



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **328075**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19950244	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1993.07.23 PCT/US93/06926
(22)	Inng.dag	1995.01.23	(85)	Videreføringsdag	1995.01.23
(24)	Løpedag	1993.07.23	(30)	Prioritet	1992.07.24, US, 919297 1993.03.15, US, 31801
(41)	Alm.tilgj	1995.03.23			
(45)	Meddelt	2009.11.23			
(73)	Innehaver	Amgen Fremont Inc, 6701 Kaiser Drive, CA94555 FREMONT, US			
(72)	Oppfinner	Aya Jakobovits, 2021 Monterey Avenue, Menlo Park, CA 94025, US Raju S Kucherlapati, 8 Gracie Lane, Darien, CT 06820, US Sue Klapholz, 76 Peter Coutts Circle, Stanford, CA 94305, US Daniel G. Brenner, Redwood City, CA, US Daniel J. Capon, Hillsborough, CA, US			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av en gjær-celle, en ikke-human pattedyrembrionisk ES celle, et kimært ikke-humant pattedyr og et transgent ikke-humant pattedyr samt gjær-celle og isolert ikke-humant pattedyr ES celle.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9110741 A1, WO 9110741 A1 DAVIES N.P. et al., Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer, Nucleic Acids Research, 1992, Vol. 20, No.11, side 2693-2698. HUXLEY C. et al., The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion, Genomics, 1991, Vol. 9, side 742-750.			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer ikke-humane vertspattedyr som kjennetegnes ved inaktiverede endogene Ig-loci og funksjonelle humane Ig-loci som gir respons på et immunogen slik at det dannes humane antistoff eller analoger derav. Vertsdyrene frembringes ved gjentatte genetiske modifikasjoner av embryoniske stamceller i forbindelse med avl. Forskjellige strategier benyttes for vilkårlig rekombinasjon av de humane loci eller ved analoge vertsloci. Det frembringes kimære og transgene pattedyr, særlig mus, som har stabilt integrerte, store xenogene DNA-segmenter. Segmentene innføres ved fusjon med gjær-sfæroplaster omfattende kunstige gjærkromosomer (YAC) som inkluderer de xenogene DNA-segmentene og en selektiv markør som f.eks. HPRT, og embryoniske stamceller.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for fremstilling av en gjærceelle, en ikke-human pattedyrembryonisk ES celle, et kimært ikke-humant pattedyr og et transgent ikke-humant pattedyr samt gjærceelle og isolert ikke-humant pattedyr ES celle.

5

INNLEDNING

Teknisk område

Området for denne oppfinnelse er fremstillingen av xenogene spesifikke bindingsproteiner i et levedyktig verts-pattedyr.

10

Bakgrunn

Muligheten for å frembringe transgene dyr er blitt revolusjonert ved at det er blitt mulig å dyrke murine embryo-stamceller og foreta genetiske modifikasjoner i disse cellene for senere overføring til mus-kimlinjen. Det er således mulig å endre endogene gener ved å introdusere fremmede gener i verten, særlig humane gener for dannelse av xenogene bindingsproteiner slik at det kan dannes dyrestammer som er i stand til å frembringe nye produkter. Ekspresjonen av slike gener in vivo i en dyremodell, kan gi mulighet for studier av funksjonen av genet, reguleringen av genekspresjon, dets bearbeidning, respons på forskjellige agens og lignende. Dyr med nye fenotyper inklusivt slike som etterligner en rekke sykdommer, kan dessuten frembringes. For eksempel er det interesse for innføring av en dominant mutasjon eller komplementering av en recessiv mutasjon. Avhengig av hvilket gen det er tale om, vil problemet med å oppnå den ønskede mutasjon variere betydelig. Mens noen utvalgte gener har vist seg å være relativt egnet for modifisering, har andre vist seg å være ekstremt resistente overfor modifisering.

På grunn av anledningen til å utvikle transgene dyr, er det betydelig interesse for å komme frem til nye fremgangsmåter som bedre sikrer fremstillingen av transgene dyr. Særlig når det er ønske om å innføre store DNA-fragmenter som omfatter hundrevis av kilobaser, er man meget opptatt av muligheten for å få ført de store fragmentene i intakt form inn i pattedyrceller, av effektiviteten av integrasjonen, funksjonsevnen til gener

30

som forekommer på fragmentet og overførselen til avkommets kimlinje. Dessuten bidrar slike fremgangsmåter for innføring av store DNA-fragmenter til å bestemme funksjonen av store DNA-fragmenter som er identifisert gjennom det pågående humangenom-prosjekt.

5 Særlig er det interesse for å fremstille xenogene spesifikke bindingsproteiner, for eksempel humane monoklonale antistoff, i små forsøksdyr som f.eks. mus. Monoklonale antistoff anvendes både diagnostisk og terapeutisk. På grunn av evnen til å binde seg til spesifikke epitoper, gir de en enestående mulighet til å identifisere molekyler som er bærere av
10 denne epitop, eller til, som sådanne eller sammen med en annen del, å rettes mot et spesifikt sete for diagnose eller terapi.

Monoklonale antistoff omfatter tunge og lette kjeder som går sammen om å danne et bindingsområde for epitopen. Hver av kjedene omfatter en variabel region og en konstant region. Aminosyresekvensen for den
15 konstante region er spesifikk for en bestemt isotype av antistoffet, så vel som for verten som produserer antistoffet.

På grunn av slektsskapet mellom sekvensen for den konstante region og arten som antistoffet stammer fra, kan innføringen av et xenogent antistoff i vertens vaskulære system, frembringe en immunrespons. Når det
20 xenogene antistoff innføres gang på gang, som ved kroniske sykdommer, blir det uhensiktsmessig å administrere antistoffet i og med at det hurtig vil bli nedbrutt og kan ha en uheldig virkning. Det har derfor vært gjort mange forsøk på å komme frem til en kilde av genetisk identiske eller allogetiske antistoff. En teknikk har involvert bruk av rekombinant DNA-teknologi, hvor
25 vertedyrets gener for tunge og lette kjeder ble identifisert og de regioner som koder for den konstante region, isolert. Disse regionene ble deretter forenet med den delen av en annen arts immunoglobulingener som koder for den variable region rettet mot en spesifikk epitop.

Selv om det resulterende kimære, delvis xenogene, antistoff er
30 vesentlig mer anvendelig enn et helt xenogent antistoff, har det fremdeles flere ulemper. Identifikasjonen, isoleringen og sammenkoblingen av de variable og konstante regioner er meget arbeidskrevende. Dessuten kan sammenkoblingen av en konstant region fra én art med en variabel region

fra en annen art, forandre de variable regionenes spesifisitet og affinitet, slik at de ønskede egenskaper til den variable region går tapt. I den variable region finnes dessuten struktur- og hypervariable sekvenser som er spesifikke for en art. Disse struktur- og hypervariable sekvensene kan resultere i uønskede antigene responser.

Det ville derfor være mer fordelaktig å fremstille allogenetiske antistoff for administrering til et vertsdyr ved å immunisere dyret med et immunogen av interesse. For primater, og særlig for mennesker, er dette ingen praktisk fremgangsmåte. De humane antistoff som er blitt fremstillet, har vært basert på tilfeldig forekomst av en tilgjengelig milt fra en vert som tidligere var blitt immunisert mot den interessante epitop. Selv om humane lymfocytter i perifert blod kan benyttes til produksjon av monoklonale antistoff, har dette ikke vært særlig vellykket ved fusjoner og har vanligvis kun ført til IgM. Det er dessuten spesielt vanskelig å frembringe en human antistoff-respons mot et humant protein, et ønskelig mål for mange terapeutiske og diagnostiske anvendelser. Det eksisterer derfor betydelig interesse for å finne alternative måter for fremstilling av allogenetiske antistoff for mennesker.

Relevant litteratur

WO 91/10741 beskriver ikke-humane pattedyrverter kjennetegnet ved inaktiverede endogene Ig loci og funksjonelle humane Ig loci for respons overfor et immunogen for å produsere antistoffer eller analoger derav.

Thomas & Capecchi (1987), Cell, 51:503-512 og Koller & Smithies (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935 beskriver inaktivering av $\beta 2$ -mikroglobulin-locuset ved homolog rekombinasjon i embryoniske stamceller. Berman et al. (1988), EMBO J. 7:727-738 beskriver det humane Ig-VH-locus. Burke, et al. (1987), Science, 236:806-812 beskriver kunstige gjærkromosomvektorer. Se også Garza et al. (1989), Science 246:641-646 og Brownstein et al. (1989), Science, 244:1348-1351. Sakano et al., beskriver et diversitets-segment av genene for immunoglobulin tung kjede i Sakano et al. (1981), Nature, 290:562-565. Tucker et al. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7684-7688 beskriver gensekvensen for den tunge kjede i muse-IgA. Blankenstein & Kruwink (1987), Eur. J. Immunol., 17:1351-

1357 beskriver den variable region av tunge kjeder hos mus. Se også Joyner et al., (1989), Nature, **338**:153-155, Traver et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **86**:5898-5902, Pachnis et al., (1990), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **87**:5109-5113 og PCT-søknad PCT/US91/00245. Bruggemann et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **86**:6709-6713 (1989); Behring Inst. Mitt. **87**:21-24 (1990); Eur. J. Immunol. **21**:1323-1326 (1991), beskriver monoklonale antistoff med humane tunge kjeder. Albertsen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **87**:4256-4260 (1990), beskriver konstruksjonen av et bibliotek av kunstige gjærkromosomer som inneholder humane DNA-fragmenter.

Kunstige gjærkromosomvektorer er beskrevet av Burke et al., Science, **236**:806-812 (1987). Pavan et al., Mol and Cell Biol. **10**(8):4163-4169 (1990) beskriver innføringen av en neomycinresistens-kasett i det human-avlede innskudd i kunstige gjærkromosomer ved å benytte homolog rekombinasjon, og overføring til en embryonal karsinom-cellelinje ved å benytte polyetylenglykol-mediert sfæroplast-fusjon. Pachnis et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **87**:5109-5113 (1990), og Gnirke et al., EMBO Journal, **10**(7):1629-1634 (1991), beskriver overføring til pattedyrceller av et kunstig gjærkromosom som bærer humant DNA. Eliceiri et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **88**:2179-2183 (1991), beskriver ekspresjonen i museceller av kunstige gjærkromosomer som inneholder humane gener. Huxley et al., Genomics, **9**:742-750 (1991), beskriver ekspresjonen i museceller av kunstige gjærkromosomer inneholdende det humane HPRT-gen. Mortensen et al., Mol and Cell Biol. **12**(5):2391-2395 (1992), beskriver bruken av høye konsentrasjoner av G418 for å dyrke heterozygote embryoniske stamceller for seleksjon av homozygote, mutasjonelt endrede celler.

Gjærprotoplastfusjon med musefibroblaster er beskrevet av Traver et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **86**:5898-5902 (1989) og Pachnis et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **87**:5109-5113 (1990). Davies et al., Nucl. Acids Res. **20**:2693-2698 (1992), beskriver målrettede forandringer i YAC. Zachau, Biol. Chem. **371**:1-6 (1990) beskriver det humane immunoglobulin lette (kappa) (IgK) locus; Matsuda et al., Nature Genetics, **3**:88-94 (1993) og Shin et al., EMBO, **10**:3641-3645 (1991), beskriver kloningen av det humane immunoglobulin tunge (IgH) locus i YAC.

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Xenogene spesifikke bindingsproteiner fremstilles i et ikke-humant levedyktig vertsdyr ved immunisering av vertsdyret med et passende immunogen.

5 Et foretrukket ikke-humant vertsdyr karakteriseres ved at: (1) det ikke er i stand til å produsere endogent immunglobulin tung kjede; (2) det i det vesentlige er ute av stand til å produsere endogene immunglobulin lette kjeder, og (3) det er i stand til å produsere xenogene immunglobulin lette og tunge kjeder for å danne et xenogent immunglobulin eller en immunglobulin-analog. Verten kan således ha et helt endogent immunglobulin-locus
10 erstattet med en del av, eller et helt, xenogent immunglobulin-locus eller ha et xenogent immunglobulin-locus innskutt i et kromosom i vertscellen og en inaktivert endogen immunglobulinregion. Disse forskjellige alternativene vil i det minste delvis, oppnås ved å benytte homolog rekombinasjon for
15 inaktivering eller erstatning ved immunglobulin-loci for de tunge og lette kjeder.

Det tilveiebringes dessuten nye fremgangsmåter for innføring av store segmenter, på minst 100 kb, av xenogent DNA, særlig humant DNA, inn i vertsdyr, særlig mus, ved å innføre et kunstig gjærkromosom (YAC)
20 inneholdende et xenogent DNA-segment på minst 100 kb, inn i en embryonisk stamcelle for integrering i stamcellens genom, seleksjon av stamceller som omfatter det integrerte YAC ved hjelp av en markør som forekommer i dette YAC, innføring av den YAC-holdige ES-celle i embryoer og utvikling av kimære mus fra embryoene. De kimære dyrene kan parres for å
25 gi dyr som er heterozygote for dette YAC. De heterozygote dyrene kan parres for å frembringe avkom som er homozygote for det integrerte YAC.

BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 er et diagram av inaktiveringsvektoren for den tunge kjedes J-region hos mus, som beskrevet i Eksempel I, infra.
30

Figur 2 er et diagram av DNA-restriksjonskartet for plasmidet pmH δ J og målmusens tung kjede J-gener, som beskrevet i Eksempel II, infra.

Figur 3 er et flow-cytometrisk plottdiagram av antistoff som farver for IgM-allotyper i musestammer, som beskrevet i Eksempel II, infra.

Figur 4 er et flow-cytometrisk histogram av antistoff som farver for IgM-allotyper i musestammer, som beskrevet i Eksempel II, infra.

5 Figur 5 er et diagram av inaktiveringsvektoren for gener for kappa konstant-regionen i muse-immunglobulin, som beskrevet i Eksempel III, infra.

Figur 6 er et diagram som viser utledningen av plasmidet pK.TK/Neo, som beskrevet i Eksempel III, infra.

10 Figur 7 er et diagram av restriksjonskartet av mål-locusets lette kjede, som beskrevet i Eksempel III, infra.

Figur 8 er et diagram av målvektoren for inaktivering av kappa lett kjede J- og konstante regioner og utformingen av målrettingsforsøket, som beskrevet i Eksempel IV, infra.

15 Figur 9 er et diagram som viser konstruksjonen av vektorer for inaktivering av kappa lett kjede J- og konstante regioner, som beskrevet i Eksempel IV, infra.

Figur 10 er et diagram av den endelige delesjonsvektor for inaktivering av kappa lett kjede J og konstante regioner

20 som beskrevet i Eksempel IV, infra.

Figur 11 er en illustrasjon av Southern blotting-analysen av celler med delesjon av lett kjede J og konstant region, som beskrevet i Eksempel IV, infra.

25 Figur 12 A-E er fotografier av resultatene av Southern blotting-analyse for karakterisering av yHPRT- og genomisk gjær-DNA integrert i ES-kloner, som beskrevet i Eksempel VI, infra (A = human repeterende Alu-sekvens; B, C = pBR322-spesifikke sekvenser for den høyre (B) og venstre (C) YAC-arm; D = gjær-Ty-repeterende sekvens; E = gjær-"single copy"-gen LYS2. Kortere eksponeringstider (12 timer for II sammenlignet med 48 timer for I) av yHPRT hvor Alu- og Ty-sekvenser ble benyttet som prober, er også vist.
30 Posisjonene av molekylvekt-markørene er avmerket. Skjemaer for høyre (a) og venstre (b) vektorarm og lokaliseringen av pBR322-avledede YAC-vektor-fragmenter er vist (= telomer; = gjær-avledede sekvenser,

0 = gjærcentromer; = pBR322-avlede sekvenser; = humant innskudd;
= EcoRI kloningssete; H = HindIII-seter).

Figur 13 A-D er fotomikrogram av resultatet av in situ hybridisering for å påvise integreringen av yHPRT- og genomiske gjær-sekvenser i ES-cellenes kromosomer, som beskrevet i Eksempel VI, infra (A, B = metafase-spredninger fra ESY-8-7-celler hybridisert til biotinylerte humane genomiske sekvenser og C = metafase-spredninger og D = interfase-kjerner fra ESY-8-6-celler hybridisert til biotinylerte repeterte gjær-DNA-sekvenser).

Figur 14 A, B, C viser det stabile bibehold av yHPRT under in vitro ES-celledifferensiering og overføring via kimlinjen hos mus, som beskrevet i Eksempel VI, infra (A: a, b = embryoide legemer; og differensierte celletyper: c = "blood islands"; d = kontraherende muskel; e = nerveceller; f = neurale tubuli dannet av ESY-kloner; B: Southern blotting-analyse av DNA ekstrahert fra differensierte ESY 5-2, 3-6, 8-5 og 8-6 (20 µg) og yHPRT i AB1380 (40 ng) ved å benytte a = human Alu-probe; b = gjær-Ty-sekvenser; C: Southern blotting-analyse av "tail DNA" (20 µg) fra 2 stykk aguti-farvet avkom (4-2 og 4-3) som skriver seg fra ESY-kimære hanner 394/95-2 ved å benytte a = humane Alu- og b = Ty-sekvenser; kortere eksponeringer (12 timer) av 8-6 og yHPRT med Ty som probe, er vist (II)).

Figur 15 A og B er fotografier av en elektroforese-gel som viser ekspresjonen av det humane HPRT-gen i forskjellig musevev, som beskrevet i Eksempel VI, infra (15A = påvisning av human HPRT-mRNA ved bruk av revers transkripsjon-PCR i ES-, ESY 3-1- og Hut-78-celler, milt og lever fra kontrollmus eller ESY 4-3 aguti-farvet avkom; 15B = påvisning av mus-γ-interferon-reseptor-mRNA ved RT-PCR i prøver fra 15A; M = størrelses-markør).

Figur 16 er et diagram av locus for det humane immunglobulins tunge kjede og en YAC-substitusjonsvektor for human tung kjede, som beskrevet i Eksempel VII, infra.

Figur 17 er et diagram av et museformerings-skjema, som beskrevet i Eksempel VIII, infra.

Figur 18 gjengir genotypene for enkelte av de vertsdyr som er fremstillet ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen.

BESKRIVELSE AV BESTEMTE UTFØRELSESFORMER

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for fremstilling av en gjærce5lle som har minst et kunstig gjærkromosom (YAC) omfattende et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede, og minst et YAC omfattende et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, idet fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

- a) introduisering inn i en første gjærce10lle et YAC som omfatter fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus eller fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus, og en selekterbar markør;
- b) introduisering av et kromosomalt DNA fra første gjærce15lle inn i en andre gjærce15lle som omfatter et YAC omfattende fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus eller fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus, og en selekterbar markør;
- c) selektering av gjærce15ller som omfatter YAC omfattende fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og YAC omfattende fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus.

Det er videre beskrevet gjærce20lle som har minst et kunstig gjærkromosom (YAC), omfattende et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede, og minst et YAC som omfatter et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, hvori gjærce25llen blir produsert ved fremgangsmåten ifølge krav 1.

Oppfinnelsen vedrører også fremgangsmåte for fremstilling av en ikke-human pattedyrebryonisk ES celle som har minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus er stabilt

integrrert inn i det samme kromosomet til en ikke-human pattedyr ES celle, idet fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

a) kombinerings under fusjonsbetingelser en ikke-human pattedyr ES celle og en gjærspæroplast dannet fra en gjærspelle ifølge krav 3, hvori nevnte spæroplast inneholder to eller flere YAC, hvori minst en YAC omfatter fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og minst et YAC som omfatter fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus, og hvori hver YAC omfatter et gen kodende for en selekterbar markør, hvor ved fragmentene blir stabilt integrerte inn i genomet til ES cellene; og

b) selektering for ES celler som bærer humant immunoglobulin loki ved hjelp av en eller flere av markørene.

Det er også beskrevet isolert ikke-humant pattedyr ES celle som har minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus er stabilt integrert inn i det samme kromosomet av ES cellen, og hvor ES cellen blir produsert ved fremgangsmåten ifølge krav 4.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre ES celle ifølge krav 5, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus har sekvensen til et fragment av humant kromosom 14 fra D segment genene til human immunoglobulin tung kjede lokuset, videre fortsettelse gjennom J segment genene og konstant region genene til og med C μ av det lokuset, hvori nevnte DNA sekvens ikke innbefatter en gamma konstant region, og hvori nevnte sekvens er operabelt koblet til minst et humant V segment gen.

Det er også beskrevet fremgangsmåte for fremstilling av et kimært ikke-humant pattedyr som har minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede

lokus og fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus er stabilt integrert inn i det samme kromosomet i minst noen av dets celler, idet fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

- a) produsering av en ES celle ifølge krav 5; og
- 5 b) produsering av det kimære ikke-humane pattedyret fra ES cellen.

Oppfinnelsen vedrører videre fremgangsmåte for fremstilling av et transgent ikke-humant pattedyr og dets avkom som har i dets somatiske og kim-celler minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, hvori fragmentet av en urearrangert tung kjede og fragmentet av en urearrangert lett kjede er stabilt integrert inn i det samme kromosomet, idet fremgangsmåten omfatter trinnet å avle det kimeriske ikke-humane pattedyret ifølge krav 11 og dets avkom for å fremstille det transgene ikke-humane pattedyret.

Det tilveiebringes nye transgene ikke-humane vertsdyr, særlig pattedyr, vanligvis murine vertsdyr, hvor vertsdyret er i stand til å gi en immunrespons på et immunogen, hvor denne respons danner antistoff som har xenogene, særlig primate og helst humane, konstante og/eller variable regioner eller tilsvarende andre effektorpeptid-sekvenser av interesse. Med "transgene" menes et dyr som inneholder en genetisk manipulert modifikasjon, særlig i sammenheng med foreliggende oppfinnelse, innføringen av et humant immunoglobulin-gen i alle dets celler. Vertene kjennetegnes ved å være i stand til å produsere xenogene immunoglobuliner, eller analoger derav, som resultat av inaktivering av de loci som koder for endogene immunoglobulin-subenheter, og å innføre xenogent DNA, for eksempel DNA som koder for humant immunoglobulin. Modifikasjonene kan bibeholde i det minste en del av de xenogene konstante regioner som sørger for sammenføyning av bindingssetet for den variable region, bundet ved C-enden til et funksjonelt peptid. Det funksjonelle peptid kan ha mange former eller konformasjoner og kan tjene som enzym, vekstfaktor,

bindingsprotein, ligand, cytokin, effektor-protein, chelaterende proteiner, etc. Antistoffene kan være av en hvilken som helst isotype, f.eks. IgA, D, E, G eller M eller subtyper innen isotypen.

Som individuelle trinn innføres som en første strategi, de xenogene, f.eks. humane, gener for tunge og lette immunglobulin-kjeder i vertsdryets kimlinje (f.eks. sperma eller oocytter), og i separate trinn gjøres de tilsvarende vertsgener ikke-funksjonelle ved inaktivering under bruk av homolog rekombinasjon. Gener for humane tunge og lette immunglobulin-kjeder rekonstrueres i en passende eukaryotisk eller prokaryotisk mikroorganisme, og de resulterende DNA-fragmenter kan føres inn i det passende vertsdyr, for eksempel inn i pronuclei til befruktede muse-oocytter eller embryoniske stamceller. Inaktivering av de endogene vertsimmunglobulin-loci oppnås ved målrettet ødeleggelse av passende loci ved homolog rekombinasjon i vertscellene, særlig embryoniske stamceller eller pronuclei av befruktede muse-oocytter. Den målrettede ødeleggelse kan skyldes innføring av en lesjon eller delesjon i mållocuset, eller delesjon inne i mållocus ledsaget av at det i dette locus innføres for eksempel en selekterbar markør. Når det er tale om embryoniske stamceller, utvikles kimære dyr som til dels skriver seg fra de modifiserte embryoniske stamcellene og som er i stand til å overføre de genetiske modifikasjonene gjennom kimlinjen. Parring av vertsdyr som har fått innført humane immunglobulin-loci, med stammer med inaktiverede endogene loci, vil føre til dyr som har rent xenogen, f.eks. human antistoffproduksjon.

I henhold til en annen alternativ strategi benyttes i det minste deler av de humane loci for tunge og lette immunglobulin-kjeder til direkte å erstatte de tilsvarende endogene immunglobulin-loci ved homolog rekombinasjon i embryoniske stamceller. Dette resulterer i samtidig inaktivering og erstatning av det endogene immunglobulin. Dette etterfølges av utvikling av kimære dyr, hvor de embryoniske stamcelle-avlede celler kan bidra til kimlinjen.

Disse former for strategi er basert på den kjente organisering av immunglobulin-kjeders loci i en rekke dyr, siden organiseringen, den relative lokalisering av exoner som koder for individuelle domener og lokaliseringen av spleiseseter og transkripsjonselementer er klarlagt i varierende grad. Hos

mennesket er locus for immunoglobulin tung kjede (IgH_{hu}) lokalisert på kromosom 14. I transkripsjonsretningen 5'-3' omfatter dette locus en stor ansamling (cluster) av gener for den variable region (V_H), genene for diversitets-regionen (D), fulgt av genene for J-regionen (J_H) og den konstante (C_H) gen-ansamling. Størrelsen av dette locus anslås å være fra ca. 1500 til ca. 2500 kilobaser (kb). Under B-celleutviklingen bringes diskontinuerlige gensegmenter fra kimlinjens IgH -locus inntil hverandre ved hjelp av en fysisk rearrangering av DNA. For at det skal dannes et tung kjede funksjonelt Ig -polypeptid, må tre diskontinuerlige DNA-segmenter fra V_H -, D- og J_H -regionene forenes på en helt bestemt sekvensiell måte; først D til J_H , deretter V_H til DJ_H , hvorved den funksjonelle enhet V_HDJ_H frembringes. Når V_HDJ_H er dannet, produseres spesifikke tunge kjeder etter transkripsjon av Ig -locuset, ved at det som templat benyttes den spesifikke $V_HDJ_HC_H$ -enhet som omfatter exoner og introner.

For immunoglobulinets lette kjeder (IgL) finnes to loci, kappa-locuset på humant kromosom 2 og lambda-locuset på humant kromosom 22. Organiseringen av disse IgL -loci tilsvarer den for IgH -locuset bortsett fra at D-regionen ikke forekommer. Etter IgH -rearrangering skjer en lignende rearrangering av et lett kjede locus ved V_L til J_L -sammenføyning av kappa- eller lambda-kjeden. Størrelsene av lambda- og kappa-lociene er hver omtrent 1000 kb til 2000 kb. Ekspresjon av rearrangert IgH og en Igk eller $Ig\lambda$ lett kjede i en bestemt B-celle bevirker dannelsen av antistoff-molekyler.

For å isolere, klonere og overføre IgH_{hu} -locuset kan det benyttes et kunstig gjær-kromosom eller "YAC". Et YAC som bærer det xenogene DNA kan innføres i ES-celler eller oocytter ved hjelp av flere metoder, inklusivt gjær-sfæroplast: ES-celle-fusjon, mikroinjeksjon og lipofeksjon. YAC vil integreres tilfeldig (dvs. ikke-homologt) i verts-genomet. Dersom gjær-sfæroplast:ES-celle-fusjon benyttes for å føre et YAC som bærer xenogent DNA, inn i ES-vertsceller, kan to eller flere YAC i en enkelt verts-gjær-celle innføres samtidig i den samme ES-vertscelle. Fordelen ved dette er at flere YAC som hvert inneholder xenogent DNA, for eksempel loci for tung og lett kjede av humant immunoglobulin, kan innføres i et enkelt kromosom i en vertscelle. Dette eliminerer behovet for oppformering av dyr som inneholder

individuelle humane Ig-gener, for å kunne frembringe et vertsdyr som er i stand til å produsere fullstendig humane immunglobuliner. For eksempel kan en gjærstamme som inneholder et enkelt YAC søkes med en vektor som f.eks. pLUTO (beskrevet infra) for å føre en selekterbar pattedyrs-markør som HPRT, og en selekterbar gjær-markør som LYS2 inn i en arm av dette YAC. Kromosomalt DNA fra målstammen benyttes deretter til å omdanne en andre, vanligvis haploid, lys2 mutant gjærstamme inneholdende et andre, forskjellig YAC. Lys⁺-kolonier analyseres deretter ved PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) for å identifisere kloner som har de to YAC og bekrefte at deres størrelse er uforandret. Ytterligere YAC med forskjellige selekterbare markører, for eksempel ADE2 (dersom verten er en ade2 mutant), kan senere adderes ved transformasjon. Alternativt søkes en YAC-holdig gjærstamme med en vektor som f.eks. pLUTO for å innføre en selekterbar pattedyrs-markør (f.eks. HPRT), som ovenfor, hvorpå den "parres" med annen YAC-holdig stamme av motsatt "kjønn". Forekomsten av de to YAC bekreftes deretter i de diploide gjærcellene, som beskrevet ovenfor. De diploide gjærstammene benyttes direkte for fusjon eller sendes gjennom meiose og ascosporogenese (sporulering) ved å benytte standardmetoder. De meiotiske produktene underkastes deretter screening for å identifisere en haploid klon inneholdende de to YAC. Enten den ene eller den annen av de ovenfor beskrevne måter benyttes, kan det andre YAC søkes med HPRT eller en annen selekterbar markør før innføring av det første YAC. Dersom hvert YAC inneholder forskjellige selekterbare gjærmarkører, kan bibehold av begge YAC under formeringen av stammen dessuten selekteres genetisk. Fusjon med ES-celler foretas deretter på samme måte som med gjærceller som inneholder et enkelt YAC. Siden mange gjærkromosomer kan integreres sammen med YAC, vil man forvente at en betydelig andel ES-kloner som uttrykker den pattedyrs-selekterbare markør som forekommer i ett YAC (f.eks. HAT^R-kloner dersom YAC-markøren er HPRT og ES-cellen er HPRT-), vil ha integrert begge YAC. Metoder som Southern blotting-analyse og/eller PCR kan benyttes for å identifisere slike kloner, og Southern blotting-analyse med pulsfelt-gelelektroforese kan benyttes til å karakterisere graden av YAC-integrasjon.

