ÖZET

AĞIR ZİNCİR ANTİKOR ÜRETEN FARELER

Tekniğin alanı, ağır zincir antikor üreten genetik olarak modifiye edilmiş farelerdir, özellikle immünoglobulin gama (IgG) geninin CH1 alanını (veya CH1 alanı ve bağlantı (menteşe) bölgesi) kodlayan bir sekansta nükleotid sekans kaybı içeren fakat fonksiyonel CH1 alanından yoksun olmayan IgM eksprese edebilen genetik olarak modifiye edilmiş farelerdir ve özellikle doğal tip IgM moleküllerini (ör. CH1 alanları ile) üretebilen fakat fonksiyonel CH1 alanından (veya CH1 alanı ve bağlantı (menteşe) bölgesi) yoksun ağır zincir IgG antikorları yapan farelerdir.

İSTEMLER

1. Bir antikor yapımına veya bunun üretimini sağlayan bir hücrenin izole edilmesine yönelik bir metot olup, özelliği;

a. bir farenin ilişkin bir antijenle immünize edilmesini, içerisinde farenin, CH1 alanını kodlayan bir nükleotit sekansının bir silinmesini içeren bir germ hattı genetik modifikasyonundan dolayı bir CH1 bölgesini kodlayan bir sekansı eksik olan bir IgG sabit bölge geni içeren bir endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesi, ve bir fonksiyonel CH1 alanını kodlayan bir endojenöz IgM sabit bölge geni içermesi, içerisinde farenin bir fonksiyonel CH1 alanı içeren bir IgM ve bir CH1 alanının tamamıyla eksik olduğu bir IgG içermesi;

b. farenin ilişkin antijene karşı bir bağışıklık yanıtı yerleştirmesine izin verilmesini; ve

c. fareden, ilişkin antijene spesifik olarak bağlanan bir antikor üreten bir hücrenin izole edilmesini içermesidir.

2. İstem 1'e göre metot olup, özelliği; içerisinde farenin ayrıca, tüm veya hemen hemen tüm immünoglobülin ağır zincir V, D ve J gen segmentlerinin bir veya daha fazla insan immünoglobülin ağır zincir VH, insan immünoglobülin ağır zincir DH ve insan immünoglobülin ağır zincir JH gen segmentleriyle değiştirilmesini içermesi, içerisinde bir veya daha fazla insan immünoglobülin ağır zincir VH, DH ve JH gen segmentlerinin, endojenöz fare loküsünde endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesine çalışır biçimde bağlanmasıdır.

3. İstem 2'ye göre metot olup, özelliği; içerisinde antikorun bir insan immünoglobülin ağır zincir değişken bölge içermesidir.

4. Önceki istemlerden herhangi birine göre metot olup, özelliği; içerisinde endojenöz IgG sabit bölge geninin bir IgG1 sabit bölge geni, bir IgG2b sabit bölge sabit bölge geni, bir IgG2a sabit bölge sabit bölge geni ve bunların kombinasyonlarından oluşan grup içinden seçilmesi, tercihen içerisinde IgG sabit bölge geninin bir IgG1 sabit bölge geni olmasıdır.

5. İstem 4'e göre metot olup, özelliği; içerisinde endojenöz IgG sabit bölge geninin bir IgG1 sabit bölge geni olması ve farenin ayrıca (a) sokak türü IgG3 proteini; (b) sokak türü IgG2a proteini; ve (c) sokak türü IgG2b proteini ifade etmesi, tercihen içerisinde farenin ayrıca (d) sokak türü IgM proteini; (e) sokak türü IgD proteini, (f) sokak türü IgA proteini; ve (h) sokak türü IgE proteini ifade etmesidir.

6. Önceki istemlerden herhangi birine göre metot olup, özelliği;

(a) endojenöz IgG ağır zincir antikorunun bir IgG1 menteşesi, bir CH2 alanı ve bir CH3 alanı içermesi;

(b) farenin bir fonksiyonel immünoglobülin hafif zincir loküsü içermesi, tercihen içerisinde immünoglobülin hafif zincir loküsünün bir κ hafif zincir gen loküsü ya da bir λ hafif zincir gen loküsü olması; ve/veya

(c) farenin bir 129 suşu, bir C57BL/6 suşu ve bir karıştırılmış 129 x C57BL/6 suşundan oluşan grup içinden seçilen bir suş olması, tercihen içerisinde farenin %50 oranında 129 ve %50 oranında C57BL/6 olmasıdır.

7. Bir ağır zincirli antikor kodlayan bir nükleik asidin izole edilmesine yönelik bir metot olup, özelliği;

a. bir farenin ilişkin bir antijenle immünize edilmesini, içerisinde farenin, CH1 alanını kodlayan bir nükleotit sekansının bir silinmesini içeren bir germ hattı genetik modifikasyonundan dolayı bir CH1 bölgesini kodlayan bir sekansı eksik olan bir IgG sabit bölge geni içeren bir endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesi, ve bir fonksiyonel CH1 alanını kodlayan bir endojenöz IgM sabit bölge geni içermesi, içerisinde farenin bir fonksiyonel CH1 alanı içeren bir IgM ve bir CH1 alanının tamamıyla eksik olduğu bir IgG içermesini;

b. farenin ilişkin antijene karşı bir bağışıklık yanıtı yerleştirmesine izin verilmesini; ve

c. fareden, ilişkin antijene spesifik olarak bağlanan bir antikor üreten bir hücrenin izole edilmesini, ve

d. immünoglobülin ağır zincir değişken bölge nükleik asitlerinin, (c) adımında izole edilen hücreden izole edilmesini içermesidir.

8. İstem 7'ye göre metot olup, özelliği; içerisinde farenin ayrıca, tüm veya hemen hemen tüm immünoglobülin ağır zincir V, D ve J gen segmentlerinin bir veya daha fazla insan immünoglobülin ağır zincir VH, insan immünoglobülin ağır zincir DH ve insan immünoglobülin ağır zincir JH gen segmentleriyle değiştirilmesini içermesi, içerisinde bir veya daha fazla insan immünoglobülin ağır zincir VH, DH ve JH gen segmentlerinin, endojenöz fare loküsünde bir endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesine çalışır biçimde bağlanmasıdır.

9. İstem 8'e göre metot olup, özelliği; içerisinde antikorun bir insan immünoglobülin ağır zincir değişken bölge içermesidir.

10. İstem 7 ila 9'dan herhangi birine göre metot olup, özelliği; içerisinde endojenöz IgG sabit bölge geninin bir IgG1 sabit bölge geni, bir IgG2b sabit bölge sabit bölge geni, bir IgG2a sabit bölge sabit bölge geni ve bunların kombinasyonlarından oluşan grup içinden seçilmesi, tercihen içerisinde IgG sabit bölge geninin bir IgG1 sabit bölge geni olmasıdır.

11. İstem 10'a göre metot olup, özelliği; içerisinde endojenöz IgG sabit bölge geninin bir IgG1 sabit bölge geni olması ve farenin ayrıca (a) sokak türü IgG3 proteini; (b) sokak türü IgG2a proteini; ve (c) sokak türü IgG2b proteini ifade etmesi, tercihen içerisinde farenin ayrıca (d) sokak türü IgM

proteini; (e) sokak türü IgD proteini, (f) sokak türü IgA proteini; ve (h) sokak türü IgE proteini ifade etmesidir.

12. İstem 7 ila 11'den herhangi birine göre metot olup, özelliği; içerisinde

(a) endojenöz IgG ağır zincir antikorunun bir IgG1 menteşesi, bir CH2 alanı ve bir CH3 alanı içermesi;

(b) farenin bir fonksiyonel immünoglobülin hafif zincir loküsü içermesi, tercihen içerisinde immünoglobülin hafif zincir loküsünün bir κ hafif zincir gen loküsü ya da bir λ hafif zincir gen loküsü olması; ve/veya

(c) farenin bir 129 suşu, bir C57BL/6 suşu ve bir karıştırılmış 129 x C57BL/6 suşundan oluşan grup içinden seçilen bir suş olması, tercihen içerisinde farenin %50 oranında 129 ve %50 oranında C57BL/6 olmasıdır.

13. İstem 1 ila 12'den herhangi birine göre metot olup, özelliği; ayrıca:

d. adım c'de izole edilen hücreden bir hibridomun üretilmesini, içerisinde hücrenin antijene spesifik bir antikoru üretmesi adımını içermesidir.

14. İstem 13'e göre metot olup, özelliği; ayrıca:

f. adım d'de üretilen hibridomdan ağır zincir değişken bölge nükleik asitlerinin izole edilmesini içermesidir.

15. İstem 13'ün bir metoduna göre oluşturulan bir hibridom olup, özelliği; içerisinde bu hibridomun, CH1 alanını kodlayan bir nükleotit sekansının bir silinmesini içeren bir germ hattı genetik modifikasyonundan dolayı bir CH1 bölgesini kodlayan bir sekansı eksik olan bir IgG sabit bölge geni içeren bir endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesini içermesidir.

16. İstem 15'e göre hibridom olup, özelliği; içerisinde endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesinin ayrıca bir fare anahtar (switch) bölgesini içermesidir.

TARİFNAME

AĞIR ZİNCİR ANTİKOR ÜRETEN FARELER

TEKNİK ALAN

Tekniğin alanı, ağır zincir antikor üreten genetik olarak modifiye edilmiş farelerdir, özellikle immünoglobulin gama (IgG) geninin CH1 alanını (veya CH1 alanı ve bağlantı (menteşe) bölgesi) kodlayan bir sekansta nükleotid sekans kaybı içeren fakat fonksiyonel CH1 alanından yoksun olmayan IgM eksprese edebilen genetik olarak modifiye edilmiş farelerdir ve özellikle doğal tip IgM moleküllerini (ör. CH1 alanları ile) üretebilen fakat fonksiyonel CH1 alanından (veya CH1 alanı ve bağlantı (menteşe) bölgesi) yoksun ağır zincir IgG antikorları yapan farelerdir.

ÖNCEKİ TEKNİK

Çoğu hayvanda, normal immünoglobulin ağır zincirler kendi soydaş hafif zincirleri ile birleştiğinde sadece iyi eksprese edilirler. İnsanlarda, yalın ağır zincirler değişken ağır, CH1 veya değişken ağır ve CH1 alanlarının sekanslarından yoksun işlevsiz ağır zincirler tarafından ortaya çıkan ağır zincir hastalığında bulunur. Hafif zincirlerden yoksun ağır zincirlere belirli balık türlerinde ve develerde rastlanır. Bu ağır zincirler fonksiyonel CH1 alanından yoksundur ve ağır zincir değişken alanlarında non-human (insan olmayan) özelliklere sahiptir. Fareleri develerde ve belirli balık türlerinde bulunan VHH alanlarını taklit eden camelized genler eksprese etmeleri için modifiye ederek, kısmen IgM ve IgG CH1 alanlarını uzaklaştırarak ve ağır zincir değişken bölgelerini develerdekilere ve/veya belirli balık türlerindekilere benzemelerini doğrulayarak camelized antikorlar yapmak için girişimlerde bulunulmuştur. Ancak, camelized antikorların deve olmayan hayvanlarda immün yanıtı uyarması beklenecektir.

Teknikte devegillerden olmayan VH alanlarına sahip ağır zincir antikorları üreten genetik olarak modifiye edilmiş non-human hayvanlara ihtiyaç vardır.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1, bir CH1 gen segmentine birleşen JH bölgesinin gen segmentini, ardından bağlantı (menteşe) bölgesini, CH2 gen segmentini ve CH3 gen segmentini; CH1 alanını (IgG1ΔCH1, orta) silen bir yapı ile hedeflenen IgG1 lokusunu ve hem CH1 alanını hem de bağlantı (menteşe) bölgesini (IgG1ΔCH1-Δmenteşe, alt) silen bir yapı ile hedeflenenIgG1 lokusunu gösteren bir farede normal tip IgG1 lokusunu gösterir (IgG1, en üst).

Şekil 2 CH1 alanından yoksun IgG1 eksprese eden fare IgG1 geninin genetik olarak modifiye lokus yapma hedefini gösterir.

Şekil 3 CH1 alanından ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun IgG1 eksprese eden fare IgG1 geninin genetik olarak modifiye lokus yapma hedefini gösterir.

Şekil 4 CH1 alanından yoksun IgG1 eksprese eden ve IgG2b veya IgG2a eksprese etmeyen fare ağır zincir sabit bölge lokusunun genetik olarak modifiye lokus yapma hedefini gösterir.

Şekil 5 CH1 alanını silen ve bağlantı (menteşe) alanını silen ve IgG2b gene ve IgG2a genini silen bir yapı ile hedeflenen fare ağır zincir sabit bölgesini gösterir.

Şekil 6 CH1 alanından yoksun veya CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgesinden (en üst) yoksun IgG1'e sahip genetik olarak modifiye edilmiş bir farenin ağır zincir sabit bölgesini ve CH1 alanından yoksun veya CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgesinden (en üst) yoksun ve IgG2a geninden yoksun ve IgG2b geninden (en alt) yoksun IgG1'e sahip genetik olarak modifiye edilmiş bir farenin ağır zincir sabit bölgesini gösterir.

Şekil 7 CHO hücre supernatantlarının bağımsız olarak kontrol (fare Fc ile sitokin ectodomain füzyonu), CH1 alanından yoksun (hVR-mFcΔCH1) kimerik (insan VR)/(fare Fc) ağır zincir antikoru, CH1 alanından yoksun (hVR*-mFcΔCH1) camelized kimerik (insan VR)/(fare Fc) ağır zincir antikoru, kimerik (insan VR)/(fare Fc) ağır zincir antikoru (hVR-mFc), camelized kimerik (insan VR)/(fare Fc) ağır zincir antikoru (hVR*-mFc), CH1 alanı ile birlikte (mFc) veya birlikte değil (mFcΔCH1) mFc eksprese etmek için işlenmiş CHO hücrelerinden Western blot'unu gösterir.

Şekil 8 anti-fare IgG ile lekelenen doğal tür fareden (sol) ve IgG1'i CH1 alanından yoksun ve bağlantı (menteşe) bölgesinden (heterozigot) yoksun olan genetik olarak modifiye edilmiş fareden fare serumunun azalan SDS-PAGE'inden Western blot görüntülerini gösterir; moleküler ağırlık belirteç pozisyonları olarak şematik ağır zincirler sağlanır.

Şekil 9 anti-fare IgG ile lekelenen doğal tür fareden (WT) ve IgG1'i CH1 alanından yoksun ve bağlantı (menteşe) bölgesinden (homozigot, sırasıyla HO 1, HO 2, HO 3, HO 4 olarak belirtilir) dört genetik olarak modifiye edilmiş fareden fare serumunun azalmayan SDS-PAGE'inden Western blot görüntülerini gösterir; her fare (WT veya HO) her hayvan (her biri için soldan sağa ardışık şeritler) için 1:5 ve 1:10 serum seyreltmesine karşılık gelen şeritler üzerinde parantez ile belirtilen iki şerit ile gösterilir.

Şekil 10 normal IgG1 antikorun (sol) ve Ch1 alanından yoksun ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun ağır zincir antikorunun şematik bir diyagramını sağlar.

Şekil 11 doğal tip farelerin (WT) ve CH1 alanından yoksun ve bağlantı (menteşe) bölgesinden (HO; CH1 alanından yoksun ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun ağır zincir antikor eksprese eden homozigot fare) yoksun genetik olarak modifiye edilmiş farelerin ayrı ayrı IgG1 ve IgG2 serum immünoglobulin analizlerini gösterir. Kontrol insan serumu toplanır.

Şekil 12 IgG1 CH1 ve bağlantı (menteşe) bölge sekansından yoksun modifiye endojen fare ağır zincir lokusunda fare ağır zincir gen sekansı taşıyan farelerin splenosit RNA'larından

amplifiye on bir bağımsız RT-PCR klonlarının protein sekanslarını gösterir. B1 = SEQ ID NO:19; B2 = SEQ ID NO:21; B3 = SEQ ID NO:23; B5 = SEQ ID NO:25; D2 = SEQ ID NO:27; D5 = SEQ ID NO:29; D6 = SEQ ID NO:31; E2 = SEQ ID NO:33; E8 = SEQ ID NO:35; E10 = SEQ ID NO:37; F6 = SEQ ID NO:39. Küçük harf bazlar rekombinasyon sırasında mutasyondan ve/veya N ilavesinden oluşan non-germline bazları belirtir. Sekansların üzerinde belirtilen noktalar çerçeve (FR) ve tamamlayıcı belirleyici bölgelerin (CDR) düzgün hizalaması için sekanstaki yapay boşlukları temsil eder. Endojen IgG1 (CH2) sabit bölgenin CH2 bölgesindeki ilk dokuz amino asit her klon için gösterilir.

Şekil 13 IgG1 CH1 bölge sekansından yoksun modifiye endojen fare ağır zincir lokusunda insan ağır zincir gen sekansı taşıyan farelerin splenosit RNA'larından amplifiye yedi bağımsız RT-PCR klonlarının protein sekanslarını gösterir. A8 = SEQ ID NO:51; C2 = SEQ ID NO:53; D9 = SEQ ID NO:55; C4 = SEQ ID NO:57; H8 = SEQ ID NO:59; A5 = SEQ ID NO:61; A2 = SEQ ID NO:63. Küçük harf bazlar rekombinasyon sırasında mutasyondan ve/veya N ilavesinden oluşan non-germline bazları belirtir. Sekansların üzerinde belirtilen noktalar çerçeve (FR) ve tamamlayıcı belirleyici bölgelerin (CDR) düzgün hizalaması için sekanstaki yapay boşlukları temsil eder. Endojen IgG1 (HINGE) sabit bölgenin 13 amino asit bağlantı (menteşe) bölgesinin ilk yedi amino asidi her klon için gösterilir.

ÖZET

Genetik olarak modifiye hücreler, non-human embriyolar, non-human hayvanlar ve bunları üretme ve kullanmaya yönelik yöntemler ve bileşimler açıklanmakta olup, hayvanlar immünoglobulin G (IgG)'de bulunan fonksiyonel CH1 sekansından yoksun olması için genetik olarak modifiye edilir, opsiyonel olarak modifiye IgG'deki fonksiyonel IgG bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun olması için modifiye edilir ve hücreler, embriyolar ve hayvanlar fonksiyonel IgM CH1 sekansını içerir. Bazı yönlerden fareler, bir veya daha fazla ya da tüm endojen fare immünoglobulin ağır zincir değişken bölge gen segmentlerinin bir veya daha fazla insan immünoglobulin ağır zincir değişken bölge gen segmentleri ile yer değiştirmesini içerebilir. Bazı yönlerden tüm endojen fare V, D ve J gen segmentleri, bir veya daha fazla insan V, bir veya daha fazla insan D ve bir veya daha fazla insan J gen segmentleri ile yer değiştirir.

Mevcut buluş bir antikor yapımına veya bunun üretimini sağlayan bir hücrenin izole edilmesine yönelik bir metot sağlamakta olup, özelliği; bu metodun:

a. bir farenin ilişkin bir antijenle immünize edilmesini, içerisinde farenin, CH1 alanını kodlayan bir nükleotit sekansının bir silinmesini içeren bir germ hattı genetik modifikasyonundan dolayı bir CH1 bölgesini kodlayan bir sekansı eksik olan bir IgG sabit bölge geni içeren bir endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesi, ve

bir fonksiyonel CH1 alanını kodlayan bir endojenöz IgM sabit bölge geni içermesi, içerisinde farenin bir fonksiyonel CH1 alanı içeren bir IgM ve bir CH1 alanının tamamıyla eksik olduğu bir IgG içermesini;

b. farenin ilişkin antijene karşı bir bağışıklık yanıtı yerleştirmesine izin verilmesini; ve

c. fareden, ilişkin antijene spesifik olarak bağlanan bir antikor üreten bir hücrenin izole edilmesini içermesidir.

Mevcut buluş ayrıca, bir ağır zincirli antikor kodlayan bir nükleik asidin izole edilmesine yönelik bir metot sağlamakta olup, bu metot:

a. bir farenin ilişkin bir antijenle immünize edilmesini, içerisinde farenin, CH1 alanını kodlayan bir nükleotit sekansının bir silinmesini içeren bir germ hattı genetik modifikasyonundan dolayı bir CH1 bölgesini kodlayan bir sekansı eksik olan bir IgG sabit bölge geni içeren bir endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesi, ve bir fonksiyonel CH1 alanını kodlayan bir endojenöz IgM sabit bölge geni içermesi, içerisinde farenin bir fonksiyonel CH1 alanı içeren bir IgM ve bir CH1 alanının tamamıyla eksik olduğu bir IgG içermesini;

b. farenin ilişkin antijene karşı bir bağışıklık yanıtı yerleştirmesine izin verilmesini; ve

c. fareden, ilişkin antijene spesifik olarak bağlanan bir antikor üreten bir hücrenin izole edilmesini, ve

d. immünoglobülin ağır zincir değişken bölge nükleik asitlerinin, (c) adımında izole edilen hücreden izole edilmesini içermesidir.

Kullanılan genetik olarak modifiye fare, genetik modifikasyonun IgG sabit bölgesini kodlayan nükleotid sekansının modifikasyonunu içerdiği bir fare olup modifikasyon IgG sabit bölgesinin CH1 alanının fonksiyonunu kaybetmesi ile sonuçlanır. Bir düzenlemede, fonksiyon modifikasyon kaybı CH1 alanını kodlayan nükleotid sekansının silinmesidir veya CH1 alanını kodlayan nükleotid sekansı içinde bir silinmedir.

Bir düzenlemede IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b ve bunların bir kombinasyonundan seçilir. Bir düzenlemede, IgG IgG1'dir. Bir düzenlemede, IgG IgG1, IgG2a ve IgG2b'dir.

Bir düzenlemede, modifikasyon ayrıca CH1 modifikasyonu içeren IgG'nin bağlantı (menteşe) bölgesi için nükleotid sekansının silinmesini içerir

Bir düzenlemede, genetik olarak modifiye fare 129 suşundan, C57BL/6 suşundan ve 129 x C57BL/6 karışımından seçilir. Belirli bir düzenlemede, fare %50 129 ve %50 C57BL/6'dır.

