



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0126871
(43) 공개일자 2015년11월13일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2013.01)
C07K 16/468 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7026152</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년09월22일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2014/026040</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/160202
국제공개일자 2014년10월02일</p> <p>(30) 우선권주장
13/798,455 2013년03월13일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777</p> <p>(72) 발명자
밥 로버트
미국 뉴저지 07661 리버 엡지 부르히스 아베뉴 292
맥휘터 존
미국 뉴욕 10591 테리타운 크레센트 드라이브 2152
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
송봉식, 정삼영</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 **제한된 면역글로블린 경쇄 레퍼토리를 발현하는 마우스**

(57) 요약

유전자 변형된 마우스가 제공되며, 이때 마우스는 제한된 수의 경쇄 가변 도메인들을 가지는 것을 특징으로 하는 면역글로블린 경쇄 레퍼토리를 발현한다. 마우스에 의해 발현된 면역글로블린 경쇄가 2개의 인간 경쇄 가변 유전자 절편 중 하나를 포함하도록 선택된 2개의 인간 경쇄 가변 유전자 절편을 제공하는 마우스가 제공된다. 본원에 기술된 것과 같은 마우스를 사용하여 보편적 경쇄를 가지는 이종특이성 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 다중 특이성 결합 단백질, 예컨대 이종특이성 항체에 사용하기에 적당한 인간 가변 영역들의 제조 방법, 및 숙주 세포가 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/01 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

맥도날드 린

미국 뉴욕 10605 화이트 플레인즈 제드니 웨이 16

스티븐스 션

미국 캘리포니아 92122 산디에고 카미노 칼마 3954

데이비스 사무엘

미국 뉴욕 10024 뉴욕 웨스트 88 스트리트 332 아
파트먼트 비2

버클러 데이빗 알.

미국 뉴저지 07930 체스터 에릭 코트 6

머허 카롤리나 에이.

미국 뉴욕 10591 테리타운 처치 스트리트 14 2층

머피 앤드류 제이.

미국 뉴욕 10520 크로톤-온-허드슨 뉴턴 코트 10

명세서

청구범위

청구항 1

면역글로불린 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 2개의 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편 및 2개 이상의 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편, 이때 2개의 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편은 인간 V_{K1-39} 유전자 절편 및 인간 V_{K3-20} 유전자 절편이고, 2개 이상의 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편은 인간 J_{K1} , J_{K2} , J_{K3} , J_{K4} 및 J_{K5} 로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개의 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편 및 2개 이상의 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편; 및

비-인간 면역글로불린 불변 영역에 작동가능하게 연결된 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린 V_H , 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린 D_H 및 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린 J_H 유전자 절편을 포함하는 마우스로서,

인간 유전자 절편들은 항체의 인간 가변 도메인들을 재배열 및 코드화할 수 있고, 나아가 마우스는 면역글로불린 경쇄를 형성하기 위하여 재배열할 수 있는 내인성 면역글로불린 V_L 유전자 절편을 포함하지 않는 마우스.

청구항 2

제 1항에 있어서, 2개의 인간 V_L 유전자 절편 및 2개 이상의 인간 J_L 유전자 절편은 마우스 또는 쥐 면역글로불린 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결되는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 3

제 2항에 있어서, 경쇄 불변 영역은 쥐 C_K 영역인 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 4

제 2항에 있어서, 경쇄 불변 영역은 마우스 C_K 영역인 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 5개의 인간 J_L 유전자 절편을 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 6

제 5항에 있어서, 5개의 인간 J_L 유전자 절편은 인간 J_{K1} , J_{K2} , J_{K3} , J_{K4} 및 J_{K5} 인 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 2개의 인간 V_L 유전자 절편 및 2개 이상의 인간 J_L 유전자 절편은 내인성 경쇄 유전자좌에 존재하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 인간 V_H , 하나 또는 그 이상의 인간 D_H 및 하나 또는 그 이상의 인간 J_H 유전자 절편은 마우스 불변 영역에 작동가능하게 연결되는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 기능성 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하

는 마우스.

청구항 10

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 비기능성 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스 또는 쥐 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결되는 2개의 인간 V_L 유전자 절편 및 2개 이상의 인간 J_L 유전자 절편은 차례로, 인간 $V_{\kappa}1-39$ 유전자 절편 및 인간 $V_{\kappa}3-20$ 유전자 절편인 2개의 인간 V_{κ} 절편과, 인간 $J_{\kappa}1$, $J_{\kappa}2$, $J_{\kappa}3$, $J_{\kappa}4$ 및 $J_{\kappa}5$ 를 포함하는 유전자좌에 존재하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 도 9의 DLC-5J 유전자좌를 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD19^+$, $CD43^+$, $c-kit^+$ 발현을 특징으로 하는 프로 B 세포 집단을 약 2.5×10^4 내지 약 1.5×10^5 세포의 범위 내에서 골수에 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD19^+$, $CD43^-$, $c-kit^-$ 발현을 특징으로 하는 프레 B 세포 집단을 약 1×10^6 내지 약 2×10^6 세포의 범위 내에서 골수에 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 IgM^+ , $B220^{int}$ 발현을 특징으로 하는 미성숙 B 세포 집단을 약 5×10^5 내지 약 7×10^5 세포의 범위 내에서 골수에 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 IgM^+ , $B220^{hi}$ 발현을 특징으로 하는 성숙한 B 세포 집단을 약 3×10^4 내지 약 1.5×10^5 세포의 범위 내에서 골수에 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD19^+$ B 세포 집단을 약 1×10^6 내지 약 3×10^6 세포의 범위 내에서 골수에 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 18

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD19^+$ 비장 B 세포 집단을 약 2×10^6 내지 약 7×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 19

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD19^+$, IgD^{hi} , IgM^{lo} 비장 B 세포 집단을 약 1×10^6 내지 약 4×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 20

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD19^+$, IgD^{lo} , IgM^{hi} 비장 B 세포 집단을 약 9×10^5 내지 약 2×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD93^+$ $B220^+$ IgM^{hi} $CD23^-$ 발현을 특징으로 하는 이행 T1 비장 B 세포 집단을 약 2×10^6 내지 약 7×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD93^+$ $B220^+$ IgM^{hi} $CD23^+$ 발현을 특징으로 하는 이행 T2 비장 B 세포 집단을 약 1×10^6 내지 약 7×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 23

제 1항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD93^+$ $B220^+$ IgM^{lo} $CD23^+$ 발현을 특징으로 하는 이행 T3 비장 B 세포 집단을 약 1×10^6 내지 약 4×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 24

제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD93^-$ $B220^+$ IgM^{hi} $CD21/35^{hi}$ $CD23^-$ 발현을 특징으로 하는 변연부 비장 B 세포 집단을 약 1×10^6 내지 약 3×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 25

제 1항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD93^-$ $B220^+$ $CD21/35^{int}$ IgM^{lo} IgD^{hi} 발현을 특징으로 하는 낭포성 유형 1 (FO-I) 비장 B 세포 집단을 약 3×10^6 내지 약 1.5×10^7 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 26

제 1항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스는 $CD93^-$ $B220^+$ $CD21/35^{int}$ IgM^{int} IgD^{hi} 발현을 특징으로 하는 낭포성 유형 2 (FO-II) 비장 B 세포 집단을 약 1×10^6 내지 약 2×10^6 세포의 범위 내에서 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 27

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항의 마우스의 분리된 세포.

청구항 28

제 27항에 있어서, 세포는 배아 줄기 (ES) 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 29

제 28항의 ES 세포를 포함하는 마우스 배아.

청구항 30

제 27항에 있어서, 세포는 B 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 31

제 30항의 B 세포로 제조된 하이브리도마.

청구항 32

항체를 생성하거나 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 코드화하는 핵산을 확인하기 위해 사용되는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스의 용도.

청구항 33

관심의 항원으로 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스를 면역시키는 단계,
 그 마우스로부터 면역글로불린 가변 영역 서열을 얻는 단계,
 그 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열을 사용하여 항원에 결합하는 항체를 제조하는 단계를 포함하는,
 관심의 항원에 결합하는 항체의 제조 방법.

청구항 34

제 33항에 있어서,
 단일 세포에서
 (a) 인간 C_H 유전자 서열과 융합되어 있는, 면역된 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스의 제 1 V_H 유전자 서열; 및
 (b) 인간 C_L 유전자 서열과 융합된 V_L 유전자 서열을 발현시키는 단계;
 전체 인간 항체를 발현하기에 충분한 조건하에서 그 단일 세포를 유지하는 단계; 및
 세포로부터 항체를 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 34항에 있어서, 세포는 면역된 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스의 제 2 V_H 유전자 서열을 포함하고, V_H 유전자 서열은 인간 C_H 유전자 서열과 융합되며, 제 1 V_H 유전자 서열은 제 1 에피토프를 인지하는 V_H 도메인을 코드화하고, 제 2 V_H 유전자 서열은 제 2 에피토프를 인지하는 V_H 도메인을 코드화하며, 이때 제 1 에피토프 및 제 2 에피토프는 동일하지 않고, 제 1 및 제 2 V_H 도메인은 V_L 유전자 서열에 의해 코드화된 V_L 도메인과 상호작용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

인간 이종특이성 항체를 제조하는 데 사용되는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스의 용도.

