

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】令和4年4月8日(2022.4.8)

【国際公開番号】WO2019/241692
 【公表番号】特表2021-528057(P2021-528057A)
 【公表日】令和3年10月21日(2021.10.21)
 【出願番号】特願2020-569099(P2020-569099)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/13(2006.01) 10
 C 1 2 N 15/62(2006.01)
 C 1 2 N 15/57(2006.01)
 C 1 2 N 15/63(2006.01)
 C 1 2 N 5/10(2006.01)
 C 1 2 N 5/0735(2010.01)
 A 0 1 K 67/027(2006.01)
 C 1 2 P 21/08(2006.01)
 C 1 2 N 5/0781(2010.01)
 C 1 2 N 5/20(2006.01)
 C 0 7 K 19/00(2006.01) 20
 C 0 7 K 16/00(2006.01)
 C 1 2 N 9/10(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/13 Z N A
 C 1 2 N 15/62 Z
 C 1 2 N 15/57
 C 1 2 N 15/63 Z
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 5/0735
 A 0 1 K 67/027 30
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 N 5/0781
 C 1 2 N 5/20
 C 0 7 K 19/00
 C 0 7 K 16/00
 C 1 2 N 9/10

【手続補正書】

【提出日】令和4年3月30日(2022.3.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

操作された免疫グロブリン重鎖多様性(D_H)領域(「操作されたD_H領域」)を含む、ヌクレオチド分子であって、前記操作されたD_H領域は、
 (i) 23merのRSSにすぐ隣接するD_H遺伝子セグメントを含む操作されたD_H遺伝子セグメント(「操作されたD_H遺伝子セグメント」)、および

(i i) その 5 ' 端で第 1 の 1 2 m e r の R S S が、その 3 ' 端で第 2 の 1 2 m e r の R S S が隣接した、再構成されていない D_H 遺伝子セグメント (「再構成されていない D_H 遺伝子セグメント」)

を含み、

(i) 前記操作された D_H 遺伝子セグメントおよび (i i) 前記再構成されていない D_H 遺伝子セグメントは、(i) 前記操作された D_H 遺伝子セグメントおよび (i i) 前記再構成されていない D_H 遺伝子セグメントが、1 2 / 2 3 規則に従って D_H - D_H 組み換え事象において結合できるように、作動可能に結合され、

前記ヌクレオチド分子が、前記操作された D_H 領域を有するげっ歯類を得るために適してあり、

場合により、前記操作された D_H 領域が、ヒト D_H 遺伝子セグメントのみを含む、ヌクレオチド分子。

10

20

30

40

50

【請求項 2】

前記ヌクレオチド分子が、

(a) 前記操作された D_H 領域の上流であり、前記操作された D_H 領域に作動可能に結合された少なくとも一つの再構成されていない免疫グロブリン重鎖可変 (V_H) 遺伝子セグメント (「再構成されていない V_H 遺伝子セグメント」) ；

(b) 前記操作された D_H 領域の下流であり、前記操作された D_H 領域に作動可能に結合された少なくとも一つの再構成されていない免疫グロブリン重鎖結合 (J_H) 遺伝子セグメント (「再構成されていない J_H 遺伝子セグメント」) ；または

(c) (a) と (b) との組み合わせ

をさらに含む、請求項 1 に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 3】

前記少なくとも一つの再構成されていない V_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト V_H 6 - 1 遺伝子セグメントを含み、前記少なくとも一つの再構成されていない J_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト J_H 6 遺伝子セグメント、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 2 に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 4】

前記少なくとも一つの再構成されていない J_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト J_H 4 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 5 遺伝子セグメント、および再構成されていないヒト J_H 6 遺伝子セグメントを含む、請求項 2 または請求項 3 に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 5】

前記少なくとも一つの再構成されていない J_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト J_H 1 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 2 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 3 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 4 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 5 遺伝子セグメント、および再構成されていないヒト J_H 6 遺伝子セグメントを含み、場合により、前記再構成されていないヒト J_H 1 遺伝子セグメント、前記再構成されていないヒト J_H 2 遺伝子セグメント、前記再構成されていないヒト J_H 3 遺伝子セグメント、前記再構成されていないヒト J_H 4 遺伝子セグメント、前記再構成されていないヒト J_H 5 遺伝子セグメント、および前記再構成されていないヒト J_H 6 遺伝子セグメントが、生殖系列配置にある、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 6】

前記少なくとも一つの再構成されていない V_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト V_H 3 - 7 4 遺伝子セグメントと再構成されていないヒト V_H 1 - 6 遺伝子セグメントの間に渡り、それらを含む、機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントの完全なレパートリー (「機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントの完全なレパートリー」) を含み、場合により、前記機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントの完全なレパートリーは、生殖系列配置にある、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項

に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 7】

前記ヌクレオチド分子が、一つ以上の機能的げっ歯類 $A d a m 6$ 遺伝子をさらに含み、場合により、前記一つ以上の機能的げっ歯類 $A d a m 6$ 遺伝子が、ヒト $V H 1 - 2$ 遺伝子セグメントとヒト $V H 6 - 1$ 遺伝子セグメントの間に位置し、および/またはヒト $A d a m 6$ 遺伝子を置換する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 8】

前記操作された D_H 遺伝子セグメントが、前記 D_H 遺伝子セグメントの 5' 末端にすぐ隣接する前記 $23mer$ の $R S S$ を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

10

【請求項 9】

前記操作された D_H 遺伝子セグメントが、前記 D_H 遺伝子セグメントの 3' 末端にすぐ隣接する前記 $23mer$ の $R S S$ を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 10】

前記操作された D_H 遺伝子セグメントが、

(a) 前記 $23mer$ の $R S S$ にすぐ隣接するヒト $D_H 3 - 3$ 遺伝子セグメントであって、場合により、前記 $23mer$ の $R S S$ が、前記 $D_H 3 - 3$ 遺伝子セグメントの 5' 末端にすぐ隣接するもの、

(b) 前記 $23mer$ の $R S S$ にすぐ隣接するヒト $D_H 2 - 2$ 遺伝子セグメントであって、場合により、前記 $23mer$ の $R S S$ が、前記 $D_H 2 - 2$ 遺伝子セグメントの 3' 末端にすぐ隣接するもの、

20

(c) 前記 $23mer$ の $R S S$ にすぐ隣接するヒト $D_H 2 - 8$ 遺伝子セグメントであって、場合により、前記 $23mer$ の $R S S$ が、前記 $D_H 2 - 8$ 遺伝子セグメントの 3' 末端にすぐ隣接するもの、

(d) 前記 $23mer$ の $R S S$ にすぐ隣接するヒト $D_H 2 - 15$ 遺伝子セグメントであって、場合により、前記 $23mer$ の $R S S$ が、前記 $D_H 2 - 15$ 遺伝子セグメントの 3' 末端にすぐ隣接するもの、または

(e) (a) ~ (d) の任意の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

30

【請求項 11】

配列番号 52 として記載されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 12】

配列番号 61 として記載されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 13】

配列番号 70 として記載されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 14】

配列番号 71 として記載されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

40

【請求項 15】

配列番号 72 として記載されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 16】

作動可能な結合で 5' から 3' に；

(a) 少なくとも一つの再構成されていないヒト $V H$ 遺伝子セグメント；

(b) 前記操作された D_H 領域であって、前記操作された D_H 遺伝子セグメントが、前記 $23mer$ の $R S S$ にすぐ隣接するヒト $D_H 3 - 3$ 遺伝子セグメントを含み、前記 $23mer$