Bir düzenlemede, genetik olarak modifiye fare, 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (ör., 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (bakınız, ör, Festing ve ark. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836) içeren bir gruptan seçilen 129 suşudur. Bir düzenlemede, genetik olarak modifiye fare C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, C57BL/Ola'dan seçilen spesifik bir düzenlemede C57BL suşudur. Belirli bir düzenlemede, genetik olarak modifiye fare yukarıda belirtilen 129 suşunun ve yukarıda belirtilen C57BL/6 suşunun bir karışımıdır. Başka bir spesifik düzenlemede, fare yukarıda belirtilen 129 suşlarının bir karışımıdır veya yukarıda belirtilen BL/6 suşlarının bir karışımıdır. Belirli bir düzenlemede, karışımın 129 suşu 129S6 (129/SvEvTac) suşudur.

İfade edilen fare ayrıca bir veya daha fazla yeniden düzenlenmemiş endojen fare ağır zincir immünoglobulin değişken bölge (mVR) gen segmentlerinin işlevsel olarak modifiye IgG sabit bölge sekansına bağlanmasını içerir. Bir örnekte, bir veya daha fazla mVR gen segmentleri VH1, VH3, VH5, VH7, VH14 ve bunların bir kombinasyonundan seçilen fare VH gen ailesindendir. Bir örnekte, bir veya daha fazla mVR gen segmentleri mVH 1-26, 1-42, 1-50, 1-58, 1-72, 3-6, 5-6, 7-1, 14-2 ve bunların bir kombinasyonundan seçilir.

Bir düzenlemede, fare fonksiyonel CH1 bölgesinden yoksun IgG ağır zincirde FR1, FR2 ve FR3 kodlayan yeniden düzenlenmiş bir gen içermekte olup FR1, FR2 ve FR3'ün her biri bağımsız olarak VH1, VH3, VH5, VH7 ve VH14 gen ailesinden seçilen mVH germline sekansından türetilen FR1, FR2 ve FR3'e en az %90, %95, %96, %97, %98 veya %99 benzerdir. Bir düzenlemede, mVH germline sekansı 1-26, 1-42, 1-50, 1-58, 1-72, 3-6, 5-6, 7-1 ve 14-2 sekansından seçilir.

Bir düzenlemede, fare DH 1-1, 2-14, 3-1, 3-2, 3-3, 4-1 ve bunların bir kombinasyonundan seçilen DH gen segmentinden türemiş bir CDR3 içerir. Bir düzenlemede, fare CDR3 JH1, JH2, JH3 veya JH4 olan bir JH tarafından kodlanan bir sekans içerir.

Bir düzenlemede, fare DH 1-1, 2-14, 3-1, 3-2, 3-3, 4-1 ve JH1, JH2, JH3 veya JH4 yeniden düzenlemesinden türemiş CDR3 kodlayan yeniden düzenlenmiş bir antikor sekansı içerir.

Bir düzenlemede, fare fonksiyonel CH1 bölgesinden yoksun IgG ağır zincirde FR4 kodlayan yeniden düzenlenmiş bir gen içermekte olup FR4, DH1-1, 2-14, 3-1, 3-2, 3-3 veya 4-1'in JH1, JH2, JH3 veya JH4 ile yeniden düzenlenmesi ile kodlanan FR4'e en az %90, %95, %96, %97, %98 veya %99 benzerdir.

Bir düzenlemede fare, endojen fare ağız zincir değişken bölge lokusunda yeniden düzenlenmemiş insan ağız zincir immünoglobulin değişken bölge (hVR) gen segmenti içerir. Bir düzenlemede fare işlevsel olarak endojen fare ağız zincir değişken bölge lokusunda modifiye IgG sabit bölge sekansına bağlanan yeniden düzenlenmemiş hVR gen segmenti içerir. Bir düzenlemede, hVR gen segmentleri VH1, VH3, VH4 ve bunların bir kombinasyonundan seçilen insan VH gen familyasındandır. Bir düzenlemede, bir veya daha fazla hVR gen segmenti 1-2, 1-8, 1-18, 1-46, 1-69, 3-21, 3-72 ve 4-59'dan seçilir. Spesifik bir düzenlemede, bir veya daha fazla hVR gen segmenti 1-8, 1-18 ve 1-69'dan seçilir.

Bir düzenlemede, tüm veya neredeyse tüm fare ağır zincir V gen segmenti bir veya daha fazla insan ağır zincir V gen segmenti ile yer değiştirir. Bir düzenlemede, tüm fare ağır zincir V ve D gen segmentleri bir veya daha fazla insan ağır zincir V ve D gen segmentleri ile yer değiştirir. Bir düzenlemede, tüm fare ağır zincir V, D ve J gen segmentleri bir veya daha fazla insan ağır zincir V gen segmenti, bir veya daha fazla insan ağır zincir D gen segmenti ve bir veya daha fazla insan ağır zincir J gen segmenti ile yer değiştirir. Bu düzenlemelerde, insan ağır zincir V ve/veya D ve/veya J gen segmentleri fare endojen ağır zincir lokusundadır ve işlevsel olarak modifiye fare sabit bölge gen(ler)ine bağlanır.

Bir düzenlemede fare, fonksiyonel CH1 bölgesinden yoksun IgG ağır zincirin FR1, FR2 ve FR3 sekanslarını kodlayan ve 1-8, 1-18 veya 1-69 insan immünoglobulin ağır zincir değişken gen segmentinin insan germline nükleotid sekansından FR1, FR2 ve FR3'e en az %80 benzer olan nükleotid sekansı içermekte olup, modifiye farenin FR1 + FR2 + FR3 sekansı optimal olarak söylenen insan germline sekansı ile fare ve insan sekanslarının CDR sekanslarına bakmaksızın hizalanır (ör, karşılaştırıldığında herhangi bir CDR amino asit benzerliğini düşünmeden optimal olarak FR'lerin hizalanması). Belirli bir düzenlemelerde, FR1, FR2 ve FR3 1-8, 1-18 veya 1-69 gen segmentleri olan ağır zincir değişken bölge gen segmentinin FR1 + FR2 + FR3'ün insan germline nükleotid sekansına yaklaşık %85, %90, %95, %96, %97, %98 ve %99 benzerdir.

Bir düzenlemede, fare ayrıca insan D6-19/J6 yeniden düzenlemesi, D6-7/J4 yeniden düzenlemesi, D4-4/J4 yeniden düzenlemesi, D6-6/J2 yeniden düzenlemesi, D3-16/J6 yeniden düzenlemesi, D6-6/J4 yeniden düzenlemesi ve D1-7/J4 yeniden düzenlemesi tarafından oluşturulan FR4'e en az %80 benzer FR4 içerir.

Bir düzenlemede fare, V1-8, V1-18 ve V1-69'dan seçilen insan ağır zincir değişken bölge gen segmentinin germline sekansı tarafından kodlanan FR1'den amino asit sekansı 1'den fazla olmayan, 2'den fazla olmayan, 3'ten fazla olmayan, 4'ten fazla olmayan veya 5'ten fazla olmayan amino asitten farklı olan FR1 kodlayan nükleotid sekansı içerir. Belirli bir düzenlemede FR1

kodlayan nükleotid sekansı, fonksiyonel CH1 sekansından yoksun IgG sabit bölgeyi kodlayan bir sekansa işlevsel olarak bağlı olan yeniden düzenlenmiş bir sekanstır.

Bir düzenlemede fare, V1-8, V1-18 ve V1-69'dan seçilen insan ağır zincir değişken bölge gen segmentinin germline sekansı tarafından kodlanan FR2'den amino asit sekansı 1'den fazla olmayan, 2'den fazla olmayan, 3'ten fazla olmayan, 4'ten fazla olmayan veya 5'ten fazla olmayan amino asitten farklı olan FR2 kodlayan nükleotid sekansı içerir. Belirli bir düzenlemede FR2 kodlayan nükleotid sekansı, fonksiyonel CH1 sekansından yoksun IgG sabit bölgeyi kodlayan bir sekansa işlevsel olarak bağlı olan yeniden düzenlenmiş bir sekanstır.

Bir düzenlemede fare, 1-8, V1-18 ve V1-69'dan seçilen insan ağır zincir değişken bölge gen segmentinin germline sekansı tarafından kodlanan FR3'ten amino asit sekansı 1'den fazla olmayan, 2'den fazla olmayan, 3'ten fazla olmayan, 4'ten fazla olmayan, 5'ten fazla olmayan, 6'dan fazla olmayan, 7'den fazla olmayan, 8'den fazla olmayan, 9'dan fazla olmayan, 10'dan fazla olmayan veya 11'den fazla olmayan amino asitten farklı olan FR3 kodlayan nükleotid sekansı içerir. Belirli bir düzenlemede FR3 kodlayan nükleotid sekansı, fonksiyonel CH1 sekansından yoksun IgG sabit bölgeyi kodlayan bir sekansa işlevsel olarak bağlı olan yeniden düzenlenmiş bir sekanstır.

Bir düzenlemede fare, insan D6-19/J6, D6-7/J4, D4-4/J4, D6-6/J2, D3-16/J6, D6-6/J4 ve D1-7/J4 yeniden düzenlemesi tarafından kodlanan FR4 amino asit sekansından 1'den fazla olmayan, 2'den fazla olmayan veya 3'ten fazla olmayan amino asitten farklı amino asit sekansı olan FR4 kodlayan nükleotid sekansı içerir. Belirli bir düzenlemede FR4 kodlayan nükleotid sekansı, fonksiyonel CH1 sekansından yoksun IgG sabit bölgeyi kodlayan bir sekansa işlevsel olarak bağlı olan yeniden düzenlenmiş bir sekanstır.

Bir düzenlemede fare, insan ağır zincir D bölge gen segmentinden (hDH) türemiş ağır zincir CDR3 kodlayan nükleotid sekansı içerir. Bir düzenlemede, hDH D1-7, D3-16, D4-4, D6-6, D6-7 ve D6-19'dan seçilir.

Bir düzenlemede fare, insan ağır zincir birleşme gen segmentinden (JH) türemiş ağır zincir CDR3 kodlayan nükleotid sekansı içerir. Belirli bir düzenlemede JH, J2, J4 ve J6'dan seçilir.

Bir düzenlemede fare, insan DH ve insan JH yeniden düzenlemesinden türemiş nükleotid sekansı tarafından kodlanan ağır zincir CDR3 içerir. Belirli bir düzenlemede CDR3, D1-7/J4, D3-16/J6, D4-4/J4, D6-6/J2, D6-6/J4, D6-7/J4 veya D6-19/J6 yeniden düzenlemesinden türetilir.

Bir düzenlemede fare, endojen mVR gen segmentlerinin hVR gen segmenti ile yer değiştirmesini içerir. Spesifik bir uygulamada, mVR gen segmentinin hVR gen segmenti ile yer değiştirmesi modifiye ağır zincir sabit bölge ile aynı alel üzerindedir. Bir başka spesifik uygulamada, mVR gen segmentinin hVR gen segmenti ile değiştirilmesi, modifiye edilmiş ağır zincir sabit bölgesinden farklı bir alel üzerindedir.

Bir düzenlemede, mVR gen segmentlerinin %90-100'ü en az bir hVR gen segmenti ile yer değiştirir. Belirli bir düzenlemede, tüm veya neredeyse tüm endojen mVR gen segmentleri en az bir hVR gen segmenti ile yer değiştirir. Bir düzenlemede, yer değişim en az 18, en az 39 veya en az 80 ya da 81 hVR gen segmentleri iledir. Bir düzenlemede, yer değişim en az 12 fonksiyonel hVR gen segmentleri, en az 25 fonksiyonel hVR gen segmentleri veya en az 43 fonksiyonel hVR gen segmentleri iledir.

Bahsedilen ayrıca en az bir yeniden düzenlenmemiş hVR gen segmenti, en az bir yeniden düzenlenmemiş insan D segmenti, en az bir yeniden düzenlenmemiş insan J segmenti ve en az bir insan ağır zincir sabit sekansı içeren transgen içeren genetik olarak modifiye edilmiş bir faredir. Bir örnekte, endojen fare ağır zincir değişken bölge ve kappa hafif zincir değişken bölge lokusları fonksiyonel olarak bastırılır. Spesifik bir örnekte fare, fonksiyonel CH1 alanından yoksun ve opsiyonel fonksiyonel CH1 alanından yoksun olarak IgG bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun fare IgG sekansı ile bitişik insan ağır zincir değişken alanı içeren kimerik insan/fare antikoru üretmek için trans-değişim(switching) yapabilir. Spesifik bir örnekte, transgen ayrıca CH1 alanından yoksun IgG sekansı ve opsiyonel olarak fonksiyonel CH1 alanına sahip IgM içerir. Başka bir spesifik örnekte, IgG sekansı bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksundur.

Bir düzenlemede fare, birinci ağır zincir değişken bölge aleli ve ikinci ağır zincir değişken bölge aleli içermekte olup, birinci alel ve ikinci alelin her ikisi de aynı fare suşundandır. Bir düzenlemede, birinci alel birinci fare suşundan ve ikinci alel ikinci fare suşundandır. Bir düzenlemede, birinci ve ikinci alellerin bir aleli mVR ile en az bir hVR'nin yer değiştirmesini içerir. Başka bir düzenlemede, her iki alel mVR ile en az bir hVR'nin yer değiştirmesini içerir.

Kullanılan genetik olarak modifiye fare bir yönüyle CH1 alanı içeren IgM eksprese eden ve fonksiyonel CH1 alanından yoksun IgG eksprese eden veya hem fonksiyonel CH1 alanından hem de fonksiyonel bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun IgG eksprese eden bir faredir.

Bir düzenlemede, IgG IgG1'dir.

Bir düzenlemede fare, dört IgG eksprese eder: modifiye IgG1 ve doğal tip IgG3, IgG2a ve IgG2b. Başka bir düzenlemede fare, ikiden fazla IgGb eksprese etmez: modifiye IgG1 ve doğal tip IgG3.

Belirli bir düzenlemede fare ağır zincir izotop eksprese eder: doğal tip IgM, doğal tip IgD, doğal tip IgG3, modifiye IgG1, doğal tip IgG2a, doğal tip IgG2b, doğal tip IgA ve doğal tip IgE. Başka bir spesifik düzenlemede fare, ağır zincir izotopları eksprese eder: doğal tip IgM, doğal tip IgD, doğal tip IgG3, modifiye IgG1, doğal tip IgA ve doğal tip IgE. Çeşitli düzenlemelerde, IgG1 modifikasyonu CH1 alanının silinmesini ve opsiyonel olarak bağlantı (menteşe) bölgesinin silinmesini içerir.

Bir düzenlemede, fare 129, C56BL/6, karışık 129 x C57BL/6'dan seçilen bir suştandır.

Bir açıdan, fare ağır zincir antikoru eksprese etmekte olup, ağır zincir antikor esas olarak bir dimerik ağır zincirden oluşur; ağır zincir fonksiyonel CH1 alanından yoksundur veya hem fonksiyonel CH1 alanından hem de fonksiyonel bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksundur; ağır zincir, germline gen bölgesi tarafından kodlanan insan ağır zincir değişken alanı ile benzer olmayan bir sekans içeren insan ağır zincir değişken alanını içerir ve ağır zincir, insan veya fare CH2 alanını ve insan ya da fare CH3 alanını içerir, ki burada fare doğal tip insan veya fare IgM eksprese eder.

Bir düzenlemede fare, fonksiyonel immünoglobulin hafif zincir gen lokusu içerir.

Bir uygulamada, memeli ağır zincir değişken alanı bir insan veya fare ağır zincir değişken alanıdır.

Bir düzenlemede, ağır zincir antikoru esas olarak fonksiyonel CH1 alanından yoksun ve fonksiyonel bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun dimerik ağır zincirden oluşmakta olup, ağır zincir en az bir somatik mutasyon içeren ve CH2 alanı ve CH3 alanı içeren insan değişken alanı içerir. Belirli bir düzenlemede, CH2 alanı ve CH3 alanı bağımsız olarak fare ve insan alanlarından seçilir. Spesifik bir düzenlemede, hem CH2 alanı hem de CH3 alanı insandır; başka bir düzenlemede hem CH2 alanı hem de CH3 alanı faredir.

Bahsedilen ayrıca bir ağır zincir antikoru olup, ağır zincir antikoru bir non-camelid değişken alan ve CH1 alanından yoksun bir ağır zincir sabit bölge içeren bir ağır zincir içerir.

Bir örnekte, ağır zincir antikoru ayrıca bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksundur.

Bir örnekte ağır zincir antikoru, esas olarak bağlantı (menteşe) bölgesinden, CH2 alanından ve CH3 alanından oluşan bir sabit bölge içerir. Başka bir düzenlemede, ağır zincir antikoru, esas olarak CH2 alanından ve CH3 alanından oluşan bir sabit bölge içerir

Bir örnekte, non-camelid değişken alanı, insan ağır zincir değişken bölge gen segmenti içeren fareden ya da genetik olarak modifiye fareden B hücrenin IgM- veya IgG-kodlayan nükleotid

sekansından somatik olarak mutasyona uğratılmış insan veya fare ağır zincir değişken alanıdır. Belirli bir düzenlemede fare, insansı (humanized) ağır zincir değişken gen segmenti içerir. Başka bir düzenlemede fare, endojen fare ağır zincir değişken bölge gen segment lokusunun en az bir insan değişken bölge gen segmenti ile yer değiştirmesini içerir. Başka bir düzenlemede fare, endojen fare ağır zincir lokusunun en az bir insan değişken gen segmenti, en az bir insan D segmenti ve en az bir insan J gen segmenti ile yer değiştirmesini içerir. Spesifik bir düzenlemede, endojen fare immünoglobulin değişken bölge lokusu tamamen veya neredeyse tamamen çok sayıda insan V, D ve J gen segmentleri içeren insan immünoglobulin değişken bölge lokusu ile yer değiştirir.

Bir düzenlemede non-camelid değişken alan insan değişken alanıdır. Başka bir düzenlemede, non-camelid değişken alanı bir veya daha fazla camelizing modifikasyon içeren insan değişken alanıdır. Spesifik bir düzenlemede, camelizing modifikasyonu L11S, V37F, G44E, L45C, L45R ve W47G'den (Kabat numaralandırması) seçilir. Spesifik bir düzenlemede, camelizing modifikasyonu V37F, G44E ve L45C'den seçilir. Spesifik bir düzenlemede, ağır zincir değişken alanı iki sistein içeren tamamlayıcılık-belirleme bölgesi 3 (CDR3) içerir.

Bir örnekte, ağır zincir antikoru, birinci ağır zincir değişken alanı içeren birinci ağır zincir dimeri ve ikinci ağır zincir değişken alanı içeren ikinci ağır zincir içermekte olup birinci ve ikinci ağır zincirlerin her biri CH1 alanından yoksundur (veya CH1 alanı ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksundur). Bir örnekte, birinci ağır zincir dimerinin insan değişken alanı birinci epitopa bağlanır ve ikinci ağır zincir dimerinin insan değişken alanı ikinci epitopa bağlanır, ki burada birinci ve ikinci epitoplar aynı değildir. Belirli bir örnekte, birinci ve ikinci ağır zincirlerin ağır zincir değişken alanları, burada açıklandığı gibi insan ağır zincir değişken alanlarını ve/veya insan ağır zincir FR alanlarını içerir.

Ayrıca mevcut buluşun bir metodu vasıtasıyla oluşturulan bir hibridom sağlanmakta olup, içerisinde bu hibridom, CH1 alanını kodlayan bir nükleotit sekansının bir silinmesini içeren bir germ hattı genetik modifikasyonundan dolayı bir CH1 bölgesini kodlayan bir sekansı eksik olan bir IgG sabit bölge geni içeren bir endojenöz immünoglobülin ağır zincir sabit bölgesi içerir. Ayrıca genetik olarak modifiye edilmiş bir insan dışı hücre açıklanmakta olup, içerisinde bu genetik modifikasyon bir IgG CH1 alanının silinmesini içerir ve hücre fonksiyonel bir IgM ifade eder. Spesifik bir durumda, hücre bir CH1 alanı kodlayan bir sekans içeren bir IgM geni içerir.

Bir durumda hücre, fare ES hücresinden, a pluripotent hücreden ve totipotent hücreden seçilir.

Ayrıca sağlanan genetik olarak modifiye edilmiş bir fare embriyosu olup, genetik modifikasyon burada açıklandığı haliyle bir modifikasyon içerir. Bir düzenlemede, genetik modifikasyon IgG CH1

alanının silinmesini içerir ve fare embriyosu fonksiyonel IgM eksprese eder. Belirli bir düzenlemede, fare embriyosu CH1 alanı içeren IgM geni içerir.

Ayrıca sağlanan donör hücresi içeren bir fare embriyosu olup, donör hücre genetik olarak modifiye edilmiştir ve genetik modifikasyon burada açıklandığı haliyle bir modifikasyondur. Bir örnekte, genetik modifikasyon IgG CH1 alanının silinmesini içerir ve hücre CH1 alanı içeren IgM geni içerir.

Bir örnekte, donör hücresi fare ES hücresidir.

Ayrıca bahsedilen bir DNA yapısı olup, DNA yapısı (a) birinci sekans 5'e homolog ve IgG CH1 bölgesinin başlangıcına hemen bitişik bir fare homoloji kolu, (b) markör veya ilaç seçim kaseti ve (c) ikinci sekans 3'e homolog ve IgG CH1 bölgesinin sonuna hemen bitişik bir homoloji kolu veya alternatif olarak ikinci sekans 3'e homolog ve IgG bağlantı (menteşe) bölgesinin sonuna hemen bitişik bir homoloji kolu içerir.

Ayrıca bahsedilen CH1 alanından yoksun bir antikor üretmeye yönelik bir yöntem olup, (a) IgG'de fonksiyonel CH1 alanından yoksun veya IgG'de fonksiyonel CH1 alanından yoksun ve fonksiyonel bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun burada açıklandığı hali ile farenin bağışıklanmasını, ki burada fare fonksiyonel CH1 alanı içeren IgM eksprese eder, (b) farenin antikor üretmesi için yeterli koşullarda tutulmasını, (c) fonksiyonel CH1 alanından yoksun veya fonksiyonel bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun fare tarafından üretilen antikorun tanımlanmasını ve (d) antikorun, antikoru üreten hücrenin veya antikor sekansını kodlayan nükleotid sekansının fareden izole edilmesini içerir.

Bir düzenlemede, fare fonksiyonel immünoglobulin hafif zincir gen lokusunu içerir.

Bir durumda, fare ağır zincir antikorunu insansılaştırmaya yönelik bir yöntem sağlanmakta olup, ilgili antijen ile ağır zincir antikorları yapan genetik olarak modifiye edilmiş farenin bağışıklanmasını, farenin immün cevap vermesini sağlamayı, farenin fare B hücresinde kodlanan fare VH bölgesinin tanımlanmasını, ki burada B hücresi spesifik olarak ilgili antijene bağlanır, ve VH bölgesinin insansılaştırılmasını içerir.

