a, BioLegend), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience), A700-CD19 (1D3, BD Biosciences).

Периферическая кровь и селезенка: антитело к FITC-к мыши (187.1, BD Biosciences),

PE-λ (RML-42, BioLegend), PeCy7-IgM (II/41, eBioscience), PerCP-Cy5.5-IgD (11-26с.2а, BioLegend), APC-CD3 (145-2C11, BD), A700-CD19 (1D3, BD), APC-eFluor780-B220 (RA3-6B2, eBioscience). После инкубация с мечеными антителами клетки отмывали и фиксировали в 2% формальдегиде. Сбор данных проводили на проточном цитометре LSRII и анализировали с помощью FlowJo. Результаты от репрезентативной Н/к и Н/к-А6 мыши показаны на фигурах 14-18.

Результаты показывают, что В-клетки Н/к-А6 мышей проходят через стадии развития В-клеток аналогично Н/к мышам в костном мозге и периферических компартментах, и показывают нормальные паттерны созревания, как только они поступают на периферию. Н/к-А6 мыши демонстрировали увеличенную $CD43^{int}CD19^{+}$ клеточную популяцию по сравнению с Н/к мышами (фиг. 16В). Это может указывать на ускоренную экспрессию IgM из гуманизированного локуса тяжелой цепи, содержащего эктопический геномный фрагмент мыши, содержащий последовательности ADAM6a и ADAM6b мыши у Н/к-А6 мышей. На периферии В- и Т-клеточные популяции Н/к-А6 мышей оказываются нормальными и сходными с Н/к мышами.

Морфология семенников и определение характеристик сперматозоидов. Для определения того, является ли стерильность у мышей, характеризующихся гуманизированными вариabельными локусами тяжелой цепи иммуноглобулина вследствие нарушений семенников и/или продукции сперматозоидов, исследовали морфологию яичек и содержание сперматозоидов в придатке семенника.

Кратко, семенники от двух групп из пяти мышей на группу (группа 1: мыши, гомозиготные в отношении вариabельных генных локусов тяжелой и к легкой цепи человека, $mADAM6^{-/-}$; группа 2: мыши, гетерозиготная в отношении вариabельных генных локусов тяжелой цепи человека и гомозиготные в отношении вариabельных генных локусов легкой цепи, $mADAM6^{+/-}$) вырезали с интактным придатком семенника и взвешивали. Образцы затем фиксировали, погружали в парафин, делали срезы и окрашивали с помощью гематоксилинового и эозинового (HE) красителя. Срезы семенника (2 семенника от каждой мыши, общим количеством 20) исследовали в отношении нарушений в морфологии и данных о продукции сперматозоидов, тогда как срезы придатка семенника исследовали в отношении присутствия сперматозоидов.

Согласно настоящему эксперименту не наблюдали различий в весе или морфологии семенников между $mADAM6^{-/-}$ мышами и $mADAM6^{+/-}$ мышами. Сперму наблюдали во всех генотипах, как в семенниках, так и в придатке семенника. Эти результаты доказывают, что отсутствие генов ADAM6a и ADAM6b мыши не приводит к обнаруживаемым изменениям в морфологии семенника, и что сперматозоиды производятся у мышей в присутствии и при отсутствии этих двух генов. Нарушения в фертильности самцов $ADAM6^{-/-}$ мышей, следовательно, вероятно, не обусловлены низкой продукцией сперматозоидов.

Подвижность и миграция сперматозоидов. Мыши, у которых отсутствуют другие представители семейства генов ADAM, являются стерильными вследствие нарушений в подвижности и миграции сперматозоидов. Миграцию сперматозоидов определяют как способность спермы проходить от матки в яйцевод, и в норме необходима для оплодотворения у мышей. Для определения того, влияет ли делеция мышинных ADAM6a и ADAM6b на этот процесс, миграцию сперматозоидов оценивали у $mADAM6^{-/-}$ мышей. Также исследовали подвижность сперматозоидов.

Кратко, сперму получали из семенников (1) мышей, гетерозиготных в отношении

вариабельных генных локусов тяжелой цепи человек и гомозиготных в отношении
 вариабельных генных локусов к легкой цепи человека (ADAM6^{+/-}); (2) мышей,
 гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов тяжелой цепи человека и
 гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов к легкой цепи человека
 5 (ADAM6^{-/-}); (3) мышей, гомозиготных в отношении вариабельных генных локусов
 тяжелой цепи человека и гомозиготных в отношении к легкой цепи дикого типа
 (ADAM6^{-/-}mk); и, (4) C57 BL/6 мышей дикого типа (WT). Не наблюдали никаких
 значительных аномалий в количество сперматозоидов или общую подвижность
 10 сперматозоидов путем осмотра. Для всех мышей наблюдали дисперсию кумулюса,
 указывая на то, что каждый образец спермы был способен проникать в клетки кумулюса
 и связываться с виттелиновым слоем *in vitro*. Эти результаты показывают, что ADAM6^{-/-}
 мыши характеризуются спермой, которая способна к проникновению в кумулюс и
 связыванию с виттелиновым слоем.

15 Оплодотворение яйцеклеток мыши *in vitro* (IVF) проводили с использованием спермы
 от мышей, как описано выше. Несколько меньшее число нерасщепленных эмбрионов
 присутствовало для ADAM6^{-/-} на следующий день после IVF, а также сниженное
 количество сперматозоидов, связанных с яйцеклетками. Эти результаты показывают,
 20 что сперма от ADAM6^{-/-} мышей, при взаимодействии с яйцеклеткой, способна к
 проникновению в кумулюс и связыванию с виттелиновым слоем.

Согласно другому эксперименту способность спермы от ADAM6^{-/-} мышей
 мигрировать из матки и через яйцевод определяли в анализе миграции сперматозоидов.

25 Кратко, первую группу из пяти подвергнутых суперовуляции самок мышей спаривали
 с пятью ADAM6^{-/-} самцами. Вторую группу из пяти подвергнутых суперовуляции самок
 мышей спаривали с пятью ADAM6^{+/-} самцами. Семейные пары подвергали наблюдению
 в отношении копуляции, и через пять-шесть часов после копуляции матку и
 прикрепленный яйцевод из всех самок удаляли и промывали для анализа. Промывочные
 30 растворы проверяли в отношении яйцеклеток для подтверждения овуляции и подсчета
 количества сперматозоидов. Миграцию сперматозоидов оценивали двумя различными
 путями. Согласно первому способу оба яйцевода удаляли из матки, промывали солевым
 раствором и любые обнаруженные сперматозоиды подсчитывали. Присутствие
 яйцеклеток также отмечали как доказательство овуляции. Согласно второму способу
 35 яйцеводы оставляли прикрепленными к матке и обе ткани фиксировали, погружали в
 парафин, делали срезы и окрашивали (как описано выше). Срезы исследовали в
 отношении присутствия сперматозоидов, как в матке, так и в обоих яйцеводах.

40 Для пяти самок, спаренных с пятью ADAM6^{-/-} самцами, очень небольшое количество
 спермы обнаружили в промывочном растворе из яйцевода. Промывочные растворы
 из яйцеводов пяти самок, спаренных с пятью ADAM6^{+/-} самцами, демонстрировали
 содержание сперматозоидов, приблизительно в 25-30 раз выше (среднее, n=10 яйцеводов),
 чем присутствующее в промывочных растворах из яйцеводов пяти самок, спаренных
 с пятью ADAM6^{-/-} самцами.

45 Получали гистологические срезы матки и яйцевода. Срезы исследовали в отношении
 присутствия сперматозоидов в матке и яйцеводе (colliculus tubarius). Осмотр
 гистологических срезов яйцевода и матки выявил, что для самок мышей, спаренных с
 ADAM6^{-/-} мышами, сперму обнаружили в матке, но не в яйцеводе. Более того, срезы

от самок, спаренных с ADAM6^{-/-} мышами выявили, что сперму не обнаружили в маточно-трубном сочленении (UTJ). В срезах от самок, спаренных с ADAM6^{+/-} мышами сперму обнаружили в UTJ и в яйцевом.

Эти результаты показывают, что мыши, не содержащие гены ADAM6a и ADAM6b, производят сперму, которая проявляет *in vivo* нарушение миграции. Во всех случаях сперму обнаружили в матке, что указывает на то, что копуляция и высвобождение спермы, вероятно, происходит в норме, но небольшое количество сперматозоидов или их отсутствие наблюдали в яйцеводах после копуляции, что измеряли или с помощью определения количества сперматозоидов, или с помощью гистологического наблюдения. Эти результаты показывают, что мыши с отсутствием генов ADAM6a и ADAM6b производят сперматозоиды, которые проявляют неспособность мигрировать из матки в яйцевод. Это нарушение, вероятно, приводит к стерильности, поскольку сперматозоиды не способны пересечь маточно-трубное сочленение в яйцевом, где оплодотворяются яйцеклетки. Взяты вместе, все эти результаты сходятся к подтверждению гипотезы о том, что гены ADAM6 мыши способствуют в направлении сперматозоидов с нормальной подвижностью мигрировать из матки, через маточно-трубное сочленение и яйцевод и, таким образом, достигать яйцеклетки для осуществления события оплодотворения. Механизм, которым ADAM6 достигает этого, может быть прямым путем действия белков ADAM6 или посредством координированной экспрессии с другими белками, например, другими белками ADAM, в сперматозоиде, как описано ниже.

Экспрессия семейства генов ADAM. Известно, что комплекс белков ADAM присутствует в виде комплекса на поверхности созревающих сперматозоидов. Мыши, не содержащие других представителей семейства генов ADAM, теряют этот комплекс, как только сперматозоиды созревают, и проявляют снижение множественных белков ADAM в зрелых сперматозоидах. Для определения того, влияет ли отсутствие генов ADAM6a и ADAM6b на другие белки ADAM сходным образом, вестерн-блоты белковых экстрактов из семенника (незрелые сперматозоиды) и придатка семенника (созревающие сперматозоиды) анализировали для определения уровней экспрессии других представителей семейства генов ADAM.

Согласно настоящему эксперименту анализировали белковые экстракты от четырех ADAM6^{-/-} и четырех ADAM6^{+/-} мышей. Результаты показали, что экспрессия ADAM2 и ADAM3 не подверглась воздействию в экстрактах семенников. Тем не менее, как ADAM2, так и ADAM3 были сильно снижены в экстрактах придатка семенника. Это демонстрирует, что отсутствие ADAM6a и ADAM6b в сперматозоидах ADAM6^{-/-} мышей может напрямую воздействовать на экспрессию и, возможно, функцию других белков ADAM, когда сперматозоиды созревают (например, ADAM2 и ADAM3). Это указывает на то, что ADAM6a и ADAM6b являются частью белкового комплекса ADAM на поверхности сперматозоидов, который может быть критически важным для правильной миграции сперматозоидов.

Пример 9. Частота использования варибельных генов тяжелой цепи человека у мышей с восстановленным ADAM6

Частоту использования выбранных варибельных генов тяжелой цепи человека определяли у мышей, гомозиготных в отношении варибельных генных локусов тяжелой и легкой цепи человека, либо не содержащих гены ADAM6a и ADAM6b мыши (mADAM6^{-/-}), либо содержащих эктопический геномный фрагмент, кодирующий гены ADAM6a и ADAM6b мыши (ADAM6^{+/+}; смотрите пример 1) с помощью анализа

количественной ПЦР с использованием зондов TAQMAN™ (как описано выше).

Кратко, очищали CD19⁺ В-клетки из селезенок mADAM6^{-/-} и ADAM6^{+/+} мышей с использованием мышиных CD19 Microbeads (Miltenyi Biotec) и общую РНК очищали с использованием мининабора RNEASY™ (Qiagen). Геномную РНК удаляли с использованием обработки не содержащей РНазу ДНКазой на колонке (Qiagen). Приблизительно 200 нг мРНК обратно транскрибировали в кДНК с использованием набора First Stand cDNA Synthesis (Invitrogen) и затем амплифицировали с использованием универсального мастер-микса для ПЦР TAQMAN™ (Applied Biosystems) с использованием системы обнаружения последовательности ABI 7900 (Applied Biosystems). Относительную экспрессию каждого гена нормировали к к константной области мыши (мСк). На таблице 9 представлены комбинации смысловых/антисмысловых/TAQMAN™ MGB зондов, используемых в настоящем эксперименте.

Таблица 9

Вн человека	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
V _H 6-1	Смысловая: CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA	6
	Антисмысловая: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA	7
	Зонд: TCCAGGACTGGTGAAGC	8
V _H 1-2	Смысловая: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT	9
	Антисмысловая: GAGAACACAGAAGTGGATGAGATC	10
	Зонд: TGAGTCCAGTCCAGGGA	11
V _H 3-23	Смысловая: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG	12
	Антисмысловая: AACCTGGTCAGAACTGCCA	13
	Зонд: AGAGAAACAGTGGATACGT	14
V _H 1-69	Смысловая: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG	15
	Антисмысловая: GCTCGTGGATTTGTCCGC	16
	Зонд: CAGAGTCACGATTACC	17
мСк	Смысловая: TGAGCAGCACCTCACGTT	18
	Антисмысловая: GTGGCCTCACAGGTATAGCTGTT	19
	Зонд: ACCAAGGACGAGTATGAA	20

Согласно настоящему эксперименту экспрессию всех четырех генов V_H человека наблюдали в анализируемых образцах. Более того, уровни экспрессии были сопоставимыми между mADAM6^{-/-} и ADAM6^{+/+} мышами. Эти результаты показывают, что все гены V_H человека, которые являлись как дистальными по отношению к сайту модификации (V_H3-23 и V_H1-69), так и проксимальными по отношению к сайту модификации (V_H1-2 и V_H6-1), были способны рекомбинироваться для образования функционально экспрессируемой тяжелой цепи человека. Эти результаты показывают, что эктопический геномный фрагмент, содержащий последовательности ADAM6a и ADAM6b мыши, вставленные в геномную последовательность тяжелой цепи человека, не оказывают влияния на V(D)J рекомбинацию генных сегментов тяжелой цепи человека в пределах локуса, и эти мыши способны к рекомбинации генных сегментов тяжелой цепи человека нормальным способом для получения функциональных иммуноглобулиновых белков тяжелой цепи.

Пример 10. Делеция локусов легкой цепи иммуноглобулина мыши

Различные нацеливающие конструкции получали с использованием технологии VELOCIGENE® (смотрите, например, патент США №6586251 и Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression

analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659) для модификации библиотек геномных бактериальных искусственных хромосом (BAC) мыши для инактивации локусов κ и λ легкой цепи мыши.

Делеция локуса λ легкой цепи мыши. ДНК из клона BAC RP23-135k15 (Invitrogen) мыши модифицировали гомологичной рекомбинацией для инактивации эндогенного локуса λ легкой цепи мыши посредством нацеленной делеции генных кластеров V λ -J λ -C λ (фиг. 20).

Кратко, целый проксимальный кластер, содержащий генные сегменты V λ 1-J λ 3-C λ 1-J1-C λ 1 удаляли в течение одного события нацеленного воздействия с использованием нацеливающего вектора, содержащего кассету неомицина, фланкированную сайтами *loxP* с 5' гомологичным плечом мыши, содержащим последовательность 5' от генного сегмента V λ 1, и 3' гомологичным плечом мыши, содержащим последовательность 3' от генного сегмента C λ 1 (фиг. 20, нацеливающий вектор 1).

Второй нацеливающий конструктор получали для точного удаления дистального эндогенного λ генного кластера мыши, содержащего V λ 2-J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4 за исключением того, что нацеливающий конструктор содержал 5' гомологичное плечо мыши, которое содержало последовательность 5' от генного сегмента V λ 2, и 3' гомологичное плечо мыши, которое содержало последовательность 5' по отношению к эндогенному генному сегменту C λ 2 (фиг. 20, нацеливающий вектор 2). Таким образом, второй нацеливающий конструктор точно удалял V λ 2-J λ 2, сохраняя при этом C λ 2-J λ 4-C λ 4 интактным на эндогенном локусе λ мыши. ES клетки, содержащие инактивированный эндогенный локус λ (описанный выше), подтверждали с помощью способов кариотипирования и скрининга (например, TAQMAN®), известных в настоящей области техники. Затем ДНК выделяли из модифицированных ES клеток и подвергали обработке с помощью CRE рекомбиназы, тем самым опосредуя делецию проксимальной нацеливающей кассеты, содержащей маркерный ген неомицина, сохраняя только один сайт *loxP* в точке делеции (фиг. 20, нижняя часть).

Делеция локуса κ легкой цепи мыши. Несколько нацеливающих конструкторов получали с использованием аналогичных способов, описанных выше для модификации ДНК из клонов BAC RP23-302g12 и RP23-254m04 мыши (Invitrogen) путем гомологичной рекомбинации для инактивации локуса κ легкой цепи мыши в двухстадийном процессе (фиг. 21).

Кратко, генные сегменты J κ (1-5) эндогенного локуса κ легкой цепи мыши удаляли за одно событие нацеленного воздействия с использованием нацеливающего вектора, содержащего кассету гигромицина-тимидинкиназы (hug-TK), содержащую один сайт *loxP* 3' по отношению к кассете hug-TK (фиг. 21, J κ нацеливающий вектор). Гомологичные плечи, используемые для получения этого нацеливающего вектора, содержали геномную последовательность мыши 5' и 3' от эндогенных генных сегментов J κ мыши. Во втором событии нацеленного воздействия второй нацеливающий вектор получали для удаления части геномной последовательности мыши выше (5') по отношению к наиболее дистальному эндогенному генному сегменту V κ мыши (фиг. 21, V κ нацеливающий вектор). Этот нацеливающий вектор содержал инвертированный сайт *lox511*, сайт *loxP* и кассету неомицина. Гомологичные плечи, используемые для получения этого нацеливающего вектора, содержали геномную последовательность мыши выше наиболее дистального генного сегмента V κ мыши. Нацеливающие векторы использовали последовательно (т.е. J κ , затем V κ) для нацеливания ДНК в ES клетках. ES, несущие дважды нацеленную хромосому (т.е. один эндогенный локус κ мыши, нацеленный с помощью обоих нацеливающих векторов), подтверждали с помощью способов

кариотипирования и скрининга (например, TAQMAN™), известных в настоящей области техники. Затем ДНК выделяли из модифицированных ES клеток и подвергали обработке Cre рекомбиназой, тем самым опосредуя делецию эндогенных генных сегментов V κ 5 мыши и обеих кассет селекции, при этом сохраняя два расположенных рядом сайтов I α x в противоположной ориентации по отношению друг к другу (фиг. 21, нижняя часть; SEQ ID NO: 59).

Таким образом, два модифицированных эндогенных локуса (κ и λ) легкой цепи, содержащие интактный энхансер и константные области, создавали для поэтапной вставки нерearанжированных зародышевых генных сегментов λ человека точным 10 образом с использованием описанных ниже нацеливающих векторов.

Пример 11. Замещение локусов легкой цепи мыши мини-локусом λ легкой цепи человека

Многочисленные нацеливающие векторы конструировали для поэтапной вставки генных сегментов λ человека в эндогенные локусы κ и λ легкой цепи мыши с использованием аналогичных способов, описанных выше. Многочисленные независимые 15 исходные модификации производили в эндогенных локусах легкой цепи, каждая из которых производила химерный локус легкой цепи, содержащий генные сегменты hV λ и J λ , функционально связанные с константными генами и энхансерами легкой цепи мыши.

Мини-локус λ человека, содержащий 12 генных сегментов V λ человека и один генный 20 сегмент J λ человека. Серию исходных нацеливающих векторов конструировали, чтобы они содержали первые 12 последовательных генных сегментов V λ человека из кластера A и генный сегмент hJ λ 1 или четыре генных сегмента hJ λ с использованием ВАС клона человека с названием RP11-729g4 (Invitrogen). На фигурах 22A и 22B показаны нацеливающие векторы, которые сконструированы для получения исходной вставки 25 генных сегментов λ легкой цепи человека на локусы λ и κ легкой цепи мыши, соответственно.

Для первого набора исходных нацеливающих векторов фрагмент ДНК длиной 124125 п.н. из 729g4 ВАС клона, содержащий 12 генных сегментов hV λ и 1 генный сегмент hJ λ конструировали, чтобы он содержал сайт PI-SceI на 996 п.н. ниже (3') от генного сегмента 30 hJ λ 1 для лигирования 3' гомологичного плеча мыши. Два различных набора гомологичных плечей использовали для лигирования с этим фрагментом человека; один набор гомологичных плечей содержал эндогенные последовательности λ мыши из 135k15 ВАС клона (фиг. 22A), и другой набор содержал эндогенную последовательность κ 5' и 3' от генных сегментов V κ и J κ мыши из ВАС клонов мыши 35 RP23-302g12 и RP23-254m04, соответственно (фиг. 22B).

Для 12/1- λ нацеливающего вектора (фиг. 22A) сайт PI-SceI конструировали на 5' - конце от 27847 п.н. фрагмента ДНК, содержащего C λ 2-J λ 4-C λ 4 мыши и энхансер 2.4 модифицированного локуса λ мыши, описанного в примере 10. Фрагмент ~28 т.п.н. мыши использовали в качестве 3' гомологичного плеча путем лигирования с ~124 т.п.н. 40 λ фрагментом человека, что создавало 3' участок соединения, содержащий, в направлении 5'-3', генный сегмент hJ λ 1, 996 п.н. последовательности λ человека 3' от генного сегмента hJ λ 1, 1229 п.н. последовательности λ мыши 5' по отношению к гену C λ 2 мыши, ген C λ 2 мыши и оставшуюся часть ~28 т.п.н. фрагмента мыши. Выше (5') от генного сегмента V λ 3-12 человека размещали дополнительные 1456 п.н. 45 последовательности λ человека до начала 5' гомологичного плеча мыши, которое содержало 23792 п.н. геномной ДНК мыши, соответствующей последовательности 5' от эндогенного локуса λ мыши. Между 5' гомологичным плечом и началом последовательности λ человека находилась кассета неомицина, фланкированная сайтами

Frт.

Таким образом, 12/1-λ нацеливающий вектор включал в себя, в направлении 5'-3', 5' гомологичное плечо, содержащее ~24 т.п.н. геномной последовательности λ мыши 5' от эндогенного λ локуса, 5' сайт Frт, кассету неомицина, сайт 3' Frт, ~123 т.п.н. геномной последовательности λ человека, содержащей первые 12 последовательных генных сегментов hVλ и генный сегмент hJλ1, сайт PI-SceI, и 3' гомологичное плечо, содержащее ~28 т.п.н. геномной последовательности мыши, включая в себя эндогенные генные сегменты Cλ2-Jλ4-Cλ4, последовательность энхансера 2.4 мыши и дополнительные геномные последовательности мыши ниже (3') энхансера 2.4 (фиг. 22А).

Аналогичным образом, в 12/1-к нацеливающий вектор (фиг. 22В) использовали такой же ~124 фрагмент λ человека за исключением того, что гомологичные плечи мыши, содержащие последовательность к мыши, использовали так, чтобы нацеливание на эндогенный locus к могло быть достигнуто путем гомологичной рекомбинации. Таким образом, 12/1-к нацеливающий вектор включал в себя, в направлении 5'-3', 5' гомологичное плечо, содержащее ~23 т.п.н. геномной последовательности мыши 5' от эндогенного локуса к, сайт I-CeuI, 5' сайт Frт, кассету неомицина, 3' сайт Frт, ~124 т.п.н. геномной последовательности λ человека, содержащей первые 12 последовательных генных сегментов hVλ и генный сегмент hJλ1, сайт PI-SceI, и 3' гомологичное плечо, содержащее ~28 т.п.н. геномной последовательности мыши, включая в себя эндогенный ген Ск мыши, Ек1 и Ек3' и дополнительную геномную последовательность мыши ниже (3') Ек3' (фиг. 22В, 12/1-к нацеливающий вектор).

Гомологичная рекомбинация с любым из этих двух исходных нацеливающих векторов создавала модифицированный locus легкой цепи (к или λ) мыши, содержащий 12 генных сегментов hVλ и генный сегмент hJλ, функционально связанные с эндогенным константным геном легкой цепи и энхансерами мыши (Ск или С λ2 и Ек1/Ек3' или Enh 2.4/Enh 3.1), который при рекомбинации приводит к образованию химерной λ легкой цепи.

Мини-locus λ человека с 12 генными сегментами Vλ человека и четырьмя генными сегментами Jλ человека. Согласно другому подходу для добавления разнообразия в химерный locus λ легкой цепи третий исходный нацеливающий вектор конструировали для вставки первых 12 последовательных генных сегментов человека Vλ из кластера А и hJλ1, 2, 3 и 7 генных сегментов в locus к легкой цепи мыши (фиг. 22В, 12/4-к нацеливающий вектор). Сегмент ДНК, содержащий генные сегменты hJλ1, Jλ2, Jλ3 и Jλ7, получали с помощью *de novo* синтеза ДНК (Integrated ДНК Technologies), включая в себя каждый генный сегмент Jλ и геномную последовательность человека, содержащую ~100 п.н. из обеих ближайших 5' и 3' областей каждого генного сегмента Jλ. Сайт PI-SceI конструировали в 3' конец этого ~1 т.п.н. фрагмента ДНК и лигировали с кассетой хлорамфеникола. Гомологичные плечи амплифицировали с помощью ПЦР из λ последовательности человека в 5' и 3' положениях по отношению к генному сегменту hJλ1 ВАС клона 729g4 человека. Гомологичную рекомбинацию с этим промежуточным нацеливающим вектором проводили на модифицированном ВАС клоне 729g4, который предварительно нацеливали выше (5') от генного сегмента NA.3-12 человека с кассетой неомицина, фланкированной сайтами Frт, который также содержал сайт I-CeuI 5' по отношению к 5' сайту Frт. Дважды нацеленный 729g4 ВАС клон включал в себя в направлении 5'-3' сайт I-CeuI, 5' сайт Frт, кассету неомицина, 3' сайт Frт, ~123 т.п.н. фрагмент, содержащий первые 12 генных сегментов hVλ, ~1 т.п.н. фрагмент, содержащий генные сегменты Jλ1, 2, 3 и 7 человека, сайт PI-SceI и кассету хлорамфеникол. Этот промежуточный нацеливающий вектор обрабатывали вместе с I-CeuI и PI-SceI и

впоследствии лигировали в модифицированный ВАС клон мыши (описанный выше) для создания третьего нацеливающего вектора.

Это лигирование давало в результате третий нацеливающий вектор для вставки последовательностей λ человека в эндогенный локус к легкой цепи, который включал в себя, в направлении 5'-3', 5' гомологичное плечо мыши, содержащее ~23 т.п.н. геномной последовательности 5' от эндогенного локуса к мыши, сайт I-CeuI, 5' сайт Frt, кассету неомицина, 3' сайт Frt, -123 т.п.н. фрагмент, содержащий первые 12 генных сегментов hV λ , ~1 т.п.н. фрагмент, содержащий генные сегменты hJ λ 1, 2, 3 и 7, сайт PI-SceI и 3' гомологичное плечо, содержащее ~28 т.п.н. геномной последовательности мыши, включая в себя эндогенный ген Ск мыши, Ек1 и Ек3' и дополнительную геномную последовательность мыши ниже (3') от Ек3' (фиг. 22В, 12/4-к нацеливающий вектор). Гомологичная рекомбинация с этим третьим нацеливающим вектором создавала модифицированный локус к легкой цепи мыши, содержащий 12 генных сегментов hV λ и четыре генных сегмента hJ λ , функционально связанных с эндогенным геном Ск мыши, который при рекомбинации приводит к образованию химерной относящейся к человеку λ / относящейся к мыши к легкой цепи.

Мини-локус λ человека с интегрированной последовательностью к легкой цепи человека. Аналогичным образом, два дополнительных нацеливающих вектора, аналогичных векторам, сконструированным для получения исходной вставки генных сегментов λ человека в эндогенный локус к легкой цепи (фиг. 22В, 12/1-к и 12/4-к нацеливающие векторы), конструировали для поэтапной вставки генных сегментов λ легкой цепи человека с использованием уникально сконструированных нацеливающих векторов, содержащих смежные геномные последовательности λ и к человека. Эти нацеливающие векторы конструировали, чтобы включать в себя ~23 т.п.н. геномную последовательность к человека, расположенную в естественных условиях между генными сегментами V κ 4-1 и J κ 1 человека. Эту геномную последовательность к человека специально помещали в этих двух дополнительных нацеливающих векторах между генными сегментами V λ и J λ человека (фиг. 22В, 12(к)1-к и 12(к)4-к нацеливающие векторы).

Оба нацеливающих вектора, содержащих геномную последовательность к человека, получали с использованием описанного выше модифицированного RP11-729g4 ВАС клона (фиг. 24). Этот модифицированный ВАС клон нацеливали с помощью кассеты селекции спектиномицина, фланкированной сайтами рестрикции NotI и AsiSI (фиг. 24, вверху слева). Гомологичная рекомбинация с кассетой спектиномицина давала в результате дважды нацеленный 729g4 ВАС клон, который включал в себя, в направлении 5'-3', сайт I-CeuI, 5' сайт Frt, кассету неомицина, 3' сайт Frt, ~123 т.п.н. фрагмент, содержащий первые 12 генные сегменты hV λ , сайт NotI приблизительно 200 п.н. ниже (3') от нонамерной последовательности hV λ 3-1 генного сегмента, кассету спектиномицина и сайт AsiSI. Отдельный ВАС клон человека, содержащий к последовательность человека (CTD-2366j12), нацеливали два независимых раза для конструирования сайтов рестрикции в положениях между генными сегментами hV κ 4-1 и hJ κ 1 для обеспечения последующего клонирования ~23 т.п.н. фрагмента для лигирования с генными сегментами hV λ , содержащимися в дважды нацеленном модифицированном 729g4 ВАС клоне (фиг. 24, вверху справа).

Кратко, размер 2366j12 ВАС клона составляет приблизительно 132 т.п.н. и он содержит генные сегменты hV κ 1-6, 1-5, 2-4, 7-3, 5-2, 4-1, геномную последовательность человека ниже от генных сегментов V κ , генные сегменты hJ κ 1-5, hСк и приблизительно 20 т.п.н. дополнительной геномной последовательности локуса к человека. Этот клон

вначале нацеливали с помощью нацеливающего вектора, содержащего кассету гигромицина, фланкированную сайтами Frt и сайтом NotI ниже (3') от 3' сайта Frt. Гомологичные плечи для этого нацеливающего вектора содержали геномную последовательность человека 5' и 3' от генных сегментов V_κ в пределах ВАС клона так, чтобы при гомологичной рекомбинации с этим нацеливающим вектором удалить генные сегменты V_κ, и сайт NotI конструировали ~133 п.н. ниже от hV_κ4-1 генного сегмента (фиг. 24, вверху справа). Этот модифицированный 2366j12 ВАС клон нацеливали независимо двумя нацеливающими векторами на 3' -конце для удаления генных сегментов hJ_λ с помощью кассеты хлорамфеникола, которая также содержала или генный сегмент hJ_λ1, сайт PI-SceI и сайт AsiSI, или геномный фрагмент λ человека, содержащий четыре генных сегмента hJ_λ (выше), сайт PI-SceI и сайт AsiSI (фиг. 24, вверху справа). Гомологичные плечи для этих двух аналогичных нацеливающих векторов содержали последовательность 5' и 3' от генных сегментов hJ_λ. Гомологичная рекомбинация с этими вторыми нацеливающими векторами и модифицированным 2366j12 ВАС клоном давала в результате дважды нацеленный 2366j12 клон, который включал в себя, в направлении 5'-3', 5' сайт Frt, кассету гигромицина, 3' сайт Frt, сайт NotI, 22800 п.н. геномный фрагмент локуса к человека, содержащий межгенную область между генными сегментами V_κ4-1 и J_κ1, или генный сегмент hJ_λ1, или геномный фрагмент λ человека, содержащий hJ_λ1, J_λ2, J_λ3 и J_λ7, сайт PI-SceI и кассету хлорамфеникола (фиг. 24, вверху справа). Два последних нацеливающих вектора для получения двух дополнительных модификаций получали с помощью двух стадий лигирования с использованием дважды нацеленных клонов 729g4 и 2366j12.

Дважды нацеленные клоны 729g4 и 2366j12 обрабатывали с помощью NotI и AsiSI, получая в результате один фрагмент, содержащий кассету неомицина и генные сегменты hV_λ, и другой фрагмент, содержащий ~23 т.п.н. геномный фрагмент локуса к человека, содержащий межгенную область между генными сегментами V_κ4-1 и J_κ1, или генный сегмент hJ_λ1, или геномный фрагмент, содержащий генные сегменты hJ_λ1, J_λ2, J_λ3 и J_λ7, сайт PI-SceI и кассету хлорамфеникола, соответственно. Лигирование этих фрагментов создавало два уникальных ВАС клона, содержащих в направлении 5'-3' генные сегменты hV_λ, геномную последовательность к человека между генными сегментами V_κ4-1 и J_κ1, или генный сегмент hJ_λ1, или геномный фрагмент, содержащий генные сегменты hJ_λ1, J_λ2, J_λ3 и J_λ7, сайт PI-SceI и кассету хлорамфеникола (фиг. 24, нижняя часть). Эти новые ВАС клоны затем обрабатывали с помощью I-CeuI и PI-SceI для высвобождения уникальных фрагментов, содержащих вышележащую кассету неомицина и смежные λ и κ последовательности человека, и лигировали в модифицированный ВАС клон 302g12 мыши, который содержал в направлении 5'-3' геномную последовательность мыши 5' от эндогенного к локуса, сайт I-CeuI, 5' сайт Frt, кассету неомицина, 3' сайт Frt, генные сегменты hV_λ (3-12 до 3-1), сайт NotI ~200 п.н. ниже от V_λ3-1, ~23 т.п.н. последовательности к человека, встречающейся в природе между генными сегментами V_κ4-1 и J_κ1 человека, или генный сегмент hJ_λ1, или геномный фрагмент, содержащий генные сегменты hJ_λ1, J_λ2, J_λ3 и J_λ7, E_κ1 мыши, ген С_κ мыши и E_κ3' (фиг. 22, 12hV_λ-V_κJ_κ-hJ_λ1 и 12hV_λ-V_κJ_κ-4hJ_λ нацеливающие векторы). Гомологичная рекомбинация с обоими из этих нацеливающих векторов создавала два отдельных модифицированных локуса к легкой цепи мыши, содержащих 12 генных сегментов hV_λ, геномную последовательность к человека, и или один, или четыре генных сегмента hJ_λ, функционально связанных с эндогенным геном С_κ мыши, который при рекомбинации приводит к образованию химерной относящейся к человеку λ/ относящейся к мыши к легкой цепи.