50

erのRSSは、前記ヒトD_H3-3遺伝子セグメントの5'末端にすぐ隣接している
操作されたD_H領域；および

(c) 少なくとも一つの再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメント、を含む、請求項
1~15のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項17】

作動可能な結合で5'から3'に；

(a) 少なくとも一つの再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメント、

(b) 前記操作されたD_H領域であって、前記操作されたD_H遺伝子セグメントが、前記
23merのRSSにすぐ隣接するヒトD_H2遺伝子セグメントを含み、前記23mer
のRSSは、前記ヒトD_H2遺伝子セグメントの3'末端にすぐ隣接しており、場合によ
り、

10

(i)前記操作されたD_H遺伝子セグメントが、23merのRSSにすぐ隣接するヒ
トD_H2-2遺伝子セグメントを含む；

(ii)前記操作されたD_H遺伝子セグメントが、23merのRSSにすぐ隣接する
ヒトD_H2-8遺伝子セグメントを含む；

(iii)前記操作されたD_H遺伝子セグメントが、23merのRSSにすぐ隣接す
るヒトD_H2-15遺伝子セグメントを含む；または

(iv)それらの任意の組み合わせである、操作されたD_H領域；および

(c) 少なくとも一つの再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメント、を含む、請求項
1~15のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

20

【請求項18】

前記少なくとも一つの再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントが、5'から3'に、
再構成されていないヒトV_H1-2遺伝子セグメントおよび再構成されていないヒトV_H
6-1遺伝子セグメントを含み、前記ヌクレオチドは、前記再構成されていないヒトV_H
1-2遺伝子セグメントと前記再構成されていないヒトV_H6-1遺伝子セグメントの間
に一つ以上の機能的げっ歯類Adam6遺伝子をさらに含み、前記再構成されていないヒ
トV_H1-2遺伝子セグメント、前記一つ以上の機能的げっ歯類Adam6遺伝子、およ
び前記再構成されていないヒトV_H6-1遺伝子セグメントが、連続している、請求項1
6または請求項17に記載のヌクレオチド分子。

【請求項19】

30

前記少なくとも一つの再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントが、前記機能的な再
構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントの完全なレパートリーを含み、場合により、
前記機能的な再構成されていないヒトV_H遺伝子セグメントの完全なレパートリーは、生
殖系列配置にある、請求項16~18のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項20】

前記少なくとも一つの再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメントが、再構成されてい
ないヒトJ_H6遺伝子セグメントを含む、請求項16~19のいずれか一項に記載のヌク
レオチド分子。

【請求項21】

前記少なくとも一つの再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメントが、再構成されてい
ないヒトJ_H4遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H5遺伝子セグメント、お
よび再構成されていないヒトJ_H6遺伝子セグメントを含む、請求項20に記載のヌク
レオチド分子。

40

【請求項22】

前記少なくとも一つの再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメントが、再構成されてい
ないヒトJ_H1遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H2遺伝子セグメント、再
構成されていないヒトJ_H3遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H4遺伝子セ
グメント、再構成されていないヒトJ_H5遺伝子セグメント、および再構成されていない
ヒトJ_H6遺伝子セグメントを含み、さらに場合により、前記再構成されていないヒトJ
H1遺伝子セグメント、前記再構成されていないJ_H2遺伝子セグメント、前記再構成さ

50

れていない J_H 3 遺伝子セグメント、前記再構成されていない J_H 4 遺伝子セグメント、前記再構成されていない J_H 5 遺伝子セグメント、および前記再構成されていない J_H 6 遺伝子セグメントが、生殖系列配置にある、請求項 2 1 に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 2 3】

その 3' 末端に、重鎖免疫グロブリン定常 (C_H) 領域またはその一部をさらに含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 2 4】

前記 C_H 領域またはその一部が、げっ歯類 C_H 領域またはその一部である、請求項 2 3 に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 2 5】

前記げっ歯類 C_H 領域またはその一部が、げっ歯類イントロンエンハンサー領域およびげっ歯類 I g M 遺伝子を含む、請求項 2 4 に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 2 6】

前記操作された D_H 遺伝子セグメントの上流に位置する薬物選択カセットをさらに含み、場合により、前記薬物選択カセットが、一つ以上の部位特異的組み換え部位と隣接する、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 2 7】

内在性げっ歯類免疫グロブリン重鎖遺伝子座での免疫グロブリン重鎖配列との相同な組み換えを可能にするよう配置された 5' および 3' 相同アームを含み、場合により、前記免疫グロブリン重鎖配列が、ヒトもしくはヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子を含む、ターゲティングベクター。

【請求項 2 8】

D_H - D_H 組み換えを操作するために免疫グロブリン重鎖可変領域を修飾する方法であって、

(a) 一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントを含む D_H 領域を含む免疫グロブリン重鎖可変鎖配列を得る工程であって、再構成されていない D_H 遺伝子セグメントの各々が、その 5' 端で第 1 の 1 2 m e r の R S S が、その 3' 端で第 2 の 1 2 m e r の R S S が隣接する、工程と、

(b) 少なくとも一つの操作された D_H 遺伝子セグメントをさらに含むように前記 D_H 領域を操作する工程であって、前記操作された D_H 遺伝子セグメントが、2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された D_H 遺伝子セグメントを含む、工程を含み、

得られた操作された D_H 領域において、前記操作された D_H 遺伝子セグメントと、前記一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントのうちの少なくとも一つとが、1 2 / 2 3 規則に従って D_H - D_H 組み換え事象において、作動可能に結合され、結合できる、方法。

【請求項 2 9】

前記一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントが、少なくとも一つの再構成されていないヒト D_H 遺伝子セグメントを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記少なくとも一つの再構成されていないヒト D_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト D_H 1 - 1 遺伝子セグメントと再構成されていないヒト D_H 7 - 2 7 遺伝子セグメントの間に渡り、それらを含む、全ての前記機能的ヒト D_H 遺伝子セグメントを含み、場合により、全ての前記機能的ヒト D_H 遺伝子セグメントは、生殖系列配置にある、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 8 (a) の前記 D_H 領域が、二つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントを含み、その各々が、その 5' 端で第 1 の 1 2 m e r の R S S と、その 3' 端で第 2 の 1 2 m e r の R S S と隣接しており、

操作工程が、

(a) 前記二つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントの少なくとも一つを、請

10

20

30

40

50

求項 2 8 (b) で規定された前記操作された D H 遺伝子セグメントで置換する工程、
 (b) 前記二つ以上の再構成されていない D H 遺伝子セグメントの少なくとも一つの前記
 第 1 の 1 2 m e r の R S S および前記第 2 の 1 2 m e r の R S S を、 2 3 m e r の R S S
 で置換する工程、または
 (c) (a) と (b) の組み合わせ、を含む、請求項 2 8 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の
 方法。