Bir düzenlemede, ağır zincir antikorları yapan genetik olarak modifiye edilmiş fare burada açıklandığı gibi bir faredir. Bir düzenlemede fare, intakt IgM geni içeren ve CH1 alanından yoksun IgG geni içeren veya CH1 alanından yoksun ve bağlantı (menteşe) alanından yoksun ağır zincir sabit lokusuna işlevsel olarak bağlı en az bir mVR gen segmenti içerir. Bir örnekte, IgG geni IgG1 genidir. Bir düzenlemede, IgG geni IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3 ve bunların bir kombinasyonundan seçilir.

Bir düzenlemede, yöntem ayrıca insansı (hümanize) VH bölgesini insan immünoglobulin sabit bölgesi üzerine kodlayan bir nükleotid sekansının klonlanmasını içerir.

Bir düzenlemede, fare mVR gen segmenti fare VH1 ve VH14'ten seçilen VH gen ailesindedir ve insansılaştırma fare VH1 veya VH14 çerçevesinin insan VH1 geninden bir çerçeve ile yer değiştirmesini içerir. Bir düzenlemede, insan VH1 geni 1-2, 1-3, 1-8, 1-17, 1-18, 1-24, 1-45, 1-46, 1-58 ve 1-69'dan seçilir. Spesifik düzenlemelerde, mVR geni 1-58 genidir ve insan geni 1-18 genidir; mVR geni 1-26 genidir ve insan geni 1-2 genidir; mVR geni 1-50 genidir ve insan geni 1-46 genidir; mVR geni 1-17 genidir ve insan geni 1-2 genidir; mVR geni 1-42 genidir ve insan geni 1-2 genidir; mVR 14-1 genidir ve insan geni 1-2 genidir veya mVR 14-2 genidir ve insan geni 1-2 genidir.

Bir düzenlemede, mVR gen segmenti VH4, VH5, VH6, VH7, VH10, VH11 ve VH13 geninden seçilen fare VH genindendir ve insansılaştırma bir fare çerçevesinin insan VH3 geninden bir çerçeve ile yer değiştirmesini içerir. Bir düzenlemede, insan VH3 geni 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-16, 3-20, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33, 3-35, 3-38, 3-43, 3-48, 3-49, 3-53, 3-64, 3-66, 3-72, 3-73 ve 3-74'ten seçilir. Spesifik bir düzenlemede, mVR geni 7-1 genidir ve insan geni 3-72 genidir; mVR geni 3-6 genidir ve insan geni 4-59 genidir; mVR geni 5-6 genidir ve insan geni 3-21 genidir.

Bir düzenlemede, mVR gen segmenti VH3 ve VH12'den seçilen fare VH gen ailesindedir ve insansılaştırma bir fare çerçevesinin insan VH4 geninden bir çerçeve ile yer değiştirmesini içerir. Bir düzenlemede, insan VH4 geni-4, 4-28, 4-31, 4-34, 4-39, 4-59 ve 4-61'den seçilir.

Bir düzenlemede, mVR gen segmenti fare VH4 gen ailesindendir ve insansılaştırma fare VH4 çerçevesinin insan VH6 geninden bir çerçeve ile yer değiştirmesini içerir. Bir düzenlemede, insan VH6 geni 6-1'dir.

Bir düzenlemede, mVR gen segmenti fare VH9 gen ailesindendir ve insansılaştırma fare VH9 çerçevesinin insan VH7 ailesinin insan VH geninden bir çerçeve ile yer değiştirmesini içerir. Bir örnekte, insan VH geni 7-4-1 ve 7-81'den seçilir.

Bir düzenlemede, insansılaştırma ayrıca bir veya daha fazla konservatif ya da konservatif olmayan ikame, bir veya daha fazla çıkartma ve/veya fare CDR'sine bir veya daha fazla ekleme içerir, öyle ki fare CDR'si insan CDR'sine daha yakın örtüşür.

Bir düzenlemede, insansılaştırma ayrıca bir veya daha fazla konservatif ya da konservatif olmayan ikame, bir veya daha fazla çıkartma ve/veya insan çerçevesinde bir veya daha fazla ekleme içerir, öyle ki fare insan çerçevesi fare çerçevesine daha yakın örtüşür

Bir yönüyle kullanılan genetik olarak modifiye fare fonksiyonel immünoglobulin hafif zincir geni içeren bir fare olup, fare hafif zincirden yoksun ve CH1 bölgesinden yoksun veya CH1 bölgesi ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun ağır zincir antikoru eksprese eder.

Fare CH1 bölgesini kodlayan bir sekanstan yoksun veya bağlantı (menteşe) ve CH1 bölgesini kodlayan bir sekanstan yoksun immünoglobulin geni içerir. Sekanstan yoksun immünoglobulin geni bir veya daha fazla ağır zincir sabit genidir. Spesifik bir düzenlemede, sekanstan yoksun immünoglobulin geni IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 geninden seçilir. Fare fonksiyonel bir CH1 alanı içeren bir IgM sabit bölge geni içerir.

Bir düzenlemede, antikor bir antijene cevap olarak eksprese edebilir ve antikor spesifik olarak antijeni bağlar.

Bir düzenlemede, antikor fare VH alanı içerir. Spesifik bir düzenlemede, fare VH alanı 1-26, 1-42, 1-50, 1-58, 1-72, 3-6, 5-6, 7-1, 14-1 ve 14-2'den seçilen fare VH gen segmentini içerir.

Bir düzenlemede, antikor insan VH alanı içerir. Spesifik bir düzenlemede, insan VH alanı 1-2, 1-18, 1-46, 3-21, 3-72 ve 4-59'dan seçilen insan VH gen segmentinden türemiş bir sekans içerir.

Bir yönüyle kullanılan genetik olarak modifiye fare esas olarak her biri CH1 alanından yoksun iki IgG1 ağır zincirden oluşan bağlayıcı protein eksprese etmekte olup, fare CH1 bölgesi içeren IgM eksprese eder ve fare kendi genomundan IgG1'in CH1 alanını kodlayan bir nükleotid sekansı içeren bir mRNA eksprese edemez.

Bir düzenlemede, her biri CH1 alanından yoksun immünoglobulin ağır zincirler N-terminalden C-terminale esas olarak insan ağır zincir immünoglobulin değişken bölgeden, opsiyonel olarak bağlantı (menteşe) bölgesinden, fare CH2 bölgesinden ve fare CH3 bölgesinden oluşur. Spesifik bir düzenlemede, ağır zincir immünoglobulin değişken bölge insan değişken bölgedir, bağlantı (menteşe) bölgesi bulunur ve fare fonksiyonel immünoglobulin hafif zincir gen lokusu içerir.

Bir yönüyle, kullanılan fare hafif zincirden yoksun ve tamamen ya da kısmen CH1 bölgesinden yoksun ağır zincir antikor eksprese etmekte olup, fare B hücresi üzerinde B hücre reseptörü eksprese etmekte olup, kendi yüzeyindeki B hücre reseptörü immünoglobulin bağlantı (menteşe) bölgesine doğrudan birleşen veya CH2 bölgesine doğrudan birleşen bir immünoglobulin ağır zincir

değişken alanını içeren bir bağlayıcı molekülü göstermekte olup, bağlayıcı molekül CH1 bölgesinden yoksundur. Bir düzenlemede, bağlayıcı molekül IgG1 CH2 ve CH3 bölgesi içerir.

Bir yönüyle, bahsedilen ilgili antijen ile farenin bağışıklanmasını içeren ağır zincir antikoru üretmeye yönelik bir yöntem sağlanmakta olup, fare CH1 bölgesini kodlayan bir sekanstan yoksun IgG geni içermekte olup, fare intakt IgM sabit bölge geni içerir, ki bu da farenin ilgili antijene karşı immün cevap göstermesine olanak sağlar ve ilgili antijeni spesifik olarak tanıyan hücre veya proteini fareden izole eder; hücre veya protein CH1 alanından yoksun ve soydaş hafif zincirden yoksun ve spesifik olarak ilgili antijene bağlanan bir ağır zincir antikoru içerir.

Bir düzenlemede, fare fonksiyonel hafif zincir geni içerir. Bir düzenlemede, fare lambda, kappa ve bunların bir kombinasyonundan seçilen fonksiyonel hafif zincir geni içerir.

Bir düzenlemede, fare tüm ya da neredeyse tüm fare ağır zincir V, D, J gen segmentlerinin bir veya daha fazla insan V, D, J gen segmentleri ile yer değiştirmesini içerir.

Bir düzenlemede, CH1 kodlayan sekanstan yoksun IgG geni IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ve bunların kombinasyonundan seçilir.

Bir düzenlemede, CH1 sekansından yoksun IgG geni IgG1'dir ve fare IgG2a, IgG2b, IgG3 ve bunların kombinasyonunu kodlayan genden yoksundur. Bir düzenlemede, CH1 sekansından yoksun IgG geni IgG2a'dır ve fare IgG1, IgG2b, IgG3 ve bunların kombinasyonunu kodlayan genden yoksundur. Bir düzenlemede, CH1 sekansından yoksun IgG geni IgG2b'dir ve fare IgG1, IgG2a, IgG3 ve bunların kombinasyonunu kodlayan genden yoksundur. Bir düzenlemede, CH1 sekansından yoksun IgG geni IgG3'tür ve fare IgG1, IgG2a, IgG2b ve bunların kombinasyonunu kodlayan genden yoksundur.

Bir düzenlemede fare, kendi yüzeyinde B hücre reseptörü taşıyan bir B hücresi içermekte olup, B hücre reseptörü ilgili antijene bağlanan yeniden düzenlenmemiş ağır zincir VDJ içerir ve B hücre reseptörü CH1 bölgesi içeren bir IgM içerir ve IgM hafif zincir içerir. Bir düzenlemede, hafif zincir yeniden düzenlenmiş VJ'dir. Spesifik bir düzenlemede hafif zincir, ilgili antijene bağlanan yeniden düzenlenmiş ağır zincir VDJ ile soydaş bir kappa veya lambda hafif zincirdir.

Ayrıca bahsedilen buluşa göre farede üretilen bir fare ağır zincir antikoru, insan ağır zincir antikoru veya kimerik insan/fare ağır zincir antikorudur.

Ayrıca bahsedilen ağır zincir değişken bölge nükleotid sekansı kullanılarak üretilen fare ağır zincir antikoru, insan ağır zincir antikoru, kimerik insan/fare ağır zincir antikoru veya insansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikoru veya farede üretilen bunların bir kısmı buluşa göre sağlanır.

Aşağıdaki detaylı açıklama gözden geçirilerek diğer düzenlemeler açıklanmaktadır ve teknikte uzman kişilerce aşikardır.

DETAYLI AÇIKLAMA

Buluş belirli yöntemler ve açıklanan deneysel koşullarla sınırlı değildir çünkü bu yöntem ve koşullar değişebilir. Buluşun amacı sadece istemlerle sınırlı olacağından burada kullanılan terminoloji sadece belirli düzenlemeleri açıklama amaçlıdır ve sınırlayıcı olması amaçlanmaz.

Başka türlü tanımlanmadıkça burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler bu buluşun ait olduğu teknikte sıradan tecrübeli kişilerce çoğunlukla anlaşılan aynı anlama sahiptir. Burada açıklananlara benzer veya eşdeğer herhangi bir yöntem ve materyal pratikte veya mevcut buluşun denenmesinde kullanılabilse de burada belirli yöntem ve materyaller açıklanmaktadır.

CH1 Alanları ve Antikor Üretimi

Genetik olarak modifiye edilmiş fareler kullanılmakta olup, bunlar bir CH1 alanı eksik olan antikorlar, örneğin ağır zincirli antikorlar, yani hafif zincirleri olmayan antikorlar üretir. Genetik olarak modifiye edilmiş fareler bir fonksiyonel immünoglobülin ağır zincir alanı (bir CH1 alanı), örn. bir IgG1 CH1 alanı eksik olan bir genetik modifikasyon içerir ve bazı uygulamalarda fonksiyonel CH1 alanı eksik olan immünoglobülin ağır zincirde bir menteşe bölgesinin bir silinmesini içeren bir başka modifikasyon içermekte olup, içerisinde fareler fonksiyonel bir IgM ifade eder. Diğer modifikasyonlar IgG1'in haricindeki izotiplerin fonksiyonsuz hale getirilmesini, örneğin genlerde silinmeler yapılmasını veya IgD, IgG3, IgG2a, IgG2b, IgA ve IgE için genlerin silinmesini içerir. Fareleri, insan dışı embriyoları ve hücreleri yapmak için genetik olarak modifiye edilmiş insan dışı embriyolar, hücreler ve hedefleme yapıları da ayrıca tarif edilmektedir.

Ağır zincir antikorları (ör. hafif zincirden yoksun antikorlar) üretebilen genetik olarak modifiye edilmiş hücreler elde etme çabaları diğer türlerde, ör. devegillerde ve belirli balıklarda, ağır zincir antikorlarını taklit etmeye yoğunlaşmıştır. Bu yaklaşım IgM ve IgG immünoglobulin sabit bölge genlerinde CH1 alanlarını silmek için fare ES hücresini genetik olarak modifiye etmek ve aynı zamanda ağır zincir değişken bölgeleri camelid veya camelized (ör. VHH ve VHH-benzeri) ES hücrelerine sokmak için kullanılmaktadır. IgM ve IgG CH1 alanlarının silinmesine büyük olasılıkla, genetik olarak modifiye edilmiş lokustan camelized antikor oluşumu ile tamamlamak için endojen, doğal antikorların oluşmasını önlemek için girişilmiştir. VHH gen segmentlerinin eklenmesine büyük olasılıkla CH1 çıkarılması ile kombinasyon haline ağır zincir antikor oluşumunu taklit etmek için

girişilmiştir. Bu hayvanlardan olan ağır zincir antikorları VHH gen segmentleri içerecektir. In vitro çalışmalar CH1 alanından yoksun ağır zincirlerde bulunduğunda non-camelid VH alanlarının memnun edici şekilde eksprese edilebilir ağır zincir antikorları oluşturmadığını belirttiğinden VHH gen segmentlerinin büyük olasılıkla ağır zincir antikorunun düzgün ekspresyonu için gerekli olduğu düşünülmüştür.

Ancak devegillerde (ve bazı kıkırdaklı balıklarda), genler CH1 alanları veya CH1-benzer alanları içerecek şekilde bulunurlar. CH1 alanından yoksun VHH-içeren antikorların RNA uçbirleştirmeden veya CH1 bölgelerini kodlayabilen DNA sekanslarının yeniden düzenlenmesinden kaynaklandığına inanılır. Dolayısıyla, devegiller bile CH1 bölgelerini kodlayan DNA sekanslarını muhafaza eder. İnsanlar (bazı durumlarda) CH1 bölgesinden tamamen ya da kısmen yoksun ağır zincir antikorları üretebildiğinden (ör. insan ağır zincir hastalığı) verilen koşullar dizisi altında devegillerden olmayanları, örneğin fareleri, CH1 bölgesinden yoksun ağır zincirler oluşturmaları için zorlamak mümkün olabilir. Bu yaklaşım CH'nin germline yapısını rahatsız etmemeye fakat yerine hayvanın hafif zincir lokusunu işlevsiz hale getirmeye dayanır. Bu yaklaşım işlevsiz hafif zincir lokusu ile ekspresyon (ör. CH1 bölgesine sahip tam uzunlukta ağır zincirler) için soydaş hafif zincir gerektiren o ağır zincirlerin herhangi bir kappa veya lambda hafif zincir eksikliğinden dolayı yapılmadığını varsayar, öyle ki hafif zincir (ör. CH1 bölgesinden yoksun ağır zincirler) olmadan eksprese edebilen ve salgılanabilen sadece o ağır zincirler eksprese olacak ve salgılanacaktır. Yaklaşım fonksiyonel hafif zincir geni oluşturmak için yeniden düzenlenebilen fonksiyonel kappa veya lambda gen segmentlerinin yokluğuna ve herhangi bir fonksiyonel yeniden düzenlenmiş hafif zincir geninin yokluğuna dayanır ve böylece her iki germline hafif zincir lokusunun fonksiyonalitesini yok etmek için genetik bir manipülasyon (ör. nakavt) gerektirir. Yaklaşım endojen CH1 nükleotid sekansının kullanılmamasına neden olan "doğal" proseslere ve sınıf değişiminde oluşan CH1 susturmanın "doğal" prosesine dayanır. Fonksiyonel hafif zincir geni içeren herhangi bir hayvanda bu prosesin kullanımının herhangi bir olasılığı yoktur. Ayrıca, "doğal" prosesin geniş miktarlarda normal RNA, ör. CH1 bölgesi kodlayan bir içeren RNA, sentezi içerdiği görünüyor.

Bileşimler ve yöntemler farenin immünoglobulin CH1 alanından (ve opsiyonel olarak bağlantı (menteşe) bölgesinden) yoksun ağır zincir antikorlarını ve VH alanlarını (ör. Fare veya insan VH alanlarını) içeren antikorları içeren bir antikor yapmasına yöneliktir. Yöntemler seçici olarak endojen non-IgM CH1 bölgesinin işlevsiz (ör. CH1 alanının sekansının silinmesi ile) hale getirilmesini ve farede kimerik insan/fare antikoru yapmak için yeniden düzenlenmemiş endojen fare değişken bölge (mVR) gen segmentlerinin veya endojen fare değişken bölge lokusunda yeniden düzenlenmemiş insan değişken bölge (hVR) gen segmentlerinin kullanımını içerir. CH1 alanının silinmesi bir veya daha fazla IgG geninde yapılır fakat IgM geninde yapılmaz. Yaklaşım fonksiyonel IgM'yi muhafaza ederken bir veya daha fazla IgG CH1 alanını seçici olarak işlevsiz hale getirir. Bir veya daha fazla IgG CH1 alanının silinmesine ek olarak başka bir düzenleme CH1

alanının silindiği veya işlevsiz hale getirildiği IgG(ler)'in bağlantı (menteşe) bölgesinin silinmesini veya işlevsiz hale getirilmesini sağlar.

IgG CH1 silme yaklaşımı hayvanda doğal B hücre gelişiminde oldukça konservatif bir bozulma kullanır çünkü genetik olarak modifiye edilmiş non-human hayvanın tüm Ig izotopları işlevsiz CH1 veya CH1 alanının (ve opsiyonel olarak bağlantının (menteşenin)) silinmesini göstermeyecektir. Dolayısıyla, CH1 modifikasyonu IgM moleküllerinde oluşmaz ve böylece fonksiyonel CH1'e sahip IgM'ye bağlı erken B hücre gelişimindeki basamakları etkilemez. IgM modifiye edilmediğinden IgG'nin CH1 alanının (ve opsiyonel olarak IgG'nin bağlantı (menteşe) bölgesinin) fakat IgM'nin CH1 alanının değil, bir veya daha fazla silinmesini taşıyan hayvanlar IgG kapsamında değişken alan sunumundan önce klonal seleksiyon basamaklarında değişken bölgelerin geniş bir repertuarını memnun edici şekilde işleyebilmelidir. Dolayısıyla çeşitli düzenlemelerde, genetik modifikasyonun(ların) ağır zincir antikorda kullanıma hazır değişken bölgelerin çeşitliliği üzerinde herhangi bir deleteriyöz etkisi IgG kapsamında seleksiyon için mevcut değişken bölge havuzunu negatif olarak etkilememelidir. Ayrıca, germline'da işlevsiz (ör. silinen) hale getirilen CH1 sekansı IgG1 olduğunda fare CH1 alanını kodlayan herhangi bir RNA yapma yeteneğinden yoksun olacaktır.

Bir veya daha fazla IgG izotopunun CH1 alanını veya CH1 alanını ve bağlantı (menteşe) bölgesini işlevsiz hale getirmek için non-human hayvanı genetik olarak modifiye etmek farenin VH bölgesinin tüm ya da neredeyse tüm repertuarından ağır zincir antikorunda eksprese etmek için uygun bir VH alanı seçebilmesi ile sonuçlanabilir. IgG izotoplarının (fakat IgM değil) seçici olarak modifiye edilmesi CH1 alanı eksikliğinden veya IgM'de CH1 alanı eksikliğinden dolayı seleksiyonu atlatan VH bölgesinin sayısında potansiyel bir azalmayı önler. Dolayısıyla, VH bölgelerinin tam repertuarı (CH1 alanından yoksun veya CH1 alanından ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun) IgG kapsamında seleksiyon için uygundur. Dolayısıyla, buluşa göre genetik olarak modifiye edilmiş farede VH alanının seleksiyonu, modifiye edilmiş IgM yapılarından dolayı IgM'ye bağlı erken B hücresi gelişim engellerinin üstesinden gelmeye hangi VH alanının yardımcı olabileceğine bağlı değildir. Yerine, eken IgM'ye bağı basamaklar normal olarak oluşmalıdır; CH1 alanından yoksun veya CH1 alanından ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun IgG kapsamında eksprese etmek için uygunluklarına göre seleksiyon için uygun geniş bir ağır zincir repertuarı ile sonuçlanır.

Dolayısıyla, çeşitli düzenlemelerde, kullanılan genetik olarak modifiye edilmiş fare fonksiyonel IgM ekspresyonunu sağlamalıdır, ki bu da daha doğal klonal seleksiyon prosesi için bir fırsat sağlamalıdır. Örneğin, fonksiyonel IgM (ör. CH1 alanından yoksun olmayan IgM) ile hem taşıyıcı hafif zincir hem de soydaş hafif zincir IgM'nin CH1 alanı boyunca ilişkilendirebilecek ve erken B hücre gelişiminde seleksiyon prosesine katılabilecek. Buluşa göre genetik olarak modifiye edilmiş farede, IgG izotopuna sınıf geçişinin birinci seleksiyon basamağı olduğuna inanılmakta olup

fonksiyonel CH1 alanından yoksun veya fonksiyonel CH1 alanından ve fonksiyonel bağlantıdan (menteşeden) yoksun sabit alan kapsamında eksprese edilebilen ağır zincir değişken alanlarının herhangi bir seleksiyonuna rastlanır.

