



(21)申請案號：112148224 (22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 04 日

(51)Int. Cl. : C12P21/08 (2006.01) C12N9/12 (2006.01)
C07K16/46 (2006.01) A01K67/027 (2024.01)

(30)優先權：2017/12/05 美國 62/594,944
2017/12/05 美國 62/594,946
2017/12/21 美國 62/609,241
2017/12/21 美國 62/609,251

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：墨菲 安德魯 MURPHY, ANDREW J. (US)；麥克唐納 琳恩 MACDONALD, LYNN (US)；郭春光 GUO, CHUNGUANG (CN)；麥克沃特 約翰 MCWHIRTER, JOHN (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：21 共 245 頁

(54)名稱
具有經改造免疫球蛋白λ輕鏈的非人類動物及其用途

(57)摘要
本發明係提供非人類動物(及/或非人類細胞)及其使用方法，該非人類動物(及/或非人類細胞)具有包含了編碼人類抗體之序列(即免疫球蛋白基因)的基因組。本文所述之非人類動物係表現含有免疫球蛋白(Ig)輕鏈之抗體，該免疫球蛋白輕鏈的特徵為存在有人類 Vλ 結構域。本文所述之非人類動物在一些實施例中的特徵為表現出含有人類 Vλ 輕鏈(其由插入有該非人類動物的內源性 Igk 輕鏈基因座之人類 Igλ 輕鏈-編碼序列編碼)之抗體。亦提供由非人類動物製造抗體之方法，該抗體含有人類可變區與小鼠恆定區。

Non-human animals (and/or non-human cells) and methods of using the same are provided, which non-human animals (and/or non-human cells) have a genome comprising human antibody-encoding sequences (i.e., immunoglobulin genes). Non-human animals described herein express antibodies that contain immunoglobulin (Ig) light chains characterized by the presence of human Vλ domains. Non-human animals provided herein are, in some embodiments, characterized by expression of antibodies that contain human Vλ light chains that are encoded by human Igλ light chain-encoding sequences inserted into an endogenous Igk light chain locus of said non-human animals. Methods for producing antibodies from non-human animals are also provided, which antibodies contain human variable regions and mouse constant regions.

指定代表圖：

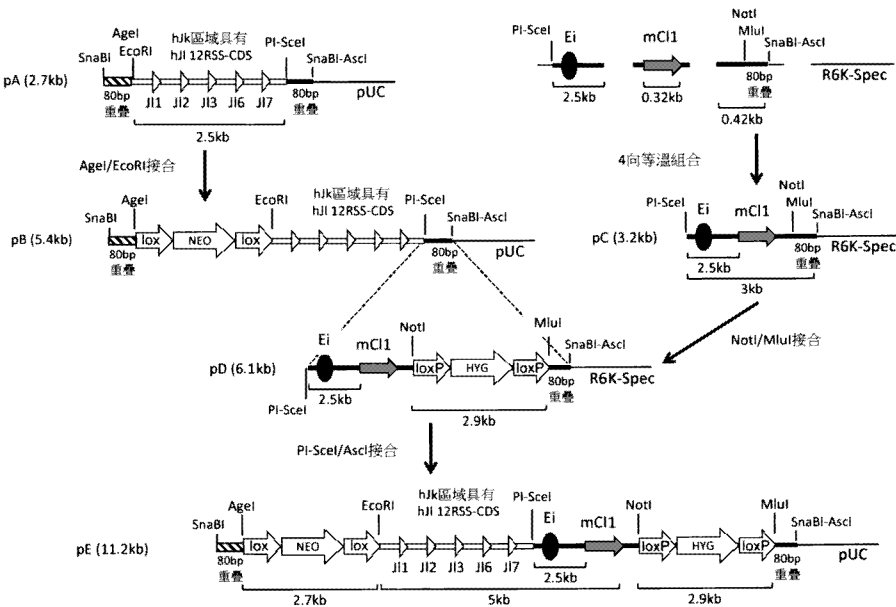


圖1A

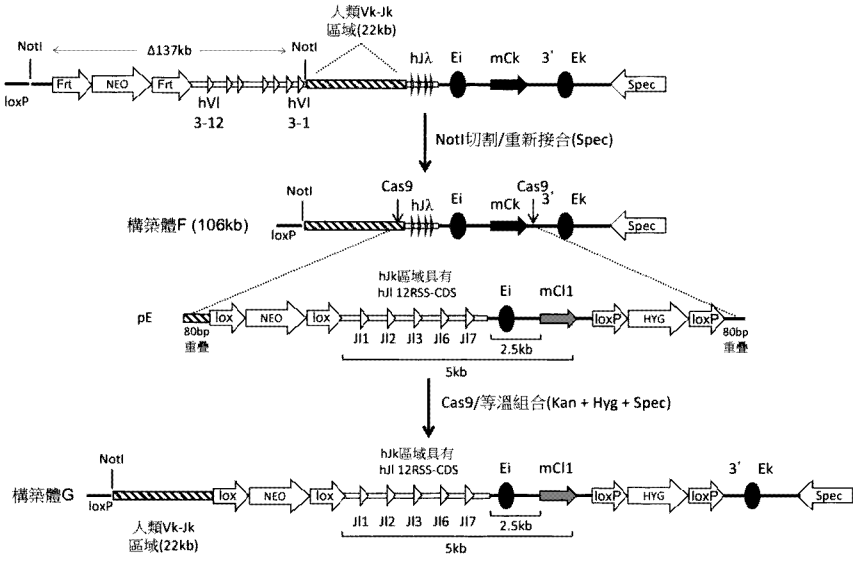


圖1B

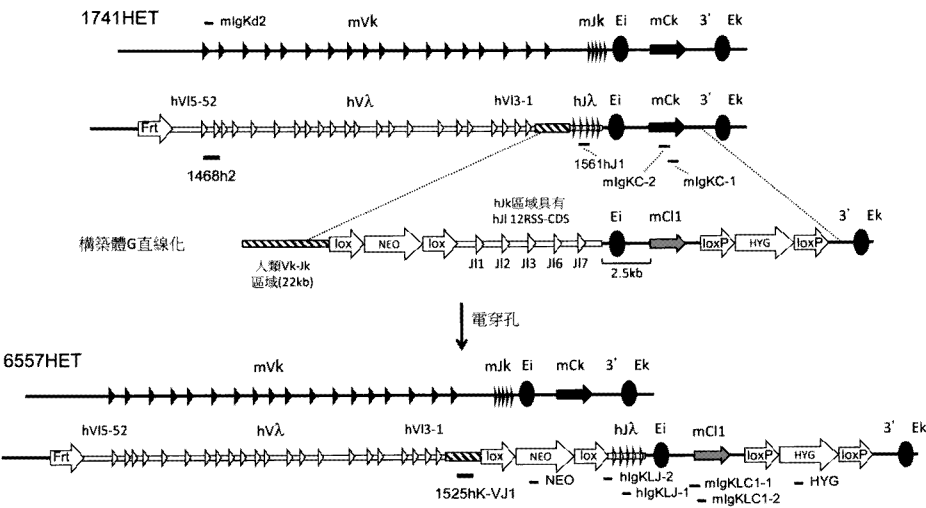


圖2A

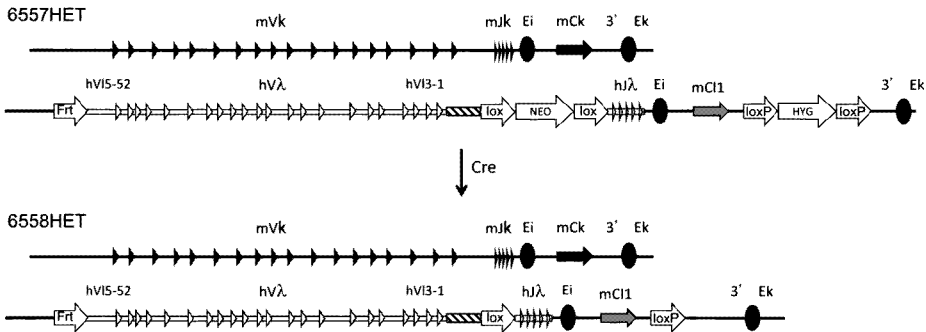


圖2B

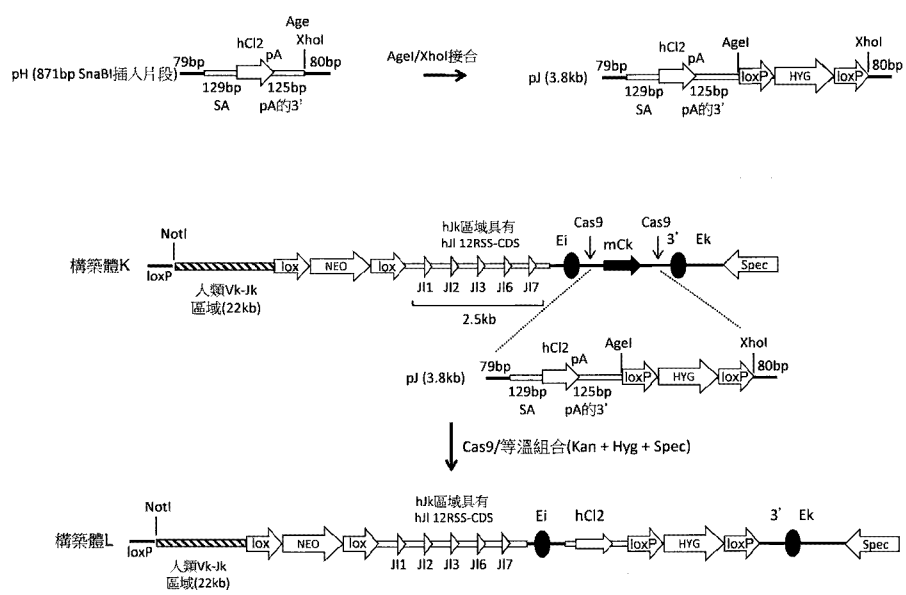


圖3

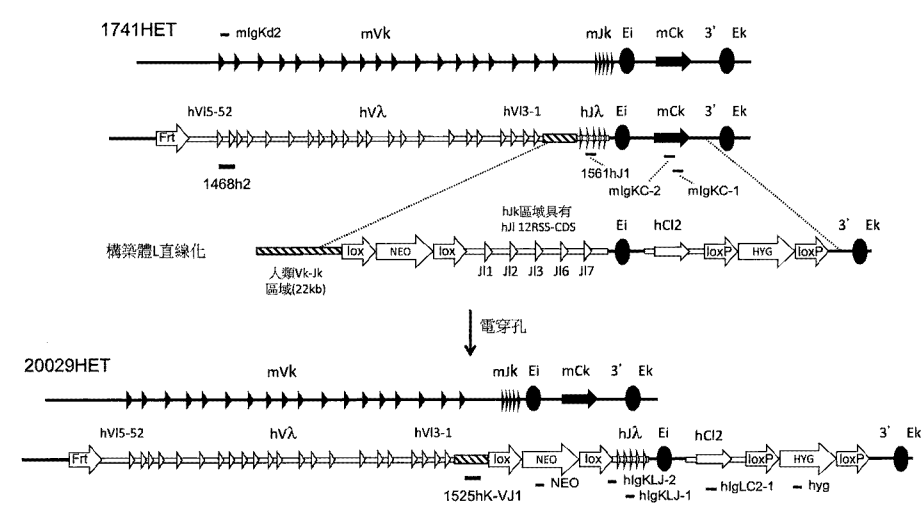


圖4A

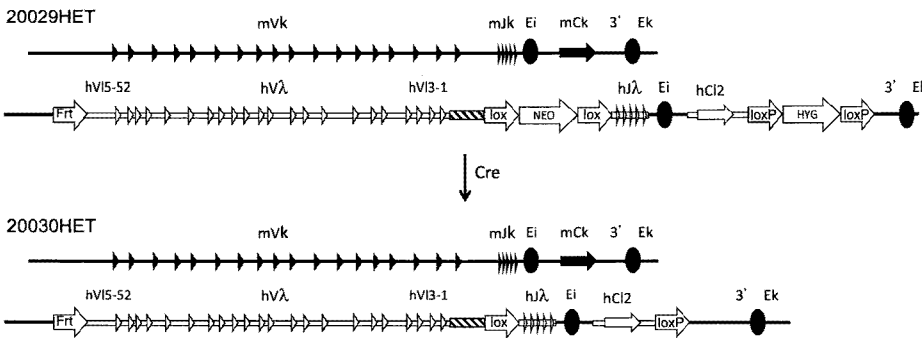


圖4B

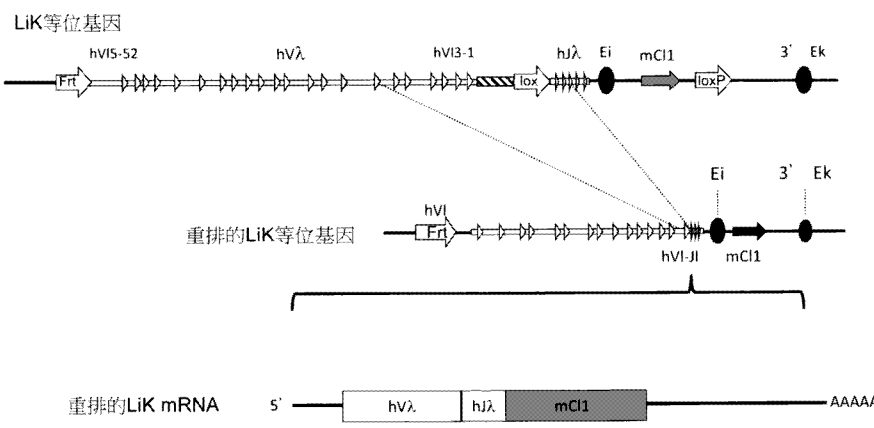


圖12

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

具有經改造免疫球蛋白 λ 輕鏈的非人類動物及其用途

NON-HUMAN ANIMALS HAVING AN ENGINEERED

IMMUNOGLOBULIN LAMBDA LIGHT CHAIN AND USES THEREOF

【中文】

本發明係提供非人類動物(及/或非人類細胞)及其使用方法，該非人類動物(及/或非人類細胞)具有包含了編碼人類抗體之序列(即免疫球蛋白基因)的基因組。本文所述之非人類動物係表現含有免疫球蛋白(Ig)輕鏈之抗體，該免疫球蛋白輕鏈的特徵為存在有人類 $V\lambda$ 結構域。本文所述之非人類動物在一些實施例中的特徵為表現出含有人類 $V\lambda$ 輕鏈(其由插入有該非人類動物的內源性 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座之人類 $Ig\lambda$ 輕鏈-編碼序列編碼)之抗體。亦提供由非人類動物製造抗體之方法，該抗體含有人類可變區與小鼠恆定區。

【英文】

Non-human animals (and/or non-human cells) and methods of using the same are provided, which non-human animals (and/or non-human cells) have a genome comprising human antibody-encoding sequences (i.e., immunoglobulin genes). Non-human animals described herein express antibodies that contain immunoglobulin (Ig) light chains characterized by the presence of human $V\lambda$ domains. Non-human animals provided herein are, in some embodiments, characterized by expression of antibodies that contain human $V\lambda$ light chains that are encoded by human $Ig\lambda$ light chain-encoding sequences inserted into an endogenous $Ig\kappa$ light chain locus of said non-human animals. Methods for producing antibodies from non-human animals are also provided, which antibodies contain human variable regions and mouse constant regions.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1A~4B、圖 12。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

具有經改造免疫球蛋白 λ 輕鏈的非人類動物及其用途

NON-HUMAN ANIMALS HAVING AN ENGINEERED

IMMUNOGLOBULIN LAMBDA LIGHT CHAIN AND USES THEREOF

【相關申請案之交叉引用】

【0001】 本申請案係主張於 2017 年 12 月 5 日提申之美國專利臨時申請案第 62/594,944 號之優先權；於 2017 年 12 月 5 日提申之美國專利臨時申請案第 62/594,946 號之優先權；於 2017 年 12 月 21 日提申之美國專利臨時申請案第 62/609,241 號之優先權；以及於 2017 年 12 月 21 日提申之美國專利臨時申請案第 62/609,251 號之優先權；其每一者係以引用方式併入本文中。

【技術領域】

【0002】 本發明係提供非人類動物(及/或非人類細胞)及其使用方法，該非人類動物(及/或非人類細胞)具有包含了編碼人類抗體之序列(即免疫球蛋白基因)的基因組。本文所述之非人類動物係表現含有免疫球蛋白(Ig)輕鏈之抗體，該免疫球蛋白輕鏈的特徵為存在有人類 $V\lambda$ 結構域。本文所述之非人類動物在一些實施例中的特徵為表現出含有人類 $V\lambda$ 輕鏈(其由插入有該非人類動物的內源性 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座之人類 $Ig\lambda$ 輕鏈-編碼序列編碼)之抗體。亦提供由非人類動物製造抗體之方法，該抗體含有人類可變區與小鼠恆定區。

【先前技術】

【0003】 人類抗體是進展最快的一類療法。在目前用於生產抗體的技術中，具編碼人類抗體(全部或部分)的基因物質之基因改造動物(例如嚙齒動物)的開發，已徹底改變了用於治療各種疾病之人類治療用單株抗體領

域。目前仍然需要開發用於產生人類單株抗體之經改良的活體內系統，其在宿主基因改造動物中可最大化人類抗體庫。

【發明內容】

【0004】 在一些實施例中，本發明提供一種嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包括：

經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (b) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
- (c) 一或多個 C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段及該一或多個人類 J λ 基因片段係操作性地連結至該一或多個 C λ 基因，且其中該嚙齒動物於該改造內源性免疫球蛋白 κ 基因座上缺乏嚙齒動物 C κ 基因。

【0005】 在一些實施例中，該一或多個 C λ 為一 C λ 基因。在一些實施例中，一 C λ 基因為或包括嚙齒動物 C λ 基因者。在一些實施例中，嚙齒動物 C λ 基因具有一與小鼠 C λ 1、小鼠 C λ 2 或小鼠 C λ 3 基因至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%相同的序列。在一些實施例中，嚙齒動物 C λ 基因為或包括小鼠 C λ 1 基因。在一些實施例中，嚙齒動物 C λ 基因為或包括大鼠 C λ 基因。在一些實施例中，大鼠 C λ 基因具有一與大鼠 C λ 1、大鼠 C λ 2、大鼠 C λ 3 或大鼠 C λ 4 基因至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%相同的序列。

【0006】 在一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段取代一或多個嚙齒動物 V κ 基因片段、一或多個嚙齒動物 J κ 基因片段，或其任一組合處。在一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段，係取代一或多個嚙齒動物 V κ 基因片段、一或多個嚙齒動物 J κ 基因片段，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段，係取代所有功能性嚙齒動物 V κ 基因片段及/或所有功能性嚙齒動物 J κ 基因片段。

【0007】 在一些實施例中，一或多個人類 Vλ 基因片段包括 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 Vλ 基因片段包括 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 Vλ 基因片段包括 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 及 Vλ3-1。

【0008】 在一些實施例中，一或多個人類 Jλ 基因片段包括 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6、Jλ7，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 Jλ 基因片段包括 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 及 Jλ7。

【0009】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 Vλ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白λ 輕鏈基因座中的人類 Vλ 基因片段。例如，請參照圖 20，第一例示性內源性人類 Vλ 非編碼序列天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白λ 輕鏈基因座之 Vλ3-12 基因片段(以及位於其 3' 端)。一種經改造內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座(包括該第一例示性內源性人類 Vλ 非編碼序列)，可包括該非編碼序列於內源性人類免疫球蛋白κ 輕鏈基因座之 Vλ3-12 基因片段附近(以及其 3' 端)。一種改造內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座(包括該第一例示性內源性人類 Vλ 非編碼序列)，可在內源性人類免疫球蛋白κ 輕鏈基因座之 Vλ2-11 基因片段附近(以及位於其

5'端)，包括該非編碼序列。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座(包括該第一例示性內源性人類 Vλ非編碼序列)，亦可在內源性人類免疫球蛋白λ輕鏈基因座之 Vλ3-12 基因片段附近(較佳位於其 3'端)，以及內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 V2-11 基因片段附近(較佳位於其 5'端)，包括該非編碼序列。在一些實施例中，該一或多個人類 Vλ非編碼序列之每一者為或包括一內含子。

【0010】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座係包括一或多個人類 Jλ非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 Jλ基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 Jλ非編碼序列，係天然地出現在鄰近於內源性人免疫球蛋白λ輕鏈基因座之人類 Jλ基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 Jλ非編碼序列之每一者為或包括一內含子。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座係包括一或多個人類 Jκ非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 Jλ基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列，係天然地出現在鄰近於內源性人免疫球蛋白κ輕鏈基因座之人類 Jκ基因片段。例如，請參照圖 21，第一例示性內源性人類 Jκ非編碼序列，係天然地出現在內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座上。包括該第一例示性內源性人 Jκ非編碼序列的經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，可為一非編碼序列，位於與改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座中的 Jλ基因片段(例如，Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7)相鄰的位置上。在一些實施例中，該一或多個人類 Jκ非編碼序列之每一者為或包括一內含子。

【0011】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座係包括一或多個人類 Vλ非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ非編碼序列之每一者，係天然地鄰近於該內源性免疫球

蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7 處。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該經改造內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4 或 J κ 5 處。

【0012】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一 κ 輕鏈非編碼序列，其介於該一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段之間。在一些實施例中， κ 輕鏈非編碼序列為一人類 κ 輕鏈非編碼序列。在一些實施例中，人類 κ 輕鏈非編碼序列係具有一序列，其天然地出現在內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類 V κ 4-1 基因片段與人類 J κ 1 基因片段之間。

【0013】 在一些實施例中，本文所述之嚙齒動物之經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為同型合子。 κ 在一些實施例中，本文所述之嚙齒動物之經改造內源性免疫球蛋白輕鏈基因座為異型合子。在一些實施例中，嚙齒動物的生殖細胞系基因組包括第二改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包括：

- (a) 一或多個人類 V κ 基因片段，以及
- (b) 一或多個人類 J κ 基因片段，

其中該一或多個人類 V κ 基因片段，以及該一或多個人類 J κ 基因片段係操作性地連結至一 C κ 基因。

【0014】 在一些實施例中，該嚙齒動物的基因組更包括編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其操作性地連結至一轉錄控制單元。在一些實施例中，該轉錄控制單元包括一 RAG1 轉錄控制單元、一 RAG2 轉錄控制單元、一免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。在一些實施例中，該編碼外源性 TdT 的核酸序列，係位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座或 RAG2 基因座上。在一些實施例中，TdT 為人類 TdT。在一些實施例中，TdT 為 TdT 的短同種型（TdTS）。

【0015】 在一些實施例中，本文所述之嚙齒動物包括編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其可操作性地連結至其生殖細胞系基因組中的轉錄控制單元，並展現出輕鏈（例如，表現其包含之輕鏈可變結構域）至少 1.2 倍、至少 1.5 倍、至少 1.75 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍，或至少 5 倍的增加，在可比較的小鼠（例如，同窩小鼠）的交界多樣性上，其不包括與其生殖細胞系基因組中的轉錄控制單元操作性地連接之外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）。在一些實施例中，交界多樣性係測定其獨特 CDR3/10,000 讀數之數值。

【0016】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包括編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其可操作地連接至其生殖細胞系基因組中的轉錄控制單元，並且至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%之由嚙齒動物產生之輕鏈（例如， λ 及/或 κ 輕鏈）具有非模板加入。

【0017】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物生殖細胞系基因組包括：經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包括：

- (a) 一或多個人類 V_H 基因片段，
- (b) 一或多個人類 D_H 基因片段，以及
- (c) 一或多個人類 J_H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座上之一嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區。

【0018】 在一些實施例中，一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係位於一或多個嚙齒動物 VH 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其任一組合處。在一些實施例中，該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係取代一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其任一組合。

【0019】 在一些實施例中，該一或多個人類 V_H 基因片段包括 V_{H3-74} 、 V_{H3-73} 、 V_{H3-72} 、 V_{H2-70} 、 V_{H1-69} 、 V_{H3-66} 、 V_{H3-64} 、 V_{H4-61} 、 V_{H4-59} 、 V_{H1-58} 、 V_{H3-53} 、 V_{H5-51} 、 V_{H3-49} 、 V_{H3-48} 、 V_{H1-46} 、 V_{H1-45} 、 V_{H3-43} 、 V_{H4-39} 、 V_{H4-34} 、 V_{H3-33} 、 V_{H4-31} 、 V_{H3-30} 、 V_{H4-28} 、 V_{H2-26} 、 V_{H1-24} 、 V_{H3-23} 、 V_{H3-21} 、 V_{H3-20} 、 V_{H1-18} 、 V_{H3-15} 、 V_{H3-13} 、 V_{H3-11} 、 V_{H3-9} 、 V_{H1-8} 、 V_{H3-7} 、 V_{H2-5} 、 V_{H7-4-1} 、 V_{H4-4} 、 V_{H1-3} 、 V_{H1-2} 、 V_{H6-1} ，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 V_H 基因片段包括 V_{H3-74} 、 V_{H3-73} 、 V_{H3-72} 、 V_{H2-70} 、 V_{H1-69} 、 V_{H3-66} 、 V_{H3-64} 、 V_{H4-61} 、 V_{H4-59} 、 V_{H1-58} 、 V_{H3-53} 、 V_{H5-51} 、 V_{H3-49} 、 V_{H3-48} 、 V_{H1-46} 、 V_{H1-45} 、 V_{H3-43} 、 V_{H4-39} 、 V_{H4-34} 、 V_{H3-33} 、 V_{H4-31} 、 V_{H3-30} 、 V_{H4-28} 、 V_{H2-26} 、 V_{H1-24} 、 V_{H3-23} 、 V_{H3-21} 、 V_{H3-20} 、 V_{H1-18} 、 V_{H3-15} 、 V_{H3-13} 、 V_{H3-11} 、 V_{H3-9} 、 V_{H1-8} 、 V_{H3-7} 、 V_{H2-5} 、 V_{H7-4-1} 、 V_{H4-4} 、 V_{H1-3} 、 V_{H1-2} 及 V_{H6-1} 。

【0020】 在一些實施例中，一或多個人類 D_H 基因片段包括 D_{H1-1} 、 D_{H2-2} 、 D_{H3-3} 、 D_{H4-4} 、 D_{H5-5} 、 D_{H6-6} 、 D_{H1-7} 、 D_{H2-8} 、 D_{H3-9} 、 D_{H3-10} 、 D_{H5-12} 、 D_{H6-13} 、 D_{H2-15} 、 D_{H3-16} 、 D_{H4-17} 、 D_{H6-19} 、 D_{H1-20} 、 D_{H2-21} 、 D_{H3-22} 、 D_{H6-25} 、 D_{H1-26} 、 D_{H7-27} ，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 D_H 基因片段包括 D_{H1-1} 、 D_{H2-2} 、 D_{H3-3} 、 D_{H4-4} 、 D_{H5-5} 、 D_{H6-6} 、 D_{H1-7} 、 D_{H2-8} 、 D_{H3-9} 、 D_{H3-10} 、 D_{H5-12} 、 D_{H6-13} 、 D_{H2-15} 、 D_{H3-16} 、 D_{H4-17} 、 D_{H6-19} 、 D_{H1-20} 、 D_{H2-21} 、 D_{H3-22} 、 D_{H6-25} 、 D_{H1-26} 、 D_{H7-27} 。

16、D_H4-17、D_H6-19、D_H1-20、D_H2-21、D_H3-22、D_H6-25、D_H1-26 及 D_H7-27。

【0021】 在一些實施例中，一或多個人類 J_H 基因片段包括 J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5、J_H6，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 J_H 基因片段包括 J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5 及 J_H6。

【0022】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座包括一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 V_H 基因片段中的至少一者，其中該一或多個 V_H 非編碼序列中的每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座中的人類 V_H 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 V_H 非編碼序列中之每一者為或包括一內含子。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座包括一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 D_H 基因片段的至少一者，其中該一或多個 D_H 非編碼序列中的每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座中之人類 D_H 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 D_H 非編碼序列的每一者為或包括一內含子。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座包括一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 J_H 非編碼序列中的每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座中的人類 J_H 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 J_H 非編碼序列之每一者為或包括一內含子。

【0023】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物之經改造內源化免疫球蛋白重鏈基因座是同型合子。

【0024】 在一些實施例中，嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區為內源性嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區。

【0025】 在一些實施例中，內源性 V_λ 基因片段、內源性 J_λ 基因片區段及內源性 C_λ 基因係全部或部分刪去。在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物無法偵測地表現內源性免疫球蛋白λ輕鏈可變結構域。在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物無法偵測地表現內源性免疫球蛋白κ輕鏈可變結構域。

【0026】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座缺乏功能性內源性嚙齒動物 Adam6 基因。在一些實施例中，嚙齒動物生殖細胞系基因組包括一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段。在一些實施例中，一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、其功能性直系同源物、其功能性同源物或其功能片段係被表現出（例如，於雄性生殖系統的細胞中，例如睪丸細胞）。

【0027】 在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之同一染色體上。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座中。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係介於第一人類 V_H 基因片段與第二人類 V_H 基因片段之間。在一些實施例中，第一人類 V_H 基因片段為 V_H1-2 ，以及第二人類 V_H 基因片段為 V_H6-1 。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段的一或多個核苷酸序列，係位於人類 Adam6 偽基因處。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段的一或多個核苷酸序列，係取代人類 Adam6 偽基因。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段的一或多個核苷酸序列，係介於一人類 V_H 基因片段與一人類 D_H 基因片段之間。

【0028】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包括表現抗體的 B 細胞群，該抗體包括免疫球蛋白 λ 輕鏈，其每一者皆包括一人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域。在一些實施例中，人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域係由重排的人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變區序列編碼，其包括 (i) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異物，以及 (ii) 一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異物。

【0029】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包括表現抗體的 B 細胞群，該抗體包括免疫球蛋白重鏈，其每一者皆包括一人類免疫球蛋白重鏈可變結構域。在一些實施例中，人類免疫球蛋白重鏈可變結構域係由重排的人類免疫球蛋白重鏈可變區序列編碼，包括 (i) 一或多個人類 VH 基因片段之一者，或其體細胞高度突變之變異物，(ii) 一或多個人類 DH 基因片段中之一者，或其體細胞高度突變之變異物，以及 (ii) 一或多個人類 JH 基因片段之一者，或其體細胞高度突變之變異物。

【0030】 在一些實施例中，本文所述的嚙齒動物係與包含一或多個表位的抗原進行免疫反應，而產生 B 細胞群。在一些實施例中，嚙齒動物產生 B 細胞群，其表現可結合（例如，特異性結合）至有興趣抗原的一或多個表位之抗體。在一些實施例中，由回應抗原而產生的 B 細胞群表現的抗體包括一具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域的重鏈，及/或一具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼之人類 λ 輕鏈可變結構域的 λ 輕鏈。在一些實施例中，由反應抗原而產生的 B 細胞群表現出的抗體，包括一重鏈，其具有由人類重鏈可變區序列編碼的人類重鏈可變結構域，及/或一 κ 輕鏈，其具有由本文所述的人類 κ 輕鏈可變區序列編碼的人類 κ 輕鏈可變結構域。

【0031】 在一些實施例中，嚙齒動物產生 B 細胞群，其表現可結合至有興趣抗原的一或多個表位之抗體，其中由反應抗原而產生的 B 細胞群表現之抗體包括：(i) 重鏈，具有由人類重鏈可變區序列編碼的人類重鏈可變結構域，(ii) λ 輕鏈，具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的 λ 輕鏈可變結構域，(iii) κ 輕鏈，具有由如本文所述人類 κ 輕鏈可變區序列編碼的人類 κ 輕鏈可變結構域編碼，或 (iv) 其任一組合。

【0032】 在一些實施例中，如本文所述之人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列，及/或人類 κ 輕鏈可變區序列為體細胞高度突變。在一些實施例中，至少約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 之回應於抗原而產生的 B 細胞群的 B 細胞係包括人類重鏈可變區序列、 λ 輕鏈可變區序列、及/或體細胞高度突變的 κ 輕鏈可變區序列。

【0033】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物是小鼠或大鼠。

【0034】 在一些實施例中，本文描述來自嚙齒動物的細胞及/或組織（例如，分離的細胞及/或組織）。在一些實施例中，提供的細胞和組織包括例如淋巴組織、脾細胞、B 細胞、幹細胞，及/或生殖細胞。在一些實施例中，所提供的細胞係經分離。在一些實施例中，分離的細胞是或包括原始 B 細胞、前驅 B 細胞、未成熟 B 細胞、成熟初始 B 細胞、經活化 B 細胞、記憶 B 細胞、B 譜系淋巴細胞，及/或漿細胞。在一些實施例中，經分離之細胞包括幹細胞（例如胚胎幹細胞），及/或生殖細胞（例如，精子、卵母細胞）。

【0035】 在一些實施例中，本揭示提供了經分離的嚙齒動物細胞，其生殖細胞系基因組包括：

經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包括：

- (a) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (b) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
- (c) C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因區段，係操作性地連結至該 C λ 基因。

【0036】 在一些實施例中，本文所述的經分離嚙齒動物細胞在改造內源性免疫球蛋白 κ 基因座處，缺乏嚙齒動物 C κ 基因。

【0037】 在一些實施例中，本文描述的經分離嚙齒動物細胞為嚙齒動物胚胎幹（ES）細胞。

【0038】 在一些實施例中，本揭示提供由本文描述的嚙齒動物 ES 細胞產生的嚙齒動物胚胎。

【0039】 在一些實施例中，本揭示提供由本文所述的經分離嚙齒動物細胞產生的永生化細胞。

【0040】 在一些實施例中，本發明提供了一種製備於生殖細胞系基因組包括經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之嚙齒動物的方法，該方法包括以下步驟：

(a) 將一或多個 DNA 片段引入嚙齒動物 ES 細胞的生殖細胞系基因組中，其中該一或多個 DNA 片段包含：

- (i) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
- (iii) 一或多個 C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段、及一或多個 C λ 基因，係引入嚙齒動物 ES 細胞的生殖細胞系基因組中的內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，以及其中一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段和一或多個 C λ 基因係操作性地連接；以及

(b) 使用 (a) 中產生的嚙齒動物 ES 細胞產生嚙齒動物。

【0041】 在一些實施例中，製備於生殖細胞系基因組包含經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之嚙齒動物的方法係包括將一 κ 輕鏈非編碼序列引入嚙齒動物 ES 細胞的生殖細胞系基因組中之步驟，使得該 κ 輕鏈非編碼序列介於該嚙齒動物 ES 細胞生殖細胞系基因組中的一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段之間。

【0042】 在一些實施例中，本發明提供了一種製備於生殖細胞系基因組包含經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之嚙齒動物的方法，該方法包括以下步驟：

改造該種係基因組之內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，以包括：

- (a) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (b) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
- (c) 一或多個 C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段和該一或多個人 J λ 基因片段，係操作性地連結至該一或多個 C λ 基因，以及

其中該一或多個 C λ 基因係插入取代該內源免疫球蛋白 κ 基因座上的嚙齒動物 C κ 基因。

【0043】 在一些實施例中，C λ 基因取代內源性免疫球蛋白 κ 基因座處的嚙齒動物 C κ 基因。

【0044】 在一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段包括 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段包括 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 及 V λ 3-1。在一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段包括 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 及 V λ 3-1。

【0045】 在一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包括 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包括 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 及 J λ 7。

【0046】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 V λ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之人類 V λ 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 V λ 非編碼序列中的每一者為或包括一內含子。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J λ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之人類 J λ 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 J λ 非編碼序列中的每一者為或包括一內含子。在一些實施例中，經改造內源免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J λ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白

κ 輕鏈基因座之人類 J κ 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 J κ 非編碼序列中的每一者為或包括一內含子。

【0047】 在一些實施例中，C λ 基因為或包括一嚙齒動物 C λ 基因。在一些實施例中，嚙齒動物 C λ 基因具有一與小鼠 C λ 1、小鼠 C λ 2 或小鼠 C λ 3 基因至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 相同的序列。在一些實施例中，嚙齒動物 C λ 基因為或包括小鼠 C λ 1 基因。在一些實施例中，嚙齒動物 C λ 基因為或包括大鼠 C λ 基因。在一些實施例中，大鼠 C λ 基因具有一與大鼠 C λ 1、大鼠 C λ 2、大鼠 C λ 3 或大鼠 C λ 4 基因至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 相同的序列。

【0048】 在一些實施例中，一或多個 DNA 片段包括至少一篩選標記物。在一些實施例中，一或多個 DNA 片段包括至少一位點特異性重組位點。

【0049】 在一些實施例中，一嚙齒動物的生殖細胞系基因組包括：

經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包括：

- (a) 一或多個人類 V_H 基因片段，
- (b) 一或多個人類 D_H 基因片段，以及
- (c) 一或多個人類 J_H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、該一或多個人類 D_H 基因片段、及該一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至一嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區。

【0050】 在一些實施例中，改造生殖細胞系基因組中內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的步驟，係於嚙齒動物 ES 細胞中進行，其生殖細胞系基因組包括經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包括一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至一嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區。

【0051】 在一些實施例中，經改造內源免疫球蛋白重鏈基因座包括係一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 V_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 V_H 非編碼序列中的每一者係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 V_H 基因片段。在

一些實施例中，該一或多個人類 V_H 非編碼序列之每一者為或包括一內含子。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座係包括一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 D_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 D_H 非編碼序列中的每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D_H 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 D_H 非編碼序列之每一者為或包括內含子。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座係包括一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 J_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 J_H 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段。在一些實施例中，該一或多個人類 J_H 非編碼序列之每一者為或包括內含子。

【0052】 在一些實施例中，本發明提供一種在嚙齒動物中產生抗體的方法，該方法包括以下步驟：

(i) 以有興趣的抗原使一嚙齒動物免疫化，

其中該嚙齒動物具生殖細胞系基因組，包含：

經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

(a) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，

(b) 一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，以及

(c) 一或多個 $C\lambda$ 基因，

其中該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段與該一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段係操作性連結至該 $C\lambda$ 基因，以及

其中該一或多個 $C\lambda$ 基因係位於該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之嚙齒動物 $C\kappa$ 基因處；

將該嚙齒動物維持在足以使該嚙齒動物對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；以及

自該嚙齒動物、嚙齒動物細胞或衍生自該嚙齒動物細胞的細胞中，回收與有興趣抗原結合的抗體。

【0053】 在一些實施例中，回應於該免疫化步驟，嚙齒動物會產生 B 細胞，其可表現與有興趣抗原結合的抗體。在一些實施例中，由 B 細胞表現

的抗體包括一重鏈，其具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域，及/或一 λ 輕鏈，其具有由人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的人類 λ 輕鏈可變結構域，如本文所述。在一些實施例中，由B細胞表現的抗體包括（i）重鏈，其具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域，（ii） λ 輕鏈，其具有由人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的人類 λ 輕鏈可變結構域，（iii） κ 輕鏈，其具有由人類 κ 輕鏈可變區序列編碼的人類 κ 輕鏈可變結構域，或（iv）其任一組合。

【0054】 在一些實施例中，回應於該免疫化步驟，嚙齒動物會產生B細胞，其可表現與有興趣抗原結合的抗體。在一些實施例中，由回應抗原而產生的B細胞群表現的抗體包括一具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域的重鏈，及/或一具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼之人類 λ 輕鏈可變結構域的 λ 輕鏈。在一些實施例中，由回應抗原而產生的B細胞群所表現之抗體包括（i）重鏈，具有由人類重鏈可變區序列編碼的人類重鏈可變結構域，（ii） λ 輕鏈，其具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的人類 λ 輕鏈可變結構域（iii） κ 輕鏈，其具有由如本文所述人類 κ 輕鏈可變區序列編碼的人類 κ 輕鏈可變結構域，或（iv）其任一組合。

【0055】 在一些實施例中，回應於該免疫化步驟，嚙齒動物會產生B細胞群，其表現與有興趣抗原之一或多個表位結合的抗體，其中由反應於一抗原而產生的B細胞群表現的抗體包括：（i）重鏈，具有由人類重鏈可變區序列編碼的人類重鏈可變結構域，（ii） λ 輕鏈，具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的 λ 輕鏈可變結構域，（iii） κ 輕鏈，具有由如本文所述人類 κ 輕鏈可變區序列編碼的人類 κ 輕鏈可變結構域編碼，或（iv）其任一組合。

【0056】 在一些實施例中，如本文所述之人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列，及/或人類 κ 輕鏈可變區序列為體細胞高度突變。在一些實施例中，至少約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%之回應於抗原而

產生的 B 細胞群的 B 細胞係包括人類重鏈可變區序列、 λ 輕鏈可變區序列、及/或體細胞高度突變的 κ 輕鏈可變區序列。

【0057】 在一些實施例中，與有興趣抗原結合的抗體係由嚙齒動物的 B 細胞中分離、回收或辨識出。在一些實施例中，與有興趣抗原結合的抗體係由嚙齒動物 B 細胞製備之融合瘤中分離、回收或辨識出。

【0058】 在一些實施例中，抗原包括一或多個表位，且與有興趣抗原結合的抗體係結合至該一或多個表位中的一個表位。

【0059】 在一些實施例中， $C\lambda$ 基因為或包括嚙齒動物 $C\lambda$ 基因。在一些實施例中，嚙齒動物 $C\lambda$ 基因具有一與小鼠 $C\lambda 1$ 、小鼠 $C\lambda 2$ 或小鼠 $C\lambda 3$ 基因至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%相同的序列。在一些實施例中，嚙齒動物 $C\lambda$ 基因為或包括小鼠 $C\lambda 1$ 基因。在一些實施例中，嚙齒動物 $C\lambda$ 基因為或包括大鼠 $C\lambda$ 基因。在一些實施例中，大鼠 $C\lambda$ 基因具有一與大鼠 $C\lambda 1$ 、大鼠 $C\lambda 2$ 、大鼠 $C\lambda 3$ 或大鼠 $C\lambda 4$ 基因至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%相同的序列。

【0060】 在一些實施例中，一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段包含 $V\lambda 5-52$ 、 $V\lambda 1-51$ 、 $V\lambda 9-49$ 、 $V\lambda 1-47$ 、 $V\lambda 7-46$ 、 $V\lambda 5-45$ 、 $V\lambda 1-44$ 、 $V\lambda 7-43$ 、 $V\lambda 1-40$ 、 $V\lambda 5-39$ 、 $V\lambda 5-37$ 、 $V\lambda 1-36$ 、 $V\lambda 3-27$ 、 $V\lambda 3-25$ 、 $V\lambda 2-23$ 、 $V\lambda 3-22$ 、 $V\lambda 3-21$ 、 $V\lambda 3-19$ 、 $V\lambda 2-18$ 、 $V\lambda 3-16$ 、 $V\lambda 2-14$ 、 $V\lambda 3-12$ 、 $V\lambda 2-11$ 、 $V\lambda 3-10$ 、 $V\lambda 3-9$ 、 $V\lambda 2-8$ 、 $V\lambda 4-3$ 、 $V\lambda 3-1$ ，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段包含 $V\lambda 5-52$ 、 $V\lambda 1-51$ 、 $V\lambda 9-49$ 、 $V\lambda 1-47$ 、 $V\lambda 7-46$ 、 $V\lambda 5-45$ 、 $V\lambda 1-44$ 、 $V\lambda 7-43$ 、 $V\lambda 1-40$ 、 $V\lambda 3-27$ 、 $V\lambda 3-25$ 、 $V\lambda 2-23$ 、 $V\lambda 3-22$ 、 $V\lambda 3-21$ 、 $V\lambda 3-19$ 、 $V\lambda 2-18$ 、 $V\lambda 3-16$ 、 $V\lambda 2-14$ 、 $V\lambda 3-12$ 、 $V\lambda 2-11$ 、 $V\lambda 3-10$ 、 $V\lambda 3-9$ 、 $V\lambda 2-8$ 、 $V\lambda 4-3$ 及 $V\lambda 3-1$ 。在一些實施例中，一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段包含 $V\lambda 5-52$ 、 $V\lambda 1-51$ 、 $V\lambda 9-49$ 、 $V\lambda 1-47$ 、 $V\lambda 7-46$ 、 $V\lambda 5-45$ 、 $V\lambda 1-44$ 、 $V\lambda 7-43$ 、 $V\lambda 1-40$ 、 $V\lambda 5-39$ 、 $V\lambda 5-37$ 、 $V\lambda 1-36$ 、 $V\lambda 3-27$ 、 $V\lambda 3-25$ 、 $V\lambda 2-23$ 、 $V\lambda 3-22$ 、 $V\lambda 3-21$ 、 $V\lambda 3-19$ 、 $V\lambda 2-18$ 、 $V\lambda 3-16$ 、 $V\lambda 2-14$ 、 $V\lambda 3-12$ 、 $V\lambda 2-11$ 、 $V\lambda 3-10$ 、 $V\lambda 3-9$ 、 $V\lambda 2-8$ 、 $V\lambda 4-3$ 及 $V\lambda 3-1$ 。

【0061】 在一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7 或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 及 J λ 7。

【0062】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7 處。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該經改造內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4 或 J κ 5 處。

【0063】 在一些實施例中，嚙齒動物具有一生殖細胞系基因組，其包括經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，包括：

- (a) 一或多個人類 V H 基因片段，
- (b) 一或多個人類 D H 基因片段，以及

(c) 一或多個人類 J_H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、該一或多個人類 D_H 基因片段、及該一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區。

【0064】 在一些實施例中，一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 、 V_H6-1 ，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 及 V_H6-1 。

【0065】 在一些實施例中，一或多個人類 D_H 基因片段包含 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、 D_H6-6 、 D_H1-7 、 D_H2-8 、 D_H3-9 、 D_H3-10 、 D_H5-12 、 D_H6-13 、 D_H2-15 、 D_H3-16 、 D_H4-17 、 D_H6-19 、 D_H1-20 、 D_H2-21 、 D_H3-22 、 D_H6-25 、 D_H1-26 、 D_H7-27 ，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 D_H 基因片段包含 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、 D_H6-6 、 D_H1-7 、 D_H2-8 、 D_H3-9 、 D_H3-10 、 D_H5-12 、 D_H6-13 、 D_H2-15 、 D_H3-16 、 D_H4-17 、 D_H6-19 、 D_H1-20 、 D_H2-21 、 D_H3-22 、 D_H6-25 、 D_H1-26 及 D_H7-27 。

【0066】 在一些實施例中，一或多個人類 J_H 基因片段包含 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H4 、 J_H5 、 J_H6 ，或其任一組合。在一些實施例中，一或多個人類 J_H 基因片段包含 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H4 、 J_H5 及 J_H6 。

【0067】 在一些實施例中，一經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座包括一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中該一或多個人類 V_H 非編碼序列之每一

者，係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 或 V_H6-1 ，以及其中該一或多個人類 V_H 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 或 V_H6-1 。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座係包括一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中該一或多個人類 D_H 非編碼序列之每一者，係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、 D_H6-6 、 D_H1-7 、 D_H2-8 、 D_H3-9 、 D_H3-10 、 D_H5-12 、 D_H6-13 、 D_H2-15 、 D_H3-16 、 D_H4-17 、 D_H6-19 、 D_H1-20 、 D_H2-21 、 D_H3-22 、 D_H6-25 、 D_H1-26 ，或 D_H7-27 ，且其中該一或多個人類 D_H 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、 D_H6-6 、 D_H1-7 、 D_H2-8 、 D_H3-9 、 D_H3-10 、 D_H5-12 、 D_H6-13 、 D_H2-15 、 D_H3-16 、 D_H4-17 、 D_H6-19 、 D_H1-20 、 D_H2-21 、 D_H3-22 、 D_H6-25 、 D_H1-26 ，或 D_H7-27 。在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座係包括一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中該一或多個人類 J_H 非編碼序列之每一者，係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H4 、 J_H5 或 J_H6 ，以及其中一或多個人類 J_H 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H4 、 J_H5 ，或 J_H6 。在一些實施例中，回收的嚙齒動物細胞為 B 細胞。在一些實施例中，衍生自嚙齒動物細胞的細胞為融合瘤。

【0068】 在一些實施例中，編碼人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列，及/或人類 κ 輕鏈可變區序列的核苷酸序列，係得自 B 細胞。

【0069】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座係缺乏功能性內源性嚙齒動物 Adam6 基因。在一些實施例中，嚙齒動物生殖細胞系基因組包括一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段。在一些實施例中，一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、其功能性直向同源物、其功能性同源物或其功能片段係被表現出（例如，於雄性生殖系統細胞，例如睪丸細胞中）。

【0070】 在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之同一染色體上。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座中。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、功能性直系同源物、功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係介於第一人類 V_H 基因片段與第二人類 V_H 基因片段之間。在一些實施例中，第一人類 V_H 基因片段為 V_{H1-2} ，以及第二人類 V_H 基因片段為 V_{H6-1} 。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係位於人類 Adam6 偽基因處。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係取代人類 Adam6 偽基因。在一些實施例中，編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸序列，係介於一人類 V_H 基因片段與一人類 D_H 基因片段之間。

【0071】 在一些實施例中，嚙齒動物為小鼠或大鼠。

【0072】 在一些實施例中，本發明提供一種嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包括同型合子的經改造內源免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包括：

(i) 一或多個人類 V λ 基因片段，其中該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合，

(ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，其中該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合，以及

(iii) 嚙齒動物 C λ 基因；

其中該一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段和該嚙齒動物 C λ 基因，可操作性地相互連接，

其中該嚙齒動物 C λ 基因係位於該內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的嚙齒動物 C κ 基因處，

其中該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包括：

(a) 一或多個人類非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，且其中一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，以及

(b) 一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7，且其中一或多個人類 J κ 非編碼序

列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4，或 J κ 5，以及

其中該免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包括一人類 κ 輕鏈非編碼序列，其介於該一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段之間，其具有一序列，天然出現在介於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類 V κ 4-1 基因片段和人類 J κ 1 基因片段之間。

【0073】 在一些實施例中，嚙齒動物 C λ 基因為小鼠 C λ 1 基因。

【0074】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子 E κ_i 和 E κ_3' 。

【0075】 在一些實施例中，經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括一或多個嚙齒動物 V κ 基因片段，及/或一或多個 J κ 基因片段的刪去。在一些實施例中，經改造內源免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座係包括所有功能性嚙齒動物 V κ 及/或 J κ 基因片段的刪去。

【0076】 在一些實施例中，本發明提供一種嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包括：

(a) 同型合子內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包括一或多個人類 V $_H$ 基因片段、一或多個人類 D $_H$ 基因片段、及一或多個人類 J $_H$ 基因片段，係操作性連結至一或多個內源性免疫球蛋白重鏈恆定區基因，使得該嚙齒動物可表現免疫球蛋白重鏈，每個重鏈包含一人類重鏈可變結構域序列和一嚙齒動物重鏈恆定結構域序列，

(b) 第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包括一或多個人類 V κ 基因片段和一或多個 J κ 基因片段，其可操作地連接至一內源性嚙齒動物 C κ 區域基因，使得該嚙齒動物可表現免疫球蛋白輕鏈，其中每一者包括一人類 κ 輕鏈可變結構域序列，以及一嚙齒動物 κ 輕鏈恆定結構域序列，以及

(c) 第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包括：

(i) 一或多個人類 V λ 基因片段，其中該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、

Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合，

(ii) 一或多個人類 Jλ基因片段，其中該一或多個人類 Jλ基因片段包含 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6、Jλ7，或其任一組合，以及

(iii) 嚙齒動物 Cλ基因；

其中該一或多個人類 Vλ基因片段、該一或多個人類 Jλ基因片段、及該嚙齒動物 Cλ基因，係操作性地互相連結，

其中該嚙齒動物 Cλ基因係位於內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座的嚙齒動物 Cκ基因處，

其中該經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座包括：

(a) 一或多個人類 Vλ非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ非編碼序列之每一者，係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白λ輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，以及

(b) 一或多個人類 Jκ非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列之每一者，係鄰近於經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中一或多個人類 Jκ非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4，或 Jκ5，以及

其中該免疫球蛋白κ輕鏈基因座包括一或多個人類κ輕鏈非編碼序列，其介於一或多個人類 Vλ基因片段與一或多個人類 Jλ基因片

段之間，其具有一序列，天然地出現在介於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類 V κ 4-1 基因片段與人類 J κ 1 基因片段之間；

使得該嚙齒動物可表現免疫球蛋白輕鏈，其中每一輕鏈包含一人類 λ 輕鏈可變結構域序列與一嚙齒動物 λ 輕鏈恆定結構域序列。

【0077】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包括失活的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座。在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物之該失活的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座為異型合子。在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物之該失活的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座為同型合子。

【0078】 在一些實施例中，該嚙齒動物基因組更包括一核酸序列，其編碼與轉錄控制單元操作地連接的外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）。在一些實施例中，該轉錄控制單元包括 RAG1 轉錄控制單元、RAG2 轉錄控制單元、免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。在一些實施例中，編碼外源 TdT 的核酸序列係位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座或 RAG2 基因座上。在一些實施例中，TdT 為人類 TdT。在一些實施例中，TdT 為 TdT 的短同種型（TdT_S）。

【0079】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包含編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其可操作地連接至其生殖細胞系基因組中之一轉錄控制單元，並展現出輕鏈交界多樣性（例如，表現所包含之輕鏈可變結構域）至少 1.2 倍、至少 1.5 倍、至少 1.75 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍，或至少 5 倍的增加，與可比較的小鼠（例如，同窩小鼠）相較，其不包括與其生殖細胞系基因組中的轉錄控制單元操作地連接的外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）。在一些實施例中，交界多樣性係藉由獨特的 CDR3/10,000 讀數來測量。在一些實施例中，交界多樣性係藉由獨特的 CDR3/10,000 讀數來測量。

【0080】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包括編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其可操作地連接至其生殖細胞系基因組中的轉錄控制單元，並且至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、

45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%之由嚙齒動物產生之輕鏈（例如， λ 及/或 κ 輕鏈）具有非模板加入。

【0081】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物為大鼠或小鼠。

【0082】 在一些實施例中，本揭示提供一抗體，經由包括以下步驟的方法製備：

- (a) 提供本文所述的嚙齒動物；
- (b) 以有興趣抗原使該嚙齒動物免疫化；
- (c) 將該嚙齒動物維持在足以使嚙齒動物對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；以及
- (d) 自該嚙齒動物，或嚙齒動物細胞，或衍生自該嚙齒動物細胞的細胞中，回收與有興趣抗原結合的抗體，

其中 (d) 的抗體包括人類重鏈可變結構域和人類 λ 輕鏈可變結構域。

【0083】 在一些實施例中，本揭示提供一抗體，經由包括以下步驟的方法製備：

- (a) 以有興趣抗原使一嚙齒動物免疫化；
- (b) 將該嚙齒動物維持在足以使嚙齒動物對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；以及
- (c) 自該嚙齒動物，或嚙齒動物細胞，或衍生自該嚙齒動物細胞的細胞中，回收與有興趣抗原結合的抗體，

其中 (c) 的抗體包括人類重鏈可變結構域和人類 λ 輕鏈可變結構域。

【0084】 在一些實施例中，嚙齒動物不可偵測地表現內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈可變結構域。在一些實施例中，嚙齒動物不可偵測地表現內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域。

【0085】 在一些實施例中，本文所述的嚙齒動物係與包含一或多個表位的抗原進行免疫反應，而產生 B 細胞群。在一些實施例中，嚙齒動物產生 B 細胞群，其表現與有興趣抗原的一或多個表位結合（例如，特異性結合）的抗體。在一些實施例中，由回應抗原而產生的 B 細胞群表現的抗體包括一具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域的重鏈，及/或一具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼之人類 λ 輕鏈可變結構域的

λ 輕鏈。在一些實施例中，由回應抗原而產生的 B 細胞群所表現之抗體包括 (i) 重鏈，具有由人類重鏈可變區序列編碼的人類重鏈可變結構域，

(ii) λ 輕鏈，其具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的人類 λ 輕鏈可變結構域 (iii) κ 輕鏈，其具有由如本文所述人類 κ 輕鏈可變區序列編碼的人類 κ 輕鏈可變結構域，或 (iv) 其任一組合。

【0086】 在一些實施例中，嚙齒動物產生 B 細胞群，其表現與有興趣抗原的一或多個表位結合的抗體，其中由回應抗原產生的 B 細胞群表現之抗體包括：(i) 重鏈，具有由人類重鏈可變區序列編碼的人類重鏈可變結構域，(ii) λ 輕鏈，其具有由人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的人類 λ 輕鏈可變結構域，如本文所述 (iii) κ 輕鏈，其具有由人類 κ 輕鏈可變區序列編碼的人類 κ 輕鏈可變結構域，如本文所述。

【0087】 在一些實施例中，如本文所述之人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列，及/或人類 κ 輕鏈可變區序列為體細胞高度突變。在一些實施例中，至少約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 之回應於抗原而產生的 B 細胞群的 B 細胞係包括人類重鏈可變區序列、λ 輕鏈可變區序列、及/或體細胞高度突變的 κ 輕鏈可變區序列。

【0088】 在一些實施例中，本發明提供一種製備抗體的方法，包括：

(i) 在宿主細胞中表現編碼一免疫球蛋白重鏈的第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包括一人類重鏈可變區序列；

(ii) 在宿主細胞中表現編碼一免疫球蛋白 λ 輕鏈的第二核苷酸序列，其中該第二核苷酸序列包括一人類 λ 輕鏈可變區序列，其由包含該生殖細胞系基因組的嚙齒動物中辨識出（例如表現及/或分離）：

經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包括：

- (a) 一或多個人類 Vλ 基因片段，
- (b) 一或多個人類 Jλ 基因片段，以及
- (c) 一或多個 Cλ 基因，

其中該一或多個人類 Vλ 基因片段和一或多個人類 Jλ 基因片段，係操作性地連結至該一或多個 Cλ 基因，以及

其中該嚙齒動物在經改造內源性免疫球蛋白 κ 基因座上缺乏一嚙齒動物 C κ 基因；

(iii) 培養該宿主細胞，使得免疫球蛋白輕鏈和免疫球蛋白重鏈可被表現，並形成抗體；以及

(iv) 自該宿主細胞，及/或宿主細胞培養物中取得抗體。

【0089】 在一些實施例中，第一核苷酸序列包括一人類重鏈恆定區。在一些實施例中，抗體為完整人類抗體。

【0090】 在一些實施例中，第二核苷酸包括人類 λ 輕鏈恆定區序列。

【0091】 在一些實施例中，抗體為反式嵌合抗體。在一些實施例中，第一核苷酸序列包括嚙齒動物重鏈恆定區。在一些實施例中，第二核苷酸序列包括嚙齒動物 λ 輕鏈恆定區序列。

【0092】 在一些實施例中，本發明提供一種嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包括：

(a) 第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (i) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
- (iii) C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因區段，係操作性地連結至該 C λ 基因，以及

其中該嚙齒動物在第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 基因座缺乏一嚙齒動物 C κ 基因；以及