【請求項 3 2】

前記免疫グロブリン重鎖可変鎖配列が、少なくとも一つの再構成されていない J H 遺伝子
 セグメントを含む J H 領域をさらに含み、
 前記 J H 領域が、前記 D H 領域に作動可能に結合され、
 前記二つ以上の再構成されていない D H 遺伝子セグメントの少なくとも一つを、請求項 2
 8 (b) で規定された前記操作された D H 遺伝子セグメントで置換する工程が、前記少な
 くとも一つの再構成されていない J H 遺伝子セグメントの欠失を含む、請求項 3 1 に記載
 の方法。

10

【請求項 3 3】

前記 J H 領域が、再構成されていないヒト J H 1 遺伝子セグメント、再構成されていない
 ヒト J H 2 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J H 3 遺伝子セグメント、再構成
 されていないヒト J H 4 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J H 5 遺伝子セグメ
 ント、および再構成されていないヒト J H 6 遺伝子セグメントを含むヒト生殖系列 J H 遺
 伝子セグメントの完全なレパートリーを含み、場合により、前記再構成されていないヒト
 J H 1 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J H 2 遺伝子セグメント、再構成され
 ていないヒト J H 3 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J H 4 遺伝子セグメント
 、再構成されていないヒト J H 5 遺伝子セグメント、および再構成されていないヒト J H
 6 遺伝子セグメントが、生殖系列配置にあり、
 少なくとも一つの生殖系列 J H 遺伝子セグメントの欠失が、前記再構成されていないヒ
 ト J H 1 遺伝子セグメント、前記再構成されていないヒト J H 2 遺伝子セグメント、およ
 び前記再構成されていないヒト J H 3 遺伝子セグメントの欠失、場合により、さらに、前
 記再構成されていないヒト J H 4 遺伝子セグメントおよび前記再構成されていないヒト J
 H 5 遺伝子セグメントの欠失を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

20

【請求項 3 4】

請求項 2 8 (b) に規定される前記操作された D H 遺伝子セグメントが、
 (a) 前記 2 3 m e r の R S S にすぐ隣接するヒト D H 3 - 3 遺伝子セグメントであって
 、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D H 3 - 3 遺伝子セグメントの 5 ' 末端
 にすぐ隣接するもの、
 (b) 前記 2 3 m e r の R S S にすぐ隣接するヒト D H 2 - 2 遺伝子セグメントであって
 、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D H 2 - 2 遺伝子セグメントの 3 ' 末端
 にすぐ隣接するもの、
 (c) 前記 2 3 m e r の R S S にすぐ隣接するヒト D H 2 - 8 遺伝子セグメントであって
 、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D H 2 - 8 遺伝子セグメントの 3 ' 末端
 にすぐ隣接するもの、
 (d) 前記 2 3 m e r の R S S にすぐ隣接するヒト D H 2 - 1 5 遺伝子セグメントであっ
 て、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D H 2 - 1 5 遺伝子セグメントの 3 '
 末端にすぐ隣接するもの、または
 (e) (a) ~ (d) の任意の組み合わせを含む、請求項 2 8 ~ 3 3 のいずれか一項に記載
 の方法。

30

40

【請求項 3 5】

操作する工程が、請求項 2 8 (a) に規定される前記 D H 領域の最も 3 ' の再構成されて
 いない D H 遺伝子セグメントを請求項 2 8 (b) に規定される前記操作された D H 遺伝子
 セグメントで置換する工程を含む、請求項 3 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

50

操作する工程が、請求項 2 8 (b) に規定される前記操作された D H 遺伝子セグメントに対応する前記一つ以上の再構成されていない D H 遺伝子セグメントのうち少なくとも一つを、請求項 2 8 (b) に規定される前記操作された D H 遺伝子セグメントで置換する工程を含む、請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子、請求項 2 7 に記載のターゲティングベクター、または請求項 2 8 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法に従って修飾された免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、免疫グロブリン重鎖遺伝子座。

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子、請求項 2 7 に記載のターゲティングベクター、請求項 2 8 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法に従って修飾された免疫グロブリン重鎖可変領域、または請求項 3 7 に記載の免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、場合により、げっ歯類生殖系列ゲノムである、げっ歯類ゲノム。

10

【請求項 3 9】

前記げっ歯類ゲノムが、

— (i) 再構成されていない V H 遺伝子セグメント、

(i i) 前記操作された D H 領域であって、場合により、前記操作された D H 領域が、ヒト D H 遺伝子セグメントのみを含むもの、および

(i i i) 再構成されていない J H 遺伝子セグメント、

を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域を含み、

20

(i) ~ (i i i) が、組み換え時に、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする再構成された重鎖可変領域配列を含むように作動可能な結合にあり、場合により、前記再構成された重鎖可変領域配列が、V H (D H - D H) J H 組み換え事象後に形成される、請求項 3 8 に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 4 0】

前記操作された D H 遺伝子セグメントが、3' の 2 3 m e r の R S S すぐ隣接する D H セグメントを含む、請求項 3 9 に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 4 1】

前記操作された D H 遺伝子セグメントが、5' の 2 3 m e r の R S S すぐ隣接する D H 遺伝子セグメントを含む、請求項 3 9 または請求項 4 0 に記載のげっ歯類ゲノム。

30

【請求項 4 2】

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、ヒト V H 遺伝子セグメント、ヒト D H 遺伝子セグメント、およびヒト J H 遺伝子セグメントのみを含むヒト免疫グロブリン重鎖可変領域である、請求項 3 9 ~ 4 1 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 4 3】

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域が、C H 領域に作動可能に結合されている、請求項 4 2 に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 4 4】

前記 C H 領域が、場合により、内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の、内在性 C H 領域である、請求項 4 3 に記載のげっ歯類ゲノム。

40

【請求項 4 5】

前記再構成されていない V H 遺伝子セグメントが、前記機能的な再構成されていないヒト V H 遺伝子セグメントの完全なレパートリーを含み、場合により、前記機能的な再構成されていないヒト V H 遺伝子セグメントの完全なレパートリーは、生殖系列配置にある、請求項 3 9 ~ 4 4 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 4 6】

前記再構成されていない J H 遺伝子セグメントが、ヒト J H 6 遺伝子セグメントを含む、請求項 3 9 ~ 4 5 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 4 7】

げっ歯類ゲノムが、内在性 A d a m 6 遺伝子を欠く、請求項 3 9 ~ 4 6 のいずれか一項に

50

記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 48】

一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子をさらに含み、場合により、前記一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、内在性げっ歯類 A d a m 6 遺伝子を含む、請求項 39 ~ 46 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 49】

前記一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、二つのヒト V H 遺伝子セグメントの間に挿入される、請求項 48 に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 50】

前記一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、再構成されていないヒト V H 1 - 2 遺伝子セグメントと再構成されていないヒト V H 6 - 1 遺伝子セグメントの間に挿入される、請求項 49 に記載のげっ歯類ゲノム。

10

【請求項 51】

前記一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、ヒト A d a m 6 偽遺伝子の代わりに挿入される、請求項 48 に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 52】

前記一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、再構成されていないヒト V H 遺伝子セグメントと再構成されていないヒト D H 遺伝子セグメントの間に挿入される、請求項 48 に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 53】

末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ遺伝子をさらに含む、請求項 38 ~ 52 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