Hele IgH_{hu}-locuset kan inngå i én eller noen få YAC-kloner sammen med en pattedyrs-markør som f.eks. Neo, HPRT, GPT, β-gal, etc. Det samme gjelder lociene for Ig lett kjede. Rekonstituering av intakte kimlinje Ig-loci ved homolog rekombinasjon mellom forskjellige YAC med overlappende homologiregioner kan oppnås i gjær. På denne måte oppnås isoleringen av DNA-fragmenter som koder for den humane Ig-kjede. Alternativt kan man klonere et intakt kimlinje-locus direkte i et enkelt YAC.

For å oppnå et bredt spektrum av antistoff med høy affinitet er det nødvendig å inkludere hele V-regionen. Forskjellige V-region-genfamilier er spredt innen den humane V-region-ansamling. Ved å oppnå et subsett av de kjente V-region-gener av de humane tunge og lette Ig-kjeders loci (Berman et al., EMBO J. (1988) 7:727-738) i stedet for hele komplementet av V-regioner, kan den transgene vert immuniseres og være i stand til å oppvise en sterk immunrespons og gi antistoff med høy affinitet. På denne måte kan relativt små DNA-fragmenter av kromosomet benyttes. For eksempel inngår et rapportert 670 kb fragment av IgH_{hu}-locuset i et NotI-NotI-restriksjonsfragment, som ville tjene til å gi et utvalg av V-regioner (Berman et al., *supra*). Øket diversitet gis også gjennom rekombinasjon med de forskjellige D- og J-regioner og somatisk mutasjon.

For å sette vertsimmunglobulin-lociene ut av funksjon, kan det benyttes homolog rekombinasjon, hvor DNA innføres ved lociene for vertens endogene immunglobulin tunge og lette kjeder, hvilket inhiberer dannelsen av endogent immunglobulin. Siden det er to alleler for tung kjede og to lett kjede loci, kappa og lambda, hvert med to alleler, selv om man kan velge å ignorere lambda-lociet, vil det måtte være gjentatte transformasjoner som resulterer i inaktivering av hvert allel. Homolog rekombinasjon kan benyttes for funksjonelt å inaktivere hvert av lociene ved innføring av det homologe DNA via en konstruksjon som kan ødelegge eller delere mållocuset i embryoniske stamceller med påfølgende innføring av de modifiserte cellene i recipient-blastocyster. Etterfølgende formering muliggjør kimlinjeoverføring av det inaktiverede locus. Man kan derfor velge å formere heterozygot avkom og selekere for homozygot avkom fra de heterozygote foreldrene.

I henhold til den andre av de alternative strategier som er beskrevet ovenfor, kan antallet trinn reduseres ved å sørge for minst et fragment av det humane immunglobulin-locus i den konstruksjon som benyttes for homolog rekombinasjon med det analoge endogene immunglobulin, slik at det humane locus erstatter i det minste en del av vertens immunglobulin-locus, hvilket resulterer i inaktivering av locuset for vertens immunglobulin-subenhet. Av særlig interesse er bruken av transformasjon for en enkelt inaktivering, med påfølgende formering av det heterozygote avkom for å frembringe et homozygot avkom. Når det humane locus benyttes for substitusjon eller innføring i verts-locuset for inaktivering, kan antall transformasjoner begrenses til tre transformasjoner, og som allerede antydnet, kan man velge å ignorere det mindre anvendte locus og begrense transformasjonene til to transformasjoner. Som et alternativ kan man velge å foreta inaktiveringen som et eget trinn for hvert locus ved å benytte embryoniske stamceller fra avkom som tidligere har hatt ett eller flere loci inaktivert. I det tilfellet hvor det bare benyttes transformasjon, og det humane locus er integrert på en tilfeldig måte i verts-genomet, kan det være nødvendig med i alt åtte eller flere transformasjoner.

For inaktivering kan det benyttes en hvilken som helst lesjon i mållocuset som resulterer i ekspresjonshindring av en immunglobulin-subenhet for dette locus. Lesjonen kan således være i en region som omfatter enhancere, f.eks. en 5'- eller 3'-enhancer, eller et intron, i V-, J- eller C-regionene, og for den tunge kjede foreligger muligheten i D-regionen, eller kombinasjoner derav. Den viktige faktor er at rearrangering av gener i Ig-kimlinjen inhiberes, idet en funksjonell beskjed som koder for det endogene immunglobulin ikke kan iverksettes, enten som følge av transkripsjonssvikt eller svikt i behandling av beskjeden eller lignende. En slik lesjon kan ha form av en delesjon i målgenet, et innskudd av et fremmed gen, en kombinasjon av et innskudd og en delesjon eller en erstatning hvor en xenogen sekvens benyttes med eller uten innføring av en delesjon i det endogene gen.

Når man er interessert i inaktivering av immunglobulin-subenhetens locus, vil lesjonen fortrinnsvis bli foretatt i ett eller flere av de exoner som

inngår i locus for immunoglobulin-subenheten, for eksempel i locusets konstante region eller J-region. Man danner således en målrettet konstruksjon som mangler funksjonelle exoner i denne region og som kan omfatte de tilstøtende sekvenser oppstrøms og/eller nedstrøms fra J- og/eller C-regionen, eller omfatter hele, eller en del av, regionen med et inaktiverende innskudd i J- eller C-exonene. Innskuddet kan være 50 bp eller mer, hvor et slikt innskudd resulterer i at dannelsen av et funksjonelt mRNA ødelegges. Det er ønskelig at minst ca. 75% av exon-sekvensen, fortrinnsvis minst ca. 90% av exon-sekvensen, deleres.

Det er ønskelig at et markør-gen benyttes i den målrettede konstruksjon for å erstatte de delerte sekvenser. Forskjellige markører, særlig slike som gjør positiv seleksjon mulig, kan benyttes. Av særlig interesse er bruken av G418-resistens som er resultat av ekspresjon av genet for neomycin-fosfotransferase ("neo").

I den målrettede konstruksjon kan det, oppstrøms og/eller nedstrøms fra målgenet, være et gen som sørger for å fastslå hvorvidt det har forekommet en homolog dobbel overkryssing (negativ seleksjon). For dette formål kan thymidinkinase-genet i Herpes simplex viruset benyttes, siden celler som uttrykker thymidinkinase kan drepes ved bruk av nukleosid-analoger som acyclovir eller gancyclovir, som har cytotoksiske virkninger på celler som inneholder et funksjonelt HSV-tk (Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)). Manglende følsomhet overfor disse nukleosidanalogene indikerer at HSV-thymidinkinase-genet mangler og at det derfor når det har skjedd homolog rekombinasjon, også har skjedd en dobbelt overkryssing.

Selv om nærværet av markørgenet i genomet vil indikere at integrasjon har funnet sted, vil det fortsatt være nødvendig å bestemme hvorvidt det har skjedd en homolog integrasjon. Dette kan oppnås på flere måter. I de fleste tilfeller vil det bli benyttet DNA-analyse ved hjelp av Southern blott-hybridisering for å fastslå lokaliseringen av integrasjonen. Ved å benytte prober for innskuddet og de sekvenser i 5'- og 3'-regionene som flankerer den region hvor homolog integrasjon ville inntre, kan man vise at homolog målretting har funnet sted.

PCR kan også med fordel benyttes for å påvise nærvær av homolog rekombinasjon. Det kan benyttes PCR-primere som er komplementære med en sekvens i den målrettede konstruksjon og komplementære med en sekvens utenfor konstruksjonen og ved mållocuset. På denne måte kan det
5 bare oppnås DNA-molekyler som har begge primerne foreliggende i de komplementære kjeder dersom det har intrådt homolog rekombinasjon. Påvisning av fragmenter med den forventede størrelse, f.eks. ved bruk av Southern blotting-analyse, støtter antagelsen om homolog rekombinasjon.

Den målrettede konstruksjon kan videre innbefatte et
10 replikasjonssystem som er funksjonelt i vertscellen. Disse replikasjonssystemene vil oftest involvere virale replikasjonssystemer, som f.eks. SV40 (Simian virus 40), Epstein-Barr-virus, polyomavirus, papillomavirus og lignende. Det kan benyttes forskjellige systemer for transkripsjonsinitiering, enten fra virus eller fra pattedyr-gener, så som SV40,
15 metallathionein-I- og II-gener, β -actin-gen, adenovirus tidlige og sene gener, fosfoglycerat-kinase-gen, RNA-polymerase II-gen eller lignende. I tillegg til promotere kan villtype-enhancere benyttes for ytterligere å forsterke ekspresjonen av markør-genet.

Ved fremstilling av de målrettede konstruksjoner for homolog
20 rekombinasjon, kan det inkluderes et replikasjonssystem for prokaryoter, særlig E. coli, for fremstilling av den målrettede konstruksjon, subkloning etter hver manipulering, analyse f.eks. restriksjons-kartlegging eller sekvensering, mangfoldiggjøring og isolering av den ønskede sekvens. Når det gjelder substitusjonsstrategien når det xenogene DNA-innskudd er stort,
25 generelt mer enn ca. 50 kbp, vanligvis mer enn 100 kbp, og i alminnelighet ikke mer enn ca. 1000 kbp, kan et kunstig gjærkromosom (YAC) benyttes for kloning av den målrettede konstruksjon.

Når en målrettet konstruksjon er fremstillet og eventuelle uønskede sekvenser, f.eks. prokaryote sekvenser fjernet, kan konstruksjonen innføres i
30 målcellen, for eksempel en ES-celle. En hvilken som helst hensiktsmessig teknikk for innføring av DNA i målcelle kan benyttes. Slike teknikker innbefatter protoplast-fusjon, f.eks. gjær-sfæroplast:cellefusjon, lipofeksjon,

elektroporering, kalsiumfosfat-mediert DNA-overføring eller direkte mikroinjeksjon.

Etter transformasjon eller transfeksjon av målcellene kan målceller selekteres ved hjelp av positive og/eller negative markører, som angitt tidligere, neomycin-resistens og acyclovir- eller gancyclovir-resistens. De celler som oppviser den ønskede fenotype, kan deretter analyseres videre ved restriksjonsanalyse, elektroforese, Southern blotting-analyse, PCR eller lignende. Ved å identifisere fragmenter som viser forekomsten av lesjonene ved mållocuset, kan man identifisere celler hvor det for å inaktivere en kopi av mållocuset, har intrådt homolog rekombinasjon.

Den ovenfor beskrevne prosess kan foretas for først å inaktivere et locus for tung kjede i en embryonisk stamcelle, hvorpå cellene mikroinjiseres i verts-blastocyster som utvikler seg til et kimært dyr. De kimære dyrene parres for å oppnå heterozygote verter. Ved formering av de heterozygote vertene kan det oppnås en homozygot vert eller isoleres embryoniske stamceller, som transformeres for å inaktivere det andre IgH-locus, hvorpå prosessen gjentas inntil alle ønskede loci er inaktivert. Alternativt kan locus for den lette kjede være det første som inaktiveres. For fullstendig å eliminere evnen til å danne lett kjede immunglobulin, er det ønskelig å inaktivere locus for både lambda og kappa lett kjede immunglobulin. På et hvilket som helst trinn kan de xenogene loci innføres.

Som allerede nevnt kan mållocuset byttes ut med det analoge xenogene locus. På denne måte vil det xenogene locus bli anbragt i det vesentlige i samme region som det analoge vertslocus, slik at enhver regulering som er assosiert med locusets posisjonen i det vesentlige vil være den samme for det xenogene immunglobulin-locus. Ved for eksempel å isolere den variable region av det humane IgH-locus (inkludert V-, D-, og J-sekvenser), eller en del av disse, og flankere det humane locus med sekvenser fra det murine locus, fortrinnsvis sekvenser som er adskilt med minst ca. 5 kbp i verts-locuset, fortrinnsvis minst ca. 10 kbp i verts-locuset, kan det humane fragment settes inn i denne region ved rekombinasjon, hvorunder det humane immunglobulin-locus erstatter den endogene variable region av verts-immunglobulin-locuset. På denne måte kan vertens evne til å

danne en endogen immunglobulin-subenhet avbrytes, mens promoteren for det humane immunglobulin-locus kan aktiveres av verts-enhanceren og reguleres av vertens regulerende system.

5 For å oppnå dannelse av xenogene bindingsproteiner i en vert, er det nødvendig at verten er i stand til å frembringe de nødvendige enzymer og andre faktorer som er involvert i produksjonen av antistoff, men mangler kompetente endogene gener for ekspresjon av tunge og lette subenheter av immunglobuliner. De enzymer og andre faktorer som er assosiert med kimlinje-rearrangering, spleising, somatisk mutasjon og lignende, vil således 10 være funksjonelle i verten. Hva som vil mangle er en funksjonell naturlig region som omfatter de forskjellige exoner som er assosiert med dannelsen av endogent immunglobulin.

Integreringen av innført xenogent DNA kan være tilfeldig eller homolog, avhengig av den bestemte strategi som benyttes. Ved å benytte 15 gjentatte transformasjonstrinn, eventuelt i kombinasjon med parring, kan det således oppnås transgene dyr som er i stand til å produsere xenogene bindingsproteiner i det vesentlige uten lett eller tungt endogent immunglobulin. Ved transformasjon menes enhver teknikk for innføring av DNA i en levedyktig celle, så som konjugasjon, PEG-mediert cellefusjon, 20 transformasjon, transfeksjon, transduksjon, elektroporering, lipofeksjon, "biolistics" eller lignende.

Når de xenogene loci er innført i vertsgenomet, enten ved homolog rekombinasjon eller ved tilfeldig integrering, og vertedyr med de endogene immunglobulin-loci inaktivert, er produsert ved passende formering av de 25 forskjellige transgene dyr, eller dyr oppnådd fra kimære dyr, kan man fremstille et vertedyr som mangler den naturlige evne til å produsere endogent immunglobulin, men har evnen til å produsere xenogene immunglobuliner med i det minste en betydelig del av den xenogene kildes repertoar.

30 Den funksjonelle inaktivering av de to kopiene av hver av de tre verts-Ig-loci (tung, kappa og lambda), hvor verten da inneholder det humane IgH og de humane Ig-kappa- og/eller lambda-loci vil gjøre produksjon av rent humane antistoff-molekyler mulig uten produksjon av verts-antistoff eller

verts/humane kimære antistoff. En slik vertsstamme vil ved immunisering med spesifikke antigener, svare med produksjon av murine B-celler som produserer spesifikke human-antistoff, hvor B-cellene kunne fusjoneres med murine myelomceller eller immortaliseres på annen måte for vedvarende stabil produksjon av humane monoklonale antistoff. Metoder for å oppnå vedvarende stabil produksjon av monoklonale antistoff er vel kjent på området.

Metodikk og strategier behøver ikke være begrenset til fremstilling av fullstendige immunglobuliner, men gir mulighet for å frembringe regioner forbundet med en del av den konstante region, f.eks. C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} eller C_{H4} eller kombinasjoner av disse. Alternativt kan ett eller flere av exonene av C_H- og C_K- eller C_λ-regionene erstattes med, eller forbindes med en sekvens som koder for et annet protein, så som et enzym, f.eks. plasminogenaktivator, superoksyd-dismutase, etc; toksiner, f.eks. ricin, abrin, difteritoksin, etc.; vekstfaktor; cytotoxisk middel, f.eks. TNF; reseptorligand eller lignende. Se for eksempel WO 89/07142; WO 89/09344; og WO 88/03559. Ved å sette inn det interessante protein i et konstant region-exon og sørge for spleising av den variable region til det modifiserte konstantregion-exon, kan det resulterende bindingsprotein ha en annen C-terminal region enn immunglobulinet. Ved å forsyne det innskutte gen med en stoppsekvens vil proteinproduktet ha det innskutte protein som den C-terminale region. Om ønskes, kan den konstante region være helt erstattet med det andre proteinet ved å sørge for en konstruksjon med de riktige spleiseseter for sammenføring av den variable region med det andre proteinet.

B-cellene fra den transgene vert, som produserer immunglobulin eller immunglobulin-analog, kan benyttes for fusjon til en murin myeloid celle for fremstilling av hybridomer, eller immortaliseres ved hjelp av andre konvensjonelle fremgangsmåter, f.eks. transfeksjon med onkogener. Disse immortaliserte cellene kan deretter dyrkes i kontinuerlig kultur eller innføres i peritoneum til en forlikelig vert for fremstilling av ascites.

Fremstilling av polyklont humant antiserum eller humane monoklonale antistoff eller antistoff-analoger er mulig. Når verts-pattedyret er blitt immunisert med et immunogen, kan de resulterende humane antistoff

isoleres fra andre proteiner ved bruk av en affinitetskolonnesom har en Fc-bindende del, så som protein A eller lignende.

Oppfinnelsen inkluderer følgende utførelsesformer av ikke-humane vertsdyr (se også Figur 18):

- 5 I. Dyr som er heterozygote for et inaktivt endogent lett kjede immunglobulin-gen (homozygote dyr oppnås ved krysning);
- II. Dyr som er heterozygote for et inaktivt endogent tung kjede immunglobulin-gen (homozygote dyr oppnås ved krysning);
- 10 III. Dyr som er homozygote for funksjonelle endogene lett og tung kjede immunglobulin-gener og hemizygote for (dvs. inneholdende en kopi av) fremmede, fortrinnsvis humane, tung kjede immunglobulin-gener (homozygote dyr oppnås ved krysning);
- 15 IV. Dyr som er homozygote for funksjonelle endogene lett og tung kjede immunglobulin-gener og hemizygote for fremmede, fortrinnsvis humane, lett kjede immunglobulin-gener (homozygote dyr oppnås ved krysning);
- V. Dyr som er heterozygote for inaktive endogene tung og lett kjede immunglobulin-gener oppnådd ved kryssing av dyr av kategori I med dyr av kategori II (homozygote dyr oppnås ved krysning);
- 20 VI. Dyr som er heterozygote for inaktive endogene tung og lett kjede immunglobulin-gener og hemizygote for fremmede, fortrinnsvis humane, tung kjede immunglobulin-gener oppnådd ved kryssing av dyr av kategori III med dyr av kategori V (dyr som er homozygote for de inaktive endogene loci og homo- eller hemizygote for det fremmede gen, oppnås ved krysning);
- 25 VII. Dyr som er heterozygote for inaktive endogene tung og lett kjede immunglobulin-gener og hemizygote for fremmede, fortrinnsvis humane, lett kjede immunglobulin-gener oppnådd ved kryssing av dyr av kategori IV med dyr av kategori V (dyr som er homozygote for de inaktive endogene loci og homo- eller hemizygote for det fremmede gen, oppnås ved krysning);
- 30 VIII. Dyr som er homozygote eller heterozygote for inaktive endogene tung og lett kjede immunglobulin-gener og hemizygote for

fremmede, fortrinnsvis humane, lett kjede immunglobulin-gener oppnådd ved kryssing av dyr av kategori VI og VII (dyr som er homozygote for de inaktive endogene loci og homo- eller hemizygote for det fremmede gen, oppnås ved krysning);

5 I henhold til en foretrukket utførelsesform benyttes de homozygote dyrene av kategori VIII til fremstilling av humane antistoff.

IX. Dyr som er homozygote for funksjonelle endogene tung og lett kjede immunglobulin-gener og hemizygote for fremmede, fortrinnsvis humane, tung og lett kjede immunglobulin-gener, oppnådd ved kryssing av
10 dyr av kategori III og IV (homozygote dyr oppnås ved krysning);

X. Dyr som er heterozygote for et inaktivt endogent tung kjede immunglobulin-gen og hemizygot for fremmede, fortrinnsvis humane, tung og lett kjede immunglobulin-gener, oppnådd ved kryssing av dyr av kategori II og IX (dyr som er homozygote for de inaktive endogene loci og homo- eller
15 hemizygote for det fremmede gen, oppnås ved krysning);

XI. Dyr som er heterozygote for et inaktivt endogent lett kjede immunglobulin-gen og hemizygote for fremmede, fortrinnsvis humane, tung og lett kjede immunglobulin-gener, oppnådd ved kryssing av dyr av kategori I og IX (dyr som er homozygote for de inaktive endogene loci og homo- eller
20 hemizygote for det fremmede gen, oppnås ved krysning).

Fremgangsmåtene angitt ovenfor muliggjør innføring av store sammenhengende, xenogene DNA-sekvenser i en ikke-human vert, f.eks. et pattedyr. Vanligvis vil sekvensen være minst 100 kb, oftere minst ca. 200 kb og i alminnelighet utgjøre fra ca. 200 til 1000 kb. Det kan således være
25 ønske om å overføre et locus av interesse, så som immunglobulin-locus, T-celle-reseptor-locus, det viktigste vevsforlikelighets-locus; regioner av et xenogent kromosom som kan inkludere ett eller flere gener av interesse, som kan, men ikke behøver, være karakterisert, så som LDL-reseptoren (Low Density Lipoprotein receptor), Apolipoprotein (Apo) B, Apo E,
30 transmembranlednings-regulatoren (transmembrane conductor regulator) for cystisk fibrose, dystrofin eller regioner av xenogene kromosomer som kan være involvert i partiell kromosom-trisomi (f.eks. kromosom 21, 7 og 10); og virus. Slikt DNA kan omfatte villtypegener eller defekte gener for studium av

en rekke sykdommer, ved å frembringe dominante mutasjoner eller komplementere recessive mutasjoner. For eksempel kan LDL-reseptoren og Apo-B-gener innføres for studium av hyperkolesterolemi, hyperlipoproteinemi og aterosklerose. Faktor VIII eller IX kan innføres for hemofili, cystisk fibrose og atrosklerose. Faktor VIII eller IX kan innføres for hemofili, cystisk fibrose og dystrofin-
5 transmembranlednings-regulator kan innføres for cystisk fibrose og dystrofin-
genet for muskeldystrofi. Det xenogene DNA beregnet for innføring ved bruk av YAC, skrives seg fra pattedyr, særlig primater og spesielt mennesket, andre vertebrater eller invertebrater og lignende. Man kan således gi verten en rekke nye muligheter, frembringe genetiske responser relatert til den
10 xenogene DNA-kilde, sørge for produksjon av antistoff, sørge for spesifikke kombinasjoner av transkripsjonsfaktorer, sørge for metabolske systemer, innføre dominante mutasjoner eller komplementere recessive mutasjoner. Det xenogene DNA kan modifiseres når det er tilstede i et YAC. Siden homolog rekombinasjon er virksom i gjær og gir høy andel av sete-spesifikk
15 integrasjon av homologt DNA når det homologe DNA flankerer annet DNA av interesse, er man i stand til å modifisere det xenogene DNA før innføring i en ES-celle. På denne måte kan man i verten innføre avvikende gener som uttrykker avvikende proteiner for å etterligne sykdomstilstander i den xenogene vert, for å studere forskjellige mekanismer for interaksjonen
20 mellom avvikende proteiner og andre xenogene proteiner eller endogene proteiner, eller for å studere gener eller gensystemer.

For å overføre store DNA-segmenter som her utførlig beskrevet, benyttes generelt YAC som omfatter en gjær-centromer, et replikasjons-origo og telomerer som avgrenser det interessante DNA. Det kan benyttes for-
25 skjellige centromerer eller telomerer, særlig centromerene fra gjær-kromosomene 4 og 5. YAC har en markør som tillater seleksjon eller screening av celler som YAC integreres i. Ikke alle markører muliggjør effektiv seleksjon. Særlig har HPRT-genet, nærmere bestemt humant HPRT, vist seg å gi effektiv seleksjon av HPRT-manglende ES-celler som bærer
30 YAC. Andre kjente markører som kan selekteres eller underkastes screening, inkluderer hygromycin, neomycin, β -gal og GPT. ES-cellen kan oppnås fra et hvilket som helst ikke-humant vertsdyr, som ES-celler er tilgjengelige fra og som kan formeres i kultur som forblir levedyktig og

funksjonell og som det eksisterer en seleksjonsmarkør for, og hvor ES-cellen kan føres inn i et embryo og kan repopulere verten, inklusivt kimlinjen.

Denne evne er hovedsakelig etablert hos gnagere, f.eks. mus og rotter, og i mindre grad hos marsvin. Mus har vært benyttet for produksjon av antistoff eller B-lymfocytter for immortalisering for produksjon av antistoff. Siden mus lett lar seg håndtere, kan produseres i store mengder og er kjent for å ha et omfattende immunrepertoar, vil mus vanligvis være det dyr som foretrekkes.

Etter hvert som andre arters ES-celler blir tilgjengelige, kan disse også benyttes i henhold til foreliggende oppfinnelse. Små forsøksdyr, særlig

gnagere, eller husdyr, inklusivt mus, rotter, kaniner, kyr, griser, hamstere, hester, hunder, sauer og marsvin, eller fugl, som f.eks. høns, kalkun, etc., vil være av særlig interesse. ES-cellene kan ha én eller flere mutasjoner, for eksempel mangle en bestemt aktivitet. Av særlig interesse i henhold til foreliggende oppfinnelse er ES-celler som mangler HPRT. Dessuten kan befruktede egg av visse arter finne anvendelse i henhold til oppfinnelsen.

Aktuelt YAC kan oppnås ved screening av eksisterende humane YAC-bibliotek, som f.eks. de som er tilgjengelige fra Centre d'Etude du Polymorphisme Human (C.E.P.H.), Paris, Frankrike og Washington University, St. Louis, MO, ved å benytte standardmetoder. Alternativt kan YAC lett fremstilles, som her utførlig beskrevet, ved å forene de gjærflankerende segmenter som omfatter én arm med en centromer og telomer og en annen med en telomer sammen med det interessante DNA. Vanligvis vil det også forekomme én eller flere markører i gjærvertens celler som muliggjør seleksjon. Av særlig interesse for gjærseleksjon er markører som komplementerer mutasjoner av gjærverten så som gener som inngår i produksjonen av aminosyrer, puriner eller pyrimidiner, URA3, TRP1, LYS2, ADE2 på YAC for å komplementere ura3-, trp1-, lys2- og Ade2-mutasjoner i verten. Ved å sørge for komplementering vil hovedsakelig bare gjærceller som bærer hele YAC være i stand til å overleve i et selektivt medium. I tillegg til gentisk å bekrefte at begge YAC-armene er bibeholdt, er det ønskelig å bekrefte integriteten av YAC ved å benytte en slik fremgangsmåte som pulsfelt-gelelektroforese.

De gjærverter som bærer YAC kan deretter benyttes som kilde for det YAC som skal innføres i ES-cellen. Overføring av YAC oppnås effektivt ved å fremstille gjær-sfæroplater i henhold til konvensjonell teknikk. Ved å bryte ned den ytre vegg under milde betingelser i et isotonisk medium, fremstilles sfæroplater i høyt utbytte. Eksponensielt voksende ES-celler protease-

5 behandles, f.eks. trypsiniseres, og kombineres med sfæroplastene. En pellet av gjær-sfæroplater kan lett fremstilles, og ES-cellene sentrifugeres sammen med denne pellet og eksponeres overfor et fusogent middel, som f.eks. PEG i 1-2 minutter. Cellene resuspenderes og inkuberes deretter i

10 passende serumfritt medium. Cellene utplates deretter på "feeder" celler, hvoretter de selekteres i overensstemmelse med den selektive markør. For HPRT-genet kan HAT-medium benyttes til seleksjon. Overlevende fusjonskolonier blir deretter plukket, mangfoldiggjort og analysert. Analysen kan foretas ved restriksjonsenzym-analyse i kombinasjon med Southern

15 blotting eller pulsfelt-gelelektroforese eller ved polymerase-kjedereaksjonen (PCR), under bruk av passende primere, hvorav minst én er komplementær med DNA-innskuddet, og med en probe med repeterende sekvenser som forekommer i det xenogen DNA, så som Alu, for deteksjon av humane DNA-sekvenser. Ty, Y', rDNA og delta-sekvenser benyttes i proben for å fastslå

20 gjærsekvenser. Prober for YAC-ender benyttes til bekreftelse av integriteten av YAC. De celler som oppviser det intakte eller tilnærmet intakte YAC-DNA integrert i verts-genomet benyttes deretter i de neste trinn. I enkelte kloner integreres bare en del, eller lite eller intet av gjær-DNA i muse-genomet. Det integrerte gjær-DNA varierer fra mer enn ca. 90% av det opprinnelige gjær-

25 genom til mindre enn ca. 10%.

I henhold til en foretrukket utførelsesform oppnås effektiv produksjon av transgene ikke-humane vertsdyr ved å benytte en fremgangsmåte som integrerer store, minst 100 kb, xenogene DNA-fragmenter i tilnærmet intakt form, i en vert i form av en embryonisk stamcelle (ES) eller et befruktet egg

30 (zygote). Innføringen av det xenogene DNA oppnås på en effektiv måte ved fusjon av ES-cellen med gjær-sfæroplater som inneholder de YAC som er bærere av de 100 kb DNA, og en selekterbar markør, under betingelser som muliggjør integrering av det YAC-DNA som inneholder markøren, i ES-celle-

genomet, eller ved transfeksjon av et rensset YAC, inn i ES-celler. ES-celler som omfatter det YAC som er integrert i genomet, selekteres deretter ved hjelp av markøren, som er funksjonell i ES-cellen. For eksempel kan hypoxantin-fosforibosyl-transferase-genet (HPRT-genet) benyttes som en markør i HPRT-manglende (HPRT-) ES-celler. For å produsere dyr fra embryoniske stamceller, kan cellene etter transformasjon, plates ut på lag av feeder-celler i et passende medium, f.eks. føtalt bovint serum-forsterket DMEM. ES-cellen kan ha et enkelt mållocus (heterozygot) eller kan manipuleres ved hjelp av homogenotiseringsprosessen slik at begge loci målrettes (homozygot). Homogenotiseringsprosessen (dannelse av homozygoter) benytter seleksjonstrykk for å utvikle de celler som har den gjenstående forekomst på begge kromosomer. Celler som inneholder de to målrettede alleler kan påvises ved å benytte et selektivt medium, og etter tilstrekkelig tid til at koloniene kan vokse, kan kolonier plukkes og analyseres med henblikk på inntrådt integrasjon eller homolog rekombinasjon. Som beskrevet tidligere kan PCR benyttes med primere innenfor eller utenfor konstruksjonssekvensen, men ved mållocuset.

