

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-135143

(P2016-135143A)

(43) 公開日 平成28年7月28日(2016.7.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO 1 K 67/027 (2006.01)	AO 1 K 67/027	Z N A 4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 132 頁)		

(21) 出願番号	特願2016-88848 (P2016-88848)	(71) 出願人	597160510
(22) 出願日	平成28年4月27日 (2016.4.27)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(62) 分割の表示	特願2015-36588 (P2015-36588)		・インコーポレイテッド
原出願日	平成24年2月24日 (2012.2.24)		REGENERON PHARMACEU
(31) 優先権主張番号	61/446, 895		TICALS, INC.
(32) 優先日	平成23年2月25日 (2011.2.25)		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
(31) 優先権主張番号	61/497, 650	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成23年6月16日 (2011.6.16)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/595, 200		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成24年2月6日 (2012.2.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ADAM6マウス

(57) 【要約】

【課題】 ADAM6マウスの提供。

【解決手段】 内因性ADAM6遺伝子座からのADAM6活性の低減もしくは欠失を含むマウス、またはマウスADAM6タンパク質をコードする内因性遺伝子座を欠いているマウスであって、雄マウスにおいて機能的であるADAM6またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする配列を含むマウスを提供する。1つの実施形態において、前記配列は、異所性ADAM6配列であるか、交配により子孫を産生する能力を雄マウスに付与する配列である。マウスADAM6またはその機能的断片もしくはホモログもしくはオルソログをコードする異所性ヌクレオチド配列を含む遺伝子改変免疫グロブリン重鎖遺伝子座を有するマウスおよび細胞も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本願明細書に記載された方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

機能的A D A M 6 遺伝子座をコードする核酸配列を含む遺伝子改変マウス、細胞、胚および組織を記載する。改変は、ヒトおよび／またはヒト化免疫グロブリン遺伝子座を含む。機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠いているがA D A M 6 機能を含むマウスを記載し、該マウスには、A D A M 6 タンパク質をコードする異所性核酸配列を含むマウスが含まれる。内因性免疫グロブリンV_H 遺伝子座の改変を含む遺伝子改変雄マウスであって、該改変が、該マウスを機能的A D A M 6 タンパク質作製不能にし、その結果、妊性を喪失させる、および該雄マウスにおけるA D A M 6 機能をさらに含むものである遺伝子改変雄マウスを記載し、該雄マウスには、該雄マウスに妊性を回復させる異所性核酸配列を含むマウスが含まれる。

10

【背景技術】

【0002】

ヒト抗体遺伝子を含むマウスは、当該技術分野において公知である。過去二十年の間の抗体の薬学的適用は、ヒト治療薬としての使用に好適である抗体の作製の多大な研究を喚起した。ヒトへのマウス抗体の反復投与は、長期処置レジメンを混乱させ得る免疫原性を生じさせる結果となるので、マウス抗体に基づく初期抗体治療薬は、ヒト治療薬として理想的ではなかった。マウス抗体をよりヒトらしくし、あまりマウス様にしないようなマウス抗体のヒト化に基づく解決策が開発された。その後、抗体に使用するためのヒト免疫グロブリン配列を発現するための方法が続き、これらは、主として、ファージ、細菌または酵母におけるヒト免疫グロブリンライブラリの *in vitro* 発現に基づくものであった。最終的に、ヒト造血細胞を生着させたマウスにおいて、および内因性免疫グロブリン遺伝子座が無能化された染色体導入マウスまたはトランスジェニックマウスにおいて、*in vitro* でヒトリンパ球から有用なヒト抗体を作製する試みがなされた。トランスジェニックマウスの場合、ランダムに組み込まれた完全ヒト導入遺伝子が、該マウスにおいて発現する免疫グロブリン配列の源として機能するために、内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座が無能化する必要があるがあった。かかるマウスは、ヒト治療薬としての使用に好適なヒト抗体を作製できるが、該マウスの免疫系に関わる重大な問題を提示する。これらの問題は、(1) マウスに十分に多様な抗体レパートリーの産生を実行できなくさせる、(2) 広範なりエンジニアリングフィックス (*re-engineering* *fixes*) の使用を必要とする、(3) おそらくヒト要素とマウス要素間の不適合性のため、最適以下のクローン選択過程をもたらす、および(4) これらのマウスを、ヒト治療薬の作製に真に有用であるために必要なヒト可変配列の大きな且つ多様な集団の信頼できない源にしてしまう。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0003】

ヒト抗体配列をはじめとする免疫グロブリン配列の生成に有用である改善された遺伝子改変マウスの作製が当該技術分野において依然として必要とされている。有用な再構成免疫グロブリン遺伝子を形成するように免疫グロブリン遺伝子セグメントを再構成できるマウス、または変更された免疫グロブリン遺伝子座からタンパク質を作製することができ、同時に、遺伝子改変の結果として生じ得る有害な変化を低減させるまたは消去することができるマウスも、依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

1つの態様では、非機能的内因性マウスA D A M 6 タンパク質またはA D A M 6 遺伝子

50

(例えば、内因性A D A M 6 遺伝子のノックアウトまたは内因性A D A M 6 遺伝子内での欠失)を生じさせる結果となる改変を含むマウスであって、雄マウスにおいて機能的であるA D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする核酸配列を含むマウスを作製するための、核酸構築物、細胞、胚、マウスおよび方法を提供する。

【0005】

1つの態様では、内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座の改変を含むマウスであって、雄マウスにおいて機能的であるA D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含むマウスを作製するための、核酸構築物、細胞、胚、マウスおよび方法を提供する。1つの実施形態において、前記内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座は、免疫グロブリン重鎖遺伝子座であり、前記改変は、雄マウスの細胞または組織のA D A M 6 活性を低減させるまたは消去する。

10

【0006】

1つの態様では、マウスA D A M 6 またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片をコードする異所性ヌクレオチド配列を含むマウスを提供する；マウスA D A M 6 またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片をコードする内因性ヌクレオチド配列を含み、重鎖免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも1つの遺伝子改変を含むマウスも提供する。

【0007】

1つの態様では、内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座の改変を含むマウスであって、雄マウスにおいて機能的であるA D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含むマウスを作製するための方法を提供する。本発明によるマウスは、例えば本明細書に記載する方法によって得ることができる。

20

【0008】

1つの態様では、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の遺伝子改変を含むマウスを作製するための方法を提供し、これらの方法の適用により、改変された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはその欠失）を含む雄マウスが得られ、該雄マウスは、交配によって子孫を産生することができる。1つの実施形態において、前記雄マウスは、マウス子宮からマウス卵管を通して移行してマウス卵子を受精させることができる精子を産生できる。

【0009】

1つの態様では、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の遺伝子改変を含むマウスを作製するための方法を提供し、これらの方法の適用により、改変された免疫グロブリン重鎖遺伝子座（またはその欠失）を含む雄マウスが得られ、該雄マウスは妊性の低減を示し、および該マウスは、その妊性低減を全部または一部回復させる遺伝子改変を含む。様々な実施形態において、前記妊性の低減は、雄マウスの精子が、マウス子宮からマウス卵管を通して移動してマウス卵子を受精させることができないことを特徴とする。様々な実施形態において、前記妊性の低減は、*in vivo*移動欠陥を示す精子を特徴とする。様々な実施形態において、前記妊性の低減を全部または一部回復させる遺伝子改変は、雄マウスにおいて機能的であるマウスA D A M 6 遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする核酸配列である。

30

40

【0010】

1つの実施形態において、前記遺伝子改変は、内因性免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座の、別の種（例えば、非マウス種）の免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座での置換を含む。1つの実施形態において、前記遺伝子改変は、オルソログ免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座の内因性免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座への挿入を含む。特定の実施形態において、前記種はヒトである。1つの実施形態において、前記遺伝子改変は、内因性免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座の全部または一部欠失を含み、該欠失は、内因性A D A M 6 機能の喪失を生じさせる結果となる。特定の実施形態において、前記内因性A D A M 6 機能の喪失は、雄マウスにおける妊性の低減に関連づけられる。

【0011】

50

1つの態様では、内因性A D A M 6 対立遺伝子からのマウスA D A M 6 発現を低減させるまたは消去する改変を有する雄マウスが、内因性A D A M 6 機能の低減または消去に起因して、妊性低減（例えば、交配による子孫産生能力の高度低減）を示すまたは本質的に不妊性であるように、該改変を含み、さらに、異所性A D A M 6 配列またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を含む、マウスを提供する。1つの態様において、マウスA D A M 6 発現を低減させるまたは消去する改変は、マウス免疫グロブリン遺伝子座の改変（例えば、挿入、欠失、置換など）である。

【0012】

1つの実施形態において、A D A M 6 機能の低減または喪失は、マウスが、マウス子宮からマウス卵管を通して進んでマウス卵子を受精させることのできる精子を産生できないことまたは実質的に産生できないことを含む。特定の実施形態において、前記マウスの射精体積中の産生された精子細胞の少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%は、交尾後に *in vivo* で卵管を通して進むことができず、マウス卵子を受精させることができない。

【0013】

1つの実施形態において、A D A M 6 機能の低減または喪失は、前記マウスの精子細胞の表面でA D A M 2 および／またはA D A M 3 および／またはA D A M 6 の複合体を形成できないことまたは実質的に形成できないことを含む。1つの実施形態において、A D A M 6 機能の喪失は、雌マウスとの交尾によってマウス卵子を受精させることが実質的にできないことを含む。

【0014】

1つの態様において、機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠いているマウスであって、該マウスにA D A M 6 機能性を付与するタンパク質（またはタンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列）を含むマウスを提供する。1つの実施形態において、前記マウスは雄マウスであり、前記機能性は、機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠いているマウスと比較して強化された妊性を含む。

【0015】

1つの実施形態において、前記タンパク質は、前記マウスの生殖細胞系における免疫グロブリン遺伝子座内にあるゲノム配列によってコードされている。特定の実施形態において、前記免疫グロブリン遺伝子座は、重鎖遺伝子座である。もう1つの特定の実施形態において、前記重鎖遺伝子座は、少なくとも1つのヒトV_H、少なくとも1つのヒトD_H および少なくとも1つのヒトJ_H 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記異所性タンパク質は、前記マウスの生殖細胞系における非免疫グロブリン遺伝子座内にあるゲノム配列によってコードされている。1つの実施形態において、前記非免疫グロブリン遺伝子座は、転写活性遺伝子座である。特定の実施形態において、前記転写活性遺伝子座は、R O S A 2 6 遺伝子座である。特定の実施形態において、前記転写活性遺伝子座は、組織特異的発現と関連づけられる。1つの実施形態において、前記組織特異的発現は、生殖組織に存在する。1つの実施形態において、前記タンパク質は、前記マウスの生殖細胞系にランダムに挿入されたゲノム配列によってコードされている。

【0016】

1つの実施形態において、前記マウスは、ヒトまたはキメラヒト／マウスまたはキメラヒト／ラット軽鎖（例えば、ヒト可変、マウスまたはラット定常）とキメラヒト可変／マウスまたはラット定常重鎖とを含む。特定の実施形態において、前記マウスは、転写活性プロモーター、例えばR O S A 2 6 プロモーター、に作動可能に連結されているキメラヒト可変／ラットまたはマウス定常軽鎖遺伝子を含む導入遺伝子を含む。さらなる特定の実施形態において、前記キメラヒト／マウスまたはラット軽鎖導入遺伝子は、前記マウスの生殖細胞系内に再構成ヒト軽鎖可変領域配列を含む。

【0017】

1つの実施形態において、前記異所性ヌクレオチド配列は、前記マウスの生殖細胞系における免疫グロブリン遺伝子座内にある。特定の実施形態において、前記免疫グロブリン

10

20

30

40

50

遺伝子座は、重鎖遺伝子座である。1つの実施形態において、前記重鎖遺伝子座は、少なくとも1つのヒトV_H、少なくとも1つのヒトD_Hおよび少なくとも1つのヒトJ_H遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記異所性ヌクレオチド配列は、前記マウスの生殖細胞系における非免疫グロブリン遺伝子座内にある。1つの実施形態において、前記非免疫グロブリン遺伝子座は、転写活性遺伝子座である。特定の実施形態において、前記転写活性遺伝子座は、R O S A 2 6 遺伝子座である。1つの実施形態において、前記異所性ヌクレオチド配列は、前記マウスの生殖細胞系にランダムに挿入された位置にある。

【0018】

1つの態様では、機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠いているマウスであって、マウスA D A M 6 機能の喪失を補う異所性ヌクレオチド配列を含むマウスを提供する。1つの実施形態において、前記異所性ヌクレオチド配列は、前記マウスに、機能的内因性A D A M 6 遺伝子を含む対応する野生型マウスに匹敵する子孫産生能力を付与する。1つの実施形態において、前記配列は、前記マウスの精子細胞の表面でA D A M 2 および／またはA D A M 3 および／またはA D A M 6 の複合体を形成する能力を、前記マウスに付与する。1つの実施形態において、前記配列は、前記マウスに、マウス子宮からマウス卵管を通してマウス卵子へと進んで該卵子を受精させる能力を付与する。

【0019】

1つの実施形態において、前記機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠き、前記異所性ヌクレオチド配列を含む前記マウスは、同じ年齢および系統の野生型マウスが6ヶ月の期間に産生する同腹子の数の少なくとも約50%、60%、70%、80%または90%の数の同腹子を産生する。

【0020】

1つの実施形態において、前記機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠き、前記異所性ヌクレオチド配列を含む前記マウスは、6ヶ月に期間にわたって交配させたとき、実質的に同じ期間にわたって実質的に同じ条件下で交配させた、該機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠き該異所性ヌクレオチド配列を欠いている同じ年齢および同じまたは類似系統のマウスに比べて、少なくとも約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約4倍、約6倍、約7倍、約8倍または約10以上後代を産生する。

【0021】

1つの実施形態において、前記機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠き、前記異所性ヌクレオチド配列を含む前記マウスは、4または6ヶ月の交配期間中に、該機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠いており該異所性ヌクレオチド配列が無い、同じ期間交配させたマウスより、同腹子あたり平均少なくとも約2倍、3倍、4倍多い数の子を産生する。

【0022】

1つの実施形態において、前記機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠き、前記異所性ヌクレオチド配列を含む前記マウスは雄マウスであり、該雄マウスは、交尾後約5～6時間の時点で卵管から回収したとき、該機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠いており該異所性ヌクレオチド配列が無いマウスに比べて少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、100倍、110倍または120倍以上である卵管移動を表わす精子を産生する。

【0023】

1つの実施形態において、前記機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠き、前記異所性ヌクレオチド配列を含む前記マウスは、雌マウスと交尾させたとき、野生型マウスからの精子にほぼ等しい効率で約6時間以内に子宮を通り抜けて卵管に入って卵管を通り抜けることができる精子を産生する。

【0024】

1つの実施形態において、前記機能的内因性A D A M 6 遺伝子を欠き、前記異所性ヌクレオチド配列を含む前記マウスは、該機能的A D A M 6 遺伝子を欠いており該異所性ヌ

10

20

30

40

50

レオチド配列が無いマウスに比べて、匹敵する期間内に約 1.5 倍、約 2 倍、約 3 倍または約 4 倍以上の同腹子を産生する。

【0025】

1つの態様では、免疫グロブリンタンパク質をコードする非マウス核酸配列をその生殖細胞系内に含むマウスを提供し、前記非マウス免疫グロブリン配列は、マウス ADAM6 遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片の挿入を含む。1つの実施形態において、前記非マウス免疫グロブリン配列は、ヒト免疫グロブリン配列を含む。1つの実施形態において、前記配列は、ヒト免疫グロブリン重鎖配列を含む。1つの実施形態において、前記配列は、ヒト免疫グロブリン軽鎖配列を含む。1つの実施形態において、前記配列は、1つ以上の V 遺伝子セグメント、1つ以上の D 遺伝子セグメントおよび1つ以上の J 遺伝子セグメントを含む；1つの実施形態において、前記配列は、1つ以上の V 遺伝子セグメントおよび1つ以上の J 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記1つ以上の V、D および J 遺伝子セグメント、または1つ以上の V および J 遺伝子セグメントは、再構成されない。1つの実施形態において、前記1つ以上の V、D および J 遺伝子セグメント、または1つ以上の V および J 遺伝子セグメントは、再構成される。1つの実施形態において、前記1つ以上の V、D および J 遺伝子セグメント、または1つ以上の V および J 遺伝子セグメントの再構成後、前記マウスは、マウス ADAM6 遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードする少なくとも1つの核酸配列をそのゲノム内に含む。1つの実施形態において、再構成後、前記マウスは、マウス ADAM6 遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードする少なくとも2つの核酸配列をそのゲノム内に含む。1つの実施形態において、再構成後、前記マウスは、マウス ADAM6 遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードする少なくとも1つの核酸配列をそのゲノム内に含む。1つの実施形態において、前記マウスは、前記 ADAM6 遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を B 細胞内に含む。1つの実施形態において、前記マウスは、前記 ADAM6 遺伝子またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を非 B 細胞内に含む。

【0026】

1つの態様では、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域またはその機能的断片を内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座から発現するマウスであって、雄マウスにおいて機能的である ADAM6 活性を含むマウスを提供する。

【0027】

1つの実施形態において、前記雄マウスは、単一の未改変内因性 ADAM6 対立遺伝子またはそのオルソログもしくは (of) ホモログもしくは機能的断片を内因性 ADAM6 遺伝子座に含む。

【0028】

1つの実施形態において、前記雄マウスは、ADAM6 機能を付与するタンパク質をコードする異所性マウス ADAM6 配列またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を含む。

【0029】

1つの実施形態において、前記雄マウスは、内因性マウス ADAM6 対立遺伝子の場所、例えば、最後の V 遺伝子セグメント配列の 3' および最初の D 遺伝子セグメントの 5' に近いマウスゲノム内の場所に ADAM6 配列またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を含む。

【0030】

1つの実施形態において、前記雄マウスは、免疫グロブリン可変遺伝子セグメントをコードする核酸配列の (ADAM6 配列の転写方向を基準にして) 上流、下流、または上流および下流に隣接する ADAM6 配列またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片を含む。特定の実施形態において、前記免疫グロブリン可変遺伝子セグメントは、ヒト遺伝子セグメントである。1つの実施形態において、前記免疫グロブリン可変遺伝

10

20

30

40

50

子セグメントは、ヒト遺伝子セグメントであり、マウスにおいて機能的なマウス A D A M 6 またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする配列は、ヒト V 遺伝子セグメント間にある；1つの実施形態において、前記マウスは、2つ以上の V 遺伝子セグメントを含み、前記配列は、前記最後の V 遺伝子セグメントと最後から二番目の V 遺伝子セグメントの間の位置にある。1つの実施形態において、前記配列は、前記最後の V 遺伝子セグメントおよび前記最初の D 遺伝子セグメントの次に来る位置にある。

【0031】

1つの態様では、非機能的内因性 A D A M 6 遺伝子、または内因性 A D A M 6 遺伝子の欠失をその生殖細胞系内に含む雄マウスを提供し、該マウスの精子細胞は、雌マウスの卵管を通過することができ、卵子を受精させることができる。1つの実施形態において、前記マウスは、雄マウスにおいて機能的であるマウス A D A M 6 遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片の染色体外コピーを含む。1つの実施形態において、前記マウスは、雄マウスにおいて機能的である異所性マウス A D A M 6 遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む。

【0032】

1つの態様において、内因性マウス A D A M 6 機能を低減させる遺伝子改変を含むマウスであって、全部もしくは一部機能的である内因性未改変対立遺伝子（例えば、ヘテロ接合体）によってあるいは雄マウスにおいて機能的である A D A M 6 またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片をコードする異所性配列からの発現によってもたらされる、少なくともいくつかの A D A M 6 機能性を含むマウスを提供する。

【0033】

1つの実施形態において、前記マウスは、機能的 A D A M 6 を欠いている雄マウスと比較して、交配により子孫を産生する能力を雄マウスに付与するのに十分な A D A M 6 機能を含む。1つの実施形態において、前記 A D A M 6 機能は、マウス A D A M 6 またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードする異所性ヌクレオチド配列の存在によって付与される。雄マウスにおいて機能的である A D A M 6 ホモログもしくはオルソログまたはその断片としては、十分な内因性マウス A D A M 6 活性が無い雄マウスにおいて観察される子孫産生能力の喪失、例えば、A D A M 6 ノックアウトマウスにおいて観察される能力の喪失を全部または一部回復させるものが挙げられる。この意味で、A D A M 6 ノックアウトマウスには、内因性遺伝子座またはその断片を含むが機能的でない、すなわち、A D A M 6 (A D A M 6 a および／もしくは A D A M 6 b) をまったく発現しない、または野生型雄マウスの本質的に正常な子孫産生能力を支持するのに不十分であるレベルで A D A M 6 (A D A M 6 a および／もしくは A D A M 6 b) を発現するマウスが含まれる。機能の喪失は、例えば、前記遺伝子座の構造遺伝子（すなわち A D A M 6 a もしくは A D A M 6 b コーディング領域）の改変、または前記遺伝子座の調節領域（例えば、A D A M 6 a 遺伝子に対して 5' のまたは A D A M 6 a もしくは A D A M 6 b コーディング領域の 3' の配列であって、A D A M 6 遺伝子の転写、A D A M 6 R N A の発現または A D A M 6 タンパク質の発現を全部または一部制御する配列）の改変に起因し得る。様々な実施形態において、雄マウスにおいて機能的であるオルソログもしくはホモログまたはその断片は、雄マウスの精子（または雄マウスの射精液中の大部分の精子細胞）がマウス卵管を通過してマウス卵子を受精させることを可能にするものである。

【0034】

1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン可変領域またはその機能的断片を発現する雄マウスは、雌マウスとの交配により子孫を産生する能力を該雄マウスに付与するのに十分な A D A M 6 活性を含み、1つの実施形態において、雌マウスと交配するとき、前記雄マウスは、1つまたは2つの内因性未改変 A D A M 6 対立遺伝子を有するマウスの子孫産生能力の、1つの実施形態では少なくとも 25%、1つの実施形態では少なくとも 30%、1つの実施形態では少なくとも 40%、1つの実施形態では少なくとも 50%、1つの実施形態では少なくとも 60%、1つの実施形態では少なくとも 70%、1つの実施形態では少なくとも 80%、1つの実施形態では少なくとも 90%、および1つの実施

形態では該マウスの子孫産生能力とほぼ同じである、子孫産生能力を示す。

【0035】

1つの実施形態において、雄マウスは、該雄マウスからの精子細胞が雌マウス卵巣を通り抜けることおよびマウス卵子を受精させることを可能にするために十分なADAM6（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片）を発現する。

【0036】

1つの実施形態において、前記ADAM6機能性は、マウス染色体配列に隣接する核酸配列によって付与される（例えば、前記核酸は、マウス染色体にランダムに組み込まれている；または例えば、前記核酸を特定の場所にターゲティングすることにより、例えば部位特異的リコンビナーゼ媒介（例えば、Cre媒介）挿入もしくは相同組換えにより、特定の場所に配置されている）。1つの実施形態において、前記ADAM6配列は前記マウスの染色体とは異なる核酸上に存在する（例えば、前記ADAM6配列は、エピソーム上に、すなわち染色体外に、例えば、発現構築物、ベクター、YAC、導入染色体などに存在する）。

【0037】

1つの態様では、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含む遺伝子改変マウスおよび細胞を提供し、該マウスは、免疫グロブリン重鎖配列の少なくとも一部分、例えば、ヒト配列の少なくとも一部分を発現し、該マウスは、雄マウスにおいて機能的であるADAM6活性を含む。1つの実施形態において、前記改変は、前記マウスのADAM6活性を低減させるまたは根絶する。1つの実施形態では、前記マウスは、ADAM6活性をコードする両方の対立遺伝子が、不在であるように、または雄マウスにおいて正常交配を支持するように実質的に機能しないADAM6を発現するように、改変される。1つの実施形態において、前記マウスは、マウスADAM6またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片をコードする異所性核酸配列をさらに含む。

【0038】

1つの態様では、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含む遺伝子改変マウスおよび細胞を提供し、該改変は、該遺伝子座のADAM6配列から発現するADAM6活性を低減させるまたは消去するものであり、および該マウスは、ADAM6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む。様々な実施形態において、前記ADAM6タンパク質またはその断片は、異所性ADAM6配列によってコードされている。様々な実施形態において、前記ADAM6タンパク質またはその断片は、内因性ADAM6対立遺伝子から発現する。様々な実施形態において、前記マウスは、第一の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子からの機能的ADAM6の発現を低減させるまたは消去する第一の改変を含む第一の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子と、第二の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子からの機能的ADAM6の発現を実質的に低減させないまたは消去しない第二の改変を含む第二の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子とを含む。

【0039】

1つの実施形態において、前記第二の改変は、最後のマウスV遺伝子グメントの（マウスV遺伝子セグメントの転写方向性を基準にして）3'にあり、およびマウス（またはキメラヒト／マウス）免疫グロブリン重鎖定常遺伝子またはその断片（例えば、ヒトおよび／またはマウス：C_H1および／またはヒンジおよび／またはC_H2および／またはC_H3をコードする核酸配列）の（定常配列の転写方向性を基準にして）5'にある。

【0040】

1つの実施形態において、前記改変は、第一のADAM6対立遺伝子をコードする第一の遺伝子座の第一の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子におけるものであり、および前記ADAM6機能は、機能的ADAM6をコードする第二の遺伝子座の第二の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子での内因性ADAM6の発現の結果として生じ、前記第二の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子は、V、Dおよび／またはJ遺伝子セグメントの少なくとも1つの改変を含む。特定の実施形態において、前記V、Dおよび／またはJ遺伝子セグメントの前記少なくとも1つの改変は、欠失、ヒトV、Dおよび／またはJ遺伝子セグメントでの置換、ラ

10

20

30

40

50

クダ科動物 V、D および／または J 遺伝子セグメントでの置換、ヒト化またはラクダ化 V、D および／または J 遺伝子セグメントでの置換、重鎖配列の軽鎖配列での置換、ならびにその組み合わせである。1 つの実施形態において、前記少なくとも 1 つの改変は、前記重鎖遺伝子座における 1 つ以上の重鎖 V、D および／または J 遺伝子セグメントの欠失ならびに 1 つ以上の軽鎖 V および／または J 遺伝子セグメント（例えば、ヒト軽鎖 V および／または J 遺伝子セグメント）での置換である。

【0041】

1 つの実施形態において、前記改変は、第一の遺伝子座の第一の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子、および第二の遺伝子座の第二の免疫グロブリン重鎖対立遺伝子におけるものであり、前記 ADAM6 機能は、前記マウスの生殖細胞系における非免疫グロブリン遺伝子座での異所性 ADAM6 発現の結果として生ずる。特定の実施形態において、前記非免疫グロブリン遺伝子座は、ROSA26 遺伝子座である。特定の実施形態において、前記非免疫グロブリン遺伝子座は、生殖組織において転写活性である。

10

【0042】

1 つの態様では、ADAM6 のヘテロ接合またはホモ接合ノックアウトを含むマウスを提供する。1 つの実施形態において、前記マウスは、ヒトもしくはヒト化免疫グロブリン配列またはラクダ科動物もしくはラクダ化ヒトもしくはマウス免疫グロブリン配列である、改変免疫グロブリン配列をさらに含む。1 つの実施形態において、前記改変免疫グロブリン配列は、内因性マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子座に存在する。1 つの実施形態において、前記改変免疫グロブリン配列は、内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座にヒト重鎖可変遺伝子配列を含む。1 つの実施形態において、前記ヒト重鎖可変遺伝子配列は、前記内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の内因性マウス重鎖可変遺伝子配列を置換する。

20

【0043】

1 つの態様では、内因性マウス ADAM6 遺伝子座から機能的内因性マウス ADAM6 を発現できないマウスを提供する。1 つの実施形態において、前記マウスは、該マウスにおいて機能的である ADAM6 またはその機能的断片をコードする異所性核酸配列を含む。特定の実施形態において、前記異所性核酸配列は、ADAM6 ノックアウトに関してホモ接合性である雄マウスによって示される子孫産生能力の喪失をレスキューするタンパク質をコードする。特定の実施形態において、前記異所性核酸配列は、マウス ADAM6 タンパク質をコードする。

30

【0044】

1 つの態様では、機能的内因性 ADAM6 遺伝子座を欠いているマウスであって、該マウスに ADAM6 機能を付与する異所性核酸配列を含むマウスを提供する。1 つの実施形態において、前記核酸配列は、内因性マウス ADAM6 配列またはその機能的断片を含む。1 つの実施形態において、前記内因性マウス ADAM6 配列は、野生型マウスにおける最も 3' 側の (the 3'-most) マウス免疫グロブリン重鎖 V 遺伝子セグメント (V_H) と最も 5' 側の (the 5'-most) マウス免疫グロブリン重鎖 D 遺伝子セグメント (D_H) の間にある ADAM6 a および ADAM6 b コード配列を含む。

【0045】

1 つの実施形態において、前記核酸配列は、マウス ADAM6 a もしくはその機能的断片をコードする配列、および／またはマウス ADAM6 b もしくはその機能的断片をコードする配列を含み、該 ADAM6 a および／もしくは ADAM6 b またはその機能的断片（単数もしくは複数）は、プロモーターに作動可能に連結されている。1 つの実施形態において、前記プロモーターは、ヒトプロモーターである。1 つの実施形態において、前記プロモーターは、マウス ADAM6 プロモーターである。特定の実施形態において、前記 ADAM6 プロモーターは、最も 5' 側のマウス D_H 遺伝子セグメントに最も近い第一の ADAM6 遺伝子の第一コドンと、最も 5' 側の D_H 遺伝子セグメントの組換えシグナル配列との間にある配列を含み、この場合の 5' は、マウス免疫グロブリン遺伝子の転写方向を基準にして示される。1 つの実施形態において、前記プロモーターは、ウイルスプロ

40

50

モーターである。特定の実施形態において、前記ウイルスプロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターである。1つの実施形態において、前記プロモーターは、ユビキチンプロモーターである。

【0046】

1つの実施形態において、前記プロモーターは、誘導性プロモーターである。1つの実施形態において、前記誘導性プロモーターは、非生殖組織での発現を調節する。1つの実施形態において、前記誘導性プロモーターは、生殖組織での発現を調節する。特定の実施形態において、前記マウスADAM6aおよび／もしくはADAM6b配列またはその機能的断片（単数もしくは複数）の発現は、生殖組織において誘導性プロモーターによって発生調節される。

10

【0047】

1つの実施形態において、前記マウスADAM6aおよび／またはADAM6bは、配列番号1のADAM6aおよび／または配列番号2（sequence SEQ ID NO: 2）のADAM6bから選択される。1つの実施形態において、前記マウスADAM6プロモーターは、配列番号3のプロモーターである。特定の実施形態において、前記ADAM6プロモーターは、ADAM6aの第一コドンの（ADAM6aの転写方向を基準にして）直ぐ上流の配列番号3の核酸配列であって、ADAM6コーディング領域の上流の配列番号3の端にわたる（extending）核酸配列を含む。もう1つの特定の実施形態において、前記ADAM6プロモーターは、ADAM6aの開始コドンの上流約5から約20ヌクレオチド以内からADAM6aの開始コドンの約0.5kb、1kb、2kbまたは3kb以上上流にわたる断片である。

20

【0048】

1つの実施形態において、前記核酸配列は、ADAM6欠如のため不妊性であるまたは妊性が低いマウスの体内に配置されたとき、妊性を向上させるまたは妊性をほぼ野生型の妊性に回復させる、配列番号3またはその断片を含む。1つの実施形態において、配列番号3またはその断片は、雌マウス卵管を通り抜けてマウス卵子を受精させることができる精子細胞を産生する能力を雄マウスに付与する。

【0049】

1つの態様では、ADAM6タンパク質をコードする内因性ヌクレオチド配列の欠失と、内因性マウスV_H遺伝子セグメントの、ヒトV_H遺伝子セグメントでの置換と、雄マウスにおいて機能的であるマウスADAM6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする異所性ヌクレオチド配列とを含むマウスを提供する。

30

【0050】

1つの実施形態において、前記マウスは、内因性ADAM6遺伝子を含む内因性免疫グロブリン遺伝子座ヌクレオチド配列の欠失を含む免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド配列を含み、および前記マウスADAM6タンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列は、該1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド配列内にある、または該1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド配列に直接隣接する。

40

【0051】

1つの実施形態において、前記マウスは、1つ以上のヒトV_H遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド配列でのすべてのまたは実質的にすべての内因性V_H遺伝子セグメントの置換を含み、前記マウスADAM6タンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列は、該1つ以上のヒトV_H遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド配列内にあるか、該1つ以上のヒトV_H遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド配列に直接隣接する。1つの実施形態において、前記マウスは、内因性D_H遺伝子遺伝子座における1つ以上の内因性D_H遺伝子セグメントの、1つ以上のヒトD_H遺伝子セグメントでの置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、内因性J_H遺伝子遺伝子座における1つ以上の内因性J_H遺伝子セグメントの、1つ以上のヒトJ_H遺伝子セグメントでの置換を

50

さらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、すべてのまたは実質的にすべての内因性 V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントの置換、ならびに内因性 V_H 、 D_H および J_H 遺伝子遺伝子座における、ヒト V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントでの置換を含み、この場合のマウスは、マウスADAM6タンパク質をコードする異所性配列を含む。特定の実施形態において、前記マウスADAM6タンパク質をコードする異所性配列は、存在するヒト V_H 遺伝子セグメントの最も3'側の末端から二番目の V_H 遺伝子セグメントと、存在するヒト V_H 遺伝子セグメントの最終(ultimate)3' V_H 遺伝子セグメントとの間に配置される。特定の実施形態において、前記マウスは、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの欠失、およびすべてのまたは実質的にすべてのヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換を含み、前記マウスADAM6タンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列は、ヒト遺伝子セグメント V_H 1-2の下流かつヒト遺伝子セグメント V_H 6-1の上流に配置されている。

10

【0052】

特定の実施形態において、前記マウスは、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド配列での、すべてのまたは実質的にすべての内因性 V_H 遺伝子セグメントの置換を含み、前記マウスADAM6タンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列は、該1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントをコードするヌクレオチド内にあるか、該1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントをコードするヌクレオチドに直接隣接する。

【0053】

1つの実施形態において、前記マウスADAM6タンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列は、前記マウスのゲノム内の導入遺伝子上に存在する。1つの実施形態において、前記マウスADAM6タンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列は、前記マウスの染色体外に存在する。

20

【0054】

1つの態様では、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むマウスであって、重鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されている再構成免疫グロブリン配列を含むB細胞を発現するマウスを提供し、該B細胞は、雄マウスにおいて機能的であるADAM6またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする遺伝子をそのゲノム内（例えば、B細胞染色体上）に含む。1つの実施形態において、前記重鎖定常領域遺伝子配列に作動可能に連結されている再構成免疫グロブリン配列は、ヒト重鎖V、Dおよび/またはJ配列；マウス重鎖V、Dおよび/またはJ配列；ヒトまたはマウス軽鎖Vおよび/またはJ配列を含む。1つの実施形態において、前記重鎖定常領域遺伝子配列は、 C_H 1、ヒンジ、 C_H 2、 C_H 3およびその組み合わせからなる群より選択されるヒトまたはマウス重鎖配列を含む。

30

【0055】

1つの態様では、遺伝子改変マウスであって、機能的にサイレンシングされた免疫グロブリン軽鎖遺伝子を含み、1つ以上の内因性免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントでの置換をさらに含み；機能的内因性ADAM6遺伝子座を欠き；および雄マウスにおいて機能的であるマウスADAM6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を発現する異所性ヌクレオチド配列を含む、遺伝子改変マウス提供する。

40

【0056】

1つの態様では、機能的内因性マウスADAM6遺伝子座または配列を欠き、およびマウスADAM6遺伝子座またはマウスADAM6遺伝子座もしくは配列の機能的断片をコードする異所性ヌクレオチド配列を含むマウスであって、異性のマウスと交配して、該異所性ADAM6遺伝子座または配列を含む後代を産生することができるマウスを提供する。1つの実施形態において、前記マウスは雄である。1つの実施形態において、前記マウスは雌である。

【0057】

1つの態様では、遺伝子改変マウスであって、内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変領

50

域遺伝子遺伝子座にヒト免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子セグメントを含み；該内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子遺伝子座に内因性機能的A D A M 6配列を欠き；および雄マウスにおいて機能的であるマウスA D A M 6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を発現する異所性ヌクレオチド配列を含む、遺伝子改変マウスを提供する。

【0058】

1つの実施形態において、前記マウスA D A M 6タンパク質を発現する異所性ヌクレオチド配列は、染色体外のものである。1つの実施形態において、前記マウスA D A M 6タンパク質を発現する異所性ヌクレオチド配列は、前記マウスのゲノム内の1つ以上の遺伝子座に組み込まれている。特定の実施形態において、前記1つ以上の遺伝子座は、免疫グロブリン遺伝子座を含む。

10

【0059】

1つの態様では、ヒトV遺伝子セグメント、D遺伝子セグメントおよびJ遺伝子セグメントに由来する免疫グロブリン重鎖配列を改変内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座から発現するマウスであって、該マウスにおいて機能的であるA D A M 6活性を含むマウスを提供する。

【0060】

1つの実施形態において、前記マウスは、複数のヒトV遺伝子セグメント、複数のD遺伝子セグメント、および複数のJ遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記D遺伝子セグメントは、ヒトD遺伝子セグメントである。1つの実施形態において、前記J遺伝子セグメントは、ヒトJ遺伝子セグメントである。1つの実施形態において、前記マウスは、ヒト化重鎖定常領域配列をさらに含み、該ヒト化は、C_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3およびその組み合わせから選択される配列の置換を含む。特定の実施形態において、前記重鎖は、ヒトV遺伝子セグメント、ヒトD遺伝子セグメント、ヒトJ遺伝子セグメント、ヒトC_H1配列、ヒトまたはマウスヒンジ配列、マウスC_H2配列、およびマウスC_H3配列に由来する。もう1つの特定の実施形態において、前記マウスは、ヒト軽鎖定常配列をさらに含む。

20

【0061】

1つの実施形態において、前記D遺伝子セグメントは、（該D遺伝子セグメントの転写方向を基準にして）5'が、前記マウスにおいて機能的であるA D A M 6活性をコードする配列に隣接する。

30

【0062】

1つの実施形態において、前記マウスにおいて機能的であるA D A M 6活性は、前記改変内因性マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子座の（V遺伝子セグメントの転写の方向を基準して）最も5'側のD遺伝子セグメントの5'および最も3'側のV遺伝子セグメントの3'にあるヌクレオチド配列の発現の結果として生ずる。

【0063】

1つの実施形態において、前記マウスにおいて機能的であるA D A M 6活性は、前記改変内因性マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子座における2つのヒトV遺伝子セグメントの間にあるヌクレオチド配列の発現の結果として生ずる。1つの実施形態において、前記2つのヒトV遺伝子セグメントは、ヒトV_H1-2遺伝子セグメントおよびV_H6-1遺伝子セグメントである。

40

【0064】

1つの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、マウスA D A M 6b配列またはその機能的断片、マウスA D A M 6a配列またはその機能的断片、およびその組み合わせから選択される配列を含む。

【0065】

1つの実施形態において、前記2つのヒトV遺伝子セグメント間のヌクレオチド配列は、該ヒトV遺伝子セグメントを基準にして反対の転写配向に配置されている。特定の実施形態において、ヌクレオチド配列は、A D A M 6遺伝子の転写方向を基準にして5'から

50

3'へ、A D A M 6 a 配列、続いてA D A M 6 b 配列をコードする。

【0066】

1つの実施形態において、前記マウスは、ヒトV遺伝子セグメントV_H 1-2とV_H 6-1の間のヒトA D A M 6 偽遺伝子配列の、マウスA D A M 6 配列またはその機能的断片での置換を含む。

【0067】

1つの実施形態において、前記マウスにおいて機能的であるA D A M 6 活性をコードする配列は、マウスA D A M 6 配列またはその機能的断片である。

【0068】

1つの実施形態において、前記マウスは、内因性マウスD F L 1 6 . 1 遺伝子セグメント（例えば、前記改変内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座に関してヘテロ接合性のマウスの場合）またはヒトD_H 1-1 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記マウスによって発現される免疫グロブリン重鎖のD 遺伝子セグメントは、内因性マウスD F L 1 6 . 1 遺伝子セグメントまたはヒトD_H 1-1 遺伝子セグメントに由来する。

10

【0069】

1つの態様では、非再構成B細胞系列のD N A 保有細胞内にマウスA D A M 6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列を含むが、再構成免疫グロブリン遺伝子座を含むB細胞内に該マウスA D A M 6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列を含まないマウスを提供し、該マウスA D A M 6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列は、マウスA D A M 6 遺伝子が野生型マウスにおいて出現する位置とは異なる、ゲノム内の位置に存在する。1つの実施形態において、前記マウスA D A M 6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列は、再構成B細胞系列のものではないすべてのまたは実質的にすべてのD N A 保有細胞に存在する；1つの実施形態において、前記核酸配列は、前記マウスの生殖細胞系細胞には存在するが、再構成B細胞の染色体には存在しない。

20

【0070】

1つの態様では、再構成免疫グロブリン遺伝子座を含むB細胞をはじめとするすべてのまたは実質的にすべてのD N A 保有細胞内にマウスA D A M 6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列を含むマウスを提供し、該マウスA D A M 6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列は、マウスA D A M 6 遺伝子が野生型マウスにおいて出現する位置とは異なる、ゲノム内の位置に存在する。1つの実施形態において、前記マウスA D A M 6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列は、前記再構成免疫グロブリン遺伝子座に隣接する核酸上にある。1つの実施形態において、前記再構成免疫グロブリン遺伝子座に隣接する核酸は、染色体である。1つの実施形態において、前記染色体は、野生型マウスにおいて見出される染色体であり、該染色体は、マウス免疫グロブリン遺伝子座の改変を含む。

30

【0071】

1つの態様では、A D A M 6 配列またはそのオルソログもしくはホモログをそのゲノムに含むB細胞を含む、遺伝子改変マウスを提供する。1つの実施形態において、前記A D A M 6 配列またはそのオルソログもしくはホモログは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座にある。1つの実施形態において、前記A D A M 6 配列またはそのオルソログもしくはホモログは、免疫グロブリン遺伝子座ではない遺伝子座にある。1つの実施形態において、前記A D A M 6 配列は、異種プロモーターによって駆動される導入遺伝子上にある。特定の実施形態において、前記異種プロモーターは、非免疫グロブリンプロモーターである。特定の実施形態において、B細胞は、A D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログを発現する。

40

【0072】

50

1つの実施形態において、前記マウスのB細胞の90%以上は、該マウスにおいて機能的であるADAM6タンパク質またはそのオルソログもしくはそのホモログまたはその断片をコードする遺伝子を含む。特定の実施形態において、前記マウスは雄マウスである。

【0073】

1つの実施形態において、前記B細胞ゲノムは、前記ADAM6配列またはそのオルソログもしくはホモログを含む、第一の対立遺伝子および第二の対立遺伝子を含む。1つの実施形態において、前記B細胞ゲノムは、前記ADAM6配列またはそのオルソログもしくはホモログを含む、第一の対立遺伝子を含むが第二の対立遺伝子を含まない。

【0074】

1つの態様において、1つ以上の内因性ADAM6対立遺伝子での改変を含むマウスを提供する。

10

【0075】

1つの実施形態において、前記改変は、前記マウスを、前記1つ以上の内因性ADAM6対立遺伝子の少なくとも1つから機能的ADAM6タンパク質を発現できなくさせる。特定の実施形態において、前記マウスは、前記内因性ADAM6対立遺伝子のそれぞれから機能的ADAM6タンパク質を発現できない。

【0076】

1つの実施形態において、前記マウスは、各内因性ADAM6対立遺伝子から機能的ADAM6タンパク質を発現できず、および該マウスは、異所性ADAM6配列を含む。

【0077】

1つの実施形態において、前記マウスは、各内因性ADAM6対立遺伝子から機能的ADAM6タンパク質を発現できず、および該マウスは、マウス免疫グロブリン重鎖定常領域配列の（マウス重鎖遺伝子座の転写の方向を基準にして）上流1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110または120 kb以内またはそれ以上上流にある異所性ADAM6配列を含む。特定の実施形態において、前記異所性ADAM6配列は、前記内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座に（例えば、遺伝子間V-D領域内、2つのV遺伝子セグメント間、V遺伝子セグメントとD遺伝子セグメントとの間、D遺伝子セグメントとJ遺伝子セグメントとの間などに）ある。特定の実施形態において、前記異所性ADAM6配列は、最後のマウスV遺伝子セグメントと最初のマウスD遺伝子セグメントの間の90から100 kb遺伝子間配列内にある。もう1つの特定の実施形態では、前記内因性90から100 kb遺伝子間V-D配列が除去され、前記異所性ADAM6配列が、最後のV遺伝子セグメントと最初のD遺伝子セグメントとの間に配置されている。

20

30

【0078】

1つの態様では、2つ以上の内因性ADAM6対立遺伝子の欠失を含む、不妊性雄マウスを提供する。1つの態様では、雄性不妊形質の保有者である雌マウスであって、非機能的ADAM6対立遺伝子または内因性ADAM6対立遺伝子ノックアウトをその生殖細胞系に含む雌マウスを提供する。

【0079】

1つの態様では、内因性免疫グロブリン重鎖V、DおよびJ遺伝子セグメントが無いマウスであって、該マウスのB細胞の大部分がADAM6配列またはそのオルソログもしくはホモログを含むマウスを提供する。

40

【0080】

1つの実施形態において、前記マウスには、2つ以上のV遺伝子セグメント、2つ以上のD遺伝子セグメント、2つ以上のJ遺伝子セグメントおよびその組み合わせから選択される内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントが無い。1つの実施形態において、前記マウスには、少なくとも1つ、かつ89以下のV遺伝子セグメント、少なくとも1つ、かつ13以下のD遺伝子セグメント、少なくとも1つ、かつ4以下のJ遺伝子セグメント、およびその組み合わせから選択される免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントが無い。1つの実施形態において、前記マウスには、約3メガ塩基の前記内因性免疫グロブリン重鎖遺

50

伝子座を含む染色体 1 2 由来のゲノム DNA 断片が無い。特定の実施形態において、前記マウスには、すべての機能的内因性重鎖 V、D および J 遺伝子セグメントが無い。特定の実施形態において、前記マウスには、8 9 の V_H 遺伝子セグメント、1 3 の D_H 遺伝子セグメントおよび 4 つの J_H 遺伝子セグメントが無い。

【0081】

1 つの態様では、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むゲノムを生殖細胞系に有し、該免疫グロブリン重鎖遺伝子座への改変が、1 つ以上のマウス免疫グロブリン可変領域配列の、1 つ以上の非マウス免疫グロブリン可変領域配列での置換を含むものであるマウスであって、マウス ADAM6 タンパク質をコードする核酸配列を含むマウスを提供する。好ましい実施形態において、前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座の D_H および J_H 配列ならびに少なくとも 3、少なくとも 10、少なくとも 20、少なくとも 40、少なくとも 60 または少なくとも 80 の V_H 配列は、非マウス免疫グロブリン可変領域配列によって置換されている。さらなる好ましい実施形態において、前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座の D_H、J_H およびすべての V_H 配列は、非マウス免疫グロブリン可変領域配列によって置換されている。前記非マウス免疫グロブリン可変領域配列は、再構成されていない場合がある。好ましい実施形態において、前記非マウス免疫グロブリン可変領域配列は、非マウス種の完全な非構成 D_H および J_H 領域ならびに少なくとも 3、少なくとも 10、少なくとも 20、少なくとも 40、少なくとも 60 または少なくとも 80 の非再構成 V_H 配列を含む。さらなる好ましい実施形態において、前記非マウス免疫グロブリン可変領域配列は、前記非マウス種の、V_H、D_H および J_H 領域すべてを含む、完全可変領域を含む。前記非マウス種は、ホモサピエンスである場合があり、前記非マウス免疫グロブリン可変領域配列は、ヒト配列である場合がある。

【0082】

1 つの態様では、少なくとも 1 つのヒト可変ドメイン／非ヒト定常ドメイン免疫グロブリンポリペプチドを含む抗体を発現するマウスであって、免疫グロブリン遺伝子座以外の遺伝子座からマウス ADAM6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログを発現するマウスを提供する。