20

【請求項 54】

前記操作された D H 領域に対してホモ接合性であることを特徴とする、請求項 38 ~ 53 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 55】

前記操作された D H 領域に対してヘテロ接合性であることを特徴とする、請求項 38 ~ 53 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

【請求項 56】

前記げっ歯類ゲノムが、ラットゲノムまたはマウスゲノムである、請求項 38 ~ 55 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム。

30

【請求項 57】

請求項 38 ~ 56 のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノムを含む、げっ歯類細胞。

【請求項 58】

前記げっ歯類細胞が、ラット細胞またはマウス細胞である、請求項 57 に記載のげっ歯類細胞。

【請求項 59】

前記げっ歯類細胞が、げっ歯類胚性幹細胞である、請求項 57 または請求項 58 に記載のげっ歯類細胞。

【請求項 60】

請求項 59 に記載のげっ歯類胚性幹細胞から生成される、げっ歯類またはげっ歯類胚であって、その生殖系列に前記げっ歯類ゲノムを含む、げっ歯類またはげっ歯類胚。

40

【請求項 61】

再構成された重鎖 V H (D H A - D H B) J H コード配列を含む体細胞ゲノムをさらに含み、

場合により、前記再構成された重鎖 V H (D H A - D H B) J H コード配列が、I g M 定常領域遺伝子配列に作動可能に結合され、および/または D H A または D H B が、前記操作された D H 遺伝子セグメントまたはその一部からもたらされ、D H A または D H B の少なくとも 9 コの塩基対が、前記操作された D H 遺伝子セグメントの少なくとも 9 コの塩基対と同一である、請求項 60 に記載のげっ歯類またはげっ歯類胚。

50

【請求項 6 2】

前記げっ歯類における全ての再構成された重鎖 V D J コード配列の少なくとも 9 5 % が、少なくとも 1 0 アミノ酸長の C D R 3 を有し、場合により、前記げっ歯類における全ての再構成された重鎖 V D J 遺伝子配列の少なくとも 7 0 % が、少なくとも 1 1 アミノ酸長の C D R 3 を有し、場合により、前記げっ歯類における全ての再構成された重鎖 V D J 遺伝子配列の少なくとも 1 5 % が、少なくとも 1 4 アミノ酸長の C D R 3 を有する、請求項 6 0 ~ 6 1 のいずれか一項に記載のげっ歯類。

【請求項 6 3】

参照げっ歯類における D_H - D_H 組み換えの頻度と比較して、少なくとも 3 倍増加した頻度の D_H - D_H 組み換えを示すことを特徴とする、請求項 6 0 ~ 6 2 のいずれか一項に記載のげっ歯類。 10

【請求項 6 4】

ゲノムが、操作された D_H 領域を含むげっ歯類を作製する方法であって、請求項 5 9 に記載の胚性幹細胞からげっ歯類を作製することを含む、方法。

【請求項 6 5】

ゲノムが、操作された D_H 領域を含むげっ歯類を作製する方法であって、
 (a) 各々、2 3 m e r の R S S にすぐ隣接する D_H ゲノムセグメント を含む、一つ以上の操作された D_H 遺伝子セグメントを含む D N A フラグメントを含むように、げっ歯類胚性幹細胞のゲノムを修飾する工程であって、場合により、前記 D N A フラグメントが、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子、請求項 2 7 に記載のターゲティングベクター、請求項 2 8 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法に従って修飾された免疫グロブリン重鎖可変領域、または請求項 3 7 に記載の免疫グロブリン重鎖を含む、工程、
 (b) (a) の前記修飾されたげっ歯類胚性幹細胞を使用してげっ歯類を生成する工程、を含む、方法。 20

【請求項 6 6】

前記げっ歯類が、ラットまたはマウスである、請求項 6 4 または請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

抗体を作製するか、またはそれをコードする核酸を得る方法であって、げっ歯類を抗原で免疫する工程であって、前記げっ歯類が、各々、2 3 m e r の R S S にすぐ隣接する、一つ以上の操作された D_H 遺伝子セグメントを含む操作された D_H 領域を含む生殖系列ゲノムを含み、場合により、前記げっ歯類が、請求項 6 0 ~ 6 6 のいずれか一項に従って作製されるげっ歯類である、工程と 30

前記げっ歯類が、前記抗原に結合する抗体、またはそれをコードする核酸を含む前記抗原に対する免疫応答を生じさせる工程を含む、方法。

【請求項 6 8】

前記げっ歯類またはげっ歯類細胞から、前記抗体、またはそれをコードする核酸を回収することをさらに含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記げっ歯類細胞が、B 細胞またはハイブリドーマである、請求項 6 7 に記載の方法。 40

【請求項 7 0】

各々、2 3 m e r の R S S にすぐ隣接する一つ以上の操作された D_H 遺伝子セグメントが、5 ' 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された D_H 遺伝子セグメントを含む、請求項 6 7 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

各々、2 3 m e r の R S S にすぐ隣接する前記一つ以上の操作された D_H 遺伝子セグメントが、3 ' 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された D_H 遺伝子セグメントを含む、請求項 6 7 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記げっ歯類が、ラットまたはマウスである、請求項 6 7 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の 50

方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0302

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0302】

当業者であれば、アッセイまたは本明細書に記述されたその他のプロセスで得られた値に起因する一般的な標準偏差または誤差を認識するであろう。本発明の背景を説明し、その実践に関して追加的詳細を提供するために本明細書において言及される出版物、ウェブサイトおよびその他の参考資料は、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる。

10

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

23merの組み換えシグナル配列(RSS)に作動可能に結合された少なくとも一つのD_H遺伝子セグメントを含む、操作された重鎖多様性(D_H)遺伝子セグメントを含む、ヌクレオチド分子。

(項目2)

ヌクレオチド配列が、(i)23merのRSSに作動可能に結合された前記少なくとも一つのD_H遺伝子セグメントおよび(ii)一方の端で12merのRSSが、他の端で別の12merのRSSが隣接した、再構成されていないD_H遺伝子セグメントを含む操作されたD_H領域を含む、

20

前記(i)23merのRSSに作動可能に結合された少なくとも一つのD_H遺伝子セグメントおよび前記(ii)一方の端で12merのRSSが、他の端で別の12merのRSSが隣接した再構成されていないD_H遺伝子セグメントが、(i)および(ii)が、12/23規則に従ってD_H-D_H組み換え事象において結合できるように、作動可能に結合され、

場合により、前記操作されたD_H領域が、ヒトD_H遺伝子セグメントのみを含む、項目1に記載のヌクレオチド分子。

(項目3)

前記ヌクレオチド分子が、

(a)前記操作されたD_H領域の上流であり、作動可能に結合された少なくとも一つの再構成されていない免疫グロブリン重鎖可変(V_H)遺伝子セグメント、

(b)前記操作されたD_H領域の下流であり、作動可能に結合された少なくとも一つの再構成されていない免疫グロブリン重鎖結合(J_H)遺伝子セグメント、または

(c)(a)と(b)との組み合わせをさらに含む、項目2に記載のヌクレオチド分子。

30

(項目4)