De kolonier som oppviser homolog rekombinasjon, kan deretter benyttes for embryo-manipulering og blastocyst-injeksjon. De selekterte ES-cellene føres deretter inn i embryoer i passende vertsdyr ved mikroinjeksjon eller på annen måte. For eksempel kan murine blastocyster oppnås fra hunddyr, ved spyling av uterus 3,5 dager etter ovulasjon. De modifiserte ES-cellene blir deretter trypsinisert, hvoretter minst 1 og opptil 15 celler, kan injiseres inn i blastocystens blastocøl. Etter injeksjon returneres minst 1, og ikke mer enn ca. 10, av blastocystene til hvert uterushorn i pseudogravide hunner. Hunnene går videre til termin, og de resulterende kimære dyr kan så analyseres på forekomst av YAC i deres somatiske celler. Med "kimær" menes et dyr som er bærer av celler oppnådd fra mer enn én kilde, f.eks. fra vertsdyret og en annen dyreart. I sammenheng med foreliggende oppfinnelse inneholder eksempelvis et kimært murint dyr en genetisk modellert modifikasjon, særlig et humant gen, i enkelte av dets celler, f.eks. i celler som utvikles fra de modifiserte embryoniske stamcellene. Forekomsten av det integrerte YAC i frembragte kimære vertsdyr, blir

deretter analysert. De kimære vertsdyr undersøkes med henblikk på kimlinje-overføring av ES-celle-genomet ved parring, for eksempel ved å parre kimære mus med C57BL/6J-mus. Kimære vertsdyr kan parres med ikke-kimære verter, enten de er genetisk identiske eller allogetiske, for screening av kimærer som i kimcellene bærer dette YAC. Avkom som er heterozygot for den genetiske modifikasjon krysses deretter for å produsere avkom som er homozygot for modifikasjonen og som konsekvent overfører den virksomme YAC-konstruksjon til sitt avkom.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for innføring av store xenogene DNA-segmenter i et ikke-humant vertsdyr, særlig en gnager, og vanligvis et murint dyr, sørger for stabil integrasjon av dette DNA. Gener i det innskutte DNA viser seg å være funksjonelle, og de resulterende kimære vertsdyr er i stand til å sørge for kimlinje-overføring av det integrerte DNA. Etter parring av det kimære vertsdyr, frembringes transgene heterozygote vertsdyr som parres for å frembringe et homozygot dyr som kan benyttes for en lang rekke formål, inklusivt fremstilling av produkter som f.eks. bindingsproteiner, for eksempel immunglobuliner, til screening av forskjellige medikamenter, til genterapi, for eksempel for å komplementere for recessive genetiske forstyrrelser, til studium av ulike sykdommer, til studium av funksjonen og reguleringen av dårlig kartlagte store DNA-fragmenter.

De etterfølgende eksempler er gitt som illustrasjon.

EKSPERIMENTELT**EKSEMPEL 1****I. Inaktivering av gene for tung kjede J (J_H) hos mus****5 A. Konstruksjon av den målrettede inaktiveringsvektor**

Et 6,4 kb EcoRI fragment som inneholder genene fra mus for tung kjede J- og flankerende sekvenser, kloner fra et genomisk bibliotek fra et Balb/C muse-embryo ved å benytte de prober som er beskrevet i Sakano et al., (1981), Nature, 290:562-565. Dette fragmentet (mDJ) settes inn i EcoRI-kuttet pUC19-plasmid (pmDJ). Et 2,9 kb-fragment som inneholder 4J-genene deleres ved XhoI-ScaI-kutting (pmDδJNeo, se Figur 1). Et 1150 bp XhoI-BamHI fragment som inneholder et neomycin-resistensgen regulert av thymidinkinase-genpromoteren i Herpes simplex virus (HSV-tk) og en polyoma-enhancer isoleres fra pMCINeo (Thomas & Capecchi (1987), Cell, 51, 503-512). En syntetisk adapter adderes til dette fragment for å omdanne BamHI-enden til en ScaI-ende, og det resulterende fragment forbindes med XhoI-ScaI-pmDδJ for å danne inaktiveringsvektoren (pmDδJ.Neo) hvor 5'- til 3'-orienteringen av neomycinet og de tunge kjede-promotorene er identisk. Dette plasmid lineariseres ved NdeI-oppslutning før transfeksjon til ES-celler. 20 Sekvensene som regulerer den homologe rekombinasjon, er 3 kb og 0,5 kb-fragmenter som er lokalisert henholdsvis 5' og 3' til neomycin-genet.

B. Dyrkning, eletroporering og seleksjon av ES-celler ES-cellelinjen E14TG2a (Hooper et al (1987), Nature, 326:292-295) dyrkes på mitomycin-behandlede primære embryoniske fibroblast-feeder-lag i det vesentlige som beskrevet (Doetschman et et. (1985), J. Embryol. Exp. Morphol. 87:27-45).

5 De embryoniske fibroblastene fremstilles fra embryoer fra C57BL/6 hunner som 14 til 16 dager tidligere er parret med en hann som er homozygot for et neomycin-transgen (Gossler et al., (1986), PNAS 83:9065-9069). Disse cellene kan vokse i medier inneholdende G418. Elektroporerings-betingelsene er beskrevet av (Boggs et al., (1986), Ex. Hematol. (NY),
10 149:988-994). ES-cellene trypsiniseres, resuspenderes i dyrkningsmediet i en konsentrasjon på 4×10^7 /mL og elektroporerer i nærvær av den målrettede DNA-konstruksjon i en konsentrasjon på 12 nM i det første forsøk og 5 nM DNA i det andre. En spenning på 300 V med en kapasitans på 150-250 μ F har vist seg optimal med en elektroporeringscelle av 5 mm lengde og
15 et tverrsnitt på 100 mm^2 . Deretter utplates 5×10^6 elektroporeerte celler på mitomycin-behandlede fibroblaster i 100 mm skåler i nærvær av Dulbecco's modifiserte Eagle's medium (DMEM) supplert med 15% føtalt bovint serum (FBS) og 0,1 mM 2-merkaptoetanol. Mediene erstattes 24 timer etter elektroporering med medier som inneholder 200 μ g/mL G418.

20 ES-kolonier som resulterer 10-14 dager etter elektroporering plukkes med uttrukne kapillær-pipetter for analyse ved bruk av PCR. Halvparten av hver utplukkede koloni oppbevares i 24-brønns plater hvor det allerede er utsådd mitomycin-behandlede feeder-celler. De andre halvdelene, hvor 3-4 slås sammen, overføres til Eppendorf-rør inneholdende ca. 0,5 mL PBS og
25 analyseres for homolog rekombinasjon ved PCR. Betingelsene for PCR-reaksjonene er i det vesentlige som beskrevet (Kim & Smithies (1988), Nucleic Acids Res. 16:8887-8893). Etter sentrifugering resuspenderes den oppnådde ES-cellepellet i 5 μ L PBS og lyses ved tilsetning av 55 μ L H_2O til hvert rør. DNAs er inaktiveres ved oppvarming av hvert rør til 95°C i 10
30 minutter. Etter behandling med proteinase K ved 55°C i 30 minutter, overføres 30 μ L av hvert lysat til et rør inneholdende 20 μ L av en reaksjonsblanding som innbefatter PCR-buffer: 1,5 μ g av hver primer, 3U Taq polymerase, 10% DMSO og 0,2 mM av hver dNTP. Ved PCR-

mangfoldiggjøringen benyttes 55 runder under bruk av en "thermocycler" med 65 sekunders smelting ved 92°C og 10 minutters renaturering og polymerisasjon ved 65°C. De to oligonukleotid-primere er TGGCGGACCGCTATCCCCAGGAC og TAGCCTGGGTCCCTCCTTAC, som tilsvarende henholdsvis en region 650 baser 3' fra startkodonet til neomycin-genet og sekvenser lokalisert i genet for tung kjede hos mus, 1100 baser 3' fra innskuddssetet. 20 µL av reaksjonsblandingen underkastes elektroforese på agarosegel og overføres til nylonmembraner (Zeta Bind). Filterne behandles med prober som utgjøres av et ³²P-merket fragment av 991 bp XbaI-fragmentet av J-C-regionen.

EKSEMPEL II

II. Delesjon av gene for Ig tung kjede J (J_H) i ES-celler fra mus

A. Konstruksjon av den målrettede substitusjonsvektor

Et 6,1 kb EcoRI fragment som inneholder gene for immunoglobulin tung kjede J-regionen og flankerende sekvenser, klonet fra et genomisk bibliotek fra et Balb/C muse-embryo og innskutt i pUC18 (pJ_H), ble kuttet med XhoI og NaeI for å delere et ca. 2,3 kb fragment inneholdende de fire J-gene (se Figur 2A). Et ca. 1,1 kb XhoI-BamHI fragment med butte ender ved BamHI-setet, inneholdende et neomycin-resistensgen regulert av Herpes simplex virus thymidinkinase-gen- (HSV-tk) promoteren og polyoma-enhancer ble isolert fra pMC1Neo (Thomas & Capecchi (1987), Cell, 51, 503-512). Dette fragmentet ble innskutt i det XhoI-NaeI-delerte pJH for å danne delesjonsvektoren (pmH_δJ, se Figur 2B), hvor den transkripsjonelle orientering av neomycin- og tung kjede-gene er den samme. Dette plasmidet ble linearisert ved NdeI-kutting før transfeksjon til ES-celler. Sekvensene som regulerer den homologe rekombinasjon, er ca. 2,8 kb og ca. 1,1 kb-fragmenter som er lokalisert henholdsvis 5' og 3' til neomycin-genet.

B. Dyrkning, eletroporering og seleksjon av ES-celler

ES-cellelinjen E14TG2a (Koller & Smithies (1989), PNAS USA, 86:8932-8935) ble dyrket på mitomycin-C-behandlede embryoniske fibroblast-feeder-lag som beskrevet (Koller & Smithies (1989), PNAS USA, 86:8932-8935). ES-celler ble trypsinisert, resuspendert i HPS-buffer (pH 7,05; 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0,7 mM Na₂HPO₄, 21 mM HEPES pH 7,1) i en konsentrasjon på 2 x 10⁷/mL og elektroporert i nærvær av 50 µg/ml av den lineariserte inaktiveringsvektor. Elektroporering ble foretatt med en BioRad Gene Pulser ved bruk av 240 volt og en kapasitans på 500 µF. 5 x 10⁶ elektroporete celler ble utplatet på mitomycin-C-behandlede fibroblaster i 100 mm skåler i nærvær av Dulbecco's modifiserte Eagle's medium (DMEM) supplert med 15% føtalt bovint serum og 0,1 mM 2-merkaptoetanol. Mediene ble erstattes 24 timer etter elektroporering med medier som inneholdt 200 µg/mL G418. G418-resistente ES-kolonier som var resultat av vekst i 12-14 dager etter elektroporering, ble plukket med uttrukne kapillær-pipetter for analyse ved bruk av polymerase-kjedereaksjon (PCR). Halvparten av hver utplukkede koloni ble overført til individuelle brønner i en 24-brønns plate hvor det allerede var utsådd mitomycin-C-behandlede feeder-celler. De andre halvdelene, hvor 4 og 4 av disse er slått sammen, ble overført til Eppendorf-rør inneholdende 0,3 mL PBS, og det ble fremstillet celle-lysater for PCR-analyse som beskrevet av Joyner et al. (1989) Nature, 338: 153-155. PCR-reaksjonen inkluderte 5-20 µL av celle-lysatet, 1 µM av hver primer, 1,5 U Taq polymerase og 200 µM dNTP. PCR-amplifikasjonen benyttet 45 runder under bruk av en "thermocycler" (Perkin-Elmer Cetus) med 1 minutt smelting ved 94°C, 2 minutters renaturering ved 55°C og 3 minutter polymerisasjon ved 72°C. De to oligonukleotid-primerne er ACGGTATCGCCGCTCCCGAT og AGTCACTGTAAAGACTTCGGGTA, som tilsvarer henholdsvis ca.120 baser 5' fra BamHI-setet til neomycin-genet og sekvenser lokalisert i genet for tung kjede hos mus, ca. 160 baser 3' fra innskuddssetet. Vellykket homolog rekombinasjon fører til et ca. 1,4 kb fragment. 20 µL av reaksjonsblandingen underkastes elektroforese på 1% agarose-gel, farves med etidiumbromid og overføres til nylonmembraner (Gene Screen). Filterne behandles med probe bestående av et ³²P-merket ca. 1,4 kb EcoRI-PstI-fragment lokalisert i tung kjede hos mus, 3' av

innskudds-setet (se Figur 2). For videre analyse ble det fremstillet genomisk DNA fra ES-celler, kuttet med restriksjonsenzymmer i henhold til produsentens anbefaling, og fragmenter separert på 1% agarose-gel. DNA ble overført til nylonmembraner (Gene Screen) og behandlet med det ovenfor beskrevne ³²P-merkede fragment som probe.

C. Analyse av G418-resistente ES-kolonier

I det første forsøk fastslo PCR-analyse av de sammenslåtte kolonier et positivt PCR-signal av forventet størrelse (ca. 1,4 kb) fra 34 sammenslåtte forråd som representerte 136 G418-resistente kolonier. De fire enkeltkolonier som hadde bidratt til dette positive forråd ble analysert individuelt ved PCR, og en positiv klon, ES33D5, ble identifisert. Lignende analyse av 540 G418-resistente kolonier oppnådd i det andre forsøk, førte til fire ytterligere positive kloner (ES41-1, ES61-1, ES65-1, ES110-1).

For å bekrefte den målrettede ødeleggelse av én kopi av J-genene (genet er autosomt og foreligger således i to kopier), ble de PCR-positive klonene mangfoldiggjort og genomisk DNA fremstillet, kuttet med HindIII eller med SacI og analysert ved Southern blotting-analyse som beskrevet ved bruk av EcoRI-PstI-proben.

Erstatningen av J-genene ved innskudd av neomycin-genet ved en homolog rekombinasjon, resulterer i et HindIII fragment som kan påvises med EcoRI-PstI-proben, som er ca. 1,9 kb lenger enn det tilsvarende fragment i det native locus, hvilket skyldes tapet av to HindIII-seter lokalisert i den delerte J-gen-region (se Figur 2C). Southern blotting-analyse av hver av de fem positive klonene ved HindIII-kutting ga et mønster som tydet på at én av de to kopiene av tung kjede J-genene var ødelagt. Tre merkede fragmenter ble påvist: ett fragment (760 bp) med samme størrelse som det forekommende i ubehandlede celler med samme intensitet, ett fragment (ca. 2,3 kb) med samme størrelse som det forekommende i ubehandlede celler, men med nedsatt intensitet i den PCR-positive klon, og et ytterligere fragment ca. 4,2 kb, den størrelse som forventes ved en homolog rekombinasjon, kun forekommende i de PCR-positive klonene. På tilsvarende måte resulterer erstatning av J-genene med neomycin-genet ved

homolog rekombinasjon i et tap på ett SacI-sete og forekomst av et fragment som kan påvises med EcoRI-PstI-proben og som er ca. 570 bp kortere enn det tilsvarende fragment i det native locus (se Figur 2C). Southern blotting-analyse av klonene etter SacI-kutting ga det forventede mønster til ett nativt og ett målrettet allel: ca. 4,0 kb fragment, med samme størrelse som det påvist i ubehandlede celler, men med nedsatt intensitet i de 5 positive klonene, og ett ytterligere fragment på ca. 3,4 kb med forventet størrelse for en målrettet homolog rekombinasjon, kun forekommende i de identifiserte klonene. Rehybridisering av de resulterende Southern blott med en probe for neomycin-genet viste at kun 4,2 kb- og 3,4 kb-fragmentene, som skrev seg fra henholdsvis HindIII- og SacI-kuttingen, hybridiserte til proben som forventet ved målrettingen.

D. Utvikling av kimære mus med J_H-delesjoner

Tre og en halv dag gamle C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) blastocyster ble tatt fra 4-5 uker gamle super-ovulerte hunner som beskrevet av Koller et al. 1989 (supra). ES-cellene ble trypsinisert, vasket én gang med friskt DMEM-medium og fortynnet til ca. 1×10^6 /mL i DMEM-medium inneholdende 10% føtalt bovint serum og 20 mM HEPES, pH 7,5. 10 til 15 celler ble injisert inn i blastocølet til hver blastocyst. ES-celleholdige blastocyster ble deretter overført kirurgisk til et børhorn i C57BL/6J X DBA/2 eller C57BL/6J X CBA F1-pseudogravide hunner.

ES-cellenes bidrag til avkommet ble vurdert visuelt ved undersøkelse av ungenes pelsfarge. Farven til C57BL/6J-mus er helsort. ES-celleforeldrelinjen E14TG2a ble isolert fra 129/Ola-embryoer som er bærer av tre pelsfarge-gener, det dominante A^W-allel i aguti-locuset, det recessive "pink-eyes-dilute"-allel i p-locuset og det recessive C^{ch} i c-locuset. Kimært avkom hvor ES-cellene har deltatt i dannelsen av dyret, har pels som inneholder aguti-grå og kremgule hår.

De kimære musenes evne til kimlinje-overføring ble undersøkt ved parring med C57BL/6J-mus, og F1-avkommet gitt poeng for aguti-farge. 50% av disse aguti-musene skulle forventes å arve det muterte allel for tung kjede

som kan identifiseres ved Southern blotting-analyse av DNA isolert fra hale (tail).

Den J_H -målrettede ES-cellelinje ES65-1, som bærer et målrettet allel for tung kjede, ble injisert i C57BL/6J-muse-blastocyster. Ca. 45% av det overlevende avkom var kimærer. To kimære hunner, 238-2 og 244-3, førte etter parring med C57BL/6J-hanner, til kimlinje-overføring med en frekvens på 100% og 15%, fastslått ut fra prosentandelen aguti-farvet avkom. Southern blotting-analyse av DNA fra heterozygot avkom tydet på forekomst av den målrettede tunge kjede i tillegg til et nativt allel i 2 av 5 undersøkte aguti-farvede unger.

Mus som var homozygote for mutasjonen ble oppnådd ved å krysse hann- og hunn-mus som var identifisert som J_H -delerte (δJ_H) heterozygoter. Avkom etter disse parringene ble analysert ved Southern blotting-analyse på nærvær av de to målrettede alleler for tung kjede.

E. Analyse av B-celler fra kimære mus

Dersom deleksjon av J_H -regionen er tilstrekkelig til å inaktivere locuset for tung kjede, burde det resultere i fullstendig blokkering av utviklingen av IgM-uttrykkende B-celler og av antistoff-dannelse. Mus som er heterozygote ved J_H -locuset, bærer et intakt og funksjonelt allel for tung kjede, som skriver seg fra C57BL/6J-opphavet, og et allel for J_H -delert tung kjede som skriver seg fra ES-cellene (129/Ola-stamme). Stammene 129 og B6 adskiller seg med hensyn til allotyper for Ig tung kjede. ES-avlede B-celler (IgM^a allotype) kan skjelnes fra B6-avlede B-celler (IgM^b allotype) med allotype-spesifikke monoklonale antistoff, ved å benytte flow-cytometrisk analyse av antistoff som uttrykker B.

Spesifisiteten av disse antistoffene er vist i Figur 3 (A-C). Lymfocytter fra perifert blod ble farvet med antistoff mot den B-celle-spesifikke markør, B220, og med antistoff mot IgM-allotypen. B-celler fra C57BL/6J-mus ga farve med antistoff rettet mot IgM^b-allotypen, men ikke mot IgM^a-allotypen (Figur 3B). B-celler som skriver seg fra 129/Ola-mus ga farve med antistoff mot IgM^a-allotypen, men ikke mot IgM^b-allotypen (Figur 3A). I heterozygote (a/b F1) mus som er bærere av et intakt ES-avledet allel for tung kjede, og et

intakt C57BL/6J-avledet allel for tung kjede, var begge allotypene tilstede i like mengder (Figur 3C).

Når B-celler fra mus som var heterozygote for J_H -delesjonen ble analysert, hvor det J_H -delerte allel for tung kjede var fra 129/Ola-opphavet, forekom ingen positive celler for IgM^a-allotypen. Alle B-celler var IgM^b-positive, fra det intakte allel for C57BL/6J tung kjede (Figur 3D). Disse resultatene tyder på at locuset for J_H -delert tung kjede inaktiveres og ikke kan kode for et funksjonelt IgM-antistoff.

Mus som var homozygote for J_H -delesjonen ble også analysert med henblikk på evnen til å produsere funksjonelle antistoff. Lymfocytter i perifert blod fra homozygote mutante mus ble analysert ved flow-cytometri ved å benytte antistoff mot den B-celle-spesifikke markør B220 og med de allotype-spesifikke markørene (se Figur 4). I motsetning til kontrollmusene (Figur 4D-F) kunne ingen B220⁺-celler eller IgM-produserende celler påvises i de mutante musene (Figur 4A-C). Dessuten hadde mutante mus intet påvisbart IgM i serumet. Disse resultatene tyder på at delesjonen av J_H -regionene fra begge allene for tung kjede fører til fullstendig inhibering av B-celleutvikling til modne B-celler og produksjon av antistoff.

F. Utvikling av homozygote mutante ES-celler

Virkningen J_H -delesjon på B-celler kan også analyseres ved å utvikle ES-celler hvor begge allelene for tung kjede er målrettet, som så benyttes for å produsere kimære mus som inneholder en populasjon av lymfoide celler som er homozygote for mutasjonen.

Homozygote δJ_H -mutante ES-celler ble frembragt ved å underkaste en av de heterozygote mutante ES-klonene, ES110-1, forhøyede nivåer av G418 (1,4 mg/mL) og deretter selektere for homogenotisering av det målrettede allel. Syv av de overlevende koloniene ble ved hjelp av Southern blotting-analyse under bruk av SacI-kutting, underkastet screening med henblikk på tap av villtype-allelet for tung kjede og ervervelse av et andre målrettet allel. For en av disse klonene, ESDK207, ble det vist at den hadde mistet det native allel for tung kjede, hvilket fremgikk av at probene ikke var i stand til å påvise villtypens 4,0 kb fragment og ved den forhøyede intensitet

av det 3,4 kb målrettede fragment. Karyotypisk analyse av ESDK207 tydet på at ca. 80% av cellene, i likhet med foreldrelinjen ES110-1, hadde 40 kromosomer, noe som tydet på at det forelå to målrettede alleler. De homozygote mutante ES-cellene ble mikroinjisert inn i C57BL/6J-
 5 blastocyster, og det ble utviklet kimære mus.

G. Analyse av B-celler fra homozygote kimærer

B-celler fra kimære mus ble analysert for å bestemme virkningen av J_H -delesjon på B-celleutvikling og antistoffproduksjon. Lymfocytter fra ES-cellelinjen (129/Ola) kan skjelnes fra blastocyst-avledede (C57BL/6J)
 10 lymfocytter med et monoklonalt antistoff mot Ly-9.1-markøren som finnes på lymfocytter av 129-opprinnelse, men ikke på de av B6-opprinnelse. Dessuten adskiller de to stammene seg, som tidligere beskrevet, med hensyn til deres IgM-allotype.

De analyserte kimærene var blitt oppnådd fra villtype E14TG2a-ES-celler (WT) eller fra ES-celler som var heterozygote (ES110-1, ES65-1) eller homozygote (ESDK207) ved den målrettede J_H -region. Mononukleære celler fra perifert blod ble farvet med antistoff mot den B-celle-spesifikke markør B220 og med antistoff enten mot Ly-9.1- eller IgM-allotyper, og deretter
 15 analysert ved to-farve-flowcytometri. For å vurdere kimærisme i T-cellelinjen, ble cellene farvet med antistoff for T-celle-markøren Thy 1.2 og med anti-Ly-9.1-antistoff. Farving av celler fra mus av foreldrestammen ga
 20 kontroller for spesifisitet og følsomhet av bestemmelsen.

Mus som ut fra vurdering av pelsfarven hadde samme grad av kimærisme, ble sammenlignet. ES-avledede B- og T-celler ble påvist i det
 25 perifere blod hos kimære mus utviklet fra villtype E14TG2a-ES-celler, hvilket bekrefter denne cellelinjes evne til å danne lymfoide celler in vivo. Analyse av kimærer utviklet fra individuelle J_H -målrettede ES65-1- og ES110-1-celler, viste nærvær av $B220^+/IgM^{a+}/Ly-9.1^+$ B-celler som inneholdt et enkelt, intakt,
 30 ES-celle-avledet locus for Ig tung kjede.

I kontrast til villtypen og kimærer med en enkelt delesjon, manglet mus utviklet fra den homozygote mutant ESDK207-cellelinje, $Ly-9.1^+/B220^+$ eller $IgM^{a+}/B220+1$ -B-celler i perifert blod. Den observerte mangel på

ESDK207-avlede B-celler skyldtes ikke mangel ved lymfopoiesen i og med at ES-avlede Ly-9.1⁺/B220⁻-celler representerte 12% av totalforrådet av mononukleære celler fra perifert blod. Av disse var ca. halvparten Thy-1.2⁺-T-celler. Delesjon av J_H-regionen fra begge alleler blokkerer således utviklingen av modne IgM^a-produserende B-celler. Lignende observasjoner ble gjort for kimære miltceller.

Kimærer ble også testet på nærvær av serum IgM som skrev seg fra ES-cellene. IgM^a-nivåene var høye i kimærer fra villtype ES-celler og celler med en enkelt målrettet mutasjon, men kunne ikke påvises i mus avledet fra ESDK207-cellelinjen.

Videre analyse viste at benmarg fra ESDK207-mus inneholdt normale IgM^{b+}-B-celler avledet fra blastocyst-verten, men manglet ES-avlede IgM^{a+}-B-celler. DK207-avledet benmarg inneholdt imidlertid en cellepopulasjon som var B220^{dull}/Ly-9.1⁺ avledet fra ES-cellene. Det er derfor sannsynlig at benmargen inneholder en subpopulasjon av ES-celle-avlede B-celle-prekursorer som blokkeres i sin modning av den homozygote delesjon av J_H-regionen.

Benmargcellene ble også analysert med tre-farve-flowcytometri ved å benytte antistoff mot Ly-9.1, B220 og enten CD43 eller Thy-1.2. Resultatene viser at storparten av ES-avlede celler var CD43-positive, hvilket stemmer overens med en tidlig blokkering av modningen. Mange av cellene var også positive for Thy-1.2, hvilket var å forvente av meget tidlige B-celle-prekursorer. Disse data viser at delesjon av J_H-regionen resulterer i at locuset for den tunge kjede ikke kan rearrangere og produsere funksjonelt IgM. Mangel på IgH- rearrangering resulterer i en blokkering av B-celle-modning, hvorved B-celle-progenitorer begrenses til et tidlig utviklingstrinn.

EKSEMPEL III**Delesjon av den konstante region (C_K) av****Ig kappa lett kjede hos mus****A. Konstruksjon av den målrettede substitusjonsvektor**

5 Kappa-regionen ble inaktivert med en vektor av substitusjonstype som ble konstruert for å delere den konstante region av kappa-locuset og erstatte den med G418-markøren for medikamentresistens gjennom homolog rekombinasjon. Homolog rekombinasjon ble regulert av homologiregioner som flankerer den konstante region (se Figur 5).

10 Et genomisk bibliotek fra 129/Ola-lever-DNA fra musefostere (Stratagene) klonet inn i lambda-fag ble underkastet screening på forekomst av mus-C_K-genet med et 1,6 kb HpaI/BamHI fragment (Steinmetz & Zachau (1980) Nucleic Acids Research 8:1693-1706) som spenner over den mus-kappa-konstante region. En lambda-fag-klon som hybridiserte til denne
15 prøve, ble identifisert og deretter rensset og benyttet som en kilde for C_K-DNA. Analyse av fag-DNA viste at kappa-konstant-region-proben hybridiserte til et 5,6 kb SphI/BamHI fragment. Dette fragment inneholdt kappa-J-region-genene, et intronisk enhancer-element og kappa konstant-regionen. Det ble deretter isolert og subklonet inn i SphI- og BamHI-setene i plasmidet
20 pUC218 for å gi plasmidet pUC218/5.6kappa.

For å konstruere delesjonsvektoren ble fragmenter inneholdende 5'-regionen av kappa konstant-regionen, et thymidinkinase-gen for negativ seleksjon, et neomycin-resistens-gen og en 3'-homologi-region til kappa konstant-regionen, ligert sammen (se Figur 6).

25 Et 4,0 kb SphI/Bsu361 fragment fra plasmidet pUC218/5.6kappa ble subklonet inn i SphI- og Bsu361-setene til vektoren pSK.A for å gi plasmidet pSK.A/5'K. Vektoren pSK.A er en modifikasjon av pBluescript SK- som har en syntetisk polylinker:

30 5' GCATATGCCTGAGGTAAGCATGCGGTACCGAATTCTATAAGCTTGCG
GCCGCAGCT
CATGCGTATACGGACTCCATTCGTACGCCATGGCTTAAGATATTCGAAC
GCCGGCG 3'

innskutt mellom pBluescript KpnI- og SacI-setene.

Et 2,7 kb EcoRI/HindIII fragment som inneholdt herpes-thymidinkinase-(TK)-genet, regulert av mus-fosfoglyceratkinase-gen-promoteren (PGK-promoter) fra plasmidet pKJtk (Tybulewicz, et al., (1991) Cell 65:1153-1163) ble innskutt i EcoRI- og NotI-setene til pSK.A/5'K ved å benytte en HindIII/NotI-adapter med sekvensen:

5' AGCTGGAACCCCTTGCCCTTGGGGAACGCCGG 3'

I det resulterende plasmid, pSK.A/5'K/TK, befinner 5'-enden av TK-genet og genet for kappa konstant region seg i nabostilling til hverandre i motsatte transkripsjonelle orienteringer.

Et 1,1 kb XhoI/BamHI fragment fra pMC1Neo, som inneholder den pattedyr-medikament-selekterbare markør for resistens mot neomycin, ble klonet inn i XhoI- og BamHI-setene til plasmidet pSK.B for å gi plasmidet pSK.B/Neo. Vektoren pSK.B er en modifikasjon av pBluescript SK- som har en syntetisk polylinker:

**5' GAGCTCGGATCCTATCTCGAGGAATTCTATAAGCTTCATATGTAGCT
CATGCTCGAGCCTAGGATAGAGCTCCTTAAGATATTCGAAGTATACA 3'**

innskutt mellom pBluescript KpnI- og SacI-setene.