B Hücre Gelişiminde IgM

Devegillerdeki, belirli balıklardaki ve patolojik durumlardaki gözlemler, bazı koşullar altında ağır zincir sabit bölgesinin CH1 alanından yoksun bir antikorun soydaş hafif zincir yokluğunda eksprese edilebildiğini, antikor üreten B hücrelerinin normal gelişiminin genellikle CH1 alanın varlığına ihtiyaç duyduğunu ortaya koymaktadır. IgM dahil tüm ağız zincir izotopları CH1 alanı içerir. Hem taşıyıcı hafif zincirin hem de soydaş hafif zincirin IgM kapsamında ağır zincirin CH1 alanı vasıtasıyla verilen ağır zincir ile etkileşime girdiğine inanılır. Ağır zincir antikorlarının gelişiminin IgM izotop ağır zincirin yapısal bütünlüğüne veya fonksiyonalitesine bağlı olması halinde IgM'nin yapısal bütünlüğünün veya fonksiyonalitesinin bozulması istenmeyecektir.

Antikorların normal gelişimi, fonksiyonel ve kullanışlı antikorların sağ kalımı ve nihai ekspresyonu ile sonuçlanan kompleks seleksiyon şemalarının çokluğu boyunca antikorların sağ kalımını gerektirir. Yapısal bozulma doğanın antikor seleksiyon şemasının bir veya daha fazlasının gerçekleşmesi için antikorun etkin bir şekilde rekabet edememesi ve evrimleşememesi ile sonuçlanması halinde antikor yapısındaki bozulmalar antikor sağ kalımına ve nihai ekspresyonuna zararı gösterebilir.

Erken antikor gelişiminde, antikor ağır zincirleri seleksiyon prosesine girmekte olup, çeşitli seleksiyon şemalarından doğa sonuç olarak fonksiyonel ve afinite olgun antikorların oluşması için ileri seleksiyona girmesi için uygun ağır zincirleri seçer. Progenitör B hücrelerinde (veya pro-B hücre) rekombine ağır zincir gen segmentlerinden eksprese edilmiş antikor ağır zincirleri normal olarak, pre-B hücre reseptörü veya pre-BCR olarak anılan bir yapı (diğer ko-reseptörleri de içerir) oluşturmak için IgM izotopundaki pro-B hücre yüzeyi üzerinde bulunan bir taşıyıcı hafif zincir ile eşleştirilir. Pre-BCR hücre yüzeyinde bulunduğunda pre-BCR'nin kendi uygun kompleks oluşumunu hücreye bildirdiğine, ağır zincirin bu erken seleksiyon basamağından geçtiğine dair hücreyi etkili bir şekilde bilgilendirdiğine inanılır. Böylece hücre ağır zincirin daha başka seleksiyona girebileceğine dair bilgilendirilir. Eğer ağır zincir IgM ve taşıyıcı hafif zincir kapsamında bulunduğunda pre-BCR oluşumuna zararlı bir hasara sahipse hücre apoptoza girecektir. Eğer hücre apoptoza girerse ağır zincirin ağır zincir değişken bölgesinin kullanışlılığı veya çeşitliliğe katkısı yok olacaktır. Dolayısıyla, antikor seçiminde çok erken basamak ağır zincirin IgM izotopu kapsamında taşıyıcı bir hafif zincir ile birlikte bulunmasını gerektirir. Taşıyıcı hafif zincirin IgM'nin CH1 alanı vasıtasıyla en az kısmen IgM ile etkileşime girdiğine inanılır. Bu erken birleşmedeki hata veya antikor yapısındaki bozulma (ör. işlevsiz CH1 alanı) klonal seleksiyon başarısızlığı, ağır zinciri

eksprese eden pro-B hücre kaybı ve belirli bir ağır zincir değişken alanının kullanışlı bir antikorda uygulanma olasının kaybı ile sonuçlanır.

Pre-BCR taşıyan hücre bu seleksiyon basamağından geçtiğinde bir sonraki basamak ağır zincirin bir soydaş hafif zincir (ör. farelerde ve insanlarda ya kappa ya da lambda) ile eşleşmesini gerektirir. Eşleşmiş ağır zincir/soydaş hafif zincir yapısı IgM'nin Ch1 alanı vasıtasıyla IgM kapsamında yine hücre, burada naive pre-B hücre, yüzeyi üzerinde bulunur. Yüzeydeki bu kompleks fonksiyonel membrana bağlı B hücre reseptörü (BCR) ile sonuçlanır. Bu BCR'nin, ağır zincirin ileri seleksiyonlar için uygun olduğuna ve hücrenin artık bu hafif zinciri eksprese edebileceğine ve afinite olgunlaşması ve sınıf geçişinin dahil olduğu daha sonraki B hücre olgunlaşma basamağını ilerletebileceğine dair hücreyi uyardığına inanılır. Eğer ağır zincir IgM ve kendi soydaş hafif zinciri kapsamında bulunduğunda BCR oluşumuna zararlı bir hasara sahipse hücre apoptoza girecektir. Eğer hücre apoptoza girerse ağır zincir değişken bölgesinin kullanışlılığı veya çeşitliliğe katkısı yok olacaktır. Dolayısıyla, antikor seçiminde çok erken basamak ağır zincirin IgM izotopu kapsamında taşıyıcı bir hafif zincir ile birlikte bulunmasını gerektirir. Yine bu erken birleşmedeki hata veya antikor yapısındaki bozulma (ör. işlevsiz CH1 alanı) klonal seleksiyon başarısızlığı ve ağır zinciri eksprese eden pre-B hücresinin eş zamanlı kaybı ile sonuçlanır.

Buraya kadar devam eden seleksiyon ile, IgM kapsamında kendi soydaş hafif zinciri ile eşleşmiş ağır zinciri sunan pre-B hücresi daha sonra sınıf geçişi ve IgG izotop kapsamında ağır zincirin ve soydaş hafif zincirin B hücre yüzeyinde bulunduğu ileri seleksiyon mekanizmaları ile sonuçlanan bir olgunlaşma prosesine girer. Bu basamakta CH1 alanından yoksun veya CH1 alanı ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun IgG ağır zincirlerin herhangi bir seleksiyonu oluşacaktır. Buluşta kullanılan farelerde, ağır zincir değişken bölgelerin normal bir repertuarının değişken alanın CH1 alanından yoksun veya CH1 alanı ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun IgG'de eksprese olup olmayacağına bağlı seleksiyon için müsait olacağına inanılır. Aksine, bozulmuş IgM'lere sahip fareler ağır zincir değişken bölgelerin tüm repertuarını muhtemelen sunmayacaktır çünkü bozulmuş IgM kapsamında seleksiyona devem edebilen değişken bölgeler sınıf geçişi için uygun olacaktır.

Dolayısıyla, fonksiyonel IgM'den yoksun bir hayvanda başka türlü uygun ağı zincir değişken gen segmentlerinin yeniden düzenlemesi ardından B hücre popülasyonu yaratabilme yeteneğinde belirgin bir azalma görülebilir. Bu durumda, hatta ağır zincir bölgelerinin geniş bir kaynağının mevcut olduğunda (ör. hayvan yeniden düzenlenebilen uygun sayıda ağır zincir değişken bölge gen segmentine sahiptir) seleksiyon prosesi sırasında ağır zincirin kalmasını azaltan IgM bozulmasından dolayı istenen derecede bir çeşitlilik gösteren B hücrelerinin tatmin edici bir popülasyonu oluşmayabilir.

Fonksiyonel IgM Geni ile Ağır Zincir Antikor Üretimi

Bir fareyi ilgili immünojen ile bağışıklayarak antikor üretmek için yeterli çeşitliliği oluşturmak için IgM kapsamında B hücre gelişimi sırasında bulunan etkili bir şekilde seleksiyonu atlatan yeniden düzenlenmiş ağır zincir bölgelerinin uygun bir sayısının sağlanması istenir. Dolayısıyla, immünoglobulin ağır zincirde işlevsiz CH1 alanı veya işlevsiz CH1 alanı ve işlevsiz bağlantı (menteşe) bölgesi içeren genetik olarak modifiye edilmiş fare her iki IgM alelinde CH1 silinmesi içermemelidir.

Bazı düzenlemelerde, genetik olarak modifiye edilmiş farede ağır zincir antikoru yapmak için tüm Ig izotoplarının CH1 alanlarının silinmesi istenmez. Dolayısıyla, diğer izotopların (ör. IgM) fonksiyonel CH1 alanlarını tutmasına olanak sağlanırken IgG'nin CH1 alanını veya bunların kısmını kodlayan nükleotid sekansını etkisizleştirerek, silerek veya aksi halde işlevsiz hale getirerek (ve bazı düzenlemelerde IgG'nin bağlantı (menteşe) bölgesini etkisizleştirerek, silerek veya aksi halde işlevsiz hale getirerek) genetik olarak modifiye edilmiş farede ağır zincir antikoru yapmak için yöntemler ve bileşimler belirtilmektedir. Diğer izotop CH1 alanlarının (bir veya daha fazla seçilmiş IgG CH1 alanlarının dışında) fonksiyonalitesinin, ağır zincir değişken alanının non-IgG izotop kapsamında, ör. IgM izotopunda sunulduğu gelişim basamaklarını bozmayan veya neredeyse bozmayan B hücre gelişim prosesi ile sonuçlandığına inanılır. Dolayısıyla, B hücre gelişimi sırasında ör. IgM bağımlı basamakların bozulması nispeten minimize edilir. Buluş olarak kısıtlı olmadan (istemlerde açıklanan) buluş sahipleri IgM kapsamında ağır zincir değişken alanının sunulması ile ilişkili erken seleksiyon basamaklarının bozulmasını minimize etmenin IgG izotopuna sınıf geçişine girmek için kalan ağır zincir değişken bölgeleri taşıyan daha çok hücre ve fonksiyonel CH1 alanından yoksun veya fonksiyonel CH1 alanından yoksun ve fonksiyonel bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun IgG kapsamında seleksiyon ile sonuçlanacağını öne sürmektedirler.

Dolayısıyla, genetik olarak modifiye edilmiş fare kullanılıp, fare üretmek için yöntemler ve bileşimler de belirtilmekte olup, genetik modifikasyon IgM alanı olmayan Ig alanında fonksiyonel CH1 alanının (başka bir düzenlemede fonksiyonel bağlantı (menteşe) bölgesinin yokluğu) yokluğu ile sonuçlanır. Çeşitli düzenlemelerde, CH1 veya CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgesi (veya bunların oldukça fonksiyonel olan bölümlerini) kodlayan bir sekans genetik olarak modifiye edilmiş farenin genomunda silinir. Genetik olarak modifiye edilmiş fare, tamamen insan antikorlarını (insan immünoglobulin genlerini dahil etmek için genetik olarak modifiye edilmiş farede) ve kimerik insan/fare antikorlarını (ör. insan değişken bölge gen segmentlerini, D bölgesi ve J bölgesi, dahil etmek için genetik olarak modifiye edilmiş farede) içeren ağır zincir antikorları (ör. hafif zincirden yoksun antikorlar) üretmek için kullanışlıdır.

Ağır Zincir Antikorları

Antikorlar insan terapötikleri olarak yararlıdır. Ağır zincir antikorlar, ör. hafif zincirden yoksun antikorlar, da insan terapötikleri olarak yararlıdır. Ağır zincir antikorları hafif zincirden yoksun

olduklarından hafif zincir içerenlerden daha küçüktürler ve dolayısıyla daha iyi doku penetrasyonu göstermeleri beklenir, bununla birlikte benzer veya daha uygun farmakokinetik profile sahiptirler ve hatta geleneksel bir antikora kıyasla benzer etkileyici fonksiyonu korurlar. Daha düşük olduklarından dolayı ağır zincir antikorları aynı zamanda verilen hacimde daha yüksek dozda uygulanabilir. Antikorların en sık uygulama yöntemi subkutan enjeksiyondur ve verilen antikor dozu için uygulama hacmindeki azalma hastalara fayda sağlayabilir ve komplikasyonları ve yüksek hacimdeki subkutan enjeksiyona bağlı ağrıyı önleyebilir.

Ağır zincir antikorlarının başka bir avantajı, tek bir terapötikte iki farklı epitop için spesifite ile ağır zincirleri heterodimerize ederek bispesifik antikorlar yapabilmeleridir. Ağır zincirler hafif zincirlerden yoksun olduğundan dolayı bispesifik antikorlar yapmak için özellikle uygundurlar, çünkü her iki ağır zincirin bağlanma afinitesine veya spesifitisine engel olmayacak fakat aynı zamanda bispesifik antikorun uygun ekspresyonunu sağlayacak ortak bir hafif zincir yapmaya gerek yoktur.

Buluşta kullanılan genetik olarak modifiye edilmiş fareler geniş çeşitlilikte ağır zincir antikoru yapmak için kullanılabilir. Burada açıklanan genetik modifikasyon ör., uygun herhangi bir fare suşunda yapılabilir. Fare suşu istenen ağır zincir antikorunu yapmaya uygun herhangi bir genetik geçmişe sahip olabilir. Belirli düzenlemeleri kapsayan bazı genetik geçmişler aşağıda sağlanmıştır.

Genetik olarak modifiye edilmiş fare buluşa göre bir genetik modifikasyon ve bir veya daha fazla yeniden düzenlenmemiş insan değişken bölge gen segmenti, bir veya daha fazla yeniden düzenlenmemiş D bölge gen segmenti ve endojen fare ağır zincir değişken bölge lokusu ile yer değiştiren bir veya daha fazla yeniden düzenlenmemiş J bölge gen segmenti içeren bir fare olabilir. Böyle bir farede, insansılaştırılmış (humanized) değişken bölge lokusu endojen fare sabit alan sekanslarının yeniden düzenlenmiş değişken bölge gen üst bölgesini oluşturmak için rekombine edebilir (immünoglobulin fare sabit bölge genlerinin bir veya daha fazlası burada açıklandığı gibi modifiye edilir). Dolayısıyla fare kimerik insan değişken/fare değişken sabit ağır zincir antikoru yapabilecektir. İlgili immünojene maruziyet ile fare afinite olgun ve ilgili immünojenin epitopunu spesifik olarak bağlayabilen buluşa göre bir ağır zincir antikoru üretebilecektir.

Genetik olarak modifiye edilmiş fare yeniden düzenlenmemiş endojen fare değişken bölge gen segmentleri, yeniden düzenlenmemiş endojen fare D bölge gen segmentleri ve yeniden düzenlenmemiş endojen fare J bölge gen segmentleri içeren bir fare olabilmekte olup, fare burada açıklandığı gibi fare ağır zincir sabit bölge genetik modifikasyonunu içerir. Dolayısıyla fare, fare ağır zincir antikoru yapabilecektir. İlgili immünojene maruziyet ile fare afinite olgun ve ilgili immünojenin epitopunu spesifik olarak bağlayabilen buluşa göre bir ağır zincir antikoru üretebilecektir.

Belirtilen yeniden düzenlenmemiş insan değişken bölge gen segmentleri, yeniden düzenlenmemiş insan D gen segmentleri ve yeniden düzenlenmemiş insan J gen segmentleri, a mu geni ve trans-geçişe olanak sağlayan bir sekans içeren insan transgeni içeren genetik olarak modifiye edilmiş bir faredir. Fare ayrıca burada açıklandığı gibi bir fare ağır zincir sabit bölge içerecektir. Dolayısıyla fare tamamen insan IgM antikoru ve trans-geçiş vasıtasıyla kimerik insan değişken/fare sabit antikoru yapabilecek olup, sabit alan burada açıklandığı gibi bir genetik modifikasyon içerir. İlgili immünojene maruziyet ile fare afinite olgun ve ilgili immünojenin epitopunu spesifik olarak bağlayabilen buluşa göre bir ağır zincir antikoru üretebilecektir.

Ağır Zincir Antikorlarının *in-vitro* Ekspresyonu

Buluş sahipleri normal insan veya fare ağır zincir değişken bölgenin (hVR veya mVR) fonksiyonel CH1 alanından yoksun IgG kapsamında in vitro sistemde eksprese edilebildiğini bulmuşlardır. Buluş sahipleri doğal tip fare IgM'li farede yeniden düzenlenmemiş hVR minilokustan hVR eksprese etmiştir. Eksprese edilen hVR CH1 alanından yoksun IgG2b üzerinde klonlanmıştır ve elde edilen hVR-IgG2bΔCH1 eksprese olmuştur ve hVR-IgG2bΔCH1 yapısı ile geçici olarak transfekte CHO hücre tarafından salgılanmıştır, fonksiyonel CH1 alanından yoksun IgG'ye, ör. ağır zincir antikoru gibi, geçtiğinde doğal tip IgM'ye sahip farede seçilmiş hVR'nin eksprese olabildiği ve hücre tarafından salgılanabildiği etkili bir şekilde elde edilmiştir.

Buluş sahipleri CH1 alanlarından yoksun ve CHO hücrelerinde hVR veya insan camelized VR (hVR*) sahip ağır zincirler eksprese etmek için bir in vitro sistem kurmuştur. VR'ler endojen fare ağır zincir lokusunun insan ağır zincir değişken bölge minilokus (üç insan V bölge gen segmentlerine, 6-1, 1-2 ve 1-3, tüm insan DH gen segmentlerine ve tüm insan JH gen segmentlerine sahip) ile yer değiştirmesini içeren RAG fareden elde edilmiştir. Endojen fare immünoglobulin kappa ve lambda hafif zincir lokusları intakt ve fonksiyonel idi.

Kimerik ağır zincir (hVR-mFc) ve camelized ağır zincir (hVR*-mFc) yapıları yukarıda açıklandığı gibi minilokus taşıyan fareden elde edilen VR sekanslarını kullanarak CHO hücrelerinde ekspresyon için yapılmıştır. Kimerik ağır zincirler, kimerik bir ağır zincir (hVR-mFc) ve fare hafif zinciri içeren fonksiyonel bir antikor oluşturmak için farede B hücre gelişimi sırasında normal V-D-J rekombinasyon ürünüdür. hVR-mFc ve hVR*-mFc yapıları hem CH1 alanına sahip hem de CH1 alanından yoksun yapılmıştır.

CHO hücrelerinde hVR-mFc ve hVR*-mFc yapılarının geçici transfeksiyonu CH1 alanının yokluğunda hVR'lere ve hVR*'lere sahip ağır zincirlerin eksprese olduğunu ve supernatant içinde çözünür kaldığını göstermiştir. CH1 alanı varlığında, ya hVR ya da hVR* içeren ağır zincirler supernatant içinde eksprese olmamıştır. Bu gözlem bu ağır zincir antikorların camelid VHH alanları

kullanmadan, ör. CH1 alanından yoksun insan veya fare VH alanları kullanarak yapılabildiğini göstermiştir.

İnsansılaştırılmış (*Humanized*) Ağır Zincir Antikorları

Bir ağır zincir antikorunun insansılaştırılmış (humanized) versiyonunu üretmek için modifikasyon için hayvan homozigotu antijen ile bağışıklanır ve hayvanın spesifik immün cevabı elde edildiğinde bağışıklanmış hayvanın dalağından hücreler hibridoma hücreler üretmek içim uygun ölümsüz bir hücre (ör. miyelom hücresi) ile birleştirilir. Alternatif olarak, antikorlar doğrudan bağışıklanmış hayvanın B hücrelerinden elde edilebilir. Hidridoma hücrelerinden alınan (ör. izole edilmiş B hücrelerinden) supernatantlar enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ile antikor varlığı açısından taranır ve antijene özgü antikorlar istenen özelliklere bağlı olarak seçilebilir.

Ağır zincir değişken bölge (VH) nükleik asitleri hibridoma ve/veya B hücrelerinden teknikte bilinen standart moleküler biyoloji teknikleri (Sambrook, et al. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel, et al. 1995. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons) kullanılarak izole edilebilir. VH nükleik asit sekansı belirlendiğinde ortaya çıkan amino asit sekansı benzer sekansa sahip ilgili VH sekansları grubunun tanımlanması için elde edilebilir ve diğer insan VH sekansları ile kıyaslanabilir. İlgili VH sekansları teknikte uzman kişilerce mevcut olan antikor veritabanları kullanılarak elde edilebilir, ör. The International ImMunoGeneTics Information System® (IMGT®). Bu karşılaştırma ya gözle ya da alternatif olarak elektronik olarak bir sıralama programı (ör. CLUSTAL) kullanarak yapılan sekans sıralaması ile gerçekleştirilebilir. Bu karşılaştırmada, tamamlayıcılık-belirleme bölgesi (CDR) ve çerçeve bölgeler (FR) tanımlanır. CDR ve FR kalıntıları standart sekans tanımına göre belirlenir (ör. Kabat et al. 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md.; Chothia and Lesk, 1987. J. Mol Biol. 196:901-917). İmmünoglobulin ağır zincir sekansının CDR ve FR bölgelerinin numaralandırma ve belirleme yöntemlerinde bazen tutarsızlıkların olabileceği teknikte uzman kişilerce bilinir. Bu durumlarda, yapısal tanımlama tercih edilir ancak sekans tanımı yöntemi tarafından tanımlanan kalıntılar ağır zincir sekanslarının kıyaslamasına bağlı olarak ikame etmek için hangi çerçeve kalıntısının belirlenmesi açısından önemli FR kalıntıları olarak kabul edilir.

Bir kez sıralandığında, VH sekanslarında ikame edilebilir pozisyonlar tanımlanır. İzole edilmiş VH sekansındaki pozisyonda amino asit özdeşliği insan VH sekanslarında kıyasla değişirse, o pozisyon izole edilmiş VH sekansının o pozisyondaki ikame uygunluğu için değerlendirilir. Böylece, kıyaslandığı diğer ilgili insan VH sekansı(ları) ile değiştiği izole edilmiş VH sekansındaki herhangi bir pozisyon potansiyel olarak, diğer ilgili insan VH sekanslarının birinde veya herhangi birinde bulunan karşılık gelen pozisyondaki amin asit ile ikame olabildiği pozisyon olarak sayılabilir. Diğer ilgili insan VH sekansları, ör. değişkenlik göstermeyenler, ile özdeşliği paylaşan pozisyonlar ikame

edilemeyen pozisyonlar olarak belirlenir. Çeşitli örneklerde, yukarıdaki yöntemler konsensüs insan ağır zincir antikor sekansı sağlamak için kullanılır.