前記少なくとも一つのV_H遺伝子セグメントが、再構成されていないヒトV_H6-1遺伝子セグメントを含み、前記少なくとも一つのJ_H遺伝子セグメントが、再構成されていないヒトJ_H6遺伝子セグメント、またはそれらの組み合わせを含む、項目3に記載のヌクレオチド分子。

40

(項目5)

前記少なくとも一つの再構成されていないJ_H遺伝子セグメントが、再構成されていないヒトJ_H4遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H5遺伝子セグメント、および再構成されていないヒトJ_H6遺伝子セグメントを含む、項目3または4に記載のヌクレオチド分子。

(項目6)

前記少なくとも一つの再構成されていないJ_H遺伝子セグメントが、再構成されていないヒトJ_H1遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H2遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H3遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H4遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H5遺伝子セグメント、および再構成されていないヒト

50

ト J_H 6 遺伝子セグメントを含み、場合により、前記再構成されていないヒト J_H 1、J_H 2、J_H 3、J_H 4、J_H 5、および J_H 6 遺伝子セグメントが、生殖系列配置にある、項目 3 ~ 5 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 7)

少なくとも一つの再構成されていない V_H 遺伝子セグメントが、場合により、生殖系列配置で、前記再構成されていないヒト V_H 3 - 7 4 と再構成されていないヒト V_H 1 - 6 遺伝子セグメントの間に渡り、それらを含む、機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントの完全なレパートリーを含む、項目 3 ~ 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 8)

一つ以上の機能的げっ歯類 A d a m 6 遺伝子をさらに含み、場合により、前記一つ以上の機能的げっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、ヒト V_H 1 - 2 遺伝子セグメントとヒト V_H 6 - 1 遺伝子セグメントの間に位置し、および / またはヒト A d a m 6 遺伝子を置換する、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 9)

前記 2 3 m e r の R S S が、前記少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントの 5' 末端に隣接する、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 10)

前記 2 3 m e r の R S S が、前記少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントの 3' 末端に隣接する、項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 11)

2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された、前記少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントが、

(a) 2 3 m e r の R S S 作動可能に結合されたヒト D_H 3 - 3 遺伝子セグメント、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D_H 3 - 3 遺伝子セグメントの 5' 末端に隣接する、

(b) 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 2 遺伝子セグメント、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D_H 2 - 2 遺伝子セグメントの 3' 末端に隣接する、

(c) 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 8 遺伝子セグメント、

場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D_H 2 - 8 遺伝子セグメントの 3' 末端に隣接する、または

(e) (a) ~ (d) の任意の組み合わせを含む、項目 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 12)

配列番号 5 2 として記載される配列を含むヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 13)

配列番号 6 1 として記載される配列を含むヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 14)

配列番号 7 0 として記載されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 15)

配列番号 7 1 として記載されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 16)

10

20

30

40

50

配列番号 72 として記載されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を含む、項目 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 17)

作動可能な結合で 5' から 3' に；

(a) 一つ以上の再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメント；

(b) 5' から 3' に

(i) 一つ以上の再構成されていないヒト D_H 遺伝子セグメント、前記一つ以上のヒト D_H 遺伝子セグメントの各々が、その 5' および 3' 末端で 12 mer の RSS が隣接する、および

(ii) その 5' 末端で 23 mer の RSS に作動可能に結合されたヒト D_H 3 - 3 遺伝子セグメントを含む 23 mer の RSS に作動可能に結合された少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントを含む、操作された D_H 領域；および

(c) 一つ以上の再構成されていないヒト J_H 遺伝子セグメント、を含む、ヌクレオチド分子。

(項目 18)

作動可能な結合で 5' から 3' に；

(a) 一つ以上の再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメント；

(b) 操作された D_H 領域、前記操作された D_H 領域が、5' から 3' に

(i) その 3' 末端で 23 mer の RSS に作動可能に結合された少なくとも一つのヒト D_H 2 遺伝子セグメントを含む、23 mer の RSS に作動可能に結合された少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメント、場合により、その 3' 末端で 23 mer の RSS に作動可能に結合された前記少なくとも一つのヒト D_H 2 遺伝子セグメントは、その 3' 末端で 23 mer の RSS に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 2 遺伝子セグメント、その 3' 末端で 23 mer の RSS に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 8 遺伝子セグメント、その 3' 末端で 23 mer の RSS に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 15 遺伝子セグメント、またはその任意の組み合わせを含む、および

(ii) 一つ以上のヒト D_H 遺伝子セグメント、前記一つ以上のヒト D_H 遺伝子セグメントの各々が、その 5' および 3' 末端で 12 mer の RSS が隣接している、を含む；および

(c) 一つ以上の再構成されていないヒト J_H 遺伝子セグメント、を含む、ヌクレオチド分子。

(項目 19)

前記一つ以上の再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントが、5' から 3' に、再構成されていないヒト V_H 1 - 2 遺伝子セグメントおよび再構成されていないヒト V_H 6 - 1 遺伝子セグメントを含み、前記ヌクレオチドは、前記再構成されていないヒト V_H 1 - 2 遺伝子セグメントと前記再構成されていないヒト V_H 6 - 1 遺伝子セグメントの間に一つ以上の機能的げっ歯類 Ad a m 6 遺伝子をさらに含み、前記再構成されていないヒト V_H 1 - 2 遺伝子セグメント、前記一つ以上のげっ歯類 Ad a m 6 遺伝子、および再構成されていないヒト V_H 6 - 1 遺伝子セグメントが、連続している、項目 17 または 18 に記載のヌクレオチド分子。

(項目 20)

前記一つ以上の再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントが、場合により、生殖系列配置で、再構成されていないヒト V_H 3 - 7 4 遺伝子セグメントと再構成されていないヒト V_H 1 - 6 遺伝子セグメントの間に渡り、されらを含む、機能的な再構成されていないヒト V_H 遺伝子セグメントの完全なレパートリーを含む、項目 17 ~ 19 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 21)

前記一つ以上の再構成されていないヒト J_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト J_H 6 遺伝子セグメントを含む、項目 17 ~ 20 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

10

20

30

40

50

(項目 2 2)

前記一つ以上の再構成されていないヒト J_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト J_H 4 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 5 遺伝子セグメント、および再構成されていないヒト J_H 6 遺伝子セグメントを含む、項目 2 1 に記載のヌクレオチド分子。

(項目 2 3)

前記一つ以上の再構成されていないヒト J_H 遺伝子セグメントが、再構成されていないヒト J_H 1 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 2 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 3 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 4 遺伝子セグメント、再構成されていないヒト J_H 5 遺伝子セグメント、および再構成されていないヒト J_H 6 遺伝子セグメントを含み、場合により、前記再構成されていないヒト J_H 1、J_H 2、J_H 3、J_H 4、J_H 5、および J_H 6 遺伝子セグメントが、生殖系列配置にある、項目 2 2 に記載のヌクレオチド分子。

(項目 2 4)

その 3' 末端に、重鎖免疫グロブリン定常領域 (C_H) またはその一部をさらに含む、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 2 5)

前記 C_H が、げっ歯類 C_H 領域またはその一部である、項目 2 4 に記載のヌクレオチド分子。

(項目 2 6)

前記げっ歯類 C_H 領域またはその一部が、げっ歯類イントロンエンハンサー領域およびげっ歯類 I g M 遺伝子を含む、項目 2 5 に記載のヌクレオチド分子。

(項目 2 7)