Et 1,1 kb BglII/BamHI fragment fra pUC218/5.6kappa, som inneholder homologi til 3'-enden av kappa-regionen, ble klonet inn i en BamHI-kuttet, alkalisk fosfatase-behandlet, pSK.C-vektor. Vektoren pSK.C er en modifikasjon av pBluescript SK- som har en syntetisk polylinker:

**5' AAGCTTATAGAATTCGGTACCTGGATCCTGAGCTCATAGCGGCCGCA
GCT
CATGTTCTGAATATCTTAAGCCATGGACCTAGGACTCGAGTATCGCCGGC
G 3'**

innskutt mellom pBluescript KpnI- og SacI-setene. Det resulterende plasmid, pSK.C/3'K er orientert slik at transkripsjonen skjer fra SacI-setet i plasmid-polylinkeren i retning mot KpnI-setet.

5 Det endelige målrettede plasmid ble konstruert ved en ligering av tre deler ved å benytte (A) et 6,1 kb NotI/NdeI fragment fra pSK.A/5'K/TK, (B) et 1,2 kb NdeI/SacI fragment fra pSK.B/Neo og (C) et 4,0 kb SacI/NotI fragment fra pSK.C/3'K ligert for å oppnå plasmidet pK.TK/neo.

10 **B. Elektroporering av kappa-delesionsvektor inn i ES-celler**

Renset plasmid-DNA fra pK.TK/Neo ble kuttet med PvuI, ekstrahert med fenol/kloroform og utfelt med etanol. DNA ble etter utfellingen resuspendert i en konsentrasjon på 1 mg/mL i 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

15 Den embryoniske stamcellelinje E14-1, en subklon av E14 (Hooper et al. (1987) Nature 326:292-295) ble dyrket i DMEM 4,5 g/L glukose (J.R.H. Biosciences) supplert med 15% varme-inaktivert føtalt kalveserum, rekombinant murin leukemi-inhibitor-faktor (ESGRO fra Gibco BRL, 1000 U/mL), 0,1 mM β -merkaptoetanol, 2 mM glutamin og 100 U/mL penicillin ved 37°C i 5% CO₂.

20 Cellene ble dyrket på lag av mitomycin-behandlede primære embryoniske fibroblast feeder-celler i det vesentlige som beskrevet (Koller & Smithies (1989) supra). De embryoniske fibroblastene ble fremstillet fra dag 14-embryoer som var bærere av den homozygote målrettede mutasjon av β 2-mikroglobulin (Koller & Smithies (1990) Science 248:1227-1230). Disse feeder-cellene kan vokse i medier som inneholder G418.

25 Ved 80% konfluens ble ES-cellene preparert for elektroporering ved trypsinisering, konsentrering ved kortvarig sentrifugering og resuspending i HEPES-bufret saltoppløsning til 2×10^7 celler/mL. Cellene ble ekvilibret ved romtemperatur og tilsatt linearisert målrettet vektor-DNA (20 μ g). Blandingen ble elektroporert ved 960 μ F og 250 V med en BioRad Gene Pulser. Cellene
30 fikk stå ved romtemperatur i 10 minutter før utplating på 4 x 10 cm skåler av mitomycin-behandlede fibroblast-"feeders" (3×10^6 feeder-celler/plate). Etter inkubering ved 37°C i 48 timer, ble cellene tilført media som inneholdt

150 µg/mL G418 for å selektere for neomycin-resistens. Etter ytterligere 48 timer ble cellene tilført media inneholdende 150 µg/mL G418 og 2 µM gancyclovir (Syntex) for å selektere for tap av thymidinkinase-genet.

5 **C. Analyse av målrettede ES-celler**

Etter 10 dagers medikament-selektering med både G418 og gancyclovir, ble de enkelte overlevende kolonier plukket og dissosiert med en dråpe trypsin i en 96-brønns plate og deretter inkubert ved 37° i 2 minutter. Cellene fra hver koloni ble overført til en brønn i en 24-brønns plate
10 inneholdende mitomycin C-behandlede feeder-celler og selektive media med G418, men uten gancyclovir. Etter ytterligere 5-8 dager ble 20% av cellene i hver brønn nedfrosset og resten benyttet til fremstilling av genomisk DNA. Cellene ble lysert med 0,4 mL 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS og proteinase K (1 mg/mL) ved inkubering over
15 natten ved 50°C. DNA ble rensert ved fenolekstraksjon og etanolutfelling, deretter vasket med 70% etanol og resuspendert i 20 µL 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.

Southern-blotting-analyse ble foretatt under bruk av BgIII-kuttet genomisk DNA fra hver prøve. Et ca. 1,2 kb BamHI/BgIII fragment som
20 inneholder regionen sammenhengende med 3'-homologifragmentet i den målrettede vektor, ble benyttet som probe. Det native ES-celle-locus ga et ca. 2,3 kb fragment, mens det målrettede ES-celle-locus ga et ca. 5,7 kb fragment. Den økte størrelse skyldes tapet av BgIII-setet under konstruksjonen av delesjonsvektoren.

25 En Southern blotting-analyse av 166 kloner viste to cellelinjer som hadde den tiltenkte mutasjon. Disse klonene ble analysert videre ved at filterne ble behandlet med en probe bestående av et ca. 1,1 kb fragment som spenner over neo-genet. Som forventet, hybridiserte proben bare til det målrettede allel.

30 Videre analyse av det genomiske DNA fra de to positive klonene, 1L2-850 og 1L2-972, etter opptining og mangfoldiggjøring, bekreftet på nytt de første observasjonene. En tredje probe, et ca. 1,7 kb HindIII/BgIII fragment som spenner over kappa-J-region-locuset, ble benyttet til kontroll av korrekt

integreringsmønster fra 5'-enden til den målrettede vektor. Ved å benytte denne probe med EcoRI-kuttet genomisk DNA, ble et ca. 15 kb fragment påvist i det native allel og et ca. 5 kb fragment fra det målrettede locus. Det ytterligere EcoRI-setet føres inn av neo-genet under målrettet homolog rekombinasjon (se Figur 7).

D. Utvikling av kimlinje-kimærer

De umodifiserte E14-1-cellene har vist seg å bidra med høy frekvens til kimlinjen etter injeksjon i C57BL/6J-blastocyster. For å utvikle kimlinje-kimærer som inneholder den målrettede kappa-region, ble de målrettede cellelinjene 1L2-850 og 1L2-972 dyrket på primære feeder-celler, deretter trypsinisert og resuspendert i injeksjonsmedium som besto av DMEM supplert med 15% føtalt kalveserum, 20 mM HEPES (pH 7,3), antibiotika og β -merkaptoetanol. ES-cellene ble injisert inn i hver enkelt blastocyst og de injiserte blastocystene deretter overført til et uterushorn i en pseudogavid hunnmus. Kimære unger ble identifisert via den kimære pelsfarge. Kimære hanner ble krysset med C57BL/6J-hunner, og kimlinje-overføringen av 129/Ola-avlede ES-celler ble påvist gjennom avkommets aguti-farvede pels.

En kimær hann fra cellelinje 1L2-972 (ut fra dens pelsfarge, ca. 40% ES-celle-avledet) førte etter parring med C57B1/6J-hunner til kimlinje-overføring med en frekvens på 25%, bestemt ved prosentandelen aguti-farvet avkom. Kimære hanner, ca. 40%, 70% og 90% kimære, fra cellelinje 1L2-850, førte til kimlinje-overføring med en frekvens på henholdsvis 90%, 63% og 33%. Blant det aguti-farvede avkom utviklet fra den 70% kimære hann fra 1L2-850, ble åtte F1-dyr av 12 dyr undersøkt ved Southern blotting-analyse (en BglII-kutting ved å benytte det ovenfor beskrevne 1,2 kb BamHI/BglII fragment som probe), under bruk av genomisk DNA oppnådd fra hale-DNA, funnet å være heterozygot ved kappa-locuset for den målrettede C_{κ} -mutasjon. Parring av en hann og en hunn fra denne gruppe av åtte F1-dyr som begge var heterozygote for C_{κ} -mutasjonen, ga én hann som ble funnet å være homozygot for denne mutasjon, hvilket ble bekreftet ved Southern blotting-analyse.

E. Analyse av B-celler oppnådd fra mus, målrettet ved kappa-locuset

Dersom locus for kappa (κ) lett kjede er inaktivert som følge av delelsjonen av den lette kjedes konstante region (C κ) den sammenkoblende region (J κ) eller både C κ og J κ , burde det resultere i fullstendig blokkering i utviklingen av κ -uttrykkende B-celler. Muse-embryo-stamceller inneholdende en enkelt kopi av den fullstendige C κ -delelsjon (Δ C κ) ble innført i de ovenfor beskrevne museblastocyster for å frembringe kimære mus. Disse kimære musene ble deretter parret med villtype C57BL/6 (B6) mus, og F1-avkommet ble undersøkt på nærvær av Δ C κ -mutasjonen ved hjelp av Southern blotting av hale-DNA. F1-mus som var bærere av Δ C κ -mutasjonen ble parret, og F2-avkommet ble undersøkt på tilsvarende måte for Δ C κ . Ett av fem F2-avkom viste seg å være bærer av en homozygot C κ -delelsjon, mens en annen var heterozygot bærer av både Δ C κ - og et villtype C κ -allel. De tre øvrige av avkommet var av villtype. Forekomst eller mangel på κ -positive B-celler ble påvist ved flowcytometrisk analyse av perifere blod-B-celler farvet med fluorescerende antistoff som reagerer med en pan-B-celle-markør (B220) eller med den κ lette kjede. For den homozygote Δ C κ -F2-mus ble det ikke påvist κ -positive B-celler, og i den heterozygote var det en reduksjon i frekvensen av κ -positive B-celler, overensstemmende med nærværet av et villtype-allel og et ikke-funksjonelt Δ C κ -allel. Disse resultatene viser at delelsjon av C κ fra kromosomet forhindrer κ -ekspressjon av muse-B-celler.

25

30

EKSEMPEL IV

Inaktivering av den kappa lett kjede J- og konstante region i immunglobulin hos mus

A. Oppsett av målrettingsforsøket

5 Den målrettede vektor ble innledningsvis konstruert som en vektor av substitusjonstype for å delere den konstante region så vel som J-regionen av kappa-locuset, og erstatte det med tre elementer gjennom homolog rekombinasjon ved bruk av homologi-regioner som flankerer den konstante region (Figur 8). Et differitoksin-gen (A-kjede) som flankerer den ene eller
10 begge homologi-regionene, ble i enkelte tilfeller inkludert som en negativt selekterbar markør. De tre elementene besto av G418-medikamentresistens-markøren, en addert DNA-homologi (ADH)-sekvens av muse-DNA homologt til en region av kappa-locuset lokalisert oppstrøms for J-regionen, samt et thymidinkinase-gen. Som resultat av inkluderingen av
15 ADH-sekvensen i vektoren, satte denne første målretting en andre kopi av ADH inn i locuset. Denne duplikasjon ble deretter benyttet for å gjennomføre en avgrenset delesjon av sekvensene mellom segmentene under pålegg av et seleksjonstrykk. I dette tilfelle delerte cellen thymidinkinase-genet som ligger mellom de to segmentene, for å overleve gancyclovir-seleksjon.

20

B. Konstruksjon av målrettings-vektoren

Homologi-regionene ble avledet fra et genomisk bibliotek av leveren fra et 129-musefoster (Stratagene) som ble underkastet screening under bruk av to prober som beskrevet ovenfor i Eksempel III. Denne subklon
25 inneholdt J-regionen, et intronisk enhancer-element og den konstante region av locuset for kappa lett kjede. Den andre proben var et 0,8 kb EcoRI fragment (Van Ness et al., (1981), Cell, 27:593-602) som ligger 2,8 kb oppstrøms for J-regionen. Fag-DNA fra en lambda-klon som var positiv for denne probe, viste at proben hybridiserte til et 5,5 kb SacI fragment som ble
30 subklonet inn i SacI-setet til pBluescript SK (Stratagene) for å gi plasmidet pSK.5'-kappa (Figur 8).

Inaktiveringsvektorene som inneholdt en 5'-homologiregion, et thymidinkinase-gen, en ADH, et neomycinresistens-gen og en 3'-

homologiregion (Figur 9), i enkelte tilfeller flankert av differitoksin-gener, ble konstruert fra tre plasmider (Figur 8) inneholdende: (a) 5'-homologifragmentet med eller uten differitoksin-genet (DT) regulert av musefosfoglycerat-kinase-gen- (PGK) promoteren som en negativ selekterbar markør, (b) herpes thymidinkinase-genet (tk) regulert av musefosfoglyceratkinase-gen- (PGK) promoteren som en negativ selekterbar markør sammen med DSH og det G418-selekterbare neomycin (neo)-gen fra pMC1Neo (Thomas & Capecchi (1987), Cell, 51:503-12) og (c) 3'-homologifragmentet med eller uten det PGK-regulerte DT-gen. Disse tre plasmidene (Figur 8) ble konstruert fra henholdsvis pSK.A, pSK.B og pSK.C, alle avledet fra plasmidet pBluescript SK ved modifikasjon av polylinkeren.

Polylinkeren av plasmid pBluescript SK ble modifisert ved mellom KpnI- og SacI-setene å klonе en syntetisk polylinker definert ved oligonukleotidene

5'-GCATATGCCTGAGGTAAGCATGCGGTACCGAATTCTATAAGCTTGCGGCCGCAGCT-3' og

5'-GCGGCCGCAAGCTTATAGAATTCGGTACCGCATGCTTACCTCAGGCATATGCGTAC-3' for å frembringe plasmidet pSK.A,

5'-GAGCTCGGATCCTATCTCGAGGAATTCTATAAGCTTCATATGTAGCT-3' og

5'-ACATATGAAGCTTATAGAATTCCTCGAGATAGGATCCHAGCTCGTAC-3' for å frembringe plasmid pSK.8,

5'-AAGCTTATAGAATTCGGTACCTGGATCCTGAGCTCATAGCGGCCGCA GCT-3'- for å frembringe plasmid pSK.B og

5'-GCGGCCGCTATGAGCTCAGGATCCAGGTACCGAATTCTATAAGCTTG TAC-3' for å frembringe plasmidet pSK.C.

En differitoksin-gen-kasett hvor genet var flankert av PGK-promoteren og det bovine veksthormon-polyadenyleringssignal (Woychik et al., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3944-3948; Pfarr et al., (1986), DNA, 5:115-122). Et 2,3 kb XbaI/EcoRI fragment fra pTH-1 (Maxwell et al, (1986), Cancer Res. 46: 4660-4664) inneholdende differitoksin A-kjeden regulert av den humane metallothionein- (hMTII) promoter, ble klonet inn i pBluescript

SK, kuttet med XbaI og EcoRI, for å gi plasmidet pSK.DT. hMTII-promoterens av pSK.DT ble erstattet med PGK-promoterens fra pKJ1 (Tybulewicz et al., (1991), Cell, 65:1153-1163). Et 0,5 kb XbaI/PstI fragment fra pKJ1 ble koblet til et 3,1 kb XbaI/NcoI fragment fra pSK.DT ved å benytte en PstI/NcoI-adap-
 5 ter dannet fra oligonukleotidene 5'-GGGAAGCCGCCGC-3' og 5'-CATGGCGGCGGCTTCCCTGCA-3' for å gi plasmidet pSK.pgkDT. Et 248 bp fragment inneholdende det bovine veksthormons polyadenyleringssignal, oppnådd ved PCR-amplifikasjon av bovine genomisk DNA under bruk av oligonukleotidprimerne
 10 5'-CAGGATCCAGCTGTGCCTTCTAGTTG-3' og 5'-CTGAGCTCTAGACCCATAGAGCCCACCGCA-3', ble klonet inn i pCR1000 (Invitron Corp., San Diego, CA). Polyadenyleringssekvensen ble deretter klonet bak DT-genet som et HindIII/PvuII fragment inn i pSK.pgkDT, kuttet med HindIII og HpaI, for å gi plasmidet pSK.pgkDTbovGH. DT-
 15 genkassetten fra pSK.pgkDTbovGH ble flyttet som et 2,1 kb EcoRI/HindIII fragment inn i pSK.A, kuttet med EcoRI og NotI, under bruk av en HindIII/NotI-adap- ter dannet fra oligonukleotidene 5'-AGCTGGAACCCCTTGC-3' og 5'-GGCCGCAAGGGTTCC-3' for å gi plasmidet pSK.A/DT. Mellom SphI- og Bsu361-setene av både pSK.A og
 20 pSK.A/DT ble 5'-homologiregionen for kappa-locuset klonet. For dette formål ble et 4,0 kb SphI/Bsu361 fragment resulterende fra en partiell Bsu361-kutting, etterfulgt av en fullstendig SphI-kutting av plasmid-subklon pUC218/5.6kappa, ligert til pSK.A eller pSK.A/DT for å gi plasmidene henholdsvis pSK.A/5'K og pSK.A/DT/5'K. I plasmidet pSK.A/DT/5'K var 5'-
 25 enden av DT-genet og kappa-fragmentet nabostillet til hverandre, løpende i motsatt transkripsjonell orientering.

PGKtk-genet fra plasmidet pKJtk (Tybulewicz et al., (1991), Cell, 65:1153-1163) ble klonet som et 2,7 kb EcoRI/HindIII mellom de unike EcoRI- og HindIII-setene av pSK.B for å gi pSK.B/TK. Et 0,8 kb EcoRI
 30 fragment benyttet for ADH, ble klonet fra pSK.5'kappa og ligert inn i EcoRI-setet av pSK.B/TK for å gi pSK.B/(TK/0,8K) slik at 5'-enden av tk-genet og kappa-fragmentet var nabostillet og løp i motsatte transkripsjonelle orienteringer. Det 1,1 kb neo-genet fra pMC1Neo ble klonet som et

XhoI/BamHI fragment mellom de samme seter av pSK.B/(TK/0,8K) for å gi pSK.B/(TK/0,8K/Neo). Plasmidet pSK.C/3'K som inneholdt 3'-homologifragmentet, ble konstruert ved å ligere pSK.C, kuttet med BamHI og behandlet med alkalisk fosfatase, til det 1,1 kb BglII/BamHI fragment som var isolert fra pUC218/5.6kappa. I pSK.C/3'K var kappa-fragmentet orientert slik at transkripsjonen utviklet seg fra SacI i plasmid-polylinkeren i retning av KpnI-setet. 2,1 kb DT-kassetten fra pSK.pgkDTbovGH ble klonet som et EcoRI/HindIII fragment inn i de samme seter av pSK.C for å gi pSK.C/3'K/DT.

Ligeringer av tre deler ble foretatt for å konstruere de endelige målrettede plasmider (Figur 9). 4,0 kb NotI/NdeI fragmentet fra pSK.A/5'K og 4,8 kb NdeI/SacI fragmentet fra pSK.B/(TK/0,8K/Neo) (oppnådd ved en SacI-kutting partielt fulgt av en NdeI-kutting av plasmidet), samt 4,0 kb SacI/NotI fragmentet fra pSK.C/3'K ble isolert og ligert sammen for å frembringe pK.(TK/0,8K/Neo). Det 6,1 kb NotI/NdeI fragmentet fra pSK.A/DT/5'K, det 4,8 kb NdeI/SacI fragmentet fra pSK.B/(TK/0,8K/Neo) og 4,0 kb SacI/NotI fragmentet fra pSK.C/3'K ble isolert og ligert sammen for å danne pK.DT/(TK/0,8K/Neo). Det 6,1 kb NotI/NdeI fragment fra pSK.A/DT/5'K, det 4,8 kb NdeI/SacI fragment fra pSK.B/(TK/0,8K/Neo) og 6,1 kb SacI/NotI fragment fra pSK.C/3'K/DT (oppnådd ved en SacI-kutting partielt fulgt av en NotI-kutting av plasmidet) ble isolert og ligert sammen for å danne pK.DT/(TK/0,8K/Neo)/DT. For elektroporering ble det rensede plasmid-DNA først kuttet med PvuI eller ApaLI, deretter ekstrahert med fenol/kloroform og utfelt ved tilsetning av etanol før sentrifugering. De resulterende DNA-pellets ble resuspendert i en konsentrasjon på 1 mg/mL i 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (TE).

C. Innføring av DNA i celler

Den embryoniske stamcellelinjen E14-1 ble dyrket som beskrevet ovenfor i Eksempel III. Cellene ble ekvilibrert ved romtemperatur og DNA
5 (20 µg) linearisert med PvuI (som beskrevet ovenfor), ble tilsatt. Blandingen ble elektroporert som beskrevet ovenfor i Eksempel III.

D. Analyse av konstant region-mårettede ES-celler

Etter 7-10 dager under medikamentsseleksjon med G418, ble de
10 enkelte overlevende koloniene plukket og dissosiert i en dråpe trypsin som beskrevet ovenfor i Eksempel III.

Southern blotting-analyse ble foretatt ved å benytte BgIII-kuttet genomisk DNA fra hver prøve. Et 2,3 kb fragment fra det native ES-celle-locuset ble påvist, mens et større 4,9 kb fragment ble påvist fra et målrettet
15 ES-celle-locus (Figur 11) ved bruk av 1,2 kb BamHI/BgIII fragmentet isolert fra den opprinnelige fag-DNA, sammenhengende med fragmentet benyttet for 3'-homologien i den målrettede vektor, som probe. Størrelsen av fragmentet økte fordi BgIII-setet i BgIII/BamHI fragmentet gikk tapt i det målrettede plasmid som følge av sammenkoblingen av et BgIII-sete med et
20 BamHI-sete ved liggeringen og at et nytt BgIII-sete lokalisert i thymidinkinasegenet, innføres i det målrettede locus.

Fra en screening foretatt ved den ovenfor beskrevne Southern-blotting-analyse av totalt 103 kloner oppnådd fra forsøk hvor tre ulike målrettede plasmider ble benyttet, ble det identifisert fem cellelinjer som var
25 bærere av den tiltenkte mutasjon (Tabell 1).

Tabell 1**C_K lett kjede målrettingsresultat i E14-1**

Konstruksjon	Antall testet ved Southern	Antall kloner m/bekreftet målretting	Klon-betegn.	Treff-frekvens
pK. (Tk/0, 8K/Neo)	44	2	625.691	1/22
pK.DT (TK/0, 8/Neo)	42	2	604.611	1/21
pK.DT (TK/0, 8K/Neo)DT	17	1	653	1/17

5

Ytterligere analyse av genomisk DNA produsert fra fire av de positive klonene (klon 625, 604, 611 og 653) bekreftet etter tining og mangfoldiggjøring, de innledende observasjoner. Ved å benytte en andre probe, et 1,7 kb HindIII/BglII fragment som spente over J-regionen av kappa-locuset, ble det korrekte integrasjonsmønster kontrollert for homolog målretting ved 5'-enden av den målrettede vektor. Ved å benytte denne probe ved en EcoRI-kutting av det genomiske DNA, ble det således påvist et 15 kb fragment fra det umodifiserte allel. I motsetning til dette ble det observert et 7,8 kb fragment fra det målrettede allel som resultat av innføringen av et nytt EcoRI-sete i thymidinkinase-genet under den homologe integreringen (Figur 11).

15

E. In vitro eksisjon av J-region-DNA fra målrettede kloner

20

For å foreta den ønskede delesjon fra det homologt målrettede kappa-locus, ble celler fra klon 653 utplatet på feeder-celler i en tetthet på 0,5-1 x 10⁶ celler/10 cm skål i nærvær av både gancyclovir (2 µM) og G418 (150 µg/mL). Etter vekst i 5 dager i nærvær av begge medikamenter, ble det plukket kloner, som beskrevet ovenfor, og disse ble overført til 24-brønns plater og dyrket under seleksjon med G418 alene. Etter ytterligere 5-8 dager ble 20% av cellene i hver brønn nedfrosset og resten benyttet til å fremstille genomisk DNA som tidligere beskrevet.

25

F. Analyse av J/konstant-region-delerte ES-celler

Southern blotting-analyse ble foretatt under bruk av BamHI-kuttet genomisk DNA fra hver prøve. Ved å benytte 0,8 kb EcoRI fragmentet benyttet som ADH i de målrettede vektorene som probe, ble det påvist et 12,7 kb fragment fra det native ES-celle-locus, mens et større, 15,8 kb, fragment ble påvist fra locuset for konstant region-målrettet ES-celle (Figur 11) ved å benytte DNA fra klon 653. Fragmentet økte i størrelse på grunn av innføringen av tk-genet, ADH- og neo-genet i det 12,7 kb lange BamHI fragment. Det ble også innført et nytt BamHI-sete ved 3'-enden av neo-genet. Ved å benytte DNA fra de J/konstant region-delerte cellene, ble det som forventet ut fra analysen av restriksjonskartet, påvist et 5,5 kb fragment fra det modifiserte locus i tillegg til 12,7 kb fragmentet fra det ikke-målrettede allel. Fra denne screening ved Southern-blotting-analyse av to kloner produsert fra $1,5 \times 10^6$ utplatede ES-celler (klon 653), ble det identifisert én cellelinje (klon 653B) som var bærer av den tiltenkte delering av J- og konstant-regionene.

Videre analyse av genomisk DNA fremstillet fra klon 653B etter opptining og mangfoldiggjøring, bekreftet de innledende observasjoner. Ved å benytte 0,8 kb EcoRI fragmentet ble deleringen kontrollert gjennom to ytterligere restriksjonskuttinger som skulle kutte utenfor den kuttete region av den målrettede vektors 5'- og 3'-ender. Ved å benytte denne probe ved en BglII-kutting av det genomiske DNA fra den ikke-kuttete klon 653, ble det således påvist et 2,6 kb fragment både fra de umodifiserte og modifiserte allelene, mens et ytterligere 4,9 kb fragment bare ble registrert fra det målrettede allel (Figur 11). Dette 4,9 kb fragment var det samme som det som ble påvist med det tidligere benyttede 1,2 kb BamHI/BglII-fragment. Ved å benytte DNA fra klon 653B, førte en BglII-kutting til et 5,8 kb fragment i tillegg til 2,6 kb fragmentet fra det umodifiserte allel. En SacI-kutting av klon 653-DNA oppviste, med 0,8 kb EcoRI fragmentet som probe, et 5,5 kb fragment både fra det umodifiserte og fra det modifiserte allel og et 3,1 kb fragment fra kun det målrettede allel (Figur 11). 5,5 kb fragmentet ble også påvist i DNA fra klon 653B og et ytterligere 2,0 kb fragment. Det 5,8 kb BglII fragment og 2,0 kb SacI fragmentet stemte overens med en analyse av det

forventede restriksjonskart for et presist eksisjons-trinn, hvor 10,3 kb av DNA, inklusivt J-regionen tk-genet og én kopi av ADH, ble delert.

G. Utvikling av kimlinje-kimærer

5 De umodifiserte E14-1-celleene bidro med høy frekvens til kimlinjen etter injeksjon i C57BL/6J-blastocyster. Cellene fra den målrettede ES-cellelinje 691, hvor kun kappa konstant regionen var delert ved homolog rekombinasjon uten noen negativ seleksjon, ble mikroinjisert og kimære dyr fremstillet som beskrevet ovenfor i Eksempel III. Celler fra den målrettede
10 ES-cellelinje 653B hvor både kappa konstant regionen og J-regionen var delert, ble også mikroinjisert og kimære dyr fremstillet som beskrevet ovenfor. Kimært avkom identifiseres ved "kimær pelsfarve". Kimlinje-overføring av den modifiserte ES-celle påvises gjennom F1-avkommets aguti-farvede pels.

15

EKSEMPEL V

Kloning av humant tung kjede locus ved bruk av kunstige gjærkromosomer

A. Fremstilling av kunstige gjærkromosomer (YAC) inneholdende human tung kjede

20 Et Spel fragment som strekker seg over den humane tunge kjede VH6-D-J-C μ -C δ -region (Berman et al. (1988), EMBO J. 7:727-738; se Figur 15) isoleres fra et humant YAC-bibliotek (Burke et al. Science, 236:806-812) ved å benytte DNA-prober beskrevet av Berman et al., (1988) EMBO J. 7:727-738. Det oppnås en klon som anslås å være ca. 100 kb. Den isolerte
25 YAC-klon karakteriseres ved pulsfelt-gelelektroforese (Burke et al. supra; Brownstein et al., Science, 244:1348-1351) under bruk av radioaktivt merkede prober for den humane tunge kjede (Berman et al., supra).

B. Innføring av YAC-kloner i embryoer eller ES-celler

Høymolekylært DNA fremstilles i agarosepluggen fra gjærceller inneholdende det interessante YAC (dvs. et YAC som inneholder det ovenfor nevnte Spel fragment fra IgH-locuset). DNA størrelses-fraksjoneres på et CHEF-gel-apparat og YAC-båndet kuttes ut fra den lavtsmeltende agarosegel. Gelfragmentet ekvilibrerer med polyaminer og smeltes og behandles deretter med agarase for å oppløse agarosen. Det polyamin-dekkede DNA injiseres deretter i den hannlige pronukleus i befruktede muse-embryoer som så kirurgisk overføres til uterus i pseudogravide hunnmus, som ovenfor beskrevet. Avkommets transgene natur analyseres ved "slot-blot" av DNA isolert fra haler (tails), og produksjonen av human tung kjede analyseres ved å undersøke en liten mengde serum for nærvær av Ig-kjeder med kanin-anti-humane antistoff.

Som et alternativ til mikroinjeksjon overføres YAC-DNA til murine ES-celler ved ES-celle:gjær-protoplast-fusjon (Traver et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5898-5902; Pachnis et al., (1990), ibid., 87:5109-5113). Først settes neomycin-resistens-genet fra pMC1Neo eller HPRT eller en annen selekterbar markør fra pattedyr og en selekterbar markør fra gjær, inn i ikke-essensielle YAC-vektorsekvenser i et plasmid. Denne konstruksjon benyttes for å omdanne en gjærstamme inneholdende IgH-YAC, og pMC1Neo (eller en annen selekterbar markør) integreres i vektorsekvensen til IgH-YAC ved homolog rekombinasjon. Det modifiserte YAC overføres deretter til en ES-celle ved protoplast-fusjon (Traver et al., (1989); Pachnis et al., 1990), og resulterende G418-resistente ES-celler (eller oppvisende en annen selekterbar fenotype) som inneholder den intakte humane IgH-sekvens, benyttes til å utvikle kimære mus. Alternativt transfekteres et rensert YAC, for eksempel ved lipofeksjon eller ved kalsiumfosfat-mediert DNA-overføring, inn i ES-celler.