Пример 12. Конструирование дополнительных генных сегментов V λ человека в мини-локус λ легкой цепи человека

Дополнительные генные сегменты hV λ добавляли независимо в каждую из исходных модификаций, описанных в примере 11 с использованием аналогичных нацеливающих векторов и способов (фиг. 23А, +16- λ нацеливающий вектор и фиг. 23В, +16-к нацеливающий вектор).

Введение 16 дополнительных генных сегментов V λ человека. Вышележащие (5') гомологичные плечи, используемые в конструировании нацеливающих векторов для добавления 16 дополнительных генных сегментов hV λ в модифицированные локусы легкой цепи, описанные в примере 11, содержали геномную последовательность мыши 5' от или эндогенного локуса к легкой цепи, или эндогенного локуса λ легкой цепи. 3' гомологичные плечи были одинаковыми для всех нацеливающих векторов и содержали геномную последовательность человека, перекрывающуюся с 5' концом λ последовательности человека описанных в примере 11 модификаций.

Кратко, два нацеливающих вектора конструировали для введения 16 дополнительных генных сегментов hV λ в описанные в примере 11 модифицированные локусы легкой цепи мыши (фиг. 23А и 5В, +16- λ или +16-к нацеливающий вектор). ~172 т.п.н. фрагмент ДНК из ВАС клона RP11-761113 человека (Invitrogen), содержащий 21 последовательный генный сегмент hV λ из кластера А, конструировали с 5' гомологичным плечом, содержащим геномную последовательность мыши 5' по отношению или к эндогенному локусу к, или эндогенному локусу λ легкой цепи и 3' гомологичным плечом, содержащим геномную последовательность λ человека. 5' к или λ гомологичные плечи мыши, используемые в этих нацеливающих конструктах, были такими же 5' гомологичными плечами, описанными в примере 11 (фиг. 23А и 23В). 3' гомологичное плечо включало в себя 53057 п.н. область наложения геномной λ последовательности человека, соответствующей эквивалентному 5' концу ~123 т.п.н. фрагмента геномной последовательности λ человека, описанной в примере 11. Эти два нацеливающих вектора включали в себя, в направлении 5'-3', 5' гомологичное плечо мыши, содержащее или ~23 т.п.н. геномной последовательности 5' эндогенного локуса к легкой цепи мыши или ~24 т.п.н. геномной последовательности мыши 5' от эндогенного локуса λ легкой цепи, 5' сайт Frt, кассету гигромицина, 3' сайт Frt и 171457 п.н. геномной последовательности λ человека, содержащей 21 последовательный генный сегмент hV λ , ~53 т.п.н. которой перекрываются с 5' -концом последовательности λ человека, описанной в примере 12, и служит в качестве 3' гомологичного плеча для этого нацеливающего конструкта (фиг. 23А и 23В, +16- λ или +16-к нацеливающие векторы). Гомологичная рекомбинация с этими нацеливающими векторами создавала независимо модифицированные локусы к и λ легкой цепи мыши, каждый из которых содержал 28 генных сегментов hV λ и генный сегмент hJ λ 1, функционально связанный с эндогенными константными генами мыши (Ск или С λ 2), которые при рекомбинации приводят к образованию химерной легкой цепи.

Аналогичным образом, +16-к нацеливающий вектор также использовали для введения 16 дополнительных генных сегментов hV λ в другие исходные модификации, описанные в примере 11, которые встраивали многочисленные генные сегменты hJ λ с интегрированной к последовательностью человека и без нее (фиг. 22В). Гомологичная рекомбинация с этим нацеливающим вектором на эндогенном локусе к мыши, содержащем другие исходные модификации, создавала локусы к легкой цепи мыши, содержащие 28 генных сегментов hV λ и генные сегменты hJ λ 1, 2, 3 и 7 с геномной последовательностью V κ -J κ человека и без нее, функционально связанной с эндогенным

геном Ск мыши, который при рекомбинации приводит к образованию химерной λ -к легкой цепи.

Введение 12 дополнительных генных сегментов V λ человека. Дополнительные генные сегменты hV λ добавляли независимо к каждой из описанных выше модификаций с использованием аналогичных нацеливающих векторов и способов. Конечная структура локуса, полученного из гомологичной рекомбинации с нацеливающими векторами, содержащими дополнительные генные сегменты hV λ , показана на фиг. 25А и 25В.

Кратко, нацеливающий вектор конструировали для введения 12 дополнительных генных сегментов hV λ в описанный выше модифицированные локусы к и λ легкой цепи мыши (фиг. 23А и 23В, +12- λ или 12-к нацеливающие векторы). 93,674 п.н. фрагмент ДНК из ВАС клона RP11-22118 человека (Invitrogen), содержащий 12 последовательных генных сегментов hV λ из кластера В, конструировали с 5' гомологичным плечом, содержащим геномную последовательность мыши 5' по отношению или к эндогенному локусу к легкой цепи, или локусу λ легкой цепи мыши, и 3' гомологичное плечо, содержащее геномную последовательность λ человека. 5' гомологичные плечи, используемые в этом нацеливающем конструкторе, были такими же 5' гомологичными плечами, используемыми для добавления описанных выше 16 генных сегментов hV λ (фиг. 23А и 23В). 3' гомологичное плечо получали путем конструирования сайта PI-SceI ~3431 п.н. 5' по отношению к генному сегменту V λ 3-29Р человека, содержащемуся в 27468 п.н. геномном фрагменте последовательности λ человека из ВАС клона RP11-761113. Этот сайт PI-SceI служил в качестве точки лигирования для соединения ~94 т.п.н. фрагмента дополнительной последовательности λ человека с ~27 т.п.н. фрагментом последовательности λ человека, который перекрывается с 5' концом последовательности λ человека в предыдущей модификации с использованием +16- λ или +16-к нацеливающих векторов (фиг. 23А и 23В). Эти два нацеливающих вектора включали в себя, в направлении 5'-3', 5' гомологичное плечо, содержащее или ~23 т.п.н. геномной последовательности мыши 5' от эндогенного локуса к легкой цепи, или ~24 т.п.н. геномной последовательности мыши 5' от эндогенного локуса λ легкой цепи, 5' сайт Frt, кассету неомицина, 3' сайт Frt и 121188 п.н. геномной последовательности λ человека, содержащей 16 генных сегментов hV λ и сайт PI-SceI, ~27 т.п.н. из которых перекрывается с 5' концом последовательности λ человека из вставки 16 добавленных генных сегментов hV λ и служит в качестве 3' гомологичного плеча для этого нацеливающего конструктора (фиг. 23А и 23В, +12- λ или 12-к нацеливающие векторы). Гомологичная рекомбинация с этими нацеливающими векторами независимо создавала модифицированные локусы к и λ легкой цепи мыши, содержащие 40 генных сегментов hV λ и hJ λ 1 человека, функционально связанный с эндогенными константными генами мыши (Ск или С λ 2) которые при рекомбинации приводили к образованию химерной легкой цепи (нижняя часть фиг. 23А и 23В).

Аналогичным образом, +12-к нацеливающий вектор также использовали для введения 12 дополнительных генных сегментов hV λ в другие исходные модификации, которые встраивали многочисленные генные сегменты hJ λ с интегрированной последовательностью к человека и без нее (фиг. 22В). Гомологичная рекомбинация с этим нацеливающим вектором на эндогенном локусе к мыши, содержащем другие модификации, создавала локус к легкой цепи мыши, содержащий 40 генные сегменты hV λ и генные сегменты hJ λ 1, 2, 3 и 7 с и без геномной последовательности Vк-Жк человека, функционально связанной с эндогенным геном Ск мыши, который при рекомбинации приводит к образованию химерной λ -к легкой цепи.

Пример 13. Идентификация нацеленных ES клеток, несущих генные сегменты λ легкой

цепи человека

Нацеленную ВАС ДНК, полученную согласно предыдущим примерам, использовали для электропорации ES клеток мыши для создания модифицированных ES клеток для создания химерных мышей, которые экспрессируют генные сегменты λ легкой цепи человека. ES клетки, содержащие вставку нереаранжированных генных сегментов λ легкой цепи человека, идентифицировали с помощью количественного анализа TAQMAN®. Наборы специфических праймеров и зонды разрабатывали для вставки последовательностей λ человека и ассоциированных кассет селекции (приобретение аллеля, GOA), потери эндогенных последовательностей мыши и любых кассет селекции (потеря аллеля, LOA) и удержания фланкирующих последовательностей мыши (удержание аллеля, AR). Для каждой дополнительной вставки последовательностей λ человека дополнительные наборы праймеров и зонды использовали для подтверждения присутствия дополнительных последовательностей λ человека, а также предыдущие наборы праймеров и зонды использовали для подтверждения удержания ранее нацеленных последовательностей человека. На таблице 10 представлены праймеры и ассоциированные зонды, используемые в анализах количественной ПЦР. На таблице 11 представлены комбинации, используемые для подтверждения вставки каждого отдела генных сегментов λ легкой цепи человека в клоны ES клеток.

ES клетки, несущие генные сегменты λ легкой цепи человека необязательно трансфектировали с помощью конструкта, который экспрессирует FLP, для удаления фланкированной Frt кассеты неомицина, введенной путем вставки нацеливающего конструкта, содержащего генные сегменты V λ 5-52 - V λ 1-40 человека (фиг. 23А и 23В). Кассету неомицина могут необязательно удалить скрещиванием с мышами, которые экспрессируют рекомбиназу FLP (например, патент США №6774279). Необязательно, кассету неомицина у мышей сохраняют.

ТАБЛИЦА 10

Праймер	SEQ ID NO:	Зонд	SEQ ID NO:
hL2F	60	hL2P	82
hL2R	61		
hL3F	62	hL3P	83
hL3R	63		
NeoF	64	NeoP	84
NeoR	65		
61hJ1F	66	61hJ1P	85
61hJ1R	67		

5	67hT1F	68	67hT1P	86
	67hT1R	69		
5	67hT3F	70	67hT3P	87
	67hT3R	71		
10	HygF	72	HygP	88
	HygR	73		
10	MKD2F	74	MKD2P	89
	MKD2R	75		
15	MKP8F	76	MKP8P	90
	MKP8R	77		
15	MKP15F	78	MKP15P	91
	MKP15R	79		
20	MK20F	80	-	-
	MKP4R	81		
20	68h2F	92	68h2P	96
	68h2R	93		
25	68h5F	94	68h5P	97
	68h5R	95		
25	mL1F	133	mL1P	141
	mL1R	134		
30	mL2F	135	mL2P	142
	mL2R	136		
30	mL11F	137	mL11P	143
	mL11R	138		
30	mL12F	139	mL12P	144
	mL12R	140		

ТАБЛИЦА 11

Модификация	Анализ	Набор прямых/обратных праймеров	Зонд	Положение последовательности
Вставка 12 hVλ и hJλ1	GOA	hL2F/hL2R	hL2P	hVλ3-12 – hVλ3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		61hJ1F/61hJ1R	61hJ1P	Последовательность hJλ
		NeoF/NeoR	NeoP	Кассета неомицина

5 10 15 20	LOA	MK20F/MKP4R	-	Последовательность <i>lox511/loxP</i> инактивированного локуса κ
		HygF/HygR	HygP	Кассета гигромицина из инактивированного локуса λ
		mL1F/mL1R	mL1P	Кластер V λ 1-C λ 1 мыши
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Кластер V λ 2-C λ 2 мыши
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Последовательность мыши в 5' локусе V κ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Последовательность мыши в 3' локусе V κ
25 30 35 40	GOA	67hT1F/67hT1R	67hT1P	hV λ 3-27 – hV λ 3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
		HygF/HygR	HygP	Кассета гигромицина
	LOA	NeoF/NeoR	NeoP	Кассета неомицина
		mL1F/mL1R	mL1P	Кластер V λ 1-C λ 1 мыши
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Кластер V λ 2-C λ 2 мыши
		mL12F/mL12R	mL12P	
	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hV λ 3-12 – hV λ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Последовательность мыши в 5' локусе V κ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Последовательность мыши в 3' локусе V κ
45	GOA	68h2F/68h2R	68h2P	hV λ 5-52 – hV λ 1-40
		68h5F/68h5R	68h5P	

		NeoF/NeoR	NeoP	Кассета неомицина
	LOA	HygF/HygR	HygP	Кассета гигромицина
5		mL1F/mL1R	mL1P	Кластер V λ 1-C λ 1 мышь
		mL2F/mL2R	mL2P	
		mL11F/mL11R	mL11P	Кластер V λ 2-C λ 2 мышь
		mL12F/mL12R	mL12P	
10	AR	hL2F/hL2R	hL2P	hV λ 3-12 – hV λ 3-1
		hL3F/hL3R	hL3P	
		67hT1F/67hT1R	67hT1P	hV λ 3-27 – hV λ 3-12
		67hT3F/67hT3R	67hT3P	
15	AR/LOA	MKD2F/MKD2R	MKD2P	Последовательность мышь в 5' локусе V κ
		MKP15F/MKP15R	MKP15P	Последовательность мышь в 3' локусе V κ

Пример 14. Получение мышей, экспрессирующих λ легкую цепь человека из эндогенного локуса легкой цепи

Описанные выше нацеленные ES клетки использовали в качестве донорных ES клеток и вводили в зародыш мыши на стадии 8 клеток и с помощью способа VELOCIMOUSE® (смотрите, например, патент США №7294754 и Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99. VELOCIMICE® (F0 мышей, полностью происходящих из донорной ES клетки), независимо несущих генные сегменты λ человека, идентифицировали путем генотипирования с использованием модификации аллельного анализа (Valenzuela *et al.*, выше), который обнаруживает присутствие уникальных генных сегментов λ человека (выше).

Частота использования к λ легкой цепи мышей, несущих генные сегменты λ легкой цепи человека. Мышей, гомозиготных в отношении каждой из трех успешных вставок генных сегментов hV λ с одним генным сегментом hJ λ (фиг. 23B), и мышей, гомозиготных в отношении первой вставки генных сегментов hV λ или с одним генным сегментом hJ λ , или с четырьмя генными сегментами J λ человека, включая в себя геномную последовательность V κ -J κ человека (фиг. 22B), анализировали в отношении экспрессии к и λ легкой цепи в спленоцитах с использованием проточной цитометрии.

Кратко, селезенки собирали от групп мышей (в диапазоне от трех до семи животных на группу) и измельчали с использованием предметных стекол. После лизиса эритроцитов (RBC) с помощью лизирующего буфера ACK (Lonza Walkersville) спленоциты окрашивали с помощью конъюгированных с флуоресцентным красителем антител, специфических к CD19 мыши (клон 1 D3; BD Biosciences), CD3 мыши (17A2; Biolegend), Igk мыши (187.1; BD Biosciences) и Ig λ мыши (RML-42; Biolegend). Данные получали с использованием проточного цитометра BD™ LSR II (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения FLOVVO™ (Tree Star, Inc.). На таблице 12 представлены средние значения в процентах для В-клеток (CD19⁺), экспрессии к легкой цепи (CD19⁺Igk⁺Ig λ ⁻) и λ легкой цепи (CD19⁺Igk⁻Ig λ ⁺), наблюдаемой в спленоцитах из групп животных, несущих каждую генетическую модификацию.

В сходном эксперименте содержание В-клеток компартмента селезенки из мышей, гомозиготных в отношении первой вставки 12 hV λ и четырех hJ λ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность V κ -J κ человека, функционально связанную с геном С κ мыши (нижняя часть фиг. 22В), и мышей, гомозиготных в отношении 40 hV λ и одного генного сегмента hJ λ (нижняя часть фиг. 23В или верхняя часть фиг. 25В), анализировали в отношении экспрессии Ig κ и Ig λ с использованием проточной цитометрии (как описано выше). На фиг. 26А показана экспрессия Ig λ и Ig κ в CD19⁺ В-клетках для репрезентативной мыши из каждой группы. Количество CD19⁺ В-клеток на селезенку также регистрировали для каждой мыши (фиг. 26В).

Согласно другому эксперименту содержание В-клеток компартментов селезенки и костного мозга из мышей, гомозиготных в отношении 40 hV λ и четырех hJ λ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность V κ -J κ человека, функционально связанную с геном С κ мыши (нижняя часть фиг. 26В), анализировали в отношении хода развития В-клеток с использованием проточной цитометрии различных маркеров клеточной поверхности.

Кратко, две группы (N=3 каждая, самцы и самки возрастом 9-12 недель) дикого типа и мышей, гомозиготных в отношении 40 hV λ и четырех hJ λ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность V κ -J κ человека, функционально связанную с геном С κ мыши, умерщвляли и собирали селезенки и костный мозг. Костный мозг собирали из бедренных костей путем промывания с помощью полной среды RPMI (среда RPMI, дополненная фетальной телячьей сывороткой, пируватом натрия, Нерес, 2-меркаптоэтанолом, заменимыми аминокислотами и гентамицином). Эритроциты из препаратов селезенки и костного мозга лизировали с помощью лизирующего буфера ACK (Lonza Walkersville), после чего отмывали полной средой RPMI. 1 \times 10⁶ клеток инкубировали с антителами к CD16/CD32 мыши (2.4G2, BD Biosciences) на льду в течение 10 минут, после чего метили с помощью выбранной панели антител в течение 30 мин. на льду.

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

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

После окрашивания клетки отмывали и фиксировали в 2% формальдегиде. Сбор данных проводили на проточном цитометре FACSCANTO II™ (BD Biosciences) и данные анализировали с помощью программного обеспечения FLOWJO™ (Tree Star, Inc.). На фигурах 27А-27D показаны результаты компартмента селезенки одной репрезентативной мыши из каждой группы. На фигурах 28А-28Е показаны результаты для компартмента костного мозга одной репрезентативной мыши из каждой группы. На таблице 13 представлены средние значения в процентах для В-клеток (CD19⁺), экспрессии κ легкой цепи (CD19⁺Ig κ ⁺Ig λ ⁻) и λ легкой цепи (CD19⁺Ig κ ⁻Ig λ ⁺), наблюдаемой в спленоцитах от групп животных, несущих различные генетические модификации. На Таблице 14 представлены средние значения в процентах для В-клеток (CD19⁺), зрелых В-клеток (B220^{hi}IgM⁺), незрелых В-клеток (B220^{int}IgM⁺), незрелых В-клеток, экспрессирующих

к легкую цепь ($B220^{int}IgM^+Ig\kappa^+$) и незрелых В-клеток, экспрессирующих λ легкую цепь ($B220^{int}IgM^+Ig\lambda^+$), наблюдаемых в костном мозге мышей дикого типа и мышей, гомозиготных в отношении 40 hV λ и четырех hJ λ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность V κ -J κ человека, функционально связанную с геном С κ мыши. Этот эксперимент повторяли с дополнительными группами описанных выше мышей и показали сходные результаты (данные не показаны).

ТАБЛИЦА 12

Генотип	В-клетки	Ig κ^+	Ig λ^+
Дикий тип	46,2	91,0	3,6
12 hV λ +hJ λ 1	28,3	10,4	62,5
12 hV λ -V κ J κ -hJ λ 1	12,0	11,0	67,5
12 hV λ -V κ J κ -4hJ λ	41,8	17,2	68,4
28 hV λ +hJ λ 1	22,0	13,3	51,1
40 hV λ +hJ λ 1	28,2	24,3	53,0

ТАБЛИЦА 13

Генотип	В-клетки	Ig κ^+	Ig λ^+
Дикий тип	49,8	91,2	3,5
40 hV λ -V κ J κ -4hJ λ	33,3	41,6	43,1

ТАБЛИЦА 14

Генотип	В-клетки	Зрелые	Незрелые	Незрелые Ig κ^+	Незрелые Ig λ^+
		В-клетки	В-клетки	В-клетки	В-клетки
Дикий тип	62,2	9,2	12,0	79,0	8,84
40 hV λ -V κ J κ -4hJ λ	60,43	2,59	7,69	38,29	43,29

Частота использования гена V λ человека у мышей, несущих генные сегменты λ легкой цепи человека. Мышей, гетерозиготных в отношении первой вставки λ последовательностей человека (hV λ 3-12-hV λ 3-1 и hJ λ 1, фиг. 23В), и гомозиготных в отношении третьей вставки λ последовательностей человека (hV λ 5-52-hV λ 3-1 и hJ λ 1, фиг. 23В), анализировали в отношении частоты использования гена λ легкой цепи человека с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) с использованием РНК, выделенной из спленоцитов.

Кратко, селезенки собирали и промывали с помощью 10 мл RPMI-1640 (Sigma) с 5% HI-FBS в стерильных одноразовых пакетах. Каждый пакет, содержащий одну селезенку, затем помещали в STOMACHER™ (Seward) и гомогенизировали при средней скорости в течение 30 секунд. Гомогенизированные селезенки фильтровали с использованием 0,7 мкм клеточного фильтра и затем осаждали с помощью центрифуги (1000 об/мин в течение 10 минут) и RBC лизировали в BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences) в течение трех минут. Спленоциты разбавляли в RPMI-1640 и центрифугировали снова, после чего ресуспендировали в 1 мл PBS (Irvine Scientific). РНК выделяли из осажденных спленоцитов с использованием известных в настоящей области техники стандартных техник.

ОТ-ПЦР проводили на РНК спленоцитов с использованием праймеров, специфических для генных сегментов hV λ человека и гена С κ мыши (таблица 15). Продукты ПЦР очищали с применением геля и клонировали в вектор pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) и секвенировали с праймерами: прямой M13 (GTAAAACGAC GGCCAG; SEQ ID NO: 113) и обратный M13 (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO: 114), расположенными в пределах вектора в положениях, фланкирующих сайт клонирования. Клоны общим количеством 84, происходящие из первой и третьей вставок λ последовательностей человека, секвенировали для определения частоты использования гена hV λ (таблица 16). Нуклеотидная последовательность участка соединения hV λ -hJ λ 1-mС κ для выбранных клонов ОТ-ПЦР показана на фиг. 29.

Аналогичным образом, мышей, гомозиготных в отношении третьей вставки генных последовательностей λ легкой цепи человека (т.е. 40 генных сегментов hV λ и четырех генных сегментов hJ λ , включая в себя геномную последовательность V κ -J κ человека, нижняя часть фиг. 25В), функционально связанных с эндогенным геном С κ мыши, анализировали в отношении частоты использования гена λ легкой цепи человека с помощью ОТ-ПЦР с использованием РНК, выделенной из спленоцитов (как описано выше). Частота использования генных сегментов λ легкой цепи человека для 26 выбранных клонов ОТ-ПЦР показана в таблице 17. Нуклеотидная последовательность участка соединения hV λ -hJ λ 1-mС κ для выбранных клонов ОТ-ПЦР показана на фиг. 30.

Аналогичным образом, мышей, гомозиготных в отношении первой вставки генных сегментов λ легкой цепи человека (12 генных сегментов hV λ и hJ λ 1, фиг. 22А и фиг. 23А), функционально связанных с эндогенным геном С λ 2 мыши, анализировали в отношении частоты использования гена λ легкой цепи человека с помощью ОТ-ПЦР с использованием РНК, выделенной из спленоцитов (как описано выше). Праймеры, специфические для генных сегментов hV λ (таблица 15) использовали с паре с одним из двух праймеров, специфических для гена С λ 2 мыши; С λ 2-1 (SEQ ID NO: 162) или С λ 2-2 (SEQ ID NO: 163).

Многочисленные генные сегменты hV λ , реаранжированные до h λ 1, наблюдали из клонов ОТ-ПЦР от мышей, несущих генные сегменты λ легкой цепи человека на эндогенном локусе λ легкой цепи мыши. Нуклеотидная последовательность участка

соединения hV λ -hJ λ -mC λ 2 для выбранных клонов ОТ-ПЦР показана на фиг. 31.

ТАБЛИЦА 15

5' праймер hV λ	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
VLL-1	CCTCTCCTCC TCACCCTCCT	98
VLL-1n	ATGRCCDGST YYYCTCTCCT	99
VLL-2	CTCCTCACTC AGGGCACA	100
VLL-2n	ATGGCCTGGG CTCTGCTCCT	101
VLL-3	ATGGCCTGGA YCCTCTCC	102
VLL-4	TCACCATGGC YTGGRYCYCM YTC	103
VLL-4.3	TCACCATGGC CTGGGTCTCC TT	104
VLL-5	TCACCATGGC CTGGAMTCYT CT	105
VLL-6	TCACCATGGC CTGGGCTCCA CТАCTT	106
VLL-7	TCACCATGGC CTGGACTCCT	107
VLL-8	TCACCATGGC CTGGATGATG CTT	108
VLL-9	TAAATATGGC CTGGGCTCCT CT	109
VLL-10	TCACCATGCC CTGGGCTCTG CT	110
VLL-11	TCACCATGGC CCTGACTCCT CT	111

3' праймер Ск мыши	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
mlgKC3'-1	CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA	112

ТАБЛИЦА 16

hVλ Наблюдаемое число клонов

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

ТАБЛИЦА 17

Клон hVλ hJλ

1-3	1-44	7
1-5	1-51	3
2-3	9-49	7
2-5	1-40	1
2-6	1-40	7
3b-5	3-1	7
4a-1	4-3	7
4a-5	4-3	7
4b-1	1-47	3
5-1	3-10	3
5-2	1-40	7
5-3	1-40	7
5-4	7-46	2
5-6	1-40	7
5-7	7-43	3
6-1	1-40	1
6-2	1-40	2
6-7	1-40	3
7a-1	3-10	7
7a-2	9-49	2

7a-7	3-10	7
7b-2	7-43	3
7b-7	7-46	7
7b-8	7-43	3
11a-1	5-45	2
11a-2	5-45	7

На фиг. 29 показана последовательность участка соединения hV λ -hJ λ 1-mC κ для клонов ОТ-ПЦР от мышей, несущих первую и третью вставку генных сегментов hV λ с одним генным сегментом hJ λ . Последовательности, показанные на фиг. 29, иллюстрируют уникальные реаранжировки, в которые вовлечены различные генные сегменты hV λ с hJ λ 1, рекомбинированные с геном C κ мыши. Как гетерозиготные мыши, несущие один модифицированный эндогенный локус к, содержащий 12 генных сегментов hV λ и hJ λ 1, так и гомозиготные мыши, несущие два модифицированных эндогенных к локуса, содержащие 40 генных сегментов hV λ и hJ λ 1, были способны производить генные сегменты λ человека, функционально связанные с геном C κ мыши и производить В-клетки, которые экспрессировали λ легкие цепи человека. Эти реаранжировки демонстрируют, что химерные локусы были способны независимо реаранжировать генные сегменты λ человека в многочисленных независимых В-клетках у этих мышей. Кроме того, эти модификации в эндогенном локусе к легкой цепи не делали какой-либо из генных сегментов hV λ неработоспособным или не предотвращали в химерном локусе рекомбинацию многочисленных генных сегментов hV λ и hJ λ (J λ 1) в ходе развития В-клеток, о чем свидетельствуют 16 различных генных сегментов hV λ , которые, как показывают наблюдения, реаранжируются с hJ λ 1 (таблица 16). Кроме того, эти мыши производили функциональные антитела, содержащие реаранжированные генные сегменты V λ -J λ человека, функционально связанные с генами C κ мыши, как часть эндогенного репертуара легких цепей иммуноглобулина.

На фиг. 30 показана последовательность участка соединения hV λ -hJ λ -mC κ для выбранных клонов ОТ-ПЦР от мышей, гомозиготных в отношении 40 hV λ и четырех hJ λ генных сегментов, включая в себя геномную последовательность V κ -J κ человека. Последовательности, показанные на фиг. 30, иллюстрируют дополнительные уникальные реаранжировки, включающие в себя многочисленные различные генные сегменты hV λ , охватывающие целый химерный локус, с многочисленными различными генными сегментами hJ λ , реаранжированными и функционально связанными с геном C κ мыши. Гомозиготные мыши, несущие модифицированные эндогенные к локусы, содержащие 40 hV λ и четыре hJ λ генных сегмента, также были способны производить генные сегменты λ человека, функционально связанные с геном C κ мыши, и производить В-клетки, которые экспрессировали λ легкие цепи человека. Эти реаранжировки дополнительно демонстрируют, что все стадии химерных локусов были способны независимо реаранжировать генные сегменты λ человека в многочисленных независимых В-клетках у этих мышей. Кроме того, эти дополнительные модификации в эндогенном локусе к легкой цепи демонстрируют, что каждая вставка генных сегментов λ человека не делала какой-либо из генных сегментов hV λ и/или J λ неработоспособным или не

предотвращала в химерном локусе рекомбинацию многочисленных генных сегментов hV λ и hJ λ в ходе развития В-клеток, о чем свидетельствуют 12 различных генных сегментов hV λ , которые, как показывают наблюдения, реаранжируются со всеми

четырьмя генными сегментами hJ λ (таблица 17) из 26 выбранных клонов ОТ-ПЦР. Кроме того, эти мыши также производили функциональные антитела, содержащие генные сегменты V λ -J λ человека, функционально связанные с областями С κ мыши, как часть эндогенного репертуара легких цепей иммуноглобулина.

На фиг. 31 показана последовательность участка соединения hV λ -hJ λ -mC λ 2 для трех отдельных клонов ОТ-ПЦР от мышей, гомозиготных в отношении 12 генных сегментов hV λ и hJ λ 1. Последовательности, показанные на фиг. 31, иллюстрируют дополнительные уникальные реаранжировки, включающие в себя различные генные сегменты hV λ , охватывающие длину первой вставки, с hJ λ 1, реаранжированным и функционально связанным с геном С λ 2 мыши (2D1 = V λ 2-8J λ 1; 2D9 = V λ 3-10J λ 1; 3E15 = V λ 3-1J λ 1). Один клон продемонстрировал непродуктивную реаранжировку вследствие N добавлений на участке соединения hV λ -hJ λ (2D1, фиг. 31). Это не редко происходит при V(D)J рекомбинации, поскольку было показано, что соединение генных сегментов в ходе рекомбинации, является неточным. Хотя этот клон представляет собой непродуктивный рекомбинант, присутствующий в репертуаре легких цепей этих мышей, он демонстрирует, что генетический механизм, который вносит вклад в разнообразие J-сегментов среди генов антител, нормально работает у этих мышей и дает в результате репертуар антител, содержащих легкие цепи с большим разнообразием.

Гомозиготные мыши, несущие модифицированные эндогенные λ локусы, содержащие 12 генных сегментов hV λ и hJ λ 1, также были способны производить генные сегменты λ человека, функционально связанные с эндогенным геном С λ мыши и производить В-клетки, которые экспрессировали обратные химерные λ легкие цепи, содержащие области hV λ , соединенные с областями С λ мыши. Эти реаранжировки дополнительно демонстрируют, что генные сегменты λ легкой цепи человека, помещенные на другой локус легкой цепи (т.е. локус λ), были способны независимо реаранжировать генные сегменты λ человека в многочисленных независимых В-клетках у этих мышей. Кроме того, модификации в эндогенном локусе λ легкой цепи демонстрируют, что вставка генных сегментов λ человека не делал какой-либо из генных сегментов hV λ и/или hJ λ 1 или не предотвращала в химерном локусе рекомбинацию многочисленных генных сегментов hV λ и hJ λ 1 в ходе развития В-клеток. Кроме того, эти мыши также производили функциональные антитела, содержащие генные сегменты V λ -J λ человека, функционально связанные с областью С λ мыши, как часть эндогенного репертуара легких цепей иммуноглобулина.

Как показано в настоящем примере, мыши, несущие генные сегменты λ легкой цепи человека на эндогенных локусах κ и λ легкой цепи, способны к реаранжировке генных сегментов λ легкой цепи человека и их экспрессии в ассоциации с областью С κ и/или С λ мыши, как часть нормального репертуара антител мыши, поскольку функциональная легкая цепь необходима во многих ключевых моментах развития В-клеток как в селезенке, так и в костном мозге. Кроме того, ранние подклассы В-клеток (например, пре-, про- и переходные В-клетки) демонстрируют нормальный фенотип у этих мышей по сравнению с однопаметными животными дикого типа (фигуры 27D, 28A и 28B). Наблюдался небольшой дефицит у популяциях В-клеток в костном мозге и периферических популяциях В-клеток, что может быть обусловлено делецией подкласса аутореактивных незрелых В-клеток и/или субоптимальной ассоциацией λ легкой цепи человека с тяжелой цепью мыши. Тем не менее частота использования Ig κ /Ig λ ,

наблюдаемая у этих мышей, демонстрирует ситуацию, которая больше напоминает экспрессию легких цепей человека, чем таковую, наблюдаемую у мышей.

Пример 15. Скрещивание мышей, экспрессирующих λ легкие цепи человека из эндогенного локуса легкой цепи

5 Для оптимизации частоты использования генных сегментов λ человека на эндогенном локусе легкой цепи мыши, мышей, несущих нереаранжированные генные сегменты λ человека, скрещивают с другой мышью, содержащей делецию в противоположном эндогенном локусе легкой цепи (или κ , или λ). Например, генные сегменты λ человека, расположенные на эндогенном локусе κ , будут единственными функциональными
10 генными сегментами легкой цепи, присутствующими у мыши, которая также несет делецию в эндогенном локусе λ легкой цепи. Таким образом, полученное потомство будет экспрессировать только λ легкие цепи человека, как описано в предыдущих примерах. Скрещивание проводят стандартными техниками, признанными в настоящей области техники, и, альтернативно, с помощью коммерческих компаний, например,
15 The Jackson Laboratory. Линии мышей, несущих генные сегменты λ легкой цепи человека на эндогенном локусе κ и делецию эндогенного локуса λ легкой цепи, подвергают скринингу в отношении присутствия уникальных обратных химерных (относящихся к человеку-мышь) λ легких цепей и отсутствия эндогенных λ легких цепей мыши.