청구항 37

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스를 면역시키고, 그 마우스로부터의 B 세포의 인간 가변 영역 유전자 서열을 사용하여 이종특이성 항체를 제조하는 것을 포함하는 이종특이성 항체의 제조 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서,
 (a) 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스의 클론적으로 선택된 림프구를 확인하는 단계, 이때 마우스는 면역되어 관심의 항원에 대한 면역 반응을 발생시키는 것이 허용되며, 림프구는 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 단계;
 (b) 림프구 또는 항체로부터 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 인간 중쇄 가변 영역을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 얻는 단계; 및
 (c) 이종특이성 항체를 제조하는 데 (b)의 뉴클레오티드 서열을 사용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 38항에 있어서, 단계 (a)부터 (c)는 먼저 관심의 제 1 항원에 대해 수행되어 제 1 인간 중쇄 가변 영역 서열이 생성되고, 단계 (a)부터 (c)는 두 번째로 관심의 제 2 항원에 대해 수행되어 제 2 인간 중쇄 가변 영역 서열이 생성되며, 이때 제 1 인간 중쇄 가변 영역 서열은 제 1 인간 중쇄를 형성하기 위해 제 1 인간 중쇄 불변 영역과 융합되어 발현되고, 제 2 인간 중쇄 가변 영역 서열은 제 2 인간 중쇄를 형성하기 위해 제 1 인간 중쇄 불변 영역과 융합되어 발현되며, 제 1 및 제 2 인간 중쇄는 V_K1-39 또는 V_K3-20 유전자 절편으로부터 발현된 단일 인간 경쇄의 존재하에 발현되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제 39항에 있어서,

- (a) - 제 1 면역원으로 면역되어 있는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스; 및
 - 제 2 면역원으로 면역되어 있는 동일한 마우스 또는 유전적으로 동일한 상이한 마우스로부터 유래된 B 세포로부터의 가변 중쇄 영역을 클로닝하는 단계;
- (b) 세포에서 (a)의 가변 중쇄 영역을 동일한 중쇄 불변 영역 및 동일한 경쇄를 사용하여 발현시켜서 이중특이성 항체를 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 40항에 있어서, 제 1 인간 중쇄는 단백질 A에 대한 제 1 인간 중쇄의 친화성을 제거하거나 실질적으로 감소시키는 변형을 포함하고, 제 2 인간 중쇄는 단백질 A에 결합하는 능력을 보유하며, 단백질 A에 대한 제 1 인간 중쇄의 친화성을 제거하거나 실질적으로 감소시키는 변형은 95R (EU 435R), 96F (EU 436F) 및 그것들의 조합으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

인간 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 유전자 절편을 선택하기 위해 사용되는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스의 용도.

청구항 43

면역되어 있는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스.

청구항 44

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 마우스를 항원으로 면역시키는 단계,
 그 결과 항원에 대해 마우스에 의해 생성된 항체로부터, 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 또는 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 얻는 단계, 및
 상기 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 또는 핵산 서열을 항체를 만드는 데 활용하는 단계를 포함하는 항체의 제조 방법.

청구항 45

제 44항에 있어서, 방법은
 (a) 마우스를 면역시켰던 항원의 상이한 에피토프들에 대한 2개의 상이한 항체로부터 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 또는 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계; 또는
 (b) 동일한 마우스, 또는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따르는 추가의 마우스를 상이한 항원으로 면역시킨 후, 제 2 항원에 특이적인 마우스에 의해 생성된 항체로부터, 중쇄 가변 영역 서열 아미노산 서열 또는 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 확인하는 단계를 포함하며,
 방법은 이중특이성 항체를 생성하기 위하여 2개의 상이한 중쇄 가변 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방

법.

청구항 46

제 44항 또는 제 45항에 있어서, 방법은 항체 또는 2개의 항체로부터 경쇄 가변 영역 서열을 또한 확인하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제 46항에 있어서, 방법은 또한 그 방법에 의해 생성된 항체에서 확인된 경쇄 및 중쇄 가변 영역 또는 영역들을 사용하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원과의 교차-참조

[0002] 본 출원은 2013년 3월 13일에 출원된 미국 특허 출원 일련번호 13/798,455호의 35 U.S.C. § 119(e) 규정하의 유익을 청구하고, 상기 출원은 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 2014년 3월 13일에 "2010794-0550_ST25"로 출원된 ascii .txt 파일로서 전자문서로 제출된 서열 목록을 참조한다. .txt 파일은 2014년 3월 11일에 생성되었고, 33kb의 크기를 가진다.

[0005] 기술분야

[0006] 다양한 인간 가변/마우스 불변 중쇄와 결합된 공통 인간 가변/마우스 불변 경쇄를 가지는 항체들을 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공된다. 마우스의 B 세포의 인간 가변 영역 유전자 서열들로부터 인간 이종특이성 항체를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

배경 기술

[0007] 항체는 전형적으로 동종이량체의 중쇄 성분을 포함하는데, 이때 각 중쇄 단량체는 동일한 경쇄와 결합된다. 이종이량체 중쇄 성분을 가지는 항체들 (예컨대 이종특이성 항체)은 치료적 항체로서 바람직하다. 그러나 이종특이성 항체의 각각의 중쇄와 만족스럽게 결합할 수 있는 적절한 경쇄 성분을 가지는 이종특이성 항체를 만드는 것은 문제가 많은 것으로 증명되었다.

[0008] 한 접근법으로, 경쇄는 모든 경쇄 가변 도메인들에 대한 유용성 통계를 조사하고, 인간 항체들에서 가장 빈번하게 사용된 경쇄를 확인하며, 그 경쇄를 시험관 내에서 상이한 특이성을 가지는 2개의 중쇄와 쌍을 이루게 함으로써 선택될 수 있다.

[0009] 다른 접근법으로, 경쇄는 파지 디스플레이 라이브러리 (예컨대 인간 경쇄 가변 영역 서열들을 포함하는 파지 디스플레이 라이브러리, 예컨대 인간 scFv 라이브러리)에서 경쇄 서열들을 관찰하고 그 라이브러리로부터 가장 공통적으로 사용된 경쇄 가변 영역을 선택함으로써 선택될 수 있다. 그런 다음 경쇄는 관심의 2개의 상이한 중쇄에 대해 시험될 수 있다.

[0010] 또 다른 접근법으로, 경쇄는 프로브로서 관심이 있는 2개의 중쇄의 중쇄 가변 서열을 사용하여 경쇄 가변 서열의 파지 디스플레이 라이브러리를 분석함으로써 선택될 수 있다. 2개의 중쇄 가변 서열과 결합하는 경쇄는 중쇄에 대한 경쇄로서 선택될 수 있다.

[0011] 또 다른 접근법으로, 후보 경쇄는 중쇄의 동족 경쇄들과 일렬배열될 수 있고, 2개의 중쇄의 동족 경쇄들에 공통적인 서열 특성에 더 밀접하게 매치시키기 위하여 경쇄에 변형이 만들어진다. 만약 면역원성의 기회가 최소화되어야 한다면, 변형은 바람직하게는 공지된 인간 경쇄 서열에 존재하는 서열을 조래하고, 그로써 단백질 가수분해성 처리는 면역원성의 가능성을 평가하기 위해 해당 기술분야에 알려져 있는 변수들과 방법들을 토대로 T 세포 에피토프를 생성하는 것 같지 않다 (즉 *in silico* 뿐 아니라 습식 분석).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 상기 접근법들은 모두 많은 선행 제한점들, 예컨대 서열 동일성, 특이한 사전-선택된 중쇄와의 결합 능력 등을 포함하는 시험관 내 방법들에 의존한다. 따라서 공통 경쇄를 포함하는 인간 에피토프-결합 단백질들을 제조하기 위해 시험관 내 조건을 조작하는 것에 의존하지 않고, 대신 생물학적으로 더 민감한 접근법들을 사용하는 조성물 및 방법들에 대한 요구가 해당 기술분야에 존재한다.

과제의 해결 수단

- [0013] **발명의 요약**
- [0014] 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 발현하는 유전자 변형 마우스가 제공되는데, 이때 그 마우스는 제한된 경쇄 가변 레퍼토리를 가진다. 친화성-성숙된 인간 중쇄 가변 도메인의 다양한 레퍼토리와 결합하고 그것을 발현하는 인간 경쇄 가변 도메인을 생성하기 위한 생물학적 시스템이 제공된다. 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 결합 단백질을 제조하기 위한 방법이 제공되는데, 그 방법은 제한된 면역글로불린 경쇄 레퍼토리를 가지는 마우스를 관심의 항원으로 면역시키고, 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 결합 단백질에서 마우스의 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열을 사용하는 것을 포함한다. 방법은 다중-특이성 항원-결합 단백질을 제조하는 데 사용하기에 적절한 인간 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 제조하기 위한 방법을 포함한다.
- [0015] 미재배열 인간 중쇄 가변 영역 유전자 절편의 레퍼토리로부터 유도된 적절한 친화성-성숙된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 선택하는 유전자 공학처리된 마우스들이 제공되는데, 이때 친화성-성숙된 인간 중쇄 가변 도메인은 하나의 인간 경쇄 가변 영역 유전자 절편으로부터 유도된 단일 인간 경쇄 가변 도메인과 결합하고 그것을 발현한다. 2개의 인간 경쇄 가변 영역 유전자 절편 중에서 선택된 것을 제공하는 유전자 공학처리된 마우스가 또한 제공된다. 다양한 측면에서, 하나 또는 2개의 유전자 절편은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 및 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 을 포함한다.
- [0016] 인간 경쇄 가변 영역 유전자 절편의 제한된 레퍼토리로부터 인간 경쇄 가변 도메인들의 제한된 레퍼토리, 또는 단일 인간 경쇄 가변 도메인을 발현하는 유전자 공학처리된 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 제공되는 마우스들은 재배열되어 단일 경쇄를 발현하는 (또는 2개의 경쇄 중 어느 하나 또는 둘 다를 발현하는) 재배열된 인간 경쇄 가변 영역 유전자 (또는 2개의 재배열된 경쇄 가변 영역 유전자)를 형성하는 단일한 미재배열 인간 경쇄 가변 영역 유전자 절편 (또는 2개의 인간 경쇄 가변 영역 유전자 절편)을 포함하도록 유전자 공학처리된다. 재배열된 인간 경쇄 가변 도메인들은 마우스에 의해 선택된 다수의 친화성-성숙된 인간 중쇄와 쌍을 이룰 수 있고, 이때 중쇄 가변 영역은 특이적으로 상이한 에피토프들에 결합한다.
- [0017] 인간 경쇄 가변 영역 서열들의 제한된 레퍼토리로부터 인간 경쇄 가변 도메인의 제한된 레퍼토리, 또는 단일 인간 경쇄 가변 도메인을 발현하는 유전자 공학처리된 마우스들이 제공된다. 어떤 구체예에서, 제공되는 마우스들은 단일 경쇄의 가변 영역을 발현하는 (또는 2개의 가변 영역 중 어느 하나 또는 둘 다를 발현하는) 단일 V/J 인간 경쇄 서열 (또는 2개의 V/J 서열)을 포함하도록 유전자 공학처리된다. 가변 서열을 포함하는 경쇄는 마우스에 의해 클론적으로 선택된 다수의 친화성-성숙된 인간 중쇄와 쌍을 이룰 수 있고, 이때 중쇄 가변 영역은 상이한 에피토프들에 특이적으로 결합한다.
- [0018] 한 측면으로, 인간 J 유전자 절편 (하나 또는 다수의 J_L 절편으로부터 선택됨)과 재배열될 수 있고 면역글로불린 경쇄의 인간 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 단일 인간 면역글로불린 V_L 영역 유전자 절편을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공된다. 다른 측면으로, 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편을 포함하고, 그것들은 각각 인간 J 유전자 절편 (하나 또는 다수의 J_L 절편으로부터 선택됨)과 재배열할 수 있고 면역글로불린 경쇄의 인간 V_L 도메인을 코드화할 수 있는 유전자 변형 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 2개의 인간 V_L 유전자 절편은 마우스 계놈의 상이한 유전자좌에 있다 (예컨대 제 1 경쇄 대립유전자에서 제 1 인간 V_L 절편을 포함하고, 제 2 경쇄 대립유전자에서 제 2 인간 V_L 절편을 포함하는 이형접합체, 이때 제 1 및 제 2 인간 V_L 절편은 동일하지 않음). 어떤 구체예에서, 2개의 인간 V_L 유전자 절편은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 유전자 절편 및 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편이다. 한 구체예에서, 인간 J_L 유전자 절편은 $J_{\kappa 1}$, $J_{\kappa 2}$, $J_{\kappa 3}$, $J_{\kappa 4}$, $J_{\kappa 5}$ 및 그것들의 쌍을 이룬 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 구체예에서, 제공되는 유전자 공학처리된 마우스는 내인성 V_L 유전자 절편을 함유하는 면역글로불린 경쇄를 발현할 수 없다. 예를 들어 어떤 구체예에서, 제공되는 유전자 공학처리된 마우스