EKSEMPEL VI**Innføring av humane Ig-gener i mus****A. Kloning av humane Ig-gener i gjær****1. Identifikasjon og karakterisering av en human IgH-YAC-klon**

5 inneholdende VH-, D-, JH-, mu- og delta-sekvenser:

PCR-primere for det humane VH6-gen

(V6A=5' GCA GAG CCT GCT GAA TTC TGG CTG 3' og

V6B=5' GTA ATA CAC AGC CGT GTC CTG G 3') ble benyttet til screening

av DNA-forråd fra Washington University Human YAC library (Washington

10 University, St. Louis, MO). Positive forråd ble deretter underkastet screening ved hybridisering av koloniene og en positiv mikrotiterplate-brønn, A287-C10,

ble identifisert. To VH6-holdige YAC av ulik størrelse (205 kb og 215 kb) ble

isolert fra mikrotiter-brønner. I tillegg til VH6, hybridiserte den mindre av de

15 to IgH-YAC, A287-C10 (205 kb), til prober for følgende sekvenser: delta, mu, JH, D, VH1, VH2 og VH4. Den største av de to IgH-YAC, A287-C10

(215 kb), hybridiserte til følgende prober: delta, JH, D, VH1, VH2 og VH4,

men ikke til mu. YAC inneholdt sekvenser fra minst 5 VH-gener inklusiv to

VH1-gener, ett VH2-, ett VH4- og ett VH6-gen. Analyse av restriksjons-

kuttinger tydet på at det 205 kb YAC inneholder en delesjon (størrelse ca.

20 20 kb) som fjerner noe av, men ikke hele D-gen-ansamlingen, mens resten av YAC synes å være intakt og ha kimlinje-konfigurasjon. PCR og detaljert

analyse av restriksjonskuttingen av det 205 kb YAC viste nærvær av flere

forskjellige D-genfamiliemedlemmer. Det 215 kb YAC syntes å inneholde

den fullstendige hoved-D-genansamling, men hadde en delesjon (ca. 10 kb)

25 som fjernet mu-genet. Denne delesjon synes ikke å påvirke JH-ansamlingen eller den enhancer som er lokalisert mellom JH- og mu-gener.

Den antatte progenitor av de ovennevnte to beslektede IgH-YAC, et

YAC på ca. 225-230 kb som inneholdt hele den genomiske region mellom

VH2-genet og delta-genet (Shin et al., 1991, supra) (se Figur 15), var ikke

30 blitt identifisert i A287-C10-mikrotiterbrønner. En tidligere alikvot av

A287-C10-mikrotiterplate-brønner ble derfor undersøkt for å finne

progenitor-YAC under den forutsetning at den var tapt under passasjen av

biblioteket. A287-C10-mikrotiterbrønner ble

strøket ut (Washington University, St. Louis, MO) og 2 av 10 analyserte kloner inneholdt et 230 kb IgH YAC sammen med et annet tilsynelatende ubeslektet YAC. Klon 1 inneholdt dessuten IgH YAC, et tilnærmet 220 kb YAC, og klon 3 inneholdt dessuten et ca. 400 kb YAC. IgH YAC inneholdt mu, den fullstendige D-profil (på basis av en BamHI-oppslutning, se nedenfor) og JH. IgH YAC fra klon 1 ble skilt fysisk fra det ubeslektede YAC ved meiotisk segregasjon ved en krysning mellom A287-C10/AB1380 og YPH857 (genotype=MAT α ade2 lys2 ura3 trp1 HIS5 CAN1 his3 leu2 cyh2, for å gi A287-C10 (230 kb/MP 313 (verts-genotype=MAT α ade2 leu2 lys2 his3 ura3 trp1 can1 cyh2).

2. Målretting av det A287-C10 kb YAC med en selekterbar markør fra pattedyr, HPRT:

En YAC høyrearms målrettings-vektor betegnet pLUTO (15,6 kb) ble frembragt ved subkloning av et humant HPRT-minigen som inngikk i et 6,1 kb BamHI fragment (Reid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4299-4303 (1990)) inn i BamHI-setet i polylinkeren til pLUS (Hermanson et al., Nucleic Acids Research, 19:4943-4938 (1991)). En kultur av A287-C10/AB1380 inneholdende både det 230 kb IgH YAC og et ubeslektet YAC, ble transformert med linearisert pLUTO og selektert for Lys⁺-transformanter. Lys⁺-klonene ble underkastet screening ved hybridisering av kloner for nærvær av mu. Det ble identifisert én klon som inneholdt et enkelt YAC på ca. 240 kb som hybridiserte til prober for mu, HPRT og LYS2.

Southern blotting-analyse av det 230 kb A287-C10 YAC målrettet med pLUTO, ble foretatt under bruk av en rekke prober for å demonstrere den intakte, ikke-rearrangerte natur av de klonede humane IgH-sekvenser. I de fleste tilfeller ble resultatene av BamHI-, HindI- og EcoRI-kuttingene sammenlignet med restriksjonsdata for WI38 (en human embryonisk fosterlunge-avledet cellelinje), 205 kb og 215 kb delesjons-derivatene av A287-C10 og publiserte verdier. Diversitet- (D) genprofilen bestemt ved hybridisering med en D-region-probe (0,45 NcoI/PstI fragment; Berman et al., 1988) viste de forventede fire D-gensegmentene (D1-D4 (Siebenlist et al., 1981; Nature, 294:631-635)). Med BamHI ble det for eksempel observert

fire restriksjonsfragmenter, 3,8 kb, 4,5 kb, 6,9 kb og 7,8 kb, i A287-C10 og WI38. WI38 hadde et ytterligere, større bånd som antas å skrive seg fra D5-regionen på kromosom 16 (Matsuda et al., 1988, EMBO, 7:1047-1051). PCR- og Southern blotting-analyse med D-familie-spesifikke primere og prober demonstrerte i det 215 kb delesjons-derivatet YAC (som viste seg å ha en intakt D-region med samme restriksjonsmønster som 230 kb YAC) forekomsten av 2 til 4 medlemmer av hver av følgende D-gen-familier: DM, DN, DK, DA, DXP og DLR. Den J-mu-introniske enhancer, som ble sekvensert fra klonede PCR-produkter fra A287-C10 230 kb YAC (primere EnA=5' TTC CGG CCC CGA TGC GGG ACT GC 3' og EnB1=5' CCT CTC CCT AAG ACT 3') og bestemt å være intakt, frembragte også individuelle restriksjonsfragmenter av tilnærmet forventede størrelser med BamHI, EcoRI og HindIII når 480 bp PCR-produktet ble benyttet som probe. JH-regionen ble vurdert med en ca. 6 kb BamHI/HindIII fragment-probe som strakte seg over DHQ52 og hele JH-regionen (Ravetch et al., 1981, Cell, 27:583-591). A287-C10 førte til restriksjonsfragmenter av tilnærmet forventede størrelser. Restriksjonsfragmentene av lik størrelse ble dessuten påvist med enhanceren og JH-probene (Ravetch et al., supra; Shin et al., 1991, supra). Det ca. 18 kb BamHI JH-fragment som ble påvist i A287-C10 og WI38 hybridiserte også til en 0,9 kb mu-probesekvens (Ravetch et al., supra). Hybridisering med 0,9 kb EcoRI fragment-mu-proben (Ravetch et al., supra) viste restriksjonsfragmenter av tilnærmet forventede størrelser (Ravetch et al., supra; Shin et al., supra): >12 kb BamHI (ca. 17 kb forventet); 0,9 kb EcoRI (0,9 kb forventet) og ca. 12 kb HindIII (ca. 11 kb forventet). WI38 ga BamHI fragment med samme størrelse som A287-C10. JH- og DHQ52-regionene fra begge YAC-delesjons-derivatene ble sekvensert og begge var i kimlinje-konfigurasjon. Delta ble analysert med et exon 1 PCR-produkt (som inneholdt regionen på tilnærmet 160 bp mellom primerne D1B= 5' CAA AGG ATA ACA GCC CTG 3' og D1D= 5' AGC TGG CTG CTT GTC ATG 3'); restriksjonsfragmenter for A287-C10 lå nær de forventet fra litteraturen (Shin et al., supra) og til de bestemt for WI38. 3'-kloningssetet av YAC kan være det første EcoRI-sete 3' av delta (Shin et al., supra) eller et annet EcoRI-sete lenger mot 3'. VH-

genprober for VH1, VH4 og VH6 (Berman et al., supra) og for VH2 (Takahashi et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5194-5198) ble benyttet for å vurdere det variable geninnhold i YAC. A287-C10 inneholder to VH1-gener som har tilnærmet den forventede størrelse (Shin et al., supra;
5 Matsuda et al., 1993, supra); restriksjons-analyse med de tre enzymene ga størrelser nær de forventede fragmenter, f.eks. med EcoRI var observerte bånd 3,4 og 7,8 kb (forventet 3,4 og 7,2 kb). De forventede størrelser av EcoRI fragmenter for VH4 (5,3 kb observert, 5,1 kb forventet) og for VH6 (0,8 kb observert, 0,9 kb forventet) (Shin et al. supra; Matsuda et al., supra)
10 forekom i A287-C10. EcoRI fragmentet med forventet størrelse ble iaktatt for VH2 (5,5 kb observert, 5,4 kb forventet), men BamHI og HindIII fragmentene var forskjellige fra de forventede. Samtidig hybridisering av BamHI- og HindIII-fragmentene med en pBR322-probe tydet på at EcoRI-setet som er i 5'-enden av VH2-genet (Shin et al., supra), er 5'-kloningssetet, hvorved det
15 naturlige 5'HindIII-setet og BamHI-setene elimineres. Den totale lengde av YAC-innskuddet (anslått til ca. 220 kb) stemmer godt med den forventede størrelse for et intakt, ikke-rearrangert segment som starter i 5'-enden av det VH2-gen som er nærmest 3', og strekker seg til et EcoRI-sete 3' av delta-locuset (Shin et al., supra).

3. Identikasjon og karakterisering av IgK YAC som inneholder CK- og VK-sekvenser:

To YAC ble identifisert ved en screening av PFG-forråd (pulsed field gel pools) fra det humane YAC-bibliotek fra Washington University (St. Louis, MO) med en probe fra genet for konstant human kappa region (CK) (2,5 kb EcoRI fragment ATCC Nr. 59173, Parklawn Dr., Rockville, MD). Disse YAC, betegnet A80-C7 (170 kb) og A276-F2 (320 kb), inneholder det kappa-delerende element kde, CK, JK og den CJ-introniske enhancer og strekker seg 3' forbi kde. Utragende 5' fra JK, inneholder YAC også B1-, B2- og B3-VK-genene bestemt ved hybridisering og/eller PCR, og muligens andre VK-sekvenser. A80-C7/AB1380-stammen inneholdt i tillegg til IgK YAC, et ubeslektet YAC av tilsvarende størrelse. Meiotisk segregasjon ble derfor benyttet for å separere disse YAC; A80-C7 ble krysset med YPH857, og det ble oppnådd et meiotisk produkt som inneholdt kun IgK YAC (MP8-2; verts-genotype= α ade2 leu2 his3 his5 lys2 ura3 trp1 can1 cyh2). A80-C7 og A276-F2 YAC er blitt målrettet med pLUTO for å inkorporere det humane HPRT-minigen i høyre vektorarm av YAC.

Restriksjonsanalyse av IgK YAC A80-C7 og A276-F2 under bruk av en rekke enzymer, støtter den konklusjon at begge YAC er ikke-rearrangert (dvs. har kimlinje-konfigurasjon). For eksempel viser BamHI-kutting etterfulgt av hybridisering med CK-proben, det forventede 13 kb restriksjonsfragment (Klobeck et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 370:1007-1012 (1989)). Båndet av samme størrelse hybridiserer til en JK-probe (et 1,2 kb PCR-produkt, hvor det benyttes primer innrettet på å amplifisere JK1-5-regionen), som forventet ut fra genkartet (Klobeck et al., supra). B3-klasse IV-genet (proben er et 123 bp PCR-produkt fra B3-genet) gir et 4,9 kb BamHI og et 2,2 kb BglII fragment, nær de publiserte verdiene på henholdsvis 4,6 kb og 2,3 kb, (Lorenz et al., Molec. Immunol. 25:479-484 (1988)). PCR-analyse av begge IgK YAC så vel som humant genomisk DNA for følgende kappa-locus-sekvenser, oppviste de forventede båndstørrelsene: Kde (120 bp), CK (304 bp), C-J intronisk enhancer (455 bp), JK1-5 (1204 bp), B3 VK (123 bp) og B1 VK-pseudogen (214 bp). Sekvenser benyttet for utviklingen av PCR-primere for CK-, JK- og C-J-enhancer-regionene er fra Whitehurst et al.,

Nucl. Acids. Res. 20:4929-4930 (1992); Kde er fra Klobeck et Zachau Nucl. Acids. Res. 14, 4591-4603 (1986); B3 er fra Klobeck et al., Nucl. Acids. Res. 13:6515-6529 (1985) og B1 er fra Lorenz et al., supra).

5

B. Innføring av 680 kb yHPRT YAC i ES-celler

1. Dyrkning av yHPRT-gjærstamme og fremstilling av gjær-sfæroplaster

Det 680 kb yHPRT er et YAC som inneholder en funksjonell kopi av det humane gen for hypoksantin-fosforibosyltransferase (HPRT) klonet fra et
10 YAC-bibliotek som beskrevet i Huxley et al., (1991) Genomics, 9:742-750. Gjærstammen som inneholder yHPRT ble dyrket i uracil- og tryptofan-manglende flytende media, som beskrevet i Huxley, et al., (1991) supra).

For å fremstille gjær-sfæroplaster, ble en 400 mL gjærkultur inneholdende yHPRT, sentrifugert og den oppnådde gjær-pellet vasket én
15 gang med vann og én gang med 1M sorbitol. Denne gjær-pellet ble resuspendert i SPEM (1M sorbitol, 10 mM natriumfosfat, pH 7,5, 10 mM EDTA, pH 8,0, 30 mM β -merkaptoetanol) i en konsentrasjon på 5×10^8 gjærceller/mL. Zymolase 20T ble tilsatt i en konsentrasjon på 150 μ g/mL gjærceller og kulturen inkubert ved 30°C inntil 90% av cellene var sfæro-
20 plaster (vanligvis 15-20 minutter). Cellene ble vasket to ganger i STC (1M sorbitol, 10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM CaCl_2) og resuspendert i STC i en konsentrasjon på $2,5 \times 10^8$ /mL.

2. Dyrkning av E14TG2a ES-celler

Den HPRT-negative ES-cellelinjen E14TG2a ble dyrket som tidligere beskrevet.

5

3. Fusjon av ES-celler og gjær-sfæroplaster

Ekspensivt voksende E14TG2a-ES-celler dyrket på gelatin-belagte skåler, ble trypsinisert og vasket tre ganger med serumfritt DMEM. En pellet av $2,5 \times 10^8$ gjær-sfæroplaster ble forsiktig dekket med 5×10^6 ES-celler som ble sentrifugert ned på den nevnte gjærpellet. Den oppnådde kombinasjonspellet ble resuspendert i 0,5 mL av enten 50% polyetylen glykol (PEG) 1500 eller 50% PEG 4000 (Boehringer, Mannheim) inneholdende 10 mM CaCl_2 . Etter inkubering i 1,5 minutter ved romtemperatur eller ved 37°C , ble 5 mL serumfritt DMEM langsomt tilsatt, hvorefter cellene ble hensatt ved romtemperatur i 30 minutter. Cellene ble deretter pelletert og resuspendert i 10 mL ES-celle-komplettmedium (som tidligere beskrevet) og anbragt på en 100 mm plate dekket med feeder-celler. Etter 24 timer ble mediet erstattet med friskt medium. 48 timer etter fusjonen ble skålene utsatt for HAT (ES-medium som inneholder $1 \times 10^{-4}\text{M}$ hypoksantin, $4 \times 10^{-7}\text{M}$ aminopterin, $1,6 \times 10^{-5}$ thymidin) seleksjon. HAT-resistente ES-kolonier ble observert 7-10 dager etter fusjonen i skålene under begge de anvendte ulike fusjonsbetingelsene. yHPRT-ES ("ESY") fusjonskolonier ble plukket og utplatet på brønner dekket med feeder-celler og mangfoldiggjort for videre analyse.

10

15

20

4. Analyse av YAC DNA integrert i yHPRT-ES fusjonskloner

DNA ekstrahert fra 23 yHPRT-ES fusjonskolonier ble kuttet med HindIII og underkastet Southern blotting-analyse (Figur 12) ved å benytte probene: en human repeterende Alu-sekvens (A); pBR322-spesifikke

5 sekvenser for den høyre (B) og venstre (C) YAC-vektorarm; gjær-Ty repeterende sekvens (D); gjær-enkeltkopi-gen LYS2 (E). Den humane HPRT-probe, et 1,6 kb cDNA i full lengde (Jolly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:477-481 (1983)) ble benyttet til å bekrefte forekomsten av det humane HPRT-gen i ESY-kloner. Alu-proben var et 300 bp BamHI fragment

10 fra BLUR8-Alu-elementet i pBP63A (Pavan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1300-1304 (1990)). Høyre- og venstre-vektorarm-probene var pBR322-avledet BamHI-Pvull, henholdsvis 1,7 og 2,7 kb fragmenter, som tilsvarte vektorsekvensen i pYAC4 (skjema a, b (Burke et al., i: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Guthrie &

15 Fink, red. Academic Press, 194:251-270 (1991)). Det 4,5 kb fragment som ble påvist ved høyrearms-proben, strakk seg over regionen mellom HindIII-setet på telomer 5'-enden og det første HindIII-setet inne i det humane innskudd (skjema a). De 3 kb og 4,1 kb fragmentene som ble påvist med

20 proben for venstre enden tilsvarer henholdsvis regionen mellom HindIII-setet i telomer-enden og HindIII-setet 5' av gjærsekvensen og den region som strekker seg fra HindIII-setet 3' av centromeren inn i human-innskuddet (skjema b). Forskjellen i hybridiserings-intensitet av disse to bånd er relatert til forskjellen i graden av homologi mellom disse fragmentene og proben. Den repeterende gjær-Ty-probe (Philippsen et al., i Gene Expression in

25 Yeast, Proceedings of the Alko Yeast Symposium, Helsinki, Korhola & Vaisanen, red. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 1:189-200 (1983)) var et 5,6 kb XhoI fragment isolert fra Ty1-holdig pJEF742 som også kunne påvise 3' HindIII fragmentet av Ty2, som følge av homologien mellom de to elementene. LYS2-genproben var et

30 1,7 BamHI fragment fra pLUS (Hermanson et al., Nuc. Acids. Res. 19:4943-4948 (1991)).

Hybridisering med en human HPRT-probe (cDNA-probe med 1,6 kb full lengde) viste at alle analyserte kloner inneholdt de samme 15, 7 og 5 kb

exon-holdige fragmentene i det humane HPRT-gen som yHPRT YAC. Gjentatt undersøkelse av de samme blottene med en 300 bp human repeterende Alu-sekvens-probe, tydet på at alle de analyserte klonene inneholdt de fleste, om ikke alle, de Alu-inneholdende fragmenter som forekommer i yHPRT (Figur 12A). Dataene tyder på at det 680 kb humane innskudd i de fleste av de analyserte kloner ikke var blitt påviselig rearrangert eller delert etter integrasjon i ES-celle-genomet. Integreringen av YAC-vektorsekvenser ble undersøkt ved å benytte spesifikke prober for vektorarmene. Rehybridisering av de samme blott med en probe for den høyre YAC-vektorarm, hvor et 4,5 kb HindIII fragment ble påvist, tydet på at den høyre YAC-arm opptil telomeren, fremdeles var intakt og ikke-rearrangert og knyttet til det humane innskudd (Figur 12B) i 10 av de 23 analyserte kloner, hvilket gir et ytterligere bevis på integreringen av YAC i disse klonene. Venstrearms-proben påviste 3 kb og 4,1 kb HindIII yHPRT-fragmentene i 18 av de 20 analyserte klonene (Figur 12C) som tyder på hyppig venstrearm-retensjon.

Den strukturelle integritet av yHPRT i ESY-kloner, ble ytterligere vurdert for to kloner (ESY-5-2 og 8-7) ved å benytte pulsfelt-gel-restriksjonsanalyse. I gjær som var bærer av yHPRT, ble det ved forskjellige prober definert fem Sfi-fragmenter av følgende tilnærmede størrelser: 315 kb (Alu, venstrearm), 145 kb (Alu, HPRT); 95 kb (Alu, høyrearm), 70 og 50 kb (kun Alu). I begge ES-klonene hadde de interne HPRT- og Alu-spesifikke fragmentene tilsvarende størrelser som yHPRT-fragmentene. Endefragmentene påvist for begge kloner var som forventet for YAC-integret i et musekromosom, større enn de i yHPRT: henholdsvis 185 og 200 kb for høyre endes fragment, og mer enn 800 kb for venstre endes fragment i begge kloner. Disse data gir sammen med Alu-profilen, ytterligere bevis for bibehold av den strukturelle integritet av YAC i disse klonene. Undersøkelsene ble supplert med fluorescens in situ hybridisering foretatt på ESY 8-7 (Figur 13A, B) og ESY 8-6 metafase-kromosom-utspredninger, hvor det for de humane sekvenser ble påvist et enkelt integrasjonssete. Fotomikrogrammer av representative metafase-utspredninger (Figur 13A, B, C) eller interfase-nuclei (Figur 13D) fra ESY 8-7-celler (Figur 13A, B) hybridisert

med biotinylerede humane genomiske sekvenser og ESY 8-6-celler (Figur 13C, D) hybridisert med biotinylerede repeterte gjær-DNA-sekvenser. Humanproben ble frembragt fra humant genomisk placenta-DNA (Clontech, Palo Alto, CA). Gjærproben besto av en blanding av DNAfragmenter som koder for de repeterte gjærelementene: delta (et 1,08 kb Sau3A fragment av pdelta6 (Gafner et al., EMBO J. 2:583-591 (1983)) og Ty (et 1,35 kb EcoRI-Sall fragment av p29 (Hermanson et al., Nuc. Acids. Res. 19:4943-4948 (1991)), rDNA (et 4,6 kb BglIIk-A L90 og et 4,4 kb BglII-B L92 fragment (Keil & Roeder, Cell, 39:377-386 (1984)) og Y'-telomer-elementene (2,0 og 1,5 kb BglII-HindIII fragmentene av p198 (Chan & Tye, Cell, 33:563-573 (1983)). Hybridisering av sekvenser på kromosom-metafase-utspredninger med biotinylerede prober og påvisning med avidin-FITC, fulgt av biotin-anti-avidin og avidin-FITC-amplifikasjon ble foretatt som beskrevet av Trask & Pinkel, Methods Cell Biol. 30:383-400 (1990) ved å benytte et Zeiss Axiophot mikroskop. Kromosomer ble "counterstained" med propidiumjodid. De viste fotomikrogrammer er representative for 95% av metafase-utspredningene eller interfase-nuclei sveip-fotografert i tre uavhengige forsøk foretatt med human- eller gjær-probene. Et enkelt integrasjonssete for de humane sekvensene ble påvist.

De samme blottene ble også undersøkt med en probe av den repeterte elementsekvens i gjær-Ty for å påvise forekomst av genomiske gjær-DNA-sekvenser i ESY-klonene (Figur 12D). Mens enkelte av klonene viste seg å inneholde det meste av de Ty-holdige fragmentene forekommende i opphavets gjærstamme, ble noen av klonene funnet å ha en meget liten fraksjon, om i det hele tatt noen, av de Ty-holdige fragmentene. Disse resultatene tyder på at det i enkelte ES-kloner ble integrert lite eller intet genomisk gjær-DNA selv om YAC-DNA integreres intakt. For å bestemme om det kromosomale gjær-DNA ble integrert i et enkelt eller i flere seter i ES-cellegenomet, ble det foretatt fluorescerende in situ hybridisering på ESY-klon 8-6 som hadde en fullstendig Ty-profil. Et enkelt integreringssete ble påvist ved å benytte en kombinert repeterende gjær-probe (Figur 13C, D), som innenfor oppløsningsgrensene, tydet på at alle gjær-DNA-fragmenter ble integrert som en blokk.

Ved å benytte ES-cellenes evne til å gjennomgå ordnet differensiering in vitro, ble YAC-stabilitet og virkningen av integrert DNA på pluripotensiteten av ES-celler undersøkt. Fire ES-kloner, inneholdende forskjellige mengder gjær-DNA (ESY 5-2, 3-6, 8-6 og 8-7) oppviste et differensieringsmønster som ikke lot seg skjelne fra mønsteret til ikke-fusjonerte ES-celler, nemlig at dannelsen av embryoider legemer førte til en rekke differensierte celletyper (Figur 14A). Southern blotting-analyse ble foretatt på DNA ekstrahert fra differensierte ESY 5-2, 3-6, 8-5 og 8-6 (20 µg) og yHPRT i AB1380 (40 ng) ved å benytte (a) en human Alu-probe og (b) gjær-Ty-sekvenser. Es-kloner ble induisert for å danne embryoider legemer ved å dyrke dem som aggregater i suspensjon i 10-14 dager som beskrevet av Martin & Evans, Cell, 6:467-474 (1975). Etter at de igjen er festet til substratum i vevskultur, fører ESY-avledede embryoider legemer til differensierte celletyper. YAC- og gjær-DNA-sekvenser ble stabilt opprettholdt av de differensierte ES-klonene under dyrkning i ikke-selektivt medium i 40 dager, hvilket viser at det stabilt integrerte fremmede DNA ikke svekket ES-cellenes pluripotensitet (Figur 14B). De differensierte kulturene opprettholdt et funksjonelt humant HPRT-gen, noe som fremgår av deres normale vekst og differensiering når de ble overført til HAT-selektivt medium.

5. Utvikling av kimære mus fra yHPRT-ES-cellelinjen

ESY-cellenes evne til å repopulere mus, inklusivt kimlinjen, ble demonstrert gjennom mikroinjeksjon av ES-celler i museblastocyster og utviklingen av kimære mus. ESY-celler ble mikroinjisert i C57BL/6J-
5 museblastocyster, og kimære mus ble utviklet som tidligere beskrevet. Kimære hanner ble parret med C57BL/6J-hunner og kimlinje-overføring bestemt gjennom forekomsten av aguti-farvet avkom. Genomisk DNA fra kimære mus, fremstillet fra hale-DNA, ble ved PCR-analyse undersøkt på forekomst av yHPRT-DNA i musegenomet. Nærværet av YAC-venstrearmen
10 ble analysert ved å benytte de to primer-oligonukleotidene, 5' TTCTCGGAGCACTGTCCGACC og 5' CTTGCGCCTTAAACCAACTTGGTACCG, som ble oppnådd henholdsvis fra pBR322-sekvensene og SUP4-genet i den venstre YAC-vektorarm. Et 259 bp PCR-produkt ble oppnådd fra analysen av den gjær som inneholdt
15 yHPRT og ESY-cellelinjene. PCR-analyse av hale-DNA fremstillet fra 18 kimære mus utviklet fra ESY-cellelinjene ESY 3-1, ESY 3-6 og ESY 5-2, førte til det forventede PCR-produkt som således tyder på nærvær av den venstre YAC-vektorarm i genomet til den kimære mus.

20 6. Kimlinje-overføring av yHPRT

Kimære hanner med pelsfarve-kimærisme på 30-60%, avledet fra ESY-cellelinjene ESY 3-1 og ESY 5-2, ble uttatt for parring for vurdering av kimlinje-overføring, dvs. for å bestemme hvorvidt den gentiske modifikasjon var overført via kimcellene (sperma eller oocytter) til dyrenes avkom. Tre av
25 de kimære ESY 3-1 avlede hanner, 394/95-1, 394/95-2 og 411-1 overførte ES-celle-genomet til avkommet med en frekvens på henholdsvis 20%, 30% og 30%. Southern blotting-analyse av hale-DNA fra det aguti-farvede avkommet tydet på nærvær av yHPRT i genomet til tre mus, 4-2, 4-3 og 5-1, avledet fra 394/395-2 kimærene. Alu-profilen oppnådd fra slike analyser
30 kunne ikke skjelles fra tilsvarende fra den parentale ES3-1 cellelinje (Figur 14C), hvilket viser at det 680 kb humane innskudd omhyggelig og sikkert ble overført gjennom muse-kimlinjen.

Ved å benytte en human HPRT-spesifikk PCR-bestemmelse på mRNA-avledede cDNA fra et yHPRT-holdig avkom, ble ekspresjonen av det humane HPRT-gen påvist i alle de undersøkte vev (Figur 15A og B), og dette viser at det overførte YAC beholdt pålitelig funksjonsdyktighet. I dette forsøk

5 ble humant HPRT-mRNA påvist gjennom revers transkripsjon (RT)-PCR i ES-, ESY 3-1- og Hut 78 (humane) celler, milt og lever fra en kontrollmus (C) eller fra 4-3 aguti-avkommet (avledet fra 394/95-2 kimærer) og en prøve som ikke inneholdt templat-DNA (angitt som "-" i Figur 15A). Revers transkripsjon av poly(A⁺)-RNA og PCR-amplifikasjon av spesifikke cDNA-sekvenser ble

10 foretatt ved å benytte cDNA-cykliseringssettet (Invitrogen). Spesifikk amplifisering av et 626 bp fragment fra humant HPRT cDNA i nærvær av murint HPRT cDNA ble foretatt som skissert av Huxley et al., supra. Integriteten av alle RNA-prøvene ble demonstrert gjennom PCR-

15 amplifikasjon av cDNA fra mus- γ -interferon-reseptoren. Primerne benyttet for amplifisering av et 359 bp fragment var: GTATGTGGAGCATAACCGGAG og CAGGTTTTGTCTCTAACGTGG. De humane HPRT og γ -interferon-reseptor-primerne ble utviklet for å eliminere muligheten for å oppnå PCR-produkter fra genomisk DNA-forurensning. PCR-produkter ble analysert ved elektroforese og visualisert med ethidiumbromid. Størrelsesmarkørene er

20 1 kb stige (BRL). Resultatene av påvisning av mus- γ -interferon-reseptor mRNA ved RT-PCR i de ovenfor beskrevne prøver, er vist i Figur 15B. Det spesifikke humane HPRT mRNA ble også påvist i de øvrige undersøkte vev (hjerne, nyre og hjerte) tatt fra 4-3 musen. Sammenlignbare steady state-nivåer av mus- og humant HPRT mRNA ble påvist i leveren til yHPRT-holdig

25 avkom. Disse resultatene tyder på at opptaket av hele 13 megabaser genomisk gjær-DNA ikke virket skadelig på korrekt utvikling, kimlinje-overføring eller gen-ekspresjon.

