



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3629720 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2022.05.02
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2022.01.19
(86)	European Application Nr.	19737613.0
(86)	European Filing Date	2019.06.14
(87)	The European Application's Publication Date	2020.04.08
(30)	Priority	2018.06.14, US, 201862685203 P 2018.07.23, US, 201862702206 P 2019.03.01, US, 201962812580 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72)	Inventor	MURPHY, Andrew J., c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, USA MACDONALD, Lynn, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, USA GUO, Chunguang, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, USA MCWHIRTER, John, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, USA VORONINA, Vera, c/o Regeneron Pharmaceuticals, Inc. 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54) Title **NON-HUMAN ANIMALS CAPABLE OF DH-DH REARRANGEMENT IN THE IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAIN CODING SEQUENCES**

(56) References
Cited: TUAILLON N & CAPRA J.D.: "VHD rearrangements in human immunoglobulin heavy chain minilocus transgenic mice", EUR. J. IMMUNOL., vol. 30, 2000, pages 2998-3005, XP002794629,
KOKUBU F ET AL: "Diverse organization of immunoglobulin VH gene loci in a primitive vertebrate", THE EMBO JOURNAL, vol. 7, no. 11, November 1988 (1988-11), pages 3413-3422,

XP002794628,
TAYLOR L.D. ET AL: "A transgenic mouse that expresses a diversity of human sequence heavy and light chain immunoglobulins", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 23, 11 December 1992 (1992-12-11), pages 6287-6295, XP002041128,
JUNG D. ET AL.: "Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus", ANNU. REV. IMMUNOL., vol. 24, 16 January 2006 (2006-01-16), pages 541-570, XP002794627,
MEEK K.D., HASEMAN C.A. & CAPRA J.D.: "Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus.", J. EXP. MED., vol. 170, July 1989 (1989-07), pages 39-57, XP002794630,

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Nukleotidmolekyl, omfattende en konstruert diversitetsregion av den tunge immunglobulinkjede (D_H) ("konstruert D_H -region"), omfattende:

- 5 (i) et konstruert D_H -gensegment, omfattende et D_H -gensegment umiddelbart naboliggende en 23-mer-RSS ("konstruert D_H -gensegment") og
- (ii) et ikke-rearrangert D_H -gensegment, flankert på sin 5'-side av en første 12-mer-RSS og på sin 3'-side av en andre 12-mer-RSS ("ikke-rearrangert D_H -gensegment"),
- 10 hvor (i) det konstruerte D_H -gensegment og (ii) det ikke-rearrangerte D_H -gensegment er operabelt koblet slik at (i) det konstruerte D_H -gensegment og (ii) det ikke-rearrangerte D_H -gensegment er i stand til å forbinde seg i en D_H - D_H -rekombinasjonshendelse ifølge 12/23-regelen,
- hvor nukleotidmolekylet egner seg for oppnåelse av gnagere som har den konstruerte D_H -region, og
- 15 valgfritt hvor den konstruerte D_H -region omfatter kun humane D_H -gensegmenter.

2. Nukleotidmolekyl ifølge krav 1, hvor nukleotidmolekylet videre omfatter:

- 20 (a) minst ett ikke-rearrangert variabelt gensegment av den tunge immunglobulinkjede (V_H) ("ikke-rearrangert V_H -gensegment") som er oppstrøms av og operabelt koblet til den konstruerte D_H -region;
- (b) minst ett ikke-rearrangert forbindende gensegment av den tunge immunglobulinkjede (J_H) ("ikke-rearrangert J_H -gensegment") som er nedstrøms av og operabelt koblet til den konstruerte D_H -region; eller
- 25 (c) en kombinasjon av (a) og (b).

3. Nukleotidmolekyl ifølge krav 2, hvor:

- (a) det minst ene ikke-rearrangerte V_H -gensegment omfatter et ikke-rearrangert humant V_H6-1 -gensegment, idet det minst ene ikke-rearrangerte
- 30 J_H -gensegment omfatter et ikke-rearrangert humant J_H6 -gensegment, eller en kombinasjon derav;