(b) 第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，更包括：

- (i) 一或多個人類 V κ 基因片段，以及
- (ii) 一或多個人類 J κ 基因片段，

其中一或多個人類 V κ 基因片段和一或多個人類 J κ 基因片段，係操作性地連結至 C κ 基因。

【0093】 在一些實施例中，C κ 基因為內源性嚙齒動物 C κ 基因。

【0094】 在一些實施例中，嚙齒動物的基因組更包括一核酸序列，其編碼與一轉錄控制單元操作性連接的外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）。

在一些實施例中，該轉錄控制單元包括 RAG1 轉錄控制單元、RAG2 轉錄控制單元、免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。在一些實施例中，編碼外源性 TdT 的核酸序列係位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座，或 RAG2 基因座上。在一些實施例中，TdT 為人類 TdT。在一些實施例中，TdT 為 TdT 的短同種型（TdT_S）。

【0095】 在一些實施例中，該嚙齒動物基因組更包括一核酸序列，其編碼與轉錄控制單元操作性連接的外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）。在一些實施例中，該轉錄控制單元包括 RAG1 轉錄控制單元、RAG2 轉錄控制單元、免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。在一些實施例中，編碼外源性 TdT 的核酸序列位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座或 RAG2 基因座上。在一些實施例中，TdT 為人類 TdT。在一些實施例中，TdT 為 TdT 的短同種型(isoform)（TdT_S）。

【0096】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包括一編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其可操作性地連接至其生殖細胞系基因組中的轉錄控制單元，並展現輕鏈交界多樣性（例如，表現所包含之輕鏈可變結構域）至少 1.2 倍、至少 1.5 倍、至少 1.75 倍、至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍的增加，與可比較的小鼠（例如，同窩小鼠）相較，其不包括操作性連接至其生殖細胞系基因組中的轉錄控制元件之外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）。在一些實施例中，交界多樣性係藉由獨特的 CDR3/10,000 讀數來測量。在一些實施例中，交界多樣性係藉由獨特的 CDR3/10,000 讀數來測量。

【0097】 在一些實施例中，本文描述的嚙齒動物包括編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其可操作地連接至其生殖細胞系基因組中的轉錄控制單元，並且至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、

45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%之由嚙齒動物產生之輕鏈（例如， λ 及/或 κ 輕鏈）具有非模板加入。

【0098】 在各種實施例中，如本文所述的非人類動物、非人類細胞或非人類組織為嚙齒動物、嚙齒動物細胞或嚙齒動物組織；在一些實施例中，為小鼠、小鼠細胞或小鼠組織；在一些實施例中，為大鼠、大鼠細胞或大鼠組織。在一些實施例中，如本文所述的小鼠、小鼠細胞或小鼠組織包含基因背景物，其包括 129 品系、BALB/c 品系、C57BL/6 品系、混合的 129xC57BL/6 品系，或其組合。

【圖式簡單說明】

【0099】 本文包括的附圖由下列附圖組成，僅用於說明目的而不是用於限制。

【0100】 圖 1A 與 1B 顯示用於產生本發明嚙齒動物之一實施例的靶向載體的建構策略（描述於實例 1.1）的例示性實施例，未按照比例。

【0101】 圖 2A 顯示一例示性實施例圖示，說明靶向載體（在實施例 1.1 中描述）插入嚙齒動物胚胎幹細胞（ES）複製株的經改造 Ig κ 輕鏈基因座中，但未按比例繪製，其中 ES 細胞複製株用於產生本發明之一實施例。

【0102】 圖 2B 顯示在經改造 Ig κ 輕鏈基因座中，重組酶介導的篩選卡匣移除（由插入目標載體（描述於實例 1.1），未按比例繪製，用於產生本發明之嚙齒動物之例示性實施例示意圖。

【0103】 圖 3 顯示用於產生本發明嚙齒動物之一實施例的靶向載體的建構策略（描述於實例 1.2 中）的例示性實施例，未按照比例繪製。

【0104】 圖 4A 顯示一示意圖，說明靶向載體（在實施例 1.2 中描述）中插入嚙齒動物胚胎幹細胞（ES）複製株的經改造 Ig κ 輕鏈基因座中，但未按比例繪製，其中 ES 細胞複製株用於產生本發明之嚙齒動物。

【0105】 圖 4B 為一例示性實施例示意圖，顯示在經改造 Ig κ 輕鏈基因座中，由插入目標載體而導致之重組酶介導的篩選卡匣移除（描述於實例 1.2），未按比例繪製，用於產生本發明之嚙齒動物實施例。

【0106】 圖 5 顯示本發明代表性實施例得到的結果，顯示從野生型（WT）和 6558 HO（LiK，同型合子）小鼠取得的代表性單細胞-閼骨髓，頂行顯示 CD19（y 軸）和 CD3（x 軸）的表現，底行表示表現有免疫球蛋白 D（IgD、y-軸）與免疫球蛋白 M（IgM、x-軸）之 CD19⁺-閼脾細胞。

【0107】 圖 6 顯示本發明代表性實施例得到的結果，包括從野生型（WT）和 6558HO（LiK，同型合子）小鼠取得的代表性單細胞-閼骨髓，頂行顯示 CD19（y 軸）和 CD3（x 軸）的表現，底行表示免疫球蛋白 M（IgD，y 軸）和 B220（x 軸）的表現。

【0108】 圖 7 顯示本發明代表性實施例得到的結果，包括由野生型（WT）和 6558HO（LiK，同型合子）小鼠取得的代表性 CD19⁺-閼脾細胞，說明含有小鼠 Igλ（y 軸）或小鼠 Igκ（x 軸）恆定區的免疫球蛋白輕鏈的表現。

【0109】 圖 8 顯示本發明的代表性實施例得到的結果，包括從各種指定的人源化小鼠取得的代表性單細胞-閼脾細胞，說明 CD19（y 軸）和 CD3（x 軸）的表現。HOH/LiK/λ^{-/-}小鼠 - 一種人源化免疫球蛋白重鏈同型合子小鼠（請參見，例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940），對於 LiK 基因座是同型合子，且對於失活的內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座是同型合子；以及 HOH/KoK/LiK/λ^{-/-}小鼠 - 一種人源化免疫球蛋白重鏈同型合子小鼠（請參見，例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940），對於包含 LiK 基因座之 kappa 基因座，和包含人源化免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之第二 κ 基因座而言為半合子，且對於失活的內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座而言為同型合子；HOH/KoK 小鼠 - 對照組小鼠，對人源化免疫球蛋白重鏈而言為同型合子，且對人源化免疫球蛋白 κ 輕鏈而言為同型合子。

【0110】 圖 9 顯示由本發明代表性實施例得到的結果，包括從各種指定的人源化小鼠取得的代表性 CD19⁺-閼脾細胞，說明含有小鼠 Igλ（y-軸）或小鼠 Igκ（x-軸）恆定區的免疫球蛋白輕鏈的表現。

【0111】 圖 10 顯示由本發明代表性實施例得到的結果，包括從各種指定的人源化小鼠取得的代表性單細胞-閼骨髓中，說明免疫球蛋白 M（IgD，y-軸）和 B220（x 軸）的表現。

【0112】 圖 11 顯示由本發明代表性實施例得到的結果，包括從各種指定的人源化小鼠取得的代表性單細胞-骨髓中，說明含有小鼠 Igλ (y-軸) 或小鼠 Igκ (x-軸) 恆定區的免疫球蛋白輕鏈之表現，於未成熟（頂行）和成熟（底行）B 細胞中。

【0113】 圖 12 顯示本發明的例示性實施例示意圖，其不按比例繪製，顯示本文所述的經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座和重排基因座，以形成一 mRNA 分子。

【0114】 圖 13 顯示本發明代表性實施例的結果，包括使用由野生型（WT）和 6558 同型合子（LiK HO）小鼠中分離出的血清之代表性 SDS-PAGE 蛋白質免疫墨漬法（西方墨漬法），如實例 3.3 中所述。

【0115】 圖 14 顯示本發明實施例的測試結果，顯示從人源化小鼠取得的代表性單細胞-脾細胞中，說明 CD19 (y 軸) 和 CD3 (x 軸) 的表現。HOH/LiK/λ^{-/-}/TdT 小鼠 - 一種人源化免疫球蛋白重鏈同型合子小鼠（請參見，例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940），對於 LiK 基因座是同型合子，且對於失活的內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座是同型合子，其包括一核酸序列，其編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）；以及和 HOH/KoK/LiK/λ^{-/-}/TdT 小鼠 - 一種人源化免疫球蛋白重鏈同型合子小鼠（請參見，例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940），對於包含 LiK 基因座之 kappa 基因座，和包含人源化免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之第二 κ 基因座而言為半合子，且對於失活的內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座(其包括編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列)而言為同型合子。

【0116】 圖 15 顯示本發明實施例的測試結果，顯示從各種指定的人源化小鼠取得的代表性 CD19⁺-脾細胞，說明含有小鼠 Igλ (y-軸) 或小鼠 Igκ (x-軸) 的恆定區的免疫球蛋白輕鏈的表現。

【0117】 圖 16 顯示本發明實施例的測試結果，顯示從各種指定的人源化小鼠取得的代表性單細胞-骨髓，說明免疫球蛋白 M (IgM, y 軸) 和 B220 (x-軸) 的表現。

【0118】 圖 17 顯示本發明實施例的測試結果，顯示從各種指定的人源化小鼠取得的代表性單細胞-骨髓，說明含有小鼠 Igλ(y-軸)或小鼠 Igκ(x-

軸)的免疫球蛋白輕鏈的表現，於未成熟（頂行）和成熟（底行）B細胞中。

【0119】 圖 18 顯示本發明實施例的測試結果，顯示使用蛋白質免疫原免疫化後，LiK/VI-3、LiK/VI-3/TdT 與 VI-3/TdT 小鼠品系的免疫反應比較圖。

【0120】 圖 19 顯示本發明實施例之測試結果，顯示使用與 HIS 標籤融合之不相關蛋白抗原進行免疫化後，LiK/VI-3、LiK/VI-3/TdT 與 VI-3/TdT 小鼠品系中，針對 His 標籤的免疫反應比較圖。

【0121】 圖 20 顯示內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座一部分之圖示，未按比例繪製。圖 20 包括第一箭頭，指向內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的第一例示性內源性人類 V λ 非編碼序列的代表。如圖所示，內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的第一例示性內源性人類 V λ 非編碼序列（由線條表示），係天然地出現在內源性人免疫球蛋白 Ig λ 輕鏈基因座中的人類 V λ 3-12 基因片段附近（由深灰色方塊表示）和人類 V λ 2-11 基因片段（由深灰色方塊表示）附近。圖 20 亦包括第二箭頭，其指向內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的第二例示性內源性人類 V λ 編碼序列的代表。如圖所示，內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的第二例示性內源性人類 V λ 非編碼序列（由線條表示），天然地出現在內源性人免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的人類 V λ 2-11 基因片段（由深灰色方塊表示）附近，和人類 V λ 3-10 基因片段（由深灰色方塊表示）附近。

【0122】 圖 21 顯示內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的一部分圖示，未按比例繪製。圖 21 包括第一箭頭，指向內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之第一例示性內源性人類 J κ 非編碼序列的代表。如圖所示，內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中的第一例示性內源性人類 J κ 非編碼序列（由線條表示），天然地出現在內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類 J κ 1 基因片段（由深灰色方塊表示）附近，和人類 J κ 2 基因片段（由深灰色方塊表示）附近。圖 21 亦包括第二箭頭，其指向內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中的第二例示性內源性人類 J κ 非編碼序列的代表。如圖所示，內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中的第二例示性內源性人類 J κ

非編碼序列（以線條表示），係天然地出現在內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類 J κ 2 基因片段（由深灰色方塊表示）附近，和人類 J κ 3 基因片段（由深灰色方塊表示）附近。

序列表中選定序列的簡要說明

【0123】 以下是小鼠、大鼠或人類 λ 基因的各種免疫球蛋白恆定區的代表性核酸和胺基酸序列。免疫球蛋白基因的核酸序列和多胜肽的基酸序列，可得自國際免疫遺傳學信息系統網站 www.imgt.org。

【0124】 小鼠 C λ 1 DNA (SEQ ID NO:1):
GCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCTGTTTCCACCTTCCTCTG
AAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGAT
TTCTACCCAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCC
TGTCACTCAGGGTATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACA
ACAAGTACATGGCTAGCAGCTACCTGACCCTGACAGCAAGAGCATG
GGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACTCATGAAGGTCAC
ACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGACTGTTCC

【0125】 小鼠 C λ 1 胺基酸(SEQ ID NO:2):
GQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVT
QGMETTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVT
HEGHTVEKSLSRADCS

【0126】 小鼠 C λ 2 DNA (SEQ ID NO:3):
GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTCACCGTGTTCACCTTCCTCTG
AGGAGCTCAAGGAAAACAAAGCCACACTGGTGTGTCTGATTTCCAAC
TTTTCCCCGAGTGGTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTACACC
TATCACCCAGGGTGTGGACACTTCAAATCCCACCAAAGAGGGCAACA
AGTTCATGGCCAGCAGCTTCCTACATTTGACATCGGACCAGTGGAGA
TCTCACAACAGTTTTACCTGTCAAGTTACACATGAAGGGGACACTGT
GGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTCTC

【0127】 小鼠 C λ 2 胺基酸(SEQ ID NO:4):

GQPKSTPTLTVFPPSSEELKENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPITQ
GVDTSNPTKEGNKFMASFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDTVEKSLS
PAECL

【0128】 小鼠 Cλ3 DNA (SEQ ID NO:5):

GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACCATGTTTCCACCTTCCCCTG
AGGAGCTCCAGGAAAACAAAGCCACACTCGTGTGTCTGATTTCCAAT
TTTTCCCCAAGTGGTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTACACC
TATCACCCAGGGTGTGGACACTTCAAATCCCACCAAAGAGGACAACA
AGTACATGGCCAGCAGCTTCTTACATTTGACATCGGACCAGTGGAGA
TCTCACAACAGTTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGGACACTGT
GGAGAAGAGTCTGTCTC CTGCAGAATG TCTC

【0129】 小鼠 Cλ3 胺基酸 (SEQ ID NO:6):

GQPKSTPTLTMFPPSPEELQENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPIT
QGVDTSNPTKEDNKYMASSF LHLTSDQWRSHNSFTCQVTH
EGDTVEKSLSPAEC

【0130】 大鼠 Cλ1 DNA (SEQ ID NO:7):

GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCACCTTCAACTG
AGGAGCTCCAGGGAAACAAAGCCACACTGGTGTGTCTGATTTCTGAT
TTCTACCCGAGTGATGTGGAAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTGCACC
TATCTCCCAGGGTGTGGACACTGCAAATCCCACCAAACAGGGCAACA
AATACATCGCCAGCAGCTTCTTACGTTTGACAGCAGAACAGTGGAGA
TCTCGCAACAGTTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGAACACTGT
GGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAATGTGTC

【0131】 大鼠 Cλ1 胺基酸 (SEQ ID NO:8):

GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAWKANGAPIS
QGVDTANPTKQGNKYIASSFLRLTAEQWRSRNSFTCQVTHEGNTVEKSL
SPAECV

【0132】 大鼠 Cλ2 DNA (SEQ ID NO:9):

ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCTGTTCCCACCTTCCTCTG
AAGAGCTCAAGACTGACAAGGCTACACTGGTGTGTATGGTGACAGAT
TTCTACCCTGGTGTATGACAGTGGTCTGGAAGGCAGATGGTACCCC
TATCACTCAGGGTGTGGAGACTACCCAGCCTTTCAAACAGAACACA
AGTACATGGCTACCAGCTACCTGCTTTTGACAGCAAAAGCATGGGAG
ACTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCCTCACGAAGAGAACACTGT
GGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGAGTGTTCC

【0133】 大鼠 Cλ2 胺基酸(SEQ ID NO:10):

DQPKATPSVTLFPPSSEELKTDKATLVCMVTDYFPGVMTVVWKADGTPI
TQGVETTQPFKQNNKYMATSYLLLTAKAWETHSNYSCQVTHEENTVEK
SLSRAECS

【0134】 大鼠 Cλ3 DNA (SEQ ID NO:11):

GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCACCTTCAACTG
AGGAGCTCCAGGGAAACAAAGCCACACTGGTGTGTCTGATTTCTGAT
TTCTACCCGAGTGATGTGGAAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTGCACC
TATCTCCCAGGGTGTGGACACTGCAAATCCCACCAAACAGGGCAACA
AATACATCGCCAGCAGCTTCTTACGTTTGACAGCAGAACAGTGGAGA
TCTCGCAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGAACACTGT
GGAAAAGAGTCTGTCTCCTGCAGAGTGTGTC

【0135】 大鼠 Cλ3 胺基酸(SEQ ID NO:12):

GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAWKANGAPIS
QGVDATANPTKQGNKYIASSFLRLTAEQWRSRNSFTCQVTHEGNTVEKSL
SPAECV

【0136】 大鼠 Cλ4 DNA (SEQ ID NO:13):

ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCTGTTCCCACCTTCCTCTG
AAGAGCTCAAGACTGACAAGGCTACACTGGTGTGTATGGTGACAGAT
TTCTACCCTGGTGTATGACAGTGGTCTGGAAGGCAGATGGTACCCC
TATCACTCAGGGTGTGGAGACTACCCAGCCTTTCAAACAGAACACA
AGTACATGGCTACCAGCTACCTGCTTTTGACAGCAAAAGCATGGGAG

ACTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCACGACGAAGAGAACAACACTGT
GGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTGAGTGTTC

【0137】 大鼠 Cλ4 胺基酸(SEQ ID NO:14):

DQPKATPSVTFLPPSSEELKTDKATLVCMVTDFYPGVMTVVWKADGTPI
TQGVETTQPFKQNNKYMATSLLLLTAKAWETHSNYSCQVTHEENTVEK
SLSRAECS

【0138】 人類 Cλ1 DNA (SEQ ID NO:15):

CCCAAGGCCAACCCACGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGA
GCTCCAAGCCAACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCT
ACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGT
CAAGGCGGGAGTGGAGACGACCAAACCCTCCAAACAGAGCAACAAC
AAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCAGCAGTGGA
AGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCAC
CGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCATAG

【0139】 人類 Cλ1 胺基酸(SEQ ID NO:16):

PKANPTVTFLPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA
GVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

【0140】 人類 Cλ2 DNA (SEQ ID NO:17):

GTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACCTCTGTTCCCGCCCTCCTCTG
AGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGAC
TTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCTTGGAAGCAGATAGCAGCCC
CGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCAACCCTCCAAACAAAGCAAC
AACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTG
GAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGC
ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

【0141】 人類 Cλ2 胺基酸(SEQ ID NO:18):

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPTECS

【0142】 人類 Cλ3 DNA (SEQ ID NO:19):

CCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCACCCTCCTCTGAGGAG
CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTA
CCCGGGAGCCGTGACAGTTGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTC
AAGGCGGGGGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACA
AGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAA
GTCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACC
GTGGAGAAGACAGTTGCCCCCTACGGAATGTTCATAG

【0143】 人類 Cλ3 胺基酸(SEQ ID NO:20):

PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
GVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

【0144】 人類 Cλ6 DNA (SEQ ID NO:21):

GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCATCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCT
GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGCCTGATCAGTGA
CTTCTACCCGGGAGCTGTGAAAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCC
CCGTCAACACGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAGAGCAA
CAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGT
GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAATGTTCATAG

【0145】 人類 Cλ6 胺基酸(SEQ ID NO:22):

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKADGSPVN
TGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPAECS

【0146】 人類 Cλ7 DNA (SEQ ID NO:23):

GTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCACCCTCCTCTG
 AGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCGTAAGTGAC
 TTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCC
 CGTCAAGGTGGGAGTGGAGACCACCAAACCCTCCAAACAAAGCAAC
 AACAAGTATGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCAGCAGT
 GGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCGGGTACGCATGAAGGGAG
 CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAATGCTCT

【0147】 人類 Cλ7 胺基酸(SEQ ID NO:24):

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVK
 VGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTVEKT
 VAPAECS

定義

【0148】 本發明的範圍由所附申請專利範圍限定，且不受本文描述的某些實施例的限制。閱讀本說明書的本領域技術人員將意識到各種修飾可等同於本文描述的實施例，或落於申請專利範圍的範疇內。通常，除非另有明確說明，否則本文使用的術語與本領域中理解的含義一致。下面提供了某些術語的明確定義；本領域技術人員從上下文中將清楚本說明書中特定例子中的這些和其他術語的含義。在整份說明書中闡述了以下和其他術語的額外定義。本說明書中引用的專利和非專利參考文獻或其相關部分，係經由引用整體併入本文。

【0149】 在申請專利範圍中使用如“第一”、“第二”、“第三”等的序數術語來修飾申請要素本身，並不意味著此申請要素優先於另一者，或有時間上的任何優先、前列或方法進行順序，僅用作標示，以將具有特定名稱的申明要素與具有相同名稱的另一要素區分（但用於使用序數術語），以區分這些申請要素。

【0150】 在本申請書中使用的術語“約”和“近似”係為等效用語。本申請書中使用的任何數字，無論是否約為或近似，都意味著涵蓋相關領域普通技術人員所理解的任何正常波動。

【0151】 除非明確相反地指出，否則說明書和申請專利範圍中的冠詞“一(a)”和“一個(an)”應理解為包括複數指示物。如果群組中的一個、多於一個或所有群組成員，在所提及的產品或方法中，存在、使用或以其他方式相關，則認為滿足包括群組中一或多個成員之間的“或”的申明或描述，除非另有說明是相反的或從上下文中顯而易見。本發明包括此類實施例，其中該群組的恰好一個成員在所提及的產品或方法中存在、使用或以其他方式相關。本發明亦包括其中大於一個或全部群組成員，在提及的產品或方法中存在、使用或以其他方式相關。此外，應該理解，本發明涵蓋所有變化、組合和置換，其中來自所列請求項中的一或多個限制、要素、條款、描述性術語等，基於相同的基本請求項（或相關的，任何其他請求項）而被引入另一個請求項，除非另有說明或者除非本領域普通技術人員明白會出現矛盾或不一致。在將要素以列表（例如，以馬庫什群組(Markush group)或類似格式）呈現的情況下，應當理解，每一子群組亦被揭示，並且可以從群組中移除任一要素。應當理解，通常，在本發明或本發明態樣中提及包括特定元件、特徵等情況下，本發明的某些實施例或本發明態樣係由或基本上由這些元素、功能等組成。出於簡化目的，這些實施例並未在本文中以此多的詞語具體闡述。亦應理解，無論是否在說明書中敘述了特定排除，本發明的任何實施例或態樣都可以明確地從權利要求中排除。

【0152】 **投予**：如本文所用，包括向個體或系統（例如，細胞、器官、組織、生物體或其相關成分或其成分群）投予一組成物。本領域技術人員將理解，投予途徑可根據例如投予組合物的個體或系統、組成物性質、投藥目的等而變化。例如，在某些實施例中，對動物個體（例如，對人類或嚙齒動物）的投藥可為支氣管（包括經由支氣管滴注）、口腔、腸內、皮間、動脈內、皮內、胃內、髓內、肌肉內、鼻內、腹膜內、鞘內、靜脈注射、心室內、黏膜、鼻腔、口腔、直腸、皮下、舌下、局部，氣管（包括經由氣管內滴注）、經皮、陰道，及/或玻璃體。在一些實施例中，投藥可包括間歇投藥。在一些實施例中，投藥可包括連續投藥（例如，灌注）至少選定的一段時間。

【0153】 **改善**：如本文所用，包括一狀態的預防、減輕或緩和，或個體狀態的改善。減輕包括但不需要完全恢復或完全預防疾病、病症或病症。

【0154】 **大約**：應用於一或多個有興趣的數值，包括與所述參考值類似的數值。在某些實施例中，術語“近似”或“約”是指落入所述參考值的 $\pm 10\%$ 內（大於或小於）的範圍，除非另有說明，或從上下文中顯而易見的數值（除非此類數字超過可能值的 100%）。

【0155】 **具生物活性**：如本文所用，是指在生物系統中、體外或活體內（例如，生物體內），具有活性的任何試劑特性。例如，當存在於生物體內時，在該生物體內具有生物學效應的試劑被認為具有生物活性。在特定實施例中，其中蛋白質或多肽具有生物活性，共享蛋白質或多肽的至少一生物活性的蛋白質或多肽之一部分通常稱為“具生物活性的”部分。

【0156】 **可比較**：如本文所用，是指二或更多個試劑、實體、情況、條件組等，它們可能彼此不相同但足夠相似，以允許它們之間進行比較，使其可根據觀察到的差異性或相似性合理地得出結論。在上下文中，本領域普通技術人員將理解，在任何特定情況下，要認為二或更多個此類試劑、實體、情況、條件組等是可比較的，需要某種程度的等同性。

【0157】 **保守性**：如本文所用，是指描述保守性胺基酸取代的實例，包括以具有相似化學性質（例如，電荷或疏水性）的側鏈 R 基團之另一胺基酸殘基，取代一胺基酸殘基。一般而言，保守性胺基酸取代基本上不會改變蛋白質的有興趣功能特性，例如，受器與配位基結合的能力。具有相似化學性質的側鏈之胺基酸群組實例包括：脂肪族側鏈如甘胺酸（Gly，G）、丙胺酸（Ala，A）、纈胺酸（Val，V）、亮胺酸（Leu，L），以及異亮胺酸（Ile，I）；脂肪族羥基側鏈，如絲胺酸（Ser，S）和蘇胺酸（Thr，T）；含醯胺的側鏈，如天冬醯胺（Asn，N）和麩胺醯胺（Gln，Q）；芳香族側鏈，如苯丙胺酸（Phe，F）、酪胺酸（Tyr，Y）和色胺酸（Trp，W）；鹼性側鏈，如離胺酸（Lys，K）、精胺酸（Arg，R）和組胺酸（His，H）；酸性側鏈，如天冬胺酸（Asp，D）和麩胺酸（Glu，E）；以及含硫側鏈，如半胱胺酸（Cys，C）和甲硫胺酸（Met，M）。保守性胺基酸取代基包括，例如纈胺酸/亮胺酸/異亮胺酸（Val/Leu/Ile，V/L/I）、

苯丙胺酸/酪胺酸 (Phe/Tyr, F/Y)、離胺酸/精胺酸 (Lys/Arg, K/R)、丙胺氨酸/纈胺酸 (Ala/Val, A/V)、麩胺酸/天冬胺酸 (Glu/Asp, E/D), 以及天冬醯胺/麩胺醯胺 (Asn/Gln, N/Q)。在一些實施例中, 保守性胺基酸取代可為以丙胺酸取代蛋白質中的任何天然殘基, 例如用於丙氨酸掃描式突變。在一些實施例中, 係進行保守性取代, 其在 PAM250 對數機率矩陣(PAM250 log-likelihood matrix)中具正數值, 如 Gonnet, G.H.等人, 1992, Science 256:1443-1445 所揭示, 該文獻以引用的方式整體併入本文。在一些實施例中, 取代為中度保守性取代, 其中該取代在 PAM250 對數機率矩陣中具有非負值。

【0158】 **對照組**: 如本文所使用的, 是指“對照”的文義理解含義, 其為比較結果的標準。通常, 對照組用於藉由分離出變數來增強實驗中的完整性, 以便得出關於這些變數的結論。在一些實施例中, 對照組是與測試反應或試驗同時進行, 以提供比較物的反應或試驗。“對照組”亦包括“對照組動物。”“對照組動物”可具有如本文所述的修飾、不同於本文所述的修飾, 或無修飾 (即野生型動物)。在一實驗中, 係進行“測試” (即, 正在測試的變數)。在第二個實驗中, “對照組”, 未使用正在測試的變數。在一些實施例中, 對照組是歷史性對照 (即, 先前進行的測試或試驗, 或先前已知的數量或結果)。在一些實施例中, 對照組為或包括列印出或以其他方式保存的記錄。對照組可為陽性對照組或陰性對照組。

【0159】 **破壞**: 如本文所使用, 是指與 DNA 分子進行同源重組事件的結果 (例如, 具有內源性同源序列, 例如基因或基因座)。在一些實施例中, 破壞可實現或代表 DNA 序列的插入、刪去、取代、置換、錯義突變或移框, 或其任一組合。插入可包括插入完整基因或基因片段, 例如外顯子, 其可為非內源性序列的來源 (例如, 異源性序列)。在一些實施例中, 破壞可增加基因或基因產物 (例如由一基因編碼的多胜肽) 的表現及/或活性。在一些實施例中, 破壞可降低基因或基因產物的表現及/或活性。在一些實施例中, 破壞可改變基因或經編碼的基因產物 (例如, 經編碼的多胜肽) 的序列。在一些實施例中, 破壞可截短或片段化一基因或經編碼的基因產物 (例如, 經編碼的多胜肽)。在一些實施例中, 破壞可延伸一基因

或經編碼的基因產物。在一些此類實施例中，破壞可實現融合多胜肽的組裝。在一些實施例中，破壞可能影響基因或基因產物的含量，但不影響活性。在一些實施例中，破壞可能影響基因或基因產物的活性，但不影響含量。在一些實施例中，破壞可能對基因或基因產物的含量沒有顯著影響。在一些實施例中，破壞可能對基因或基因產物的活性沒有顯著影響。在一些實施例中，破壞可能對基因或基因產物的含量或活性沒有顯著影響。

【0160】 測定、測量、評價、評估、試驗與分析：在本文中可互換使用，以指稱任何形式的測量，並包括測定一要素是否存在。這些術語包括定量及/或定性測定。試驗可為相對性或絕對性。“試驗其存在”可決定某物存在的量，及/或確定它是否存在。

【0161】 內源性啟動子：如本文所用，係指與內源性基因天然相關的啟動子，例如在野生型生物中。

【0162】 經改造：如本文所用，一般指的是人為操縱的態樣。例如，在一些實施例中，當二或更多個序列並非以天然順序連接在一起，而是以人為操縱直接與經改造多核苷酸連結時，一多核苷酸便被視為“經改造的”。在一些實施例中，經改造多核苷酸可包含在自然界中發現的調控序列，其與第一編碼序列操作性連接但不與第二編碼序列操作性連接，其可藉由人為連接，使其操作性地與第二編碼序列連結。此外，或額外地，在一些實施例中，各自編碼自然界中彼此不連接的多胜肽單元或結構域的第一和第二核酸序列，可在單一經改造多核苷酸中互相連接。相較之下，在一些實施例中，如果細胞或生物體已被操作，使其基因信息被改變（例如，先前未存在的新基因物質已被引入，或者，先前存在的基因物質已被改變或移除），則可被認為是“經改造的”。如本領域普通技術人員所理解的，經改造多核苷酸或細胞的後代通常仍被稱為“經改造的”，即使實際操作是在先前實體上進行。此外，如本領域技術人員將理解的，可使用各種方法，其可以實現如本文所述的“改造化”。例如，在一些實施例中，“改造化”可涉及藉由使用電腦系統程式執行分析或比較來篩選或設計（例如，核酸序列、多胜肽序列、細胞、組織，及/或生物體），或以其他方式分析、建議，及/或篩選序列、改變等）。此外，或額外地，在一些實施例中，“改

造化”可涉及使用體外化學合成方法，及/或重組核酸技術，例如核酸倍增（例如，經由聚合酶連鎖反應）雜交、突變、轉化、轉染等，及/或各種經控制配對法之任一者。如本領域技術人員所理解的，多種已建立的此類技術（例如，用於重組 DNA、寡核苷酸合成、組織培養和轉化（例如，電穿孔、脂質轉染等））為本領域熟知，且描述於本說明書中引用，及/或討論的各種一般和更特定之參考文獻中。請見如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 及 *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Manipulation*, 第五版, Old, R.W. 及 S.B. Primrose 編, Blackwell Science, Inc., 1994, 經由引用整體併入本文。

【0163】 具功能性：如本文所用，是指具有特定性質（例如，形成編碼序列的一部分）及/或活性的實體（例如，基因或基因區段）之一形式或片段。例如，在免疫球蛋白的情況下，可變區係由獨特的基因片段（即 V、D 及/或 J）編碼，該基因片段被組裝（或重組），以形成功能性編碼序列。當存在於基因組中時，基因片段以聚集物形式組織，儘管確實發生了變化。“功能性”基因片段是在表現序列（即可變區）中表示的基因片段，其中相對應的基因組 DNA 已被分離出（即複製），並經定序辨識出。一些免疫球蛋白基因片段序列包含開放閱讀框，且被認為具功能性，儘管未在表現庫中存在，而其他免疫球蛋白基因片段序列則包含導致終止密碼子的突變（例如點突變、插入、刪去等），及/或截短序列，其隨後使得此類基因片段序列無法發揮與非突變序列相關的特性，及/或活性。這些序列不以表現序列存在，因此歸類為偽基因。

【0164】 基因：如本文所用，是指染色體中編碼一產物（例如 RNA 產物及/或多肽產物）的一段 DNA 序列。在一些實施例中，基因包括編碼序列（即編碼特定產物的序列）。在一些實施例中，基因包括非編碼序列。在一些特定的實施例中，基因可包括編碼（例如，外顯子）和非編碼（例如，內含子）序列。在一些實施例中，基因可包括一或多個調節序列（例如，啟動子、增強子等），及/或內含子序列，例如，其可以控制或影響基因表現的一或多個態樣（例如，細胞類型-特異性表現、誘導型表達等）。

為了清楚起見，我們注意到，如在本發明中使用的，術語“**基因**”通常是指編碼一多胜肽或其片段之核酸的一部分；該術語可任擇地包括調控序列，本領域普通技術人員將由上下文而清楚。該定義並非排除將術語“**基因**”應用於非-蛋白質-編碼表現單元，而是澄清在大多數情況下，本文中使用的術語係指編碼多胜肽的核酸。

【0165】 異源性：如本文所用，是指來自不同來源的試劑或實體。例如，當用於指稱存在於特定細胞或生物體中的多胜肽、基因或基因產物時，該術語闡明了相關的多胜肽、基因或基因產物：1) 由人工製造；2) 經由人工（例如，藉由基因工程）導入細胞或生物體（或其前體）；及/或 3) 並非由相關細胞或生物體（例如，相關細胞類型或生物體類型）天然產生或存在。“**異源性**”亦包括正常存在於特定天然細胞或生物體中的多胜肽、基因或基因產物，但已被改變或修飾，例如，藉由在非天然相關控制下的突變或置入，且在一些實施例中，為非內源性調控單元（例如，啟動子）。

【0166】 宿主細胞：如本文所用，是指已導入核酸或蛋白質的細胞。本領域技術人員閱讀本揭示內容時將理解，這些術語不僅指稱特定的個體細胞，亦用於指稱此類細胞的後代。由於突變或環境影響可能會在後代中發生某些修飾，因此這些後代實際上可能與親代細胞不同，但仍包含在術語“**宿主細胞**”的範圍內。在一些實施例中，宿主細胞為或包含原核或真核細胞。通常，宿主細胞是適合接受及/或產生異源核酸或蛋白質的任何細胞，不論細胞屬於生命界中的哪一界。例示性細胞包括原核生物和真核生物（單細胞或多細胞）、細菌細胞（例如，大腸桿菌(*Escherichia coli*)、芽孢桿菌屬(*Bacillus spp.*)、鏈黴菌屬(*Streptomyces spp.*)等）、分枝桿菌細胞、真菌細胞、酵母細胞（例如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、嗜甲醇酵母(*Pichia pastoris*)、甲醇酵母(*Pichia methanolica*)等）、植物細胞、昆蟲細胞（例如 SF-9、SF-21、桿狀病毒感染的昆蟲細胞、粉紋夜蛾等）、非人類動物細胞、人類細胞或細胞融合物，例如，融合瘤或四倍體。在一些實施例中，細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在一些實施例中，細胞為真核細胞並選自於下列細胞：CHO (如 CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS (如

COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎細胞(如 HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60、(e.g.、BHK21)、Jurkat、Daudi、A431 (epidermal)、CV-1、U937、3T3、L cell、C127 cell、SP2/0、NS-0、MMT 060562、支持細胞、BRL 3A 細胞、HT1080 細胞、骨髓瘤細胞、腫瘤細胞和衍生自上述細胞的細胞株。在一些實施例中，細胞包含一或多個病毒基因，例如表現病毒基因的視網膜細胞（例如，PER.C6® 細胞）。在一些實施例中，宿主細胞為或包含分離的細胞。在一些實施例中，宿主細胞為組織的一部分。在一些實施例中，宿主細胞為生物體的一部分。

【0167】 等同度：與本文序列比較結合使用，於此係指經由本領域已知的可用於決定核苷酸及/或胺基酸序列等同度的數種不同演算法而確定的等同度。在一些實施例中，使用 ClustalW v.1.83（慢）比對決定本文所述的等同度，使用 10.0 的開放空位罰分、0.1 的延伸空位罰分，以及使用 Gonnet 相似度矩陣（MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008）。

【0168】 替代：如本文所用，是指位置性取代，其中第一核酸序列位於染色體中第二核酸序列的位置上（例如，其中該第二核酸序列先前（例如，最初）位於染色體中，例如，位於第二核酸序列的內源性基因座上）。術語“替代”並非必須自例如基因座或染色體中移除第二核酸序列。在一些實施例中，該第二核酸序列和該第一核酸序列彼此可比較，例如，第一和第二序列彼此同源，含有相對應的單元（例如，蛋白質編碼單元、調節單元等），及/或具有相似或等同的序列。在一些實施例中，第一及/或第二核酸序列包括一或多個啟動子、增強子、剪接供體位點、剪接受體位點、內含子、外顯子、未轉譯區（UTR）；在一些實施例中，第一及/或第二核酸序列包括一或多個編碼序列。在一些實施例中，第一核酸序列為第二核酸序列的同源物或變異體（例如，突變體）。在一些實施例中，第一核酸序列為第二序列的直向同源物或同源物。在一些實施例中，第一核酸序列為或包含人類核酸序列。在一些實施例中，包括其中第一核酸序列為或包含一人類核酸序列，第二核酸序列為或包含一嚙齒動物序列（例如，小鼠或大鼠序列）。在一些實施例中，包括其中第一核酸序列為或包含一人類核

酸序列，第二核酸序列為或包含一人類序列。在一些實施例中，第一核酸序列為第二序列的變異體或突變體（即，與第二序列相較，其含有一或多個序列差異(例如取代)的序列）。如此配置的核酸序列可包括一或多個調控序列，其為用於獲得如此配置的序列之來源核酸序列的一部分（例如，啟動子、增強子、5'-或 3'-非轉譯區等）。例如，在各實施例中，第一核酸序列是以一異源性序列取代一內源性序列，而導致如此配置（包含該異源性序列）的核酸序列可製造基因產物，但不表現內源性序列；第一核酸序列具有內源基因組序列，其具有編碼一多胜肽的核酸序列，該多胜肽具有與由內源性序列編碼的多胜肽相似的功能（例如，該內源性基因組序列編碼非人類可變區多胜肽(全部或部分)，以及該 DNA 片段編碼一或多個人類可變區多胜肽(全部或部分)）。在各實施例中，人類免疫球蛋白基因區段或其片段，係位於一內源性非人類免疫球蛋白基因區段或片段處。

【0169】 **體外**：如本文所用，是指在人為環境中發生的事件，例如在試管或反應容器中、在細胞培養物中等，而不是在多細胞生物體內。

【0170】 **活體內**：如本文所用，是指在多細胞生物體內發生的事件，例如人類及/或非人類動物。在細胞-基礎系統的上下文中，該術語可以用於指稱在活細胞內發生的事件（例如，與**體外**系統相反）。

【0171】 **經分離的**：如本文所用，是指物質及/或實體（1）與一開始製造時（無論是在自然界中還是在實驗設備中），與之結合的至少一些成份分離，及/或（2）由人工設計、生產、製備，及/或製造。經分離的物質及/或實體可與約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%，或大於約 99%之最初與其結合的其他成份分離。在一些實施例中，經分離的試劑與 10%至 100%、15%-100%、20%-100%、25%-100%、30%-100%、35%-100%、40%-100%、45%-100%、50%-100%、55%-100%、60%-100%、65%-100%、70%-100%、75%-100%、80%-100%、85%-100%、90%-100%、95%-100%、96%-100%、97%-100%、98%-100%，或 99%-100%之最初與其結合的其他成份分離。在一些實施例中，經分離的試劑與 10%至 100%、10%-99%、10%-98%、10%-97%、10%-96%、

10%-95%、10%-90%、10%-85%、10%-80%、10%-75%、10%-70%、10%-65%、10%-60%、10%-55%、10%-50%、10%-45%、10%-40%、10%-35%、10%-30%、10%-25%、10%-20%，或 10%-15%之最初與其結合的其他成份分離。在一些實施例中，經分離的試劑與 11%至 99%、12%-98%、13%-97%、14%-96%、15%-95%、20%-90%、25%-85%、30%-80%、35%-75%、40%-70%、45%-65%、50%-60%，或 55%-60%之最初與其結合的其他成份分離。在一些實施例中，經分離的試劑為約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%，或大於約 99%純。在一些實施例中，經分離的試劑為 80%-99%、85%-99%、90%-99%、95%-99%、96%-99%、97%-99%，或 98%-99%純的。在一些實施例中，經分離的試劑為 80%-99%、80%-98%、80%-97%、80%-96%、80%-95%、80%-90%，或 80%-85%純的。在一些實施例中，經分離的試劑為 85%-98%、90%-97%，或 95%-96%純的。在一些實施例中，若物質實質上不含其他成分，則該物質為“純的”。在一些實施例中，如本領域技術人員將理解的，一物質在與某些其他成份，例如，一或多種載體或賦形劑（例如緩衝液、溶劑、水等）組合後，仍可被視為“經分離的”或甚至“純的”；在此類實施例中，物質的百分比或純度之計算不包括這些載體或賦形劑。僅用於示範，在一些實施例中，於下列情況下，生物性聚合物如天然存在的多胜肽或多核苷酸被認為是“經分離的”：當 a) 其來源或衍生來源並非與自然狀態下其伴隨成分之一部分或全部相關；b) 其實質上不含與自然界中產生它的相同物種之其他多胜肽或核酸；或 c) 由細胞或其他表現系統(其並非天然製造其之物種)表現，或者與其中成分結合。因此，舉例而言，在某些實施例中，經化學合成或於製造其之天然細胞系統不同之系統中合成之多胜肽，被認為是“經分離的”多胜肽。此外，或額外地，在一些實施例中，進行一或多種純化技術的多胜肽可視為是“經分離的”多胜肽，其某種程度上與其它成分分開：a) 天然與之結合者；及/或 b) 最初製造時與之結合者。

【0172】 基因座(locus)或基因座(loci)：如本文所用，是指基因（或重要序列）、DNA 序列、多胜肽-編碼序列，在生物體基因組的染色體上的位

置或位點。例如，“**免疫球蛋白基因座**”可指免疫球蛋白基因片段（例如，V、D、J或C）、免疫球蛋白基因片段 DNA 序列、免疫球蛋白基因片段-編碼序列，或免疫球蛋白基因片段，在生物體基因組染色體上的位置，其已鑑定出此序列所在位置。“**免疫球蛋白基因座**”可包含免疫球蛋白基因片段的調控元件，包括但不限於增強子、啟動子、5'及/或 3'調控序列或區域，或其組合。“**免疫球蛋白基因座**”可包含基因間 DNA，例如通常位於或出現在野生型基因座中的基因片段之間的 DNA。本領域普通技術人員將理解，在一些實施例中，染色體可含有數百甚至數千個基因，當於不同物種之間進行比較時，會呈現相似遺傳基因座的物理性共定位。這種遺傳基因座可被描述為具有共享的同線性。

【0173】 **天然地出現**：如本文所用，關於生物學要素（例如，核酸序列）意指一生物學要素可在特定背景及/或位置中發現，而在細胞或生物體（例如動物）中尚未進行改造（例如，基因工程改造）。換言之，作為天然出現在指定的內容及/或位置中的序列，並不在改造（例如，基因工程改造）結果之指定內容及/或位置中。例如，在內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中，天然出現在鄰近於人類 J κ 1 基因片段的序列，為可發現鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座(無基因工程改造)之人類 J κ 1 基因片段。在一些實施例中，序列可由其天然出現之細胞或生物體中取得、衍生及/或分離出。在一些實施例中，細胞或生物體並非天然出現於細胞或生物體中的序列之直接來源。例如，細胞或生物體中的相對應序列可被辨識出，之後經由本領域已知的機制產生或複製。

【0174】 **非人類動物**：如本文所用，是指任何非人類的脊椎動物。在一些實施例中，非人動物為圓口類動物、硬骨魚、軟骨魚（例如鯊魚或鱈）、兩棲動物、爬行動物、哺乳動物和鳥。在一些實施例中，非人類動物為哺乳類動物。在一些實施例中，非人類哺乳動物為靈長類動物、山羊、綿羊、豬、狗、牛或嚙齒動物。在一些實施例中，非人類動物為嚙齒動物，例如大鼠或小鼠。

【0175】 **核酸**：如本文所用，是指加入或可加入至寡核苷酸鏈中的任一化合物及/或物質。在一些實施例中，“**核酸**”為一化合物及/或物質，其係

或可經由磷酸二酯鍵結加入寡核苷酸鏈中。從內文可以清楚地看出，在一些實施例中，“*核酸*”是指單獨核酸殘基（例如，核苷酸及/或核苷）；在一些實施例中，“*核酸*”是指包含單獨核酸殘基的寡核苷酸鏈。在一些實施例中，“*核酸*”為或包含 RNA；在一些實施例中，“*核酸*”為或包含 DNA。在一些實施例中，“*核酸*”為、包含或係由一或多個天然核酸殘基組成。在一些實施例中，“*核酸*”為、包含或係由一或多個核酸類似物組成。在一些實施例中，核酸類似物與“*核酸*”的不同之處在於其不利用磷酸二酯骨架。例如，在一些實施例中，“*核酸*”為、包含或係由一或多個“*胜肽核酸*”組成，其為本領域已知的並具有胜肽鍵，而非骨架中的磷酸二酯鍵。此外，或額外地，在一些實施例中，“*核酸*”具有一或多個硫代磷酸酯，及/或 5'-N-亞磷鹽胺鍵，而非磷酸二酯鍵。在一些實施例中，“*核酸*”為、包含或由一或多個天然核苷（例如，腺苷、胸苷、鳥苷、胞苷、尿苷、去氧腺苷、去氧胸苷、去氧鳥苷和去氧胞苷）組成。在一些實施例中，“*核酸*”為、包含或由一或多個核苷類似物組成（例如，2-胺基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯並嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5 丙炔基-胞苷、C-5 丙炔基-尿苷、2-胺基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-胺基腺苷、7-去氨腺苷、7-去氨鳥苷、8-氧代腺苷、8-氧代鳥苷，O(6)- 甲基鳥嘌呤、2-硫代胞苷、甲基化鹼基、嵌入性鹼基，及其組合）。在一些實施例中，與天然核酸中者相較，“*核酸*”包含一或多個經修飾的醣類（例如，2'-氟核糖、核糖、2'-去氧核糖、阿拉伯糖及己糖）。在一些實施例中，“*核酸*”具有一核苷酸序列，其編碼功能性基因產物，例如 RNA 或多胜肽。在一些實施例中，“*核酸*”包括一個或多個內含子。在一些實施例中，“*核酸*”包括一個或多個外顯子。在一些實施例中，“*核酸*”係藉由將一或多種從天然來源分離、酵素性合成之分離物製備，該合成係以互補性模板的聚合反應（活體內或體外）、重組細胞或系統的複製，以及化學合成為基礎。在一些實施例中，“*核酸*”為至少但不限於 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、

425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000 或更多個殘基長度。在一些實施例中，一“*核酸*”為單股；在一些實施例中，一“*核酸*”為雙股。在一些實施例中，“*核酸*”具一核苷酸序列，其包含至少一單元，其編碼一胜肽，或為編碼一胜肽之序列之互補序列。在一些實施例中，“*核酸*”具酵素活性。

【0176】 **操作性連接**：如本文所用，是指其中所描述的元件處於允許它們以其預期方式起作用的關係並排。控制序列“*操作性地連結至*”編碼序列，係以編碼序列之表現係於可與控制序列相容之條件下達成之方式連結。*操作性地連接*序列包括表現控制序列(其與有興趣基因鄰接)，以及表現控制序列(其反式或遠距離起作用，以控制有興趣基因(或有興趣序列))二者。術語“*表現控制序列*”包括多核苷酸序列，其為影響與其連接的編碼序列之表現和加工所必需的。“*表現控制序列*”包括：適當的轉錄起始、終止、啟動子和增強子序列；有效的 RNA 加工信號，如剪接和多腺苷酸化信號；穩定細胞質 mRNA 的序列；增強轉譯效率的序列(即 Kozak 一致序列)；增強多胜肽穩定性的序列；以及當需要時，增強多胜肽分泌的序列。此種控制序列的性質根據宿主生物體而不同。例如，在原核生物中，此類控制序列通常包括啟動子、核糖體結合位點和轉錄終止序列，而在真核生物中，這種控制序列通常包括啟動子和轉錄終止序列。術語“*控制序列*”係指包括其存在對於表現和加工是必不可少的成分，並亦可包括其存在有利於如前導序列和融合夥伴序列之額外成分。

【0177】 **生理條件**：如本文所用，是指技術上理解的關於細胞或生物體生存及/或複製的條件。在一些實施例中，該術語包括可能在生物體或細胞系統之天然發生的外部或內部條件。在一些實施例中，生理條件為存在於人類或非人類動物體內的條件，尤其是存在於手術部位及/或手術部位內的條件。生理條件通常包括，例如，溫度範圍 20-40°C、1 大氣壓、pH 值 6-8、葡萄糖濃度 1-20 mM、大氣位準的氧濃度，以及在地球上的重力。在一些實施例中，實驗室中的條件係操縱及/或維持於生理條件下。在一些實施例中，生理條件係位於生物體中。

【0178】 **多胜肽**：如本文所用，是指任何胺基酸聚合鏈。在一些實施例中，多胜肽具有天然發生的胺基酸序列。在一些實施例中，多胜肽具有自然界不存在的胺基酸序列。在一些實施例中，多胜肽具有一胺基酸序列，其含有在天然地彼此分開發生的部分（即，來自兩種或更多種不同生物，例如人類和非人類部分）。在一些實施例中，一多胜肽具有一胺基酸序列，其被設計為經由人為設計及/或產生。在一些實施例中，一多胜肽具有由天然不存在的序列編碼的胺基酸序列（例如，經由人為設計及/或產生以編碼該多胜肽的改造序列）。

【0179】 **重組**：如本文所用，是指經由重組方式設計、改造、製備、表現、創造或分離的多胜肽，例如使用重組表現載體轉染到宿主細胞中而表現的多胜肽、分離自重組性、組合式人類多胜肽庫之多胜肽((Hoogenboom, H. R., 1997, TIB Tech. 15:62-70; Azzazy, H.及 W.E. Highsmith, 2002, Clin. Biochem. 35:425-45; Gavilondo, J. V.及 J.W. Larrick, 2002, BioTechniques 29:128-45; Hoogenboom H.,及 P. Chames, 2000, Immunol. Today 21:371-8，其內容經由引用完整併入本文)、從動物（例如小鼠）分離出的已經遺傳工程改造以包括人類免疫球蛋白基因抗體(請見如 Taylor, L. D.等人, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-95; Kellermann, S-A.及 L.L. Green, 2002, Curr. Opin. Biotechnol. 13:593-7; Little, M.等人, 2000, Immunol. Today 21:364-70; Osborn, M.J.等人, 2013, J. Immunol. 190:1481-90; Lee, E-C.等人, 2014, Nat. Biotech. 32(4):356-63; Macdonald, L.E.等人, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5147-52; Murphy, A.J.等人, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-8，其內容經由引用完整併入本文)，或藉由以涉及將所選序列單元彼此剪接的任何其他方式製備、表現、產生或分離的多胜肽。在一些實施例中，在自然界中發現一或多種此類篩選出的序列單元。在一些實施例中，一或多種此類篩選出的序列單元係於電腦上設計。在一些實施例中，一或多種此類篩選出的序列單元來自已知序列單元的突變（例如，活體內或體外），例如來自天然或合成的（例如人造的）來源。例如，在一些實施例中，重組性多胜肽由有興趣的來源生物（例如人類、小鼠等）的基因組中發現的序列組成。在一些實施例中，重組性多胜肽具有由突變產

生的胺基酸序列（例如，體外或活體內，例如，在非人類動物中），使得該重組性多胜肽的胺基酸序列(當源自於並相關於多胜肽序列)可能不是天然存在於非人類動物活體內的基因組中。

【0180】 **參考物**：如本文所用，是指一種標準或對照試劑、動物、群組、個體、群體、樣本、序列或數值，係與有興趣之試劑、動物、群組、個體、群體、樣本、序列或數值相較。在一些實施例中，參考試劑、動物、群組、個體、群體、樣本、序列或數值，係實質上同時與該待測試或待測定之有興趣試劑、動物、群組、個體、群體、樣本、序列或數值，進行測試及/或測定。在一些實施例中，參考試劑、動物、群組、個體、群體、樣本、序列或數值，為經驗值參考，任擇地在有形介質中具體化。在一些實施例中，參考物係指對照組。“參考物”亦包括“參考動物”。“參考動物”可具有如本文所述的修飾、不同於本文所述的修飾，或無修飾（即野生型動物）。通常，如本領域技術人員所理解的，參考試劑、動物、群組、個體、群體、樣本、序列或數值，係於在測定或鑑定有興趣試劑、動物(如哺乳動物)、群組、個體、群體、樣本、序列或數值之可比較條件下，測定或鑑定。

【0181】 **取代**：如本文所用，是指在宿主基因座（例如，在基因組中）中發現的“被取代的”核酸序列（例如，基因），自該基因座中移除，並在其位置上放置了不同的“取代用”核酸的過程。在一些實施例中，被取代的核酸序列和取代用核酸序列彼此相當，亦即，例如，它們彼此同源，含有相對應的單元（例如，蛋白質-編碼單元、調控單元等），及/或具有相似或相同的序列。在一些實施例中，被取代的核酸序列包括啟動子、增強子、剪接供體位點、剪接受體位點、內含子、外顯子、未轉譯區（UTR）之一或多者；在一些實施例中，取代用核酸序列包括一或多個編碼序列。在一些實施例中，取代用核酸序列為被取代核酸序列之同源物或變異體(如突變體)。在一些實施例中，取代用核酸序列為被取代序列的直向同源物或同源物。在一些實施例中，取代用核酸序列為或包含人類核酸序列。在一些實施例中，包括其中取代用核酸序列為或包含人類核酸序列，而被取代的核酸序列為或包含一嚙齒動物序列（例如，小鼠或大鼠序列）。在一些實施例中，包括其中取代用核酸序列為或包含一人類核酸序列，而被取代的核

酸序列為或包含一人類序列。在一些實施例中，取代用核酸序列為被取代序列的變異體或突變體（即，含有一或多個序列差異的序列，如取代，與被取代序列相較）。如此配置的核酸序列可包括一或多個調控序列，其為用於獲得如此配置的序列的來源核酸序列的一部分（例如，啟動子、增強子、5'-或 3'-未轉譯區等）。例如，在各實施例中，該取代為以一異源性序列取代一內源性序列，其導致由如此配置的核酸序列（包含異源性序列）可產生基因產物，但不表現內源性序列；取代物為一段具有核酸序列的內源基因組序列，該核酸序列編碼與由內源性序列編碼的多胜肽具有相似功能的多胜肽（例如，內源性基因組序列編碼一非人類可變區多胜肽(整體或部分)，以及該 DNA 片段編碼一或多個人類可變區多胜肽(整體或部分))。在各實施例中，一內源性非人類免疫球蛋白基因區段或其片段，被一人類免疫球蛋白基因區段或其片段取代。

【0182】 實質上：如本文所用，係指展現出所有或接近所有或某些程度的有興趣的特徵或性質之定性條件。生物學領域的一般技術人員將理解，生物和化學現象很少（如果有的話）完成，及/或完全進行或達成或避免一絕對結果。因此，術語“**實質上**”用於涵蓋許多生物和化學現象中固有的完整性潛在缺乏。

【0183】 實質上相似性：如本文所用，是指胺基酸或核酸序列之間的比較。如本領域一般技術人員所理解的，如果兩個序列在相對應位置具有相似的殘基（例如胺基酸或核苷酸），則通常認為它們是“**實質上相似的**”。如本領域所理解的，儘管類似的殘基可為相同的殘基（也參見下文的**實質等同度**），但類似的殘基亦可具有適當可比較的結構及/或功能特徵的非等同殘基。例如，如本領域一般技術人員所熟知的，某些胺基酸通常被分類為“**疏水性**”或“**親水性**”胺基酸，及/或具有“**極性**”或“**非極性**”側鏈。將一種胺基酸替換為相同類型的另一種胺基酸通常視為“**保守性**”取代。典型的胺基酸分類摘錄於下表中。

丙胺酸	Ala	A	非極性	中性	1.8
精胺酸	Arg	R	極性	正電性	-4.5
天冬醯胺	Asn	N	極性	中性	-3.5

天冬胺酸	Asp	D	極性	負電性	-3.5
半胱胺酸	Cys	C	非極性	中性	2.5
麩胺酸	Glu	E	極性	負電性	-3.5
麩胺醯胺	Gln	Q	極性	中性	-3.5
甘胺酸	Gly	G	非極性	中性	-0.4
組胺酸	His	H	極性	正電性	-3.2
異亮胺酸	Ile	I	非極性	中性	4.5
亮胺酸	Leu	L	非極性	中性	3.8
離胺酸	Lys	K	極性	正電性	-3.9
蛋胺酸	Met	M	非極性	中性	1.9
苯丙胺酸	Phe	F	非極性	中性	2.8
脯胺酸	Pro	P	非極性	中性	-1.6
絲胺酸	Ser	S	極性	中性	-0.8
蘇胺酸	Thr	T	極性	中性	-0.7
色胺酸	Trp	W	非極性	中性	-0.9
酪胺酸	Tyr	Y	極性	中性	-1.3
纈胺酸	Val	V	非極性	中性	4.2

兩性胺基酸	3字母代 1字母代	
	號	號
天冬醯胺或天冬胺酸	Asx	B
麩胺醯胺或麩胺酸	Glx	Z
亮胺酸或異亮胺酸	Xle	J
未指定或未知胺基酸	Xaa	X

【0184】 如本領域眾所周知的，胺基酸或核酸序列可使用各種演算法中的任何一種進行比較，包括市售電腦程序中可用者，例如用於核苷酸序列的 BLASTN，以及用於胺基酸序列的 BLASTP、缺口 BLAST 及 PSI-BLAST。此類程式之實例係描述於 Altschul, S. F.等人, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul, S.F.等人, 1996, Meth. Enzymol. 266:460-80; Altschul, S.F.等人, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D.及 B.F.F. Ouellette (編) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998;及 Misener 等人 (編) Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132, Humana Press, 1998, 經由引用整體併入本文。除了辨識出相似序列之外，上述程序通常提供相似度