薬物選択カセットをさらに含み、

前記薬物選択カセットが、2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された前記 D_H 遺伝子セグメントの上流に位置し、

前記薬物選択カセットが、一つ以上の部位特異的組み換え部位と場合により隣接する、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子。

(項目 2 8)

免疫グロブリン重鎖配列との相同な組み換えを可能にするよう配置された 5' および 3' 相同アームを含み、場合により、前記免疫グロブリン重鎖配列が、内在性げっ歯類免疫グロブリン重鎖遺伝子座に位置し、ヒトもしくはヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域、またはその組み合わせを含む、項目 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子を含む、ターゲティングベクター。

(項目 2 9)

D_H - D_H 組み換えを操作するために免疫グロブリン重鎖可変領域を修飾する方法であって、

一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントを含む D_H 領域を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を得る工程、再構成されていない D_H 遺伝子セグメントの各々が、一方の端で 1 2 m e r の R S S が、他の端で別の 1 2 m e r の R S S が隣接する、

2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントをさらに含むように前記 D_H 領域を修飾する工程を含む、方法。

(項目 3 0)

前記一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントが、一つ以上の再構成されていないヒト D_H 遺伝子セグメントを含む、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントが、場合により、生殖系列配置で、前記生殖系列ヒト D_H 1 - 1 と前記生殖系列ヒト D_H 7 - 2 7 遺伝子セグメントの間に渡り、それらを含む、全ての機能的生殖系列ヒト D_H 遺伝子セグメントを含む、項目 3 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 3 2)修飾工程が、(a) 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された D_H 遺伝子セグメントを有する前記一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントの少なくとも一つ、(b) 2 3 m e r の R S S を有する再構成されていない D_H 遺伝子セグメントに隣接する前記二つの 1 2 m e r の R S S の少なくとも一つ、または(c) (a) と (b) の組み合わせ、を置換する工程を含む、項目 2 9 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。(項目 3 3)前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、少なくとも一つの再構成されていない J_H 遺伝子セグメントを含む J_H 領域をさらに含み、前記 J_H 領域が、前記 D_H 領域に作動可能に結合され、前記一つ以上の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントの少なくとも一つを、前記 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合され前記 D_H 遺伝子セグメントで置換する工程が、前記 J_H 領域内に含まれる少なくとも一つの再構成されていない J_H 遺伝子セグメントで欠失する工程を含む、項目 3 2 に記載の方法。(項目 3 4)前記 J_H 領域が、ヒト生殖系列 J_H 1 遺伝子セグメント、ヒト生殖系列 J_H 2 遺伝子セグメント、ヒト生殖系列 J_H 3 遺伝子セグメント、ヒト生殖系列 J_H 4 遺伝子セグメント、ヒト生殖系列 J_H 5 遺伝子セグメント、およびヒト生殖系列 J_H 6 遺伝子セグメントを含むヒト生殖系列 J_H 遺伝子セグメントの完全なレパートリーを含み、場合により、前記ヒト生殖系列 J_H 1、J_H 2、J_H 3、J_H 4、J_H 5、および J_H 6 遺伝子セグメントが、生殖系列配置にあり、前記 J_H 領域内に含まれる少なくとも一つの生殖系列 J_H 遺伝子セグメントの欠失が、前記再構成されていないヒト J_H 1、J_H 2、および J_H 3 遺伝子セグメントの欠失、場合により、前記 J_H 4 および J_H 5 遺伝子セグメントの欠失をさらに含む、項目 3 3 に記載の方法。(項目 3 5)2 3 m e r の R S S に作動可能に結合され前記少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントが、(a) 2 3 m e r の R S S 作動可能に結合されたヒト D_H 3 - 3 遺伝子セグメント、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D_H 3 - 3 遺伝子セグメントの 5 ' 末端に隣接する、(b) 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 2 遺伝子セグメント、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D_H 2 - 2 遺伝子セグメントの 3 ' 末端に隣接する、(c) 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 8 遺伝子セグメント、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D_H 2 - 8 遺伝子セグメントの 3 ' 末端に隣接する、(d) 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合されたヒト D_H 2 - 1 5 遺伝子セグメント、場合により、前記 2 3 m e r の R S S が、前記 D_H 2 - 1 5 遺伝子セグメントの 3 ' 末端に隣接する、または(e) (a) ~ (d) の任意の組み合わせを含む、項目 2 9 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。(項目 3 6)置換される前記少なくとも一つの再構成されていない D_H 遺伝子セグメントが、前記 D_H 領域の最も 3 ' の再構成されていない D_H 遺伝子セグメントを含む、項目 3 2 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。(項目 3 7)置換される前記少なくとも一つの再構成されていない D_H 遺伝子セグメントが、2 3 m

10

20

30

40

50

e r の R S S に作動可能に結合された前記少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントに対応する D_H 遺伝子セグメントを含む、項目 3 2 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

項目 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子、項目 2 8 に記載のターゲティングベクター、または項目 2 9 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法に従って修飾された免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、免疫グロブリン重鎖遺伝子座。

(項目 3 9)

項目 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の核酸、項目 2 8 に記載のターゲティングベクター、項目 2 9 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法に従って修飾された免疫グロブリン重鎖可変領域、または項目 3 8 に記載の免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座を含み、場合により、げっ歯類生殖系列ゲノムである、げっ歯類ゲノム。

(項目 4 0)

(i) 再構成されていない重鎖可変 (V_H) 遺伝子セグメント、
(i i) 操作された重鎖可変領域多様性 (D_H) 領域、前記操作された D_H 領域が、一つ以上の生殖系列 D_H 遺伝子セグメントおよび 2 3 m e r 組み換えシグナル配列 (R S S) に作動可能に結合された一つ以上の D_H 遺伝子セグメントを含む、および

(i i i) 再構成されていない重鎖結合 (J_H) 遺伝子セグメント、を含む、免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、げっ歯類生殖系列ゲノムであって、

(i) ~ (i i i) が、組み換え時に、前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、免疫グロブリン重鎖可変ドメインをコードする再構成された重鎖可変領域配列を含み、場合により、前記再構成された重鎖可変領域配列が、V_H (D_H - D_H) J_H 組み換え現象後に形成される、げっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 1)

2 3 m e r 組み換えシグナル配列 (R S S) に作動可能に結合された前記一つ以上の D_H 遺伝子セグメントが、3' の 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された D_H セグメントを含む、項目 4 0 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 2)

2 3 m e r 組み換えシグナル配列 (R S S) に作動可能に結合された前記一つ以上の D_H 遺伝子セグメントが、5' の 2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された D_H セグメントを含む、項目 4 0 または 4 1 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 3)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、ヒト V_H、D_H、および J_H 遺伝子セグメントのみを含むヒト免疫グロブリン重鎖可変領域である、項目 4 0 ~ 4 2 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 4)

前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域が、免疫グロブリン重鎖定常領域に作動可能に結合されている、項目 4 3 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 5)

前記免疫グロブリン重鎖定常領域が、場合により、内在性げっ歯類免疫グロブリン重鎖遺伝子座の、内在性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域である、項目 4 4 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 6)