【0083】

1 つの実施形態において、前記 ADAM6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログは、前記マウスの B 細胞において発現され、該 B 細胞は、ヒト可変配列と非ヒト定常配列とを含む再構成免疫グロブリン配列を含む。

【0084】

1 つの実施形態において、前記非ヒト定常配列は、齧歯動物配列である。1 つの実施形態において、前記齧歯動物は、マウス、ラットおよびハムスターから選択される。

【0085】

1 つの態様では、不妊性雄マウスを作製するための方法を提供し、この方法は、ドナー ES 細胞の内因性 ADAM6 対立遺伝子を非機能的にすること（または該対立遺伝子をノックアウトすること）、該ドナー ES 細胞を宿主胚に導入すること、代理母において該宿主胚を妊娠させること、および該ドナー ES 細胞に全部または一部由来する後代を該代理母に出産させることを含む。1 つの実施形態において、前記方法は、後代を交配させて不妊性雄マウスを得ることをさらに含む。

【0086】

1 つの態様では、対象となる遺伝子改変を有するマウスであって、不妊性であるマウスを作製するための方法を提供し、この方法は、（a）対象となる遺伝子改変をゲノム内で行う工程；（b）前記ゲノムを改変して、内因性 ADAM6 対立遺伝子をノックアウトするか、または内因性 ADAM6 対立遺伝子を非機能的にする工程；および（c）前記ゲノムをマウスの作製に用いる工程を含む。様々な実施形態において、前記ゲノムは、ES 細胞からのものであり、または核移植実験で使用される。

【0087】

1 つの態様では、本明細書に記載のターゲティングベクター、ヌクレオチド構築物また

は細胞を使用して作製されるマウスを提供する。

【0088】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスと、野生型マウスであるまたは遺伝子改変されている第二のマウスとの交配の後代を提供する。

【0089】

1つの態様では、マウス免疫グロブリン重鎖配列の、一つ以上の異種免疫グロブリン重鎖配列での置換を含むマウス系統を維持するための方法を提供する。1つの実施形態において、前記1つ以上の異種免疫グロブリン重鎖配列は、ヒト免疫グロブリン重鎖配列である。

【0090】

1つの実施形態において、前記マウス系統は、1つ以上のマウスV_H、D_Hおよび／またはJ_H遺伝子セグメントの欠失を含む。1つの実施形態において、前記マウスは、1つ以上のヒトV_H遺伝子セグメント、1つ以上のヒトD_H遺伝子セグメントおよび／または1つ以上のヒトJ_H遺伝子セグメントをさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、少なくとも3、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも40、少なくとも60または少なくとも80のヒトV_Hセグメント、少なくとも27のヒトD_H遺伝子セグメント、および少なくとも6のJ_H遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記マウスは、定常領域遺伝子に作動可能に連結されている、少なくとも3、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも40、少なくとも60または少なくとも80のヒトV_Hセグメント、前記少なくとも27のヒトD_H遺伝子セグメントおよび前記少なくとも6のJ_H遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記定常領域遺伝子は、マウス定常領域遺伝子である。1つの実施形態において、前記定常領域遺伝子は、C_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3および／もしくはC_H4またはその組み合わせから選択されるマウス定常領域遺伝子配列を含む。

【0091】

1つの実施形態において、前記方法は、前記マウス免疫グロブリン重鎖配列の置換に関してヘテロ接合性の雄マウスを産生する工程、および前記ヘテロ接合雄マウスを野生型雌マウスとまたはヒト重鎖配列に関してホモ接合性もしくはヘテロ接合性である雌マウスと交配させる工程を含む。1つの実施形態において、前記方法は、ヘテロ接合雄と、野生型である雌またはヒト重鎖配列に関してホモ接合性もしくはヘテロ接合性である雌とを繰り返し交配させることにより前記系統を維持する工程を含む。

【0092】

1つの実施形態において、前記方法は、ヒト重鎖配列に関してホモ接合性またはヘテロ接合性の雄または雌マウスから細胞を得る工程と、これらの細胞をドナー細胞として、またはこれらの細胞からの核をドナー核として利用する工程と、宿主細胞を使用してならびに／または代理母において該細胞および／もしくは核を妊娠させて遺伝子改変動物を作製するために該細胞または核を使用する工程とを含む。

【0093】

1つの実施形態では、重鎖遺伝子座における置換に関してヘテロ接合性である雄マウスのみを雌マウスに交配させる。特定の実施形態において、前記雌マウスは、置換される重鎖遺伝子座に関してホモ接合性、ヘテロ接合性または野生型である。

【0094】

1つの実施形態において、前記マウスは、内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座におけるλおよび／またはκ軽鎖可変配列の、異種免疫グロブリン軽鎖配列での置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記異種免疫グロブリン軽鎖配列は、ヒト免疫グロブリンλおよび／またはκ軽鎖可変配列である。

【0095】

1つの実施形態において、前記マウスは、内因性免疫グロブリン遺伝子座以外の遺伝子座に導入遺伝子をさらに含み、該導入遺伝子は、免疫グロブリン軽鎖定常領域配列に（非再構成配列については）作動可能に連結されているまたは（再構成配列については）融合

10

20

30

40

50

されている、再構成または非再構成異種 λ または κ 軽鎖配列（例えば、非再構成 V_L および非再構成 J_L 、または再構成 VJ ）をコードする配列を含む。1つの実施形態において、前記異種 λ または κ 軽鎖配列はヒトのものである。1つの実施形態において、前記定常領域配列は、齧歯動物、ヒトおよび非ヒト霊長類から選択される。1つの実施形態において、前記定常領域配列は、マウス、ラットおよびハムスターから選択される。1つの実施形態において、前記導入遺伝子は、前記軽鎖配列の発現を駆動する非免疫グロブリンプロモーターを含む。特定の実施形態において、前記プロモーターは、転写活性プロモーターである。特定の実施形態において、前記プロモーターは、ROSA26プロモーターである。

【0096】

1つの態様では、上流ホモロジーアームおよび下流ホモロジーアームを含む核酸構築物を提供し、該上流ホモロジーアームは、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列と同一または実質的に同一である配列を含み、該下流ホモロジーアームは、ヒトまたはマウス免疫グロブリン可変領域配列と同一または実質的に同一である配列を含み、マウスADAM6タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む配列が、該上流ホモロジーアームと該下流ホモロジーアームの間に配置されている。特定の実施形態において、前記マウスADAM6遺伝子をコードする配列は、野生型マウスの場合に該マウスADAM6が連結されているマウスプロモーターに作動可能と連結されている。

【0097】

1つの態様では、(a) ヒト可変領域遺伝子セグメントヌクレオチド配列と同一または実質的に同一であるヌクレオチド配列と (b) マウスにおいて機能的であるマウスADAM6またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードするヌクレオチド配列とを含むターゲティングベクターを提供する。

【0098】

1つの実施形態において、前記ターゲティングベクターは、前記マウスADAM6をコードする配列に作動可能に連結されているプロモーターをさらに含む。特定の実施形態において、前記プロモーターは、マウスADAM6プロモーターである。

【0099】

1つの態様では、マウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座を改変するためのヌクレオチド構築物であって、少なくとも1つの部位特異的リコンビナーゼ認識部位と、マウスにおいて機能的であるADAM6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする配列とを含む構築物を提供する。

【0100】

1つの態様では、本明細書に記載の遺伝子改変を含む、ES細胞、多能性細胞および人工多能性(induced pluripotent)細胞をはじめとする(しかしこれらに限定されない)マウス細胞およびマウス胚を提供する。XXである細胞およびXYである細胞を提供する。本明細書に記載の改変、例えば、前核注入により細胞に導入される改変、を含有する核を含む細胞も提供する。ウイルス導入ADAM6遺伝子を含む細胞、胚およびマウス、例えば、該マウスにおいて機能的であるADAM6遺伝子を含む形質導入構築物を含む細胞、胚およびマウスも提供する。

【0101】

1つの態様では、機能的内因性マウスADAM6遺伝子座を欠いている遺伝子改変マウス細胞であって、マウスADAM6タンパク質またはその機能的断片をコードする異源性ヌクレオチド配列を含む、遺伝子改変マウス細胞を提供する。1つの実施形態において、前記細胞は、内因性免疫グロブリン重鎖可変遺伝子配列の改変をさらに含む。特定の実施形態において、前記内因性免疫グロブリン重鎖可変遺伝子配列の改変は、マウス V_H 遺伝子セグメントの欠失、マウス D_H 遺伝子セグメントの欠失、マウス J_H 遺伝子セグメントの欠失およびその組み合わせから選択される欠失を含む。特定の実施形態において、前記マウスは、1つ以上のマウス免疫グロブリン V_H 、 D_H および/または J_H 配列の、ヒト免疫グロブリン配列での置換を含む。特定の実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン

10

20

30

40

50

配列は、ヒト V_H 、ヒト V_L 、ヒト D_H 、ヒト J_H 、ヒト J_L およびその組み合わせから選択される。

【0102】

1つの実施形態において、前記細胞は、全能性細胞、多能性細胞、または人工多能性細胞である。特定の実施形態において、前記細胞は、マウス ES 細胞である。

【0103】

1つの態様では、再構成免疫グロブリン重鎖遺伝子を含むマウス B 細胞であって、雄マウスにおいて機能的である ADAM6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする核酸配列を該 B 細胞の染色体上に含む B 細胞を提供する。1つの実施形態において、前記マウス B 細胞は、前記核酸配列の 2 つの対立遺伝子を含む。

10

【0104】

1つの実施形態において、前記核酸配列は、前記再構成マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座に隣接する核酸分子（例えば、B 細胞染色体）上にある。

【0105】

1つの実施形態において、前記核酸配列は、前記再構成マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む核酸分子とは異なる核酸分子（例えば、B 細胞染色体）上にある。

【0106】

1つの実施形態において、前記マウス B 細胞は、マウスまたはヒト免疫グロブリン定常領域遺伝子に作動可能に連結されている再構成非マウス免疫グロブリン可変遺伝子配列を含み、この場合の B 細胞は、雄マウスにおいて機能的である ADAM6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする核酸配列を含む。

20

【0107】

1つの態様では、改変免疫グロブリン重鎖遺伝子座と、雄マウスにおいて機能的であるマウス ADAM6 またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片をコードする核酸配列とを含む染色体を含む、マウス体細胞を提供する。1つの実施形態において、前記核酸配列は、前記改変免疫グロブリン重鎖遺伝子座と同じ染色体上にある。1つの実施形態において、前記核酸は、前記改変免疫グロブリン重鎖遺伝子座とは異なる染色体上にある。1つの実施形態において、前記体細胞は、前記核酸配列の単一のコピーを含む。1つの実施形態において、前記体細胞は、前記核酸配列の少なくとも 2 つのコピーを含む。特定の実施形態において、前記体細胞は、B 細胞である。特定の実施形態において、前記細胞は、生殖細胞である。特定の実施形態において、前記細胞は、幹細胞である。

30

【0108】

1つの態様では、マウス生殖細胞であって、マウス ADAM6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列を該生殖細胞の染色体上に含み、該マウス ADAM6（またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片）をコードする核酸配列が、野生型マウス生殖細胞の染色体内の位置とは異なる染色体内の位置にあるマウス生殖細胞を提供する。1つの実施形態において、前記核酸配列は、マウス免疫グロブリン遺伝子座にある。1つの実施形態において、前記核酸配列は、前記生殖細胞の、マウス免疫グロブリン遺伝子座と同じ染色体上にある。1つの実施形態において、前記核酸配列は、前記生殖細胞の、マウス免疫グロブリン遺伝子座とは異なる染色体上にある。1つの実施形態において、前記マウス免疫グロブリン遺伝子座は、少なくとも 1 つのマウス免疫グロブリン配列の、少なくとも 1 つの非マウス免疫グロブリン配列での置換を含む。特定の実施形態において、前記少なくとも 1 つの非マウス免疫グロブリン配列は、ヒト免疫グロブリン配列である。

40

【0109】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスに由来する多能性細胞、人工多能性細胞または全能性細胞を提供する。特定の実施形態において、前記細胞は、マウス胚性幹（ES）細胞である。

【0110】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスに由来する組織を提供する。1つの実施形態

50

において、前記組織は、本明細書に記載のマウスの脾臓、リンパ節または骨髓に由来する。

【0111】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスに由来する核を提供する。1つの実施形態において、前記核は、B細胞ではない2倍体細胞からのものである。

【0112】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスにおいて作製される免疫グロブリン可変領域をコードするヌクレオチド配列を提供する。

【0113】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスにおいて作製される抗体の免疫グロブリン重鎖可変領域アミノ酸配列または免疫グロブリン軽鎖可変領域アミノ酸配列を提供する。

【0114】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスにおいて作製される抗体の可変領域をコードする免疫グロブリン重鎖可変領域ヌクレオチド配列または免疫グロブリン軽鎖可変領域ヌクレオチド配列を提供する。

【0115】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスにおいて作製される抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab)₂、scFv）を提供する。1つの態様では、遺伝子改変マウスを作製するための方法を提供し、この方法は、該マウスの内因性ADAM6遺伝子座の（免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントの転写を基準にして）上流の1つ以上の免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントを、1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントで置換する工程、および該マウスの該ADAM6遺伝子座の（免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントの転写を基準にして）下流の1つ以上の免疫グロブリン遺伝子セグメントを、1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖または軽鎖の遺伝子セグメントで置換する工程を含む。1つの実施形態において、前記マウスの内因性ADAM6遺伝子座の上流の1つ以上の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントを置換する、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、V遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記マウスの内因性ADAM6遺伝子座の上流の1つ以上の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントを置換するヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、VおよびD遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記マウスの内因性ADAM6遺伝子座の下流の1つ以上の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントを置換する、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、J遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記マウスの内因性ADAM6遺伝子座の下流の1つ以上の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントを置換する、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、DおよびJ遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記マウスの内因性ADAM6遺伝子座の下流の1つ以上の内因性免疫グロブリン遺伝子セグメントを置換する、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、V、DおよびJ遺伝子セグメントを含む。

【0116】

1つの実施形態では、前記ADAM6遺伝子の上流および／または下流の前記1つ以上の免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントを多能性細胞、人工多能性細胞、または全能性細胞中で置換して、遺伝子改変前駆細胞を形成し；該遺伝子改変前駆細胞を宿主に導入し；そして、該遺伝子改変前駆細胞を含む該宿主を妊娠させて、該遺伝子改変前駆細胞に由来するゲノムを含むマウスを形成する。1つの実施形態において、前記宿主は胚である。特定の実施形態において、前記宿主は、マウス前桑実胚（pre-morula）（例えば8または4細胞期）、4倍体胚、胚性細胞の集合体、または胚盤胞から選択される。

【0117】

1つの態様では、遺伝子改変マウスを作製する方法を提供し、この方法は、マウス免疫グロブリン遺伝子セグメントとマウスADAM6（または雄マウスにおいて機能的なそのオルソログもしくはホモログもしくは断片）ヌクレオチド配列とを含むマウスヌクレオチド配列を、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを含む配列で置換して、第一のキメラ遺

10

20

30

40

50

伝子座を形成する工程、その後、マウスA D A M 6 コード配列（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片をコードする配列）を、前記ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを含む配列に挿入して、第二のキメラ遺伝子座を形成する工程を含む。

【0118】

1つの実施形態において、前記第二のキメラ遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン重鎖可変（ V_H ）遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記第二のキメラ遺伝子座は、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変（ V_L ）遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記第二のキメラ遺伝子座は、ヒト D_H 遺伝子セグメントおよびヒト J_H 遺伝子セグメントに作動可能に連結されているヒト V_H 遺伝子セグメントまたはヒト V_L 遺伝子セグメントを含む。さらなる特定の実施形態において、前記第二のキメラ遺伝子座は、マウス $C_H 2 + C_H 3$ 配列と融合するヒト $C_H 1$ 配列、またはヒト $C_H 1$ およびヒトヒンジ配列を含む第三のキメラ遺伝子座に作動可能に連結されている。

10

【0119】

1つの態様では、妊性雄マウスを作製するための、マウスA D A M 6 遺伝子座または配列を含む異所性ヌクレオチド配列を含むマウスの使用を提供し、この使用は、前記マウスA D A M 6 遺伝子座または配列を含む前記異所性ヌクレオチド配列を含むマウスを、機能的内因性マウスA D A M 6 遺伝子座または配列を欠いているマウスと交配させること、および該異所性A D A M 6 遺伝子座もしくは配列を有する後代を産生できる雌である後代を得ること、または該異所性A D A M 6 遺伝子座もしくは配列を含む雄であって、野生型雄マウスによって示される妊性とほぼ同じである妊性を示す雄である後代を得ることを含む。

20

【0120】

1つの態様では、免疫グロブリン可変領域ヌクレオチド配列を作製するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

【0121】

1つの態様では、完全ヒトF a b または完全ヒトF（a b）₂ を作製するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

【0122】

1つの態様では、不死化細胞系を作製するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

30

【0123】

1つの態様では、ハイブリドーマまたはクアドローマを作製するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

【0124】

1つの態様では、ヒト重鎖可変領域およびヒト軽鎖可変領域を含有するファージライブラリーを作製するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

【0125】

1つの態様では、ヒト抗体を作製するための可変領域配列を生成するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供し、この使用は、（a）本明細書に記載のマウスを対象となる抗原で免疫すること、（b）（a）の免疫したマウスからリンパ球を単離すること、（c）前記リンパ球を1つ以上の標識抗体に曝露すること、（d）前記対象となる抗原に結合できるリンパ球を同定すること、および（e）前記リンパ球からの1つ以上の可変領域核酸配列を増幅し、それによって可変領域配列を生成することを含む。

40

【0126】

1つの実施形態では、前記リンパ球を前記マウスの脾臓に由来する。1つの実施形態では、前記リンパ球を前記マウスのリンパ節に由来する。1つの実施形態では、前記リンパ球を前記マウスの骨髄に由来する。

【0127】

1つの実施形態において、前記標識抗体は、蛍光団結合体化抗体である。1つの実施形態において、1つ以上の前記蛍光団結合体化抗体は、I g M、I g G および／またはその

50

組み合わせから選択される。

【0128】

1つの実施形態において、前記リンパ球は、B細胞である。

【0129】

1つの実施形態において、前記1つ以上の可変領域核酸配列は、重鎖可変領域配列を含む。1つの実施形態において、前記1つ以上の可変領域核酸配列は、軽鎖可変領域配列を含む。1つの特定の実施形態において、前記軽鎖可変領域配列は、免疫グロブリンκ軽鎖可変領域配列である。1つの実施形態において、前記1つ以上の可変領域核酸配列は、重鎖可変領域配列およびκ軽鎖可変領域配列を含む。

【0130】

1つの実施形態では、ヒト抗体を作製するための重鎖可変領域配列およびκ軽鎖可変領域配列を生成するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供し、この使用は、(a) 本明細書に記載の Maus を対象となる抗原で免疫すること、(b) (a) の免疫した Maus から脾臓を単離すること、(c) 前記脾臓からの B リンパ球を1つ以上の標識抗体に曝露すること、(d) 前記対象となる抗原に結合できる (c) の B リンパ球を同定すること、および (e) 前記 B リンパ球からの重鎖可変領域核酸配列およびκ軽鎖可変領域核酸配列を増幅し、それによって該重鎖可変領域配列およびκ軽鎖可変領域配列を生成することを含む。

【0131】

1つの実施形態において、ヒト抗体を作製するための重鎖可変領域配列およびκ軽鎖可変領域配列を生成するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供し、この使用は、(a) 本明細書に記載の Maus を対象となる抗原で免疫すること、(b) (a) の免疫した Maus から1つ以上のリンパ節を単離すること、(c) 前記1つ以上のリンパ節からの B リンパ球を1つ以上の標識抗体に曝露すること、(d) 前記対象となる抗原に結合できる (c) の B リンパ球を同定すること、および (e) 前記 B リンパ球からの重鎖可変領域核酸配列およびκ軽鎖可変領域核酸配列を増幅し、それによって該重鎖可変領域配列およびκ軽鎖可変領域配列を生成することを含む。

【0132】

1つの実施形態では、ヒト抗体を作製するための重鎖可変領域配列およびκ軽鎖可変領域配列を生成するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供し、この使用は、(a) 本明細書に記載の Maus を対象となる抗原で免疫すること、(b) (a) の免疫した Maus から骨髄を単離すること、(c) 前記骨髄からの B リンパ球を1つ以上の標識抗体に曝露すること、(d) 前記対象となる抗原に結合できる (c) の B リンパ球を同定すること、および (e) 前記 B リンパ球からの重鎖可変領域核酸配列およびκ軽鎖可変領域核酸配列を増幅し、それによって該重鎖可変領域配列およびκ軽鎖可変領域配列を生成することを含む。様々な実施形態において、前記1つ以上の標識抗体は、IgM、IgG および/またはその組み合わせから選択される。

【0133】

様々な実施形態では、ヒト抗体を作製するための重鎖およびκ軽鎖可変領域配列を生成するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供し、この使用は、増幅重および軽鎖可変領域配列をヒト重および軽鎖定常領域配列に融合させること、融合した重および軽鎖配列を細胞において発現させること、および発現された重および軽鎖配列を回収し、それによってヒト抗体を産生させることをさらに含む。

【0134】

様々な実施形態において、前記ヒト重鎖定常領域は、IgM、IgD、IgA、IgE および IgG から選択される。様々な特定の実施形態において、前記 IgG は、IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 から選択される。様々な実施形態において、前記ヒト重鎖定常領域は、C_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3、C_H4 またはその組み合わせを含む。様々な実施形態において、前記軽鎖定常領域は、免疫グロブリンκ定常領域である。様々な実施形態において、前記細胞は、Helix細胞、DU145細胞、Lnca細胞

10

20

30

40

50

、M C F - 7 細胞、M D A - M B - 4 3 8 細胞、P C 3 細胞、T 4 7 D 細胞、T H P - 1 細胞、U 8 7 細胞、S H S Y 5 Y (ヒト神経芽腫) 細胞、S a o s - 2 細胞、V e r o 細胞、C H O 細胞、G H 3 細胞、P C 1 2 細胞、ヒト網膜細胞 (例えば、P E R . C 6 (商標) 細胞) および M C 3 T 3 細胞から選択される。特定の実施形態において、前記細胞は、C H O 細胞である。

【0135】

1つの態様において、対象となる抗原に対して特異的な逆キメラ齧歯動物ーヒト抗体を産生させるための方法を提供し、この方法は、本明細書に記載のマウスを該抗原で免疫する工程、該抗原に対して特異的な逆キメラマウスーヒト抗体を産生するマウスから少なくとも1つの細胞を単離する工程、該抗原に対して特異的な該逆キメラマウスーヒト抗体を産生する少なくとも1つの細胞を培養する工程、および該抗体を得る工程を含む。1つの実施形態において、前記逆キメラマウスーヒト抗体は、マウスまたはラット重鎖定常遺伝子と融合するヒト重鎖可変ドメイン、およびマウスまたはラットまたはヒト軽鎖定常遺伝子と融合するヒト軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0136】

1つの実施形態において、前記抗原に対して特異的な前記逆キメラ齧歯動物ーヒト抗体を産生する少なくとも1つの細胞の培養は、前記マウスから単離された少なくとも1つの細胞から産生された少なくとも1つのハイブリドーマ細胞で行う。

【0137】

1つの態様において、対象となる抗原に対して特異的な完全ヒト抗体を産生させるための方法を提供し、この方法は、本明細書に記載のマウスを該抗原で免疫する工程、該抗原に対して特異的な逆キメラ齧歯動物ーヒト抗体を産生するマウスから少なくとも1つの細胞を単離する工程、該抗原に対して特異的な該逆キメラ齧歯動物ーヒト抗体に由来する完全ヒト抗体を産生する少なくとも1つの細胞を産生させる工程、および該完全ヒト抗体を産生する少なくとも1つの細胞を培養する工程、および該完全ヒト抗体を得る工程を含む。

20

【0138】

様々な実施形態において、前記抗原に対して特異的な逆キメラ齧歯動物ーヒト抗体を産生するマウスから単離される少なくとも1つの細胞は、脾細胞またはB細胞である。

【0139】

様々な実施形態において、前記抗体は、モノクローナル抗体である。

30

【0140】

様々な実施形態において、前記対象となる抗原での免疫を、タンパク質、DNA、DNAとタンパク質の組み合わせ、または該抗原を発現する細胞を用いて行う。

【0141】

1つの態様では、免疫グロブリン可変領域またはその断片をコードする核酸配列を作製するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。1つの実施形態では、前記核酸配列を使用して、ヒト抗体またはその抗原結合断片を作製する。1つの実施形態では、前記マウスを使用して、抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体) 、s c F v、二重特異性 s c F v、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディー、V - N A R、V_{HH}、V_L、F (a b)、F (a b)₂、D V D (すなわち、二重可変ドメイン抗原結合タンパク質)、S V D (すなわち、単一可変ドメイン抗原結合タンパク質) または二重特異性 T 細胞エンゲージャー (b i s p e c i f i c T - c e l l e n g a g e r : B i T E) から選択される抗原結合タンパク質を作製する。

40

【0142】

1つの態様では、機能的内因性マウス A D A M 6 配列が無いマウスに異所性 A D A M 6 配列を導入するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供し、この使用は、本明細書に記載のマウスと、該機能的内因性マウス A D A M 6 配列が無いマウスとを交配させることを含む。

【0143】

50

1つの態様では、異所性A D A M 6配列を有するマウスを作製するための、本明細書に記載のマウスからの遺伝子材料の使用を提供する。1つの実施形態において、前記使用は、本明細書に記載のマウスの細胞の核を使用する核移植を含む。1つの実施形態において、前記使用は、本明細書に記載のマウスの細胞を、該細胞に由来する動物を産生するためにクローニングすることを含む。1つの実施形態において、前記使用は、前記異所性A D A M 6配列を含むマウスを作製するためのプロセスにおける、本明細書に記載のマウスの精子または卵子の利用を含む。

【0144】

1つの態様では、改変免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む妊性雄マウスを作製するための方法であって、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含む第一のマウス生殖細胞を、雄マウスにおいて機能的であるA D A M 6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含む第二のマウス生殖細胞で受精させる工程；受精細胞を形成する工程；前記受精細胞を胚へと発生させる工程；および代理母において前記胚を妊娠させてマウスを得る工程を含む方法を提供する。

【0145】

1つの実施形態において、前記受精は、雄マウスと雌マウスを交配させることによって達成される。1つの実施形態では、前記雌マウスが前記A D A M 6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含む。1つの実施形態では、前記雄マウスが前記A D A M 6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは断片を含む。

【0146】

1つの態様では、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むゲノムを有するマウスの妊性を回復させるまたは強化するための、マウスA D A M 6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログまたは対応するA D A M 6タンパク質の機能的断片をコードする核酸配列の使用を提供し、この場合の改変は、内因性A D A M 6機能を低減させるまたは消去する。

【0147】

1つの実施形態では、前記核酸配列を前記マウスのゲノムの異所位置に組み込む。1つの実施形態では、前記核酸配列を前記マウスのゲノムの内因性免疫グロブリン遺伝子座に組み込む。特定の実施形態において、前記内因性免疫グロブリン遺伝子座は、重鎖遺伝子座である。1つの実施形態では、前記核酸配列を前記マウスのゲノムの内因性免疫グロブリン遺伝子座以外の位置に組み込む。

【0148】

1つの態様では、ヒト疾患または障害の処置のために、薬物（例えば、抗原結合タンパク質）を製造するための、または薬物（例えば、抗原結合タンパク質）の可変配列をコードする配列を製造するための、本明細書に記載のマウスの使用を提供する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1）

マウスであって、該マウスは、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むゲノムを有し、該改変は、内因性A D A M 6機能の低減または消去を含み、そして該マウスは、マウスA D A M 6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログまたは対応するA D A M 6タンパク質の機能的断片をコードする核酸配列をさらに含む、マウス。

（項目2）

前記核酸配列が、異所位置に位置する、項目1に記載のマウス。

（項目3）

前記核酸配列が、内因性免疫グロブリン遺伝子座にある、項目1または2に記載のマウス。

（項目4）

前記核酸配列が、前記マウスゲノムの内因性免疫グロブリン遺伝子座以外の位置に組み込まれている、項目1または2に記載のマウス。

（項目5）

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座の前記改変が、1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子配列の配置を含む、項目1～4のいずれか一項に記載のマウス。

(項目6)

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座の前記改変が、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座内の1つ以上の配列の、1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子配列での置換を含む、項目1～4のいずれか一項に記載のマウス。

(項目7)

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座の前記改変が、1つ以上の内因性重鎖V (V_H) 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト重鎖V (V_H) 遺伝子セグメントでの置換を含む、項目6に記載のマウス。

10

(項目8)

前記免疫グロブリン重鎖遺伝子座の前記改変が、内因性重鎖可変遺伝子配列の、ヒト重鎖可変遺伝子配列での置換を含む、項目1に記載のマウス。

(項目9)

前記核酸配列が、マウスADAM6 aタンパク質および／もしくはADAM6 bタンパク質、またはそのオルソログ、ホモログもしくは機能的断片をコードする、項目1～8のいずれか一項に記載のマウス。

(項目10)

マウスの免疫グロブリン重鎖遺伝子座を改変するための方法であって、以下：

(a) 雄マウスにおいて内因性マウスADAM6活性の低減または消去を結果としてもたらし、該マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の第一の改変を行う工程；および

(b) 雄マウスにおいて機能的であるADAM6活性を該マウスに付与する核酸配列を付加するための該マウスに対する第二の改変を行う工程を含む方法。

20

(項目11)

前記工程(b)の核酸配列が異所位置に付加される、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記第一の改変が、1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子配列の配置を含む、項目10または11に記載の方法。

(項目13)

前記第一の改変が、前記マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座内の1つ以上の配列の、1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子配列での置換を含む、項目10または11に記載の方法。

30

(項目14)

前記第一の改変が、1つ以上の内因性 V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換を含む、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記第一の改変が、内因性重鎖可変遺伝子配列の、ヒト重鎖可変遺伝子配列での置換を含む、項目10に記載の方法。

(項目16)

前記第一および前記第二の改変が同時に行われる、項目10～15のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目17)

項目10～16のいずれか一項に記載の方法によって得ることができるマウス。

(項目18)

項目1～9および17のいずれか一項に記載のマウスからの単離細胞。

(項目19)

項目1～9および17のいずれか一項に記載のマウスからの単離組織。

(項目20)

ヒトマウス逆キメラ抗体、完全ヒト抗体、完全ヒトFab断片および／または完全ヒト

50

F (a b)₂ 断片の産生のための、項目 1 ～ 9 および 17 のいずれか一項に記載のマウスの使用。

(項目 21)

抗原に対して特異的な逆キメラマウスーヒト抗体を産生させるための方法であって、以下の工程：

- a) 項目 1 ～ 9 および 17 のいずれか一項に記載のマウスを該抗原で免疫する工程；
- b) 該抗原に対して特異的な逆キメラマウスーヒト抗体を産生するマウスから少なくとも 1 つの細胞を単離する工程；および
- c) 工程 b) の抗体を産生する少なくとも 1 つの細胞を培養し、そして該抗体を得る工程を含む方法。

10

(項目 22)

工程 c) における前記培養する工程が、工程 b) において得た前記少なくとも 1 つの細胞から産生された少なくとも 1 つのハイブリドーマ細胞で行われる、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

抗原に対して特異的な完全ヒト抗体を産生させるための方法であって、以下の工程：

- a) 項目 1 ～ 9 および 17 のいずれか一項に記載のマウスを該抗原で免疫する工程；
- b) 該抗原に対して特異的な逆キメラマウスーヒト抗体を産生するマウスから少なくとも 1 つの細胞を単離する工程；
- c) 工程 b) の該抗体に由来し、該抗原に対して特異な完全ヒト抗体を産生する少なくとも 1 つの細胞を産生させる工程；および
- d) 工程 c) の抗体を産生する少なくとも 1 つの細胞を培養する工程、および該抗体を得る工程を含む方法。

20

(項目 24)

工程 b) において得られる前記少なくとも 1 つの細胞が、脾細胞または B 細胞である、項目 21 および 23 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 25)

前記抗体がモノクローナル抗体である、項目 21 ～ 24 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 26)

工程 a) の前記抗原での免疫が、タンパク質、DNA、DNA とタンパク質の組み合わせ、または前記抗原を発現する細胞で行われる、項目 21 ～ 25 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 27)

内因性 ADAM6 機能を低減させるまたは消去する免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含むゲノムを有するマウスの妊性を回復または向上させるための、マウス ADAM6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログまたは対応する ADAM6 タンパク質の機能的断片をコードする核酸配列の使用。

(項目 28)

前記核酸配列が、前記マウスの前記ゲノムの異所位置に組み込まれている、項目 27 に記載の使用。

40

(項目 29)

前記核酸配列が、前記マウスの前記ゲノムの内因性免疫グロブリン遺伝子座に組み込まれている、項目 27 または 28 に記載の使用。

(項目 30)

前記核酸配列が、前記マウスのゲノムの内因性免疫グロブリン遺伝子座以外の位置に組み込まれている、項目 27 または 28 に記載の使用。

【図面の簡単な説明】

【0149】

【図 1A】図 1A は、約 1 メガ塩基 (Mb) のヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子

50

座（白抜きの記号）での約3メガ塩基（Mb）のマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座（黒塗りの記号）の直接ゲノム置換の一般説明図（縮尺不定）を示すものである。

【図1B】図1Bは、ヒト免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座の2つのほぼ同一のリピートのうちの約0.5メガ塩基（Mb）の第一のリピート、すなわち近位リピート（白抜きの記号）での約3メガ塩基（Mb）のマウス免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座（黒塗りの記号）の直接ゲノム置換の一般説明図（縮尺不定）を示すものである。

【図2A】図2Aは、すべてのマウスV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントの欠失ならびに3つのヒトV_H、すべてのヒトD_HおよびJ_H遺伝子セグメントでの置換を生じさせる結果となるマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座の直接ゲノム置換についての最初の3工程（A～C）の詳細な説明図（縮尺不定）を示すものである。ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントの第一の挿入のためのターゲティングベクター（3hV_HBACvec）が示されており、このターゲティングベクターは、67kb 5'マウスホモロジーアーム、選択カセット（白抜きの長方形）、部位特異的組換え部位（白抜きの三角形）、145kbヒトゲノム断片および8kb 3'マウスホモロジーアームを有する。後続のターゲティングベクターから挿入されるヒト（白抜きの記号）およびマウス（黒塗りの記号）免疫グロブリン遺伝子セグメント、追加の選択カセット（白抜きの長方形）および部位特異的組換え部位（白抜きの三角形）が示されている。

【図2B】図2Bは、77の追加のヒトV_H遺伝子セグメントの挿入および最後の選択カセットの除去を生じさせる結果となるマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座の直接ゲノム置換についての追加の6工程（D～I）の詳細な説明図（縮尺不定）を示すものである。最初のヒト重鎖遺伝子セグメント挿入物（3hV_H-CREハイブリッド対立遺伝子）への追加のヒトV_H遺伝子セグメントの挿入のためのターゲティングベクター（18hV_HBACvec）が示されており、このターゲティングベクターは、20kb 5'マウスホモロジーアーム、選択カセット（白抜きの長方形）、196kbヒトゲノム断片および62kbヒトホモロジーアームを有し、該ヒトホモロジーアームは、示されている最初のヒト重鎖遺伝子セグメント挿入物の5'端とオーバーラップしており、該ヒト遺伝子セグメントに対して5'に部位特異的組換え部位（白抜きの三角形）がある。後続のターゲティングベクターによって挿入されるヒト（白抜きの記号）およびマウス（黒塗りの記号）免疫グロブリン遺伝子セグメントならびに追加の選択カセット（白抜きの長方形）が示されている。

【図2C】図2Cは、すべてのマウスVκおよびJκ遺伝子セグメントの欠失（Igκ-CREハイブリッド対立遺伝子）を生じさせる結果となるマウス免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座の直接ゲノム置換についての最初の3工程（A～C）の詳細な説明図（縮尺不定）を示すものである。前記ターゲティングベクターから挿入される選択カセット（白抜きの長方形）および部位特異的組換え部位（白抜きの三角形）が示されている。

【図2D】図2Dは、前記近位リピートのすべてのヒトVκおよびJκ遺伝子セグメントの挿入および最後の選択カセットの欠失（40hVκdHygハイブリッド対立遺伝子）を生じさせる結果となるマウス免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座の直接ゲノム置換についての追加の5工程（D～H）の詳細な説明図（縮尺不定）を示すものである。後続のターゲティングベクターによって挿入されるヒト（白抜きの記号）およびマウス（黒塗りの記号）免疫グロブリン遺伝子セグメントならびに追加の選択カセット（白抜きの長方形）が示されている。

【図3A】図3Aは、標的胚性幹（ES）細胞におけるヒト重鎖遺伝子配列の挿入およびマウス重鎖遺伝子配列の喪失を検出するための定量的PCR（qPCR）プライマー／プローブセットの場所を含む、スクリーニング戦略の一般説明図（縮尺不定）を示すものである。未改変マウス染色体（上部）および正しくターゲティングされた染色体（下部）上の欠失領域（「喪失」プローブCおよびD）、挿入された領域（「hIgH」プローブGおよびH）および隣接領域（「保持」プローブA、B、EおよびF）のためのqPCRプライマー／プローブセットを用いた、ES細胞およびマウスにおける第一のヒト重鎖遺伝子挿入についてのスクリーニング戦略が示されている。

【図 3 B】図 3 B は、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントの第一の挿入についての、親 E S 細胞および改変 E S 細胞における実測プローブコピー数の代表的算定を示すものである。プローブ A から F についての実測プローブコピー数は、 $2 / 2 \Delta \Delta C t$ と算定された。 $\Delta \Delta C t$ は、 $ave [\Delta C t (\text{試料}) - med \Delta C t (\text{対照})]$ として算定され、この式中の $\Delta C t$ は、被験プローブと基準プローブ（アッセイに依存して 4 と 6 の間の基準プローブ）の間の $C t$ の差である。用語 $med \Delta C t$ （対照）は、親 E S 細胞からの多数（ > 60 ）の非標的 DNA 試料の中央値 $\Delta C t$ である。各改変 E S 細胞クローンを 6 つひと組（sexuplicate）でアッセイした。親 E S 細胞における Ig H プローブ G および H のコピー数を算定するために、これらのプローブが改変 E S 細胞では 1 のコピー数を有すると仮定し、増幅が観察されなかったとしても 35 の最大 $C t$ を用いた。

【図 3 C】図 3 C は、プローブ D および H のみを使用して算定した各遺伝子型の 4 匹のマウスについてのコピー数の代表算定を示すものである。野生型マウス：WT マウス；ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントの最初の挿入物に関してヘテロ接合性のマウス：HET マウス；ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントの最初の挿入物に関してホモ接合性のマウス：Homo マウス。

【図 4 A】図 4 A は、細菌相同組換え（BHR）による $3hV_H BACvec$ の構築に用いた 3 工程についての詳細な説明図（縮尺不定）を示すものである。ターゲティングベクターから挿入されたヒト（白抜きの記号）およびマウス（黒塗りの記号）免疫グロブリン遺伝子セグメント、選択カセット（白抜きの長方形）および部位特異的組換え部位（白抜きの三角形）が示されている。

【図 4 B】図 4 B は、Not I 消化後の 3 つの BAC クローン（B1、B2 および B3）のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を示すものである。マーカー M1、M2 および M3 は、それぞれ、ローレンジ、ミドルレンジおよびラムダラダー PFGE マーカー（New England BioLabs、マサチューセッツ州イプスウィッチ）である。

【図 5 A】図 5 A は、漸増量のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントでのマウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の逐次的改変の概略説明図（縮尺不定）を示すものである。重鎖ヒト化の 3 つの異なる段階それぞれからホモ接合型マウスを作製した。白抜きの記号はヒト配列を示し、黒塗りの記号はマウス配列を示す。

【図 5 B】図 5 B は、漸増量のヒト免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子セグメントでのマウス免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座の逐次的改変の概略説明図（縮尺不定）を示すものである。 κ 軽鎖ヒト化の 3 つの異なる段階それぞれからホモ接合型マウスを作製した。白抜きの記号はヒト配列を示し、黒塗りの記号はマウス配列を示す。

【図 6】図 6 は、野生型および VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスにおける B 細胞集団の FACS ドットプロットを示すものである。野生型（wt）、VELOCIMMUNE（登録商標）1（V1）、VELOCIMMUNE（登録商標）2（V2）または VELOCIMMUNE（登録商標）3（V3）マウスの脾臓（最上段、上から三段目および最下段）または鼠蹊リンパ節（上から二段目）からの細胞を、表面 IgM を発現する B 細胞（最上段、および上から二段目）、 κ もしくは λ 軽鎖のいずれかを含有する表面免疫グロブリン（上から三段目）または特定のハプロタイプの表面 IgM（最下段）について染色し、集団を FACS によって分離した。

【図 7 A】図 7 A は、接合部の多様性およびヌクレオチド付加の証拠となる、 $V_H - D_H - J_H$ （CDR3）接合部周辺のランダムに選択した VELOCIMMUNE（登録商標）抗体の代表重鎖 CDR3 配列を示すものである。重鎖 CDR3 配列を D_H 遺伝子セグメント使用量（usage）に従ってグループ分けし、その生殖細胞系を各グループの上に太字で提供する。各重鎖 CDR3 配列についての V_H 遺伝子セグメントを各配列の 5' 端のカッコ内に記入する（例えば、3-72 は、ヒト V_H 3-72 である）。各重鎖 CDR3 についての J_H 遺伝子セグメントを各配列の 3' 端のカッコ内に記入する（例えば、3 は、ヒト J_H 3 である）。示されている各配列についての配列番号は、上から下に進んで、次のとおりである：配列番号 21；配列番号 22；配列番号 23；配列番号 24；配列

10

20

30

40

50

番号 25 ; 配列番号 26 ; 配列番号 27 ; 配列番号 28 ; 配列番号 29 ; 配列番号 30 ; 配列番号 31 ; 配列番号 32 ; 配列番号 33 ; 配列番号 34 ; 配列番号 35 ; 配列番号 36 ; 配列番号 37 ; 配列番号 38 ; 配列番号 39 。

【図 7 B】図 7 B は、接合部の多様性およびヌクレオチド付加の証拠となる、 $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ (CDR3) 接合部周辺のランダムに選択した V E L O C I M M U N E (登録商標) 抗体の代表軽鎖 CDR3 配列を示すものである。各軽鎖 CDR3 配列についての V_{κ} 遺伝子セグメントを各配列の 5' 端のカッコ内に記入する (例えば、1-6 は、ヒト V_{κ} 1-6 である)。各軽鎖 CDR3 についての J_{κ} 遺伝子セグメントを各配列の 3' 端のカッコ内に記入する (例えば、1 は、ヒト J_{κ} 1 である)。示されている各配列についての配列番号は、上から下に進んで、次のとおりである：配列番号 40 ; 配列番号 41 ; 配列番号 42 ; 配列番号 43 ; 配列番号 44 ; 配列番号 45 ; 配列番号 46 ; 配列番号 47 ; 配列番号 48 ; 配列番号 49 ; 配列番号 50 ; 配列番号 51 ; 配列番号 52 ; 配列番号 53 ; 配列番号 54 ; 配列番号 55 ; 配列番号 56 ; 配列番号 57 ; 配列番号 58 。

【図 8】図 8 は、38 (非免疫 IgM)、28 (非免疫 IgG)、32 (IgG からの非免疫 Ig κ)、36 (免疫 IgG) または 36 (IgG からの免疫 Ig κ) 配列セットの中の各ヌクレオチド (NT ; 左縦列) およびアミノ酸 (AA ; 右縦列) 位置で変化した配列のパーセントとして (マッチする生殖細胞系配列へのアラインメント後に) スコアを付けた V E L O C I M M U N E (登録商標) 抗体の重鎖および軽鎖の体細胞超変異頻度を示すものである。陰影のあるバーは、CDR の場所を示す。

【図 9 A】図 9 A は、野生型マウス (白抜きのバー) または V E L O C I M M U N E (登録商標) マウス (黒塗りのバー) における IgM および IgG アイソタイプについての血清免疫グロブリンのレベルを示すものである。

【図 9 B】図 9 B は、野生型マウス (白抜きのバー) または V E L O C I M M U N E (登録商標) マウス (黒塗りのバー) における IgA アイソタイプについての血清免疫グロブリンのレベルを示すものである。

【図 9 C】図 9 C は、野生型マウス (白抜きのバー) または V E L O C I M M U N E (登録商標) マウス (黒塗りのバー) における IgE アイソタイプについての血清免疫グロブリンのレベルを示すものである。

【図 10 A】図 10 A は、IL-6R のエクストドメインでの 2 ラウンドの免疫後 (採血試料 (bleed) 1) または 3 ラウンドの免疫後 (採血試料 2) の 7 匹の V E L O C I M M U N E (登録商標) (VI) および 5 匹の野生型 (WT) マウスからの血清のインターロイキン-6 受容体 (IL-6R) に対する抗原特異的 IgG 力価を示すものである。

【図 10 B】図 10 B は、7 匹の V E L O C I M M U N E (登録商標) (VI) マウスおよび 5 匹の野生型 (WT) マウスからの抗 IL-6R 特異的 IgG アイソタイプ特異的力価を示すものである。

【図 11 A】図 11 A は、V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスにおいて産生された抗インターロイキン-6 受容体モノクローナル抗体の親和性分布を示すものである。

【図 11 B】図 11 B は、V E L O C I M M U N E (登録商標) (VI) マウスおよび野生型 (WT) マウスにおいて産生された抗インターロイキン-6 受容体モノクローナル抗体の抗原特異的遮断を示すものである。

【図 12】図 12 は、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座におけるマウス ADAM6a および ADAM6b 遺伝子の概略説明図 (縮尺不定) を示すものである。ヒト化内因性重鎖遺伝子座へのマウス ADAM6a および ADAM6b の挿入のために使用したターゲティングベクター (mADAM6 ターゲティングベクター) が示されており、このターゲティングベクターは、5' および 3' 端に工学的に作製された制限酵素認識部位を含む部位特異的組換え部位 (Frt) が隣接する選択カセット (HYG : ハイグロマイシン) を有する。

【図 13】図 13 は、ヒト重鎖可変遺伝子セグメント 1-2 (V_H 1-2) と 6-1 (V_H 6-1) の間にあるヒト ADAM6 偽遺伝子 (hADAM6 Ψ) の概略説明図 (縮尺不定) を示すものである。ヒト ADAM6 偽遺伝子を欠失させ、ヒト重鎖遺伝子座にユニ-

10

20

30

40

50

クな制限酵素認識部位を挿入する細菌相同組換えのためのターゲティングベクター（hADAM6Ψターゲティングベクター）が示されており、このターゲティングベクターは、5'および3'端に工学的に作製された制限酵素認識部位を含む部位特異的組換え部位（loxP）が隣接する選択カセット（NEO：ネオマイシン）を有する。部位特異的組換え部位が隣接する選択カセットを含む、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子をコードするゲノム断片を含有する、結果として得られる標的ヒト化重鎖遺伝子座の説明図（縮尺不定）が示されている。

【図14A】図14Aは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}\kappa^{+}/^{+}$ ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}A6^{res}\kappa^{+}/^{+}$ ）の骨髓中のIgMおよびB220の表面発現についてのシングレット（singlet）でゲートしたリンパ球のFACS等高線図を示すものである。未熟（ $B220^{int}IgM^{+}$ ）および成熟（ $B220^{high}IgM^{+}$ ）B細胞の百分率を各等高線図に記入する。

10

【図14B】図14Bは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}\kappa^{+}/^{+}$ ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}A6^{res}\kappa^{+}/^{+}$ ）の大腿骨から単離した骨髓中の未熟（ $B220^{int}IgM^{+}$ ）および成熟（ $B220^{high}IgM^{+}$ ）B細胞の総数を示すものである。