- (b) det minst ene ikke-rearrangerte J_H -gensegment omfatter et ikke-rearrangert humant J_{H4} -gensegment, et ikke-rearrangert J_{H5} -gensegment og et ikke-rearrangert humant J_{H6} -gensegment;
- (c) det minst ene ikke-rearrangerte J_H -gensegment omfatter et ikke-rearrangert humant J_{H1} -gensegment, et ikke-rearrangert humant J_{H2} -gensegment, et ikke-rearrangert humant J_{H3} -gensegment, et ikke-rearrangert humant J_{H4} -gensegment, et ikke-rearrangert humant J_{H5} -gensegment og et ikke-rearrangert humant J_{H6} -gensegment, valgfritt hvor det ikke-rearrangerte humane J_{H1} -gensegment, det ikke-rearrangerte humane J_{H2} -gensegment, det ikke-rearrangerte humane J_{H3} -gensegment, det ikke-rearrangerte humane J_{H4} -gensegment, det ikke-rearrangerte humane J_{H5} -gensegment og det ikke-rearrangerte humane J_{H6} -gensegment er i kimbanekonfigurasjon; og/eller
- (d) det minst ene ikke-rearrangerte V_H -gensegment omfatter det fullstendige repertoar av funksjonelle ikke-rearrangerte humane V_H -gensegmenter som strekker seg mellom og innbefatter et ikke-rearrangert humant V_{H3-74} -gensegment og et ikke-rearrangert humant V_{H1-6} -gensegment ("fullstendig repertoar av funksjonelle ikke-rearrangerte humane V_H -gensegmenter"), valgfritt hvor det fullstendige repertoar av funksjonelle ikke-rearrangerte humane V_H -gensegmenter er i kimbanekonfigurasjon.

4. Nukleotidmolekyl ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor:

- (a) nukleotidmolekylet videre omfatter ett eller flere funksjonelle gnager-Adam6-gener, valgfritt hvor det ene eller de flere funksjonelle gnager-Adam6-gener er anordnet mellom et humant V_{H1-2} -gensegment og et humant V_{H6-1} -gensegment og/eller erstatter et humant Adam6-gen;
- (b) det konstruerte D_H -gensegment omfatter 23-mer-RSS-en umiddelbart naboliggende 5'-enden av D_H -gensegmentet;
- (c) det konstruerte D_H -gensegment omfatter 23-mer-RSS-en umiddelbart naboliggende 3'-enden av D_H -gensegmentet;
- (d) det konstruerte D_H -gensegment omfatter:

- (i) et humant D_H3 -3-gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en, valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 5'-enden av D_H3 -3-gensegmentet;
- 5 (ii) et humant D_H2 -2-gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en, valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 3'-enden av D_H2 -2-gensegmentet;
- (iii) et humant D_H2 -8-gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en, valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 3'-enden av D_H2 -8-gensegmentet;
- 10 (iv) et humant D_H2 -15-gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en, valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 3'-enden av D_H2 -15-gensegmentet; eller
- (v) en hvilken som helst kombinasjon av (i)-(iv);
- (e) nukleotidmolekylet omfatter nukleotidsekvensen ifølge SEQ ID NO:52
- 15 eller omfatter nukleotidsekvensen ifølge SEQ ID NO:61;
- (f) nukleotidmolekylet omfatter nukleotidsekvensen ifølge SEQ ID NO:70;
- (g) nukleotidmolekylet omfatter nukleotidsekvensen ifølge SEQ ID NO:71; og/eller
- (h) nukleotidmolekylet omfatter nukleotidsekvensen ifølge SEQ ID NO:72.

20

5. Nukleotidmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, omfattende i operabel forbindelse fra 5' til 3':

- (a) minst ett ikke-rearrangert humant V_H -gensegment,
- (b) den konstruerte D_H -region, hvor det konstruerte D_H -gensegment omfatter
- 25 et humant D_H3 -3-gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en, hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 5'-enden av det humane D_H3 -3-gensegment, og
- (c) minst ett ikke-rearrangert humant J_H -gensegment.

30 **6.** Nukleotidmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, omfattende i operabel forbindelse fra 5' til 3':

- (a) minst ett ikke-rearrangert humant V_H -gensegment,

(b) den konstruerte D_H -region, hvor det konstruerte D_H -gensegment omfatter et humant D_{H2} -gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en, hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 3'-enden av det humane D_{H2} -gensegment, valgfritt hvor:

- 5 (i) det konstruerte D_H -gensegment omfatter et humant D_{H2-2} -gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS;
- (ii) det konstruerte D_H -gensegment omfatter et humant D_{H2-8} -gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS;
- 10 (iii) det konstruerte D_H -gensegment omfatter et humant D_{H2-15} -gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS; eller
- (iv) en hvilken som helst kombinasjon derav, og
- (c) minst ett ikke-rearrangert humant J_H -gensegment.