前記再構成されていない V_H 遺伝子セグメントが、場合により、生殖系列配置の、V_H 3 - 7 4 ~ V_H 6 - 1 の間に渡り、それらを含む、機能的生殖系列ヒト V_H 遺伝子セグメントの完全なレパトリーを含む、項目 4 0 ~ 4 5 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 7)

前記再構成されていない重鎖 J_H 遺伝子セグメントが、ヒト J_H 6 遺伝子セグメントを含む、項目 4 0 ~ 4 6 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 8)

10

20

30

40

50

げっ歯類生殖系列ゲノムが、内在性 A d a m 6 遺伝子を欠く、項目 4 0 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 4 9)

一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子をさらに含み、場合により、前記一つ以上のげっ歯類内在性 A d a m 6 遺伝子が、内在性げっ歯類 A d a m 6 遺伝子を含む、項目 4 0 ~ 4 7 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 0)

前記一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、二つのヒト V_H 遺伝子セグメントの間に挿入される、項目 4 9 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 1)

前記一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、ヒト V_H 1 - 2 遺伝子セグメントとヒト V_H 6 - 1 遺伝子セグメントの間に挿入される、項目 5 0 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 2)

前記一つ以上の一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、ヒト A d a m 6 偽遺伝子の代わりに挿入される、項目 4 9 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 3)

前記一つ以上の一つ以上のげっ歯類 A d a m 6 遺伝子が、ヒト V_H 遺伝子セグメントとヒト D_H 遺伝子セグメントの間に挿入される、項目 4 9 に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 4)

末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ遺伝子をさらに含む、項目 3 9 ~ 5 3 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 5)

前記操作された D_H 領域に対してホモ接合性であることを特徴とする、項目 3 9 ~ 5 4 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 6)

前記操作された D_H 領域に対してヘテロ接合性であることを特徴とする、項目 3 9 ~ 5 4 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 7)

前記げっ歯類が、ラットまたはマウスである、項目 3 9 ~ 5 6 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノム。

(項目 5 8)

項目 3 9 ~ 5 7 のいずれか一項に記載のげっ歯類生殖系列ゲノムを含む、げっ歯類またはげっ歯類細胞。

(項目 5 9)

前記げっ歯類またはげっ歯類細胞が、ラット、マウス、ラット細胞、またはマウス細胞である、項目 5 8 に記載のげっ歯類またはげっ歯類細胞。

(項目 6 0)

前記げっ歯類細胞が、げっ歯類胚性幹細胞である、項目 5 8 または 5 9 に記載のげっ歯類またはげっ歯類細胞。

(項目 6 1)

項目 6 0 に記載のげっ歯類胚性幹細胞から生成される、げっ歯類またはげっ歯類細胞。

(項目 6 2)

再構成された重鎖 V_H (D_HA - D_HB) J_H コード配列を含む体細胞ゲノムをさらに含み、

場合により、前記再構成された重鎖 V_H (D_HA - D_HB) J_H 遺伝子セグメントが、I g M 定常領域遺伝子配列に作動可能に結合され、および / または D_HA または D_HB が、2 3 m e r の R S S に作動可能に結合された前記 D_H 遺伝子セグメントまたはその一部からもたらされ、D_HA または D_HB の少なくとも 9 コの塩基対が、2 3 m e r の R S S

10

20

30

40

50

に作動可能に結合された前記 D_H 遺伝子セグメントの少なくとも 9 コの塩基対またはその一部およびその各々と同一である、項目 58 ~ 61 のいずれか一項に記載のげっ歯類、げっ歯類胚、またはげっ歯類細胞。

(項目 63)

前記げっ歯類における全ての再構成された重鎖 V D J コード配列の少なくとも 95% が、少なくとも 10 アミノ酸長の C D R 3 を有し、場合により、前記げっ歯類における全ての再構成された重鎖 V D J 遺伝子配列の少なくとも 70% が、少なくとも 11 アミノ酸長の C D R 3 を有し、場合により、前記げっ歯類における全ての再構成された重鎖 V D J 遺伝子配列の少なくとも 15% が、少なくとも 14 アミノ酸長の C D R 3 を有する、項目 58 ~ 62 のいずれか一項に記載のげっ歯類。

(項目 64)

参照げっ歯類における D_H - D_H 組み換えの頻度と比較して、少なくとも少なくとも 3 倍増加した頻度の D_H - D_H 組み換えを示すことを特徴とする、項目 58 ~ 63 のいずれか一項に記載のげっ歯類。

(項目 65)

ゲノムが、操作された D_H 領域を含むげっ歯類を作製する方法であって、項目 60 に記載の胚性幹細胞からげっ歯類を作製することを含む、方法。

(項目 66)

ゲノムが、操作された D_H 領域を含むげっ歯類を作製する方法であって、

(a) 各々、23mer の R S S に作動可能に結合された一つ以上の D_H 遺伝子セグメントを含む DNA フラグメントを含む、げっ歯類胚性幹細胞のゲノムを修飾する工程、場合により、前記 DNA フラグメントが、項目 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子、項目 28 に記載のターゲティングベクター、項目 30 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法に従って修飾された免疫グロブリン重鎖可変領域、または項目 38 に記載の免疫グロブリン重鎖を含む、

(b) (a) の前記修飾されたげっ歯類胚性幹細胞を使用してげっ歯類を生成する工程を含む、方法。

(項目 67)

ゲノムが、操作された D_H 領域を含む、げっ歯類を作製する方法であって、

23mer の R S S に作動可能に結合された少なくとも一つの D_H セグメントを含むように免疫グロブリン重鎖可変領域の再構成されていない D_H 領域を修飾する工程、前記再構成されていない D_H 領域が、一つ以上の生殖系列 D_H 遺伝子セグメントをさらに含む、これにより、前記げっ歯類を作製する工程を含む、方法。

(項目 68)

修飾する工程が、前記一つ以上の再構成されていないヒト D_H 遺伝子セグメントを置換する工程、場合により、一つ以上の J_H 遺伝子セグメントを、23mer の R S S に作動可能に結合された前記少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントで置換する工程を含む、項目 67 に記載の方法。

(項目 69)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域であり、場合により、前記ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域が、少なくとも一つの V_H 遺伝子セグメントを含む再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 V_H 遺伝子クラスター、一つ以上の再構成されていないヒト D_H 遺伝子セグメントを含む再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 D_H 領域、および一つの再構成されていないヒト J_H 遺伝子セグメントを含む再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 J_H 遺伝子クラスターを含み、前記再構成されていないヒト免疫グロブリン重鎖 D_H 領域が、23mer の R S S に作動可能に結合された少なくとも一つの D_H 遺伝子セグメントを含むように修飾される、項目 67 または 68 に記載の方法。

(項目 70)

前記修飾する工程が、

10

20

30

40

50

(i) 機能的ヒトV_H遺伝子セグメント、場合により、V_H3-74~V_H6-1に渡り、それらを含む、全ての前記機能的ヒトV_H遺伝子セグメントの完全なレパートリー、場合により、全ての前記機能的ヒトV_H遺伝子セグメントが、生殖系列配置で位置する、
 (ii) 23merのRSSに作動可能に結合された少なくとも一つのD_H遺伝子セグメントで置換されるD_H7-27を除き、再構成されていないヒトD_H遺伝子セグメントの完全なレパートリー、および