20

【図15A】図15Aは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}\kappa^{+}/^{+}$ ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}A6^{res}\kappa^{+}/^{+}$ ）の骨髓中のc-kitおよびCD43の表面発現についてのCD19⁺ゲートB細胞のFACS等高線図を示すものである。プロB（ $CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$ ）細胞およびプレB（ $CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$ ）細胞の百分率を各等高線図のそれぞれ右上および左下象限（quadrant）に記入する。

【図15B】図15Bは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}\kappa^{+}/^{+}$ ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}A6^{res}\kappa^{+}/^{+}$ ）の大腿骨から単離した骨髓中のプロB（ $CD19^{+}CD43^{+}ckit^{+}$ ）細胞およびプレB（ $CD19^{+}CD43^{-}ckit^{-}$ ）細胞の総数を示すものである。

30

【図16A】図16Aは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}\kappa^{+}/^{+}$ ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}A6^{res}\kappa^{+}/^{+}$ ）の骨髓中のCD19およびCD43の表面発現についてのシングレットでゲートしたリンパ球のFACS等高線図を示すものである。未熟B（ $CD19^{+}CD43^{-}$ ）細胞、プレB（ $CD19^{+}CD43^{int}$ ）細胞およびプロB（ $CD19^{+}CD43^{+}$ ）細胞の百分率を各等高線図に記入する。

40

【図16B】図16Bは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}\kappa^{+}/^{+}$ ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}A6^{res}\kappa^{+}/^{+}$ ）の骨髓中の未熟B（ $CD19^{+}CD43^{-}$ ）細胞およびプレB（ $CD19^{+}CD43^{int}$ ）細胞のヒストグラムを示すものである。

【図17A】図17Aは、ヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス（ $H^{+}/^{+}\kappa^{+}/^{+}$ ）ならびにマウスADAM6遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接

50

合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$) の脾細胞における CD19 および CD3 の表面発現についてのシングレットでゲートしたリンパ球の FACS 等高線図を示すものである。B ($CD19^{+} CD3^{-}$) 細胞および T ($CD19^{-} CD3^{+}$) 細胞の百分率を各等高線図に記入する。

【図 17B】図 17B は、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ \kappa^{+}/+$) ならびにマウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$) の脾臓における Ig λ および Ig κ 軽鎖の表面発現についての CD19⁺ゲート B 細胞の FACS 等高線図を示すものである。Ig λ^{+} (左上象限) B 細胞および Ig κ^{+} (右下象限) B 細胞の百分率を各等高線図に記入する。

10

【図 17C】図 17C は、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ \kappa^{+}/+$) ならびにマウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$) の脾臓における CD19⁺ B 細胞の総数を示すものである。

【図 18A】図 18A は、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ \kappa^{+}/+$) ならびにマウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$) の脾臓における Ig D および Ig M の表面発現についての CD19⁺ゲート B 細胞の FACS 等高線図を示すものである。成熟 B 細胞 ($CD19^{+} Ig D^{high} Ig M^{int}$) の百分率を各等高線図に記入する。右の等高線図上の矢印は、Ig M および Ig D 表面発現に関連した B 細胞の成熟過程を図示するものである。

20

【図 18B】図 18B は、 $CD19^{+} Ig M^{high} Ig D^{int}$ から $CD19^{+} Ig M^{int} Ig D^{high}$ に成熟する間の、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ \kappa^{+}/+$) ならびにマウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$) の脾臓における B 細胞の総数を示すものである。

30

【図 19】図 19 は、ヒト細胞表面受容体 (抗原 A) で免疫した、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ \kappa^{+}/+$; $n=5$)、ならびにマウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$; $n=5$) からの、第 1 回および第 2 回採血試料についての抗体力価を示すものである。

【図 20】図 20 は、ヒト受容体チロシンキナーゼ (抗原 B) に特異的なヒト抗体で免疫した、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ \kappa^{+}/+$; $n=5$)、ならびにマウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$; $n=10$) からの、第 1 回および第 2 回採血試料についての抗体力価を示すものである。

40

【図 21】図 21 は、TGF- β シグナル伝達経路を調節する機能を果たす分泌ヒトタンパク質 (抗原 C) で免疫した、ヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ \kappa^{+}/+$; $n=12$)、ならびにマウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+}/+ A6^{res} \kappa^{+}/+$; $n=12$) からの、第 1 回および第 2 回採血試料についての抗体力価を示すものである。

【図 22】図 22 は、ヒト受容体チロシンキナーゼ (抗原 D) で免疫した、マウス ADAM6 遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重鎖およびヒト κ 軽鎖可変

50

遺伝子遺伝子座に関してホモ接合性のマウス ($H^{+ / +} A 6^{r e s k^{+ / +}} ; n = 12$) からの、第1回および第2回採血試料についての抗体力価を示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0150】

本発明は、記載する特定の方法および実験条件に限定されない。かかる方法および条件は変わることがあるからである。本発明の範囲の特許請求の範囲によって定義するので、本明細書において用いる専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としたものであり、限定することを意図したものではないことを理解されたい。

【0151】

別様に定義しない限り、本明細書において用いるすべての用語および句は、その用語または句が用いられている文脈から相反することが明確に指摘されるまたは明確に分かる場合を除き、その用語および句が当該技術分野において獲得している意味を含む。本明細書に記載するものに類似したまたは等価の任意の方法および材料を本発明の実施または試験に用いることができるが、今は特定の方法および材料を記載する。言及するすべての出版物は、参照により本明細書に援用されている。

【0152】

遺伝子セグメントの量を指すために用いるときの句「実質的な」または「実質的に」（例えば、「実質的にすべての」V遺伝子セグメント）は、機能的遺伝子セグメントと非機能的遺伝子セグメントの両方を含み、および様々な実施形態において、例えば、すべての遺伝子セグメントの80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上を含む；様々な実施形態において、「実質的にすべての」遺伝子セグメントは、例えば、機能的（すなわち、非偽遺伝子）遺伝子セグメントの少なくとも95%、96%、97%、98%または99%を含む。

【0153】

用語「置換」は、ゲノム内の配列を該ゲノム配列の遺伝子座において異種配列（例えば、マウスにおけるヒト配列）で置換するようなやり方でDNA配列を細胞のゲノムに配置する場合のものを含む。そのようにして配置されたDNAは、そのようにして配置された配列を得るために使用した源DNAの一部である1つ以上の調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、5'または3'非翻訳領域、適切な組換えシグナル配列など）を含み得る。例えば、様々な実施形態において、前記置換は、そのように置かれた（placed）DNA配列（異種配列を含む）から遺伝子産物の産生をもたらす結果となる、異種配列に代えての内因性配列の置き換えであり、該内因性配列の発現ではない；前記置換は、内因性ゲノム配列の、該内因性ゲノム配列によってコードされているタンパク質と類似の機能を有するタンパク質をコードするDNA配列での置換である（例えば、前記内因性ゲノム配列は、免疫グロブリン遺伝子またはドメインをコードしており、前記DNA断片は、一つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子またはドメインをコードする）。様々な実施形態において、内因性遺伝子またはその断片は、対応するヒト遺伝子またはその断片で置換される。対応するヒト遺伝子またはその断片は、置換される内因性遺伝子もしくは断片のオルソログである、置換される内因性遺伝子もしくは断片のホモログである、または置換される内因性遺伝子もしくは断片と構造および／もしくは機能の点で実質的に同一もしくは同じである、ヒト遺伝子または断片である。

【0154】

遺伝モデルとしてのマウスは、トランスジェニックおよびノックアウト技術によって大きく向上され、これらの技術により特定の遺伝子の指向性過発現または欠失の効果の研究が可能になった。あらゆるその利点にもかかわらず、前記マウスは、マウスをヒト疾患についての不完全なモデルにならしめるおよびヒト治療薬を試験するまたはそれらを作製するための不完全なプラットフォームにならしめる遺伝的障害をやはり提示する。第一に、ヒト遺伝子の約99%はマウスホモログを有する（Waterstonら、2002、Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome、Nature 420:520-562

)が、可能性のある治療薬は、多くの場合、所期のヒト標的のマウスオルソログと交叉反応することができない、または不適切に交叉反応する。この問題を未然に防ぐために、選択標的遺伝子を「ヒト化」することができる、すなわち、マウス遺伝子を消去して、対応するオルソログヒト遺伝子配列により置換することができる(例えば、米国特許第6,586,251号、同第6,596,541号および同第7,105,348号明細書;これらは参照により本明細書に援用されている)。最初、「ノックアウト・プラス・トランスジェニックヒト化(knockout-plus-transgenic humanization)」戦略によりマウス遺伝子をヒト化する努力は、前記内因性遺伝子の欠失(すなわち、ノックアウト)を保有するマウスとランダムに組み込まれたヒト導入遺伝子を保有するマウスとの交配を必要とした(例えば、Brillら、2006、Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution、Thromb Haemost 95:341-347;Homanicsら、2006、Production and characterization of murine models of classic and intermediate maple syrup urine disease、BMC Med Genet 7:33;Jamsaiら、2006、A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/beta-thalassemia、Genomics 88(3):309-15;Panら、2006、Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor(preTCR) function:human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gamma delta-deficient mice、Mol Immunol 43:1741-1750参照)。しかし、これらの努力は、サイズ制限によって妨げられた;従来のノックアウト技術は、大きなマウス遺伝子を該遺伝子の大きなヒトゲノムカウンターパートで直接置換するのに十分なものではなかった。該マウス遺伝子の同じまさにその遺伝子の場所で(すなわち内因性マウス遺伝子座で)ヒトカウンターパート遺伝子により内因性マウス遺伝子を直接置換する直接相同置換の直接的なアプローチは、技術的な難しさのため、滅多に試みられない。今まで、直接置換に対する努力は手の込んだ厄介な手順を必要とし、それ故、取り扱うことができる遺伝子材料の長さおよび操作することができる精度が限定された。

【0155】

外因的に導入されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、マウスの前駆体B細胞内で再構成する(Altら、1985、Immunoglobulin genes in transgenic mice、Trends Genet 1:231-236)。この発見は、ヒト抗体を発現させるためにノックアウト・プラス・トランスジェニックアプローチを用いるマウスの工学的作製に活用された(Greenら、1994、Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs、Nat Genet 7:13-21;Lonbergら、1994、Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications、Nature 368:856-859;Jakobovitsら、2007、From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice、Nat Biotechnol 25:1134-1143)。マウス免疫グロブリン

重鎖およびκ軽鎖遺伝子座は、これらのマウスにおいて、各内因性遺伝子座の小さいが重大な部分の標的欠失、続いて、上に記載したようなランダムに組み込まれた大きな導入遺伝子としての、またはミニ染色体としてのヒト免疫グロブリン遺伝子遺伝子座の導入により不活性化された (Tomizukaら、2000、Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies、PNAS USA 97: 722-727)。かかるマウスは、遺伝子工学の重要な前進を象徴した；それらから単離された完全ヒトモノクローナル抗体は、様々なヒト疾患の処置に有望な治療的可能性をもたらした (Gibsonら、2006、Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer、Clin Colorectal Cancer 6: 29-31; Jakobovitsら、2007; Kimら、2007、Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two Phase II studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma、Blood 109 (11): 4655-62; Lonberg、2005、Human antibodies from transgenic animals、Nat Biotechnol 23: 1117-1125; Makerら、2005、Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study、Ann Surg Oncol 12: 1005-1016; McClungら、2006、Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density、New Engl J Med 354: 821-831)。しかし、上で論じたように、これらのマウスは、野生型マウスと比較して、損なわれたB細胞発生および免疫不全を示す。かかる問題は、活発な体液性応答を維持するおよびしたがって一部の抗原に対する完全ヒト抗体を産生するマウスの能力を潜在的に制限する。前記不全は、(1) ヒト免疫グロブリン導入遺伝子のランダムな導入に起因する不十分な機能性、ならびに上流および下流制御要素の欠如に起因する結果としての不正確な発現 (Garrettら、2005、Chromatin architecture near a potential 3' end of the IgH locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites、Mol Cell Biol 25: 1511-1525; Manisら、2003、Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region、Mol Immunol 39: 753-760; Pawlitzkyら、2006、Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse IgH locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A、J Immunol 176: 6839-6851); (2) B細胞の正常な成熟、増殖および生存に要求されるシグナル伝達過程を害し得る、ヒト定常ドメインと細胞表面のB細胞受容体シグナル伝達複体のマウス要素の間の非効率的種間相互作用 (Hombachら、1990、Molec

ular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class、Nature 343:760-762) ; および (3) 親和性選択 (Raoら、2002、Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells、J Immunol 169:1859-1868) および免疫グロブリン血清濃度 (Brambellら、1964、A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism、Nature 203:1352-1354 ; Junghans and Anderson、1996、The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor、PNAS USA 93:5512-5516 ; Raoら、2002 ; Hjelmlら、2006、Antibody-mediated regulation of the immune response、Scand J Immunol 64:177-184 ; Nimmerjahn and Ravetch、2007、Fc-receptors as regulators of immunity、Adv Immunol 96:179-204) を低減させ得る、可溶性ヒト免疫グロブリンとマウスFc受容体の間の非効率の種間相互作用に起因し得る。これらの不
10
20
全は、内因性重および軽鎖遺伝子座におけるその天然の場所の中のマウス免疫グロブリン遺伝子座の可変領域のみのin situヒト化によって修正することができる。これは、マウス定常領域の保持に基づきマウス環境で正常な相互作用および選択が可能であろう「逆キメラ」(すなわち、ヒトV:マウスC)抗体を作製するマウスを有効に生じさせる結果となるであろう。さらに、かかる逆キメラ抗体は、治療のために完全ヒト抗体に容易に再配列することができる。

【0156】

内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座における置換と共に、または免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子(例えば、キメラ免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子もしくは完全ヒト完全マウスなど)と共に、前記内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座における異種(例えば、別の種から
30
40
の)免疫グロブリン配列による置換を含む遺伝子改変動物を作製することができる。前記異種免疫グロブリン重鎖配列が由来する種は多種多様であり得、免疫グロブリン軽鎖配列置換に利用される免疫グロブリン軽鎖配列、または免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子に関しても多種多様であり得る。

【0157】

様々な実施形態において、免疫グロブリン可変領域核酸配列、例えば、V、Dおよび/またはJセグメントは、ヒトまたは非ヒト動物から得られる。V、Dおよび/またはJセグメントの供給に好適な非ヒト動物としては、例えば、硬骨魚、軟骨魚、例えばサメおよびエイ、両生類、爬虫類、哺乳類、鳥類(例えば、ニワトリ)が挙げられる。非ヒト動物としては、例えば、哺乳類が挙げられる。哺乳類としては、例えば、非ヒト霊長類、ヤギ
40
50
、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウシ(例えば、雌ウシ、雄ウシ、バッファロー)、シカ、ラクダ、フェレットおよび齧歯動物および非ヒト霊長類(例えば、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ、マーモセット、アカゲザル、ヒヒ)が挙げられる。好適な非ヒト動物は、ラット、マウスおよびハムスターを含む齧歯動物のファミリーから選択される。1つの実施形態において、前記非ヒト動物はマウスである。この文脈から明白であるように、様々な非ヒト動物(例えば、サメ、エイ、哺乳類(例えば、ラクダ、齧歯動物、例えばマウスおよびラット))を可変ドメインまたは可変領域遺伝子セグメントの源として使用することができる。

【0158】

前記文脈によると、非ヒト動物は、可変配列またはセグメントと併用される定常領域配
50

列の源としても使用される。例えば、ヒトまたは非ヒト可変配列に作動可能に連結される導入遺伝子（例えば、齧歯動物、例えばマウスもしくはラットもしくはハムスター、定常配列に作動可能に連結されたヒトまたは非ヒト霊長類可変配列）において齧歯動物定常配列を使用することができる。したがって、様々な実施形態において、ヒトV_H、Dおよび／またはJセグメントを齧歯動物（例えば、マウスまたはラットまたはハムスター）定常領域遺伝子配列に作動可能に連結させる。一部の実施形態では、前記ヒトV_H、Dおよび／またはJセグメント（または1つ以上の再構成VDJもしくはVJ遺伝子）を、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子座ではない遺伝子座に組み込まれる導入遺伝子におけるマウス、ラットまたはハムスター定常領域遺伝子配列に作動可能に連結または融合させる。

【0159】

10

特定の実施形態では、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座におけるV_H、D_HおよびJ_Hセグメントの、1つ以上のヒトV_H、D_HおよびJ_Hセグメントでの置換を含み、該1つ以上のヒトV_H、D_HおよびJ_Hセグメントが、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子に作動可能に連結されているものであるマウスを提供し、この場合のマウスは、内因性免疫グロブリン遺伝子座以外の遺伝子座に導入遺伝子を含み、該導入遺伝子は、マウスまたはラットまたはヒト定常領域に作動可能に連結された非再構成または再構成ヒトV_LおよびヒトJ_Lセグメントを含む。

【0160】

子孫を産生するマウスの能力を維持しながら、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン可変遺伝子遺伝子座でマウス生殖細胞系免疫グロブリン可変遺伝子遺伝子座を大規模にin situ遺伝子置換するための方法を記載する。具体的には、前記マウス定常領域をインタクトで残しながら、6メガ塩基のマウス重鎖およびκ軽鎖免疫グロブリン可変遺伝子遺伝子座両方を該遺伝子のヒトカウンターパートでの正確に置換することを記載する。結果として、マウス定常領域を維持しながら、マウスの生殖細胞系免疫グロブリン可変レパートリーすべてが等価のヒト生殖細胞系免疫グロブリン可変配列で正確に置換されたマウスを生み出した。前記ヒト可変領域をマウス定常領域に連結させて、再構成して生理的に適切なレベルで発現するキメラヒトマウス免疫グロブリン遺伝子座を形成する。発現する抗体は、「逆キメラ」である。すなわち、それらはヒト可変領域配列およびマウス定常領域配列を含む。ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する抗体を発現するヒト化免疫グロブリン可変領域を有するこれらのマウスは、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスと呼ばれる。

20

30

【0161】

VELOCIMMUNE（登録商標）ヒト化マウスは、野生型マウスのものと本質的に区別できない完全機能的体液性免疫系を示す。前記ヒト化マウスは、B細胞発生の全ての段階で正常な細胞集団を提示する。前記ヒト化マウスは、正常なリンパ器官形態を示す。VELOCIMMUNE（登録商標）マウスの抗体配列は、正常なV（D）J再構成および正常な体細胞超変異頻度を示す。これらのマウスにおける抗体集団は、正常なクラススイッチ（例えば、正常なアイソタイプスイッチ）の結果として生ずるアイソタイプ分布を表わす。VELOCIMMUNE（登録商標）マウスを免疫することにより、治療候補としての使用に好適なヒト免疫グロブリン可変ドメインを有する大量の多様な抗体レパートリーを産生する頑強な体液性免疫応答が得られる。このプラットフォームは、薬学的に許容され得る抗体および他の抗原結合タンパク質を作製するための豊富な自然親和性成熟ヒト免疫グロブリン可変領域配列源を提供する。

40

【0162】

マウス免疫グロブリン可変配列の、ヒト免疫グロブリン可変配列での正確な置換により、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスを作製することができる。とはいえ、非常に大きな長さのヒト免疫グロブリン配列の逐次的リコンビニアリング（sequential recombineering）による、重および軽鎖遺伝子座における内因性マウス免疫グロブリン配列の、等価ヒト免疫グロブリン配列での正確の置換は、マウスとヒトの間の免疫グロブリン遺伝子座の分岐進化のため、一定の課題を提起し得る。例えば、

50

免疫グロブリン遺伝子座内に散在する遺伝子間配列は、マウスとヒトの間で同一ではなく、一部の状況では、機能的に等価でないこともある。マウスとヒトの間の免疫グロブリン遺伝子座におけるその相違は、特に内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の一定の部分をヒト化または操作するとき、やはりヒト化マウスに異常を生じさせる結果となる場合がある。マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座における一部の改変は有害である。有害な改変としては、例えば、改変されたマウスの交配および子孫産生能力の喪失を挙げることができる。すべてのマウス定常鎖遺伝子および遺伝子座転写制御領域を含むハイブリッド遺伝子座内の隣接マウス配列をインタクトなままおよび機能的なまま、マウス重および軽鎖免疫グロブリン遺伝子座 ($V_H-D_H-J_H$ および V_K-J_K) の 6 メガ塩基可変領域の、対応する 1.4 メガ塩基ヒトゲノム配列での正確な大規模 *in situ* 置換を行った (図 1A および 図 1B)。具体的には、VELOCIGENE (登録商標) 遺伝子工学技術 (例えば、米国特許第 6,586,251 号明細書および Valenzuela ら、2003、High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis、Nat Biotechnol 21:652-659 参照) を用いて、ヒト V_H 、 D_H 、 J_H 、 V_K および J_K 遺伝子配列を、ヒト生殖細胞系可変遺伝子座のオーバーラップ断片を担持する 13 のキメラ BAC ターゲティングベクターの段階的挿入により、マウス ES 細胞に導入した。

【0163】

マウス免疫グロブリン遺伝子のヒト化は、今日までのマウスゲノムへの最大の遺伝子改変を代表する。ランダムに組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子での以前の努力は、(上で論じた) ある程度の成果を上げたが、前記マウス免疫グロブリン遺伝子の、該遺伝子のヒトカウンターパートでの直接置換は、ほかの点では正常なマウスにおいて完全ヒト抗体を効率的に産生することができる効率を劇的に増加させる。さらに、かかるマウスは、無能化された内因性遺伝子座および完全ヒト抗体導入遺伝子を保有するマウスと比較して、実質的に任意の抗原での免疫後に得ることができる完全ヒト抗体の多様性の劇的増大を示す。様々な分化段階で有意に低減された B 細胞集団を示すランダムに組み込まれたヒト導入遺伝子を有するマウスとは対照的に、置換されヒト化された遺伝子座の多彩なバージョンが完全に正常な成熟および未熟 B 細胞レベルを示す。ヒト遺伝子導入マウスにおけるヒト遺伝子セグメント数を増加させる努力は、かかる欠陥を低減させたが、拡張されたそれらの免疫グロブリンレパートリーは、野生型マウスと比較して B 細胞集団の低減を全部は修正しなかった。

【0164】

免疫グロブリン遺伝子座が置換されたマウス (すなわち、VELOCIMMUNE (登録商標) マウス) において観察される野生型に近い体液性免疫機能にもかかわらず、ランダムに組み込まれた導入遺伝子を利用する一部のアプローチでは遭遇しない、免疫グロブリンの直接置換を利用すると遭遇する他の課題がある。マウスとヒトの間の免疫グロブリン遺伝子座の遺伝子組成の相違は、免疫グロブリン遺伝子セグメントが置換されたマウスの繁殖にとって有益な配列の発見をもたらした。具体的には、前記内因性免疫グロブリン遺伝子座内にあるマウス ADAM 遺伝子は、妊性におけるその役割のため、免疫グロブリン遺伝子座が置換されたマウスに最適に存在する。

【0165】

マウス ADAM 6 のゲノムの場所および機能

いずれかの機能的 ADAM 6 タンパク質を発現する能力が無い雄マウスは、驚くべきことに、交配して子孫を産生する該マウスの能力の欠陥を示す。これらのマウスには、すべてのまたは実質的にすべてのマウス免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントをヒト可変領域遺伝子セグメントで置換することによって機能的 ADAM 6 タンパク質を発現する能力が無い。ADAM 6 遺伝子座が、 D_H 遺伝子セグメントの上流にある V_H 遺伝子セグメント遺伝子座の 3' 端の近位の、前記内因性マウス免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子遺伝子座の領域内にあるため、この ADAM 6 機能の喪失が生ずる結果となる。すべてのま

たは実質的にすべての内因性マウス重鎖可変遺伝子セグメントの、ヒト重鎖可変遺伝子セグメントでの置換に関してホモ接合性であるマウスを交配させるために、それぞれが該置換に関してホモ接合性であり、生産的交配を待つ雄と雌を供給することは、一般に厄介なアプローチである。好結果の同腹子は、頻度が低く、サイズが小さい。その代り、前記置換に関してヘテロ接合性の雄を用いて、前記置換に関してホモ接合性の雌と交配させて、前記置換に対してヘテロ接合性の後代を産生し、その後、それらからホモ接合型マウスを繁殖させた。前記雄マウスの妊性の喪失についての可能性のある原因は、ホモ接合型雄マウスにおける機能的A D A M 6 タンパク質の不在であると本発明者らは決定した。

【0166】

様々な態様において、損傷した（すなわち、非機能的またはわずかに機能的な）A D A M 6 遺伝子を含む雄マウスは、妊性の低減または消去を示す。マウス（および他の齧歯動物）ではA D A M 6 遺伝子が免疫グロブリン重鎖遺伝子座にあるため、本発明者らは、置換された免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含むマウスを繁殖させるために、または該マウスの系統を作り、維持するために、様々な改変交配または繁殖スキームを利用することを決定した。内因性免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座の置換に関してホモ接合性の雄マウスの低い妊性または不妊性は、マウス系統のかかる改変の維持を困難にする。様々な実施形態において、前記系統の維持は、前記置換に関してホモ接合性の雄マウスによって示される不妊問題の回避を含む。

【0167】

1つの態様では、本明細書に記載のマウスの系統を維持するための方法を提供する。マウスの前記系統は、異所性A D A M 6 配列を含む必要がなく、様々な実施形態において、マウスの前記系統は、A D A M 6 のノックアウト（例えば、機能的ノックアウト）に関してホモ接合性またはヘテロ接合性である。

【0168】

前記マウス系統は、雄マウスにおいて妊性の低減または喪失を生じさせる結果となる内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変を含む。1つの実施形態において、前記改変は、A D A M 6 遺伝子の調節領域および／またはコーディング領域の欠失を含む。特定の実施形態において、前記改変は、その改変を含む雄マウスの妊性を低減させるまたは消去する内因性A D A M 6 遺伝子（調節領域および／またはコーディング領域）の改変を含む；特定の実施形態において、前記改変は、その改変に関してホモ接合性である雄マウスの妊性を低減させるまたは消去する。

【0169】

1つの実施形態において、前記マウス系統は、A D A M 6 遺伝子のノックアウト（例えば、機能的ノックアウト）または欠失に関してホモ接合性またはヘテロ接合性である。

【0170】

1つの実施形態では、前記改変に関してホモ接合性またはヘテロ接合性であるマウスから細胞を単離すること、および宿主胚において前記ドナー細胞を用いること、および代理母において前記宿主胚およびドナー細胞を妊娠させること、および前記遺伝子改変を含む後代を前記代理母から得ることによって、前記マウス系統を維持する。1つの実施形態において、前記ドナー細胞は、E S 細胞である。1つの実施形態において、前記ドナー細胞は、多能性細胞、例えば導入多能性細胞である。

【0171】

1つの実施形態では、前記改変に関してホモ接合性またはヘテロ接合性であるマウスから、前記改変を含む核酸配列を単離すること、および前記核酸配列を宿主核に導入すること、および好適な動物において前記核酸配列および前記宿主核を含む細胞を妊娠させることによって、前記マウス系統を維持する。1つの実施形態では、前記核酸配列を宿主卵母細胞の胚に導入する。

【0172】

1つの実施形態では、前記改変に関してホモ接合性またはヘテロ接合性であるマウスから核を単離すること、および前記核を宿主細胞に導入すること、および好適な動物におい

10

20

30

40

50

て前記核および宿主細胞を妊娠させて、前記改変に関してホモ接合性またはヘテロ接合性である後代を得ることによって、前記マウス系統を維持する。

【0173】

1つの実施形態では、前記遺伝子改変を含む雄マウスからの精液を用いる、雌マウス（野生型、前記改変に関してホモ接合性、または前記改変に関してヘテロ接合性）の *in vitro* 受精（IVF）を用いることによって、前記マウス系統を維持する。1つの実施形態において、前記雄マウスは、前記遺伝子改変に関してヘテロ接合性である。1つの実施形態において、前記雄マウスは、前記遺伝子改変に関してホモ接合性である。

【0174】

1つの実施形態では、前記遺伝子改変に関してヘテロ接合性である雄マウスを雌マウスと交配させて、前記遺伝子改変を含む後代を得ること、前記遺伝子改変を含む雄および雌後代を同定すること、および前記遺伝子改変に関してヘテロ接合性である雄を、野生型である、前記遺伝子改変に関してホモ接合性であるまたはヘテロ接合性である雌との交配に用いて、前記遺伝子改変を含む後代を得ることによって、前記マウス系統を維持する。1つの実施形態では、前記遺伝子改変に関してヘテロ接合性の雄と、野生型雌、前記遺伝子改変に関してヘテロ接合性の雌、または前記遺伝子改変に関してホモ接合性の雌とを交配させる工程を繰り返して、前記マウス系統での前記遺伝子改変を維持する。

【0175】

1つの態様では、内因性免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座の、1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖配列での置換を含むマウス系統を維持するための方法であって、前記マウス系統を交配させて、ヘテロ接合型雄マウスを産生する工程を含み、前記ヘテロ接合性雄マウスを交配させて、前記系統において前記遺伝子改変を維持する方法を提供する。特定の実施形態において、前記系統は、ホモ接合性雄と野生型雌、または前記遺伝子改変に関してホモ接合性もしくはヘテロ接合性の雌とのいずれの交配によっても維持されない。

【0176】

前記ADAM6タンパク質は、タンパク質のADAMファミリーのメンバーであり、ADAMは、A Disintegrin And Metalloprotease（ディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ）の頭文字である。タンパク質のADAMファミリーは、大きく、多様であり、細胞接着をはじめとする多様な機能を有する。ADAMファミリーの一部のメンバーは、精子形成および受精に関与する。例えば、ADAM2は、精子-卵子相互作用に関与するタンパク質ファーターリンのサブユニットをコードする。ADAM3、すなわちシリステインは、透明帯への精子の結合に必要であるようである。ADAM2またはADAM3いずれかの不在は不妊性を生じさせる結果となる。ADAM2、ADAM3およびADAM6は、マウス精子細胞の表面で複合体を形成すると仮定されている。ヒトV_H遺伝子セグメントV_H1-2とV_H6-1の間で通常見出されるヒトADAM6遺伝子は、偽遺伝子であるようである（図12）。マウスには2つのADAM6遺伝子-ADAM6aおよびADAM6b-があり、これらは、マウスV_H遺伝子セグメントとD_H遺伝子セグメントの間の遺伝子間領域において見つけられ、前記マウスにおいて、ADAM6a遺伝子およびADAM6b遺伝子は、周囲の免疫グロブリン遺伝子セグメントのものとは反対の転写配向に配向する（図12）。マウスの場合、正常な受精には機能的ADAM6遺伝子座が明らかに要求される。そこで、機能的ADAM6遺伝子座または配列は、内因性ADAM6遺伝子座が欠けているまたは非機能的内因性ADAM6遺伝子座を有する雄マウスにおいて示される受精の徹底的低減を補うまたはレスキューすることができる、ADAM6遺伝子座または配列を指す。

【0177】

ADAM6aおよびADAM6bをコードする、マウスにおける前記遺伝子間配列の位置が、内因性マウス重鎖を改変するとき該遺伝子間配列に改変を受けやすくさせる。V_H遺伝子セグメントを欠失させるもしくは置換するとき、またはD_H遺伝子セグメントを欠失させるもしくは置換するとき、結果として得られるマウスは重度の妊性欠損を示す確率が高い。この欠損を補償するために、内因性マウスADAM6遺伝子座の改変に起因する

A D A M 6 活性の喪失を補うタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むようにマウスを改変する。様々な実施形態において、補足性ヌクレオチド配列は、妊性欠損をレスキューするマウス A D A M 6 a、マウス A D A M 6 b、またはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片をコードするものである。

【0178】

妊性をレスキューする前記ヌクレオチド配列を任意の好適な位置に配置することができる。前記配列を前記遺伝子間領域に配置することができ、またはゲノム内の任意の好適な位置に（すなわち、異所的に）配置することができる。1つの実施形態では、前記ヌクレオチド配列を、マウスゲノムにランダムに組み込む導入遺伝子に導入することができる。1つの実施形態では、前記配列をエピソームで、すなわちマウス染色体上ではなく別々の核酸上で、維持することができる。好適な位置としては、転写許容性または活性である位置、例えば、R O S A 2 6 遺伝子座（Z a m b r o w i c z ら、1 9 9 7、P N A S U S A 9 4 : 3 7 8 9 - 3 7 9 4）、B T - 5 遺伝子座（M i c h a e l ら、1 9 9 9、M e c h . D e v . 8 5 : 3 5 - 4 7）またはO c t 4 遺伝子座（W a l l a c e ら、2 0 0 0、N u c l e i c A c i d s R e s . 2 8 : 1 4 5 5 - 1 4 6 4）が挙げられる。転写活性遺伝子座へのヌクレオチド配列のターゲティングは、例えば米国特許第7, 4 7 3, 5 5 7 号明細書に記載されており、この参考文献は参照により本明細書に援用されている。

【0179】

あるいは、妊性をレスキューする前記ヌクレオチド配列を誘導性プロモーターとカップリングさせて、適切な細胞および／または組織、例えば生殖組織、での最適な発現を促進することができる。例示的誘導性プロモーターとしては、物理的手段によって活性化されるプロモーター（例えば、熱ショックプロモーター）および／または化学的手段によって活性化されるプロモーター（例えば、I P T G もしくはテトラサイクリン）が挙げられる。

【0180】

さらに、前記ヌクレオチド配列の発現を他の遺伝子に関連づけて、特定の発生段階または特定の組織内での発現を実現することができる。かかる発現は、前記ヌクレオチド配列を、特定の発生段階で発現する遺伝子のプロモーターと作動可能に連結させることによって実現することができる。例えば、宿主種のゲノムへと工学的に作製された1つの種からの免疫グロブリン配列を、その宿主種からのC D 1 9 遺伝子（B細胞特異的遺伝子）のプロモーター配列と作動可能に連結させる。免疫グロブリンが発現する正確な発生段階でのB細胞特異的発現が実現される。

【0181】

挿入されたヌクレオチド配列の頑強な発現を実現するためのさらにもう1つの方法は、構成的プロモーターの利用である。例示的構成的プロモーターとしては、S V 4 0、C M V、U B C、E F 1 A、P G K および C A G G が挙げられる。同様に、所望のヌクレオチド配列を選択された構成的プロモーターと作動可能に連結させ、それにより、該ヌクレオチド配列によってコードされているタンパク質（単数または複数）の高い発現レベルが得られる。

【0182】

用語「異所性」は、自然界で通常は遭遇しない位置への転位または配置（例えば、核酸配列の、該核酸配列が野生型マウスにおいて見出されるのと同じ位置でない位置への配置）を含むことを意図したものである。様々な実施形態において、この用語は、その対象がその正常なまたは正しい位置外にあるという意味で用いられる。例えば、「... をコードする異所性ヌクレオチド配列」という句は、マウスでは通常遭遇しない位置に出現するヌクレオチド配列を指す。例えば、マウス A D A M 6 タンパク質（または雄マウスに対して同じまたは同様の妊性の恩恵をもたらすそのオルソログもしくはホモログもしくは断片）をコードする異所性ヌクレオチド配列の場合、該配列は、野生型マウスにおいて通常見出される位置とは異なるマウスのゲノム内の位置に配置されることがある。かかる場合、

野生型マウスにおける位置とは異なるマウスのゲノム内の位置に前記配列を配置することにより、マウス配列の新規配列接合部を生み出すこととなる。マウスA D A M 6の機能的ホモログまたはオルソログは、A D A M 6 - / - マウスにおいて観察される妊性喪失（例えば、交配により子孫を産生する雄マウスの能力の喪失）のレスキューをもたらす配列である。機能的ホモログまたはオルソログは、A D A M 6 aのアミノ酸配列に対しておよび / またはA D A M 6 bのアミノ酸配列に対して少なくとも約89%以上の同一性、例えば99%以下の同一性を有するタンパク質、ならびにA D A M 6 aおよび / またはA D A M 6 bの欠失またはノックアウトを含む遺伝子型を有するマウスの首尾よく交配する能力を補うまたはレスキューすることができるタンパク質を含む。

【0183】

前記異所位置は、（例えば、マウスA D A M 6配列を含有する導入遺伝子のランダム挿入の場合のように）どこでもよく、または例えば、野生型マウスにおける（例えば、改変内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座内だがその天然の位置の上流または下流のいずれか、例えば、改変免疫グロブリン遺伝子座内だが、異なる遺伝子セグメント間、またはマウスV-D遺伝子間配列内の異なる位置における）その場所に近い（しかし、正確に同じではない）位置であってもよい。異所性配置の一例は、ヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座内への配置である。例えば、1つ以上の内因性V_H遺伝子セグメントの、ヒトV_H遺伝子セグメントでの置換であって、内因性A D A M 6配列を除去する置換を含むマウスを、マウスA D A M 6配列がヒトV_H遺伝子セグメントを含有する配列内に配置されるように工学的に作製することができる。結果として得られる改変は、ヒト遺伝子配列内に（異所性）マウスA D A M 6配列を生じさせることとなり、このヒト遺伝子配列内へのマウスA D A M 6配列の（異所性）配置は、ヒトA D A M 6偽遺伝子の位置（すなわち、2つのVセグメント間）に近い場合もあり、またはマウスA D A M 6配列の位置（すなわち、V-D遺伝子間領域内）に近い場合もある。マウスの生殖細胞系内のヒト遺伝子配列（例えば、免疫グロブリン遺伝子配列）内にまたは該ヒト遺伝子配列に隣接した（異所性）マウスA D A M 6配列の接合により作られる、結果として生ずる配列接合部は、野生型マウスのゲノム内の同じまたは同様の位置と比較して新しいものになる。

【0184】

様々な実施形態において、A D A M 6またはそのオルソログもしくはホモログが無い非ヒト動物を提供し、この欠如が該非ヒト動物を不妊性にするか、該非ヒト動物の妊性を実質的に低減させる。様々な実施形態において、前記A D A M 6またはそのオルソログもしくはホモログ欠如は、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変に起因する。妊性の実質的低減は、例えば、妊性（例えば、交配頻度、同腹子あたりの子、1年あたりの同腹子、など）の約50%、60%、70%、80%、90%または95%またはそれより多くの低減である。様々な実施形態では、非ヒト動物の雄において機能的であるマウスA D A M 6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を前記非ヒト動物に補充し、この補充されたA D A M 6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片により、妊性低減の全部または実質的部分がレスキューされる。妊性の実質的部分のレスキューは、例えば、前記非ヒト動物が、非改変（すなわち、A D A M 6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログへの改変を有さない動物）重鎖遺伝子座と比較して少なくとも70%、80%または90%またはそれより多い妊性を示すような妊性の回復である。

【0185】

様々な実施形態において、前記遺伝子改変動物（すなわち、例えば免疫グロブリン重鎖遺伝子座の改変に起因して、機能的A D A M 6またはそのオルソログもしくはホモログが無い動物）に付与する配列は、A D A M 6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログから選択される。例えば、マウスにおけるA D A M 6機能の喪失は、1つの実施形態では、マウスA D A M 6遺伝子の付加によってレスキューされる。1つの実施形態において、マウスにおけるA D A M 6機能の喪失は、マウス、例えば齧歯動物、に対して近縁の種、例えば、異なる系統または種のマウス、任意の種のラット、齧歯動物、のオルソログまた

はホモログを付加することによってレスキューされ、この場合、前記マウスのオルソログまたはホモログの付加により、A D A M 6 機能の喪失またはA D A M 6 遺伝子の喪失に起因する妊性の喪失がレスキューされる。他の種からのオルソログおよびホモログは、様々な実施形態において系統発生的に関連した種から選択され、および様々な実施形態において、約80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上または97%以上である内因性A D A M 6（またはオルソログ）との同一性パーセントを示し、およびA D A M 6に関連したまたは（非マウスの場合は）A D A M 6 オルソログに関連した妊性喪失をレスキューする。例えば、A D A M 6 機能が無い遺伝子改変雄ラット（例えば、ヒト免疫グロブリン重鎖可変領域で置換された内因性免疫グロブリン重鎖可変領域を有するラット、またはラット免疫グロブリン重鎖領域のノックアウトを有するラット）の場合、そのラットの妊性の喪失は、ラットA D A M 6 の付加によって、または一部の実施形態ではラットA D A M 6 のオルソログ（例えば、別のラット系統もしくは種からの、または1つの実施形態ではマウスからの、A D A M 6 オルソログ）の付加によってレスキューされる。

10

【0186】

このように、様々な実施形態において、A D A M 6 タンパク質（またはそのオルソログもしくはホモログ）をコードする核酸配列、または該核酸配列と作動可能に連結された調節領域の改変に起因して妊性を示さないまたは妊性の低減を示す遺伝子改変動物は、妊性の喪失を補うまたは回復させる核酸配列を含み、この場合、妊性の喪失を補うまたは回復させる核酸配列は、同じ種の異なる系統からのものであるか、系統発生的に類縁の種からのものである。様々な実施形態において、前記補足性核酸配列は、A D A M 6 オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片である。様々な実施形態において、前記補足性A D A M 6 オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片は、妊性の欠陥を有する遺伝子改変動物に近縁である非ヒト動物からのものである。例えば、前記遺伝子改変動物が特定の系統のマウスである場合、A D A M 6 オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片を、別の系統のマウスから得ることができ、類縁種のマウスから得ることができる。1つの実施形態において、前記妊性の欠陥を含む遺伝子改変動物が齧歯目（order Rodentia）のものである場合、前記A D A M 6 オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片は、齧歯目の別の動物からのものである。1つの実施形態において、前記妊性の欠陥を含む遺伝子改変動物は、ネズミ亜目（suborder Myomorpha）（例えば、トビネズミ（jerboas）、ジャンピングマウス（jumping mice）、カンガルーハムスター、ハムスター、新世界ラットおよびマウス、ハタネズミ、純種のマウスおよびラット（true mice and rat）、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ、キノボリマウス、イワマウス、オジロキヌゲネズミ、マダガスカルラットおよびマウス、トゲヤマネ、デバネズミ、タケネズミ、モグラネズミ）のものであり、前記A D A M 6 オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片は、齧歯目の動物、またはネズミ亜目の動物から選択される。

20

30

【0187】

1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物は、トビネズミ上科（superfamily Dipodoidea）からのものであり、前記A D A M 6 オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片は、ネズミ上科（superfamily Muroidea）からのものである。1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物は、ネズミ上科からのものであり、前記A D A M 6 オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片は、トビネズミ上科からのものである。

40

【0188】

1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物は齧歯動物である。1つの実施形態において、前記齧歯動物は、ネズミ上科から選択され、前記A D A M 6 オルソログまたはホモログは、ネズミ上科内の異なる種からのものである。1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物は、カンガルーハムスター科（Calomyscidae）（例えば、カンガルーハムスター）、キヌゲネズミ科（Cricetidae）（例えば、ハムスター、新世界ラットおよびマウス、ハタネズミ）、ネズミ科（Muridae）（純種のマウスお

50

よびラット、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ)、アシナガマウス科(Nesomyidae)(キノボリマウス、イワマウス、オジロキヌゲネズミ、マダガスカルラットおよびマウス)、トゲヤマネ科(Platacanthomyidae)(例えば、トゲヤマネ)およびメクラネズミ科(例えば、デバネズミ、タケネズミおよびモグラネズミ)から選択される科からのものであり;および前記ADAM6オルソログまたはホモログは、同じ科の異なる種から選択される。特定の実施形態において、前記遺伝子改変齧歯動物は、純種のマウスまたはラット(ネズミ科)から選択され、前記ADAM6オルソログまたはホモログは、アレチネズミ、トゲマウス、またはタテガミネズミから選択される種からのものである。1つの実施形態において、前記遺伝子改変マウスは、ネズミ科のメンバーからのものであり、および前記ADAM6オルソログまたはホモログは、ネズミ科の異なる種からのものである。特定の実施形態において、前記遺伝子改変齧歯動物は、ネズミ科のマウスであり、および前記ADAM6オルソログまたはホモログは、ネズミ科のラット、アレチネズミ、トゲマウスまたはタテガミネズミからのものである。

10

【0189】

様々な実施形態において、1つの科の中の齧歯動物の1つ以上の齧歯動物ADAM6オルソログもしくはホモログまたはその機能的断片は、ADAM6オルソログまたはホモログが無い同じ科(例えば、キヌゲネズミ科(例えば、ハムスター、新世界ラットおよびマウス、ハタネズミ);ネズミ科(例えば、純種のマウスおよびラット、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ))の遺伝子改変齧歯動物に妊性を回復させる。

【0190】

様々な実施形態において、ADAM6オルソログ、ホモログおよびその断片を、該オルソログ、ホモログまたは断片が、ADAM6活性が無い遺伝子改変雄非ヒト動物(例えば、ADAM6またはそのオルソログのノックアウトを含む齧歯動物、例えばマウスまたはラット)に妊性を回復させるかどうか確認することにより、機能性について評価する。様々な実施形態において、機能性は、内因性ADAM6またはそのオルソログもしくはホモログが無い遺伝子改変動物の精子の、遺伝子改変動物の同じ種の卵管を移動して卵子を受精させる能力と定義される。

20

【0191】

様々な態様において、マウスADAM6(例えば、雄マウスにおいて機能的であるそのオルソログまたはホモログまたは断片)に同様の妊性の恩恵をもたらすタンパク質をコードする異所性ヌクレオチド配列を含有する、内因性重鎖可変領域遺伝子座またはその部分の欠失または置換を含むマウスを作製することができる。前記異所性ヌクレオチド配列としては、異なるマウス系統または異なる種、例えば異なる齧歯動物種、のADAM6ホモログまたはオルソログ(またはその断片)であるタンパク質をコードするヌクレオチド配列であって、妊性の恩恵、例えば、指定された期間にわたっての同腹子数の増加、および/または同腹子あたりの子の数の増加、および/またはマウス卵管を通り抜けてマウス卵子を受精させる雄マウスの精子細胞の能力、を付与するヌクレオチド配列が挙げられる。

30

【0192】

1つの実施形態において、前記ADAM6は、マウスADAM6タンパク質と少なくとも89%から99%同一である(例えば、マウスADAM6aまたはマウスADAM6bと少なくとも89%から99%同一である)ホモログまたはオルソログである。1つの実施形態において、前記異所性ヌクレオチド配列は、マウスADAM6aと少なくとも89%同一のタンパク質、マウスADAM6bと少なくとも89%同一のタンパク質、およびその組み合わせから独立して選択される1つ以上のタンパク質をコードする。1つの実施形態において、前記ホモログまたはオルソログは、マウスADAM6aおよび/またはマウスADAM6bと同一であるまたはマウスADAM6aおよび/またはマウスADAM6bと約89%以上同一であるように改変されているラット、ハムスター、マウス、またはモルモットタンパク質である。1つの実施形態において、前記ホモログまたはオルソログは、マウスADAM6aおよび/またはマウスADAM6bと同一であるか、マウスADAM6aおよび/またはマウスADAM6bと少なくとも90%、91%、92%、9

40

50

3 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %または99 %同一である。

【0193】

ヒト化重鎖マウスにおける異所性ADAM6

遺伝子ターゲティングの進展、例えば、細菌人工染色体(BAC)の開発により、今や、比較的大きいゲノム断片の組換えが可能である。BAC工学は、マウスES細胞に大きな欠失および大きな挿入を施すことができるようにした。

【0194】

ヒト抗体を作るマウスは、ここしばらくの間に利用可能になった。これらのマウスは、ヒト治療用抗体の開発の重要な前進の代表であるが、その有用性を制限する多数の重大な異常を提示する。例えば、これらのマウスは、損なわれたB細胞発生を提示する。この損なわれた発生は、トランスジェニックマウスと野生型マウスの間の様々な相違に起因し得る。

10

【0195】

ヒト抗体は、成熟、増殖、またはクローン選択中の生存についてのシグナルを伝達するマウス細胞の表面のマウスプレB細胞受容体またはB細胞受容体と最適に相互作用しない可能性がある。完全ヒト抗体は、マウスFc受容体系と最適に相互作用しない可能性があるし、マウスは、ヒトFc受容体との1対1の対応を提示しないFc受容体を発現する。結局、完全ヒト抗体を作る様々なマウスは、野生型B細胞発生に要求され得るすべての真正マウス配列を含まない、例えば、下流エンハンサー要素および他の遺伝子座制御要素を含まない。