Burada açıklanan amaca yönelik insansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikoru, önceden belirlenen antijene bağlanabilen ve insan FR amino asit sekansına kıyasla oldukça benzer ya da aynı amino asit sekansına sahip FR bölgesi ve non-human CDR amino asit sekansına oldukça benzer veya aynı amino asit sekansına sahip CDR içeren immünoglobulin ağır zincir amino asit sekansı varyantı veya kısmıdır. Genel olarak, insansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikoru, non-human kaynaktan türetilmiş bir veya daha fazla amino asit kalıntılarına sahiptir. Bu kalıntılar tipik olarak ağır zincir değişken alanından türetilir. Ayrıca, bu kalıntılar örneğin afinite ve/veya spesifite yanı sıra antikor fonksiyonu ile ilişkili diğer istenen biyolojik aktivite gibi ilişkili özelliklere sahip olabilir.

Çeşitli düzenlemelerde, insansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikoru, tüm ya da neredeyse tüm CDR bölgelerinin non-human VH alanlarındakilere karşılık geldiği ve tüm ya da neredeyse tüm FR bölgelerinin insan VH alan sekansındakiler olduğu VH alanlarının neredeyse tümünün en az birini ve diğer düzenlemelerde en az ikisini içerir. İnsansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikoru, bir düzenlemede en az bir CH1 alanından yoksun ve bir düzenlemede aynı zamanda insan Fc'nin bağlantı (menteşe) bölgesinden de yoksun özgün bir immünoglobulin sabit bölge (Fc) içerecektir. Bir düzenlemede, ağır zincir antikor hafif zincir içermeyecektir ve immünoglobulin G (IgG) ağır zincir sabit bölgesinin CH2 ve CH3 bölgelerini içerecektir. Bir düzenlemede, ağır zincir antikorun sabit bölgesi IgG ağır zincir Fc'nin bağlantı (menteşe), CH2 ve CH3 bölgelerini içerecektir. Bir düzenlemede, ağır zincir antikorun sabit bölgesi IgM'nin CH1 bölgesini içerecektir.

İnsansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikoru IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 içeren herhangi bir IgG sınıfından seçilecektir. Çeşitli düzenlemelerde, sabit bölge birden fazla IgG sınıfını içerebilir ve istenen efektör fonksiyonlarını optimize etmek için belirli sabit bölgelerin seçimi teknikte sıradan tecrübe dahilindedir.

Genel olarak, insansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikorunun ağır zincir FR ve ağır zincir CDR bölgeleri parental sekanslara, tam olarak karşılık gelmesi beklenmez, ör. non-human ağır zincir CDR veya insan ağır zincir FR'ler en az bir kalıntının ikamesi, eklenmesi veya çıkarılması ile değiştirilebilir, böylece ağır zincir CDR veya verilen yerdeki ağır zincir FR kalıntısı ya insan ağır zincir FR sekansına ya da non-human ağır zincir CDR sekansına karşılık gelmez. Ancak bu mutasyonlar genişletilmeyecektir. Bir düzenlemede, insansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikor kalıntılarının en az %75'i parental ağır zincir FR ve ağır zincir CDR sekanslarınınkine karşılık gelecektir, başka bir düzenlemede %90 ve başka bir düzenlemede %95'ten fazla.

Burada açıklandığı gibi insansılaştırılmış (humanized) ağır zincir antikorları bir düzenlemede parental sekansların ve çeşitli in silico kavramsal insansılaştırılmış (humanized) kompozit sekansları analiz prosesi ile mevcut ve teknikte uzman kişilerce bilinen bilgisayar programları kullanılarak hazırlanır. İnsansılaştırılmış (humanized) versiyonları yapmak ve/veya immunojenesite, afinite, vb. gibi özelliklerin değişimi ne yönelik sekans modifikasyonları teknikte bilinen yöntemler kullanılarak yapılır (ör. US 5,565,332 Hoogenboom et al.; US 5,639,641 Pedersen et al.; US 5,766,886 Studnicka et al.; US 5,859,205 Adair et al.; US 6,054,297 Carter et al.; US 6,407,213 Carter et al.; US 6,639,055 Carter et al.; US 6,849,425 Huse et al.; US 6,881,557 Foote; US 7,098,006 Gorman et al.; US 7,175,996 Watkins et al.; US 7,235,643 Nicolaides et al.; US 7,393,648 Rother et al.; US 7,462,697 Couto et al.).

Çeşitli örneklerde, parental ağır zincir antikor varyantı yapmak için parental ağır zincir antikor sekansına planlanan ikameler bir düzenlemede parental ağır zincir antikorunun antijen bağlayıcı aktivitesini sağlayanlardır veya başka bir düzenlemede artıranlardır. Genel olarak, parental ağır zincir antikorunun ağır zincir antikor varyantı belirli antijene parental ağır zincir antikorunun bağlayıcı afinitesinin en az %10, en az %20, en az %30, en az %40, en az %50, en az %60, en az %70, en az %80, en az %90 veya en az %100'ü (ör. en az %150, en az %200, en az %500, en az %1000 veya en az %10000'e kadar) olan antijen bağlayıcı afiniteye sahiptir. Bazı düzenlemelerde, ağır zincir antikor varyantı parental ağır zincir antikoruna kıyasla tek bir ikame içerecektir. Ancak, diğer örneklerde, birçok amino asit, ör. yaklaşık 5 veya 10 veya daha fazlası, verilen pozisyonda özdeşliği paylaşan diğer insan ağır zincir sekanslarından türemiş parental ağır zincir antikor sekansına kıyasla ikame edilir. Bir düzenlemedeki ikameler konservatiftir (ör. yer değiştirilecek kalıntıya benzer özellikleri paylaşan bir amino asit) ve başka bir düzenlemede non-konservatiftir (ör. yer değiştirilecek kalıntıdan farklı özellikler paylaşan bir amino asit). Çeşitli örneklerde, elde edilen varyant ağır zincir antikoru istenen bağlayıcı afinitenin ve/veya spesifitenin yer değiştiren kalıntılar tarafından anlamlı olarak azalmadığını doğrulamak için test edilir. Bazı düzenlemelerde, gelişmiş varyant ağır zincir antikoru farklı insan ağır zincir sekanslarından amino asitlerin ikamesi ile üretilir.

Doğal olarak oluşan ağır zincir antikorları (ör. devegillerde bulunan) geleneksel antikor moleküllerindeki (ör. iki ağır zincir ve iki hafif zincir) ağır ve hafif zincir değişken bölgeleri arasındaki arayüze karşılık gelen pozisyonlardaki özgün amino asit kalıntılarını içermek için gösterilmektedir. Bu arayüz kalıntılarının geleneksel antikorlarda birbirine göre iki zincirin proksimitesini veya oryantasyonunu etkilediği bilinmektedir. Bu doğal ağır zincir antikorlarının hafif zincir değişken bölgelerin yokluğu ile körele kalıntıların yer değişimini içerdiği bilinmektedir, karakteristik immünoglobulin katını korumak için geleneksel antikorlarına kıyasla sekanstaki diğer pozisyonlarda kalıntıları muhafaza ederler. Doğal ağır zincir antikorlarında bulunan ikameler L11S, V37F, G44E, L45R veya L45C, W47G ve ağır zincir değişken bölgenin CDR1 ve CDR3'ü arasındaki disülfit bağa

katkıda bulunan ilave sistein kalıntılarıdır. Bazı örneklerde, ağır zincir antikorları bu pozisyonlarda parental antikorun kalıntılarını muhafaza eder. Diğer örneklerde, parental antikor doğal ağır zincir antikorlarındaki kalıntılar ile ilişkili bu pozisyonlarda mutasyonlar gösterir. Bazı düzenlemelerde, burada açıklandığı gibi genetik olarak modifiye edilmiş fareden izole edilmiş VH sekanslarından türemiş insansılaştırılmış (humanized) bir ağır zincir antikoru yaparken parental ağır zincir antikorunda bulunan ile aynı olan kalıntıyı bu pozisyonların en az birinde veya bir örnekte tüm bu pozisyonlarda muhafaza etmek planlanabilir. Çeşitli örneklerde, teknikte uzman bir kişi bu arayüz kalıntılarının mantıklı bir şekilde burada açıklanan genetik olarak modifiye edilmiş fare tarafından yapılan ağır zincir antikorlarındaki zincir arası etkileşimlere dahil olması beklenmez.

Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Hayvanların Oluşumu

Ağır zincir antikoru eksprese eden bir hayvan oluşumuna yönelik genetik modifikasyonlar farenin örnek olarak kullanımı ile uygun bir şekilde açıklanır. Buluşa göre genetik olarak modifiye edilmiş fare çeşitli yollarla yapılabilir, bunun belirli düzenlemeleri aşağıda tartışılmaktadır.

IgG1 lokusunun şematik bir gösterimi (ölçekli değildir) IgG1 lokusundaki CH alanı hizalanmasını göstermek için Şekil 1'de sağlanır. Gösterildiği gibi, CH1, CH2 ve CH3 alanları ve bağlantı (menteşe) bölgesi geçiş bölgesinin nükleotid aşağı bölgesi kolaylıkla tanımlanabilir aralığında bulunur.

IgG'nin CH1 alanını kodlayan nükleotid sekansından yoksun fakat bir bağlantı (menteşe) bölgesi içeren genetik olarak modifiye bir fare teknikte bilinen herhangi bir yöntemle yapılabilir. Örneğin, CH1 alanından yoksun fakat bir bağlantı (menteşe) içeren kesik IgG1 ile IgG1 geninin yer değiştirdiği bir hedef vektör yapılabilir. Şekil 2 endojen CH1 alanının yukarı bölge sekansını içeren 5' (genomik IgG1 geninin transkripsiyonunun yönüne göre) homoloji koluna, bunu takiben IgG1 bağlantısına (menteşesini), IgG1 CH2 alanına, IgG1 CH3 alanını kodlayan nükleotid sekanslarına, ilaç seleksiyon kasetine (ör. loxed dirençli gen) ve IgG1 transmembran alanına ve transmembran alanına göre sekans 3' içeren bir 3' homoloji koluna sahip hedef yapı ile hedeflenen bir fare genomunu (üst) gösterir. Lokustaki homolog rekombinasyonu ve ilaç seleksiyon kasetinin (ör. Cre tedavisi) uzaklaştırılması üzerine endojen IgG1 CH1 alanından yoksun IgG1 ile yer değiştirir (Şekil 2'nin altı; lox tarafı gösterilmemiş). Şekil 1 (IgG1ΔCH1, orta) bağlantı (menteşe) sekansına birleşmiş J bölge sekansına sahip IgG1 eksprese edecek elde edilen lokusun yapısını gösterir.

IgG1'in CH1 alanını kodlayan nükleotid sekansından yoksun ve bağlantı (menteşe) bölgesini kodlayan nükleotid sekansından yoksun genetik olarak modifiye bir fare teknikte bilinen herhangi bir yöntemle yapılabilir. Örneğin, IgG1 genini Ch1 alanını kodlayan bir sekanstan yoksun ve bağlantı (menteşe) bölgesini kodlayan bir sekanstan yoksun kesik IgG1 ile yer değiştiren bir hedef vektör yapılabilir. Şekil 3 endojen CH1 alanının yukarı bölge sekansını içeren 5' (genomik IgG1

geninin transkripsiyonunun yönüne göre) homoloji koluna, bunu takiben IgG1 CH2 alanını kodlayan nükleotid sekanslarına, IgG1 CH3 alanına, ilaç seleksiyon kasetine (ör. loxed dirençli gen) ve IgG1 transmembran alanına ve transmembran alanına göre sekans 3' içeren bir 3' homoloji koluna sahip hedef yapı ile hedeflenen bir fare genomunu (üst) gösterir. Lokustaki homolog rekombinasyonu ve ilaç seleksiyon kasetinin (ör. Cre tedavisi) uzaklaştırılması üzerine endojen IgG1 geni CH1 alanından yoksun (Şekil 3'ün altı; lox tarafı gösterilmemiş) IgG1 geni ile yer değiştirir. Şekil 1 (IgG1ΔCH1- Δmenteşe, alt) CH2 alanına birleşmiş J bölge sekansına sahip IgG1 eksprese edecek elde edilen lokusun yapısını gösterir.

IgG1 CH1 sekansından (IgG1ΔCH1) yoksun veya IgG1 CH1 sekansından ve bağlantıdan (menteşeden) yoksun bir genetik olarak modifiye edilmiş bir fare bir veya daha fazla diğer izotopları silerek, ör. IgG2b ve IgG2a kodlayan sekansları silerek ya da fonksiyonel olarak silerek ayrıca modifiye edilebilir. Örneğin, hedef yapı, endojen bağlantı (menteşe) bölge sekansının yukarı bölge sekansını (veya endojen CH1 alanının yukarı bölgesini) içeren 5' homoloji koluna, IgG1 CH2 alanını ve CH3 alanını kodlayan sekanslara, ilaç seleksiyon kasetine, ardından IgG1 transmembran alanını, ve istenirse başka bir ilaç seleksiyon kasetine sahip olarak yapılır. Lokustaki homolog rekombinasyonu ve ilaç seleksiyon kasetinin (ör. Cre tedavisi) uzaklaştırılması üzerine endojen ağır zincir lokusu sadece iki IgG geni içerir: endojen IgG3 ve IgG1ΔCH1 (bakınız Şekil 4, alt; rekombinaz tarafı gösterilmemiş; bakınız Şekil 6, alt).

IgG1ΔCH1-Δmentee veya IgG1ΔCH1ΔIgG2aIΔgG2b aleline sahip genetik olarak modifiye edilmiş farede eksprese olmuş IgG1 Şekil 10'un sağ panelinde gösterildiği gibi bir yapıya sahip olacaktır, ör. VH alanı CH2 alanında birleşecektir. Karşılaştırma için Şekil 10'un sol paneli doğal tip bir antikor sağlar; CH1 alanının bağlantı (menteşe) bölgesi ile CH2 alanına bağlanmasını ve hafif zincir sabit alanı CL'ye gösterir disülfit bağı ile bağlanır. Aksine, genetik olarak modifiye edilmiş fare tarafından yapılan antikor bağlantı (menteşe) ve CH1 alanlarından yoksundur ve dolayısıyla herhangi bir CL alanından yoksundur.

Yukarıda açıklandığı gibi genetik olarak modifiye edilmiş fareler ve diğerleri uygun bir fare ES hücresine (bir veya daha fazla bağımsız hedefler) uygun bir hedef yapı sokarak yapılır ve hedef yapının bir markör veya seleksiyon kasetini içeren pozitif klonlar tanımlanır ve büyütülür. Klonlar daha sonra kimerik fare veya tamamen ES-hücresinden türemiş fare yapmak için uysun koşullar altında konak embriyoda donör ES hücreleri olarak kullanılır. Markör veya seleksiyon kaseti opsiyonel olarak ya ES hücre evresinde ya da kimerik veya ES hücre türemiş farede ör. loxed kaset uygulayarak ve Cre-içeren suş üreterek veya ES hücresinin Cre ekspresyon vektörü ile elektroporasyonu ile uzaklaştırılabilir.

IgG1ΔCH1-Δmenteşe aleline (heterozigot) sahip genetik olarak modifiye edilmiş fare buluşun bir düzenlemesine göre yapılmıştır. Serum fareden izole edilmiştir ve anti-fare IgG1 antikoru kullanarak ağır zinciri tespit etmek için Western (azalan koşullar) lekelenmiştir. doğal tip IgG1 ağır zincir boyutuna karşılık gelen bant gösteren bir doğal tip farenin aksine IgG1ΔCH1-Δmenteşe aleli içermek için genetik olarak modifiye edilmiş fare aynı zamanda VH, CH2 ve CH3 alanlarından oluşan ağır zincir antikorunun boyutunda beklenen anti fare IgG1 antikoru ile tepki veren ağır zincir eksprese etmiştir (bakınız Şekil 8).

ÖRNEKLER

Örnek 1: Ağır Zincir Antikorlarının *in vitro* Ekspresyonu

Kimerik ağır zincir yapıları moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak insan değişken bölgelerini murin IgG2b (mIgG2b) sabit bölge ile birleştirmek için yapılmıştır (ör. bakınız Maniatis et al. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory). Her bir yapı için insan değişken gen segmenti her iki eksonu (ör. lider sekans artı olgun sekansı) içeren tam uzunlukta insan değişken gen segmenti olup, endojen fare immünoglobulin ağır zincir lokusu ile üç hVR gen segmentlerinin yer değiştirmesini, tüm hDH gen segmentlerini ve tüm hJH gen segmentlerini içeren naive RAG fareden izole edilen IgM'nin hVR'sinde tanımlanmıştır. IgM antikorunun hafif zinciri fare hafif zinciri idi.

mIgG2b sekansının iki versiyonu kullanılmıştır; biri CH1 alanı ile ve biri CH1 alanı ile değil. Diğer birkaç yapı aynı zamanda transfeksiyon ve ekspresyon kontrolleri olarak hizmet vermek için de yapılmıştır. Birinci kontrol yapısı farenin IgG2a (mIgG2a) sabit bölgesinin (Kontrol I) CH2 ve CH3 alanlarına birleşmiş sitokin reseptörü kullanılarak yapılmıştır. Diğer iki kontrol murin ROR sinyal sekansını CH1 alanlı ve CH1 alansız murin IgG2a sekansı ile birleştirerek yapılmıştır (sırasıyla Kontrol II ve III).

Her insan değişken bölgenin camelized versiyonu da PCR yönlendirilmiş mutagenez teknikleri kullanılarak yapılmıştır (ör. bakınız Hutchinson et al. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. J. Biol. Chem. 253(18):6551-60). Her değişken bölge için deve benzeri özellikler içeren insan değişken bölge sekansı ile sonuçlanan insan değişken bölge sekansında spesifik mutasyon yaratmak için iki spesifik primer dizi kullanılmıştır. Değişken bölgenin 5' yarımını içeren bir ürünü amplifiye etmek için primer L1 (SEQ ID NO:1) ve HH1.2 mut BOT (SEQ ID NO:2) kullanılırken HH1.2 mut TOP (SEQ ID NO:3) ve m18.3.1 (SEQ ID NO:4) değişken bölgenin 3' yarımını amplifiye etmek için kullanılmıştır. Bu ürünler saflaştırılmıştır ve primer L1 ve m18.3.1 kullanılarak üçüncü PCR reaksiyonuna şablon olarak kullanmak üzere birlikte karıştırılmıştır. Elde edilen camelized insan değişken bölge PCR ürünü klonlanmıştır, saflaştırılmıştır ve dizileme için doğrulanmıştır.

Tam uzunluktaki ağır incir yapıları (değişken ve sabit) insan değişken bölgelerinin (camelized ve non-camelized) ve sabit bölgelerinin kohezif uçlar vasıtasıyla birbirine izleyen ligasyon sağlamak için restriksiyon enzim bölgeleri içeren primerler ile amplifiye edilmesi ile yapılmıştır. Tüm tam uzunluktaki ağır incir yapıları ekspresyon vektörleri içine klonlanmıştır, saflaştırılmıştır ve yine dizileme ile doğrulanmıştır. Tablo 1 her ağır zincir yapısını, bunların SEQ ID NO'larını ve her yapının kısa açıklamasını sunmaktadır.

Tablo 1

Yapı	**Açıklama**	**SEQ ID NO (DNA/Protein)**
hVR-mFc	Fare IgG2b'ye birleşmiş non-camelized insan değişken bölge	5/6
hVR*-mFc	Fare IgG2b'ye birleşmiş camelized insan değişken bölge	7/8
hVR-mFcΔCH1	CH1 alanından yoksun fare IgG2b'ye birleşmiş non-camelized insan değişken bölge	9/10
hVR*-mFcΔCH1	CH1 alanından yoksun fare IgG2b'ye birleşmiş camelized insan değişken bölge	11/12

Kimerik ağır zincir yapıları immünoglobulin hafif zincir yokluğundaki ekspresyonu analiz etmek için Çin Hamster Yumurtalık hücrelerine (CHO-K1) geçici olarak transfekte olmuştur. Supernatantlar ve hücre lizatları, kemilüminesans ile anti-fare IgG antikoruna (Promega) konjüge yabanturpu peroksidaz (HRP) kullanarak ağır zincir varlığını tespit etmek için Western blot ile incelenmiştir. Tüm kimerik ağır zincir yapılar geçici olarak altı (6) bağımsız kez transfekte olmuştur. Transfeksiyonların temsili bir Western blot'ı Şekil 7'de gösterilmektedir.

CH1 alanlı ve CH1 alansız tüm kimerik ağır zincir yapılar yanı sıra kontrol yapıları hücre lizatında tespit edilmiştir. Sadece CH1 alanından yoksun yapılar supernatantlarda gözlenmiştir (Şekil 7, sol). Kontrol I ve Kontrol III (CH1 alanından yoksun fare Fc protein) de tespit edilmiştir fakat CH1 alanı içeren fare Fc proteini tespit edilmemiştir. CH1 alanı içeren hem camelized hem de non-camelized ağır zincir yapıları herhangi bir transfeksiyon için supernatantta tespit edilmemiştir (Şekil 7, sağ). Ancak, CH1 alanından yoksun hem camelized hem de non-camelized ağır zincir yapıları tüm transfeksiyonlar için supernatantta tespit edilmiştir. Bununla birlikte, sonuçlar CH1 alanından yoksun hVR'lerin (normal veya camelized) ekprese olabileceğini ve immünoglobulin hafif zincir yokluğunda geçici olarak transfekte olmuş CHO hücrelerinden salgılanabildiğini ancak CH1 alanı

içeren hVR'lerin (normal veya camelized) hafif zincir yokluğunda salgılanamadığını ortaya koymaktadır.

Örnek 2: Fare Ağır Zincir IgG1 Sabit Bölgenin Modifikasyonu

A. Fare IgG1-CH1-menteşe Hedef Vektörünün Hazırlanması (Şekil 3)

VELOCIMMUNE® farenin (aşağıda açıklanmıştır) ES hücresinden C57BL/6 aleli için Fare IgG1 sabit alanının CH1 ve menteşe bölgelerinin çıkarılmasını dahil eden hedef vektör yapısı oluşturulmuştur.

Hedef yapı, VELOCIGENE® teknolojisi kullanılarak Bakteriyel yapay kromozomu (BAC) BMQ 70p08 modifiye etmek için yapılmıştır (bakınız, ör. US Pat. No. 6,586,251 and Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659). Kalan IgG1 genini intakt olarak (ör. CH2, CH3 ve transmembran eksonlar) bırakırken BMQ 70p08 BAC DNA CH1 ve IgG1 sabit alanının menteşe bölgelerini silmek için modifiye edilmiştir.