(iii) 少なくとも、再構成されていないヒトJ_H6遺伝子セグメント、および場合により、少なくとも再構成されていないヒトJ_H4遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H5遺伝子セグメント、および再構成されていないヒトJ_H6遺伝子セグメントと、を含む前記免疫グロブリン重鎖可変領域を生じる、項目69に記載の方法。

10

(項目71)

23merのRSSに作動可能に結合された前記少なくとも一つのD_H遺伝子セグメントが、5'-23merのRSSに作動可能に結合されたD_H3-3遺伝子セグメントを含む、項目70に記載の方法。

(項目72)

前記修飾する工程が、

(i) 機能的ヒトV_H遺伝子セグメント、場合により、V_H3-74~V_H6-1に渡り、それらを含む、全ての機能的ヒトV_H遺伝子セグメントの完全なレパートリー、場合により、全ての前記機能的ヒトV_H遺伝子セグメントが、生殖系列配置で位置する、

(ii) 再構成されていないD_H2-2、D_H2-8、およびD_H2-15遺伝子セグメントを除き、再構成されていないヒトD_H遺伝子セグメントの完全なレパートリー、その各々が、23merのRSSに作動可能に結合された少なくとも一つのD_H遺伝子セグメントで置換される、および

20

(iii) 再構成されていないヒトJ_H遺伝子セグメント、場合により、再構成されていないヒトJ_H1遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H2遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H3遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H4遺伝子セグメント、再構成されていないヒトJ_H5遺伝子セグメント、および再構成されていないヒトJ_H6遺伝子セグメントの完全なレパートリー、を含む前記免疫グロブリン重鎖可変領域をもたらす、項目69に記載の方法。

(項目73)

30

23merのRSSに作動可能に結合された前記少なくとも一つのD_H遺伝子セグメントが、3'-23merのRSSに作動可能に結合されたヒトD_H2-2遺伝子セグメント、3'-23merのRSSに作動可能に結合されたヒトD_H2-8遺伝子セグメント、または3'-23merのRSSに作動可能に結合されたヒトD_H2-15遺伝子セグメントを含み、場合により、前記再構成されていないD_H2-2、D_H2-8、およびD_H2-15遺伝子セグメントが、それぞれ、3'末端の23merのRSSに作動可能に結合された前記ヒトD_H2-2遺伝子セグメント、3'末端の23merのRSSに作動可能に結合された前記ヒトD_H2-8遺伝子セグメント、および3'末端の23merのRSSに作動可能に結合された前記ヒトD_H2-15遺伝子セグメントで置換される、項目72に記載の方法。

40

(項目74)

前記免疫グロブリン重鎖可変領域が、

(a) 一つ以上のげっ歯類Adam6遺伝子をさらに含み、場合により、前記一つ以上のげっ歯類Adam6遺伝子が、二つの再構成されていないV_H遺伝子セグメントの間、場合により、再構成されていないヒトV_H1-2遺伝子セグメントと再構成されていないヒトV_H6-1遺伝子セグメントの間に位置する、および/または

(b) 免疫グロブリン重鎖定常領域に作動可能に結合され、場合により、前記免疫グロブリン重鎖定常領域が、内在性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域、場合により、内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の内在性げっ歯類免疫グロブリン重鎖定常領域である、項目67~73のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目75)

前記げっ歯類が、ラットまたはマウスである、項目65～74のいずれか一項に記載の方法。

(項目76)

抗体を作製するか、またはそれをコードする核酸を得る方法であって、
げっ歯類を抗原で免疫する工程、前記げっ歯類が、各々、23merのRSSに作動可能に結合された一つ以上のD_Hセグメントを含む操作されたD_H領域を含む生殖系列ゲノムを含み、場合により、前記げっ歯類が、項目58～64のいずれか一項に記載のげっ歯類である、

前記げっ歯類が、前記抗原に結合する抗体、またはそれをコードする核酸を含む前記抗原に対する免疫応答を生じさせる工程を含む、方法。

10

(項目77)

前記げっ歯類またはげっ歯類細胞から、前記抗体、またはそれをコードする核酸を回収することをさらに含む、項目76に記載の方法。

(項目78)

前記げっ歯類細胞が、B細胞またはハイブリドーマである、項目76に記載の方法。

(項目79)

各々、23merのRSSに作動可能に結合された一つ以上のD_Hセグメントが、5'
23merのRSSに作動可能に結合されたD_H遺伝子セグメントを含む、項目76～78のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目80)

各々、23merのRSSに作動可能に結合された一つ以上のD_Hセグメントが、3'
23merのRSSに作動可能に結合されたD_H遺伝子セグメントを含む、項目76～79のいずれか一項に記載の方法。

(項目81)

前記げっ歯類が、ラットまたはマウスである、項目76～80のいずれか一項に記載の方法。

(項目82)

げっ歯類重鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に結合された再構成重鎖V_H(D_HA - D_HB)J_Hコード配列を含む、げっ歯類ゲノム、核酸または免疫グロブリン遺伝子座であって、場合により、前記再構成重鎖は、D_HAおよびD_HBの各々が、それぞれ、最大1個のヌクレオチド変異で、第1および第2の生殖系列D_H遺伝子セグメントと40%の同一性を示すため、高度変異される、および/またはV_H(D_HA - D_HB)J_Hコード配列と決定される、げっ歯類ゲノム、核酸または免疫グロブリン遺伝子座。

30

(項目83)

前記D_HB遺伝子セグメントが、ヒト生殖系列D_H3 - 3遺伝子セグメントからもたらされる、項目82に記載のげっ歯類ゲノム、核酸または免疫グロブリン遺伝子座。

(項目84)

前記D_HA遺伝子セグメントが、ヒト生殖系列D_H2 - 2、D_H2 - 8またはD_H2 - 1.5遺伝子セグメントからもたらされる、項目82に記載のげっ歯類ゲノム、核酸または免疫グロブリン遺伝子座。

40

(項目85)

前記再構成重鎖V_H(D_HA - D_HB)J_Hコード配列が、20を超えるアミノ酸長のCDR3をコードする、項目82～84のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム、核酸または免疫グロブリン遺伝子座。

(項目86)

前記J_H遺伝子セグメントが、ヒト生殖系列J_H6遺伝子セグメントからもたらされる、項目82～85のいずれか一項に記載のげっ歯類ゲノム、核酸または免疫グロブリン遺伝子座。

(項目87)

50

項目 8 2 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のゲノム、核酸、または免疫グロブリン遺伝子座を含む、げっ歯類またはげっ歯類細胞。

(項目 8 8)

前記げっ歯類が、ラットもしくはマウスであるか、または前記げっ歯類細胞が、ラット細胞もしくはマウス細胞である、項目 8 7 に記載のげっ歯類またはげっ歯類細胞。

(項目 8 9)

前記げっ歯類細胞が、げっ歯類 B 細胞である、項目 8 7 または 8 8 に記載のげっ歯類またはげっ歯類細胞。

(項目 9 0)

骨髄腫細胞と融合された、項目 8 9 に記載のげっ歯類 B 細胞を含む、ハイブリドーマ。

10

20

30

40

50