는 내인성 V_L 유전자 절편의 부분 또는 전부를 비활성화 및/또는 제거하는 유전자 변형을 함유한다.

- [0019] 한 구체예에서, 단일 인간 V_L 유전자 절편은 $J_{\kappa 1}$, $J_{\kappa 2}$, $J_{\kappa 3}$, $J_{\kappa 4}$ 및 $J_{\kappa 5}$ 로부터 선택된 인간 J_L 유전자 절편에 작동가능하게 연결되고, 이때 단일 인간 V_L 유전자 절편은 경쇄 가변 영역 유전자를 코드화하는 서열을 형성하기 위해 하나 또는 그 이상의 인간 J_L 유전자 절편 중 어느 것으로 재배열될 수 있다.
- [0020] 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 면역글로불린 경쇄 유전자를 형성하기 위해 재배열할 수 있는 내인성 마우스 V_L 유전자 절편을 포함하지 않는 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함하는데, 이때 V_L 유전자좌는 경쇄 유전자의 V_L 영역을 코드화하기 위해 재배열할 수 있는 단일 인간 V_L 유전자 절편을 포함한다. 특정 구체예에서, 인간 V_L 유전자 절편은 인간 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 유전자 절편 또는 인간 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 유전자 절편이다. 어떤 구체예에서, 제공되는 유전자 변형된 마우스는 면역글로불린 경쇄 유전자를 형성하기 위해 재배열할 수 있는 내인성 마우스 V_L 유전자 절편을 포함하지 않는데, 이때 V_L 유전자좌는 경쇄 유전자의 V_L 영역을 코드화하기 위해 재배열할 수 있는 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편을 포함한다. 어떤 특정 구체예에서, 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 유전자 절편, 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편 및 그것들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 어떤 특정 구체예에서, 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편은 인간 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 유전자 절편 및 인간 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 유전자 절편이다.
- [0021] 한 측면으로, 면역글로불린 경쇄의 인간 V_L 도메인을 코드화하는 단일 재배열된 (V/J) 인간 면역글로불린 경쇄 가변 (V_L) 영역 (즉 V_L/J_L 영역)을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공된다. 다른 측면으로, 마우스는 면역글로불린 경쇄의 인간 V_L 도메인을 코드화할 수 있는 2개 이하의 재배열된 인간 V_L 영역을 포함한다.
- [0022] 한 구체예에서, V_L 영역은 재배열된 인간 $V_{\kappa 1-39/J}$ 서열 또는 재배열된 인간 $V_{\kappa 3-20/J}$ 서열이다. 한 구체예에서, 재배열된 V_L/J_L 서열의 인간 J_L 절편은 $J_{\kappa 1}$, $J_{\kappa 2}$, $J_{\kappa 3}$, $J_{\kappa 4}$ 및 $J_{\kappa 5}$ 로부터 선택된다. 특정 구체예에서, V_L 영역은 인간 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 서열 또는 인간 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 서열이다. 특정 구체예에서, 마우스는 인간 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 서열 및 인간 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 서열 둘 다를 가진다.
- [0023] 한 구체예에서, 인간 V_L 유전자 절편은 인간 또는 마우스 리더 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 리더 서열은 마우스 리더 서열이다. 특정 구체예에서, 마우스 리더 서열은 마우스 $V_{\kappa 3-7}$ 리더 서열이다. 특정 구체예에서, 리더 서열은 미재배열 인간 V_L 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다. 특정 구체예에서, 리더 서열은 재배열된 인간 V_L/J_L 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0024] 한 구체예에서, V_L 유전자 절편은 면역글로불린 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 구체예에서, 프로모터 서열은 인간 프로모터 서열이다. 특정 구체예에서, 인간 면역글로불린 프로모터는 인간 $V_{\kappa 3-15}$ 프로모터이다. 특정 구체예에서, 프로모터는 미재배열 인간 V_L 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다. 특정 구체예에서, 프로모터는 재배열된 인간 V_L/J_L 서열에 작동가능하게 연결된다.
- [0025] 한 구체예에서, 경쇄 유전자좌는 5'쪽에 (V_L 유전자 절편의 전사 방향과 관련하여) 인간 면역글로불린 프로모터가 있고 3'쪽에 인간 J 절편과 재배열하는 인간 V_L 유전자 절편이 있는 리더 서열을 포함하고 내인성 마우스 경쇄 불변 영역 (C_L)을 포함하는 역 키메라 경쇄의 V_L 도메인을 코드화한다. 특정 구체예에서, V_L 유전자 절편은 마우스 V_{κ} 유전자좌에 있고, 마우스 C_L 은 마우스 C_{κ} 이다.
- [0026] 한 구체예에서, 경쇄 유전자좌는 5'쪽에 (V_L 유전자 절편의 전사 방향과 관련하여) 인간 면역글로불린 프로모터가 있고 3'쪽에 재배열된 인간 V_L 영역 (V_L/J_L 서열)이 있는 리더 서열을 포함하고 내인성 마우스 경쇄 불변 영역 (C_L)을 포함하는 역 키메라 경쇄의 V_L 도메인을 코드화한다. 특정 구체예에서, 재배열된 인간 V_L/J_L 서열은 마우스 카파 (κ) 유전자좌에 있고, 마우스 C_L 은 마우스 C_{κ} 이다.
- [0027] 한 구체예에서, 변형된 마우스의 V_L 유전자좌는 κ 경쇄 유전자좌이고, κ 경쇄 유전자좌는 마우스 κ 인트론의

인헨서, 마우스 κ 3' 인헨서 또는 인트론 인헨서 및 3' 인헨서 둘 다를 포함한다.

- [0028] 한 구체예에서, 마우스는 비기능적 면역글로불린 람다(λ) 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 구체예에서, λ 경쇄 유전자좌는 유전자좌의 하나 또는 그 이상의 서열의 결실을 포함하고, 이때 하나 또는 그 이상의 결실은 λ 경쇄 유전자좌를 경쇄 유전자를 형성하기 위해 재배열을 할 수 없도록 만든다. 다른 구체예에서, λ 경쇄 유전자좌의 모든 또는 실질적으로 모든 V_L 유전자 절편은 결실된다.
- [0029] 한 구체예에서, 마우스는 인간 V_L 유전자 절편으로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 V_L 도메인을 포함하는 경쇄를 만든다. 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_L 유전자 절편으로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 V_L 도메인 및 마우스 C_K 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 마우스는 λ 경쇄를 발현하지 않는다.
- [0030] 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 인간 V_L 영역 서열을 체세포적으로 과돌연변이시킬 수 있다. 특정 구체예에서, 마우스는 재배열할 수 있고 V_L 도메인을 코드화할 수 있는 인간 V_L 유전자 절편으로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자를 포함하고, 재배열된 면역글로불린 경쇄 유전자는 체세포적으로 돌연변이된 V_L 도메인을 포함한다.
- [0031] 한 구체예에서, 마우스는 마우스 C_K 에 연결된 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_L 도메인을 포함하는 경쇄를 발현하는 세포를 포함하는데, 이때 경쇄는 인간 V_H 유전자 절편으로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 V_H 도메인을 포함하는 중쇄와 결합하고 중쇄는 마우스 중쇄 불변 영역 (C_H)을 포함한다. 특정 구체예에서, 중쇄는 마우스 C_{H1} , 마우스 힌지, 마우스 C_{H2} 및 마우스 C_{H3} 를 포함한다. 특정 구체예에서, 중쇄는 인간 C_{H1} , 힌지, 마우스 C_{H2} 및 마우스 C_{H3} 를 포함한다.
- [0032] 한 구체예에서, 마우스는 하나 또는 그 이상의 인간 V_H 유전자 절편을 이용하는 내인성 마우스 V_H 유전자 절편의 대체를 포함하는데, 이때 인간 V_H 유전자 절편은 마우스 C_H 영역 유전자에 작동가능하게 연결됨으로써, 마우스는 인간 V_H 유전자 절편들을 재배열하고 인간 V_H 도메인 및 마우스 C_H 를 포함하는 역 키메릭 면역글로불린 중쇄를 발현한다. 한 구체예에서, 미재배열 마우스 V_H 유전자 절편의 90 내지 100%가 적어도 하나의 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 특정 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 V_H 유전자 절편들은 적어도 하나의 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 19, 적어도 39 또는 적어도 80 또는 81개의 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 이루어진다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 12개의 기능성 미재배열 인간 V_H 유전자 절편, 적어도 25개의 기능성 미재배열 인간 V_H 유전자 절편 또는 적어도 43개의 기능성 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 이루어진다. 한 구체예에서, 마우스는 모든 마우스 D_H 및 J_H 절편이 적어도 하나의 미재배열 인간 D_H 절편과 적어도 하나의 미재배열 인간 J_H 절편으로 대체되는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 미재배열 인간 D_H 절편은 1-1, D1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13, 7-27 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 적어도 하나의 미재배열 인간 J_H 절편은 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 인간 V_H 유전자 절편은 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 인간 V_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된다.
- [0033] 한 구체예에서, 마우스는 관심의 항원에 특이적으로 결합하는 결합 단백질을 발현하는 B 세포를 포함하고, 이때 결합 단백질은 인간 V_{K1-39}/J_{K5} 재배열 또는 인간 V_{K3-20}/J_{K1} 재배열로부터 유도된 경쇄를 포함하며, 세포는 1-69, 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 3-33, 3-53, 4-39, 4-59 및 5-51 유전자 절편으로부터 선택된 인간 V_H 유전자 절편의 재배열로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 중쇄 유전자를 포함한다. 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 인간 V_H 유전자 절편은 1, 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택된 인간 중쇄 J_H 유전자 절편으로 재배열된다. 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 인간 V_H 및 J_H 유전자 절편은 1-1, 1-7, 1-26, 2-8, 2-15, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13 및 7-27로부터 선택된 인간 D_H 유전자 절편으로 재배열된다. 특정 구체예에서, 경쇄 유전자는 1, 2, 3, 4, 또는 5 또는 그 이상의 체세포 과돌연변이를 가진다.