Kısaca, homoloji kolunun üst ve alt bölgeleri sırasıyla primer m102 (SEQ ID NO:13) ve m104 (SEQ ID NO:14) ve m100 (SEQ ID NO:15) ve m99 (SEQ ID NO:16) kullanmak için yapılmıştır. Bu homoloji kolları, IgG1 sabit alanının CH2, CH3 ve transmembran bölgelerini muhafaza ederken IgG1 sabit alanının CH1 ve menteşe bölgelerini silen bir kaset yapmak için kullanılmıştır (bakınız, ör. Şekil 3). Hedef yapı, IgG1 geninin CH3 ve transmembran alan eksonları arasında konumlanan loxed higromisin bir dirençli gen içermektedir. CH1 ve menteşe eksonlarının (ör. IgG3, IgD, IgM) gen üst bölgesi ve IgG1 transmembran eksonun (ör. IgG2b, IgG21, IgE, IgA, vb) alt bölgesi hedef yapı ile modifiye edilmemiştir. Tüm sabit alanların geçiş bölgeleri hedef yapı tarafından modifiye edilmemiştir. Çıkarma boyunca olan nükleotid sekansı, çıkarma noktasında bulunan uçbirleştirme akseptör sekansını belirten şunları içermektedir: TGACAGTGTA ATCACATATA CTTTTTCTTG T(AG)TCCCAGA AGTATCATC (SEQ ID NO:17). Çıkarma sekansı, uçbirleştirme akseptörünün pre-CH1 sekansları 5' ve uçbirleştirme akseptörünün CH2 ekson sekansları 3' ile birlikte bir uçbirleştirme akseptörü (yukarıda parantez içinde yer alan AG) içerir.

B. Fare IgG1-CH1 Hedef Vektörünün Hazırlanması (Şekil 2)

VELOCIMMUNE® farenin (aşağıda açıklanmıştır) ES hücresinden 129/SvEvTac aleli için Fare IgG1 sabit alanının CH1 silinmesini dahil eden ikinci hedef vektör yapısı Örneğin A bölümünde açıklandığı gibi benzer bir yolla oluşturulmuştur.

Hedef yapı, VELOCIGENE® teknolojisi kullanılarak Bakteriyel yapay kromozomu (BAC) BMQ 70p08 modifiye etmek için yapılmıştır (bakınız, ör. US Pat. No. 6,586,251 and Valenzuela et al.

(2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659). Kalan IgG1 genini intakt olarak (ör. menteşe, CH2, CH3 ve transmembran eksonlar) bırakırken BMQ 70p08 BAC DNA IgG1 sabit alanının CH1 bölgesini silmek için modifiye edilmiştir.

İkinci hedef yapıya yönelik homoloji kolları CH1-menteşe hedef vektörüne (bu Örneğin A bölümünde açıklandığı gibi) yönelik olanlar ile aynıydı. Bu homoloji kolları, IgG1 sabit alanının CH2, CH3 ve transmembran bölgelerini muhafaza ederken IgG1 sabit alanının CH1 bölgesini silen bir kaset yapmak için kullanılmıştır (bakınız, ör. Şekil 2). Hedef yapı, IgG1 geninin CH3 ve transmembran alan eksonları arasında konumlanan loxed higromisin bir dirençli gen içermektedir. CH1 eksonununn (ör. IgG3, IgD, IgM) gen üst bölgesi ve IgG1 transmembran eksonun (ör. IgG2b, IgG21, IgE, IgA, vb) alt bölgesi hedef yapı ile modifiye edilmemiştir. Tüm sabit alanların geçiş bölgeleri hedef yapı tarafından modifiye edilmemiştir. Çıkarma boyunca olan nükleotid sekansı, çıkarma noktasında bulunan uçbirleştirme akseptör sekansını belirten şunları içermektedir: TGACAGTGTA ATCACATATA CTTTTTCTTG T(AG)TGCCCAG GGATTGTGGT TGTAAGCCTT GCATATGTAC AGGTAAGTCA GTAGGCCTTT CACCCTGACC C (SEQ ID NO:64). Çıkarma sekansı, uçbirleştirme akseptörünün pre-CH1 sekansları 5' ve uçbirleştirme akseptörünün menteşe ekson sekansları 3' ile birlikte bir uçbirleştirme akseptörü (yukarıda parantez içinde yer alan AG) içerir.

Örnek 3: ES Hücrelerinde Fare Ağır Zincir Sabit Bölgesinin Modifikasyonu

A. IgG1-CH1-Menteşe Hedef Vektörü ile Hedef Fare ES Hücreleri

Fare ES hücreleri yukarıda açıklanan hedef yapı ile hedeflenmiştir (ör. IgG1 geninin CH1 ve menteşe bölgelerinin çıkarılmasını dahil eden hedef yapı). ES hücresi 129 suşu ve C57BL/6 suşunun 50/50 karışımı olan, fare ağır zincir ve hafif zincir değişken bölge gen segmentlerinin yeniden düzenlenmemiş insan ağır zincir ve hafif zincir değişken bölge gen segmentleri ile yer değiştirmesini içeren genetik modifikasyonlar taşıyan VELOCIMMUNE® faredendi. C57BL/6 ile melezlemek için kullanılan 129 suşu fare ağır zincir ve hafif zincir değişken bölge gen segmentlerinin insan ağır zincir ve hafif zincir değişken bölge gen segmentleri ile yer değiştirmesini içeren bir suştur.

Heterozigot VELOCIMMUNE® fareler bir alelde 129 suşundan tek bir dizi endojen fare ağır zincir sabit bölge genlerini ve diğer alelde C57BL/6 suşundan tek bir dizi endojen fare ağır zincir sabit bölge genlerini taşır. 129 ağır zincir aleli, endojen fare ağır zincir değişken bölge gen segmentleri ile yer değiştiren (ör. endojen fare lokusunda) insan ağır zincir değişken bölge gen segmentleri olan ağır zincir değişken bölge gen segmentlerinin lokusu ile bitişiktir. BL/6 ağır zincir aleli, doğal tip fare ağır zincir değişken bölge gen segmentleri ile bitişiktir. VELOCIMMUNE® fareler doğal tip

endojen hafif zincir sabit bölge genlerini de taşır. Dolayısıyla, IgG, D, E veya A CH1 silinmesi içeren bir yapı ile 129 alelini hedefleyerek kimerik insan/fare ağır zincir antikoru üretilebilir, ancak benzer yapılı C57BL/6 alelini hedefleyerek CH1 alanından yoksun ve bağlantıdan (menteşeden) yoksun tamamen fare ağır zincir antikoru üretilebilir.

Yukarıda açıklanan VELOCIMMUNE® farelerden ES hücreleri Örnek 2'nin A bölümünün linearize hedef vektör ile elektroporate edilmiştir ve higromisin dirençli gen varlığı için seçilmiştir.

B. IgG1-CH1 Hedef Vektörü ile Hedef Fare ES Hücreleri

Benzer şekilde, fare ES hücresi Örnek 2'nin b bölümünde açıklanan CH1 hedef yapı ile hedeflenmiştir (ayrıca bakınız Şekil 2). ES hücresi 129/SvEvTac suşu ve C57BL/6 suşunun 50/50 karışımı olan, fare ağır ve hafif zincir değişken bölge gen segmentlerinin yeniden düzenlenmemiş insan ağır ve hafif zincir değişken bölge gen segmentleri ile yer değiştirmesini içeren genetik modifikasyonlar taşıyan VELOCIMMUNE® faredendi. C57BL/6 ile melezlemek için kullanılan 129/SvEvTac suşu fare ağır zincir ve hafif zincir değişken bölge gen segmentlerinin insan ağır zincir ve hafif zincir değişken bölge gen segmentleri ile yer değiştirmesini içeren bir suştur.

Heterozigot VELOCIMMUNE® fareler bir alelde129/SvEvTac suşundan tek bir dizi endojen fare ağır zincir sabit bölge genlerini ve diğer alelde C57BL/6 suşundan tek bir dizi endojen fare ağır zincir sabit bölge genlerini taşır. 129/SvEvTac ağır zincir aleli, endojen fare ağır zincir değişken bölge gen segmentleri ile yer değiştiren (ör. endojen fare lokusunda) insan ağır zincir değişken bölge gen segmentleri olan ağır zincir değişken bölge gen segmentlerinin lokusu ile bitişiktir. BL/6 ağır zincir aleli, doğal tip fare ağır zincir değişken bölge gen segmentleri ile bitişiktir. VELOCIMMUNE® fareler doğal tip endojen hafif zincir sabit bölge genlerini de taşır. Dolayısıyla, IgG, D, E veya A CH1 silinmesi içeren bir yapı ile129/SvEvTac alelini hedefleyerek kimerik insan/fare ağır zincir antikoru üretilebilir, ancak benzer yapılı C57BL/6 alelini hedefleyerek CH1 alanından yoksun ve bağlantıdan (menteşeden) yoksun tamamen fare ağır zincir antikoru üretilebilir.

VELOCIMMUNE® farelerden ES hücreleri yukarıda Örnek 2'nin B bölümünde açıklanan linearize hedef vektör ile elektroporate edilmiştir ve higromisin dirençli gen varlığı için seçilmiştir.

Örnek 4: Modifiye Edilmiş IgG1 Sabit Bölgesini Taşıyan Fareler Üretmek

A. IgG1-CH1-Menteşe Silinmesi Taşıyan Fareler

Yukarıda açıklanan hedeflenen ES hücreleri donör ES hücreleri olarak kullanılmıştır ve VELOCIMOUSE® yöntemi (bakınız, ör, US Pat. No. 7,294,754 and 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) ile 8-hücre evre fare embriyosuna verilmiştir. Hedeflenmiş C57BL/6 IgG1 alellerini taşıyan VELOCIMICE® (F0 fareler tamamen donör ES hücrelerinden türetilmiştir) silinmiş menteşe ve CH1 bölgelerinin üst ve alt bölümlerinde konumlanan sekansların varlığını tespit eden alel analizi modifikasyonu (Valenzuela et al., supra) kullanarak genotipleme ile tanımlanmıştır.

Hedef yapı ile katılan IgG1 CH3 eksonunun loxed hyg kasetinin alt bölümünün ve IgG1 transmembran eksonunun üst bölümünün uzaklaştırılması için IgG1 CH1 ve menteşe silinmesi için genotiplendirilen fareler (C57BL/6 alelinde, ör. fare aleli) Cre silici suşu (bakınız, ör. International Patent Application Publication No. WO 2009/114400) için yetiştirilmiştir (bakınız, ör. Şekil 3). Yavrular genotiplendirilmiştir ve IgG1 CH1 ve menteşe silinmesi için heterozigot olan yavrular C57BL/6 alelinden yavrunun serumunda eksprese edilen IgG1 ağır zincirini incelemek için seçilmiştir.

B. IgG1-CH1 Silinmesi Taşıyan Fareler

Benzer şekilde, IgG1 CH1 bölgesinin silinmesini taşıyan hedeflenen ES hücreleri donör ES hücreleri olarak kullanılmıştır ve VELOCIMOUSE® yöntemi (bakınız, ör, US Pat. No. 7,294,754 and 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) ile 8-hücre evre fare embriyosuna verilmiştir. Hedeflenmiş 129SvEv/Tac alellerini taşıyan VELOCIMICE® (F0 fareler tamamen donör ES hücrelerinden türetilmiştir) silinmiş CH1 bölgesinin üst ve alt bölümlerinde konumlanan sekansların varlığını tespit eden alel analizi modifikasyonu (Valenzuela et al., supra) kullanarak genotipleme ile tanımlanmıştır.

Hedef yapı ile katılan IgG1 CH3 eksonunun loxed hyg kasetinin alt bölümünün ve IgG1 transmembran eksonunun üst bölümünün uzaklaştırılması için IgG1 CH1 silinmesi için genotiplendirilen fareler (129/SvEvTac alelinde, ör. insan aleli) Cre silici suşu (bakınız, ör. International Patent Application Publication No. WO 2009/114400) için yetiştirilmiştir (bakınız, ör. Şekil 2). Yavrular genotiplendirilmiştir ve IgG1 CH1 silinmesi için homozigot olan yavrular modifiye edilmiş IgG1 ağır zincir ekspresyonunu incelemek için seçilmiştir.

Örnek 5: Modifiye Edilmiş IgG1 Genini Taşıyan Farelerden Ağır Zincir Antikorları

A. IgG1-ΔCH1-Δ Menteşe Fareler

Yukarıda CH1 ve menteşe silinmesini içeriyor olarak tanımlanan fare yavrusu ve doğal tip yavru yetiştirilmiştir ve yetiştirilen farelerden alınan serumlar anti-mIgG1 antikoru kullanılarak serumlarda eksprese edilmiş herhangi bir IgG tanımlamak için Western blot'a hazırlanmıştır. Kısaca, 1:100 fare serumlarının 10 µL'si SDS-PAGE azaltmada kullanıldı ve jel PVDF membranına transfer edildi.

Blot %0.05 Tween-20 (TBST; Sigma) ile Tris-Tampon Salin'de %5 yağsız süt ile gece boyunca bloklandı, TBST ile her yıkama için 5 dakika boyunca 4 kez yıkandı ve sonrasında oda sıcaklığında iki saat boyunca TBST'de %1 yağsız sütte 1:1000 seyreltilmiş primer antikora (keçi anti-mIhH1 konjüge HRP, Southern Biotech) maruz bırakıldı. Blot, her yıkma 5 dakika olacak şekilde 6 kez yıkandı. Blot 5 dakika boyunca SUPERSIGNAL™ West Pico Kemilüminesant İkamesi (Thermo Scientific) ile geliştirildi ve sonrasında 1 dakika boyunca filme maruz bırakıldı.

Hedeflenen donör ES hücreden türetilmiş VELOCIMOUSE® (%50 doğal tip BL/6; %50 ΔCH1-ΔMenteşe BL/6) alınan serum bantların bir karışımını ortaya koymuştur: bir bant yaklaşık 57.5kD olup doğal tip IgG için beklenen boyut ve bir bant yaklaşık 45 kD olup CH1 alanından ve bağlantı (menteşeden) yoksun IgG için beklenen boyut (Şekil 8). Sonuçlar, doğal tip BL/6 alelinden ve kendi ΔCH1-Δmenteşe BL/6 alelinden ΔCH1/Δmenteşe fare ağır zincirden normal fare ağır zinciri eksprese eden VELOCIMOUSE® ile uyumludur. Bu sonuç, fonksiyonel IgM geni ve CH1 alanından ve bağlantı (menteşe) alanından yoksun bir IgG geni taşıyan genetik olarak modifiye edilmiş farelerin serumda ağır zincir antikorlar eksprese edebildiklerini göstermektedir.

B. IgG1-ΔCH1 Fareler

Benzer şekilde, CH1 silinmesi için homozigot olan fare yavruları ve doğal tip yavrular yetiştirilmiştir. Yetiştirilen farelerden alınan plazma ve serum (beş homozigot; iki doğal tip için) anti-mIgG1 antikoru kullanılarak serumlarda eksprese edilmiş herhangi bir IgG tanımlamak için Western blot'a hazırlanmıştır (yukarıda açıklanmıştır). IgG1-ΔCH1 silinmesi için homozigot olan farelerden alınan serum ve plazmanın Western blot'u bantların bir karışımını göstermiştir: bir bant yaklaşık 45 kD olup CH1 alanından yoksun tek zincir IgG1 için beklenen boyut ve bir bant yaklaşık 75 kD olup CH1 alanından yoksun dimer IgG için beklenen boyut (veriler gösterilmemiştir). Sonuçlar, ister bir ister her iki ağır zincir lokusundan IgG1-ΔCH1 ağır zinciri eksprese eden homozigot VELOCIMICE® ile uyumludur. Bu sonuç, fonksiyonel IgM geni ve CH1 alanından yoksun bir IgG geni taşıyan genetik olarak modifiye edilmiş farelerin hayvanların immün sisteminin periferik lenfosit bölmesinde ağır zincir antikorlar eksprese edebildiklerini göstermektedir.

Örnek 6: IgG1-CH1-Manteşe Silinmesi için Homozigot olan Farelerin Özellikleri

IgG1-CH1-manteşe silinmesi için heterozigot olan VELOCIMICE® silinme için homozigot olan fareler elde etmek için beraber yetiştirilmiştir. Dört fare yavrusu IgG1 ΔCH1-Δmenteşe için homozigot olarak tanımlanmıştır. Bu dört fare ve doğal tip fare yetiştirilmiştir ve yetiştirilen farelerden alınan serumlar anti-mIgG1 antikoru kullanılarak serumlarda eksprese edilmiş herhangi bir IgG tanımlamak için Western blot'a hazırlanmıştır (yukarıda açıklandığı gibi). Şekil 9, bu deneyde kullanılan PVDF membranından geliştirilen filmi göstermektedir. Serum 1:5 ve 1:10 seyreltilmiştir ve her seyreltmenin 10 µL'si her fare için jelin üstüne yan yana yüklendi. Jel

görüntülerin en üst bölümlerinde, her farenin yanı sıra IgG1 (1) ve IgG2a (2a) için şeritler etiketlendi.

Doğal tip fareden alınan serum iki ağır zincir ve iki hafif zincir (yaklaşık 150 kD) içeren normal antikorlar eksprese eden doğal tip fare için beklenen paterni gösterdi. Tüm dört farenin (IgG1 ΔCH1-Δmenteşe için homozigot) her biri bantların bir karışımını gösterdi: bir bant yaklaşık 150 kD olup IgG1 dışında doğal tip IgG için beklenen boyut (ör. IgG2a, IgG2b veya IgG3) ve bir bant yaklaşık 45 kD olup CH1 alanından ve bağlantıdan (menteşeden) yoksun IgG için beklenen boyut (Şekil 9). Bu sonuçlar CH1 alanından ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun ve hafif zincirden yoksun IgG1 ağır zincir antikorunu eksprese eden fareler ile uyumludur. Bu sonuç ayrıca fonksiyonel IgM geni ve CH1 alanından ve bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun bir IgG geni taşıyan genetik olarak modifiye edilmiş farelerin serumda ağır zincir antikorlar eksprese edebildiklerini göstermektedir.

Başka bir deneyde, IgG'nin serum ekspresyonu ELISA analizi kullanılarak IgG1 ΔCH1-Δmenteşe için homozigot farelerden belirlenmiştir. Kısaca, ya mIgG1 ya da mIgG2b (Pharmingen) için spesifik antikorlar ayrı ayrı seyreltildi ve 100 µl/kuyucuk plakların üzerinde 1 x PBS'de (Irvine Scientific) 2 µg/ml'de kaplandı ve 4°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün plaklar %0.05 Tween-20 (PBST; Sigma) ile PBS ile 4 kez yıkandı. Dördüncü yıkamadan sonra, plaklar %5 BSA (Sigma) ile 250 µL/kuyucuk PBST ile bloklandı ve bir saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Serum ve standartlar, 400 ng/ml (mIgG1) veya 600 ng/ml (mIgG2b) başlangıç konsantrasyonunda plakta aşağı doğru (yukarıdan aşağıya) %0.5 BSA'da PBST'de seri olarak seyreltildi (seyreltme faktörü, 0.316). Bloklama sonrasında, plaklar tekrar PBST ile dört kez yıkandı. Dördüncü yıkamanın ardından, 100 µL serum veya standart plaklara eklendi ve oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edildi. Plaklar tekrar PBST ile dört kez yıkandı. Yıkamaların ardından, 100 µL biyotinile edilmiş saptama antikoru (10 ng/ml rat anti-mIgG1 veya 250 ng/ml anti-mIgG2b; Pharmingen) plaklara eklendi ve oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edildi. Plaklar tekrar yukarıda açıklandığı gibi yıkandı. Yıkamanın ardından, PBST'de streptavidin (HRP-SA) ile konjüge yabanturpu peroksidazın 1:20000 seyreltmesinin 100 µL/kuyucuk plaklara eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. Plaklar daha sonra PBST ile 6 kez yıkandı, ardından Sübstrat A ve B'nin (BD OPTEIA™; BD Biosciences) 1:1 seyreltmesinin 100 µL/kuyucuk plaklara eklendi ve plaklar karanlıkta tutuldu. Reaksiyon karanlıkta gelişti ve istenildiği gibi 1 N fosforik asit ile durduruldu (yaklaşık 15 dakika). Durdurulan reaksiyonlar Wallac 1420 Work Station VICTOR™ Plaka Okuyucuda 450 nm (1 saniye/okuma) absorpsiyon dalga boyunda okundu ve sonuçlar grafiklerde gösterildi (Şekil 11).

Doğal tip farelerden alınan serum normal seviyede IgG1 ve IgG2b gösterdi. IgG1 ΔCH1-Δmenteşe için homozigot olan fareler CH1 alanından ve periferde bağlantı (menteşe) bölgesinden yoksun

IgG1 eksprese edebilme yeteneğine sahiplerdi (serum, Şekil 11'in sol tarafı). Ayrıca, diğer IgG izotoplarının (ör. IgG2b) serum seviyeleri doğal tip seviyelerden dikkat çekici şekilde düşmemişti (Şekil 11'in sağ tarafı). Bu sonuç ayrıca fonksiyonel IgM geni ve CH1 alanından ve bağlantı (menteşe) alanından yoksun bir IgG geni taşıyan genetik olarak modifiye edilmiş farelerin serumda saptanabilen modifiye edilmiş IgG izotopu (ör. CH1 alanından ve bağlantıdan (menteşeden) yoksun) eksprese edebildiklerini göstermektedir.

Örnek 7: IgG1 Modifiye Farelerde V-D-J Yeniden Düzenlemelerin Analizi

A. IgG1-CH1-Menteşe Silinmesi için Homozigot Olan Fareler

IgG1 ΔCH1-Δmenteşe modifikasyonu için homozigot olan fareler, splenositlerden izole edilen RNA kullanarak ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile V-D-J rekombinasyonu ve ağır zincir gen kullanımı için analiz edildi.

Kısaca, dalaklar alındı ve steril tek kullanımlık çantalarda %5 HI-FBS ile 10 ml RPMI-1640 (Sigma) ile sıvandı. Tek bir dalak içeren her çanta daha sonra STOMACHER™ (Seward) içine yerleştirildi ve 30 saniyeye ayarlanan ortamda homojenize edildi. Homojenize edilen dalaklar 0.7 µm hücre süzgeci kullanılarak filtre edildi ve daha sonra santrifüj (10 dakika boyunca 1000 rpm) ile peletlendi ve kırmızı kan hücreleri (RBC) üç dakika boyunca BD PHARM LYSE™ (BD Biosciences) içinde lize edildi. Splenositler RPMI-1640 ile seyreltildi ve 1 ml PBS'de (Irvine Scientific) resüspansiyonun ardından tekrar santrifüjlendi. Peletlenmiş splenositlerden teknikte bilinen standart teknikler kullanılarak RNA izole edildi.