Resultatene ovenfor demonstrerer at gjær-sfæroplaster er effektive bærere for avgivelse av en enkelt kopi høymolekylære DNA-fragmenter til

30 ES-celler og at slike molekyler overføres stabilt og funksjonelt gjennom muse-kimlinjen. Alu-profilene, supplert med PFGE-analyse og in situ hybridisering av enkelte av ES-klonene underbygger sterkt at majoriteten av klonene praktisk talt inneholdt hele det humane innskudd i ikke-rearrangert

form (dvs. i "kimlinje-konfigurasjon") med høy frekvens av kloner (40%) som også beholdt begge YAC-armene. Det betydelige opptak av genomisk gjær-DNA var ikke skadelig for korrekt differensiering av ES-celler in vitro og in vivo og forhindret ikke kimlinje-overføring eller gen-ekspressjon. Gjennom disse metodene kan man overføre store fragmenter genomisk DNA som innskudd i ikke-humane dyregenomer, hvor innskuddene kan overføres intakt gjennom kimlinje-overføring. Et stort utvalg xenogent DNA kan derfor overføres til ikke-humane vertsdyr, så som pattedyr, særlig små forsøksdyr, som kan gi nye fenotyper eller nye genotyper. For eksempel kan man gi små forsøksdyr gener til et pattedyr, f.eks. et menneske, for å studere etiologien for en sykdom, eller humane geners respons på et stort utvalg av forskjellige agens. Alternativt kan man innføre store loci i en pattedyrs-vert for å produsere andre arters produkter, for eksempel skaffe tilveie humane proteinsekvenser av slike proteiner som immunoglobuliner, T-celle-reseptorer, MHC-antigener (Major Histocompatibility Complex), etc.

Innføring av tung kjede YAC A287-C10 og kappa kjede YAC A80-Ci ES-celler og embryoer

Gjær som inneholder det humane tung kjede YAC A287-C10 målrettet med pLUTO (yA287-C10) ble "spheroplasted" og fusjonert med den HPRT-manglende ES-cellelinje E14.1TG3B1 som beskrevet ovenfor. Ti HAT-resistente ES (ESY)-kloner (2B, 2C, 2D, 3A, 3B, 5C, 1125A, 1125E, 100/1500 og 100/4000) ble plukket og mangfoldiggjort for DNA-analyse. Vurderingen av det integrerte YAC ble foretatt ved Southern blotting-analyse av HindIII-kuttet DNA fra disse klonene under bruk av humane tung kjede prober for de ovenfor beskrevne D-, J_H-, μ - og VH2-regionene. Samtlige ESY-kloner ble funnet å inneholde de forventede >10 kb J_H- og μ -fragmentene. Samtlige ESY-kloner unntatt 2D- og 5C-kloner ble funnet å inneholde 4,8 kb VH2 kb fragmentet. Samtlige ESY-kloner, unntatt 2D og 3B, ble funnet å inneholde de forventede 10 og 7,6 kb D-genfragmentene. Genomiske gjær-sekvenser ble påvist ved hybridisering til det repeterende gjær-Ty-element i alle ESY-klonene unntatt 2B, 2D, 100/1500 og 5C. ESY-klonene 2B, 3A og 5C ble mikroinjisert i C57B/6 blastocyster som beskrevet

ovenfor, og kimære mus (10 fra 2B-klonen, 1 fra 3A-klonen og 1 fra 5C-klonen) ble frembragt. Southern blotting-analyse av hale-DNA fra 10 av disse kimære dyrene tydet på nærvær av de fleste, om ikke alle, de tilsynelatende 10 Alu-fragmentene påvist i yA287-C10 i gjær, så vel som nærvær av VH₂- og D-genfragmenter. De frembragte kimære musene ble parret med C57BL16J-mus for vurdering av kimlinje-overføring. En kimær hann, 78K-3, avledet fra 2B-klonen, overførte ES-cellegenomet til sitt avkom med en frekvens på 100%. Southern blotting-analyse av hale-DNA fra fire av i alt 6 aguti-farvede musunger tydet på nærvær av sekvenser av human tung kjede.

Fusjonsforsøk med gjær som inneholdt det humane kappa kjede YAC A80-C7 målrettet med pLUTO (yA80 C7) med E14.1TG3B1 ES-celler frembragte 2 HAT-resistente ESY-kloner: M4.4.1 og M5.2.1. Southern blotting-analyse av HindIII-kuttete DNA fra disse kloner oppviste nærvær av samtlige av de tilsynelatende 10 Alu-fragmenter som ble påvist i yA80-C7 i gjær. I begge klonene var de genomiske gjær-sekvensene integrert. ESY-kloner ble mikroinjisert i C57B1/6J-blastocyster, og det ble utviklet kimære mus.

20

EKSEMPEL VII

Fremstilling av humant Ig ved i kimære mus å innføre humant Ig ved bruk av homolog rekombinasjon

Som alternativ til måten beskrevet i Eksempel I-VI, innføres humane Ig-gener i muse-Ig-locuset ved å erstatte loci for muse-immunglobuliners tunge og lette kjede direkte med fragmenter av loci for de humane tunge og lette kjeder under bruk av homolog rekombinasjon. Dette etterfølges av utvikling av kimære transgene dyr, hvor celler avledet fra embryoniske stamceller bidrar til kimlinjen.

25

A. Konstruksjon av human tung kjede substitusjonsvektor

De humane sekvenser som ønskes innført, inkluderer Spel 100 kb fragmentet av genomisk DNA som omfatter den humane VH6-D-J-C μ -C δ tunge kjederegion isolert fra et humant-YAC-bibliotek som beskrevet tidligere. Sekvensen for den flankerende tunge kjede hos mus, som 5 regulerer den homologe rekombinasjons-substitusjon, inneholder et 10 kb BamHI fragment av mus-C ϵ -C α -tung kjede og et 5'J558-fragment som omfatter 5'-halvdelen av J558-fragmentet av den variable region i den tunge kjede hos mus, i henholdvis 3'-10 og 5'-enden til de humane sekvenser (Figur 16). Disse mus-sekvensene isoleres fra et genomisk museembryo-bibliotek ved å benytte probene beskrevet i henholdvis Tucker et al., (1981), PNAS USA, 78:7684-7688 og Blankenstein & Krawinkel (1987, supra). Det 1150 bp XhoI til BamHI fragment som inneholder et neomycin-resistens-gen regulert av promoteren 15 for Herpes simplex virusets thymidinkinase-gen (HSV-tk) og en polyoma-enhancer isoleres fra pMC1Neo (Koller & Smithies, 1989, supra). En syntetisk adapter adderes til dette fragmentet for å omdanne XhoI-enden til en BamHI-ende, og det resulterende fragment forbindes med BamHI-mus-C ϵ -C α i et plasmid.

20 Fra YAC-klonen som inneholder locuset for den humane tunge kjede isoleres DNA-sekvenser fra hver ende av innskuddet ved invers PCR (Silverman et al., (1989) PNAS, 86:7485-7489) eller ved plasmid "rescue" i E. coli, (Burke et al., (1987); Garza et al., (1989), Science, 246:641-646; Traver et al., 1989) (se Figur 8). Den isolerte humane sekvens fra 5'V6-25 enden av YAC liggeres til mus-J-558-sekvensen i et plasmid, og likeledes liggeres den humane sekvens som skriver seg fra 3'Cd-enden av YAC til Neo-genet i det ovenfor beskrevne plasmid som inneholder Neo og mus-C ϵ -C α . Det humane V6-mus J558-segment subklones nå inn i en halv-YAC-kloningsvektor som inkluderer en selekterbar gjær-markør (HIS3) som ikke 30 forekommer i det opprinnelige IgH YAC, en centromer (CEN) og en enkelt telomer (TEL). Det humane C δ -Neo-mus-C ϵ -C α subklones likeledes inn i en separat halv-YAC-vektor med en annen selektiv gjær-markør (LEU2) og en enkelt TEL. Den halve-YAC-vektor som inneholder det humane V6 DNA

lineariseres og benyttes til å transformere en gjærstamme som er delert med hensyn til de kromosomale HIS3- og LEU2-loci og som bærer IgH-YAC.

Seleksjon for histidin-prototrofi fører til gjærkolonier som har undergått homolog rekombinasjon mellom de humane V6-DNA-sekvenser og

5 inneholder et rekombinant YAC. Den halv-YAC-vektor som inneholder det humane C δ -DNA lineariseres deretter og benyttes til å transformere gjærstammen utviklet i det foregående trinn. Seleksjon for leucin-prototrofi resulterer i en gjærstamme som inneholder det fullstendige IgH-substitusjons YAC (se Figur 16). Fortrinnsvis foretas begge målrettingsprosesser i et

10 enkelt transformasjonstrinn, hvor det samtidig selekteres for leucin- og histidin-prototrofi. Dette er særlig anvendelig når de opprinnelige sentriske og acentriske YAC-armene er i motsatt orientering i forhold til den som er vist i Figur 16. Dette YAC isoleres og innføres i ES-celler ved mikroinjeksjon som tidligere beskrevet for embryoer.

15

EKSEMPEL VIII

Kryssing av transgene mus

A. Utvikling av mus som produserer humane monoklonale antistoff

Mus som inneholder locuset for humant immunglobulin parres med

20 mus med inaktiverede murine immunglobulin-gener for å frembringe mus som kun produserer humane antistoff. Ved å gå ut fra fire heterozygote stammer, fordres avl i tre generasjoner for å frembringe en mus som er homozygot for inaktive murine kappa og tung kjede immunglobuliner og heterozygot for locuset for humant immunglobulins tunge kjede og kappa-kjede. Avls-

25 programmet er vist i Figur 17.

EKSEMPEL IX**Fremstilling av humane monoklonale antistoff****A. Immunisering av mus**

Kimlinje-kimære mus inneholdende integrert humant DNA fra
5 immunglobulin-loci immuniseres ved injeksjon av et antigen i adjuvans.
Musene gis en tilleggsinjeksjon av antigen 14 dager etter den primære
immunisering, hvilket gjentas etter 35 og 56 dager. Fra de immuniserte
dyrene tas en blodprøve for å bestemme titeret av serum-antistoff mot
immuniserings-antigenet. Den mus som har høyest titer avlives, hvorpå
10 milten tas ut.

B. Fusion av splenocytter

Myelomceller benyttet som fusjonspartner for miltcellene, opptines 6
dager før fusjonen og dyrkes i vevskultur. Et døgn før fusjonen fordeles
15 cellene på friskt medium som inneholder 10% føtalt kalveserum i en
konsentrasjon på 5×10^5 celler/mL. Om morgenen dagen for fusjon
fortynnes cellene med et tilsvarende volum medium supplert med 20% føtalt
kalveserum og 2X OPI- (3 mg/mL), 0,1 mg/mL natriumpyruvat og 0,4 IE/mL
insulin) oppløsning.

20 Etter avlivning av musen uttas milten aseptisk og anbringes i en skål
med dyrkningsmedium. Cellene rives fra hverandre inntil milten er revet i
små biter og de fleste celler er tatt ut. Cellene vaskes i friskt, sterilt medium,
og klumpene får mulighet til å skille seg ut.

Splenocytene vaskes to ganger til ved sentrifugering i medium uten
25 serum. Under den andre vaskingen, vaskes myelomcellene også inn i et
separat rør. Etter den avsluttende vasking, kombineres de to cellepellets
som så sentrifugeres en gang sammen.

En oppløsning av 50% polyetylen glykol (PEG) tilsettes langsomt til
den oppnådde cellepellet mens cellene resuspenderes i totalt 2 minutter. 10
30 mL oppvarmet medium tilsettes til celleoppløsningen under langsom
omrøring i 3 minutter. Cellene sentrifugeres og supernatanten fjernes.
Cellene resuspenderes i 10 mL medium supplert med 20% føtalt
kalveserum, 1X OPI-oppløsning og 1X AH-oppløsning (58 μ M azaserin,

0,1 mM hypoksantin). De fusjonerte cellene anbringes som alikvoter i 96-brønns plater og dyrkes ved 37° i 1 uke.

Supernatant uttas aseptisk fra hver brønn og forenes til forrådspuljer. Disse forrådene undersøkes med hensyn til reaktivitet mot det
5 immuniserende antigen. Positive forråd undersøkes ytterligere for å finne frem til individuelle brønner. Når en positiv brønn er identifisert, overføres cellene fra 96-brønns platen til 0,5 mL medium supplert med 20% føtalt kalveserum, 1X OPI, og 1X AH i en 24-brønns plate. Når denne kulturen blir tett begrodd, mangfoldiggjøres cellene i 5 mL og deretter i 10 mL. På dette
10 trinn subklones cellene slik at en enkelt antistoff-produserende celle befinner seg i kulturen.

I overensstemmelse med de ovenfor beskrevne fremgangsmåter kan det fremstilles et kimært ikke-humant vertsdyr, særlig et murint vertsdyr, som kan immuniseres for å produsere humane antistoff eller analoger som er
15 spesifikke for et immunogen. På denne måte unngås problemene med å oppnå humane monoklonale antistoff, siden det transgene vertsdyr kan immuniseres med immunogener som ikke kunne vært benyttet med et menneske som vert. Det kan dessuten sørges for tilleggsinjeksjoner og adjuvanter som ikke ville tillates brukt på mennesker. De resulterende B-
20 cellene kan deretter benyttes for immortalisering for den kontinuerlige produksjon av det ønskede antistoff. De immortaliserte cellene kan benyttes til isolering av gener som koder for immunoglobulinet eller analoger, og kan underkastes ytterligere molekylær modifikasjon etter metoder, som f.eks. in vitro mutagenese eller annen teknikk for å endre antistoffenes egenskaper.
25 Disse modifiserte genene kan deretter returneres til de immortaliserte cellene ved transfeksjon for å tilveiebringe en varig cellulær kilde av de ønskede antistoff i et pattedyr. Foreliggende oppfinnelse sørger således for en lettvin kilde til humane antistoff, hvor de humane antistoff produseres på analog måte som ved produksjon av antistoff i et menneske. Vertsdyrets
30 celler gjør det på en forholdsvis lettvin måte mulig å oppnå aktivering og rearrangering av humant DNA for produksjon av humane antistoff i vertscellene.

Det kan følgelig fremstilles humane antistoff mot humane immunogener, f.eks. proteiner, ved immunisering av angjeldende vertspattedyr med humane immunogener. De resulterende antisera vil være spesifikke for det humane immunogen og kan høstes fra vertens serum. De immuniserte B-celler fra verten kan benyttes for immortalisering, f.eks. myelomcellefusjon, transfeksjon, etc., for å gi immortaliserte celler, f.eks. hybridomer, til fremstilling av monoklonale antistoff. Antistoffene, antiserum og monoklonale antistoff, vil bli glykosylert i overensstemmelse med hvilken art cellen som produserer antistoffene tilhører. Sjeldne variable regioner i Ig-locuset kan rekrutteres ved fremstilling av antistoffene slik at antistoff med sjeldne variable regioner kan oppnås.

15

20

25

30

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for fremstilling av en gjærce5lle som har minst et kunstig gjærkromosom (YAC) omfattende et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede, og minst et YAC omfattende et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, idet fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

- 10 a) introduisering inn i en første gjærce10lle et YAC som omfatter fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus eller fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus, og en selekterbar markør;
- b) introduisering av et kromosomalt DNA fra første gjærce15lle inn i en andre gjærce15lle som omfatter et YAC omfattende fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus eller fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus, og en selekterbar markør;
- c) selektering av gjærce20ller som omfatter YAC omfattende fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og YAC omfattende fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori trinn (b) blir oppnådd ved parring av første og andre gjærce20lle.

3. Gjærce25lle som har minst et kunstig gjærkromosom (YAC), omfattende et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede, og minst et YAC som omfatter et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, hvori gjærce30llen blir produsert ved fremgangsmåten ifølge krav 1.

4. Fremgangsmåte for fremstilling av en ikke-human pattedyrembrionisk ES celle som har minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human

immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus er stabilt integrert inn i
5 det samme kromosomet til en ikke-human pattedyr ES celle, idet fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

a) kombinerings under fusjonsbetingelser en ikke-human pattedyr ES celle og en gjærsporeplast dannet fra en gjærsporecelle ifølge krav 3, hvori
10 nevnte sporeplast inneholder to eller flere YAC, hvori minst en YAC omfatter fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og minst et YAC som omfatter fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus, og hvori hver YAC omfatter et gen kodende for en selekterbar markør, hvor ved fragmentene blir stabilt integrerte inn i genomet til ES cellene; og

b) selektering for ES celler som bærer humant immunoglobulin loki ved hjelp av en eller flere av markørene.
15

5. Isolert ikke-humant pattedyr ES celle som har minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et
20 urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin lett kjede, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus er stabilt integrert inn i det samme kromosomet av ES cellen, og hvor ES cellen blir produsert ved fremgangsmåten ifølge krav 4.

25 6. ES celle ifølge krav 5, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus har sekvensen til et fragment av humant kromosom 14 fra D segment genene til human immunoglobulin tung kjede lokuset, videre fortsettelse gjennom J segment genene og konstant region genene til og med C μ av det
30 lokuset, hvori nevnte DNA sekvens ikke innbefatter en gamma konstant region, og hvori nevnte sekvens er operabelt koblet til minst et humant V segment gen.

7. ES celle ifølge krav 5, hvori genomet til ES cellen omfatter minst et inaktivert endogent immunoglobulin tung kjede lokus, hvori lokuset blir inaktivert for å unngå rearrangement av lokuset og å forebygge dannelse av et transkript av et rearrangert immunoglobulin tung kjede lokus.

5

8. ES celle ifølge krav 7, hvori det minst ene endogene immunoglobulin tung kjede lokuset blir inaktivert ved delesjon av alle J segment genene.

9. ES celle ifølge krav 7, hvori genomet av ES cellen videre omfatter minst et inaktivert endogent immunoglobulin lett kjede lokus, hvori lokuset blir inaktivert for å unngå rearrangement av lokuset og å unngå dannelse av et transkript av et rearrangert immunoglobulin lett kjede lokus.

10

10. ES celle ifølge krav 9, hvori minst det ene endogene immunoglobulin lett kjede lokuset blir inaktivert ved delesjon av C κ genet.

15

11. Fremgangsmåte for fremstilling av et kimært ikke-humant pattedyr som har minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus og fragmentet av et urearrangert lett kjede lokus er stabilt integrert inn i det samme kromosomet i minst noen av dets celler, idet fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

20

25 a) produsering av en ES celle ifølge krav 5; og

b) produsering av det kimære ikke-humane pattedyret fra ES cellen.

25

12. Fremgangsmåte for fremstilling av et transgent ikke-humant pattedyr og dets avkom som har i dets somatiske og kim-celler minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin tung kjede lokus tilstrekkelig for å kode for en human immunoglobulin tung kjede og minst et fragment av et urearrangert humant immunoglobulin lett kjede lokus tilstrekkelig for å kode

30

for en human immunoglobulin lett kjede, hvori fragmentet av en urearrangert tung kjede og fragmentet av en urearrangert lett kjede er stabilt integrert inn i det samme kromosomet, idet fremgangsmåten omfatter trinnet å avle det kimeriske ikke-humane pattedyret ifølge krav 11 og dets avkom for å fremstille det transgene ikke-humane pattedyret.

13. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 4, 11 eller 12, hvori fragmentet av et urearrangert tung kjede lokus har sekvensen til et fragment av humant kromosom 14 fra D segment genene til human immunoglobulin tung kjede lokuset, gjennom J segment genene og konstant region genene til og med C μ av det lokuset, hvori nevnte DNA sekvens ikke innbefatter en gamma konstant region, og hvori nevnte DNA sekvens er operabelt koblet til minst et humant V segment gen.

14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 4, 11 eller 12, hvori genomet til ES cellen omfatter minst et inaktivert endogent immunoglobulin tung kjede lokus, hvori lokuset blir inaktivert for å unngå rearrangement av lokuset og for å unngå dannelsen av et transkript av et rearrangert immunoglobulin tung kjede lokus.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvori det i det minste ene endogene immunoglobulin tung kjede lokuset blir inaktivert ved delesjon av alle J segment genene.

16. Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvori genomet til ES cellen omfatter minst et inaktivert endogent immunoglobulin lett kjede lokus, hvori lokuset blir inaktivert for å unngå rearrangement av lokuset og for å unngå dannelsen av et transkript av et rearrangert immunoglobulin lett kjede lokus.

17. Fremgangsmåte ifølge krav 16, hvori minst et endogent immunoglobulin lett kjede lokus blir inaktivert ved delesjon av C κ genet.

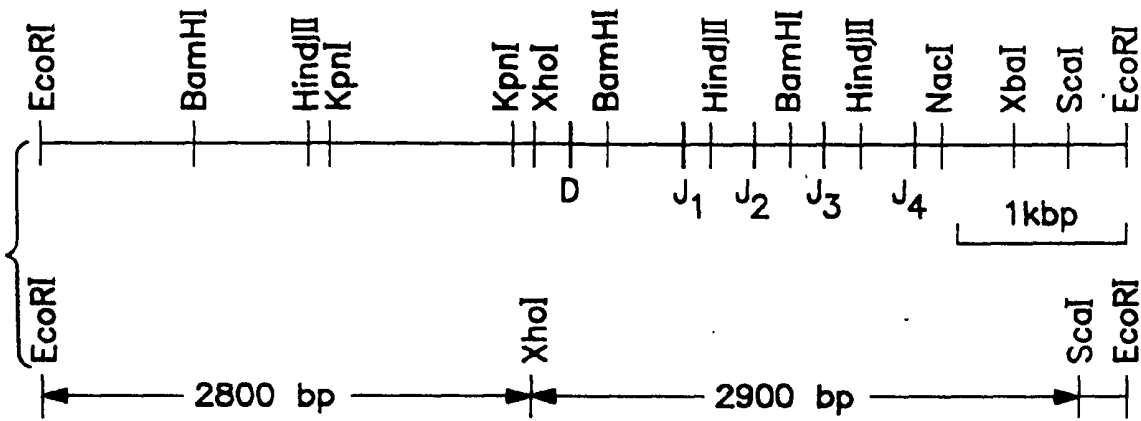


FIG. IA

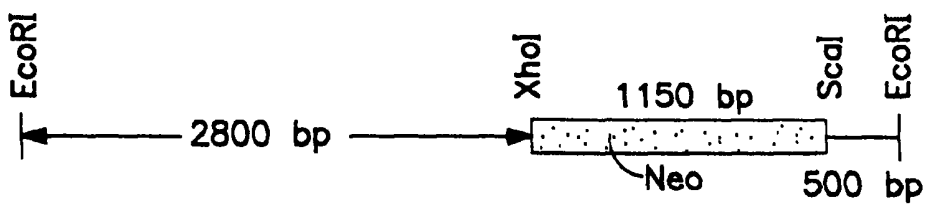


FIG. IB

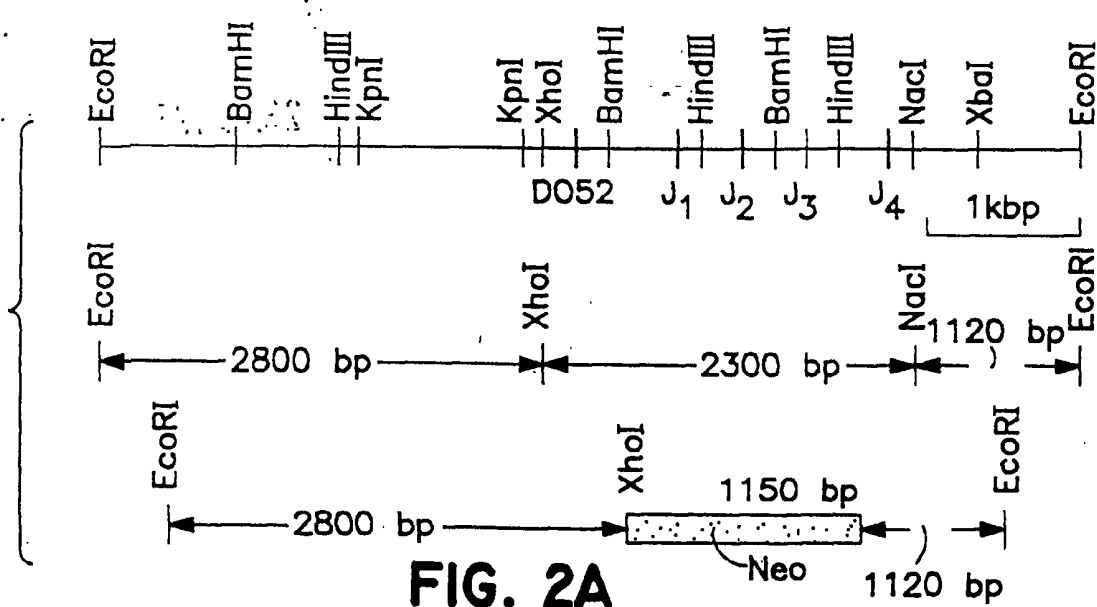


FIG. 2A

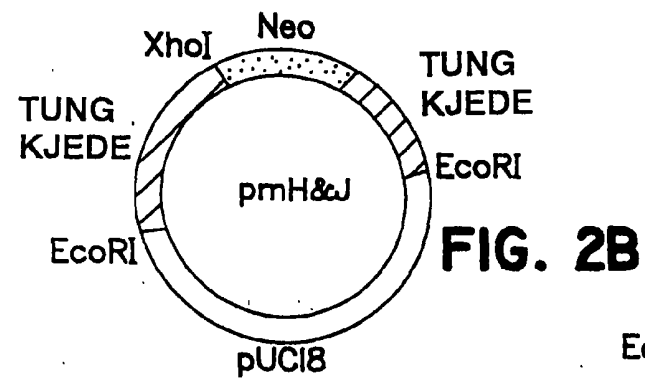


FIG. 2B

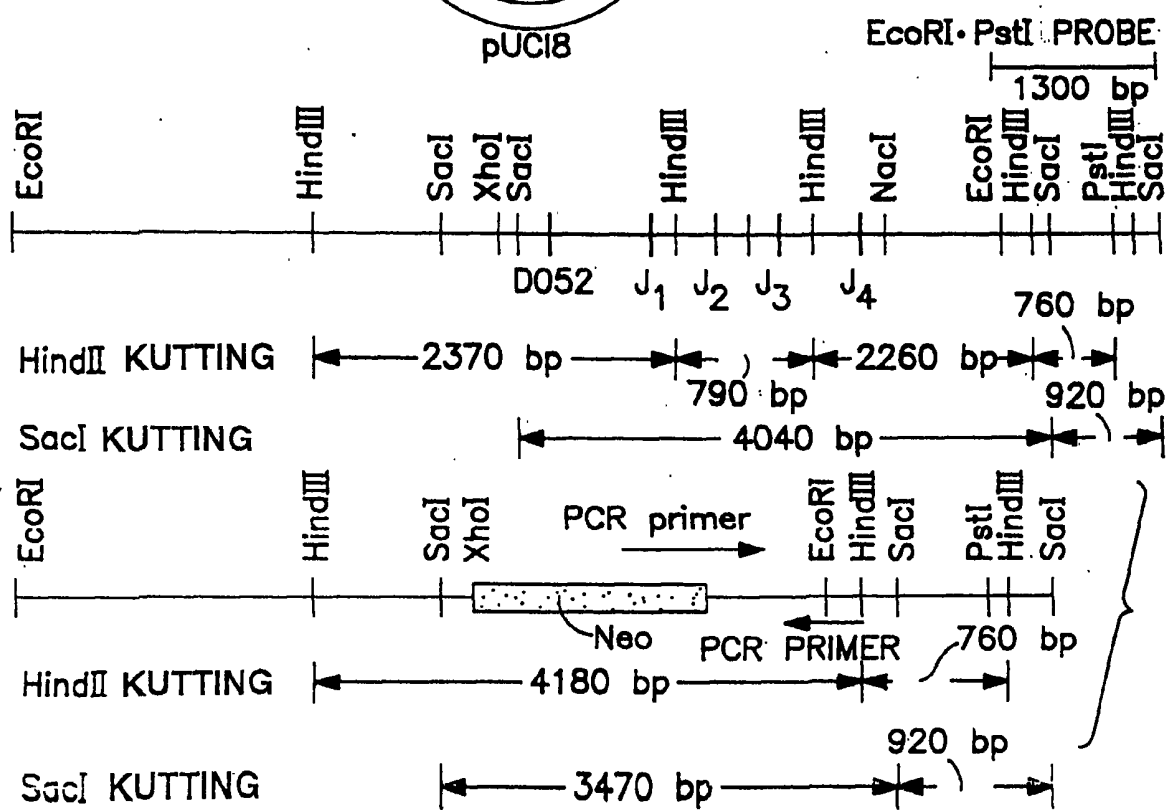
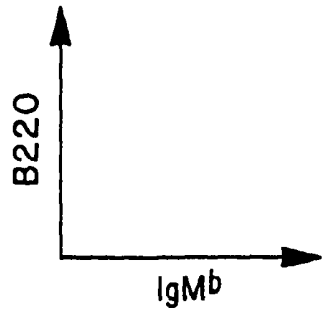
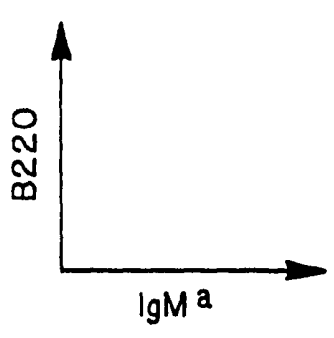
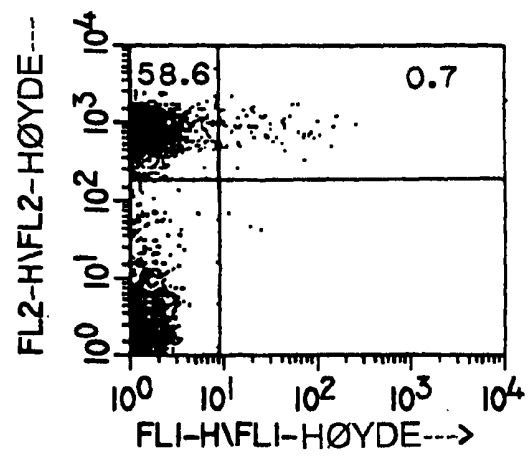
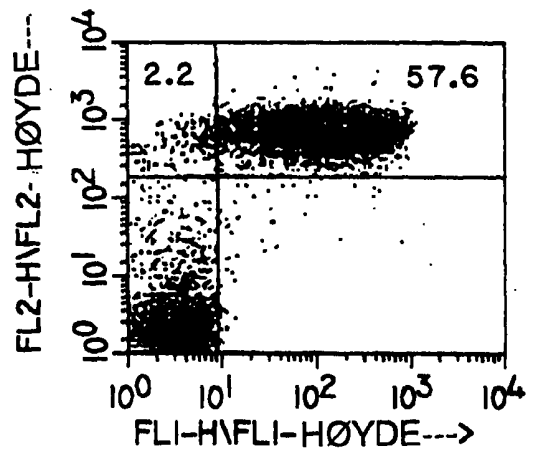