[0034]

한 구체예에서, 마우스는 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/3, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3-30/5-12/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7-27/5, 3-30/7-27/6, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, 4-39/1-26/3, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4, 4-59/3-22/3, 5-51/3-16/6, 5-51/5-5/3, 5-51/6-13/5, 3-53/1-1/4, 1-69/6-6/5 및 1-69/6-13/4로부터 선택된 $V_H/D_H/J_H$ 영역을 포함하는 재배열된 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 서열을 포함하는 B 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, B 세포는 마우스 중쇄 불변 영역과 융합된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 및 마우스 경쇄 불변 영역과 융합된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하는 결합 단백질을 발현한다.

[0035]

한 구체예에서, 재배열된 인간 V_L 영역은 인간 $V_{K1-39J_{K5}}$ 서열이고, 마우스는 (i) 인간 V_L/J_L 서열로부터 유도된 V_L 도메인 및 (ii) 마우스 C_L 을 포함하는 역 키메라 경쇄를 발현하며; 이때 경쇄는 (i) 마우스 C_H 및 (ii) 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 인간 V_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 V_H 유전자 절편으로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인을 포함하는 역 키메라 중쇄와 결합된다. 한 구체예에서, 마우스는 체세포적으로 돌연변이된 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, C_L 은 마우스 C_K 이다. 특정 구체예에서, 인간 V_H 유전자 절편은 2-5, 3-13, 3-23, 3-30, 4-59, 5-51 및 1-69 유전자 절편으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인은 1-1, 1-7, 2-8, 3-3, 3-10, 3-16, 3-22, 5-5, 5-12, 6-6, 6-13 및 7-27로부터 선택된 D_H 절편으로부터 유도된 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인은 1, 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택된 J_H 절편으로부터 유도된 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인은 2-5/6-6/1, 2-5/3-22/1, 3-13/6-6/5, 3-23/2-8/4, 3-23/3-3/4, 3-23/3-10/4, 3-23/6-6/4, 3-23/7-27/4, 3-30/1-1/4, 3-30/1-7/4, 3-30/3-3/4, 3-30/3-22/5, 3-30/5-5/2, 3-30/5-12/4, 3-30/6-6/1, 3-30/6-6/3, 3-30/6-6/4, 3-30/6-6/5, 3-30/6-13/4, 3-30/7-27/4, 3-30/7-27/5, 3-30/7-27/6, 4-59/3-16/3, 4-59/3-16/4, 4-59/3-22/3, 5-51/5-5/3, 1-69/6-6/5 및 1-69/6-13/4로부터 선택된 재배열된 인간 $V_H/D_H/J_H$ 서열에 의해 코드화된다.

[0036]

한 구체예에서, 재배열된 인간 V_L 영역은 인간 $V_{K3-20J_{K1}}$ 서열이고, 마우스는 (i) 재배열된 인간 V_L/J_L 서열로부터 유도된 V_L 도메인 및 (ii) 마우스 C_L 을 포함하는 역 키메라 경쇄를 발현하며; 이때 경쇄는 (i) 마우스 C_H 및 (ii) 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 인간 V_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 V_H 유전자 절편으로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 를 포함하는 역 키메라 중쇄와 결합된다. 한 구체예에서, 마우스는 체세포적으로 돌연변이된 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, C_L 은 마우스 C_K 이다. 특정 구체예에서, 인간 V_H 유전자 절편은 3-30, 3-33, 3-53, 4-39 및 5-51 유전자 절편으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인은 1-1, 1-7, 1-26, 2-15, 3-3, 3-16 및 6-13으로부터 선택된 D_H 절편으로부터 유도된 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인은 3, 4, 5 및 6으로부터 선택된 J_H 절편으로부터 유도된 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인은 3-30/1-1/4, 3-30/3-3/3, 3-33/1-7/4, 3-33/2-15/4, 4-39/1-26/3, 5-51/3-16/6, 5-51/6-13/5 및 3-53/1-1/4로부터 선택된 재배열된 인간 $V_H/D_H/J_H$ 서열에 의해 코드화된다.

[0037]

한 구체예에서, 마우스는 재배열된 인간 $V_{K1-39J_{K5}}$ 서열 및 재배열된 인간 $V_{K3-20J_{K1}}$ 서열 두 가지를 모두 포함하고, 마우스는 (i) 인간 $V_{K1-39J_{K5}}$ 서열 또는 인간 $V_{K3-20J_{K1}}$ 서열로부터 유도된 V_L 도메인 및 (ii) 마우스 C_L 을 포함하는 역 키메라 경쇄를 발현하며; 이때 경쇄는 (i) 마우스 C_H 및 (ii) 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51, 6-1 인간 V_H 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 V_H 유전자 절편으로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 를 포함하는 역 키메라 중쇄와 결합된다. 한 구체예에서, 마우스는 체세포적으로 돌연변이된 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서 C_L 은 마우스 C_K 이다.

- [0038] 한 구체예에서, 내인성 미재배열 마우스 V_H 유전자 절편의 90 내지 100%가 적어도 하나의 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 특정 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 미재배열 마우스 V_H 유전자 절편은 적어도 하나의 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 대체된다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 18, 적어도 39, 적어도 80 또는 81개의 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 이루어진다. 한 구체예에서, 대체는 적어도 12개의 기능성 미재배열 인간 V_H 유전자 절편, 적어도 25개의 기능성 미재배열 인간 V_H 유전자 절편 또는 적어도 43개의 미재배열 인간 V_H 유전자 절편으로 이루어진다.
- [0039] 한 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 C57BL 마우스이고, 특정 구체예에서, C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr 및 C57BL/Ola로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 상기 언급된 129 계통과 상기 언급된 C57BL/6 계통의 혼합이다. 다른 특정 구체예에서, 마우스는 상기 언급된 129 계통들의 혼합, 또는 상기 언급된 BL/6 계통들의 혼합이다. 특정 구체예에서, 혼합의 129 계통은 129S6 (129/SvEvTac) 계통이다.
- [0040] 한 구체예에서, 마우스는 마우스 C_k 및 재배열된 인간 V_k1-39J_k5 서열 또는 재배열된 인간 V_k3-20J_k1 서열로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_L 도메인을 포함하는 경쇄와, 마우스 C_H 및 1-2, 1-8, 1-24, 1-69, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 3-53, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51 및 6-1 인간 V_H 유전자 절편으로부터 선택된 인간 V_H 유전자 절편으로부터 유도된 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인을 포함하는 중쇄를 포함하는 역 키메라 항체를 발현하는데, 이때 마우스는 전체 마우스 항체를 발현하지 못하고 전체 인간 항체를 발현하지 못한다. 한 구체예에서, 마우스는 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자 절편이 재배열된 인간 V_k1-39J_k5 서열 또는 재배열된 인간 V_k3-20J_k1 서열로 대체된 것을 포함하고, 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 V_H 유전자 절편이 완전한 또는 실질적으로 완전한 인간 V_H 유전자 절편의 레퍼토리로 대체된 것을 포함하는 κ 경쇄 유전자좌를 포함한다.
- [0041] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 항원-특이적 항체들의 집단이 제공되는데, 이때 항체는 인간 V_k1-39/J_k5 재배열 또는 인간 V_k3-20/J_k1 재배열로부터 유도된 경쇄를 포함하고, 항체는 1-2, 1-3, 1-8, 1-18, 1-24, 1-46, 1-58, 1-69, 2-5, 2-26, 2-70, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-16, 3-20, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33, 3-43, 3-48, 3-53, 3-64, 3-72, 3-73, 4-31, 4-34, 4-39, 4-59, 5-51 및 6-1 인간 V_H 유전자 절편으로부터 선택된 인간 V_H 유전자 절편의 재배열로부터 유도된 재배열된 면역글로블린 중쇄 유전자를 포함한다. 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 인간 V_H 유전자 절편은 1, 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택된 인간 중쇄 J_H 유전자 절편으로 재배열된다. 특정 구체예에서, 경쇄는 1, 2, 3, 4 또는 5 또는 그 이상의 체세포성 과돌연변이를 가진다.
- [0042] 한 구체예에서, 경쇄는 1, 2, 3 또는 4개의 체세포성 과돌연변이를 가진다. 한 구체예에서, 경쇄 유전자는 1 또는 2개의 돌연변이를 가진다. 다양한 구체예에서, 경쇄 유전자는 그것의 서열을 따라 다중 돌연변이를 일으킬 수 있다.
- [0043] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_k1-39/J_k5 재배열로부터 유도되고 경쇄는 적어도 하나 또는 4개 이하의 체세포성 과돌연변이를 가진다. 한 구체예에서, 경쇄는 적어도 2개의 체세포성 과돌연변이를 가진다. 한 구체예에서, 경쇄는 적어도 3개의 체세포성 과돌연변이를 가진다. 한 구체예에서, 경쇄는 적어도 4개의 체세포성 과돌연변이를 가진다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 그런 체세포성 과돌연변이는 경쇄의 하나 또는 그 이상의 프레임워크 영역 (FW)에 존재한다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 그런 체세포성 과돌연변이는 경쇄의 하나 또는 그 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)에 존재한다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 그런 체세포성 과돌연변이는 경쇄의 하나 또는 그 이상의 FW 및/또는 하나 또는 그 이상의 CDR에 존재한다. 다양한 구체예에서, 프레임워크 영역은 프레임워크 1 (FW1), 프레임워크 2 (FW2), 프레임워크 3 (FW3) 및/또는 그것들의 조합으로부터 선택된다. 다양한 구체예에서, CDR은 CDR1, CDR2, CDR3 및/또는 그것들의 조합으로부터 선택된다.
- [0044] 한 구체예에서, 중쇄는 하나 또는 그 이상의 FW 또는 하나 또는 그 이상의 CDR에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄는 하나 또는 그 이상의 FW 및 하나 또는 그 이상의 CDR에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄는 하나 또는 그 이상의 FW 또는 하나 또는 그 이상의 CDR에 적어도 2개의 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄는 하나 또는 그 이상의 FW 및 하나 또는 그 이상의 CDR에 적어도 2개의 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄는 하나 또는 그 이상의 FW 및 하나 또는 그 이상의 CDR에 적어도