的指示。在一些實施例中，兩個序列被視為實質上相似，若至少例如但不限於 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的相對應殘基，在殘基相關延伸上相似（例如，相同或包括保守性取代）。在一些實施例中，相關的延伸是完整序列（例如基因序列、基因片段、編碼結構域的序列、多胜肽，或結構域）。在一些實施例中，該相關延伸為至少 9、10、11、12、13、14、15、16、17 個或更多個殘基。在一些實施例中，該相關延伸為至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50 個或更多個殘基。在一些實施例中，該相關延伸包括沿著完整序列的連續殘基。在一些實施例中，該相關延伸包括沿著完整序列的不連續殘基，例如，經由多胜肽或其一部分的折疊構形聚集在一起的非連續殘基。

【0185】 實質上等同度：如本文所用，是指胺基酸或核酸序列之間的比較。如本領域一般技術人員所理解的，若兩個序列在相對應位置含有相同的殘基（例如胺基酸或核苷酸），則通常認為它們是“實質上等同的”。如本領域眾所周知的，胺基酸或核酸序列可使用各種演算法中的任何一種進行比較，包括市售電腦程序中可用者，例如用於核苷酸序列的 BLASTN，以及用於胺基酸序列的 BLASTP、缺口 BLAST 及 PSI-BLAST。此類程式之實例係描述於 Altschul, S. F. 等人, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul, S.F. 等人, 1996, Meth. Enzymol. 266:460-80; Altschul, S.F. 等人, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D. 及 B.F.F. Ouellette (編) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及 Misener 等人 (編) Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132, Humana Press, 1998，經由引用整體併入本文。除了辨識出相等序列之外，上述程序通常提供等同度的指示。在一些實施例中，兩個序列被視為實質上等同，若至少例如但不限於 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的相對應殘基，在殘基的相關延伸上等同。在一些實施例中，該殘基的相關延伸為一完整序列。在一些實施例中，該相關延伸為如但不限於，至少 10、15、20、25、30、35、40、45、50 個或更多個殘基。

【0186】 **靶向構築體或靶向載體**：如本文所用，是指包含靶向區域的多核苷酸分子。靶向區域包含與目標細胞、組織或動物中的序列相同或實質上相同的序列，並經由同源重組將該靶向構築體整合到該細胞、組織或動物基因組內之一位置。本文亦包括和描述了使用位點特異性重組酶識別位點（例如，*loxP* 或 *Frt* 位點）靶向的靶向區域。在一些實施例中，如本文所述的靶向構築體更包含特別有興趣的核酸序列或基因、篩選標記、控制及/或調控序列，以及允許經由外源性加入蛋白質重組介導的其他核酸序列，該蛋白質幫助或促進涉及此類序列的重組。在一些實施例中，如本文所述的靶向構築體更包含全部或部分有興趣基因，其中該有興趣基因為編碼多肽的異源性基因，其全部或部分具有與由內源性序列編碼的蛋白質相似的功能。在一些實施例中，如本文所述的靶向構築體更包含全部或部分的有興趣人源化基因，其中該人源化有興趣基因全部或部分地編碼具有與由內源性序列編碼的多肽相似的功能。在一些實施例中，靶向構築體（或靶向載體）可包含由人工操作的核酸序列。例如，在一些實施例中，可建構靶向構築體（或靶向載體），以包含經改造或重組性多核苷酸，其包含二或更多個序列，該序列在自然界中不以該順序連接在一起，而是人為操作，以使該改造或重組性多核苷酸彼此直接連接。

【0187】 **轉基因或轉基因構築體**：如本文所用，是指經由人為操作，例如經由此述方法導入細胞中的一段核酸序列（其編碼如有興趣的多肽（整體或部分））。轉基因相對於其導入之基因改造動物或細胞而言，可為部分或完全異源性，即外來的。轉基因可包括一或多種轉錄調控序列和任何其他核酸，例如內含子或啟動子，其可能是表現選定的核酸序列所必需的。

【0188】 **基因修飾非人類動物或基因改造非人類動物**：在本文中可互換使用，是指任何非天然存在的非人類動物，其中非人類動物的一或多種細胞含有異源性核酸及/或編碼有興趣多肽（全部或部分）的基因。例如，在一些實施例中，“**基因修飾的非人類動物**”或“**基因改造非人類動物**”是指含有轉基因或轉基因構築體的非人類動物，如本文所述。在一些實施例中，異源性核酸及/或基因直接或間接地藉由有意的基因操作，例如經由顯微注射或經由重組病毒感染，導入其前驅細胞而導入細胞中。術語基因操作不

包括典型的育種技術，而是涉及重組 DNA 分子的引入。該分子可整合在染色體內，亦可為染色體外複製 DNA。述語“*基因修飾的非人類動物*”或“*基因改造的非人類動物*”是指其異源性核酸及/或基因為異型合子或同型合子的動物，及/或具有異源性核酸及/或基因的單複製數或多複製數的動物。

【0189】 載體：如本文所用，是指能夠傳送另一核酸至與其結合者之一核酸分子。在一些實施例中，載體能夠進行核酸的染色體外複製及/或表現，使其與宿主細胞（例如真核和/或原核細胞）連接。能夠引導操作性連接的基因表現的載體，在本文中稱為“*表現載體*。”

【0190】 野生型：如本文所用，是指具有在“*正常*”狀態或內容下，在自然界中發現的結構及/或活性的實體（相對於突變體、患病、改變等）。本領域一般技術人員將理解，野生型基因和多肽通常以多種不同形式（例如，等位基因）存在。

【實施方式】

【0191】 本發明提供一種經改造非人類動物，其具有編碼人類 V λ 結構域的異源性基因材料，其中該異源性基因材料包含人類 V λ 與 J λ 基因序列（即基因片段），以及提供適當重排的其他人類序列（例如，重組信號序列（RSS）），並表現具有 Ig λ 輕鏈的抗體，其包括人類部分和非人類部分，或具有完整人類 Ig λ 輕鏈的抗體。例如，在各種實施例中，當人類基因片段存在於經改造非人類動物的基因組中時，亦可存在相對應的重組信號序列（例如，V λ RSS 與 V λ 基因片段、J λ RSS 與 J λ 基因片段、V κ RSS 與 V κ 基因片段、J κ RSS 與 J κ 基因片段等）。在各種實施例中，提供的經改造非人類動物含有以一方式插入的異源性基因材料，該方式使得含有具有人類 V λ 結構域和非人類或人類 C λ 結構域的輕鏈之抗體，被表現於非人類動物的抗體庫中。此外，所提供的經改造非人類動物含有以一方式插入的異源性基因材料，該方式使得含有具人類 V λ 結構域和非人類或人類 C λ 結構域的輕鏈之抗體，由經改造 Ig κ 輕鏈基因座中表現出，該基因座包括人類和非人類 Ig λ 基因序列（例如，基因片段），且在一些實施例中，在非人類動物生殖細胞系基因組中表現人類 Ig κ 輕鏈序列。

【0192】 不希望受任何特定理論的束縛，預期本文所述的非人類動物可提供經改良的活體內系統，該系統利用表現含有人類 V λ 結構域的抗體，來產生治療用抗體。在一些實施例中，亦預期如本文所述的非人類動物可提供含有異源性基因材料的另一改造形式的輕鏈基因座（例如，Ig κ 輕鏈基因座），用於開發人抗體-基礎治療劑（例如，人單株抗體、多特異性結合劑、scFv、融合多胜肽等），用於與偏移抗體反應相關之疾病目標（例如，以 κ 或 λ 輕鏈的絕大部分為特徵的抗體反應）。因此，所提供的非人類動物特別適用於開發針對與不良免疫原性相關的標靶（例如病毒）的人類抗體和人類抗體-基礎分子（例如，多特異性結合劑、scFv、融合多胜肽等），部分是由於抗體庫及/或反應偏斜。

【0193】 本發明內容特別描述免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包括一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段，以及一 C λ 基因。這種基因座被稱為“在 κ 中的 λ ”基因座或“LiK”。

【0194】 特別地，本發明內容描述一種具有生殖細胞系基因組的非人類動物（例如嚙齒動物）的產生，該生殖細胞系基因組含有改造 Ig κ 輕鏈基因座，在一些實施例中，其特徵為引入多個人類 V λ 和 J λ 基因片段，以及引入非人類或人類 C λ 基因，位於非人類 C κ 基因處，使得該多個人類 V λ 和 J λ 基因片段可操作性連結至該非人類或人類 C λ 基因。如本文所述，此類改造 Ig κ 輕鏈基因座的產生，會導致含有輕鏈的抗體表現，該輕鏈包括來自該非人類動物生殖細胞系基因組中的改造 Ig κ 輕鏈基因座之人類 V λ 結構域和非人類或人類 C λ 結構域。在一些實施例中，所提供的非人類動物生殖細胞系基因組包含 Ig κ 輕鏈基因座，包括人類 Ig λ 輕鏈序列。在一些實施例中，所提供的非人類動物的生殖細胞系基因組包含（i）Ig κ 輕鏈基因座，包括人類 Ig λ 輕鏈序列，以及（ii）（a）Ig κ 輕鏈基因座，包括人類 Ig λ 輕鏈序列，或（ii）（b）Ig κ 輕鏈基因座，包括人類 Ig κ 輕鏈序列。在一些實施例中，所提供的非人類動物生殖細胞系基因組包含如本文所述的 Ig κ 輕鏈基因座，更包含（i）人源化 IgH 基因座，或（ii）人源化 IgH 基因座，以及功能性靜默或以其他方式提供之非功能性內源性 Ig λ 輕鏈基因座。

如本文所述，所提供的非人類動物可表現含有包含人類 $V\lambda$ 結構域的 $Ig\lambda$ 輕鏈的抗體庫。

【0195】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物在 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座內含有人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物在 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座內含有人類和非人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物在 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座內含有人類 $Ig\lambda$ 和人 $Ig\kappa$ 輕鏈序列。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物在 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座內含有人類 $Ig\lambda$ 、人類 $Ig\kappa$ 和鼠類 $Ig\kappa$ ，及/或鼠類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物在 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座內含有人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列、非人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列、人類 $Ig\kappa$ 輕鏈序列、非人類 $Ig\kappa$ 輕鏈序列，或其組合。在如本文所述的非人類動物的許多實施例中，非人類序列為或包含鼠類序列（例如，小鼠或大鼠）。

【0196】 在一些實施例中， $Ig\kappa$ 及/或 $Ig\lambda$ 輕鏈序列包括人類及/或鼠類來源的基因間 DNA。在一些實施例中， $Ig\kappa$ 及/或 $Ig\lambda$ 輕鏈序列包括基因間 DNA，其被改造且基於源自人類或鼠類來源的來源序列。在一些實施例中，其中該基因間 DNA 經置放、插入、定位或改造（例如 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座中的 $Ig\kappa$ 基因間 DNA），使該基因間 DNA 具有相同的免疫球蛋白基因座。在一些實施例中，其中該基因間 DNA 經置放、插入、定位或改造（例如 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座中的 $Ig\lambda$ 基因間 DNA），使該基因間 DNA 具有不同的免疫球蛋白基因座。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物含有經改造 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座，其含有基因間 DNA，其包括 $Ig\kappa$ 輕鏈序列、 $Ig\lambda$ 輕鏈序列，及/或其組合。

【0197】 在各實施例中，人源化免疫球蛋白重鏈基因座含有至少一人類 V_H 、至少一人類 D_H ，以及至少一人類 J_H 基因片段，係操作性連結至一非人類免疫球蛋白重鏈恆定區（例如，包括一或多個免疫球蛋白重鏈恆定區基因的內源性非人類免疫球蛋白重鏈恆定區，例如 IgM 、 IgD 、 IgG 、 IgE 、 IgA 等），例如，多個人類 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段，係操作性連接到非人類免疫球蛋白重鏈恆定區。在一些實施例中，所提供的非人類動物具有一生殖細胞系基因組，其包括附圖中描繪的一或多個免疫球蛋白基因座。此

類經改造非人類動物提供人類抗體和人抗體片段的來源，並提供適於利用人類 $V\lambda$ 序列產生人類治療用抗體之經改良活體內系統。

【0198】 如下面實例部分所述，所提供的非人類動物基因組中含有至少一人類重鏈（即 V_H 、 D_H 和 J_H ）與輕鏈（例如，內源性 κ 基因座上的 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ ）可變區基因片段，例如多個人類重鏈（即 V_H 、 D_H 和 J_H ），以及輕鏈（例如，內源性 κ 基因座處的 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ ）可變區基因片段，其位於內源性免疫球蛋白基因座位置之非人類可變區基因片段處，並包括人類可變區基因片段之間的人類非編碼基因間 DNA。此類基因間 DNA 包括，例如，啟動子、前導序列和重組訊號序列，其允許在抗體的可變結構域中適當重組和表現人類基因片段。此技術人員應了解到非人類免疫球蛋白基因座亦包含此類非編碼基因間 DNA。在閱讀本發明後，本領域技術人員將理解，可使用其他人類或非人類基因間 DNA 建構此類基因座，因而在非人類動物抗體中，導致人類可變結構域的相同表現。此類相似的基因座僅需要含有所需人類基因片段的人類編碼序列（即外顯子），以達成含有人類可變結構域的抗體表現。

【0199】 在以下部分中詳細描述了某些實施例的各態樣，每一者皆可應用於如本文所述的任何態樣或實施例。下列之用途未受到限制。

非人類動物的抗體庫

【0200】 免疫球蛋白（亦稱為抗體）是大的（約 150 kD）、Y 形醣蛋白，其由宿主免疫系統的 B 細胞產生，以中和病原體（例如，病毒，細菌等）。每一免疫球蛋白（Ig）係由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈組成，每條輕鏈具有兩個結構組成：可變結構域和恆定結構域。重鏈和輕鏈可變區在由不同 B 細胞產生的抗體中是不同的，但由單個 B 細胞或 B 細胞複製株產生的所有抗體則是相同的。每種抗體的重鏈和輕鏈可變區共同包含該抗原結合區（或抗原結合位點）。免疫球蛋白可以稱為同種型或群組之不同變異體形式存在，基於它們包含的重鏈恆定區（或結構域）。重鏈恆定區在相同同種型的所有抗體中是相同的，但在不同同種型的抗體中不同。下表摘錄小鼠和人類的九種抗體同種型。

小鼠	人類
IgM	IgM
IgD	IgD
IgG1	IgG1
IgG2a	IgG2
IgG2b	IgG3
IgG2c	IgG4
IgG3	IgE
IgE	IgA1
IgA	IgA2

【0201】 已在其他物種中發現了額外的同種型(isotype)。由於不同同種型之間的不同結構特徵，以及在動物體內的不同位置（細胞、組織等）中發現，同種型賦予抗體特定的生物學特性。最初，B 細胞產生具有相同抗原結合區的 IgM 和 IgD。活化後，B 細胞藉由稱為群組轉換的過程轉換到不同的同種型，其涉及 B 細胞產生的抗體恆定區的變化，而可變區則保持相同，因而保留原始抗體的抗原特異性（B 細胞）。

【0202】 兩個分離的基因座（Igκ和 Igλ）含有基因片段(依據重排情況)，其編碼抗體的輕鏈，並表現出等位基因和同種型排除。κ⁺比λ⁺ B 細胞之表現比例，在各物種之間不同。例如，人類出現約 60:40(κ:λ)的比例。在小鼠與大鼠中，觀察到 95:5 (κ:λ)之比例。有趣的是，在貓中觀察到的κ：λ 比例（5:95），與小鼠和大鼠相反。已進行了若干研究以闡明這些觀察到的比例背後的可能原因，並已提出基因座的複雜性（即，基因片段的數量，特別是 V 基因片段）和基因片段重排的效率，作為基本原理。人類 Igλ輕鏈基因座延伸超過 1,000 kb，並包含約 70 個 Vλ基因片段（29 至 33 個功能性）和 7 個 Jλ-Cλ基因片段對（4 至 5 個功能性），其分為三個群集(請參見例如美國專利 No.9,006,511 的圖 1，其經由引用完整併入本文)。所表現的抗體庫中觀察到的 Vλ區大多數由最近端群集（稱為群集 A）內包含的基因片段編碼。小鼠 Igλ輕鏈基因座與人類基因座顯著不同，取決於品系，僅包含少數 V λ和 Jλ 基因片段，組成兩個不同基因群集（請參見例如美國專利 No.9,006,511 中的圖 2，其經由引用完整併入本文）。

【0203】 用於治療各種人類疾病的治療性抗體的開發，主要集中在改造非人類動物系的創造，特別是改造嚙齒動物品系，在其基因組中含有與人類免疫球蛋白基因相對應的不同量的基因材料（綜述於如 Brüggenmann, M. 等人, 2015, Arch. Immunol. Ther. Exp. 63:101-8，其經由引用完整併入本文）。創造這種基因改造嚙齒動物品系的最初努力，集中於整合人類免疫球蛋白基因座的部分，這些部分本身可以支持基因片段的重組，以及產生完整人類重鏈及/或輕鏈，同時具有失活之內源性免疫球蛋白基因座（請見如 Brüggenmann, M. 等人, 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 86:67-09-13; Brüggenmann, M. 等人, 1991, Eur. J. Immunol. 21:1323-6; Taylor, L.D. 等人, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Davies, N.P. 等人, 1993, Biotechnol. 11:911-4; Green, L.L. 等人, 1994, Nat. Genet. 7:13-21; Lonberg, N. 等人, 1994, Nature 368:856-9; Taylor, L.D. 等人, 1994, Int. Immunol. 6:579-91; Wagner, S.D. 等人, 1994, Eur. J. Immunol. 24:2672-81; Fishwild, D.M. 等人, 1996, Nat. Biotechnol. 14:845-51; Wagner, S.D. 等人, 1996, Genomics 35:405-14; Mendez, M.J. 等人, 1997, Nat. Genet. 15:146-56; Green, L.L. 等人, 1998, J. Exp. Med. 188:483-95; Xian, J. 等人, 1998, Transgenics 2:333-43; Little, M. 等人, 2000, Immunol. Today 21:364-70; Kellermann, S.A. 及 L.L. Green, 2002, Cur. Opin. Biotechnol. 13:593-7，其經由引用完整併入本文）。尤其是，某些努力包括整合人類 Igλ 輕鏈序列（請見如美國專利申請公開號 2002/0088016 A1、2003/0217373 A1 與 2011/0236378 A1；美國專利號 6,998,514 與 7,435,871；Nicholson, I.C. 等人, 1999, J. Immunol. 163:6898-906; Popov, A.V 等人, 1999, J. Exp. Med. 189(10):1611-19，其經由引用完整併入本文）。這些努力集中於含有人類 Vλ、Jλ 和 Cλ 序列的酵母人工染色體的隨機整合，因而創造出表現完整人類 Igλ 輕鏈的小鼠品系（即人類 Vλ 和 Cλ 結構域）。最近的努力採用了類似的策略，其使用亦包含人類 Vλ、Jλ 和 Cλ 序列的構築體（Osborn, M.J. 等人, 2013, J. Immunol. 190:1481-90; Lee, E-C. 等人, 2014, Nat. Biotech. 32(4):356-63，每一者皆經由引用完整併入本文）。

【0204】 然而，其他努力包括將人類 Vλ 和 Jλ 基因片段特異性插入內源性嚙齒動物 Ig 輕鏈基因座（κ 和 λ），使得該人類 Vλ 和 Jλ 基因片段可操作

性連結至內源性 Ig 輕鏈恆定區基因(請見如美國專利號 9,006,511、9,012,717、9,029,628、9,035,128、9,066,502、9,150,662 與 9,163,092；所有皆經由引用完整併入本文)。在此類動物中，來自群集 A 和 B，以及一或四個人類 J λ 基因片段的所有人類 V λ 基因片段，係插入內源性 Ig κ 和 Ig λ 輕鏈基因座中。結果為，數個不同的人類 V λ 和 J λ 基因片段，在兩個改造嚙齒動物 Ig 輕鏈基因座上皆呈現出適當的重排，以形成功能性輕鏈表現於嚙齒動物抗體庫中，該輕鏈包括內源性 C κ 與 C λ 區域內容中的人類 V λ 結構域（請參見如，美國專利號 9,006,511 的表 7 和圖 11-13，其經由引用完整併入本文）。具體而言，具有包含人類 V λ 和 J λ 基因片段的經改造 Ig κ 輕鏈基因座的小鼠，在脾隔室中呈現出人類 λ 比內源性 λ 比例（藉由測量 IgC κ 比 IgC λ 比例）為約 1：1（請參見如，美國專利號 9,006,511 的表 4，其經由引用完整併入本文）。實際上，兩種改造小鼠品系（即改造 Ig κ 或改造 Ig λ 輕鏈基因座）皆顯示出人類 V λ 結構域可由嚙齒動物的內源性 Ig 輕鏈基因座表現，這通常在輕鏈表現上展現出很大的偏差（請見上文）。本揭示提供了以下認知：可產生另一改造 Ig 輕鏈基因座結構，以最大化抗體庫中的人類 V λ 和 J λ 基因片段用於非人類動物之治療靶標的用途，特別是，與包含 Ig λ 輕鏈基因座的非人類動物相較，該輕鏈基因座缺乏通常與人類 Ig λ 輕鏈基因座（即，出現在人體細胞中的此類基因座）相關的複雜性和穩健品質（例如，小鼠和大鼠）。此另一經改造 Ig 輕鏈基因座結構提供由其設計產生的獨特抗體庫的能力。

【0205】 本發明示範非人類動物的成功製造，其生殖細胞系基因組含有改造內源性 Ig κ 輕鏈基因座，該基因座包含多個人類 V λ 和 J λ 基因片段，其操作性連結至非人類或人類 Ig λ 輕鏈恆定區基因，其中該非人類或人類 Ig λ 輕鏈恆定區基因，係插入內源性 Ig κ 輕鏈基因座之非人類 Ig κ 輕鏈恆定區基因位置。尤其是，本發明特別證明成功產生（1）可表現具有人類可變區和非人類恆定區的抗體之經改造非人類動物，其中該抗體包括含有人類 V λ 結構域和非人類 C λ 結構域的輕鏈，以及（2）可表現具有人類可變區和人類恆定區的抗體之經改造非人類動物，其中該抗體包括含有人類 V λ 和 C λ 結構域的輕鏈。如本文具體舉例說明的，藉由將該多個人類 V λ 和

J λ 基因片段插入內源性 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）中，來達成此類輕鏈的表現。在一些實施例中，所提供的非人類動物係進行改造，以使內源性 Ig λ 輕鏈可變區的表現失活（例如經由基因刪去）。

【0206】 在一些實施例中，所提供的非人類動物係進行改造，使得內源性 Ig κ 輕鏈可變區的表現失活（例如，藉由置換或取代）。在一些實施例中，所提供的非人類動物係進行改造，使非人類動物表現來自經改造內源性 Ig κ 輕鏈基因座之人類 Ig λ 輕鏈可變區，以及來自經改造內源性人類 Ig κ 輕鏈基因座之 Ig κ 輕鏈可變區。因此，在至少一些實施例中，本發明包括開發用於產生人類抗體之經改良活體內系統，藉由提供含有另一改造 Ig κ 輕鏈基因座的經改造非人類動物，其可表現包含人類 V λ 結構域和非人類或人類 C λ 結構域的抗體庫。

核酸構築體

【0207】 通常，含有人類 Ig λ 輕鏈序列（例如，人類 V λ 和 J λ 基因片段）的多核苷酸分子或其部分，係與一載體連接（例如插入），較佳為 DNA 載體，以在宿主細胞中複製該多核苷酸分子。

【0208】 人類 Ig λ 輕鏈序列可直接由已知序列或來源（例如，基因庫）中複製出，或合成自基於來自 GenBank 或其他公開可用資料庫（例如，IMGT）的公開序列，使用電腦設計的生殖細胞系序列。此外，細菌人工染色體（BAC）庫可提供有興趣的免疫球蛋白 DNA 序列（例如，人類 V λ 和 J λ 序列及其組合）。BAC 庫可包含 100-150kb 的插入片段，並能包含大至 300kb 的插入片段(Shizuya,等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:8794-8797; Swiatek,等人, 1993, Genes and Development 7:2071-2084; Kim, 等人, 1996, Genomics 34 213-218；其經由引用完整併入本文）。例如，已描述具有 164-196 kb 平均插入大小的人類 BAC 庫 (Osoegawa, K.等人, 2001, Genome Res. 11(3):483-96; Osoegawa, K.等人, 1998, Genomics 52:1-8, Article No. GE985423，其經由引用完整併入本文）。人類和小鼠基因組 BAC 庫已被建構並可商購獲得（例如，ThermoFisher）。基因組 BAC 庫亦可作為免疫球蛋白 DNA 序列，以及轉錄控制區的來源。

【0209】 此外，可從酵母人工染色體（YAC）分離、複製，及/或轉移出免疫球蛋白 DNA 序列。例如，已確定人類 Igλ輕鏈基因座的核苷酸序列（請參見如 Dunham, I.等人, 1999, *Nature* 402:489-95，其經由引用完整併入本文）。此外，YAC 先前已用於組裝人類 Igλ輕鏈基因座轉基因（請見如 Popov, A.V.等人, 1996, *Gene* 177:195-201; Popov, A.V.等人, 1999, *J. Exp. Med.* 189(10):1611-19，其經由引用完整併入本文）。完整 Igλ輕鏈基因座（人類或嚙齒動物）可被複製出，並包含在數個 YAC 中。如果使用多個 YAC 並包含相似性重疊的區域，則它們可在酵母宿主菌株內重組，以產生代表整個基因座或基因座必要部分的單一構築體（例如，以靶向載體靶向的區域）。YAC 臂可藉由改造方式，以哺乳動物選擇卡匣額外修飾，以幫助將構築體導入胚胎幹細胞或胚胎中，藉由本領域已知及/或本文描述的方法。

【0210】 用於構建如本文所述的經改造 Igκ輕鏈基因座的人類 Igλ輕鏈基因片段之 DNA 和胺基酸序列，可由公開的資料庫（例如，GenBank、IMGT 等），及/或公開的抗體序列獲得。在一些實施例中，含有人類 Igλ輕鏈基因片段的核酸構築體包含 J 區（即，包括多個輕鏈 J 基因片段的基因組序列），其中該 J 區包含人類 Jλ 基因片段的編碼序列及其相對應的 12RSS，其中該 12RSS 已於非編碼基因間 DNA 中定位，通常與人類 Jκ 基因片段的編碼序列及其相對應的 23RSS 結合。

【0211】 在一些實施例中，此一序列可稱為經改造輕鏈 J 區。在一些實施例中，含有人類 Igλ輕鏈基因片段的核酸構築體包含人類 Vλ和 Jλ序列，其操作性連結至人類或非人類 Igλ輕鏈恆定區(Cλ)基因。在一些實施例中，含有人類 Igλ輕鏈基因片段的核酸構築體包含人類 Vλ和 Jλ序列，其操作性連結至一或多個非人類 Igκ輕鏈增強子區(或增強子序列)。在一些實施例中，含有人類 Igλ輕鏈基因片段的核酸構築體包含人類 Vλ和 Jλ序列，其操作性連結至一非人類或人類 Cλ區基因，以及非人類 Igκ輕鏈增強子區(或增強子序列)。

【0212】 在一些實施例中，含有人類 Vλ和 Jλ序列的核酸構築體更包含人類及/或鼠類來源的基因間 DNA。在一些實施例中，基因間 DNA 為或包

含非編碼鼠類 Igκ 輕鏈序列、非編碼人類 Igκ 輕鏈序列、非編碼鼠類 Igλ 輕鏈序列、非編碼人類 Igλ 輕鏈序列，或其組合。

【0213】 可使用本領域已知的方法製備核酸構築體。例如，核酸構築體可製備為較大質體的一部分。這種製備允許以本領域已知的有效方式複製和篩選出正確的構築體。如本文所述，含有人類 Igλ 輕鏈序列的核酸構築體(全部或部分)可位於質體上的限制性位點之間，使其可由剩餘的質體序列中分離出，以加入希望的非人類動物。

【0214】 用於製備核酸構築體（例如質體）和宿主生物體轉型的各種方法為本領域已知。對於原核和真核細胞的其他合適表現系統，以及一般重組程序，請參見 *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Manipulation*, 第五版, Old, R.W. 及 S.B. Primrose 編, Blackwell Science, Inc., 1994 及 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Sambrook, J. 等人編, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989，其中每一者皆經由引用完整併入本文。

靶向載體

【0215】 靶向載體可用於將核酸構築體導入基因組目標基因座，並包含一核酸構築體，以及位於該核酸構築體側翼的同源臂；本領域技術人員將理解通常適用於靶向載體的設計、結構及/或用途的各種選擇和特徵。例如，靶向載體可為線性形式或環狀形式，且其可為單股或雙股。靶向載體可為去氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA）。為了便於參考，同源臂在本文中稱為 5' 和 3'（即上游和下游）同源臂。該術語涉及同源臂與靶向載體內的核酸構築體的相對位置。5' 和 3' 同源臂對應於靶向基因座內的區域，或另一靶向載體內的區域，其在本文中分別稱為“5' 目標序列”以及“3' 目標序列”。在一些實施例中，同源臂亦可作為 5' 或 3' 目標序列。

【0216】 在一些實施例中，本文描述的方法係使用能夠彼此重組的兩種、三種或更多種靶向載體。在各種實施例中，目標載體為如本文其他地方所述的大靶向載體（LTVEC）。在此類實施例中，第一、第二和第三靶向載體每一者皆包含 5' 和 3' 同源臂。該第一靶向載體的 3' 同源臂包含一序列，

其與第二靶向載體的 5'同源臂重疊（即重疊序列），其允許該第一和第二 LTVEC 之間的同源重組。

【0217】 在雙靶向方法中，第一靶向載體的 5'同源臂和第二靶向載體的 3'同源臂，可類似於目標基因組基因座內的相對應片段（即，目標序列），其可促進該第一和第二靶向載體與相對應的基因組片段進行同源重組，並修飾該目標基因組基因座。

【0218】 在三重靶向方法中，第二靶向載體的 3'同源臂可包含與第三靶向載體的 5'同源臂重疊的序列（即重疊序列），其可允許該第二和第三 LTVEC 之間的同源重組。第一靶向載體的 5'同源臂和第三靶向載體的 3'同源臂，類似於目標基因組基因座內的相對應片段（即目標序列），其可促進該第一和第三靶向載體與相對應的基因組片段進行同源重組，並修飾該目標基因組基因座。

【0219】 同源臂與目標序列或二同源臂“相對應(*correspond*)”或“對應於(*corresponding*)” 另一者，當該二區域與另一者共享足夠的序列等同度時，另一者作為同源重組反應的受體。在靶向載體（即重疊序列）上或在兩個同源臂之間發現的特定目標序列，和相對應的同源臂之間的序列等同度，可為允許發生同源重組的任何程度之序列等同度。僅用於舉例，靶向載體（或其片段）的同源臂與另一靶向載體的目標序列，或目標基因組基因座（或其片段）的目標序列共有的序列等同度可為，例如但不限於，至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%之序列等同度，使序列可進行同源性重組。

【0220】 此外，同源臂和相對應的目標序列之間相對應的相似（例如，等同度）區域，可為足以促進目標基因組基因座處的同源重組之任何長度。例如，特定的同源臂及/或相對應的目標序列，可包含相對應的類似區域，例如但不限於，約 5-10kb、5-15kb、5-20kb、5-25kb、5-30kb、5-35kb、5-40kb、5-45kb、5-50kb、5-55kb、5-60kb、5-65kb、5-70kb、5-75kb、5-80kb、5-85kb、5-90kb、5-95kb、5-100kb、100-200kb，或 200-300kb 長度（例如本文其他地方所述），使得同源臂具有足夠的相似性，以與細胞的

目標基因組基因座內或另一靶向載體內的相對應目標序列進行同源重組。在一些實施例中，特定的同源臂及/或相對應的目標序列，可包含相對應的類似區域，例如但不限於，約 10-100kb、15-100kb、20-100kb、25-100kb、30-100kb、35-100kb、40-100kb、45-100kb、50-100kb、55-100kb、60-100kb、65-100kb、70-100kb、75-100kb、80-100kb、85-100kb、90-100kb，或 95-100kb 長度（例如本文其他地方所述），使得同源臂具有足夠的相似性，以與細胞的目標基因組基因座內或另一靶向載體內的相對應目標序列，進行同源重組。

【0221】 第一靶向載體的 3'同源臂和第二靶向載體的 5'同源臂的重疊序列，或第二靶向載體的 3'同源臂和第三靶向載體的 5'同源臂的重疊序列，可為足以促進該靶向載體之間同源重組的任何長度。例如，同源臂的特定重疊序列可包括相對應的重疊區域，其為約 1-5kb、5-10kb、5-15kb、5-20kb、5-25kb、5-30kb、5-35kb、5-40kb、5-45kb、5-50kb、5-55kb、5-60kb、5-65kb、5-70kb、5-75kb、5-80kb、5-85kb、5-90kb、5-95kb、5-100kb、100-200kb，或 200-300kb 長度，使得同源臂具有足夠的相似性，以與細胞的目標基因組基因座內或另一靶向載體內的相對應目標序列進行同源重組。在一些實施例中，特定的同源臂及/或相對應的目標序列，可包含相對應的類似區域，例如但不限於，1-100kb、5-100kb、10-100kb、15-100kb、20-100kb、25-100kb、30-100kb、35-100kb、40-100kb、45-100kb、50-100kb、55-100kb、60-100kb、65-100kb、70-100kb、75-100kb、80-100kb、85-100kb、90-100kb，或 95-100kb 長度，使得同源臂具有足夠的相似性，以與細胞的目標基因組基因座內或另一靶向載體內的相對應目標序列，進行同源重組。在一些實施例中，重疊序列為 1-5kb，包括端值。在一些實施例中，重疊序列為約 1kb 至約 70kb，包括端值。在一些實施例中，重疊序列為約 10kb 至約 70kb，包括端值。在一些實施例中，重疊序列為約 10kb 至約 50kb，包括端值。在一些實施例中，重疊序列至少 10kb。在一些實施例中，重疊序列至少 20kb。例如，重疊序列可為約 1kb 至約 5kb，包括端值、約 5kb 至約 10kb，包括端值、約 10kb 至約 15kb，包括端值、約 15kb 至約 20kb，包括端值、約 20kb 至約 25kb。包括端值、約

25kb 至約 30kb，包括端值、約 30kb 至約 35kb，包括端值、約 35kb 至約 40kb，包括端值、約 40kb 至約 45kb，包括端值、約 45kb 至約 50kb，包括端值、約 50kb 至約 60kb，包括端值、約 60kb 至約 70kb，包括端值、約 70kb 至約 80kb，包括端值、約 80kb 至約 90kb，包括端值、約 90kb 至約 100kb，包括端值、約 100kb 至約 120kb，包括端值、約 120kb 至約 140kb，包括端值、約 140kb 至約 160kb，包括端值、約 160kb 至約 180kb，包括端值、約 180kb 至約 200kb，包括端值、約 200kb 至約 220kb，包括端值、約 220kb 至約 240kb，包括端值、約 240kb 至約 260kb，包括端值、約 260kb 至約 280kb，包括端值，或約 280kb 至約 300kb，包括端值。僅用於舉例，重疊序列可為約 20kb 至約 60kb，包括端值。此外，重疊序列可為至少 1kb、至少 5kb、至少 10kb、至少 15kb、至少 20kb、至少 25kb、至少 30kb、至少 35kb、至少 40kb、至少 45kb、至少 50kb、至少 60kb、至少 70kb、至少 80kb、至少 90kb、至少 100kb、至少 120kb、至少 140kb、至少 160kb、至少 180kb、至少 200kb、至少 220kb、至少 240kb、至少 260kb、至少 280kb，或至少 300kb。在一些實施例中，重疊序列可為至多 400kb、至多 350kb、至多 300kb、至多 280kb、至多 260kb、至多 240kb、至多 220kb、至多 200kb、至多 180kb、至多 160kb、至多 140kb、至多 120kb、至多 100kb、至多 90kb、至多 80kb、至多 70kb、至多 60kb，或至多 50kb。

【0222】 在一些實施例中，同源臂可對應於細胞天然的基因座（例如，靶向基因座），或者它們可對應於整合至細胞基因組中的異源性或外源性 DNA 片段，包括例如轉基因、表達卡匣，或 DNA 的異源或外源區。在一些實施例中，同源臂可對應於細胞中靶向載體上的一個區域。在一些實施例中，靶向載體的同源臂可對應於酵母人工染色體（YAC）、細菌人工染色體（BAC）、人類人工染色體，或適當宿主細胞中包含的任何其他改造區域。此外，靶向載體的同源臂可對應於或衍生自 BAC 庫、黏接質體庫，或 P1 噬菌體庫的區域。在一些實施例中，靶向載體的同源臂對應於原始、異源或外源於原核生物、酵母菌、鳥類（例如雞）、非人類哺乳動物、嚙齒動物、人類、大鼠、小鼠、倉鼠、兔子、豬、牛、鹿、羊、山羊、貓、

狗、雪貂、靈長類動物（如狒狒、恒河猴）、家養哺乳動物、農業哺乳動物，或任何其他有興趣的生物。在一些實施例中，同源臂對應於細胞的基因座，其顯示使用常規方法靶向目標的靈敏度有限，或顯示在靶位點整合成功的情況相對低，及/或顯著的脫靶整合，在沒有由核酸酶試劑（例如 Cas 蛋白）誘發的切口或雙股斷裂的情況下。在一些實施例中，同源臂被設計為包括經改造 DNA。

【0223】 在一些實施例中，靶向載體的 5'和 3'同源臂對應於目標基因組。或者，同源臂對應於相關基因組。例如，目標基因組是第一品系的小鼠基因組，而靶向臂對應於第二品系的小鼠基因組，其中第一品系和第二品系不同。在某些實施例中，同源臂對應於相同動物的基因組，或來自相同品系的基因組，例如，目標基因組是第一品系的小鼠基因組，而靶向臂對應於來自相同小鼠或相同品系的小鼠基因組。

【0224】 靶向載體的同源臂可為具有足以促進與相對應目標序列進行同源重組事件的任何長度，包括例如長度 1-5kb，包括端點、5-10kb，包括端點、5-15kb，包括端點、5-20kb，包括端點、5-25kb，包括端點、5-30kb，包括端點、5-35kb，包括端點、5-40kb，包括端點、5-45kb，包括端點、5-50kb，包括端點、5-55kb，包括端點、5-60kb，包括端點、5-65kb，包括端點、5-70kb，包括端點、5-75kb，包括端點、5-80kb，包括端點、5-85kb，包括端點、5-90kb，包括端點、5-95kb，包括端點、5-100kb，包括端點、100-200kb，包括端點，或 200-300kb，包括端點。在一些實施例中，靶向載體的同源臂可為具有足以促進與相對應目標序列的同源重組事件的任何長度，其為長度 1-100kb，包括端點、5-100kb，包括端點、10-100kb，包括端點、15-100kb，包括端點、20-100kb，包括端點、25-100kb，包括端點、30-100kb，包括端點、35-100kb，包括端點、40-100kb，包括端點、45-100kb，包括端點、50-100kb，包括端點、55-100kb，包括端點、60-100kb，包括端點、65-100kb，包括端點、70-100kb，包括端點、75-100kb，包括端點、80-100kb，包括端點、85-100kb，包括端點、90-100kb，包括端點，或 95-100kb，包括端點。如本文所述，大靶向載體可採用更長的靶向臂。

【0225】 核酸酶試劑（例如，CRISPR/Cas 系統）可與靶向載體組合使用，以促進目標基因座的修飾（例如，修飾 Ig κ 輕鏈基因座，或修飾先前已修飾的或已改造的 Ig κ 輕鏈基因座）。此類核酸酶試劑可促進靶向載體和目標基因座之間的同源重組。當核酸酶試劑與靶向載體組合使用時，靶向載體可包含 5'和 3'同源臂，其對應於位於足夠接近核酸酶切割位點的 5'和 3'目標序列，以在核酸酶切割位點處的切口或雙股斷裂處，促進目標序列和同源臂之間的同源重組事件發生。術語“**核酸酶切割位點**”包括 DNA 序列，在該處（例如，Cas9 切割位點）以核酸酶試劑產生切口或雙股斷裂。目標基因座內對應於靶向載體的 5'和 3'同源臂的目標序列為“**足夠接近**”核酸酶切割位點，若該距離可在識別位點處的切口或雙股斷裂上，促進 5'及 3'目標序列和同源臂之間的同源重組事件發生。因此，在某些實施例中，對應於靶向載體的 5'和/或 3'同源臂的目標序列為在特定識別位點的至少一個核苷酸內，或在特定識別位點的至少 10 個核苷酸至約 14kb 內。在一些實施例中，核酸酶切割位點緊鄰該目標序列之至少一者或二者。

【0226】 對應於靶向載體和核酸酶切割位點的同源臂之目標序列的空間關係可以變化。例如，目標序列可位於核酸酶切割位點的 5'端、目標序列可位於識別位點的 3'端，或目標序列可位於核酸酶切割位點的側翼。

【0227】 與單獨使用靶向載體相較，靶向載體（包括例如大靶向載體）與核酸酶試劑組合使用，可使靶向效率增加。例如，當靶向載體與核酸酶試劑結合使用時，靶向載體的靶向效率可增加至少兩倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少六倍、至少七倍、至少八倍、至少九倍、至少十倍，或在由這些整數形成的範圍內，例如 2-10 倍，與僅使用靶向載體時相較。

【0228】 一些靶向載體為“**大靶向載體**”或“LTVEC”，其包括靶向載體，其含有對應於並源自於某些核酸序列(大於一般用於在細胞中進行同源重組的其他方法者)的同源臂。LTVEC 的長度可為如至少 10kb，或者 5'同源臂和 3'同源臂的總和可為如至少 10kb。LTVEC 亦包括靶向載體，其包含的核酸構建體大於一般用於在細胞中進行同源重組的其他方法的核酸構建體。例如，由於 LTVEC 的大小限制，LTVEC 可使傳統質體-基礎靶向載體無法容納的大基因座修飾成為可能。例如，目標基因座可為（即，5'和 3'同

源臂可對應於)細胞之一基因座，其無法使用常規方法靶向，或其僅可被錯誤地靶向，或僅在效率顯著低的情況下靶向，在由核酸酶試劑(例如 Cas 蛋白)誘發的切口或雙鏈斷裂不存在下。

【0229】 在一些實施例中，本文描述的方法使用二或三個 LTVEC，其能夠在三向或四向重組事件中彼此重組，並與目標基因組基因座重組。這些方法使得使用單一 LTVEC 無法實現的大基因座修飾成為可能。

【0230】 LTVEC 的實例包括衍生自細菌人工染色體(BAC)、人工人類染色體，或酵母菌人工染色體(YAC)的載體。LTVEC 可為線性形式或圓形形式。LTVEC 的實例和製備它們的方法描述於例如美國專利號 6,586,251、6,596,541 和 7,105,348 中；國際專利申請公開號 WO 2002/036789，其中每一者皆經由引用完整併入本文。

提供非人類動物、細胞和組織。

【0231】 提供表現(例如，其 B 細胞表現)抗體的非人類動物，該抗體包含輕鏈，該輕鏈包括由對應於人類 Igλ 輕鏈基因座(即，人類 Vλ 和 Jλ 基因片段的至少一部分)之至少一部分的基因材料整合，而產生的人類 Vλ 結構域，且其編碼一人類 Vλ 結構域(即重排的人類 Vλ-Jλ 序列)，位於非人類動物生殖細胞系基因組中相對應的非人類 Igκ 輕鏈可變區序列處。本文描述的適當實例包括但不限於嚙齒動物，特別是小鼠。

【0232】 本發明提供一種經改良的活體內系統，用於辨識及開發新抗體、抗體成分(例如，抗原結合部分，及/或包含它們的組成物或形式)，及/或抗體-基礎療法，例如，可用於治療影響人類的各種疾病者。此外，本發明亦包括可辨識出具有經改造免疫球蛋白基因座，如經改造免疫球蛋白(Ig)κ(κ)輕鏈基因座，及/或以其他方式表現、產生或含有抗體庫，其特徵為具有人類 Vλ 的輕鏈(λ)區域者)的非人類動物(例如，嚙齒動物)。例如，在一些實施例中，此種非人類動物可用於利用人類 Vλ 序列的多樣性，辨識和開發出新穎之抗體-基礎治療劑。在一些實施例中，本文所述的非人類動物提供改進的活體內系統，用於開發用於人類投藥的抗體及/或抗體-基礎治療劑。在一些實施例中，本文所述的非人類動物提供經

改良的活體內系統，用於開發用於人類投藥的抗體及/或抗體-基礎治療劑，其包含人類 V λ 結構域，特徵為表現度增進（例如，於抗原特異性抗體庫中表現及/或呈現出），與含有人類 V λ 區序列的現有活體內系統獲得的抗體及/或抗體-基礎治療劑相較。

【0233】 本發明尤其提供了具有 Ig κ 輕鏈基因座的非人類動物，其含有經改造免疫球蛋白輕鏈可變區，以及經改造免疫球蛋白輕鏈恆定區基因。如本文所述，所提供的非人類動物在其生殖細胞系基因組中含有免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈可變區，其特徵為存在一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段，其中一或多個人類 V λ 和一或多個人類 J λ 基因片段，係操作性地連結至免疫球蛋白 λ 輕鏈恆定區（C λ ）基因，其中該免疫球蛋白 λ 輕鏈恆定區（C λ ）基因，係位於該非人類動物之內源性免疫球蛋白 κ 基因座的非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區（C κ ）基因處。在一些實施例中，所提供的非人類動物包含 Ig κ 輕鏈基因座，其含有基因間 DNA，其源自於免疫球蛋白 λ 輕鏈及/或免疫球蛋白 κ 輕鏈，及其組合。

【0234】 在許多實施例中，經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈可變區更包含一免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，其定位或插入該一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段。在一些實施例中，該經定位或插入於該一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段之間的免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，為或包含一鼠類（例如，大鼠或小鼠）序列。在一些實施例中，該經定位或插入於該一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段之間的免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，為或包含一人類序列。例如，在一些實施例中，人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列為或包含一基因組序列，其天然存在於人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類 V κ 4-1 基因片段與人類 J κ 1 基因片段之間。

【0235】 在一些實施例中，所提供的非人類動物包含至少 5 個、至少 6 個、至少 7 個、至少 8 個、至少 9 個、至少 10 個、至少 11 個、至少 12 個、至少 13 個、至少 14 個、至少 15 個、至少 16 個、至少 17 個、至少 18 個、至少 19 個、至少 20 個、至少 21 個、至少 22 個、至少 23 個、至少 24 或至少 25 個功能性人類 V λ 基因片段。在一些實施例中，所提供的非人類動

物包含 5 至 25、5 至 24、5 至 23、5 至 22、5 至 21、5 至 20、5 至 19、5 至 18、5 至 17、5 至 16、5 至 15、5 至 14、5 至 13、5 至 12、5 至 11、5 至 10、5 至 9、5 至 8、5 至 7，或 5 至 6 個功能性人類 V λ 基因片段。在一些實施例中，所提供的非人類動物包含 6 至 25、7 至 25、8 至 25、9 至 25、10 至 25、11 至 25、12 至 25、13 至 25、14 至 25、15 至 25、16 至 25、17 至 25、18 至 25、19 至 25、20 至 25、21 至 25、22 至 25、23 至 25，或 24 至 25 個功能性人類 V λ 基因片段。在一些實施例中，所提供的非人類動物包含 6 至 24、7 至 23、8 至 22、9 至 21、10 至 20、11 至 19、12 至 18、13 至 17、14 至 16，或 15 至 16 個功能性人類 V λ 基因片段。在一些實施例中，所提供的非人類動物包含 6 至 24、7 至 23、8 至 22、9 至 21、10 至 20、11 至 19、12 至 18、13 至 17，或 14 至 16 個功能性人類 V λ 基因片段。

【0236】 在一些實施例中，所提供的非人類動物包含總共 10 至 70、10 至 65、10 至 60、10 至 55、10 至 50、10 至 45、10 至 40、10 至 35、10 至 30、10 至 25、10 至 20，或 10 至 15 個人類 V λ 基因片段。在一些實施例中，所提供的非人類動物包含總共 15 至 70、20 至 70、25 至 70、30 至 70、35 至 70、40 至 70、45 至 70、50 至 70、55 至 70、60 至 70，或 65 至 70 個人類 V λ 基因片段。在一些實施例中，所提供的非人類動物包含總共 15 至 65、20 至 60、25 至 55、20 至 50、25 至 45、30 至 40、30 至 35，或 35 至 40 個人類 V λ 基因片段。

【0237】 在一些實施例中，所提供的非人類動物含有天然或生殖細胞系構型的人類 V λ 及/或 J λ 基因片段（例如，含有多個人類 V λ 及/或 J λ 基因片段編碼序列，其間散佈有非編碼人類免疫球蛋白 λ 輕鏈序列的 DNA 序列）。在一些實施例中，所提供的非人類動物含有遠離或偏離天然或生殖細胞系構型的人類 V λ 及/或 J λ 基因片段（例如，含有多個人類 V λ 及/或 J κ 基因片段編碼序列，其間散佈有非編碼免疫球蛋白 λ 輕鏈序列(如人類或鼠類)的 DNA 序列）。在一些實施例中，所提供的非人類動物含有人類 V λ 及/或 J λ 基因片段，其構型並非天然存在於人類細胞生殖細胞系基因組的人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中。

【0238】 在一些實施例中，所提供的非人類動物含有一 DNA 序列，其位於內源性非人類 Igκ輕鏈基因座上，其包括多個人類 Vλ和 Jλ編碼序列，其間散佈(或併列、結合等)非編碼人類免疫球蛋白輕鏈序列（例如，κ，λ及其組合）。在一些實施例中，所提供的非人類動物包含一 DNA 序列，其位於內源性非人類 Igλ輕鏈基因座上，其包括多個人類 Vλ與 Jλ編碼序列，其間散佈有非編碼非人類(如鼠類)免疫球蛋白λ輕鏈序列。

【0239】 在一些實施例中，所提供的非人類動物特徵為表現一抗體，其來自該非人類動物生殖細胞系基因組之內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，該抗體含有（1）人類 Vλ結構域，以及（2）非人類或人類 Cλ結構域。在一些實施例中，所提供的非人類動物特徵為經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座的人類 Vλ區域的利用率增進（例如，但不限於，約 2 倍），與一或多種參考用經改造非人類動物相較。

【0240】 在一些實施例中，係提供一種非人類動物、非人類細胞或非人類組織，其生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其包含：（a）一或多個人類 Vλ基因片段，（b）一或多個人類 Jλ基因片段，以及（c）一 Cλ基因，其中（a）和（b）操作性地連接至（c），其中該嚙齒動物在內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座處，缺乏嚙齒動物 Cκ基因。

【0241】 在一些實施例中，係提供一種非人類動物、非人類細胞或非人類組織，其生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其包含插入一或多個人類 Vλ基因片段、一或多個人類 Jλ基因片段和一 Cλ基因，其中人類 Vλ和 Jλ基因片段係操作性地連結至該 Cλ基因，且其中 Cλ基因插入於該內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之非人類 Cκ基因處。在非人類動物、非人類細胞或非人類組織的許多實施例中，插入於內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之非人類 Cκ基因處之 Cλ基因，為一種非人類或人類 Cλ基因。在一些實施例中，非人類 Cλ基因為或包含一哺乳動物 Cλ基因，其選自於由靈長類動物、山羊、綿羊、豬、狗、牛或嚙齒動物 Cλ基因組成之群組。

【0242】 在一些實施例中，非人類 Cλ基因為或包含嚙齒動物 Cλ基因。

【0243】 在一些實施例中，嚙齒動物 Cλ 基因為或包含小鼠 Cλ 基因。在一些實施例中，小鼠 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由小鼠 Cλ1、小鼠 Cλ2 和小鼠 Cλ3 組成群組之小鼠 Cλ 基因，至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 98% 等同度。在一些實施例中，一小鼠 Cλ 基因包含一序列，其與選自於由小鼠 Cλ1、小鼠 Cλ2 和小鼠 Cλ3 組成群組之小鼠 Cλ 基因，實質上等同或等同。在一些實施例中，小鼠 Cλ1 基因為或包含 SEQ ID NO：1。在一些實施例中，小鼠 Cλ2 基因為或包含 SEQ ID NO：3。在一些實施例中，小鼠 Cλ3 基因為或包含 SEQ ID NO：5。在一些實施例中，小鼠 Cλ 基因包含一序列，其等同於一小鼠 Cλ1 基因。

【0244】 在一些實施例中，小鼠 Cλ 基因包含一序列，其 80% 至 100%、85% 至 100%、90% 至 100%、95% 至 100%，或 98% 至 100% 等同於一小鼠 Cλ 基因，其選自於由小鼠 Cλ1、小鼠 Cλ2 和小鼠 Cλ3 組成之群組。在一些實施例中，小鼠 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由小鼠 Cλ1、小鼠 Cλ2 和小鼠 Cλ3 組成群組之小鼠 Cλ 基因，至少 80% 至 98%、80% 至 95%、80% 至 90%，或 80% 至 85% 之等同度。在一些實施例中，小鼠 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由小鼠 Cλ1、小鼠 Cλ2 和小鼠 Cλ3 組成群組之小鼠 Cλ 基因，85% 至 98%、90% 至 95% 或 88% 至 93% 的等同度。

【0245】 在一些實施例中，嚙齒動物 Cλ 基因為或包含大鼠 Cλ 基因。在一些實施例中，大鼠 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由大鼠 Cλ1、大鼠 Cλ2、大鼠 Cλ3 和大鼠 Cλ4 基因組成群組之大鼠 Cλ 基因，至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 98% 的等同度。在一些實施例中，大鼠 Cλ 基因包含一序列，其與選自於由大鼠 Cλ1、大鼠 Cλ2、大鼠 Cλ3 和大鼠 Cλ4 基因組成群組之大鼠 Cλ 基因，實質上等同或等同。在某些實施例中，大鼠 Cλ1 基因為或包含 SEQ ID NO：7。在某些實施例中，大鼠 Cλ2 基因為或包含 SEQ ID NO：9。在某些實施例中，大鼠 Cλ3 基因為或包含 SEQ ID NO：11。在某些實施例中，大鼠 Cλ4 基因為或包含 SEQ ID NO：13。

【0246】 在一些實施例中，大鼠 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由大鼠 Cλ1、大鼠 Cλ2、大鼠 Cλ3 和大鼠 Cλ4 基因組成群組之大鼠 Cλ 基因，

80%至 100%、85%至 100%、90%至 100%、95%至 100%，或 98%至 100% 的等同度。在一些實施例中，大鼠 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由大鼠 Cλ1、大鼠 Cλ2、大鼠 Cλ3 和大鼠 Cλ4 基因組成群組之大鼠 Cλ 基因，80%至 98%、80%至 95%、80%至 90%，或 80%至 85%的等同度。在一些實施例中，大鼠 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由大鼠 Cλ1、大鼠 Cλ2、大鼠 Cλ3 和大鼠 Cλ4 基因組成群組之大鼠 Cλ 基因，85%至 98%、90%至 95%，或 88%至 93%的等同度。

【0247】 在一些實施例中，人類 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由人類 Cλ1、人類 Cλ2、人類 Cλ3、人類 Cλ6 和人類 Cλ7 基因組成群組之人類 Cλ 基因，至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 98%之等同度。在一些實施例中，人類 Cλ 基因包含一序列，其與選自於由人類 Cλ、人類 Cλ2、人類 Cλ3、人類 Cλ6 和人類 Cλ7 基因組成群組之人類 Cλ 基因，實質上等同或等同。在一些實施例中，人類 Cλ 基因包含一序列，其等同於選自於由人類 Cλ1、人類 Cλ2、人類 Cλ3、人類 Cλ6 和人類 Cλ7 基因組成群組之人類 Cλ 基因。在某些實施例中，人類 Cλ1 基因為或包含 SEQ ID NO：15。在某些實施例中，人類 Cλ2 基因為或包含 SEQ ID NO：17。在某些實施例中，人類 Cλ3 基因為或包含 SEQ ID NO：19。在某些實施例中，人類 Cλ6 基因為或包含 SEQ ID NO：21。在某些實施例中，人類 Cλ7 基因為或包含 SEQ ID NO：23。在某些實施例中，人類 Cλ 基因為或包含人類 Cλ2 基因。

【0248】 在一些實施例中，人類 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由人類 Cλ1、人類 Cλ2、人類 Cλ3、人類 Cλ6 和人類 Cλ7 基因組成群組之人類 Cλ 基因，80%至 100%、85%至 100%、90%至 100%、95%至 100%，或 98%至 100%之等同度。在一些實施例中，人類 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由人類 Cλ1、人類 Cλ2、人類 Cλ3、人類 Cλ6 和人類 Cλ7 基因組成群組之人類 Cλ 基因，80%至 98%、80%至 95%、80%至 90%，或 80%至 85%之等同度。在一些實施例中，人類 Cλ 基因包含一序列，其具有與選自於由人類 Cλ1、人類 Cλ2、人類 Cλ3、人類 Cλ6 和人類 Cλ7 基因

組成群組之人類 C λ 基因，85%至 98%、90%至 95%，或 88%至 93%之等同度。

【0249】 在所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段的插入，係取代內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的非人類 V κ 和 J κ 基因片段。在一些實施例中，插入包括天然出現在人類 V λ 和 J λ 基因片段之間的人類非編碼 DNA，及其組合。在所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段的插入，係位於或取代內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的非人類 V κ 和 J κ 基因片段。在所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含插入至少 24 個、至少 34 個、至少 52 個、至少 61 個，或至少 70 個人類 V λ 基因片段，以及至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個，或至少 5 個人類 J λ 基因片段。在所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含 39 個人類 V λ 基因片段和至少 5 個人類 J λ 基因片段的插入。在所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含插入人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1 或其任一組合，以及人類 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7 或其任一組合。在一些實施例中，插入包括人類非編碼 DNA，其天然出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座之人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，以及人類非編碼 DNA（全部或部分），其天然地出現在鄰近於內源性人 λ 輕鏈基因座之人類 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7。在一些實施例中，插入包括人類非編碼 DNA，其天然出

現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座之人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，以及人類非編碼 DNA，其天然地出現在鄰近於內源性人類 κ 輕鏈基因座之人類 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4，或 J κ 5。在一些實施例中，人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1 或其任一組合的插入，包括人類非編碼 DNA，其天然出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座之人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，以及人類 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7 或其任一組合的插入，包括人類非編碼 DNA（整體或部分），其天然地出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座之人類 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7。在一些實施例中，人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合之插入，包括人類非編碼 DNA，其天然出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座之人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，以及人類 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7 或其任一組合之插入，包括人

類非編碼 DNA（整體或部分），其天然地出現在鄰近於內源性人類 κ 輕鏈基因座之人類 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4，或 J κ 5。