FIG. 2C



a allotype



b allotype

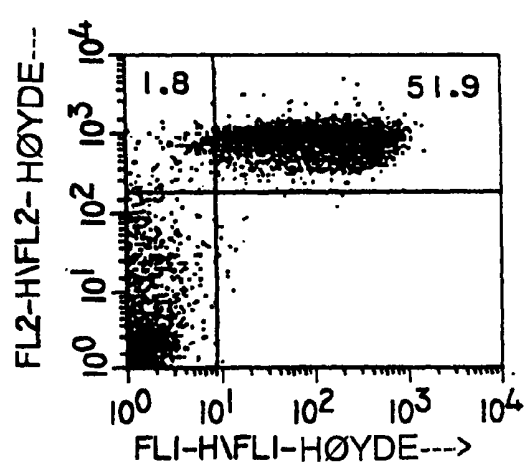
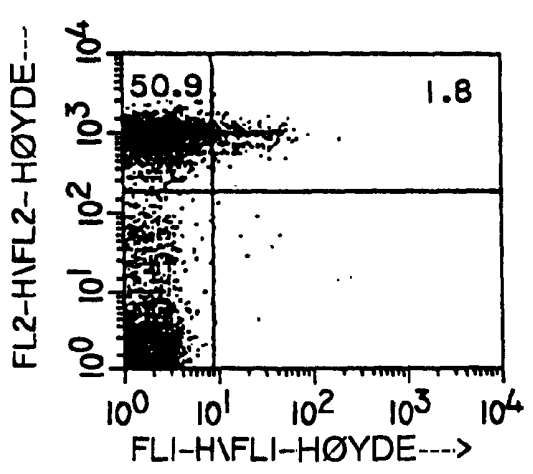
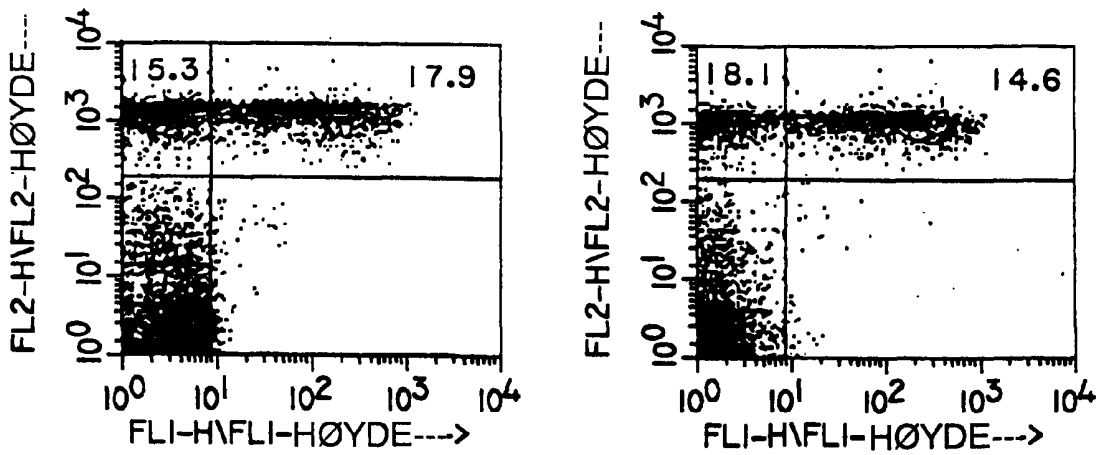


FIG. 3-1

a/b FI



$\Delta J_H / b FI$

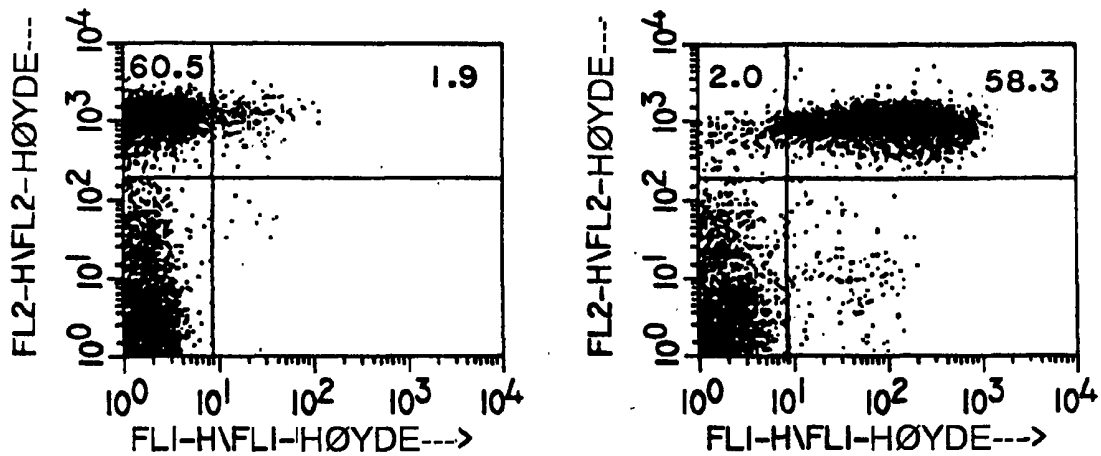


FIG. 3-2

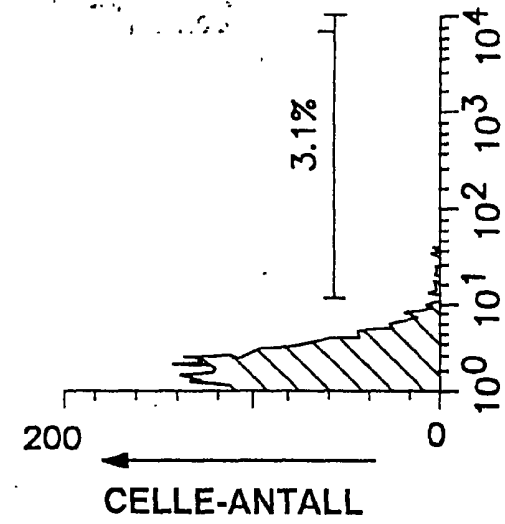


FIG. 4C

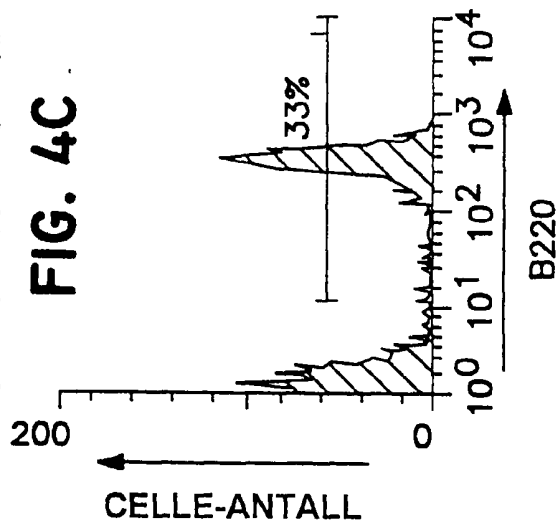


FIG. 4F

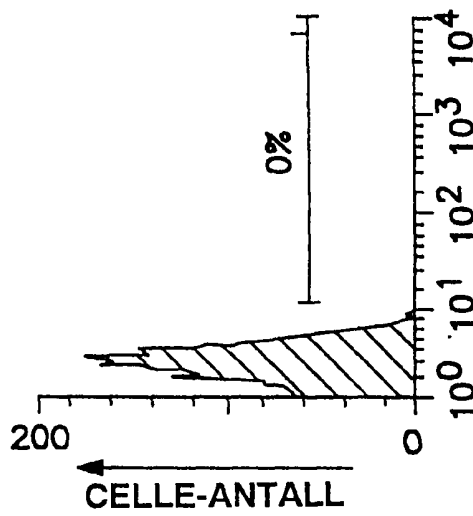


FIG. 4B

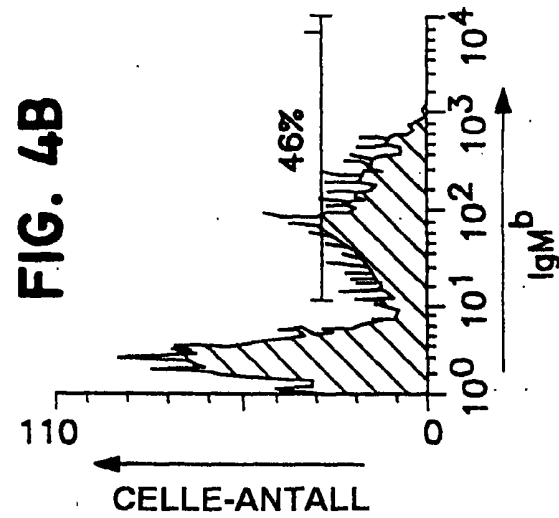


FIG. 4E

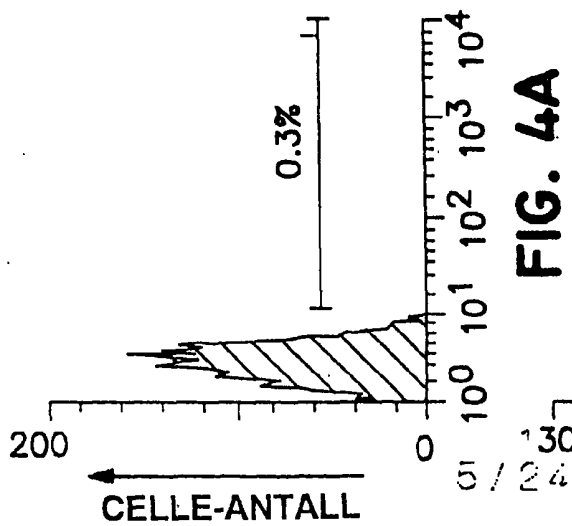


FIG. 4A

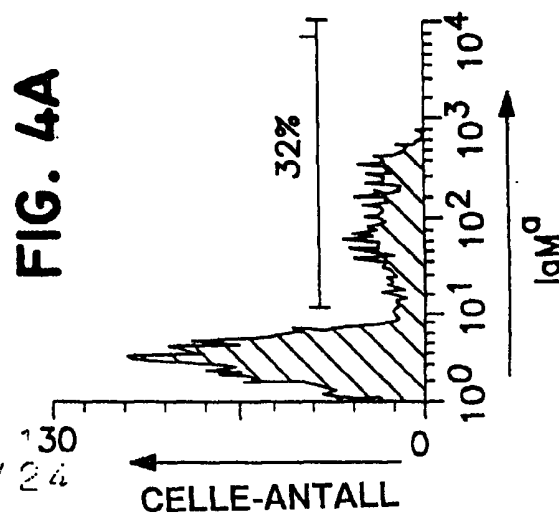


FIG. 4D

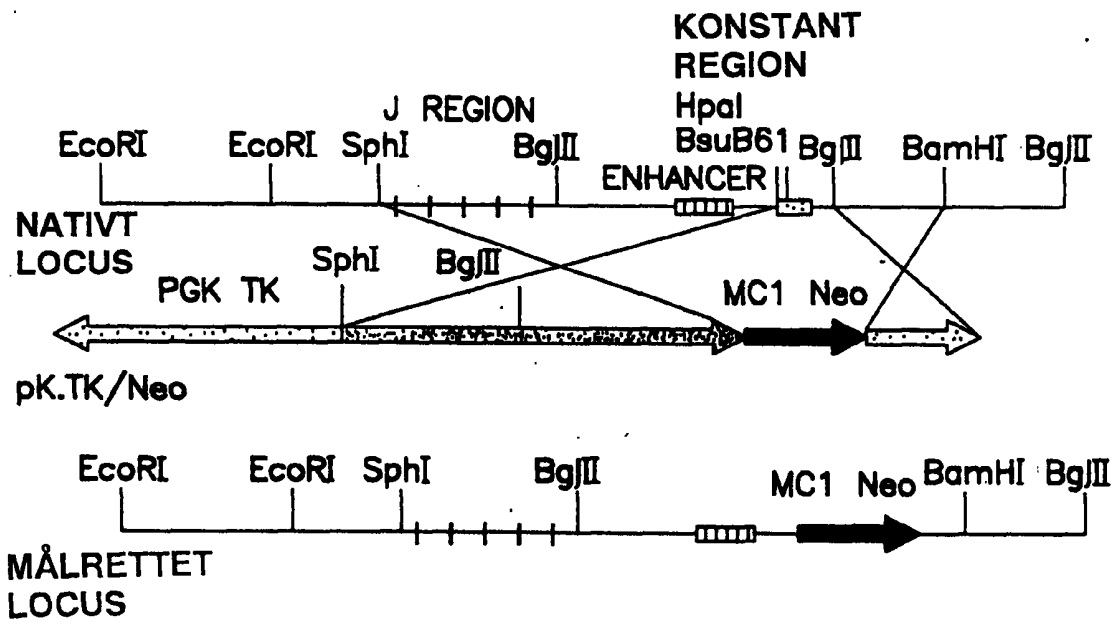


FIG. 5

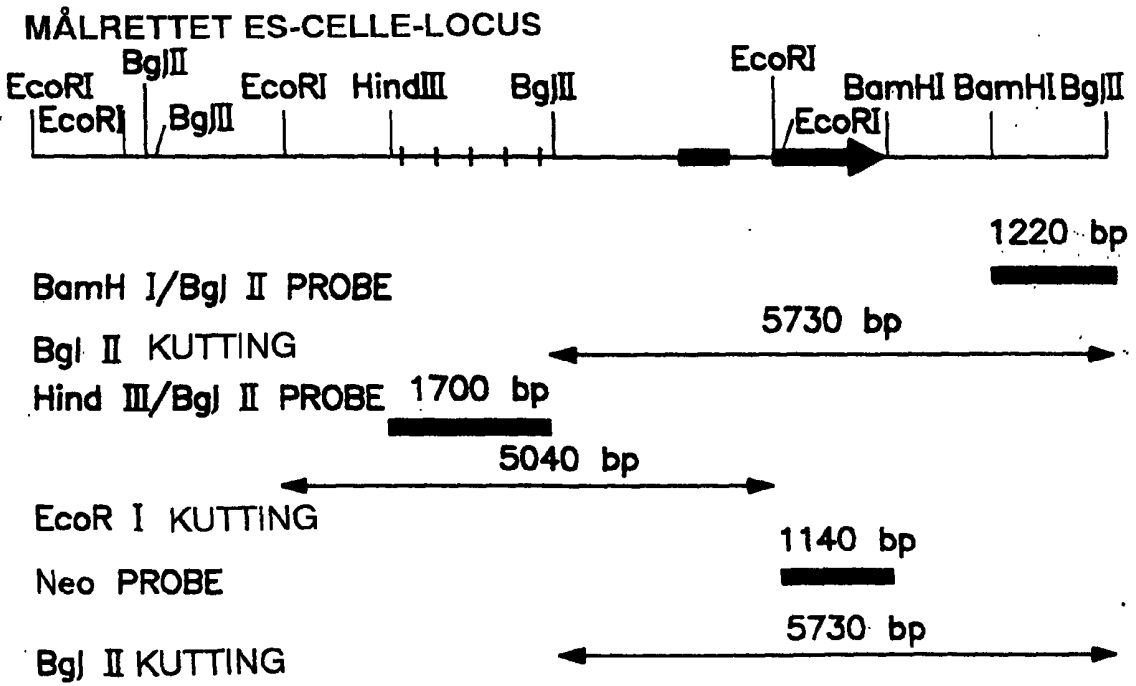
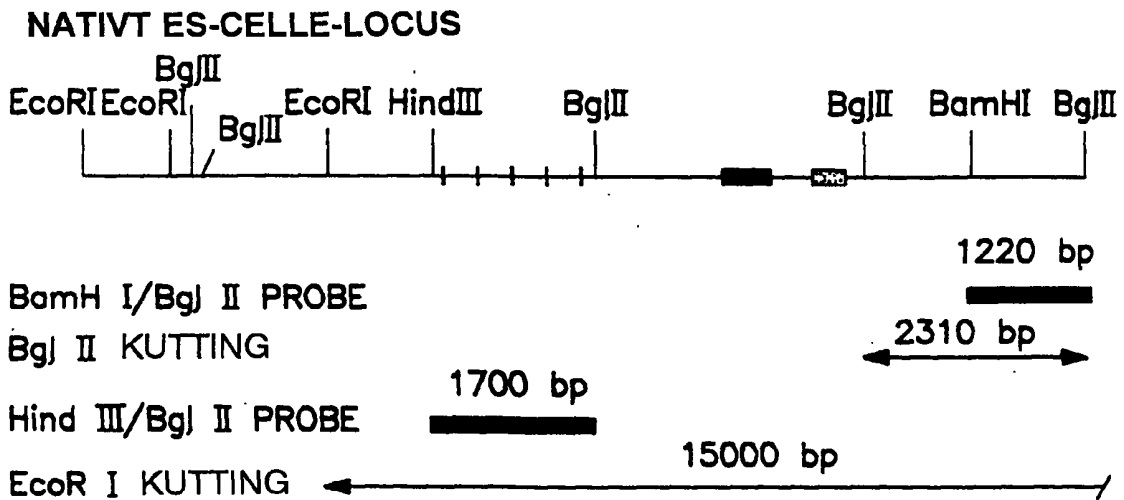
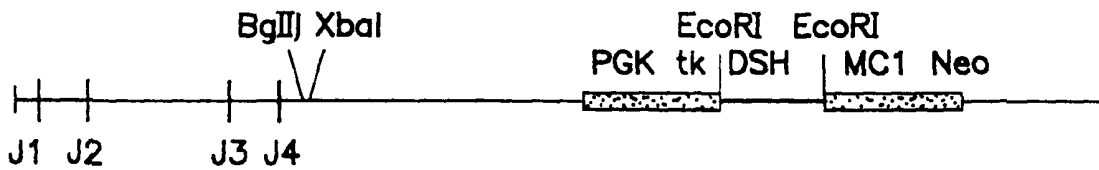


FIG. 7

J-REGION-KNOCKOUT-VEKTOR



MÅLRETTINGSSKJEMA

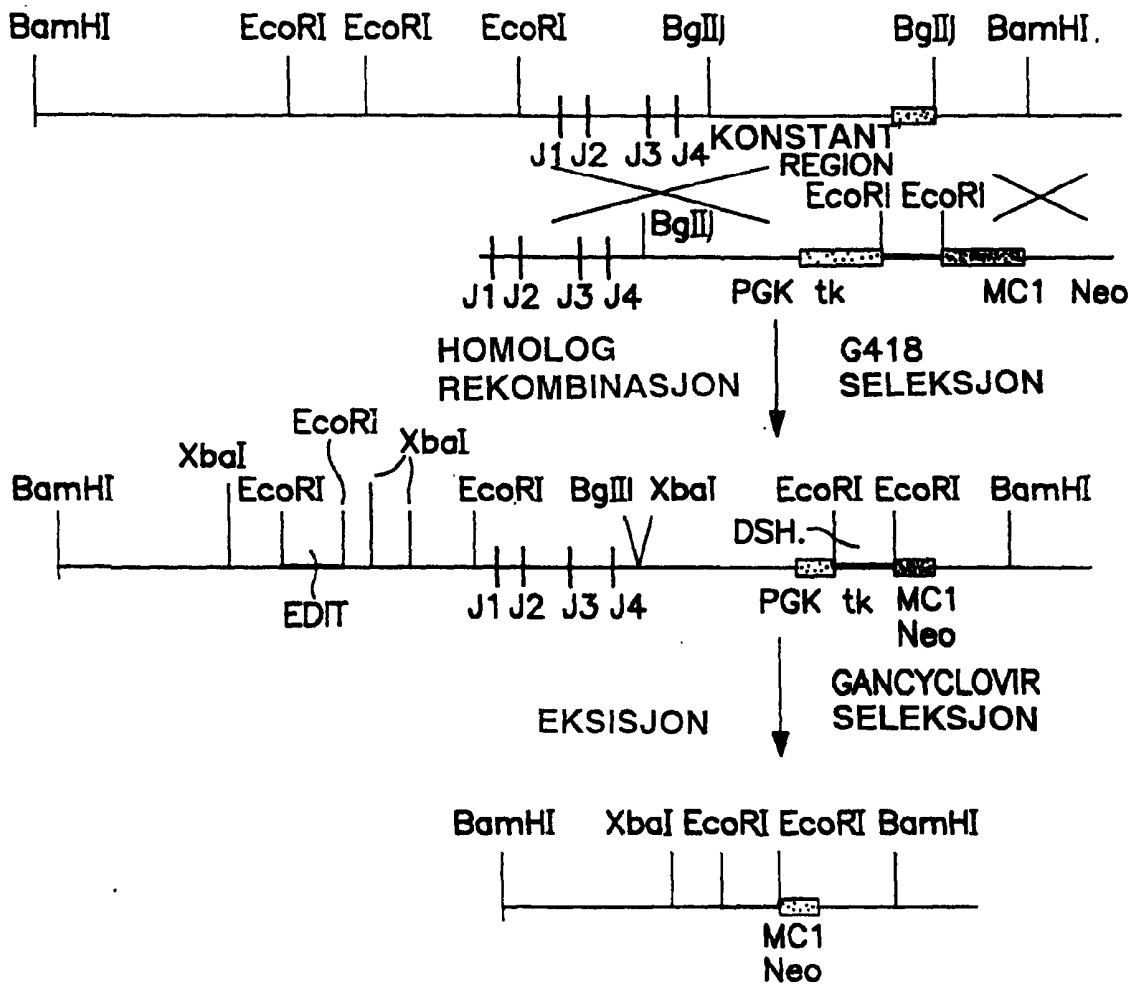


FIG. 8

NdeI Bsu361 SphI KpnI EcoRI HindIII NotI
 GCATATGCCCTGAGTAAGCATGGTACCGAATTCATAAGCTTGGCCCGCAGCT
 CATGCGTATACGGACTCCATTGACCGCATGGCTTAAGATATTCGAACGCCCGCC

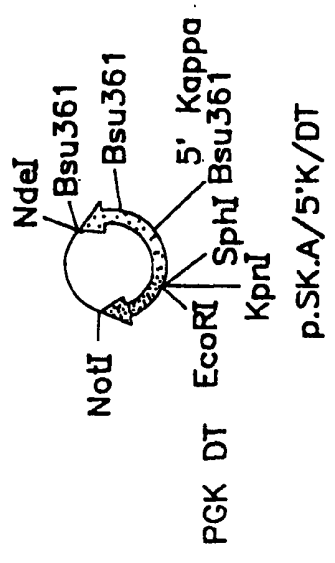
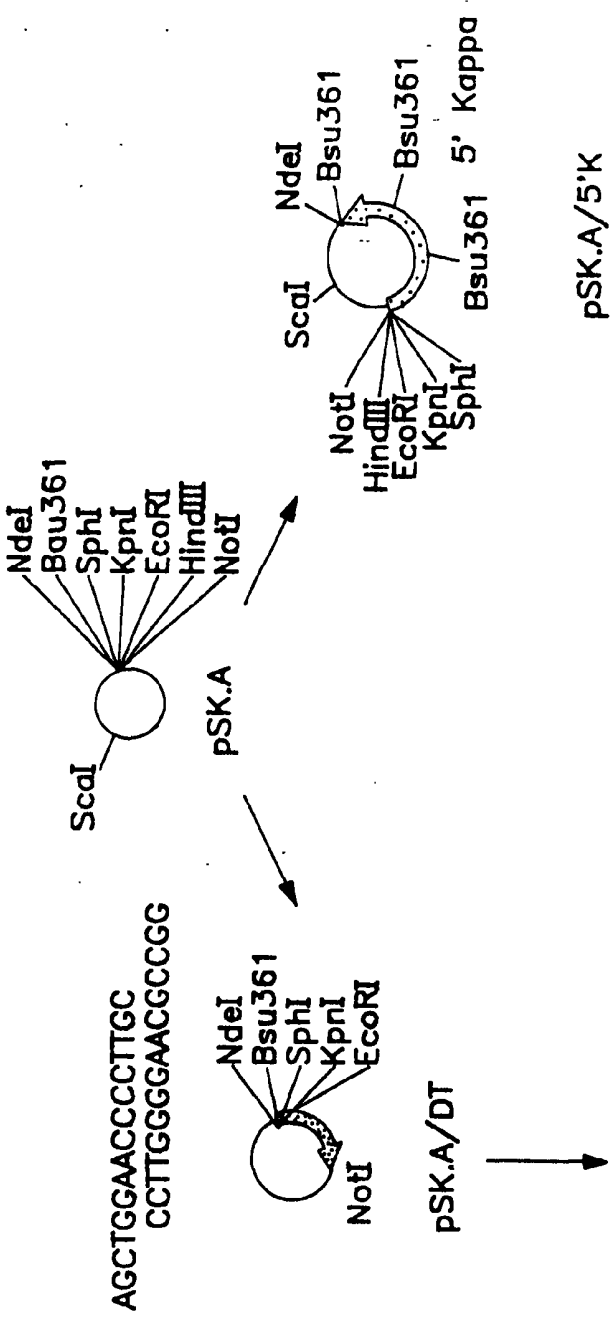


FIG. 9-1

...SacI BamHI XhoI EcoRI HindIII NdeI
 GAGCTCGGATCCTATCTCGAGGAATTCTATAAGCTTCATATGTAGCT
 CATCCTCGAGCCTAGGATAGAGCTCCTTAAGATATTCTGAAGTATACA

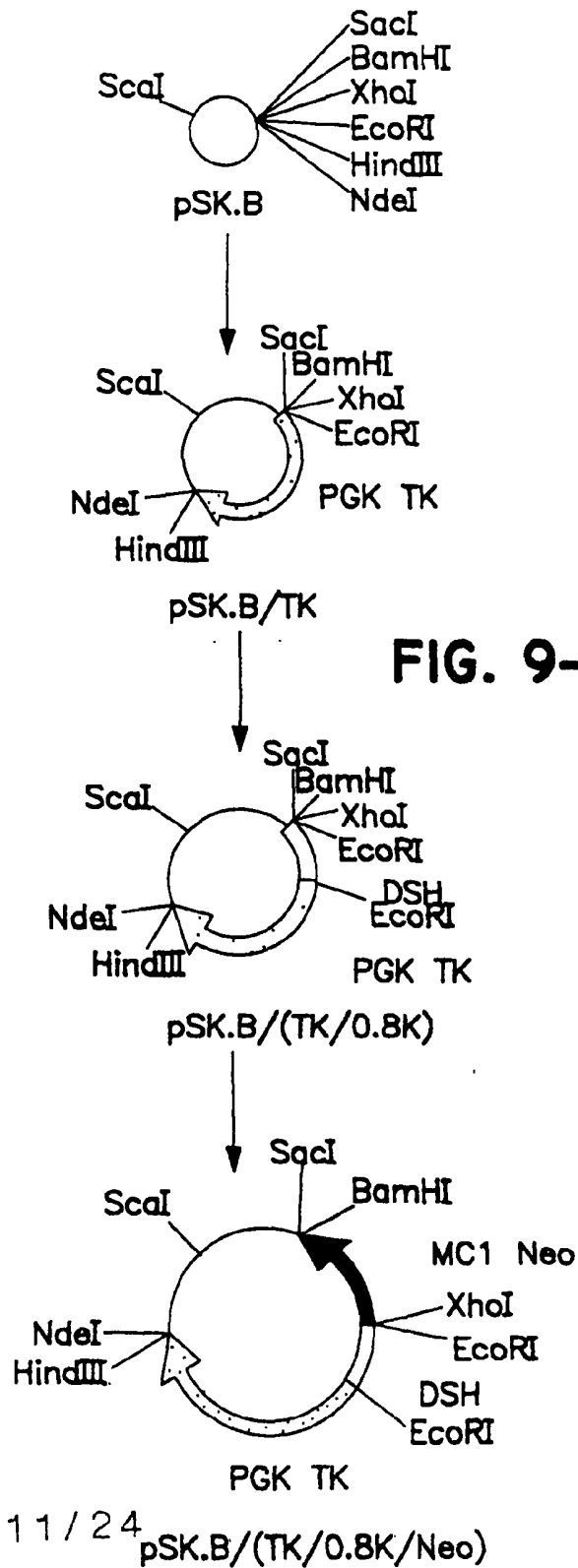


FIG. 9-2

HindIII EcoRI KpnI BamHI SacI NotI
 AAGCTTATAGAATTTCGGTACCTGGATCCTGAGCTCATAGCGGCCGCAGCT
 CATGTTTGAATATCTTAAGCCATGGACCTAGGACTCGAGTATCGCCGGCG