Мышей, несущих нереаранжированный локус λ легкой цепи человека, также
20 скрещивали с мышами, которые содержат замещение эндогенного варибельного генного локуса тяжелой цепи мыши варибельным генным локусом тяжелой цепи человека (смотрите патент США №6596541, Regeneron Pharmaceuticals, генетически сконструированная мышь VELOCIMMUNE®). Мышь VELOCIMMUNE® включает в себя, частично, геном, содержащий варибельные области тяжелой цепи человека,
25 функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши так, чтобы мышь производила антитела, содержащие варибельную область тяжелой цепи человека и константную область тяжелой цепи мыши в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующая варибельные области тяжелых цепей антител, могут выделить и функционально связать с ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи
30 человека. Затем ДНК могут экспрессировать в клетку, способную экспрессировать полностью человеческую тяжелую цепь антитела. При подходящей схеме скрещивания получают мышей, несущих замещение эндогенного локуса тяжелой цепи мыши локусом тяжелой цепи человека и нереаранжированным локусом λ легкой цепи человека на эндогенном локусе κ легкой цепи. Антитела, содержащие соматически мутированные
35 варибельные области тяжелой цепи человека и варибельные области λ легкой цепи человека, могут выделять при иммунизации с помощью представляющего интерес антигена.

Пример 16. Получение антител от мышей, экспрессирующих тяжелые цепи человека и λ легкие цепи человека

40 После скрещивания мышей, которые содержат нереаранжированный локус λ легкой цепи человека, с различными требуемыми линиями, содержащими модификации и делеции других эндогенных локусов Ig (описанных выше), выбранных мышей иммунизировали представляющим интерес антигеном.

В общем, мышь VELOCIMMUNE®, содержащая одну из отдельных
45 реаранжированных зародышевых областей легкой цепи человека, сенсibilизировали антигеном, и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяли из сыворотки животных, лимфатические клетки могут быть слитыми с клеточной линией миеломы для получения бессмертных гибридных клеточных линий, и такие гибридные

клеточные линии подвергают скринингу и отбору для идентификации гибридомных клеточных линий, которые производят антитела, содержащие тяжелую цепь человека и λ легкую цепь человека, которые являются специфическими к используемому для иммунизации антигену. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелых цепей и λ легких цепей, могут выделять и соединять с требуемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Вследствие присутствия дополнительных генных сегментов hV λ по сравнению с эндогенным локусом λ мыши, разнообразие репертуара легких цепей сильно увеличивается и предоставляет повышенное разнообразие антигенспецифическому репертуару при иммунизации. Полученные клонированные последовательности антител могут впоследствии получать в такой клетке, как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или вариабельные домены легких и тяжелых цепей, могут выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов (например, В-клеток).

Вначале, выделяют высокоаффинные химерные антитела с вариабельной областью человека и константной областью мыши. Как описано выше, определяют характеристики антител и проводят селекцию в отношении требуемых характеристик, включая в себя аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши замещают требуемой константной областью человека для получения полностью человеческого антитела, содержащего соматически мутированную тяжелую цепь человека и λ легкую цепь человека, происходящую из нерearанжированного локуса λ легкой цепи человека согласно настоящему изобретению. Подходящие константные области человека включают в себя, например, относящиеся к дикому типу или модифицированные IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Пример 17. Скрещивание содержащих ADAM6 мышей и содержащих вариабельный сегмент λ человека мышей

Любую из описанных в настоящем документе мышей, которая содержит модификацию эндогенного гена ADAM6 или его ортолога или гомолога и дополнительно содержит ген, которые предоставляет мышам функцию ADAM6, скрещивают с мышью, содержащей модификацию, которая содержит вариабельный сегмент λ человека (например, сегмент V и J), функционально связанный с константным геном λ или к человека или мыши. Мышь, содержащая вариабельный сегмент λ человека, может содержать вариабельный сегмент, присутствующий на модифицированном эндогенном локусе λ или к или на трансгене. Мышей скрещивают и потомство дополнительно скрещивают между собой при необходимости и потомство подвергают скринингу в отношении фертильных мышей, которые проявляют функцию ADAM6 и которые также экспрессируют последовательность λ человека, ассоциированную с константной областью λ или к человека или мыши, в зависимости от конкретного случая.

Мышь, содержащую гуманизированный вариабельный локус тяжелой цепи (сегменты V, D и J человека, замещающие все или по существу все сегменты V, D и J мыши), которая дополнительно содержит эктопическую последовательность ADAM6 (или последовательность ортолога или гомолога ADAM6, которая предоставляет мышам функцию ADAM6), скрещивают с мышью, которая содержит замещение всех или по существу всех сегментов V и J легкой цепи сегментом V и J λ легкой цепи человека на локусе λ мыши и/или локусе к мыши. Потомство дополнительно скрещивают при необходимости и идентифицируют мышей, которые экспрессируют антитело, содержащее V_H человека, слитый с константной последовательностью тяжелой цепи, и когнатный λ V_L человека, слитый с константной последовательностью λ или к легкой цепи.

Мышей подвергают воздействию представляющего интерес антигена и позволяют

им развить иммунный ответ. Антитела, специфические к представляющему интерес антигену, идентифицируют и последовательности V_H человека и переменные последовательности λ человека (включая в себя переменные последовательности λ человека, соединенные с константными областями κ мыши) идентифицируют и используют для получения антитела человека путем конструирования последовательностей переменного домена в комбинации с генами константной области человека.

В одном случае путем скрещивания получают мышь, которая содержит замещение всех или по существу всех сегментов V, D и J тяжелой цепи мыши сегментами V, D и J человека на эндогенном локусе тяжелой цепи мыши, и которая содержит аллель легкой цепи, который содержит замещение всех или по существу всех переменных последовательностей λ легкой цепи одной или несколькими переменными последовательностями λ человека на эндогенном локусе λ мыши, функционально связанными с константной последовательностью λ , и которая содержит аллель легкой цепи, который содержит замещение всех или по существу всех переменных последовательностей κ легкой цепи на эндогенном локусе κ одной или несколькими переменными последовательностями λ человека. Животное подвергают воздействию представляющего интерес антигена и позволяют развить иммунный ответ. Идентифицируют антитела, которые связывают представляющий интерес антиген, которые содержат переменные домены тяжелой цепи человека, когнатные переменным доменам λ человека на константной области λ мыши или κ мыши. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные домены используют для получения полностью человеческого антитела путем конструирования переменных последовательностей в комбинации с последовательностями константной области человека.

Описанные в настоящем примере мыши содержат одну или несколько межгенных областей V κ -J κ , описанных в тексте описания и на фигурах в настоящем документе.

(57) Формула изобретения

1. Мышь для получения последовательностей переменной области иммуноглобулина человека, геном которой содержит:

(а) вставку одного или нескольких генных сегментов V_L , человека и одного или нескольких генных сегментов J_L , человека выше константной области легкой цепи иммуноглобулина мыши;

(б) вставку одного или нескольких генных сегментов V_H человека, одного или нескольких генных сегментов D_H человека и одного или нескольких генных сегментов J_H человека выше константной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши; и

(с) эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, причем эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты является смежной с одним или несколькими генными сегментами V_H человека, одним или несколькими генными сегментами D_H человека или одним или несколькими генными сегментами J_H человека, и причем белок ADAM6 или его функциональный фрагмент экспрессируется из эктопической последовательности нуклеиновой кислоты.

2. Мышь по п. 1, у которой константная область легкой цепи иммуноглобулина мыши представляет собой область $S\kappa$ мыши.

3. Мышь по п. 1, у которой константная область легкой цепи иммуноглобулина

мышь представляет собой область C_L мыши.

4. Мышь по п. 1, которая содержит от 12 до 40 генных сегментов V_L человека.

5. Мышь по п. 4, которая содержит 12 генных сегментов V_L человека.

6. Мышь по п. 4, которая содержит 28 генных сегментов V_L человека.

5 7. Мышь по п. 4, которая содержит 40 генных сегментов V_L человека.

8. Мышь по п. 1, у которой один или несколько генных сегментов J_L человека выбраны из J_{L1} , J_{L2} , J_{L3} , J_{L7} и их комбинации.

9. Мышь по п. 1, которая содержит по меньшей мере четыре генных сегмента J_L человека.

10 10. Мышь по п. 9, у которой по меньшей мере четыре генных сегмента J_L человека содержат по меньшей мере J_{L1} , J_{L2} , J_{L3} и J_{L7} .

11. Мышь по п. 1, причем мышь не содержит эндогенный генный сегмент V_L и/или эндогенный генный сегмент J_L в эндогенном локусе легкой цепи иммуноглобулина.

15 12. Мышь по п. 1, которая содержит эндогенные генные сегменты V_L и/или эндогенные генные сегменты J_L , которые являются неспособными к реаранжировке для образования вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина у мыши.

13. Мышь по п. 1, у которой все или по существу все эндогенные генные сегменты V_k и эндогенные генные сегменты J_k замещены одним или несколькими генными сегментами V_L , человека и одним или несколькими генными сегментами J_L человека.

14. Мышь по п. 1, у которой все или по существу все эндогенные генные сегменты V_L , и эндогенные генные сегменты J_L замещены одним или несколькими генными сегментами V_L человека и одним или несколькими генными сегментами J_L человека.

15. Мышь по п. 1, у которой все или по существу все эндогенные генные сегменты V_L и эндогенные генные сегменты J_L являются интактными у мыши, и мышь содержит один или несколько генных сегментов V_L человека и один или несколько генных сегментов J_L человека, вставленных между эндогенными генными сегментами V_L и/или эндогенными генными сегментами J_L и эндогенной константной областью легкой цепи иммуноглобулина.

30 16. Мышь по п. 15, у которой интактные эндогенные генные сегменты V_L и эндогенные генные сегменты J_L сделали неспособными к реаранжировке для образования иммуноглобулинового вариабельного домена легкой цепи антитела у мыши.

35 17. Мышь по п. 1, причем мышь дополнительно содержит межгенную область V_k - J_k иммуноглобулина человека из локуса к легкой цепи человека, причем межгенная область V_k - J_k человека является смежной с одним или несколькими генными сегментами V_L человека и одним или несколькими генными сегментами J_L человека.

40 18. Мышь по п. 16, у которой межгенная область V_k - J_k человека расположена между генным сегментом V_L человека и генным сегментом J_L человека.

19. Клетка, экспрессирующая последовательности вариабельной области иммуноглобулина человека, полученная от мыши по п. 1, причем геном клетки включает:

(а) вставку одного или нескольких генных сегментов V_L человека и одного или нескольких генных сегментов J_L человека выше константной области легкой цепи иммуноглобулина мыши;

(б) вставку одного или нескольких генных сегментов V_H человека, одного или нескольких генных сегментов D_H человека и одного или нескольких генных сегментов J_H человека выше константной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши; и

(с) эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, причем эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты является смежной с одним или несколькими генными сегментами V_H человека, одним или несколькими генными сегментами D_H человека или одним или

5 несколькими генными сегментами J_H человека, и причем белок ADAM6 или его функциональный фрагмент экспрессируется из эктопической последовательности нуклеиновой кислоты.

20. Применение клетки по п. 19 для получения антигенсвязывающего белка.

21. Применение клетки по п. 19 для получения гибридомы.

22. Применение клетки по п. 19 для получения квадromы.

23. Применение по пп. 20, 21 или 22, при котором клетка представляет собой В-клетку.

24. Применение по пп. 20, 21 или 22, при котором клетка получена из селезенки, костного мозга или лимфатического узла мыши.

25. Применение клетки по п. 19 для получения полностью человеческого антитела.

26. Применение клетки по п. 19 для получения вариабельного домена легкой цепи λ иммуноглобулина человека.

27. Применение клетки по п. 19 для получения вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина человека.

28. Применение клетки по п. 19 для получения вариабельного домена легкой цепи λ иммуноглобулина человека и вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина человека.

29. Способ получения антитела, которое связывается с представляющим интерес антигеном, причем способ предусматривает:

(а) воздействие на мышь по п. 1 представляющего интерес антигена,

(б) выделение одного или нескольких В-лимфоцитов мыши, причем один или несколько В-лимфоцитов экспрессируют антитело, которое связывает представляющий интерес антиген,

(с) идентификацию последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую цепь иммуноглобулина антитела, которое связывает указанный представляющий интерес антиген, причем легкая цепь иммуноглобулина содержит вариабельный домен λ легкой цепи иммуноглобулина человека и не относящийся к человеку константный домен легкой цепи иммуноглобулина,

(d) использование последовательности нуклеиновой кислоты согласно (с) с последовательностью нуклеиновой кислоты константной области легкой цепи иммуноглобулина человека для получения антитела человека, которое связывает представляющий интерес антиген.

30. Способ по п. 29, при котором константная область легкой цепи иммуноглобулина мыши представляет собой С_к мыши.

31. Способ по п. 29, при котором константная область легкой цепи иммуноглобулина мыши представляет собой С_л мыши.

32. Способ по п. 29, при котором антитело содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека и константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина мыши.

33. Способ по любому из пп. 29-32, при этом эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты мыши является эктопической тем, что она является вставленной или внехромосомной.

34. Способ по п. 33, при этом эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты мыши является эктопической тем, что она является вставленной.

35. Генетически модифицированная мышь для получения последовательностей вариабельной области иммуноглобулина человека, геном которой содержит:

(а) один или несколько нереаранжированных генных сегментов $V\lambda$ человека и один или несколько нереаранжированных генных сегментов $J\lambda$ человека в эндогенном локусе легкой цепи иммуноглобулина мыши,

(б) один или несколько нереаранжированных генных сегментов V_H человека, один или несколько генных сегментов D_H человека и один или несколько нереаранжированных генных сегментов J_H человека в эндогенном локусе тяжелой цепи иммуноглобулина мыши,

причем мышь способна экспрессировать белок ADAM6 или его функциональный фрагмент из эктопической последовательности нуклеиновой кислоты в ее геноме, причем эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты является смежной с одним или несколькими генными сегментами V_H человека, одним или несколькими генными сегментами D_H человека или одним или несколькими генными сегментами J_H человека.

36. Мышь по п. 35, причем мышь экспрессирует антитела, содержащие тяжелые цепи иммуноглобулина, которые содержат вариабельные домены тяжелой цепи иммуноглобулина человека и не относящиеся к человеку константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, и легкие цепи, которые содержат вариабельные домены λ легкой цепи иммуноглобулина человека и не относящиеся к человеку константные области легкой цепи иммуноглобулина.

37. Мышь по п. 36, у которой не относящаяся к человеку константная область легкой цепи иммуноглобулина представляет собой константную область к легкой цепи иммуноглобулина или константную область λ легкой цепи иммуноглобулина.

38. Мышь п. 35, у которой эндогенный локус легкой цепи иммуноглобулина мыши представляет собой локус λ легкой цепи иммуноглобулина.

39. Мышь по п. 35, у которой эндогенный локус легкой цепи иммуноглобулина мыши представляет собой локус κ легкой цепи иммуноглобулина.

40. Мышь по п. 35, причем мышь не содержит эндогенный генный сегмент V_L и/или эндогенный генный сегмент J_L в эндогенном локусе легкой цепи иммуноглобулина.

41. Мышь по п. 40, у которой генный сегмент V_L и/или генный сегмент J_L представляют собой эндогенный генный сегмент $V\kappa$ и/или эндогенный генный сегмент $J\kappa$.

42. Мышь по п. 40, у которой эндогенный генный сегмент V_L и/или эндогенный генный сегмент J_L представляют собой эндогенный генный сегмент $V\lambda$ и/или эндогенный генный сегмент $J\lambda$.

43. Мышь по п. 35, у которой эндогенные генные сегменты V_L и эндогенные генные сегменты J_L мыши замещены одним или несколькими генными сегментами $V\lambda$ человека и одним или несколькими генными сегментами $J\lambda$ человека.

44. Мышь по п. 43, у которой эндогенные генные сегменты V_L и эндогенные генные сегменты J_L представляют собой генные сегменты κ .

45. Мышь по п. 43, у которой эндогенные генные сегменты V_L и эндогенные генные сегменты J_L представляют собой генные сегменты λ .

46. Мышь по п. 35, у которой один или несколько генных сегментов $V\lambda$ человека происходят из фрагмента кластера А локуса λ легкой цепи иммуноглобулина человека.

47. Мышь по п. 46, у которой фрагмент кластера А продолжается от V λ 3-27 человека до V λ 3-1 человека.

48. Мышь по п. 46, у которой фрагмент кластера А продолжается от V λ 3-12 человека до J λ 1 человека.

5 49. Мышь по п. 35, у которой один или несколько генных сегментов V λ человека происходят из фрагмента кластера В локуса λ легкой цепи иммуноглобулина человека.

50. Мышь по п. 49, у которой фрагмент кластера В продолжается от V λ 5-52 человека до V λ 1-40 человека.

10 51. Мышь по п. 35, у которой один или несколько генных сегментов V λ человека происходят из фрагмента кластера А и из фрагмента кластера В локуса λ легкой цепи иммуноглобулина человека.

52. Мышь по п. 35, которая содержит по меньшей мере 12 генных сегментов V λ человека.

15 53. Мышь по п. 35, которая содержит по меньшей мере 28 генных сегментов V λ человека.

54. Мышь по п. 35, которая содержит по меньшей мере 40 генных сегментов V λ человека.

20 55. Мышь по п. 35, у которой один или несколько нереаранжированных генных сегментов J λ человека выбраны из группы, состоящей из J λ 1, J λ 2, J λ 3, J λ 7 и их комбинации.

56. Мышь по любому из пп. 35-55, у которой белок ADAM6 или его функциональный фрагмент кодируется эндогенной последовательностью мыши.

57. Применение мыши по любому из пп. 35-55 для получения антигенсвязывающего белка.

25 58. Применение по п. 57, при котором антигенсвязывающий белок представляет собой антигенсвязывающий белок человека.

59. Применение по п. 57 или 58, причем антигенсвязывающий белок представляет собой антитело.

30 60. Применение по п. 57, при котором применение включает экспрессию в клетке млекопитающего вариабельного домена иммуноглобулина человека, полученного от мыши.

61. Клетка, экспрессирующая последовательности вариабельной области иммуноглобулина человека, полученная от мыши по любому из пп. 35-55, при этом геном клетки включает:

35 (а) вставку одного или нескольких генных сегментов V λ человека и одного или нескольких генных сегментов J λ человека выше константной области легкой цепи иммуноглобулина мыши;

40 (b) вставку одного или нескольких генных сегментов V H человека, одного или нескольких генных сегментов D H человека и одного или нескольких генных сегментов J H человека выше константной области тяжелой цепи иммуноглобулина мыши; и

45 (с) эктопическую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ADAM6 или его функциональный фрагмент, причем эктопическая последовательность нуклеиновой кислоты является смежной с одним или несколькими генными сегментами V H человека, одним или несколькими генными сегментами D H человека или одним или несколькими генными сегментами J H человека, и причем белок ADAM6 или его функциональный фрагмент экспрессируется из эктопической последовательности нуклеиновой кислоты.

62. Клетка по п. 61, причем клетка получена из селезенки, костного мозга или лимфатического узла.

63. Клетка по п. 61, причем клетка представляет собой В-клетку.

5 64. Клетка по п. 61, причем клетка представляет собой эмбриональную стволовую (ES) клетку.

65. Клетка по п. 61, причем клетка представляет собой зародышевую клетку.

10

15

20

25

30

35

40

45

Перечень последовательностей

<110> Macdonald, Lynn
 Stevens, Sean
 Gurer, Cagan
 Hosiawa, Karolina A.
 Andrew J. Murphy

 <120> Humanized Light Chain Mice

 <130> 1390A-WO

 <150> 61/578,097
 <151> 2011-12-20

 <160> 163

 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

 <210> 1
 <211> 754
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 1
 Met Leu Ser Leu Thr Trp Gly Met Arg Leu Val Glu Arg Pro Val Val
 1 5 10 15
 Pro Arg Val Leu Leu Leu Phe Ala Leu Trp Leu Leu Leu Val
 20 25 30
 Pro Val Trp Cys Ser Gln Gly His Pro Thr Trp Arg Tyr Ile Ser Ser
 35 40 45
 Glu Val Val Ile Pro Arg Lys Glu Ile Tyr His Thr Lys Gly Leu Gln
 50 55 60
 Ala Gln Arg Leu Leu Ser Tyr Ser Leu Arg Phe Arg Gly Gln Arg His
 65 70 75 80
 Ile Ile His Leu Arg Lys Thr Leu Ile Trp Pro Arg His Leu Leu
 85 90 95
 Leu Thr Thr Gln Asp Asp Gln Gly Ala Leu Gln Met Glu Tyr Pro Phe
 100 105 110
 Phe Pro Val Asp Cys Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Glu Gly Ile Leu Gln
 115 120 125
 Ser Met Val Thr Val Asp Thr Cys Tyr Gly Gly Leu Ser Gly Val Ile
 130 135 140
 Lys Leu Asp Asn Leu Thr Tyr Glu Ile Lys Pro Leu Asn Asp Ser Gln
 145 150 155 160
 Ser Phe Glu His Leu Val Ser Gln Ile Val Ser Glu Ser Asp Asp Thr
 165 170 175
 Gly Pro Met Asn Ala Trp Lys His Trp Ser His Asn Thr Gly Ser Pro
 180 185 190
 Ser Ser Arg Leu Glu Tyr Ala Asp Gly Ala Pro Arg Leu Ser Ser Lys
 195 200 205
 Asn Tyr Ala Thr His Pro Ala Ala Ile Lys Gly His Phe Gln Ala Thr
 210 215 220
 His Ser Val Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Asp Lys Leu Ser Ser Thr Val
 225 230 235 240
 Glu Tyr Leu Phe Lys Val Ile Ser Leu Met Asp Thr Tyr Leu Thr Asn
 245 250 255
 Leu His Met Arg Tyr Tyr Val Phe Leu Met Thr Val Tyr Thr Glu Ala
 260 265 270
 Asp Pro Phe Ser Gln Asp Phe Arg Val Pro Gly Gly Gln Ala His Thr
 275 280 285
 Phe Tyr Glu Arg Val Phe Tyr Ala His Phe Arg Pro Asp Ala Gly Ala

290 295 300
 Ile Ile Asn Lys Asn Ser Pro Gly Asp Asp Ala Val Asn Pro Ala Glu
 305 Arg Ser Ile Cys Ser 310 Pro Ser Ala Leu Ile Cys Leu Gly Gln His 320
 Arg Asn Pro Leu 325 Phe Leu Ser Ile Ile Thr Asn Arg Val 335 Gly Arg
 Ser Leu Gly 340 Leu Lys His Asp Glu Gly Tyr Cys Ile Cys 350 Gln Arg Arg
 355 Asn Thr Cys Ile Met Phe Lys 360 Asn Pro Gln Leu Thr Asp Ala Phe Ser
 370 Asn Cys Ser Leu Ala Glu 375 Ile Ser Asn Ile Leu Asn Thr Pro Asp Leu
 385 Met Pro Cys Leu Phe 405 Tyr Asp Arg His Val Tyr Tyr Asn Thr Ser Leu
 Thr Tyr Lys Phe 420 Cys Gly Asn Phe Lys Val Asp Asn Asn Glu Gln Cys
 425 Asp Cys Gly Ser Gln Lys Ala Cys Tyr Ser Asp Pro Cys Cys Gly Asn
 435 Asp Cys Arg Leu Thr Pro Gly 440 Ser Ile Cys Asp Lys Glu Leu Cys Cys
 450 Ala Asn Cys Thr Tyr Ser 455 Pro Ser Gly Thr Leu Cys Arg Pro Ile Gln
 465 Asn Ile Cys Asp Leu 470 Pro Glu Tyr Cys Ser Gly Ser Lys Phe Ile Cys
 Pro Asp Asp Thr 485 Tyr Leu Gln Asp Gly Thr Pro Cys Ser Glu Glu Gly
 Tyr Cys Tyr Lys Gly Asn Cys Thr 500 Asp Arg Asn Ile Gln Cys Met Glu
 515 Ile Phe Gly Val Ser Ala Lys 520 Asn Ala Asn Ile Lys Cys Tyr Asp Ile
 530 Asn Lys Gln Arg Phe Arg 535 Gly His Cys Thr Arg Ala Glu Glu Ser
 545 Leu Thr Phe Asn Ala 550 Cys Ala Asp Gln Asp Lys Leu Cys Gly Arg Leu
 Gln Cys Thr Asn Val Thr Asn Leu Pro Phe Leu Gln Glu His Val Ser
 560 Phe His Gln Ser Val Ile Ser Gly Val Thr Cys Phe Gly Leu Asp Glu
 580 His Arg Gly Thr Glu Thr Ala 600 Asp Ala Gly Leu Val Arg His Gly Thr
 610 Pro Cys Ser Arg Gly Lys 615 Phe Cys Asp Arg Gly Ala Cys Asn Gly Ser
 625 Leu Ser Arg Leu Gly 630 Tyr Asp Cys Thr Pro Glu Lys Cys Asn Phe Arg
 Gly Val Cys Asn Asn Arg Arg Asn Cys 645 His Cys His Phe Gly Trp Ser
 Pro Pro Lys Cys Lys Glu Glu Gly 650 His Ser Gly Ser Ile Asp Ser Gly
 675 Ser Pro Val Gln Arg Arg Ile Ile Lys Gln Asn Leu Glu Pro Val
 690 Val Tyr Leu Arg Ile Leu 695 Phe Gly Arg Ile Tyr Phe Leu Phe Val Ala
 705 Leu Leu Phe Gly Ile Ala Thr Arg Val Gly Val Thr Lys Ile Phe Arg
 Phe Glu Asp Leu 725 Gln Ala Ala Leu Arg 730 Ser Trp Gln Glu Gln Ala Lys
 740 Asp Lys

<210> 2
 <211> 756

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

```

Met Leu Ser Leu Thr Trp Gly Met Arg Leu Val Glu Arg Pro Val Val
 1      5      10      15
Pro Arg Val Leu Leu Leu Phe Ala Leu Trp Leu Leu Leu Val
 20      25      30
Pro Val Trp Cys Ser Gln Gly His Pro Thr Trp Arg Tyr Ile Ser Ser
 35      40      45
Glu Val Val Ile Pro Arg Lys Glu Ile Tyr His Thr Lys Gly Leu Gln
 50      55      60
Ala Gln Arg Leu Leu Ser Tyr Ser Leu His Phe Arg Gly Gln Arg His
 65      70      75      80
Ile Ile His Leu Arg Arg Lys Thr Leu Ile Trp Pro Arg His Leu Leu
 85
Leu Thr Thr Gln Asp Asp Gln Gly Ala Leu Gln Met Asp Tyr Pro Phe
 100      105      110
Phe Pro Val Asp Cys Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Glu Gly Ile Pro Gln
 115      120      125
Ser Met Val Thr Val Asp Thr Cys Tyr Gly Gly Leu Ser Gly Val Met
 130      135      140
Lys Leu Asp Asp Leu Thr Tyr Glu Ile Lys Pro Leu Asn Asp Ser Gln
 145      150      155      160
Ser Phe Glu His Leu Val Ser Gln Ile Val Ser Glu Ser Asp Asp Thr
 165      170      175
Gly Pro Met Asn Ala Trp Lys His Trp Ser His Asn Thr Gly Ser Pro
 180      185      190
Ser Ser Arg Leu Glu Tyr Ala Asp Gly Ala Pro Arg Ile Ser Ser Lys
 195      200      205
Asn Tyr Ala Thr His Pro Ala Ala Ile Lys Gly His Phe Gln Ala Thr
 210      215      220
Asn Ser Val Tyr Asn Ser Ala Ala Gly Asp Lys Leu Ser Ser Thr Val
 225      230      235      240
Gly Tyr Leu Phe Gln Val Ile Ser Leu Met Asp Thr Tyr Leu Thr Asn
 245      250      255
Leu His Met Arg Tyr Tyr Val Phe Leu Met Thr Val Tyr Thr Asn Ser
 260      265      270
Asp Pro Phe Arg Leu Glu Phe Ala Val Pro Gly Gly Ser Ala Tyr Asn
 275      280      285
Tyr Tyr Val Ser Val Phe Tyr Asn Lys Phe Lys Pro Asp Ala Gly Val
 290      295      300
Leu Leu Asn Lys Tyr Gly Pro Gln Asp Asn Gln Val Asn Pro Ala Glu
 305      310      315      320
Arg Ser Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ile Cys Ile Gly Lys Tyr Asp
 325      330      335
Arg Asn Pro Leu Phe Leu Ser Pro Ile Ile Thr Asn Arg Val Gly Arg
 340      345      350
Ser Leu Gly Leu Lys Tyr Asp Glu Gly Tyr Cys Val Cys Gln Arg Arg
 355      360      365
Asn Thr Cys Ile Met Phe Arg His Pro Gln Leu Thr Asp Ala Phe Ser
 370      375      380
Asn Cys Ser Leu Ala Glu Ile Ser Asn Ile Leu Asn Thr Pro Gly Leu
 385      390      395      400
Met Pro Cys Leu Phe Tyr Asp Arg His Val Tyr Tyr Asn Thr Ser Leu
 405      410      415
Thr Tyr Lys Phe Cys Gly Asn Phe Lys Val Asp Asn Asp Glu Gln Cys
 420      425      430
Asp Cys Gly Ser Gln Lys Ala Cys Tyr Ser Asp Pro Cys Cys Gly Asn
 435      440      445
Asp Cys Arg Leu Thr Pro Gly Ser Ile Cys Asp Lys Glu Leu Cys Cys
 450      455      460
Ala Asn Cys Thr Tyr Ser Pro Ser Gly Thr Leu Cys Arg Pro Ile Gln

```

465 Asn Ile Cys Asp Leu Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Thr Lys Tyr Ile Cys 470 475 480
 Pro Asp Asp Thr 485 Leu Gln Asp Gly Thr Pro Cys Ser Glu Asp Gly 495
 Tyr Cys Tyr 500 Lys Gly Asn Cys Thr Asp Arg Asn Ile Gln Cys Met Glu 510
 Ile Phe Gly Val Ser Ala Lys Asn Ala Asn Ile Lys Cys Tyr Asp Ile 515
 Asn Lys Gln Arg Phe Arg Phe Gly His Cys Thr Arg Ala Glu Glu Ser 520
 545 Leu Thr Phe Asn Ala Cys Ala Asp Gln Asp Lys Leu Cys Gly Arg Leu 535
 Gln Cys Thr Asn Val Thr Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Glu His Val Ser 540
 Phe His Gln Ser Ile Ile Ser Gly Phe Thr Cys Phe Gly Leu Asp Glu 550
 His Arg Gly Thr Glu Thr Thr Asp Ala Gly Met Val Arg His Gly Thr 555
 625 Pro Cys Ser Lys Ser Lys 630 Phe Cys Asp Gln Gly Ala Cys Ser Gly Ser 600
 Leu Ser His Leu Gly Tyr Asp Cys Thr Pro Glu Lys Cys Ser Phe Arg 610
 Gly Val Cys Asn Asn His Arg Asn Cys His Cys His Phe Gly Trp Lys 620
 Pro Pro Glu Cys Lys Glu Glu Gly Leu Ser Gly Ser Ile Asp Ser Gly 635
 Ser Pro Pro Val Gln Arg His Thr Ile Lys Gln Lys Gln Glu Pro Val 640
 Val Tyr Leu Arg Ile Leu Phe Gly Arg Ile Tyr Phe Leu Phe Val Ala 650
 705 Leu Leu Phe Gly Ile Ala Thr Arg Val Gly Val Thr Lys Ile Phe Arg 660
 Phe Glu Asp Leu 725 Gln Ala Thr Leu Arg 730 Ser Gly Gln Gly Pro Ala Arg 670
 Asp Lys Pro Lys 745 750 755