7. Nukleotidmolekyl ifølge krav 5 eller krav 6, hvor:

- 15 (a) det minst ene ikke-rearrangerte humane V_H -gensegment omfatter fra 5' til 3' et ikke-rearrangert humant V_{H1-2} -gensegment og et ikke-rearrangert humant V_{H6-1} -gensegment, hvor nukleotidet videre omfatter ett eller flere funksjonelle gnager-Adam6-gener mellom det ikke-rearrangerte humane V_{H1-2} -gensegment og det ikke-rearrangerte humane V_{H6-1} -gensegment, og
- 20 hvor det ikke-rearrangerte humane V_{H1-2} -gensegment, det ene eller de flere funksjonelle gnager-Adam6-gener og det ikke-rearrangerte humane V_{H6-1} -gensegment er sammenhengende;
- (b) det minst ene ikke-rearrangerte humane V_H -gensegment omfatter det fullstendige repertoar av funksjonelle ikke-rearrangerte humane V_H -gensegmenter, valgfritt hvor det fullstendige repertoar av funksjonelle ikke-
- 25 rearrangerte humane V_H -gensegmenter er i kimbanekonfigurasjon; og/eller
- (c) det minst ene ikke-rearrangerte humane J_H -gensegment omfatter et ikke-rearrangert humant J_{H6} -gensegment, valgfritt hvor:
- (i) det minst ene ikke-rearrangerte humane J_H -gensegment omfatter et ikke-
- 30 rearrangert humant J_{H4} -gensegment, et ikke-rearrangert J_{H5} -gensegment og det ikke-rearrangerte humane J_{H6} -gensegment; og/eller
- (ii) hvor det minst ene ikke-rearrangerte humane J_H -gensegment omfatter et ikke-rearrangert humant J_{H1} -gensegment, et ikke-rearrangert humant J_{H2} -

gensegment, et ikke-rearrangert humant J_H3-gensegment, et ikke-rearrangert humant J_H4-gensegment, et ikke-rearrangert humant J_H5-gensegment og et ikke-rearrangert humant J_H6-gensegment, videre valgfritt hvor det ikke-rearrangerte humane J_H1-gensegment, det ikke-rearrangerte J_H2-gensegment, det ikke-rearrangerte J_H3-gensegment, det ikke-rearrangerte J_H4-gensegment, det ikke-rearrangerte J_H5-gensegment og det ikke-rearrangerte J_H6-gensegment er i kimbanekonfigurasjon.

8. Nukleotidmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, som videre omfatter:

- 10 (a) på sin 3'-ende, en konstant region av den tunge immunglobulinkjede (C_H) eller et avsnitt derav;
- (b) på sin 3'-ende, en gnager C_H-region eller et avsnitt derav;
- (c) på sin 3'-ende, en gnager-C_H-region eller et avsnitt derav, omfattende en intronisk gnager-forsterkerregion og et gnager-IgM-gen; og/eller
- 15 (d) en legemiddelutvalgskassetten som befinner seg oppstrøms av det konstruerte D_H-gensegment, valgfritt hvor legemiddelutvalgskassetten er flankert av ett eller flere stedsspesifikke rekombinasjonssteder.

9. Målvektor, omfattende et nukleotidmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene

- 20 1-8, omfattende 5'- og 3'-homologiarmen som er konfigurert til å tillate homolog rekombinasjon med en sekvens av den tunge immunglobulinkjede på et endogent locus av den tunge immunglobulinkjede av en gnager, valgfritt hvor sekvensen av den tunge immunglobulinkjede omfatter en human eller humanisert variabel region av den tunge immunglobulinkjede.

25

10. Fremgangsmåte for modifisering av en variabel region av den tunge immunglobulinkjede for å konstruere D_H-D_H-rekombinasjon, idet fremgangsmåten omfatter:

- 30 (a) å oppnå en sekvens av den variable kjede av den tunge immunglobulinkjede, omfattende en D_H-region, omfattende ett eller flere ikke-rearrangerte D_H-gensegmenter, hvorav hvert ikke-rearrangerte D_H-gensegment er flankert på sin 5'-side av en første 12-mer-RSS og på sin 3'-side av en andre 12-mer-RSS,

valgfritt hvor det ene eller de flere ikke-rearrangerte D_H -gensegmenter omfatter minst ett ikke-rearrangert humant D_H -gensegment, videre valgfritt hvor det minst ene ikke-rearrangerte humane D_H -gensegment omfatter alle de funksjonelle humane D_H -gensegmenter som strekker seg mellom og innbefatter et ikke-rearrangert humant D_{H1-1} -gensegment og et ikke-rearrangert humant D_{H7-27} -gensegment, valgfritt hvor alle de funksjonelle humane D_H -gensegmenter er i kimbanekonfigurasjon, og