20

【0196】

完全ヒト抗体を作製するマウスは、何らかの形で無能化されている内因性免疫グロブリン遺伝子座を一般に含み、可変および定常免疫グロブリン遺伝子セグメントを含むヒト導入遺伝子が、そのマウスゲノム内のランダムな場所に導入される。内因性遺伝子座が、機能的免疫グロブリン遺伝子を形成するように遺伝子セグメントを再構成できないほど無能化されている限り、たとえB細胞発生が損なわれていたとしても、かかるマウスにおいて完全ヒト抗体を作製するという目的を達成することができる。

【0197】

ヒト導入遺伝子遺伝子座から完全ヒト抗体を作製せざるを得ないのだが、マウスにおけるヒト抗体の産生は、好ましくない過程であるようである。一部のマウスでは、この過程は、トランススイッチの機序によりキメラヒト可変/マウス定常重鎖(軽鎖ではなく)が形成される結果をもたらすには好ましいものではない。この機序により、完全ヒト抗体をコードする転写産物は、ヒトアイソタイプからマウスアイソタイプへとトランスでアイソタイプスイッチされる。完全ヒト導入遺伝子は、マウス重鎖定常領域遺伝子の非損傷コピーを保持する内因性遺伝子座から離れた場所にあるため、この過程はトランスでの過程となる。かかるマウスではトランススイッチが容易に分かるが、この現象はB細胞発生のレスキューにやはり不十分であり、B細胞発生は明らかに害されたままである。いずれにせよ、トランススイッチ現象は軽鎖に関して起こらないので、かかるマウスにおいてトランススイッチされた抗体は、完全ヒト軽鎖を保持する；おそらく、トランススイッチは、シスでの正常なアイソタイプスイッチに(それとは異なるにせよ)用いられる内因性遺伝子座におけるスイッチ配列に依存する。したがって、完全ヒト抗体を作製するように工学的に作製されたマウスが、マウス定常領域を有する抗体を作製するためにトランススイッチ機序を選択する場合であっても、その戦略は、正常B細胞発生のレスキューにやはり不十分である。

30

40

【0198】

抗体ベースのヒト治療薬の作製における主な関心事は、特定のエピトープを特異的に認識し、望ましい親和性で、通常は一常にはないが一高い親和性で、そのエピトープを結合する有用な可変ドメインを同定するために十分多様なヒト免疫グロブリン可変領域配列を作製することである。(本明細書に記載する)VELOCIMMUNE(登録商標)マウスの開発前は、マウス定常領域と共にヒト可変領域を発現するマウスが、導入遺伝子か

50

らヒト抗体を作製するマウスとの何らかの有意差を示すことになるという指摘はなかった。しかし、その仮定は間違っていた。

【0199】

内因性マウス遺伝子座におけるヒト免疫グロブリン可変領域でのマウス免疫グロブリン可変領域の正確な置換を含有する V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスは、B細胞発生に関して野生型マウスとの驚くべき、また注目すべき類似性を提示する。驚くべき、また実にすばらしい発生の点で、V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスは、免疫に応答して産生される可変領域が完全ヒトのものであるという1つの重要な点のみが野生型マウスと異なる、本質的に正常な野生型応答を免疫に対して提示した。

【0200】

V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスは、内因性遺伝子座におけるマウス免疫グロブリン重鎖 (I g H) および免疫グロブリン軽鎖 (例えば、 κ 軽鎖、I g κ) の生殖細胞系可変領域の、対応するヒト免疫グロブリン可変領域での正確な大規模置換を含有する。合計で約6メガ塩基のマウス遺伝子座が約1.5メガ塩基のヒトゲノム配列で置換される。この正確な置換により、結果として、ヒト可変領域とマウス定常領域を有する重および軽鎖を作製するハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスが得られる。マウス $V_H - D_H - J_H$ および $V_\kappa - J_\kappa$ セグメントの正確な置換は、隣接するマウス配列をインタクトなままおよび機能的なままハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座に残す。前記マウスの体液性免疫系は、野生型マウスのものと同様に機能する。B細胞発生はいずれの重要な点でも妨害されず、抗原チャレンジすると前記マウスにおいて多様性に富んだヒト可変領域が産生される。

【0201】

V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスは、重および κ 軽鎖についての免疫グロブリン遺伝子セグメントがヒトおよびマウスにおいて同様に再構成するので実現可能であるのだが、その遺伝子座は同じまたはほぼ同じであるというわけではない——明らかにそれらはそうではない。しかし、その遺伝子座は、すべての V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントを含有する約300万塩基対の連続するマウス配列を、ヒト免疫グロブリン遺伝子座からの等価の配列を基本的にかバーする約100万塩基の連続するヒトゲノム配列で置換することによって重鎖可変遺伝子座のヒト化を達成することができるほどに類似する。

【0202】

一部の実施形態では、一定のマウス定常領域遺伝子配列の、ヒト遺伝子配列でのさらなる置換 (例えば、マウス $C_H 1$ 配列の、ヒト $C_H 1$ での置換、およびマウス C_L 配列の、ヒト C_L 配列での置換) により、結果として、例えば完全ヒト抗体断片、例えば完全ヒト F a b の作製に好適な、ヒト可変領域および部分ヒト定常領域を有する抗体を作製するハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスが得られる。ハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスは、正常な可変遺伝子セグメント再構成、正常な体細胞超変異頻度および正常なクラススイッチを示す。これらのマウスは、野生型マウスと区別できない体液性免疫系を示し、および、マウスにヒト可変領域遺伝子セグメントの完全レパートリーが無い場合でさえ、正常な細胞集団をすべてのB細胞発生段階で提示し、正常なリンパ器官構造を提示する。これらのマウスの免疫は、可変遺伝子セグメント使用量の広範な多様性を提示する頑強な体液性応答を生じさせる結果となる。

【0203】

マウス生殖細胞系可変領域遺伝子セグメントの正確な置換により、部分ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスの作製が可能になる。部分ヒト免疫グロブリン遺伝子座は、再構成し、超変異し、正常にクラススイッチするため、ヒト可変領域を含むマウスでは部分ヒト免疫グロブリン遺伝子座により抗体が産生される。その可変領域をコードするヌクレオチド配列を同定し、クローニングして、選ばれた任意の配列、例えば、特定の用途に好適な任意の免疫グロブリンアイソタイプと (例えば i n v i t r o 系において) 融合させ、その結果、全部がヒト配列に由来する抗体または抗原結合タンパク質を得ることが

10

20

30

40

50

できる。

【0204】

リコンビニアリング法による大規模ヒト化を用いてマウス胚性幹（ES）細胞を改変して、マウス V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントの本質的にすべてを含む3メガ塩基以下のマウス重鎖免疫グロブリン遺伝子座を、いくつかのまたは本質的にすべてのヒト V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントを含有する1メガ塩基以下のヒトゲノム配列を有する等価のヒト遺伝子セグメントで正確に置換した。本質的にすべてのヒト V_K および J_K 遺伝子セグメントをコードする2つのリピートの一方を含むヒトゲノムの二分の一メガ塩基以下のセグメントを使用して、マウス V_K および J_K 遺伝子セグメントの本質的にすべてを含有するマウス免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座の3メガ塩基セグメントを置換した。

10

【0205】

かかる置換免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスは、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の最も3'側の V_H 遺伝子セグメントと最も5'側の D_H 遺伝子セグメントの間で通常は見出される内因性マウスADAM6遺伝子座の破壊または欠失を含み得る。この領域の破壊は、内因性マウスADAM6遺伝子座の機能性の低減または消去をもたらし得る。ヒト重鎖レパートリーの最も3'側の V_H 遺伝子セグメントを置換に使用すると、ヒトADAM6偽遺伝子であるように見える偽遺伝子を含有する遺伝子間領域がこれらの V_H 遺伝子セグメント間、すなわち、ヒト V_H 1-2と V_H 1-6の間に存在する。しかし、このヒト遺伝子間配列を含む雄マウスは、妊性の低減を示す。

【0206】

上記の置換遺伝子座を含み、マウスADAM6をコードする異所性核酸配列も含むマウスであって、本質的に正常な妊性を示すマウスを記載する。1つの実施形態において、前記異所性核酸配列は、改変内因性重鎖遺伝子座のヒト V_H 1-2とヒト V_H 6-1の間に配置されたマウスADAM6a配列および／またはマウスADAM6b配列またはその機能的断片を含む。1つの実施形態において、前記異所性核酸配列は、改変内因性重鎖遺伝子座のヒト V_H 1-2とヒト V_H 6-1の間に配置された配列番号3である。配列番号3のADAM6遺伝子の転写方向は、周囲のヒト V_H 遺伝子セグメントの転写の方向に対して逆である。本明細書における例は、示されるヒト V_H 遺伝子セグメント間に異所性配列を配置することによる妊性のレスキューを示すが、マウスゲノム内の任意の好適な転写許容遺伝子座への（またはさらには染色体外への）異所性配列の配置が雄マウスの妊性を同様

20

30

【0207】

マウスADAM6遺伝子またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片を含む異所性配列を有する機能的ADAM6遺伝子座を欠いているマウスを補足する現象は、非機能的なまたは最小機能的な内因性ADAM6遺伝子座を有する任意のマウスのレスキューに適用できる一般的な方法である。それ故、免疫グロブリン重鎖遺伝子座のADAM6破壊改変を含む非常に多数のマウスを本発明の組成物および方法でレスキューすることができる。したがって、本発明は、内因性ADAM6機能を含む免疫グロブリン重鎖遺伝子座の多種多様な改変を有するマウスを含む。一部の（非限定的）例を本明細書に提供する。記載するVELOCIIMMUNE（登録商標）マウスに加えて、ADAM6に関する組成物および方法を非常に多くの用途に、例えば、重鎖遺伝子座を多種多様な方法で改変するとき用いることができる。

40

【0208】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片）をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス D_H 遺伝子セグメントおよび J_H 遺伝子セグメントの、ヒト D_H 遺伝子セグメントおよびヒト J_H 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスであって、 C_H 1領域および／またはヒンジ領域が無いマウスを提供する。1つの実施形態において、前記マウスは、（a）ヒト V_H -マウス C_H 1-マウス C_H 2-マウ

50

ス $C_H 3$; (b) ヒト V_H - マウス ヒンジ - マウス $C_H 2$ - マウス $C_H 3$; および (c) ヒト V_H - マウス $C_H 2$ - マウス $C_H 3$ から選択される免疫グロブリン鎖の二量体である単一可変ドメイン結合タンパク質を作製する。

【0209】

1つの態様では、1つ以上のマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメント (mV_H 、 mD_H および/または mJ_H) の、1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメント (hV_H 、 hD_H および/または hJ_H) での置換を有するマウスであって、1つ以上のマウス免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメント (mV_κ および/または mJ_κ) の、1つ以上のヒト免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメント (hV_κ および/または hJ_κ) での置換をさらに含むマウスにおいて、妊性をレスキューするヌクレオチド配列をヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列内 (例えば、ヒト $V_H 1-2$ 遺伝子セグメントと $V_H 1-6$ 遺伝子セグメントの間) に配置する。

10

【0210】

1つの実施形態において、前記1つ以上のマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメントは、約3メガ塩基のマウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む。1つの実施形態において、前記1つ以上のマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座の少なくとも89の V_H 遺伝子セグメント、少なくとも13の D_H 遺伝子セグメント、少なくとも4の J_H 遺伝子セグメントまたはその組み合わせを含む。1つの実施形態において、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメントは、約1メガ塩基のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含む。1つの実施形態において、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメントは、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の少なくとも80の V_H 遺伝子セグメント、少なくとも27の D_H 遺伝子セグメント、少なくとも6の J_H 遺伝子セグメントまたはその組み合わせを含む。

20

【0211】

1つの実施形態において、前記1つ以上のマウス免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメントは、約3メガ塩基のマウス免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座を含む。1つの実施形態において、前記1つ以上のマウス免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメントは、マウス免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座の少なくとも137の V_κ 遺伝子セグメント、少なくとも5の J_κ 遺伝子セグメントまたはその組み合わせを含む。1つの実施形態において、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメントは、約二分の一メガ塩基のヒト免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座を含む。特定の実施形態において、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメントは、ヒト免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座の (免疫グロブリン κ 定常領域に関して) 近位リピートを含む。1つの実施形態において、前記1つ以上のヒト免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメントは、ヒト免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座の少なくとも40の V_κ 遺伝子セグメント、少なくとも5の J_κ 遺伝子セグメントまたはその組み合わせを含む。

30

【0212】

1つの実施形態では、前記ヌクレオチド配列を2つのヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントの間に配置する。特定の実施形態において、前記2つのヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントは、重鎖遺伝子セグメントである。1つの実施形態では、前記ヌクレオチド配列を V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスにおけるヒト $V_H 1-2$ 遺伝子セグメントとヒト $V_H 1-6$ 遺伝子セグメントとの間に配置する (米国特許第6, 596, 541号および同第7, 105, 348号明細書; これらは参照により本明細書に援用されている)。1つの実施形態において、そのように改変された V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスは、少なくとも80のヒト V_H 遺伝子セグメント、27のヒト D_H 遺伝子セグメントおよび6のヒト J_H 遺伝子セグメントでのマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子セグメントの置換、および少なくとも40のヒト V_κ 遺伝子セグメントおよび5のヒト J_κ 遺伝子セグメントでのマウス免疫グロブリン κ 軽鎖可変遺伝子セグメントの置換を含む。

40

【0213】

1つの態様において、機能的マウス A D A M 6 遺伝子座 (またはそのオルソログもしくは

50

はホモログもしくは機能的断片)は、内因性マウス V_H 遺伝子セグメントを置換するヒト V_H 遺伝子セグメントの中央に存在する。1つの実施形態では、少なくとも89のマウス V_H 遺伝子セグメントを除去し、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントで置換し、およびマウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、ヒト V_H 遺伝子セグメントの3'端に直ぐ隣接して存在するか、2つのヒト V_H 遺伝子セグメント間に存在する。特定の実施形態において、前記マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、挿入されたヒト V_H 遺伝子セグメントの3'末端の約20キロ塩基(kb)から約40キロ塩基(kb)以内の2つの V_H 遺伝子セグメント間に存在する。特定の実施形態において、前記マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、挿入されたヒト V_H 遺伝子セグメントの3'末端の約29kbから約31kb以内の2つの V_H 遺伝子セグメント間に存在する。特定の実施形態において、前記マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、挿入されたヒト V_H 遺伝子セグメントの3'末端の約30, 184bp以内に存在する。特定の実施形態において、前記置換は、ヒト V_H 遺伝子セグメント $V_H 1-2$ および $V_H 6-1$ を含み、前記マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、該 $V_H 1-2$ 遺伝子セグメントの下流かつ該 $V_H 6-1$ 遺伝子セグメントの上流に存在する。特定の実施形態において、前記マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、ヒト $V_H 1-2$ 遺伝子セグメントとヒト $V_H 6-1$ 遺伝子セグメントの間に存在し、この場合、該マウス $A D A M 6$ 遺伝子座の5'端は、該ヒト $V_H 1-2$ 遺伝子セグメントの3'末端から約13, 848bpであり、および該 $A D A M 6$ 遺伝子座の3'端は、該ヒト $V_H 6-1$ 遺伝子セグメントから約29, 737bp 5'側に存在する。特定の実施形態において、前記マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、マウスの細胞内に $A D A M 6$ 機能を付与する配列番号3またはその断片を含む。そこで、特定の実施形態において、ヒト V_H 遺伝子セグメントの構成は、以下のものである(ヒト V_H 遺伝子セグメントの転写方向に関して上流から下流に): ヒト $V_H 1-2$ - マウス $A D A M 6$ 遺伝子座 - ヒト $V_H 6-1$ 。特定の実施形態では、ヒト $V_H 1-2$ とヒト $V_H 6-1$ 間の $A D A M 6$ 偽遺伝子をマウス $A D A M 6$ 遺伝子座で置換する。1つの実施形態において、転写方向に関して、マウス $A D A M 6$ 遺伝子座のマウス $A D A M 6 a$ およびマウス $A D A M 6 b$ のうちの1つ以上の配向は、ヒト V_H 遺伝子セグメントについての配向と比較して逆である。あるいは、マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、最も3'側のヒト V_H 遺伝子セグメントと最も5'側の D_H 遺伝子セグメントの間の遺伝子間領域に存在する。最も5'側の D_H セグメントがマウスであろうと、ヒトであろうと、このとおりであるはずである。

【0214】

同様に、すべてのまたは実質的にすべての内因性マウス V_H 遺伝子セグメントを置換する、前記1つ以上のヒト V_L 遺伝子セグメント(例えば、 V_K または V_λ セグメント)で改変されるマウスは、上に記載したように、例えばマウス $A D A M 6$ 遺伝子座もしくはその機能的断片を含む下流ホモロジーアームを有するターゲティングベクターを利用することにより、内因性マウス $A D A M 6$ 遺伝子座を維持するように改変することができ、あるいは2つのヒト V_L 遺伝子セグメント間に、またはヒト V_L 遺伝子セグメントと D_H 遺伝子セグメントとの間(ヒトであろうとマウスであろうと、例えば、 $V_\lambda + m/h D_H$)もしくは J 遺伝子セグメントとの間(ヒトであろうとマウスであろうと、例えば、 $V_K + J_H$)に位置する異所配列で損傷マウス $A D A M 6$ 遺伝子座を置換するように改変することができる。1つの実施形態において、前記置換は、2つ以上のヒト V_L 遺伝子セグメントを含み、および前記マウス $A D A M 6$ 遺伝子座またはその機能的断片は、2つの最も3'側の V_L 遺伝子セグメント間に存在する。そこで、特定の実施形態において、ヒト V_L 遺伝子セグメントの構成は、以下のものである(ヒト遺伝子セグメントの転写方向に関して上流から下流に): ヒト $V_L 3'-1$ - マウス $A D A M 6$ 遺伝子座 - ヒト $V_L 3'$ 。1つの実施形態において、転写方向に関して、マウス $A D A M 6$ 遺伝子座のマウス $A D A M 6 a$ およびマウス $A D A M 6 b$ のうちの1つ以上の配向は、ヒト V_L 遺伝子セグメントの配向と比較して逆である。あるいは、マウス $A D A M 6$ 遺伝子座は、最も3'側のヒト V_L 遺伝子セグメントと最も5'側の D_H 遺伝子セグメントの間の遺伝子間領域に存在する。

最も 5' 側の D_H セグメントがマウスであろうと、ヒトであろうとこのとおりであるはずである。

【0215】

1つの態様では、1つ以上の内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの置換を有する、および少なくとも1つの内因性マウス D_H 遺伝子セグメントを含むマウスを提供する。かかるマウスにおいて、前記内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの改変は、最も 5' 側の D_H 遺伝子セグメントではなく、最も 3' 側の V_H 遺伝子セグメントの1つ以上についての改変を含み得、この場合、前記1つ以上の最も 3' 側の V_H 遺伝子セグメントの改変が、前記内因性マウス A D A M 6 遺伝子座を破壊しないようにまたは非機能的にしないように注意する。例えば、1つの実施形態において、前記マウスは、すべてのまたは実質的にすべての内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換を含み、および前記マウスは、1つ以上の内因性 D_H 遺伝子セグメントおよび機能的内因性マウス A D A M 6 遺伝子座を含む。

10

【0216】

もう1つの実施形態において、前記マウスは、最も 3' 側の内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの改変、および1つ以上の内因性マウス D_H 遺伝子セグメントの改変を含み、該改変は、内因性 A D A M 6 遺伝子座が機能的なままである程度まで該内因性マウス A D A M 6 遺伝子座の完全性が維持されるように行う。一例では、かかる改変を二工程で行う：

(1) 上流ホモロジーアームと、機能的マウス A D A M 6 遺伝子座のすべてまたは部分を含む下流ホモロジーアームとを有するターゲティングベクターを利用して、最も 3' 側の内因性マウス V_H 遺伝子セグメントを1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントで置換する工程；(2) 次に、マウス A D A M 6 遺伝子座のすべてまたは機能的部分を含む上流ホモロジーアームを有するターゲティングベクターで内因性マウス D_H 遺伝子セグメントを置換する工程。

20

【0217】

様々な態様において、改変が内因性マウス A D A M 6 の機能を破壊する場合、マウス A D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的ホモログをコードする異所性配列を含有するマウスの利用は有用である。内因性マウス A D A M 6 機能を破壊する確率は、マウス免疫グロブリン遺伝子座への改変を行うとき、特に、マウス免疫グロブリン重鎖可変領域および周囲の配列を改変するときに高い。したがって、かかるマウスは、全部もしくは一部が欠失している、全部もしくは一部がヒト化されている、または全部もしくは一部が（例えば、V_KもしくはV_λ配列で）置換されている免疫グロブリン重鎖遺伝子座を有するマウスを作製するときに特に有益である。下に記載するマウスに対して記載の遺伝子改変を行うための方法は当業者に公知である。

30

【0218】

マウス A D A M 6 タンパク質をコードする異所性配列またはマウス A D A M 6 タンパク質の妊性の恩恵をもたらす実質的に同一もしくは同様のタンパク質をコードする異所性配列を含有するマウスは、内因性マウス A D A M 6 配列を破壊するかまたは欠失させるマウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座への改変に関連して特に有用である。ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する抗体を発現するマウスに関連して主として記載したが、かかるマウスは、内因性マウス A D A M 6 遺伝子を破壊する任意の遺伝子改変に関連して有用である。これが、マウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座の改変を含有する多種多様な遺伝子改変マウスを包含することは、当業者であれば認める。これらには、例えば、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントのすべてまたは一部分の欠失または置換を、他の改変にかかわらず有するマウスが含まれる。非限定的な例を下に記載する。

40

【0219】

一部の態様では、マウスにおいて機能的な異所性マウス、齧歯動物または他の A D A M 6 遺伝子（またはオルソログもしくはホモログもしくは断片）と1つ以上のヒト免疫グロブリン可変および／または定常領域遺伝子セグメントとを含む遺伝子改変マウスを提供する。様々な実施形態において、マウスにおいて機能的である他の A D A M 6 遺伝子オルソ

50

ログまたはホモログまたは断片は、ウシ、イヌ、霊長類、ウサギまたは他の非ヒト配列を含み得る。

【0220】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス D_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト D_H 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス J_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト J_H 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスを提供する。

【0221】

1つの実施形態において、前記マウスは、マウス C_H1 ヌクレオチド配列の、ヒト C_H1 ヌクレオチド配列での置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、マウスヒンジヌクレオチド配列の、ヒトヒンジヌクレオチド配列での置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座(V_L および J_L)の、ヒト免疫グロブリン軽鎖可変遺伝子座での置換をさらに含む。1つの実施形態において、前記マウスは、マウス免疫グロブリン軽鎖定常領域ヌクレオチド配列の、ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域ヌクレオチド配列での置換をさらに含む。特定の実施形態において、前記 V_L 、 J_L および C_L は、免疫グロブリン κ 軽鎖配列である。特定の実施形態において、前記マウスは、ヒトヒンジおよびヒト C_H1 配列と融合したマウス C_H2 およびマウス C_H3 免疫グロブリン定常領域配列を含むので、該マウス免疫グロブリン遺伝子座が再構成して、(a)ヒト可変領域、ヒト C_H1 領域、ヒトヒンジ領域ならびにマウス C_H2 およびマウス C_H3 領域を有する重鎖と、(b)ヒト可変ドメインおよびヒト定常領域を含む免疫グロブリン軽鎖をコードする遺伝子とを含む結合タンパク質をコードする遺伝子を形成する。

【0222】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_L 遺伝子セグメントでの置換と、必要に応じて、すべてのもしくは実質的にすべての D_H 遺伝子セグメントおよび／もしくは J_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト D_H 遺伝子セグメントおよび／もしくはヒト J_H 遺伝子セグメントでの置換と、または必要に応じて、すべてのもしくは実質的にすべての D_H 遺伝子セグメントおよび J_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト J_L 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスを提供する。

【0223】

1つの実施形態において、前記マウスは、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメントの、1つ以上の V_L 、1つ以上の D_H 、および1つ以上の J 遺伝子セグメント(例えば、 $J\kappa$ または $J\lambda$)での置換を含み、これらの遺伝子セグメントは、内因性マウスヒンジ領域に作動可能に連結されており、該マウスは、転写方向に5'から3'へと、ヒト V_L —ヒトまたはマウス D_H —ヒトまたはマウス J —マウスヒンジーマウス C_H2 —マウス C_H3 を含有する再構成免疫グロブリン鎖遺伝子を形成する。1つの実施形態において、前記 J 領域は、ヒト $J\kappa$ 領域である。1つの実施形態において、前記 J 領域は、ヒト J_H 領域である。1つの実施形態において、前記 J 領域は、ヒト $J\lambda$ 領域である。1つの実施形態において、前記ヒト V_L 領域は、ヒト $V\lambda$ 領域およびヒト $V\kappa$ 領域から選択される。

【0224】

特定の実施形態において、前記マウスは、マウスまたはヒト定常領域と、ヒト $V\kappa$ 、ヒト D_H およびヒト $J\kappa$ ；ヒト $V\kappa$ 、ヒト D_H およびヒト J_H ；ヒト $V\lambda$ 、ヒト D_H およびヒト $J\lambda$ ；ヒト $V\lambda$ 、ヒト D_H およびヒト J_H ；ヒト $V\kappa$ 、ヒト D_H およびヒト $J\lambda$ ；ヒト $V\lambda$ 、ヒト D_H およびヒト $J\kappa$ に由来する可変領域とを有する、単一可変ドメイン抗体を発現する。特定の実施形態では、列挙した V 、 D および J 遺伝子セグメント間でのまたは列挙した V および J 遺伝子セグメント間での生産的再構成の発生が可能になるように、

組換え認識配列を改変する。

【0225】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片）をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_L 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのもしくは実質的にすべての D_H 遺伝子セグメントおよび J_H 遺伝子セグメントの、ヒト J_L 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスであって、 C_H1 および／またはヒンジ領域が無いマウスを提供する。

【0226】

1つの実施形態において、前記マウスには C_H1 ドメインをコードする配列が無い。1つの実施形態において、前記マウスにはヒンジ領域をコードする配列が無い。1つの実施形態において、前記マウスには C_H1 ドメインおよびヒンジ領域をコードする配列が無い。

10

【0227】

特定の実施形態において、前記マウスは、マウス C_H3 ドメインに結合しているマウス C_H2 ドメインに融合しているヒト免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ λ または κ ）を含む結合タンパク質を発現する。

【0228】

1つの態様では、機能的ADAM6タンパク質（またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片）をコードする異所性ADAM6配列と、すべてのまたは実質的にすべてのマウス V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_L 遺伝子セグメントでの置換と、すべてのもしくは実質的にすべてのマウス D_H および J_H 遺伝子セグメントの、ヒト J_L 遺伝子セグメントでの置換とを含むマウスを提供する。

20

【0229】

1つの実施形態において、前記マウスは、 C_H1 領域、ヒンジ領域、 C_H1 およびヒンジ領域、または C_H1 領域およびヒンジ領域および C_H2 領域をコードする免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子配列の欠失を含む。

【0230】

1つの実施形態において、前記マウスは、以下のものから選択されるホモ二量体を含む単一可変ドメイン結合タンパク質を作製する：（a）ヒト V_L —マウス C_H1 —マウス C_H2 —マウス C_H3 ；（b）ヒト V_L —マウスヒンジ—マウス C_H2 —マウス C_H3 ；（c）ヒト V_L —マウス C_H2 —マウス C_H3 。

30

【0231】

1つの態様では、無能化または欠失された内因性マウスADAM6遺伝子座を含む、無能化された内因性重鎖免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスであって、ヒトまたはマウスまたはヒト／マウスもしくは他のキメラ抗体を発現する核酸配列を含むマウスを提供する。1つの実施形態において、前記核酸配列は、組み込まれた導入遺伝子上に存在し、該導入遺伝子は、マウスゲノムにランダムに組み込まれている。1つの実施形態において、前記核酸配列は、野生型マウスでは見出さないエピソーム（例えば、染色体）上にある。

【0232】

1つの実施形態において、前記マウスは、無能化された内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座をさらに含む。特定の実施形態において、前記内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座は、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）軽鎖遺伝子座から選択される。特定の実施形態において、前記マウスは、無能化された内因性 κ 軽鎖遺伝子座および無能化された λ 軽鎖遺伝子座を含み、この場合のマウスは、ヒト免疫グロブリン重鎖可変ドメインおよびヒト免疫グロブリン軽鎖ドメインを含む抗体を発現する。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖ドメインは、ヒト κ 軽鎖ドメインおよびヒト λ 軽鎖ドメインから選択される。

40

【0233】

1つの態様では、キメラ抗体を発現する遺伝子改変動物であって、該遺伝子改変動物に

50

において機能的であるA D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログを発現する遺伝子改変動物を提供する。

【0234】

1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物は、マウスおよびラットから選択される。1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物はマウスであり、前記A D A M 6 タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログは、該遺伝子改変動物とは異なる系統であるマウス系統からのものである。1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物は、キヌゲネズミ科の齧歯動物（例えば、ハムスター、新世界ラットまたはマウス、ハタネズミ）であり、および前記A D A M 6 タンパク質オルソログまたはホモログは、ネズミ科の齧歯動物（例えば、純種のマウスおよびラット、アレチネズミ、トゲマウス、タテガミネズミ）からのものである。1つの実施形態において、前記遺伝子改変動物は、ネズミ科の齧歯動物であり、前記A D A M 6 タンパク質オルソログまたはホモログは、キヌゲネズミ科の齧歯動物からのものである。

10

【0235】

1つの実施形態において、前記キメラ抗体は、ヒト可変ドメインと齧歯動物の定常領域配列とを含む。1つの実施形態において、前記齧歯動物は、キヌゲネズミ科の齧歯動物およびネズミ科の齧歯動物から選択される。特定の実施形態において、前記キヌゲネズミ科およびネズミ科の齧歯動物は、マウスである。特定の実施形態において、前記キヌゲネズミ科およびネズミ科の齧歯動物は、ラットである。1つの実施形態において、前記キメラ抗体は、ヒト可変ドメインと、マウスまたはラットから選択される動物からの定常ドメインとを含む；特定の実施形態において、前記マウスまたはラットは、キヌゲネズミ科およびネズミ科から選択される。1つの実施形態において、前記キメラ抗体は、ヒト重鎖可変ドメインと、ヒト軽鎖可変ドメインと、マウスおよびラットから選択される齧歯動物由来の定常領域配列とを含み、この場合のヒト重鎖可変ドメインおよびヒト軽鎖は同種のものである。特定の実施形態において、同種のものとしては、ヒト重鎖およびヒト軽鎖可変ドメインが、該ヒト軽鎖可変ドメインと該ヒト重鎖可変ドメインを一緒に発現してその可変ドメインを個々のB細胞の表面と一緒に提示する単一B細胞からのものである、同種のも

20

【0236】

1つの実施形態では、前記キメラ抗体を免疫グロブリン遺伝子座から発現させる。1つの実施形態では、前記キメラ抗体の重鎖可変ドメインを再構成内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座から発現させる。1つの実施形態では、前記キメラ抗体の軽鎖可変ドメインを再構成内因性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座から発現させる。1つの実施形態では、前記キメラ抗体の重鎖可変ドメインおよび／または前記キメラ抗体の軽鎖可変ドメインを再構成導入遺伝子（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子座以外の遺伝子座の動物のゲノムに組み込まれている非再構成核酸配列から誘導された再構成核酸配列）から発現させる。1つの実施形態において、前記キメラ抗体の軽鎖可変ドメインを再構成導入遺伝子（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子座以外の遺伝子座の動物のゲノムに組み込まれている非再構成核酸配列から誘導された再構成核酸配列）から発現させる。

30

【0237】

特定の実施形態では、前記導入遺伝子を転写活性遺伝子座、例えば、R O S A 2 6 遺伝子座、例えばネズミ（例えばマウス）R O S A 2 6 遺伝子座から発現させる。

40

【0238】

1つの態様では、非ヒト動物であって、ヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含み、該ヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座が非ヒトA D A M 6 配列またはそのオルソログもしくはホモログを含む、非ヒト動物を提供する。

【0239】

1つの実施形態において、前記非ヒト動物は、マウス、ラットおよびハムスターから選択される齧歯動物である。

【0240】

50

1つの実施形態において、前記非ヒトA D A M 6 オルソログまたはホモログは、マウスA D A M 6 配列とオルソログおよび／または相同性である配列であり、そのオルソログまたはホモログは、非ヒト動物において機能的である。

【0241】

1つの実施形態において、前記非ヒト動物は、マウス、ラットおよびハムスターから選択され、前記A D A M 6 オルソログまたはホモログは、マウス、ラットおよびハムスターから選択される非ヒト動物からのものである。特定の実施形態において、前記非ヒト動物はマウスであり、前記A D A M 6 オルソログまたはホモログは、異なるマウス種、ラットおよびハムスターから選択される動物からのものである。特定の実施形態において、前記非ヒト動物はラットであり、前記A D A M 6 オルソログまたはホモログは、異なるラット種、マウスおよびハムスターから選択される齧歯動物からのものである。特定の実施形態において、前記非ヒト動物はハムスターであり、前記A D A M 6 オルソログまたはホモログは、異なるハムスター種、マウスおよびラットから選択される齧歯動物からのものである。

10

【0242】

特定の実施形態において、前記非ヒト動物は、ネズミ亜目からのものであり、前記A D A M 6 配列は、トビネズミ上科の齧歯動物およびネズミ上科の齧歯動物から選択される動物からのものである。特定の実施形態において、前記齧歯動物は、ネズミ上科のマウスであり、前記A D A M 6 オルソログまたはホモログは、ネズミ上科のマウスまたはラットまたはハムスターからのものである。

20

【0243】

1つの実施形態において、前記ヒト化重鎖遺伝子座は、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメント、1つ以上のヒト D_H 遺伝子セグメントおよび1つ以上のヒト J_H 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメント、1つ以上のヒト D_H 遺伝子セグメントおよび1つ以上のヒト J_H 遺伝子セグメントは、1つ以上のヒト、キメラおよび／または齧歯動物（例えば、マウスもしくはラット）定常領域遺伝子に作動可能に連結されている。1つの実施形態において、前記定常領域遺伝子はマウスである。1つの実施形態において、前記定常領域遺伝子はラットである。1つの実施形態において、前記定常領域遺伝子はハムスターである。1つの実施形態において、前記定常領域遺伝子は、ヒンジ、 $C_H 2$ 、 $C_H 3$ およびその組み合わせから選択される配列を含む。特定の実施形態において、前記定常領域遺伝子は、ヒンジ、 $C_H 2$ および $C_H 3$ 配列を含む。

30

【0244】

1つの実施形態において、前記非ヒトA D A M 6 配列は、ヒト免疫グロブリン重鎖配列に隣接する。1つの実施形態において、前記非ヒトA D A M 6 配列は、ヒト免疫グロブリン重鎖配列内に位置する。特定の実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン重鎖配列は、V、Dおよび／またはJ 遺伝子セグメントを含む。

【0245】

1つの実施形態において、前記非ヒトA D A M 6 配列は、2つのV 遺伝子セグメント間に位置する。1つの実施形態において、前記非ヒトA D A M 6 配列は、V 遺伝子セグメントとD 遺伝子セグメントの間に並置されている。1つの実施形態において、前記マウスA D A M 6 配列は、V 遺伝子セグメントとJ 遺伝子セグメントの間に位置する。1つの実施形態において、前記マウスA D A M 6 配列は、D 遺伝子セグメントとJ 遺伝子セグメントの間に並置されている。

40

【0246】

1つの態様では、免疫グロブリン遺伝子座からヒト V_L ドメインと同種のヒト V_H ドメインを発現するB細胞を含む遺伝子改変非ヒト動物であって、該免疫グロブリン遺伝子座から非免疫グロブリン非ヒトタンパク質を発現する遺伝子改変非ヒト動物を提供する。1つの実施形態において、前記非免疫グロブリン非ヒトタンパク質は、A D A Mタンパク質である。特定の実施形態において、前記A D A Mタンパク質は、A D A M 6 タンパク質ま

50

たはそのホモログもしくはオルソログもしくは機能的断片である。

【0247】

1つの実施形態において、前記非ヒト動物は、齧歯動物（例えば、マウスまたはラット）である。1つの実施形態において、前記齧歯動物は、ネズミ科のものである。1つの実施形態において、前記齧歯動物は、ネズミ上科のものである。特定の実施形態において、前記ネズミ上科の齧歯動物は、マウスおよびラットから選択される。

【0248】

1つの実施形態において、前記非免疫グロブリン非ヒトタンパク質は、齧歯動物タンパク質である。1つの実施形態において、前記齧歯動物は、ネズミ科のものである。1つの実施形態において、前記齧歯動物は、ネズミ上科のものである。特定の実施形態において、前記齧歯動物は、マウス、ラットおよびハムスターから選択される。

10

【0249】

1つの実施形態において、前記ヒト V_H および V_L ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に直接またはリンカーによって結合する。特定の実施形態において、前記定常ドメイン配列は、ヒンジ、 C_H2 、 C_H3 およびその組み合わせから選択される配列を含む。特定の実施形態において、前記ヒト V_L ドメインは、 V_K または V_λ ドメインから選択される。

【0250】

1つの態様では、遺伝子改変非ヒト動物であって、その生殖細胞系にヒト免疫グロブリン配列を含み、雄非ヒト動物の精子が*in vivo*移動欠陥を特徴とする、遺伝子改変非ヒト動物を提供する。1つの実施形態において、前記*in vivo*移動欠陥は、前記雄非ヒト動物の精子が同じ種の雌非ヒト動物の子宮から卵管を通して移動することができないことを含む。1つの実施形態において、前記非ヒト動物には、ADAM6タンパク質またはその機能的断片をコードするヌクレオチド配列が無い。特定の実施形態において、前記ADAM6タンパク質またはその機能的断片は、ADAM6aおよび／もしくはADAM6bタンパク質またはその機能的断片を含む。1つの実施形態において、前記非ヒト動物は齧歯動物である。特定の実施形態において、前記齧歯動物は、マウス、ラットおよびハムスターから選択される。

20

【0251】

1つの態様では、ADAM6タンパク質またはそのオルソログもしくはホモログもしくは機能的断片をコードする非ヒト配列に隣接するヒト免疫グロブリン配列を含む非ヒト動物を提供する。1つの実施形態において、前記非ヒト動物は齧歯動物である。特定の実施形態において、前記齧歯動物は、マウス、ラットおよびハムスターから選択される。

30

【0252】

1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン配列は、免疫グロブリン重鎖配列である。1つの実施形態において、前記免疫グロブリン配列は、1つ以上の V_H 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン配列は、1つ以上の D_H 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン配列は、1つ以上の J_H 遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン配列は、1つ以上の V_H 遺伝子セグメント、1つ以上の D_H 遺伝子セグメントおよび1つ以上の J_H 遺伝子セグメントを含む。

40

【0253】

1つの実施形態において、前記免疫グロブリン配列は、天然ヒトレパートリーにおいて高頻度である1つ以上の V_H 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記1つ以上の V_H 遺伝子セグメントは、2つ以下の V_H 遺伝子セグメント、3つ以下の V_H 遺伝子セグメント、4つ以下の V_H 遺伝子セグメント、5つ以下の V_H 遺伝子セグメント、6つ以下の V_H 遺伝子セグメント、7つ以下の V_H 遺伝子セグメント、8つ以下の V_H 遺伝子セグメント、9つ以下の V_H 遺伝子セグメント、10以下の V_H 遺伝子セグメント、11以下の V_H 遺伝子セグメント、12以下の V_H 遺伝子セグメント、13以下の V_H 遺伝子セグメント、14以下の V_H 遺伝子セグメント、15以下の V_H 遺伝子セグメント、

50

16以下の V_H 遺伝子セグメント、17以下の V_H 遺伝子セグメント、18以下の V_H 遺伝子セグメント、19以下の V_H 遺伝子セグメント、20以下の V_H 遺伝子セグメント、21以下の V_H 遺伝子セグメント、22以下の V_H 遺伝子セグメントまたは23以下の V_H 遺伝子セグメントを含む。

【0254】

特定の実施形態において、前記1つ以上の V_H 遺伝子セグメントは、5つの V_H 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記1つ以上の V_H 遺伝子セグメントは、10の V_H 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記1つ以上の V_H 遺伝子セグメントは、15の V_H 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記1つ以上の V_H 遺伝子セグメントは、20の V_H 遺伝子セグメントを含む。

10

【0255】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 6-1、 V_H 1-2、 V_H 1-3、 V_H 2-5、 V_H 3-7、 V_H 1-8、 V_H 3-9、 V_H 3-11、 V_H 3-13、 V_H 3-15、 V_H 3-16、 V_H 1-18、 V_H 3-20、 V_H 3-21、 V_H 3-23、 V_H 1-24、 V_H 2-26、 V_H 4-28、 V_H 3-30、 V_H 4-31、 V_H 3-33、 V_H 4-34、 V_H 3-35、 V_H 3-38、 V_H 4-39、 V_H 3-43、 V_H 1-45、 V_H 1-46、 V_H 3-48、 V_H 3-49、 V_H 5-51、 V_H 3-53、 V_H 1-58、 V_H 4-59、 V_H 4-61、 V_H 3-64、 V_H 3-66、 V_H 1-69、 V_H 2-70、 V_H 3-72、 V_H 3-73および V_H 3-74から選択される。

20

【0256】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 1-2、 V_H 1-8、 V_H 1-18、 V_H 1-46、 V_H 1-69、 V_H 3-7、 V_H 3-9、 V_H 3-11、 V_H 3-13、 V_H 3-15、 V_H 3-21、 V_H 3-23、 V_H 3-30、 V_H 3-33、 V_H 3-43、 V_H 3-48、 V_H 4-31、 V_H 4-34、 V_H 4-39、 V_H 4-59、 V_H 5-51および V_H 6-1から選択される。

【0257】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 1-18、 V_H 1-46、 V_H 1-69、 V_H 3-7、 V_H 3-11、 V_H 3-15、 V_H 3-21、 V_H 3-23、 V_H 3-30、 V_H 3-33、 V_H 3-48、 V_H 4-34、 V_H 4-39、 V_H 4-59および V_H 5-51から選択される。

30

【0258】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 1-18、 V_H 1-69、 V_H 3-7、 V_H 3-11、 V_H 3-15、 V_H 3-21、 V_H 3-23、 V_H 3-30、 V_H 3-43、 V_H 3-48、 V_H 4-39、 V_H 4-59および V_H 5-51から選択される。

【0259】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 1-18、 V_H 3-11、 V_H 3-21、 V_H 3-23、 V_H 3-30、 V_H 4-39および V_H 4-59から選択される。

40

【0260】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 1-18、 V_H 3-21、 V_H 3-23、 V_H 3-30および V_H 4-39から選択される。

【0261】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 1-18、 V_H 3-23および V_H 4-39から選択される。

【0262】

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 V_H 3-21、 V_H 3-23および V_H 3-30から選択される。

【0263】

50

様々な実施形態において、前記 V_H 遺伝子セグメントは、 $V_H 3-23$ 、 $V_H 3-30$ および $V_H 4-39$ から選択される。

【0264】

特定の実施形態において、ヒト免疫グロブリン配列は、少なくとも18の V_H 遺伝子セグメント、27の D_H 遺伝子セグメントおよび6の J_H 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン配列は、少なくとも39の V_H 遺伝子セグメント、27の D_H 遺伝子セグメントおよび6の J_H 遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン配列は、少なくとも80の V_H 遺伝子セグメント、27の D_H 遺伝子セグメントおよび6の J_H 遺伝子セグメントを含む。

【0265】

1つの実施形態において、前記非ヒト動物はマウスであり、該マウスは、内因性マウス V_H 遺伝子セグメントの、1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントでの置換を含み、該ヒト V_H 遺伝子セグメントはマウス C_H 領域遺伝子に作動可能に連結されているので、該マウスは、ヒト V_H 遺伝子セグメントを再構成し、およびヒト V_H ドメインとマウス C_H を含む逆キメラ免疫グロブリン重鎖を発現する。1つの実施形態では、非再構成マウス V_H 遺伝子セグメントの90~100%が、少なくとも1つの非構成ヒト V_H 遺伝子セグメントで置換されている。特定の実施形態では、前記内因性マウス V_H 遺伝子セグメントのすべてまたは実質的にすべてが、少なくとも1つの非再構成ヒト V_H 遺伝子セグメントで置換されている。1つの実施形態において、前記置換は、少なくとも19、少なくとも39、または少なくとも80もしくは81の非再構成ヒト V_H 遺伝子セグメントでのものである。1つの実施形態において、前記置換は、少なくとも12の機能的非再構成ヒト V_H 遺伝子セグメント、少なくとも25の機能的非再構成ヒト V_H 遺伝子セグメントまたは少なくとも43の機能的非再構成ヒト V_H 遺伝子セグメントでのものである。1つの実施形態において、前記マウスは、すべてのマウス D_H および J_H セグメントの、少なくとも1つの非再構成ヒト D_H セグメントおよび少なくとも1つの非再構成ヒト J_H セグメントでの置換を含む。1つの実施形態において、前記少なくとも1つの非再構成ヒト D_H セグメントは、1-1、1-7、1-26、2-8、2-15、3-3、3-10、3-16、3-22、5-5、5-12、6-6、6-13、7-27およびその組み合わせから選択される。1つの実施形態において、前記少なくとも1つの非再構成ヒト J_H セグメントは、1、2、3、4、5、6およびその組み合わせから選択される。特定の実施形態において、前記1つ以上のヒト V_H 遺伝子セグメントは、1-2、1-8、1-24、1-69、2-5、3-7、3-9、3-11、3-13、3-15、3-20、3-23、3-30、3-33、3-48、3-53、4-31、4-39、4-59、5-51、6-1ヒト V_H 遺伝子セグメントおよびその組み合わせから選択される。

【0266】

様々な実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン配列は、非ヒト動物（例えば、齧歯動物、例えばマウス、ラットまたはハムスター）の生殖細胞系における定常領域と作動可能な連結状態にある。1つの実施形態において、前記定常領域は、ヒト、キメラヒト／マウスまたはキメラヒト／ラットまたはキメラヒト／ハムスター、マウス、ラットまたはハムスター定常領域である。1つの実施形態において、前記定常領域は、齧歯動物（例えば、マウスまたはラットまたはハムスター）定常領域である。特定の実施形態において、前記齧歯動物は、マウスまたはラットである。様々な実施形態において、前記定常領域は、少なくとも $C_H 2$ ドメインおよび $C_H 3$ ドメインを含む。

【0267】

1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン重鎖配列は、非ヒト動物（例えば、齧歯動物、例えばマウス、ラットまたはハムスター）の生殖細胞系における免疫グロブリン重鎖遺伝子座にある。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン重鎖配列は、非ヒト動物の生殖細胞系における非免疫グロブリン重鎖遺伝子座にあり、この非重鎖遺伝子座は、転写活性遺伝子座である。特定の実施形態において、前記非重鎖遺伝子座は、R O S A 2 6 遺伝子座である。

10

20

30

40

50

【0268】

様々な態様において、前記非ヒト動物は、該非ヒト動物の生殖細胞系にヒト免疫グロブリン軽鎖配列（例えば、1つ以上の非再構成軽鎖VおよびJ配列、または1つ以上の再構成VJ配列）をさらに含む。特定の実施形態において、前記免疫グロブリン軽鎖配列は、免疫グロブリンκ軽鎖配列である。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、1つ以上のV_L遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、1つ以上のJ_L遺伝子セグメントを含む。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、1つ以上のV_L遺伝子セグメントおよび1つ以上のJ_L遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、少なくとも16のVκ遺伝子セグメントおよび5つのJκ遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、少なくとも30のVκ遺伝子セグメントおよび5つのJκ遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、少なくとも40のVκ遺伝子セグメントおよび5つのJκ遺伝子セグメントを含む。様々な実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、非ヒト動物（例えば、齧歯動物、例えばマウス、ラットまたはハムスター）の生殖細胞系における定常領域と作動可能な連結状態にある。1つの実施形態において、前記定常領域は、ヒト、キメラヒト／齧歯動物、マウス、ラットまたはハムスター定常領域である。特定の実施形態において、前記定常領域は、マウスまたはラット定常領域である。特定の実施形態において、前記定常領域は、マウスκ定常（mCκ）領域またはラットκ定常（rCκ）領域である。