<210> 3
 <211> 13894
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 3
 gtcctaagggt agcgaggggat gacagattct ctgttcagtg cactcagggt ctgcctccac 60
 gagaatcacc atgccctttc tcaagactgt gttctgtgca gtgccctgtc agtggaatc 120
 tggagagcat gcttccatga gcttgtagt agtataatc gtaagccatg gctttgtgtt 180
 aatggtgatg ttctacatac cagtctctg gcttaataat gaggtgatga ttctatgttc 240
 ctgtaacgct tcctcaactg ggtcctaagt ctttcttcac tccatctatt cctctaagga 300
 atgacctga aaatcccatc acaaactata ggagatggga accatcaaaa aacacagtga 360
 caaagagggt ggaacgcatac aggggttcagg aaccatattt taaaaagata tcgtaataaa 420
 cttcttaaaa gagatataga caaatctcca ttaatacggg gaccagaggc ctaaggctaa 480
 gaaccaatgg tggctcaagg tctcctgcta cccgaggagc aaacgtagag cagtttctaa 540
 tgattttatt aaaatataga atcaaaagta ccagtttgca attttgaaag atttatttca 600
 gcaatgcaac aacatcaggt ggtgccgagt ccaacacgtc ttatgtccca tgatataaac 660
 aaaggccatc cagaactgtg gactggagtt ctacctgtgc ccctaatagac attcagattt 720
 tttttccatt ctctttatct tagaggagac agggggctaa ctcatattac ttgtcctttg 780
 cttgttcttg ccaagaacgt aaagcagctt gcaagtcctc aaacctaaat atcttagtaa 840
 ctcttacacg agtggcaatg ccaaagagca gtgcaacaaa gaggaagtaa atacgaccaa 900

```

agagtattct taaatacact actggctcta ggttctgttt tattatgccc cttgaaccg 960
gaggggaccc actgtctatg ctccactgt gtccctcttc tttgcacttt ggagggctcc 1020
aaccaaaatg gcaatggcaa ttccgacgat tgttacacac tcctctgaaa ttgcattttt 1080
ctgggggtgca gtcataaccc aaacgagata aacttccatt gcaagctcct cgatcacaga 1140
acttaccctt tgaacacggg gtaccatgtc tcaccaatcc agcatctgct gtttctgtcc 1200
cacgatgttc atcaagccca aagcaggtaa cccagagat aaccgattga tggaaatgaaa 1260
catgttcttg caaaaatgga agatttgtga cattggtaca ctgcaacctt ccacacagct 1320
tgtcctgatc agcacaagca ttgaatgtga ggctttcttc tgctctagta caatgcccaa 1380
atcgaaaccg ttgtttgttg atgtcatagc acttaatat agcattctta gcacttacac 1440
caaagatttc catgcattgt atgttgcat cagtgcagtt acctttatag cagtaacctt 1500
cttctgagca tgggtgtcca tcttgcatg aagtgtcatc tgggcaaatg aacttagagc 1560
cactacagta ctctggaaga tcacatatgt tctggatagg tctgcagagt gtcccagaag 1620
gactgtaagt gcaatttgca cagcataatt ctttatcaca aatgctacca ggtgttaacc 1680
tgcaatcatt tccacagcag ggatctgaat aacatgcctt ttgggagcca cagtcacact 1740
gctcattggt atctactttg aagtttccac aaaacttata agtcaatgat gtattataat 1800
aaacatgacg gtcatagaaa agacatggca tcagatcagg agtattaagt atgttgctta 1860
tctctgcaag ggaacaattg ctgaaagcat ctgttaattg aggatttttg aacatgatgc 1920
aggtgttccct tctctggcag atacagtacc cctcatcatg ttttaggcct aaactccttc 1980
caacacgatt ggttattata atagataaaa ataaaggatt tgcaccatgt tgaccaagac 2040
aaattagggc tgagggagaa catatactcc tctcagctgg attaacagca tcatctcctg 2100
gcgaattctt gttaattata gctcctgcat caggcctaaa atgagcataa aatactctct 2160
catagaaagt atagcctgac cctcctggaa ctgaaaaatc ttgtgaaaaa ggatcagcct 2220
cgtatacac agtcatgaga aagacatagt accgcatatg aagattggtc agatagggtg 2280
ccattaaact aatgacttta aacaaatact caacagtaga tgaaagttg tcacctccag 2340
aagcactata tacagaatgg gttgcttgaa agtgcccttt tatagcagct ggatgtgtag 2400
cgtaattctt actagatagt ctgggagctc catctgcata ttccaatctg gaggaggag 2460
aacctgtatt atggctccag tgcttccatg cattcatagg ccctgtgtca tcagactcag 2520
atactatctg agaacaagg tgttcaagg tctgtgaatc attgaggggt ttgatttcat 2580
aggtgaagggt atccaacttt atgaccttgc acaggccccc ataacaagta tccacagtga 2640
ccatggattg caggatcccc tccaggtagc caatatagta acaatctaca ggaaaaaagg 2700
ggtactccat ctgtaaggct ccttggtcat ctgagttgt cagcaacaag tgcttgggcc 2760
aaatgagtgt ctttctccgc aggtggatga tatgtctctg gccccgaaaa cgcaagctat 2820
acgagagcag tctttgtgct tgaagtcctt tggatgtgta gatctccttc cgaggaataa 2880
ccactccga tgagatgtaa cgcaagtgg gatggccttg agaaccacag actggaacca 2940
ggaggagcag ccagagtga aatagcaaga ggaggacctt ggggaccaca ggtctttcca 3000
ctagcctcat gccccagggtc agagataaca tcctgggtgg agctaaactc cctctgtgtg 3060
gccactgcct ggtctagaaa atactgcag aggaactaaa acctcctcag gctcccaacc 3120
taagtgttta cccagacaac tggagttagg taacagtcac tgggtgtggc aggaattgag 3180
tctgaatgtg ttagctgagg ttgaggttaa atattgtcaa aagggtatgtc tataaatgtg 3240
cctggacaag aaaaagtcaga agcagcaagg agtgtctctg acaggctcaa tcctttcttt 3300
tctttttttg aagtcaaaa tatcatttcc acgtgaatgt atttggttcc cagtgtgact 3360
ctgggtctct ttctaggagt caatatttct ttatatcttg gctcatgttt ttcacagtgt 3420
ttctaacttc ttgttttgtt ttgttttgtt gtttgtttga aagttagaag taaatactgt 3480
ctatattagc ctttttagcta taaatgattg tttttatttc ttctaactat gttttgtttg 3540
agttttgggt aaactattta caaatgagtt ttttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag 3600
tttggagctt tctgttaata ttgtgtgtt gtttctccaa tattattaga cctgagaatt 3660
ctacctgggt acctgtgaac tccagaattt ttaaaaaatc catctcttgg gaacattatc 3720
tctgaccccg tctgaggccg aagtggctgt cccctcccaa ccttagtat ctttctttcc 3780
tgactattgg gatttcttca agcaatcagg ctgatgggtt ctacgcagtg agaccagtag 3840
actgtcggtg tgaacgtcga agagtctgcc acacactccg ggttcatcaa cagtgttttc 3900
gcgtctctta cttttgtaga aggaatgca gcctctgagt tttctccaag aaatcattga 3960
tgaaagggtg aaaagatggg tatcaccgg agttcatgac aagccctggc tcagacacgt 4020
gagcaagggtc tacagcccca aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagataggag 4080
aaaaaaatgg gtagttggag ggttgatcaa cttacttcct ctcaaacata tatatctcat 4140
ctaagtgtgc aggggaaaaac tctgtagaac tactgggata cctgctcacc ccaggagcc 4200
tcatgaataa gtctctgctt ctgcctgtga gccatgagca ttactgcacc tgataaccct 4260
gcagcttctc aggggaaggg gaggaagtga cttggccctt gttctggtaa ggtgaagagga 4320
gataaatccc ttctcattga ttagggtgag aggggtcatg tgctctatca ttgggtgacc 4380
agttgggaca tgggtttata ccaaagtcat cactctgagg ttctgtgtac caccaggctg 4440
aactcccata tcctacatgg acataggaca acaccaagca gaaggaggtt ttaggactaa 4500
actgaaggac agagatgcgg tttctaaca actagggagt gccagggcca gcctctctaa 4560
ccactatagg acactgtgga gtctggttac aaagagagat tactcaaggt ccttagcact 4620
gattacagag catatctcag atgccttctg ctgaccagat gtatctttgc ataactgtcc 4680

```

tatccagatt	cagaaaattg	atgccacata	gccaaagtga	ctttcaggaa	cagacgattt	4740
aaaaacaggg	agagagatgt	gagagaaagg	agaaggagag	agagaaggga	gagggagaga	4800
agagagaggg	agacggagaa	ggaaagaggg	agaaggagaa	ggagagaagg	ggcatggaca	4860
gagggagggg	cagaaggaga	gaggagatag	agagggggat	aaggaagaag	ggagggaggg	4920
agagagagag	aaggctaagt	ctttccatac	ctgggtccca	atacctctta	taaccaagc	4980
acatggtttc	acatatcaca	atgcggttgg	gatatagata	actgtaaata	cttgtgaaaa	5040
taatggggct	gagatctggg	gttttcatga	tagtttcaaa	gtcacccgtac	tgactaaaaac	5100
cttccactgg	cccactctca	gcttcctaat	ctgaggggat	caaatttccc	actaagtgtg	5160
tttagaaaga	tctccacctt	tttgcccttg	tcttccagt	ccccacctac	gttctggtct	5220
cccacatctg	atgtctttct	agtgtattctg	gccctgctctg	ctccacagct	acaaacccct	5280
tcctataatg	agctctgtgc	tgagccatca	tcctgaatca	atccacctta	agcagatgtt	5340
ttgcttattt	ttcctgtgtc	catactacag	aggaaaaggta	ggcatgtaga	agctgaagca	5400
tctcacctca	ttccaagcac	cctcagctctc	taaatgtgcc	cccttgtttc	cagaagtgc	5460
acctcaagca	tcttttattc	attcatctta	gagggccaca	tgtgctgtag	tgttataaga	5520
tgaaatttaa	agcattaatt	attcctaaca	agccaattaa	acaagccaaa	aacattcatc	5580
agtcattccc	atggaacctc	tgaagcatct	tcctgtctta	acctggggtt	ttccagggtt	5640
gtcttgggat	cacaggagct	gtcctgtcta	ccagccatat	aaaggcagac	ctatcagaat	5700
tacaccagac	ttctcaccat	agactataaa	agccagaata	tcctggacag	atgttatata	5760
gaaactaaga	gaacacaaat	gccagccag	gctactatac	ccagcaaaac	tctcaattac	5820
catcgatgaa	gaaaccaaga	tattccatta	caagtccaaa	tttacacaat	atctttccat	5880
aaatccagcc	ctacaaagga	tagcagatgg	aaaactccaa	cacaggtagg	aaaactacac	5940
cctgaaagaa	gcactaaagt	aatcatcttt	caacacactc	aaaagaagat	aaccacacaa	6000
acataatttc	acctctaaca	acaaaaataa	agtaggcaac	aatcactatt	ccttaataac	6060
tcttttaaca	tcaatggact	caattctcca	ataaaaagac	atagactaac	agactgaata	6120
cataaacagg	acacagcatt	ttgctgcata	aagcaaacac	agcgttactt	tttttttctt	6180
aaatgacatt	ttttattaga	tattgtcttt	attgacattt	caaatgttat	cccccttctt	6240
ggtttacctt	ctgaaatccc	ctatctcttc	ccccctcccc	tgctcaccaa	tccacccact	6300
cccacttcca	ggccctggca	atccccata	tttgggcata	gagccttcac	aggaccaagg	6360
tactctcctt	gcattgtatga	ccaatagtc	cattctctgc	tacaaatgca	gctagatcta	6420
tgagtcccac	catgttttct	tttgttggtg	gtttcatgcc	agggagctct	tggagtactg	6480
attggttcat	attgttggtt	tcctatggg	gttataaaac	ctttcaactt	cttgggtcct	6540
ttctctggct	gcctcattgg	ggaccttggt	cgaagtccaa	tggatgactg	tgagcatcca	6600
cttctgtatt	tgccaggcac	tgccagagcc	tctcagaaga	cagctatatc	aagatcctgg	6660
cagcaagctc	ttgttggtat	ccacaaaagt	gtctgtgggt	tgtctatggg	atggatcccc	6720
aaaggggcag	tctctggatg	gtcatttctt	cagtctctgt	tccacacttt	gtctctttaa	6780
ctccttccat	gactatttta	ttcctccctc	taagaaggac	cgaagtattc	atactttggt	6840
cttcttctct	gaaattcatg	ttgtttgtga	attgtatctt	tgatattccg	aacttctggg	6900
ctaataatcca	cttatcagtg	agtgaataatc	atgtgtgttc	ttatgtgatt	gagttacctc	6960
actcaggatg	atatctctcca	gaaccatcca	tttgtctaa	aatttaatga	attcattgtt	7020
tttaataagct	gaggagtact	ccattgtgta	aatgtaccac	atcttctgta	ccattgttct	7080
tcttgagggg	catctggggt	ctttaaagct	tctggacatt	aatataaagg	ctgctatgga	7140
aatagtggag	aatgtgtcct	tattacatgt	tgagacatct	tctgggtata	tgcccaggag	7200
tgctattgct	ggatcctctg	atagtactat	gtccaatttt	ctgaggaact	gccaaactga	7260
tttacagagt	ggttgtacca	gcttgcaatt	ccaccagcaa	tggagaaatg	ttccccctcc	7320
tccacatcct	caccaacatc	tgctgtcacc	tcaatttggt	cttagtgatt	cagacagggtg	7380
tgaggtggaa	tatcaggggt	gtttggcatt	tccctgatga	ctagtgatat	tgaaaaaaat	7440
tttaagtgtt	tctcagccat	tcagtattct	tcagttaga	attcactgtt	tagctctgta	7500
ctcagggttt	tttaataggg	ttatttggtt	ttctggagtc	taacgtcttg	aattctttct	7560
atataattgga	tattagccct	ctgtcatatt	taggattgggt	aaagatcttt	cccaatatgt	7620
tggtgtcctt	tttgtgtcct	ttgccttaca	gaaccttttt	aattttatga	ggtccccattt	7680
gctaattctt	cattttacag	cacaagccat	tggtgttctg	ttcaaaaatc	tttccccctg	7740
aaccctatct	tcgaggatct	tccccacttt	ctcctctata	agtttcagtg	tctctattat	7800
tgtgtctagg	ggtaccgaag	ttcctattcc	gaagttccta	ttctctagaa	agtataggaa	7860
cttccctagg	gtttaaaccc	gcgggtggagc	tctgatgtgg	gaacgcttca	gtgttcagga	7920
accatattgat	ttatttaaaa	tatagaatca	aaagtaacca	tttgcagttt	tgaagatttt	7980
attccagtg	aagcattagc	aatgcacca	catcagggtga	tttctgaatc	caacacgtct	8040
tatgtcttca	tgatattaaa	aaaaaaaaaa	ggccatccag	aactgtgaac	ttgagttcta	8100
ccctgttccc	tactgacatt	cagattttct	tttttgcat	ctctttatct	tacaggagac	8160
aggaggggag	ggctaactca	ttttactttg	gcttggtcct	tgctgggtct	tgccagaaac	8220
gtaaaagtagc	ttgcaagtct	tcaaatctaa	aaatcttagt	aactcctaca	cgagtggcaa	8280
tgccaaagag	cagtgcacaa	aagaggaagt	aaatacgacc	aaagagtatt	cttaaatata	8340
ccactgctc	ttgtttttgt	tttattgtgt	gcctttgaac	tggaggggac	ccactgtcta	8400
tgctccact	tagtccctct	tctttgcact	ctggaggctt	ccaacaaaaa	tgacaatggc	8460

aattccgatg	attgtttacac	actcctctaa	aactgcattt	ttctgggggtg	cagtcataac	8520
ccaaatgaga	taaactttcca	ctgcaagctc	cttgatcaca	gaacttactt	ttggagcagg	8580
gggtaccatg	tctcaccatt	ccagcatctg	ttgtttctgt	cccacgatgt	tcatcaagcc	8640
caaagcaggt	aaaccagag	ataatcgatt	gatggaatga	aacatgttct	tgcaaatatg	8700
gaagattggt	gacattggta	cactgcaacc	ttccacacag	cttgtcctga	tcagcacaag	8760
cattgaatgt	gaggctttct	tctgtcttag	tacaatgccc	aaatcgaaac	cgttgtttgt	8820
tgatgtcata	gcacttaata	ttagcattct	tagcacttac	accaaagatt	tccatgcatt	8880
gtatgttgcg	atcagtgtag	ttacctttat	agcagtaacc	atcttctgag	catgggtgtcc	8940
catcttgtag	ataagtgtca	tctggggcaa	tgtatttagt	cccattacag	tactctggaa	9000
gatcacatat	gttctgggata	ggctgcgaga	gtgtcccaga	aggactgtaa	gtgcaatttg	9060
cacagcataa	ttctttatca	caaagtctac	cagggtgttaa	cctgcaatca	tttccacagc	9120
agggatctga	ataacatgcc	ttttgggagc	cacagtcaca	ctgctcatcg	ttatctactt	9180
tgaagtttcc	acaaaactta	taagtcaatg	atgtattata	ataaacatga	cggatcataga	9240
aaagacatgg	catcagacca	ggagtattaa	gtatgttgct	tatctctgca	agggaaacaat	9300
tgctgaaagc	atctgttaat	tgaggatgtc	tgaacataat	gcagggtgtc	cttctctggc	9360
agacacagta	cccccatca	tattttaagc	ctaaactcct	tccaacacga	ttggttatta	9420
taggagataa	aaataaagga	tttgcgcat	atttaccat	acaaattagg	gctaagggaag	9480
aacatatact	cctctcagct	ggattaaact	ggttatcttg	tgcccatac	ttattaagta	9540
aaactcctgc	atcaggctta	aatttattat	aaaagactga	cacatagtaa	ttataagccg	9600
accctcctgg	aactgcaaac	tcaagtcgaa	atggatcaga	attggtgtac	acagtcatga	9660
gaagacata	gtaccgcata	tgaagattgg	tcagataggt	gtccattaaa	ctaatgactt	9720
gaacacaaata	cccaacagta	gatgaaagt	gtcacctgc	agcagaatta	tatacagaat	9780
tggttgcttg	aaagtggcct	tttatagcag	ctggatgtgt	agcgtagtct	ttactagata	9840
ttctgggagc	tccatctgca	tattccaatc	tggaggaggg	agaacctgta	ttatggctcc	9900
agtgtctcca	tgcatctata	ggcctctgtg	catcagactc	agatactatc	tgagaaacaa	9960
gggtgttcaaa	gctctgtgaa	tcattgaggg	gtttgatttc	ataggtaagg	tcacttaact	10020
tcattgacccc	tgacaggccc	ccataacaag	tatccacagt	gaccatggat	tgtgggatcc	10080
cttccaggta	gccaatatag	taacaatcta	caggaaaaaa	ggggtaatcc	atctgtaagg	10140
ctccttggtc	atcttgagtt	gtcagcaaca	agtgtctggg	ccaaatgagt	gtctttctcc	10200
gcagggtggat	gatattgtct	tggccccgaa	aatgcaagct	atatgagagc	agtctttgtg	10260
cttgaagtcc	tttggtagtg	tagatctcct	tccgaggaat	aaccacctcc	gatgagatgt	10320
aacgccaagt	aggatggcct	tgagaacacc	agactggaac	caggaggagc	agccagagtg	10380
caaatagcaa	gaggaggacc	ctggggacca	caggctcttc	cactagcctc	atgccccagg	10440
tcagagataa	catcctgggt	ggagctaaat	ccctctgctg	tggccactgc	ctggtctaga	10500
aaatactgac	agaggactaa	aaacctcttc	aggctcccaa	cctaagtggg	taccagaca	10560
actggagtta	ggtaacagtc	actgggtgtg	gcaggaattg	agtctgaatg	tgttagctga	10620
ggttgaggtt	aaatatgttc	tctataaatg	tgcctggaca	tgccctgaga	agaaaagtca	10680
gaagcagcaa	ggagtgtctc	tgacaggctc	aatcctttct	tttctttttt	tgaagttcaa	10740
aatatcattt	ccacgtgaat	gtattttggt	cccagtgatg	ctctgggtct	ctttctagga	10800
gtcaatattt	ctttatatct	tggctcatgt	ttctcacagt	tgttctaatt	cttctgtttg	10860
ttttgtttgt	ttgtttgaac	gttagtagta	aatactgtct	atattagcct	tttagctata	10920
aatgattggt	tttatttctt	ctaatcatat	tttgtttgag	ttttgggttaa	actattttaca	10980
aatgagtttt	ttttttttcc	ttttgggtgt	tgctcgaag	tttggagcct	tctgttaata	11040
ttgtgtttgt	atttttccaa	tattattaga	cctgagaatt	ctatctgggt	acctgtgaac	11100
tctagaattt	ttaaaaattc	catctcttgg	gaacattacc	tctgaccccg	tctgaggccg	11160
aagtggctgt	ccccctccaa	cctttagtat	ctttctttcc	tgactattgg	gattttctca	11220
agcaatcagg	ctgatgggtt	ctcagcagtg	agaccagtag	actgccggta	tgaacgtcga	11280
agagactgcc	acacactcca	ggttcatcaa	cagtgccttc	gcgtctctta	ctttgtaga	11340
aggaaaagca	gcctctgagt	tatctccaag	aaatcattaa	tgaagagagt	aaaagatggg	11400
tatcaccggg	agttcatgac	aagccctggc	tcagacacgt	gagcaaggtc	tacagcccca	11460
aagataggct	gccctgcaac	atgtatttat	aagatagaag	aaaaaaatgg	gtggttggag	11520
ggttgatcaa	cttacttcct	ctcaaacata	tatatctcat	ctaagtgtgc	aggggaaaac	11580
ttctgtaggac	tactgggatt	gttattatca	ttattattat	tattattatt	attattatta	11640
tattattatt	tattaactta	aggcatttta	ttagatattt	tcttcattta	gttttcaaat	11700
gttatccccg	gaacctccta	tactctctcc	ctgccctgct	cccccaacca	cccactccta	11760
catcctggcc	ctggcattcc	cctatactgt	ggcagatgat	cttcgtaaga	ccaagagcct	11820
ttcctcccat	tgtaggccta	ctaggctatc	ctcttttaca	tatgcaacta	gagtcacagc	11880
tctggggagg	tattgcttag	ttcatattgt	ttttctcctt	ataggggtgc	agatcccttt	11940
agctccttgg	gtactttctc	tagctcctcc	attggggggc	ctgtgttcca	tccaatagat	12000
gactgtgagc	atccacttct	gtatttgcca	ggtattggca	tggatcttac	tgcaccttct	12060
gaactctcta	agcagctttc	ctggtcacct	ccaggagcct	catgaataag	tctctgtctc	12120
ccccttgggg	ctatgagcat	tactgcacct	gatacacctt	gcagcttctt	aggggaagag	12180
gaggaagtgg	cttggccctt	gtctggttaa	ggtgaagagga	gataaatccc	ttctcatgaa	12240


```

ttaggggtgag aagggtcatg tgctctatca ttggtgacca acttggggac atgggcttat 12300
acagtcatca ctctgaggct ctgtgtacca ccagactgaa ctcccatatc ctacatgcac 12360
ataggacaac accaagtaga aggaggtttt aggactaaac tgaaggacag agatggggtt 12420
tctaaacaac tagggagtgc cagggccagc ctctctaacc actataggac actatggagt 12480
ctggttacaa agagagatta ctcaaggctc ttagcactga ttacagagca tatctcagat 12540
gccttctgct gaccagatgt atctttgcat aatctgccta tccagattca gaaaattgat 12600
gccacatagc caagtggact ttcaggaaca gacgatttaa aaacaggcag agagatgtga 12660
gagaaaggag aaggagagag agaagggaga gggagagaag agagagggag acggagaaag 12720
aaagagggag aaggagaagg agagaagggg catggacaga gggagggaca gaaggagaga 12780
ggagatagag agggggataa ggaagaaagg agggagggag agagagagaa ggctaagtct 12840
ttccatacct ggggtcccaat acctcttata acccaagcac atggtttcag atatcacaat 12900
gcggttgga tatagataac tgtaaatact tgtgaaaata atggggctga gatctggggt 12960
gttcatgata gtttcaaagt cactgtactg actaaaacct tccactggcc catctccagc 13020
ttgttaatct gagggatatca aatttccac taagtgtgtt tagaaagatc tccacctttt 13080
tgccctagtc ttccagtgc ccacctacgt tctggctctc cacatctgat gtcttctcag 13140
tgattctggc cctgcctgct ccacagctac aaacccttc ctataatgag ctctgtgctg 13200
agccatcctc ctgaatcaat ccaccttaag cagatgtttt gcttattttt cctgtgtcca 13260
tactacagag gaagggtagg catgtagaag ctgaggcatc tcattctcact ctaagcacc 13320
tcagtctcta aatgtgcccc ttgttttcca gcagttcagc ctcaagcatc ttttattcac 13380
tcgtcttaga gggacacatg tgctgtagtg ttataagatg aaatttaaag cattagtta 13440
tcccaacaag ccaattaaac aagccaaaaa cattcatcag tcattcccat ggaacctctg 13500
aagcatcttc ctgctctaac ctgtgatttc ctagggtcgc tgtgggatca caggagctgt 13560
cctgtttacc agcctatcct gtcccacggg attcagttat tagtgggtgc gagggggacc 13620
gcaaaccctg aagaaaatgg gattggaaga gaaaagagaa acgaagacca agtagatctt 13680
ttcctatcaa ggtcttcggt tattaggctg aggtgcctgg tgtaaagcat gcatcgctgg 13740
gaatagggaag gggtcgaggg ggaattttac aaagaacaaa gaagcgggca tctgctgaca 13800
tgagggccga agtcaggctc caggcagcgg gagctccacc gcggtggcgc catttcatta 13860
cctctttctc cgcaccgcac atagataaag ctta 13894

```

<210> 4
 <211> 251
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

```

<400> 4
ccagcttcag tagtaatcgt tcattctgtg taaaaaggca ggatttgaag cgatggaaga 60
tgggagtacg gggcggttga agacaaagtg ccacacagcg cagccttcgt ctagaccccc 120
gggctaacta taacggtcct aaggtagcga ggggatgaca gattctctgt tcagtgcact 180
cagggtctgc ctccacgaga atcaccatgc cttttctcaa gactgtgttc tgtgcagtgc 240
cctgtcagtg g
251

```

<210> 5
 <211> 245
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

```

<400> 5
aggggtcgag ggggaatttt acaaagaaca aagaagcggg catctgctga catgagggcc 60
gaagtcaggc tccaggcagc gggagctcca ccgcggtggc gccatttcat tacctctttc 120
tccgcacccg acatagataa agcttatccc ccaccaagca aatcccccta cctggggccg 180
agcttcccgt atgtgggaaa atgaatccct gaggtcgatt gctgcatgca atgaaattca 240
actag
245

```

<210> 6
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 6
 caggtacagc tgcagcagtc a 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 7
 ggagatggca caggtgagtg a 21
 <210> 8
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 8
 tccaggactg gtgaagc 17
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 9
 tagtcccagt gatgagaaag agat 24
 <210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 10
 gagaacacag aagtggatga gatc 24
 <210> 11
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 11
 tgagtccagt ccagggga 17

<210> 12
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 12
 aaaaattgag tgtgaatgga taagagtg 28

 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 13
 aaccctgggc agaaactgcc a 21

 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 14
 agagaaacag tggatacgt 19

 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 15
 aactacgcac agaagttcca gg 22

 <210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 16
 gctcgtggat ttgtccgc 18

 <210> 17
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

<400> 17 cagagtcacg attacc	16
<210> 18 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> synthetic	
<400> 18 tgagcagcac cctcacgtt	19
<210> 19 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> synthetic	
<400> 19 gtggcctcac aggtatagct gtt	23
<210> 20 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> synthetic	
<400> 20 accaaggacg agtatgaa	18
<210> 21 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> synthetic	
<400> 21 gctagtagtg gggcctacag gccttttgat atc	33
<210> 22 <211> 48 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> synthetic	
<400> 22 gcaaaagccc aggggagtgg gagctactac acctatgctt ttgatatc	48
<210> 23 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> synthetic
 <400> 23
 gcgagagagg gtatagtggg aactactgag gactttgatt ac 42
 <210> 24
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 24
 gcgagaggga cagtgggagc cctctttgac tac 33
 <210> 25
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 25
 gcgaaaccta gtgggagcta ctcttggttc gacccc 36
 <210> 26
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 26
 gcgagaggag gagggataaa ctggaactcg aatgcttttg atatc 45
 <210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 27
 gcgagaggat ataactggaa ctactttgac tac 33
 <210> 28
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 28
 gcgaaagagt ataactggaa ccactggtac tttgactac 39
 <210> 29

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 29
 gcgagagaga taactggaac cccctttgac tac 33

 <210> 30
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 30
 gcgaggggat ataactggaa cttttctttt ttgactac 39

 <210> 31
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 31
 gcgagaggta actggaactc tctgggcttt gactac 36

 <210> 32
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 32
 gcgaaaaggg ctactatggt tcggggagct cttgactac 39

 <210> 33
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 33
 gcgagagata ttactatggt tcggggagtt attataacga aggtctacgg tatggacgct 60

 <210> 34
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

<400> 34
 gcgagagagt atagcagctt tgactac 27
 <210> 35
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 35
 gcgagagaga gtatagcagc tcgttgtgac tac 33
 <210> 36
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 36
 gcaagagagg ataggagctc gccctcggg tactttgact ac 42
 <210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 37
 gcgagagatc ttggggaagg ctac 24
 <210> 38
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 38
 accacccata actggggagg gtttgactac 30
 <210> 39
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 39
 gcgagagata ggggaccg 18
 <210> 40
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic
 <400> 40
 caacagagtt atagtacccc tccggagacg 30
 <210> 41
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 41
 caacagctta atagttaccc tcggacg 27
 <210> 42
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 42
 caacagctta atagttacca ttcact 26
 <210> 43
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 43
 caacatttta atagttaccc gtcact 27
 <210> 44
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 44
 cagcagtata ataactggcc ttcact 27
 <210> 45
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 45
 ctacagcata atagttaccc gtggacg 27
 <210> 46
 <211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 46
 ctacagcata atagttaccc tcggacg 27
 <210> 47
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 47
 cagcagtatg gtagctcacc tcggacg 27
 <210> 48
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 48
 atgcaaggta cacactggcc gtggacg 27
 <210> 49
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 49
 atgcaagggtt cacactggcc gtacact 27
 <210> 50
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 50
 atgcaaggta cacactggcc gtcact 27
 <210> 51
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 51
 caacagtatg ataatctccc tcccact 27

<210> 52
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 52
 caacagtatg ataatctccc attcact 27

 <210> 53
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 53
 caacagtatg ataatctccc cgtcact 27

 <210> 54
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 54
 caacagtatg ataatctccc gatcacc 27

 <210> 55
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 55
 caacggattt acaatgccga cacc 24

 <210> 56
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 56
 caacagagtt acagtacccc catgtacact 30

 <210> 57
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

<400> 57
caacagagtt acagtacccc tctcact 27

<210> 58
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 58
caacagagtt acagtactcc tcccact 27

<210> 59
<211> 219
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 59
actttcagaa tggttctgaa cagtctctga gaaacacgga agacggccgc ataacttcgt 60
atagtataca ttatacgaag ttattctaga cccccgggct cgataactat aacggtccta 120
aggtagcgac tcgagataac ttcgtataat gtatgctata cgaagttatc catggtaagc 180
ttacgtggca tacagtgtca gattttctgt ttatcaagc 219

<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 60
agctgaatgg aaacaaggca a 21

<210> 61
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 61
ggagacaatg ccccgagtga 19

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 62
tcccataggg ctaggatttc c 21

<210> 63

<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 63
tcccttcaca ctgttcccc 19

<210> 64
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 64
ggtggagagg ctattcggc 19

<210> 65
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 65
gaacacggcg gcatcag 17

<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 66
tcaacctttc ccagcctgtc t 21

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 67
ccccagagag agaaaacaga tttt 24

<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 68

ccctggtgaa gcatgtttgc 20

<210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 69
 tgtggcctgt ctgccttacg 20

<210> 70
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 70
 cacacctaga ccccggaagt c 21

<210> 71
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 71
 tcgctttgcc agttgattct c 21

<210> 72
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 72
 tgcggccgat ccttagcc 17

<210> 73
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 73
 ttgaccgatt ccttgagg 18

<210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>

20

<223> synthetic
 <400> 74
 gcaaaca aaa accactggcc 20
 <210> 75
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 75
 ggccacattc catgggttc 19
 <210> 76
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 76
 ccatgactgg gcctctgtag ac 22
 <210> 77
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 77
 caagtcaggg tgcta atgct gtatc 25
 <210> 78
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 78
 cacagcttgt gcagcctcc 19
 <210> 79
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 79
 gggcactgga tacgatgtat gg 22
 <210> 80
 <211> 21
 <212> DNA

<213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 80
 tcataggtag gtctcagttt g 21
 <210> 81
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 81
 tgatctgctg tgtttcatcc t 21
 <210> 82
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 82
 tgacatgaac catctgtttc tctctcgaca a 31
 <210> 83
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 83
 agagacgctc cgaggtaag gtgctctag 29
 <210> 84
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 84
 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23
 <210> 85
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 85
 accctctgct gtcct 16

<210> 86
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 86
 ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa 26

 <210> 87
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 87
 tccacactgt cggctgggag ctca 24

 <210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 88
 acgagcgggt tcggcccatt c 21

 <210> 89
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 89
 ctgttcctct aaaactggac tccacagtaa atggaaa 37

 <210> 90
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 90
 tgccgcttat acaacactgc catctgc 27

 <210> 91
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

<400> 91
 agaagaagcc tgtactacag catccgtttt acagtca 37
 <210> 92
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 92
 gggctacttg aggaccttgc t 21
 <210> 93
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 93
 gacagccctt acagagtttg gaa 23
 <210> 94
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 94
 aagaccagga gctctgccta agt 23
 <210> 95
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 95
 cccatcacga actgaagttg ag 22
 <210> 96
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 96
 cagggcctcc atcccaggca 20
 <210> 97
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic
 <400> 97
 cccagtggtg tgaatcactc taccctcc 28
 <210> 98
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 98
 cctctcctcc tcaccctcct 20
 <210> 99
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <220>
 <221> variation
 <222> (4)...(4)
 <223> r=a or g
 <220>
 <221> variation
 <222> (9)...(9)
 <223> s=c or g
 <220>
 <221> variation
 <222> 11, 12, 13
 <223> y=c or t
 <400> 99
 atgrccdgst yyyctctcct 20
 <210> 100
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 100
 ctcctcactc agggcaca 18
 <210> 101
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <220>

25

<221> variation
 <222> (18)...(18)
 <223> s=c or g

 <400> 101
 atggcctggg ctctgctsct 20

 <210> 102
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <220>
 <221> variation
 <222> (11)...(11)
 <223> y=c or t

 <220>
 <221> variation
 <222> (13)...(13)
 <223> s=c or g

 <400> 102
 atggcctgga ycsctctcc 19

 <210> 103
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <220>
 <221> variation
 <222> 11, 16, 18, 21
 <223> y=c or t

 <220>
 <221> variation
 <222> (15)...(15)
 <223> r=a or g

 <220>
 <221> variation
 <222> (20)...(20)
 <223> m=a or c

 <400> 103
 tcaccatggc ytggrycym ytc 23

 <210> 104
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 104

26

tcaccatggc ctgggtctcc tt 22

<210> 105
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<220>
 <221> variation
 <222> (16)...(16)
 <223> m=a or c

<220>
 <221> variation
 <222> (19)...(19)
 <223> y=c or t

<400> 105
 tcaccatggc ctggamtcyt ct 22

<210> 106
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 106
 tcaccatggc ctgggctcca ctactt 26

<210> 107
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 107
 tcaccatggc ctggactcct 20

<210> 108
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 108
 tcaccatggc ctggatgatg ctt 23