【0250】 在所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，如本文所述的免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含一人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，其介於一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段、一或多個人類 V λ 基因片段，以及一或多個人類 J λ 基因區段，及其組合之間。在一些實施例中，如本文所述的人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列為或包含一基因組序列，其天然地存在介於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類 V κ 4-1 基因片段與人類 J κ 1 基因片段之間。

【0251】 在所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，該非人類動物、非人類細胞或非人類組織的生殖細胞系基因組，更包含一內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包含插入一或多個人類 V_H基因片段、一或多個人類 D_H基因片段，和一或多個人類 J_H基因片段，其中人類 V_H、D_H和 J_H基因片段，係操作性連結至內源性免疫球蛋白重鏈基因座上的非人類免疫球蛋白重鏈恆定區(請參見如，美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 和 8,791,323，其中每一者皆經由引用完整併入本文)。

【0252】 在一些實施例中，插入一或多個人類 V_H基因片段、一或多個人類 D_H基因片段，和一或多個人類 J_H基因片段係替代(in place of)或取代，全部或部分地，非人類 V_H、D_H和 J_H基因片段(例如，以人類 V_H、D_H與 J_H基因片段之編碼序列，定位性地取代或替代非人類 V_H、D_H與 J_H基因片段之編碼序列)。在一些實施例中，插入包括人類非編碼 DNA，其天然地出現在介於人類 V_H、D_H和 J_H基因片段及其組合之間。在一些實施例中，一非人類免疫球蛋白重鏈恆定區為或包含一內源性非人類免疫球蛋白重鏈恆定區。在許多實施例中，非人類免疫球蛋白重鏈恆定區(例如，內源性)包括一或多個非人類免疫球蛋白重鏈恆定區基因或基因片段(例如，IgM、IgD、IgG、IgE、IgA 等)。在某些實施例中，本文所述的免疫球蛋白重鏈基因座包含插入人類 V_H基因片段 V_H3-74、V_H3-73、V_H3-72、V_H2-70、V_H1-69、V_H3-66、V_H3-64、V_H4-61、V_H4-59、V_H1-58、V_H3-53、V_H5-51、

V_H3-49、V_H3-48、V_H1-46、V_H1-45、V_H3-43、V_H4-39、V_H4-34、V_H3-33、V_H4-31、V_H3-30、V_H4-28、V_H2-26、V_H1-24、V_H3-23、V_H3-21、V_H3-20、V_H1-18、V_H3-15、V_H3-13、V_H3-11、V_H3-9、V_H1-8、V_H3-7、V_H2-5、V_H7-4-1、V_H4-4、V_H1-3、V_H1-2、V_H6-1，或其任一組合、人類 D_H 基因片段 D_H1-1、D_H2-2、D_H3-3、D_H4-4、D_H5-5、D_H6-6、D_H1-7、D_H2-8、D_H3-9、D_H3-10、D_H5-12、D_H6-13、D_H2-15、D_H3-16、D_H4-17、D_H6-19、D_H1-20、D_H2-21、D_H3-22、D_H6-25、D_H1-26、D_H7-27，或其任一組合，以及人類 J_H 基因片段 J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5、J_H6，或其任一組合。在某些實施例中，插入包括人類非編碼 DNA，其天然出現在鄰近於內源性重鏈基因座之人類 V_H3-74、V_H3-73、V_H3-72、V_H2-70、V_H1-69、V_H3-66、V_H3-64、V_H4-61、V_H4-59、V_H1-58、V_H3-53、V_H5-51、V_H3-49、V_H3-48、V_H1-46、V_H1-45、V_H3-43、V_H4-39、V_H4-34、V_H3-33、V_H4-31、V_H3-30、V_H4-28、V_H2-26、V_H1-24、V_H3-23、V_H3-21、V_H3-20、V_H1-18、V_H3-15、V_H3-13、V_H3-11、V_H3-9、V_H1-8、V_H3-7、V_H2-5、V_H7-4-1、V_H4-4、V_H1-3、V_H1-2，或 V_H6-1、人類非編碼 DNA，其天然出現在鄰近於人類 D_H1-1、D_H2-2、D_H3-3、D_H4-4、D_H5-5、D_H6-6、D_H1-7、D_H2-8、D_H3-9、D_H3-10、D_H5-12、D_H6-13、D_H2-15、D_H3-16、D_H4-17、D_H6-19、D_H1-20、D_H2-21、D_H3-22、D_H6-25、D_H1-26，或 D_H7-27，以及人類非編碼 DNA，其天然出現在鄰近於內源性重鏈基因座之人類 J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5，或 J_H。

【0253】 在一些實施例中，本文描述的非人類動物在其基因組（例如，其生殖細胞系基因組）中包括一 Adam6 基因，其編碼一 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物，功能同源物或功能片段（請參見如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940，其中每一者皆經由引用完整併入本文）。在一些實施例中，ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段，係由 Adam6 基因表現。在一些實施例中，Adam6 基因並非源自於包含 Adam6 基因的非人類動物（例如，包含大鼠 Adam6 基因或從另一小鼠品系獲得的小鼠 Adam6 基因之小鼠）。在一些實施例中，本文描述的非人類動物包括異位 Adam6 基因。如本文所用，“異位”Adam6 基因是指與野生型非人類動物中出現的 Adam6 基因不同的 Adam6 基因。例如，Adam6

基因可位於不同的染色體上、位於不同的基因座上，或者位於不同序列附近。例示性異位 Adam6 基因是位於人類免疫球蛋白序列（例如，人類重鏈可變區基因片段）內的小鼠 Adam6 基因。在一些實施例中，本文描述的非人類動物包括插入或整合的 Adam6 基因。

【0254】 在一些實施例中，本文描述的非人類動物包括在其基因組（例如，其生殖細胞系基因組）中，插入編碼一或多個非人類 Adam6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列。

【0255】 在一些實施例中，本文描述的非人類動物包括在其基因組（例如，其生殖細胞系基因組）中編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列。在一些實施例中，本文描述的非人類動物在其基因組（包括其生殖細胞系基因組）中包括小鼠 Adam6a 基因及/或小鼠 Adam6b 基因。在一些實施例中，本文描述的非人類動物包括小鼠 ADAM6a、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段，及/或小鼠 ADAM6b、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段之一或多個核苷酸序列。

【0256】 在一些實施例中，編碼一或多種非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列，係插入及/或位於內源性免疫球蛋白重鏈基因座之同一染色體上。在一些實施例中，編碼非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列，係插入及/或位於一位置，使得該編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段之一或多個核苷酸序列，係與人類免疫球蛋白重鏈可變區基因片段鄰接。在一些實施例中，編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列，係插入及/或位於一位置，使得該編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段之一或多個核苷酸序列，係鄰近於人類免疫球蛋白重鏈可變區基因片段。在一些實施例中，編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列，係插入及/或位於一位置，使得該編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、

其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段之一或多個核苷酸序列，係介於人類免疫球蛋白重鏈可變區基因片段之間。在一些實施例中，編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列，係插入及/或位於第一與第二人類 V_H 基因片段之間。在一些實施例中，第一人類 V_H 基因片段為人類 V_H1-2，以及第二人類 V_H 基因片段為人類 V_H6-1。在一些實施例中，編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列，係插入及/或位於人類 Adam6 偽基因處。在一些實施例中，編碼一或多個非人類 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、功能同源物或功能片段的一或多個核苷酸序列，係插入人類 V_H 基因片段與人類 D_H 基因片段之間。

【0257】 在一些實施例中，本文描述的非人類動物包括可恢復或增強 ADAM6 活性的 Adam6 基因。在一些實施例中，Adam6 基因可將 ADAM6 活性恢復至包括功能性、內源性 Adam6 基因之可比較的非人類動物的位準。在一些實施例中，Adam6 基因可將 ADAM6 活性增強為不包含該功能性 Adam6 基因的可比較非人類動物的 ADAM6 活性之至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍，或至少 10 倍。

【0258】 在一些實施例中，本文描述的非人類動物包括恢復或增強雄性非人類動物生育力的 Adam6 基因。在一些實施例中，Adam6 基因可將雄性非人類動物的生育力恢復至包括功能性、內源性 Adam6 基因的可比較非人類動物的位準。在一些實施例中，Adam6 基因可恢復雄性非人類動物的生育力，使得該雄性非人類動物經由交配產生的幼崽數量，為不包括該功能性 Adam6 基因之可比較雄性非人類動物交配產生的幼崽數量之至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%。在一些實施例中，Adam6 基因可增強雄性非人類動物的生育力，使得該雄性非人類動物經由交配產生的幼崽數量，為不包括該功能性 Adam6 基因之可比較雄性非人類動物交配產生的幼崽數量之至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 6 倍、至少 7 倍、至少 8 倍、至少 9 倍，或至少 10 倍。

【0259】 在一些實施例中，如本文所述的非人類免疫球蛋白重鏈基因座缺乏至少一內源性非人類 Adam6 基因。在一些實施例中，缺乏至少一內源性非人類 Adam6 基因，會降低缺乏內源性非人類 Adam6 基因的雄性小鼠之 ADAM6 活性及/或生育力。在一些實施例中，如本文所述的非人類免疫球蛋白重鏈基因座包括至少一內源性非人類 Adam6 基因的破壞。在一些實施例中，至少一內源性非人類 Adam6 基因的破壞降低了缺乏內源性非人類 Adam6 基因的雄性小鼠之 ADAM6 活性及/或生育力。

【0260】 在非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，該非人類動物、非人類細胞或非人類組織的內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子或異型合子，如本文所述。

【0261】 在非人類動物、非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，該非人類動物、非人類細胞或非人類組織的內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座為同型合子或異型合子，如本文所述。

【0262】 在所提供的非人類動物，非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，該內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座係完全或部分刪去。在所提供的非人類動物，非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座為功能性靜默或不具功能性（例如，基因靶向）。在所提供的非人類動物，非人類細胞或非人類組織的一些實施例中，該非人類動物，非人類細胞或非人類組織的功能性靜默或不具功能之內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座為同型合子或異型合子，如本文所述。

【0263】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物、非人類細胞或非人類組織，係不可偵測地表現內源性免疫球蛋白λ輕鏈、內源性免疫球蛋白κ輕鏈，或內源性免疫球蛋白λ輕鏈，以及內源性免疫球蛋白κ輕鏈。

【0264】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物，非人類細胞或非人類組織具有一基因組，其更包含一編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）的核酸序列，其操作性連結至一轉錄控制單元。

【0265】 在一些實施例中，轉錄控制單元包括 RAG1 轉錄控制單元、RAG2 轉錄控制單元、免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白κ輕鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白λ輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。

【0266】 在一些實施例中，編碼外源性 TdT 的核酸序列係位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座，或 RAG2 基因座。

【0267】 在一些實施例中，該 TdT 為人類 TdT。在一些實施例中，該 TdT 為 TdT 的短同種型（TdTS）。

【0268】 在一些實施例中，人類 Ig λ 輕鏈序列包含來自（例如，分離或得自），或與人類 Ig λ 輕鏈基因座相同的基因材料，其中人類 Ig λ 輕鏈序列編碼一 Ig 輕鏈，其包含來自人類 Ig λ 輕鏈基因座的基因材料之編碼部分。在一些實施例中，如本文所述的人類 Ig λ 輕鏈序列包含至少一人類 V λ 基因片段和至少一人類 J λ 基因片段，以及促進該至少一人類 V λ 基因片段與該至少一人類 J λ 基因片段重排所必需的一或多個序列（例如，重組訊號序列），以形成功能性重排的人類 V λ -J λ 序列，其編碼人類 V λ 結構域。在許多實施例中，人類 Ig λ 輕鏈序列包含多個人類 V λ 和 J λ 基因片段，以及促進該人類 V λ 基因片段與 J λ 基因片段重排所必需的一或多個序列。在許多實施例中，人類 Ig λ 輕鏈序列包含至少一或多個人類 V λ 基因片段的編碼序列（例如，外顯子），以及至少一或多個人類 J λ 基因片段的編碼序列（例如，外顯子）。在一些實施例中，如本文所述的人類 Ig λ 輕鏈序列為人類 Ig λ 輕鏈基因座的基因組序列（例如，從細菌人工染色體分離出及/或複製出），並包含多個人類生殖細胞系結構中的 V λ 基因片段。在一些實施例中，人類 Ig λ 輕鏈序列包含生殖細胞系結構中的人類 V λ 和 J λ 序列（即基因片段）（即，經由干預 DNA 而分離出的多個人類 V λ 基因片段，該 DNA 包括重組必需和促進的序列，以及藉由干預 DNA 而分離出的多個 J λ 基因片段，該 DNA 包括重組必需和促進的序列）。

【0269】 在一些實施例中，如本文所述的人類 Ig λ 輕鏈序列為經改造序列，並包含多個人類 J λ 基因片段，其構型不同於在人類細胞中出現的人類 Ig λ 輕鏈基因座。在一些實施例中，如本文所述的人類 Ig λ 輕鏈序列為經改造序列，並包含多個人類 V λ 和 J λ 基因片段，其構型相似於或類似於野生型鼠類或人類細胞中出現的 Ig κ 輕鏈基因座。在一些實施例中，人類 Ig λ 輕鏈序列包含經改造人類 J λ 序列（即，經由重新 DNA 合成製備的人類 J λ 基

因片段的編碼序列，其包括與一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段重組所必需和促進的序列。在一些實施例中，人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列包含 $Ig\kappa$ 和 $Ig\lambda$ 序列，其分別天然地出現在 $Ig\kappa$ 與 $Ig\lambda$ 基因組序列中。在某些實施例中，人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列包含 $Ig\kappa$ 序列，特別是 $J\kappa$ 區域（即，包含編碼和非編碼序列之一序列，其出現在含有多個 $J\kappa$ 基因片段的區域），其天然地出現在 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座中，除了該 $Ig\kappa$ 序列含有 $J\lambda$ 基因片段和 $J\lambda 12RSS$ 的編碼序列，位於 $J\kappa$ 基因片段和 $J\kappa 23RSS$ 的相對應編碼序列位置上之外。在某些實施例中，人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列包含多個 $J\lambda$ 基因片段和 $J\lambda 12RSS$ ，位於 $J\kappa$ 區域序列的 $J\kappa$ 基因片段和 $J\kappa 23RSS$ 位置上。在各實施例中，包含重組所必需和促進的序列之干預（或基因間）DNA，包括人類 $Ig\kappa$ 及/或人類 $Ig\lambda$ 基因組序列。此外，在一些實施例中，包括重組所必需和促進序列之干預（或基因間）DNA，包括鼠類 $Ig\kappa$ 及/或鼠類 $Ig\lambda$ 基因組序列。

【0270】 在某些實施例中，人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列為或包含出現在附圖中的序列。在一些實施例中，人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列編碼，或能夠編碼（例如，在人類基因片段重排後）一 $V\lambda$ 結構域多胜肽，其中 $V\lambda$ 結構域多胜肽出現在一免疫球蛋白中，特別是由人類 B 細胞表現的免疫球蛋白。亦提供用於製造非人類動物、非人類胚胎和細胞的非人類動物、胚胎、細胞與靶向構築體，含有該人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列，位於相對應的非人類 $Ig\kappa$ 輕鏈序列處（例如，內源性嚙齒動物 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座）。

【0271】 在一些實施例中，一人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列係插入非人類動物生殖細胞系基因組內相對應之非人類 $Ig\kappa$ 輕鏈序列的位置上。在一些實施例中，一人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列係插入於一非人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列（例如，非人類 $Ig\lambda$ 輕鏈恆定區基因序列）的上游，其中該非人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列係位於非人類 $Ig\kappa$ 輕鏈序列的位置上（例如，非人類 $Ig\kappa$ 輕鏈恆定區基因序列）。在一些實施例中，一人類 $Ig\kappa$ 輕鏈序列係插入該人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列的中間段（即，介於人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段之間），使得該人類 $Ig\kappa$ 輕鏈序列與人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列並置。

【0272】 在一些實施例中，非人類 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座上的所有或實質上所有的可變區，經一或多個人類 $Ig\lambda$ 輕鏈序列（如本文所述）取代或替換，

且該一或多個人類 Igλ輕鏈序列係操作性連結至一非人類或人類 Igλ輕鏈恆定區基因。在一些實施例中，非人類 Igκ輕鏈恆定區基因在包括如本文所述的人類 Ig λ輕鏈序列的非人類動物中，經刪去或被取代。在一非限制性實施例中，在插入非人類 Igκ輕鏈基因座的人類 Igλ輕鏈序列的情況下，該插入係以保持插入點（例如，非人類 Igκ內含子增強子，及/或非人類 Igκ3'增強子）附近的非人類 Igκ輕鏈增強子區（或增強子序列）之完整性的方式進行。因此，此類非人類動物具有野生型 Igκ輕鏈增強子區域（或增強子序列），其操作性地連結至人類和非人類 Igλ輕鏈序列（例如，人類 Vλ和 Jλ基因片段，以及非人類 Cλ區域基因），或操作性連結至人類 Igλ輕鏈序列（例如人類 Vλ和 Jλ基因片段，以及人類 Cλ區域基因）。在一些實施例中，非人類 Igκ輕鏈基因座，其以本文所述的一或多個人類 Igλ輕鏈序列改變、置換、破壞、刪去、取代或改造，為鼠類 Igκ輕鏈基因座。在一些實施例中，如本文所述的一或多個人類 Igλ輕鏈序列，係插入該非人類 Igκ輕鏈基因座兩個複製版本之非人類 Igκ輕鏈基因座之一個複製版本（即等位基因）中，而產生一非人類動物，其人類 Igκ輕鏈序列為異型合子。在非人類動物的一些實施例中，其人類 Igκ輕鏈序列為異型合子，該非人類動物包括一或多個人類 Igκ輕鏈序列，其插入該非人類 Igκ輕鏈基因座的另一個複製版本（即，等位基因）。在一些實施例中，係提供一種非人類動物，其 Igκ輕鏈基因座為同型合子，其包括如本文所述的一或多個人類 Igλ輕鏈序列。

【0273】 在一些實施例中，如本文所述的經改造非人類 Igκ輕鏈基因座包含人類 Vλ和 Jλ基因片段，其操作性地連結至一非人類或人類 Igλ輕鏈恆定區基因，其中該非人類或人類 Igλ輕鏈恆定區基因，係位於一非人類 Igκ輕鏈恆定區基因處，該基因出現在同一物種的非人類動物之野生型 Igκ輕鏈基因座中。

【0274】 在一些實施例中，一內源性非人類 Igλ輕鏈基因座之一或多個內源性非人類 Igλ輕鏈序列(或其部分)未被刪去。在一些實施例中，一內源性非人類 Igλ輕鏈基因座的一或多個內源性非人類 Igλ輕鏈序列(或其部分)係被刪去。在一些實施例中，一內源性非人類 Igλ輕鏈基因座上的一

或多個內源性非人類 Ig λ 輕鏈序列（例如，V、J 及/或 C，或其任一組合），係被改變、置換、破壞、刪除或取代，使得該非人類 Ig λ 輕鏈基因座為功能性靜默。在一些實施例中，一內源性非人類 Ig λ 輕鏈基因座上的一或多個內源性非人類 Ig λ 輕鏈序列（例如，V、J 及/或 C，或其任一組合），係被改變、置換、破壞、刪除或取代，使得該非人類 Ig λ 輕鏈基因座為功能性失活（即，無法產生具功能性之抗體輕鏈，其可於人類動物的抗體庫中表現出及/或可偵測出）。例如美國專利 No.9,006,511（請參見如圖 2）中提供了內源性非人類 Ig λ 輕鏈基因座失活的指南，其經由引用完整併入本文。

【0275】 在一些實施例中，非人類動物含有如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座，其隨機整合至其基因組中（例如，作為隨機整合的人類 Ig λ 輕鏈序列的一部分）。因此，此類非人類動物可被描述為具有人類 Ig λ 輕鏈轉基因，其含有多個人類 V λ 和 J λ 基因片段，係操作性地連結至非人類或人類 Ig λ 輕鏈恆定區基因，以及非人類 Ig κ 輕鏈增強子區域（或增強子序列），使得該人類 V λ 和 J λ 基因片段能夠重排，並編碼非人類動物表現庫中的抗體之 Ig 輕鏈，其中該 Ig 輕鏈包括人類 V λ 結構域和非人類 C λ 結構域，或其中該 Ig 輕鏈包括人類 V λ 和 C λ 結構域。可使用多種方法偵測如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座或轉基因，包括如 PCR、西方墨漬法、南方墨漬法、限制片段長度多樣性（RFLP），或等位基因獲得或缺失試驗。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物之經改造 Ig κ 輕鏈基因座為異型合子，如本文所述。在一些實施例中，本文所述的非人類動物之經改造 Ig κ 輕鏈基因座為半合子，如本文所述。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物含有經改造 Ig κ 輕鏈基因座或轉基因的一或多個複製版本，如本文所述。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物含有如圖中所示的 Ig κ 輕鏈基因座。

【0276】 本發明認知到如本文所述的非人類動物將利用其基因組中包含的人類重鏈、 λ 輕鏈和 κ 輕鏈可變區基因片段，於其抗體篩選和產生機制中（例如，重組和體細胞高度突變）。因此，在各實施例中，由本文所述的非人類動物產生的人類免疫球蛋白人類重鏈、 λ 輕鏈和 κ 輕鏈可變結構

域，係由人類重鏈、 λ 輕鏈與 κ 輕鏈可變區基因片段編碼，其分別包括在其基因組中或其體細胞高度突變的變異體中。

【0277】 在一些實施例中，提供了一種非人類動物，其基因組包含經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其中該非人類動物包括 B 細胞，其包括人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列、及/或體細胞高度突變的人類 κ 輕鏈可變區序列。在一些實施例中，存在於本發明小鼠 B 細胞中的人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈，及/或人類 κ 輕鏈可變區序列，具有 1、2、3、4、5，或更多個體細胞高度突變。本領域技術人員已知用於辨識成熟抗體序列中的來源基因片段的方法。例如，可使用各種工具來輔助此分析，例如，DNAPLOT、IMGT/V-QUEST、JOINSOLVER、SoDA 及 Ab-origin。

【0278】 尤其是，本發明提供如本文所述的非人類動物之細胞和組織。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之脾細胞（及/或其他淋巴組織）。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之 B 細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之原始 B 細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之前驅 B 細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之未成熟 B 細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之成熟初始 B 細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之活化 B 細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之記憶 B 細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之 B 譜系淋巴細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之漿體或漿細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之幹細胞。在一些實施例中，幹細胞為胚胎幹細胞。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之生殖細胞。在一些實施例中，生殖細胞為卵母細胞。在一些實施例中，生殖細胞為精細胞。一些實施例中，如本文所述的非人類動物之精細胞，係表現一或多種 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、功能性同源物或功能片段。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物之任何細胞或組織可被分離出。在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物之經分離細胞及/或經分離組織。在一些實施例中，係提供一種融合瘤，其中該融合瘤係由本文所述的非人類動物 B 細胞

製備。在一些實施例中，融合瘤係由以有興趣抗原進行免疫化的非人類動物的 B 細胞製備。在一些實施例中，融合瘤係以非人類動物的 B 細胞製備，該 B 細胞表現結合（例如，特異性結合）至有興趣抗原上的表位之抗體。

【0279】 如本文所述的任何非人類動物，可在足以使該非人類動物對一或多個有興趣抗原產生免疫反應的條件和時間下，以一或多種有興趣抗原進行免疫化。本領域技術人員已知使非人類動物免疫化的方法。作為使非人類動物免疫化的例示性、非限制性方法，可見於 US 2007/0280945A1，其經由引用完整併入本文。

【0280】 尤其是，本揭示提供如本文所述的經免疫化非人類動物，以及由其分離出的細胞和組織。在一些實施例中，本文所述的非人類動物係回應以包含一或多個表位之抗原進行的免疫化，而產生 B 細胞群。在一些實施例中，非人類動物會產生 B 細胞群，其表現結合（例如，特異性結合）至有興趣抗原的一或多個表位之抗體。在一些實施例中，由回應抗原而產生的 B 細胞群表現的抗體包括一具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域的重鏈，及/或一具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼之人類 λ 輕鏈可變結構域的 λ 輕鏈。在一些實施例中，由回應抗原而產生的 B 細胞群所表現之抗體包括 (i) 一重鏈，具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域，(ii) 一 λ 輕鏈，其具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼之人類 λ 輕鏈可變結構域 (iii) 一 κ 輕鏈，其具有由如本文所述人類 κ 輕鏈可變區序列編碼之人類 κ 輕鏈可變結構域，或 (iv) 其任一組合。

【0281】 在一些實施例中，非人類動物產生 B 細胞群，其表現與有興趣抗原的一或多個表位結合之抗體，其中由回應抗原而產生的 B 細胞群所表現的抗體包括：(i) 一重鏈，具有由人類重鏈可變區序列編碼之人類重鏈可變結構域，(ii) 一 λ 輕鏈，具有由如本文所述人類 λ 輕鏈可變區序列編碼的 λ 輕鏈可變結構域，(iii) 一 κ 輕鏈，具有由如本文所述人類 κ 輕鏈可變區序列編碼之人類 κ 輕鏈可變結構域編碼，或 (iv) 其任一組合。在一些實施例中，如本文所述之人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列，及/或人類 κ 輕鏈可變區序列為體細胞高度突變。在一些實施例中，

由回應抗原而產生的 B 細胞群中的 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%之 B 細胞，包括一人類重鏈可變區序列、一人類 λ 輕鏈可變區序列，及/或一人類 κ 輕鏈可變區序列，其為體細胞高度突變性。

【0282】 在一些實施例中，本文提供的非人類動物，在其生殖細胞系基因組中，（1）包括經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含（a）一或多個人類 V λ 基因片段，（b）一或多個人類 J λ 基因片段，以及（c）一 C λ 基因，其中該一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段，係操作性地連結至該 C λ 基因，（2）在經改造內源性免疫球蛋白 κ 基因座處，缺乏嚙齒動物 C κ 基因，以及（3）包括經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含（a）一或多個人類 V κ 基因片段，（b）一或多個人類 J κ 基因片段，以及（c）一 C κ 基因，其中該一或多個人類 V κ 基因片段和一或多個人 J κ 基因片段，係操作性連結至該 C κ 基因。在一些實施例中，此種非人類動物的脾細胞中的輕鏈(其為 λ 輕鏈)百分比（例如，如藉由流式細胞術偵測或觀察到的（請參見例如實例 3））為至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%，或至少 75%。在一些實施例中，此種非人類動物的脾細胞中的輕鏈(其為 λ 輕鏈)百分比（例如，如藉由流式細胞術偵測或觀察到的（請參見例如實例 3））介於 35-80%、介於 35-75%、介於 40-80%、介於 40-75%、介於 50-80%、介於 50-75%、介於 55-80%、介於 55-75%、介於 60-80%，或介於 60-75%。在一些實施例中，此種非人類動物的脾細胞中的輕鏈(其為 κ 輕鏈)百分比（例如，如藉由流式細胞術偵測或觀察到的（請參見例如實例 3））至多為 65%、至多 60%、至多 55%、至多 50%、至多 45%、至多 40%，或至多 35%。在一些實施例中，此種非人類動物的脾細胞中的輕鏈(其為 κ 輕鏈)百分比（例如，如藉由流式細胞術偵測或觀察到的（請參見例如實例 3））介於 20-65%、介於 25-65%、介於 20-60%、介於 25-60%、介於 20-55%、介於 25-55%、介於 20-50%、介於 25-50%、介於 20-45%、介於 25-45%、介於 20-40%，或介於 25-40%。在一些實施例中，此類非人類動物的脾細胞中的 κ ： λ 輕鏈的比例（例如，如藉由流式細胞術偵測或觀察到的

(請參見例如實例 3)) 介於 0.5:1 至 3:1、0.65:1 至 3:1、介於 0.8:1 至 3:1、介於 1:1 至 3:1、介於 1.2:1 至 3:1、介於 1:1 至 2.3:1、介於 1.1:1 至 1.8:1、介於 1.2:1 至 2.3:1，或介於 1.2:1 至 1.8:1。

製造所提供之非人類動物的方法

【0283】 係提供用於製備非人類動物的組成物與方法，該動物的生殖細胞系基因組包含經改造 **Igκ** 輕鏈基因座，其包括一或多個人類 **Igλ** 輕鏈序列（例如，人類 **Vλ** 和 **Jλ** 基因片段），係位於非人類 **Igκ** 輕鏈序列處，其包括人類 **Igλ** 輕鏈編碼序列，其包括人類 **Vλ** 和 **Jλ** 片段的特異性多樣性（例如，特異性 **V** 及/或 **J** 等位基因或變異體），包括用於製備非人類動物的組成物和方法，該動物表現包含 **Igλ** 輕鏈的抗體，該輕鏈包含人類可變區和非人類或人類恆定區，由 **Igκ** 輕鏈基因座組裝而成，其含有人類 **Vλ** 和 **Jλ** 基因片段，操作性連結至非人類或人類 **Igλ** 輕鏈恆定區基因，其中該非人類或人類 **Igλ** 輕鏈恆定區基因係位於非人類 **Igκ** 輕鏈恆定區基因處，其通常出現在野生型非人類 **Igκ** 輕鏈基因座中。在一些實施例中，亦提供一種製備非人類動物的組成物與方法，該動物在內源性 **Igκ** 增強子及/或內源性 **Igκ** 調控序列的控制下，表現此類抗體。在一些實施例中，亦提供一種製備非人類動物的組成物與方法，該動物在異源性 **Igκ** 增強子及/或異源性 **Igκ** 調控序列的控制下，表現此類抗體。

【0284】 本文描述的方法包括插入人 **Vλ** 和 **Jλ** 序列，其編碼非人類或人類 **Igλ** 輕鏈恆定區基因的人類 **Vλ** 結構域上游（例如，小鼠或人類的 **Cλ** 區域基因），其中該非人類或人類 **Igλ** 輕鏈恆定區基因係位於非人類 **Igκ** 輕鏈恆定區基因處，其通常出現在野生型非人類 **Igκ** 輕鏈基因座，以表現抗體，該抗體的特徵為存在含有人類 **Vλ** 結構域和非人類 **Cλ** 結構域（例如，嚙齒動物 **Cλ** 結構域）的輕鏈，或存在含有人類 **Vλ** 和非人類 **Cλ** 結構域（例如，一或多個嚙齒動物 **Cλ** 結構域）的輕鏈，並表現於 **B** 細胞表面以及非人類動物的血清中。

【0285】 在一些實施例中，該方法包括將含有人類 **Vλ** 和 **Jλ** 基因片段的基因材料，插入 **Igκ** 輕鏈基因座（例如，野生型、經修飾或經改造的 **Igκ** 輕

鏈基因座)。在某些實施例中，該方法包括將含有人類 J λ 基因片段的基因材料，插入經修飾或經改造品系的 Ig κ 輕鏈基因座中。在一些實施例中，含有人類 Ig λ 輕鏈序列的基因材料可被改造或基因組化(例如，由細菌人工染色體中複製出)。在一些實施例中，含有人類 Ig λ 輕鏈序列的基因材料可由公開來源，及/或細菌人工染色體中設計，使得該基因材料含有人類 V λ 和 J λ 片段，其方向不同於人類 Ig λ 輕鏈基因座中出現者，但該基因材料仍含有可支持該人類 V λ 和 J λ 片段重排的序列，以編碼 Ig 輕鏈之功能性人類 V λ 結構域。舉例而言，可使用本文提供的指南，設計對應於多個人類 V λ 和 J λ 基因片段的基因材料，以構建一人類 Ig λ 輕鏈序列，其含有具不同於人類細胞之人類 Ig λ 輕鏈基因座上出現的順序及/或排列之人類 V λ 和 J λ 片段(例如，相似於或類似於人類或嚙齒動物 Ig κ 輕鏈基因座的排列，例如，一系列 V 基因片段，藉由在 3' 插入干預 DNA，隨後接 3' 一系列 J 基因片段)。在此實例中，人類 V λ 和 J λ 基因片段的基因材料將等同於人類細胞中的相對應片段，然而，順序和排列可能不同。當建構經改造 Ig κ 輕鏈基因座，以產生如本文所述的非人類動物時，可配置必需的重組訊號序列，使得該人類 V 和 J 基因片段可正確地重排，並形成功能性人類 V λ 結構域。人類 V λ 和 J λ 基因片段的生殖細胞系構型和適當重組所必需的序列指南，可參見如 Molecular Biology of B Cells, London: Elsevier Academic Press, 2004, Honjo, T., Alt, F.W., Neuberger, M. 編, 第 4 章(37-59 頁)及第 5 章(61-82 頁)；其經由引用完整併入本文。

【0286】 在一些實施例中，該方法包括在單一 ES 細胞複製株中的多次插入。在一些實施例中，該方法包括在連續的 ES 細胞複製株中進行的依序插入。在一些實施例中，該方法包括在改造 ES 細胞複製株中進行的單次插入。

【0287】 在一些實施例中，該方法包括在鼠類 C λ 1 基因(或人類 C λ 2 基因)上游的 DNA 插入，使得該 DNA 插入係操作性連結至該鼠類 C λ 1 基因(或人類 C λ 2 基因)，其中 DNA 插入包含人類 V λ 基因片段 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、

V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合，以及人類 J λ 基因片段 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合，以及其中該鼠類 C λ 1 基因(或人類 C λ 2 基因)係位於內源性 Ig κ 輕鏈基因座的鼠類 C κ 基因處。

【0288】 在一些實施例中，該方法包括將 DNA 插入人類 V λ 3-1 基因片段下游和經改造 Ig κ 輕鏈基因座的非人類 Ig κ 內含子增強子區（或增強子序列）上游，使得該 DNA 插入係操作性連結至小鼠 C λ 1 基因（或人類 C λ 2 基因），其中該 DNA 插入包含一人類 Ig κ 基因組序列，其天然地出現在介於人類 Ig κ 輕鏈基因座的人類 V κ 4-1 基因片段和人類 J κ 1 基因片段之間，以及一或多個人類 J λ 基因片段（例如，一、二、三、四、五、六或七），其中小鼠 C λ 1 基因（或人類 C λ 2 基因）係位於內源性非人類 Ig κ 輕鏈基因座之小鼠 C κ 基因位置處。在某些實施例中，該方法包括將 DNA 插入至人類 V λ 3-1 基因片段和非人類 Ig κ 內含子增強子之間，其中該 DNA 插入包括人類 V κ -J κ 序列，其天然地出現在人類 Ig κ 輕鏈基因座的人類 V κ 4-1 和 J κ 1 基因片段，與 5 個人類 J λ 基因片段之間（例如，J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 和 J λ 7）。在各實施例中，包括人類 J λ 基因片段的 DNA 插入，包含具有人類 J λ 基因片段和人類 J λ 12RSS 的編碼序列之人類 J κ 基因組 DNA。

【0289】 使用本文所述的方法可達成插入額外的人類 V λ 和 J λ 片段，以進一步補充經改造 Ig λ 輕鏈基因座的多樣性。例如，在一些實施例中，該方法可包括插入約 270kb 的 DNA 至經改造 Ig κ 輕鏈基因座的鼠類 C λ 1 基因（或人類 C λ 2 基因）上游，使得該 DNA 可操作性連結至該小鼠 C λ 1 基因（或人類 C λ 2 基因），其中該 DNA 包括人類 V λ 基因片段 V λ 10-54、V λ 6-57、V λ 4-60、V λ 8-61 與 V λ 4-69。在此類實施例中，該 DNA 插入人類 V λ 5-52 基因片段的上游，該基因片段係操作性連結至經改造 Ig κ 輕鏈基因座的小鼠 C λ 1 基因（或人類 C λ 2 基因），其中該 DNA 包括人類 V λ 基因片段 V λ 10-54、V λ 6-57、V λ 4-60、V λ 8-61 和 V λ 4-69。在某些實施例中，該 DNA 包括人類 VpreB 基因。上述額外的人類 V λ 基因片段可直接從市售的 BAC 複製株複製出，並使用本文所述或本領域已知的重組技術，排列

在較小的 DNA 片段中。此外，可合成上述額外的人類 V λ 基因片段作為經改造 DNA 片段，並使用本領域已知的分子生物學技術，將其加入至如上所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座中。同樣地，額外的人類 J λ 基因片段可得自市售的 BAC 複製株，或直接從公開的序列合成。如本文所述的非人類動物經改造 Ig κ 輕鏈基因座的例示性說明，係列於圖 2B 或 4B 中。

【0290】 在適當的情況下，編碼人類 V λ 結構域的人類 Ig λ 輕鏈序列（即，包含人類 V λ 和 J λ 基因片段的序列）可分別修飾，以包括在非人類動物中表現最佳化的密碼子（例如，請參見美國專利號 5,670,356 和 5,874,304）。密碼子最佳化序列為經改造序列，且較佳編碼由非密碼子最佳化親代多核苷酸編碼的同一多胜肽（或具有與全長多胜肽實質上相同活性的全長多胜肽生物活性片段）。在一些實施例中，編碼人類 V λ 結構域的人類 Ig λ 輕鏈序列，可分別包括經改變的序列，以最佳化特定細胞類型（例如嚙齒動物細胞）的密碼子使用。例如，待插入至非人類動物（例如嚙齒動物）基因組中的每一核苷酸序列的密碼子可經最佳化，以在非人類動物的細胞中表現。這種序列可描述為密碼子最佳化序列。

【0291】 編碼人類 V λ 結構域的核苷酸序列之插入，係使用如本文所述的非人類動物生殖細胞系基因組的最低修飾，並導致包含具有人類 V λ 結構域的輕鏈之抗體表現，其中人類 V λ 結構域由內源性經改造 Ig κ 輕鏈基因座表現。產生經改造非人類動物的方法，包括剔除和嵌入，為本領域已知（請參見，例如，Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner 編, Oxford University Press, Inc., 2000；其經由引用完整併入本文）。例如，基因改造嚙齒動物的產生可任選地涉及破壞一或多個內源性嚙齒動物基因（或基因片段）的基因座，並引入一或多個異源性基因（或基因片段或核苷酸序列）至該嚙齒動物基因組中，在一些實施例中，在與內源性嚙齒動物基因（或基因片段）相同的位置上。在一些實施例中，編碼人類 V λ 結構域的核苷酸序列，係被引入嚙齒動物生殖細胞系基因組中隨機插入的經改造輕鏈轉基因之鼠類或人類 Ig λ 輕鏈恆定區基因上游。在一些實施例中，編碼人類 V λ 結構域的核苷酸序列，係引入嚙齒動物生殖細胞系基因組中的內源性 Ig κ 輕鏈基因座上之鼠類或人類 Ig λ 輕鏈恆定區基因的上游；在某些實施例

中，內源性 Ig κ 輕鏈基因座被改變、修飾或改造，以含有與小鼠 C λ 1 基因操作性連接或與人類 C λ 2 基因操作性連接的人類 Ig λ 基因片段（例如，人類 V 和 J）。

【0292】 用於構建如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座的例示性方法之示意圖（未按比例），係提供於圖 1A、1B、2A、2B、3、4A 和 4B 中。特別地，圖 1A 和 1B 列出了構建經改造 Ig κ 輕鏈基因座的例示性策略，其特徵在於插入含有多個人類 V λ 和 J λ 基因片段的核苷酸序列。如圖 1A 和 1B 所示，含有人類 V κ - J κ 基因間區域的 DNA 片段（請參見美國專利號 9,006,511、9,012,717、9,029,628、9,035,128、9,066,502、9,150,662 和 9,163,092）和含有一組人類 J λ 基因片段（例如，人類 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 與 J λ 7）之經改造片段，係操作性連結至一嚙齒動物 Ig κ 內含子增強子區域（或增強子序列），經由使用實例 1 中描述之各種分子生物學技術的一系列步驟。此經改造片段亦被改造，以包含嚙齒動物 Ig λ 輕鏈恆定區，其操作性地連結至該人類 J λ 基因片段。篩選卡匣（例如，新黴素 (Neomycin) 和潮黴素 (Hygromycin)）係包含於靶向載體中，以允許於細菌和哺乳動物細胞（例如胚胎幹細胞）中篩選出陽性複製株。如圖所示，新黴素抗性基因側接 *lox2372* 位點特異性重組位點(*lox*)，並定位於人類 V κ - J κ 區域與人 J λ 基因片段組之間，而潮黴素篩選卡匣側接 *loxP* 位點-特異性重組位點，並定位於嚙齒動物 Ig λ 輕鏈恆定區(mC λ 1) 基因的 3'端。該 DNA 片段之後與含有嚙齒動物 Ig κ 輕鏈 3'增強子的 DNA 片段組合，以產生最終靶向載體（圖 1B）。所得靶向載體（構建體 G）係直線化，並進行電穿孔進入嚙齒動物胚胎幹(ES) 細胞中，以創造出嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包含經改造之 Ig κ 輕鏈基因座。如下面實例部分所述，用於靶向載體電穿孔的嚙齒動物 ES 細胞，含有經改造 Ig κ 輕鏈基因座，如先前描述於美國專利號 9,006,511、9,012,717、9,029,628、9,035,128、9,066,502、9,150,662 和 9,163,092 中；其經由引用完整併入本文。如圖 3 中所描繪的，與靶向載體同源重組可產生經改造 Ig κ 輕鏈基因座，其特徵在於多個人類 V λ 和 J λ 基因片段係操作性連結至鼠類 C λ 1 基因，其中該小鼠 C λ 1 基因係位於小鼠 C κ 基因的位置上，該基因天然地出現於野生型 Ig κ 輕鏈基因座中。

人類 J λ 基因片段係經獨特改造為尚未天然出現在基因組人類 J κ 區域中的序列，但具有人類 J λ 編碼序列和相關的 12RSS，位於人類 J κ 編碼序列和相關 23RSS 處。陽性嚙齒動物 ES 細胞複製株係使用本文所述及/或本領域已知的篩選方法確認。可依據需要藉由重組酶介導的刪去作用，刪除任何剩餘的篩選卡匣（請參見實例 2）。

【0293】 此外，可在靶向載體中使用人類 C λ 基因，而非小鼠 C λ 基因。僅用於舉例，圖 3 說明了以與上述類似方式構建的靶向載體，不同之處在於編碼人類 C λ 2基因的序列，係被改造至靶向載體中，並操作性連結至五個人類 J λ 基因片段。使用這種方法在開發人類抗體治療劑方面提供了額外的益處，因為編碼輕鏈可變區和恆定區的 DNA 可以一起分離，因而減少任何後續的選殖步驟，其連接人類輕鏈恆定區，以製備完整人類抗體。

【0294】 用於構建如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座的靶向載體，可加入非人類細胞（例如嚙齒動物胚胎幹細胞）的生殖細胞系基因組中。在一些實施例中，如本文所述的靶向載體係加入非人類細胞的生殖細胞系基因組之野生型 Ig κ 輕鏈基因座中，該細胞更包含人類 V $_H$ 、D $_H$ 和 J $_H$ 基因組 DNA（例如，含有多個人類 V $_H$ 、D $_H$ 和 J $_H$ 基因片段），係操作性連結至一或多個免疫球蛋白重鏈恆定區基因（例如，請參見美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 和 8,791,323，其中每一者皆經由引用完整併入本文）。在一些實施例中，如本文所述的靶向載體係加入非人類細胞生殖細胞系基因組中的經修飾或經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中，該非人類細胞更包含人類 V $_H$ 、D $_H$ 和 J $_H$ 基因組 DNA（例如，含有多個人類 V $_H$ 、D $_H$ 和 J $_H$ 基因片段），係操作性連結至一或多個免疫球蛋白重鏈恆定區基因（例如，請參見美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940、8,791,323、9,006,511、9,012,717、9,029,628、9,035,128、9,066,502、9,150,662 與 9,163,092，其中每一者皆經由引用完整併入本文）。

【0295】 靶向載體經由電穿孔引入嚙齒動物（例如小鼠）胚胎幹細胞中，使得靶向載體中包含的序列可使非人類細胞或非人類動物（例如小鼠）有能力表現一抗體，該抗體具有輕鏈，其包括人類 V λ 結構域，以及非人類或人類 C λ 結構域，且該輕鏈係由內源性改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座表現。

如本文所述，係產生一種基因改造嚙齒動物，其中在嚙齒動物生殖細胞系基因組中產生經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座（例如，含有一人類 Igλ輕鏈序列的內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座（即，多個人類 Vλ和 Jλ基因片段），其操作性連結至一嚙齒動物或人類 Cλ基因，位於內源性嚙齒動物 Cκ基因處）。抗體表現於嚙齒動物 B 細胞表面與該嚙齒動物的血清中，其中該抗體特徵為其輕鏈具有人類 Vλ結構域和非人類或人類 Cλ結構域。當嚙齒動物生殖細胞系基因組之內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座不被靶向載體攻擊時，較佳將改造免疫球蛋白κ輕鏈轉基因插入至不同於內源性嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈基因座處（例如，隨機插入的轉基因）。

【0296】 如上所述，在非人類動物中產生改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座，係提供可產生抗體之經改造嚙齒動物品系，該抗體包括由此一免疫球蛋白κ輕鏈基因座（其具有一人類 Vλ結構域與一非人類或人類 Cλ結構域）表現的免疫球蛋白λ輕鏈。利用改造免疫球蛋白重鏈基因座的存在，其包括多個人類 V_H、D_H和 J_H基因片段，其操作性地連結至免疫球蛋白重鏈恆定區基因，係創造出經改造的嚙齒動物品系，其產生用於開發人類抗體基礎療法的抗體和抗體成分。因此，可實現了單一改造嚙齒動物品系，其具有可提供另一活體內系統的能力，用於探索人類 Vλ結構域，以開發出用於治療人類疾病的新穎抗體基礎藥物。

【0297】 在一些實施例中，係提供一種製造非人類動物之方法，該動物之生殖細胞系基因組包含改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，該方法包括（a）將 DNA 片段引入非人類胚胎幹細胞中，該 DNA 片段包含一核苷酸序列，其包括（i）一或多個人類 Vλ基因片段，（ii）一或多個人類 Jλ基因片段，以及（iii）一 Cλ基因（例如，非人類或人類），其中（i）-（iii）可操作性地連結，且其中該核苷酸序列更包含一免疫球蛋白 k 輕鏈序列，介於（i）和（ii）之間，（b）取得（a）中產生之非人類胚胎幹細胞；以及（c）使用（b）中的嚙齒動物胚胎幹細胞製造一嚙齒動物。

【0298】 在一些實施例中，提供了一種製造非人類動物之方法，該動物之生殖細胞系基因組包含經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因，該方法包括（a）將一 DNA 片段引入一非人類胚胎幹細胞中，該 DNA 片段包含一

核苷酸序列，其包括一或多個人類 J λ 基因片段、一或多個非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子，以及一非人類或人類 C λ 基因，其中該人類 J λ 基因片段係操作性地連結至該一或多個非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子與該非人類或人類 C λ 基因，(b) 取得 (a) 中產生之非人類胚胎幹細胞；以及 (c) 使用 (b) 中的嚙齒動物胚胎幹細胞製造一嚙齒動物。

【0299】 在一些實施例中，係提供一種製造非人類動物的方法，該動物的生殖細胞系基因組包含改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其中該經改造之內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含插入一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段，以及一非人類或人類 C λ 基因，其中該人類 V λ 和 J λ 基因片段係操作性連結至該非人類或人類 C λ 基因，以及該非人類 C 或人類 C λ 基因插入位於內源性免疫球蛋白 κ 基因座上之一非人類 C κ 基因處，該方法包括修飾非人類動物的生殖細胞系基因組，使其包含經改造的內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包括插入一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段，以及一非人類或人類 C λ 基因，其中該人類 V λ 和 J λ 基因片段係操作性地連結至該非人類或人類 C λ 基因，其中該非人類或人類 C λ 基因係插入位於內源性免疫球蛋白 κ 基因座上的非人類 C κ 基因處。

【0300】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段包括至少 24 個、至少 34 個、至少 52 個、至少 61 個，或至少 70 個人類 V λ 基因片段。在非人類動物製造方法的一些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段包括 39 個人類 V λ 基因片段。在非人類動物製造方法的某些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段包括人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合。在某些實施例中，一或多個人類 V λ 基因片段包括人類非編碼 DNA，其天然出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座中的相關人類 V λ 基因片段。

【0301】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包括至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個人類 J λ 基因片段。在非人類動物製造方法的一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包括 5 個人類 J λ 基因片段。在非人類動物製造方法的一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包含人類 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。在某些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包括人類非編碼 DNA(全部或部分)，其天然地出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座中的相關人類 J λ 基因片段。在一些實施例中，一或多個人類 J λ 基因片段包括人類非編碼 DNA，其天然地出現在鄰近於內源性人類 κ 輕鏈基因座之人類 J κ 1-J κ 5。

【0302】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段包括基因間 DNA，其含有非編碼免疫球蛋白 DNA（例如，天然出現在鄰近於兩個 V 基因片段、V 和 J 基因片段，或兩個 J 基因片段之編碼序列之間的 DNA）。在許多實施例中，該非編碼免疫球蛋白 DNA 為非編碼免疫球蛋白輕鏈 DNA（例如人類或鼠類）。在一些實施例中，非編碼免疫球蛋白輕鏈 DNA 為免疫球蛋白 κ 輕鏈 DNA、免疫球蛋白 λ 輕鏈 DNA，或其組合。

【0303】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段更包含一或多個篩選標記。在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段更包含一或多個位點-特異性重組位點。在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段更包含一或多組位點-特異性重組位點，其以相同的重組酶重組。在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段更包含一或多組位點-特異性重組位點，其以不同的重組酶重組。

【0304】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段包含經改造序列，其包括免疫球蛋白 κ 輕鏈序列和免疫球蛋白 λ 輕鏈序列，係以連續序列方式結合。在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段包含一改造序列，其包括免疫球蛋白 κ 輕鏈序列和免疫球蛋白 λ 輕鏈序列，其在單一序列中被一非免疫球蛋白序列（例如，重組信號序列、抗性基因及其組合）插入而組合。在非人類動物製造方法的一些實施例中，經改造序列包括 J κ 區的一部分和 J λ 區的一部分。在一些實施例中，經改造序列包括人類 J κ 區的一部分和人類 J λ 區的一部分。在某些實施例中，人類 J κ 區的一部分

包括天然出現在人類細胞中的人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座中之人類 Jκ區非編碼序列。在某些實施例中，人類 Jλ區的一部分包括一或多個人類 Jλ基因片段的編碼序列和重組信號序列（RSS）。在非人類動物製造方法的一些實施例中，DNA 片段包含一改造序列，在一些實施例中，其特徵為存在一或多個人類 Jλ 基因片段的編碼序列和重組信號序列（RSS），其定位取代或置換（即，定位於）人類 Jκ基因片段上的相對應編碼序列和重組信號序列（RSS），使得該一或多個人類 Jλ基因片段之編碼序列和重組信號序列（RSS）位於該一或多個人類 Jκ基因片段之該非編碼序列內，或與其相鄰、連續或並列。

【0305】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，一 DNA 片段係引入非人類胚胎幹細胞，其生殖細胞系基因組包含一或多個改造免疫球蛋白基因座（例如，免疫球蛋白重鏈、免疫球蛋白κ輕鏈、免疫球蛋白λ輕鏈，及其組合）。在某些實施例中，經改造免疫球蛋白基因座為內源性經改造免疫球蛋白基因座。

【0306】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，一 DNA 片段係引入非人類胚胎幹細胞，其生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包含插入一或多個人類 V_H基因片段、一或多個人類 D_H基因片段，和一或多個人類 J_H基因片段，其中該人類 V_H、D_H和 J_H基因片段，係操作性連結至一非人類免疫球蛋白重鏈恆定區。

【0307】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，一 DNA 片段係引入非人類胚胎幹細胞，其生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其包含插入一或多個人類 Vλ與一或多個人類 Jλ基因片段，其中該人類 Vλ和 Jλ基因片段，係操作性連結至非人類免疫球蛋白κ輕鏈恆定區基因。在非人類動物製造方法的一些實施例中，一 DNA 片段係引入非人類胚胎幹細胞，其生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其包含一或多個人類 Vλ與一或多個人類 Jλ基因片段之插入，以及一人類免疫球蛋白κ輕鏈序列定位、置於或位於該一或多個人類 Vλ基因片段與該一或多個人類 Jλ 基因片段之間，其中該人類 Vλ和 Jλ基因片段係操作性連結至一非人類免疫球蛋白κ輕鏈恆定區基因。

【0308】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，修飾該非人類動物的生殖細胞系基因組以使其包含經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，係於非人類胚胎幹細胞中進行，該細胞之生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包含插入一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段，以及一或多個人類 J_H 基因片段，其中該人類 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段，係操作性連結至一非人類免疫球蛋白重鏈恆定區。

【0309】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，修飾非人類動物的生殖細胞系基因組以使其包含經改造的免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，係於非人類胚胎幹細胞中進行，該細胞之生殖細胞系基因組包含一內源免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含插入一或多個人類 $V\lambda$ 和一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，其中該人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段係操作性連結至一非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區基因。在非人類動物製造方法的一些實施例中，修飾該非人類動物的生殖細胞系基因組以使其包含經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，係於非人類胚胎幹細胞中進行，該細胞之生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白 κ 重鏈基因座，其包含插入一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段、一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，以及一人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，係定位於、放置或位於該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段與該一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段之間，其中該人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，係操作性地連結至一非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區基因。

【0310】 在非人類動物製造方法的一些實施例中，插入一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段，和一或多個人類 J_H 基因片段，包括天然出現在鄰近於人類 V_H 基因片段之人類非編碼 DNA、天然地出現在鄰近於人類 D_H 基因片段，以及天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白基因座中之人類 J_H 基因片段之人類非編碼 DNA。

【0311】 在一些實施例中，係提供由本文所述的方法製備、產生、製造、獲得或可獲得的非人類動物。

【0312】 在一些實施例中，本文所述的非人類動物基因組更包含一或多個人類免疫球蛋白重鏈可變區，如美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 和 8,791,323 中所述，其中每一者係經由引用完整併入本文。此

外，可將本文所述的經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，改造至不同修飾品系的胚胎幹細胞中，例如 VELOCIMMUNE®品系(請見如美國專利號 8,502,018 及/或 8,642,835；係經由引用完整併入本文)。隨後可經由育種實現如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座之同型合子。或者，在隨機插入經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈轉基因（如上所述）的情況下，嚙齒動物品系可基於來自該轉基因的人類 V λ 結構域的表現等來篩選。在一些實施例中，VELOCIMMUNE®小鼠可為 VELOCIMMUNE® 1 (VI-1)小鼠，其包括 18 個人類 V_H基因片段，所有人類 D_H基因片段和所有 J_H基因片段。VI-1 小鼠亦可包括 16 個人類 V κ 基因片段和所有人類 J κ 基因片段。在一些實施例中，VELOCIMMUNE®小鼠可為 VELOCIMMUNE® 2 (VI-2) 小鼠，其包括 39 個人類 V_H基因片段、所有人類 D_H基因片段以及所有 J_H基因片段。VI-2 小鼠亦可包括人類 30 個 V κ 基因片段和所有人類 J κ 基因片段。在一些實施例中，VELOCIMMUNE®小鼠可為 VELOCIMMUNE® 3 (VI-3)小鼠，其包括 80 個人類 V_H基因區段、所有人類 D_H基因片段和所有 J_H基因片段。VI-3 小鼠亦可包括人類 40 個 V κ 基因區段和所有人類 J κ 基因區段。

【0313】 此外及/或額外地，在一些實施例中，如本文所述的非人類動物的生殖細胞系基因組更包含刪去、失活、功能性靜默的或其他非功能性內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座。使用本文所述的方法及/或本領域已知的方法可實現基因修飾，以刪除或產生非功能性基因或基因座。

【0314】 基因改造創始非人類動物可被辨識出，基於其生殖細胞系基因組中經改造 Ig κ 輕鏈基因座的存在，及/或在非人類動物組織或細胞中表現具有人類 V λ 結構域與非人類或人類 C λ 結構域的抗體。基因改造創始非人類動物之後可用於培育攜帶該經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的其他非人類動物，因而創造一組非人類動物，每一者係攜帶經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之一或多個複製版本。此外，攜帶如本文所述的經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的基因改造非人類動物，可進一步與其他攜帶其他轉基因（例如人類免疫球蛋白基因）或改造免疫球蛋白基因座之基因改造非人類動物一起培育。

【0315】 亦可產生含有篩選出的系統之基因改造非人類動物，該系統允許轉基因或整合入的序列之調控、定向、誘導及/或細胞類型特異性表現。例如，如本文所述的非人類動物可被改造以包含一或多個序列，其編碼有條件表現的抗體之人類 V λ 結構域 (如綜覽於 Rajewski, K.等人, 1996, J. Clin. Invest. 98(3):600-3，係經由引用完整併入本文)。例示性系統包括噬菌體 P1 的 Cre/loxP 重組酶系統 (請參見，例如，Lakso, M.等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6232-6，係經由引用完整併入本文)，以及釀酒酵母(*S. cerevisiae*)的 FLP/Frt 重組酶系統 (O’Gorman, S.等人, 1991, Science 251:1351-5，係經由引用完整併入本文)。此類動物可經由構建“雙”基因改造動物來提供，例如經由交配兩種基因改造動物，其中一種含有包含篩選出的修飾之轉基因 (例如，改造 Ig κ 輕鏈基因座，如本文所述)，而另一種含有編碼重組酶的轉基因 (例如，Cre 重組酶)。

【0316】 如本文所述的非人類動物可如上所述製備，或使用本領域已知的方法製備，以包含額外的人類、人源化或其他改造基因，通常取決於非人類動物的預期用途。此種人類、人源化或其他改造基因的基因材料，可經由進一步改變具有如上所述的基因修飾或改變的細胞 (例如，胚胎幹細胞) 的基因組，或經由本領域已知的育種技術以及其他基因修飾或改造品系而引入，依據需求。在一些實施例中，係製備如本文所述的非人類動物，以進一步包含人類 IgH 及/或 Ig κ 輕鏈基因或基因片段 (請參見例如 Murphy, A.J.等人, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158；美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 與 8,791,323；美國專利號 8,791,323；以及美國專利申請公開號 2013/0096287 A1；其每一者係經由引用完整併入本文)。

【0317】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物可經由將本文所述的靶向載體引入來自經修飾或經改造品系的細胞中而製備。例如，可將如本文所述的靶向載體引入 VELOCIMMUNE®小鼠中。VELOCIMMUNE®小鼠會表現具有完整人類可變區和小鼠恆定區的抗體。在另一個實例中，可將如本文所述的靶向載體引入經改造小鼠中，如美國專利號 9,006,511、9,012,717、9,029,628、9,035,128、9,066,502、9,150,662 與 9,163,092 中所

述，其係經由引用完整併入本文。在一些實施例中，係製備如本文所述的非人類動物，以進一步包含人類免疫球蛋白基因（可變區及/或恆定區基因）。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物包含如本文所述的改造 Igκ 輕鏈基因座，以及來自異源性物種（例如人類）的基因材料，其中該基因材料(全部或部分)編碼一或多個人類重鏈及/或 Igκ 輕鏈可變區。