Fare ağır zincir değişken bölge (VH) gen segmentlerine (Novagen) ve fare IgG1 CH2 primerine (CGATGGGGGC AGGGAAAGCT GCAC; SEQ ID NO:40) özgü bir dizi dejenere primer kullanılarak splenosit RNA üzerinde RT-PCR gerçekleştirildi. PCR ürünleri jel ile saflaştırıldı ve pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen)'ya klonlandı ve M13 İleri GTAAAACGAC GGCCAG; SEQ ID NO:41) ve klonlama bölgesinin yanında bulunan pozisyonlardaki vektör sekansları içinde bulunan M13 Ters (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO:42) primerleri ile sıralandı. On dokuz klon ağır zincir gen kullanımını ve yeniden düzenlenmiş VH bağlantısının sekansını ve IgG1 sabit bölgenin CH2'sini belirlemek için dizelendi (Tablo 2).

Tablo 2

Ağır zincir gen kullanımı

Klon	V_H	D_H	J_H
B1	1-58	3-2	2

Tablo 2

Ağır zincir gen kullanımı

Klon	V_H	D_H	J_H
B2	1-26	4-1	1
B3	1-50	2-14	2
B4	1-58	3-2	2
B5	14-2	4-1	4
D2	3-6	1-1	4
D5	14-1	3-3	2
D6	14-2	4-1	3
D7	3-6	1-1	4
E2	7-1	3-1	4
E3	1-50	2-14	2
E4	1-50	2-14	2
E7	1-50	2-14	2
E8	1-72	1-1	4
E10	1-42	1-1	1
F6	5-6	1-1	1
F7	5-6	1-1	1
F8	5-6	1-1	1
F10	5-6	1-1	1

Şekil 12 on dokuz RT-PCR klonunun on biri için IgG1 sabit bölgesinin CH2'sine yeniden düzenlenmiş VH alanlarının sekans sıralamasını gösterir. Şekil 12'de gösterilen sekanslar farklı ağır zincir V, D ve J gen seğmenlerini ve CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgelerinden yoksun fare IgG1 içeren özgün yeniden düzenlemeleri gösterir. CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgelerinin silinmesi için homozigot fareler CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgelerinden yoksun fare IgG1 sabit bölgeden CH2-CH3 bölgesine işlevsel olarak bağlı fare VH alanlarını içeren ağır zincirler üretebilmekte ve CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgelerinden yoksun ve hafifi zincirden yoksun fare IgG1 ağır zincirler eksprese eden B hücrelerini üretebilmektedir (Şekil 8 ve 9). Bu yeniden düzenlemeler, modifiye edilmiş lokusların bağımsız olarak fare ağır zincir gen segmentlerini ve develerde normal olarak bulunanlara benzer ağır zincir antikorları üretmek için bu farelerdeki

bağımsız B hücrelerini çok kez yeniden düzenleyebildiğini göstermektedir. Ayrıca, bu Örnek endojen IgG1 CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgelerinin silinmesinin lokusu işlemez hale getirmediğini veya modifiye edilmiş IgG1 sabit bölge içeren rekombinasyonu önlemediğini göstermektedir. Bu fareler, B hücre gelişiminde tespit edilebilen herhangi bir hasar olmadan endojen repertuarın bir kısmı olarak CH1 ve bağlantı (menteşe) bölgelerinden yoksun IgG1 içeren fonksiyonel ağır zincir antikorlar yapmışlardır.

B. IgG1-CH1 Silinmesi için Homozigot Olan Fareler

Benzer şekilde, IgG1 ΔCH1 modifikasyonu için homozigot olan fareler splenositlerden izole edilen RNA kullanarak ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile V-D-J rekombinasyonu ve insan ağır zincir gen kullanımı için analiz edildi.

Kısaca, bu Örneğin A bölümünde yukarıda açıklandığı gibi dalaklar iki homozigot IgG1-ΔCH1 fareden izole edildi. CD19+ B hücreleri toplanan splenositlerden manyetik hücre sıralaması (MACS, Miltenyi Biotec) kullanılarak izole edildi. RNA, sıralanan CD19+ B hücrelerinden Qiagen ALLPREP™ DNA/RNA mini kit (Qiagen) kullanılarak ekstrakte edildi. cDNA'nın birinci strandı SUPERSCRIPT™ III Ters Transkriptaz ve Oligo (dT) 20 primer (Invitrogen) ile sentezlendi. Daha sonra cDNA 3' fare IgG1 menteşe spesifik primer ve insan ağır değişken öncü sekansına bağlanması planlanan 5' dejenere primerler ile gerçekleştirilen PCR için şablon olarak kullanıldı (Tablo 3). PCR ürünleri pCR2.1 TOPO™ TA vektöre (Invitrogen) klonlandı ve M13 İleri ve M13 Ters primerleri ile sıralandı (Örneğin A bölümünde yukarıda açıklandığı gibi).

Tablo 3

Primer	**Sekans (5'-3')**	**SEQ ID NO:**
hVHL-1	TCACCATGGA CTGSACCTGG A	43
hVHL-2	CCATGGACAC ACTTTGYTCC AC	44
hVHL-3	TCACCATGGA GTTTGGGCTG AGC	45
hVHL-4	AGAACATGAA ACAYCTGTGG TTCTT	46
hVHL-5	ATGGGGTCAA CCGCCATCCT	47
hVHL-6	ACAATGTCTG TCTCCTTCCT CAT	48
3' mIgG1 Menteşe	GCAAGGCTTA CAACCACAAT C	49

IgG1 ΔCH1 için homozigot farelerde ağır zincir gen kullanımını belirlemek için yirmi sekiz RT-PCR klonları sıralandı. Bu klonlar içinde, insan V, D ve J gen segmentlerinin yedi özgün yeniden düzenlemesi gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4

Ağır Zincir Gen Kullanımı

Klon	V_H	D_H	J_H
A2	1-69	6-19	6
A5	1-69	6-7	4
A8	1-8	4-4	4
C2	1-18	6-6	2
C4	1-18	3-16	6
D9	1-18	6-6	4
H8	1-18	1-7	4

Şekil 13, Tablo 4'te gösterilen yedi yeniden düzenleme için IgG1 sabit bölgenin menteşe-CH2-CH3'e yeniden düzenlenen VH alanlarının sekans sıralamasını gösterir. Şekil 13'te gösterilen sekanslar farklı insan ağır zincir V, D ve J gen segmentlerini ve CH1 bölgesinden yoksun fare IgG1 içeren özgün yeniden düzenlemeleri gösterir. Endojen IgG1 sabit bölge geninin CH1 bölgesinin silinmesi için homozigot fareler, CH1 alanından yoksun fare IgG1 sabit bölgesinden işlevsel olarak menteşe-CH2-CH3 bölgesine bağlı olan insan VH alanlarını içeren ağır zincirleri ve CH1 bölgelerinden yoksun ve hafif zincirden yoksun fare IgG1 ağır zincirlerini eksprese eden B hücrelerini üretebilmiştir (veri gösterilmemiştir). Bu yeniden düzenlemeler ister bir ister her iki modifiye edilmiş lokusun (IgG1 ΔCH1-Δmenteşe ve IgG1 ΔCH1) bağımsız olarak ağır zincir gen segmentlerini (fare ve insan) çok kez ve develerde normal olarak bulunanlara benzer ağır zincir antikorları üretmek için bu farelerdeki bağımsız B hücrelerini yeniden düzenleyebildiğini göstermektedir. Ayrıca, bu Örnek endojen IgG1 CH1 silinmesinin lokusu işlemez hale getirmediğini veya insan V, D ve J gen segmentlerini ve modifiye edilmiş IgG1 sabit bölge içeren rekombinasyonu önlemediğini göstermektedir. Bu fareler, insan ağır zincir V alanını ve B hücre gelişiminde tespit edilebilen herhangi bir hasar olmadan endojen repertuarın bir kısmı olarak CH1'den yoksun fare IgG1 içeren fonksiyonel ağır zincir antikorlar yapmışlardır.

SEKANS LİSTESİ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
<120> AĞIR ZİNCİR ANTİKOR ÜRETEN FARELER
<130> 0761A-WO
<140> To be assigned
<141> 2010-12-10
<150> 61/285,250
<151> 2009-12-10
<160> 64
<170> Fast SEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 1
tcaccatgga ctggacctgg a 21
<210> 2
<211> 40
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 2
cccatcaact cacactcttg tccaggggcc tgtcgaaacc 40
<210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 3
ctggtttcga caggcccctg gacaagagtg tgagttgatg 40
<210> 4
<211> 33

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 4

acgttccgga tgaggagacg gtgaccaggg ttc 33

<210> 5

<211> 1449

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 5

<210> 6

<211> 482

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 6

<210> 7

<211> 1449

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 7

[illegible]

[illegible]

<210> 8

<211> 482

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 8

<210> 9

<211> 1149

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 9

<210> 10

<211> 382

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<210> 11

<211> 1149

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 11

<210> 12

<211> 382

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 12

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 13
caacacaagt gcgatgcac 19
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 14
gattagcctc catgcctact c 21
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik

<400> 15

21 gatgatcatg tgggtagacc t

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 16

tctatgctat ctcagtgcta 20

<210> 17

<211> 49

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 17

tgacagtgta atcacatata ctttttcttg tagtcccaga agtatcatc 49

<210> 18

<211> 384

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 18

<210> 19

<211> 128

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 19

<210> 20

<211> 381

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 20

<210> 21

<211> 127

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 21

<210> 22

<211> 375

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 22

[illegible]

<210> 23

<211> 125

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 23

[illegible]

<210> 24

<211> 393

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 24

[illegible]

<210> 25

<211> 131

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 25

<210> 26

<211> 387

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 26

<210> 27

<211> 129

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 27

<210> 28

<211> 378

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 28

<210> 29

<211> 126

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 29

<210> 30

<211> 369

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 30

<210> 31

<211> 123

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 31

<210> 32

<211> 399

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 32

<210> 33

<211> 133

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 33

<210> 34

<211> 399

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 34

<210> 35

<211> 133

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 35

<210> 36
<211> 375
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 36

<210> 37
<211> 125
<212> PRT
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 37

<210> 38

<211> 396

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 38

<210> 39

<211> 132

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 39

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 40

cgatgggggc agggaaagct gcac 24

<210> 41

<211> 16

<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 41
gtaaaacgac ggccag 16
<210> 42
<211> 17
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 42
caggaaacag ctatgac 17
<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<221> variation
<222> (14)...(14)
<223> s = c or g
<220>
<223> sentetik
<400> 43
21 tcaccatgga ctgsacctgg a
<210> 44
<211> 22
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<221> variation
<222> (17)...(17)
<223> y = c or t
<220>
<223> sentetik
<400> 44
ccatggacac actttgytcc ac 22

<210> 45
<211> 23
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 45
23 tcaccatgga gtttgggctg agc
<210> 46
<211> 25
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<221> variation
<222> (14)...(14)
<223> y = c or t
<220>
<223> sentetik
<400> 46
25 agaacatgaa acayctgtgg ttctt
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 47
atggggtcaa ccgccatcct 20
<210> 48
<211> 23
<212> DNA
<213> Yapay sekans
<220>
<223> sentetik
<400> 48
acaatgtctg tctccttcct cat 23
<210> 49
<211> 21

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 49

gcaaggctta caaccacaat c 21

<210> 50

<211> 381

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 50

<210> 51

<211> 127

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 51

<210> 52

<211> 378

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 52

<210> 53

<211> 126

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 53

<210> 54

<211> 378

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 54

<210> 55

<211> 126

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<210> 56

<211> 408

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 56

<210> 57

<211> 136

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 57

<210> 58

<211> 372

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 58

<210> 59

<211> 124

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 59

<210> 60

<211> 378

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 60

<210> 61

<211> 126

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 61

<210> 62

<211> 390

<212> DNA

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 62

<210> 63

<211> 130

<212> PRT

<213> Yapay sekans

<220>

<223> sentetik

<400> 63

<210> 64

<211> 101

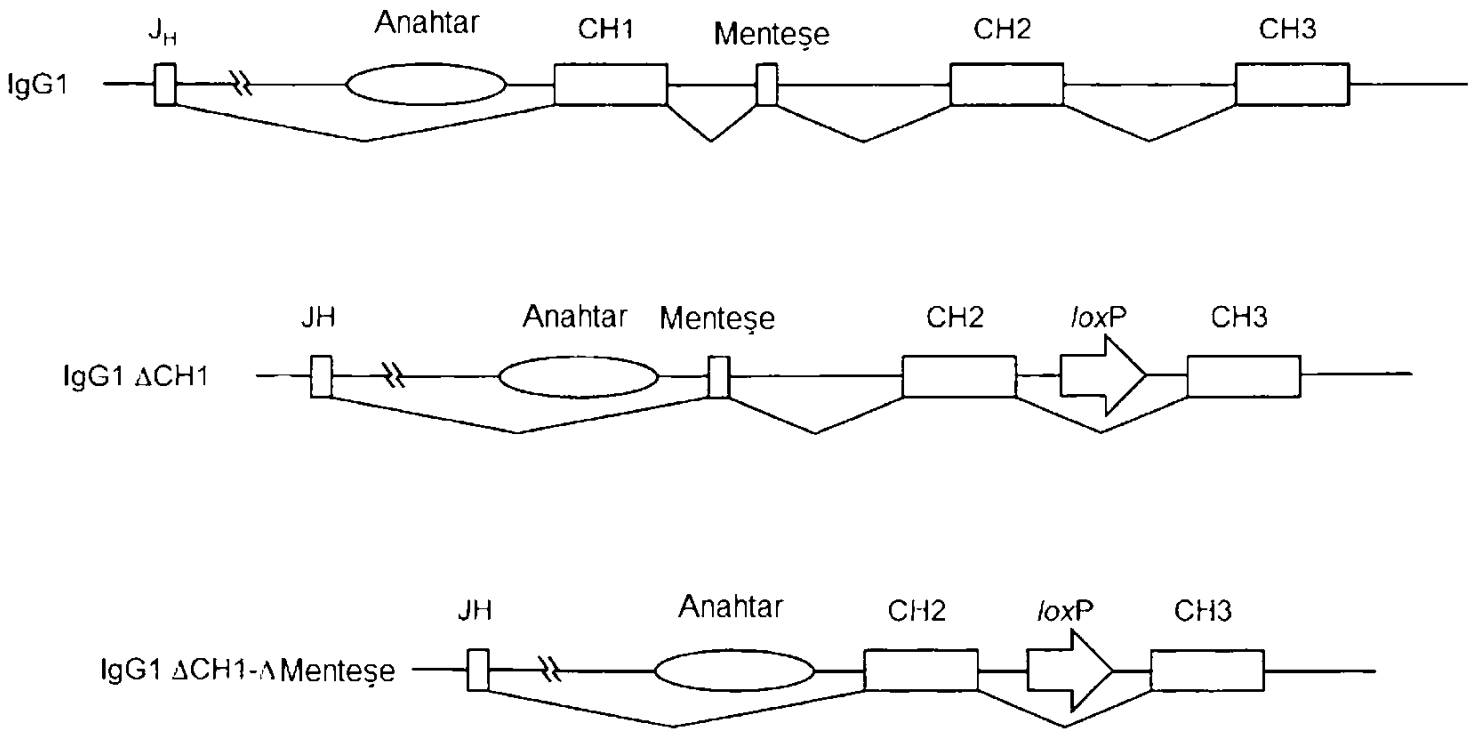
<212> DNA

<213> Yapay sekans

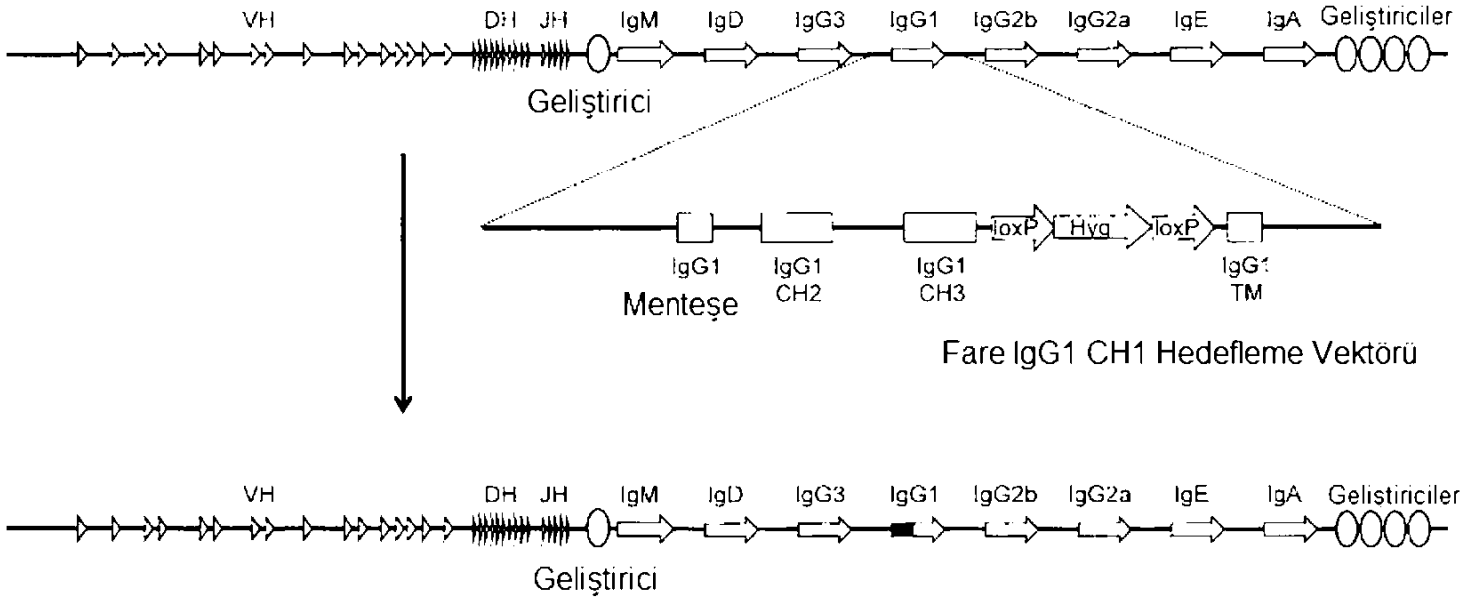
<220>

<223> sentetik

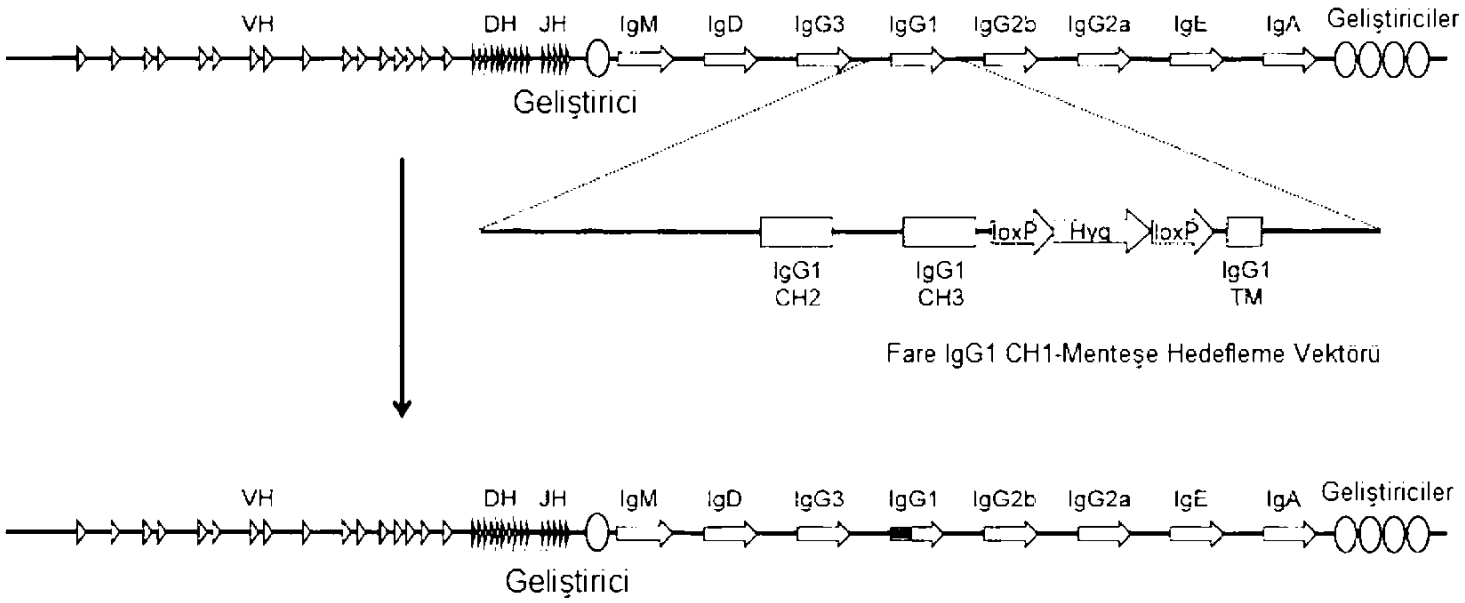
<400> 64


IgG1
J_H
Anahtar
CH1
Menteşe
CH2
CH3
IgG1 ΔCH1
JH
Anahtar
Menteşe
CH2
loxP
CH3
IgG1 ΔCH1-ΔMenteşe
JH
Anahtar
CH2
loxP
CH3