<210> 109
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> synthetic

27

<400> 109
 taaatatggc ctgggctcct ct 22
 <210> 110
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 110
 tcaccatgcc ctgggctctg ct 22
 <210> 111
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 111
 tcaccatggc cctgactcct ct 22
 <210> 112
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 112
 cccaagctta ctggatgggtg ggaagatgga 30
 <210> 113
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 113
 gtaaaacgac ggccag 16
 <210> 114
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 114
 caggaaacag ctatgac 17
 <210> 115
 <211> 440
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

28

<220>
<223> synthetic

<400> 115
gggcctgggc tctgctgctc ctcaccctcc tctactcaggg cacagggtcc tgggcccagt 60
ctgccctgac tcagcctccc tccgcgtccg ggtctcctgg acagtcagtc accatctcct 120
gcactggaac cagcagtgac gttggtggtt ataactatgt ctcttggtac caacagcacc 180
caggcaaac ccccaaac atgatttatg aggtcagtaa gcggccctca ggggtccctg 240
atcgcttctc tggctccaag tctggcaaca cggcctccc gaccgtctct gggctccagg 300
ctgaggatga ggctgattat tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttcgtcttcg 360
gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tccatcttcc 420
caccatccag taagcttggg 440

<210> 116
<211> 441
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 116
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcgcgtccc ggggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactgaa ccagcagtgag cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaac ccccaaac catgatttat gaggtcacta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300
gctgaggatg aggtcgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 117
<211> 441
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 117
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctcc ctcgcgtccc ggggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactgaa ccagcagtgag cgttggtggt tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaac ccccaaac catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggtccag 300
gctgaggatg aggtcgatta ttactgcagc tcatatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g 441

<210> 118
<211> 438
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 118
atggcctggg ctctgctcct caccctcctc actcagggca cagggtcctg ggcccagtct 60
gccctgactc agcctccctc cgcgtccggg tctcctggac agtcagtcac catctcctgc 120
actggaacca gcagtgacgt tgggtggtat aactatgtct cctggtagca acagaccca 180
ggcaaaagccc ccaactcat gatttatgag gtcagtaagc ggccctcagg ggtccctgat 240

```

cgcttctctg gctccaagtc tggcaacacg gcctccctga cgtctcttgg gctccaggct 300
gaggatgagg ctgattatta ctgcagctca tatgcaggca gcaacaatta tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggg

```

```

<210> 119
<211> 438
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> synthetic

```

```

<400> 119
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctacgcctcc ctccgcgtcc ggggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactgaa ccagcagtgta cgttggtggg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag ccccaaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtcgatta ttactgcagc tcataatgcag gcagcaacaa tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatccagta agcttggg

```

```

<210> 120
<211> 441
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> synthetic

```

```

<400> 120
atggcctggg ctctgctcct cctcaccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctacgcctcc ctccgcgtcc ggggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactgaa ccagcagtgta cgttggtggg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag ccccaaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtcgatta ttactgcagc tcataatgcag gcagcaacaa ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaagggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtaagcttgg g

```

```

<210> 121
<211> 442
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> synthetic

```

```

<400> 121
atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctcaactcagg gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctacgcctcc ctccgcgtcc ggggtctcctg gacagtcagt caccatctcc 120
tgcaactgaa ccagcagtgta cgttggtggg tataactatg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaaag ccccaaaact catgatttat gaggtcagta agcggccctc aggggtccct 240
gatcgcttct ctggctccaa gtctggcaac acggcctccc tgaccgtctc tgggctccag 300
gctgaggatg aggtcgatta ttactgcagc tcataatgcag gcagcaacaa tttatgtctt 360
cggaactggg accaagggtca cgtcctaggg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt 420
cccaccatcc agtaagcttg gg

```

```

<210> 122
<211> 428
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

<220>
<223> synthetic

<400> 122
 ccttcatttt ctccacaggt ctctgtgctc tgctgtgct gactcagccc ccgtctgcat 60
 ctgccttgct gggagcctcg atcaagctca cctgcaccct aagcagtgag cacagcacct 120
 acaccatcga atgggtatcaa cagagaccag ggaggtcccc ccagtatata atgaagggtta 180
 agagtgatgg cagccacagc aagggggacg ggatccccga tcgcttcag ggctccagtt 240
 ctggggctga ccgctacctc acctctcca acctccagtc tgacgatgag gctgagtatc 300
 actgtggaga gagccacacg attgatggcc aagtcggttg tgtcttcgga actgggacca 360
 aggtcaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catcttcca ccatccagta 420
 agcttggg 428

<210> 123
 <211> 441
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 123
 atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacaggggc ctgggcccag 60
 tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggcccag gacagaaggc caccatctcc 120
 tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
 ggaacagccc ccaaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
 cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
 ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggtagca gcctgagtcg ttatgtcttc 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtgagcagtt a 441

<210> 124
 <211> 441
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 124
 atgacctgct cccctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacaggggc ctgggcccag 60
 tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtgtct gcggcccag gacagaaggc caccatctcc 120
 tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctggtacca gcagctccca 180
 ggaacagccc ccaaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
 cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
 ggggacgagg ccgattatta ctgcggaaca tgggtagca gcctgagtcg ggcctttttt 360
 ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
 ccaccatcca gtgagcagtt a 441

<210> 125
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 125
 cccgggcaga gggtcacat ctctgttctt ggaagcagct ccaacatcgg aagtaatact 60
 gtaaaactggt accagcagct cccaggaacg gccccaaac tcctcatcta tagtaataat 120
 cagcgccct caggggtccc tgaccgattc tctggctcca agtctggcac ctgagcctcc 180
 ctggccatca gtgggctcca gtctgaggat gaggtgatt attactgtgc agcatgggat 240

gacagcctga atggttatgt cttcggaact gggaccaagg tcaccgtcct aggggctgat 300
gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca tccagtggagc agtta 345

<210> 126
<211> 432
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 126
atggcctgga cccctctcct gctccccctc ctcaactttct gcacagtctc tgaggcctcc 60
tatgagctga cacagccacc ctcggtgtca gtgtccccag gacaaacggc caggatcacc 120
tgctctggag atgcattgcc aaaaaaatat gcttattggc accagcagaa gtcaggccag 180
gccccgtgac tggatcatcta tgaggacagc aaacgaccct ccgggatccc tgagagattc 240
tctggctcca gctcagggac aatggccacc ttgactatca gtggggccca ggtggaggat 300
gaagctgact actactgtta ctcaacagac tacagtggta atcatgtctt cggaaactggg 360
accaaggtca ccgtccctagg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
agtggagcag ta 432

<210> 127
<211> 426
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 127
atggcctgga ctccctctctt tctgttcctc ctcaacttgc gccagggtc caattcccag 60
gctgtgggtga ctcaggagcc ctcaactgact gtgtccccag gagggacagt cactctcacc 120
tgtggctcca gcactggagc tgtcaccagt ggtcattatc cctactggtt ccagcagaag 180
cctggccaag cccccaggac actgatttat gatacaagca acaaacactc ctggacacct 240
gccccggtct caggctccct ccttgggggc aaagctgccc tgaccctttc ggggtgcgag 300
cctgaggatg aggtgagta ttactgcttg ctctctata gtgtgtgcta tgtcttcgga 360
actgggacca aggtcaccgt cctaggggct gatgtgcac caactgtatc catcttccca 420
ccatcc 426

<210> 128
<211> 331
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 128
agtggctctg ggacagacgg ccaggattac ctgtggggga aacaacattg gaagtaaaaa 60
tgtgactggg taccagcaga agccaggcca ggccccctgt ctggtcatct atagggataa 120
caaccggccc tctgggatcc ctgagcgatt ctctggctcc aactcgggga acacggccac 180
cctgaccatc agcagagccc aagccgggga tgaggctgac tattactgtc aggtgtggga 240
cagcagcact tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc gtcctagggg ctgatgctgc 300
accaactgta tccatcttcc caccatccag t 331

<210> 129
<211> 417
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> synthetic

```

<400> 129
actcctctcc tcctcctgtt cctctctcac tgcacagggt ccctctcgca ggctgtgctg 60
actcagccgt cttccctctc tgcattctct ggagcatcag ccagtctcac ctgcaccttg 120
cgagtgaggc tcaatgttgg tacctacagg atatactgg accagcagaa gccaggagg 180
cctccccagt atctcctgag gtacaaatca gactcagata agcagcaggg ctctggagtc 240
cccagccgct tctctggatc caaagatgct tcggccaatg cagggatttt actcatctct 300
gggctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtatga tttggcacag cagcgcttat 360
gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc ctaggggctg atgtgcacc aactgta 417

```

```

<210> 130
<211> 393
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> synthetic

```

```

<400> 130
tttctgttcc tcctcacttg ctgcccaggg tccaattctc agactgtggt gactcaggag 60
ccctcactga ctgtgtccc aggagggaca gtcactctca cctgtgcttc cagcactgga 120
gcagtaccca gtggttacta tccaaactgg ttccagcaga aacctggaca agcaccagg 180
gcactgattt atagtacaag caacaaacgc tcctggaccc ctgcccgggt ctcaggctcc 240
ctccttgggg gcaaaagctgc cctgacactg tcagggtgtg agcctgagga cgaggctgag 300
tattactgcc tgctctacta tgggtgtgct tatgtcttcg gaactgggac caaggtcacc 360
gtcctagggg ctgatgctgc accaactgta tcc 393

```

```

<210> 131
<211> 417
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> synthetic

```

```

<400> 131
atggcctggg ctctgctgct cctcactctc ctactcagg acacagggtc ctgggcccag 60
tctgccctga ctcagcctgc ctccgtgtct gggctctcct gacagtcat caccatctcc 120
tgcactggaa ccagcagtgat tgttgggagt tataactctg tctcctggta ccaacagcac 180
ccaggcaaa ccccaaaact catgatttat gagggcagta agcggccctc aggggtttct 240
aatcgcttct ctggctccaa gtcctggcaac acggcctccc tgacaatctc tgggctccag 300
gctgaggacg aggctgatta ttactgtgct tcatatgcag gtagtagcac ttatgtcttc 360
ggaactggga ccaaggtcac cgtcctaggg gctgatgctg caccaactgt atccatc 417

```

```

<210> 132
<211> 348
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> synthetic

```

```

<400> 132
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcctgcactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg gtaccaacag 120
caccagagca aagcccccaa actcatgatt tatgaggtca gtaatcggcc ctgagggttt 180
tctaactcgt tccttggtc caagtctggc aacacggcct ccctgacct ctctgggctc 240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatata caagcagcag cacttatgtc 300
ttcggaaact ggaccaaggt caccggcctg ggggctgatg ctgcacca 348

```

```

<210> 133
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
 <223> synthetic
 <400> 133
 aacaaccgag ctccaggtgt 20
 <210> 134
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 134
 agggcagcct tgtctccaa 19
 <210> 135
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 135
 cctgccagat tctcaggctc 20
 <210> 136
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 136
 catcacaggg gcacagactg 20
 <210> 137
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 137
 gatttgctga gggcagggt 19
 <210> 138
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> synthetic
 <400> 138
 cccaagtct gatccttct t 21
 <210> 139

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 139
 gctgaccaac gatcgccataa 20

 <210> 140
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 140
 taagcgccac actgcacct 19

 <210> 141
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 141
 cctgccagat tctcaggctc cctg 24

 <210> 142
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 142
 ctgattggag acaaggctgc cct 23

 <210> 143
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 143
 ccttcatact cttgcatcct cccttctcca 30

 <210> 144
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic

 <400> 144

ttccttctct tctgtgactc aattatttgt ggaca 35

<210> 145
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 145
 tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttctgtgt tcggaggagg caccggctg 120
 accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 146
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 146
 tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggctc 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 147
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 147
 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccagt ctgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catgggatga cagcctgaat ggtgctgtgt tcggaggagg caccagctg 120
 accgccctcg gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 148
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 148
 tctggcacct cagcctccct ggccatcagt gggctccggt ccgaggatga ggctgattat 60
 tactgtgcag catgggatga cagcctgagt ggtcgggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
 accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159

<210> 149
 <211> 153
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 149

```
tcggggaaca cggccaccct gaccatcagc agagcccaag ccgggggatga ggctgactat 60
tactgtcagg tgtgggacag cagcactgct gtgttcggag gaggcaccca gctgaccgcc 120
ctcggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153
```

<210> 150
 <211> 156
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

```
<400> 150
tcagggaaca tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat gctgtgttcg gaggaggcac ccagctgacc 120
gccctcgggg ctgatgctgc accaactgta tccatc 156
```

<210> 151
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

```
<400> 151
tcagggaaca tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat catagggtgt tcggcggagg gaccaagctg 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 152
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

```
<400> 152
tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgccagt cctatgacag cagcctgagt ggttatgtct tcggaactgg gaccaaggtc 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 153
 <211> 159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

```
<400> 153
gatgcttcgg ccaatgcagg gattttactc atctctgggc tccagtctga ggatgaggct 60
gactattact gtatgatttg gcacagcagc gctgtggtat tcggcggagg gaccaagctg 120
accgtcctag gggctgatgc tgcaccaact gtatccatc 159
```

<210> 154
 <211> 153
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 154
 cttgggggca aagctgccct gacactgtca ggtgtgcagc ctgaggacga ggctgagtat 60
 tactgcctgc tctactatgg tgggtgctcg gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120
 ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 155
 <211> 153
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 155
 cttgggggca aagctgccct gaccttttcg ggtgcgcagc ctgaggatga ggctgagtat 60
 tactgcttgc tctcctatag tgggtgctcga gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc 120
 ctaggggctg atgctgcacc aactgtatcc atc 153

<210> 156
 <211> 165
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 156
 tcaggcctga atcgggtacct gaccatcaag aacatccagg aagaggatga gaggactac 60
 cactgtgggg cagaccatgg cagtgggagc aacttcgtgt ctgtgttcgg aggaggcacc 120
 cagctgaccg ccctcggggc tgatgctgca ccaactgtat ccac 165

<210> 157
 <211> 164
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 157
 tctggcacgt cagccaccct gggcatcacc ggactccaga ctggggacga ggccgattat 60
 tactgcggaa catgggatag cagcctgagt gctggccccg ggtgttcggc ggagggacca 120
 agctgaccgt cctaggggct gatgctgcac caactgtatc catc 164

<210> 158
 <211> 22800
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 158
 aagctctaaa actacaaact gctgaaagat ctaatgacta ggacagccta gtaattttca 60
 taggggcata aatgtgaaac gccttggtga tcgtagaaga aagcagaaga gaaagcattc 120
 ccaatttctt aactgccttt tacctatatt aatcagtaat atactggctt ttacctctgt 180
 taatcataat aaacaaattc tcaataaatt ttatcgatac tcttcaatgc ctgctcagca 240
 acatttttcg aaggcagctc aagatattaa ataactcata agggccaacc tcctattgca 300
 gcattctttg ggatttaacc agtttcccaa gactcttttc acaatgttaa gatgttagaa 360
 atagatccaa aactaggtga tatatccctt agtaaaactg tgagggtcaa cttgtctggc 420
 taatgcttcc atttaaaaat ttctctttct tgatccttca ttgtatgtac acaataaatc 480
 aggggaaaac tttaactgag tgaatcaaag tattctcatt attataatag gagcttcaca 540

```

cacacacaaa aaaatcaatt ctattactct cagcctcagt tcctaaagcc aagttaaagt 600
cctgttctaa gatcattggt gcatgaccat atgtattcca ggtctaactt aaactgtgga 660
taaatcccag caggacatta gagatTTTTg tgagagtaag catataggat tcagggttta 720
tgagcttttag atTTTTcttg tcaaaatgaa tgagagttgc catatctaaa aattattccc 780
agataaataa aattcactac ctagaattaa tttatgcata taagtagaaa tgctatctcc 840
ctttttacca tccaaagtgg aaagcctcat ggaactagaa attaatatta gaaaaatcag 900
ttaataaaaag tatgtcattt catcaattca ataagttata atagcaaaaa accataataa 960
attatcactt aaatgtcaat acatttataa actatggtac ataaatagga tattgaatag 1020
ccattgatgc tcctgatgaa aattagcagg cagtataaaa tgataaaatg gaagcacatg 1080
tcaataaata aaataagttt tatgtaattt aggagaaaaat ggtgataatg acacaaaaatg 1140
tgaattatgg atgcatctat aaaattcttt gtacatttgt gaattgtaaa tatttatctt 1200
agagacattt ttactttgta tatgttccat ttgtcacct atatgtccca gtctccttac 1260
aaatgctatg gccaaagaaa taggcataca tacatccttt gcaggctgag gcaggaaaaa 1320
gatcttacgg aattttccag tctatccttt atctgtataa gcaacttaag aggccatgtg 1380
ctccaaatgg tgcaaatata agatggtaga gcctctgtct gcctggatcc ttgagtggct 1440
gcatggagca gaggaccttt ctggccctgg tgaagattgt agcatgagca agatataagc 1500
atTTTgttgg gctaggccat gagatTTTgg gcaagtgtat aacctaccct attatggaaa 1560
atataaatac acaaaaacaga aaagagagag agaagtgaga gaagactgtg agagaagtgc 1620
atgagagaag actgtgtttt gttcatttcc tataatccta tatcaccatg ggtcctgtg 1680
ccttctgttg atcaaaactaa tgttctacag ctccaaagaa gaatgtctgc ctaacgtctc 1740
cattccaatg acctagagac taaaagccaa aaagaacctt agaaaattatc tattgcattc 1800
tttgatgtaa ggaaatatct tagagggcac agatagaaat atcttaacct aggtcactta 1860
gttctgtgga gagtgtaggc taaaaccagg ctttttgact cctaattttg tgctctttac 1920
accttctcac atcacttctc caaccctaac tctagcagaa aaggctaaaa taagatatat 1980
gcatagattt gctattataa gtccatgtac ttctcagac gctttaagat ggggtcttct 2040
atggttcaca ataagcagca gagggaagtg aataactatc ttcgtctccc ctactgctat 2100
ttgtgcagtt tgaagcttat ctcttaaatc atgttttctt ctctgtagta atactacaac 2160
ttgtgccttt tatgtgtgta taaatTTTaa tataattttt ttccatgaac cattcaagta 2220
aaatggacac tccaaaaaga tgttcaataa ggttacatgg cttcacattg cccctctac 2280
accatcttgt ggagctacac attcacctca cccaattttg agaaaaataa tcaagaaaat 2340
gactctcact agcagtgaga ccaagtccat aagcactaat gtcatcagtg cacactgcag 2400
cctcatgctg ccaagcatgt tttgggcgta tccttgactt ggtttggtga catgatcaaa 2460
ggtacatttt ccacctgcat agcccatcc tgatctata gccttccttg tgtctttgtg 2520
aacaacctag tgtgaactca agtatgaga cagatctcaa ttaatttaga aagtttattt 2580
tcccaagatt aaggacaagc ccatgataaa gcctccagag gtcttgatat atgtgcccc 2640
gggggtcggg gcacagcttg gtgttataca ttttagggag acaagaaaca tcaatcgata 2700
tgtagaagat gtgcatcgct ttgtctcgga aaggtgtgac aactcaaggc agggaaaggg 2760
gcttctctgt ggggttgcat tgttttgagt ctctgatcag cctttcacat gtgaaaggca 2820
ggtagagaaa tagtcattta tgccttagtc tggcttattg aaacagtagg gcagaagaag 2880
cattgcatat gcatttgtct gaagtgaaca gagggatgac tttgagctct gtcttttctt 2940
tgtccacaag gaattacctt gtgggcaaat tgtgagggag gtatgtagct ttttttctt 3000
tgtagctatc ttatttagga ataaaatggg aggcaggttt gcctgatgca attcccagct 3060
tgactttccc ttttggctta gtgatttttg ggttcctgag gtttattttt tctttcacat 3120
tagtataact acctttcttt ttctaattcc ttttctactt gtatgtgtta cagctgactt 3180
atgttacttg caaaaagaat tctgactaat gcaccatctg actagaaggc agggttcttc 3240
gatgataacg aatcctccag aatctagtaa acagaattgc ctgaaaaaga ggtgggtgtc 3300
ttcttgggga atttctcatg gcaatgaatg gcaactggcc aaaggattta tgaccagact 3360
gagctctctt ttatctattc tgttactcac caagacctat tagggtttgt gctccacagg 3420
gacactggtt tctaagttct agggttaaac agtccactcc caggccacc acaccatacc 3480
ctcctgacat ctggtgaaca gcaataaaat tgtttcttat tctgaaaatc ctccaatact 3540
tccaccatcc ccaaaaatgc agtggaggag gagagaaaat gaattgttcc attagagaac 3600
acaatatcca ttatattatt cttggccttt gagatacctt acaaaacaaa tacaaaaaaa 3660
gtcccaattt aacatctttt aataatcttt acaaaacaga acacatctcc tttcttgata 3720
atagtcaaga ggctcagtgg caactgtggt gaaaagtgtc agattctggt catgtttcaa 3780
aggtagaaaa aatagaattt gttaacatat tggatgtgag gcgtgggaga aacgtgaaat 3840
caagggtggt gcaagtgttt aacctgagca actagagaat ttggaaggac atttctgag 3900
atgggggaag caggcgggaa tcagggatta gagtgaaca tattagacat ttgagatgcc 3960
tgctagacct ctaattggca atatcccttg gacaggtgga tgaatatgcy tgattctgga 4020
gttcgggaaa tagtccgggt ggagatgcaa atttgggaaa cagggcgagg ttactagcaa 4080
tgagttaaat caatgaaggc aggtcgggac ctggcaggta acccaacaag tagaggctga 4140
agagatgaga agaaaaacagc acaggagact tagaagcagt ggtcaggagg aaggagtga 4200
accaagaaag tgatgtccca gagccaacaa aataaggatt tcttttctgt ttacaaatgt 4260
aaaattaaaa ggtttaataa aaagaaaatt tacttttatg gttggttgtt attaatggtt 4320

```



```

ccaaacactg tctcctatct gtagaatcag aactctctca tggcagtaga aaatttggaa 4380
agttactttt taaaagggtgt gtgcactgct gccctttgct ggtcaagttt atgcactgca 4440
aattccaagg acgattgctc gtcagctttt ctccttttaa atagctcagg ctgtacaagc 4500
tagaaaagac ctcgcaagat attccttcca acatttgcac ttgacttatg ggaagtgcag 4560
gttcagccag aaaagttgtg tgcaaggccg tttatgtaag tttatcagac ctgattctta 4620
cggtcttccc cattgtttcg agcctccctt ccattcactt cccgctcata cgcgaccaag 4680
tataggacag gagtagttat tctgcacttt atagcagctc cactgtctgg cactctgatg 4740
ttctttaatt acaagcttta tgacagtgat tctcaacctg ctccactgcc tccacctagt 4800
ggcagaaaga agaaaatgtg tgtaactcgg gagtctctgg tctgaaagct ccgggggtatc 4860
atttcttcaa agtcttgagc ttgtttttgt ttgtatttat ttatttattt gttttagaga 4920
caaggtctcg cactgcactc cagcctggga gacagagcga gacaattcag gatctatcta 4980
gtgaataaag agatatcagt aatgactgtt ttatatgtg gctgtagcgc attcgaggga 5040
taattcgatt ctgttctgct ttcgaatgca tggctcactg taacctcaa cctccgggct 5100
caagcgatcc tcttacctca gcttctccag tagttgagct tgatttattt taaagtttca 5160
taaaattttg gcattttctt ccacaatatg gccatgtgtg ctttactata aaatattttc 5220
atcacaaaat ttacatcgct ggaatcccc ataagccagt ttgagaaaca caaccacaaga 5280
aagcagaaca gactcaaat atccctttaa tcccccttaa ccacaatat aaaacagtc 5340
gtgactgggc gtgttggtt acactgttaa tccagcact ttgggaggcc aaggcggtg 5400
gattacttga gctcaggagt tcaagaccag cctggccaac atgtgtgaaac cccgtcccta 5460
ttaaaaatcc aaaattattc aggagtgtg gcaggcagtt gtaatcccag ctactggga 5520
ggctgaggca ggagaatcac ttgaaccag gaggtggagg ttgtagttag ccaagattg 5580
gccagtgcac tccagcctgg gcaacagagc gagacttcca tcttaaaaaa aaaaaattaa 5640
gtaaaataaa tataaaaaaa taaagcagtc cttattgata tctctttatt cactaaatca 5700
acctggaatt gacctgaatt ctgattttt tttcatcatg gattttttgc attaatttg 5760
attgttttaa tattgcatta aaatattatt tatcttgact actgagtttg cgggacctcc 5820
ttaaaattta tgaccaaggc aatgcctcac tcaactgcct taccataatc tgggccacat 5880
atcaggggct ccaatagcaa gcaacatgac ttttgaacag ctaagacttc tctcttact 5940
gtgaagacca gatgggccc gcaaacagt taacctctac atgaaaatgc acgagattcc 6000
aactacaacc aggcacaaaa gactctgat gtgaagtccc agccctccaa gtcccaactt 6060
cctgaaggga aagagcacc ccaagtctga ccagaggcca gactcataac gaagatggaa 6120
tgtgagcttg acatagaagg ggtggttagc cctggctcag taatgaagag gctttcggt 6180
ctgaaggaa agctcagcac attcaaaagt tagaagggag gtccagtcac taggagcagg 6240
gaaggagaga agggccaata agaacacacag acaggaggga ggggtcaggg caagatcata 6300
ctggaaacaa ctagagagct aataaaagtc acagtgcaca gtccccacat ggaccagact 6360
cttcggaatc tctaggcatc aatttgggca ccagtagttt tcaaagttct ccagaagatt 6420
ctatgcacac cagccaaggg tgggaaccac aggtgtttggc ctagggatca tgacaatgag 6480
tttctaagtg caataagaaa cctccagaga gtttaagcag gggaataatt tgattttgtt 6540
cttgtttgtg atttttaaa atcagtctgg ttactgtgtg taagacaata atccagaaaa 6600
tctgttgctc atgaaccaca tatctgtaaa ttgtctccc ctgtaactgg atctaaccaa 6660
caaaaattag tactactaa gaaattacat gccaggggac tatgctaagt aattcataaa 6720
cactatttta ttactcctc acagcaagtt tataagagaa acgttattat ttccacattt 6780
cggatgagaa atttgaggct tggggaaagt taagtaattt acctaatgtc acaccagtt 6840
cataagatgc agagttaaga ttctaattct gtgtctaagt tgatgctcca tcaaaccacac 6900
cacgcctcca actaggaagc aacatgctgg ccagaggatg ctgtcatcaa gtttacagaa 6960
tgggttagatt tctaggcaca gatgaataaa tcaacatgtt ggtttgcaat agaatgaatc 7020
tatccagctc tgaatttgca tccaagggtt tgtgagcaca caagtctaaa agtgtggcct 7080
cagctctgct aacttcatca aggtgaatac ctaggaggcc accctctgag accaccagat 7140
ggacagtcac ccattctgtt acagatggtg aagccacata ccagctttgc catctgatg 7200
tctctattca cattcaacat ttatacaaga aatagtcata tggatccttt tcaatagaca 7260
gtactgggga aattgaattg ccatatgcag aagaatggaa ctgacctct atctctcacc 7320
aaatacaaaa gttaactcaa gacagattaa agacttcatc ataagacctg taactacaaa 7380
aacactagaa gaaaacctag ggaaaatgct tctggaatta atctagggtg agaactcagg 7440
actaagatat caaaagcaca agcaccaaaa caaaaataga caaacaggac ttaattaaac 7500
tagaacgctt ctgaacagca agagaaataa tcaatagagt gaacagataa tctgcagaat 7560
gggtgaaaaa atttgcaaac tatgcatcct acagggaaat aatgtccaga atttagaagg 7620
aactcaaaac attcaacaac aacagcaaaa taacccacc aaaaaagtg gcaaaggaca 7680
tgaatagaca tttttcaaaa gaaggtatat gatatggtt ggctctgtgt cctccaccag 7740
atctcacctt aaattgtaat aatccccaca tatcatggga gagaccgggt gggaggtaat 7800
tgaatcatgg gggcagggtt gtcccagct gttctcatga tactgaataa gtccatgag 7860
atctgatgat ttataaagg ggagttcccc tgcacacact ctcttgctg cctccatgta 7920
atatgtgcct ttgttctcc tttgcttctt gccatgattg tgaggcctct ccagccatat 7980
ggaaactgag caattaaacc actttttctt tgtaaatcac ccaatcttgg gtagtcttt 8040
attagcagca taagaacaga ctaatacagt gtacaaatgg ccaagaagcg tacaaaaaac 8100