3개의 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄는 하나 또는 그 이상의 FW 및 하나 또는 그 이상의 CDR에 적어도 4개의 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 중쇄는 하나 또는 그 이상의 FW 및 하나 또는 그 이상의 CDR에 적어도 5개 이상의 돌연변이를 포함하고; 특정 구체예에서, 중쇄는 2개의 FW에 적어도 5개 이상의 돌연변이를 포함하며; 특정 구체예에서, 중쇄는 하나의 FW 및 하나의 CDR에 적어도 5개 이상의 돌연변이를 포함한다.

[0045] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 9%는 FW1에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 9%는 FW1에 존재하는 하나의 돌연변이를 가진다. 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 25%는 CDR1에 존재하는 적어도 하나 또는 2개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 19%는 CDR1에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 5%는 CDR1에 존재하는 2개의 돌연변이를 가진다.

[0046] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 20%는 FW2에 존재하는 적어도 하나 또는 3개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 17%는 FW2에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 1%는 FW2에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 1%는 FW2에 존재하는 3개의 돌연변이를 가진다.

[0047] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 10%는 CDR2에 존재하는 적어도 하나 또는 2개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 10%는 CDR2에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 1%는 CDR2에 존재하는 2개의 돌연변이를 가진다.

[0048] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 29%는 FW3에 존재하는 적어도 하나 또는 4개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 21%는 FW3에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 5%는 FW3에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 2%는 FW3에 존재하는 3개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 2%는 FW3에 존재하는 4개의 돌연변이를 가진다.

[0049] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 37%는 CDR3에 존재하는 적어도 하나 또는 4개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 27%는 CDR3에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 8%는 CDR3에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 1%는 CDR3에 존재하는 3개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 1%는 CDR3에 존재하는 4개의 돌연변이를 가진다.

[0050] 한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 항원-특이적 항체들의 집단이 제공되는데, 이때 항체는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도된 경쇄를 포함하고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 9%는 FW1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 25%는 CDR1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 20%는 FW2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 10%는 CDR2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 29%는 FW3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, V_K1-39/J_K5-유도된 경쇄의 약 37%는 CDR3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.

[0051] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 35%는 FW1에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 25%는 FW1에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 9%는 FW1에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 1%는 FW1에 존재하는 3개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 1%는 FW1에 존재하는 5개 이상의 돌연변이를 가진다.

[0052] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 92%는 CDR1에 존재하는 적어도 하나 또는 4개 이하의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 92%는 CDR1에 존재하는 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 26%는 CDR1에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 44%는 CDR1에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 19%는 CDR1에 존재하는 3개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 3%는 CDR1에 존재하는 4개의 돌연변이를 가진다.

[0053] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 66%는 FW2에 존재하는 적어도 하나

또는 3개 이하의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 66%는 FW2에 존재하는 적어도 하나, 적어도 2개 또는 적어도 3개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 35%는 FW2에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 23%는 FW2에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 8%는 FW2에 존재하는 3개의 돌연변이를 가진다.

[0054] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 70%는 CDR2에 존재하는 적어도 하나 또는 4개 이하의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 70%는 CDR2에 존재하는 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 34%는 CDR2에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 20%는 CDR2에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 12%는 CDR2에 존재하는 3개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 5%는 CDR2에 존재하는 4개의 돌연변이를 가진다.

[0055] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 91%는 FW3에 존재하는 적어도 하나 또는 최대 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 91%는 FW3에 존재하는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 19%는 FW3에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 33%는 FW3에 존재하는 2개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 22%는 FW3에 존재하는 3개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 11%는 FW3에 존재하는 4개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 7%는 FW3에 존재하는 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.

[0056] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 63%는 CDR3에 존재하는 적어도 하나 또는 2개 이하의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 63%는 CDR3에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 54%는 CDR3에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 9%는 CDR3에 존재하는 2개의 돌연변이를 가진다.

[0057] 한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 항원-특이적 항체들의 집단이 제공되는데, 이때 항체는 인간 V_K1-39/J_K5 재배열로부터 유도된 경쇄를 포함하고, 중쇄의 적어도 35%는 FW1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, 중쇄의 약 92%는 CDR1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, 중쇄의 약 66%는 FW2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, 중쇄의 약 70%는 CDR2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, 중쇄의 약 91%는 FW3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, 중쇄의 약 63%는 CDR3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.

[0058] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 경쇄 유전자는 적어도 하나 또는 2개 이하의 체세포성 과돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄 유전자는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 그 이상의 체세포성 과돌연변이를 가진다. 특정 구체예에서, 돌연변이는 경쇄의 하나 또는 그 이상의 프레임워크 영역에 존재한다. 특정 구체예에서, 돌연변이는 경쇄의 하나 또는 그 이상의 CDR 영역에 존재한다. 특정 구체예에서, 돌연변이는 경쇄의 하나 또는 그 이상의 프레임워크 영역 및/또는 하나 또는 그 이상의 CDR 영역에 존재한다. 다양한 구체예에서, 프레임워크 영역은 프레임워크 1(FW1), 프레임워크 2(FW2), 프레임워크 3(FW3) 및/또는 그것들의 조합으로부터 선택된다.

[0059] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 10%는 FW1에 적어도 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 10%는 FW1에 하나의 돌연변이를 가진다.

[0060] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 53%는 CDR1에 존재하는 적어도 하나 또는 2개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 27%는 CDR1에 존재하는 하나 또는 2개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 54%는 CDR1에 존재하는 하나 또는 2개의 돌연변이를 가진다.

[0061] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 6%는 FW2에 존재하는 적어도 하나 또는 2개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 6%는 FW2에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 3%는 FW2에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 3%는 FW2에 존재하는 2개의 돌연변이를 가진다.

[0062] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 3%는 CDR2에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 3%는 CDR2에 존재하는 하나의 돌연변이를 가진다.

- [0063] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 17%는 FW3에 존재하는 적어도 하나 또는 2개 이하의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 20%는 FW3에 존재하는 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 17%는 FW3에 존재하는 2개의 돌연변이를 가진다.
- [0064] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고, V_K3-30/J_K1-유도된 경쇄의 약 43%는 CDR3에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 경쇄의 적어도 43%는 CDR3에 존재하는 하나의 돌연변이를 가진다.
- [0065] 한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 항원-특이적 항체들의 집단이 제공되는데, 이때 항체는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도된 경쇄를 포함하고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 10%는 FW1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 53%는 CDR1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 6%는 FW2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 3%는 CDR2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 37%는 FW3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, V_K3-20/J_K1-유도된 경쇄의 약 43%는 CDR3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.
- [0066] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 43%는 FW1에 존재하는 적어도 하나 또는 2개 이하의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 42%는 FW1에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 41%는 FW1에 존재하는 1개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 2%는 FW1에 존재하는 2개의 돌연변이를 가진다.
- [0067] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 92%는 CDR1에 존재하는 적어도 하나 또는 4개 이하의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 43%는 CDR1에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 25%는 CDR1에 존재하는 적어도 2개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 15%는 CDR1에 존재하는 적어도 3개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 10%는 CDR1에 존재하는 4개 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.
- [0068] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 46%는 FW2에 존재하는 적어도 하나 또는 3개 이하의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 34%는 FW2에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 10%는 FW2에 존재하는 2개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 2%는 FW2에 존재하는 3개 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.
- [0069] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 84%는 CDR2에 존재하는 적어도 하나 또는 최대 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 39%는 CDR2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 18%는 CDR2에 존재하는 2개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 21%는 CDR2에 존재하는 3개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 3%는 CDR2에 존재하는 4개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 2%는 CDR2에 존재하는 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.
- [0070] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 92%는 FW3에 존재하는 적어도 하나 또는 최대 5개 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 21%는 FW3에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 20%는 FW3에 존재하는 적어도 2개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 13%는 FW3에 존재하는 적어도 3개의 돌연변이를 가지고; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 20%는 FW3에 존재하는 적어도 4개의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 18%는 FW3에 존재하는 적어도 5개의 돌연변이를 가진다.
- [0071] 한 구체예에서, 경쇄는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도되고 중쇄의 약 7%는 CDR3에 존재하는 적어도 하나의 돌연변이를 가지며; 한 구체예에서, 중쇄의 적어도 7%는 CDR3에 존재하는 하나의 돌연변이를 가진다.
- [0072] 한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 항원-특이적 항체들의 집단이 제공되는데, 이때 항체는 인간 V_K3-20/J_K1 재배열로부터 유도된 경쇄를 포함하고, 중쇄의 적어도 43%는 FW1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, 중쇄의 약 92%는 CDR1에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, 중쇄의 약 46%는 FW2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, 중쇄의 약 84%는 CDR2에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지고, 중쇄의 약 92%는 FW3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지며, 중쇄의 약 7%는 CDR3에 존재하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가진다.