【0318】 例如，如本文所述，包含如本文所述的經改造 Igκ 輕鏈基因座的非人類動物，可進一步包含（例如，經由交叉-育種或多基因靶向策略）一或多種修飾，如描述於 Murphy, A.J.等人, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-8; Macdonald, L.E.等人, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5147-52；U.S.專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 與 8,791,323；所有皆經由引用完整併入本文。在一些實施例中，包含如本文所述的經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座的嚙齒動物，係與包含人源化免疫球蛋白重鏈及/或免疫球蛋白κ輕鏈可變區基因座的嚙齒動物進行雜交（請參見，例如，美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 及/或 8,791,323；係經由引用完整併入本文）。在一些實施例中，包含如本文所述的改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座的嚙齒動物，係與包含人源化免疫球蛋白重鏈基因座（請參見，例如，美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 及/或 8,791,323；係經由引用完整併入本文），以及失活之內源性免疫球蛋白λ輕鏈基因座（請參見，例如，美國專利號 9,006,511、9,012,717、9,029,628、9,035,128、9,066,502、9,150,662 與 9,163,092，係經由引用完整併入本文）的嚙齒動物進行雜交。

【0319】 儘管已描述在小鼠中構建改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座的實施例（即，具有改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座的小鼠，其特徵為存在多個人類 Vλ 和 Jλ 基因片段，其操作性連結至小鼠或人類 Cλ 基因，其中該一或多個人類 Cλ 基因係定位於一小鼠 Cκ 基因處，使得該含有人類 Vλ 抗體與小鼠或人類 Cλ 結構域可被表現出）係於此廣泛討論，亦提供包含經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座的其他非人類動物。此種非人類動物包括可經基因修飾以表現如本文所述的抗體之任何動物，包括例如哺乳動物，例如小鼠、大鼠、兔、豬、牛（例如，牛、公牛、水牛）、鹿、綿羊、山羊、雞、貓、

狗、雪貂、靈長類動物（如狢猿、恒河猴）等。例如，對於那些不容易獲得合適的可基因修飾的 ES 細胞之非人類動物，係採用其他方法製備包含該基因修飾的非人類動物。此類方法包括，例如，修飾非 ES 細胞基因組（例如，纖維母細胞或誘導的多潛能細胞），並採用體細胞核轉移技術（SCNT）將基因修飾的基因組轉移至合適的細胞中，例如去核的卵母細胞，並在合適的條件下，於非人類動物中孕育該經修飾細胞（例如，經修飾的卵母細胞），以形成胚胎。

【0320】 修飾非人類動物（例如，豬、牛、嚙齒動物、雞等基因組）的生殖細胞系基因組的方法，包括例如使用鋅指核酸酶（ZFN）、轉錄激活因子樣效應子核酸酶（TALEN），或 Cas 蛋白（即 CRISPR/Cas 系統），以包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座。用於修飾非人類動物的生殖細胞系基因組的方法指南，可見於如美國專利申請號 14/747,461（於 2015 年 6 月 23 日提申）、14/948,221（於 2015 年 11 月 20 日提申），和 14/974,623（於 2015 年 12 月 18 日提申）；經由引用完整併入本文。

【0321】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物為哺乳動物。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物為小型哺乳動物，例如跳鼠 (Dipodoidea) 或鼠類 (Muroidea) 超級家族。在一些實施例中，如本文所述的基因修飾動物為嚙齒動物。在一些實施例中，如本文所述的嚙齒動物選自於小鼠、大鼠和倉鼠。在一些實施例中，如本文所述的嚙齒動物選自於鼠類 (Muroidea) 超級家族。在一些實施例中，如本文所述的基因修飾動物選自於倉鼠科 (Calomyscidae)（例如，類似小鼠之倉鼠）、倉鼠科 (Cricetidae)（例如，倉鼠、新世界大鼠和小鼠，田鼠）、鼠科 (Muridae)（真小鼠和大鼠、沙鼠、刺狀小鼠、冠毛大鼠）、非洲攀鼠亞科 (Nesomyidae)（攀爬小鼠、岩攀鼠、有尾大鼠、馬達加斯加大鼠和小鼠）、刺山鼠科 (Platacanthomyidae)（例如，多刺睡鼠）和鼯形鼠科 (Spalacidae)（例如，鼯鼠、竹子大鼠和鼯鼠）。在某些實施例中，如本文所述的基因修飾嚙齒動物選自於真正的小鼠或大鼠（鼠科）、沙鼠、多刺小鼠和冠毛大鼠。在某些實施例中，如本文所述的基因修飾小鼠為來自鼠科 (Muridae) 之一成員。

在一些實施例中，如本文所述的非人類動物為嚙齒動物。在某些實施例中，如本文所述的嚙齒動物選自於小鼠和大鼠。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物為小鼠。

【0322】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物為嚙齒動物，其為小鼠 C57BL 品系，選自於 C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/KaLwN、C57BL/6、C57BL/6J、C57BL/6ByJ、C57BL/6NJ、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr 及 C57BL/Ola。在某些實施例中，如本文所述的小鼠為 129-品系，選自於由品系 129P1、129P2、129P3、129X1、129S1 (e.g. 129S1/SV、129S1/SvIm)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129/SvJae、129S6 (129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、129T2 組成之群組 (請見如 Festing 等人, 1999, *Mammalian Genome* 10:836; Auerbach, W.等人, 2000, *Biotechniques* 29(5):1024-1028, 1030, 1032，\每一者皆經由引用完整併入本文)。在某些實施例中，如本文所述的基因修飾小鼠為前述 129 品系和前述 C57BL/6 品系的混合。在某些實施例中，如本文所述的小鼠為前述 129 品系之混合，或前述 BL/6 品系的混合。在某些實施例中，如本文所述混合品系中的 129 品系為 129S6 (129/SvEvTac)品系。在一些實施例中，如本文所述的小鼠為 BALB 品系，例如 BALB/c 品系。在一些實施例中，如本文所述的小鼠為 BALB 品系和另一種上述品系的混合。

【0323】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物為大鼠。在某些實施例中，如本文所述的大鼠選自於 Wistar 大鼠、LEA 品系、Sprague Dawley 品系、Fischer 品系、F344、F6 及 Dark Agouti。在某些實施例中，如本文所述的大鼠品系選自於由 Wistar、LEA、Sprague Dawley、Fischer、F344、F6 及 Dark Agouti 組成群組之二或多種品系的混合。

【0324】 大鼠多潛能細胞及/或全能細胞可來自任何大鼠品系，包括例如 ACI 大鼠品系 (最初源自 August 和 Copenhagen 株的近交品系)、Dark Agouti (DA) 大鼠品系、Wistar 大鼠品系、LEA 大鼠品系、Sprague Dawley (SD) 大鼠品系，或 Fischer 大鼠品系，如 Fisher F344 或 Fisher F6。大鼠多潛能細胞及/或全能細胞亦可衍生自上述兩種或更多種品系的混合品

系。例如，大鼠多潛能細胞及/或全能細胞可來自 DA 品系或 ACI 品系。ACI 大鼠品系的特徵為具有黑色野鼠色、具有白色腹部和足部，以及 RT1av1 單倍型。這些品系可得自多種來源，包括 Harlan Laboratories。來自 ACI 大鼠的大鼠 ES 細胞株實例為 ACI.G1 大鼠 ES 細胞。DA 大鼠品系特徵為具有刺豚鼠外皮和 RT1av1 單倍型。這些大鼠可得自多種來源，包括 Charles River 和 Harlan Laboratories。來自 DA 大鼠的大鼠 ES 細胞株實例為 DA.2B 大鼠 ES 細胞株，以及 DA.2C 大鼠 ES 細胞株。在一些實施例中，大鼠多潛能細胞及/或全能細胞來自近交大鼠品系（請參見，例如，於 2014 年 8 月 21 日公開的美國專利申請公開號 2014-0235933 A1，其經由引用完整併入本文）。在大鼠基因組中（例如，在大鼠 ES 細胞中），使用如本文所述的方法及/或構建體進行修飾的指南，可見於如美國專利申請公開號 2014-0310828 和 2017-0204430；這兩篇文獻皆經由引用完整併入本文。

具體的例示性實施例 - 免疫球蛋白重鏈基因座

【0325】 在一些實施例中，提供的非人類動物包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，且更包含改造 IgH 基因座（或等位基因），其特徵為存在多個人類 V_H 、 D_H 與 J_H 基因片段，其以生殖細胞系構型排列，並操作性地連結至非人類免疫球蛋白重鏈恆定區基因、增強子和調控區。在一些實施例中，如本文所述的改造免疫球蛋白重鏈基因座（或等位基因）包含一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段和一或多個人類 J_H 基因片段，其操作性連結至非人類免疫球蛋白重鏈恆定區。在某些實施例中，經改造免疫球蛋白重鏈基因座（或等位基因）包含至少人類 V_H 基因片段 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 、 V_H6-1 ，或其任一組合。在某些實施例中，經改造 IgH 基因座（或等位基因）包含至少人類 D_H 基因片段 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、

D_H6-6、D_H1-7、D_H2-8、D_H3-9、D_H3-10、D_H5-12、D_H6-13、D_H2-15、D_H3-16、D_H4-17、D_H6-19、D_H1-20、D_H2-21、D_H3-22、D_H6-25、D_H1-26、D_H7-27，或其任一組合。在某些實施例中，經改造免疫球蛋白重鏈基因座（或等位基因）包含至少人類 J_H 基因片段 J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5、J_H6，或其任一組合。

【0326】 本發明認知到本文所述的非人類動物將利用其基因組中包含的人類重鏈可變區基因片段，於其抗體篩擇和產生機制中（例如，重組和體細胞過度突變）。因此，在各實施例中，由本文所述的非人類動物產生的人類免疫球蛋白重鏈可變結構域，係由其基因組或體細胞高度突變體中包含的人類重鏈可變區基因片段編碼。

【0327】 在一些實施例中，提供了一種非人類動物，其基因組包含經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其中該非人類動物包括 B 細胞，其包括人類重鏈可變區序列、人類λ 輕鏈可變區序列、及/或體細胞高度突變的人類κ 輕鏈可變區序列。在一些實施例中，存在於本發明小鼠 B 細胞中的人類重鏈可變區序列、人類λ 輕鏈可變區序列及/或人類κ 輕鏈可變區序列，具有 1、2、3、4、5 或更多個體細胞高度突變。本領域技術人員已知用於辨識出成熟抗體序列中的來源基因片段的方法。例如，可使用各種工具來幫助進行此分析，例如，DNAPLOT、IMGT/V-QUEST、JOINSOLVER、SoDA 及 Ab-origin。

【0328】 在一些實施例中，非人類免疫球蛋白重鏈恆定區包括一或多個非人類免疫球蛋白重鏈恆定區基因，例如免疫球蛋白 M（IgM）、免疫球蛋白 D（IgD）、免疫球蛋白 G（IgG）、免疫球蛋白 E（IgE）和免疫球蛋白 A（IgA）。在某些實施例中，非人類免疫球蛋白重鏈恆定區包括嚙齒動物 IgM、嚙齒動物 IgD、嚙齒動物 IgG3、嚙齒動物 IgG1、嚙齒動物 IgG2b、嚙齒動物 IgG2a、嚙齒動物 IgE 和嚙齒動物 IgA 恆定區基因。在一些實施例中，該人類 V_H、D_H 和 J_H 基因片段，係操作性連結至一或多個非人類免疫球蛋白重鏈增強子（即，增強子序列或增強子區域）。在一些實施例中，該人類 V_H、D_H 和 J_H 基因片段，係操作性連結至一或多個非人類免疫球蛋白重鏈調控區（或調控序列）。在一些實施例中，該人類 V_H、D_H

和 J_H 基因片段，係操作性連結至一或多個非人類免疫球蛋白重鏈增強子（或增強子序列）與一或多個非人類免疫球蛋白重鏈調控區（或調控序列）。

【0329】 在一些實施例中，如本文所述的改造免疫球蛋白重鏈基因座不含有內源性 Adam6 基因。在一些實施例中，如本文所述的改造免疫球蛋白重鏈基因座，不含有與同一物種之野生型非人類動物的生殖細胞系基因組中發現的相同生殖細胞系基因組的內源性 Adam6 基因（或 Adam6 編碼序列）。在一些實施例中，如本文所述的改造免疫球蛋白重鏈基因座不含人類 Adam6 偽基因。在一些實施例中，如本文所述的改造免疫球蛋白重鏈基因座包含插入至少一核苷酸序列，其編碼一或多個非人類（例如嚙齒動物）Adam6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段。在一些實施例中，該插入可位於如本文所述的改造免疫球蛋白重鏈基因座之外（例如但不限於，V_H 基因片段的 5' 最上游），在經改造免疫球蛋白重鏈基因座內，或非人類動物生殖細胞系基因組（例如，但不限於，隨機引入的非人類 Adam6 編碼序列）、細胞或組織中的其他位置。

【0330】 在各實施例中，如本文所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織，無法偵測地表現(全部或部分)抗體分子內的內源性非人類 V_H 區域。在各實施例中，如本文所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織不含（或缺乏或含有刪去）一或多個核苷酸序列，其(全部或部分)編碼抗體分子中的內源性非人類 V_H 區域（例如，V_H、D_H，及/或 J_H）。在各實施例中，如本文所提供的非人類動物、非人類細胞或非人類組織具有一生殖細胞系基因組，其包括內源性非人類 V_H、D_H 和 J_H 基因片段的刪去(全部或部分)。在各實施例中，所提供的非人類動物具生育力。

【0331】 創造攜帶此類改造免疫球蛋白重鏈基因座（或等位基因）之靶向載體、非人類細胞和動物的指南，可見於美國專利號 8,502,018、8,642,835、8,697,940 與 8,791,323，每一者皆經由引用完整併入本文。本領域技術人員已知本領域用於實現此種基因改造及/或操作非人類動物（例如哺乳動物）基因組，或者用於製備、提供或製造此類序列，以引入非人類動物的生殖細胞系基因組之各種技術。

具體的例示性實施例 - 免疫球蛋白κ輕鏈基因座

【0332】 在一些實施例中，所提供的非人類動物包含經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其特徵為存在多個人類 Vλ 和 Jλ 基因片段，其排列為生殖細胞系構型（即，未重排以及與重組信號序列結合），並插入且操作性連結至非人類或人類 Cλ 基因的上游，其中該非人類或人類 Cλ 基因係插入位於非人類 Cκ 基因處。如本文所述，此類經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座更包括非人類免疫球蛋白κ輕鏈增強子區（或增強子序列）。在一些實施例中，經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座包含一或多個人類 Vλ 基因片段和一或多個人類 Jλ 基因片段，其可操作地連接至一非人類或人類 Cλ 基因。在某些實施例中，經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座（或等位基因）包含至少出現在人類免疫球蛋白λ輕鏈基因座的群集 A 中的人類 Vλ 基因片段；在一些實施例中，人類免疫球蛋白λ輕鏈基因座的群集 A 和群集 B；在某些實施例中，人類免疫球蛋白λ輕鏈基因座的群集 A、群集 B 和群集 C。在某些實施例中，經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座（或等位基因）包含至少人類 Vλ 基因片段 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合。在某些實施例中，經改造的 Igκ 輕鏈基因座（或等位基因）包含至少人類 Jλ 基因片段 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6Jλ7，或其任一組合。

【0333】 本發明認知到如本文所述的非人類動物將利用其基因組中包含的人類λ輕鏈可變區基因片段，進行其抗體篩選和產生機制（例如，重組和體細胞過度突變）。因此，在各實施例中，由本文所述的非人類動物產生的人類免疫球蛋白λ輕鏈可變結構域，係由其基因組或其體細胞高突變體中包含的人類λ輕鏈可變區基因片段編碼。

【0334】 在一些實施例中，提供了一種非人類動物，其基因組包含經改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其中該非人類動物包括 B 細胞，其包括人類

重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列、及/或體細胞高度突變的人類 κ 輕鏈可變區序列。在一些實施例中，存在於本發明小鼠 B 細胞中的人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列及/或人類 κ 輕鏈可變區序列，具有 1、2、3、4、5 或更多個體細胞高度突變。本領域技術人員已知用於辨識出成熟抗體序列中的來源基因片段的方法。例如，可使用各種工具來幫助進行此分析，例如，DNAPLOT、IMGT/V-QUEST、JOINSOLVER、SoDA 及 Ab-origin。

【0335】 在許多實施例中，經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座（或等位基因）含有與野生型免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座（或等位基因）中出現的相同非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子區域（或增強子序列）。在一些實施例中，經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座（或等位基因）含有出現在不同物種（例如，不同的嚙齒動物物種）的野生型免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座（或等位基因）之非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子區域（或增強子序列）。

【0336】 在一些實施例中，該人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段係操作性連結至一或多個非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子（即增強子序列或增強子區）。在某些實施例中，該人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段係操作性連結至一鼠類免疫球蛋白 κ 輕鏈內含子增強子區(Ig κ Ei 或 Ei κ)。在某些實施例中，該人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，係操作性連結至一鼠類免疫球蛋白 κ 輕鏈 3'增強子區域（Ig κ 3'E 或 3'E κ ）。在某些實施例中，該人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，係操作性連結至一鼠類 Ei κ ，並操作性連結至鼠 3'E κ 。

【0337】 在一些實施例中，如本文所述的經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座（或等位基因）不含（即缺乏）一人類 $VpreB$ 基因（或人類 $VpreB$ 基因編碼序列）。

【0338】 在一些實施例中，經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 $C\lambda$ 基因，包括嚙齒動物 $C\lambda$ 基因，例如小鼠 $C\lambda$ 基因或大鼠 $C\lambda$ 基因。在某些實施例中，經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 $C\lambda$ 基因為或包含來自基因背景的小鼠 $C\lambda$ 基因，其包括 129 品系、BALB/c 品系、C57BL/6 品系、混合 129xC57BL/6 品系，或其組合。

【0339】 在一些實施例中，本文所述之經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 C λ 基因包含一序列，其至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%，或至少 98%等同於 SEQ ID NO:1 (小鼠 C λ 1)、SEQ ID NO:3 (小鼠 C λ 2)或 SEQ ID NO:5 (小鼠 C λ 3)。在一些實施例中，本文所述之經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 C λ 基因，包含一序列，其實質上等同於或等同於 SEQ ID NO:1 (小鼠 C λ 1)、SEQ ID NO:3 (小鼠 C λ 2) 或 SEQ ID NO:5 (小鼠 C λ 3)。在一些實施例中，如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 C λ 基因為或包含小鼠 C λ 1 基因的序列。

【0340】 在一些實施例中，本文所述之經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 C λ 基因包含一序列，其至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%，或至少 98%等同於 SEQ ID NO:2 (小鼠 C λ 1)、SEQ ID NO:4 (小鼠 C λ 2)或 SEQ ID NO:6 (小鼠 C λ 3)。在一些實施例中，本文所述之經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 C λ 基因包含一序列，其其實質上等同於或等同於 SEQ ID NO:2 (小鼠 C λ 1)、SEQ ID NO:4 (小鼠 C λ 2)或 SEQ ID NO:6 (小鼠 C λ 3)。在一些實施例中，由位於如本文所述經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）之序列編碼的非人類 C λ 基因，為或包含小鼠 C λ 1 結構域多胜肽。

【0341】 在一些實施例中，如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的非人類 C λ 基因包一序列，其至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%，或至少 98%等同於 SEQ ID NO:7 (大鼠 C λ 1)、SEQ ID NO:9 (大鼠 C λ 2)、SEQ ID NO:11 (大鼠 C λ 3)或 SEQ ID NO:13 (大鼠 C λ 4)。在一些實施例中，本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）之非人類 C λ 基因包含一序列，其實質上等同於或等同於 SEQ ID NO:7(大鼠 C λ 1)、SEQ ID NO:9 (大鼠 C λ 2)、SEQ ID NO:11 (大鼠 C λ 3)或 SEQ ID NO:13 (大鼠 C λ 4)。某些實施例中，如本文所述的改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）之非人類 C λ 基因，為或包含大鼠 C λ 1 基因的序列。

【0342】 在一些實施例中，如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）之非人類 C λ 基因包含一序列，其至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%，或至少 98%等同於 SEQ ID NO:8 (大鼠 C λ 1)、SEQ ID

NO:10 (大鼠 C λ 2)、SEQ ID NO:12 (大鼠 C λ 3)，或 SEQ ID NO:14 (大鼠 C λ 4)。在一些實施例中，本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）之非人類 C λ 基因包含一序列，其實質上等同於或等同於 SEQ ID NO:8 (大鼠 C λ 1)、SEQ ID NO:10 (大鼠 C λ 2)、SEQ ID NO:12 (大鼠 C λ 3)，或 SEQ ID NO:14 (大鼠 C λ 4)。在一些實施例中，由位於如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）上的序列編碼之非人類 C λ 基因，為或包含大鼠 C λ 1 結構域多胜肽。

【0343】 在一些實施例中，經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的人類 C λ 基因包括人類 C λ 基因，例如人類 C λ 1 基因、人類 C λ 2 基因、人類 C λ 3 基因、人類 C λ 6 基因，或人類 C λ 7 基因。在某些實施例中，經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的人類 C λ 基因，為或包含人類 C λ 2 基因。

【0344】 在一些實施例中，如本文所述的改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的人類 C λ 基因包含一序列，其至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%，或至少 98%等同於 SEQ ID NO:15 (人類 C λ 1)、SEQ ID NO:17 (人類 C λ 2)、SEQ ID NO:19 (人類 C λ 3)、SEQ ID NO:21 (人類 C λ 6)，或 SEQ ID NO:23 (人類 C λ 7)。在一些實施例中，本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的人類 C λ 基因包含一序列，其實質上等同於或等同於 SEQ ID NO:15 (人類 C λ 1)、SEQ ID NO:17 (人類 C λ 2)、SEQ ID NO:19 (人類 C λ 3)、SEQ ID NO:21 (人類 C λ 6)或 SEQ ID NO:23 (人類 C λ 7)。在一些實施例中，如本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）的人類 C λ 基因，為或包含人類 C λ 2 基因的序列。

【0345】 在一些實施例中，如位於本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）之一序列編碼之人類 C λ 結構域，包含一序列，其至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%，或至少 98%等同於 SEQ ID NO:16 (人類 C λ 1)、SEQ ID NO:18 (人類 C λ 2)、SEQ ID NO:20 (人類 C λ 3)、SEQ ID NO:22 (人類 C λ 6)，或 SEQ ID NO:24 (人類 C λ 7)。在一些實施例中，本文所述的經改造 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）之一序列編碼之人類 C λ 結構域包含一序列，其實質上等同於或等同於 SEQ ID NO:16 (人類 C λ 1)、SEQ ID NO:18 (人類 C λ 2)、SEQ ID NO:20 (人類 C λ 3)、SEQ ID NO:22 (人

類 C λ 6)，或 SEQ ID NO:24 (人類 C λ 7)。在一些實施例中，由位於如本文所述的改造 Ig κ 輕鏈基因座(或等位基因)上之一序列編碼的人類 C λ 結構域，為或包含一人類 C λ 2 結構域多胜肽。

【0346】 除其他外，本發明內容證實在 Ig κ 輕鏈基因座（或等位基因）處，人類 V λ 和 J λ 基因片段的存​​在，可增加所提供的輕鏈庫多樣性，與非人類動物的表現抗體庫中的輕鏈多樣性相較，該非人類動物不包含此類經改造 Ig κ 輕鏈基因座。

具體的例示性實施例- 免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座

【0347】 在一些實施例中，所提供的非人類動物包含如本文所述的經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，且更包含野生型或失活免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座（或等位基因）。

【0348】 在一些實施例中，所提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞及/或非人類組織，包含內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座的刪去(全部或部分)。在一些實施例中，所提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞及/或非人類組織，包含在內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座內的插入，其中該插入使得該內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座無功能。在一些實施例中，所提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞及/或非人類組織，包含內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座的一或多個基因片段的刪去，使得該內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座，無法重組及/或表現抗體的功能性輕鏈。

【0349】 在一些實施例中，所提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞及/或非人類組織，(全部或部分地)無法偵測地表現抗體分子中的內源性非人類 V λ 區域。在一些實施例中，所提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞及/或非人類組織，不包含（或缺乏或含有刪去）一或多個核苷酸序列，其(全部或部分)編碼抗體分子中的內源性非人類 V λ 區域。在一些實施例中，所提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞及/或非人類組織，具有生殖細胞系基因組，其包括全部或部分內源性非人類 V λ 和 J λ 基因片的刪去。在一些實施例中，所提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞

及/或非人類組織，為生殖細胞系基因組，其包括內源性非人類 $V\lambda$ 、 $J\lambda$ 和 $C\lambda$ 基因片段之刪去(全部或部分)。

【0350】 有關創造攜帶失活 $Ig\lambda$ 輕鏈基因座（或等位基因）之靶向載體、非人類細胞和動物的指南，請參閱美國專利號 9,006,511、9,012,717、9,029,628、9,035,128、9,066,502、9,150,662 與 9,163,092，其經由引用完整併入本文。本領域技術人員可理解本領域已知的多種技術，用於實現特定基因座的基因失活，及/或操作非人類動物（例如哺乳動物）基因組，或用於製備、提供或製造此類基因失活（例如，基因缺失），用於引入非人類動物的生殖細胞系基因組。

具體的例示性實施例- 免疫球蛋白基因座的組合

【0351】 在一些實施例中，提供的非人類動物包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，且更包含一或多個額外的人類或人源化基因（例如，經由雜交育種或多基因靶向策略）。此種非人類動物可如上所述製備，或使用本領域已知的方法製備，以根據非人類動物的預期用途獲得所需的經改造基因型。此類額外的人類或人源化基因之基因材料，可經由進一步改變具有如上所述基因修飾的細胞（例如，胚胎幹細胞）基因組，或經由本領域已知的育種技術和其他基因修飾品系引入。

【0352】 在一些實施例中，所提供的非人類動物更包含人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座（例如，包括但不限於多個人類 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段，其操作性連結至內源性免疫球蛋白重鏈基因座上之一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因）。在一些實施例中，所提供的非人類動物之經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為異型合子，如本文所述，且其人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座為異型合子。在一些實施例中，所提供的非人類動物之改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為同型合子，如本文所述，且其人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子。

【0353】 在一些實施例中，所提供的非人類動物更包含人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座（例如，包括但不限於多個人類 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段，其操作性連結至內源性免疫球蛋白重鏈基因座上的一或多個嚙齒動物

免疫球蛋白重鏈恆定區基因，和人源化免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座(例如，包括但不限於，多個人類 $V\kappa$ 和 $J\kappa$ 基因片段，其操作性連結至內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區基因。在一些實施例中，所提供的非人類動物之人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座為異型合子，且更包含一個內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其可含有多個人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，其操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白 λ 輕鏈恆定區基因

(即，如本文所述的改造 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座)，以及另一個內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其具有多個人類 $V\kappa$ 和 $J\kappa$ 基因片段，其操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區基因。在一些實施例中，所提供的非人類動物之人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子，且更包含一個內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其可含有多個人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，其操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白 λ 輕鏈恆定區基因(即，如本文所述的改造 $Ig\kappa$ 輕鏈基因座)，以及另一個內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其具有多個人類 $V\kappa$ 與 $J\kappa$ 基因片段，其操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區基因。

【0354】 在一些實施例中，所提供的非人類動物具有一基因組，其包含 (a) 同型合子或異型合子之人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座的基因組，其包含人類 V_H 、 D_H 與 J_H 基因片段，其操作性連結至一或多個內源性非人類免疫球蛋白重鏈恆定區，使得該非人類動物可表現一免疫球蛋白重鏈，其包含人類 V_H 結構域序列與非人類 C_H 結構域序列之融合；(b) 第一免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，其係操作性連結至一非人類免疫球蛋白 $C\lambda$ 基因，使得該非人類動物可表現一免疫球蛋白輕鏈，其包含一人類 $V\lambda$ 結構域序列與非人類 $C\lambda$ 結構域序列之融合物；以及 (c) 第二免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含人類 $V\kappa$ 和 $J\kappa$ 基因片段，其操作性連結至一內源性非人類 $C\kappa$ 基因，使得該非人類動物可表現一免疫球蛋白輕鏈，其包含一人類 $V\kappa$ 結構域序列與一小鼠 $C\kappa$ 結構域序列之融合物。

【0355】 在一些實施例中，所提供的非人類動物具有一基因組，其包含 (a) 同型合子或異型合子之人類或人源化免疫球蛋白重鏈基因座的基因

組，其包含人類 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段，其操作性連結至一或多個內源性非人類免疫球蛋白重鏈恆定區，使得該非人類動物可表現一免疫球蛋白重鏈，其包含人類 V_H 結構域序列與非人類 C_H 結構域序列之融合；(b) 第一免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，其係操作性連結至非人類免疫球蛋白 $C\lambda$ 基因，使得該非人類動物可表現一免疫球蛋白輕鏈，其包含一人類 $V\lambda$ 結構域序列與非人類 $C\lambda$ 結構域序列之融合；(c) 第二免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含人類 $V\kappa$ 和 $J\kappa$ 基因片段，其操作性連結至一內源性非人類 $C\kappa$ 基因，使得該非人類動物可表現一免疫球蛋白輕鏈，其包含一人類 $V\kappa$ 結構域序列與一小鼠 $C\kappa$ 結構域序列之融合，以及 (d) (全部或部分地) 同源性或異源性功能失活或刪去的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座。

【0356】 例如，如本文所述，包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的非人類動物可進一步包含（例如，經由交叉育種或多基因靶向策略）一或多種修飾，如描述於美國專利號 8,642,835、8,697,940、9,006,511、9,035,128、9,066,502、9,150,662 與 9,163,092；其中每一者皆經由引用完整併入本文。在一些實施例中，所提供的非人類動物更包含人源化免疫球蛋白重鏈基因座（例如，一免疫球蛋白重鏈基因座，其包含人類 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段，其操作性連結至一或多個非人類免疫球蛋白重鏈恆定區基因）。在一些實施例中，所提供的非人類動物更包含人源化免疫球蛋白重鏈基因座，和無功能內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座（例如，全部或部分刪去，或以其他方式使其無功能）。

在一些實施例中，所提供的非人類動物包含一免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其具有人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，其操作性連結至一人類或非人類 $C\lambda$ 基因，其定位於一非人類 $C\kappa$ 基因處，以及一第二免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含人類 $V\kappa$ 和 $J\kappa$ 基因片段，其操作性連結至一內源性非人類 $C\kappa$ 基因。在此類實施例中，所提供的非人類動物被稱為經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的半合子。在一些實施例中，本文提供的半合子非人類動物更包含一人源化免疫球蛋白重鏈基因座。在一些實施例中，本文提供的該半合子非人

類動物更包含一人源化免疫球蛋白重鏈基因座和無功能之內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座。

使用所提供之非人類動物、細胞或組織之方法

【0357】 如本文所述的非人類動物可使用作為抗體開發的平台。尤其是，本文描述的非人類動物代表一絕佳平台，用於產生和辨識人類 λ 輕鏈可變結構域和包含此種人類 λ 輕鏈可變結構域的抗體。

【0358】 因此，本發明提供本文描述的非人類動物，其可用於製備抗體的方法中。根據本發明製備的抗體可包括如人類抗體、嵌合抗體、反向嵌合抗體、這些抗體任一者的片段，或其組合。

【0359】 在一些實施例中，如本文所述的非人類動物可用於製備人類抗體（例如，完整人類抗體），其中該人類抗體包含衍生自如本文所述的非人類動物之細胞基因物質編碼的核酸序列可變區。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物在足以使該非人類動物對該有興趣抗原產生免疫反應的條件和時間下，以該有興趣抗原產生免疫反應。抗體及/或抗體序列（即，編碼抗體之一部分的序列，例如可變區序列）係由非人類動物（或一或多個細胞，例如，一或多個 B 細胞）分離及/或辨識出，因而免疫化，並使用各種試驗測量如親和性、特異性、表位拼圖、阻斷配體 - 受體相互作用的能力、抑制受器活化等而鑑定。在各種實施例中，如本文所述的由非人類動物產生的抗體，包含一或多個人類可變區，其衍生自由非人類動物分離出的一或多個人類可變區核苷酸序列。在一些實施例中，可如本文所述，於非人類動物中產生抗藥物抗體（例如，抗獨特型抗體）。在各實施例中，如本文所述的由非人類動物產生的抗體為反向嵌合抗體，其包括一人類輕鏈可變結構域和一非人類（例如嚙齒動物）輕鏈恆定結構域，及/或一人類重鏈可變結構域，以及一非人類（例如嚙齒動物）重鏈恆定結構域。

【0360】 在各實施例中，由非人類動物產生的抗體包括具有人類可變結構域和非人類恆定結構域的重鏈和輕鏈。在一些實施例中，如本文所述的由非人類動物產生的抗體為反向嵌合抗體，其包括人類輕鏈可變結構域和非人類（例如嚙齒動物）輕鏈恆定結構域。在一些實施例中，如本文所述

的由非人類動物產生的抗體為反向嵌合抗體，其包括人類重鏈可變結構域和非人類（例如嚙齒動物）重鏈恆定結構域。

【0361】 在一些實施例中，所提供的方法包括以有興趣抗原使如本文所述的非人類動物免疫化。在一些實施例中，所提供的方法包括辨識出來自該非人類動物的淋巴細胞（例如，選殖篩選出的淋巴細胞），其中該淋巴細胞會表現與有興趣抗原結合（例如，特異性結合）的抗體。在一些實施例中，淋巴細胞為 B 細胞。在一些實施例中，人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列及/或人類 κ 輕鏈可變區序列，係由淋巴細胞（例如，B 細胞）取得及/或辨識出（例如，基因分型，例如，定序）。在一些實施例中，人類重鏈可變結構域序列、人類 λ 輕鏈可變結構域序列及/或人類 κ 輕鏈可變結構域序列，係由淋巴細胞（例如，B 細胞）取得及/或辨識出（例如，定序）。在一些實施例中，來自非人類動物 B 細胞之人類重鏈可變區序列、人類 λ 輕鏈可變區序列及/或人類 κ 輕鏈可變區序列，係於宿主細胞中表現。在一些實施例中，來自非人類動物 B 細胞之人類重鏈可變區序列變異體、一人類 λ 輕鏈可變區序列及/或一人類 κ 輕鏈可變區序列，係於宿主細胞中表現。在一些實施例中，變異體包括一或多個突變。在一些實施例中，一或多個突變可增進包括該變異體之抗體的藥物動力學及/或藥效學特性。在一些實施例中，一或多種突變可增進包括該變異體之抗體的特異性、親和力及/或免疫原性。

【0362】 在一些實施例中，製備人類抗體的方法包括辨識出一核苷酸序列，其編碼來自本文所述的非人類動物之人類免疫球蛋白重鏈可變結構域，及/或人類免疫球蛋白輕鏈可變結構域；以及 (i) 將編碼人類免疫球蛋白重鏈可變結構域的核苷酸序列，連接或接合至編碼人類免疫球蛋白重鏈恆定結構域的核苷酸序列，因而形成一人類免疫球蛋白重鏈序列，其編碼完整人類免疫球蛋白重鏈，(ii) 將編碼人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域的核苷酸序列，連接或接合至編碼人類免疫球蛋白 λ 輕鏈恆定結構域的核苷酸序列，因而形成一人類免疫球蛋白 λ 輕鏈序列，其編碼完整人類免疫球蛋白 λ 輕鏈，及/或 (iii) 將編碼人類免疫球蛋白 κ 輕鏈可變結構域的核苷酸序列，連接或接合至編碼人類免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定結構域的核苷酸序列，

因而形成一人類免疫球蛋白κ輕鏈序列，其編碼一完整的人類免疫球蛋白κ輕鏈。在某些實施例中，人類免疫球蛋白重鏈序列，和（i）人類免疫球蛋白λ輕鏈序列，或（ii）人類免疫球蛋白κ輕鏈序列係於細胞中表現（例如，宿主細胞、哺乳動物細胞），使得完整人類免疫球蛋白重鏈和（i）完整人類免疫球蛋白λ輕鏈或（ii）完整人類免疫球蛋白κ輕鏈被表現出，並形成人類抗體。在一些實施例中，人類抗體係由細胞或包含細胞的培養基中分離出。

【0363】 如本文所述的非人類動物可用於辨識一核苷酸或核酸序列，其編碼由本文所述的非人類動物產生的人類可變結構域，例如，作為抗某一表位或抗原之抗體的一部分。

【0364】 如本文所述的非人類動物可用於辨識由本文所述的非人類動物產生的人類可變結構域，例如，作為抗某一表位或抗原之抗體的一部分，之胺基酸序列。

【0365】 如本文所述的非人類動物提供經改良的活體內系統和生物材料（例如，細胞、核苷酸、多肽，蛋白質複合物）的來源，用於產生可用於多種試驗的人類抗體。在各種實施例中，如本文所述的非人類動物用於開發治療劑，其可靶向有興趣的多胜肽（例如，跨膜型或分泌型多胜肽），及/或調節與有興趣多胜肽有關的一或多種活性，及/或調節該有興趣多胜肽與其他結合夥伴（例如配位基或受器多胜肽）的交互作用。例如，在各實施例中，如本文所述的非人類動物係用於開發治療劑，其可靶向一或多種受器多胜肽、調節受器多胜肽活性，及/或調節受器多胜肽與其他結合夥伴的交互作用。在各實施例中，如本文所述的非人類動物，係用於辨識、篩選，及/或開發與一或多個有興趣多胜肽結合的候選治療劑（例如，抗體，siRNA等）。在各實施例中，如本文所述的非人類動物用於篩選和開發可阻斷一或多有興趣多胜肽活性，或阻斷一或多個受器多胜肽活性的候選治療劑（例如，抗體，siRNA等）。各種實施例中，如本文所述的非人類動物用於測定一或多個有興趣多胜肽的拮抗劑和/或協同劑的結合情況。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物用於測定結合一或多個候選治療性抗體的表位或表位群，該抗體結合一或多個有興趣多胜肽。

【0366】 在各實施例中，如本文所述的非人類動物用於測定一或多個人類抗體候選物的藥物動力學特徵。在各實施例中，如本文所述的一或多個非人類動物和一或多個對照組或參考組非人類動物，每一者皆暴露於一或多個人類抗體候選物下，於各種劑量下 (如 0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、7.5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg，或 50 mg/kg 或更高)。候選治療性抗體可經由任何所需的投藥途徑投藥，包括腸胃外和非腸胃外投藥途徑。腸胃外途徑包括例如靜脈內、動脈內、門靜脈內、肌肉內、皮下、腹膜內、脊柱內、鞘內、腦室內、顱內、胸膜內或其他注射途徑。非腸胃外途徑包括例如口服、鼻腔、穿皮、肺、直腸、口腔、陰道、眼部。投藥亦可經由連續輸注、局部給藥、由植入物 (凝膠、薄膜等) 持續釋放，及/或靜脈內注射。在不同時間點 (例如，0 小時、6 小時、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天，或至多 30 天或更多天)，自非人類動物 (人源化和對照組) 中分離血液。可使用取自如本文所述的非人類動物之樣品進行各種測定，以確定投予的候選治療性抗體的藥物動力學特徵，包括但不限於，總 IgG、抗治療性抗體反應、凝集等。

【0367】 在各實施例中，如本文所述的非人類動物，係用於測量阻斷或調節有興趣多胜肽活性的治療效果，以及由於細胞變化，或在受器多胜肽情況下，非人類動物細胞表面受器多胜肽的密度變化，而造成之基因表現影響。在各實施例中，將如本文所述的非人類動物或由其分離的細胞，暴露於候選治療劑下 (其與有興趣多胜肽結合)，並經過一段時間後，分析其對於特定細胞過程之影響，該過程係與該有興趣多胜肽相關，例如，配位基-受器相互作用或訊息傳遞。

【0368】 如本文所述的非人類動物，可表現人類抗體可變區，因此可產生細胞、細胞株和細胞培養物，以作為人類抗體可變區的來源，用於結合和功能性試驗，例如，用於測定拮抗劑或協同劑的結合或功能，特別是當該拮抗劑或協同劑對於有興趣人類抗原或某一表位具特異性時，其功能為

配位基-受器相互作用(結合)。在各種實施例中，與候選治療性抗體或 siRNA 結合的表位，可使用由本文所述的非人類動物分離出的細胞而確定。

【0369】 來自所提供的非人類動物的細胞可被分離出，並在特別基底 (ad hoc basis) 上使用，或者可在培養物中維持許多代。在各實施例中，來自所提供的非人類動物之細胞為永生化（例如，經由使用病毒），並可無限期地保持在培養物中（例如，在連續培養中）。

【0370】 在一些實施例中，該非人類細胞為非人類淋巴細胞。在一些實施例中，非人類細胞選自於 B 細胞、樹突細胞、巨噬細胞、單核細胞和 T 細胞。在一些實施例中，非人細胞為未成熟 B 細胞、成熟初始 B 細胞、活化 B 細胞、記憶 B 細胞及/或漿細胞。

【0371】 在一些實施例中，非人類細胞為非人類胚胎幹 (ES) 細胞。在一些實施例中，非人類 ES 細胞為嚙齒動物 ES 細胞。在某些實施例中，嚙齒動物 ES 細胞為小鼠 ES 細胞，來自 129 品系、C57BL 品系、BALB/c 或其混合物。在某些實施例中，嚙齒動物胚胎幹細胞為小鼠胚胎幹細胞，且為 129 和 C57BL 品系混合。在某些實施例中，嚙齒動物胚胎幹細胞為小鼠胚胎幹細胞，且為 129、C57BL 與 BALB/c 品系混合。

【0372】 在一些實施例中，提供如本文所述的非人類 ES 細胞，用於製備非人類動物的用途。在某些實施例中，非人類 ES 細胞為小鼠 ES 細胞，並用於製造包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的小鼠。在某些實施例中，非人類 ES 細胞為大鼠 ES 細胞，並用於製造包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的大鼠。

【0373】 在一些實施例中，非人類組織選自脂肪、膀胱、腦、乳腺、骨髓、眼、心臟、腸、腎、肝、肺、淋巴結、肌肉、胰腺、血漿、血清、皮膚、脾、胃、胸腺、睪丸、卵子及其組合。

【0374】 在一些實施例中，係提供由本文所述的經分離非人類細胞或組織製備、產生、製造或獲得的永生化細胞。

【0375】 在一些實施例中，提供由如本文所述的非人類 ES 細胞製備、產生、製造或獲得的非人類胚胎。在某些實施例中，非人類胚胎為嚙齒動物胚胎；在一些實施例中，為小鼠胚胎；在一些實施例中，為大鼠胚胎。

【0376】 如本文所述的非人類動物，係提供一種活體內系統，用於產生與有興趣多胜肽結合之人類抗體可變區的變異體（例如人類 V λ 結構域變異體）。此類變異體包括人類抗體可變區，其具有所需功能性、特異性，與目標多胜肽的二或多種變異體共有的共同表位之低交叉反應性。在一些實施例中，如本文所述的非人類動物係用於產生人類抗體可變區，其包含一系列變異體可變區，其可篩選所需或增進的功能性。

【0377】 如本文所述的非人類動物係提供用於產生一種活體內系統，用於產生人類抗體可變區庫（例如，人類 V λ 結構域庫）。此類可變區庫提供重鏈及/或輕鏈可變區序列的來源，其可基於期望的效應子功能移植到不同的 Fc 區上，使用作為可變區序列的親和力成熟的來源，利用本領域已知技術（例如定點突變、易錯 PCR 等），及/或使用作為用於產生抗體-基礎治療分子的抗體成分來源，例如嵌合性抗原受體（即，使用抗體成分改造的分子，例如 scFv）、多特異性結合劑（例如，雙特異性結合劑）和融合蛋白（例如，單結構域抗體，scFv 等）。

【0378】 在一些實施例中，係提供在非人類動物中產生抗體的方法，該方法包括以下步驟：（a）以有興趣抗原使本文所述的非人類動物免疫化；（b）將該非人類動物維持在足以使非人類動物對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；（c）自與有興趣抗原結合的非人類動物或非人類細胞中回收抗體。

【0379】 在非人類動物中產生抗體之方法的一些實施例中，該非人類細胞為 B 細胞。在非人類動物中產生抗體之方法的一些實施例中，該非人類細胞為融合瘤。

【0380】 在一些實施例中，提供了非人動物，其生殖細胞系基因組包含同型合子之內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含（i）人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其組合，（ii）人類 J J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合，以及（iii）非人類或人

類 C λ 基因，其中 (i) - (iii) 彼此可操作性連接，該非人類或人類 C λ 基因係插入位於內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的非人類 C κ 基因處，該人類 V λ 基因片段包括人類非編碼 DNA，其天然地出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座中相對應的人類 V λ 基因片段，以及該人類 J λ 基因片段包括人類非編碼 DNA，其天然地出現在鄰近於內源性人類 λ 輕鏈基因座中相對應的人類 V λ 基因片段。在所提供的非人類動物的某些實施例中，非人類 C λ 基因為或包含小鼠 C λ 1 基因。在所提供非人類動物的某些實施例中，人類 C λ 基因為或包含人類 C λ 2 基因。在所提供非人類動物的某些實施例中，該內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含非人類免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子 E κ i 和 3'E κ 。在所提供非人類動物的某些實施例中，該內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包括非人類 V κ 和 J κ 基因片段的刪去。

【0381】 在一些實施例中，係提供以一方法製備的抗體，該方法包括以下步驟：(a) 提供如本文所述的非人類動物；(b) 以有興趣抗原使非人類動物產生免疫反應；(c) 將該非人類動物維持在足以使該非人類動物對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；(d) 自與有興趣抗原結合的非人類動物或非人類細胞中回收抗體，其中 (d) 之抗體包括人類 V H 和 V λ 結構域。

【0382】 在經由一方法製備抗體的一些實施例中，由重排的人類重鏈可變區編碼的人類 V H 結構域包含一人類 V H 3-74、V H 3-73、V H 3-72、V H 2-70、V H 1-69、V H 3-66、V H 3-64、V H 4-61、V H 4-59、V H 1-58、V H 3-53、V H 5-51、V H 3-49、V H 3-48、V H 1-46、V H 1-45、V H 3-43、V H 4-39、V H 4-34、V H 3-33、V H 4-31、V H 3-30、V H 4-28、V H 2-26、V H 1-24、V H 3-23、V H 3-21、V H 3-20、V H 1-18、V H 3-15、V H 3-13、V H 3-11、V H 3-9、V H 1-8、V H 3-7、V H 2-5、V H 7-4-1、V H 4-4、V H 1-3、V H 1-2 V H 6-1，或其體細胞高度突變變異體。

【0383】 在經由一方法製備抗體的一些實施例中，由重排的人類 λ 輕鏈可變區編碼的人類 V λ 結構域包含人類 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、

Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其體細胞高度突變之變異體。

【0384】 在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞或非人類組織，用於製備及/或開發用於治療或診斷的藥物（例如，抗體或其片段）。

【0385】 在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞或非人類組織，用於製備用於治療、預防或改善疾病、病症或症狀的藥物。

【0386】 在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞或非人類組織，用於藥物或疫苗的製造及/或開發，例如使用作為藥物之用途。

【0387】 在一些實施例中，係提供如本文所述的非人類動物、非人類細胞或非人類組織，用於製造及/或開發抗體或其片段之用途。

【0388】 如本文所述的非人類動物提供一活體內系統，用於分析和測試藥物或疫苗。在各種實施例中，候選藥物或疫苗可遞送至一或多種如本文所述的非人類動物中，之後監測該非人類動物，以確定對藥物或疫苗的免疫反應、藥物或疫苗安全性概況之一或多者，或對疾病或症狀，及/或疾病或病症的一或多種症狀的影響。用於確定安全性特徵的例示性方法包括毒性測量、最佳劑量濃度、抗體（即抗藥物）反應、藥物或疫苗的功效和可能的風險因素。這些藥物或疫苗可在此類非人類動物中改進及/或開發。

【0389】 疫苗藥效可使用多種方法測量。簡言之，使用本領域已知的方法接種本文所述的非人類動物，之後以疫苗刺激，或將疫苗投予已經感染的非人類動物。非人類動物對疫苗的反應，可經由監測及/或對非人類動物（或由其分離出的細胞）進行一或多種試驗來測量，以確定該疫苗的效力。之後使用本領域已知，及/或本文所述的一或多種措施，將非人類動物對疫苗的反應與對照組動物進行比較。

【0390】 疫苗功效可進一步經由病毒中和試驗來確定。簡言之，如本文所述的非人類動物係進行免疫反應，並在免疫反應後的不同天收集血清。將血清的系列稀釋液與病毒預靜置，在此期間血清中對於病毒具特異性的

抗體將與其結合。之後將病毒/血清混合物加入許可細胞中，藉由噬斑試驗或微量中和室驗確定感染性。若血清中的抗體可中和病毒，則與對照組相較，斑塊或相對螢光酶單位會較少。

【0391】 如本文所述的非人類動物會製造人類抗體可變區，因此，係提供一種活體內系統，用於製造人類抗體，其用於診斷應用（例如，免疫學、血清學、微生物學、細胞病理學等）。在各實施例中，如本文所述的非人類動物可用於製造人類抗體可變區，其結合相關抗原位點，用於細胞變化之辨識，例如指示病理變化的特定細胞表面標誌物的表現。此類抗體可與各種化學實體（例如，放射性追蹤劑）共軛，並可以根據需要用於各種活體內及/或體外試驗。

【0392】 如本文所述的非人類動物提供增進的活體內系統，用於開發和篩選用於腫瘤學及/或傳染病學的人類抗體。在各種實施例中，如本文所述的非人類動物與對照組非人類動物（例如，具有與本文所述不同的基因修飾，或不具有基因修飾，即野生型），可植入腫瘤（或腫瘤細胞），或感染病毒（例如，流感病毒、HIV、HCV、HPV等）。植入感染後，可投予非人類動物一候選治療劑。在投予候選治療劑之前，可允許腫瘤或病毒有足夠的時間，在非人類動物體內一或多處建立。此外且/或額外地，可在此類非人類動物中監測免疫反應，以鑑定和篩選出可作為治療劑開發的潛在人類抗體。

醫藥組成物

【0393】 在一些實施例中，由本文揭示的非人類動物製造的抗體、核酸或其治療相關部分，或衍生自由本文揭示的非人類動物產生的抗體、核酸或其治療相關部分，可投予個體中（例如，人類個體）。在一些實施例中，醫藥組成物包括由本文揭示的非人類動物製造之抗體。在一些實施例中，醫藥組成物可包含緩衝劑、稀釋劑、賦形劑或其任一組合。在一些實施例中，如果需要，組成物亦可含有一或多種額外的治療活性物質。

【0394】 儘管本文提供的醫藥組成物描述主要涉及適合於對人類進行道德性投予之醫藥組成物，但本領域技術人員將理解，此類組成物通常適合

投予各種動物。修飾適於對人類投藥的醫藥組成物，以使該組成物適於投予各種動物，是可以理解的，且一般技術的獸醫藥理學家可僅通過一般實驗（如果有的話）來設計及/或進行此種修飾。

【0395】 例如，本文提供的醫藥組成物可以無菌可注射形式（例如，適於皮下注射或靜脈內輸注的形式）提供。例如，在一些實施例中，醫藥組成物以適於注射的液體劑型提供。在一些實施例中，醫藥組成物以粉末形式提供（例如，凍乾及/或滅菌），任選地在真空下，其可在注射前以水性稀釋劑（例如水、緩衝液、鹽類溶液等）重新配製。在一些實施例中，醫藥組成物係稀釋及/或重製於水、氯化鈉溶液、醋酸鈉溶液、苯甲醇溶液、磷酸鹽緩衝鹽水等中。在一些實施例中，粉末應與水性稀釋劑輕輕混合（例如，不搖動）。

【0396】 本文所述醫藥組成物的配方，可經由藥理學領域已知或之後開發的任何方法製備。一般而言，這種製備方法包括將活性成分與稀釋劑或另一種賦形劑，及/或一或多種其它輔助成分結合的步驟，之後，如果需要及/或希望，將產品成型及/或包裝成所期望的單一劑量或多劑量單位。

【0397】 在一些實施例中，包含由本文揭示非人類動物製造的抗體之醫藥組成物，可包含在用於儲存或投藥的容器中，例如小瓶、注射器（例如，IV 注射器）或袋中（例如，IV 袋）。本發明的醫藥組成物可以大包裝製備、包裝及/或銷售，為單一單位劑量，及/或多個單一單位劑量。如本文所使用，“單位劑量”是包含預定活性成分的醫藥組成物之不連續量。活性成分的量通常等於給予個體的活性成分劑量，及/或這種劑量的方便部分，例如，這種劑量的一半或三分之一。

【0398】 本發明醫藥組成物中的活性成分、藥學上可接受賦形劑，及/或任何其他成分的相對量，將根據所治療的個體、大小及/或症狀而變化，且更取決於組成物之投藥途徑。舉例而言，該組成物可包含 0.1% 至 100% (w/w) 的活性成分。

【0399】 醫藥組成物可額外包含藥學上可接受的賦形劑，如本文所用，其包括任一與所有的溶劑、分散介質、稀釋劑或其他液體載體、分散或懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠劑或乳化劑、防腐劑、固體黏著劑、

潤滑劑及類似物，適合於所需的特定劑型。Remington's The Science and Practice of Pharmacy,第 21 版, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)揭示用於配製醫藥組成物的各種賦形劑，以及用於其製備的已知技術。除非任何常規賦形劑介質與物質或其衍生物不相容，例如經由產生任何不希望的生物效應，或以不利方式與醫藥組成物的任何其他成分作用，否則其用途視為落於本發明範疇內。

【0400】 在一些實施例中，醫藥上可接受的賦形劑為至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%純的。在一些實施例中，賦形劑被核准用於人類和用於獸醫用途。在一些實施例中，賦形劑由美國食品藥物管理局核准。在一些實施例中，賦形劑為醫藥用等級。在一些實施例中，賦形劑符合美國藥典（USP）、歐洲藥典（EP）、英國藥典及/或國際藥典的標準。

【0401】 在醫藥組成物的製造中使用的藥學上可接受的賦形劑包括但不限於，惰性稀釋劑、分散劑及/或成粒劑、界面活性劑及/或乳化劑、崩解劑、黏合劑、防腐劑、緩衝劑、潤滑劑及/或油。此類賦形劑可任擇地包括在醫藥組成物中。根據配製者的判斷，諸如可可脂及栓劑蠟、著色劑、塗覆劑、甜味劑、調味劑及/或芳香劑之賦形劑，可存在於組成物中。

【0402】 在一些實施例中，提供的醫藥組成物包含一種多種藥學上可接受的賦形劑（例如，防腐劑、惰性稀釋劑、分散劑、界面活性劑，及/或乳化劑、緩衝劑等）。在一些實施例中，醫藥組成物包含一或多種防腐劑。在一些實施例中，醫藥組成物不含防腐劑。

【0403】 在一些實施例中，醫藥組成物以可冷藏及/或冷凍的形式提供。在一些實施例中，藥物組合物以無法冷藏及/或冷凍的形式提供。在一些實施例中，重新配製溶液及/或液體劑型，可在重新配製後儲存一段時間（例如，2 小時、12 小時、24 小時、2 天、5 天、7 天、10 天、2 週、一個月、兩個月或更長時間）。在一些實施例中，抗體組成物的儲存若超過特定時間，會導致抗體降解。

【0404】 在投藥之前，液體劑型及/或重新配製溶液可包含顆粒物質及/或變色。在一些實施例中，若出現變色或混濁，及/或若在過濾後仍殘留顆粒物質，則不應使用該溶液。

【0405】 例如，在 Remington 中可以找到製劑及/或製造藥劑的一般考慮因素：The Science and Practice of Pharmacy,第 21 版, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

套組

【0406】 本發明更提供一種包裝或套組，其包含一或多個容器，填充有至少一種如本文所述的非人類動物、非人類細胞、DNA 片段、靶向載體或其任一組合。套組可用於任何可應用的方法（例如，研究方法）。任擇地與此類容器組合者可為一注意事項，其為由管理藥品或生物製品的製造、使用或銷售的政府機構規定形式，該注意事項反映（a）該機構核准用於人類之製造、使用或銷售，（b）使用說明，及/或（c）管理二或更多種材料及/或生物製品（如本文所述的非人類動物或非人類細胞）轉移的合約，及其組合。

【0407】 在一些實施例中，係提供一套組，其包含如本文所述的非人類動物、非人類細胞、非人類組織、永生化細胞、非人類 ES 細胞或非人類胚胎。在一些實施例中，係提供一套組，其包含來自如本文所述的非人類動物、非人類細胞、非人類組織、永生化細胞、非人類 ES 細胞或非人類胚胎的胺基酸（例如，抗體或其片段）。在一些實施例中，係提供一套組，其包含來自如本文所述的非人類動物、非人類細胞、非人類組織、永生化細胞、非人類 ES 細胞或非人類胚胎的核酸(如編碼一抗體或其片段之核酸)。在一些實施例中，係提供一套組，其包含由如本文所述的非人類動物、非人類細胞、非人類組織、永生化細胞、非人類 ES 細胞或非人類胚胎中辨識出的序列(胺基酸及/或核酸序列)。

【0408】 在一些實施例中，係提供如本文所述的套組，其用於製備及/或開發用於治療或診斷的藥物（例如，抗體或其片段）。

【0409】 在一些實施例中，係提供如本文所述的套組，其用於製備及/或開發用於治療、預防或改善疾病、病症或症狀的藥物（例如，抗體或其片段）。

【0410】 某些實施例的其他特徵將由下列例示性實施例的描述過程中更臻清楚，這些是為了說明而提供，並不旨在限制本發明。

實例

【0411】 提供以下實例以便向本領域技術人員描述如何製備和使用本文所述的方法和組成物，且并不旨在限制本發明人視為其發明的範圍。除非另有說明，否則溫度以攝氏度表示，壓力為大氣壓或接近大氣壓。

實例 1. 構建靶向載體，用於產生表現來自 κ 輕鏈基因座的至少一個 λ 輕鏈的嚙齒動物

實例 1.1. 改造包含嚙齒動物 λ 恆定區的靶向載體

【0412】 本實例說明了構建靶向載體，以插入非人類動物例如嚙齒動物（例如小鼠）基因組中的例示性方法。此外，本實例呈現非人類動物的產生，其生殖細胞系基因組包含經改造的免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座。尤其是，本實例呈現一靶向載體的構建，用於在嚙齒動物中改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，使得該嚙齒動物可表現及/或產生抗體，其包括免疫球蛋白 λ 輕鏈，其具有來自非人類動物生殖細胞系基因組中的該免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類可變區和非人類免疫球蛋白 λ 恆定（ $C\lambda$ ）區域。如下文實例 2 中所述，含有多個人類 $J\lambda$ （例如， $J\lambda 1$ 、 $J\lambda 2$ 、 $J\lambda 3$ 、 $J\lambda 6$ 和 $J\lambda 7$ ）的 DNA 片段編碼序列，以及嚙齒動物 $C\lambda$ （例如，小鼠 $C\lambda 1$ ）編碼序列，係插入內源性嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中。在特定例示性實施例中，小鼠 $C\lambda 1$ 基因係插入取代小鼠 $C\kappa$ 基因，並與嚙齒動物 $Ig\kappa$ 增強子（例如， $E\kappa i$ 和 $3'E\kappa$ ）操作性連結。用於產生靶向載體的例示性策略，該載體用於在嚙齒動物中產生經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其特徵在於存在多個人類 $V\lambda$ 和 $J\lambda$ 基因片段，其操作性連結至一嚙齒類（例如小鼠） $C\lambda$ 基因，並操作性連結至內源性 $Ig\kappa$ 增強子，係示於圖 1（圖 1A：構建靶向載體的

初始步驟；圖 1B：構建靶向載體的其他後續步驟；人類 V λ 和 J λ 基因片段之間的人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，係以具有下寬對角線的空白條狀表示（例如，請參見美國專利號 9,006,511、9,035,128、9,066,502、9,150,662 和 9,163,092），lox：lox2372；NEO：新黴素抗性基因（neo^R），在泛素啟動子的轉錄控制下，HYG：潮黴素抗性基因（hyg^R），在泛素啟動子的轉錄控制下，Spec：大觀黴素抗性基因（Spec^R），R6K：R6K 複製起點）。

【0413】 含有人類 J λ 和嚙齒動物 C λ 編碼序列的靶向載體，用於插入嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，係使用 VELOCIGENE® 技術（參見，例如，美國專利號 6,586,251 和 Valenzuela 等人, 2003, Nature Biotech.