```

aaaatgctca	aatcactaat	cactagagaa	tcgcaagtta	aaaccacaat	gagatattat	8160
cttacagcag	tcagaatgcc	tattattaaa	acaccaaaaa	ataacatggt	ggcaaggatg	8220
cagagaaaag	ggaatactta	cacattatta	gtgggaatgt	aaactagtac	agcttctgtg	8280
gaaaacacta	tggagatttc	tcaaagaact	agaaatagaa	ctaccatgtg	gttcagcaat	8340
accacaactg	ggtatctacc	caaagggaaa	taaattatta	tataaaaaag	atatctgcac	8400
tcacttgttt	attgcagcac	tattcacaa	agcaaaagata	tggaatcaac	ccaagtgtcc	8460
atcaacagat	gattggataa	agaaaacgtg	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtat	8520
acacatacca	caatgaaata	ctattcagct	ataaagaaaa	gaatgaaatc	atgtcttttg	8580
cagcaatgtg	gttggaactg	gaggccatta	tcttaagtgg	ataattcaaa	aacagaagg	8640
caaatgtcac	atgttctcac	ttataaagtgg	gagctaaatg	atgtgtacac	atggacatag	8700
agtgtgttat	gataaacact	ggagattgag	atgggtggaa	gggtggaagg	aggttgagtg	8760
atgagaaaa	actaaatgga	tacaataac	atgattcagg	cgatagatac	actaaaagcc	8820
cagacttcac	cactacacag	tatagctatg	tagcaaaatt	gcacctgtat	tgcttaaatt	8880
tatacaagta	aaaaaaagat	cgtacgaatt	ctgtttttta	ttctctatga	aattactact	8940
gagagtatta	tccaatgccg	tttctatgca	gtgcccccaa	tattatccat	ttagcagctc	9000
ctatgcaatg	ccccaaagata	gaaattgtct	tcaactttta	tcccaggaaa	accttcagtc	9060
acacgtagaa	actagaaatt	tttcccctag	atgaaagtta	tgtaacataa	cacattatct	9120
tcattttagt	ggtttccaag	aagctcagaa	ccagatttta	tgttcaatca	aaaactgctt	9180
atttttaagt	aggtttactg	aggataaaat	tacaataaaa	gccacctttt	cgtgtatatt	9240
tctataagtt	ttggcaaatg	catagctgtg	taaccacaac	cacattcaag	atataggaca	9300
tcattttcat	cttttaaagt	cccttctctc	cccttctctc	acccagcccc	ttggcaacca	9360
ctggtttttg	tctgatccaa	tcgtttgcct	cttcctgaat	gtcatgtaaa	tagagccatg	9420
caatgtgaag	ctttttgagt	ctggtttgtg	tcacttggtt	acttaggaga	atgcatttga	9480
gattcatctt	tgctgtttcg	tgtagcacta	gttcactgtc	tattgttgag	tagtattcca	9540
ttgtgtggat	atgccacaga	ttgtttatct	agttaacaat	ttaaagccat	ttggtcatct	9600
ctaattttta	gctgctaaga	ataaagttag	tgtaagcttt	ccaatgcagg	ttttgtgtgt	9660
aactcaggat	ttcatttcgc	ttgggtaaat	tcctagcttt	gggactgctg	agtcactctg	9720
taggtgtatg	ttgaacttta	taagaaactg	ccaaactggt	ttccaaagt	gctgtgctct	9780
tttgccatcc	cacagcagct	gaatggaggt	tccacttgct	cgagcctagt	attttaactt	9840
cactatatac	cttctttgat	gacatatcct	ttcaaatttt	tggtcaagtt	tttattgggg	9900
tggtgttact	atggactgtg	agagttcctt	gtatattctg	catatgattt	ttttctcaca	9960
ttgtgttttt	atgaatatgt	tctcccaatg	tgtggcgctt	tttattttct	taacgtgcca	10020
tgtagaagag	agaagttaa	ttttatgatg	tccaaattat	ctttttttct	tttctttttt	10080
agatcaaaat	aggggtctat	tttgattacc	actgttattt	tatctccatt	tgatttttga	10140
tttttatttt	tatttttcta	atttcattgt	aaatttttaa	ttaaacccaa	atatttctagg	10200
ggaaagaggg	aagataaaaa	tagtctaact	tgggcataaa	tttttagagtc	atatttcttt	10260
gccgagaaa	gaaactagct	ctcttacatt	gattgtttaa	tttcagacgt	cactacttta	10320
tgaggatgcc	caaattatgg	gctttaaaaa	atatatatcc	aaacaggggt	tcagaaagaa	10380
taactaattt	gtccacaaca	acacaaaaaa	tgattccacc	ataagtttgc	ccagtgcag	10440
gggtctatatt	attttctata	tatacaattc	tacaactggg	tcttaaagct	actgtacata	10500
acctaagtta	aaatattagg	tattagttga	taagacattt	tatcatctat	gaaatgttgc	10560
ctgtttgtcat	agtttagagaa	tcttttaaaa	tatggagcta	ttttcataga	ttaaactatg	10620
ccagttaaaa	gttgggtaaa	aagaactaca	gaataatatt	tatgtttatc	gtgtaagggt	10680
ttaaagcaaa	ctccaagtca	ttttcatcaa	tgaaatcaat	aaggttttgc	aaatatatat	10740
gatatgaaa	actgatttaa	aatgcaata	aggggagagt	ttgagagaga	gagagagacc	10800
aaatgatttt	ataattctag	taagtttata	ggtttatggg	gtttttacgt	acttttctac	10860
ccaacttgct	tataagactt	taatgaatca	cttagaattt	ttaaaataat	ttattattac	10920
tctgtacctg	ttctttactc	tgcaaatctt	accttgccct	tttgtctaaa	agcaataaaa	10980
tctgacctgg	tttatatcgt	atcattgatt	ttgttactta	gcaagcacag	tgatccatta	11040
ggcctatgta	ggctcatggg	ttatacaaca	ctgccatctg	ctgacagagt	gtgacagtca	11100
cagtcagcaa	cacgagacca	ctttattttc	atttttagtg	tttatagaaa	tatgaatata	11160
cacaaatagt	ataatgaacc	ctaagcttca	caaattaaca	ttttgcta	ctgttttcaa	11220
ctaccgcctc	ccccctcatc	caattactct	gttctctcac	ctctctcac	acagacactg	11280
gcagtatttt	tcagccaatc	attaatacgt	tgccaactga	taaggacttt	taaaaaacaa	11340
ccaccatttc	attatgattc	ccagcataat	tgagagtaat	tcccta	ccaataccca	11400
ttttctattc	caatttcctt	gattgtcttt	aaactgtttt	taccctaagt	ttgcttaaat	11460
caaagtccag	gtcctgttaa	acatattggt	aagttttacc	caaaccacaa	taaataaata	11520
aataaataaa	taaataacct	attttttcca	attccaggga	atagtgaag	agggtaaatg	11580
ccattattta	gaaacataaa	tcacatcata	ggactagaat	tatcttgaag	tcaaaattga	11640
agactgaaaa	tggaaaagaa	aggtatagac	taaaacttatt	taaaaacttc	aatgcagaac	11700
tctaagagaa	gatattagaa	agttgtacca	gcattcatta	ttcagtattc	atcagtattc	11760
actcagctat	atgtagtgtg	aatctaacta	gaggagcttg	atcagataaa	gagataacatt	11820
tttctcacca	agggcgactc	tggaggcagg	tggttcagag	ctagacagct	gctgcaggac	11880

```

ccaggctcctt tccctgcctg ctcctccact ctagcttggt actttcatcc tgcaagatgg 11940
gtgttttctgc caagttccag atagaagaag atagaacaca aaggagaaat aagcagtggt 12000
gcctctgtcc atcaagcaaa atttttccag aaatgcacaa tagatttcag atgatgtctc 12060
aacagtccta actgcaaaga agctgaggaa ttagattttt ggctgggaca ctgttgccct 12120
gtaaaaaaat tgggattctg ttattaaaga ataagaggag ggaagaaaga ttgaaactc 12180
ctatgcaata gtgaaaaaaa taagaaactc aataaaaaag tgggcatacc ttaaaaacag 12240
gcaattcaca acagatgaga cccaatagc caataaacat ttttaaatgg tcaacctcat 12300
gagtgtacag aaaacacaaa tatgtatttt aaacaaaaa taaaatacaa tgtattgacc 12360
atttgagtgg aaaaaaatta aaaagcctga taatatcaag tattggagag gatgtagagt 12420
gaggaaactc catggaggac ctatcattgc aaatgtggga atgaaactta atacacgaat 12480
ttgaggccaa tttgtaaatt gaaaaatgcg cacacctgc aaccaagtac cccttgcaat 12540
atttttgaaa agacaaaaac gttatgtaaa tggaatcatg caatatgtga cctttatact 12600
cagcataatg cccctcagat ccattgaaat catgtgtatc aacagctcac tatttttttt 12660
ttaatttttt tttagagacag agtctcactc gtgcacacag ggtggagtgc agtggcgaga 12720
tcataactct cttagcagc ctcgaactcc tgggctcaag catcctcctg cctcagcctc 12780
ccaagtacgt aggactacag gcatgggaca caacacacag ctaatttttt taaatttttt 12840
ttagagacat ggtctcacta tgtgacctac gctggctca aactcctagg tcaagcgatt 12900
ctccacctc tacttcacaa agtgctgtag gtatgtaggt atggattgta ggtatgaacc 12960
accgtgcca actcactact ttttattact aattattcca tgggatggat gtaccgcagt 13020
ttgttttacc ataatcttat tgtaggacat ttgtactgat tccagttttt ttttaataca 13080
aataaaacca ctatgaatag ttgtgtattg tatacgtttt tgtgctaagt ttccattttt 13140
ctgggataag ttttcatttc tttgggcttt tactgtatcc ttgatattat aatatgttac 13200
atcttcagtt ttattctatt caatatataa tcttttattt tccttgaaat ctcccatgga 13260
ttgtttagaa gtgtgtgttt ttgtttccaa gggtttgga tttttcccat tatttttcta 13320
ttatcgattt ccagtttgat tccagggtgt cagagaacac acttcatgtg atttcagttc 13380
tataaaattt gttgaggttt gttacatggc ccagtatatg gcaatttttg tatatgttcc 13440
atgagcactt gaaaagaatg cgaattctgc tgggtgctgt tggagttttc cagcaatgtt 13500
gattttatgat ctactcatt gatgggtgtg ttgagtttga tgtgttctta cgtatggcagc 13560
tttaacattc ttgtcaggta attctaactg ctctgtcatg tcagtattag cgctctctaa 13620
ctgtctcatc aaagctgaga ttttctggt tcccctggtt cctgttggga tgtgtggttt 13680
tcatttgaaa tctggacttt ggagtattgt gttatgaggc tttggatctc atttaactc 13740
attctcagcga atttctctc ttgccaacta ggaaggagaa gttgggtgtt tgaatggagc 13800
agagccgtta ctgcctaaga attgttttac tgggcttccc ctttctttct cctttgacta 13860
gagagagcca gctttttatt agggctttat gtttttctgg gcctgttggg gtttctgggt 13920
tgacaactt ctccagaacc aagtctggaa tggatgaggc aaaaagaaa cccgtggaat 13980
gactgtctgg gtcgtctctt ggtcccaat gtccctaact ggtctgcctt cttctctcca 14040
gcttcagag ttctcataag ttgtctttac gtacaatgtc cggggttttt actttacttg 14100
agagaaatag gtaaaagtaa ttctactcca tctttcagga agcaaaagcc cccttggtga 14160
tttttttaaa ctttcaaaaa caaaacaaaa ggcagctgca acagtaaaaga agctagtaac 14220
acccttggtg ggaatttcaa gtccaaatc acattttaag tttggctagc cagtgaagac 14280
atcagaatag ttcaggtttt aaacaaattt atattttatg ttatgcata actaaaagct 14340
gaaggcatct tatatttact aagcacctat tttgttcttg ttaaaaagac agaattccat 14400
tccctaggaa atttgacctg gcagctggag ctgatccacc tggccactag agcacagagc 14460
agggagagta gttagcctgc cccagccacc cctcaagaca ggattctttc tctgggaact 14520
gtaggtaaca ctaaatcggt ctggaacaca acaacgaaag aagaaaggaa agagaaagaa 14580
agaaaggaaag aaagagagag agaaggaaag aagggaggga gggaaaggaa gaaggggaaag 14640
ggaagggaat ggaagggaag gaagggaaga aaaggaaaga agggaggag agaggaggga 14700
aggaaggaaa ggaagggaag gaaggaaaga ggaaagaaaa aaagaaagaa agaagaaaga 14760
aagaaagaca agaaagaaag aaagaaagaa agaaagggga aagaaagaa agaggaaaga 14820
aagagaaaga aagaaagaa agaaagggaa gaaagagaaa gaaagaaaaa gaaagagaaa 14880
gaaagagaaa gacaagaaag aaaaaggaaa gaaaagaaag agaaaagaaa gaaagaaaag 14940
aaagaaagag aaagaaagaa aaagaaagaa agaaaagaag aaagagaaag aaagaaagaa 15000
aaagaaagaa agaaagaaag aaagaaaaag aaaaagaaag gagaaaatga cagcaattac 15060
ttttgcaaca acctaatata agttttttaa aagtttaata ttctgttcca tgcatgtctg 15120
gatacccttat aaataacagg gcatcctatg acctgaattt cccaaattat gagttgaggg 15180
tttgaactag ttttaaaaaa caaggaggcc aggcgactg gctcatgcct gtaatcccag 15240
cactttggga ggtgagga ggtggtcac gaggtcagga gctcgagacc agccttacca 15300
acatagtga acaccgctc tactaaaaat acaaaaatta gccgggcgtg atggtgcgca 15360
cctgtaactc gagctactca gcaggctgag gcaggagaat cgcttgacc cagaaggcgg 15420
aggttgcagt gagccaagat cacagcattg cactccagcc tgggcgacag agggagactc 15480
cgtcttcaaa aaaaaaaaaa aagacaagga atctgtaaaa caggcactgg aagtatatgc 15540
acttttattt tcatctatg ctatccgatg cctactgcta tttcccttca tatttaacct 15600
ccaacagctg cattttgctc cctccagacc acctgattgg agctcacgtg ctccacaca 15660

```

```

gtacctccaa ccagagagag tcgagtccca cagaaaggcg taacaatcac cagtaatttt 15720
gcacttattt tacattgtgc cttgatacag agtactcaat gaatgctctt tgaatcatat 15780
ttaataaata tgtgtatttg ggattgtagc atattgcagc taccctggata tataatttaa 15840
ttagaaaaaa aattttgtgt ggctcaatca acaaacgact tttctctctc tctctttctc 15900
tttctccctc tctctctctt tctctcagc tgatgttgct ggagttcagt gttgtgcaga 15960
tggcagtgac aaatgccatg ggcacatgag atatgataaa aggtccctga agaagggtga 16020
gaaccagtta tcttatgaaa tttccagag tgggtactgg atctctcctg tctggcacca 16080
tgctggcctc agcccaaggg gaatttcctt ccagagacag agggcagtgga ttgaggtggg 16140
gagacagatc gtaacactga gacttacatg aggacaccaa acagaaaaaa ggtggcaagt 16200
atagaaaaat ctttttctg gacagtcttc tctgttctaa cttcagcaaa attctccccc 16260
cagtggtatg cattgcacaa cctcatatat gctatgtttt ttctctataca cacttaccta 16320
tgataaaatg cattaattag tcacagtaag aggttaacaa caataactag taataaata 16380
gaacaattca gtaaaataag agttacttga gcacaaacac taggatataca tgacagtcaa 16440
tctgatgacc aagagggtga ctaagcatct aaacaggagg gtaagtgtag acagcatgga 16500
gacgctggac aaagggtatg ttcagtccca ggctggtatg gagcgggaag gcatgatag 16560
tcacacgctt actaaggcac acaatttaaa atgagttaat tcttattttt agaaatttct 16620
ttttaatttt ttcaagtact agttgcctac aggttaactga aaccccagaa agcaaaattg 16680
ttgataagga ggtactactg tacatcgctc ttgaaaccaa ctttatcatt tgctagtata 16740
tacatatata cctacataca tacatatata catacctgca cacacctata tgtatacgt 16800
cacacacaca cagcacaca cacactacta catctactaa tgttagaata agtttgctaa 16860
ataagatgca caacttggtt atgtcctaca gagcaataaa accataagca ttggggttat 16920
cttttctact agataaaaaat ccatttatcat ttcatataaa ttttctttac attaacatct 16980
aaacttttgc atctagtttt taatcatcat aaatagggaag caaatgaact gtttctctag 17040
tgaatcaaat atccttgaaa acatacatag tcactctttt ggtttatttt tatttttaga 17100
taaatatttt aaagttttaa ataatttaac attcacaata gtttgtgact gatatatttg 17160
acttggctct tcaaaccttaa tttgtacttt tatgtatcgt gcttacctca attttttatt 17220
cacttttctt aaactttgct ggattgggtt attatttttg tctatttctt ttcttcttag 17280
tggtttggga ggggtttttt aatcccatta ctattgaatg cctattaact tgcccccttt 17340
ttctttcaat ctctattccc acggctctgaa gcatgagggc caagctgtct gtaaccagca 17400
gagagatgac ccagggtgta ttccactctc cactgtccac ctatcaccat tcccagccc 17460
atagctctga agtacggctt tcttggggct ctgtggggaa aactagaact ggctgcttca 17520
aggacacctc ctgtttttgc aatggaaaaa atgtttctaa attccagttt ctctatgaat 17580
tcaatgacat ggttttaaatc tctgtggtgt tcttcaaagt ttttcttctt aataggacct 17640
ctcatgattc tccaaccacg aaataaattc attatcattt ttatatattt tctgtcattg 17700
caaaggaggt tttgaaagag tggaggacgc gctaataaac tcaaaaatcc acactatttc 17760
ttgtttccat ctgtgtttca ttcatgtttt ccattggcct gtccgcctcc tatcctcttt 17820
cttagacttg gagctctagc ctacagcagg atagggaata gagagatcag actgttactt 17880
tgtctatgta gaaaaggaag acataagaaa ctccattttg atctgtatcc tgaacaattg 17940
ttttgccttg agatgctgtt aatctgtaac tttagcccca accttgtgct cacagaaaca 18000
tgtgttgatg ggaatcaaga ttttaaggat ctaggcgtgt gcagaatgtg ccttgttaac 18060
aacatgttta caggcagtat gcttggtaaa agtcatcgcc atttcccat ctcgattaac 18120
taggggcaca gtgactgctg gaaagccgca gggacctctg cccaggaaaa ctgggtattg 18180
tccaagggtt ctccccactg agacagcctg agatatggcc ttgctgggat ggaagatct 18240
gaccgtcccc cagcctgaca cccgtgaagg gtctgctgct aggaggatta gtaaaagg 18300
aaggcctctt gcggttgaga taagaggaa cctctgtct cctgcatgcc cctgggaacg 18360
gcatgtctca gtgtaaaacc tgattgtaca ttcgttctat tctgagatag gagaaaaccg 18420
ctctgtggct ggaggcgaga tatgtgctgc gcaatgtgc tctgttgtt tttactacac 18480
tgagatgttt ggggtgagaga agcataaatc tggcctacgt gcacatccag gcatagtacc 18540
ttcccttgaa ttacttgtg acacagattc cttgtctcac atgttttctt gctgaccttc 18600
tccccactat caccctgttc tcctgccgca ttccccttgc tgaggttagt gaaatagtaa 18660
tcaataaata ctgagggaac tcagagaccg gtgccagcgc gggctcctcc tatgctgagt 18720
gacggctcct tgggcccact gttccttctc tatactttgt ctctgtgtct tatttctttt 18780
ctcagctctc cgtcccacct gacgagaaat acccacaggt gtggaggggc tggacacccc 18840
ttcgagccag gattatcagg gcatttgggg gcttgcaaaa ctaagcccca actcatgat 18900
ttcacaactt catccagagc cagcctgaac agtagttgcc catgatttct atgccttaat 18960
acgagaagag aacatagggg ctgggtgcca agtaggtaga caggaggggc agggaaactc 19020
aagacagagc ttgaggggct catctcctct gcaaaatgaa acaaaaacca cagcactgaa 19080
tatgtaaatc tcgggtggctg aaccctcctt aggatagtaa gccctgacac aattgctgct 19140
atcttctctt tctctcaagg aagtcaaaaa acacctgcag ccttactgtc cccttgaaa 19200
caagatgaac atctacattt tctaaagtgg gacaagaatc tctgttcata tttatgtccc 19260
atgcatttgc acgtggccgg acaaggactt ttgtcttctg cagcacatct gtcttcagat 19320
atgagaggaa cctggaggcg cctggaggcg gcaagaagc agctctttct caagtacct 19380
cctctatctc cctacttcct ggctaattgg gcagccttga tccttgggaa tccaggacag 19440

```

```

atatccactc gtagacaaact agctggaaga atgacaacca atcagggttc aagcaccact 19500
ggatgtgaac cacagaattt cctcctctcc ttgtggaatg tcagcttacg tctgacaaaa 19560
aatgtaaaaa tgagagagtt acaatcttaa ggaggagtcg agctaaagca gaaagaatca 19620
cctactctgg actccagcat gactgctgag ctcaaatata tatagagaga gaaagaacca 19680
caaaactgaa gatggatata agctacagac ttctctgagt caggtaggga aatggccatc 19740
cctcaaacct tgcaaaaggc aaacttatgc cattgtgtcc tctgacatac tgggtgatgt 19800
actgtatggt actgatgtga ggggaacttc ctaaaattggc tagtaaatga tgccaaataa 19860
aaagcaaaaa tgatatcttct tgaatgttta catctgagga acattgctaa aataatttat 19920
cagtagtttt caggatgatt tatagatgtg cattgaagtg tgtacttgtg ctctctctct 19980
cctctctctc tctctctctc tcctctctct cgctctttct ctcttgccc cctccctccc 20040
ctgactttcc ttctgtcccc ctccacagca gtttatattt ttttctgat aatctaactt 20100
tgctgagggg tcaatgtaaa gcaccttcag tgatgagtta gttggaatgt tcccaaagaa 20160
attctatttc cagcactctt ttacatgaaa tccaagaagc tctcagacta tcttactgac 20220
accttgccct tcctcaacag atcaatctta tcaatgtcca tcacagatat tttgtagaac 20280
gggtgattct ggcagagtc cagagatgct tctgagacaa catttgcttt caaaaaatga 20340
accacacaca tcctaaagat ctccagccact tcccatgttt cattttgtgt tacagcaaac 20400
atcacacaaa tcattcctac agatcaccac tgcattgtat caataaaata gtttttgcag 20460
caatgggtact tatgataatc atcttttatt gtttacaagt actgctttac aatagtattt 20520
cggttgactc gttcatatta gatttccaat tagctcactt aggaacataa gtccctcgaa 20580
cagctcagtc atctttttca ttctgtttc tatcccttac atctctttcc tttgcagagc 20640
actatctctc acactgaaac aggaagcgtt ttaccttttt ggcatgcttg atttaaatga 20700
tatagaaaag tatttgacaa agaaaactca cacatgtgtg tacatatctt ttaaaaagtt 20760
atgtttatgc attgcacagg aatatcgaga atgctaatag gcaatgtcag agtttactgt 20820
ttttcaaaat tagtcaggtt ttattatttc taaaaactat aaaaatgaata tattcacatc 20880
accatacaga agagttaggag gagatggcat aaagtgtcat tggtcctcct ctgcaatccc 20940
aggagataac taccagcac aatttatgtc tttaaataat cagcccgat ttatatcat 21000
atatattcaa tgtagatggg atcatgatata ctcaccacac atactcttca gtgacctgca 21060
ttttcacaac caccttccac gtaactatat agaagtctac gtcttcccc taaagtctgc 21120
ttgtgtctac attgtaaaagc tctagcacag tttaaccaaa ctctatttaa tgaggatttt 21180
agtatttttt cactctttta acaatatttc catgtgtagt cttatacata cgtctgtaca 21240
cacttatccc agtctaagga gttcctttta ccttccccca tcccagcatt cctgtctcag 21300
cttgttgctt ccgttgagtg actttactcc tggagtataa tctgctgata gttcagttaa 21360
aaacatggga tctgagttta ggtcacagct ctgccactta ctgccataag ccagtttctt 21420
gacctctctg cctcaagttt ttgacaccta caaagtaggg gataatatta gttcctagtt 21480
catagagtct tgggaataat taaatgtgat gatccatgta caatgtctgg cacttagtaa 21540
gtgctcaata aatgtcaccc tttatgattg gtattgcgtg tatgtctgca gagaaaatca 21600
ctttgtgtcc cctttaaaaa aggaactatgc cttgtgtcag ctattttgca cattaaattt 21660
cacttgccaa tattaactct ccacctctaa cttgatccct ctcttctctc atcttctggt 21720
gagaccaaata gctaattctg ctattcaagg caactagcaa agctgccagt gacagaatca 21780
aataaaacct cccctaactt ttagaattgt agttatgatt tctgttgtaa aagttactgt 21840
tgtggcagtc agtattagtc tttggtctat gatagcatct ctgacttatt attgaytttc 21900
aattakgtat ttttttttat ttattctgaa aatgtttggt aagcatttgc taagtaaaga 21960
tactggackg agcctcccaa atacagggca aataaaacat caaacagctt ataatttaga 22020
agggtagaag agaactctgaa agcagggtaaa aataaacagg cactcggctg ggcgcggtgg 22080
ctcacgcctg taatcccagc actttgggag gccgaggtgg gcggtacacg aggtcaggag 22140
atcgagacca tcctggctaa cacggtgaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaatta 22200
gcgaggcgtg gtggcgggcg cctttagtcg cagctagtcg ggaggtctgag gcaggagaaat 22260
tgggtgaacc cgggaggcgg agcttgcatg gagccaagat cgcaccactg cactccagcc 22320
tgggygacag agcgagactc cgtctcaaaa aaaataaata aataaaataa aaaataatta 22380
ggtagcttag gccagtgac ctgtctctgt actctgtaaa ttcagggtcac ctgctcaggg 22440
ctaactctgag agaaggctct tcttcagttg aattttgaaa gacaattagc agttcacaag 22500
ctaaccaggg tggacaaaga tgttcccaag cagagggagt gcttggtgaa gctggaggcc 22560
atagaaaaac tctaaggagt gtagggaggt gggagttaag tatggaaggg gtgaggatgg 22620
aagggttaaga gagatacaag gctgcaaaaa tggagctgga ctcaaaagaa aatactgaaa 22680
aggctctcag tgttgttgat gagattacta tggaaacact atggaacact gggactccat 22740
ggcagctcca aagatggcat gcgcctggtc cagctcagta agagctgagc tcttctctgt 22800

```

<210> 159
 <211> 154
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 159

tctggcaaca cggcctccct gaccgtctct gggctccagg ctgaggatga ggctgattat 60
tactgcagct catatgcagg cagcaacaat ttaagtcttc ggaactggga ccaagggtcac 120
cgtcctaggt cagcccaagt ccactccac tctc 154

<210> 160

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 160

tcagggacaa tggccacctt gactatcagt ggggcccagg tggaggatga agctgactac 60
tactgttact caacagacag cagtggtaat cattatgtct tcggaactgg gaccaagggtc 120
accgtcctag gtcagcccaa gtccactccc actctc 156

<210> 161

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 161

tctgggaaca cagccactct gaccatcagc gggacccagg ctatggatga ggctgactat 60
tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcc gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 120
ctaggtcagc ccaagtccac tcccactctc 150

<210> 162

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 162

agggtgaaac acggtgagag t 21

<210> 163

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

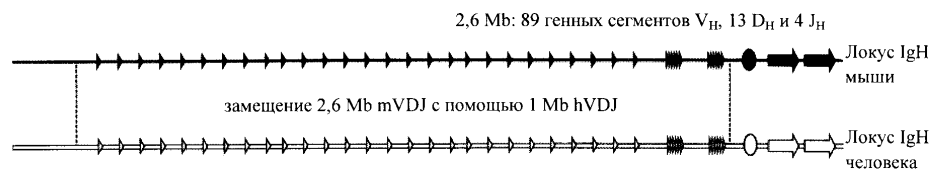
<220>

<223> synthetic

<400> 163

ccactcgggg aaaagttgga a 21

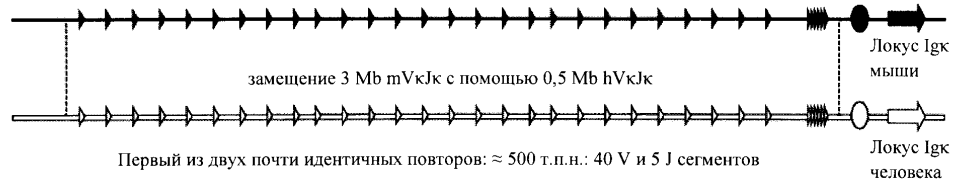
1/61



ФИГ. 1А

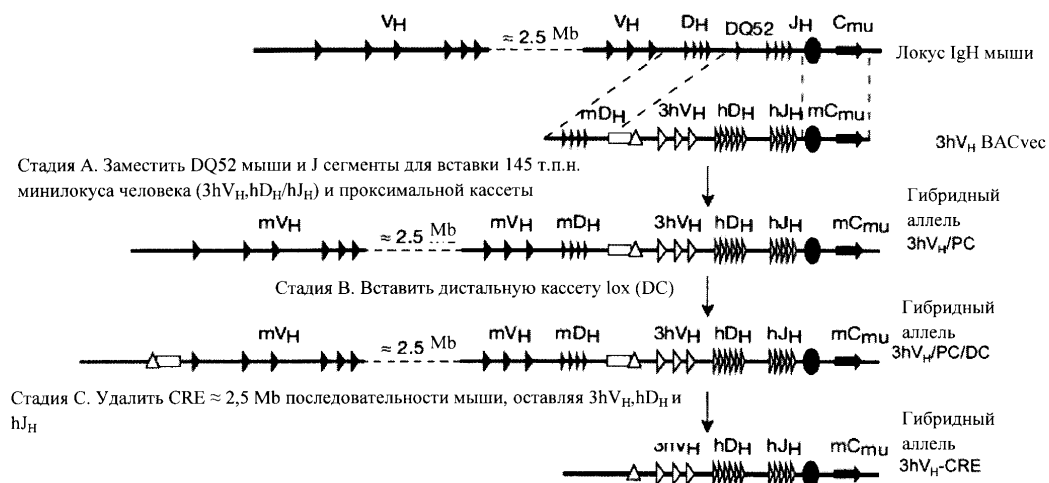
2/61

≈ 3 Мб: 137 Vκ и 5 Jκ генов сегментов



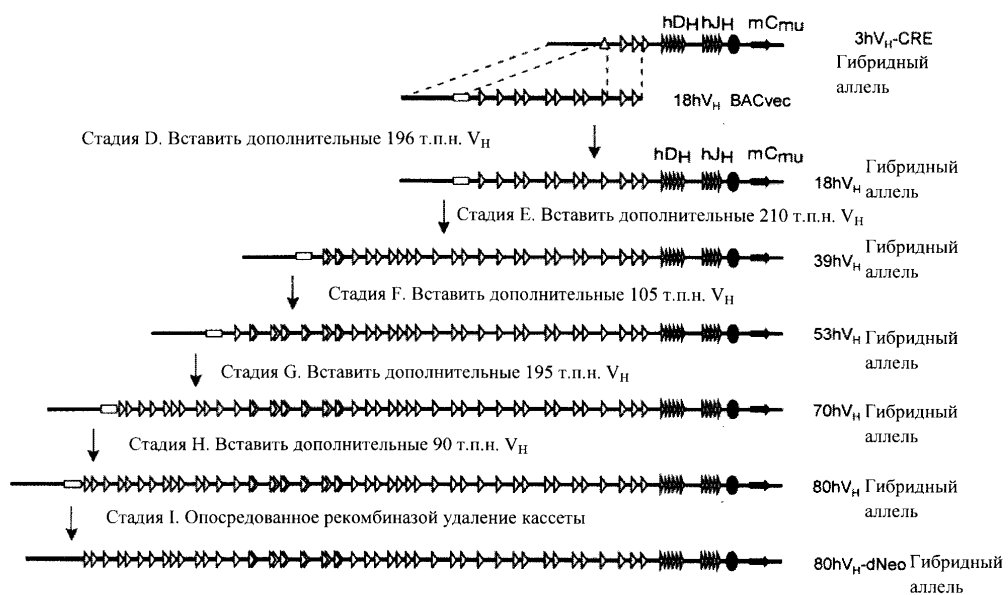
ФИГ. 1В

3/61



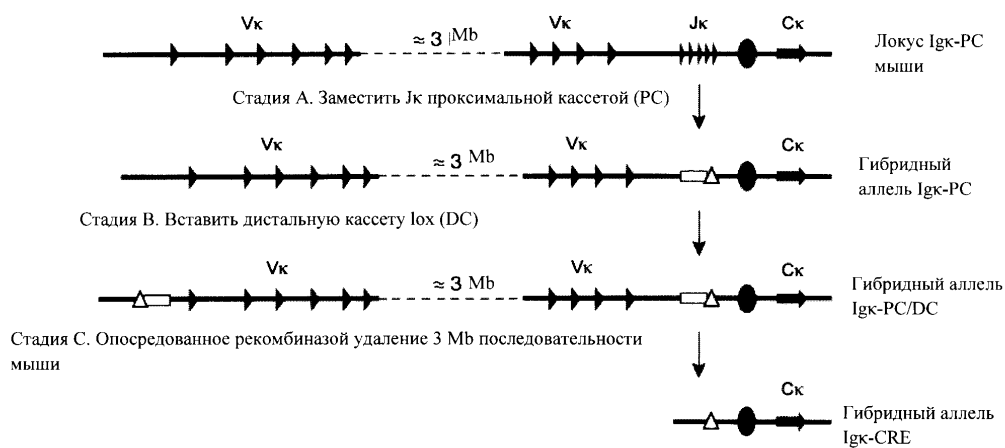
ФИГ. 2А

4/61



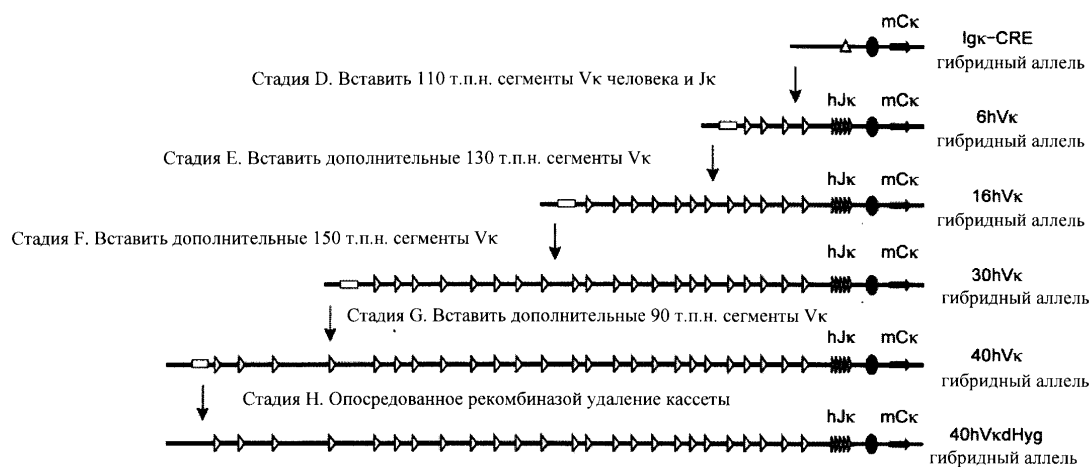
ФИГ. 2В

5/61



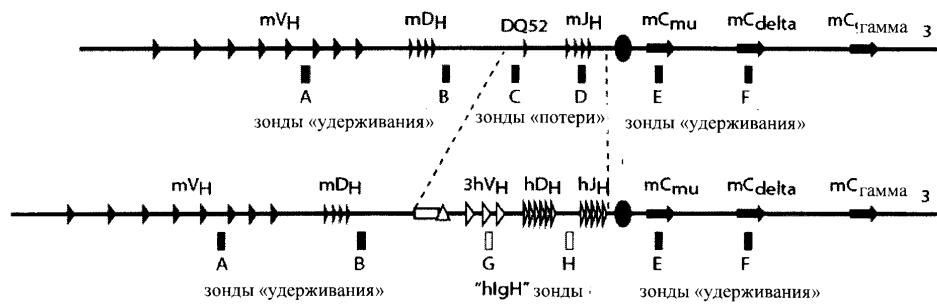
ФИГ. 2С

6/61



ФИГ. 2D

7/61



ФИГ. 3А

8/61

		A	B	C	D	E	F	G	H
Родительская ES	Теоретическое число копий	2	2	2	2	2	2	0	0
	Наблюдаемое число копий	1.9	1.8	2.1	1.8	1.9	1.8	<0.01	<0.04
Модифицированная ES	Теоретическое число копий	2	2	1	1	2	2	1	1
	Наблюдаемое число копий	1.9	2.4	1.0	1.0	2.0	1.9	+	+

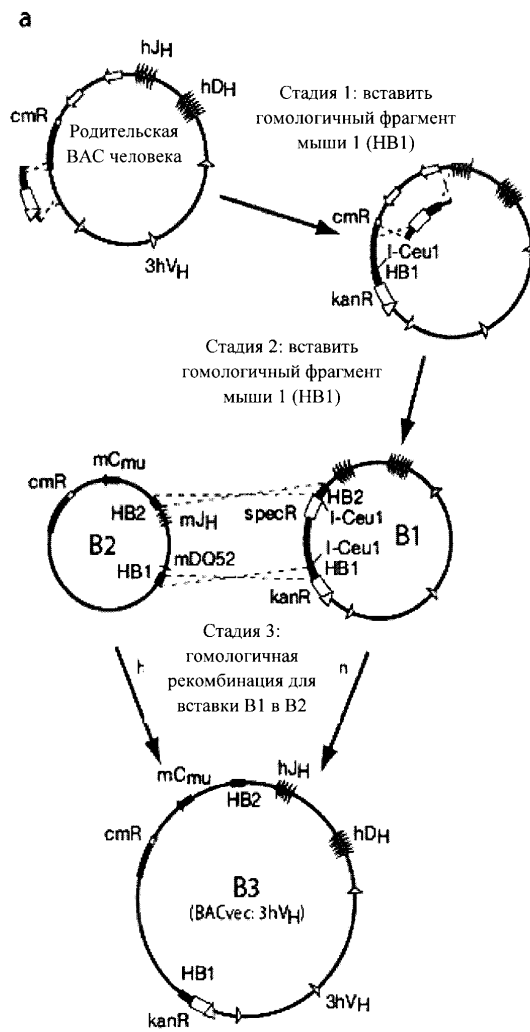
ФИГ. 3В

9/61

	число копий	D	H
WT мыши	Теоретическое	2	0
	Наблюдаемое 1	1.71	< 0.01
	Наблюдаемое 2	2.07	< 0.01
	Наблюдаемое 3	2.16	< 0.01
	Наблюдаемое 4	1.88	< 0.01
Het мыши	Теоретическое	1	1
	Наблюдаемое 1	1.22	1.04
	Наблюдаемое 2	0.94	1.02
	Наблюдаемое 3	0.85	0.95
	Наблюдаемое 4	1.02	1.00
Homo мыши	Теоретическое	0	2
	Наблюдаемое 1	< 0.01	2.37
	Наблюдаемое 2	< 0.01	2.22
	Наблюдаемое 3	< 0.01	2.43
	Наблюдаемое 4	< 0.01	1.93