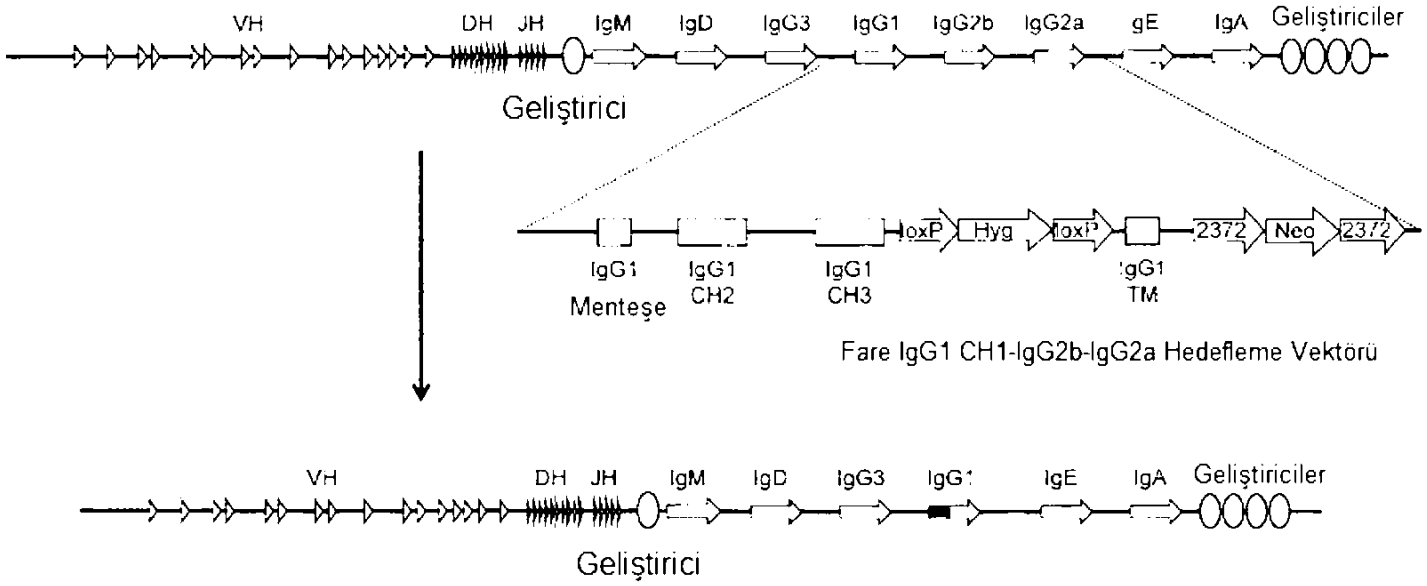
Şekil 1


VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgG2b
IgG2a
IgE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici
IgG1
Menteşe
IgG1
CH2
IgG1
CH3
loxP
Hyg
loxP
IgG1
TM
Fare IgG1 CH1 Hedefleme Vektörü
VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgG2b
IgG2a
IgE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici

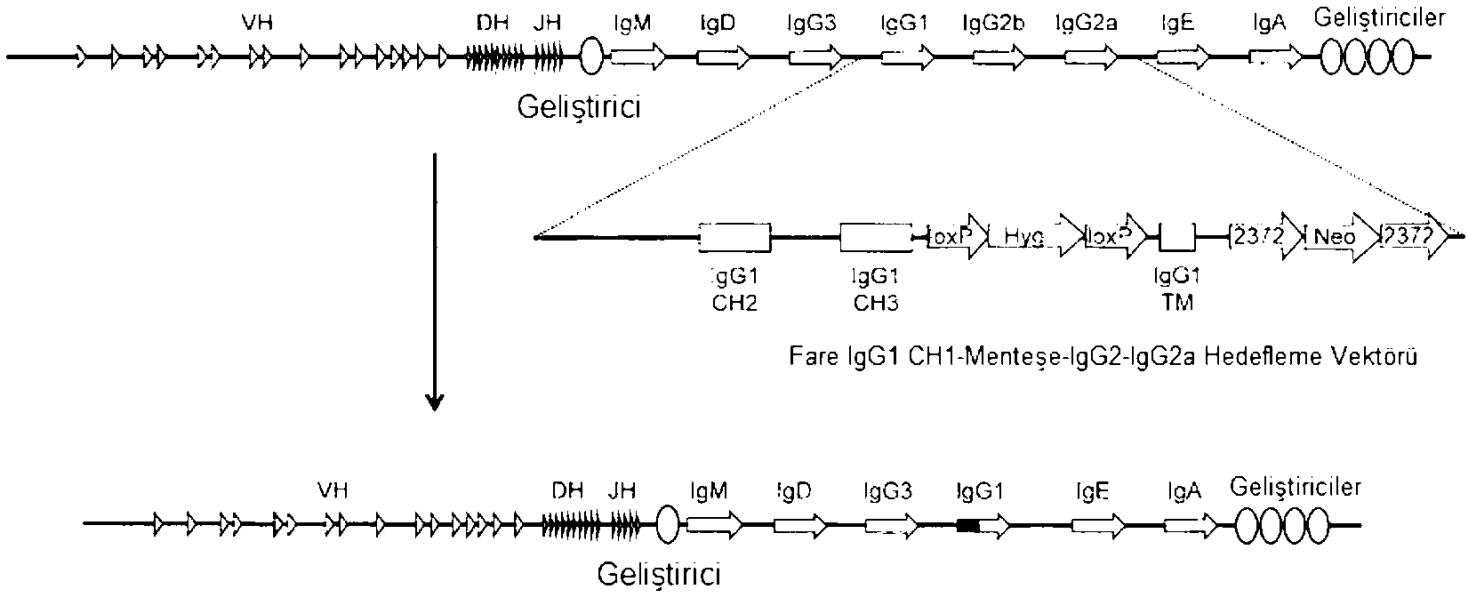
Şekil 2


VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgG2b
IgG2a
IgE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici
loxP
Hyg
loxP
IgG1
CH2
IgG1
CH3
IgG1
TM
Fare IgG1 CH1-Menteşe Hedefleme Vektörü
VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgG2b
IgG2a
IgE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici

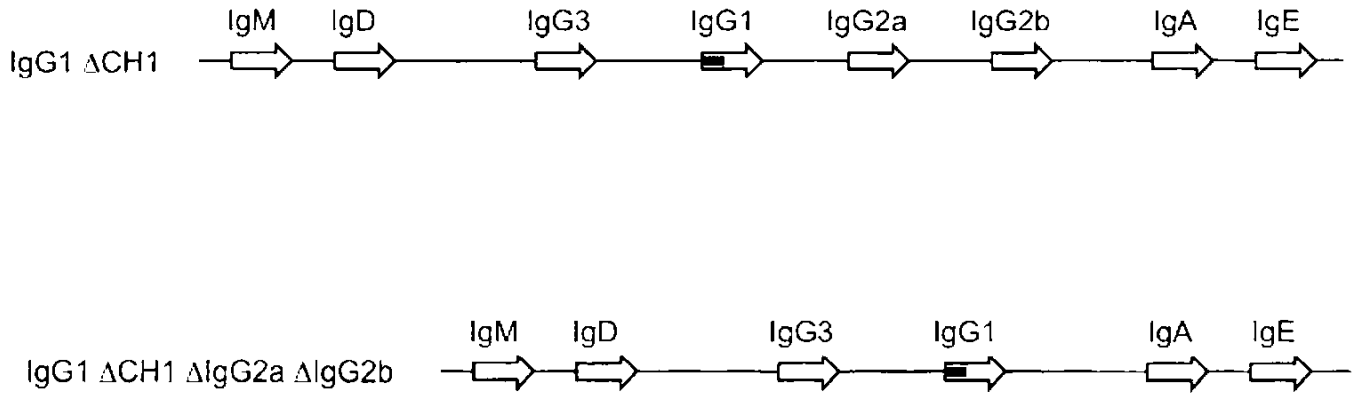
Şekil 3


VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgG2b
IgG2a
gE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici
IgG1
Menteşe
IgG1
CH2
IgG1
CH3
loxP
Hyg
loxP
IgG1
TM
2372
Neo
2372
Fare IgG1 CH1-IgG2b-IgG2a Hedefleme Vektörü
VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici

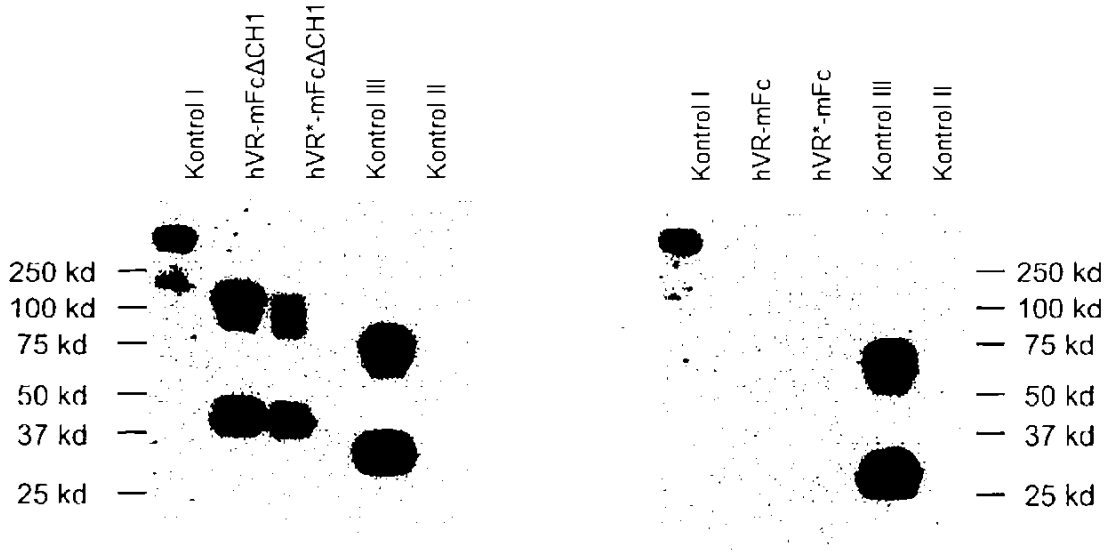
Şekil 4


VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgG2b
IgG2a
IgE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici
loxP
Hyg
loxP
2372
Neo
2372
IgG1
CH2
IgG1
CH3
IgG1
TM
Fare IgG1 CH1-Menteşe-IgG2-IgG2a Hedefleme Vektörü
VH
DH
JH
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgE
IgA
Geliştiriciler
Geliştirici

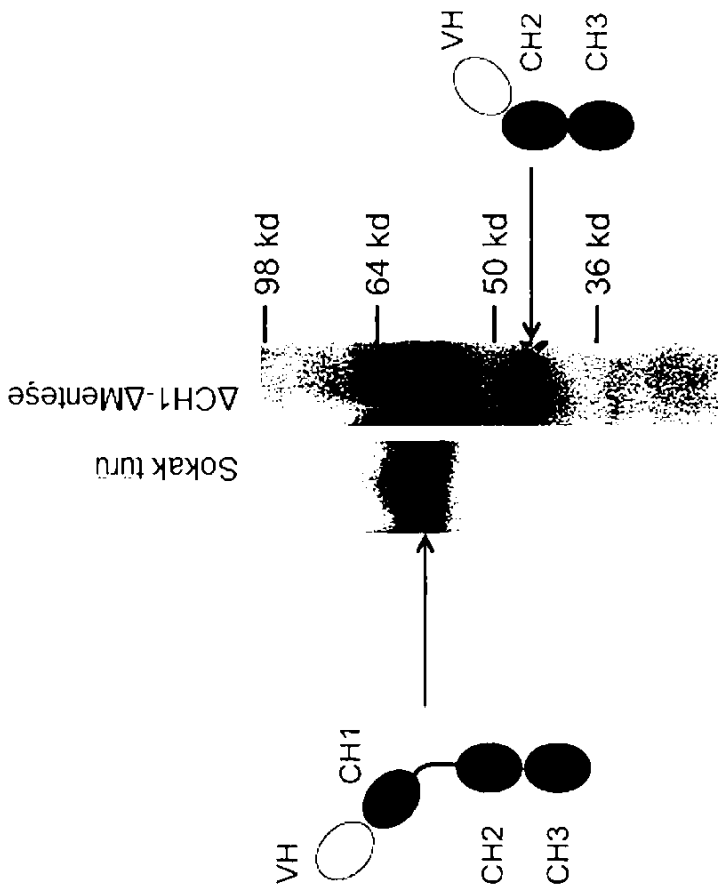
Şekil 5


IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgG2a
IgG2b
IgA
IgE
IgG1 ΔCH1
IgM
IgD
IgG3
IgG1
IgA
IgE
IgG1 ΔCH1 ΔIgG2a ΔIgG2b

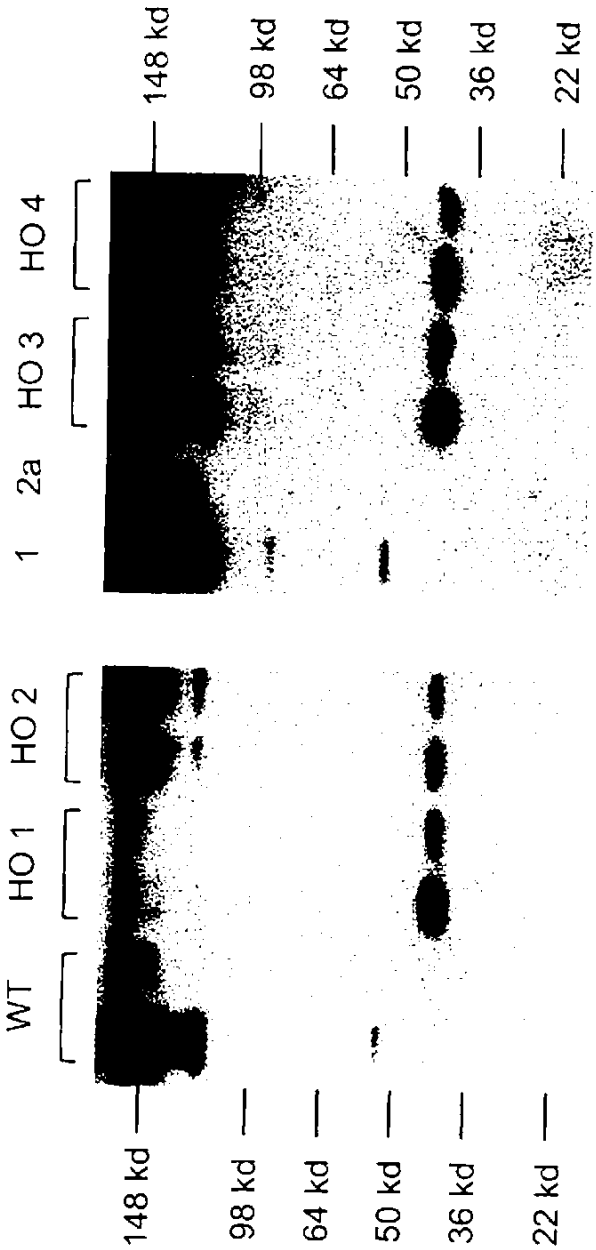
Şekil 6


Kontrol I
hVR-mFcΔCH1
hVR*-mFcΔCH1
Kontrol III
Kontrol II
250 kd
100 kd
75 kd
50 kd
37 kd
25 kd
Kontrol I
hVR-mFc
hVR*-mFc
Kontrol III
Kontrol II
250 kd
100 kd
75 kd
50 kd
37 kd
25 kd

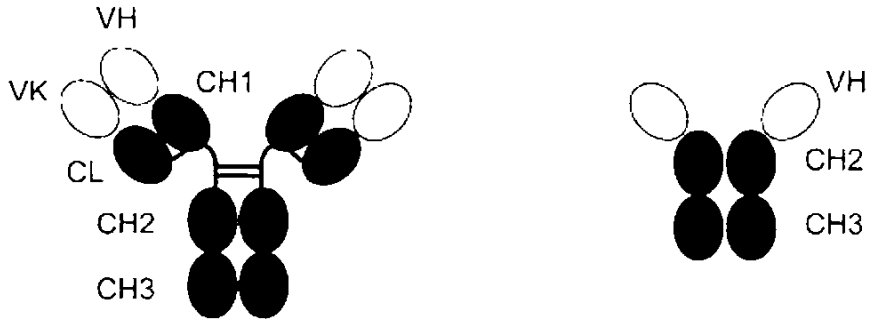
Şekil 7


VH
CH1
CH2
CH3
Sokak türü
ΔCH1-ΔMentesşe
98 kd
64 kd
50 kd
36 kd
VH
CH2
CH3

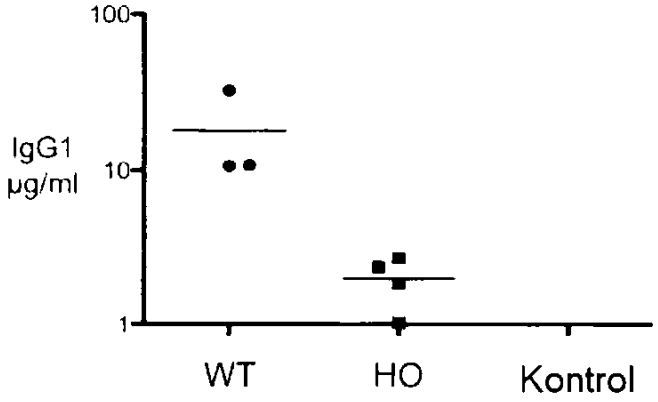
Şekil 8

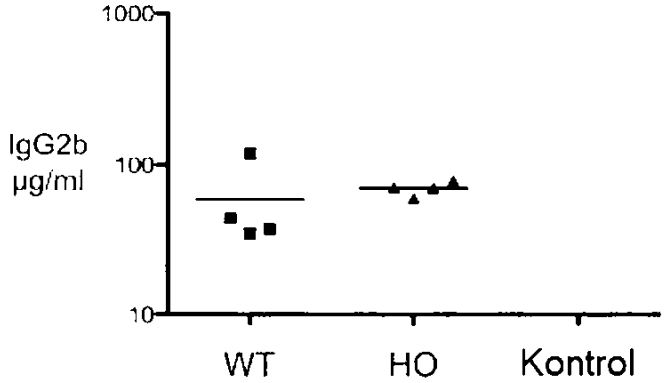

WT
HO 1
HO 2
1
2a
HO 3
HO 4
148 kd
98 kd
64 kd
50 kd
36 kd
22 kd
148 kd
98 kd
64 kd
50 kd
36 kd
22 kd

Şekil 9



Şekil 10


100
10
1
IgG1
µg/ml
WT
HO
Kontrol


1000
100
10
IgG2b
µg/ml
WT
HO
Kontrol

Şekil 11

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
B1	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTS	GYTFTSYG.	INWVKQRPGQGLEWIGY	IYIGNGYT..	EYNEKFK
B2	EVQLQQSGrELVKPGASVmISCtAS	GYTFiDYf.	iNWmKrSHGqSLEWIGD	INPNNGGs..	nYNQKFK
B3	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS	GYTFTSYW.	MQWVKQRPGQGLEWIGE	IDPSDSYT..	NYNQKFK
B5	EVQLQQSGAEiVKsGASVKLSCTAS	GFNmKDYf.	iHWVKQRTEQGLEWIGR	lDPEDGkT..	KYAPKFQ
D2	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVT	GYSITSGYY	WNWIRQFPGNKLEWMGY	ISYDGrN...	NYNPSLK
D5	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTAS	GFNIKDYY.	iHWVKkRPEQGLEWIGR	IDPEDGDT..	EYAPKFQ
D6	EVQLQQSGTELVKPGASaKLSCTAS	GFNvKDYf.	MHWVKQkTEQGLEWIGR	IVPEDGET..	KsAPKFQ
E2	EVKLVESGGGLVQSGRSLRLSCATS	GFTFSDFY.	MEWVRQAPGKGLEWIAt	SRNKlNDYTp	EfSASVK
E8	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS	GYTFTSYW.	MHWVKQRPGRGLEWIGR	IDPNSGGT..	KYNEKlK
E10	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS	GYSFTGYY.	MNWVKQSPEKSLEWIGE	INPSTGGT..	TYNQKFK
F6	EVQLVESGGDLVcPGGSLKLSCAAS	GFTFSSYG.	MSWVRQTPDKRLEWVAT	ISSGGSYT..	YYPDSVK

	FR3	CDR3	FR4	CH2
B1	GKATLTSDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYFr	ARGrvGPY.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI
B2	GKATLTVDKSSSTAYMdLRSLTSEDSAVYYC	AKLGRD.....WYFDV	WGtGTTVTVSS	VPEVSSVFI
B3	GKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTpEDSAVYYC	ARCRY.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI
B5	GKATITADTSSNTAYLhLSSLTSEDTAVYYC	ARGGLGREE..YYAvDY	WGQGTSVTVSS	VPEVSSVFI
D2	NRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYC	AIHTVVGD....YvMDY	WGQGTSVTVSS	VPEVSSVFI
D5	GKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDiAVYYC	TTSRpF.....YFDY	WGQGTTLTVSS	VPEVSSVFI
D6	drtTIrtDTSSNTshLQLnSLTSEDTAVYYC	ARPNPP.....Y	WGQGTLVTVSv	VPEVSSVFI
E2	GRFIVSRDTSQnILYLQMNALRpEDTAIYYC	ARAcSdYDR..YYAMDY	WGQGTSVTVSS	VPEVSSVFI
E8	nKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	AREEINYYGSTYgAMDY	WGQGTSVTVSS	VPEVSSVFI
E10	AKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYC	AGG.....YWYFDV	WGtGTTVTVSS	VPEVSSVFI
F6	GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYC	ARHDYYGSSYG.WYFDV	WGtGTTVTVSS	VPEVSSVFI

Şekil 12

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
A8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYD.	INWVRQATGQGLEWMGW	MNPNSGkT..	GYAQKFQ
C2	QVQLVQSGAEmKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	yYAQnLQ
D9	QVQLVQSGAEmKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	yYAQnLQ
C4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	NYAQKLQ
H8	QVQLlQSGAEVKKPGASVKVSyKAS	dYTFTSYG.	ISWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGNT..	NYAQnLQ
A5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA.	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA..	NYAQKFQ
A2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA.	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA..	NYAQKFQ

	FR3	CDR3	FR4	HINGE
A8	GRVaMTRkTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYC	AReDYSNYgd.....FDY	WGQGTLVTVSS	VPRDCGC
C2	GRVTMTTDTSTSaAfMdLRSLRSDDTAVYYC	ARdgYStSSl.....DY	WGQGTLVTVSS	VPRDCGC
D9	GRVTMTTDTSTSaAfMdLRSLRSDDTAVYYC	ARdgYStSSl.....DY	WGQGTLVTVSS	VPRDCGC
C4	GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC	ARddMITFGGVIanYYYYGMDV	WGQGTTVTVtS	VPRDCGC
H8	GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDsAVYYC	AReeLEl.....FDY	WGQGTLVTVSS	VPRDCGC
A5	GRVTITTDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ARdgYStSSl.....DY	WGQGTLVTVSS	VPRDCGC
A2	GRVTITTDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	AvIAVAGT.....YYYYGMDV	WGQGTTVTVSl	VPRDCGC

Şekil 13