(b) å konstruere D_H -regionen til videre å omfatte minst ett konstruert D_H -gensegment, hvor det konstruerte D_H -gensegment omfatter et D_H -gensegment umiddelbart naboliggende en 23-mer-RSS, hvor, i den resulterende konstruerte D_H -region, er det konstruerte D_H -gensegment og minst ett av det ene eller de flere ikke-rearrangerte D_H -gensegmenter operabelt koblet og i stand til å ta del i en D_H - D_H -rekombinasjonshendelse ifølge 12/23-regelen,

valgfritt hvor den resulterende konstruerte D_H -region omfatter kun humane D_H -gensegmenter.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvor D_H -regionen ifølge krav 10(a) omfatter to eller flere ikke-rearrangerte D_H -gensegmenter, hvorav hvert er flankert på sin 5'-side av en første 12-mer-RSS og på sin 3'-side av en andre 12-mer-RSS, og hvor konstruering omfatter

(a) å erstatte minst ett av de to eller flere ikke-rearrangerte D_H -gensegmenter med det konstruerte D_H -gensegment som definert i krav 10(b),

(b) å erstatte den første 12-mer-RSS eller den andre 12-mer-RSS av minst ett av de to eller flere ikke-rearrangerte D_H -gensegmenter med en 23-mer-RSS, eller

(c) en kombinasjon av (a) og (b), valgfritt hvor sekvensen av den variable kjede av den tunge immunglobulinkjede videre omfatter en J_H -region, omfattende minst ett ikke-rearrangert J_H -gensegment, hvor J_H -regionen er operabelt koblet til D_H -regionen, og

hvor å erstatte minst ett av de to eller flere ikke-rearrangerte D_H -
 gensegmenter med det konstruerte D_H -gensegment som definert i krav 10(b),
 omfatter å deletere det minst ene ikke-rearrangerte J_H -gensegment,
 videre valgfritt hvor J_H -regionen omfatter et fullstendig repertoar av humane
 5 kimbane- J_H -gensegmenter, omfattende et ikke-rearrangert humant J_{H1} -
 gensegment, et ikke rearrangert humant J_{H2} -gensegment, et ikke-
 rearrangert humant J_{H3} -gensegment, et ikke-rearrangert humant J_{H4} -
 gensegment, et ikke-rearrangert humant J_{H5} -gensegment og et ikke-
 rearrangert humant J_{H6} -gensegment, valgfritt hvor det ikke-rearrangerte
 10 humane J_{H1} -gensegment, det ikke-rearrangerte humane J_{H2} -gensegment,
 det ikke-rearrangerte humane J_{H3} -gensegment, det ikke-rearrangerte
 humane J_{H4} -gensegment, det ikke-rearrangerte humane J_{H5} -gensegment
 og det ikke-rearrangerte humane J_{H6} -gensegment er i
 kimbanekonfigurasjon, og
 15 hvor å deletere minst ett kimbane- J_H -gensegment omfatter å deletere det
 ikke-rearrangerte humane J_{H1} -gensegment, det ikke-rearrangerte humane
 J_{H2} -gensegment og det ikke-rearrangerte humane J_{H3} -gensegment, og
 valgfritt videre å deletere det ikke-rearrangerte humane J_{H4} -gensegment og
 det ikke-rearrangerte humane J_{H5} -gensegment.

20

12. Fremgangsmåte ifølge krav 10 eller 11, hvor:

- (a) det konstruerte D_H -gensegment ifølge krav 10(b) omfatter
 (i) et humant D_{H3-3} -gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en,
 valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 5'-enden av D_{H3-3} -
 25 3-gensegmentet,
 (ii) et humant D_{H2-2} -gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en,
 valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 3'-enden av D_{H2-2} -
 2-gensegmentet,
 (iii) et humant D_{H2-8} -gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-
 30 en, valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 3'-enden av
 D_{H2-8} -gensegmentet,

- (iv) et humant D_H2-15-gensegment umiddelbart naboliggende 23-mer-RSS-en, valgfritt hvor 23-mer-RSS-en er umiddelbart naboliggende 3'-enden av D_H2-15-gensegmentet, eller
- (v) en hvilken som helst kombinasjon av (i)-(iv);
- 5 (b) konstruering omfatter å erstatte det mest 3' ikke-rearrangerte D_H-gensegment av D_H-regionen som definert i krav 10(a), med det konstruerte D_H-gensegment som definert i krav 10(b); og/eller
- (c) konstruering omfatter å erstatte minst ett av det ene eller de flere ikke-rearrangerte D_H-gensegmenter som svarer til det konstruerte D_H-gensegment som definert i krav 10(b), med det konstruerte D_H-gensegment
- 10 som definert i krav 10(b).