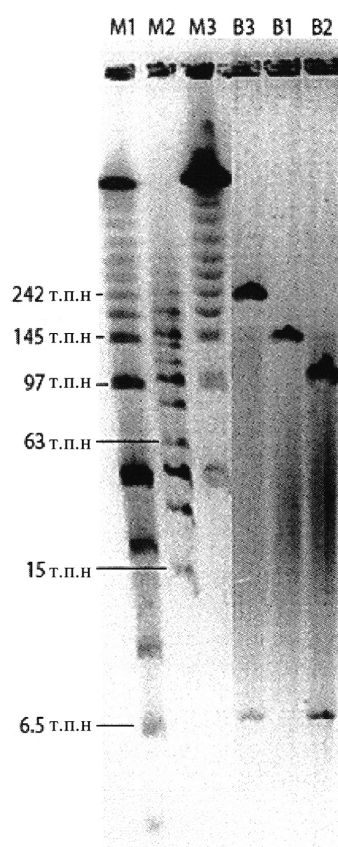
ФИГ. 3С

10/61



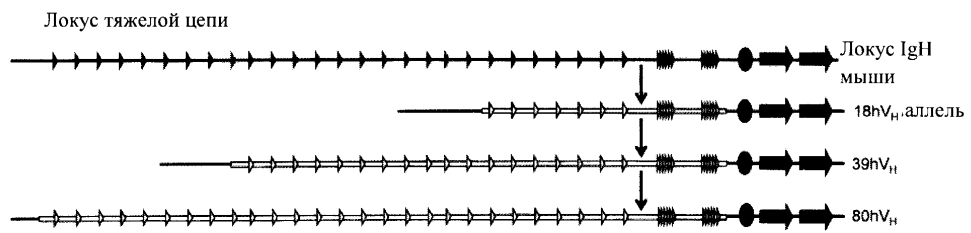
ФИГ. 4А

11/61

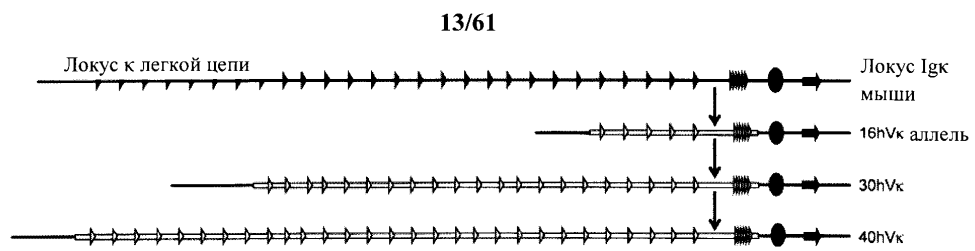


ФИГ. 4В

12/61

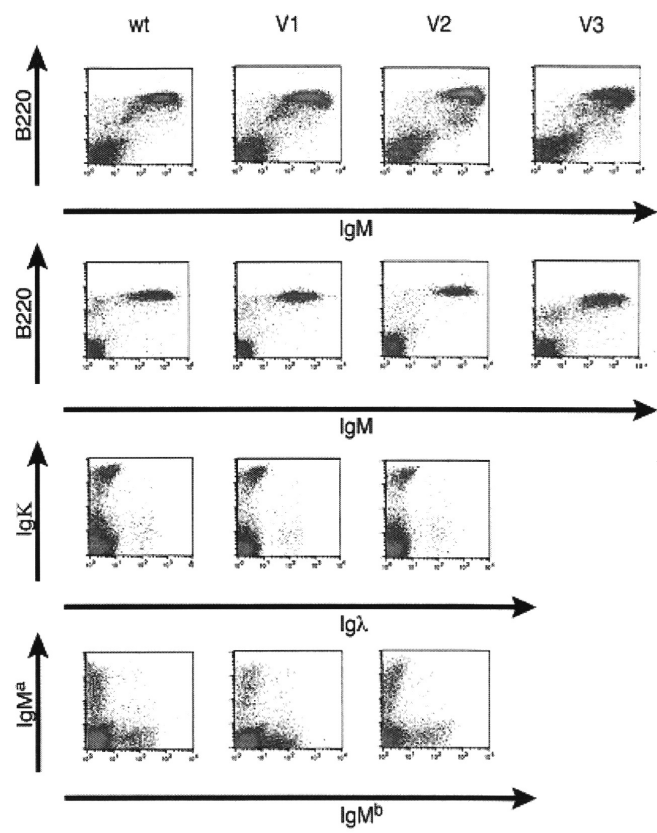


ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

14/61



ФИГ. 6

15/61

3'V _H	N	D _H	N	5'J _H
(3-72) GCTAG	(D _H 1-28)	GGTATAGTGGGAAGCTACTAC		
(3-9) GCAAAAG	CCCAGGGG	TAGTGGGgcCTAC	AGGC	CTTTGATATC (3)
(3-7) GCGAGAGA	G	AGTGGGAGCTACTAC	ACCT	ATGCTTTTGATATC (3)
(4-59) GCGAGAG	GGAC	GGTATAGTGGGAaCTACT	GAGG	ACTTTGAtTAC (4)
(3-23) GCGAAA	CC	AGTGGGAGC	CCT	CTTTGACTAC (4)
		TAGTGGGAGCTACT	C	CTGGTTCGACCCC (5)
	(D _H 1-7)	GGTATAACTGGAACTAC		
(4-34) GCGAGAGG	AGGAG	GGTATAACTGGAACT	CGA	ATGCTTTTGATATC (3)
(1-2) GCGAGAG	GA	TATAACTGGA		ACTACTTTGACTAC (4)
(3-23) GCGAAAGA		GTATAACTGGAAcCAC	TGG	TACTTTGACTAC (4)
(3-7) GCGAGAGA	G	ATAACTGGAAC	CCC	CTTTGACTAC (4)
(4-59) GCGAG	GGGA	TATAACTGGAACT	TTTCTTTT	TTTGACTAC (4)
(4-39) GCGAGA	GG	TAACTGGAACT	CTCTGGG	CTTTGACTAC (4)
	(D _H 3-10)	GTATTACTATGgTTTCGGGGAGTTATTATAAC		
(3-30) GCGA	AAAGGGC	TACTATGgTTTCGGGGAG	CTC	TTGACTAC (4)
(1-2) GCGAGAGA		TATTACTATGgTTTCGGGGAGTTATTATAAC	GAAGGT	CTACGGTATGGACGTC (6)
	(D _H 6-6)	GAGTATAGCAGCTCCTCC		
(1-2) GCGAGAGA		GTATAGCAG		CTTTGACTAC (4)
(3-48) GCGAGA	GA	GAGTATAGCAGCTCGT	TG	TGACTAC (4)
(3-13) GCAAGAGA	GG	ATAGgAGCTCGcCC	CTCGGG	TACTTTGACTAC (4)
	(D _H 7-27)	CTAACTGGGGGA		
(3-7) GCGAGAGA	TCT	TGGGGGA	AGG	CTAC (4)
(3-15) ACCAC	CCA	TAACTGGGGGA	GGG	TTTGACTAC (4)
(3-48) GCGAGA	GATA	GGGGGA		CCg (5)

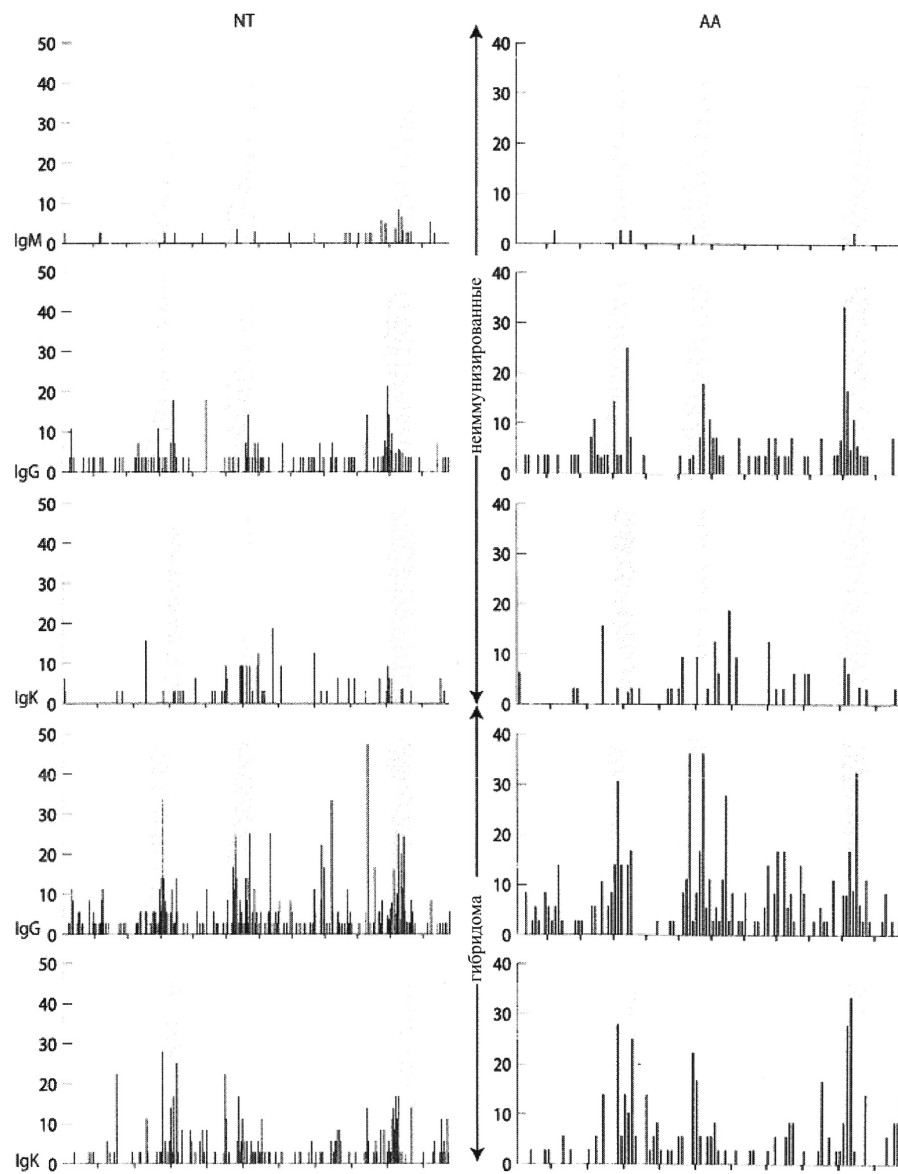
ФИГ. 7А

16/61

	3'Vk	N	5' Jk
(1-6)	CAACAGAGTTAtAGTACCCCTCC	GGA	GACG(1)
(1-9)	CAACAGCTTAATAGTTACCTC		GGACG(1)
(1-9)	CAACAGCTTAATAGTTACC		ATTCAC(3)
(1-9)	CAACAttTTAATAGTTACCC		GCTCACT(4)
(3-15)	CAGCAGTATAATAACTGGCCTC		TCACT(4)
(1-17)	CTACAGCATAATAGTTACCC		GTGGACG(1)
(1-17)	CTACAGCATAATAGTTACCTC		GGACG(1)
(3-20)	CAGCAGTATGGTAGCTCACCTC		GGACG(1)
(2-30)	ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGACG(1)
(2-30)	ATGCAAGGTtCACACTGGCC		GTACACT(2)
(2-30)	ATGCAAGGTACACACTGGCC		GCTCACT(4)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCCTCC		CACT(3)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCC		ATTCAC(3)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCC	CG	TCACT(4)
(1-33)	CAACAGTATGATAATCTCCC		GATCAC(5)
(1-37)	CAACGGAtTTACAATGCC	GA	CACC(5)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACCCC	CA	TGTACACT(2)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACCCCTC		TCACT(4)
(1-39)	CAACAGAGTTACAGTACtCCTCC		CACT(4)