10

20

【0269】

1つの実施形態において、前記非ヒト動物はマウスであり、該マウスは、すべてのまたは実質的にすべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントの、少なくとも6のヒトVκ遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのJκ遺伝子セグメントでの置換を含む。1つの実施形態では、すべてのまたは実質的にすべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントが、少なくとも16のヒトVκ遺伝子セグメント（ヒトVκ）および少なくとも1つのJκ遺伝子セグメントで置換されている。1つの実施形態では、すべてのまたは実質的にすべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントが、少なくとも30のヒトVκ遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのJκ遺伝子セグメントで置換されている。1つの実施形態では、すべてのまたは実質的にすべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントが、少なくとも40のヒトVκ遺伝子セグメントおよび少なくとも1つのJκ遺伝子セグメントで置換されている。1つの実施形態において、前記少なくとも1つのJκ遺伝子セグメントは、2、3、4または5つのヒトJκ遺伝子セグメントを含む。

30

40

【0270】

1つの実施形態において、前記ヒトVκ遺伝子セグメントは、Vκ4-1、Vκ5-2、Vκ7-3、Vκ2-4、Vκ1-5およびVκ1-6を含む。1つの実施形態において、前記Vκ遺伝子セグメントは、Vκ3-7、Vκ1-8、Vκ1-9、Vκ2-10、Vκ3-11、Vκ1-12、Vκ1-13、Vκ2-14、Vκ3-15およびVκ1-16を含む。1つの実施形態において、前記ヒトVκ遺伝子セグメントは、Vκ1-17、Vκ2-18、Vκ2-19、Vκ3-20、Vκ6-21、Vκ1-22、Vκ1-23、Vκ2-24、Vκ3-25、Vκ2-26、Vκ1-27、Vκ2-28、Vκ2-29およびVκ2-30を含む。1つの実施形態において、前記ヒトVκ遺伝子セグメントは、Vκ3-31、Vκ1-32、Vκ1-33、Vκ3-34、Vκ1-35、Vκ2-36、Vκ1-37、Vκ2-38、Vκ1-39およびVκ2-40を含む。

【0271】

特定の実施形態において、前記Vκ遺伝子セグメントは、Vκ4-1からVκ2-40までのヒト免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子座にわたる連続したヒト免疫グロブリンκ遺伝子セグメントを含み、前記Jκ遺伝子セグメントは、Jκ1からJκ5までのヒト免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子座にわたる連続した遺伝子セグメントを含む。

50

【0272】

1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、非ヒト動物の生殖細胞系における免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にある。特定の実施形態において、前記非ヒト動物の生殖細胞系における免疫グロブリン軽鎖遺伝子座は、免疫グロブリンκ軽鎖遺伝子座である。1つの実施形態において、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖配列は、転写活性である非ヒト動物の生殖細胞系における非免疫グロブリン軽鎖遺伝子座にある。特定の実施形態において、前記非免疫グロブリン遺伝子座は、R O S A 2 6 遺伝子座である。

【0273】

1つの態様では、本明細書に記載の非ヒト動物の細胞にコードされている1つ以上の可変領域核酸配列に由来する可変ドメインを含むヒト抗体の作製方法を提供する。

10

【0274】

1つの態様では、本明細書に記載の非ヒト動物から単離された1つ以上の可変領域核酸配列に由来する抗体または抗体断片を含むポリペプチドを含む薬学的組成物を提供する。1つの実施形態において、前記ポリペプチドは抗体である。1つの実施形態において、前記ポリペプチドは、重鎖のみの抗体である。1つの実施形態において、前記ポリペプチドは、一本鎖可変断片（例えば、s c F v）である。

【0275】

1つの態様では、抗体を作製するための、本明細書に記載の非ヒト動物の使用を提供する。様々な実施形態において、前記抗体は、前記非ヒト動物から単離された1つ以上の可変領域核酸配列に由来する1つ以上の可変ドメインを含む。特定の実施形態において、前記可変領域核酸配列は、免疫グロブリン重鎖遺伝子セグメントを含む。特定の実施形態において、前記可変領域核酸配列は、免疫グロブリン軽鎖遺伝子セグメントを含む。

20

【実施例】

【0276】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物の作製および使用の仕方を説明するために提供するものであり、本発明者らが自分達の発明とみなすものの範囲を限定することを意図したものではない。別の指示が無い限り、温度は摂氏で示し、圧力は大気圧または近大気圧である。

【0277】

実施例1

30

マウス免疫グロブリン遺伝子のヒト化

ヒトおよびマウス細菌人工染色体（BAC）を使用して、マウス免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座のヒト化のための13の異なるBACターゲティングベクター（BAC v e c）を工学的に作製した。表1および2は、マウス免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座のヒト化にそれぞれ利用したすべてのBAC v e cを構築するために行った工程の説明を示すものである。

【0278】

ヒトおよびマウスBACの同定。BACライブラリーを用いてスポットしたフィルターのハイブリダイゼーションにより、またはマウスBACライブラリーDNAプールのPCRスクリーニングにより、免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座の5'および3'端にわたるマウスBACを同定した。対象となる領域に対応するプローブを使用して、標準条件下でフィルターをハイブリダイズした。対象となる標的領域に隣接するユニークなプライマーペアを使用してPCRによりライブラリープールをスクリーニングした。同じプライマーを使用する追加のPCRを行って、所与のウェルをデコンボリュートし、対象となる対応するBACを単離した。BACフィルターとライブラリープールの両方を129 SvJマウスES細胞（Incyte Genomics / Invitrogen）から生成した。全免疫グロブリン重鎖およびκ軽鎖遺伝子座をカバーするヒトBACを、BACライブラリー（Caltech B、CもしくはDライブラリーおよびRPCI-11ライブラリー、Research Genetics / Invitrogen）を用いてスポットしたフィルターのハイブリダイゼーションとPCRベースの方法によるヒトBAC

40

50

ライブラリープール (Caltechライブラリー、Invitrogen) のスクリーニングによるか、またはBAC末端配列データベース (Caltech Library、TIGR) の使用によるかの、いずれかによって同定した。細菌相同組換えおよびライゲーションによるBACvecの構築。細菌相同組換え (BHR) を記載されている (Valenzuelaら、2003; Zhangら、1998、A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*、Nat Genet 20:123-128) とおりに行った。殆どの場合、PCR生成ホモロジーボックスのクローン化カセットへのライゲーション、続いてライゲーション産物のゲル単離、そして標的BACを保有するBHRコンピテント細菌へのエレクトロポレーションによって線状断片を生成した。適切な抗生物質ペトリ皿での選択の後、正しく組換えられたBACを、両方の新規接合部にわたってのPCR、続いてパルスフィールドゲルでの制限酵素分析 (Schwartz and Cantor、1984、Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis、Cell 37:67-75)、そしてヒト配列全域にわたって分布するプライマーを使用するPCRによるスポットチェックによって同定した。

10

【0279】

3工程の逐次的BHR工程を用いて、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の最初のヒト化工程のための3hV_H BACvecを構築した (図4Aおよび表1)。第一工程 (工程1) では、ヒト親BACのヒトV_H 1-3遺伝子セグメントから上流に、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と相同性の領域 (HB1) と細菌にカナマイシン耐性をおよび動物細胞にG418耐性を付与する遺伝子 (kanR) と部位特異的組換え部位 (例えば、loxP) とを含有するカセットを導入した。第二工程 (工程2) では、最後のJ_H セグメントから直ぐ下流に、マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座と相同性の第二の領域 (HB2) と細菌にスペクチノマイシンに対する耐性を付与する遺伝子 (specR) とを含有する第二のカセットを導入した。この第二工程は、J_H 6から下流のヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座配列とBACベクタークロラムフェニコール耐性遺伝子 (cmR) とを欠失させることを含んだ。次に、第三工程 (工程3) では、最初の2工程の間に付加されたI-CeuI部位を使用して二重改変ヒトBAC (B1) を線形化し、2つの相同性領域 (HB1およびHB2) によるBHRによってマウスBAC (B2) に組み込んだ。第一 (cm/kan)、第二 (spec/kan) および第三 (cm/kan) 工程のための薬剤選択は、所望の産物に特異的であるように設計した。制限酵素での消化後にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により改変BACクローンを分析して、適切な構築物を決定した (図4B)。

20

30

【0280】

同様に、重鎖およびκ軽鎖遺伝子座のヒト化のために12の追加のBACvecを工学的に作製した。場合によっては、選択マーカーの注意深い配置と共に、BHRによる両方の親BACvecへの稀な制限酵素認識部位導入による、BHRの代わりにBACライゲーションを行って、2つの大きなBACを結合した。これにより、特定の薬剤マーカーの組み合わせでの選択の際に、所望のライゲーション産物の生残が可能になった。稀な制限酵素での消化後のライゲーションによって得た組換えBACを、BHRによって得たものと同様に (上に記載したように) 同定し、スクリーニングした。

40

【0281】

【表 1 - 1】

表1

BACvec	工程	説明	プロセス
3hV _H	1	ヒト近位BAC CTD-2572o2の上流にマウスホモロジーボックスを挿入する	BHR
	2	ヒト近位BAC CTD-2572o2の下流にマウスホモロジーボックスを挿入する	BHR
	3	3hV _H /27hD _H /9hJ _H をマウス近位BAC CT7-302a07に挿入して3hV _H BACvecを作製する	BHR
DC	1	マウスBAC CT7-253i20を使用してマウスIgH遺伝子座の遠位端にカセットを挿入する	BHR
18hV _H	1	ヒトBAC CTD-2572o2を使用して3hV _H 挿入物の下流端にspecRマーカを挿入する	BHR
	2	I-CeuIおよびNot部位を3hV _H 挿入物の上流端にpuroRに隣接して挿入する	BHR
	3	Rel2-408p02 BACの下流端(V _H 2-5の約10kb下流)にNot部位を挿入する	BHR
	4	Rel2-408p02 BACの上流端(V _H 1-18の約23kb上流)にI-CeuI部位を挿入する	BHR

10

20

30

【 0 2 8 2 】

【表 1 - 2】

	5	工程4からの184kb断片を工程2からの153kbベクターにライゲートする	ライゲーション
	6	3hV _H との相同領域(homology)約85kbを欠失させ65kbを残して、CTD-2572o2 BACからのヒト相同領域のトリミングする	BHR
	7	カセットおよびNot部位をCT7-253i20 BAC内のマウスIgH遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	8	ヒトBACから上流に挿入するためのマウス遠位ホモロジーアームをサブクローニングする	ライゲーション
	9	20kbマウスアームをRel2-408p02の上流に挿入する	BHR
	10	hygRからneoRに選択カセットを交換して18hV _H BACvecを作製する	BHR
39hV _H	1	I-CeuIおよびPI-SceI部位をヒトBAC CTD-2534n10の遠位端にhygRに隣接して挿入する	BHR
	2	CTD-2534n10 BACの近位端にCmRを挿入して、RP11-72n10 BACへのライゲーションのための選択を可能にする	BHR
	3	CTD-2534n10 BACへのライゲーションのためにRP11-72n10 BACにPI-SceI部位を挿入する	BHR
	4	I-CeuIおよびAscI部位をRP11-72n10 BACの遠位端にpuroRに隣接して挿入する	BHR
	5	工程4の構築物からの161kb断片を工程2の構築物にライゲートし、hygRを置換する	ライゲーション
	6	CT7-253i20 BACを使用してマウス遠位ホモロジーアームの近位端にneoRおよびAscI部位を挿入する	BHR
	7	マウス遠位ホモロジーアームの遠位端にspecRおよびI-CeuI部位を挿入する	BHR
	8	工程5からのヒト挿入物にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートする	ライゲーション
	9	UbCpおよびpAをホモロジーボックスとして使用してneoからhygに選択カセットを交換して39hV _H BACvecを作製する	BHR

10

20

30

40

【表 1 - 3】

53hV _H	1	ヒトCTD-3074b5 BACの近位端にspecRを挿入する	BHR
	2	ヒトCTD-3074b5 BACの遠位端にAscI部位を挿入する	BHR
	3	CT7-253i20 BACを使用してマウス遠位ホモロジーアームの近位端にhygRおよびAscI部位を挿入する	BHR
	4	工程2からの構築物上にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートする	ライゲーション
	5	UbCpおよびpAをホモロジーボックスとして使用してhygからneoに選択カセットを交換して53hV _H BACvecを作製する	BHR
70hV _H	1	PI-SceIおよびI-CeuI部位をヒトCTD-2195p5 BACの遠位端にspecに隣接して挿入する	BHR
	2	CTD-2195p5 BACへのライゲーションのためにRP11-926p12 BACの近位端にI-CeuI部位を挿入する	BHR
	3	マウスアームのライゲーションのためにRP11-926p12 BACの遠位端にPI-SceIおよびAscI部位を挿入する	BHR
	4	工程3からの構築物上にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートする	ライゲーション
	5	マウス遠位ホモロジーアームとRP11-926p12 BACからのhIgH断片とをCTD-2195p5 BAC上にライゲートして70hV _H BACvecを作製する	ライゲーション
80hV _H	1	I-CeuIおよびAscI部位をCTD-2313e3 BACの遠位端にhygRに隣接して挿入する	BHR
	2	工程1からのヒトCTD-2313e3 BAC上にマウス遠位ホモロジーアームをライゲートして80hV _H BACvecを作製する	ライゲーション

10

20

30

【0284】

【表 2】
表2

BACvec	工程	説明	プロセス
Ig κ -PC	1	CT7-254m04 BACを使用してloxP部位をマウスJ-Cイントロン内に挿入する	BHR
Ig κ -DC	1	CT7-302g12 BACを使用してloxP部位をマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
6hV κ	1	PI-SceI部位をCTD-2366j12 BAC内のhJ κ 5から約400bp下流に挿入する	BHR
	2	I-CeuIおよびAscI部位をCTD-2366j12 BACの遠位端にhygRに隣接して挿入する	BHR
	3	CT7-254m04 BACを使用してI-CeuIおよびPI-SceI部位をmJ κ から下流にpuroRに隣接して挿入する	BHR
	4	工程3からの構築物を使用してhIgV κ /J κ をマウスEnh κ /C κ から上流に挿入する	ライゲーション
	5	工程4の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	6	CT7-302g12 BACを使用してNeo選択カセットをマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	7	マウス遠位ホモロジーアームを工程6からの構築物中のヒト挿入物の上流にライゲートして6hV κ BACvecを作製する	ライゲーション
16hV κ	1	RP11-1061b13 BACの遠位端にNeoRを挿入する	BHR
	2	工程1の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	3	CT7-302g12 BACを使用してHyg選択カセットをマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	4	マウス遠位ホモロジーアームを工程2の構築物からのヒト挿入物の上流にライゲートして16hV κ BACvecを作製する	ライゲーション
30hV κ	1	HygRをRP11-99g6 BACの遠位端に挿入する	BHR
	2	工程1の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	3	CT7-302g12 BACを使用してNeo選択カセットをマウスIg κ 遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	4	マウス遠位ホモロジーアームを工程2の構築物からのヒト挿入物の上流にライゲートして30hV κ BACvecを作製する	ライゲーション
40hV κ	1	NeoRをCTD-2559d6 BAC内のhIgH遺伝子座の遠位端に挿入する	BHR
	2	工程1の構築物中のcmRをspecRで置換する	BHR
	3	マウス遠位ホモロジーアームを工程2の構築物中のヒト挿入物の上流にライゲートして40hV κ BACvecを作製する	ライゲーション

胚性幹（ES）細胞の改変およびマウスの産生。記載されている（Valenzuelaら、2003）ようなVELOCIGENE（登録商標）遺伝子工学法を用いて、ES細胞（F1H4）ターゲティングを行った。胚盤胞（Valenzuelaら、2003）または8細胞注入（Poueymirouら、2007、F0 generation mice fully derived from gene-targeted e

m b r y o n i c s t e m c e l l s a l l o w i n g i m m e d i a t e p h e n o t y p i c a n a l y s e s、Nat Biotechnol 25:91-99)のいずれかによる改変ES細胞からのマウスの誘導は、記載されているとおりであった。PCRベースのアッセイでプローブとプライマーのユニークなセットを用いてES細胞またはマウスからのDNAをスクリーニングすることにより、標的ES細胞およびマウスを確認した(例えば、図3A、3Bおよび3C)。すべてのマウス研究は、Regenerationの施設内動物管理使用委員会(Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)によって監督され、承認された。核型分析および蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)。核型分析は、Coriell Cell Repositories(Coriell Institute for Medical Research、ニュージャージー州カムデン)によって行われた。FISHは、標的ES細胞を用いて、記載されている(Valenzuelaら、2003)とおりに行った。マウスBAC DNAまたはヒトBAC DNAのいずれかに対応するプローブを、ニック翻訳(Invitrogen)により蛍光標識dUTPヌクレオチドスペクトルオレンジまたはスペクトルグリーン(Vysis)で標識した。

【0285】

免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座。重鎖遺伝子座の可変領域のヒト化は、VELOCI GENE(登録商標)遺伝子工学技術(例えば、米国特許第6,586,251号明細書およびValenzuelaら、2003参照)を用いて、9工程の逐次的工程で、すべてのV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントを含有する約3百万塩基対(Mb)の連続するマウスゲノム配列を、等価ヒト遺伝子セグメントを含有する約1Mbの連続するヒトゲノム配列で直接置換することによって達成した(図1Aおよび表1)。

【0286】

J_H遺伝子セグメントと定常領域遺伝子の間のイントロン(J-Cイントロン)は、転写エンハンサー(Neuberger、1983、Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells、EMBO J 2:1373-1378)、その後アイソタイプスイッチ中の組換えに必要な単純リピート領域(Kataokaら、1980、Rearrangement of immunoglobulin gamma 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch、PNAS USA 77:919-923)を含有する。マウス内でのヒト化重鎖遺伝子座の効率的発現およびクラススイッチ両方を保存するために、マウス重鎖イントロンエンハンサーおよびスイッチドメインを維持するようにヒトV_H-D_H-J_H領域とマウスC_H領域の間の接合部(近位接合部)を選択した。合成オリゴヌクレオチドによって駆動される細菌相同組換えを用いるVELOCI GENE(登録商標)遺伝子工学法(上記)の使用により、すべての置換においてこのおよび後続の接合部の正確なヌクレオチド位置が実現可能であった。このようにして、近位接合部を最後のJ_H遺伝子セグメントから約200bp下流に配置し、遠位接合部を、ヒト遺伝子座の最も5'側のV_H遺伝子セグメントの数百上流、かつJ558.55としても公知のマウスV_H1-86遺伝子セグメントから約9kb下流に配置した。前記マウスV_H1-86(J558.55)遺伝子セグメントは最遠位重鎖可変遺伝子セグメントであり、このセグメントは、C57BL/6マウスでは偽遺伝子であるが、標的129対立遺伝子において不十分なRSS配列であるにもかかわらず潜在的に活性であると報告されている。前記マウス重鎖遺伝子座の遠位端は、報告によれば、遺伝子座発現および/または再構成を調節する制御要素を含有し得る(Pawlitzyら、2006)。

【0287】

ヒト免疫グロブリンDNA配列のマウスへの第一の挿入は、約75kbのマウスホモロジーアームを使用して、3つのV_H、27すべてのD_Hおよび9つのJ_Hヒト遺伝子セグ

メントを含有するヒト重鎖遺伝子座の144 kbの近位端をマウスIgH遺伝子座の近位端に挿入し、相伴って16.6 kbのマウスゲノムを欠失させることによって達成した（工程A、図2A；表1および3、3hV_H）。この大きな144 kb挿入および随伴する16.6 kb欠失を単一の工程（工程A）で行い、この工程は0.2%の頻度で行われた（表3）。欠失マウス配列内のおよび欠失マウス配列に隣接するプローブならびに挿入ヒト配列内のプローブを使用する天然対立遺伝子の喪失（loss-of-native-allele：LONA）アッセイ（Valenzuelaら、2003）により、正しくターゲティングされたES細胞にスコアを付けし、全挿入にわたって複数のプローブを使用して大きなヒト挿入物の完全性を検証した（図3A、3Bおよび3C）。多ラウンドの逐次的ES細胞ターゲティングが予想されたので、この工程およびすべての後続の工程で標的ES細胞クローンを核型分析（上記）に付し、20のうち少なくとも17のスプレッドにおいて正常な核型を示すクローンのみを後続の工程に用いた。

【0288】

工程Aからの標的ES細胞をBACvecで再ターゲティングし、それにより、重鎖遺伝子座の遠位端に19 kb欠失を生じさせた（工程B、図2A）。工程BのBACvecは、工程AのBACvecに含有されているネオマイシン耐性遺伝子（neo）とは対照的にハイグロマイシン耐性遺伝子（hyg）を含有した。これら2つのBACvecからの耐性遺伝子は、同じ染色体へのターゲティング成功により、該2つの耐性遺伝子ばかりでなくV_H1-86以外のすべてのマウスV_H遺伝子セグメントおよびDQ52以外のすべてのD_H遺伝子セグメントを含有するおよそ3 Mbのマウス重鎖可変遺伝子遺伝子座をloxP部位に隣接させるように、ならびにDQ52およびすべてのマウスJ_H鎖遺伝子セグメントが工程Aにおいて欠失されるように設計した。同じ染色体上に二重にターゲティングされたES細胞クローンを、3hV_H近位カセットを高G418においてホモ接合性にさせること（Mortensenら、1992、Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct、Mol Cell Biol 12:2391-2395）および遠位hygカセットの運命を追跡することによって同定した。loxP部位が隣接するような手法で改変された4 Mb以下のサイズのマウスセグメントは、薬剤選択不在の場合でさえ、高効率（約11%以下）でのCREリコンビナーゼの一過的発現によりES細胞において首尾よく欠失した（Zhengら、2000、Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications、Mol Cell Biol 20:648-655）。同様の手法で、本発明者らは、一過的CRE発現後に8%のES細胞クローンにおいて3 Mb欠失を実現した（工程C、図2A、表3）。欠失マウス配列のいずれかの末端におけるプローブ、ならびにneoおよびhygの喪失、および唯一残存するloxP部位を含有する欠失点にわたるPCR産物の出現を用いるLONAアッセイによって欠失にスコアを付けた。さらに、蛍光in situハイブリダイゼーションによって欠失を確認した（データを示さない）。

【0289】

各工程が210 kb以下のヒト遺伝子配列の正確な挿入を含む、VELOCIGENE（登録商標）遺伝子工学法を用いる一連の5工程（工程E～H、図2B）で、ヒト重鎖可変領域の残部を3hV_H対立遺伝子に付加させた。各工程について、各新たなBACvecの近位端を前の工程の最遠位ヒト配列とオーバーラップするように設計し、各新たなBACvecの遠位端は、工程Aにおいて使用したのと同じ遠位マウス相同領域を含有した。工程D、FおよびHのBACvecはneo選択カセットを含有したが、工程EおよびGのものは、hyg選択カセットを含有し、したがって、G418とハイグロマイシンの間で交互に選択した。工程Dにおけるターゲティングを、3hV_Hハイブリッド対立遺伝子の遠位loxP部位にわたるユニークなPCR産物の喪失によってアッセイした。工程EからIについてのターゲティングは、前の選択カセットの喪失によってアッセイした。最後の工程（工程I、図2B）では、Frt部位（McLeodら、1986、Iden

tification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle、Mol Cell Biol 6:3357-3367) が隣接する neo 選択カセットを、一過的 FLP 発現 (Buchholz ら、1998、Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis、Nat Biotechnol 16:657-662) によって除去した。工程 D、E および G についての BAC vec のヒト配列は、2 つの親ヒト BAC 各々に由来したが、工程 F および H からのヒト配列は、単一の BAC からのものであった。挿入ヒト配列にわたって複数のプローブを使用して、ヒト配列の保持を工程ごとに確認した (上記したとおり、例えば図 3 A、3 B および 3 C)。各工程で、正常な核型および生殖細胞系の潜在力を有するクローンのみを次の工程に進めた。最後の工程からの ES 細胞は、9 種の逐次的操作 (表 3) の後、依然として生殖細胞系に寄与することができた。重鎖対立遺伝子の各々についてホモ接合性のマウスは、生育可能であり、健常であるように見え、および本質的に野生型の体液性免疫系を実証した (実施例 3 参照)。

10

【0290】

【表 3】

表3

ハイブリッド 対立遺伝子	ヒト 配列	ターゲティング 構築物	ターゲティング 効率	% 使用 量	総 V _H	機能的 V _H
3hV _H	144 kb	240 kb	0.2%	5	3	3
3hV _H /DC	144 kb	110 kb	0.1%	5	3	3
3hV _H -CRE	144 kb	—	8%	5	3	3
18hV _H	340 kb	272 kb	0.1%	25	18	12
39hV _H	550 kb	282 kb	0.2%	60	39	25
53hV _H	655 kb	186 kb	0.4%	65	53	29
70hV _H	850 kb	238 kb	0.5%	90	70	39
80hV _H	940 kb	124 kb	0.2%	100	80	43
80hV _H dNeo	940 kb	—	2.6%	100	80	43

免疫グロブリンκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座。重鎖のものに類似した手法で、すべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントを含有する約3Mbのマウス配列を、近位ヒトVκおよびJκ遺伝子セグメントを含有する約0.5Mbのヒト配列で直接置換することにより、8工程の逐次的工程でκ軽鎖可変領域をヒト化した（図1B；表2および4）。

【0291】

ヒトκ軽鎖遺伝子座の可変領域は、800kbスペーサーによって隔てられた2つのほぼ同一の400kbリピートを含有する（Weichholdら、1993、The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity、Genomics 16:503-511）。これらのリピートは非常に類似しているので、近位リピートを使用することによりマウスにおいて

ほぼすべての遺伝子座多様性を再現することができる。さらに、遠位リピートを欠くκ軽鎖遺伝子座の天然ヒト対立遺伝子が報告されている（Schaiableら、1993、The immunoglobulin kappa locus: polymorphism and haplotypes of Caucasoid and non-Caucasoid individuals、Hum Genet 91:261-267）。本発明者らは、約3Mbのマウスκ軽鎖可変遺伝子配列を約0.5Mbのヒトκ軽鎖可変遺伝子配列で置換して、すべてのマウスVκおよびJκ遺伝子セグメントを近位ヒトVκおよびすべてのヒトJκ遺伝子セグメントで有効に置換した（図2Cおよび2D；表2および4）。重鎖遺伝子座について実施例1において記載する方法とは対照的に、任意のヒト配列を付加する前に3工程のプロセスですべてのVκおよびJκ遺伝子セグメントを含有する全マウスVκ遺伝子領域を欠失させた。最初、neoカセットを可変領域の近位端に導入した（工程A、図2C）。次に、hygカセットをκ遺伝子座の遠位端に挿入した（工程B、図2C）。残存する3MbのマウスVκ領域と共に両方の耐性遺伝子の欠失がCRE処理により誘導されるように、リコンビナーゼ認識部位（例えば、loxP）を各選択カセットの中に再び置いた（工程C、図2C）。

【0292】

重鎖について用いた方法（実施例1参照）に類似した方法を用いて、150kb以下のヒト免疫グロブリンκ軽鎖配列を1工程で挿入して、免疫グロブリンκ軽鎖可変領域を含有する約480kbサイズのヒトゲノム断片を4工程の逐次的工程（図2D；表2および4）で挿入した。最後のハイグロマイシン耐性遺伝子を一過的FLPe発現によって除去した。重鎖と同様に、いずれの工程後にも、標的ES細胞クローンを全ヒト挿入物の完全性、正常な核型および生殖細胞系の潜在性について評価した。κ軽鎖対立遺伝子の各々についてホモ接合性のマウスが産生され、健常であることおよび正常な外観のものであることが判明した。

【0293】

【表4】

表4

ハイブリッド 対立遺伝子	ヒト 配列	ターゲティング 構築物		使 用 量	総 Vκ	機能的 Vκ
		ターゲティング 構築物	ターゲティング 効率			
Igκ-PC	0	132 kb	1.1%	-	-	-
Igκ-PC/DC	0	90 kb	0.4%	-	-	-
Igκ-CRE	0	-	1%	-	-	-
6hVκ	110 kb	122 kb	0.3%	14	6	4
16hVκ	240 kb	203 kb	0.4%	47	16	11
30hVκ	390 kb	193 kb	0.1%	70	30	18
40hVκ	480 kb	185 kb	0.2%	100	40	25
40hVκdHyg	480 kb	-	0.7%	100	40	25

実施例 2

複数のヒト化免疫グロブリン対立遺伝子の組み合わせによる完全ヒト化マウスの産生
幾つかの箇所に、実施例1に記載したようなヒト免疫グロブリン重鎖またはκ軽鎖可変
レパートリーの一部を保有するES細胞を微量注射し、得られたマウスを交配させて、

ヒト生殖細胞系免疫グロブリンレパートリーの徐々に大きな断片 (fraction) を有する VELOCIMMUNE (登録商標) マウスの複数のバージョンを生み出した (表 5 ; 図 5 A および 5 B)。VELOCIMMUNE (登録商標) 1 (V1) マウスは、18 のヒト V_H 遺伝子セグメントおよびすべてのヒト D_H および J_H 遺伝子セグメントを、16 のヒト V_K 遺伝子セグメントおよびすべてのヒト K 遺伝子セグメントと併せて有する。VELOCIMMUNE (登録商標) 2 (V2) および VELOCIMMUNE (登録商標) (V3) マウスは、合計 39 の V_H および 30 の V_K および 80 の V_H および 40 の V_K をそれぞれ保有する増加した可変レパートリーを有する。マウス V_H 、 D_H および J_H 遺伝子セグメント、ならびに V_K および J_K 遺伝子セグメントをコードするゲノム領域は完全に置換されたたていたので、すべてのバージョンの VELOCIMMUNE (登録商標) マウスにより産生される抗体が、マウス定常領域に連結されたヒト可変領域を含有する。マウス λ 軽鎖遺伝子座は、VELOCIMMUNE (登録商標) マウスの様々な実施形態においてインタクトなままであり、様々な VELOCIMMUNE (登録商標) κ 軽鎖遺伝子座の発現効率についてのコンパレータとして役立つ。

【0294】

免疫グロブリン重鎖および κ 軽鎖両方のヒト化について二重にホモ接合性のマウスを、実施例 1 で記載した対立遺伝子のサブセットから産生させた。二重ホモ接合型マウスを産生するための交配コースの間に観察されたすべての遺伝子型は、大体メンデル比で発生した。ヒト重鎖対立遺伝子の各々についてホモ接合性の雄後代は、妊性低減を実証し、これはマウス ADAM6 活性の喪失に起因した。マウス重鎖可変遺伝子遺伝子座は、2 つのはめ込んだ機能的 ADAM6 遺伝子 (ADAM6 a および ADAM6 b) を含有する。マウス重鎖可変遺伝子遺伝子座のヒト化の間、挿入されたヒトゲノム配列は、ADAM6 偽遺伝子を含有した。マウス ADAM6 は、妊性に要求され得、それ故、ヒト偽遺伝子の存在にもかかわらずヒト化重鎖可変遺伝子遺伝子座におけるマウス ADAM6 遺伝子の欠如が妊性の低減をもたらした可能性がある。実施例 7 ~ 11 は、マウス ADAM6 遺伝子のヒト化重鎖可変遺伝子遺伝子座へのリエンジニアリング、およびヒト化重鎖免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスにおける野生型レベルの妊性の回復を記載する。

【0295】

【表 5】

表5

VELOCIMMUNE (登録商標) マウスのバージョン	重鎖			κ 軽鎖		
	ヒト	対立遺	5' V_H	ヒト	対立遺	5' V_K
	V_H	伝子	遺伝子	V_K	伝子	遺伝子
V1	18	18h V_H	V_H1-18	16	16h V_K	V_K1-16
V2	39	39h V_H	V_H4-39	30	30h V_K	V_K2-29
V3	80	80h V_H	V_H3-74	40	40h V_K	V_K2-40

実施例 3

ヒト化免疫グロブリン遺伝子を有するマウスにおけるリンパ球集団

3つの異なるバージョンのVELOCIMMUNE（登録商標）マウスにおける成熟B細胞集団をフローサイトメトリーによって評価した。

【0296】

簡単に言うと、標準的な方法を用いて、骨髄、脾臓および胸腺からの細胞懸濁液を作製した。BD Pharmingen FACS染色緩衝液中 5×10^5 細胞/mLで細胞を再懸濁させ、抗マウスCD16/32（BD Pharmingen）でブロックし、適切な抗体カクテルで染色し、BD CYTOFIX（商標）で固定し、これらの作業はすべて製造業者の指示に従って行った。最終細胞ペレットを0.5mL染色緩衝液に再懸濁させ、BD FACSCALIBUR（商標）およびBD CELLQUEST PRO（商標）ソフトウェアを使用して分析した。すべての抗体（BD Pharmingen）を質量希釈／カクテルで調製し、0.5mg/ 10^5 細胞の最終濃度まで添加した。

10

【0297】

骨髄（A～D）染色用の抗体カクテルは、次のとおりであった：A：抗マウスIgM^b-FITC、抗マウスIgM^a-PE、抗マウスCD45R（B220）-APC；B：抗マウスCD43（S7）-PE、抗マウスCD45R（B220）-APC；C：抗マウスCD24（HSA）-PE；抗マウスCD45R（B220）-APC；D：抗マウスBP-1-PE、抗マウスCD45R（B220）-APC。

【0298】

脾臓および鼠蹊リンパ節（E～H）染色用の抗体カクテルは、次のとおりであった：E：抗マウスIgM^b-FITC、抗マウスIgM^a-PE、抗マウスCD45R（B220）-APC；F：抗マウスIg λ 1、 λ 2、 λ 3軽鎖-FITC、抗マウスIg κ 軽鎖-PE、抗マウスCD45R（B220）-APC；G：抗マウスLy6G/C-FITC、抗マウスCD49b（DX5）-PE、抗マウスCD11b-APC；H：抗マウスCD4（L3T4）-FITC、抗マウスCD45R（B220）-PE、抗マウスCD8a-APC。結果を図6に示す。

20

【0299】

ホモ接合型VELOCIMMUNE（登録商標）マウスの脾臓またはリンパ節から単離したリンパ球をマーカーB220およびIgMの表面発現について染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した（図6）。試験したすべてのバージョンのVELOCIMMUNE（登録商標）マウスにおけるB220⁺IgM⁺成熟B細胞集団のサイズは、それらが含有するV_H遺伝子セグメントの数にかかわらず、実質的に野生型マウスのものと同一であった。加えて、ホモ接合性ハイブリッドヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有するマウスも、正常マウス免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子座を有するが3つしかV_H遺伝子セグメントを有さないマウス、またはホモ接合性ハイブリッドヒト化 κ 軽鎖と正常マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座を含有するマウスでさえも、その末梢区画に正常な数のB220⁺IgM⁺細胞を有した（示さず）。これらの結果は、ヒト可変遺伝子セグメントおよびマウス定常領域を有するキメラ遺伝子座が、成熟B細胞区画に十分に集合できることを示している。さらに、重鎖または κ 軽鎖遺伝子座のいずれかにおける可変遺伝子セグメントの数、およびしたがって抗体レパートリーの理論的多様性は、成熟B細胞の野生型集団を産生する能力と相関しない。対照的に、ランダムに組み込まれた完全ヒト免疫グロブリン導入遺伝子および不活性化マウス免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスは、これらの区画に低減数のB細胞を有し、その欠損の重度は、導入遺伝子に含まれている可変遺伝子セグメントの数に依存する（GreenおよびJakobovits、1998、Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes、J Exp Med 188：483-495）。これは、「in situ遺伝子ヒト化」戦略が、「ノックアウト・プラス・トランスジェニック」アプローチで実現されるランダムに組み込まれる導入遺伝子とは基本的に異なる機

30

40

50

能的帰結をもたらす結果となることの証拠となる。

【0300】

対立遺伝子排除および遺伝子座選択

対立遺伝子排除を維持する能力を、異なるバージョンのヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性のマウスで調査した。

【0301】

129S6/SvEvTacおよびC57BL/6NTacヘテロ接合胚に由来するF1 ES系列(F1H4、Valenzuelaら、2003)で免疫グロブリン遺伝子座のヒト化を行った。ヒト重鎖生殖細胞系可変遺伝子配列を129S6対立遺伝子にターゲットングする。この対立遺伝子はIgM^aハプロタイプを保有するが、未改変マウスC57BL/6N対立遺伝子はIgM^bハプロタイプを有する。IgMのこれらの対立遺伝子形態は、IgM^aまたはIgM^b対立遺伝子において見出される多型に特異的な抗体を使用してフローサイトメトリーにより区別することができる。図6(最下段)に示されているように、各バージョンのヒト化重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性のマウスにおいて同定されたB細胞は、単一の対立遺伝子、IgM^a(ヒト化対立遺伝子)またはIgM^b(野生型対立遺伝子)のいずれか、しか発現しない。これは、対立遺伝子排除に関する機序が、VELOCIIMMUNE(登録商標)マウスにおいてインタクトであることの証拠となる。加えて、ヒト化対立遺伝子(IgM^a)について陽性のB細胞の相対数は、存在するV_H遺伝子セグメントの数に大体比例する。ヒト化免疫グロブリン遺伝子座は、18のヒトV_H遺伝子セグメントを有するVELOCIIMMUNE(登録商標)1ヘテロ接合体マウスではB細胞のおおよそ30%において発現し、ならびに39および80のヒトV_H遺伝子セグメントをそれぞれ有するVELOCIIMMUNE(登録商標)2および3(示さず)ヘテロ接合体マウスではB細胞の50%において発現する。注目に値することとして、ヒト化マウス対立遺伝子を発現する細胞の、野生型マウス対立遺伝子を発現する細胞に対する比(VELOCIIMMUNE(登録商標)1マウスについては0.5およびVELOCIIMMUNE(登録商標)2マウスについては0.9)は、ヒト化遺伝子座に含有される可変遺伝子セグメント数の、野生型遺伝子座に含有される可変遺伝子セグメントの数に対する比(VELOCIIMMUNE(登録商標)1マウスについては0.2およびVELOCIIMMUNE(登録商標)2マウスについては0.4)より大きい。これは、対立遺伝子選択の確率が、1つもしくは他の染色体のランダム選択と任意の特定のVセグメントRSSのランダム選択の間の中間であることを示している。さらに、一方の対立遺伝子が組み換えに利用できるようになり、その過程を完了し、組換えを遮断し、その後、他方の対立遺伝子が利用能になるB細胞が、すべてではないが、一部存在し得る。加えて、ハイブリッドヒト化重鎖遺伝子座または野生型マウス重鎖遺伝子座のいずれかに由来する表面IgM(sIgM)を有する細胞の様な分布は、該ハイブリッド遺伝子座が正常レベルで動作している証拠である。対照的に、ランダムに組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、野生型マウス免疫グロブリン遺伝子座との競合が不十分である(Bruggemannら、1989、A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice、PNAS 86:6709-6713; Greenら、1994; Tuailonら、1993、Human immunoglobulin heavy-chain minilocus recombination in transgenic mice: gene-segment use in mu and gamma transcripts、PNAS USA 90:3720-3724)。これは、さらに、VELOCIIMMUNE(登録商標)マウスによって産生される免疫グロブリンが、「ノックアウト・プラス・トランスジェニック」アプローチによって作製されるマウスにおけるランダムに組み込まれた導入遺伝子によって産生されるものとは機能的に異なることの証拠となる。

【0302】

129S6またはC57BL/6Nでは、非ヒト化κ軽鎖遺伝子座に対するヒト化κ軽

10

20

30

40

50

鎖遺伝子座の対立遺伝子排除の調査にC κ 領域の多型を利用できない。しかし、VELOCIIMMUNE（登録商標）マウスすべてが野生型マウス λ 軽鎖遺伝子座を有するので、ヒト化 κ 軽鎖遺伝子座の再構成および発現がマウス λ 軽鎖発現を防止できるかどうかを観察することが可能である。マウス λ 軽鎖を発現する細胞の数に対するヒト化 κ 軽鎖を発現する細胞の数の比は、 κ 軽鎖遺伝子座に挿入されたヒトV κ 遺伝子セグメントの数にかかわらず、VELOCIIMMUNE（登録商標）マウスでは野生型マウスと比べて比較的不変であった（図6、上から三段目）。加えて、二重陽性（ $\kappa + \lambda$ ）細胞数の増加は無く、このことから、ハイブリッド κ 軽鎖遺伝子座での生産的組換えが、マウス λ 軽鎖遺伝子座の組換えの適切な抑制をもたらす結果となることが示された。対照的に、ランダムに組み込まれた κ 軽鎖導入遺伝子と一野生型マウス λ 軽鎖遺伝子座ではなく一不活性化されたマウス κ 軽鎖遺伝子座を含有するマウスは、 λ / κ 比の劇的増大を示す（Jacobovits、1998）。これは、導入された κ 軽鎖導入遺伝子が、かかるマウスでは十分に機能しないことを意味する。これは、さらに、「ノックアウト・プラス・トランスジェニック」マウスによって作製されるものと比較してVELOCIIMMUNE（登録商標）マウスによって作製される免疫グロブリンにおいて観察される異なる機能的帰結の証拠となる。

10

【0303】

B細胞発生。VELOCIIMMUNE（登録商標）マウスにおける成熟B細胞集団は、（上に記載したように）野生型マウスのものと似ているため、早期B細胞分化の欠陥を成熟B細胞集団の増殖によって補償することが可能である。フローサイトメトリーを用いてB細胞集団を分析することによって、様々なB細胞分化段階を調査した。表6は、特定の細胞表面マーカーを使用して、野生型同腹子と比較したVELOCIIMMUNE（登録商標）マウスにおける、FACにより定義した各B細胞系列の細胞の画分の比を示すものである。

20

【0304】

早期B細胞発生は骨髄で起こり、異なるB細胞分化段階は、細胞表面マーカー発現のタイプおよび量の変化によって特徴づけられる。これらの表面発現における差異は、細胞内部の免疫グロブリン遺伝子座で起こる分子の変化と相関する。プロB細胞からプレB細胞への移行には機能的重鎖タンパク質の再構成および発現の成功が必要であるが、プレBから成熟B期への移行は、 κ または λ 軽鎖の正しい再構成および発現によって支配される。したがって、B細胞分化段階間の非効率的移行は、所与の段階のB細胞の関連集団の変化によって検出することができる。

30

【0305】

【表 6】

表6

VELOCIMMUNE (登録商標) マウスのバージョン	骨髄				脾臓	
	プロB	プレB	未熟	成熟	出現	成熟
	CD43 ^{hi}	CD24 ^{hi}	B220 ^{lo}	B220 ^{hi}	B220 ^{hi}	B220 ^{hi}
	B220 ^{lo}	B220 ^{lo}	IgM ⁺	IgM ⁺	IgM ⁺	IgM ⁺
					IgD ⁺	
V1	1.1	1.0	0.9	1.0	1.1	1.0
V2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
V3	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1

10

いずれの V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスにおいても B 細胞分化に大きな欠陥は認められなかった。V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスにおいて、ヒト重鎖遺伝子セグメントの導入はプロ B からプレ B への移行に影響を及ぼすようには見えず、またヒト κ 軽鎖遺伝子セグメントの導入はプレ B から B への移行に影響を及ぼさない。これは、ヒト可変領域およびマウス定常領域 (c o n s t a n t) を保有する「逆キメラ」免疫グロブリン分子が、B 細胞シグナル伝達および共受容体分子に関連して正常に機能して、マウス環境で適切な B 細胞分化をもたらすことを実証している。対照的に、ランダムに組み込まれた免疫グロブリン導入遺伝子および不活性化された内因性重鎖または κ 軽鎖遺伝子座を含有するマウスでは、B 細胞分化中の異なる集団間のバランスが様々な程度に摂動される (G r e e n および J a k o b o v i t s 、 1 9 9 8) 。

20

【0306】

30

実施例 4

ヒト化免疫グロブリンマウスにおける可変遺伝子レパートリー

脾細胞およびハイブリドーマ細胞を含む複数の源からのヒト可変領域の逆転写酵素・ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) により、V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスのヒト化抗体レパートリーにおけるヒト可変遺伝子セグメントの使用量を分析した。可変領域配列、遺伝子セグメント使用量、体細胞超変異、および再構成可変領域遺伝子セグメントの接合部多様性を決定した。

【0307】

簡単に言うと、T R I Z O L (商標) (I n v i t r o g e n) または Q i a g e n R N E A S Y (商標) M i n i K i t (Q i a g e n) を使用して $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 脾細胞または約 $10^4 \sim 10^5$ ハイブリドーマ細胞から全 RNA を抽出し、S U P E R S C R I P T (商標) I I I O n e - S t e p R T - P C R システム (I n v i t r o g e n) を使用してマウス定常領域特異的プライマーでプライミングした。重鎖と κ 軽鎖の両方についてのヒト可変領域の各ファミリーのためのプールされたリーダープライマーとペアで上述の 3' 定常特異的プライマーを個々に使用して、各試料からの 2 ~ 5 μ L の RNA を用いて反応を行った。試薬およびプライマーの容量、および R T - P C R / P C R 条件は、製造業者の指示に従って行った。プライマー配列は、複数の源の基づいた (W a n g および S t o l l a r 、 2 0 0 0 、 H u m a n i m m u n o g l o b u l i n v a r i a b l e r e g i o n g e n e a n a l y s i s b y s i n g l e c e l l R T - P C R 、 J I m m u n o l M e t h o d s 2 4 4 : 2 1 7 -

40

50

225; Ig-primer sets, Novagen)。適宜、プールされたファミリー特異的フレームワークプライマーと第一の反応で使ったのと同じマウス3'免疫グロブリン定常特異的プライマーとを用いて第二のネステッドPCR反応を行った。各反応からのアリコート(5 μ L)をアガロース電気泳動によって分析し、MONTAGE(商標)Gel Extraction Kit(Millipore)を使用してアガロースから反応生成物を精製した。TOPO(商標)TA Cloning System(Invitrogen)を使用して精製生成物をクローニングし、エレクトロポレーションによりDH10 β 大腸菌(E. coli)細胞に形質転換した。各形質転換反応から個々のクローンを選択し、2mLのLBブロス培養液(LB broth culture)中で抗生物質選択しながら一晩37 $^{\circ}$ Cで成長させた。キットベースアプローチ(Qiagen)により細菌培養物からプラスミドDNAを精製した。

【0308】

免疫グロブリン可変遺伝子の使用量。ABI 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて、重鎖クローンと κ 軽鎖クローン両方のプラスミドDNAをT7リバースプライマーまたはM13リバースプライマーのいずれかで配列決定した。生配列データをSEQUENCHER(商標)(v4.5、Gene Codes)にインポートした。各配列をコンティグに組み立て、IMGT V-Quest(Brochetら、2008、IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis、Nucleic Acids Res 36:W503-508)検索機能を用いてヒト免疫グロブリン配列にアラインして、ヒトV_H、D_H、J_HおよびV κ 、J κ セグメント使用量を同定した。体細胞超変異および組換え接合部分析のために配列を生殖細胞系配列と比較した。

【0309】

RAG相補性(Chenら、1993、RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development、PNAS USA 90:4528-4532)による最初の重鎖改変(3hV_H-CREハイブリッド対立遺伝子、図2Aの最下部)を含有するES細胞からマウスを産生させ、脾細胞RNAからcDNAを調製した。挿入されたヒト遺伝子セグメント内でのV(D)J組換えおよびその後のマウスIgM定常ドメインまたはIgG定常ドメインのいずれかへのスプライシングによって生ずることになる予測キメラ重鎖mRNAに特異的なプライマーセット(上記)を使用して、そのcDNAを増幅させた。これらのcDNAクローンに由来する配列(示さず)は、正しいV(D)J組換えがヒト可変遺伝子配列内で発生したこと、再構成されたヒトV(D)J遺伝子セグメントがインフレームでマウス定常ドメインへと正しくスプライシングしたこと、およびクラススイッチ組換えが発生したことを実証した。後続のハイブリッド免疫グロブリン遺伝子座のmRNA産物のさらなる配列分析を行った。