13. Locus av den tunge immunoglobulinkjede, omfattende nukleotidmolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, målvektoren ifølge krav 9 eller den variable

15 region av den tunge immunoglobulinkjede, modifisert ifølge fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10-12.

14. Gnagergenom, omfattende nukleotidmolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, målvektoren ifølge krav 9, den variable region av den tunge

20 immunoglobulinkjede modifisert ifølge fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10-12, eller locuset av den tunge immunoglobulinkjede ifølge krav 13, hvor gnagergenomet valgfritt er et gnager-kimbanegenom.

15. Gnagergenom ifølge krav 14, hvor gnagergenomet omfatter en variabel region

25 av den tunge immunoglobulinkjede som omfatter:

- (a) ikke-rearrangerte V_H-gensegmenter,
- (b) den konstruerte D_H-region, valgfritt hvor den konstruerte D_H-region omfatter kun humane D_H-gensegmenter; og
- (c) ikke-rearrangerte J_H-gensegmenter,
- 30 hvor (a)-(c) er i operabel kobling slik at, ved rekombinasjon, omfatter den variable region av den tunge immunoglobulinkjede en rearrangert sekvens av den variable region av den tunge kjede, som koder for et variabelt domene av den tunge immunoglobulinkjede, valgfritt hvor den rearrangerte sekvens av

den variable region av den tunge kjede tildannes etter en $V_H(D_H-D_H)J_H$ -rekombinasjonshendelse,

valgfritt hvor:

- 5 (aa) det konstruerte D_H -gensegment omfatter et D_H -segment umiddelbart naboliggende en 3' 23-mer-RSS;
- (bb) de konstruerte D_H -gensegmenter omfatter et D_H -gensegment umiddelbart naboliggende en 5' 23-mer RSS;
- 10 (cc) den variable region av den tunge immunglobulinkjede er en human variabel region av den tunge immunglobulinkjede, omfattende kun humane V_H -gensegmenter, humane D_H -gensegmenter og humane J_H -gensegmenter, valgfritt hvor den humane variable region av den tunge immunglobulinkjede er operabelt koblet til en C_H -region, videre valgfritt hvor C_H -regionen er en endogen C_H -region, valgfritt på et endogent locus av den tunge immunglobulinkjede;
- 15 (dd) de ikke-rearrangerte humane V_H -gensegmenter omfatter det fullstendige repertoar av funksjonelle ikke-rearrangerte humane V_H -gensegmenter, valgfritt hvor det fullstendige repertoar av funksjonelle ikke-rearrangerte humane V_H -gensegmenter er i kimbanekonfigurasjon;
- (ee) de ikke-rearrangerte J_H -gensegmenter omfatter et humant J_H6 -gensegment; og/eller
- 20 (ff) (i) gnagergenomet mangler et endogent Adam6-gen; eller (ii) gnagergenomet videre omfatter ett eller flere gnager-Adam6-gener, valgfritt hvor:
- det ene eller de flere gnager-Adam6-gener omfatter et endogent gnager-Adam6-gen;
- 25 det ene eller de flere gnager-Adam6-gener innsettes mellom to humane V_H -gensegmenter, valgfritt hvor det ene eller de flere gnager-Adam6-gener innsettes mellom et ikke-rearrangert humant V_H1-2 -gensegment og et ikke-rearrangert humant V_H6-1 -gensegment
- 30 det ene eller de flere gnager-Adam6-gener innsettes i stedet for et humant Adam6-pseudogen; og/eller

det ene eller de flere gnager-Adam6-gener innsettes mellom et ikke-rearrangert humant V_H-gensegment og et ikke-rearrangert humant D_H-gensegment.