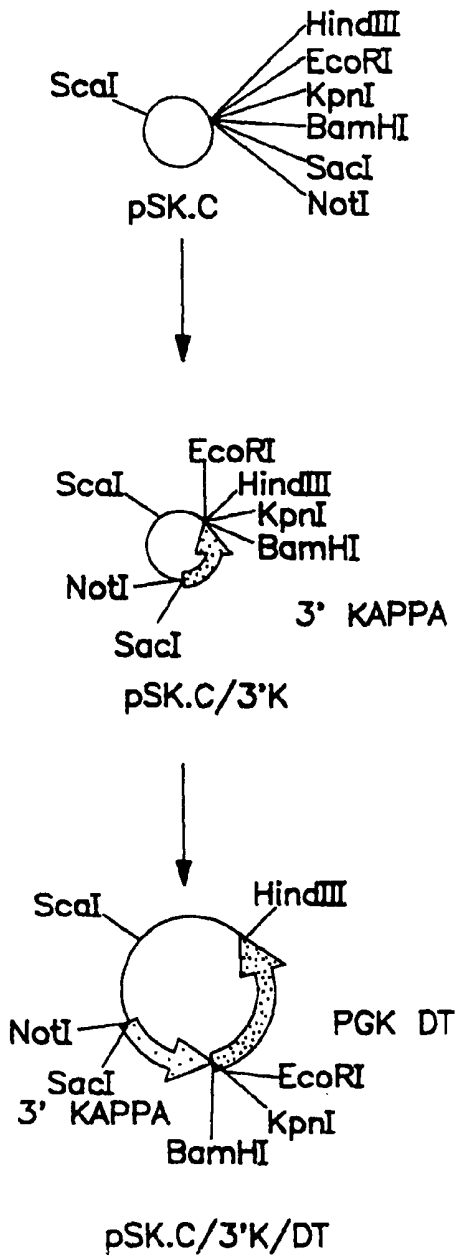
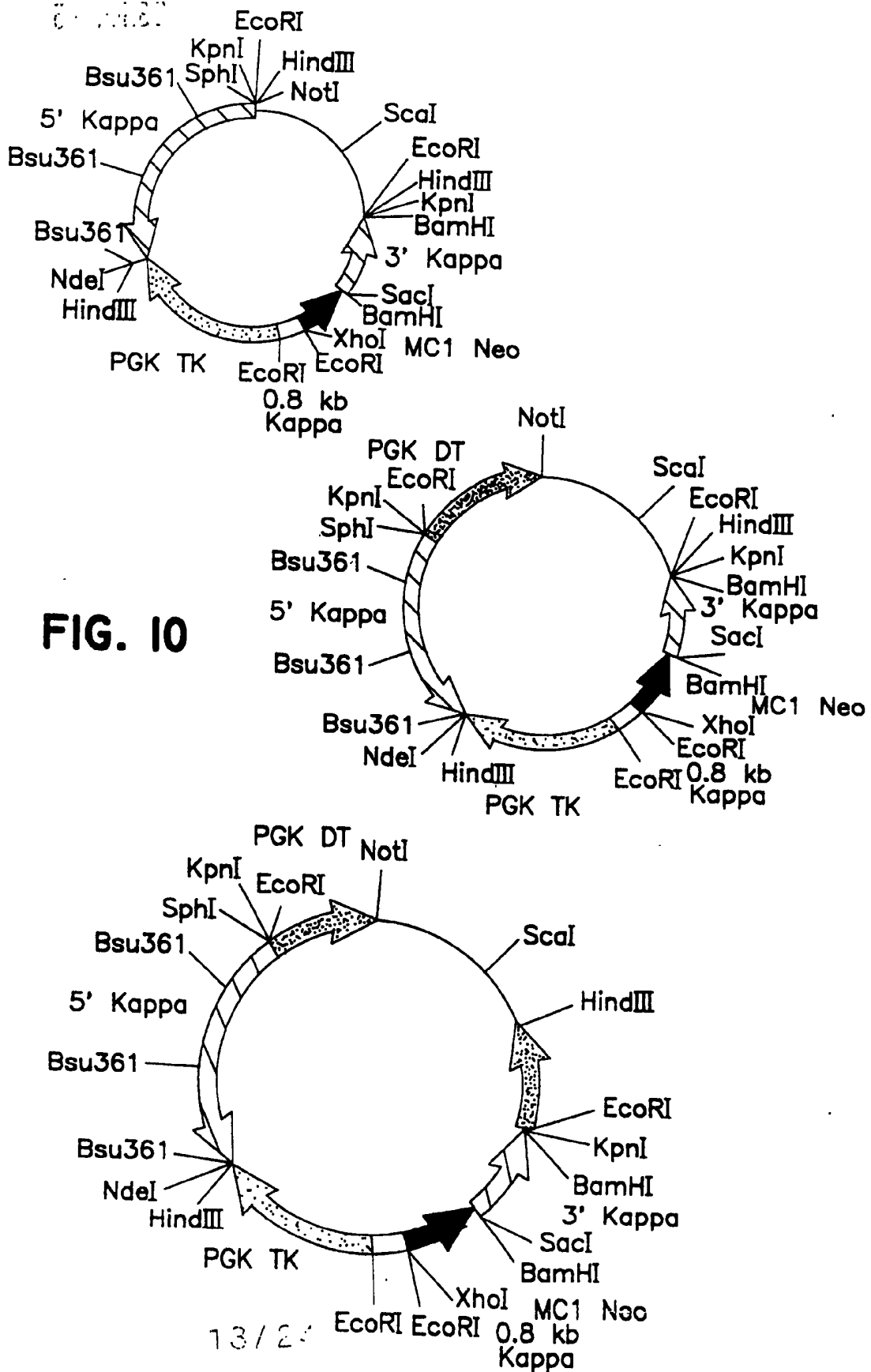


FIG. 9-3



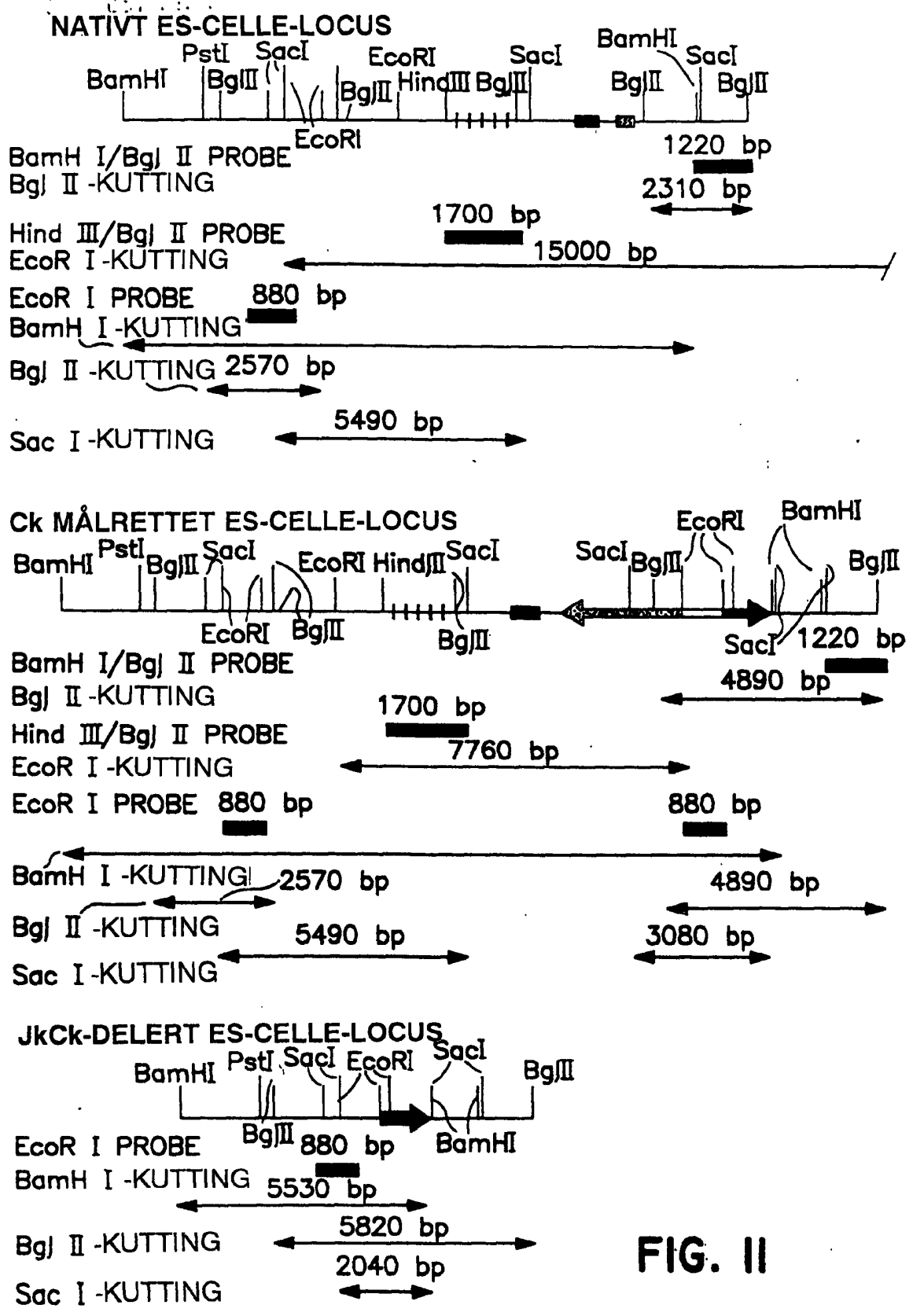


FIG. II

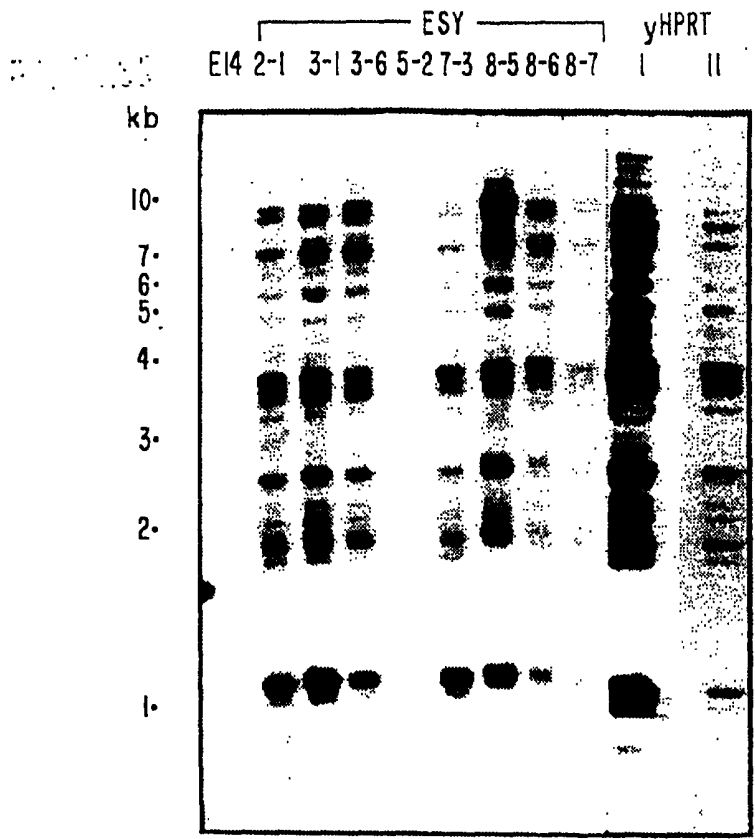


FIG. 12A

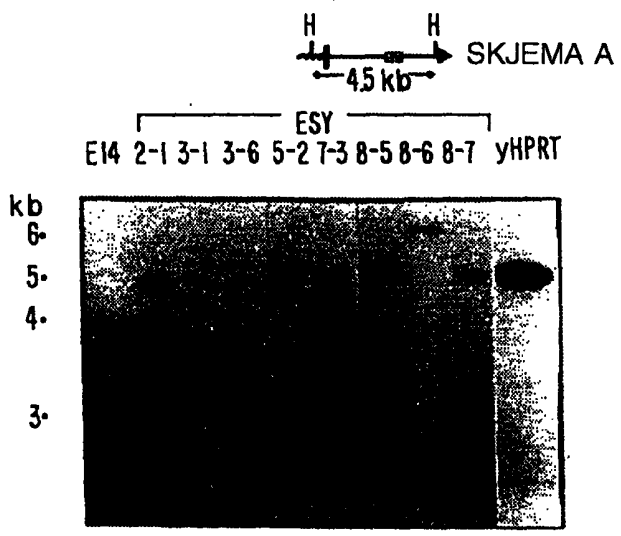


FIG. 12B

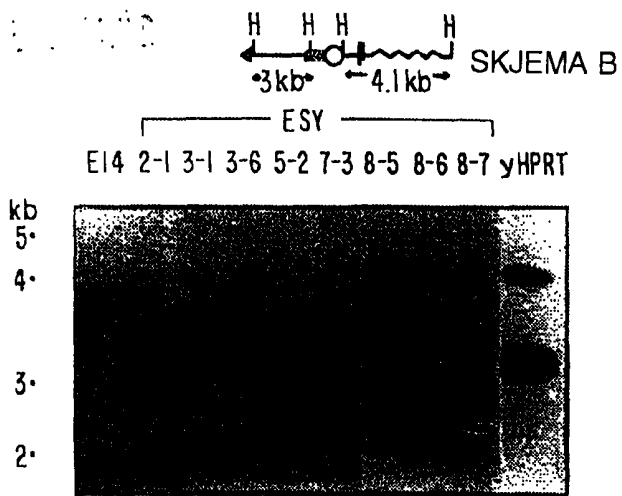


FIG. 12C

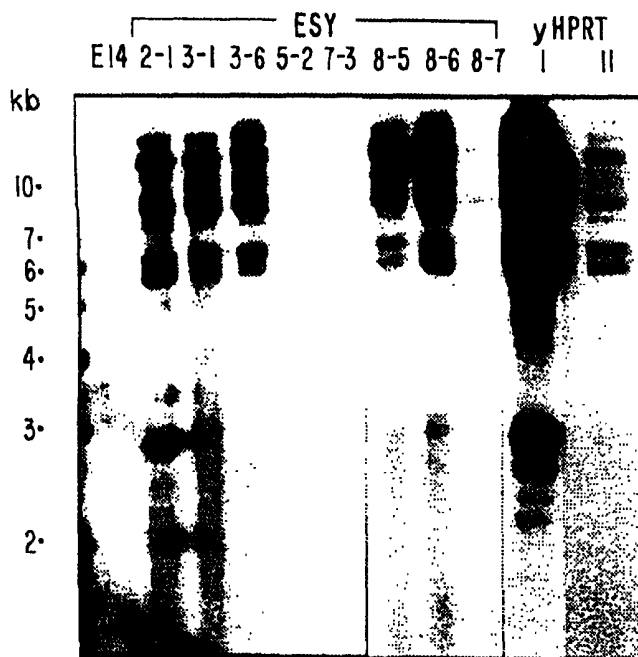


FIG. 12D

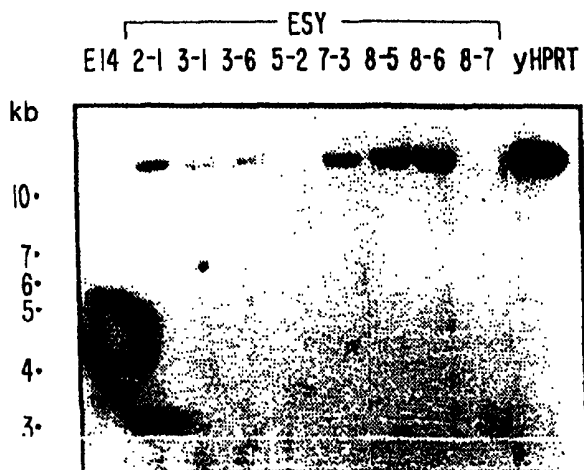


FIG. 12E

FIG. 13

FIG. 13A

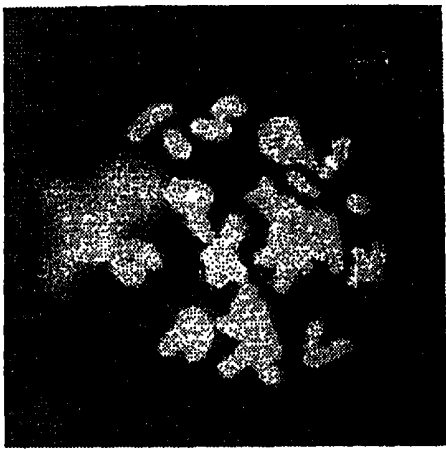


FIG. 13B

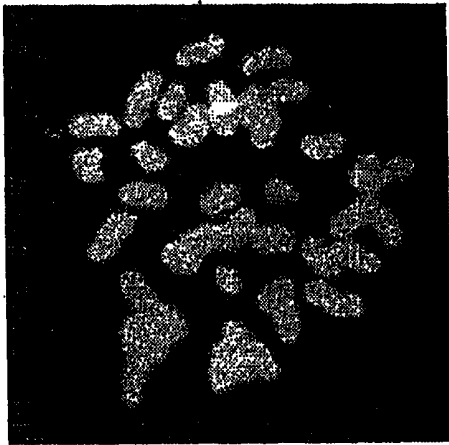
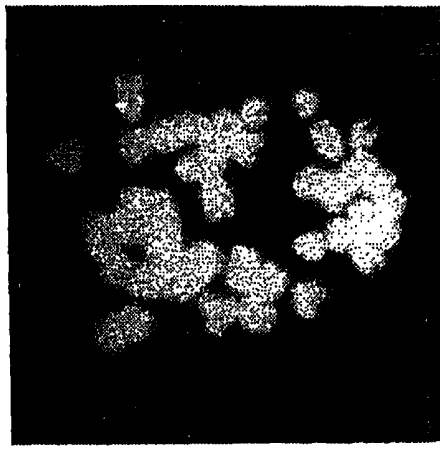


FIG. 13C

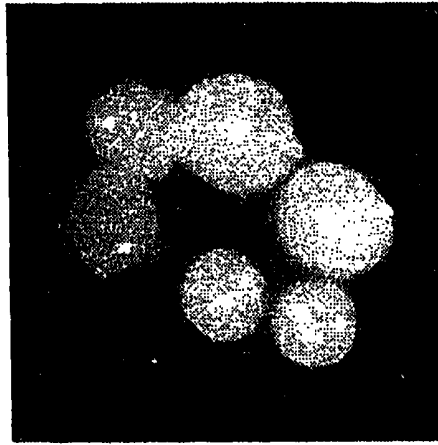


FIG. 13D



FIG. 14A



FIG. 14B



FIG. 14C

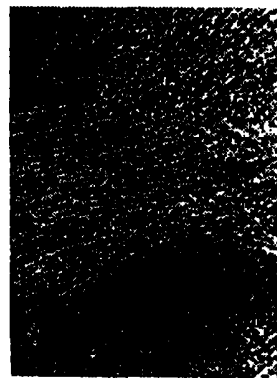


FIG. 14D

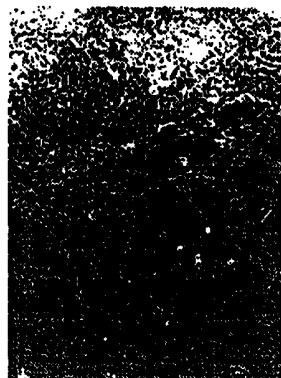


FIG. 14E



FIG. 14F

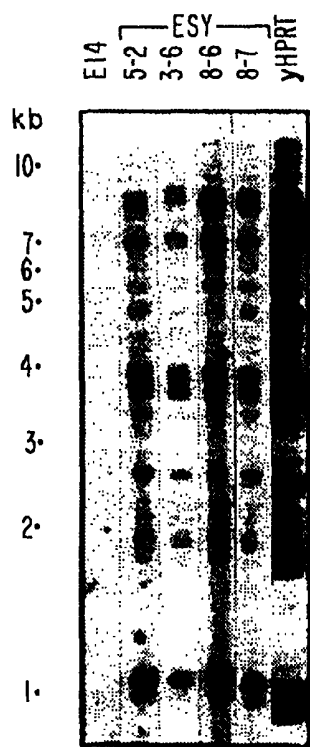


FIG. 14G

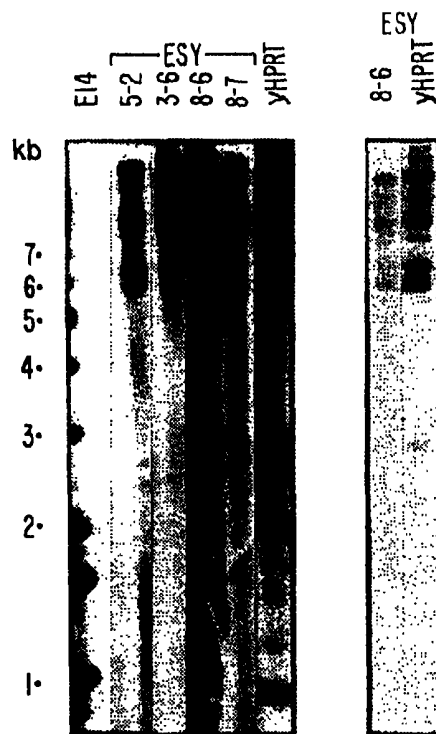


FIG. 14H FIG. 14I



FIG. 14J



FIG. 14K

FIG. 15A

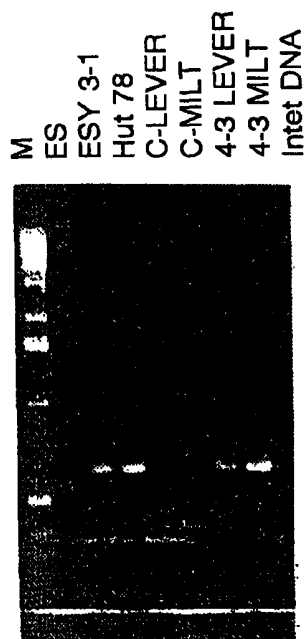
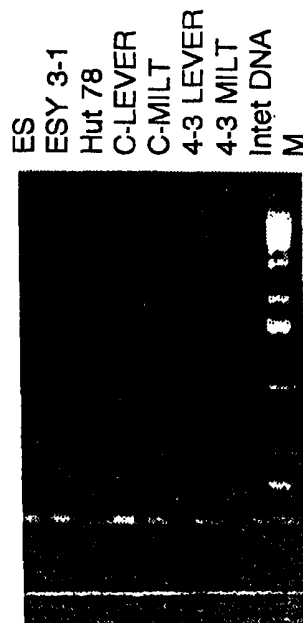


FIG. 15B



SPREDTE MEDLEMMER AV V1.V2.V3.V4.V5

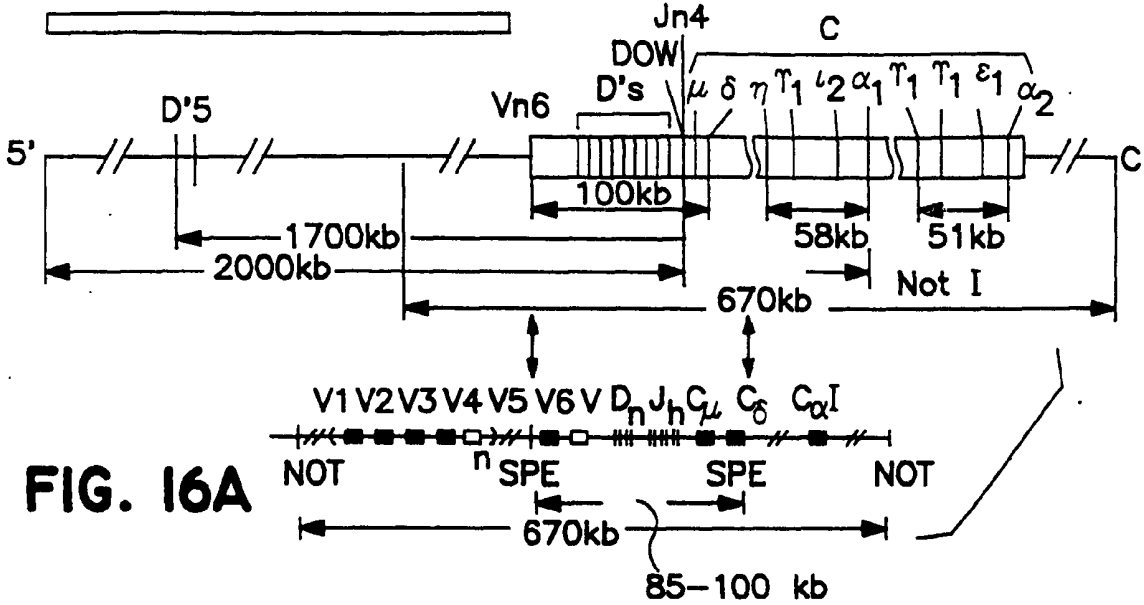


FIG. 16A

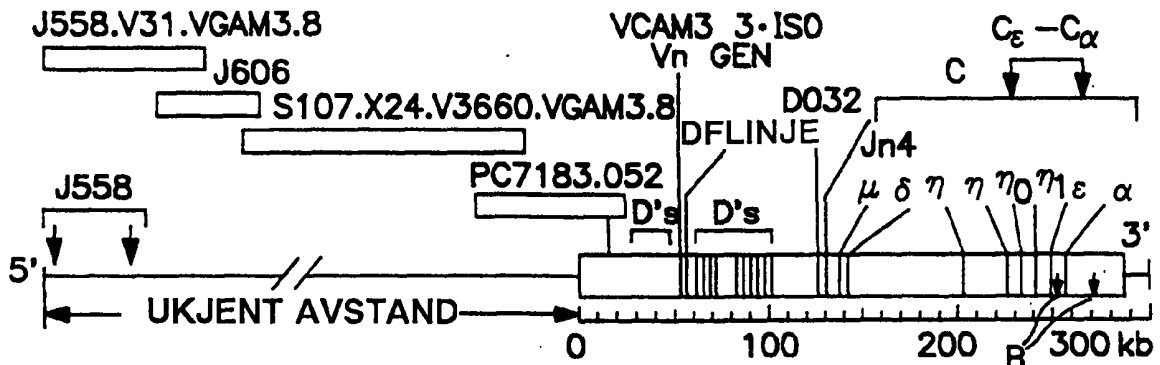


FIG. 16B

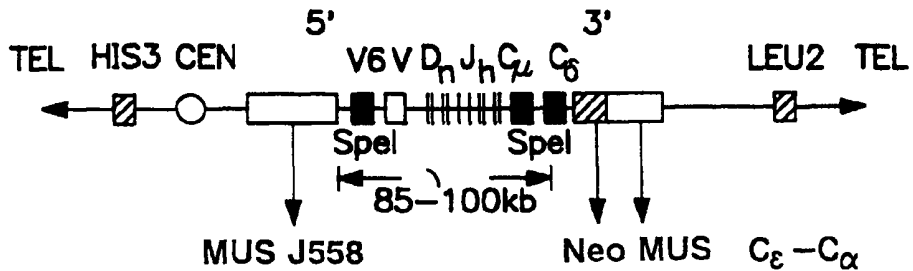


FIG. 16C 21/24

KRYSSNINGSSKJEMA FOR MUS

Kryssing IA.

heterozygot inaktivt murint IgH
 X
 heterozygot inaktivt murint IgK

MlgH (inaktiv) MlgK
 MlgH MlgK
 X
MlgH MlgK (inaktiv)
 MlgH MlgK
 ↓

F1 (Kryssing IA)

MlgH (inaktiv) MlgK (inaktiv)
 MlgH MlgK

Kryssing IB.

heterozygot humant IgH
 X
 heterozygot humant IgK

MlgH MlgK HlgH
 MlgH MlgK
 X
MlgH MlgK HlgK
 MlgH MlgK
 ↓

F1 (Kryssing IB)

MlgH MlgK HlgH HlgK
 MlgH MlgK

Kryssing II. F1 (Kryssing IA) X F1 (Kryssing IB)

↓

F2 Firfoldige heterozygoter

MlgH (inaktiv) MlgK (inaktiv) HlgH HlgK
 MlgH MlgK

Kryssing III. Kryssing av F2-mus

↓

F3 Doble homozygoter

MlgH (inaktiv) MlgK (inaktiv) HlgH HlgK
 MlgH (inaktiv) MlgK (inaktiv)

FIG. 17

FIG. 18A

PATTEDYRS-VERT GENOTYPER

Hetero- eller hemizygoter mus Mus av krysningsprodukt *

I.	$\frac{\Delta mIgL}{mIgL}$	$\frac{mIqH}{mIqH}$	$\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL}$	$\frac{mIqH}{mIqH}$
II.	$\frac{mIqL}{mIqL}$	$\frac{\Delta mIqH}{mIqH}$	$\frac{mIqL}{mIqL}$	$\frac{\Delta mIqH}{\Delta mIqH}$
III.	$\frac{mIqL}{mIqL}$	$\frac{mIqH}{mIqH}$	$\frac{mIqL}{mIqL}$	$\frac{mIqH}{mIqH}$
IV.	$\frac{mIqL}{mIqL}$	$\frac{mIqH}{mIqH}$	$\frac{mIqL}{mIqL}$	$\frac{mIqH}{mIqH}$
V.	Dyr I X Dyr II			
	$\frac{\Delta mIqL}{mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$	$\frac{\Delta mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$
VI.	Dyr III X Dyr V			
	$\frac{mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$	$\frac{mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$
VII.	Dyr IV X Dyr V			
	$\frac{mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$	$\frac{mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$
VIII.	Dyr VI X Dyr VII			
	$\frac{\Delta mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{\Delta mIqH}{\Delta mIqH}$	$\frac{\Delta mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{\Delta mIqH}{\Delta mIqH}$
	$\frac{mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$	$\frac{mIqL}{\Delta mIqL}$	$\frac{mIqH}{\Delta mIqH}$

IX. Dyr III X Dyr IV
 $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{mIgh}{mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$
 $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{mIgh}{mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$

X. Dyr II X Dyr IX
 $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{\Delta mIgh}{\Delta mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$
 $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{\Delta mIgh}{\Delta mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$ and $\frac{mIgL}{mIgL} \frac{\Delta mIgh}{\Delta mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$

XI. Dyr I X Dyr IX
 $\frac{\Delta mIgL}{mIgL} \frac{mIgh}{mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$
 $\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{mIgh}{mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$ and $\frac{\Delta mIgL}{\Delta mIgL} \frac{mIgh}{mIgh} \frac{hIgL}{hIgL} \frac{hIgh}{hIgh}$

*Ikke alle mulige krysnings-genotyper er vist.

Δ = funksjonelt inaktivt locus
 m = mus-endogent gen
 h = humant transgen
 Igh = immunglobulin tung kjede
 IgL = immunglobulin lett kjede

FIG. 18B