【0310】

同様の実験で、免疫していない野生型およびVELOCIMMUNE(登録商標)マウスからのB細胞をフローサイトメトリーによりB220およびIgMまたはIgGの表面発現に基づいて分離した。B220⁺IgM⁺または表面IgG⁺(sIgG⁺)細胞をプールし、RT-PCR増幅およびクローニング(上記)の後にV_HおよびV κ 配列を得た。非免疫VELOCIMMUNE(登録商標)1マウス(表7)およびVELOCIMMUNE(登録商標)3マウス(表8)からの1セットのRT-PCR増幅cDNAにおける代表的な遺伝子使用量を記録した(*不完全RSS(defective RSS); †欠けているか偽遺伝子)。アステリスク:不完全RSSを有する遺伝子セグメント。†:遺伝子セグメントが欠けているまたは偽遺伝子である。

【0311】

【表 7－1】

表7

V _H 実測		D _H 実測		V _K 実測	
1-18	3	1-1	1	1-16	2
1-17P	0	2-2	2	3-15	1
3-16*	0	3-3	4	1-12	5
3-15	13	4-4	0	3-11	1
3-13	9	5-5	0	1-9	5
3-11	6	5-18	4	1-8	2
3-9	8	6-6	5	3-7*	0
1-8	6	1-7	7	1-6	5
3-7	2	2-8	0	1-5	8
2-5	2	3-9	4	5-2	6
1-3	0	3-10	2	4-1	8
1-2	11	4-11	1		
6-1	5	5-12	1		
				J _K 実測	

【 0 3 1 2 】

10

20

【表 7－2】

J _H 実測		6-13	3	1	12
1	2	1-14	0	2	10
2	1	2-15	0	3	5
3	8	3-16	1	4	10
4	33	4-17	0	5	0
5	5	6-19	2		
6	16	1-20	2		
		2-21	1		
		3-22	0		
		4-23	2		
		5-24	1		
		6-25	1		
		1-26	6		
		7-27	10		

10

20

【 0 3 1 3 】

【表 8 - 1】

表8

V _H	実測	D _H	実測	V _K	実測
7-81†	0	1-1	7	2-40	1
3-74†	0	2-2	8	1-39	34
3-73	1	3-3	9	1-37	2
3-72	2	4-4	4	1-33	35
2-70	2	5-5	6	2-30	8
1-69	3	5-18	6	2-29	2
3-66	1	6-6	29	2-28	7
3-64	1	1-7	30	1-27	5
4-61	1	2-8	4	2-24	7
4-59	10	3-9	8	6-21*	3
1-58	0	3-10	10	3-20	10
3-53	0	4-11	4	1-17	13
5-51	5	5-12	5	1-16	10
3-49	2	6-13	17	3-15	13
3-48	7	1-14	2	1-12	13
1-46	1	2-15	3	3-11	13
1-45	0	3-16	4	1-9	11
3-43	10	4-17	3	1-8	1
4-39	4	6-19	8	3-7*	0
3-38*	0	1-20	3	1-6	6
3-35*	0	2-21	1	1-5	7
4-34	8	3-22	5	5-2	0
3-33	14	4-23	2	4-1	21
4-31	4	5-24	2		
3-30	13	6-25	2	J _K	実測

10

20

30

40

【 0 3 1 4 】

【表 8 - 2】

4-28	0	1-26	17	1	50
2-26	0	7-27	7	2	37
1-24	3	J _H 実測			
3-23	18				
3-21	0				
3-20	0				
1-18	4				
1-17P	1	1	2	3	28
3-16*	0	2	8	4	64
3-15	13	3	26	5	22
3-13	6	4	95	6	
3-11	5	5	11		
3-9	31	6	58		
1-8	7				
3-7	11				
2-5	1				
1-3	0				
1-2	6				
6-1	9				

10

20

30

表 7 および 8 に示したように、機能的ヒト V_H、D_H、J_H、V_K および J_K 遺伝子セグメントのほぼすべてが利用される。この実験の VELOCIMMUNE（登録商標）マウスでは検出されなかったが記載した機能的可変遺伝子セグメントのうちの幾つかは、不完全組換えシグナル配列（RSS）を保有すると報告されており、それ故、発現することは期待されないことになる（Feeney、2000、Factors that influence formation of B cell repertoire、Immunol Res 21:195-202）。ナイーブレパートリーと免疫レパートリーの両方から単離された、様々な VELOCIMMUNE（登録商標）マウスからの免疫グロブリン配列の幾つかの他のセットの分析は、これらの遺伝子セグメントの使用量を、より低い頻度においてではあるが示した（データを示さない）。集合体遺伝子使用量データは、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスが含有するすべての機能的ヒト V_H、D_H、J_H、V_K および J_K 遺伝子セグメントが、様々なナイーブおよび免疫レパートリーにおいて観察されることを示した（データを示さない）。ヒト V_H 7-81 遺伝子セグメントは、ヒト重鎖遺伝子座配列の分析で同定されている（Matsudaら、1998、The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus、J Exp Med 188:2151-2162）が、全 VELOCIMMUNE（登録商標）3 マウスゲノムの再配列決定により確認し

40

50

たところ、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスには存在しない。

【0315】

抗体の重および軽鎖の配列が、特に再構成可変ドメイン内の短鎖ポリペプチドセグメントにおいて、例外的な可変性を示すことは公知である。これらの領域は、超可変領域または相補性決定領域（C D R）として公知であり、抗体分子の構造内に抗原の結合部位を作る。介在ポリペプチド配列は、フレームワーク領域（F R）と呼ばれる。重鎖と軽鎖の両方に3つのC D R（C D R 1、C D R 2、C D R 3）および4つのF R（F R 1、F R 2、F R 3、F R 4）がある。1つのC D R、C D R 3、は、このC D RがV_H、D_HおよびJ_H遺伝子セグメントとV_κおよびJ_κ遺伝子セグメントの両方の組換えによって作られ、抗原と遭遇する前に相当量のレパートリー多様性を生じさせる点でユニークである。この接合は、エキソヌクレアーゼ活性によるヌクレオチド欠失と末端デオキシヌクレオチデルトランスフェラーゼ（T d T）による非テンプレートコード付加（n o n - t e m p l a t e e n c o d e d a d d i t i o n）の両方のため正確ではなく、それ故、組換え過程の結果として新規配列を可能とする。F Rは、全体としては可変領域の高い変異性のため実質的な体細胞変異を示すことができるが、しかし、可変性は、可変領域全域に均等に分布されない。C D Rは、抗原結合を可能にする、抗体分子の表面に集中および局在する高可変領域である。接合部多様性を実証する、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスからの選択された抗体のC D R 3接合部周囲の重鎖および軽鎖配列を、図7 Aおよび7 Bにそれぞれ示す。

10

【0316】

図7 Aに示すように、非テンプレートコードヌクレオチド付加（N-付加）が、V E L O C I M M U N E（登録商標）マウスからの抗体におけるV_H-D_H接合とD_H-J_H接合の両方において認められ、これは、ヒトセグメントに関するT d Tの正しい機能を示している。V_H、D_HおよびJ_Hセグメントの、該セグメントの生殖細胞系カウンターパートと比較しての終点は、エンドヌクレアーゼ活性も発生したことを示している。重鎖遺伝子座とは異なり、ヒトκ軽鎖再構成は、V_κおよびJ_κセグメントの組換えによって形成されるC D R 3でのT d T付加が殆どまたは全く示さない（図7 B）。これは、プレB細胞からB細胞への移行のときの軽鎖再構成中にマウスにおけるT d T発現の欠如に起因すると予想される。再構成ヒトV_κ領域のC D R 3で観察される多様性は、主として、組換え事象中にエキソヌクレアーゼ活性によって導入される。

20

30

【0317】

体細胞超変異。体細胞超変異と呼ばれるプロセスにより、胚中心反応中に再構成免疫グロブリン遺伝子の可変領域にさらなる多様性が加えられる。体細胞変異可変領域を発現するB細胞は、濾胞樹状細胞によって提示される抗原への接近について他のB細胞と競合する。抗原に対してより高い親和性を有するこれらのB細胞は、末梢へと出ていく前にさらに増殖し、クラススイッチされる。それ故、スイッチされたアイソタイプを発現するB細胞は、典型的に抗原に遭遇し、胚中心反応を経たものであり、ナイーブB細胞に比べて増加した変異数を有する。さらに、主としてナイーブs I g M⁺B細胞からの可変領域配列は、抗原選択を受けたs I g G⁺B細胞からの可変配列より相対的に少ない変異を有すると予想されよう。

40

【0318】

免疫していないV E L O C I M M U N E（登録商標）マウスからのs I g M⁺もしくはs I g G⁺B細胞または免疫したマウスからのs I g G⁺B細胞からの、ランダムV_HまたはV_κクローンからの配列を、その生殖細胞系可変遺伝子セグメントと比較し、生殖細胞系配列に対する変化に注釈を付けた。得られたヌクレオチド配列をコンピュータで翻訳し、アミノ酸変化をもたらす変異にも注釈を付けた。すべての可変領域からデータを照合し、所与の位置での変化率を算定した（図8）。

【0319】

図8に示すように、免疫していないV E L O C I M M U N E（登録商標）マウスからのs I g G⁺B細胞に由来するヒト重鎖可変領域は、同じ脾細胞プールからのs I g M⁺B

50

細胞に比べてより多くのヌクレオチドを示し、免疫したマウスに由来する重鎖可変領域は、さらに多くの変化を示す。変化の数は、フレームワーク領域に比べて相補性決定領域（CDR）において増えており、これは抗原選択を示す。ヒト重鎖可変領域からの対応するアミノ酸配列も、IgMに比べてIgGのほうが有意に多い変異の数、および免疫したIgGのほうがさらにいっそう多い数を示す。これらの変異もまた、フレームワーク配列と比較してCDR内においてのほうが頻度が高いようであり、これは、抗体が*in vivo*で抗原選択されたことを示唆している。ヌクレオチド変異数とアミノ酸変異数の同様の増加が、免疫したマウスからのIgG⁺B細胞に由来するVκ配列に見出される。

【0320】

VELOC IMMUNE（登録商標）マウスにおいて観察された遺伝子使用量および体細胞超変異頻度は、これらのマウスにおいて、存在する本質的にすべての遺伝子セグメントが、完全機能性逆キメラ抗体を形成するように再構成できることを実証している。さらに、VELOC IMMUNE（登録商標）抗体は、マウス免疫系内で、親和性選択および成熟に至るよう充分に関与して、その標的抗原を効果的に中和できる完全成熟ヒト抗体を作製する。VELOC IMMUNE（登録商標）マウスは、複数のクラスの抗原への頑強な免疫応答を開始することができ、その結果、高親和性でもあり治療使用に好適でもある広範なヒト抗体の利用がもたらされる（データを示さない）。

【0321】

実施例 5

リンパ系構造および血清アイソタイプの分析

H&Eで染色した野生型またはVELOC IMMUNE（登録商標）マウスからの組織試料の脾臓、鼠蹊リンパ節、バイエル板および胸腺の全体構造を光学顕微鏡法によって調査した。野生型およびVELOC IMMUNE（登録商標）マウスから採集した血清中の免疫グロブリンアイソタイプのレベルを、LUMINEX（商標）技術を用いて分析した。

【0322】

リンパ系器官構造。リンパ系組織の構造および機能は、造血細胞の正しい発生に一部依存する。B細胞発生または機能の欠陥は、リンパ系組織の構造の変化として示され得る。染色組織切片の分析により、野生型マウスとVELOC IMMUNE（登録商標）マウスの間に二次リンパ系器官の外観の有意差は特定認められなかった（データを示さない）。

【0323】

血清免疫グロブリンレベル。各アイソタイプの発現レベルは、野生型マウスとVELOC IMMUNE（登録商標）マウスで類似している（図9A、9Bおよび9C）。これは、可変遺伝子セグメントのヒト化が、クラススイッチまたは免疫グロブリン発現および分泌に明白な有害作用を及ぼさず、したがって、これらの機能に必要なすべての内因性マウス配列を明白に維持することを実証している。

【0324】

実施例 6

ヒト化免疫グロブリンマウスにおける免疫および抗体産生

異なるバージョンのVELOC IMMUNE（登録商標）マウスを抗原で免疫して、外来抗原攻撃に対する体液性応答を調査した。

【0325】

免疫およびハイブリドーマ開発。VELOC IMMUNE（登録商標）および野生型マウスをタンパク質、DNA、DNAとタンパク質の組み合わせ、または抗原を発現する細胞の形態の抗原で免疫することができる。典型的には、動物に3週間ごとに合計2から3回、追加免疫する。各抗原を追加免疫後、各動物から血清試料を採集し、血清力価決定により抗原特異的抗体応答について分析する。融合前に、必要に応じて5 μgのタンパク質またはDNAの融合前最終追加免疫を、腹腔内注射および／または静脈内注射によってマウスに施した。脾細胞を回収し、電気融合チャンバ内で製造業者の提案プロトコル（Cytoto Pulse Sciences Inc.、メリーランド州グレンバーニー）に従

ってAg 8. 6 5 3 骨髓腫細胞に融合させる。培養の10日後、ELISAアッセイ (HarlowおよびLane、1988、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press、New York) を用いてハイブリドーマを抗原特異性についてスクリーニングする。あるいは、免疫したVELOCIMMUNE (登録商標) マウスから抗原特異的B細胞を直接単離し、本明細書に記載のものを含む標準的な技術を用いてスクリーニングして、対象となる抗原に特異的なヒト抗体を得る (例えば、米国特許出願公開第2007/0280945号A1明細書参照 (この参考文献はその全体が参照により本明細書に援用されている))。

【0326】

血清力価決定。動物抗抗原血清応答をモニターするために、各追加免疫の約10日後に血清試料を採集し、抗原特異的ELISAを用いてその力価を決定する。簡単に言うと、Nunc MAXISORP (商標) 96 ウェルプレートに2 μ g/mLの抗原で一晩、4°Cで被覆し、それをウシ血清アルブミン (Sigma、ミズーリ州セントルイス) でブロッキングする。3倍希釈系列の血清試料を1時間、室温でプレートに結合させる。その後、0.05% Tween-20を含有するPBSでそのプレートを洗浄し、全IgG力価についてはHRP結合体化ヤギ抗マウスFc (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州ウエストグローヴ) をまたはアイソタイプ特異的力価についてはビオチン標識アイソタイプ特異的ポリクローナル抗体もしくは軽鎖特異的ポリクローナル抗体 (Southern Biotech Inc.) をそれぞれ使用して結合IgGを検出する。ビオチン標識抗体については、プレート洗浄後、HRP結合体化ストレプトアビジン (Pierce、イリノイ州ロックフォード) を添加する。BD OPTEDIA (商標) (BD Biosciences Pharmingen、カリフォルニア州サンディエゴ) などの比色基質を使用してすべてのプレートを顕色させる。1Mリン酸で反応を停止させた後、450nmでの光吸収を記録し、Graph PadからのPRISM (商標) ソフトウェアを使用してデータを分析する。バックグラウンドシグナルの2倍のシグナルを得るために必要な希釈度を力価と定義する。

【0327】

1つの実験では、VELOCIMMUNE (登録商標) マウスをヒトインターロイキン-6受容体 (hIL-6R) で免疫した。hIL-6Rで免疫したVELOCIMMUNE (登録商標) および野生型マウスについての血清力価の代表セットを図10Aおよび10Bに示す。

【0328】

VELOCIMMUNE (登録商標) および野生型マウスは、同様の力価範囲でIL-6Rに対する強い応答を開始した (図10A)。VELOCIMMUNE (登録商標) および野生型コホートからの数匹のマウスは、単回抗原追加免疫後に最大応答に達した。これらの結果は、この抗原に対する免疫応答強度および動態は、VELOCIMMUNE (登録商標) および野生型マウスにおいて同様であったことを示す。これらの抗原特異的抗体応答をさらに分析して、血清中で見出される抗原特異的抗体の特定のアイソタイプを調査した。VELOCIMMUNE (登録商標) 群と野生型群の両方が主としてIgG1応答を惹起した (図10B)。これは、体液性応答中のクラススイッチが各タイプのマウスにおいて同様であることを示唆している。

【0329】

溶液中の抗原への抗体結合の親和性決定。抗原に対する抗体結合親和性を決定するために、ELISAベースの溶液競合アッセイが典型的に設計される。

【0330】

簡単に言うと、順化培地中の抗体を、0から10mg/mLの範囲の抗原タンパク質の希釈系列とプレミックスする。次に、その抗体と抗原の混合物の溶液を2から4時間、室温で、結合平衡に達するまでインキュベートする。次に、その混合物中の遊離抗体の量を、定量的サンドイッチELISAを用いて測定する。PBS溶液中の1 μ g/mLの抗原

タンパク質で一晩、4℃で96ウェルMAXISORB（商標）プレート（VWR、ペンシルバニア州ウエストチェスター）を被覆し、その後、BSAでの非特異的ブロッキングを行う。次に、その抗体-抗原混合物溶液をこれらのプレートに移し、その後、1時間インキュベートする。次に、そのプレートを洗浄緩衝液で洗浄し、プレートに結合した抗体をHRP結合体化ヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体試薬（Jackson Immuno Research Lab）で検出し、BD OPTEDIA（商標）（BD Biosciences Pharmingen、カリフォルニア州サンディエゴ）などの比色基質を使用して顕色させた。1Mリン酸で反応を停止させた後、450nmでの光吸収を記録し、Graph PadからのPRISM（商標）ソフトウェアを使用してデータを分析する。溶液中の抗原の濃度に対するシグナルの依存度を4パラメータフィット分析で分析し、IC₅₀（溶液中に抗原が存在しない抗体試料からのシグナルの50%低減を達成するために必要な抗原濃度）として報告する。

【0331】

1つの実験では、VELOCIMMUNE（登録商標）マウスをhIL-6Rで免疫した（上記のとおり）。図11Aおよび11Bは、VELOCIMMUNE（登録商標）および野生型マウスからの抗hIL6R抗体についての親和性測定値の代表セットを示すものである。

【0332】

免疫したマウスに3回目の抗原追加免疫を施した後、ELISAアッセイを用いて血清力価を決定する。選択した野生型およびVELOCIMMUNE（登録商標）マウスコホートから脾細胞を単離し、Ag8.653骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを形成し、選択下で成長させた（上記のとおり）。産生された合計671の抗IL-6Rハイブリドーマのうち、236は、抗原特異的抗体を発現することが判明した。抗原陽性ウェルから回収した培地を使用して、溶液競合ELISAを用いて抗原への結合の抗体親和性を決定した。VELOCIMMUNE（登録商標）マウス由来の抗体は、溶液中の抗原への結合に関して広範な親和性を示す（図11A）。さらに、236の抗IL-6Rハイブリドーマのうちの49は、in vitro バイオアッセイにおいてIL-6の受容体への結合を遮断することが判明した（データを示さない）。さらに、これらの49の抗IL-6R遮断抗体は、野生型マウスの並行免疫に由来する遮断抗体のものと同様の範囲の高い溶液親和性を示した（図11B）。

【0333】

実施例7

マウスADAM6ターゲティングベクターの構築

マウス免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座の、ヒト免疫グロブリン重鎖可変遺伝子遺伝子座での置換のため、初期バージョンのVELOCIMMUNE（登録商標）マウスにはマウスADAM6遺伝子の発現が無い。特に、雄VELOCIMMUNE（登録商標）マウスは、妊性の低減を明らかに示す。それ故、妊性の欠陥をレスキューするために、ADAM6を発現する能力をVELOCIMMUNE（登録商標）マウスに再設計した。

【0334】

VELOCIGENE（登録商標）遺伝子工学技術（上記）を用いて、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子のヒト化重鎖遺伝子座への挿入のためのターゲティングベクターを構築して、Dr. Frederick Alt（Harvard University）から入手した細菌人工染色体（BAC）929d24を改変した。マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子を含むゲノム断片と、ヒト化重鎖遺伝子座のヒトV_H1-2遺伝子セグメントとヒトV_H6-1遺伝子セグメントの間にあるヒトADAM6偽遺伝子（hADAM6Ψ）の標的欠失のためのハイグロマイシンカセットとを含むように、929d24 BAC DNAを工学的に作製した（図12）。

【0335】

まず、マウスADAM6b遺伝子と約800bpの上流（5'）配列と約4800bpの下流（3'）配列とを含むゲノム断片を929d24 BACクローンからサブク

ローニングした。マウスADAM6a遺伝子と約300bpの上流(5')配列と約3400bpの下流(3')配列とを含有する第二のゲノム断片を、別途、929d24 BACクローンからサブクローニングした。マウスADAM6b遺伝子およびADAM6a遺伝子を含有する2つのゲノム断片を、Frt組換え部位が隣接するハイグロマイシンカセットにライゲートして、ターゲティングベクター(マウスADAM6ターゲティングベクター、図12;配列番号3)を作製した。ヒト化重鎖遺伝子座へのライゲーションのためにマウスADAM6b遺伝子に続いてそのターゲティングベクターの5'末端上およびマウスADAM6a遺伝子に続いてその3'末端上に異なる制限酵素認識部位を工学的に作製した(図12の下部)。

【0336】

マウス重鎖可変遺伝子遺伝子座の、ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座での置換を含有するBACクローンには、マウスADAM6ターゲティングベクターの後続のライゲーションのために、ヒト化遺伝子座のヒトV_H1-2遺伝子セグメントとヒトV_H6-1遺伝子セグメントの間にあるヒトADAM6偽遺伝子(hADAM6Ψ)を含む別の改変を施した(図13)。

【0337】

簡単に言うと、loxP組換え部位が隣接するネオマイシンカセットを、ヒトV_H1-2遺伝子セグメントの3'(hADAM6Ψに対して5')およびヒトV_H6-1遺伝子セグメントの5'(hADAM6Ψに対して3';図13の中央参照)の位置に、ヒトゲノム配列を含有するホモロジーアームを含有するように、工学的に作製した。このターゲティング構築物の挿入部位の場所は、ヒトADAM6偽遺伝子の約1.3kb5'側かつ約350bp3'側であった。このターゲティング構築物にマウスADAM6ターゲティングベクターと同じ制限酵素認識部位も含めて、ヒトADAM6偽遺伝子の欠失を含有する改変BACクローンとマウスADAM6ターゲティングベクターの間での後続のBACライゲーションを可能にした。

【0338】

両方の構築物に由来するBAC DNAの消化後、そのゲノム断片を互いにライゲートして、マウスADAM6aおよびADAM6bスクレオチド配列を含む、異所に配置されたゲノム配列を含有するヒト化重鎖遺伝子座を含有する、工学的に作製したBACクローンを構築した。ヒト化重鎖遺伝子座内のヒトADAM6遺伝子の欠失と、ES細胞へのマウスADAM6aおよびADAM6b配列の挿入のための最終のターゲティング構築物は、5'から3'へ、ヒトV_H1-2遺伝子セグメントの3'の約13kbのヒトゲノム配列を含有する5'ゲノム断片;マウスADAM6b遺伝子の下流の約800bpのマウスゲノム配列;マウスADAM6b遺伝子;マウスADAM6b遺伝子の上流の約4800bpのゲノム配列;5'Frt部位;ハイグロマイシンカセット;3'Frt部位;マウスADAM6a遺伝子の下流の約300bpのマウスゲノム配列;マウスADAM6a遺伝子;マウスADAM6a遺伝子の上流の約3400bpのマウスゲノム配列;そしてヒトV_H6-1遺伝子セグメントの5'の約30kbのヒトゲノム配列を含有する3'ゲノム断片を含有した(図13の下部)。

【0339】

工学的に作製したBACクローン(上記)を使用して、ヒト化重鎖遺伝子座を含有するマウスES細胞をエレクトロポレートして、ヒト化重鎖遺伝子座内にマウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む、異所に配置されたマウスゲノム配列を含む改変ES細胞を作製した。ヒト化重鎖遺伝子座内に異所性マウスゲノム断片を含有する陽性ES細胞を、TAQMAN(商標)プローブを使用する定量的PCRアッセイ(LieおよびPetroopoulos、1998、Advances in quantitative PCR technology: 5'nuclease assays、Curr Opin Biotechnol 9(1):43-48)によって同定した。ヒト化重鎖遺伝子座の改変部分の外側の5'上流および下流領域を、該改変領域内に配置したプライマーおよびプローブを使用してPCRにより確認して、ヒト化重鎖遺伝子座内の異所性マウスゲ

10

20

30

40

50

ノム配列の存在およびハイグロマイシンカセットの存在を確認した。上流挿入点にわたるヌクレオチド配列には、次のものが含まれ、これは、該挿入点の上流のヒト重鎖ゲノム配列と、該挿入点に存在するマウスゲノム配列に隣接して連結されている（下のカッコ内に入っている）I-CeuI制限酵素認識部位とを示すものである：(CCAGCTTCA T TAGTAATCGT TCATCTGTGG TAAAAAGGCA GGATTTGAAG CGATGGAGA TGGGAGTACG GGGCGTTTGA A GACAAAGTG CCACACAGCG CAGCCTTCTGT CTAGACCC CC GGGCTA ACTA TAACGGTCC T AAGGTAGCGA G)GGGATGACAG ATTCTCTGT T CAGTGCACCTC AGGGTCTG C C TCCACGAGAA TCACCATG C C CTTTCTCAAG ACTGT GTTCT GTGCAGTGCC CTGTCA GTGG (配列番号4)。標的領域の3'端の下流挿入点にわたるヌクレオチド配列には、次のものが含まれ、これは、マウスゲノム配列と、該挿入点の下流のヒト重鎖ゲノム配列に隣接して連結されている（下のカッコ内に入っている）PISceI制限酵素認識部位とを示すものである：(AGGGGTCGAG GGGGAATTTT AC AAAGAA CA AAGAAGCGGG CATCTGCTGA CATGAGGGCC GAAGTCAGGC TCCAGGC AGC GGGAGCTCCA CCGCGGTGGC GCCATTTTCAT TACCTCTTTTC TCCGCA CCGG ACATAGATAAAGCTT)ATCCC CCACC AAGCAAATCC CCTACCTGG GGCCGAGCTT C CCGTATGTG GGAAAATGAA TCCCTGAGGT CGATTGCT GC ATGCAATGAA ATTC AACTAG (配列番号5)。

【0340】

上に記載した標的ES細胞をドナーES細胞として使用し、VELOCIMOUSE（登録商標）マウスの工学的作製方法（例えば、米国特許第7,6598,442号、同第7,576,259号および同第7,294,754号参照）により8細胞期マウス胚に導入した。マウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む異所性マウスゲノム配列を含有するヒト化重鎖遺伝子座を保有するマウスを、該ヒト化重鎖遺伝子座内のマウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子の存在を検出する対立遺伝子アッセイ（Valenzuelaら、2003）の改良法を用いる遺伝子型解析によって同定した。

【0341】

マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子を含むヒト化重鎖遺伝子座を保有するマウスをFLPeデリターマウス系統（例えば、Rodriguezら、2000、High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nature Genetics 25:139-140参照）と交配させて、例えばES細胞期または胚で除去されないターゲティングベクターによって導入された一切のFrt'edハイグロマイシンカットを除去した。必要に応じて、ハイグロマイシンカセットをマウス内に保持した。

【0342】

子を遺伝子型解析し、マウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む異所性マウスゲノム断片を含有するヒト化重鎖遺伝子座についてヘテロ接合性の子を、マウスADAM6遺伝子発現および妊娠の特徴づけのために選択した。

【0343】

実施例8

ADAM6レスキューマウスの特徴づけ

フローサイトメトリー。ヒト重およびヒトκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性(H⁺/+κ⁺/+)の25週齢の3匹のマウスと、ヒト重鎖遺伝子座の両方の対立遺伝子内にマウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子をコードする異所性マウスゲノム断片を有するヒト重およびヒトκ軽鎖についてホモ接合性(H⁺/+A6resκ⁺/+)の18~20週齢の3匹のマウスを、BD LSR II System (BD Bi

10

20

30

40

50

oscience)でのFACSによるリンパ球細胞集団の同定および分析のために屠殺した。リンパ球を特定の細胞系列についてゲートし、B細胞発生の様々な段階を経る発達について分析した。動物から採集した組織としては、血液、脾臓および骨髓が挙げられる。EDTAが入っているBDマイクロテイナーチューブ(BD Biosciences)に血液を採集した。ウシ胎仔血清とビルビン酸ナトリウムとHEPESと2-メルカプトエタノールと非必須アミノ酸とゲンタマイシンとを補充した完全RPMI培地でフラッシュすることにより大腿骨から骨髓を採集した。血液、脾臓および骨髓調製物からの赤血球を塩化アンモニウム系溶解緩衝液(例えば、ACK溶解緩衝液)で溶解し、その後、完全RPMI培地で洗浄した。

【0344】

細胞集団を染色するために、様々な組織源からの 1×10^6 細胞を氷上で10分間、抗マウスCD16/CD32(2.4G2、BD Biosciences)と共にインキュベートし、その後、下記の抗体カクテルの1つまたは組み合わせで30分間、氷上で標識した。

【0345】

骨髓：抗マウスFITC-CD43(1B11、BioLegend)、PE-ckit(2B8、BioLegend)、PECy7-IgM(II/41、eBioscience)、PerCP-Cy5.5-IgD(11-26c.2a、BioLegend)、APC-eFluor780-B220(RA3-6B2、eBioscience)、A700-CD19(1D3、BD Biosciences)。

【0346】

末梢血および脾臓：抗マウスFITC- κ (187.1、BD Biosciences)、PE- λ (RML-42、BioLegend)、PECy7-IgM(II/41、eBioscience)、PerCP-Cy5.5-IgD(11-26c.2a、BioLegend)、APC-CD3(145-2C11、BD)、A700-CD19(1D3、BD)、APC-eFluor780-B220(RA3-6B2、eBioscience)。標識された抗体と共にインキュベートした後、細胞を洗浄し2%ホルムアルデヒドで固定した。データ収集をLSRIIFローサイトメーターで行い、FlowJo(TreeStar, Inc.)で分析した。代表 H^+/κ^+ および $H^+/\lambda^+ A6res\kappa^+$ マウスからの結果を図14~18に示す。

【0347】

結果は、 $H^+/\lambda^+ A6res\kappa^+$ マウスのB細胞が、骨髓および末梢区画において H^+/κ^+ マウスと同様の様式でB細胞発生段階を経て発達すること、それらが末梢に入ると正常な成熟パターンを示すを実証している。 $H^+/\lambda^+ A6res\kappa^+$ マウスは、 H^+/κ^+ マウスと比較して増大したCD43^{int}CD19⁺細胞集団を明示した(図16B)。これにより、 $H^+/\lambda^+ A6res\kappa^+$ マウスにおける、マウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む異所性マウスゲノム断片を含有するヒト化重鎖遺伝子座からIgM発現の促進を示すことができる。末梢では、 $H^+/\lambda^+ A6res\kappa^+$ マウスのBおよびT細胞集団は、正常であり、 H^+/κ^+ マウスと同様であるようである。

【0348】

精巣の形態および精子の特徴づけ。ヒト化免疫グロブリン重鎖可変遺伝子座を有するマウスにおける不妊性が、精巣および/または精子産生の欠陥に起因するかどうかを決定するために、精巣の形態および精巣上体の精子含有量を調査した。

【0349】

簡単に言うと、2群(1群につき $n=5$;群1:ヒト重鎖および κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス、 H^+/κ^+ ;群2:ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてヘテロ接合性および κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス、 $H^+/-\kappa^+$)から精巣をインタクトな精巣上体と共に切開し、計量した。次に、その検体を固定し、パラフィンに包埋し、切片にし、ヘマトキシリンおよびエオシン(HE

10

20

30

40

50

）染色剤で染色した。精巣切片（マウス1匹につき2つの精巣、合計20）を形態の欠陥および精子産生の証拠について調査し、一方、精巣上体切片を精子の存在について調査した。

【0350】

この実験では、 $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ マウスと $H^{+}/- \kappa^{+}/+$ マウスの間で精巣重量または形態の差は観察されなかった。すべての遺伝子型の精巣および精巣上体の両方において、精子が観察された。これらの結果は、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子の不在が、精巣形態の検出可能な変化をもたらさないこと、ならびにマウスにおいてこれら2つの遺伝子の存在下および不在下で精子が産生されることを確認する。したがって、雄 $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ マウスの妊性の欠陥が低い精子産生量に起因する可能性は低い。

10

【0351】

精子の運動能および移動。他のADAM遺伝子ファミリーメンバーが無いマウスは、精子の運動能または移動の欠陥に起因して不妊性である。精子の移動は、子宮から卵管に進む精子の能力と定義され、通常、マウスの受精に必要である。マウスADAM6aおよびADAM6bの欠失がこのプロセスに影響を及ぼすかどうかを決定するために、 $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ マウスにおける精子の移動および運動能を評価した。

【0352】

簡単に言うと、（1）ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてヘテロ接合性およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ $H^{+}/- \kappa^{+}/+$ ）；（2）ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性およびヒト κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウス（ $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ ）；（3）ヒト重鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性および野生型 κ 軽鎖についてホモ接合性のマウス（ $H^{+}/+ m\kappa$ ）；および（4）野生型C57BL/6マウス（WT）の精巣から精子を得た。検査により精子数または総合的精子運動能に重大な異常は認められなかった。すべてのマウスについて、卵丘細胞分散（cumulus dispersal）が観察された。これは、各精子試料が*in vitro*で卵丘細胞に侵入して透明帯を結合できることを示していた。これらの結果は、 $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ マウスが、卵丘に侵入して透明帯を結合し得る精子を有することを確認する。

20

【0353】

*in vitro*でのマウス卵子の受精（IVF）を、上記のマウスからの精子を使用して行った。IVFの翌日に $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ マウスについてやや少ない数の卵割胚が観察され、卵子に結合した精子の低減数も観察された。これらの結果は、 $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ マウスからの精子が、卵子に曝露されると、卵丘に侵入して透明帯を結合し得ることを確認する。

30

【0354】

もう1つの実験では、子宮から卵管を通して移動する $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ マウスからの精子の能力を精子移動アッセイで決定した。

【0355】

簡単に言うと、過排卵雌マウスの第一の群（ $n=5$ ）を $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ 雄（ $n=5$ ）を用意し、過排卵雌マウスの第二の群（ $n=5$ ）を $H^{+}/- \kappa^{+}/+$ 雄（ $n=5$ ）を用意した。これらの交配ペアを交尾について観察し、交尾の5から6時間後、分析のためにすべての雌から子宮および付属の卵管を除去し、フラッシュした。フラッシュ溶液を卵子について点検して排卵を検証し、精子数を得た。精子移動を2つの異なる方法で評価した。第一に、両方の卵管を子宮から除去し、食塩水でフラッシュし、確認された一切の精子を計数した。卵子の存在も排卵の証拠として書き留めた。第二に、卵管を子宮に付属したまま残し、両方の組織を固定し、パラフィンに包埋し、切片にして染色した（上記のとおり）。切片を子宮内の精子の存在についても、両方の卵管における精子の存在についても調査した。

40

【0356】

5匹の $H^{+}/+ \kappa^{+}/+$ 雄と交配させた雌については、卵管からのフラッシュ溶液中に

50

精子が殆ど見つからなかった。H⁺/⁻κ⁺/⁺雄と交配させた雌の卵管からのフラッシュ溶液は、H⁺/⁺κ⁺/⁺雄と交尾させた雌の卵管からのフラッシュ溶液中に存在するものより約25から30倍多い精子レベル（平均、n=10卵管）を示した。H⁺/⁺κ⁺/⁺およびH⁺/⁺A6^{res}κ⁺/⁺マウスの代表交配比較を表9に示す。

【0357】

子宮および卵管の組織学的切片を調製した。その切片を子宮および卵管（colliculus tubarius）においての精子の存在について調査した。卵管および子宮の組織学的切片の検査により、H⁺/⁺κ⁺/⁺マウスと交配させた雌マウスについては子宮では精子を認めるが卵管では認められないことが明らかにされた。さらに、H⁺/⁺κ⁺/⁺マウスと交配させた雌からの切片により、精子が子宮卵管境界（UTJ）で認められないことが明らかになった。H⁺/⁻κ⁺/⁺マウスと交配させた雌からの切片では、UTJおよび卵管において精子が同定された。

【0358】

これらの結果は、ADAM6aおよびADAM6b遺伝子を欠いているマウスがin vivo移動欠陥を示す精子を作ることを確認する。すべての場合、精子が子宮内に観察された。これは、交配および精子放出は正常に行われたようであるが、精子数または組織学的観察のいずれかによって測定すると、交配後に卵管内で精子は殆どまたは全く観察されなかったことを示していた。これらの結果は、ADAM6aおよびADAM6b遺伝子を欠いているマウスが、子宮から卵管への移動不能を示す精子を産生することを確認する。精子が子宮卵管境界（uterine-tubule junction）を越えて、卵子が受精する卵管へと移動することができないため、この欠陥は不妊性をもたらすようである。纏めると、これらの結果のすべてが、マウスADAM6遺伝子は、正常移動能を有する精子を子宮から出て子宮卵管境界および卵管を通して移動するように方向づけ、そして卵子に近づいて受精事象を実現するという仮説の支持に向けられる。ADAM6がこれを実現する機序は、前記ADAM6タンパク質の一方もしくは両方によって方向づけられることもあり、または下に記載するような、精子細胞における他のタンパク質、例えば他のADAMタンパク質、との協調発現により方向づけられることもある。

【0359】

【表9】

表9

雄遺伝子型	交配動物 (雄/雌)	交配期間	同腹子	子孫
H ^{+/+} κ ^{+/+}	6/6	6ヵ月間	2	25
H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	4/8	4ヵ月間	4	198

ADAM遺伝子ファミリー発現。ADAMタンパク質の複合体が、成熟中の精子の表面に複合体として存在することは公知である。他のADAM遺伝子ファミリーメンバーが無いマウスは、精子が成熟するにつれてこの複合体を喪失し、成熟精子において複数のADAMタンパク質の低減を示す。ADAM6aおよびADAM6b遺伝子の欠如が、他のADAMタンパク質に対して同様に影響を及ぼすかどうかを決定するために、精巣（未熟精子）および精巣上体（成熟中の精子）からのタンパク質抽出物のウェスタンブロットを分析して、他のADAM遺伝子ファミリーメンバーの発現レベルを決定した。

【0360】

この実験では、H⁺/⁺κ⁺/⁺およびH⁺/⁻κ⁺/⁺マウスの群（1群あたりn=4）からのタンパク質抽出物を分析した。その結果は、ADAM2およびADAM3の発

現に影響を受けないことを精巣抽出物中で示した。しかし、ADAM2とADAM3の両方が、精巣上体抽出物中では劇的に低減していた。これは、 $H^{+}/+$ $\kappa^{+}/+$ マウスの精液中のADAM6aおよびADAM6bの不在が、精子が成熟するにつれて他のADAMタンパク質（例えば、ADAM2およびADAM3）の発現およびおそらく機能に対して直接影響を及ぼし得ることを明示する。これは、ADAM6aおよびADAM6bが、精子の表面にADAMタンパク質複合体の部分として存在し、そのことが正しい精子移動にとって極めて重要であり得ることを示唆している。

【0361】

実施例9

ADAM6レスキューマウスにおけるヒト重鎖可変遺伝子使用

10

TAQMAN（商標）プローブを使用する定量的PCRアッセイ（上記のとおり）によりマウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子を欠いている（ $H^{+}/+$ $\kappa^{+}/+$ ）か、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子をコードする異所性ゲノム断片を含有する（ $H^{+}/+$ $A6^{res} \kappa^{+}/+$ ）かのいずれかの、ヒト重および κ 軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウスについて、選択ヒト重鎖可変遺伝子使用量を決定した。

【0362】

簡単に言うと、マウスCD19 Microbeads (Miltenyi Biotec) を使用して $H^{+}/+$ $\kappa^{+}/+$ および $H^{+}/+$ $A6^{res} \kappa^{+}/+$ マウスの脾臓からのCD19⁺B細胞を精製し、RNEASY（商標）Mini kit (Qiagen) を使用して全RNAを精製した。RNase不含DNaseオンカラム処理剤 (Qigae 20
en) を使用してゲノムRNAを除去した。First Stand cDNA Synthesisキット (Invitrogen) を使用して約200ngのmRNAをcDNAに逆転写し、その後、ABI 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用してTAQMAN（商標）Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) で増幅した。各遺伝子の相対発現をマウス κ 軽鎖定常領域 (mC κ) の発現に正規化した。表10は、この実験に使用したセンス/アンチセンス/TAQMAN（商標）MGBプローブの組み合わせを示すものである。

【0363】

【表 10】

表10

ヒトV _H	配列 (5'-3')	配列番号
V _H 6-1	センス: CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA	6
	アンチセンス: GGAGATGGCACAGGTGAGTGA	7
	プローブ: TCCAGGACTGGTGAAGC	8
V _H 1-2	センス: TAGTCCCAGTGATGAGAAAGAGAT	9
	アンチセンス: GAGAACACAGAAGTGGATGAGATC	10
	プローブ: TGAGTCCAGTCCAGGGA	11
V _H 3-23	センス: AAAAATTGAGTGTGAATGGATAAGAGTG	12
	アンチセンス: AACCCCTGGTCAGAAACTGCCA	13
	プローブ: AGAGAAACAGTGGATACGT	14
V _H 1-69	センス: AACTACGCACAGAAGTTCCAGG	15
	アンチセンス: GCTCGTGGATTTGTCCGC	16
	プローブ: CAGAGTCACGATTACC	17
mC _κ	センス: TGAGCAGCACCCCTCACGTT	18
	アンチセンス: GTGGCCTCACAGGTATAGCTGTT	19
	プローブ: ACCAAGGACGAGTATGAA	20

10

20

30

この実験では、分析した試料において4つすべてのヒトV_H遺伝子の発現が観察された。さらに、発現レベルは、H⁺/+κ⁺/+マウスとH⁺/+A6resκ⁺/+マウスの間で類似するものであった。これらの結果は、改変部位に対して遠位にあるヒトV_H遺伝子（V_H3-23およびV_H1-69）および改変部位に対して近位にあるヒトV_H遺伝子（V_H1-2およびV_H6-1）の両方ともすべてが、機能的に発現するヒト重鎖を形成するように組み換えることができた。これらの結果は、ヒト重鎖ゲノム配列に挿入されたマウスADAM6aおよびADAM6b配列を含む異所性ゲノム断片が、その遺伝子座内でのヒト重鎖遺伝子セグメントのV(D)J組換えに影響を及ぼさなかったこと、およびこれらのマウスが、通常の様式でヒト重鎖遺伝子セグメントを組換えて、機能的重鎖免疫グロブリンタンパク質を産生することができることを明示している。

40

【0364】

実施例10

ADAM6レスキューマウスにおける体液性免疫応答

マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子を欠いている（H⁺/+κ⁺/+）か、マウスADAM6aおよびADAM6b遺伝子をコードする異所性ゲノム断片を含有する（H⁺/+A6resκ⁺/+）かのいずれかの、ヒト重およびκ軽鎖可変遺伝子遺伝子座についてホモ接合性のマウスについて、多価抗原免疫スキーム、続いて抗体単離および特徴づけにより、体液性免疫応答を決定した。結果を、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを含むV(D)J組換えに対する任意の作用の決定、血清力価の推移、ハイブリドーマによる抗体の産生および抗原に対する親和性の評価のために比較した。

50

【0365】

免疫プロトコル。ヒト細胞表面受容体（抗原A）、ヒト受容体チロシン・プロテインキナーゼに対して特異的なヒト抗体（抗原B）、TGF- β シグナル伝達経路を調節する機能を果たす分泌ヒトタンパク質（抗原C）、およびヒト受容体チロシンキナーゼ（抗原D）を、マウスの群における比較免疫に利用した。上記抗原での免疫の前にマウスの群から血清を採集した。初回抗原刺激免疫では、アジュバントとして10 μ gのCpGオリゴヌクレオチド（Invivogen）と混合して各抗原（各2.3 μ g）を投与した。マウス1匹につき25 μ Lの容量の免疫原を足蹠（footpad）（f. p.）経由で投与した。その後、2.3 μ gの抗原をアジュバントとしての10 μ gのCpGおよび25 μ gのAdju-Phos（Brenntag）と共に用いて、合計6回の追加免疫のために第3、6、11、13、17および20日にf. p. 経由でマウスに追加免疫した。4回目および6回目の追加免疫後、それぞれ第15および22日にマウスを交配させ、抗血清を各特異的抗原に対する抗体力価についてアッセイした。

【0366】

ELISAアッセイを用いて免疫したマウスの血清における抗体力価を決定した。リン酸緩衝食塩水（PBS、Irvine Scientific）中のそれぞれの抗原（2 μ g/mL）で96ウェルマイクロタイタープレート（Thermo Scientific）を一晩、4℃で被覆した。翌日、プレート洗浄機（Molecular Devices）を使用して、0.05% Tween 20を含有するリン酸緩衝食塩水（PBS-T、Sigma-Aldrich）で4回、プレートを洗浄した。その後、PBS中0.5%ウシ血清アルブミン（BSA、Sigma-Aldrich）、250 μ Lでプレートをブロッキングし、1時間、室温でインキュベートした。その後、4回、PBS-Tでプレートを洗浄した。免疫したマウスからの血清および免疫する前の血清を、1:300または1:1000で開始して0.5% BSA-PBS中で3倍段階希釈し、ブロッキングしたプレートに2つひと組で添加し、1時間、室温でインキュベートした。最後の2つのウェルは空のままにして、二次抗体対照として使用した。プレートをプレート洗浄機においてPBS-Tで再び4回洗浄した。ヤギ抗マウスIgG-Fc-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP、Jackson ImmunoResearch）またはヤギ抗マウスIgG-カップ-HRP（Southern Biotech）結合体化二次抗体の1:5000/1:10,000希釈物をプレートに添加し、1時間、室温でインキュベートした。PBS-Tで8回、プレートを再び洗浄し、TMB/H₂O₂を基質として使用して顕色させた。その基質を20分間インキュベートし、2N H₂SO₄（VWR）または1N H₃PO₄（JT Baker）で反応を停止させた。分光光度計（Victor, Perkin Elmer）を用いて450nmでプレートを読み取った。Graphpad PRISMソフトウェアを使用して抗体力価を算定した。

【0367】

バックグラウンドより2倍上に相当する抗原結合のシグナルにおける、実験的滴定範囲内の血清希釈度として血清力価を算定した。体液性免疫応答についての結果を図19（抗原A）、図20（抗原B）、図21（抗原C）および図22（抗原D）に示す。選択した免疫の各群からのマウスから単離した2つの脾臓を使用して作製したハイブリドーマの抗原陽性スコアを図11に示す（抗原スコアは、2X/バックグラウンドに等しい）。

【0368】

この実施例に示すように、Adam6レスキューマウス（H⁺/+ A6^{res} κ ⁺/+）において産生された抗体の力価は、ADAM6aおよびADAM6bが無く、ヒト化重鎖を有するマウス（H⁺/+ κ ⁺/+）に匹敵した。さらに、H⁺/+ A6^{res} κ ⁺/+マウスからの脾臓は、高親和性の抗体を含めて、試験したすべての抗原について抗原陽性ハイブリドーマをH⁺/+ κ ⁺/+マウスに匹敵するレベルで生じさせた。したがって、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有する高い親和性を有する抗体の産生にかんがみて、Adam6レスキューマウスにおいてヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントのV(D)J組換えの欠陥は存在しないと考えられる。

【0369】

【表11】

表11

抗原	マウス系統	抗原スコア
A	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	76
A	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	32
B	H ^{+/+} κ ^{+/+}	4
B	H ^{+/+} κ ^{+/+}	12
B	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	41
B	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	95

10

実施例11

抗原結合親和性の決定

抗原Bへの特異的結合を示す抗体の結合親和性を、リアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサー（BIAcore 2000）を使用してスクリーニングした。抗原Bで免疫した2系統のマウス（H^{+/+}κ^{+/+}およびH^{+/+}A6^{res}κ^{+/+}）から単離したハイブリドーマからの順化培地をBIAcoreスクリーニング中に使用した。BIAcoreセンサー表面を、先ず、ポリクローナルウサギ抗マウス抗体（GE）で誘導体化して、順化培地から抗抗原B抗体を捕捉した。全スクリーニング法の間、HBST（0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v Surfactant P20）をランニング緩衝液として使用した。抗原BのFab断片を50μL/分の流量で、100nM濃度で、抗抗原B抗体捕捉表面にわたって注入した。HBSTランニング緩衝液中で、抗体-抗原会合を3分間モニターし、そして一方、捕捉された抗体からの抗原の解離を5分間モニターした。この実験を25℃で行った。Scrubber 2.0曲線フィッティングソフトウェアを使用する1:1結合モデルへの、データの処理およびフィッティングによって、会合（ka）および解離（kd）反応速度定数を決定した。結合解離平衡定数（K_D）および解離半減期（T_{1/2}）をその反応速度定数から次のように算定した：K_D（M）= kd / ka；および T_{1/2}（分）=（ln 2 /（60 * kd））。選択抗抗原B抗体の結果を表12に示す。