- [0073] 한 측면으로, 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 면역글로불린 경쇄를 발현하는 마우스가 제공되는데, 이때 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 마우스의 생식선에 존재하고, 면역글로불린 경쇄는 인간 가변 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 마우스의 생식선은 재배열된 경쇄 서열을 포함하는 마우스의 모든 B 세포에 존재하는 모든 비-대용(non-surrogate) 경쇄 서열과 동일한 V 절편과 동일한 J 절편으로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열을 포함한다.
- [0074] 한 구체예에서, 마우스의 생식선은 기능성 미재배열 면역글로불린 경쇄 V 유전자 절편이 결핍되어 있다. 한 구체예에서, 마우스의 생식선은 기능성 미재배열 면역글로불린 경쇄 J 유전자 절편이 결핍되어 있다.
- [0075] 한 구체예에서, 마우스의 생식선은 1개 이하, 2개 이하 또는 3개 이하의 재배열된 (V/J) 경쇄 서열을 포함한다.
- [0076] 한 구체예에서, 재배열된 V/J 서열은 κ 경쇄 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, κ 경쇄 서열은 인간 κ 경쇄 서열이다. 특정 구체예에서, κ 경쇄 서열은 인간 $V_{\kappa 1-39}/J$ 서열, 인간 $V_{\kappa 3-20}/J$ 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, κ 경쇄 서열은 인간 $V_{\kappa 1-39}/J_{\kappa 5}$ 서열이다. 특정 구체예에서, κ 경쇄 서열은 인간 $V_{\kappa 3-20}/J_{\kappa 1}$ 서열이다.
- [0077] 한 구체예에서, 마우스는 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열에 대해 마우스 κ 인트론 인핸서 5', 마우스 κ 3' 인핸서 및 그것들의 조합으로부터 선택된 서열을 마우스의 생식선에 더 포함한다.
- [0078] 한 구체예에서, 마우스는 미재배열 인간 V_H 유전자 절편, 미재배열 인간 D_H 유전자 절편 및 미재배열 인간 J_H 유전자 절편을 포함하며, 이때 상기 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편은 중쇄 불변 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 면역글로불린 중쇄 가변 유전자 서열을 형성하기 위해 재배열될 수 있다. 한 구체예에서, 마우스는 다수의 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편을 포함한다. 특정 구체예에서, 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편은 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 유전자좌에서 내인성 마우스 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편을 대체한다. 특정 구체예에서, 마우스는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 마우스 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편이 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 절편으로 대체된 것을 포함한다.
- [0079] 한 구체예에서, 마우스는 마우스 불변 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, 마우스는 인간 불변 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현한다.
- [0080] 한 구체예에서, 마우스는 C_H1 서열, 힌지 서열, C_H2 서열, C_H3 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된 마우스 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄를 발현한다.
- [0081] 한 구체예에서, 마우스는 C_H1 서열, 힌지 서열, C_H2 서열, C_H3 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄를 발현한다.
- [0082] 한 구체예에서, 마우스의 생식선에서 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 있다. 특정 구체예에서, 마우스의 생식선에서 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자좌에서 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 경쇄 V 및 J 서열을 대체한다.
- [0083] 한 측면으로, 단일 인간 V 절편 및 단일 인간 J 절편으로부터 생성된 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 비-대용 경쇄 서열을 포함하는 각각의 B 세포를 특징으로 하는 B 세포 집단을 포함하는 마우스가 제공되며, 이때 마우스의 생식선에 있는 경쇄 가변 서열만이 단일 인간 V 절편 및 단일 인간 J 절편으로부터 생성된 재배열된 서열이며, 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 각각의 B 세포는 동족의 인간 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유전자를 더 포함하고, 재배열된 경쇄 유전자는 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 체세포성 과돌연변이를 포함한다.
- [0084] 어떤 구체예에서, 성숙한 B 세포 집단이 각각의 성숙한 B 세포가 표면에 2개의 인간 V_L 유전자 절편 중 하나 및 5개 이하의 인간 J_L 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 비-대용 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하고, 이때 마우스의 생식선의 경쇄 가변 서열 ($V_L J_L$ 서열)만이 2개의 인간 V_L 유전자 절편 중 하나 및 5개 이하의 인간 J_L 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 재배열된 서열이고, 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 각각의 B 세포는 동족의 인간 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 유전자를 더 포함하며, 재배열된 경쇄 유전자는 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 5개 또는 그 이상의 체세포성 과돌연변이를 포함한다. 어떤 구체예에서, 재배열된 경쇄 유전자는 하나, 2개, 3개, 4개 또

는 5개의 체세포성 과돌연변이를 포함한다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술되는 것과 같은 마우스는 관심의 항원으로 면역화되었고, 어떤 구체예에서 성숙한 B 세포 집단은 관심의 항원에 결합하는 B 세포가 풍부하다.

[0085] 어떤 구체예에서, 성숙한 B 세포 집단이 각각의 성숙한 B 세포가 표면에 2개의 인간 V_L 유전자 절편 중 하나 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4, 또는 5개)의 인간 J_L 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 비-대용 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하고, 이때 V_L 유전자 절편은 동일하지 않은 2개의 V_L 유전자 절편으로 본질적으로 구성되며 V_L 유전자좌는 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_L 유전자 절편을 포함하고, 재배열된 경쇄 유전자를 포함하는 각각의 B 세포는 동종의 인간 중쇄 가변 도메인을 코딩화하는 유전자를 더 포함하며, 재배열된 경쇄 유전자는 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 5개 또는 그 이상의 체세포성 과돌연변이를 포함한다. 어떤 구체예에서, 재배열된 경쇄 유전자는 하나, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 체세포성 과돌연변이를 포함한다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술되는 것과 같은 마우스는 관심의 항원으로 면역화되었고, 어떤 구체예에서 성숙한 B 세포 집단은 관심의 항원에 결합하는 B 세포가 풍부하다.

[0086] 한 측면으로, 상기에서 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 다능성, 유도된 다능성 또는 분화전능성 세포가 제공된다. 특정 구체예에서 세포는 마우스 배아줄기(ES) 세포이다.

[0087] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 조직이 제공된다. 한 구체예에서, 조직은 본원에 기술된 것과 같은 마우스의 비장, 림프절 또는 골수로부터 유도된다.

[0088] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 핵이 제공된다. 한 구체예에서, 핵은 B 세포가 아닌 이배체 세포로부터 유래된다.

[0089] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 분리된 마우스 세포가 제공된다. 한 구체예에서, 그 세포는 ES 세포이다. 한 구체예에서, 세포는 림프구이다. 한 구체예에서, 그 림프구는 B 세포이다. 한 구체예에서, B 세포는 인간 유전자 절편으로부터 유도된 가변 도메인을 포함하는 키메라 중쇄; 및 재배열된 인간 $V_{\kappa}1-39/J$ 서열, 재배열된 인간 $V_{\kappa}3-20/J$ 서열 또는 그것들의 조합으로부터 유도된 경쇄를 발현하며; 이때 중쇄 가변 도메인은 마우스 불변 영역에 융합되고 경쇄 가변 도메인은 마우스 또는 인간 불변 영역에 융합된다.

[0090] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스의 B 세포로 만들어진 하이브리도마가 제공된다. 특정 구체예에서, B 세포는 관심의 에피토프를 포함하는 면역원으로 면역화된 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유래되고, B 세포는 관심의 에피토프에 결합하는 결합 단백질 발현하며, 결합 단백질은 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인 및 마우스 C_H 및, 재배열된 인간 $V_{\kappa}1-39/J_{\kappa}5$ 또는 재배열된 인간 $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}1$ 및 마우스 C_L 로부터 유도된 인간 V_L 도메인을 가진다.

[0091] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 유도된 공여 B 세포를 포함하는 마우스 배아(embryo)가 제공된다.

[0092] 한 측면으로, 벡터의 5' 및 3' 마우스 상동성 아암의 서열들을 참조로 전사 방향으로 5'에서 3'으로, 5' 마우스 상동성 아암, 인간 또는 마우스 면역글로불린 프로모터, 인간 또는 마우스 리더 서열 및 재배열된 인간 $V_{\kappa}1-39/J_{\kappa}5$ 또는 재배열된 인간 $V_{\kappa}3-20/J_{\kappa}1$ 로부터 선택된 인간 V_L 영역 및 3' 마우스 상동성 아암을 포함하는 표적화 벡터가 제공된다. 한 구체예에서, 5' 및 3' 상동성 아암은 5'쪽에 존재하고 마우스 C_{κ} 유전자에 근접한 인핸서 서열에 대해 5' 쪽 서열로 벡터를 겨냥한다. 한 구체예에서, 프로모터는 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 절편 프로모터이다. 특정 구체예에서, 프로모터는 인간 $V_{\kappa}3-15$ 프로모터이다. 한 구체예에서, 리더 서열은 마우스 리더 서열이다. 특정 구체예에서, 마우스 리더 서열은 마우스 $V_{\kappa}3-7$ 리더 서열이다.

[0093] 한 측면으로, 상기에서 기술된 것과 같지만, 5' 마우스 상동성 아암 대신에 5' 측에 부위-특이적 재조합효소 인지 부위 (SRRS)를 포함하는 인간 또는 마우스 프로모터와, 3' 마우스 상동성 아암 대신에 3' 측에 SRRS를 포함하는 인간 V_L 영역을 포함하는 표적화 벡터가 제공된다.