21(6):652-9; 經由引用完整併入本文）和本領域已知的分子生物學技術創造。閱讀本實例的一般技術人員將理解，所描述的技術和方法可用於利用任何人類 J λ 和任何 C λ 編碼序列，或編碼序列（或序列片段）的組合。

【0414】 簡言之，一段 2.7kb 的 DNA 片段，其含有人類 J λ 基因片段 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 與 J λ 7，以及獨特的 5' 和 3' 重疊區域，其分別對應於人類 V κ -J κ 基因組（非編碼）序列，以及小鼠 C κ 基因的 5' 基因組序列，係由重新 DNA 合成方式製備（pA; 圖 1A，左上角，Blue Heron Biotech, Bothell, WA）。各種限制酶識別位點包含於 DNA 片段中，以幫助之後篩選標記和其他 DNA 片段之選殖（如下所述）。DNA 片段經過獨特設計，以含有與人類 J λ 編碼序列和人類 J λ 重組信號序列（RSS）並列的非編碼人類 J κ 序列。如技術上已知，RSS 由七個核苷酸（七聚體）的保守性嵌段組成，接著是長度為 12 或 23 個鹼基對的間隔區，之後是第二段 9 個核苷酸（九聚體）的保守區。因此，RSS 具有 7-12-9（12RSS）或 7-23-9（23RSS）的配置，取決於相關的基因區段（請參見，例如，Murphy, Kenneth 等人, “第 5 章” *Janeway's Immunobiology*, 第 8 版, Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, 2012 之圖 5.4，其經由引用完整併入本文）。尤其是，人類 J λ 基因片段（即人類 J λ 編碼序列）及其相關的 12RSS，被取代位於人類 J κ 基因片段（即人類 J κ 編碼序列）與其相關的 23RSS 處。因此，此片段含有人類 J λ 與 J κ DNA 序列。在本文所述的靶向載體中包含此類序列，可在改造嚙齒動物 Ig κ 輕鏈基因座內提供（或促進）人類 V λ 和 J λ 基因區段的有效連接。

【0415】 質體 A (pA) 係以 AgeI 和 EcoRI 切割，並接合至新黴素篩選卡匣（即，在泛素啟動子控制下的 Neo^R 基因，其接有 lox2372 位點），其含有相容的末端，以產生質體 B (pB)（圖 1A）。此外，獨特 DNA 片段，其含有小鼠 Igκ 內含子增強子 (Ei)、小鼠 Cλ1 基因（來自 BAC 複製株 RP23-60e14）的、一段含有 316bp 序列的 DNA 片段，其緊鄰於小鼠 C κ 編碼序列的下游，並有 80bp 的重疊序列，以促進等溫組合，以及限制酶識別位點 (NotI、MluI)，以促進之後的複製步驟，以及 R6K-Spec（一種大觀黴素腺苷酸轉移酶基因，以及 R6K 複製起點），係藉由聚合酶連鎖反應 (PCR) 倍增，並經由等溫組合在一起（請見如 Gibson, D.G. 等人, 2009, Nat. Meth. 6(5):343-5; Gibson, D.G. 等人, 2010, Nat. Meth. 7:901-903；其經由引用完整併入本文），以創造出質體 C (pC)，之後以 NotI 和 MluI 切割，並接合到潮黴素(Hygromycin)篩選卡匣（即在泛素啟動子控制下的 Hyg^R 基因，其接有 loxP 位點），含有可相容末端，以創造出質體 D (pD；圖 1A，頂部和中間右側)。所得的質體 (pD；圖 1A，中間) 之後以 PI-SceI 和 AscI 切割，並與含有相容末端的質體 B (pB) 接合（圖 1A，底部），以產生質體 E (pE)。

【0416】 在下一步驟中，含有人類 Vλ 與 Jλ 基因片段的靶向載體，係操作性連結至小鼠 Cκ 基因和人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列(其定位於人類 Vλ 和 Jλ 基因片段之間)（請參見如，美國專利號 9,006,511，其經由引用完整併入本文），分別以 NotI 切割並重新接合，以移除包含人類免疫球蛋白 κ 序列的人類 Vλ 區域（圖 1B，頂部），導致約 137kb 之刪去。所得到的構建體（構建體 F），係使用 CRISPR/Cas9 等溫組合法，與質體 E (pE) 組合（請參見如，美國專利號 9,738,897 和美國公開號 2016/0145646；經由引用完整併入本文），使得具有人類 Jλ-12RSS 編碼序列 (CDS) 的人類 Jκ 區域，係操作性連接至人類 Vκ-Jκ 基因間（非編碼）區域（請參見如美國專利號 9,006,511，其經由引用完整併入本文），與小鼠 Igκ 3' 增強子（圖 1B）。在含有卡那黴素(Kanamycin)、潮黴素(Hygromycin)和大觀黴素(Spectinomycin)的培養基上，篩選出陽性細菌複製株。所得到的靶向載體（構建體 G）含有(由 5'端至 3'端)一 loxP 識別位點、NotI 位點、人類

V κ -J κ 基因間序列（請見如美國專利號 9,006,511，其經由引用完整併入本文）、側接有 *lox2372* 識別位點的新黴素(Neomycin)篩選卡匣、具有 5 個人類 J λ 基因片段的人類 J κ 區域，以及其各自的 12RSS、一小鼠免疫球蛋白 κ 內含子增強子 (Ei κ)、一小鼠 C λ 1 基因、側接有 *loxP* 識別位點的潮黴素(Hygromycin)篩選卡匣、小鼠免疫球蛋白 κ 3'增強子 (3'E κ)，以及大觀黴素(Spectinomycin)篩選卡匣（圖 1B）。

實例 1.2. 改造包含人類 λ 恆定區的靶向載體

【0417】 本實例說明構建靶向載體，以插入非人類動物例如嚙齒動物（例如小鼠）基因組中的例示性方法。此外，本實例呈現非人類動物的製造，其生殖細胞系基因組包含改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座。尤其是，本實例呈現靶向載體之構建，其用於在嚙齒動物中改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，使得該嚙齒動物可表現及/或產生抗體，其包含的免疫球蛋白 λ 輕鏈具有人類可變區以及來自該非人類動物生殖細胞系基因組中的該免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之人類免疫球蛋白 λ 恆定 (C λ) 區。如下面實例 2 所述，含有多個人類 J λ (如 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 與 J λ 7)編碼序列，以及一人類 C λ (如人類 C λ 2)編碼序列之 DNA 片段，係插入一內源性嚙齒類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座。尤其是，人類 C λ 2 基因係插入小鼠 C κ 基因位置，並操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白 κ 增強子（例如，Ei κ 和 3'E κ ）。用於創造靶向載體的例示性策略係於圖 3 中闡述。

【0418】 含有人類 J λ 和人類 C λ 編碼序列的靶向載體，用於插入嚙齒動物 Ig κ 輕鏈基因座，係使用 VELOCIGENE®技術 (請見如美國專利號 6,586,251，以及 Valenzuela 等人, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-9；經由引用完整併入本文)，以及技術上已知的分子生物技術創造。閱讀本實施例的普通技術人員將理解，所描述的方法和技術可用於使用任何人類 J λ 和 C λ 編碼序列，或編碼序列（或序列片段）的組合，若有需要的話。

【0419】 簡言之，一段 871bp 之 DNA 片段，含有一人類 C λ 編碼序列與獨特的 5'和 3'重疊區，分別對應於小鼠 C κ 基因的基因組序列之 5'和 3'，係以 重新 DNA 合成法製備(pH; 圖 3，左上角，Blue Heron Biotech, Bothell,

WA)。各種限制酶識別位點係包括在 DNA 片段中，以允許隨後選殖篩選標記物和其他 DNA 片段（如下所述）。質體 H (pH) 係以 AgeI 和 XhoI 切割，並接合至潮黴素(Hygromycin)篩選卡匣（即 Hyg^R 基因，在側接有 loxP 位點的泛素啟動子控制下），其含有相容的末端，以產生質體 J (pJ；圖 3)。中間構建體（構建體 K，使用 Cas9 和等溫組合，由構建體 F 和質體 B 產生），其含有一改造人類 J κ 區域，具有人類 J λ 編碼序列（如上所述），操作性連結至小鼠 C κ 基因與小鼠 Ig κ 增強子，使用 CRISPR/Cas9 等溫組裝方法，與質體 J 組合（請參見如美國專利號 9,738,897，與美國公開號 2016/0145646；經由引用完整併入本文），使得具有人類 J λ -12RSS 編碼序列（CDS）的人類 J κ 區域，可操作性連結至質體 J 的人類 C λ 2 (圖 3)。在含有卡那黴素(Kanamycin)、潮黴素(Hygromycin)和大觀黴素(Spectinomycin)的培養基上，篩選出陽性細菌複製株。得到的靶向載體（構建體 L）含有(由 5'端至 3'端)，loxP 識別位點、NotI 位點、人類 V κ -J κ 基因間序列（請參見如美國專利號 9,006,511，其經由引用完整併入本文）、側接有 lox2372 識別位點的新黴素(Neomycin)篩選卡匣、具有 5 個人類 J λ 基因片段與其各自的 12RSS 的人類 J κ 區域、小鼠 Ig κ 內含子增強子 (Ei κ)、人類 C λ 2 基因、側接有 loxP 識別位點的潮黴素(Hygromycin)篩選卡匣、小鼠免疫球蛋白 κ 3'增強子 (3'E κ) 和大觀黴素(Spectinomycin)篩選卡匣（圖 3）。

實例 2. 產生具有改造輕鏈基因座的嚙齒動物

【0420】 本實例呈現非人類動物（例如嚙齒動物）的產生，其生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包括插入多個人類 V λ 與 J λ 基因片段以及嚙齒動物或人類 C λ 基因，其中該人類 V λ 與 J λ 基因片段，係操作性連結至該嚙齒動物或人類 C λ 基因，且該嚙齒動物或人類 C λ 基因插入取代內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之嚙齒動物 C κ 基因。在一些實施例中，此類非人類動物的特徵為免疫球蛋白 λ 輕鏈（可變和恆定結構域），係表現自內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座。

【0421】 實例 1.1 和 1.2 中描述的靶向載體之靶向插入，係經由聚合酶連鎖反應確認。經聚合酶連鎖反應確認的靶向 BAC DNA，係經由電穿孔法引入 F1 雜交（C57BL6NTac/129S6SvEvTac）小鼠胚胎幹（ES）細胞，之後在篩選用培養基中培養。

【0422】 用於構建體 G（小鼠 Cλ1）電穿孔的 ES 細胞，具有生殖細胞系基因組，其包括異源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其含有多個人類 Vλ與 Jλ基因片段，操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈恆定區基因，其包括嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈增強子，以及一人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，其定位於人類 Vλ和 Jλ基因片段之間，以及一野生型嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈基因座。電穿孔前後的 ES 細胞如圖 2A 所示（1741HET：嚙齒動物 ES 細胞複製株，其具有改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座異型合子之基因組，含有人類 Vλ與 Jλ基因片段，可操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈恆定區基因，包括嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈增強子，以及一人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，其定位於人類 Vλ和 Jλ基因片段之間，由具有寬向下對角線的空白條表示，以及野生型免疫球蛋白重鏈和λ輕鏈基因座，例如請參見美國專利號 9,006,511、9,035,128、9,066,502、9,150,662 和 9,163,092，其經由引用完整併入本文；6557HET：一種小鼠 ES 細胞複製株，在插入構建 G 後產生基因組異型合子之改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其包括嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈增強子，其中該改造免疫球蛋白κ輕鏈基因座的特徵為存在多個人類 Vλ和 Jλ基因片段，其中人類 Jλ基因片段包含在人類 Jκ區域序列中，其具人類 Jλ基因片段編碼序列和人 Jλ12RSS，取代相對應的人類 Jκ基因片段編碼序列和人類 Jκ23RSS，以及其中人類 Vλ和 Jλ基因片段係操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白λ輕鏈恆定區基因（例如，mCλ1）；lox: lox2372; NEO：在泛素啟動子轉錄控制下的新黴素(Neomycin)抗性基因(neo^R)；HYG：在泛素啟動子轉錄控制下的潮黴素(Hygromycin)抗性基因(hyg^R)；用於篩選 ES 細胞複製株的所選引子/探針組的位置，指出在下文描述的試驗中檢測到的改造 Igκ輕鏈基因座內的區域的位置附近)。

【0423】 用於構建體 L（小鼠 Cλ2）電穿孔的 ES 細胞，具有生殖細胞系基因組，其包括異源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座，其含有多個人類 Vλ與

J λ 基因片段，操作性連結至嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈恆定區基因，其包括嚙齒動物免疫球蛋白輕鏈 κ 增強子，以及一人類免疫球蛋白 κ 輕鏈序列，其定位於人類 V λ 和 J λ 基因片段之間，以及一野生型嚙齒動物 Ig κ 基因座。電穿孔前後的 ES 細胞如圖 4A 所示（1741HET：*supra*；20029HET：一種插入靶向載體之小鼠 ES 細胞複製株，該載體具有基因組異型合子之改造 Ig κ 輕鏈基因座，其包括嚙齒動物免疫球蛋白 κ 輕鏈增強子，其中該改造 Ig κ 輕鏈基因座的特徵為存在多個人類 V λ 和 J λ 基因片段，其中人類 J λ 基因片段包含在人類 J κ 區域序列中，其具人類 J λ 基因片段編碼序列和人 J λ 12RSS，取代相對應的人類 J κ 基因片段編碼序列和人類 J κ 23RSS，以及其中人類 V λ 和 J λ 基因片段係操作性連結至人類 Ig λ 輕鏈恆定區基因（例如，hC λ 2）；lox: lox2372; NEO：在泛素啟動子轉錄控制下的新黴素 (Neomycin)抗性基因 (neo^R)；HYG：在泛素啟動子轉錄控制下的的潮黴素 (Hygromycin)抗性基因(hyg^R)；用於篩選 ES 細胞複製株的所選引子/探針組的位置，指出在下文描述的試驗中檢測到的改造 Ig κ 輕鏈基因座內的區域的位置附近)。

【0424】 在電穿孔後 10 天挑選抗藥性菌落，並經由 TAQMAN™篩選，並進行核型分析以進行正確的靶向，如前所述(Valenzuela 等人, *supra*; Frendewey, D.等人, 2010, Methods Enzymol. 476:295-307; 經由引用完整併入本文)。表 1 列出了用於篩選陽性 ES 細胞複製株的例示性引子/探針組（F：正向；R：反向；P：探針；GOA：等位基因增加 LOA：等位基因缺失；WT：野生型）。

【0425】 VELOCIMOUSE®法(DeChiara, T.M.等人, 2010, Methods Enzymol. 476:285-294; DeChiara, T.M., 2009, Methods Mol. Biol. 530:311-324; Poueymirou 等人, 2007, Nat. Biotechnol. 25:91-99;經由引用完整併入本文)，其中靶向 ES 細胞係注射到未濃縮的 8-細胞期 Swiss Webster 胚胎中，用於產生健康的完全 ES 細胞衍生 F0 代小鼠，其改造 Ig κ 輕鏈基因座為異型合子（圖 2A 和 4A）。將 F0 代異型合子小鼠與 C57Bl6/NTac 小鼠雜交，以產生 F1 異型合子，其異種交配，以產生同型合子之 F2 代動物，用於表型分析。

【0426】 或者，可以修飾具有如上所述的改造免疫球蛋白 κ 基因座的鼠類 ES 細胞，以根據需要移除經由靶向載體引入的一或多個篩選卡匣（圖 2B：6557HET：如上文；6558HET：一種小鼠 ES 細胞複製株，其中新黴素和潮黴素篩選卡匣經重組酶介導切下後，與靶向載體同源重組；圖 4B：20029HET：如上文；20030HET：一種小鼠 ES 細胞複製株，其中新黴素和潮黴素篩選卡匣經重組酶介導切下後，與靶向載體同源重組。Cre：Cre 重組酶）。例如，經由靶向載體引入的新黴素和潮黴素卡匣可藉由重組酶暫時表現經由育種表現重組酶的基因改造品系，在改造 ES 細胞（或胚胎）中移除（請見如 Lakso, M.等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6; Orban, P.C.等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6861-5; Gu, H.等人, 1993, Cell 73(6):1155-64; Araki, K.等人, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:160-4; Dymecki, S.M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93(12):6191-6;所有這些皆經由引用完整併入本文）。

【0427】 總而言之，本實例說明嚙齒動物（例如，小鼠）的產生，其生殖細胞系基因組包含改造 Ig κ 輕鏈基因座，其特徵為存在多個人類 V λ 與 J λ 基因片段，其操作性連結至嚙齒動物或人類 C λ 基因，該嚙齒動物或人類 C λ 基因係插入取代內源性 Ig κ 輕鏈基因座的嚙齒動物 C κ 基因的位置。如前所述的改造 Ig κ 輕鏈基因座包括非內源性排列的多個人類 V λ 與 J λ 基因片段。本文所述之用於將人類 V λ 與 J λ 基因片段，以及嚙齒動物或人類 C λ 基因插入取代嚙齒動物 C κ 基因位置的策略，能夠構建表現抗體的嚙齒動物，該抗體僅包含人類 V λ 結構域。目前尚不清楚這種僅包括 λ 基因片段（在內源性 λ 基因座之外，於非內源性方向）之改造 Ig κ 輕鏈基因座，是否能夠產生功能性輕鏈。如本文所述，此種人類 V λ 結構域係由所提供的嚙齒動物之生殖細胞系基因組中的內源性 Ig κ 輕鏈基因座表現。

表 1。用於篩選陽性 ES 細胞複製株的代表性引子/探針組

名稱	序列(5'-3')	試驗
mIgKC-1	F GTGGAAGATTGATGGCAGTGAAC (SEQ ID NO:25)	LOA
	R GTGCTGCTCATGCTGTAGGT (SEQ ID NO:26)	
	P AAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGA (SEQ ID NO:27)	
mIgKC-2	F CCATCCAGTGAGCAGTTAACATC (SEQ ID NO:28)	LOA
	R TGTCGTTCACTGCCATCAATC (SEQ ID NO:29)	
	P AGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTC (SEQ ID NO:30)	
mIgKLC 1-1	F GGAGCCCTTCCTTGTTACTTCA (SEQ ID NO:31)	GOA - 6557
	R AGGTGGAAACAGGGTGACTGATG (SEQ ID NO:32)	
	P TCCTCTGTGCTTCCTTCCTCAGGC (SEQ ID NO:33)	
mIgKLC 1-2	F TCCTTGTTACTTCATACCATCCTCT (SEQ ID NO:34)	GOA - 6557
	R AGGGTGACTGATGGCGAAGACT (SEQ ID NO:35)	
	P TTCCTTCCTCAGGCCAGCCC (SEQ ID NO:36)	
hIgKLJ-1	F GAGGCTTGCTGAGCTTTCAG (SEQ ID NO:37)	GOA
	R AGGACGGTCAGCTTGGTC (SEQ ID NO:38)	
	P TATGAGCCTGTGTACAGTGTTGGG (SEQ ID NO:39)	
hIgKLJ-2	F GCTGACCCAGGACTCTGTTC (SEQ ID NO:40)	GOA
	R TCCAGTTCCGAAGACATAACAC (SEQ ID NO:41)	
	P CCCTTTGGTGAGAAGGGTTTGGTC (SEQ ID NO:42)	
hIgLC2-1	F TACGCGGCCAGCAGCTAT (SEQ ID NO:43)	GOA - 2002 9
	R TGGCAGCTGTAGCTTCTGT (SEQ ID NO:44)	
	P CTGAGCCTGACGCCTGAGCAG (SEQ ID NO:45)	
1561hJ1	F TCAACCTTTCCAGCCTGTCT (SEQ ID NO:46)	LOA
	R CCCCAGAGAGAGAAAACAGATTTT (SEQ ID NO:47)	
	P ACCCTCTGCTGTCCCT (SEQ ID NO:49)	
Neo	F GGTGGAGAGGCTATTCGGC (SEQ ID NO:50)	GOA

	R	GAACACGGCGGCATCAG (SEQ ID NO:51)	
	P	TGGGCACAACAGACAATCGGCTG (SEQ ID NO:52)	
	F	TGCGGCCGATCTTAGCC (SEQ ID NO:53)	
Hyg	R	TTGACCGATTCTTGCGG (SEQ ID NO:54)	GOA
	P	ACGAGCGGGTTCGGCCCATTC (SEQ ID NO:55)	
	F	GGGCTACTTGAGGACCTTGCT (SEQ ID NO:56)	
1468h2	R	GACAGCCCTTACAGAGTTTGAA (SEQ ID NO:57)	親代
	P	CAGGGCCTCCATCCCAGGCA (SEQ ID NO:58)	
	F	ATCTCCCTACTTCCTGGCTAATG (SEQ ID NO:59)	
1525hk-VJ1	R	GCTTGGAACCTGATTGGTTGTC (SEQ ID NO:60)	親代
	P	AGCCTTGATCCTTGGGAATCCAGGACA (SEQ ID NO:61)	
	F	GCAAACAAAAACCACTGGCC (SEQ ID NO:62)	
mIgKd2	R	GGCCACATTCCATGGGTTC (SEQ ID NO:63)	WT
	P	CTGTTCTCTAAAACTGGACTCCACAGTAAATGG AAA (SEQ ID NO:64)	

實例 3. 具有改造免疫球蛋白輕鏈基因座的嚙齒動物之鑑定

實例 3.1. 具有改造免疫球蛋白輕鏈基因座之嚙齒動物免疫細胞的表型評估

【0428】 本實例呈現嚙齒動物（例如小鼠）中各種免疫細胞群的鑑定，該嚙齒動物經改造以包含多個人類 Vλ 與 Jλ 基因片段，係操作性連結至嚙齒動物 Cλ 基因，以及嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈增強子和調節區，其位於內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座內。尤其是，本實例具體呈現，與野生型嚙齒動物相較，本文所述的具有改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的嚙齒動物，顯示出獨特的輕鏈表現分布。本實例亦呈現所提供的嚙齒動物會由改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座表現廣範圍的人類 Vλ 區域庫。

【0429】 簡而言之，係自野生型 (WT、75% C57BL/6NTac 25% 129SvEvTac)和 6558HO（(同型合子 LiK、75% C57BL/6NTac 25% 129SvEvTac) 小鼠中，取得脾和股骨。藉由以含有 2.5%胎牛血清（FBS）的 1x 磷酸鹽緩衝鹽水（PBS，Gibco）沖洗，自股骨收集骨髓。以 ACK 裂解緩衝液（Gibco）裂解來自脾和骨髓製備物的紅血球，之後以含有 2.5%FBS 的 1xPBS 沖洗。

【0430】 將分離出的細胞 (1×10^6) 與選定的抗體混合物，一同於 $+4^\circ\text{C}$ 靜置 30 分鐘：抗-mIg κ -FITC (187.1, BD Biosciences)、抗-mIg λ -PE (RML-42, BioLegend; 1060-09, Southern Biotech)、抗-mIg λ -FITC (106002, Bio-Rad; ABIN303989, Antibodies-online)、抗小鼠 IgM-PeCy7 (II/41, eBioscience)、抗小鼠 IgD-PerCP/Cy5.5 (11-26c.2a, BioLegend)、抗小鼠 CD3-Pacific Blue (17A2, BioLegend)、抗小鼠 B220-APC (RA3-6B2, eBioscience)、抗小鼠 CD19-APC-H7 (ID3, BD Biosciences)。染色後，細胞經清洗並在 2% 甲醛中固定。數據採集係於 BD LSRFORTESSA™ 流式細胞儀上進行，並以 FLOWJO™ 進行分析。代表性結果如圖 5-7 所示。

【0431】 如圖 5 和 6 所示，與脾臟和骨髓區室中的野生型小鼠相較，LiK 小鼠顯示出類似的 CD19⁺ 和未成熟/成熟 B 細胞的各自分佈。然而，與野生型小鼠相較，LiK 小鼠表現出獨特的輕鏈表現，因為在這些小鼠中僅觀察到 Ig λ ⁺ 表現（圖 7）。尤其是，LiK 小鼠中 > 90% 的 CD19⁺ B 細胞，會表現免疫球蛋白 λ 輕鏈，因而證實在改造免疫球蛋白 κ 基因座處的適當重組和表現。如所預期的，鑑於這些小鼠缺乏小鼠 C κ 基因，LiK 小鼠呈現出在流式細胞術中無可偵測出的免疫球蛋白 κ 表現（即，抗-mIg κ 抗體偵測到恆定區）。相似位準的免疫球蛋白 λ 輕鏈表現，可由另外的 LiK 小鼠同窩小鼠中觀察到（數據未顯示）。來自 LiK 基因座的小鼠 C λ 區域之人類 V λ 區域的表現，係經由使用次世代定序技術（在下面的實例 3.2 中描述）之免疫球蛋白庫譜分析而確認。

實例 3.2 具有經改造免疫球蛋白輕鏈基因座的齧齒動物之免疫球蛋白庫

【0432】 上述改造齧齒動物品系中的人類抗體基因（即 VDJ 基因片段）的用途，係經由次世代定序抗體庫分析而決定。尤其是，由 LiK 基因座同型合子小鼠的脾細胞分離出的 RNA (6558 HO)，係進行 RT-PCR 定序，以確認 LiK 基因座的正確轉錄和重組。重排的 LiK 基因座代表性說明如圖 12 所示（LiK 基因座：如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座；重排的 LiK 基因座：改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座（本文稱為“LiK 基因座”）

的代表性重排，導致人類 Vλ-Jλ重組；重排 LiK mRNA：重排的 LiK 基因座之代表性轉錄和 mRNA 加工）。

【0433】 簡言之，藉由使用小鼠抗 CD19 磁珠和 MACS 管柱（Miltenyi Biotech）的磁性細胞分選，脾 B 細胞從總脾細胞中富集。根據製造商的說明書，使用 RNeasy Plus RNA 分離套組（Qiagen），自純化的脾 B 細胞中分離出總 RNA。使用 SMARTer™ RACE cDNA 倍增套組(Clontech)和免疫球蛋白λ特異性引子（請見下文）進行逆轉錄，以產生含有免疫球蛋白λ恆定區基因序列的 cDNA。在此過程中，與序列 3'端的模板轉換（TS）引子反向互補的 DNA 序列，係連接至新合成的 cDNA 的 3'末端。經純化的 Igλ-特異性 cDNA 之後使用 TS 特異性引子和特異於小鼠 Cλ1 序列之反向引子，經第 1 輪 PCR 反應倍增。使用 Pippin Prep (SAGE Science) 分離約 450-700bp 的 PCR 產物，之後經第 2 輪 PCR 反應，進一步倍增這些片段。表 2 列出用於譜庫構建之選用引子序列（for:正向引子；rev：反向引子）。範圍為約 400bp-700bp 的 PCR 產物係分離、純化並以 qPCR 定量，使用 KAPA 庫定量套組（KAPA Biosystems），之後載入 Miseq 定序儀 (Illumina)，使用 Miseq 試劑套組 v3（2x300 個循環）進行定序。

【0434】 用於生物資訊分析，Raw Illumina 序列係基於品質、長度和相對應恆定區基因引子的匹配度，進行去多重化和過濾。重疊的配對末端讀取係使用客製內部串聯進行合併和分析。該串聯使用 IgBLAST(NCBI, v2.2.25+)的局部安裝，將重排的輕鏈序列與人類生殖細胞系 Vλ與 Jλ基因片段數據庫對齊，並代表生產性和非生產性連結，以及終止密碼子的存在。使用國際免疫遺傳學資訊系統（IMGT）中定義的邊界，擷取 CDR3 序列和預期的非模板核苷酸。

表 2。用於庫組建立的代表性引子

引子名稱	序列(5'-3')
TS 引子	CACCATCGAT GTCGACACGC CTAGGG (SEQ ID NO:65)
IgλC (RT 引子)	CACCAGTGTG GCCTTGTTAG TCTC (SEQ ID NO:66)

IgλC (第 1 輪 PCR)	ACACTCTTTC CCTACACGAC GCTCTTCCGA TCTCAGGGTG ACTGATGGCG AAGAC (SEQ ID NO:67)
TS 特異性 (第 1 輪 PCR)	GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGCTCTTCCG ATCTCACCAT CGATGTCGAC ACGCCTA (SEQ ID NO:68)
for (第 2 輪 PCR)	AATGATACGG CGACCACCGA GATCTACAC XXXXXX ACACTCTTTC CCTACACGAC GCTCTTCCGA TCT (SEQ ID NO:69)
rev (第 2 輪 PCR)	CAAGCAGAAG ACGGCATACG AGAT XXXXXX GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGCTCTTCCG ATCT (SEQ ID NO:70)

【0435】 包含在本文中的例示性改造小鼠之 LiK 基因座，其大部分功能性人類 Vλ與 Jλ基因片段，係於 LiK 小鼠表現之抗體庫表示，該小鼠包含多個人類 Vλ與 Jλ基因片段，其操作性連結至內源性 κ 基因座處的嚙齒動物 Cλ基因（數據未顯示）。總結之，本發明人觀察到 LiK 小鼠的 B 細胞會如預期地表現具有自 LiK 基因座表現的輕鏈之抗體。在所分析的轉錄物中，並未觀察到改變的剪接產物、插入、刪去或其他未預期的突變。這些結果確認，LiK 基因座處的重組會產生功能性輕鏈，作為這些小鼠抗體庫的一部分。類似的分析係於包含多個人類 Vλ和 Jλ基因片段的小鼠中進行，該基因片段操作性連結至內源性 κ 基因座之人類 Cλ基因，其中偵測到多個人類 Vλ 和 Jλ基因片段（數據未顯示）。

實例 3.3 具有經改造輕鏈基因座的嚙齒動物之抗體表現

【0436】 本實例呈現非人類動物抗體（例如 IgG）的表現，該抗體含有輕鏈，其特徵為存在有人類 Vλ區域和嚙齒動物或人類 Cλ區域，且該輕鏈由經改造的內源性嚙齒動物免疫球蛋白κ輕鏈基因座表現。此外，本實例具體呈現非人類動物（例如嚙齒動物）血清中 IgG 抗體（二聚體和單體形式）的表現，其生殖細胞系基因組包含一內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座，其包含插入一或多個人類 Vλ基因片段、一或多個人類 Jλ基因片段和一嚙齒動物 Cλ基因，，其中該人類 Vλ和 Jλ基因片段係操作性連結至該嚙齒動物 Cλ基因，以及其中該嚙齒動物 Cλ基因插入位於內源性嚙齒動物 Igκ輕鏈基因座之嚙齒動物 Cκ基因位置。

【0437】 血液係由野生型(WT, 75% C57BL/6NTac 25% 129SvEvTac) 和 6558 同型合子(“LiK”, 75% C57BL/6NTac 25% 129SvEvTac) 小鼠中抽取。

使用 Eppendorf 管，在 4°C 下，以 9000 rpm 離心 5 分鐘，自血液中分離出血清。所收集的血清用於免疫印漬術，以辨識 IgG 抗體的表現。

【0438】 小鼠血清係以 1:100 或 1:500 之 PBS (不含 Ca^{2+} 與 Mg^{2+}) 稀釋，並於 4-20% Novex Tris-Glycine 凝膠上進行電泳，在還原與非還原條件下。根據製造商的說明書，將凝膠轉移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。印漬膜以 5% 脫脂牛奶之 0.05% Tween-20 的 Tris 緩衝鹽水 (TBST, Sigma) 阻斷整夜。將 PVDF 膜暴露於一級抗體 (與 HRP 連接的山羊抗-mIgG1, Southern Biotech) 中，其以 1:1000 的比例稀釋於 0.1% 脫脂牛奶之 TBST 溶液中，於室溫下 1 小時。印漬膜清洗四次，每次清洗 10 分鐘，並依據製造商的說明書，使用 Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) 顯影 5 分鐘。印漬膜之後使用 GE Healthcare ImageQuant LAS-4000 Cooled CCD Camera Gel Documentation System 進行成像。以 15 秒的間隔拍攝圖像，直至拍攝 20 張圖像或圖像完全曝光，以先發生者為準。代表性結果如圖 13 所示 (泳道編號顯示在每個凝膠圖像的頂部，兩個圖像的泳道分配是相同的；左上：還原樣本；左下：非還原樣本；LiK HO: 6558 異型合子；WT: 野生型；分子量顯示在每一凝膠圖像的左側)

【0439】 如圖 13 所示，在 LiK 小鼠中表現的 IgG 抗體大小，與在野生型小鼠中表現的 IgG 抗體大小相似，顯示 LiK 小鼠會產生與抗原結合的功能性抗體，並可使用作為一活體內系統，用於製造人類抗體和人類抗體成分，用於治療人類疾病。

實例 4. 包括數個經改造免疫球蛋白基因座的嚙齒動物之產生與鑑定

【0440】 如本文所述的 LiK 嚙齒動物係使用本領域已知的技術，分別與多種改造嚙齒動物品系育種，多重繁殖，以建立含有以下改造免疫球蛋白基因座的嚙齒動物品系：(1) 一種嚙齒動物品系，其人類免疫球蛋白重鏈為同型合子 (請參見，例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940，每一者皆經由引用完整併入本文)，其包含同型合子之人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，該基因座包含 $\text{V}\lambda$ 與 $\text{J}\lambda$ 基因片段，其可操作地連接至如本文所述的

C λ 基因，且其失活的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座為同型合子（參見，例如，美國專利號 9,006,511，其經由引用完整併入本文），在一些實施例中，在本文中稱為 HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$ 小鼠，（2）一種嚙齒動物品系，其人源化免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子(如前文)，其失活的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座為同型合子(如前文)，且包含人類第一免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為半合子，其包含人類 V λ 和 J λ 基因片段，其可操作性地連接至如本文所述的 C λ 基因，以及第二免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含人類 V κ 和 J κ 基因片段，係操作性連結至一內源性小鼠 C κ 基因（請參見，例如，美國專利號 8,642,835 與 8,697,940，每一者皆經由引用完整併入本文），在一些實施例中，在本文中稱為 HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$ 小鼠。此外，此種小鼠可藉由將包含改造基因座的靶向載體引入已包含數個改造免疫球蛋白基因座的 ES 細胞中而產生。在一些實施例中，該嚙齒動物中的免疫球蛋白重鏈基因座包含功能性和表現出的嚙齒動物 Adam6 基因。

【0441】 具體而言，LiK 小鼠在多重育種中與多個改造小鼠品系一起繁殖，以建立 HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$ 與 HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$ 小鼠。

【0442】 一旦建立，各種免疫細胞群可在這些人源化小鼠中，以流式細胞術鑑定。簡言之，脾臟和股骨係由 HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$ (n=3)、HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$ (n=4)和 VELOCIMMUNE® (“HoH/KoK”；n = 3；請參見美國專利號 8,642,835 和 8,697,940，其中每一者皆經由引用完整併入本文) 小鼠，並如上所述製備，用於流式細胞術分析。代表性結果在圖 8-11 中列出。於測試的改造小鼠品系之脾細胞中觀察到的平均輕鏈表現(κ : λ)大致如下：
HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$: 0:100、HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$: 40:60、HoH/KoK: 85:15。

實例 5. 在經改造嚙齒動物中產生抗體

【0443】 本實例說明在嚙齒動物中，使用目標抗原（例如，單一通道或多通道膜蛋白等）產生抗體，其包含如上所述的改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座。本實例中描述的方法或本領域熟知的免疫化方法，可用於以各種抗原（例如多胜肽等）免疫化含有改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的嚙齒動物，如上所述。本文上述的任何基因修飾的嚙齒動物，例如，

LiK 小鼠 - 包含免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的小鼠，其包含人類 V λ 與 J λ 基因片段，係操作性連接至 C λ 基因(例如其 LiK 基因座為同型合子的小鼠)；
 HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$ 小鼠 - 包含 LiK 基因座的小鼠(例如其 LiK 基因座為同型合子的小鼠)，且亦包含人源化免疫球蛋白重鏈基因座（請參見，例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940，其中每一者皆經由引用完整併入本文），以及失活的內源免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座（請參見，例如，美國專利號 9,006,511，其經由引用完整併入本文）；以及 HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$ 小鼠- 具有第一免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座半合子之小鼠，其包含 LiK 和第二免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含人類 V κ 與 J κ 基因片段，係操作性連結至內源性小鼠 C κ 基因（請參見，例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940），且亦包含人源化免疫球蛋白重鏈基因座（請參見例如，美國專利號 8,642,835 和 8,697,940，其中每一者皆經由引用完整併入本文），以及失活的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座（請參見例如美國專利號 9,006,511，其經由引用併入本文），可用於以有興趣抗原進行免疫化之後，產生抗體。此類小鼠適於免疫化，以及產生人類抗體及/或人類抗體片段。

【0444】 進一步包括上述改造免疫球蛋白基因座的 LiK 小鼠，係使用本領域已知的免疫方法，以有興趣抗原刺激。免疫反應係經由 ELISA 免疫試驗監測（即血清效價）。當達到希望的免疫反應時，收獲脾細胞（及/或其他淋巴組織），並與小鼠骨髓瘤細胞融合，以保持其存活率，並形成永生融合瘤細胞株。所產生的融合瘤細胞株係經掃描（例如，經由 ELISA 試驗）與篩選，以辨識出產生抗原-特異性抗體的融合瘤細胞株。可依據需要進一步鑑定融合瘤的相對結合親和力和同種型。使用此技術和上述免疫原，可獲得數種抗原-特異性嵌合抗體（即，具有人類可變結構域和嚙齒動物恆定結構域的抗體）。

【0445】 編碼重鏈和輕鏈可變區的 DNA，可被分離出或製備，且可連結至人類重鏈和輕鏈恆定區（例如，希望的同種型），以製備完整人類抗體。此種完整人類抗體（及/或其重鏈或輕鏈），可於細胞中產生，通常為

哺乳動物細胞如 CHO 細胞。完整人類抗體之後可鑑定其對於有興趣抗原的相對結合親和力，及/或中和活性。

【0446】 編碼具抗原特異性之嵌合抗體(其由本文描述及/或示範之改造小鼠的 B 細胞產生)，及/或其輕鏈及/或重鏈的可變結構域的 DNA，可直接由抗原特異性淋巴細胞中分離出。例如，具有人類可變區和嚙齒動物恆定區的高親和力嵌合抗體，可被分離出和鑑定，以使有興趣的特定抗體（及/或產生它們的 B 細胞）被定義出。僅舉幾個例子，這些抗體及/或其可變區及/或其恆定區的評估特徵，可為或包括親和力、選擇性、表位等同性等之一或多者。

【0447】 嚙齒動物恆定區以期望的人類恆定區替換，以產生完全人類抗體。儘管所選出的恆定區可根據特定用途而不同，但在可變區中都具有高親和性抗原結合及目標特異性特徵。或者，當使用含有人類 C λ 2 基因的 LiK 小鼠，取代本文所述的嚙齒動物 C κ 基因時，省略了取代抗體(自免疫化小鼠中分離出)之嚙齒動物恆定區的步驟。抗原特異性抗體亦直接由呈現抗原陽性但不與骨髓瘤細胞融合之 B 細胞（來自免疫化小鼠）中分離出，例如美國專利號 7,582,298 中所述，該專利特別經由引用完整併入本文。使用此方法，係製備數種完整人類抗原-特異性抗體（即，具有人類可變結構域和人類恆定結構域的抗體）。

實例 6. 產生具有經改造輕鏈基因座並表現人類末端去氧核苷酸轉移酶 (TdT) 基因的嚙齒動物

實例 6.1. 產生具有經改造輕鏈基因座並表現人類 TDT 的嚙齒動物

【0448】 本實例說明產生一種小鼠，其生殖細胞系基因組包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，並進一步表現人類 TdT。表現人類 TdT 的小鼠係如 WO 2017/210586 之實例 1.1 中所述製備，其經由引用完整併入本文。經過多次育種，產生具有包含如本文所述的改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座與進一步表現人類 TdT 的基因組之小鼠，以建立包含兩種修飾的小鼠品系群組。

實例 6.2. 具有改造 Kappa 基因座並表現人類 TDT 的嚙齒動物之表型評估

【0449】 一旦建立，係經由流式細胞術在這些人源化小鼠中鑑定出免疫細胞群。簡言之，脾和股骨係由 HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$ /TdT (n=4)與 HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$ /TdT (n=6)小鼠中收獲，並如上所述製備用於流式細胞術分析（參見上文實例 3）。代表性結果在圖 14-17 中列出。在測試的改造小鼠品系之脾細胞中觀察到的平均輕鏈表現 ($\kappa:\lambda$)如下：HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$ /TdT: 0:100、HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$ /TdT: 45:55。

實例 6.3. 人類免疫球蛋白 *Kappa* 接合多樣性，以及包含人類 *TdTS* 的 *LiK* 小鼠之非生殖細胞系加入

【0450】 如 WO 2017/210586（經由引用完整併入本文）所呈現，包含外源性引入 TdT 的小鼠，在其輕鏈中表現出接合多樣性和非生殖細胞系核苷酸添加（亦為本文所用的“非模板核苷酸添加”）二者皆增加。包含 HoH/LiK/ $\lambda^{-/-}$ /TdT，以及 HoH/KoK/LiK/ $\lambda^{-/-}$ /TdT 的小鼠係經評估，以決定它們的免疫球蛋白譜系序列多樣性，以及在其 CDR3 中之非模板核苷酸加入，使用次世代定序技術。

【0451】 簡言之，脾細胞係由小鼠中收獲，且藉由抗小鼠 CD19 磁珠和 MACS 管柱（Miltenyi Biotech），將 B 細胞由總脾細胞中陽性富集。總 RNA 係使用 RNeasy Plus 套組（Qiagen），由脾 B 細胞中分離出。

【0452】 使用寡-dT 引子進行反轉錄，之後進行基因特異性 PCR，以產生含有小鼠 C λ 1 序列的 cDNA，使用 SMARTer™ RACE cDNA 倍增套組 (Clontech)。在反轉錄期間，特異性 DNA 序列(P1IA: 5'-CCCATGTACT CTGCGTTGAT ACCACTGCTT-3'、SEQ ID NO:71) 係連結至新合成 cDNA 的 3'端。使用 NucleoSpin Gel 和 PCR Clean-Up Kit (Clontech) 純化 cDNA，之後進一步倍增，使用與小鼠 C λ 1 特異性引子(5'-CACCAGTGTG GCCTTGTTAG TCTC-3'、SEQ ID NO:73)配對的 P1IA (5' – AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTACAT – 3'、SEQ ID NO:72)。

【0453】 經純化之倍增子之後以 PCR 倍增，使用 P1IA 特異性引子(5'-GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGCTCTTCCG ATCTAAGCAG TGGTATCAAC GCAGAGT-3'、SEQ ID NO:74)，以及巢式(nested)小鼠

Cλ1特異性引子(5'-ACACTCTTTC CCTACACGAC GCTCTTCCGA
TCTAAGGTGG AAACAGGGTG ACTGATG-3'、SEQ ID NO:75)。介於
450-690bp 的 PCR，並以 Pippin Prep (SAGE Science)收集。這些片段係使
用以下引子，經由 PCR 進一步倍增：5'-AATGATACGG CGACCACCGA
GATCTACACX XXXXXACACT CTTTCCCTAC ACGACGCTCT
TCCGATC-3'、SEQ ID NO:76 及 5'-CAAGCAGAAG ACGGCATACG
AGATXXXXXX GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGCTCTTCCG ATCT-3'、
SEQ ID NO:77 ("XXXXXX" 代表一段 6bp 指引序列，使多重樣本可定序)。
介於 490bp-710bp 之間的 PCR 產物經由 Pippin Pre 分離出和收集，之後進
行 qPCR 定量，使用 KAPA 庫定量套組 (KAPA Biosystems)，之後載入
至 Miseq 定序儀 (Illumina)上進行定序 (v3, 600-循環)。

【0454】 對於生物資訊學分析，將得到的 Illumina 序列去多重化並修正
品質。之後使用局部安裝的 igblast (NCBI、v2.2.25+)組裝和註釋重疊的配
對末端讀值。讀值係與人類生殖細胞系 Vλ與 Jλ片段資料庫比對，並依據
最佳命中進行分類。當偵測到具有相同分數的多個最佳命中時，將序列標
記為模稜兩可，並從分析中移除。開發一套內部 perl 原件來分析結果。

【0455】 來自 HoH/LiK/λ^{-/-}/TdT 小鼠脾 B 細胞的 λ 輕鏈，以及來
HoH/KoK/LiK/λ^{-/-}/TdT 小鼠脾 B 細胞的 λ 和 κ 輕鏈二者，係測試在 λ 及/或
κ 位點之非模板加入和交界多樣性的增加。來自 HoH/LiK/λ^{-/-}/TdT，以及
HoH/KoK/LiK/λ^{-/-}/TdT 小鼠的輕鏈，在交界多樣性方面增加至少 2 倍，係
以獨特的 CDR3/ 10,000 讀數測量 (數據未顯示)。此外，(λ 及/或 κ) 來
自 HoH/LiK/λ^{-/-}/TdT 和 HoH/KoK/LiK/λ^{-/-}/TdT 小鼠的輕鏈，約有 50%具有
非模板添加，與沒有 TdT 的對照組小鼠的輕鏈相較，對照組僅具有約 10%
的非模板添加 (數據未顯示)。

實例 7. 經改造嚙齒動物的免疫化，以及對於免疫原產生免疫反應的分析

【0456】 本實例說明 LiK/VI-3 和 LiK/VI-3/TdT 小鼠的免疫化，以及血
清抗體對於免疫原反應的分析。簡言之，(1) VI-3/TdT (例如，人類 κ 輕
鏈的陽性對照組，其亦具有內源性小鼠 λ 輕鏈基因座)，以及具有人類 λ

輕鏈的 VI-3 小鼠，(2) LiK/VI-3，以及 (3) LiK/VI-3/TdT，分別以蛋白質免疫原進行免疫化，使用標準流程和佐劑。在免疫反應開始前將小鼠採血，並在免疫原加強後定期採血。針對各抗原上進行抗血清效價試驗。

【0457】 使用 ELISA 測定抗免疫原的血清中的抗體效價 將 96 孔微量滴定盤 (Pierce) 塗佈 2 µg/ml 抗原之磷酸鹽緩衝鹽水溶液 (PBS, Irvine Scientific)，在 4°C 下整夜。滴定盤以 0.05% Tween-20 (PBS-T, Sigma-Aldrich) 之 PBS 溶液清洗，並在室溫下以 250 µl 之 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma-Aldrich) 之 PBS 溶液阻斷 1 小時。以 PBS-T 清洗滴定盤。將免疫化前和免疫化抗血清在 1%BSA-PBS 中連續稀釋 3 倍，並在室溫下加入盤中 1 小時。清洗滴定盤，並加入山羊抗-小鼠 IgG-Fc-辣根過氧化物酶 (HRP) 共軛的二級抗體(Jackson ImmunoResearch)、山羊抗小鼠 Kappa-HRP (SouthernBiotech)，或山羊抗小鼠 Lambda-HRP (SouthernBiotech)，以 1:5000 稀釋於盤中，並在室溫下靜置 1 小時。滴定盤經清洗，並使用 TMB/H₂O₂ 作為受質顯色，靜置 15-20 分鐘。反應以酸終止，滴定盤於光譜儀上 (Victor, Perkin Elmer)，於 450 nm 讀取。使用 Graphpad PRISM 軟體計算抗體效價。效價定義為血清稀釋因數插入值，其中該結合訊號為背景值的 2 倍。

【0458】 以蛋白質免疫原免疫化之後，係研究 LiK/VI-3、LiK/VI-3/TdT 及 VI-3/TdT 小鼠的體液免疫反應。來自以蛋白質免疫化的小鼠之抗血清，顯示出對於 LiK/VI-3 與 LiK/VI-3/TdT 品系中的抗原具有高抗原效價，與 VI-3/TdT 品系相較(圖 18)。在 LiK/VI-3 和 LiK/VI-3/TdT 小鼠中引發高 λ 效價。在 VI-3/TdT 品系小鼠中，在三隻小鼠中未觀察到 λ 效價，而在兩隻小鼠中觀察到低效價，這對應於該品系小鼠 λ 可變區的低使用率。如預期的，LiK/VI-3 和 LiK/VI-3/TdT 小鼠並未顯示出 kappa 效價，因為它們缺乏 κ 輕鏈，而 VI-3/TdT 則顯示高 kappa 效價。圖 19 顯示在具有抗-Fc 和抗-κ 偵測的所有三種小鼠品系中，在 His 標籤不相關蛋白質抗原上，觀察到基線效價 (最低血清稀釋度)，而在 LiK/VI-3 與 LiK/VI-3/TdT 小鼠中，以抗 λ 偵測僅觀察到非常低的效價。

一些實施例

實施例 1. 一種基因修飾之嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包括：

第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，
- (b) 一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，以及
- (c) $C\lambda$ 基因，

其中該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，以及一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段係操作性地連結至該 $C\lambda$ 基因；以及

其中該嚙齒動物於該第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上缺乏嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 2. 如實施例 1 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物之第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為同型合子。

實施例 3. 如實施例 1 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物之第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為異型合子。

實施例 4. 如實施例 3 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物的生殖細胞系基因組包含第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段，以及
- (b) 一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段，

其中該一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段以及一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段係操作性連結至一 $C\kappa$ 基因。

實施例 5. 如實施例 4 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的 $C\kappa$ 基因為內源性嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 6. 如實施例 1 至 5 任一項所述之基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物於該第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上缺乏嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 7. 一種基因修飾之嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包括：

(a)第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (i)一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，
- (ii)一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，以及
- (iii) $C\lambda$ 基因，

其中一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，以及一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段係操作性地連結至該 $C\lambda$ 基因；以及

其中該嚙齒動物於該第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上缺乏嚙齒動物 $C\kappa$ 基因；以及

(b) 第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包括：

- (i)一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段，以及
- (ii) 一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段，

其中該一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段以及一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段係操作性連結至 $C\kappa$ 基因。

實施例 8. 如實施例 7 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的 $C\kappa$ 基因為內源性嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 9. 如實施例 1 至 8 任一項所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上之 $C\lambda$ 基因包含嚙齒動物 $C\lambda$ 基因。

實施例 10. 如實施例 1 至 9 任一項所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼片段中的至少一個相鄰，其中該一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼序列天然地出現在內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座上人類 $V\lambda$ 基因片段的鄰近區域中；

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 J λ 非編碼片段中的至少一個相鄰，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列天然地出現在內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座上人類 J λ 基因片段的鄰近區域中；或

(iii) 其任一組合。

實施例 11. 如實施例 1 至 10 任一項所述之基因修飾嚙齒動物，其中：

(i) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。

實施例 12. 如實施例 11 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於該內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1；以及

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，以及其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7。

實施例 13. 如實施例 11 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於該內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1；以及

(ii) 一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4，或 J κ 5。

實施例 14. 如實施例 1 至 13 任一項所述之基因修飾嚙齒動物，其中：

(i) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、

Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合；以及

(ii)該一或多個人類 Jλ 基因片段包含 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6、Jλ7，或其任一組合。

實施例 15. 如實施例 14 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1；以及

(ii) 一或多個人類 Jλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7。

實施例 16. 如實施例 14 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈座之 Vλ4-69、

Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1；以及

(ii) 一或多個人類 Jκ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jκ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4，或 Jκ5。

實施例 17. 一種基因修飾之嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包含：

第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

(i) 一或多個人類 Vλ 基因片段，其中該一或多個人類 Vλ 基因片段包含 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合，

(ii) 一或多個人類 Jλ 基因片段，其中該一或多個人類 Jλ 基因片段包含 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6、Jλ7 或其任一組合，

(iii) 嚙齒動物 Cλ 基因，

(iv) 一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之

Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、
Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、
Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、
Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，且其
中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一
內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、
Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、
Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、
Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、
Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，

(v) 一或多個人類 Jκ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ 非編
碼序列之每一者鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之
Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jκ 非編碼序列
之每一者係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座
之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4 或 Jκ5，以及

(vi) 人類 κ 輕鏈非編碼序列，介於該一或多個人類 Vλ 基因片段
與該一或多個人類 Jλ 基因片段之間，其具有天然地出現在內源性人
類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的人類 Vκ4-1 基因片段與人類 Jκ1 基因
片段之間的一段序列，

其中該一或多個人類 Vλ 基因片段、該一或多個人類 Jλ 基因片段及該
嚙齒動物 Cλ 基因，係操作性地互相連結，以及

其中該嚙齒動物 Cλ 基因係取代該內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之
嚙齒動物 Cκ 基因。

實施例 18. 如實施例 17 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物之生
殖細胞系基因組包含一第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 Vκ 基因片段，以及
- (b) 一或多個人類 Jκ 基因片段，

其中該一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段與該一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段，係操作性地連結至 $C\kappa$ 基因。

實施例 19. 如實施例 18 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 $C\kappa$ 基因為內源性嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 20. 如實施例 1 至 19 任一項所述之基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物之生殖細胞系基因組更包含：

經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 V_H 基因片段，
- (b) 一或多個人類 D_H 基因片段，以及
- (c) 一或多個人類 J_H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、該一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區域基因，其位於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座上。

實施例 21. 一種基因修飾嚙齒動物，其生殖細胞系基因組更包含：

(a) 經改造之內源性免疫球蛋白重鏈基因座，包含一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連接至一或多個內源性免疫球蛋白重鏈恆定區域基因，使得該嚙齒動物表現免疫球蛋白重鏈，其包含一人類重鏈可變結構域序列與一嚙齒動物重鏈恆定結構域序列，其中該生殖細胞系基因組對於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座而言為同型合子；

(b) 第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (i) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，其中該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段包含 $V\lambda 5-52$ 、 $V\lambda 1-51$ 、 $V\lambda 9-49$ 、 $V\lambda 1-47$ 、 $V\lambda 7-46$ 、 $V\lambda 5-45$ 、 $V\lambda 1-44$ 、 $V\lambda 7-43$ 、 $V\lambda 1-40$ 、 $V\lambda 5-39$ 、 $V\lambda 5-37$ 、 $V\lambda 1-36$ 、 $V\lambda 3-27$ 、 $V\lambda 3-25$ 、 $V\lambda 2-23$ 、 $V\lambda 3-22$ 、 $V\lambda 3-21$ 、 $V\lambda 3-19$ 、 $V\lambda 2-18$ 、 $V\lambda 3-16$ 、

Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合，

(ii)一或多個人類 Jλ基因片段，其中該一或多個人類 Jλ基因片段包含 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6、Jλ7 或其任一組合，

(iii) 嚙齒動物 Cλ基因，

(iv)一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第二經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，且其中一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白λ輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，

(v) 一或多個人類 Jκ非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列係鄰近於該第二經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4 或 Jκ5，以及

(vi)人類κ輕鏈非編碼序列，介於該一或多個人類 Vλ基因片段與該一或多個人類 Jλ基因片段之間，其具有天然地出現在一內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之人類 Vκ4-1 基因片段與人類 Jκ1 基因片段之間的一段序列，

其中該一或多個人類 Vλ基因片段、該一或多個人類 Jλ基因片段、及該嚙齒動物 Cλ基因係操作性地互相連結，

其中嚙齒動物 Cλ基因係位於該第二內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之嚙齒動物 Cκ基因的位置上；以及

(c) 第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含一或多個人類 V_{κ} 基因片段，以及一或多個 J_{κ} 基因片段，係操作性地連結至內源性嚙齒動物 C_{κ} 區域基因，使得該嚙齒動物表現免疫球蛋白輕鏈，其包含人類 κ 輕鏈可變結構域序列，以及嚙齒動物 κ 輕鏈恆定結構域序列，

其中該嚙齒動物表現免疫球蛋白輕鏈，其包含人類 λ 輕鏈可變結構域序列，以及嚙齒動物 λ 輕鏈恆定結構域序列。

實施例 22. 如實施例 20 或 21 所述之基因修飾嚙齒動物，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係替代一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其組合。

實施例 23. 如實施例 20-22 中任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係取代一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其任一組合。

實施例 24. 如實施例 20-23 中任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 V_H 基因片段中的至少一個相鄰，其中該一或多個 V_H 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 V_H 基因片段；

(ii) 一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 D_H 基因片段中的至少一個相鄰，其中該一或多個 D_H 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D_H 基因片段；

(iii) 一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 J_H 基因片段中的至少一個相鄰，其中該一或多個 J_H 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段；

(iv) 其任一組合。

實施例 25. 如實施例 20-24 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該一或多種嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因，為一或多種內源性嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 26. 如實施例 20-25 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中：

(i) 該一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_{H3-74} 、 V_{H3-73} 、 V_{H3-72} 、 V_{H2-70} 、 V_{H1-69} 、 V_{H3-66} 、 V_{H3-64} 、 V_{H4-61} 、 V_{H4-59} 、 V_{H1-58} 、 V_{H3-53} 、 V_{H5-51} 、 V_{H3-49} 、 V_{H3-48} 、 V_{H1-46} 、 V_{H1-45} 、 V_{H3-43} 、 V_{H4-39} 、 V_{H4-34} 、 V_{H3-33} 、 V_{H4-31} 、 V_{H3-30} 、 V_{H4-28} 、 V_{H2-26} 、 V_{H1-24} 、 V_{H3-23} 、 V_{H3-21} 、 V_{H3-20} 、 V_{H1-18} 、 V_{H3-15} 、 V_{H3-13} 、 V_{H3-11} 、 V_{H3-9} 、 V_{H1-8} 、 V_{H3-7} 、 V_{H2-5} 、 V_{H7-4-1} 、 V_{H4-4} 、 V_{H1-3} 、 V_{H1-2} 、 V_{H6-1} ，或其任一組合，