20

30

【0370】

【表 1 2】

表12

抗体	マウス系統	K _D (M)	T _{1/2} (分)
5D6	H ^{+/+} κ ^{+/+}	1.62E-08	3
8G10	H ^{+/+} κ ^{+/+}	1.20E-08	5
10F10	H ^{+/+} κ ^{+/+}	1.09E-08	3
1F5	H ^{+/+} κ ^{+/+}	1.00E-07	0.3
10G8	H ^{+/+} κ ^{+/+}	1.47E-07	0.3
1B11	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	1.98E-08	6
2D9	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	9.40E-10	51
4D11	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	5.60E-08	0.8
6C5	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	1.10E-09	188
6F4	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	1.35E-08	3
7C4	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	2.00E-06	0.05
8G12	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	2.31E-09	19
9B12	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	3.47E-09	13
10B4	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	3.60E-09	23
11E7	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	3.06E-08	2
11E12	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	2.70E-07	0.1
1E4	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	7.00E-10	58
4D2	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	5.80E-10	150
5H6	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	2.60E-09	3
5H10	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	6.00E-09	70
9A9	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	3.80E-09	12
11C11	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	1.55E-09	38
12C10	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	5.90E-09	16
12G7	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	9.00E-08	7
12G9	H ^{+/+} A6 ^{res} κ ^{+/+}	3.32E-09	12

同様の実験で、抗原 A に結合するハイブリドーマー順化培地に存在する異なるモノクローナル抗体の動態を、リアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサー（B I A c o r e 4 0 0 0）アッセイを用いて決定した。このアッセイで使用したすべてのハイブリドーマクローンは、H^{+/+} A 6^{res} κ^{+/+} マウスにおいて産生された。

【0 3 7 1】

簡単に言うと、抗原 A 特異的抗体を捕捉するために、先ず、ポリクローナルウサギ抗マウス抗体（G E カタログ # B R - 1 0 0 8 - 3 8）をセンサーチップ上に固定した。2つの異なる緩衝液 - P B S P、p H 7. 2 および P B S P、p H 6. 0 - で、B I A c o r e スクリーニングを行った。両方の緩衝液に 0. 1 m g / m L の B S A を補充した。順化培地からの抗抗原 A 抗体の捕捉後、1 μ M の抗原 A 単量体（それぞれのランニング緩衝液中で調製したもの）を、1. 5 分間、3 0 μ L / 分で捕捉抗体表面にわたって注入し、2 5 ° C のそれぞれのランニング緩衝液で 1. 5 分間、結合抗原 A 単量体の解離をモニターし

た。Scrubber 2.0 曲線フィッティングソフトウェアを使用する 1 : 1 結合モデルへの、データの処理およびフィッティングにより、会合 (k_a) および解離 (k_d) 反応速度定数を決定した。結合解離平衡定数 (K_D) および解離半減期 ($T_{1/2}$) をその反応速度定数から次のように算定した: $K_D (M) = k_d / k_a$; および $T_{1/2} (分) = (ln 2 / (60 * k_d))$ 。pH 7.2 および pH 6.0 で抗原 A 単量体に結合する選択抗抗原 A 抗体についての結合動態パラメータを表 13 に示す。NB: この実験条件下で結合が検出されなかった。

【0372】

【表13-1】

表13

抗体	pH7.2		pH6.0	
	$K_D (M)$	$T_{1/2} (分)$	$K_D (M)$	$T_{1/2} (分)$
1D7	3.89E-10	25	9.45E-10	17
2B4	NB	NB	NB	NB
2B7	3.90E-09	1.2	2.98E-09	2
2F7	2.36E-10	144	2.06E-11	1882
3A7	NB	NB	6.42E-10	17
3F6	NB	NB	NB	NB
4A6	1.91E-09	2	2.12E-09	2
4C4	NB	NB	NB	NB
4E12	2.69E-10	16	2.03E-10	18
5C11	1.68E-09	3	2.31E-09	3
5D10	NB	NB	4.56E-09	2
5E7	NB	NB	NB	NB
5F10	NB	NB	NB	NB
5F11	8.18E-10	8	6.79E-10	7
5G4	3.55E-10	15	7.42E-11	53

【0373】

10

20

30

【表 1 3 - 2】

5G9	6.39E-10	15	4.31E-10	21
5H8	4.73E-10	15	NB	NB
6D2	NB	NB	NB	NB
6D3	2.88E-10	14	8.82E-11	39
6E4	NB	NB	2.67E-09	4
6E6	1.37E-09	10	1.30E-09	14
6H6	NB	NB	NB	NB
7A12	NB	NB	NB	NB
7C3	NB	NB	NB	NB
7E8	4.38E-10	22	2.63E-10	34
7F10	NB	NB	NB	NB
7G9	NB	NB	NB	NB
8B8	NB	NB	NB	NB
8B11	NB	NB	NB	NB
8C3	NB	NB	NB	NB
8E9	NB	NB	NB	NB
8G3	NB	NB	NB	NB
8H3	NB	NB	NB	NB
8H4	3.70E-07	0.1	NB	NB
8H8	NB	NB	NB	NB
1A8	2.30E-09	4	7.40E-10	6
1B6	NB	NB	NB	NB
1C6	NB	NB	NB	NB
1C12	NB	NB	NB	NB
1D2	NB	NB	NB	NB
1E2	1.17E-09	42	3.08E-09	29
1E3	5.05E-10	89	8.10E-10	57
1E6	1.97E-08	3	1.84E-08	3
1E9	1.14E-09	30	1.14E-09	25
1H6	2.93E-09	14	9.87E-10	25
2H9	2.30E-08	2	1.91E-08	2
3A2	1.15E-10	44	1.25E-10	33
3A4	1.70E-10	31	1.44E-10	30
3D11	NB	NB	1.58E-08	1
3H10	2.82E-09	20	2.59E-09	15
4B6	7.79E-10	6	6.36E-10	7
4H6	9.18E-11	62	1.20E-10	43
5A2	NB	NB	7.04E-10	12
5C5	8.71E-11	49	7.02E-11	48
5F6	6.16E-11	114	5.46E-11	121

上に示したように、 $H^{+}/+A6res_{\kappa^{+}/+}$ マウスと $H^{+}/+\kappa^{+}/+$ マウスの両方から、類似する特徴の高親和性抗体を得た。表 1 2 に提示した 2 5 の抗体の中で、 $H^{+}/+A6res_{\kappa^{+}/+}$ マウスにおいて産生された 2 0 の抗体は、0.5 nM から 1 μ M の範囲の親和性を明白に示し、そして一方で、 $H^{+}/+\kappa^{+}/+$ マウスにおいて産生された 5 つの抗体は、1 0 nM から 1 5 0 nM の範囲の親和性を明白に示した。さらに、図 1 3 に示した 5 5 の抗体は、抗原 A 単量体への結合について 2 0 pM から 3 5 0 nM の範囲の親和性を明白に示した。

10

20

30

40

50

【0374】

この実施例で実証されるように、マウス A d a m 6 遺伝子のヒト化免疫グロブリン重鎖遺伝子座への再挿入は、工学的に作製された生殖細胞系から再構成されたヒト遺伝子セグメントに由来する、ナノモル濃度以下の範囲 (s u b n a n o m o l a r r a n g e) の多様な親和性を有するヒト抗体のレパートリーを特徴とする複数の抗原に対する頑強な免疫応答を開始させるマウスの能力を害さない。

【化 1】

SEQUENCE LISTING

<110> Lynn Macdonald
 Sean Stevens
 Andrew J. Murphy

<120> ADAM6 Mice

<130> 1360A-WO

10

<140> To be assigned
 <141>

<150> 61/595,200
 <151> 2012-02-06

<150> 61/497,650
 <151> 2011-06-16

<150> 61/446,895
 <151> 2011-02-25

20

<160> 58

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 754
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1

Met	Leu	Ser	Leu	Thr	Trp	Gly	Met	Arg	Leu	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Val	
1				5					10					15		
Pro	Arg	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	
			20					25					30			
Pro	Val	Trp	Cys	Ser	Gln	Gly	His	Pro	Thr	Trp	Arg	Tyr	Ile	Ser	Ser	
		35					40					45				
Glu	Val	Val	Ile	Pro	Arg	Lys	Glu	Ile	Tyr	His	Thr	Lys	Gly	Leu	Gln	
	50					55					60					
Ala	Gln	Arg	Leu	Leu	Ser	Tyr	Ser	Leu	Arg	Phe	Arg	Gly	Gln	Arg	His	
65					70					75				80		
Ile	Ile	His	Leu	Arg	Arg	Lys	Thr	Leu	Ile	Trp	Pro	Arg	His	Leu	Leu	
			85						90					95		
Leu	Thr	Thr	Gln	Asp	Asp	Gln	Gly	Ala	Leu	Gln	Met	Glu	Tyr	Pro	Phe	
			100					105					110			
Phe	Pro	Val	Asp	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Leu	Glu	Gly	Ile	Leu	Gln	
		115				120						125				
Ser	Met	Val	Thr	Val	Asp	Thr	Cys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Val	Ile	
	130					135					140					
Lys	Leu	Asp	Asn	Leu	Thr	Tyr	Glu	Ile	Lys	Pro	Leu	Asn	Asp	Ser	Gln	
145				150						155				160		
Ser	Phe	Glu	His	Leu	Val	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Glu	Ser	Asp	Asp	Thr	
			165						170					175		

30

40

【化 2】

Gly	Pro	Met	Asn	Ala	Trp	Lys	His	Trp	Ser	His	Asn	Thr	Gly	Ser	Pro	
			180					185					190			
Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ala	Pro	Arg	Leu	Ser	Ser	Lys	
		195					200					205				
Asn	Tyr	Ala	Thr	His	Pro	Ala	Ala	Ile	Lys	Gly	His	Phe	Gln	Ala	Thr	
	210					215					220					
His	Ser	Val	Tyr	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys	Leu	Ser	Ser	Thr	Val	
225					230					235					240	
Glu	Tyr	Leu	Phe	Lys	Val	Ile	Ser	Leu	Met	Asp	Thr	Tyr	Leu	Thr	Asn	
				245					250					255		
Leu	His	Met	Arg	Tyr	Tyr	Val	Phe	Leu	Met	Thr	Val	Tyr	Thr	Glu	Ala	
			260					265					270			
Asp	Pro	Phe	Ser	Gln	Asp	Phe	Arg	Val	Pro	Gly	Gly	Gln	Ala	His	Thr	
		275					280					285				
Phe	Tyr	Glu	Arg	Val	Phe	Tyr	Ala	His	Phe	Arg	Pro	Asp	Ala	Gly	Ala	
	290					295					300					
Ile	Ile	Asn	Lys	Asn	Ser	Pro	Gly	Asp	Asp	Ala	Val	Asn	Pro	Ala	Glu	
305					310					315					320	
Arg	Ser	Ile	Cys	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Ile	Cys	Leu	Gly	Gln	His	Gly	
				325					330					335		
Arg	Asn	Pro	Leu	Phe	Leu	Ser	Ile	Ile	Ile	Thr	Asn	Arg	Val	Gly	Arg	
			340					345					350			
Ser	Leu	Gly	Leu	Lys	His	Asp	Glu	Gly	Tyr	Cys	Ile	Cys	Gln	Arg	Arg	
		355					360					365				
Asn	Thr	Cys	Ile	Met	Phe	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Phe	Ser	
	370					375					380					
Asn	Cys	Ser	Leu	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Asp	Leu	
385					390					395					400	
Met	Pro	Cys	Leu	Phe	Tyr	Asp	Arg	His	Val	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Ser	Leu	
				405					410					415		
Thr	Tyr	Lys	Phe	Cys	Gly	Asn	Phe	Lys	Val	Asp	Asn	Asn	Glu	Gln	Cys	
			420					425					430			
Asp	Cys	Gly	Ser	Gln	Lys	Ala	Cys	Tyr	Ser	Asp	Pro	Cys	Cys	Gly	Asn	
		435					440					445				
Asp	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro	Gly	Ser	Ile	Cys	Asp	Lys	Glu	Leu	Cys	Cys	
		450				455					460					
Ala	Asn	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Gly	Thr	Leu	Cys	Arg	Pro	Ile	Gln	
465					470					475					480	
Asn	Ile	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Lys	Phe	Ile	Cys	
				485					490					495		
Pro	Asp	Asp	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asp	Gly	Thr	Pro	Cys	Ser	Glu	Glu	Gly	
			500					505					510			
Tyr	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn	Cys	Thr	Asp	Arg	Asn	Ile	Gln	Cys	Met	Glu	
		515					520					525				
Ile	Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Asn	Ile	Lys	Cys	Tyr	Asp	Ile	
	530					535					540					
Asn	Lys	Gln	Arg	Phe	Arg	Phe	Gly	His	Cys	Thr	Arg	Ala	Glu	Glu	Ser	
545					550					555					560	
Leu	Thr	Phe	Asn	Ala	Cys	Ala	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Leu	
				565					570					575		
Gln	Cys	Thr	Asn	Val	Thr	Asn	Leu	Pro	Phe	Leu	Gln	Glu	His	Val	Ser	
			580					585					590			
Phe	His	Gln	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Val	Thr	Cys	Phe	Gly	Leu	Asp	Glu	
		595					600					605				
His	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Ala	Asp	Ala	Gly	Leu	Val	Arg	His	Gly	Thr	
	610					615					620					

10

20

30

40

【化 3】

Pro Cys Ser Arg Gly Lys Phe Cys Asp Arg Gly Ala Cys Asn Gly Ser
 625 630 635 640
 Leu Ser Arg Leu Gly Tyr Asp Cys Thr Pro Glu Lys Cys Asn Phe Arg
 645 650 655
 Gly Val Cys Asn Asn Arg Arg Asn Cys His Cys His Phe Gly Trp Ser
 660 665 670
 Pro Pro Lys Cys Lys Glu Glu Gly His Ser Gly Ser Ile Asp Ser Gly
 675 680 685
 Ser Pro Pro Val Gln Arg Arg Ile Ile Lys Gln Asn Leu Glu Pro Val
 690 695 700
 Val Tyr Leu Arg Ile Leu Phe Gly Arg Ile Tyr Phe Leu Phe Val Ala
 705 710 715 720
 Leu Leu Phe Gly Ile Ala Thr Arg Val Gly Val Thr Lys Ile Phe Arg
 725 730 735
 Phe Glu Asp Leu Gln Ala Ala Leu Arg Ser Trp Gln Glu Gln Ala Lys
 740 745 750
 Asp Lys

10

<210> 2
 <211> 756
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<400> 2

Met Leu Ser Leu Thr Trp Gly Met Arg Leu Val Glu Arg Pro Val Val
 1 5 10 15
 Pro Arg Val Leu Leu Leu Leu Phe Ala Leu Trp Leu Leu Leu Val
 20 25 30
 Pro Val Trp Cys Ser Gln Gly His Pro Thr Trp Arg Tyr Ile Ser Ser
 35 40 45
 Glu Val Val Ile Pro Arg Lys Glu Ile Tyr His Thr Lys Gly Leu Gln
 50 55 60
 Ala Gln Arg Leu Leu Ser Tyr Ser Leu His Phe Arg Gly Gln Arg His
 65 70 75 80
 Ile Ile His Leu Arg Arg Lys Thr Leu Ile Trp Pro Arg His Leu Leu
 85 90 95
 Leu Thr Thr Gln Asp Asp Gln Gly Ala Leu Gln Met Asp Tyr Pro Phe
 100 105 110
 Phe Pro Val Asp Cys Tyr Tyr Ile Gly Tyr Leu Glu Gly Ile Pro Gln
 115 120 125
 Ser Met Val Thr Val Asp Thr Cys Tyr Gly Gly Leu Ser Gly Val Met
 130 135 140
 Lys Leu Asp Asp Leu Thr Tyr Glu Ile Lys Pro Leu Asn Asp Ser Gln
 145 150 155 160
 Ser Phe Glu His Leu Val Ser Gln Ile Val Ser Glu Ser Asp Asp Thr
 165 170 175
 Gly Pro Met Asn Ala Trp Lys His Trp Ser His Asn Thr Gly Ser Pro
 180 185 190
 Ser Ser Arg Leu Glu Tyr Ala Asp Gly Ala Pro Arg Ile Ser Ser Lys
 195 200 205
 Asn Tyr Ala Thr His Pro Ala Ala Ile Lys Gly His Phe Gln Ala Thr
 210 215 220
 Asn Ser Val Tyr Asn Ser Ala Ala Gly Asp Lys Leu Ser Ser Thr Val
 225 230 235 240

30

40

【化 4】

Gly	Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Ile	Ser	Leu	Met	Asp	Thr	Tyr	Leu	Thr	Asn	
				245					250					255		
Leu	His	Met	Arg	Tyr	Tyr	Val	Phe	Leu	Met	Thr	Val	Tyr	Thr	Asn	Ser	
			260					265					270			
Asp	Pro	Phe	Arg	Leu	Glu	Phe	Ala	Val	Pro	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Asn	
		275					280					285				
Tyr	Tyr	Val	Ser	Val	Phe	Tyr	Asn	Lys	Phe	Lys	Pro	Asp	Ala	Gly	Val	
	290					295					300					
Leu	Leu	Asn	Lys	Tyr	Gly	Pro	Gln	Asp	Asn	Gln	Val	Asn	Pro	Ala	Glu	
305					310					315					320	
Arg	Ser	Ile	Cys	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Cys	Ile	Gly	Lys	Tyr	Asp	
			325					330					335			
Arg	Asn	Pro	Leu	Phe	Leu	Ser	Pro	Ile	Ile	Thr	Asn	Arg	Val	Gly	Arg	
			340					345					350			
Ser	Leu	Gly	Leu	Lys	Tyr	Asp	Glu	Gly	Tyr	Cys	Val	Cys	Gln	Arg	Arg	
		355					360					365				
Asn	Thr	Cys	Ile	Met	Phe	Arg	His	Pro	Gln	Leu	Thr	Asp	Ala	Phe	Ser	
	370					375					380					
Asn	Cys	Ser	Leu	Ala	Glu	Ile	Ser	Asn	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	
385					390					395					400	
Met	Pro	Cys	Leu	Phe	Tyr	Asp	Arg	His	Val	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Ser	Leu	
			405						410					415		
Thr	Tyr	Lys	Phe	Cys	Gly	Asn	Phe	Lys	Val	Asp	Asn	Asp	Glu	Gln	Cys	
			420					425					430			
Asp	Cys	Gly	Ser	Gln	Lys	Ala	Cys	Tyr	Ser	Asp	Pro	Cys	Cys	Gly	Asn	
		435					440					445				
Asp	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro	Gly	Ser	Ile	Cys	Asp	Lys	Glu	Leu	Cys	Cys	
	450					455					460					
Ala	Asn	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Gly	Thr	Leu	Cys	Arg	Pro	Ile	Gln	
465					470					475					480	
Asn	Ile	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Tyr	Cys	Asn	Gly	Thr	Lys	Tyr	Ile	Cys	
			485						490					495		
Pro	Asp	Asp	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asp	Gly	Thr	Pro	Cys	Ser	Glu	Asp	Gly	
			500					505					510			
Tyr	Cys	Tyr	Lys	Gly	Asn	Cys	Thr	Asp	Arg	Asn	Ile	Gln	Cys	Met	Glu	
		515					520					525				
Ile	Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Asn	Ile	Lys	Cys	Tyr	Asp	Ile	
	530					535					540					
Asn	Lys	Gln	Arg	Phe	Arg	Phe	Gly	His	Cys	Thr	Arg	Ala	Glu	Glu	Ser	
545					550					555					560	
Leu	Thr	Phe	Asn	Ala	Cys	Ala	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Cys	Gly	Arg	Leu	
			565						570					575		
Gln	Cys	Thr	Asn	Val	Thr	Asn	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln	Glu	His	Val	Ser	
			580					585					590			
Phe	His	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Gly	Phe	Thr	Cys	Phe	Gly	Leu	Asp	Glu	
		595					600					605				
His	Arg	Gly	Thr	Glu	Thr	Thr	Asp	Ala	Gly	Met	Val	Arg	His	Gly	Thr	
	610					615					620					
Pro	Cys	Ser	Lys	Ser	Lys	Phe	Cys	Asp	Gln	Gly	Ala	Cys	Ser	Gly	Ser	
625					630					635					640	
Leu	Ser	His	Leu	Gly	Tyr	Asp	Cys	Thr	Pro	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Arg	
			645						650					655		
Gly	Val	Cys	Asn	Asn	His	Arg	Asn	Cys	His	Cys	His	Phe	Gly	Trp	Lys	
			660					665					670			
Pro	Pro	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Gly	Leu	Ser	Gly	Ser	Ile	Asp	Ser	Gly	
		675					680						685			

10

20

30

40

【化 5】

Ser Pro Pro Val Gln Arg His Thr Ile Lys Gln Lys Gln Glu Pro Val
 690 695 700
 Val Tyr Leu Arg Ile Leu Phe Gly Arg Ile Tyr Phe Leu Phe Val Ala
 705 710 715 720
 Leu Leu Phe Gly Ile Ala Thr Arg Val Gly Val Thr Lys Ile Phe Arg
 725 730 735
 Phe Glu Asp Leu Gln Ala Thr Leu Arg Ser Gly Gln Gly Pro Ala Arg
 740 745 750
 Asp Lys Pro Lys
 755

10

<210> 3
 <211> 13894
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 3
 gtcctaaggt agcgagggat gacagattct ctgttcagtg cactcagggt ctgcctccac
 60
 gagaatcacc atgccctttc tcaagactgt gttctgtgca gtgccctgtc agtggaatc
 120
 tggagagcat gcttccatga gcttgtgagt agtatatcta gtaagccatg gctttgtgtt
 180
 aatggtgatg ttctacatac cagttctctg gcttaataat gaggtgatga ttctatgttc
 240
 ctgtaacgct tctcactg ggtcctaagt ctttcttcac tccatctatt cctctaagga
 300
 atgatcctga aaatcccatc acaaactata ggagatggga accatcaaaa aacacagtga
 360
 caaagaggtg ggaacgcac agggttcagg aaccatattt taaaaagata tcgtaaataa
 420
 cttcttaaaa gagatataga caaatctcca ttaatacggg gaccagaggc ctaaggctaa
 480
 gaaccaatgg tggctcaagg tctcctgcta cccgaggagc aaacgtagag cagtttctaa
 540
 tgatttattt aaaatataga atcaaaagta ccagtttgca attttgaaag atttatttca
 600
 gcaatgcaac aacatcaggt ggtgccgagt ccaacacgtc ttatgtccca tgatataaac
 660
 aaaggccatc cagaactgtg gactggaggt ctaccttgtc ccctaattgac attcagattt
 720
 tttttccatt ctctttatct tagaggagac agggggctaa ctcatcttac ttgtcctttg
 780
 cttgttcttg ccaagaacgt aaagcagctt gcaagtcttc aaacctaaat atcttagtaa
 840
 ctctacacg agtggcaatg ccaaagagca gtgcaacaaa gaggaagtaa atacgaccaa
 900
 agagtattct taaatacact actggtctta ggttctgttt tattatgogc ctttgaaccg
 960
 gaggggaccc actgtctatg ctcccactgt gtccctcttc tttgcacttt ggagggctcc
 1020

20

30

40

【化 6】

aaccaaaatg gcaatggcaa ttccgacgat tggtacacac tcctctgaaa ttgcattttt
1080
ctgggggtgca gtcataaccc aaacgagata aacttccatt gcaagctcct cgatcacaga
1140
acttaccctt tgaacacggg gtaccatgtc tcaccaatcc agcatctgct gtttctgtcc
1200
cacgatgttc atcaagccca aagcaggtaa cccagagat aaccgattga tggaatgaaa
1260
catgttcttg caaaaatgga agattgggtga cattgggtaca ctgcaacctt ccacacagct
1320
tgtcttgatc agcacaagca ttgaatgtga ggctttcttc tgctctagta caatgcccaa
1380
atcgaaccg ttgtttgttg atgtcatagc acttaatat agcattctta gcacttacac
1440
caaagatttc catgcattgt atgttgcat cagtgcagtt acctttatag cagtaacctt
1500
cttctgagca tgggtgtccc tcttgcatg aagtgtcatc tgggcaaagt aacttagagc
1560
cactacagta ctctggaaga tcacatatgt tctggatagg tctgcagagt gtcccagaag
1620
gactgttaagt gcaatttgca cagcataaatt ctttatcaca aatgctacca ggtgttaacc
1680
tgcaatcatt tccacagcag ggatctgaat aacatgcctt ttgggagcca cagtcacact
1740
gtcattgtt atctactttg aagtttccac aaaacttata agtcaatgat gtattataat
1800
aaacatgacg gtcatagaaa agacatggca tcagatcagg agtattaagt atgttgctta
1860
tctctgcaag ggaacaattg ctgaaagcat ctgttaattg aggatttttg aacatgatgc
1920
aggtgttcct tctctggcag atacagtacc cctcatcatg ttttaggcct aaactccttc
1980
caacacgatt gggtattata atagataaaa ataaaggatt tcgacatgt tgaccaagac
2040
aaattagggc tgaggagaga catatactcc tctcagctgg attaacagca tcatctctg
2100
gcgaattctt gtttaattata gtcctgcat caggcctaaa atgagcataa aatactctct
2160
catagaaagt atgagcctgc cctcctggaa ctcgaaaatc ttgtgaaaat ggatcagcct
2220
cggatatacac agtcatgaga aagacatagt accgcatatg aagattggtc agataggtgt
2280
ccattaaact aatgacttta aacaaatact caacagtaga tgaaagtgtg tcacctccag
2340
aagcactata tacagaatgg gttgcttgaa agtggccttt tatagcagct ggatgtgtag
2400
cgtaattctt actagatagt ctgggagctc catctgcata ttccaatctg gaggagggag
2460
aacctgtatt atggctccag tgcttccatg cattcatagg ccctgtgtca tcagactcag
2520
atactatctg agaaacaagg tgttcaaagc tctgtgaatc attgaggggt ttgatttcat
2580
aggtaagggt atccaacttt atgaccctg acaggccccc ataacaagta tccacagtga
2640
ccatggattg caggatcccc tccaggtagc caatatagta acaatctaca ggaaaaaagg
2700

10

20

30

40

【化 7】

ggtactccat ctgtaaggct ccttgggtcat cttgagttgt cagcaacaag tgtctggggc
 2760
 aaatgagtggt ctttctccgc aggtggatga tatgtctctg gccccgaaaa cgcaagctat
 2820
 acgagagcag tctttgtgct tgaagtcott tggatggta gatctccttc cgaggaataa
 2880
 ccacctccga tgagatgtaa cgccaagtgg gatggccttg agaacaccag actggaacca
 2940
 ggaggagcag ccagagtgc aatagcaaga ggaggaccct ggggaccaca ggtctttcca
 3000
 ctagcctcat gccccaggct agagataaca tcctgggtgg agctaactcc ctctgctgtg
 3060
 gccactgcct ggtctagaaa atactgacag aggactaaaa acctcctcag gctcccaacc
 3120
 taagtgggta ccagacaac tggagttagg taacagtcac tgggtgtggc aggaattgag
 3180
 tctgaatgtg ttagctgagg ttgaggttaa atattgtcaa aagggatgtc tataaatgtg
 3240
 cctggacaag aaaagtcaga agcagcaagg agtgtctctg acaggctcaa tcctttcttt
 3300
 tccttttttg aagttcaaaa tatcatttcc acgtgaatgt atttgggtcc cagtgtgact
 3360
 ctgggtctct ttctaggagt caatatttct ttatatcttg gctcatgttt ttcacagttg
 3420
 ttctaacttc ttgttttggt ttgtttgttt gtttgtttga aagttagaag taaatactgt
 3480
 ctatattagc cttttagcta taaatgattg tttttatttc ttctaactat gttttgtttg
 3540
 agttttgggt aaactattta caaatgagtt ttttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag
 3600
 tttggagcct tctgttaata ttgtgttggt gtttctccaa tattattaga cctgagaatt
 3660
 ctacctgggt acctgtgaac tcagaattt ttaaaaattc catctcttgg gaacattatc
 3720
 tctgaccccg tctgaggccg aagtggctgt cccctccaa cctttagtat ctttctttcc
 3780
 tgactattgg gatttcttca agcaatcagg ctgatgggtt ctcagcagtg agaccagtag
 3840
 actgtcggta tgaacgtcga agagtctgcc acacactccg ggttcacaa cagtgccttc
 3900
 gcgtctctta cttttgtaga aggaaatgca gcctctgagt tttctccaag aaatcattga
 3960
 tgaaagggtg aaaagatggg tatcaccgg agttcatgac aagccctggc tcagacacgt
 4020
 gagcaaggct tacagcccca aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagataggag
 4080
 aaaaaaatgg gtagttggag ggttgatcaa cttacttcct ctcaaacata tatatctcat
 4140
 ctaagtgtgc aggggaaaac tctgtagaac tactgggata cctgctcacc ccaggagcc
 4200
 tcatgaataa gtctctgctt ctgccttgta gccatgagca ttactgcacc tgataccct
 4260
 gcagcttcct aggggaagagg gaggaagtga cttggccct gtctgggtta ggtaagagga
 4320
 gataaatccc ttctcattga ttagggtag aggggtcatg tgctctatca ttggtgaccc
 4380

10

20

30

40

【化 8】

agttgggaca tgggtttata ccaaagtcac cactctgagg ttctgtgtac caccaggctg
 4440
 aactcccata tcctacatgg acataggaca acaccaagca gaaggagggt ttaggactaa
 4500
 actgaaggac agagatgcgg ttcttaaaca actagggagt gccagggcca gcctctctaa
 4560
 ccactatagg acaactgtgga gtctggttac aaagagagat tactcaaggt ccttagcact
 4620
 gattacagag catatctcag atgccttctg ctgaccagat gtatctttgc ataactgtcc
 4680
 tatccagatt cagaaaattg atgccacata gccaaagtga ctttcaggaa cagacgattt
 4740
 aaaaacaggc agagagatgt gagagaaagg agaaggagag agagaaggga gagggagaga
 4800
 agagagaggg agacggagaa ggaaagaggg agaaggagaa ggagagaagg ggcattggaca
 4860
 gagggaggga cagaaggaga gaggagatag agagggggat aaggaagaag ggaggagggg
 4920
 agagagagag aaggctaagt ctttccatac ctgggtccca atacctctta taacccaagc
 4980
 acatggtttc acatatcaca atgcgggttg gatatagata actgtaaata cttgtgaaaa
 5040
 taatggggct gagatctggg gttttcatga tagtttcaaa gtcaccgtac tgactaaaac
 5100
 cttccactgg cccatctcca gcttctaat ctgaggggat caaatttccc actaagtgtg
 5160
 tttagaaaga tctccacctt ttgccccttg tcttccagtg cccacctac gttctggtct
 5220
 cccacatctg atgtcttctc agtgattctg gccctgcctg ctccacagct acaaaccctt
 5280
 tcctataatg agctctgtgc tgagccatca tcctgaatca atccacctta agcagatgtt
 5340
 ttgcttattt ttctgtgtc cactactacag aggaaaggta ggcattgtag agctgaagca
 5400
 tctcacctca ttccaagcac cctcagcttc taaatgtgcc cccttggttc cagaagtgc
 5460
 acctcaagca tctttttattc attcatctta gagggccaca tgtgctgtag tgttataaga
 5520
 tgaaatttaa agcattaatt attcctaaca agccaattaa acaagccaaa aacattcatc
 5580
 agtcattccc atggaacctc tgaagcatct tcctgctcta accttgggtt ttccagggt
 5640
 gctctgggat cacaggagct gtctgtcta ccagccatat aaaggcagac ctatcagaat
 5700
 tacaccagac ttctcaccat agactataaa agccagaata tcctggacag atgttataca
 5760
 gaaactaaga gaacacaaat gccagcccag gtactatac ccagcaaaac tctcaattac
 5820
 catcgatgaa gaaaccaaga tattccatta caagtccaaa ttacacaaat atctttccat
 5880
 aaatccagcc ctacaaagga tagcagatgg aaaactccaa cacaggtagg aaaactacac
 5940
 cctagaaaga gcactaaagt aatcatcttt caacacactc aaaagaagat aaccacacaa
 6000
 acataattcc acctctaaca acaaaaataa agtaggcaac aatcactatt ccttaatatc
 6060

10

20

30

40

【化 9】

tcttttaaca tcaatggact caattctcca ataaaaagac atagactaac agactgaata
 6120
 cataaacagg acacagcatt ttgctgcata aagcaaacac agcggttactt ttttttttct
 6180
 aaatgacatt ttttattaga tattgtcttt attgacattt caaatgttat cccctttcct
 6240
 ggttttaccct ctgaaatccc ctatctcctc cccctccccc tgctcaccaa tccaccact
 6300
 cccacttcca ggccctggca atccccata ttggggcata gagccttcac aggaccaagg
 6360
 tactctcctt gcattgatga ccaactagtc cattctctgc taaaaatgca gctagatcta
 6420
 tgagtccac catgttttct tttgttggtg gtttcatgcc agggagctct tggagtactg
 6480
 attggttcat attgttggtc tccctatggg gttacaaaac ccttcaactt cttgggtcct
 6540
 ttctctggct gcctcattgg ggaccttggt cgaagtccaa tggatgactg tgagcatcca
 6600
 cttctgtatt tgccaggcac tggcagagcc tctcagaaga cagctatata aagatcctgg
 6660
 cagcaagctc ttgttggtat ccacaaaagt gtctgggtgg tgtctatggg atggatcccc
 6720
 aaaggggcag tctctggatg gtcattcctt cagtctctgt tccacacttt gtctctttaa
 6780
 ctcttccat gactatttta ttctcctc taagaaggac cgaagtattc atactttggt
 6840
 cttccttctt gaaattcatg tgttttgtga attgtatctt tgatattccg aacttctggg
 6900
 ctaatatcca cttatcagtg agtgaatata atgtgtgttc ttatgtgatt gagttacctc
 6960
 actcaggatg atatcctcca gaaccatcca ttgtcttaag aatttaatga attcattggt
 7020
 tttaatatgct gaggagtact ccattgtgta aatgtaccac attttctgta cccattgttc
 7080
 tcttgaggga catctgggtt ctttaaagct tctggacatt aaatataagg ctgctatgga
 7140
 aatagtggag aatgtgtcct tattacatgt tggagcatct tctgggtata tgcccaggag
 7200
 tgctattgct ggatcctctg atagtactat gtccaatttt ctgaggaact gccaaactga
 7260
 ttacagagt ggttgtagca gcttgcaatt ccaccagcaa tggagaaatg ttccccttcc
 7320
 tccacatcct caccaacatc tgctgtcacc tcaatttggt cttagtattt cagacagggtg
 7380
 tgagggtgga tatcagggtt gtttggcatt tccctgatga ctagtatat tgaaaaaat
 7440
 tttaagtgtt tctcagccat tcagtattct tcagttgaga attcactgtt tagctctgta
 7500
 ctcagggttt tttaatatggg ttatttggtt ttctggagtc taacgtcttg aattctttct
 7560
 atatattgga tattagccct ctgtcatatt taggattggt aaagatcttt cccaatatgt
 7620
 tggctgcctt ttgtgtcct ttgccttaca gaaccttttt aattttatga ggtcccat
 7680
 gctaattctt cattttacag cacaagccat tgggtgttctg ttcaaaaatc tttccccctg
 7740

10

20

30

40

【化 10】

aaccctatct tcgaggatct tccccacttt ctccctctata agtttcagtg tctctattat
7800
tgtgctgagg ggtaccgaag ttcctattcc gaagttccta ttctctagaa agtataggaa
7860
cttccctagg gtttaaaccg gcggtggagc tctgatgtgg gaacgcttca gtgttcagga
7920
accatattgat ttattttaaaa tatagaatca aaagtaccaa tttgcagttt tgaaagattt
7980
attccagtgt aagcattagc aatgcaccaa catcagggtga tttctgaatc caacacgtct
8040
tatgtcctca tgatattaaa aaaaaaaaaa ggccatccag aactgtgaac ttgagttcta
8100
ccttggtccc tactgacatt cagattttct tttttgcatt ctctttatct tacaggagac
8160
aggaggggag ggctaactca ttttactttg gcttggtccct tgctggctct tgcccagaac
8220
gtaaagtagc ttgcaagtct tcaaactctaa aaatcttagt aactcctaca cgagtggcaa
8280
tgccaaagag cagtgcacaa aagaggaagt aaatacgacc aaagagtatt cttaaataca
8340
ccactggctc ttgtttttgt tttattgtgt gcctttgaac tggaggggac ccactgtcta
8400
tgctccact tagtccctct tctttgcact ctggaggctt ccaaccaaaa tgacaatggc
8460
aattccgatg attgtttacac actcctctaa aactgcattt ttctggggtg cagtcataac
8520
ccaaatgaga taaacttcca ctgcaagctc cttgatcaca gaacttactt ttggagcagg
8580
gggtaccatg tctcaccatt ccagcatctg ttgtttctgt cccacgatgt tcatcaagcc
8640
caaagcaggt aaaccagag ataatcgatt gatggaatga aacatgttct tgcaaatatg
8700
gaagattggt gacattggta cactgcaacc ttccacacag cttgtcctga tcagcacaag
8760
cattgaatgt gaggttttct tctgctctag tacaatgcc aaatcgaaac cgttgtttgt
8820
tgatgtcata gcacttaata ttagcattct tagcacttac accaaagatt tccatgcatt
8880
gtatgttgcg atcagtgcag ttacctttat agcagtaacc atcttctgag catgggtgtcc
8940
catcttgagc ataagtgtca tctgggcaaa tgtatttagt cccattacag tactctggaa
9000
gatcacatat gttctggata ggtctgcaga gtgtcccaga aggactgtaa gtgcaatttg
9060
cacagcataa ttctttatca caaatgctac caggtgttaa cctgcaatca tttccacagc
9120
agggatctga ataacatgcc ttttgggagc cacagtcaca ctgctcatcg ttatctactt
9180
tgaagtttcc acaaaaactta taagtcaatg atgtattata ataaacatga cggatcataga
9240
aaagacatgg catcagacca ggagtattaa gtatgttgct tatctctgca agggaacaat
9300
tgctgaaagc atctgttaat tgaggatgtc tgaacataat gcaggtgttc cttctctggc
9360
agacacagta cccctcatca tattttaagc ctaaactcct tccaacacga ttgggtatta
9420

10

20

30

40

【化 1 1】

taggagataa aaataaagga tttcgatcat atttaccaat acaaattagg gctaaggaag
 9480
 aacatatact cctctcagct ggattaacct ggttatcttg tggcccatac ttattaagta
 9540
 aaactcctgc atcaggctta aatttattat aaaagactga cacatagtaa ttataagccg
 9600
 accctcctgg aactgcaaac tcaagtcgaa atggatcaga attggtgtac acagtcatga
 9660
 gaaagacata gtaccgcata tgaagattgg tcagataggt gtccattaaa ctaatgactt
 9720
 gaaacaaata cccaacagta gatgaaagtt tgtcacctgc agcagaatta tatacagaat
 9780
 tggttgcttg aaagtggcct tttatagcag ctggatgtgt agcgtagttc ttactagata
 9840
 ttctgggagc tccatctgca tattccaatc tggaggaggg agaacctgta ttatggctcc
 9900
 agtgcttcca tgcattcata ggccctgtgt catcagactc agatactatc tgagaaacaa
 9960
 ggtgttcaaa gctctgtgaa tcattgaggg gtttgatttc ataggtaagg tcatctaact
 10020
 tcatgacccc tgacaggccc ccataacaag tatccacagt gaccatggat tgtgggatcc
 10080
 cctccaggta gccaatatag taacaatcta caggaaaaaa ggggtaatcc atctgtaagg
 10140
 ctccctgggc atcttgagtt gtcagcaaca agtgtctggg ccaaagtagt gtctttctcc
 10200
 gcagggtgat gatatgtctc tggccccgaa aatgcaagct atatgagagc agtctttgtg
 10260
 cttgaagtcc tttggatatg tagatctcct tccgaggaat aaccacctcc gatgagatgt
 10320
 aacgccagt aggatggcct tgagaacacc agactggaac caggaggagc agccagagt
 10380
 caaatagcaa gaggaggacc ctggggacca caggctcttc cactagcctc atgccccagg
 10440
 tcagagataa catcctgggt ggagctaaat ccctctgctg tggccactgc ctggtctaga
 10500
 aaatactgac agaggactaa aaacctcctc aggcctccaa cctaagtggg taccagaca
 10560
 actggagtta ggtaacagtc actgggtgtg gcagggaattg agtctgaatg tgtagctga
 10620
 gggtgaggtt aaatattgtc aaaagggtg tctataaatg tgcttgaca agaaaagtca
 10680
 gaagcagcaa ggagtgtctc tgacaggctc aatcctttct tttctttttt tgaagttcaa
 10740
 aatatcattt ccacgtgaat gtatttggtt cccagtgtga ctctgggtct ctttctagga
 10800
 gtcaatatct ctttatatct tggctcatgt ttctcacagt tgttctaatt tcttgttttg
 10860
 ttttgtttgt ttgtttgaac gtagtagta aatactgtct atattagcct ttagctata
 10920
 aatgattgtt tttatttctt ctaatcatat tttgtttgag ttttggttaa actatttaca
 10980
 aatgagtttt ttttttttcc ttttgggtgt tgctcgaaag tttggagctt totgttaata
 11040
 ttgtgttgtt atttttccaa tattattaga cctgagaatt ctatctgggt acctgtgaac
 11100

10

20

30

40

【化 1 2】

tctagaattt ttaaaaattc catctcttgg gaacattacc tctgaccccg tctgaggccg
 11160
 aagtggctgt cccctccaa cctttagtagt ctttctttcc tgactattgg gattttcttca
 11220
 agcaatcagg ctgatgggtt ctcagcagtg agaccagtag actgccggta tgaacgtcga
 11280
 agagactgcc acacactcca ggttcatcaa cagtgccttc gcgtctctta cttttgtaga
 11340
 aggaaaagca gcctctgagt tatctccaag aaatcattaa tgaaagagtt aaaagatggg
 11400
 tatcaccggg agttcatgac aagccctggc tcagacacgt gagcaagggtc tacagcccca
 11460
 aagataggct gccctgcaac atgtatttat aagatagaag aaaaaaatgg gtggttgagg
 11520
 gggtgatcaa cttacttcct ctcaaacata tatatctcat ctaagtgtgc aggggaaaac
 11580
 tctgtaggac taactgggatt gttattatca ttattattat tattattatt attattatta
 11640
 ttattattat tattaactta aggcatttta ttagatatatt tcttcattta gttttcaaat
 11700
 gttatcccg gaacctccta tactctctcc ctgccctgct cccaaccca cccactccta
 11760
 catcctggcc ctggcattcc cctatactgt ggcagatgat cttcgtaaga ccaagagcct
 11820
 ttctctccat tgatggccta ctaggctatc ctcttttaca tatgcaacta gagtcacagc
 11880
 tctggggagg tattgcttag ttcatattgt ttttctcct ataggggttc agatcccttt
 11940
 agctccttgg gtactttctc tagctcctcc attggggggc ctgtgttcca tccaatagat
 12000
 gactgtgagc atccacttct gtatttgcca ggtattggca tggatcttac tgcaccttct
 12060
 gaactctcta agcagctttc ctggtcacct ccaggagcct catgaataag tctctgcttc
 12120
 ccccttgtgg ctatgagcat tactgcacct gatacacct gcagcttcct aggggaagagg
 12180
 gaggaagtgg cttggccctt gtctgggtta ggtaagagga gataaatccc ttctcatgaa
 12240
 ttaggggtgag aagggtcatg tgctctatca ttggtgacca acttggggac atgggcttat
 12300
 acagtcatca ctctgaggct ctgtgtacca ccagactgaa ctcccatatc ctacatgcac
 12360
 ataggacaac accaagtaga aggaggtttt aggactaaac tgaaggacag agatgggggtt
 12420
 tctaaacaac tagggagtgc cagggccagc ctctctaacc actataggac actatggagt
 12480
 ctggttacaa agagagatta ctcaagggtc ttagcactga ttacagagca tatctcagat
 12540
 gccttctgct gaccagatgt atctttgcat aatctgccta tccagattca gaaaattgat
 12600
 gccacatagc caagtggact ttcaggaaca gacgatttaa aaacaggcag agagatgtga
 12660
 gagaaaggag aaggagagag agaagggaga gggagagaag agagagggag acggagaagg
 12720
 aaagagggag aaggagaagg agagaagggg catggacaga gggagggaca gaaggagaga
 12780

10

20

30

40

【化 1 3】

ggagatagag aggggggataa ggaagaaagg agggaggag agagagagaa ggctaagtct
 12840
 ttccatacct ggggtcccaat acctcttata acccaagcac atgggtttcag atatcacaat
 12900
 gcggttgga tatagataac tgtaaatact tgtgaaaata atggggctga gatctgggg
 12960
 tttcatgata gtttcaaagt cactgtactg actaaaacct tccactggcc catctccagc
 13020
 ttgttaatct gagggtatca aatttccac taagtgtgtt tagaaagatc tccacctttt
 13080
 tgccctagtc ttccagtgc ccacctacgt tctggctctc cacatctgat gtcttctcag
 13140
 tgattctggc cctgcctgct ccacagctac aaacccttc ctataatgag ctctgtgctg
 13200
 agccatcatc ctgaatcaat ccaccttaag cagatgtttt gcttattttt cctgtgtcca
 13260
 tactacagag gaagggtagg catgtagaag ctgaggcatc tcatctcact ctaagcacc
 13320
 tcagtctcta aatgtgcccc ttgtttcca gcagttcagc ctcaagcatc ttttattcac
 13380
 tcgtcttaga gggacacatg tgctgtagtg ttataagatg aaatttaaag cattagttat
 13440
 tccaacaag ccaattaaac aagccaaaaa cattcatcag tcattcccat ggaacctctg
 13500
 aagcatcttc ctgctctaac cttgagtttc ctagggtgc tgtgggatca caggagctgt
 13560
 cctgtttacc agcctatcct gtccacggg attcagttat tagtgggtgc gagggggacc
 13620
 gcaaacctgg aagaaaatgg gattggaaga gaaaagagaa acgaagacca agtagatctt
 13680
 ttccatcaa ggtcttcgtt tattaggctg aggtgcctgg tgtaaagcat gcatcgcggg
 13740
 gaataggaag gggtcgagg ggaattttac aaagaacaaa gaagcgggca tctgctgaca
 13800
 tgagggccga agtcaggctc caggcagcgg gagctccacc gcggtggcgc catttcatta
 13860
 cctctttctc cgcacccgac atagataaag ctta
 13894

10

20

30

<210> 4
 <211> 251
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

40

<400> 4
 ccagcttcat tagtaatcgt tcatctgtgg taaaaaggca ggatttgaag cgatggaaga
 60
 tgggagtacg gggcggttga agacaaagtg ccacacagcg cagccttcgt ctagaccccc
 120
 gggctaacta taacggtcct aaggtagcga ggggatgaca gattctctgt tcagtgcact
 180

【化 1 4】

caggggtctgc ctccacgaga atcaccatgc cctttctcaa gactgtgttc tgtgcagtgc
 240
 cctgtcagtg g
 251

<210> 5
 <211> 245
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

10

<400> 5
 aggggtcgag ggggaatttt acaaagaaca aagaagcggg catctgctga catgaggggc
 60
 gaagtcaggc tccaggcagc gggagctcca ccgcggtggc gccatttcac tacctctttc
 120
 tccgcacccg acatagataa agcttatccc ccaccaagca aatcccccta cctggggccg
 180
 agcttcccgat atgtgggaaa atgaatccct gaggtcgatt gctgcatgca atgaaattca
 240
 actag
 245

20

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 6
 caggtacagc tgcagcagtc a
 21