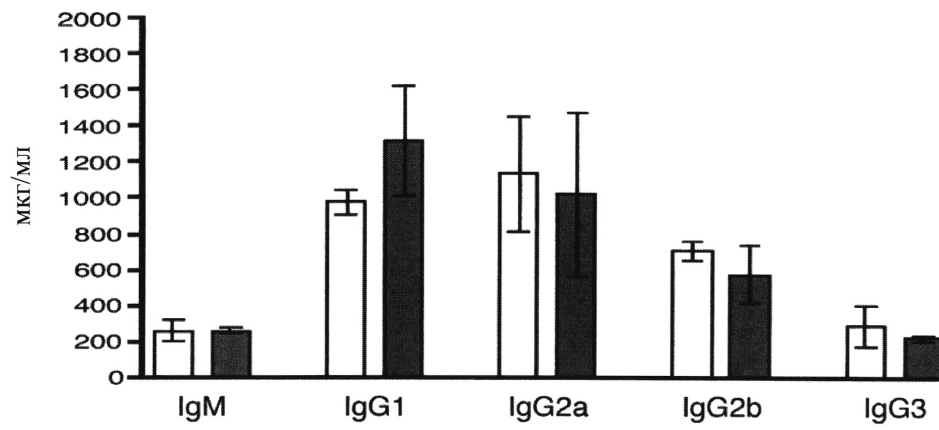
ФИГ. 7В

17/61



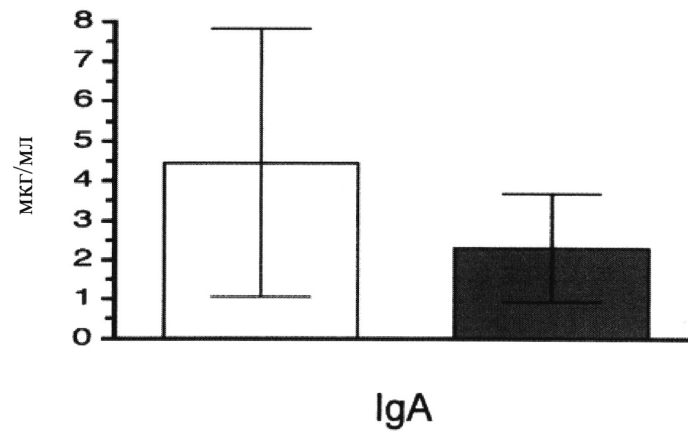
ФИГ. 8

18/61



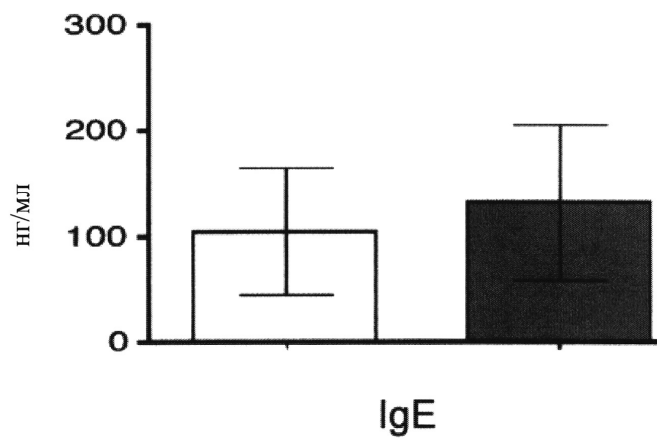
ФИГ. 9А

19/61



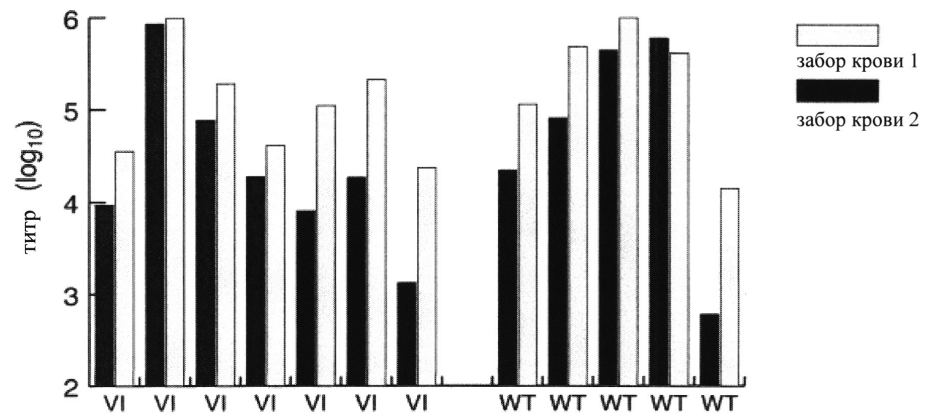
ФИГ. 9В

20/61



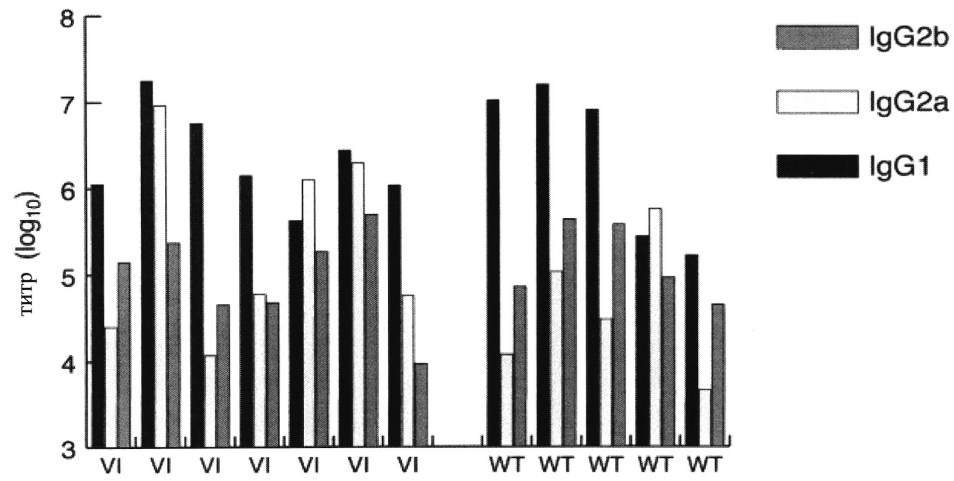
ФИГ. 9С

21/61

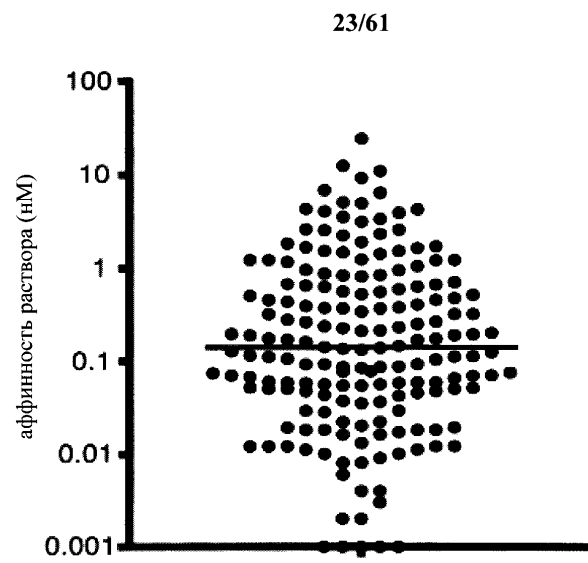


ФИГ. 10А

22/61

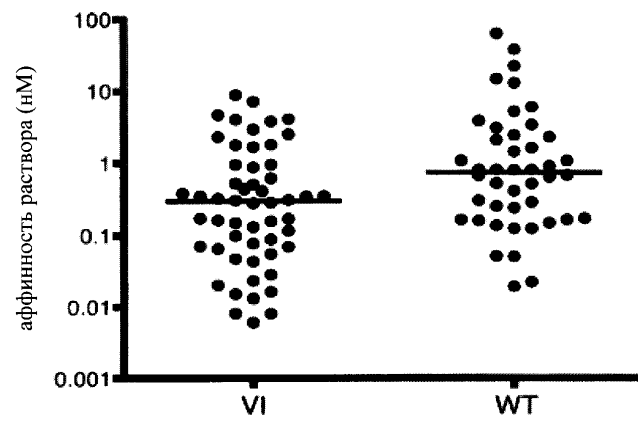


ФИГ. 10В



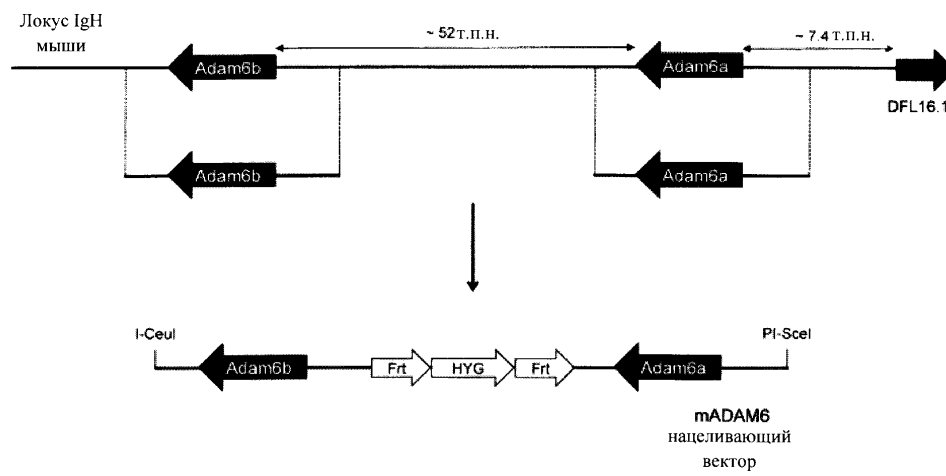
ФИГ. 11А

24/61



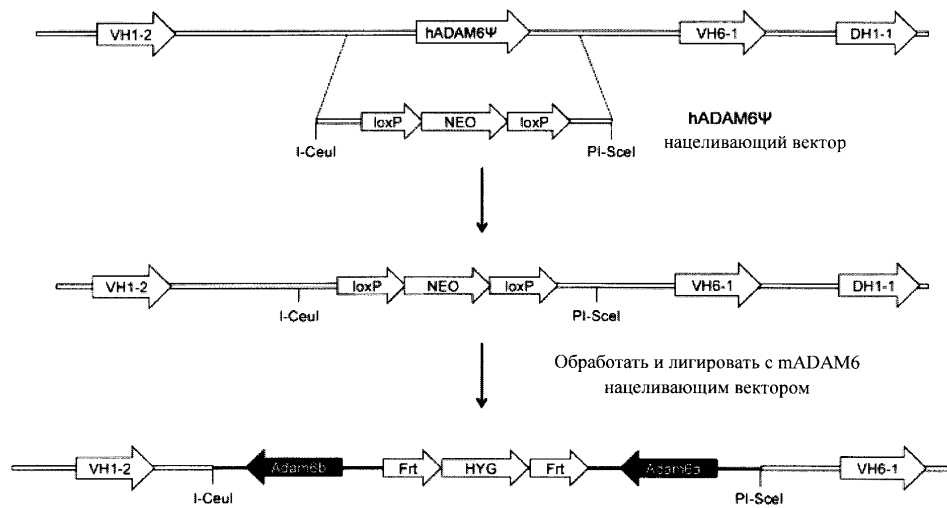
ФИГ. 11В

25/61



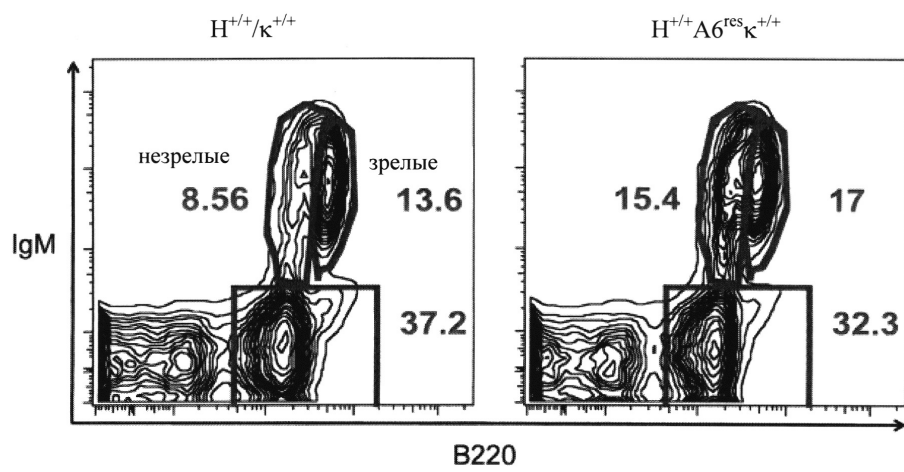
ФИГ. 12

26/61



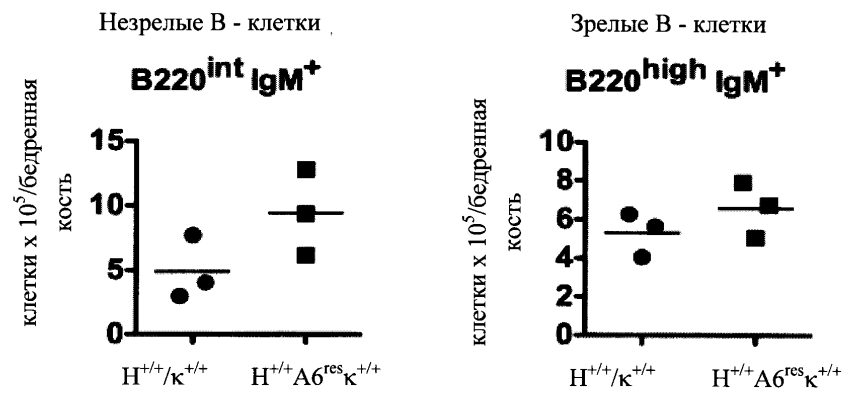
ФИГ. 13

27/61



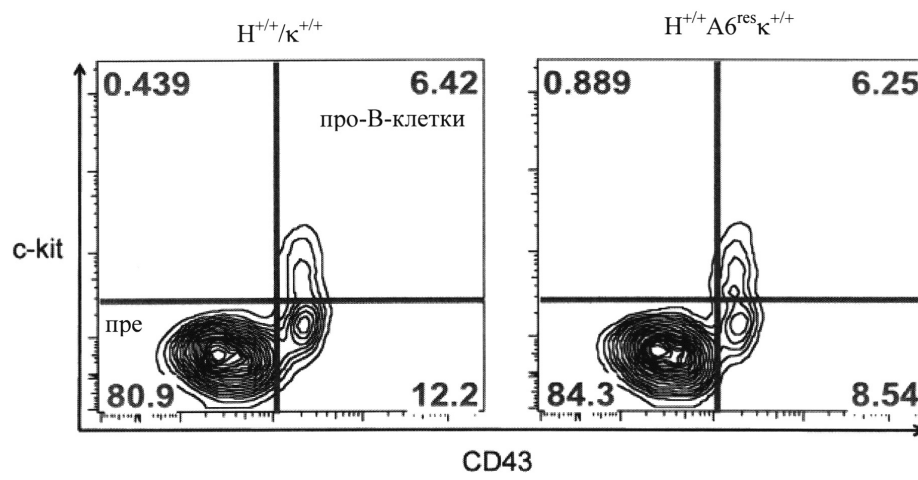
ФИГ. 14А

28/61



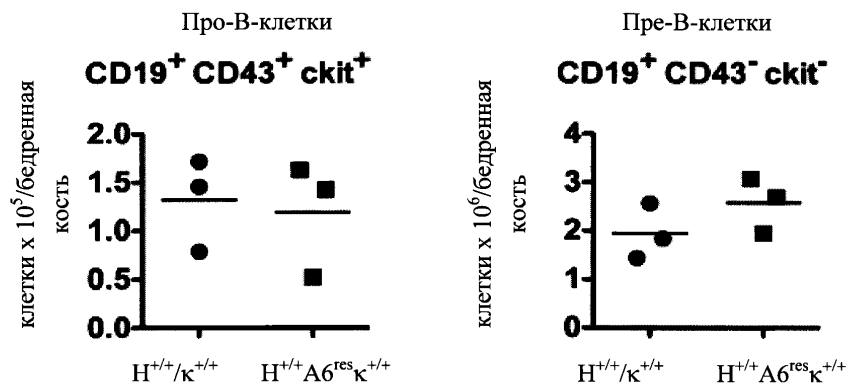
ФИГ. 14В

29/61



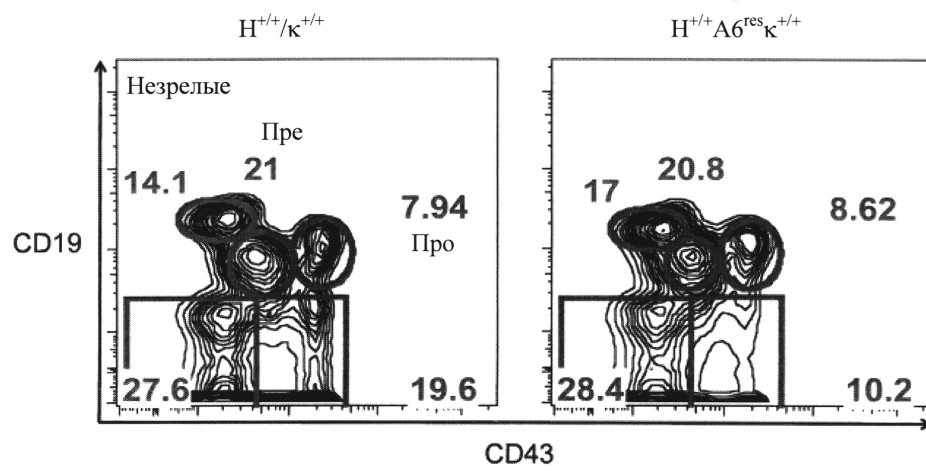
ФИГ. 15А

30/61



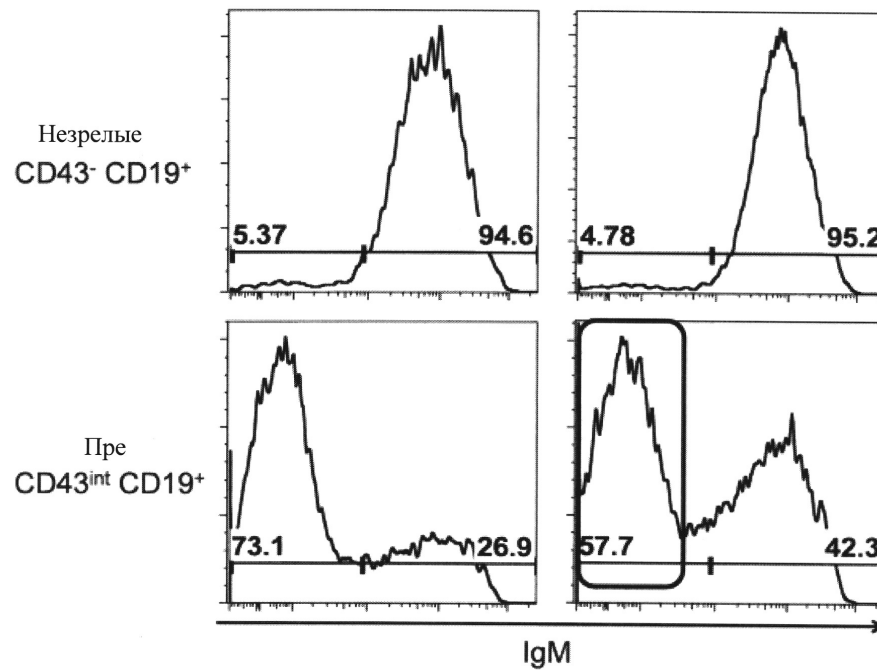
ФИГ. 15В

31/61



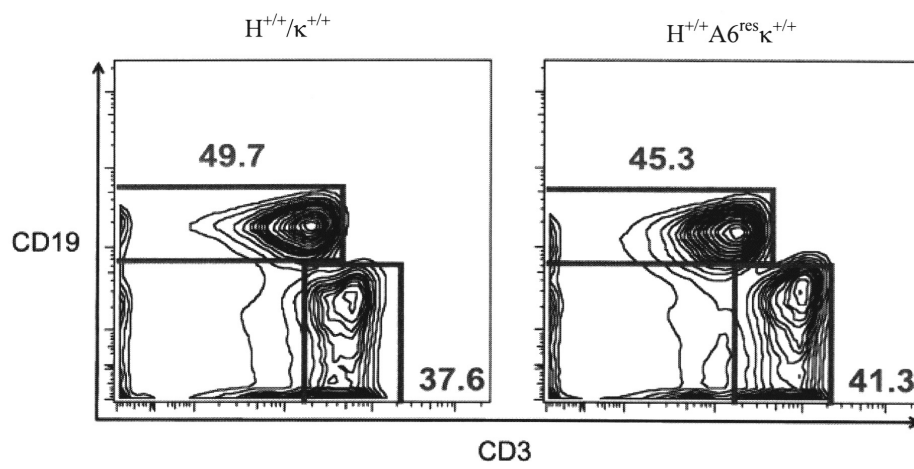
ФИГ. 16А

32/61



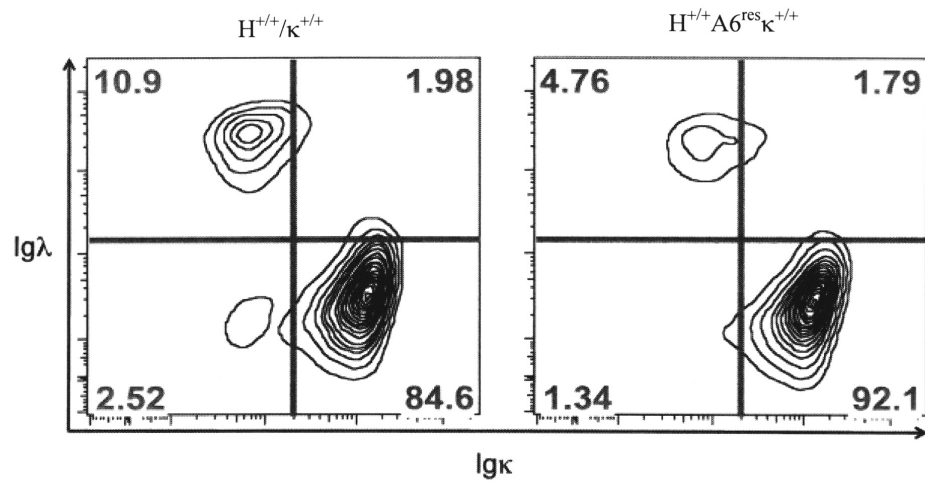
ФИГ. 16В

33/61



ФИГ. 17А

34/61

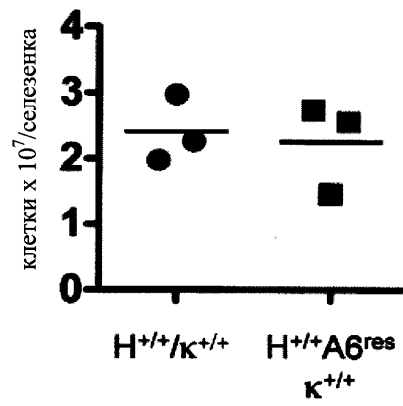


ФИГ. 17В

35/61

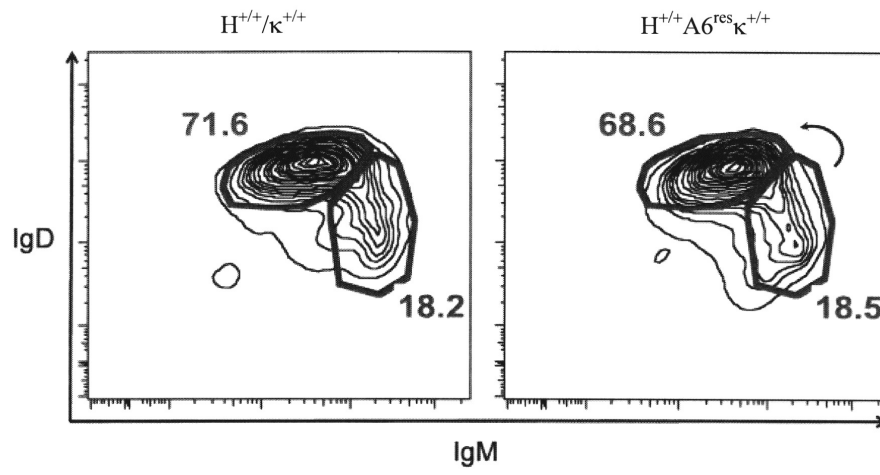
Общее количество В-клеток

CD19⁺



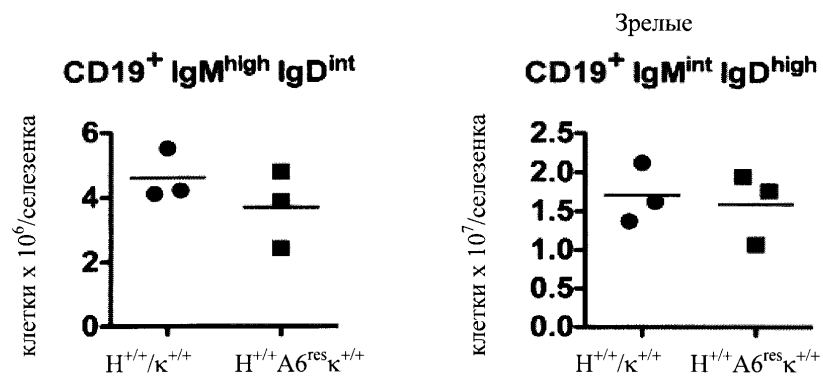
ФИГ. 17С

36/61



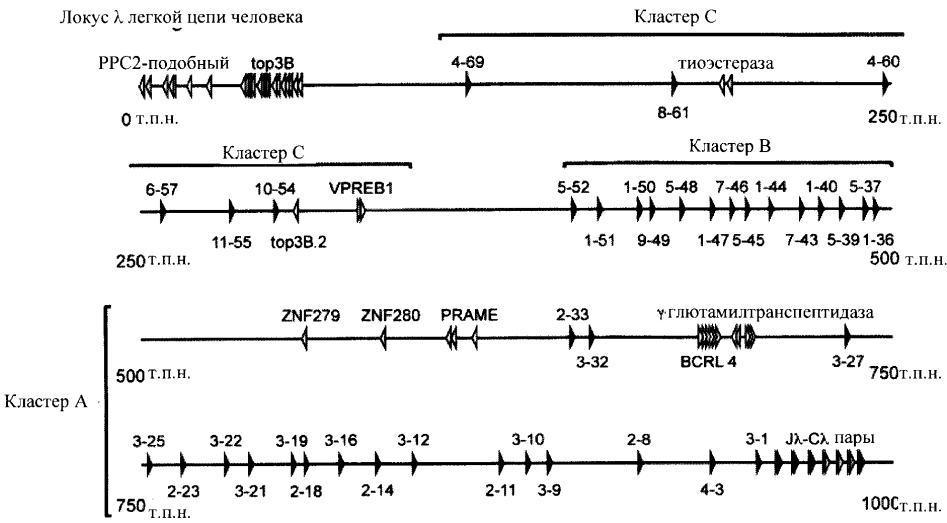
ФИГ. 18А

37/61



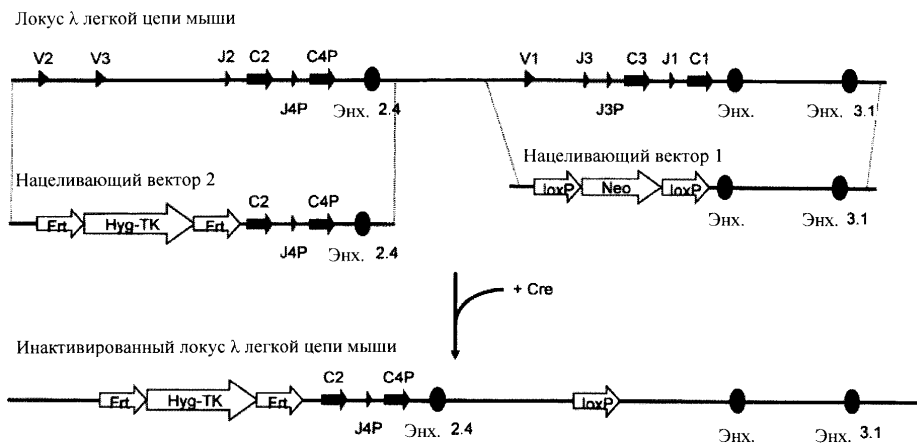
ФИГ. 18В

38/61



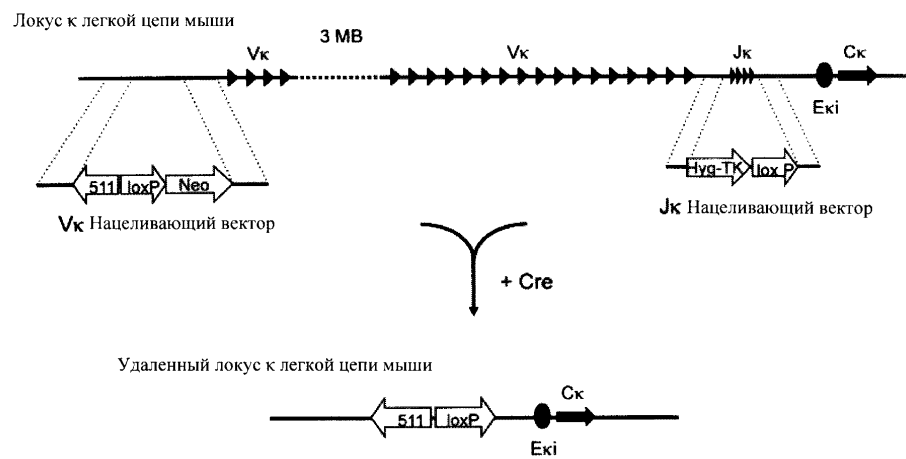
ФИГ. 19

39/61



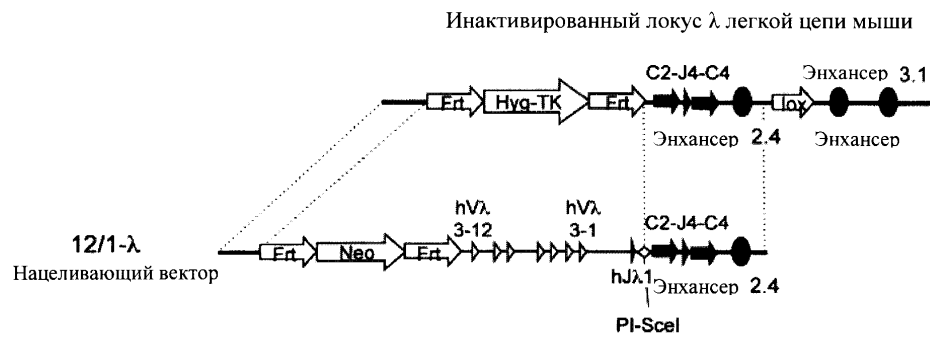
ФИГ. 20

40/61



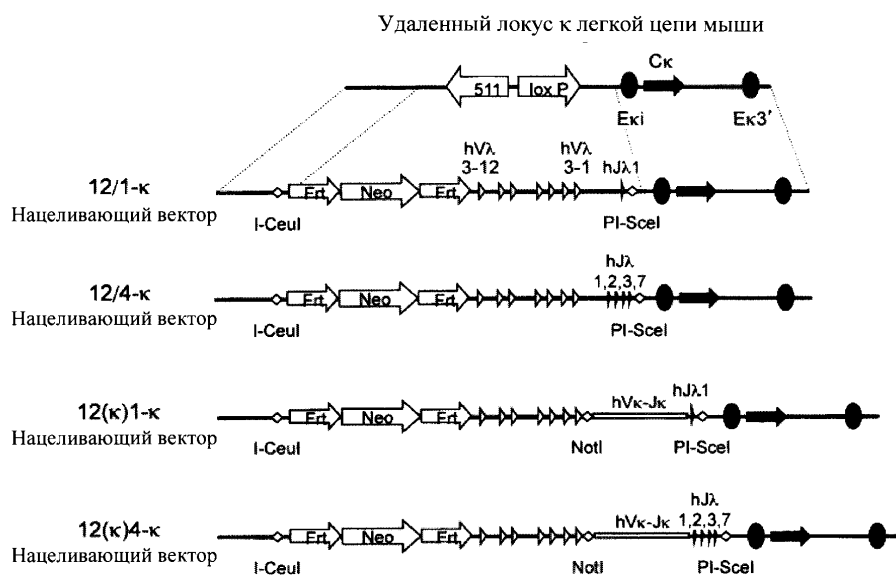
ФИГ. 21

41/61



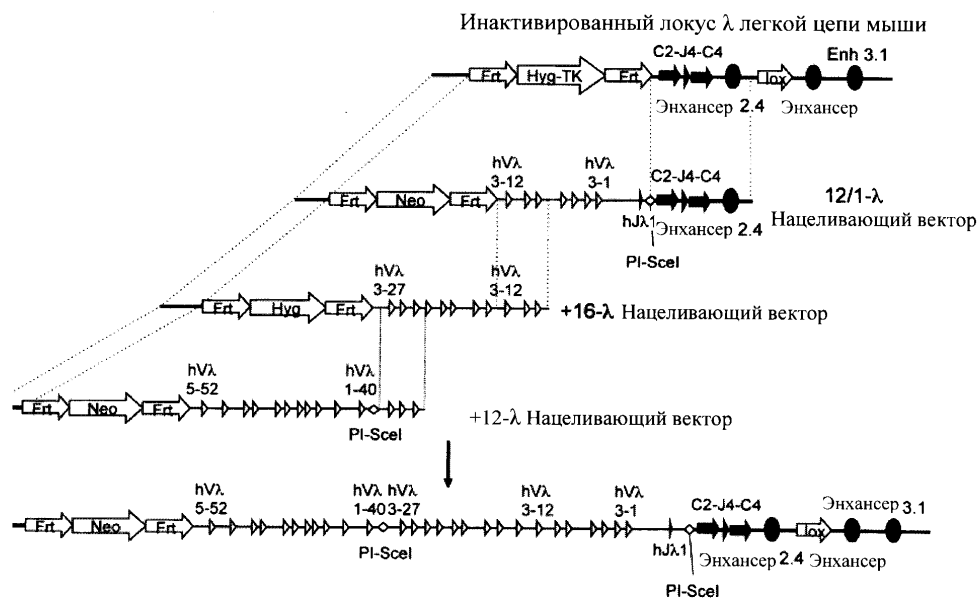
ФИГ. 22А

42/61



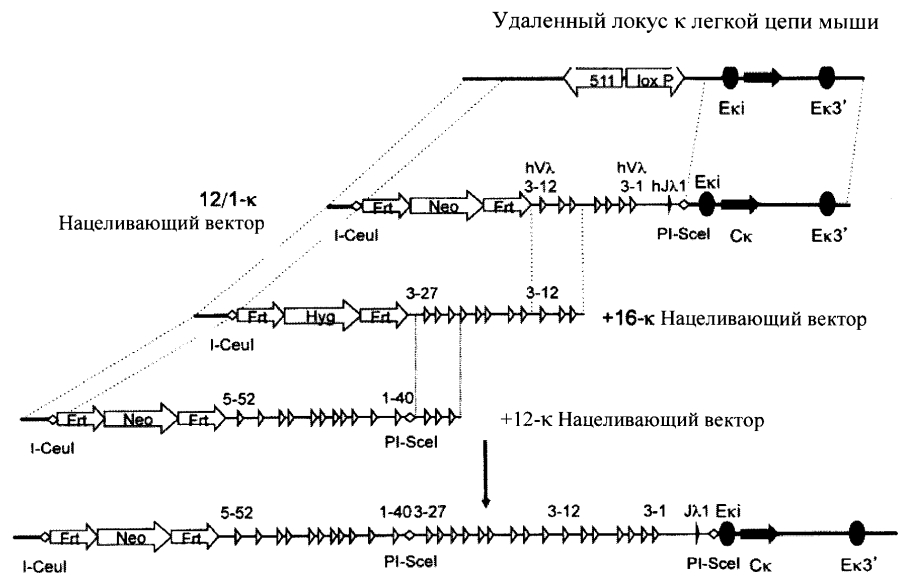
ФИГ. 22В

43/61



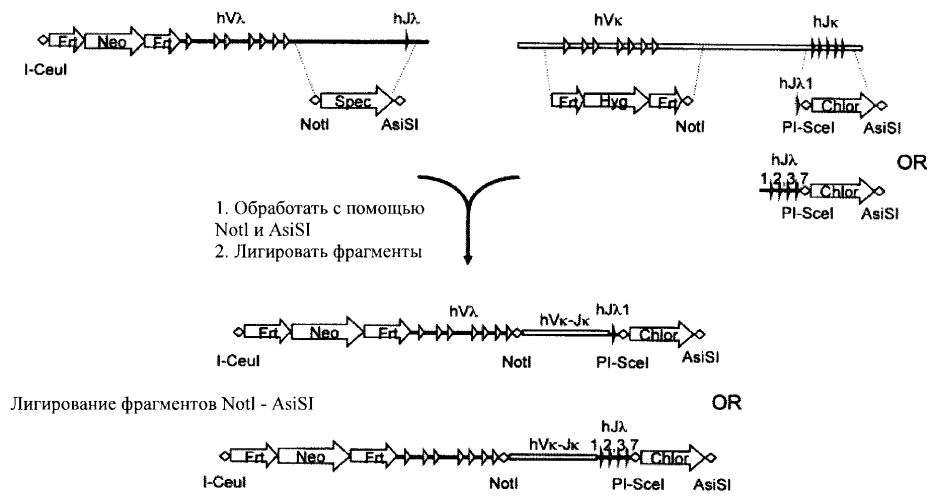
ФИГ. 23А

44/61



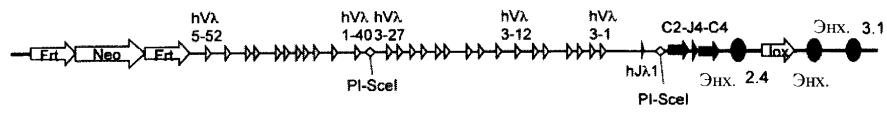
ФИГ. 23В

45/61



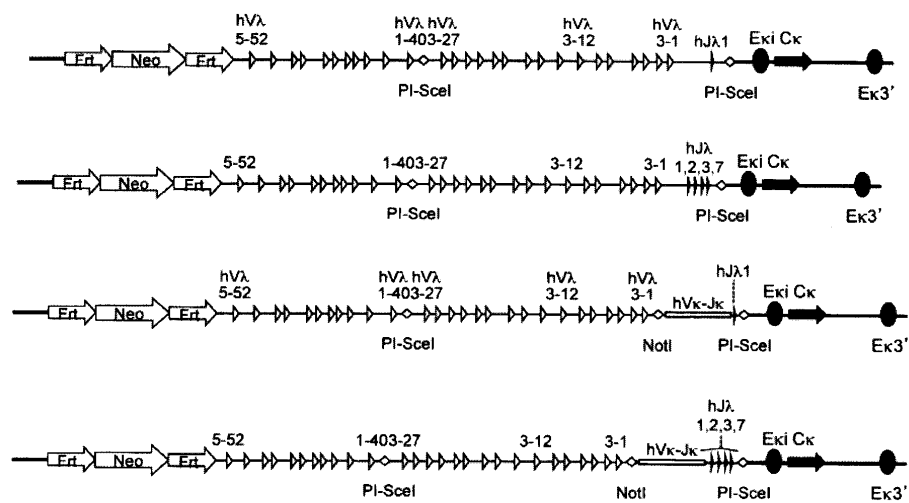
ФИГ. 24

46/61



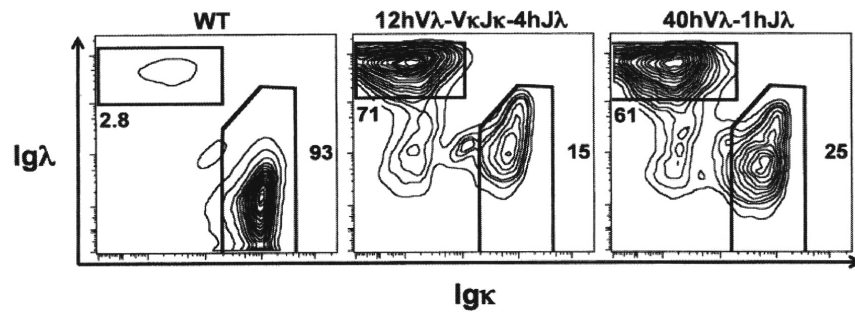
ФИГ. 25А

47/61



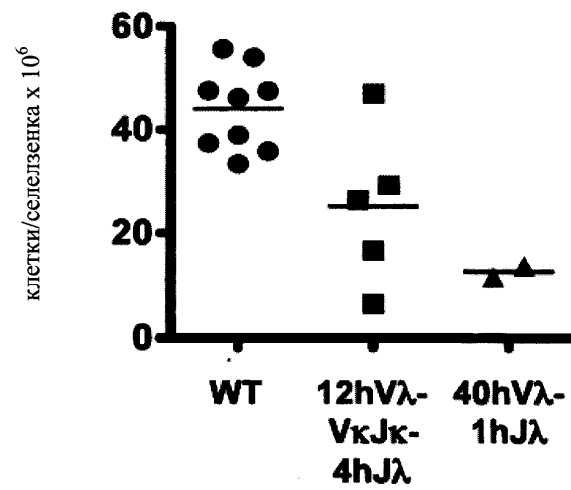
ФИГ. 25В

48/61



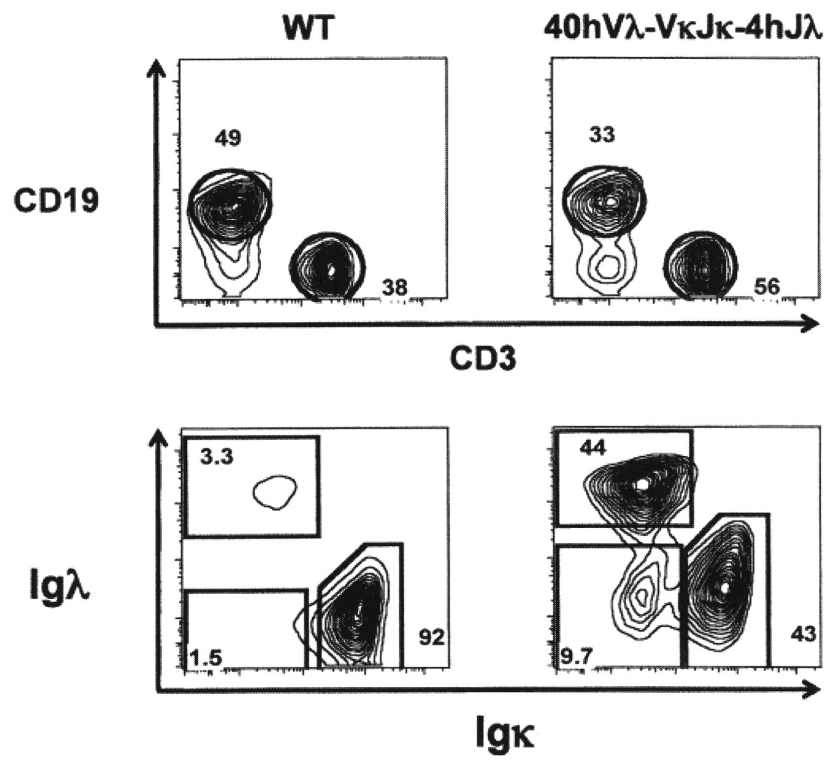
ФИГ. 26А

49/61



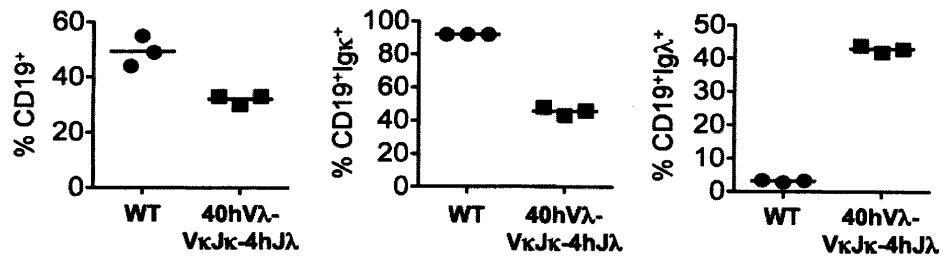
ФИГ. 26В

50/61



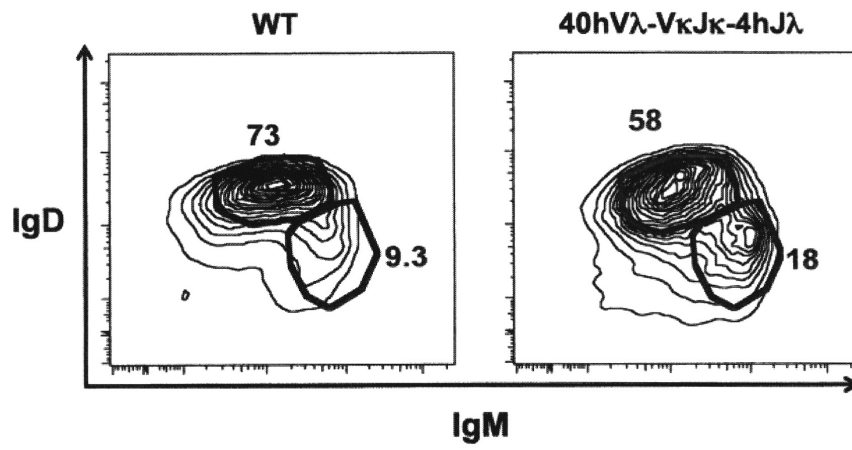
ФИГ. 27А

51/61



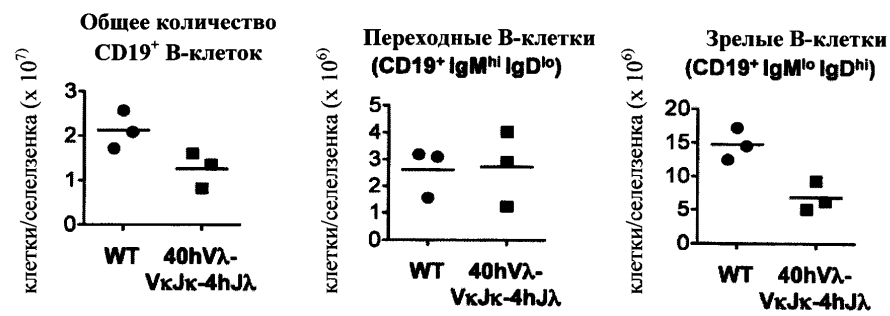
ФИГ. 27В

52/61



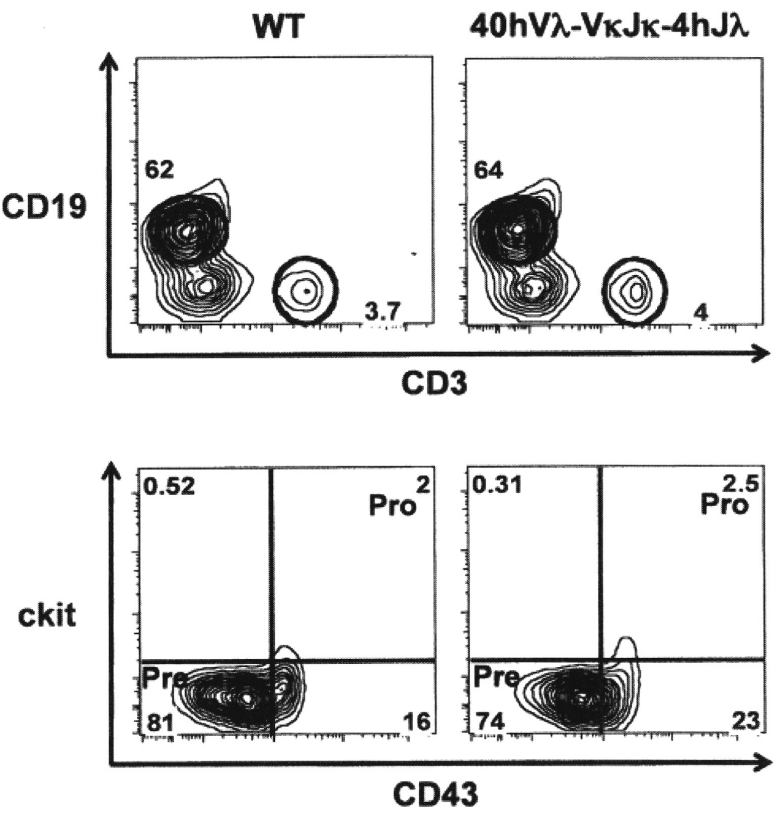
ФИГ. 27С

53/61



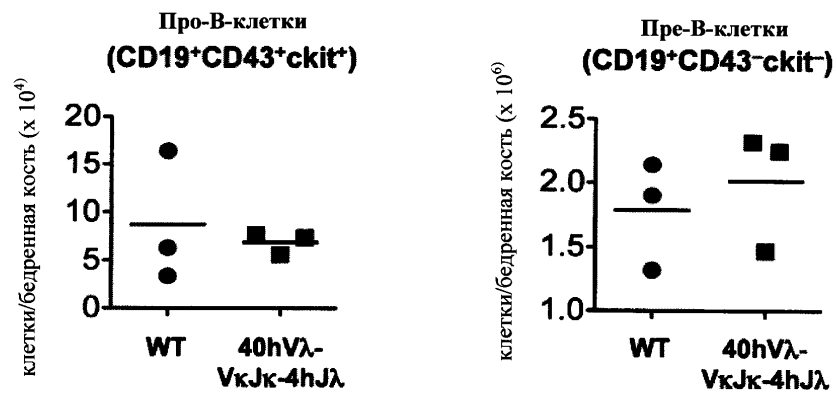
ФИГ. 27D

54/61



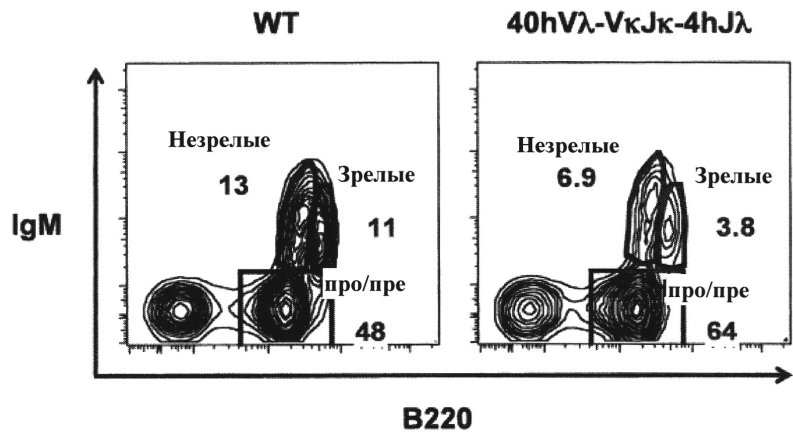
ФИГ. 28А

55/61



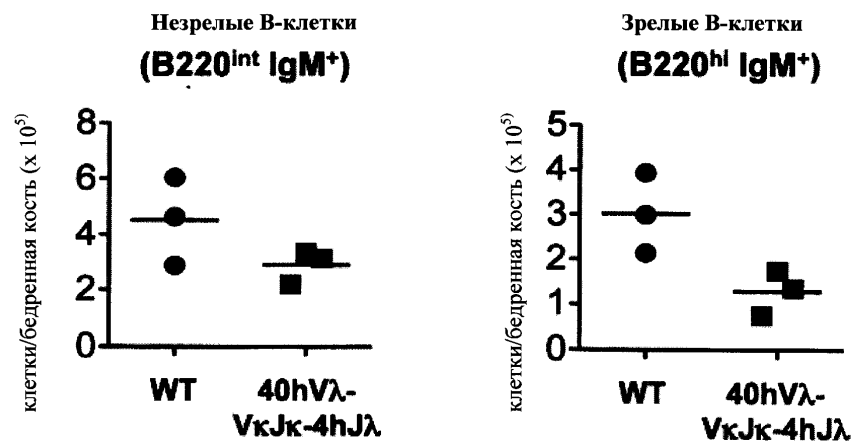
ФИГ. 28В

56/61



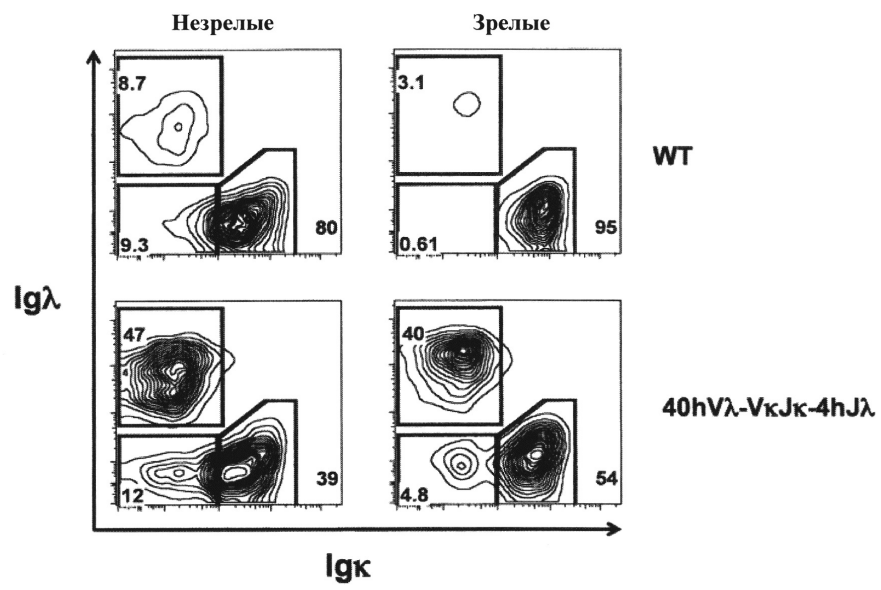
ФИГ. 28С

57/61



ФИГ. 28D

58/61



ФИГ. 28Е

59/61

	3' Vλ человека	ЖЛ1 человека	5' Ск мыши
A6	GCAACAAATT	tcgTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
B6	GCAACAAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F6	GCAACAAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
B7	GCAACAAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E7	GCAACAAATT	GTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
F7	GCAACAAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
C8	GCAACAAATT	ATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
E12	CAAGTCGGTT	gtGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-4	TGAGTGTCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1-20	TGAGTGTGg	gcttttTtGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
3B43	CTGAATGGT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-8	AGTGGTAAT	cATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
5-19	AGTGGTGTCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
1010	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTC
11A1	AGCAGCGCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTA
7A8	GGTGGTGTCT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
3A3	AGTAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-7	AGCAGCACT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTg	GGGCTGATGCTGCACCA
FWR4		F G T G T K V T V L G A D A A P T V S I F	

ФИГ. 29

60/61

	3' Vλ человека	λλ человека	5' Ск мыши
5-2	CAGCCTGAGTGGTTC	TGTGTTCCGGAGGAGGCACCCGGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-5	CAGCCTGAGTGGTTC	ATGTCCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
1-3	CAGCCTGAATGGT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4B-1	CAGCCTGAGTGGTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
3B-5	CAGCAGCACTGC	TGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
7A-1	CAGCAGTGGTAAT	GCTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-1	CAGCAGTGGTAATCATAG	GGTGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
4A-1	CAGCCTGAGTGGTT	ATGTCCTTCGGAACCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
11A-1	CAGCAGCGCT	GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-7	CTACTATAGTGGTGCTC	GGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
5-4	CTCCTATAGTGGTGCTCGa	GTATTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
2-3	GAGCAACTTCGTGT	CTGTGTTCCGGAGGAGGCACCCAGCTGACCGCCCTCG	GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATC
FWA4		F G G G T K L T V L G A D A A P T V S I	

ФИГ. 30

61/61

	3' Vλ человека	Жλ1 человека	5' Cλ2 мыши
2D1	GCAGGCAGCAACAATTta	agTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	gtCAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTC
2D9	GACAGCAGTGGTAATCAT	TATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	gtCAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTC
3E15	GACAGCAGCACTGCGc	gtCCTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTAG	gtCAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTC
FNRA		F G T G T K V T V L G Q P K S T P T L	

ФИГ. 31