(ii) 該一或多個人類 D_H 基因片段包含 D_{H1-1} 、 D_{H2-2} 、 D_{H3-3} 、 D_{H4-4} 、 D_{H5-5} 、 D_{H6-6} 、 D_{H1-7} 、 D_{H2-8} 、 D_{H3-9} 、 D_{H3-10} 、 D_{H5-12} 、 D_{H6-13} 、 D_{H2-15} 、 D_{H3-16} 、 D_{H4-17} 、 D_{H6-19} 、 D_{H1-20} 、 D_{H2-21} 、 D_{H3-22} 、 D_{H6-25} 、 D_{H1-26} 、 D_{H7-27} ，或其任一組合，以及

(iii) 該一或多個人類 J_H 基因片段包含 J_{H1} 、 J_{H2} 、 J_{H3} 、 J_{H4} 、 J_{H5} 、 J_{H6} ，或其任一組合。

實施例 27. 如實施例 20-26 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座缺乏功能性內源性嚙齒動物 Adam6 基因。

實施例 28. 如實施例 20-27 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該生殖細胞系基因組更包含一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段。

實施例 29. 如實施例 28 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多者係經表現。

實施例 30. 如實施例 28 或 29 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之同一染色體上。

實施例 31. 如實施例 28-30 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座內。

實施例 32. 如實施例 28-31 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸，係替代人類 Adam6 偽基因。

實施例 33. 如實施例 28-32 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸，係取代人類 Adam6 偽基因。

實施例 34. 如實施例 28-33 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸，係介於第一人類 V_H基因片段和第二人類 V_H基因片段之間。

實施例 35. 如實施例 34 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該第一人類 V_H基因片段為 V_H1-2，以及該第二人類 V_H基因片段為 V_H6-1。

實施例 36. 如實施例 28-31 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多個核苷酸，係介於人類 V_H 基因片段和人類 D_H 基因片段之間。

實施例 37. 如實施例 20 與 22-36 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物之該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子。

實施例 38. 如實施例 9-37 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物 C λ 基因具有與小 C λ 1、小鼠 C λ 2 或小鼠 C λ 3 基因至少 80% 相同的序列。

實施例 39. 如實施例 9-38 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物 C λ 基因包含 C λ 1 基因。

實施例 40. 如實施例 9-39 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物 C λ 基因包含大鼠 C λ 基因。

實施例 41. 如實施例 40 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物 C λ 基因具有與大鼠 C λ 1、大鼠 C λ 2、大鼠 C λ 3 或大鼠 C λ 4 基因至少 80% 相同的序列。

實施例 42. 如實施例 1-41 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段，係替代一或多個嚙齒動物 V κ 基因片段、一或多個嚙齒動物 J κ 基因片段，或其任一組合。

實施例 43. 如實施例 1-42 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段，係取代一或多個嚙齒

動物 V κ 基因片段、一或多個嚙齒動物 J κ 基因片段，或其任一組合。

實施例 44. 如實施例 1-43 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該第一經改造內源免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含一 κ 輕鏈非編碼序列，其介於一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段之間。

實施例 45. 如實施例 44 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該 κ 輕鏈非編碼序列為人類 κ 輕鏈非編碼序列。

實施例 46. 如實施例 45 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該人類 κ 輕鏈非編碼序列具有一段序列，其天然地出現在內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中的人類 V κ 4-1 基因片段和人類 J κ 1 基因片段之間。

實施例 47. 如實施例 1-46 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，更包含失活的內源性免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座。

實施例 48. 如實施例 47 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物之經改造內源免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座為異型合子。

實施例 49. 如實施例 47 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物之失活內源免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座為同型合子。

實施例 50. 如實施例 1-49 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該內源性 V λ 基因片段、該內源性 J λ 基因片段，且該內源性 C λ 基因係全部或部分刪去。

實施例 51. 如實施例 1-50 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物無法偵測地表現內源免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域。

實施例 52. 如實施例 1-51 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物無法偵測地表現內源免疫球蛋白 κ 輕鏈可變結構域。

實施例 53. 如實施例 1-52 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物包含表現抗體的 B 細胞群，包括免疫球蛋白 λ 輕鏈，其每一者皆包括人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域。

實施例 54. 如實施例 53 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域係由重排的人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變區序列編碼，該序列包含 (i) 一或多個人類 V λ 基因區段之一者，或其體細胞高度突變的變異體，以及 (ii) 一或多個人類 J λ 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異體。

實施例 55. 如實施例 1-54 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物的生殖細胞系基因組更包含一編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶 (TdT) 的核酸序列，其操作性地連結至一轉錄控制單元。

實施例 56. 如實施例 55 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該 TdT 為 TdT 的短同種型 (TdTS)。

實施例 57. 如實施例 55 或 56 所述的基因修飾嚙齒動物，其中該轉錄控制單元包含一 RAG1 轉錄控制單元、一 RAG2 轉錄控制單元、一免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。

實施例 58. 如實施例 55-57 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該編碼外源性 TdT 的核酸序列，係位於一免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、一免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、一免疫球蛋白重鏈基因座、一 RAG1 基因座，或一 RAG2 基因座的生殖細胞系基因組中。

實施例 59. 一種基因修飾的嚙齒動物，其生殖細胞系基因組包含

(a) 編碼末端去氧核苷酸轉移酶 (TdT) 之核酸序列，其操作性地連接至一轉錄控制單元；

(b) 經改造的內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包含一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段，和一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至一或多個內源性免疫球蛋白重鏈恆定區基因，使得該嚙齒動物表現免疫球蛋白重鏈，其中每一重鏈皆包含一人類重鏈可變結構域序列和一嚙齒動物重鏈恆定結構域序列，其中該生殖細胞系基因組之經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子；以及

(c) 經改造之內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

(i) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，其中該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段包含 $V\lambda 5-52$ 、 $V\lambda 1-51$ 、 $V\lambda 9-49$ 、 $V\lambda 1-47$ 、 $V\lambda 7-46$ 、 $V\lambda 5-45$ 、 $V\lambda 1-44$ 、 $V\lambda 7-43$ 、 $V\lambda 1-40$ 、 $V\lambda 5-39$ 、 $V\lambda 5-37$ 、 $V\lambda 1-36$ 、 $V\lambda 3-27$ 、 $V\lambda 3-25$ 、 $V\lambda 2-23$ 、 $V\lambda 3-22$ 、 $V\lambda 3-21$ 、 $V\lambda 3-19$ 、 $V\lambda 2-18$ 、 $V\lambda 3-16$ 、 $V\lambda 2-14$ 、 $V\lambda 3-12$ 、 $V\lambda 2-11$ 、 $V\lambda 3-10$ 、 $V\lambda 3-9$ 、 $V\lambda 2-8$ 、 $V\lambda 4-3$ 、 $V\lambda 3-1$ ，或其任一組合，

(ii) 一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，其中該一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段包含 $J\lambda 1$ 、 $J\lambda 2$ 、 $J\lambda 3$ 、 $J\lambda 6$ 、 $J\lambda 7$ 或其任一組合，

(iii) 嚙齒動物 $C\lambda$ 基因，

(iv) 一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼序列，其中該一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼序列之每一者係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 $V\lambda 5-52$ 、 $V\lambda 1-51$ 、 $V\lambda 9-49$ 、 $V\lambda 1-47$ 、 $V\lambda 7-46$ 、 $V\lambda 5-45$ 、 $V\lambda 1-44$ 、 $V\lambda 7-43$ 、 $V\lambda 1-40$ 、 $V\lambda 3-27$ 、 $V\lambda 3-25$ 、 $V\lambda 2-23$ 、 $V\lambda 3-22$ 、 $V\lambda 3-21$ 、 $V\lambda 3-19$ 、 $V\lambda 2-18$ 、 $V\lambda 3-16$ 、 $V\lambda 2-14$ 、 $V\lambda 3-12$ 、 $V\lambda 2-11$ 、 $V\lambda 3-10$ 、 $V\lambda 3-9$ 、 $V\lambda 2-8$ 、 $V\lambda 4-3$ 或 $V\lambda 3-1$ ，且其中該一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於該內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 $V\lambda 5-52$ 、 $V\lambda 1-51$ 、 $V\lambda 9-49$ 、 $V\lambda 1-47$ 、 $V\lambda 7-46$ 、 $V\lambda 5-45$ 、 $V\lambda 1-44$ 、 $V\lambda 7-43$ 、 $V\lambda 1-40$ 、 $V\lambda 3-27$ 、 $V\lambda 3-25$ 、 $V\lambda 2-23$ 、 $V\lambda 3-22$ 、

Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、
Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，

(v) 一或多個人類 Jκ非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列之每一者係鄰近於該經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 與 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於該內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4 或 Jκ5，以及

(vi) 人類κ輕鏈非編碼序列，其介於一或多個人類 Vλ基因片段與一或多個人類 Jλ基因片段之間，其包含天然地出現在內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之人類 Vκ4-1 基因片段和人類 Jκ1 基因片段之間，

其中該一或多個人類 Vλ基因片段、一或多個人類 Jλ基因片段及嚙齒動物 Cλ基因可操作性地互相連接，

其中該嚙齒動物 Cλ基因係替代該內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座上的嚙齒動物 Cκ基因，

其中生殖細胞系基因組之經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座為同型合子，以及

其中該嚙齒動物會表現免疫球蛋白輕鏈，其包含一人類λ輕鏈可變結構域序列，其與一嚙齒動物λ輕鏈恆定結構域序列融合。

實施例 60. 如實施例 1-59 任一項所述的基因修飾嚙齒動物，其中該嚙齒動物為大鼠或小鼠。

實施例 61. 一種經分離的嚙齒動物細胞，得自於實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物。

實施例 62. 一種永生化細胞，由實施例 61 經分離的嚙齒動物細胞產生。

實施例 63. 如實施例 61 所述之經分離的嚙齒動物細胞，其中該嚙齒動物細胞為嚙齒動物胚胎幹(ES)細胞。

實施例 64. 一種嚙齒動物胚胎，由實施例 63 所述之嚙齒動物 ES 細胞產生。

實施例 65. 一種使用如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物製造抗體之用途。

實施例 66. 一種使用如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物製造輕鏈可變區序列之用途。

實施例 67. 一種使用如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物製造輕鏈可變結構域序列之用途。

實施例 68. 一種得自如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物的經分離 B 細胞，其中該 B 細胞之基因組包含：

(a) 重排的人類 λ 輕鏈可變區序列，其操作性地連接至一 λ 輕鏈可變區序列，其中該重排的人類 λ 輕鏈可變區序列包括：

(i) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異體，以及

(ii) 一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異體。

實施例 69. 如實施例 68 所述之經分離 B 細胞，更包含：

(b) 重排的人類重鏈可變區序列，其可操作性地連接一嚙齒動物重鏈可變區序列，其中該重排的人類重鏈可變區序列包含：

(i) 一或多個人類 V_H 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異體，以及

(ii) 一或多個人類 D_H 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異體，以及

(iii) 一或多個人類 J_H 基因片段之一，或其體細胞高度突變的變異體。

實施例 70. 一種抗體，由包含下列步驟之方法製備：

(a) 提供如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物；

(b) 以有興趣之抗原使該嚙齒動物免疫化；

(c) 將該嚙齒動物維持在足以使該嚙齒動物對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；以及

(d) 自該嚙齒動物回收：

(i) 與有興趣抗原結合的抗體，

(ii) 核苷酸，其編碼與該有興趣抗原之抗體結合的人類輕鏈或重鏈可變結構域、輕鏈或重鏈，或

(iii) 可表現與該有興趣抗原結合之抗體的細胞，

其中 (d) 的抗體包括人類重鏈可變和人類 λ 輕鏈可變結構域。

實施例 71. 一種經分離的嚙齒動物細胞，其基因組包含：

第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

(a) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段，

(b) 一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，以及

(c) $C\lambda$ 基因，

其中該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段和一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，可操作性地連接至該 $C\lambda$ 基因，以及

其中該經分離的嚙齒動物細胞在第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座處，缺乏嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 72. 如實施例 71 之經分離嚙齒動物細胞，其中該經分離嚙齒動物細胞之第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為同型合子。

實施例 73. 如實施例 71 之經分離嚙齒動物細胞，其中該經分離嚙齒動物細胞之第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為異型合子。

實施例 74. 如實施例 73 之經分離嚙齒動物細胞，其中該經分離嚙齒動物細胞的基因組包含第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含：

(a)一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段，以及

(b)一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段，

其中該一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段與該一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段，係操作性地連結至 $C\kappa$ 基因。

實施例 75. 如實施例 74 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上之 $C\kappa$ 基因為內源性嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 76. 如實施例 71-75 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該經分離嚙齒動物細胞缺乏該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的嚙齒動物 $C\kappa$ 基因。

實施例 77. 如實施例 71-76 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 $C\lambda$ 基因包含嚙齒動物 $C\lambda$ 基因。

實施例 78. 如實施例 71-77 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼序列，其中每一者係與該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段中的至少一者相鄰，其中該一或多個人類 $V\lambda$ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的人類 $V\lambda$ 基因片段；

(ii) 一或多個人類 $J\lambda$ 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段中的至少一者相鄰，其中該一或多個人類 $J\lambda$ 非編碼序列係天

然地出現在鄰近於內源性人免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的人類 J λ 基因片段;
或

(iii) 其任一組合。

實施例 79. 如實施例 71-78 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中：

(i) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、
V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、
V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、
V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或
其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或
其任一組合。

實施例 80. 如實施例 79 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該第一經改造
內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序
列係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-
51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、
V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、
V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、
V λ 4-3，或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列係天然地出現在
鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-
49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、
V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、
V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或
V λ 3-1；以及

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序
列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、
J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列係天然地出

現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7。

實施例 81. 如實施例 79 所述之經分離齙齒動物細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，

(ii) 一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4，或 J κ 5。

實施例 82. 如實施例 71-81 任一項所述之經分離齙齒動物細胞，其中：

(a) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合；以及

(b) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7 或其任一組合。

實施例 83. 如實施例 82 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1；以及

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7。

實施例 84. 如實施例 82 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、

Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1；以及

(ii) 一或多個人類 Jκ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jκ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4，或 Jκ5。

實施例 85. 如實施例 71-84 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該嚙齒動物細胞之基因組更包含：

經改造之內源性免疫球蛋白重鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 V_H 基因片段，
- (b) 一或多個人類 D_H 基因片段，以及
- (c) 一或多個人類 J_H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段和一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性連結至經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 86. 如實施例 85 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段和一或多個人類 J_H 基因片段，係替代一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段或其組合。

實施例 87. 如實施例 85 或 86 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段和一或多個人類 J_H 基因片段，係取代一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其任何組合。

實施例 88. 如實施例 85-87 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座更包含：

(i) 該一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係與該一或多個人類 V_H 基因片段中的至少一者相鄰，其中該一或多個 V_H 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 V_H 基因片段附近；

(ii) 該一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 D_H 基因片段中的至少一者相鄰，其中該一或多個 D_H 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D_H 基因片段；

(iii) 該一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係與一或多個人類 J_H 基因片段中的至少一者相鄰，其中該一或多個 J_H 非編碼序列之每一者係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段；或

(iv) 其任一組合。

實施例 89. 如實施例 85-88 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因為一或多個內源性嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 90. 如實施例 85-89 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中：

(i) 該一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、

V_H3-33、V_H4-31、V_H3-30、V_H4-28、V_H2-26、V_H1-24、V_H3-23、V_H3-21、
V_H3-20、V_H1-18、V_H3-15、V_H3-13、V_H3-11、V_H3-9、V_H1-8、V_H3-7、
V_H2-5、V_H7-4-1、V_H4-4、V_H1-3、V_H1-2、V_H6-1，或其任一組合，

(ii) 該一或多個人類 D_H基因片段包含 D_H1-1、D_H2-2、D_H3-3、D_H4-4、
D_H5-5、D_H6-6、D_H1-7、D_H2-8、D_H3-9、D_H3-10、D_H5-12、D_H6-13、D_H2-
15、D_H3-16、D_H4-17、D_H6-19、D_H1-20、D_H2-21、D_H3-22、D_H6-25、D_H1-
26、D_H7-27，或其任一組合，以及

(iii) 該一或多個人類 J_H基因片段包含 J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5、J_H6，
或其任一組合。

實施例 91. 如實施例 85-90 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中經改
造內源性免疫球蛋白重鏈基因座缺乏一功能性內源性嚙齒動物 Adam6 基因。

實施例 92 如實施例 85-91 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該嚙
齒動物細胞的基因組更包含一或多個核苷酸序列，其編碼嚙齒動物
ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一
或多者。

實施例 93 如實施例 92 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個核
苷酸序列，其編碼嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功
能同源物或其功能片段之一或多者，係包含於該經改造內源性免疫球蛋白
重鏈基因座之同一染色體上。

實施例 94. 如實施例 92 或 93 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多
個核苷酸序列，其編碼嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、
其功能同源物或其功能片段之一或多者，係包括於該經改造內源性免疫球
蛋白重鏈基因座中。

實施例 95. 如實施例 92-94 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多者，係位於人類 Adam6 偽基因位置上。

實施例 96. 如實施例 92-95 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多者，係取代人類 Adam6 偽基因。

實施例 97. 如實施例 92-96 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多者，係介於第一人類 V_H 基因片段，以及第二人類 V_H 基因片段之間。

實施例 98. 如實施例 97 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該第一人類 V_H 基因片段為 V_H1-2，以及該第二人類 V_H 基因片段為 V_H6-1。

實施例 99. 如實施例 92-94 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段之一或多者，係介於人類 V_H 基因片段與人類 D_H 基因片段之間。

實施例 100. 如實施例 85-99 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該經分離嚙齒動物細胞之經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子。

實施例 101. 如實施例 71-100 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該經分離嚙齒動物細胞之基因組更包含一編碼外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT）之核酸序列，其操作性地連結至一轉錄控制單元。

實施例 102. 如實施例 101 所述之經分離嚙齒動物細胞，其中 TdT 為 TdT 的短同種型（TdT_S）。

實施例 103. 如實施例 101 或 102 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該轉錄控制單元包含一 RAG1 轉錄控制單元、一 RAG2 轉錄控制單元、一免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。

實施例 104. 如實施例 101-103 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該編碼外源 TdT 的核酸序列，係位於嚙齒動物細胞基因組之免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座，或 RAG2 基因座上。

實施例 105. 如實施例 71-104 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該嚙齒動物細胞為大鼠細胞或小鼠細胞。

實施例 106. 一種永生化細胞，產生自如實施例 71-105 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞。

實施例 107. 如實施例 71-105 任一項所述之經分離嚙齒動物細胞，其中該嚙齒動物細胞為嚙齒動物胚胎幹（ES）細胞。

實施例 108. 一種嚙齒動物胚胎，由實施例 107 所述之嚙齒動物 ES 細胞產生。

實施例 109. 一種製備基因修飾嚙齒動物之方法，包含下列步驟：

（a）將一或多個 DNA 片段引入嚙齒動物 ES 細胞基因組中的第一經改造免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中，其中該一或多個 DNA 片段包含：

- （i）一或多個人類 V λ 基因片段，
- （ii）一或多個人類 J λ 基因片段，以及

(iii) 一 C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段和 C λ 基因，係引入嚙齒動物 ES 細胞基因座的內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中，且其中該一或多個人類 V λ 基因片段、一或多個人類 J λ 基因片段和 C λ 基因可操作性地連接； 以及

(b) 使用(a)產生的嚙齒動物 ES 細胞產生一嚙齒動物。

實施例 110. 如實施例 109 所述之方法，其中該嚙齒動物 ES 細胞之基因組包含第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含：

(i) 一或多個人類 V κ 基因片段，以及

(ii) 一或多個人類 J κ 基因片段，

其中該一或多個人類 V κ 基因片段，以及該一或多個人類 J κ 基因片段，係操作性地連結至一 C κ 基因。

實施例 111. 如實施例 109 或 110 所述之方法，其中該嚙齒動物 ES 細胞之基因組包含經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，包含：

(i) 一或多個人類 V $_H$ 基因片段，

(ii) 一或多個人類 D $_H$ 基因片段，以及

(iii) 一或多個人類 J $_H$ 基因片段，

其中該一或多個人類 V $_H$ 基因片段、一或多個人類 D $_H$ 基因片段、及一或多個人類 J $_H$ 基因片段，係操作性地連結至該經改造內源免疫球蛋白重鏈基因座之一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 112. 如實施例 109-111 任一項所述之方法，其中該一或多個 DNA 片段更包含至少一篩選標記。

實施例 113. 如實施例 109-112 任一項所述之方法，其中該一或多個 DNA 片段更包含至少一個位點特異性重組位點。

實施例 114. 如實施例 109-113 任一項所述之方法，更包含引入一或多個人類 V λ 非編碼序列和一或多個人類 V λ 非編碼序列，至該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列中的每一者，係鄰近於一人類 V λ 基因片段，且該一或多個人類 J λ 非編碼序列中的每一者，係鄰近於一人類 J λ 基因片段。

實施例 115. 如實施例 109-114 任一項所述之方法，更包含將一 κ 輕鏈非編碼序列引入該嚙齒動物 ES 細胞的基因組中，使得該 κ 輕鏈非編碼序列介於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上之一或多個人類 V λ 基因片段與一或多個人類 J λ 基因片段之間。

實施例 116. 如實施例 109-115 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物 ES 細胞為大鼠 ES 細胞或小鼠 ES 細胞。

實施例 117. 一種製造基因修飾嚙齒動物之方法，包含下列步驟：

(a) 在該嚙齒動物的生殖細胞系基因組中，改造第一內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，以包括：

- (i) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
- (iii) 一 C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段和該一或多個人類 J λ 基因片段，係操作性連結至該 C λ 基因，以及

其中該 C λ 基因係插入該第一內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中。

實施例 118. 如實施例 117 所述之方法，其中該方法更包含下列步驟：

(b) 在該嚙齒動物的生殖細胞系基因組中，改造第二內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，以包括：

- (i) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及

(iii) C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段和一或多個人類 J λ 基因片段，係操作性地連接至該 C λ 基因，以及

其中該 C λ 基因插入該第二內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座。

實施例 119. 如實施例 117 所述之方法，其中該方法更包含下列步驟：

(b) 在嚙齒動物的生殖細胞系基因組中，改造第二內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，以包括：

(i) 一或多個人類 V κ 基因片段，以及

(ii) 一或多個人類 J κ 基因片段，

其中該一或多個人類 V κ 基因片段和一或多個人類 J κ 基因片段，係操作性地連接至 C κ 基因。

實施例 120. 如實施例 119 所述之方法，其中第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的 C κ 基因為內源性嚙齒動物 C κ 基因。

實施例 121. 如實施例 117-120 任一項所述之方法，其中該方法更包含下列步驟：

(c) 在該嚙齒動物的生殖細胞系基因組中，改造經改造的內源性免疫球蛋白重鏈基因座，以包括：

(i) 一或多個人類 V $_H$ 基因片段，

(ii) 一或多個人類 D $_H$ 基因片段，以及

(iii) 一或多個人類 J $_H$ 基因片段，

其中該一或多個人類 V $_H$ 基因片段、一或多個人類 D $_H$ 基因片段及一或多個人類 J $_H$ 基因片段，係操作性地連接至一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 122. 如實施例 117-121 任一項所述之方法，其中在該嚙齒動物的生殖細胞系基因組中改造第一內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座的步驟，係於

嚙齒動物 ES 細胞中進行，其基因組包含第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含一或多個人類 V_{κ} 基因片段，以及一或多個人類 J_{κ} 基因片段，其中該一或多個人類 V_{κ} 基因片段和一或多個人類 J_{κ} 基因片段，可操作性地連接至 C_{κ} 基因。

實施例 123. 如實施例 122 所述之方法，其中該第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的 C_{κ} 基因為內源性嚙齒動物 C_{κ} 基因。

實施例 124. 如實施例 117-120、122 與 123 任一項所述之方法，其中該改造步驟係於 嚙齒動物 ES 細胞中進行，該細胞之基因組包含經改造之內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包含一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 125. 如實施例 121-124 任一項所述之方法，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座包含一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 V_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 V_H 非編碼序列中的每一者，係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座中的人類 V_H 基因片段。

實施例 126. 如實施例 121-125 任一項所述之方法，其中經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座包含一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 D_H 基因之至少一者，其中該一或多個 D_H 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D_H 基因片段。

實施例 127. 如實施例 121-126 任一項所述之方法，其中經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座包含一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J_H 基因之至少一者，其中該一或多個 J_H 非編碼序列之每一

者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段。

實施例 128. 如實施例 109-127 任一項所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座缺乏嚙齒動物 Cκ 基因。

實施例 129. 如實施例 110-115 以及 119-128 任一項所述之方法，其中該第二經改造內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座上的 Cκ 基因為內源性嚙齒動物 Cκ 基因。

實施例 130. 如實施例 109-129 任一項所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座上的 Cλ 基因包含嚙齒動物 Cλ 基因。

實施例 131. 如實施例 109-130 任一項所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ 輕鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 Vλ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白λ 輕鏈基因座上的人類 Vλ 基因片段；

(ii) 一或多個人類 Jλ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 Jλ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白λ 輕鏈基因座上的人類 Jλ 基因片段；或

(iii) 其任一組合。

實施例 132. 如實施例 109-131 任一項所述之方法，其中：

(i) 該一或多個人類 Vλ 基因片段包含 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、

V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1 或其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。

實施例 133. 如實施例 132 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1；以及

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7。

實施例 134. 如實施例 132 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、

V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1；以及

(ii) 一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4，或 J κ 5。

實施例 135. 如實施例 109-134 任一項所述之方法，其中

(i) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1；或其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。

實施例 136. 如實施例 135 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、

Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1；以及

(ii)一或多個人類 Jλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7。

實施例 137. 如實施例 135 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i)一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1；以及

(ii) 一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，以及其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4 或 J κ 5。

實施例 138. 如實施例 111-116 與 121-137 任一項所述之方法，其中該一或多個人類 V $_H$ 基因片段、一或多個人類 D $_H$ 基因片段、及一或多個人類 J $_H$ 基因片段，係替代一或多個嚙齒動物 V $_H$ 基因片段、一或多個嚙齒動物 D $_H$ 基因片段、一或多個嚙齒動物 J $_H$ 基因片段，或其任一組合。

實施例 139. 如實施例 111-116 與 121-138 任一項所述之方法，其中該一或多個人類 V $_H$ 基因片段、一或多個人類 D $_H$ 基因片段、及一或多個人類 J $_H$ 基因片段，係取代一或多個嚙齒動物 V $_H$ 基因片段、一或多個嚙齒動物 D $_H$ 基因片段、一或多個嚙齒動物 J $_H$ 基因片段，或其任一組合。

實施例 140. 如實施例 111-116 與 121-139 任一項所述之方法，其中該經改造之內源性免疫球蛋白重鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 V $_H$ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 V $_H$ 基因片段之至少一者，其中該一或多個 V $_H$ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 V $_H$ 基因片段；

(ii) 一或多個人類 D $_H$ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 D $_H$ 基因片段之至少一者，其中該一或多個 D $_H$ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D $_H$ 基因片段；

(iii) 一或多個人類 J $_H$ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J $_H$ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 J $_H$ 非編碼序列之每一者，

係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段；或

(iv) 其任一組合。

實施例 141. 如實施例 111-116 與 121-140 任一項所述之方法，其中該一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因，為一或多個內源性嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 142. 如實施例 111-116 與 121-141 任一項所述之方法，其中：

(i) 該一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_H3-74、V_H3-73、V_H3-72、V_H2-70、V_H1-69、V_H3-66、V_H3-64、V_H4-61、V_H4-59、V_H1-58、V_H3-53、V_H5-51、V_H3-49、V_H3-48、V_H1-46、V_H1-45、V_H3-43、V_H4-39、V_H4-34、V_H3-33、V_H4-31、V_H3-30、V_H4-28、V_H2-26、V_H1-24、V_H3-23、V_H3-21、V_H3-20、V_H1-18、V_H3-15、V_H3-13、V_H3-11、V_H3-9、V_H1-8、V_H3-7、V_H2-5、V_H7-4-1、V_H4-4、V_H1-3、V_H1-2、V_H6-1，或其任一組合；

(ii) 該一或多個人類 D_H 基因片段包含 D_H1-1、D_H2-2、D_H3-3、D_H4-4、D_H5-5、D_H6-6、D_H1-7、D_H2-8、D_H3-9、D_H3-10、D_H5-12、D_H6-13、D_H2-15、D_H3-16、D_H4-17、D_H6-19、D_H1-20、D_H2-21、D_H3-22、D_H6-25、D_H1-26、D_H7-27，或任一組合；以及

(iii) 該一或多個人類 J_H 基因片段包含 J_H1、J_H2、J_H3、J_H4、J_H5、J_H6，或其任一組合。

實施例 143. 如實施例 111-116 與 121-142 任一項所述之方法，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座缺乏功能性內源性嚙齒動物 Adam6 基因。

實施例 144. 如實施例 111-116 與 121-143 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物 ES 細胞的基因組或嚙齒動物的生殖細胞系基因組更包含一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能性同源物或其功能性片段。

實施例 145. 如實施例 144 所述之方法，其中編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能性同源物或功能性片段之一或多個核苷酸，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之同一染色體上。

實施例 146. 如實施例 144 或 145 所述之方法，其中編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能性同源物或其功能性片段之一或多個核苷酸，係包括於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座上。

實施例 147. 如實施例 144-146 任一項所述之方法，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能性同源物或功能性片段之一或多個核苷酸，係替代人類 Adam6 偽基因。

實施例 148. 如實施例 144-147 任一項所述之方法，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能性同源物或功能性片段之一或多個核苷酸，係取代人類 Adam6 偽基因。

實施例 149. 如實施例 144-148 任一項所述之方法，其中該編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能性同源物或功能性片段之一或多個核苷酸，係介於第一人類 V_H 基因片段與第二人類 V_H 基因片段之間。

實施例 150. 如實施例 149 所述之方法，其中該第一人類 V_H 基因片段為 V_H1-2，以及該第二人類 V_H 基因片段為 V_H6-1。

實施例 151. 如實施例 144-146 所述之方法，其中該一或多個核苷酸，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能性同源物或功能性片段，係介於一人類 V_H 基因片段與一人類 D_H 基因片段之間。

實施例 152. 如實施例 111-116 與 121-151 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物之經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子。

實施例 153. 如實施例 109-152 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物 ES 細胞的基因組或嚙齒動物的生殖細胞系基因組更包含一核酸序列，其編碼一外源末端去氧核苷酸轉移酶（TdT），其操作性地連結至一轉錄控制單元。

實施例 154. 如實施例 153 所述之方法，其中該 TdT 為 TdT 的短同種型（TdTS）。

實施例 155. 如實施例 153 或 154 所述之方法，其中該轉錄控制單元包含一 RAG1 轉錄控制單元、一 RAG2 轉錄控制單元、一免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、一免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。

實施例 156. 如實施例 153-155 任一項所述之方法，其中該編碼外源性 TdT 的核酸序列，係位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座或 RAG2 基因座上。

實施例 157. 如實施例 109-156 任一項所述之方法，其中嚙齒動物為大鼠或小鼠。

實施例 158. 一種在經基因修飾嚙齒動物中製備抗體之方法，該方法包含下列步驟：

(a) 以有興趣的抗原使嚙齒動物免疫化，

其中該嚙齒動物具生殖細胞系基因組，包含：

第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

(i) 一或多個人類 V λ 基因片段，

(ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及

(iii) C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段與該一或多個人類 J λ 基因片段，係操作性連結至該 C λ 基因，以及

其中該 C λ 基因(c)係替代該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之嚙齒動物 C κ 基因；

(b) 將該嚙齒動物維持在足以使該嚙齒動物對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；以及

(c) 自該嚙齒動物中回收：

(i) 與該有興趣抗原結合之抗體，

(ii) 核苷酸，其編碼與該有興趣抗原結合之抗體的人類輕鏈或重鏈可變結構域、輕鏈或重鏈，或

(iii) 表現與該有興趣抗原結合之抗體的細胞。

實施例 159. 如實施例 158 所述之方法，其中該嚙齒動物細胞為 B 細胞。

實施例 160. 如實施例 159 所述之方法，更包含自該 B 細胞產生融合瘤。

實施例 161. 一種製造抗體的方法，包含：

(a) 在宿主細胞中表現編碼一免疫球蛋白重鏈的第一核苷酸序列，其中該第一核苷酸序列包括一人類重鏈可變區序列；

(b) 在宿主細胞中表現編碼一免疫球蛋白 λ 輕鏈的第二核苷酸序列，其中該第二核苷酸序列包括一人類 λ 輕鏈可變區序列，其於基因修飾嚙齒動物中辨識出，該嚙齒動物生殖細胞系基因組包含：

第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

(i) 一或多個人類 V λ 基因片段，

(ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及

(iii) C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段與該一或多個人類 J λ 片段，係操作性地連結至該 C λ 基因，以及

其中該嚙齒動物於該經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座處缺乏嚙齒動物 C κ 基因；

(c) 培養該宿主細胞，使該免疫球蛋白輕鏈和免疫球蛋白重鏈可被表現，並形成抗體；以及

(d) 自該宿主細胞或宿主細胞培養物中取得該抗體。

實施例 162. 如實施例 161 所述之方法，其中該第一核苷酸更包括一人類重鏈恆定區基因。

實施例 163. 如實施例 161 或 162 所述之方法，其中該第二核苷酸更包括一人類 λ 輕鏈恆定區基因。

實施例 164. 如實施例 158-163 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物之第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為同型合子。

實施例 165. 如實施例 158-163 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物之第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為異型合子。

實施例 166. 如實施例 165 所述之方法，其中該嚙齒動物的生殖細胞系基因組包含第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

(a) 一或多個人類 V κ 基因片段，以及

(b) 一或多個人類 J κ 基因片段，

其中該一或多個人類 V κ 基因片與該一或多個人類 J κ 基因片段，係操作性連結至 C κ 基因。

實施例 167. 如實施例 166 所述之方法，其中第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的 C κ 基因為內源性嚙齒動物 C κ 基因。

實施例 168. 如實施例 158-167 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物在第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上缺乏嚙齒動物 C κ 基因。

實施例 169. 如實施例 158-168 任一項所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上的 C λ 基因包含嚙齒動物 C λ 基因。

實施例 170. 如實施例 158-169 任一項所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 V λ 基因片段中的至少一者，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列，係天然地出現在鄰近於一內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的人類 V λ 基因片段；

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J λ 基因片段中的至少一者，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列，係天然地出現在鄰近於一內源性人免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的人類 J λ 基因片段；或

(iii) 其任一組合。

實施例 171. 如實施例 158-170 任一項所述之方法，其中：

(i) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。

實施例 172. 如實施例 171 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i)一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，以及

(ii)一或多個人類 Jλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7。

實施例 173. 如實施例 171 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座包含：

(i)一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、

Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1；以及

(ii) 一或多個人類 Jκ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jκ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4，或 Jκ5。

實施例 174. 如實施例 158-173 任一項所述之方法，其中：

(i) 該一或多個人類 Vλ 基因片段包含 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3、Vλ3-1，或其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 Jλ 基因片段包含 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6、Jλ7，或其任一組合。

實施例 175. 如實施例 174 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3，或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白λ輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、

Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，以及

(ii)一或多個人類 Jλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列之每一者係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7。

實施例 176. 如實施例 174 所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座包含：

(i)一或多個人類 Vλ 非編碼序列，其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，且其中該一或多個人類 Vλ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 Vλ4-69、Vλ8-61、Vλ4-60、Vλ6-57、Vλ10-54、Vλ5-52、Vλ1-51、Vλ9-49、Vλ1-47、Vλ7-46、Vλ5-45、Vλ1-44、Vλ7-43、Vλ1-40、Vλ5-39、Vλ5-37、Vλ1-36、Vλ3-27、Vλ3-25、Vλ2-23、Vλ3-22、Vλ3-21、Vλ3-19、Vλ2-18、Vλ3-16、Vλ2-14、Vλ3-12、Vλ2-11、Vλ3-10、Vλ3-9、Vλ2-8、Vλ4-3 或 Vλ3-1，以及

(ii)一或多個人類 Jκ非編碼序列，其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jλ1、Jλ2、Jλ3、Jλ6 或 Jλ7，且其中該一或多個人類 Jκ非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白κ輕鏈基因座之 Jκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4 或 Jκ5。

實施例 177. 如實施例 158-176 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物的生殖細胞系基因組更包含：

經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 V_H 基因片段，
- (b) 一或多個人類 D_H 基因片段，以及
- (c) 一或多個人類 J_H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座上之一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 178. 如實施例 177 所述之方法，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係替代一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其組合。

實施例 179. 如實施例 177 或 178 任一項所述之方法，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係取代一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其任一組合。

實施例 180. 如實施例 177-179 任一項所述之方法，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 V_H 基因片段中的至少一者，其中該一或多個 V_H 非編碼序列中的每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 V_H 基因片段；

(ii) 一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 D_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 D_H 非編碼序列之每一者，係

天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D_H 基因片段；

- (iii) 一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J_H 基因片段中的至少一者，其中該一或多個 J_H 非編碼序列之每一者，係天然地鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段；或
- (iv) 其任一組合。

實施例 181. 如實施例 177-180 任一項所述之方法，其中該一或多種嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因為一或多種內源性嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 182. 如實施例 177-181 任一項所述之方法，其中：

- (i) 該一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 、 V_H6-1 ，或其任一組合，
- (ii) 該一或多個人類 D_H 基因片段包含 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、 D_H6-6 、 D_H1-7 、 D_H2-8 、 D_H3-9 、 D_H3-10 、 D_H5-12 、 D_H6-13 、 D_H2-15 、 D_H3-16 、 D_H4-17 、 D_H6-19 、 D_H1-20 、 D_H2-21 、 D_H3-22 、 D_H6-25 、 D_H1-26 、 D_H7-27 ，或其任一組合，以及
- (iii) 該一或多個人類 J_H 基因片段包含 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H4 、 J_H5 、 J_H6 ，或其任一組合。

實施例 183. 如實施例 177-182 任一項所述之方法，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，缺乏功能性內源性嚙齒動物 Adam6 基因。

實施例 184. 如實施例 177-183 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物的生殖細胞系基因組更包含一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、其功能同源物或其功能片段。

實施例 185. 如實施例 184 所述之方法，其中該一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段係被表現。

實施例 186. 如實施例 184 或 185 所述之方法，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段，係包含於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之同一染色體上。

實施例 187. 如實施例 184-186 任一項所述之方法，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段，係包含於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座內。

實施例 188. 如實施例 184-187 任一項所述之方法，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段，係替代人類 Adam6 偽基因。

實施例 189. 如實施例 184-188 任一項所述之方法，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段，係取代人類 Adam6 偽基因。

實施例 190. 如實施例 184-189 任一項所述之方法，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能同源物或功能片段，係介於第一人類 V_H 基因片段與第二人類 V_H 基因片段之間。

實施例 191. 如實施例 190 所述之方法，其中該第一人類 V_H 基因片段為 V_{H1-2} ，以及該第二 V_H 基因片段為 V_{H6-1} 。

實施例 192. 如實施例 184-187 任一項所述之方法，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直向同源物、功能性同源物或功能性片段，係介於人類 V_H 基因片段與人類 D_H 基因片段之間。

實施例 193. 如實施例 177-192 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物之經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子。

實施例 194. 如實施例 158-193 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物包含表現抗體的 B 細胞群，包括免疫球蛋白 λ 輕鏈，每一者皆包括人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域。

實施例 195. 如實施例 194 所述之方法，其中該人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變結構域，係由重排的人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變區序列編碼，該序列包含 (i) 一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段之一者或其體細胞高度突變的變異物，以及 (ii) 一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段之一者或其體細胞高度突變的變異物。

實施例 196. 如實施例 158-195 任一項所述之方法，其中嚙齒動物生殖細胞系基因組更包含一核酸序列，其編碼操作性連結至轉錄控制單元之外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)。

實施例 197. 如實施例 196 所述之方法，其中 TdT 為 TdT 的短同種型 (TdTS)。

實施例 198. 如實施例 196 或 197 所述之方法，其中該轉錄控制單元包含 RAG1 轉錄控制單元、RAG2 轉錄控制單元、免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。

實施例 199. 如實施例 196-198 任一項所述之方法，其中該編碼外源性 TdT 的核酸序列，係位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座，或 RAG2 基因座的生殖細胞系基因組中。

實施例 200. 如實施例 158-199 任一項所述之方法，其中該嚙齒動物為大鼠或小鼠。

實施例 201. 一種嚙齒動物胚胎幹(ES)細胞，其基因組包含：

第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：

- (a) 一或多個人類 V λ 基因片段，
- (b) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
- (c) C λ 基因，

其中該一或多個人類 V λ 基因片段與該一或多個人類 J λ 基因片段，係操作連結至該 C λ 基因，以及

其中該嚙齒動物 ES 細胞在第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座處，缺乏嚙齒動物 C κ 基因。

實施例 202. 如實施例 201 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物類 ES 細胞之第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為同型合子。

實施例 203. 如實施例 201 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物類 ES 細胞之第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為異型合子。

實施例 204. 如實施例 203 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物 ES 細胞之基因組包含第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，其包含：

(i) 一或多個人類 V_{κ} 基因片段，以及

(ii) 一或多個人類 J_{κ} 基因片段，

其中該一或多個人類 V_{κ} 基因片段，與該一或多個人類 J_{κ} 基因片段，係操作性地連結至 C_{κ} 基因。

實施例 205. 如實施例 204 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 C_{κ} 基因，為內源性嚙齒動物 C_{κ} 基因。

實施例 206. 如實施例 201-205 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物 ES 細胞之基因體包含一經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包含：

(i) 一或多個人類 V_H 基因片段，

(ii) 一或多個人類 D_H 基因片段，以及

(iii) 一或多個人類 J_H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，可操作性連結至該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 207. 如實施例 201-206 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物在第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座處，缺乏嚙齒動物 C_{κ} 基因。

實施例 208. 如實施例 201-207 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中在該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上之 C_{λ} 基因包含嚙齒動物 C_{λ} 基因。

實施例 209. 如實施例 201-208 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 V λ 基因片段中的至少一者，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座中的人類 V λ 基因片段；

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 J λ 基因片段之至少一者，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座的人類 J λ 基因片段；或

(iii) 其任一組合。

實施例 210. 如實施例 201-209 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中：

(i) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。

實施例 211. 如實施例 210 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一

者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，以及

(ii)一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7。

實施例 212. 如實施例 210 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i)一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，以及

(ii)一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6 或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4 或 J κ 5。

實施例 213. 如實施例 201-212 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中：

(i) 該一或多個人類 V λ 基因片段包含 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3、V λ 3-1，或其任一組合；以及

(ii) 該一或多個人類 J λ 基因片段包含 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6、J λ 7，或其任一組合。

實施例 214. 如實施例 213 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3，或 V λ 3-1，以及

(ii) 一或多個人類 J λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7。

實施例 215. 如實施例 213 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：

(i) 一或多個人類 V λ 非編碼序列，其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，且其中該一或多個人類 V λ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座之 V λ 4-69、V λ 8-61、V λ 4-60、V λ 6-57、V λ 10-54、V λ 5-52、V λ 1-51、V λ 9-49、V λ 1-47、V λ 7-46、V λ 5-45、V λ 1-44、V λ 7-43、V λ 1-40、V λ 5-39、V λ 5-37、V λ 1-36、V λ 3-27、V λ 3-25、V λ 2-23、V λ 3-22、V λ 3-21、V λ 3-19、V λ 2-18、V λ 3-16、V λ 2-14、V λ 3-12、V λ 2-11、V λ 3-10、V λ 3-9、V λ 2-8、V λ 4-3 或 V λ 3-1，以及

(ii) 一或多個人類 J κ 非編碼序列，其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係鄰近於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J λ 1、J λ 2、J λ 3、J λ 6，或 J λ 7，且其中該一或多個人類 J κ 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之 J κ 1、J κ 2、J κ 3、J κ 4 或 J κ 5。

實施例 216. 如實施例 201-215 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物 ES 細胞之基因組更包含：

經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，其包含：

- (a) 一或多個人類 V H 基因片段，
- (b) 一或多個人類 D H 基因片段，以及
- (c) 一或多個人類 J H 基因片段，

其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 217. 如實施例 216 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係替代該一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、及一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其組合。

實施例 218. 如實施例 216 或 217 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個人類 V_H 基因片段、一或多個人類 D_H 基因片段、及一或多個人類 J_H 基因片段，係取代該一或多個嚙齒動物 V_H 基因片段、一或多個嚙齒動物 D_H 基因片段、及一或多個嚙齒動物 J_H 基因片段，或其任一組合。

實施例 219. 如實施例 216-218 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 V_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 V_H 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 V_H 基因片段；

(ii) 一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於該一或多個人類 D_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 D_H 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D_H 基因片段；

(iii) 一個多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 J_H 非編碼序列中之每一者，係天然地出現在相鄰於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段；或

(iv) 其任一組合。

實施例 220. 如實施例 216-219 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因，為一或多個內源性嚙齒動物免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

實施例 221. 如實施例 216-220 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中：

(i) 該一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 、 V_H6-1 ，或其任一組合，

(ii) 該一或多個人類 D_H 基因片段包含 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、 D_H6-6 、 D_H1-7 、 D_H2-8 、 D_H3-9 、 D_H3-10 、 D_H5-12 、 D_H6-13 、 D_H2-15 、 D_H3-16 、 D_H4-17 、 D_H6-19 、 D_H1-20 、 D_H2-21 、 D_H3-22 、 D_H6-25 、 D_H1-26 、 D_H7-27 ，或其任一組合，以及

(iii) 該一或多個人類 J_H 基因片段包含 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H4 、 J_H5 、 J_H6 ，或其任一組合。

實施例 222. 如實施例 216-221 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座缺乏功能性內源性嚙齒動物 Adam6 基因。

實施例 223. 如實施例 216-222 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物基因組更包含一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能性同源物或其功能片段。

實施例 224. 如實施例 223 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、

功能性同源物或功能性片段，係包含於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座之同一染色體上。

實施例 225. 如實施例 223 或 224 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能性同源物或其功能片段，係包含於該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座內。

實施例 226. 如實施例 223-225 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能性同源物或其功能片段，係替代一人類 Adam6 偽基因。

實施例 227. 如實施例 223-226 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能性同源物或其功能片段，係取代人類 Adam6 偽基因。

實施例 228. 如實施例 223-227 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能性同源物或其功能片段，係介於第一人類 V_H 基因片段與第二人類 V_H 基因片段之間。

實施例 229. 如實施例 228 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該第一人類 V_H 基因片段為 V_H1-2，以及該第二人類 V_H 基因片段為 V_H6-1。

實施例 230. 如實施例 223-225 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該一或多個核苷酸序列，其編碼一或多個嚙齒動物 ADAM6 多胜肽、其功能性直系同源物、其功能性同源物或其功能片段，係介於人類 V_H 基因片段與人類 D_H 基因片段之間。

實施例 231. 如實施例 216-230 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物細胞之經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子。

實施例 232. 如實施例 201-231 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物 ES 細胞的基因組更包含一核酸序列，其編碼一外源性末端去氧核苷酸轉移酶（TdT），其係操作性地連結至一轉錄控制單元。

實施例 233. 如實施例 232 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該 TdT 為 TdT 的短同種型（TdTS）。

實施例 234. 如實施例 232 或 233 所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該轉錄控制單元包含 RAG1 轉錄控制單元、RAG2 轉錄控制單元、免疫球蛋白重鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 κ 輕鏈轉錄控制單元、免疫球蛋白 λ 輕鏈轉錄控制單元，或其任一組合。

實施例 235. 如實施例 232-234 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該編碼外源性 TdT 的核酸序列，係位於免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座、免疫球蛋白 λ 輕鏈基因座、免疫球蛋白重鏈基因座、RAG1 基因座或 RAG2 基因座。

實施例 236. 如實施例 201-235 任一項所述之嚙齒動物 ES 細胞，其中該嚙齒動物 ES 細胞為大鼠 ES 細胞或小鼠 ES 細胞。

實施例 237. 一種製備對一抗原具特異性之完整人類抗體的方法，包含下列步驟：

- (a) 以該抗原使如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物免疫化；
- (b) 決定編碼一抗體之人類重鏈可變結構域的核苷酸序列，該抗體可特異性結合至該抗原，且該抗體由經基因修飾的小鼠產生，及/或決定編碼一人類 λ 抗體輕鏈可變結構域之核苷酸序列，該抗體可特異性結合至該抗原，且該抗體由經基因修飾的小鼠產生；以及

(c) 表現完整人類抗體，藉由使用：

(i) 編碼(b)之人類重鏈可變結構域的核苷酸序列，其可操作性地連接至人類重鏈恆定區基因，及/或

(ii) 編碼(b)之人類λ輕鏈可變結構域的核苷酸序列，其可操作性地連接至人類輕鏈恆定區基因。

實施例 238. 一種製備對一抗原具特異性之完整人類抗體的方法，包含下列步驟：

(a) 在哺乳動物細胞中表現包含兩個人類λ輕鏈和兩個人類重鏈的完整人類抗體，其中每一人類λ輕鏈包括人類λ輕鏈可變結構域，其由人類λ輕鏈可變區編碼，且每一人類重鏈包括人類重鏈可變結構域，其由人類重鏈可變區編碼，其中該至少一人類重鏈或λ輕鏈可變區的核苷酸序列是由實施例 1-60 中任一項所述的嚙齒動物中獲得；以及

(b) 獲得該完整人類抗體。

實施例 239. 一種製備對一抗原具特異性之完整人類抗體的方法，包含下列步驟：

(a) 以該抗原使如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物免疫化；

(b) 決定抗體的人類重鏈可變結構域序列，該抗體特異性結合至該抗原，且該抗體由基因修飾的小鼠產生，及/或決定一抗體之人類λ輕鏈可變結構域序列，該抗體可特異性結合至該抗原，且該抗體由經基因修飾的小鼠產生；以及

(c) 表現完整人類抗體，藉由使用：

(i) (b)之人類重鏈可變結構域序列，係可操作性地連接至人類重鏈恆定結構域序列，及/或

(ii) (b)之人類λ輕鏈可變結構域序列，係可操作性地連接至人類輕鏈恆定結構域序列。

實施例 240. 如實施例 239 所述之方法，其中使用與人類重鏈恆定結構域序

列操作性連接的 (b) 之人類重鏈可變結構域序列，包含表現核苷酸序列，其編碼 (b) 之人類重鏈可變結構域序列，以及人類重鏈恆定結構域序列。

實施例 241. 如實施例 239 或 240 所述的方法，其中使用與人類 λ 輕鏈恆定結構域序列操作性連接的 (b) 之人類輕鏈可變結構域序列，包含表現一核苷酸序列，其編碼 (b) 之人類 λ 輕鏈可變結構域序列，以及人類輕鏈恆定結構域序列。

實施例 242. 一種製備對一抗原具特異性之完整人類抗體的方法，包含下列步驟：

(a) 在哺乳動物細胞中表現包含兩個人類 λ 輕鏈和兩個人類重鏈的完整人類抗體，其中每一人類 λ 輕鏈包括人類輕鏈可變結構域，以及每一人類重鏈包括人類重鏈可變結構域，其中該至少一人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域的胺基酸序列，是由實施例 1-60 中任一項所述的嚙齒動物中獲得；以及

(b) 獲得該完整人類抗體。

實施例 243. 一種產生人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列之方法，包含下列步驟：

(a) 使如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物免疫化；以及

(b) 決定抗體的人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列，該抗體係特異性結合至該抗原，並由經基因修飾的小鼠產生。

實施例 244. 如實施例 243 所述之方法，其中該決定人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列，包含決定編碼人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列之核苷酸序列。

實施例 245. 一種製備完整人類重鏈或完整人類輕鏈之方法，包含下列步驟：

(a) 使如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物免疫化；以及

(b) 決定一抗體的人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列，該抗體特異性結合至該抗原，且由經基因修飾的小鼠產生；以及

(c) 分別將該人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列，操作性地連結至一人類重鏈或輕鏈恆定結構域序列，以形成完整人類重鏈或完整人類輕鏈。

實施例 246. 如實施例 245 之方法，其中分別將該人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列，操作性地連結至人類重鏈或輕鏈恆定結構域序列，包含將編碼人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域序列之核苷酸，操作性地連結至編碼該人類重鏈或輕鏈恆定結構域序列之核苷酸上。

實施例 247. 一種產生人類重鏈或 λ 輕鏈可變區序列之方法，包含下列步驟：

(a) 使如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物免疫化；以及

(b) 決定人類重鏈或 λ 輕鏈可變區序列，其分別編碼抗體之人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域，該抗體特異性地結合至該抗原，且其由經基因修飾之小鼠產生。

實施例 248. 一種製備編碼完整人類重鏈或完整人類輕鏈之核苷酸序列之方法，包含下列步驟：

(a) 使如實施例 1-60 任一項所述之嚙齒動物免疫化；以及

(b) 決定人類重鏈或 λ 輕鏈可變區序列，其分別編碼抗體之人類重鏈或 λ 輕鏈可變結構域，該抗體特異性地結合至該抗原，且其由經基因修飾的小鼠產生；以及

(c) 分別將該人類重鏈或 λ 輕鏈可變區序列，操作性地連結至人類重鏈或輕鏈恆定區基因，以形成編碼完整人類重鏈或完整人類輕鏈之核苷酸序列。

等效物

【0459】 本領域技術人員應理解，本領域技術人員將可輕易想到本揭示的各種改變、修飾和改進。此種改變、修飾和改進旨在成為本揭示的一部分，並且旨在落入本發明的精神和範圍內。因此，前面的描述和附圖僅為

例示性，且本公開中描述的任何發明，將經由以下申請專利範圍進一步詳細描述。

【0460】 本領域技術人員將理解，典型的標準差或誤差，可歸因於在本文所述的試驗或其他過程中獲得的數值。本文引用於描述本發明背景，並提供關於其實施的其他細節的文獻、網站和其他參考材料，經由引用完整併入本文。

【序列表】

【0461】 本申請案含有序列表，其以 ASCII 格式電子提申，且其全文係以引用方式完整併入本文中。建立於 2018 年 12 月 3 日的 ASCII 副本，名稱為 2010794-1441_SL.txt，大小為 30,059 位元組。

申請專利範圍

1. 一種在經基因修飾小鼠中製備抗體之方法，該方法包含下列步驟：
 - (a) 以有興趣的抗原使該經基因修飾小鼠免疫化，
其中該經基因修飾小鼠具生殖細胞系基因組，包含：
 - 第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，包含：
 - (i) 一或多個人類 V λ 基因片段，
 - (ii) 一或多個人類 J λ 基因片段，以及
 - (iii) 小鼠 C λ 基因，
 其中(i)之該一或多個人類 V λ 基因片段與(ii)之該一或多個人類 J λ 基因片段，係操作性連結至(iii)之該小鼠 C λ 基因，以及
 其中(iii)該小鼠 C λ 基因係替代該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座之小鼠 C κ 基因；
 其中(i)之該一或多個人類 V λ 基因片段與(ii)之該一或多個人類 J λ 基因片段，係替代一或多個內源性小鼠 V κ 基因片段及一或多個內源性小鼠 J κ 基因片段；
 其中該經基因修飾小鼠於該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座上缺乏小鼠 C κ 基因；
 - (b) 將該經基因修飾小鼠維持在足以使該經基因修飾小鼠對有興趣抗原產生免疫反應的條件下；以及
 - (c) 自該經基因修飾小鼠中回收：
 - (i) 與該有興趣抗原結合之抗體，其中該抗體包含一輕鏈，該輕鏈包含人類 λ 可變結構域及小鼠 λ 恆定結構域，
 - (ii) 核苷酸，其編碼與該有興趣抗原結合之抗體的人類輕鏈或重鏈可變結構域、輕鏈或重鏈，其中與該有興趣抗原結合之抗體包含一輕鏈，該輕鏈包含人類 λ 可變結構域及小鼠 λ 恆定結構域，或
 - (iii) 表現與該有興趣抗原結合之抗體的細胞，其中該抗體包含一輕鏈，該輕鏈包含人類 λ 可變結構域及小鼠 λ 恆定結構域。

2. 如請求項 1 所述之方法，其中該經基因修飾小鼠之該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為同型合子。
3. 如請求項 1 所述之方法，其中該經基因修飾小鼠之該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座為異型合子。
4. 如請求項 3 所述之方法，其中該經基因修飾小鼠的生殖細胞系基因組包含第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座，該第二經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座包含：
 - (a) 一或多個人類 $V\kappa$ 基因片段，以及
 - (b) 一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段，
 其中該一或多個人類 $V\kappa$ 基因片與該一或多個人類 $J\kappa$ 基因片段，係操作性連結至 $C\kappa$ 基因。
5. 如請求項 1 所述之方法，其中該小鼠的生殖細胞系基因組更包含：經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座，包含：
 - (a) 一或多個人類 V_H 基因片段，
 - (b) 一或多個人類 D_H 基因片段，以及
 - (c) 一或多個人類 J_H 基因片段，
 其中(a)之該一或多個人類 V_H 基因片段、(b)之該一或多個人類 D_H 基因片段、及(c)之該一或多個人類 J_H 基因片段，係操作性地連結至該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座上之一或多個小鼠免疫球蛋白重鏈恆定區基因。
6. 如請求項 5 所述之方法，其中(a)之該一或多個人類 V_H 基因片段、(b)之該一或多個人類 D_H 基因片段、及(c)之該一或多個人類 J_H 基因片段，係位於一或多個小鼠 V_H 基因片段、一或多個小鼠 D_H 基因片段、一或多個小鼠 J_H 基因片段，或其組合。

7. 如請求項 5 或 6 所述之方法，其中該經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座更包含：

(i) 一或多個人類 V_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 V_H 基因片段中的至少一者，其中該一或多個 V_H 非編碼序列中的每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 V_H 基因片段；

(ii) 一或多個人類 D_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 D_H 基因片段之至少一者，其中該一或多個 D_H 非編碼序列之每一者，係天然地出現在鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 D_H 基因片段；

(iii) 一或多個人類 J_H 非編碼序列，其中每一者係鄰近於一或多個人類 J_H 基因片段中的至少一者，其中該一或多個 J_H 非編碼序列之每一者，係天然地鄰近於內源性人類免疫球蛋白重鏈基因座之人類 J_H 基因片段；或