- 5 **16.** Gnagergenom ifølge krav 14 eller 15, hvor:
- (a) gnagergenomet videre omfatter et terminalt deoksynukleotidyltransferasegen;
- (b) gnagergenomet er **karakterisert ved at** det er homozygot for den konstruerte D_H-region eller gnagergenomet er **karakterisert ved at** det er
- 10 heterozygot for den konstruerte D_H-region; og/eller
- (c) gnagergenomet er et rottegenom eller et musgenom.
- 17.** Gnagercelle som omfatter gnagergenomet ifølge et hvilket som helst av kravene 14 til 16, valgfritt hvor gnagercellen er en rottecelle eller en musecelle.
- 15 **18.** Gnagercelle ifølge krav 17, hvor gnagercellen er en embryonal gnager-stamcelle.
- 19.** Gnager, oppnådd fra den embryonale gnager-stamcelle ifølge krav 18, hvor
- 20 gnageren omfatter gnagergenomet i sin kimbane.
- 20.** Gnager ifølge krav 19, hvor:
- (a) gnageren videre omfatter et somatisk genom som omfatter en kodingssekvens av en rearrangert tung kjede V_H(D_HA-D_HB)J_H,
- 25 valgfritt hvor kodingssekvensen av den rearrangerte tunge kjede V_H(D_HA-D_HB)J_H er operabelt koblet til en gensekvens av en konstant IgM-region og/eller hvor D_HA eller D_HB er avledet fra det konstruerte D_H-gensegment eller et avsnitt derav, og minst 9 basepar av D_HA eller D_HB er identisk med minst 9 basepar av det konstruerte D_H-gensegment; og/eller
- 30 (b) minst 95% av alle rearrangerte VDJ-kodingssekvenser av den tunge kjede i gnageren har en CDR3-lengde på minst 10 aminosyrer, valgfritt hvor minst 70% av alle rearrangerte VDJ-gensekvenser av den tunge kjede i gnageren har en CDR3-lengde på minst 11 aminosyrer, valgfritt hvor minst

15% av alle rearrangerte VDJ-gensekvenser av den tunge kjede i gnageren har en CDR3-lengde på minst 14 aminosyrer, videre valgfritt **karakterisert ved at** gnageren utviser minst en 3-foldig forhøyet frekvens av D_H - D_H -rekombinasjon sammenlignet med frekvensen av D_H - D_H -rekombinasjon i en referansegnager.

21. Fremgangsmåte for fremstilling av en gnager, hvis genom omfatter en konstruert D_H -region, idet fremgangsmåten omfatter:

- (A) å generere gnageren fra den embryonale stamcelle ifølge krav 18, eller
- (B)
- (a) å modifisere genomet av en embryonal gnager-stamcelle til å omfatte et DNA-fragment omfattende ett eller flere konstruerte D_H -gensegmenter, idet hvert omfatter et D_H -gensegment umiddelbart naboliggende en 23-mer-RSS, valgfritt hvor DNA-fragmentet omfatter nukleotidmolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, målvektoren ifølge krav 9, den variable region av den tunge immunoglobulinkjede, modifisert ifølge fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 10-12, eller den tunge immunoglobulinkjede ifølge krav 13, og
- (b) å oppnå gnageren under anvendelse av den modifiserte embryonale gnager-stamcelle fra (B)(a).

22. Fremgangsmåte ifølge krav 21, hvor gnageren er en rotte eller en mus.

23. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff eller oppnåelse av en nukleinsyre som koder for samme, idet fremgangsmåten omfatter

- å immunisere en gnager med et antigen, hvilken gnager omfatter et kimbanegenom som omfatter en konstruert D_H -region som omfatter ett eller flere konstruerte D_H -gensegmenter som hvert er umiddelbart naboliggende en 23-mer-RSS, valgfritt hvor gnageren er gnageren ifølge et hvilket som helst av kravene 19 til 20 eller fremstilt ifølge krav 21, og
- å tillate at gnageren danner en immunrespons på antigenet, innbefattende et antistoff, eller en nukleinsyre som koder for samme, som binder til antigenet, valgfritt hvor:

- (a) fremgangsmåten er en som videre omfatter å gjenvinne antistoffet eller nukleinsyren som koder for samme, fra gnageren eller en gnagercelle, hvor gnagercellen er en B-celle eller et hybridom;
- 5 (b) ett eller flere konstruerte D_H -gensegmenter som hvert er umiddelbart naboliggende en 23-mer-RSS, omfatter et D_H -gensegment som er operabelt koblet til en 5' 23-mer-RSS;
- (c) ett eller flere konstruerte D_H -gensegmenter som hvert er umiddelbart naboliggende en 23-mer-RSS, omfatter et D_H -gensegment som er operabelt koblet til en 3' 23-mer-RSS; og/eller
- 10 (d) gnageren er en rotte eller en mus.