[0094] 한 측면으로, 역 키메라 항체는 본원에 기술된 것과 같은 마우스에 의해 만들어지는데, 이때 역 키메라 항체는 인간 V_L 및 마우스 C_L 을 포함하는 경쇄와, 인간 V_H 및 마우스 C_H 를 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0095] 한 측면으로, 항체의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 단일 세포에서 (a) 인간 C_H 유전자 서열과 융합된 본

원에 기술된 것과 같이 번역화된 마우스의 제 1 V_H 유전자 서열; (b) 인간 C_L 유전자 서열과 융합된 본원에 기술된 것과 같이 번역화된 마우스의 V_L 유전자 서열을 발현시키고; 및 (c) 그 세포를 전체 인간 항체를 발현시키기에 충분한 조건하에서 유지시키며, 항체를 분리하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 세포는 인간 C_H 유전자 서열과 융합된 본원에 기술된 것과 같은 제 2 번역화된 마우스의 제 2 V_H 유전자 서열을 포함하고, 제 1 V_H 유전자 서열은 제 1 에피토프를 인지하는 V_H 도메인을 코드화하며, 제 2 V_H 유전자 서열은 제 2 에피토프를 인지하는 V_H 도메인을 코드화하고, 이때 제 1 에피토프 및 제 2 에피토프는 동일하지 않다.

[0096] 한 측면으로, 에피토프-결합 단백질의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 관심의 에피토프를 포함하는 면역원으로 본원에 기술된 것과 같은 마우스를 노출시키고, 그 마우스를 관심의 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 생성하기 위해 마우스에 충분한 조건하에서 유지시키며, 관심의 에피토프에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 분리하는 것을 포함하고; 이때 에피토프-결합 단백질은 마우스 C_L 및 재배열된 인간 V_K 1-39J K_5 또는 재배열된 인간 V_K 3-20J K_1 로부터 유도된 인간 V_L 을 포함하는 경쇄와 결합된, 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 및 마우스 C_H 를 포함하는 중쇄를 포함한다.

[0097] 한 측면으로, 에피토프-결합 단백질을 발현하는 세포가 제공되는데, 이때 세포는 (a) 재배열된 인간 V_K 1-39J K_5 또는 재배열된 인간 V_K 3-20J K_1 로부터 유도된 인간 V_L 도메인을 코드화하는 인간 뉴클레오티드 서열, 이때 인간 뉴클레오티드 서열은 인간 면역글로불린 경쇄 불변 도메인 cDNA 서열 (예컨대 인간 K 불변 도메인 DNA 서열)에 (직접 또는 링커를 통해) 융합되는 인간 뉴클레오티드 서열; 및 (b) 제 1 인간 V_H 뉴클레오티드 서열로부터 유도된 인간 V_H 도메인을 코드화하는 제 1 인간 V_H 뉴클레오티드 서열, 이때 제 1 인간 V_H 뉴클레오티드 서열은 인간 면역글로불린 중쇄 불변 도메인 cDNA 서열에 (직접 또는 링커를 통해) 융합되는 제 1 인간 V_H 뉴클레오티드 서열을 포함하고; 에피토프-결합 단백질은 제 1 에피토프를 인지한다. 한 구체예에서, 에피토프-결합 단백질은 10^{-6} M보다 아래, 10^{-8} M보다 아래, 10^{-9} M보다 아래, 10^{-10} M보다 아래, 10^{-11} M보다 아래 또는 10^{-12} M보다 아래의 해리 상수로 제 1 에피토프에 결합한다.

[0098] 한 구체예에서, 세포는 제 2 인간 V_H 도메인을 코드화하는 제 2 인간 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 이때 제 2 인간 서열은 인간 면역글로불린 중쇄 불변 도메인 cDNA 서열에 (직접 또는 링커를 통해) 융합되며, 제 2 인간 V_H 도메인은 제 1 에피토프를 특이하게 인지하지 못하고 (예컨대 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 또는 그 이상의 해리 상수를 나타냄), 에피토프-결합 단백질은 제 1 에피토프와 제 2 에피토프를 인지하며, 제 1 및 제 2 면역글로불린 중쇄는 각각 (a)의 동일한 경쇄와 결합한다.

[0099] 한 구체예에서, 제 2 V_H 도메인은 10^{-6} M보다 아래, 10^{-7} M보다 아래, 10^{-8} M보다 아래, 10^{-9} M보다 아래, 10^{-10} M보다 아래, 10^{-11} M보다 아래 또는 10^{-12} M보다 아래의 해리 상수로 제 2 에피토프에 결합한다.

[0100] 한 구체예에서, 에피토프-결합 단백질은 제 1 면역글로불린 중쇄 및 제 2 면역글로불린 중쇄를 포함하고, 각각은 인간 V_K 1-39J K_5 또는 인간 V_K 3-20J K_1 로부터 선택된 재배열된 인간 V_L 영역으로부터 유도된 동일한 경쇄에 결합되며, 제 1 면역글로불린 중쇄는 나노 몰에서 피코 몰 범위의 해리 상수로 제 1 에피토프와 결합하고, 제 2 면역글로불린 중쇄는 나노 몰에서 피코 몰 범위의 해리 상수로 제 2 에피토프와 결합하며, 제 1 에피토프와 제 2 에피토프는 동일하지 않고, 제 1 면역글로불린 중쇄는 제 2 에피토프에 결합하지 않거나 또는 제 2 에피토프에 마이크로 몰 범위보다 약한 (예컨대 밀리 몰 범위) 해리 상수로 결합하고, 제 2 면역글로불린 중쇄는 제 1 에피토프에 결합하지 않거나 제 1 에피토프에 마이크로 몰 범위보다 약한 (예컨대 밀리 몰 범위) 해리 상수로 결합하며, V_L , 제 1 면역글로불린 중쇄의 V_H 및 제 2 면역글로불린 중쇄의 V_H 중 하나 또는 그 이상은 체세포적으로 돌연변이된다.

[0101] 한 구체예에서, 제 1 면역글로불린 중쇄는 단백질 A-결합 잔기를 포함하고, 제 2 면역글로불린 중쇄는 단백질 A-결합 잔기가 결핍되어 있다.

[0102] 한 구체예에서, 세포는 핵산 서열을 발현하는 CHO, COS, 293, HeLa 및 망막 세포 (예컨대 PERC.6™ 세포)로부터 선택된다.

- [0103] 한 측면으로, 인간 V_H 및 마우스 중쇄 불변 도메인, 인간 V_L 및 마우스 경쇄 불변 도메인을 포함하는 역 키메라 항체가 제공되는데, 이때 항체는 본원에 기술된 것과 같은 마우스를 에피토프를 포함하는 면역원으로 면역시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조되고, 항체는 마우스를 면역시킨 면역원의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 한 구체예에서, V_L 도메인은 체세포적으로 돌연변이된다. 한 구체예에서, V_H 도메인은 체세포적으로 돌연변이된다. 한 구체예에서, V_L 도메인과 V_H 도메인은 둘 다 체세포적으로 돌연변이된다. 한 구체예에서, V_L 은 마우스 C_k 도메인에 연결된다.
- [0104] 한 측면으로, 내인성 마우스 중쇄 유전자좌에서 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 V_H 유전자 절편을 대체하는 인간 V_H 유전자 절편; 모든 마우스 경쇄 유전자 절편을 대체하는, 재배열된 $V_{k1-39/J}$ 및 재배열된 $V_{k3-20/J}$ 또는 그것들의 조합으로부터 선택된 하나 또는 2개보다 많지 않은 재배열된 인간 경쇄 V_L/J_L 서열을 포함하는 마우스가 제공되고; 이때 인간 중쇄 가변 유전자 절편은 마우스 불변 유전자에 연결되며, 재배열된 인간 경쇄 서열은 인간 또는 마우스 불변 유전자에 연결된다.
- [0105] 어떤 구체예에서, 내인성 마우스 면역글로불린 중쇄 유전자좌에서 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 면역글로불린 V_H 유전자 절편을 대체하는 인간 면역글로불린 V_H 유전자 절편; 모든 마우스 면역글로불린 경쇄 유전자 절편을 대체하는, 2개 이하의 미재배열 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편 및 둘 또는 그 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 미재배열 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편 또는 5개의 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편을 포함하는 마우스가 제공되며; 이때 인간 면역글로불린 V_H 유전자 절편은 마우스 면역글로불린 불변 유전자에 연결되고, 미재배열 인간 면역글로불린 V_L 및 J_L 유전자 절편은 인간 또는 비-인간 면역글로불린 불변 유전자에 연결된다. 어떤 구체예에서, 비-인간 불변 유전자는 마우스 면역글로불린 불변 유전자이다. 어떤 구체예에서, 비-인간 면역글로불린 불변 유전자는 쥐 면역글로불린 불변 유전자이다.
- [0106] 한 측면으로, 마우스 ES 세포는 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 중쇄 가변 유전자 절편이 인간 중쇄 가변 유전자 절편으로 대체된 것과 하나 또는 2개보다 많지 않은 재배열된 인간 경쇄 V_L/J_L 서열을 포함하고, 이때 인간 중쇄 가변 유전자 절편은 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 유전자에 연결되며, 재배열된 인간 경쇄 V_L/J_L 서열은 마우스 또는 인간 면역글로불린 경쇄 불변 유전자에 연결된다. 특정 구체예에서, 경쇄 불변 유전자는 마우스 불변 유전자이다.
- [0107] 어떤 구체예에서, 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 면역글로불린 V_H 유전자 절편이 인간 면역글로불린 V_H 유전자 절편으로 대체되고 2개 이하의 미재배열 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 미재배열 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편을 포함하는 마우스 ES 세포가 제공되며, 이때 인간 면역글로불린 V_H 유전자 절편은 마우스 면역글로불린 중쇄 불변 유전자에 연결되고, 미재배열 인간 면역글로불린 V_L 및 J_L 유전자 절편은 비-인간 또는 인간 면역글로불린 경쇄 불변 유전자에 연결된다. 어떤 특정 구체예에서, 비-인간 면역글로불린 경쇄 불변 유전자는 마우스 면역글로불린 불변 유전자이다. 어떤 특정 구체예에서, 마우스는 5개의 미재배열 면역글로불린 J_L 유전자 절편을 포함한다.
- [0108] 어떤 구체예에서, 적어도 하나의, 어떤 구체예에서는 모든 마우스 V_L 유전자 절편이 하나의 인간 V_L 유전자 절편 또는 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편에 의해 대체되어 있는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 마우스의 인간 V_L 유전자 절편은 항체의 면역글로불린 V_L 도메인을 코드화하기 위해 둘 이상의 인간 J_L 유전자 절편 중 하나에 재배열할 수 있다. 어떤 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 마우스의 경쇄 유전자의 인간 V_L 유전자 절편(들)은 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_L 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다.
- [0109] 어떤 구체예에서, 재배열 전에 내인성 V_L 유전자 절편을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않는다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 전에 내인성 J_L 유전자 절편을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않는다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 전

에 내인성 V_L 및 J_L 유전자 절편을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않는다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다.