(iv) 其任一組合。

8. 如請求項 5 或 6 所述之方法，其中該一或多種小鼠免疫球蛋白重鏈恆定區基因為一或多種內源性小鼠免疫球蛋白重鏈恆定區基因。

9. 如請求項 5 或 6 所述之方法，其中：

(i) 該一或多個人類 V_H 基因片段包含 V_H3-74 、 V_H3-73 、 V_H3-72 、 V_H2-70 、 V_H1-69 、 V_H3-66 、 V_H3-64 、 V_H4-61 、 V_H4-59 、 V_H1-58 、 V_H3-53 、 V_H5-51 、 V_H3-49 、 V_H3-48 、 V_H1-46 、 V_H1-45 、 V_H3-43 、 V_H4-39 、 V_H4-34 、 V_H3-33 、 V_H4-31 、 V_H3-30 、 V_H4-28 、 V_H2-26 、 V_H1-24 、 V_H3-23 、 V_H3-21 、 V_H3-20 、 V_H1-18 、 V_H3-15 、 V_H3-13 、 V_H3-11 、 V_H3-9 、 V_H1-8 、 V_H3-7 、 V_H2-5 、 V_H7-4-1 、 V_H4-4 、 V_H1-3 、 V_H1-2 、 V_H6-1 ，或其任一組合，

(ii) 該一或多個人類 D_H 基因片段包含 D_H1-1 、 D_H2-2 、 D_H3-3 、 D_H4-4 、 D_H5-5 、 D_H6-6 、 D_H1-7 、 D_H2-8 、 D_H3-9 、 D_H3-10 、 D_H5-12 、 D_H6-13 、 D_H2-15 、 D_H3-16 、 D_H4-17 、 D_H6-19 、 D_H1-20 、 D_H2-21 、 D_H3-22 、 D_H6-25 、 D_H1-26 、 D_H7-27 ，或其任一組合，以及

(iii) 該一或多個人類 J_H 基因片段包含 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H4 、 J_H5 、 J_H6 ，或其任一組合。

10. 如請求項 5 或 6 所述之方法，其中該經基因修飾小鼠之經改造內源性免疫球蛋白重鏈基因座為同型合子。

11. 如請求項 1 至 6 中任一項所述之方法，其中(i)之該一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段與(ii)之該一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段，係替代該一或多個小鼠 $V\kappa$ 基因片段、該一或多個小鼠 $J\kappa$ 基因片段或其組合。

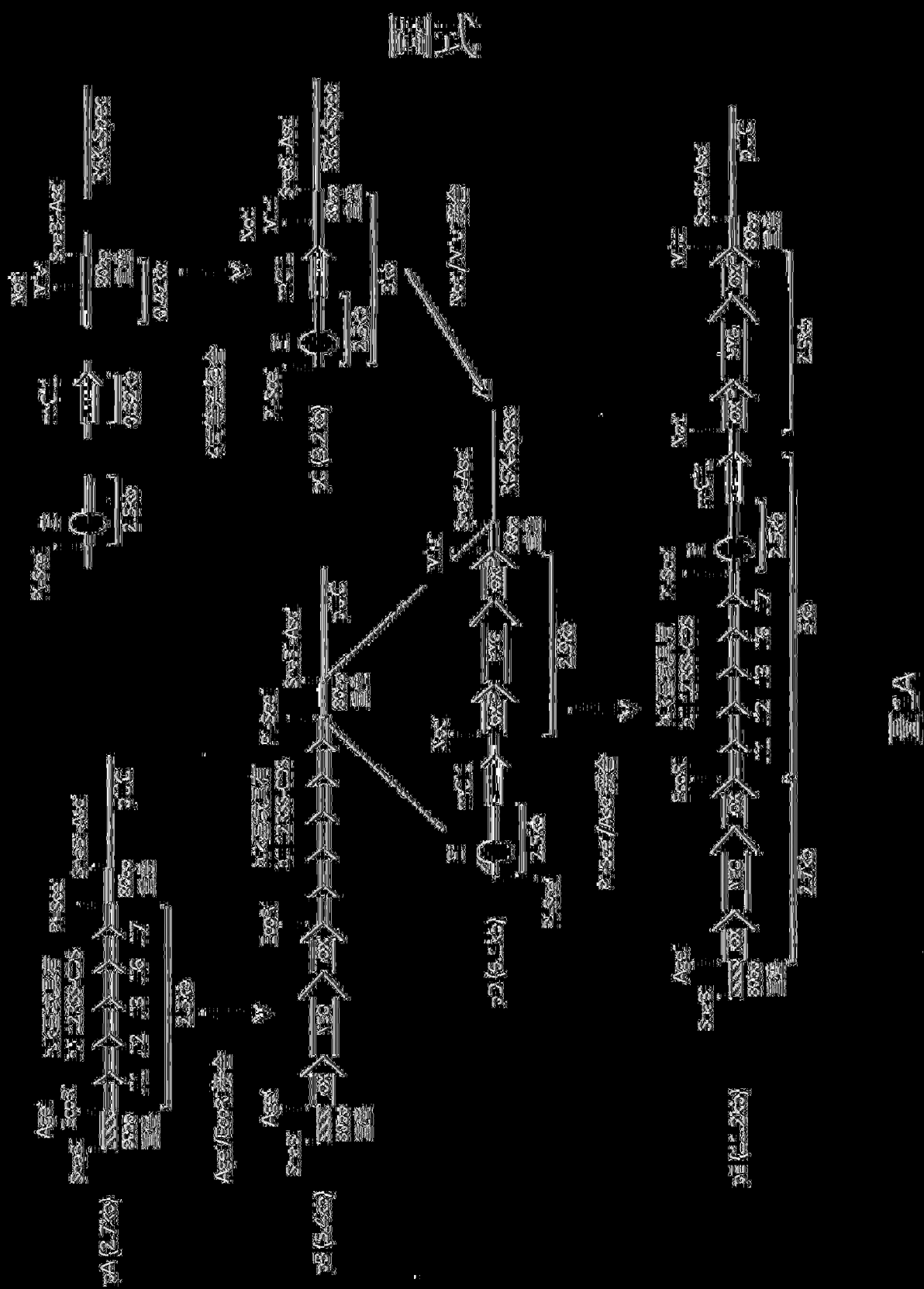
12. 如請求項 1 至 6 中任一項所述之方法，其中該第一經改造內源性免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座更包含一 κ 輕鏈非編碼序列，其介於一或多個人類 $V\lambda$ 基因片段與一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段之間。

13. 如請求項 12 所述之方法，其中該 κ 輕鏈非編碼序列具有一段序列，其天然地出現在內源性人類免疫球蛋白 κ 輕鏈基因座中的人類 $V\kappa4-1$ 基因片段和人類 $J\kappa1$ 基因片段之間。

14. 如請求項 1 至 6 中任一項所述之方法，其中該內源性 $V\lambda$ 基因片段、該內源性 $J\lambda$ 基因片段，且該內源性 $C\lambda$ 基因係全部或部分刪去。

15. 如請求項 1 至 6 中任一項所述之方法，其中各該人類輕鏈可變結構域係由重排的人類免疫球蛋白 λ 輕鏈可變區序列編碼，該序列包含(i)之該一或多個人類 $V\lambda$ 基因區段之一者，或其體細胞高度突變的變異體，以及(ii)之該一或多個人類 $J\lambda$ 基因片段之一者，或其體細胞高度突變的變異體。

16. 如請求項 1 至 6 中任一項所述之方法，其中該生殖細胞系基因組更包含核酸序列，其編碼操作性地連結至轉錄控制單元之外源性末端去氧核苷酸轉移酶(TdT)。



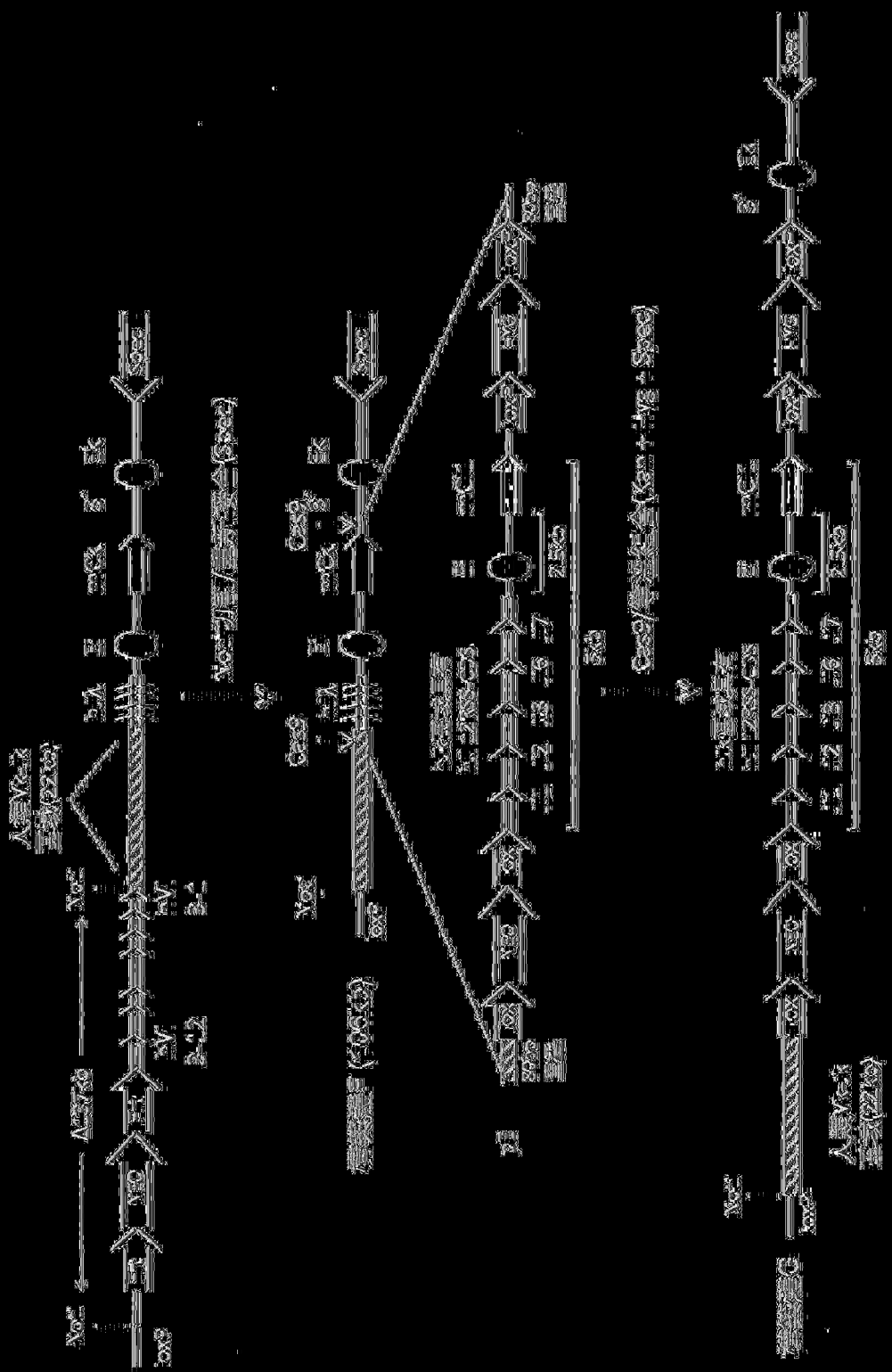
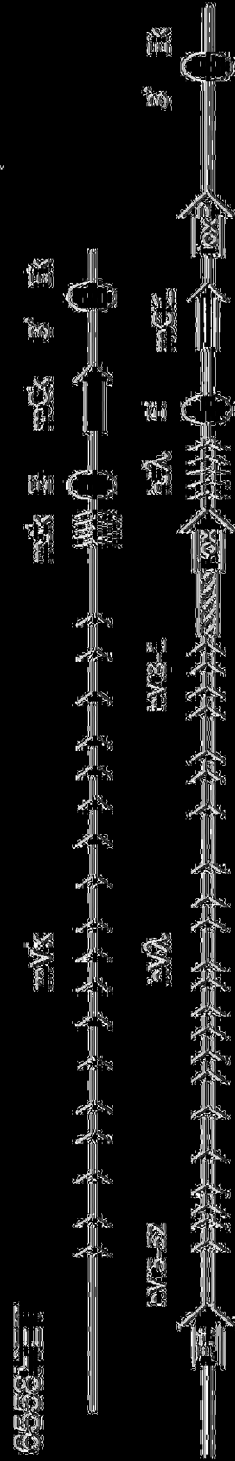
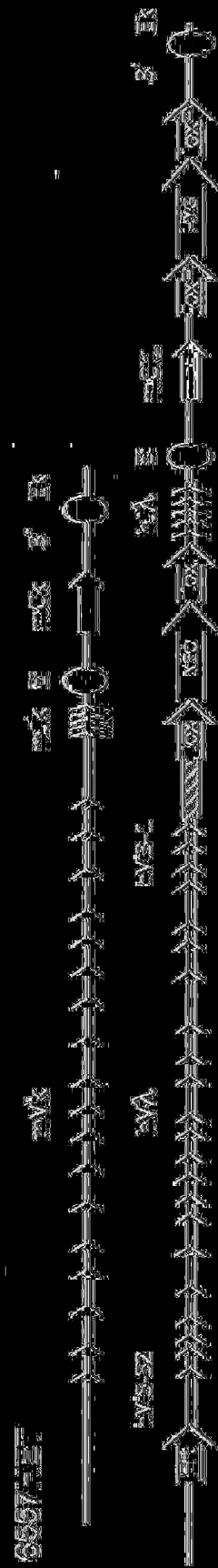


Fig. 3



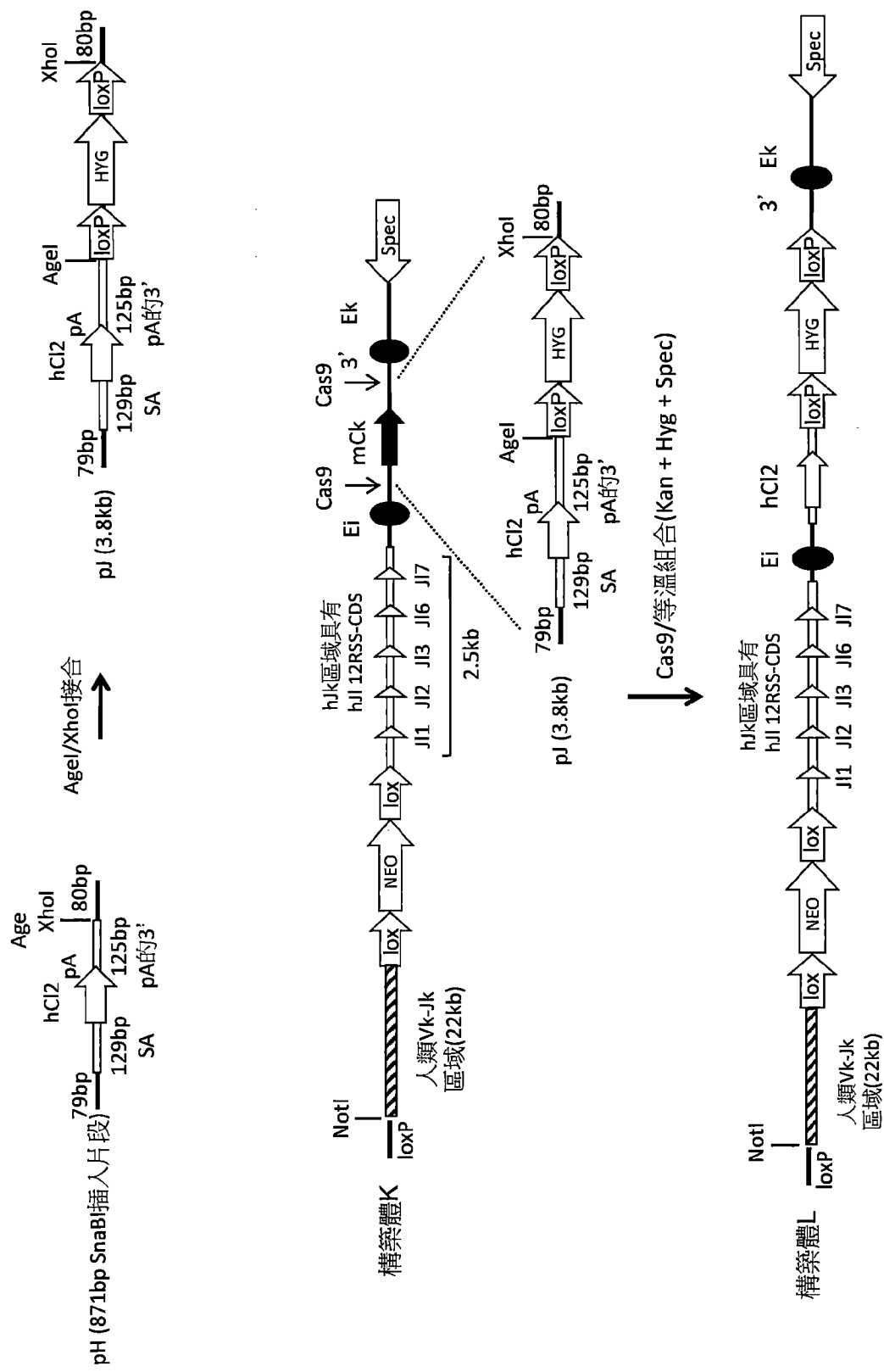


圖 3

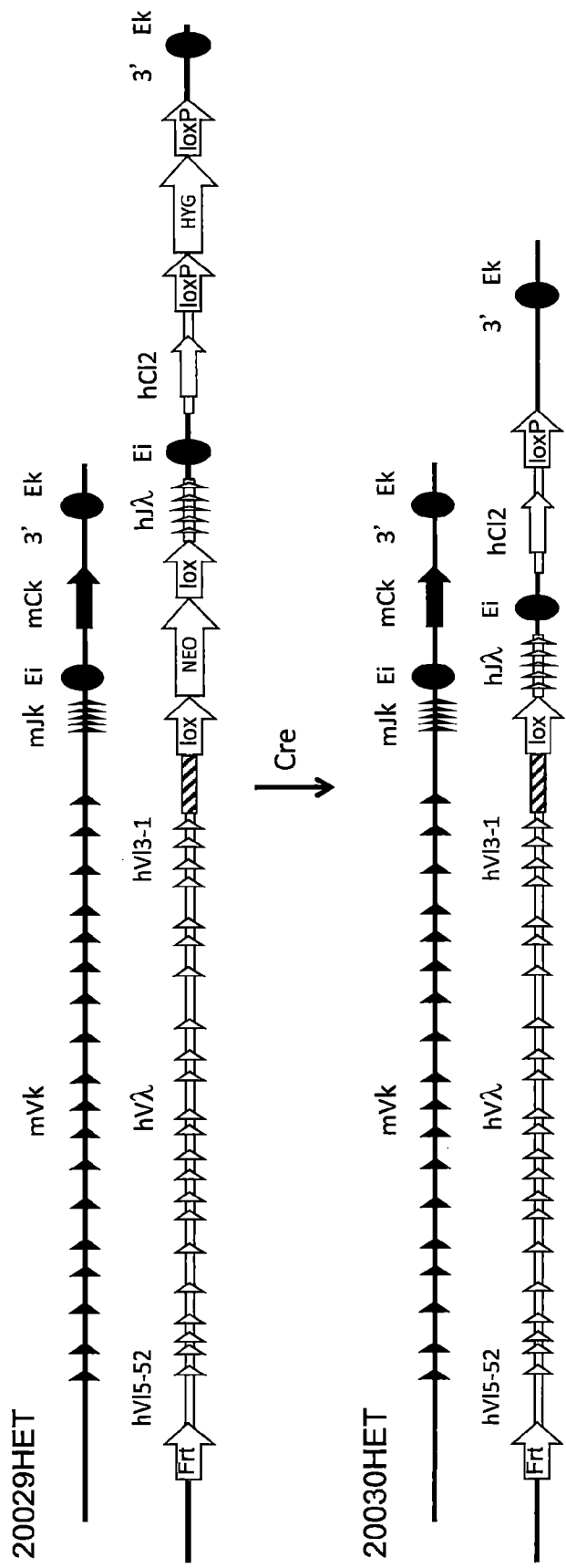
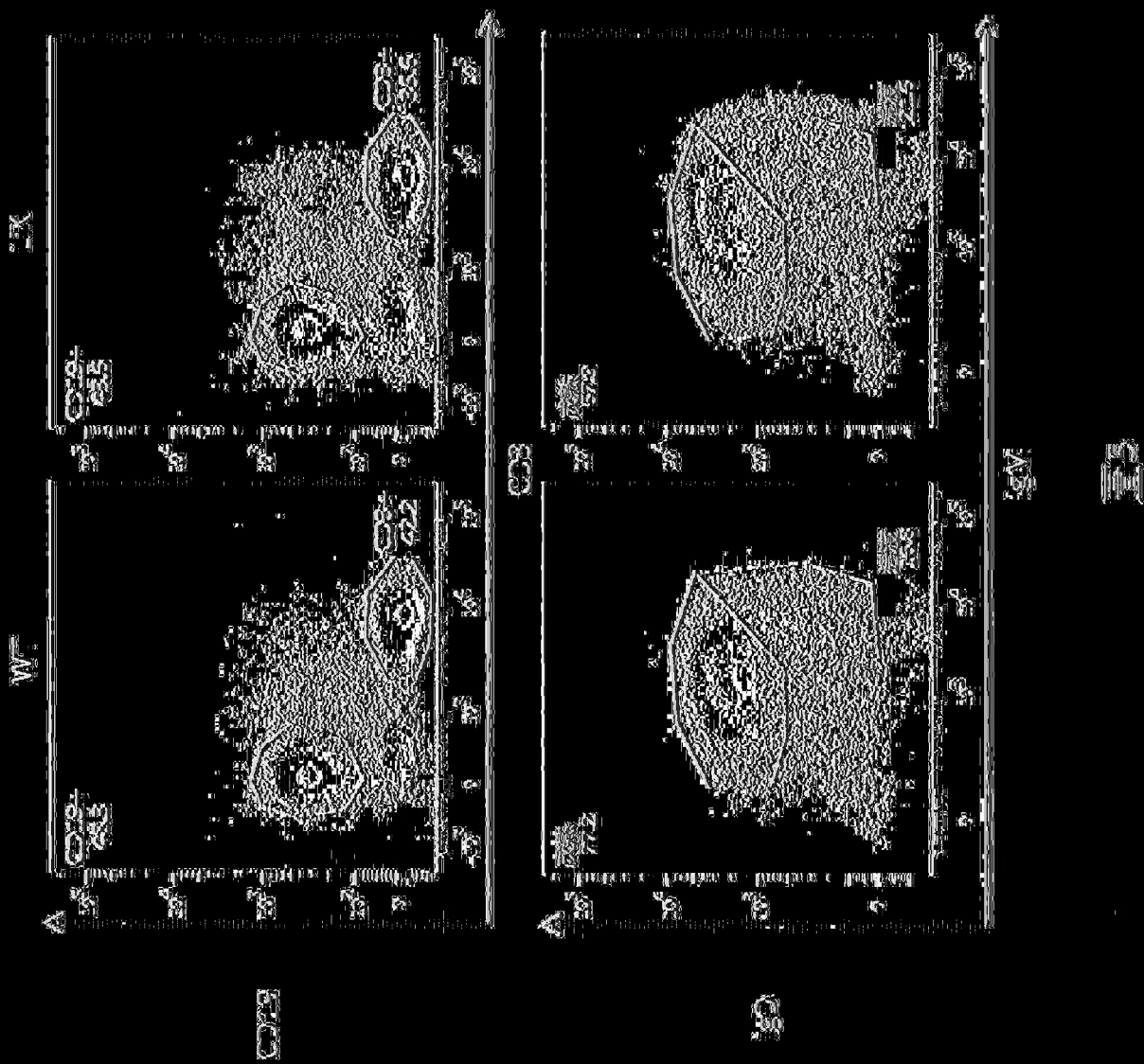
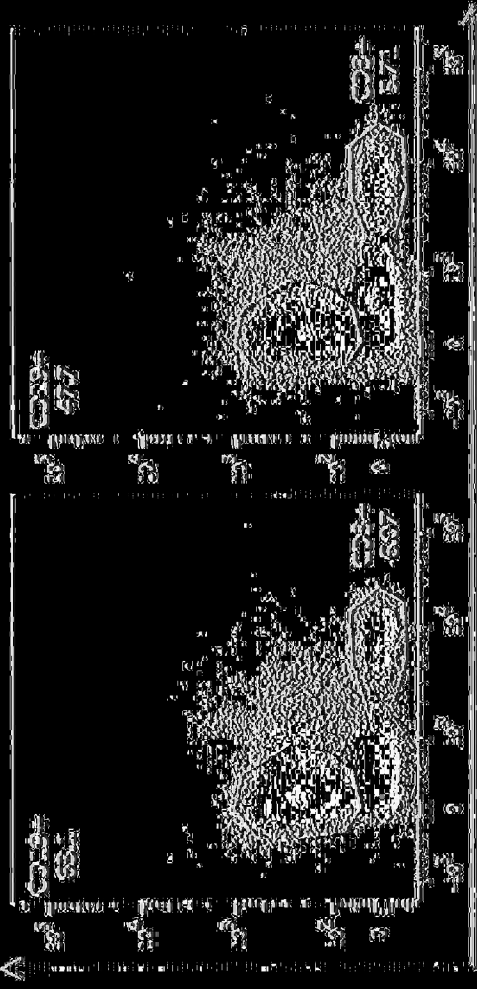


圖 4B

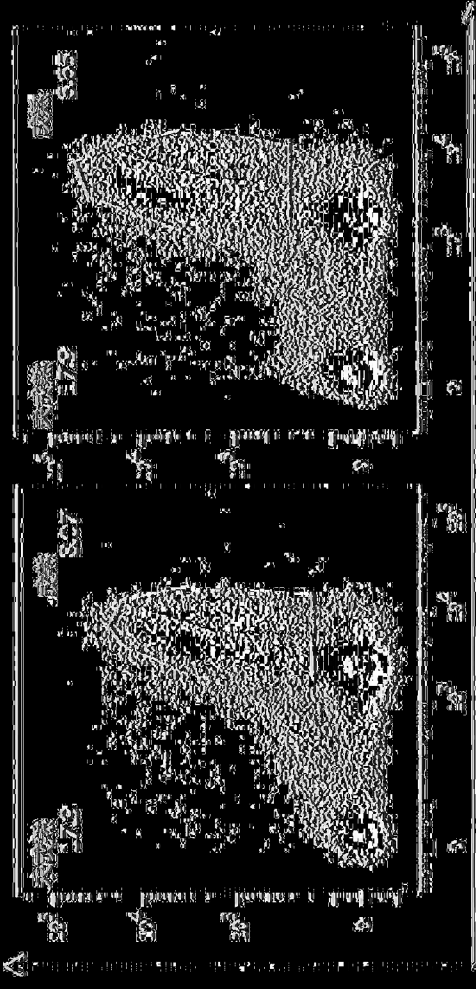


18

18



18



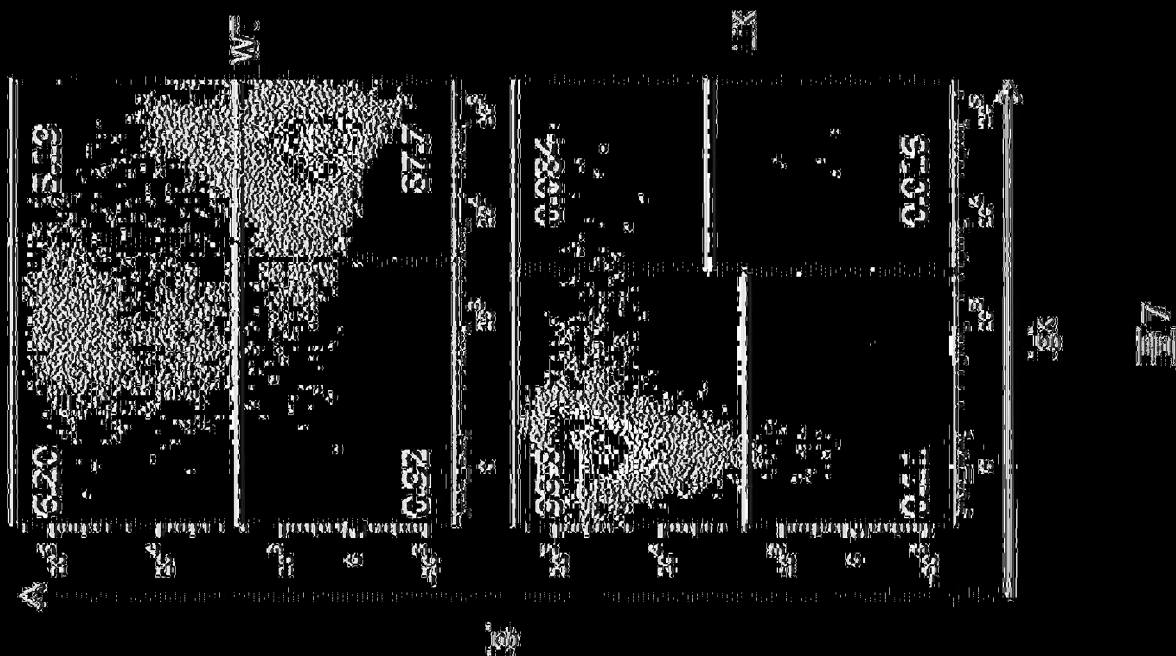
18

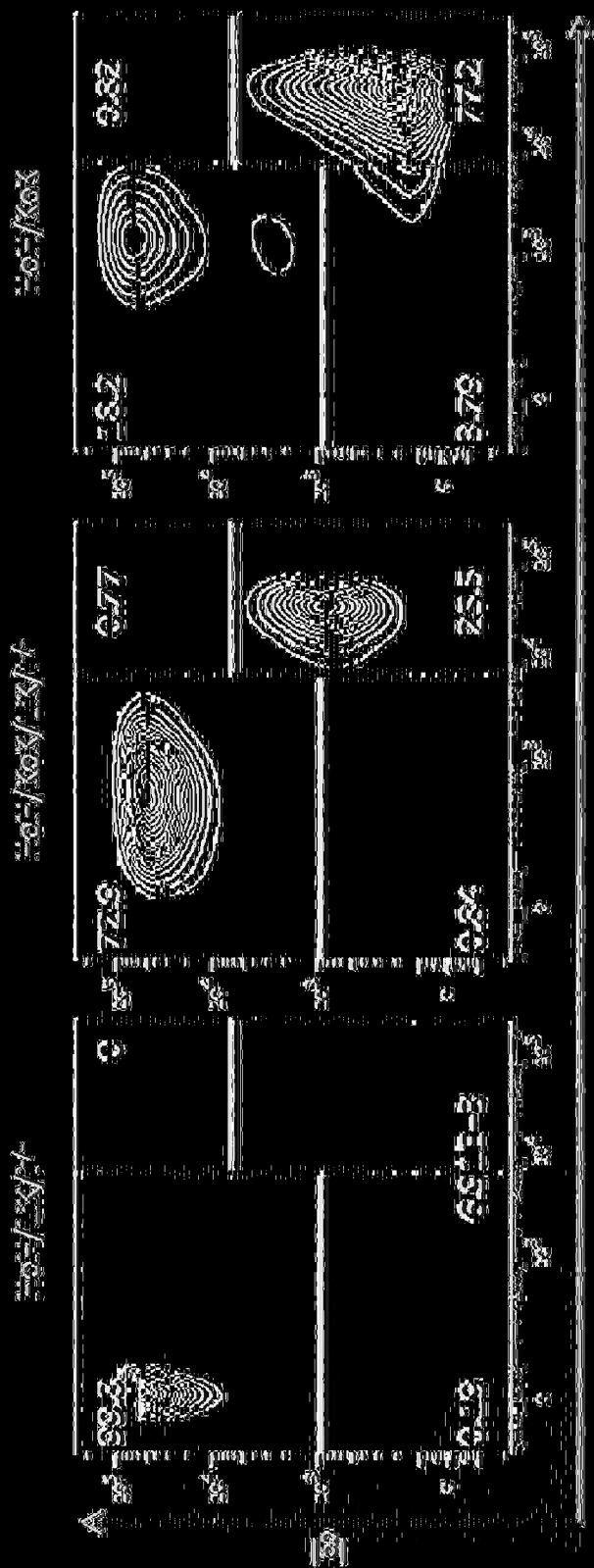
18

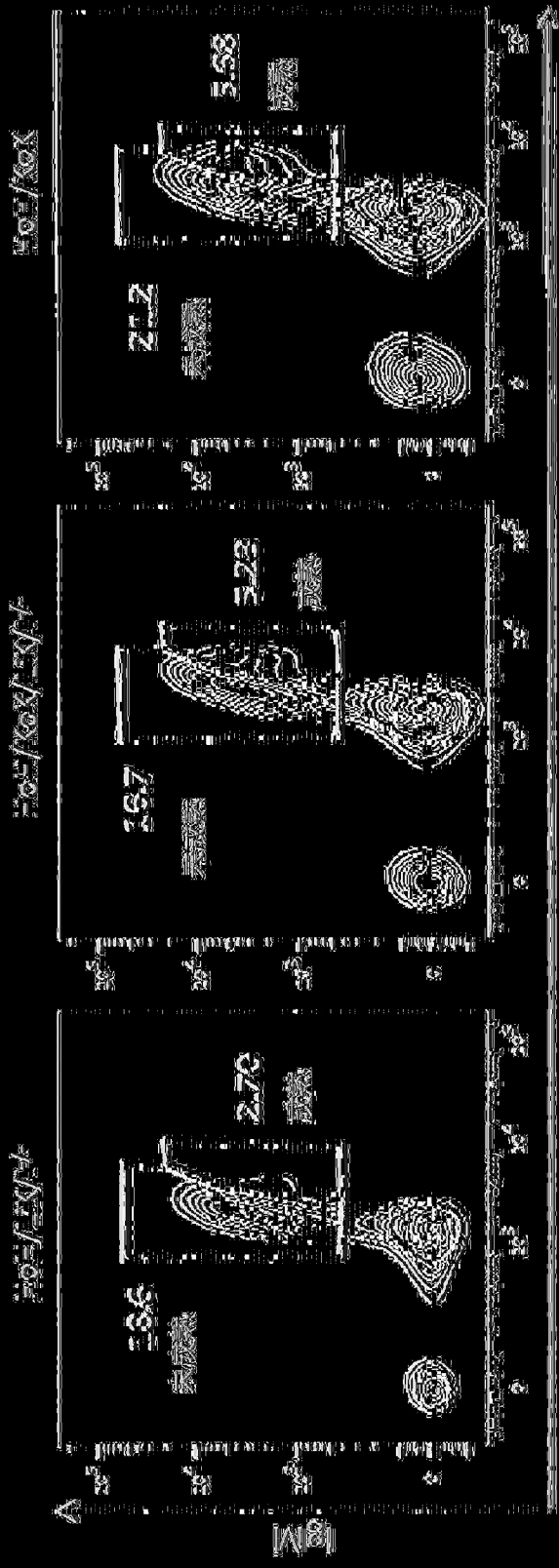
18

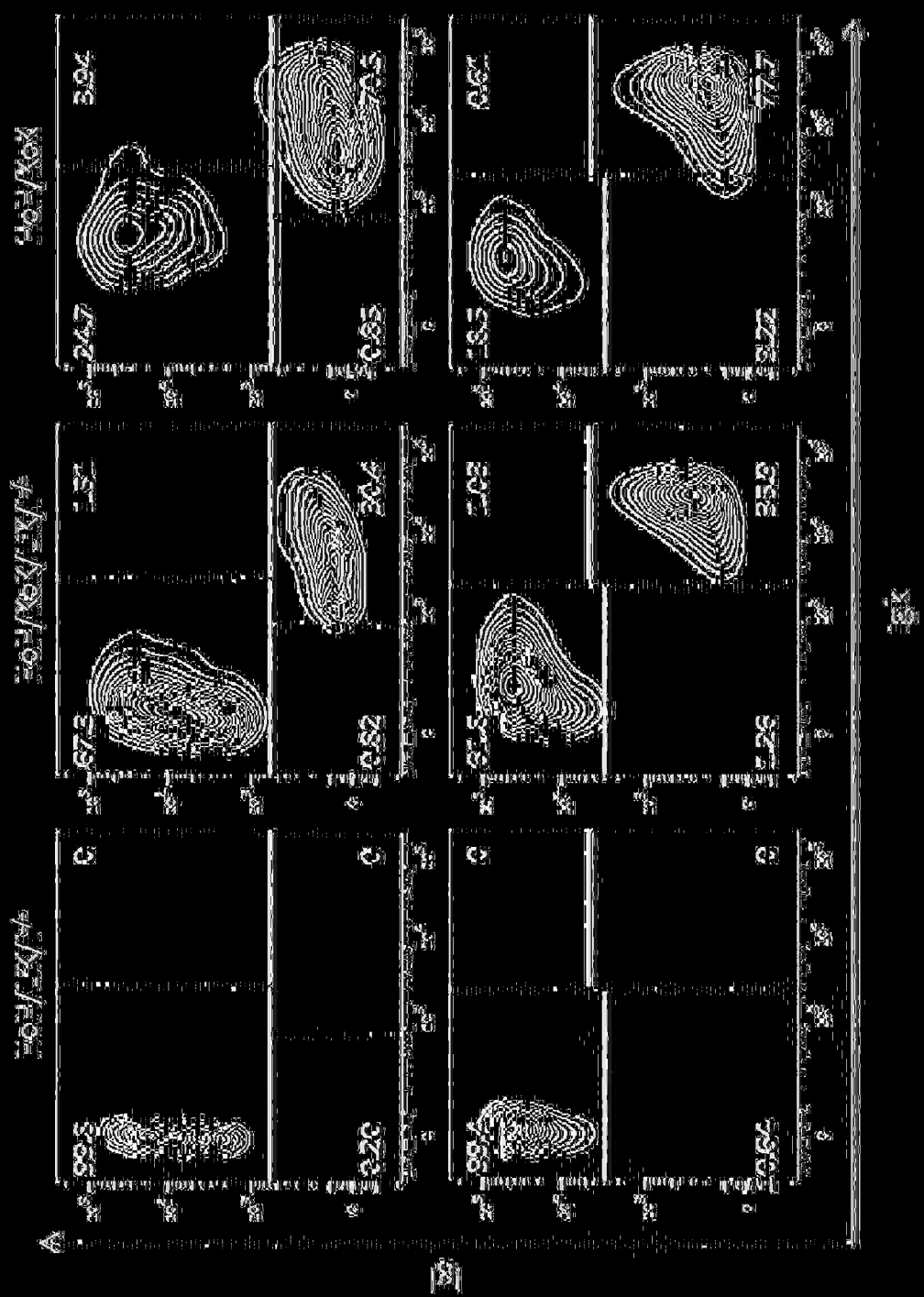
18

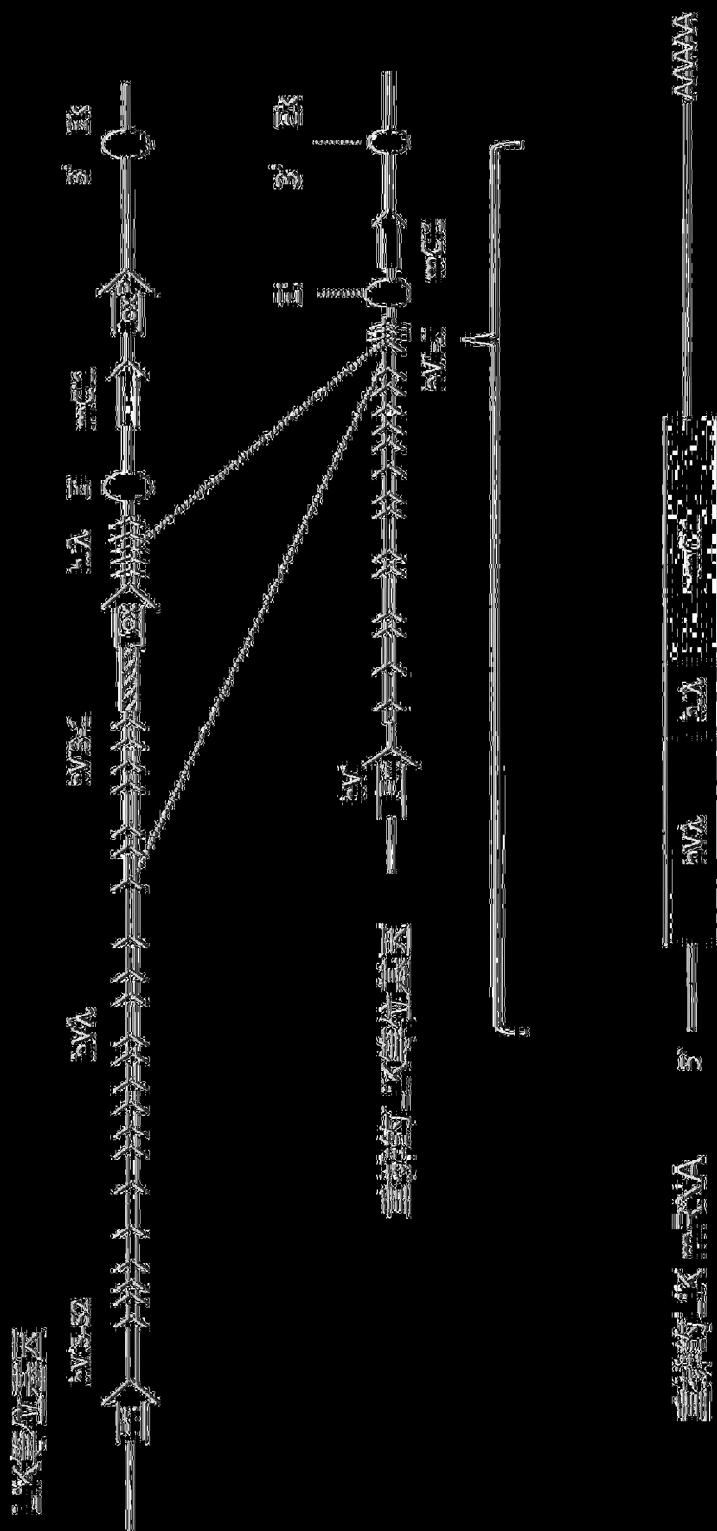
18

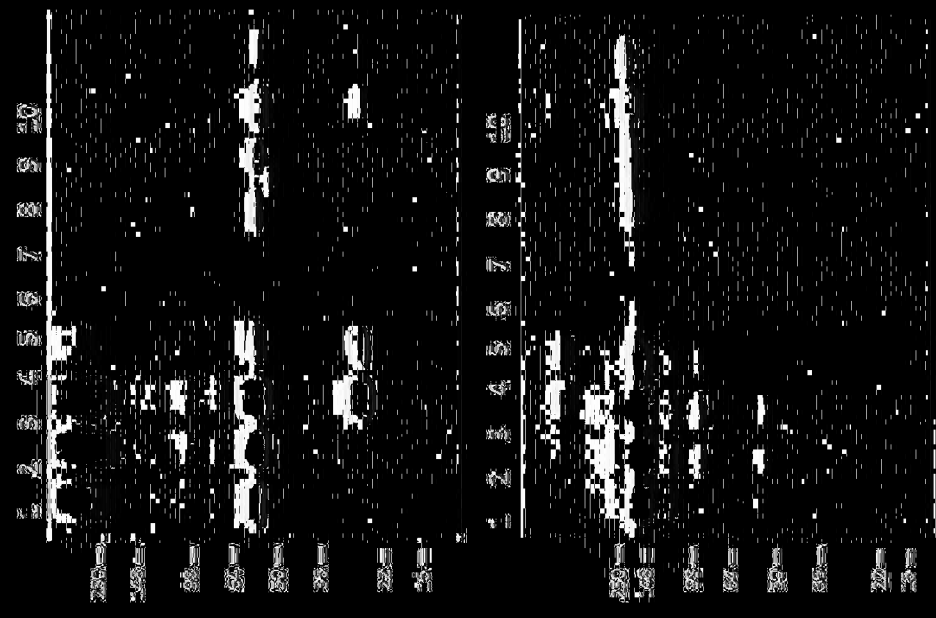




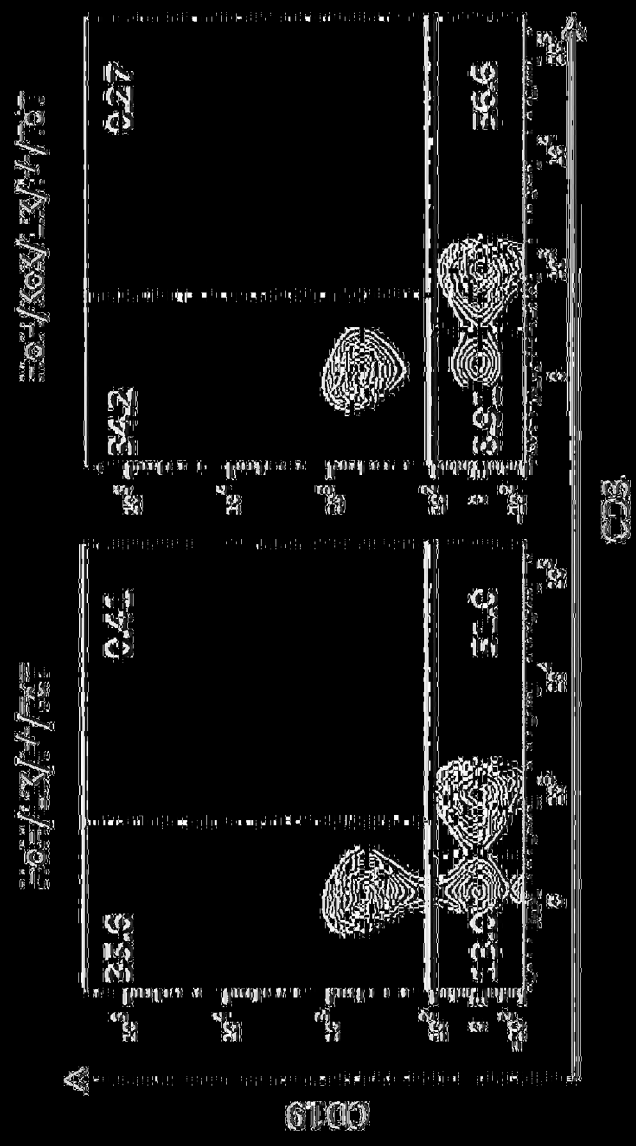


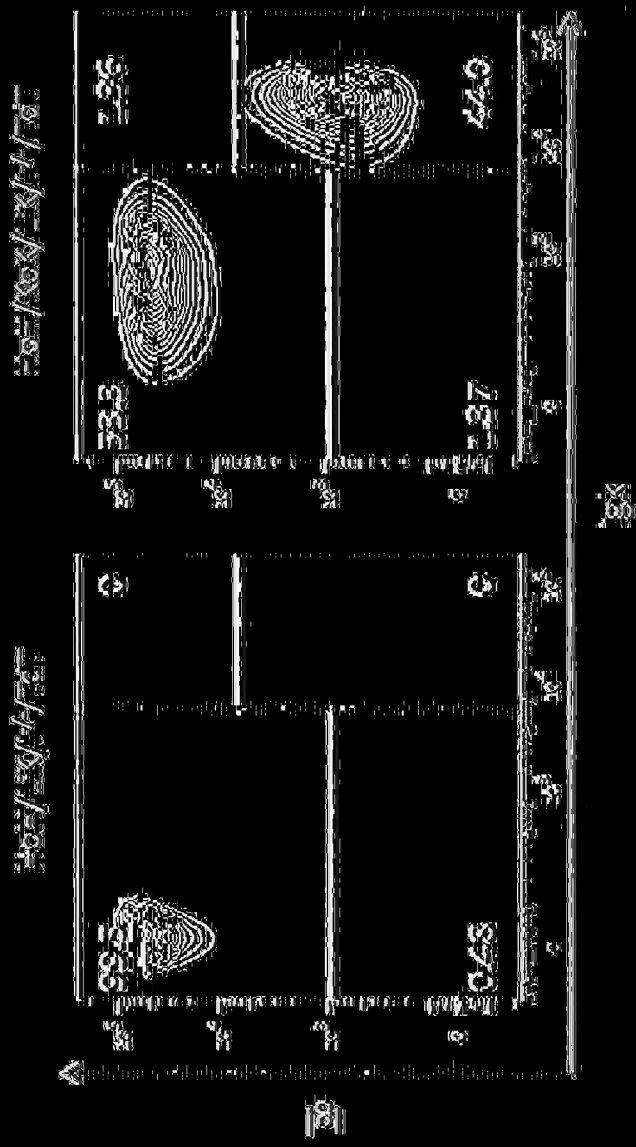




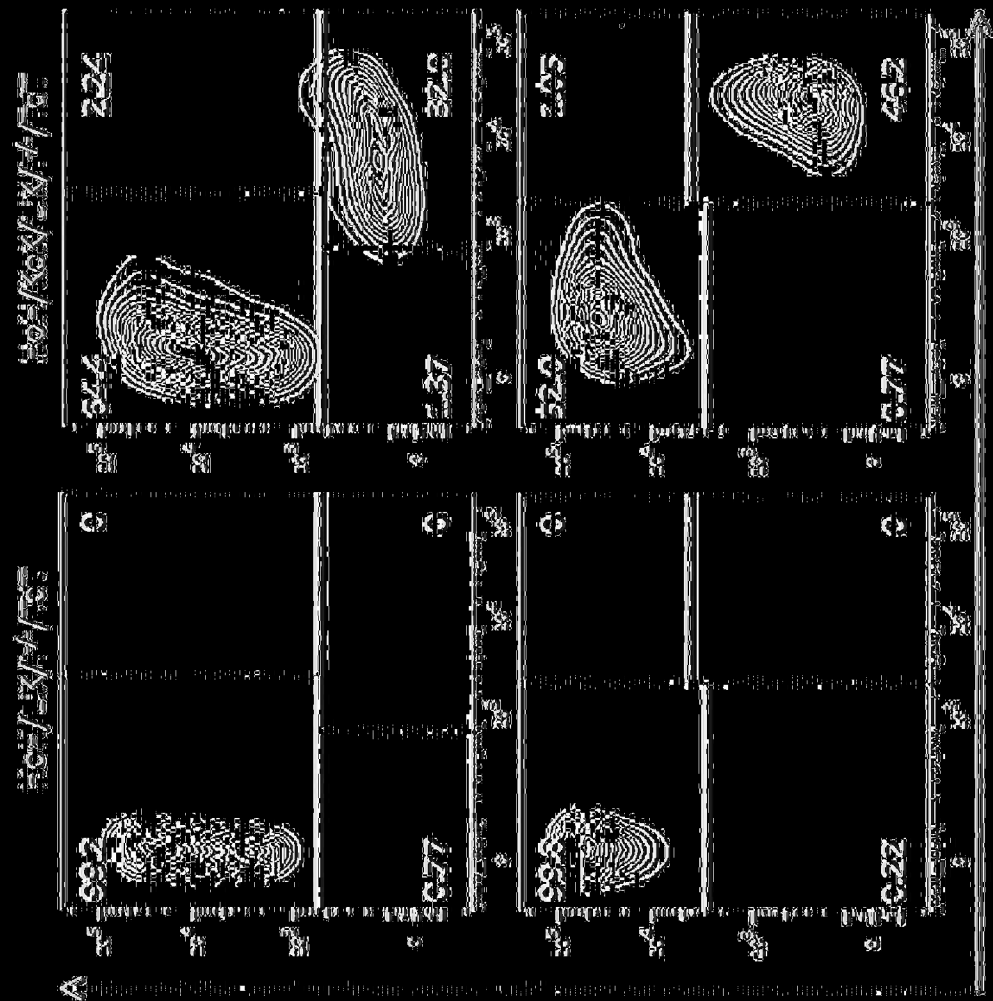


項目	単位	数量	金額
1	個	100	1000
2	個	200	2000
3	個	300	3000
4	個	400	4000
5	個	500	5000
6	個	600	6000
7	個	700	7000
8	個	800	8000
9	個	900	9000
10	個	1000	10000









38x

27

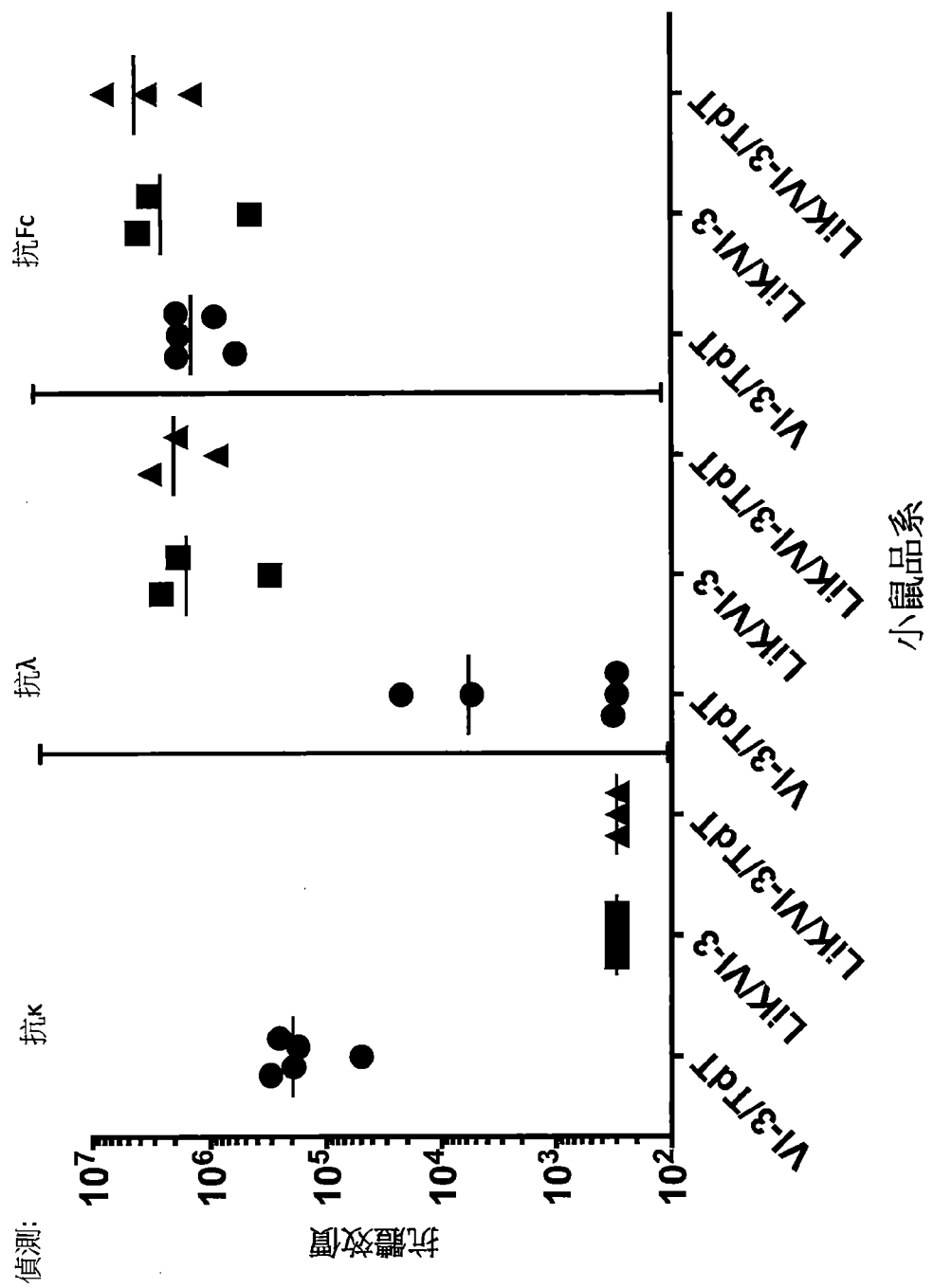
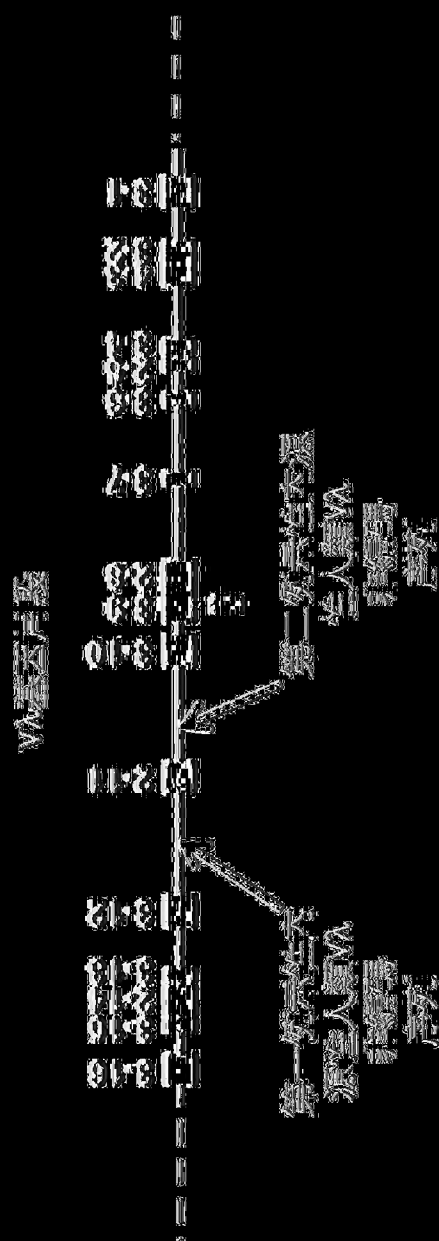


圖18



鄭分爲太源三人和人《金瓶梅本座》



部分約本源竺人環經鑑基天座

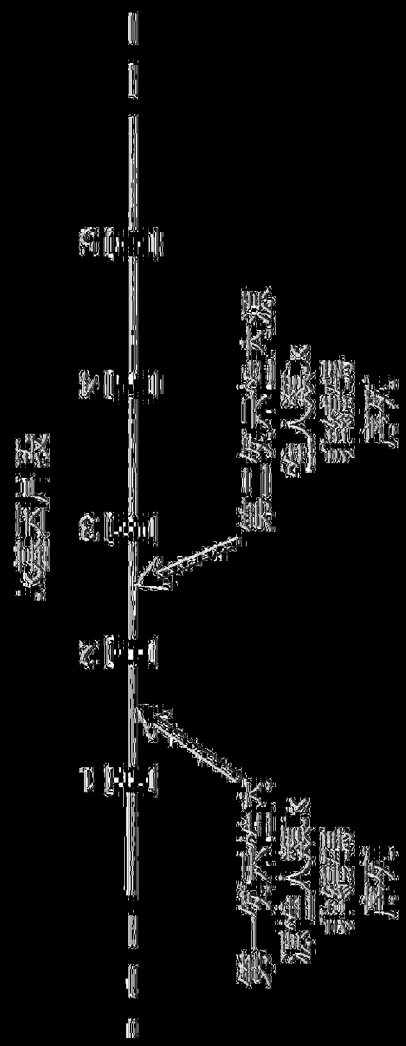


圖22