30

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 7
 ggagatggca caggtgagtg a
 21

40

<210> 8
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

【化 1 5】

<400> 8
tccaggactg gtgaagc
17

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

10

<400> 9
tagtcccagt gatgagaaag agat
24

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

20

<400> 10
gagaacacag aagtggatga gatc
24

<210> 11
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

30

<400> 11
tgagtccagt ccaggga
17

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

40

<400> 12
aaaaattgag tgtgaatgga taagagtg
28

<210> 13
<211> 21
<212> DNA

【化 1 6】

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 13

aaccctgggc agaaactgcc a

21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 14

agagaaacag tggatacgt

19

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 15

aactacgcac agaagttcca gg

22

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 16

gctcgtggat ttgtccgc

18

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 17

cagagtcacg attacc

16

10

20

30

40

【化 17】

<210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 18
 tgagcagcac cctcacgtt
 19

10

<210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 19
 gtggcctcac aggtatagct gtt
 23

20

<210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 20
 accaaggacg agtatgaa
 18

30

<210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 21
 gctagtagtg gggcctacag gccttttgat atc
 33

40

<210> 22
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

【化 1 8】

<400> 22
 gcaaaaagccc aggggagtgaggagctactac acctatgctt ttgatatc
 48

<210> 23
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

10

<400> 23
 gcgagagagg gtatagtggg aactactgag gactttgatt ac
 42

<210> 24
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

20

<400> 24
 gcgagaggga cagtgggagc cctctttgac tac
 33

<210> 25
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

30

<400> 25
 gcgaaaccta gtgggagcta ctcttggttc gacccc
 36

<210> 26
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

40

<400> 26
 gcgagaggag gaggggtataa ctggaactcg aatgcttttg atatc
 45

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA

【化 19】

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 27

gcgagaggat ataactggaa ctactttgac tac
33

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 28

gcgaaagagt ataactggaa ccactggtag tttgactac
39

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 29

gcgagagaga taactggaac cccctttgac tac
33

<210> 30

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 30

gcgaggggat ataactggaa cttttctttt tttgactac
39

<210> 31

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 31

gcgagaggta actggaactc tctgggcttt gactac
36

10

20

30

40

【化 2 0】

<210> 32
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 32
gcgaaaaggg ctactatggt tcggggagct cttgactac
39

10

<210> 33
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 33
gcgagagata ttactatggt tcggggaggt attataacga aggtctacgg tatggacgtc
60

20

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 34
gcgagagagt atagcagctt tgactac
27

30

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 35
gcgagagaga gtatagcagc tcgttgtagc tac
33

40

<210> 36
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

【化 2 1】

<223> synthetic

<400> 36

gcaagagagg ataggagctc gcccctcggg tactttgact ac
42

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> synthetic

<400> 37

gcgagagatc ttggggaagg ctac
24

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> synthetic

<400> 38

accacccata actggggagg gtttgactac
30

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> synthetic

<400> 39

gcgagagata ggggaccg
18

<210> 40

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> synthetic

<400> 40

caacagagtt atagtacccc tccggagacg
30

<210> 41

<211> 27

【化 2 2】

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 41
caacagctta atagttaccc tcggacg
27

<210> 42
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 42
caacagctta atagttacca ttcact
26

<210> 43
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 43
caacatttta atagttaccc gtcact
27

<210> 44
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 44
cagcagtata ataactggcc ttcact
27

<210> 45
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 45

10

20

30

40

【化 2 3】

ctacagcata atagttaccc gtggacg
27

<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

10

<400> 46
ctacagcata atagttaccc tcggacg
27

<210> 47
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

20

<400> 47
cagcagtatg gtagctcacc tcggacg
27

<210> 48
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

30

<400> 48
atgcaaggta cacactggcc gtggacg
27

<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

40

<400> 49
atgcaagggtt cacactggcc gtacact
27

<210> 50
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

【化 2 4】

<220>
<223> synthetic

<400> 50
atgcaaggta cacactggcc gtcact
27

<210> 51
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 51
caacagtatg ataatctccc tcccact
27

<210> 52
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 52
caacagtatg ataatctccc attcact
27

<210> 53
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 53
caacagtatg ataatctccc cgtcact
27

<210> 54
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 54
caacagtatg ataatctccc gatcacc
27

<210> 55

10

20

30

40

【化 2 5】

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 55
caacggattt acaatgccga cacc
24

10

<210> 56
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 56
caacagagtt acagtacccc catgtacact
30

20

<210> 57
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 57
caacagagtt acagtacccc tctcact
27

30

<210> 58
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic

<400> 58
caacagagtt acagtactcc toccact
27

40

【図 4 B】

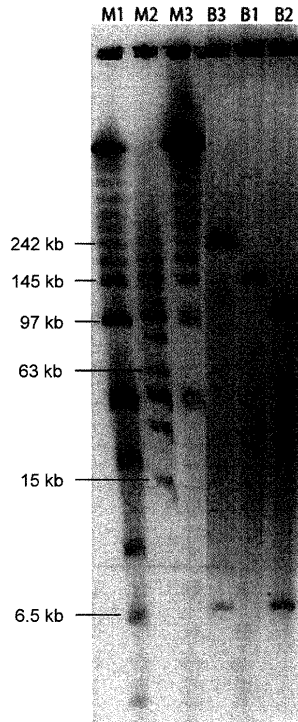


FIG. 4B

【図 6】

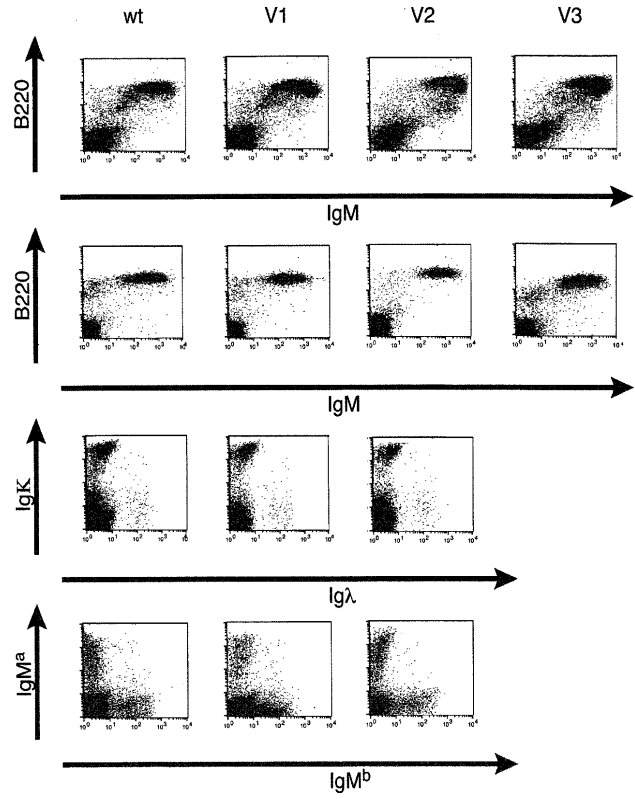


FIG. 6

【図 7 A】

3'V _H	N	D _H	N	5'J _H
(3-72) GCTAG	(D _H 1-26) GGTATAGTGGAGCTACTAC	TAGTGGGcCTAC	AGGC	CTTTTGTATTC (3)
(3-9) GCARAAG	CCGAGGG	AGTGGGAGCTACTAC	ACCT	ATGCTTTTGTATTC (3)
(3-7) GCGAGAGA	G	GGTATAGTGGAGCTACT	GAGG	ACTTTGTACTAC (4)
(4-59) GCGAGAG	GGAC	AGTGGGAGC	CCT	CTTTGTACTAC (4)
(3-23) GCGAAA	CC	TAGTGGGAGCTACT	C	CTGGTTGCAACCC (5)
(4-34) GCGAGAGG	AGGAG	(D _H 1-7) GGTATACTGGAGCTACTAC	CGA	ATGCTTTTGTATTC (3)
(1-2) GCGAGAG	GA	GGTATACTGGAGCTACTAC	CTC	ACTACTTTGTACTAC (4)
(3-23) GCGAAGA	G	TATACTGGAG	TGG	TACTTTGTACTAC (4)
(3-7) GCGAGAGA	GGGA	ATACTGGAGC	CCC	CTTTGTACTAC (4)
(4-59) GCGAG	GG	TATACTGGAGCT	TTTCTTTT	TTTGTACTAC (4)
(4-39) GCGAGA	GG	TAACTGGAGCT	CTCTGGG	CTTTGTACTAC (4)
(3-30) GCGA	(D _H 3-10) GTATTACTAGTGGTTCGGGGAGTTATTAAC	TTACTATGTTTCGGGGAG	CTC	TTGACTAC (4)
(1-2) GCGAGAGA	AAAGGC	TATTACTATGTTTCGGGGAGTTATTAAC	GAAGGT	CTACGGTATGGACCTC (6)
(1-2) GCGAGAGA	GA	(D _H 6-6) GAGTATAGCAGCTGCTCC	CTATAGCAG	CTTTGTACTAC (4)
(3-48) GCGAGA	GG	GATATAGCAG	TG	TGACTAC (4)
(3-13) GCAAGAGA	GG	GATATAGCAGCTCGT	CTCGGG	TACTTTGTACTAC (4)
(3-7) GCGAGAGA	TCT	(D _H 7-27) CTAACTGGGGA	AGG	CTAC (4)
(3-15) ACCAC	CCA	TGGGGA	GGG	TTTGTACTAC (4)
(3-48) GCGAGA	GATA	TAACTGGGGA	GGGA	CCG (5)

FIG. 7A

【図 7 B】

3'V _K	N	5'J _K
(1-6) CAACAGAGTTATAGTACCCCTCC	GGA	GACG (1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTACCCCTC		GGACG (1)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTACCCCTC		ATTCACT (3)
(1-9) CAACAGCTTAATAGTACCCCTC		GCTCACT (4)
(3-15) CAGCAGTATTAATAGTACCCCTC		TCACT (4)
(1-17) CTACAGCATTAATAGTACCCCTC		GTGGACG (1)
(1-17) CTACAGCATTAATAGTACCCCTC		GGACG (1)
(3-20) CAGCAGTATGTTAGTACCCCTC		GGACG (1)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTGGACG (1)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GTACACT (2)
(2-30) ATGCAAGGTACACACTGGCC		GCTCACT (4)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCCCTC		CACT (3)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCCCTC		ATTCACT (3)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCCCTC	CG	TCACT (4)
(1-33) CAACAGTATGATTAATCTCCCTC		GATCACC (5)
(1-37) CAACGGATTTACAAATGCC	GA	CACC (5)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTC	CA	TGTACACT (2)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTC		TCACT (4)
(1-39) CAACAGAGTTACAGTACCCCTC		CACT (4)

FIG. 7B

【図 9 A】

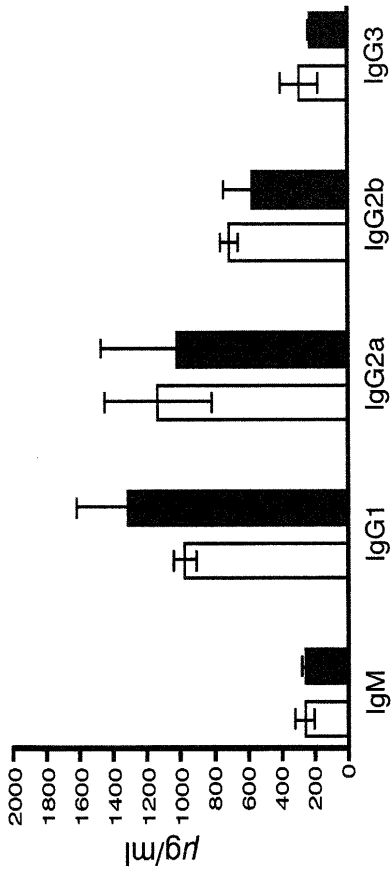


FIG. 9A

【図 9 B】

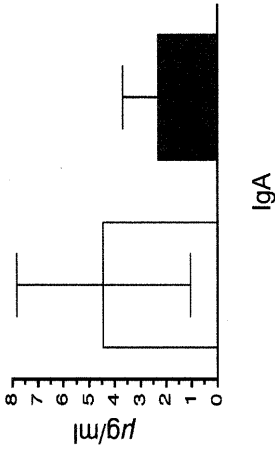


FIG. 9B

【図 9 C】

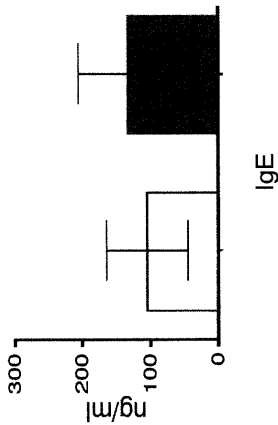


FIG. 9C

【図 17 A】

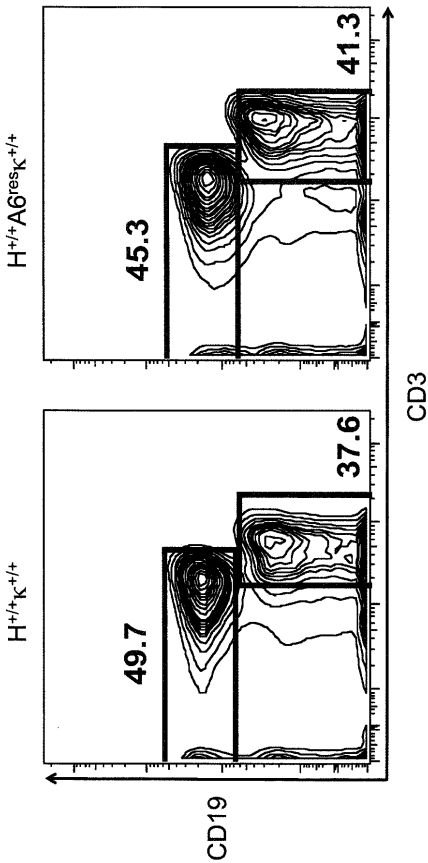


FIG. 17A

【図 17 B】

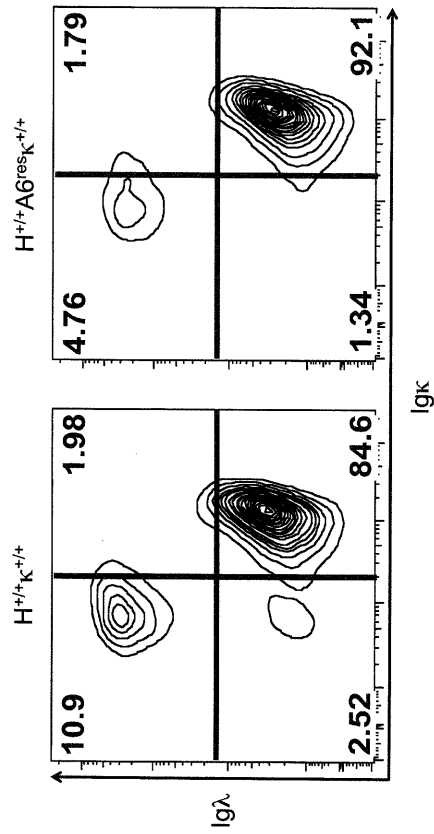


FIG. 17B

【図 18 A】

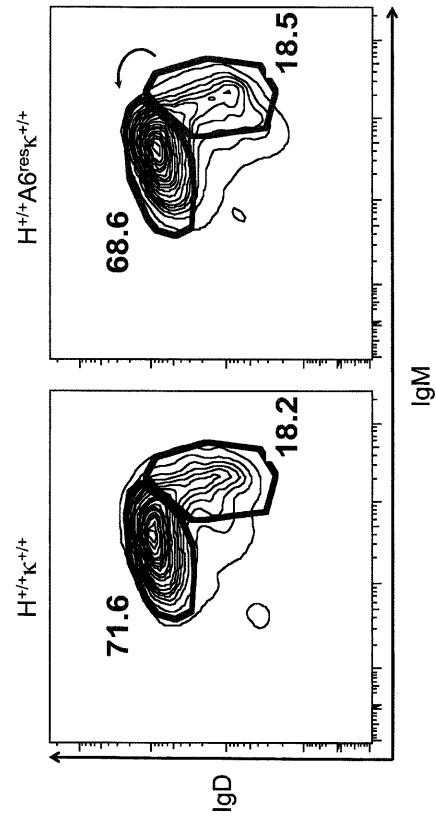


FIG. 18A

【図 1 A】

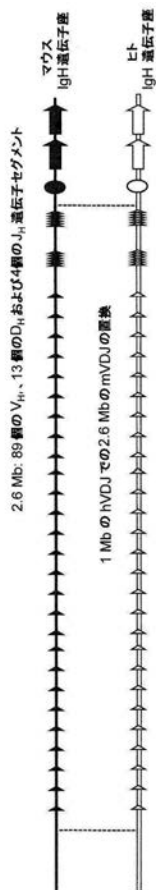


FIG. 1A

【図 1 B】

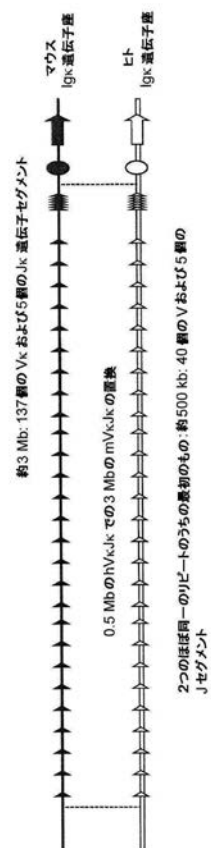


FIG. 1B

【図 2 A】

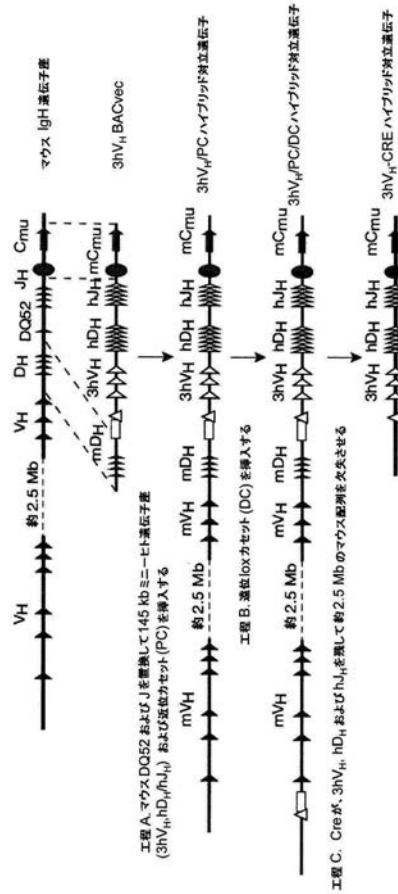


FIG. 2A

【図 2 B】

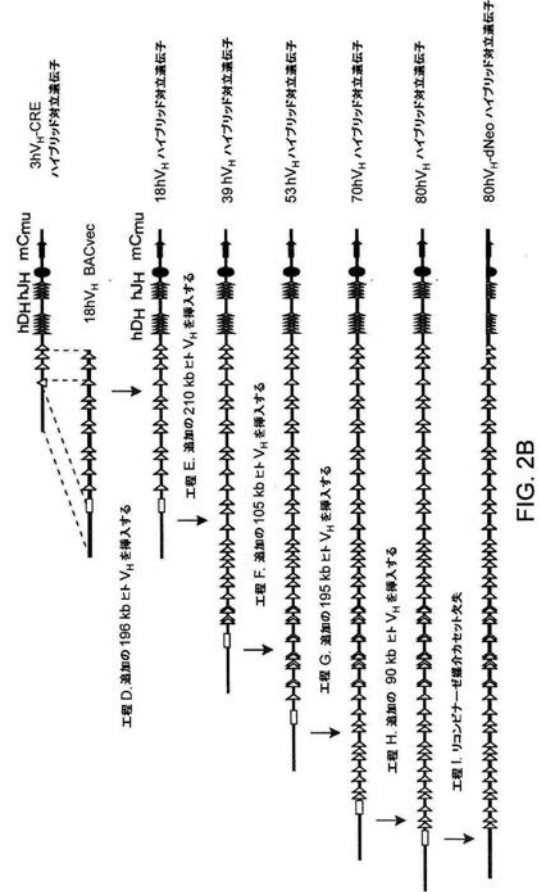


FIG. 2B

【図 2 C】

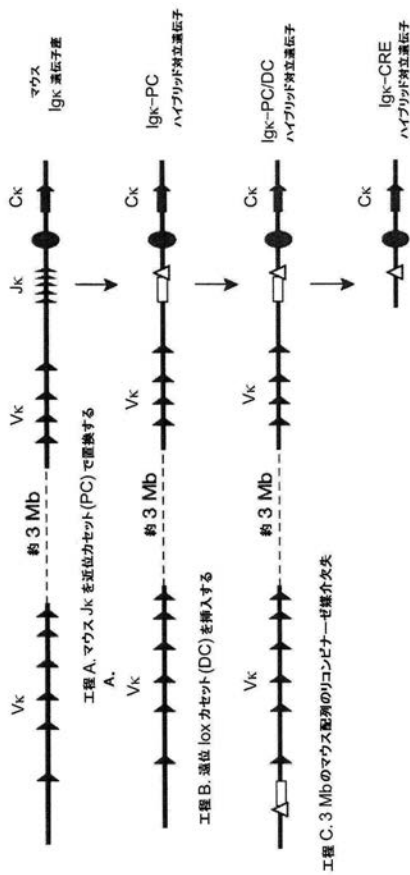


FIG. 2C

【図 2 D】

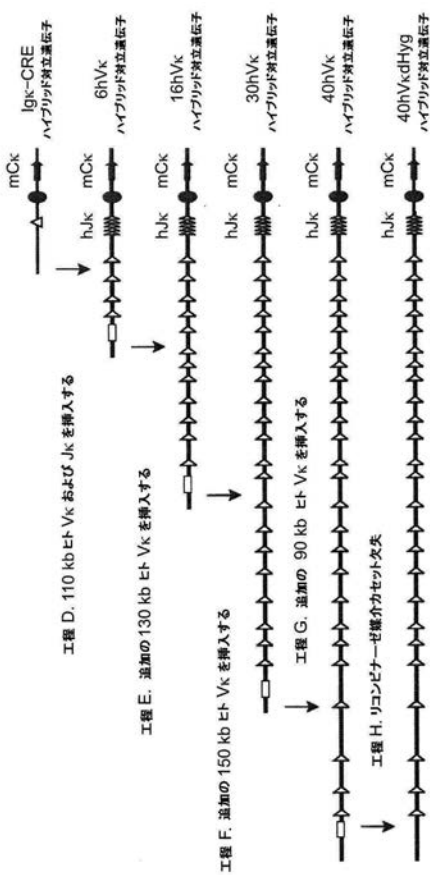


FIG. 2D

【図 3 A】

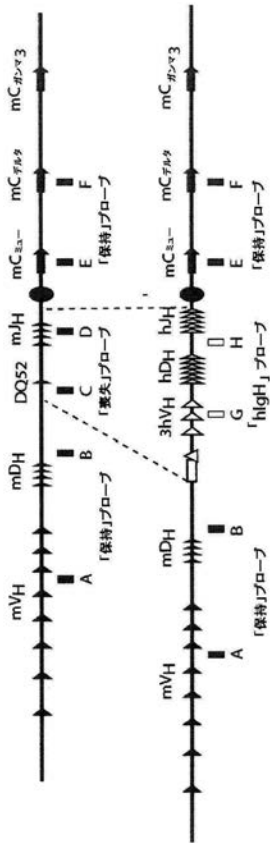


FIG. 3A

【図 3 B】

	A	B	C	D	E	F	G	H
親 ES	理論コピ一数	2	2	2	2	2	0	0
	実測コピ一数	1.9	1.8	2.1	1.8	1.9	<0.01	<0.04
改変 ES	理論コピ一数	2	2	1	1	2	1	1
	実測コピ一数	1.9	2.4	1.0	1.0	2.0	1.9	+

FIG. 3B

【図 3 C】

	コピ一数	D	H
WT マウス	理論数	2	0
	実測 1	1.71	<0.01
	実測 2	2.07	<0.01
	実測 3	2.16	<0.01
	実測 4	1.88	<0.01
	理論数	1	1
	実測 1	1.22	1.04
	実測 2	0.94	1.02
Het マウス	実測 3	0.85	0.95
	実測 4	1.02	1.00
	理論数	0	2
	実測 1	<0.01	2.37
Homo マウス	実測 2	<0.01	2.22
	実測 3	<0.01	2.43
	実測 4	<0.01	1.93

FIG. 3C

【図 4 A】

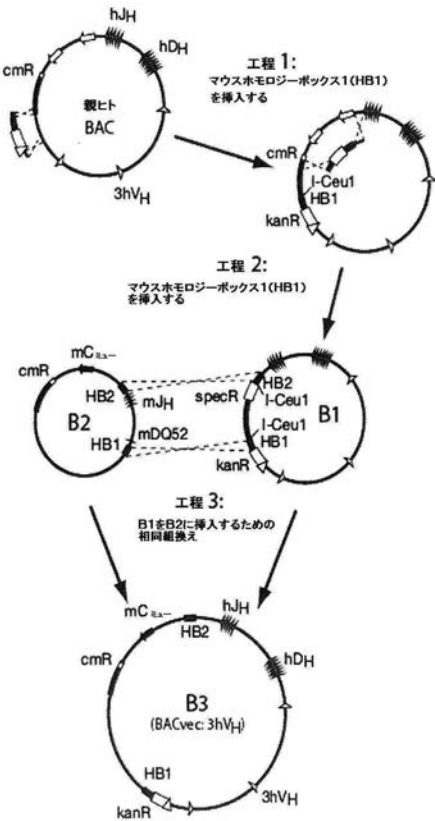


FIG. 4A

【図 5 B】

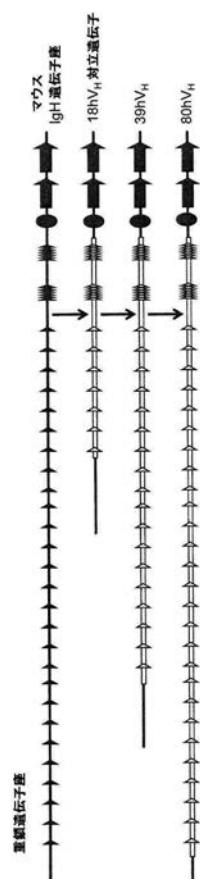


FIG. 5A

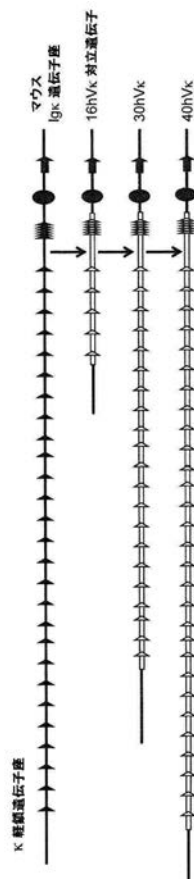


FIG. 5B

【图 8】

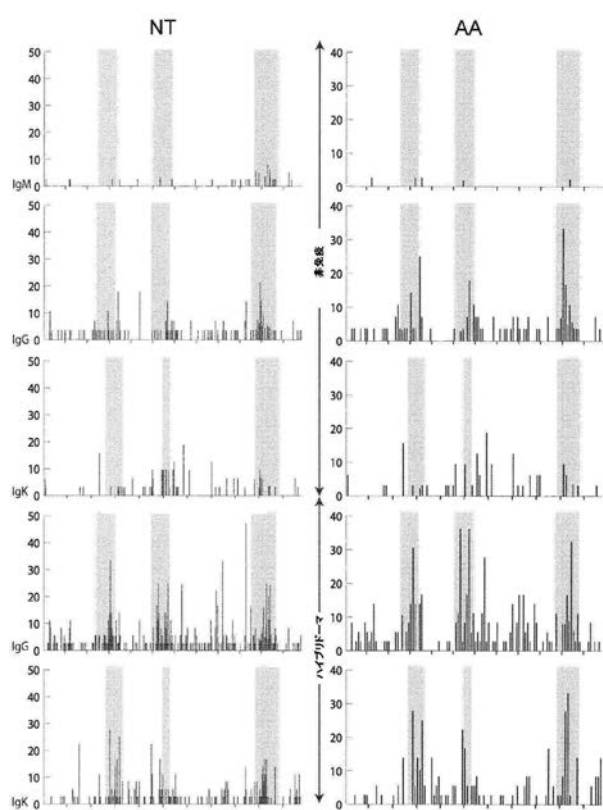


FIG. 8

【図 10 A】

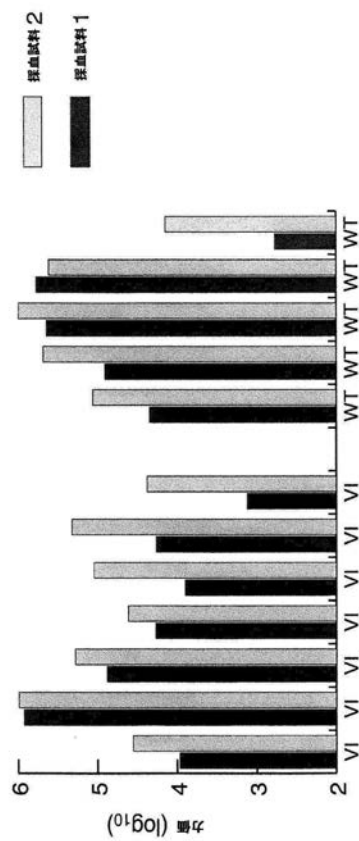
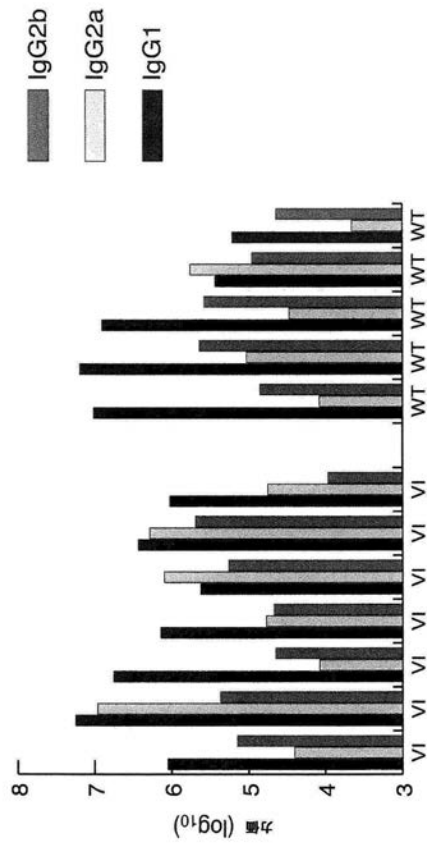


FIG. 10A

【図 1 0 B】



【図 1 1 B】

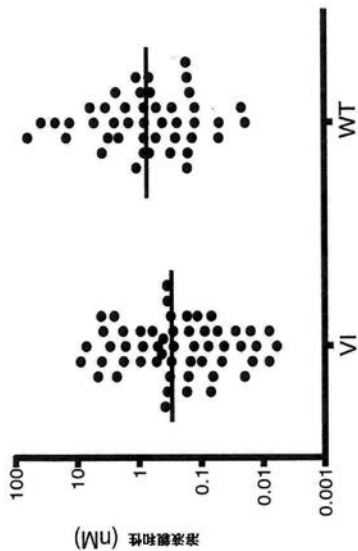


FIG. 11B

【図 1 1 A】

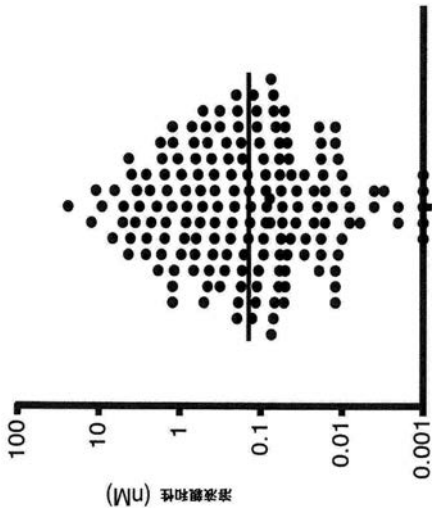


FIG. 11A

【図 1 2】

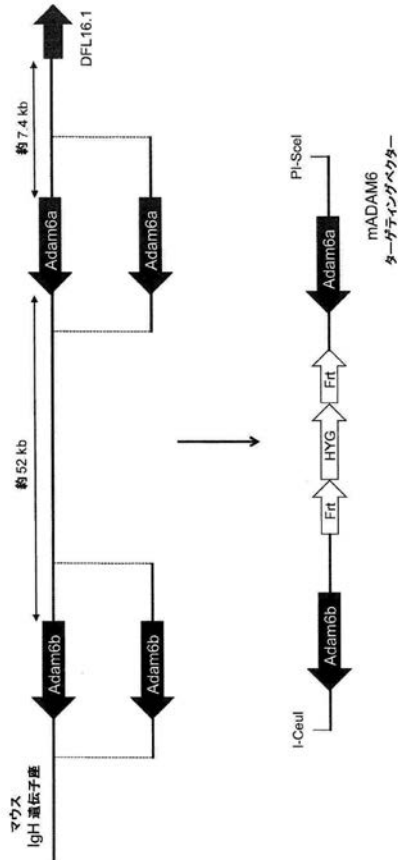


FIG. 12

【図 1 3】

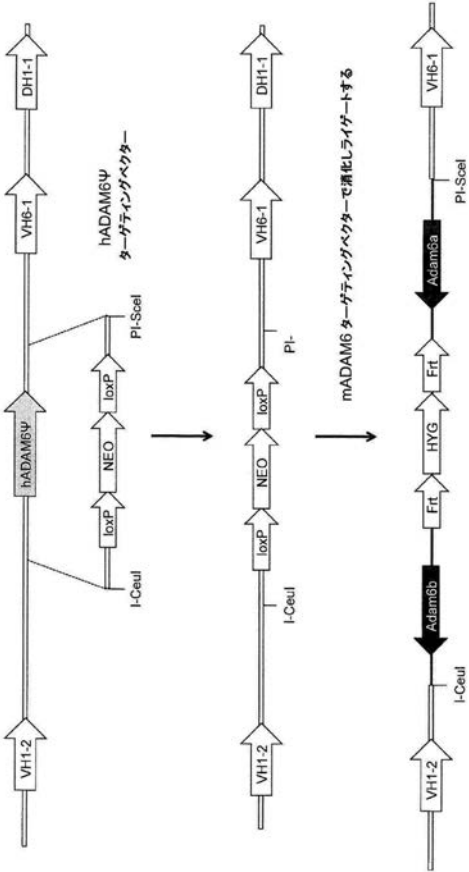


FIG. 13

【図 1 4 A】

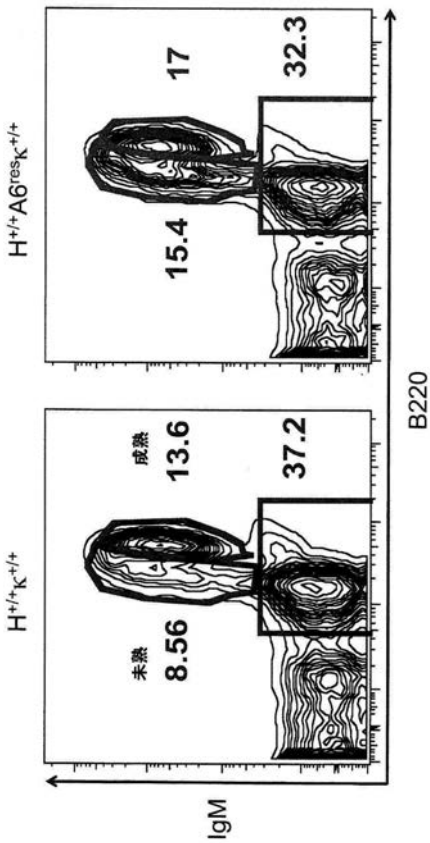


FIG. 14A

【図 1 4 B】

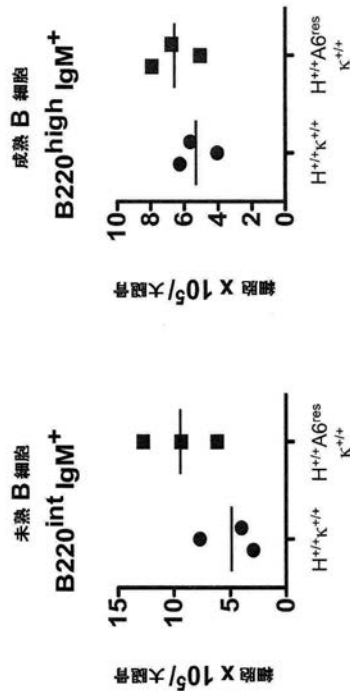


FIG. 14B

【図 1 5 A】

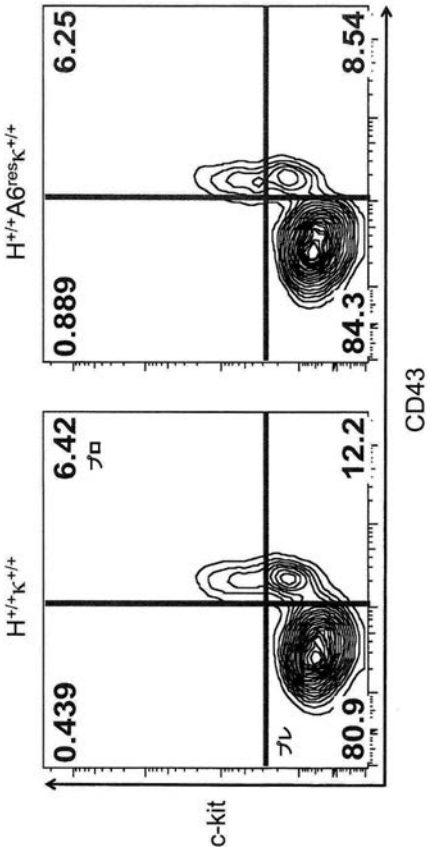


FIG. 15A

【図 15 B】

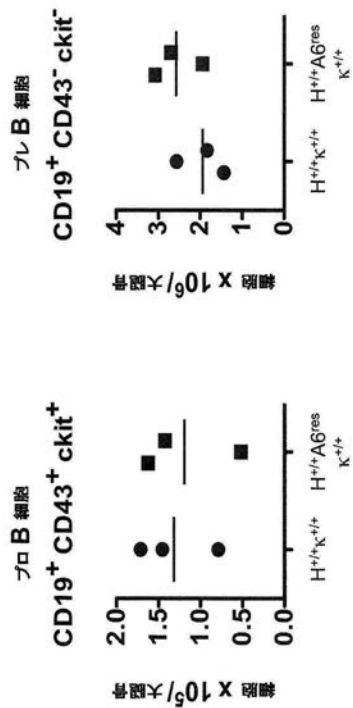


FIG. 15B

【図 16 A】

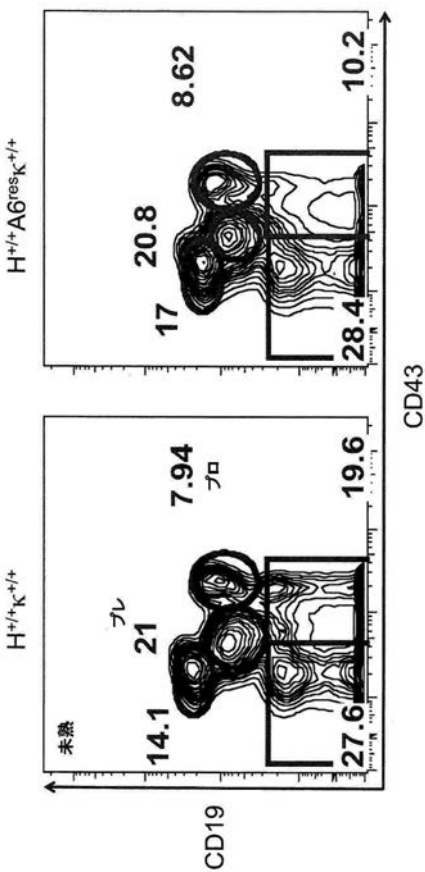


FIG. 16A

【図 16 B】

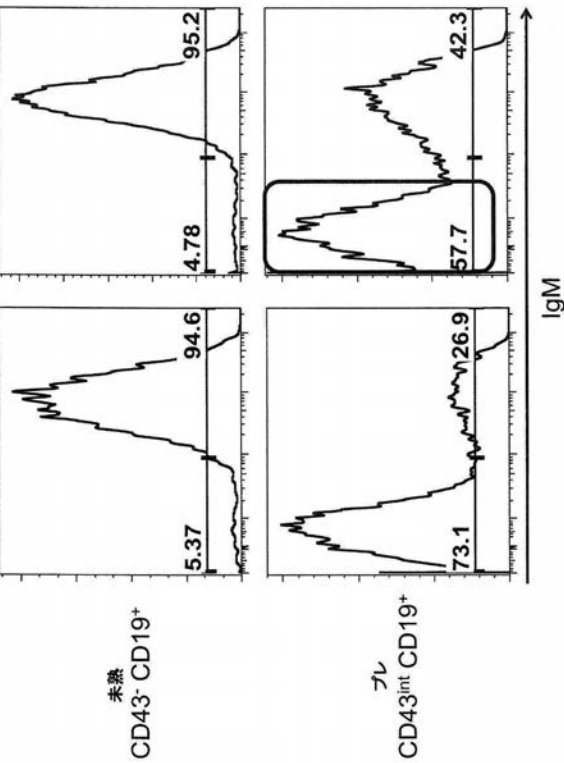


FIG. 16B

【図 17 C】

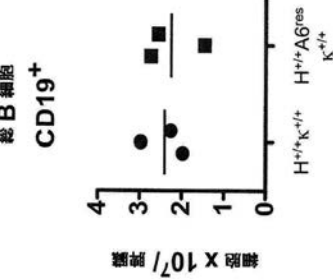


FIG. 17C

【図 18 B】

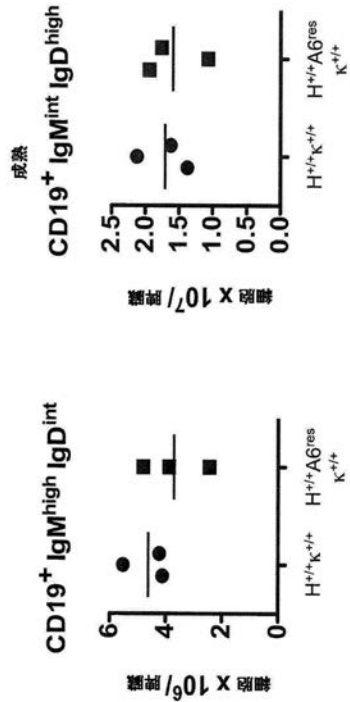


FIG. 18B

【図 19】

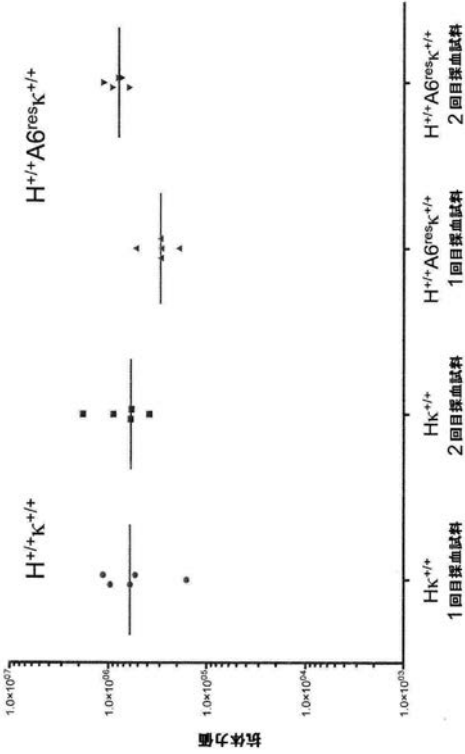


FIG. 19

【図 20】

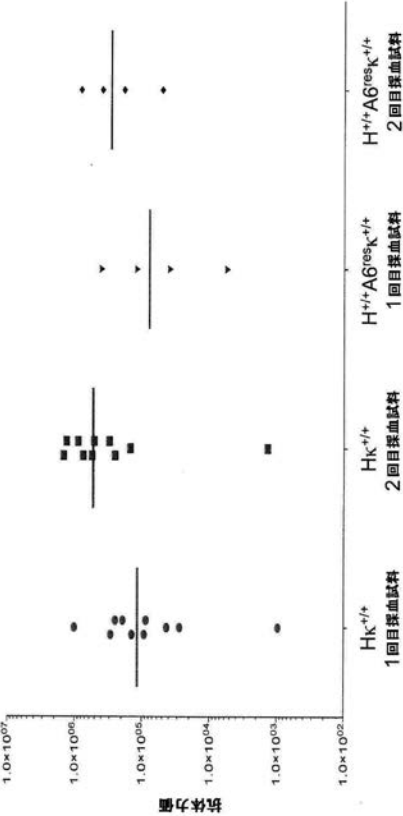


FIG. 20

【図 21】

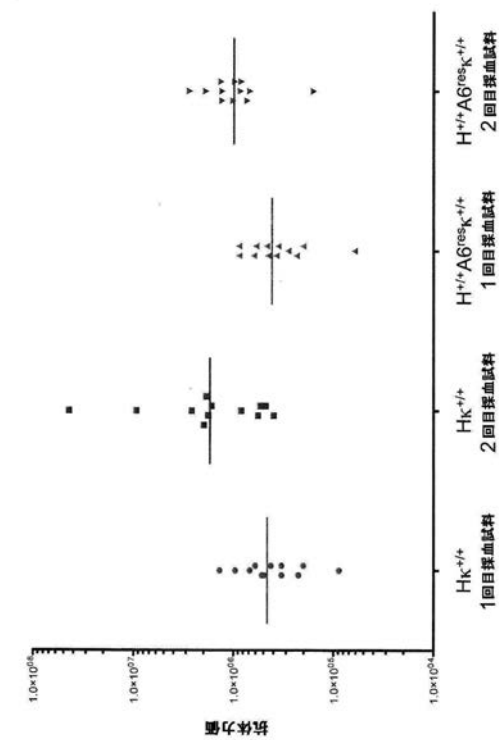


FIG. 21

【図 2 2】

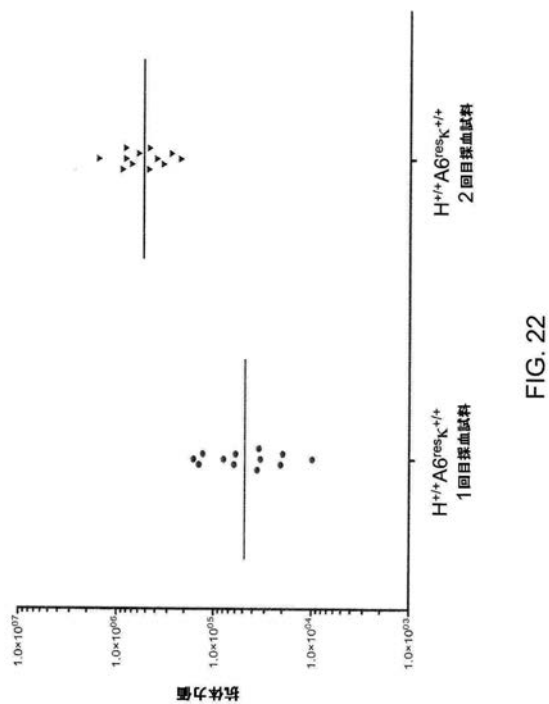


FIG. 22

【配列表】

2016135143000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 リン マクドナルド

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10605, ホワイト プレインズ, ゲドニー ウェイ 1
6

(72)発明者 ショーン スティーブンス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94158, サンフランシスコ, ベリー ストリート 3
55, ナンバー413

(72)発明者 アンドリュー ジェイ. マーフィー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10520, クロトニーオンーハドソン, ニュートン コー
ト 10

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01

4B065 AA91X AA91Y AB01 AB05 AC14 AC20 BA02 BA08 CA24 CA25

CA44 CA60

【外国語明細書】
2016135143000001.pdf