[0110] 어떤 구체예에서, 재배열 후에 내인성 V_L 유전자 절편을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않는다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 후에 내인성 J_L 유전자 절편을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않는다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 후에 내인성 V_L 및 J_L 유전자 절편을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하지 않는다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다.

[0111] 어떤 구체예에서, 재배열 전에 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_L 유전자 절편을 함유한다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 가지는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 전에 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편과 5개의 인간 J_L 유전자 절편을 함유한다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다.

[0112] 어떤 구체예에서, 재배열 후에 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편 및 5개 이하 (예컨대 5, 4, 3, 2 또는 1개)의 인간 J_L 유전자 절편을 함유한다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 가지는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 후에 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편과 하나, 2, 3, 4 또는 5개의 인간 J_L 유전자 절편을 함유한다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다.

[0113] 어떤 구체예에서, 재배열 후에 하나의 인간 V_L 유전자 절편 및 5개 이하 (예컨대 5, 4, 3, 2 또는 1개)의 인간 J_L 유전자 절편을 함유한다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 가지는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 후에 하나의 인간 V_L 유전자 절편과 하나, 2, 3, 4 또는 5개의 인간 J_L 유전자 절편을 함유한다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다.

[0114] 다양한 구체예에서, 인간 V_L 및 J_L 유전자 절편들은 인간 V_K 및 J_K 유전자 절편들이다. 다양한 구체예에서, 인간 V_K 절편들은 인간 V_{K1-39} 유전자 절편 및 인간 V_{K3-20} 유전자 절편으로부터 선택된다. 어떤 구체예에서, 인간 V_K 절편은 인간 V_{K1-39} 및 인간 V_{K3-20} 이다. 어떤 구체예에서, 인간 J_K 절편은 J_{K1} , J_{K2} , J_{K3} , J_{K4} , J_{K5} 유전자 절편 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 어떤 구체예에서, 인간 J_K 유전자 절편은 J_{K1} , J_{K2} , J_{K3} , J_{K4} , J_{K5} 이다.

[0115] 어떤 구체예에서, 재배열 전에 도 1, 도 2, 도 3 또는 도 9의 구조와 실질적으로 동일한 구조를 함유한다는 점에서 도 19의 참조 구조와 상이한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다. 어떤 구체예에서, 재배열 전에 도 1, 도 2, 도 3 또는 도 9의 구조와 동일한 구조를 가지는 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다.

[0116] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스에 의해 제조된 항원-결합 단백질이 제공된다. 특정 구체예에서, 항원-결합 단백질은 마우스 불변 영역과 융합된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 및 V_{K1-39} 유전자 절편 또는 V_{K3-20} 유전자 절편으로부터 유도된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역을 포함하고, 이때 경쇄 불변 영역은 마우스 불변 영역이다.

[0117] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터의 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열로부터 만들어진 전체 인간 항원-결합 단백질이 제공되며, 이때 항원-결합 단백질은 본원에 기술된 것과 같은 마우스의 서열로부터 유도된 인간 가변 영역을 포함하는 전체 인간 중쇄, 및 V_{K1-39} 또는 V_{K3-20} 을 포함하는 전체 인간 경쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 1 내지 5개의 체세포 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 마우스의 B 세포에서 중쇄 가변 영역과 쌍을 이룬 동족의 경쇄 가변 영역이다.

[0118] 한 구체예에서, 전체 인간 항원-결합 단백질은 제 1 중쇄 및 제 2 중쇄를 포함하고, 이때 제 1 중쇄 및 제 2 중쇄는 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 독립적으로 유도된 비-동일성 가변 영역을 포함하며, 제 1 및 제 2 중쇄는 각각 V_{K1-39} 유전자 절편 또는 V_{K3-20} 유전자 절편으로부터 유도된 인간 경쇄와 결합된 숙주세포로부터

터 발현된다. 한 구체예에서, 제 1 중쇄는 제 1 항원의 제 1 에피토프에 특이적으로 결합하는 제 1 중쇄 가변 영역을 포함하고, 제 2 중쇄는 제 2 항원의 제 2 에피토프에 특이적으로 결합하는 제 2 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 구체예에서, 제 1 항원 및 제 2 항원은 상이하다. 특정 구체예에서, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일하고, 제 1 에피토프와 제 2 에피토프는 동일하지 않다; 특정 구체예에서, 제 1 에피토프의 결합 단백질의 제 1 분자에 의한 결합은 결합 단백질의 제 2 항원에 의한 제 2 에피토프의 결합을 차단하지 못한다.

[0119] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 마우스의 인간 면역글로불린 서열로부터 유도된 전체 인간 결합 단백질은 제 1 면역글로불린 중쇄 및 제 2 면역글로불린 중쇄를 포함하고, 이때 제 1 면역글로불린 중쇄는 제 1 면역글로불린 중쇄의 가변 영역에 동일하지 않은 제 1 가변 영역을 포함하고, 제 1 면역글로불린 중쇄는 야생형 단백질 A 결합 결정기를 포함하며, 제 2 중쇄는 야생형 단백질 A 결합 결정기가 결핍되어 있다. 한 구체예에서, 제 1 면역글로불린 중쇄는 분리 조건하에서 단백질 A에 결합하고, 제 2 면역글로불린 중쇄는 단백질 A에 결합하지 않거나, 분리 조건하에서 단백질 A에 결합하는 제 1 면역글로불린 중쇄보다 적어도 10배, 100배 또는 1000배 더 약하게 단백질 A에 결합한다. 특정 구체예에서, 제 1 및 제 2 중쇄는 IgG1 아이소타입이고, 이때 제 2 중쇄는 95R (EU 435R), 96F (EU 436F) 및 그것들의 조합으로부터 선택된 변형을 포함하며, 제 1 중쇄는 그런 변형이 결핍되어 있다.

[0120] 한 측면으로, 이중특이성 항원-결합 단백질의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 제 1 에피토프를 포함하는 관심의 제 1 항원에 본원에 기술된 것과 같은 제 1 마우스를 노출시키고, 제 2 에피토프를 포함하는 관심의 제 2 항원에 본원에 기술된 것과 같은 제 2 마우스를 노출시키며, 관심의 항원에 대해 제 1 및 제 2 마우스가 각각 면역 반응을 일으키도록 허용하고, 제 1 마우스에서 관심의 제 1 항원의 제 1 에피토프에 결합하는 제 1 인간 중쇄 가변 영역을 확인하며, 제 2 마우스에서 관심의 제 2 항원의 제 2 에피토프에 결합하는 제 2 인간 중쇄 가변 영역을 확인하며, 관심의 제 1 항원의 제 1 에피토프에 결합하는 제 1 중쇄를 코드화하는 제 1 전체 인간 중쇄 유전자를 제조하고, 관심의 제 2 항원의 제 2 에피토프에 결합하는 제 2 중쇄를 코드화하는 제 2 전체 인간 중쇄 유전자를 제조하며, 이중특이성 항원-결합 단백질을 형성하기 위하여 인간 V_K1-39 또는 인간 V_K3-20 유전자 절편으로부터 유도된 단일한 전체 인간 경쇄를 발현하는 세포에서 제 1 중쇄 및 제 2 중쇄를 발현시키고, 이중특이성 항원-결합 단백질을 분리하는 것을 포함한다.

[0121] 한 구체예에서, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일하지 않다.

[0122] 한 구체예에서, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일하고 제 1 에피토프와 제 2 에피토프는 동일하지 않다. 한 구체예에서, 제 1 에피토프에 대한 제 1 중쇄 가변 영역의 결합은 제 2 에피토프에 대한 제 2 중쇄 가변 영역의 결합을 차단하지 못한다.

[0123] 한 구체예에서, 인간 경쇄는 제 1 중쇄와 쌍을 이룰 때 제 1 항원의 제 1 에피토프에 특이적으로 결합하고, 제 2 중쇄와 쌍을 이룰 때 제 2 항원의 제 2 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0124] 한 구체예에서, 제 1 항원은 가용성 항원 및 세포 표면 항원 (예컨대 종양 항원)으로부터 선택되고, 제 2 항원은 세포 표면 수용체를 포함한다. 특정 구체예에서, 세포 표면 수용체는 면역글로불린 수용체이다. 특정 구체예에서, 면역글로불린 수용체는 Fc 수용체이다. 한 구체예에서, 제 1 항원과 제 2 항원은 동일한 세포 표면 수용체이고, 제 1 에피토프에 대한 제 1 중쇄의 결합은 제 2 에피토프에 대한 제 2 중쇄의 결합을 차단하지 못한다.

[0125] 한 구체예에서, 경쇄의 경쇄 가변 도메인은 2 내지 5개의 체세포성 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 도메인은 제 1 또는 제 2 중쇄 가변 도메인 중 어느 하나로 면역된 제 1 또는 제 2 마우스의 B 세포에서 발현된 체세포적으로 돌연변이된 동족 경쇄이다. 한 구체예에서, 세포의 경쇄는 생식선 서열을 포함한다.

[0126] 한 구체예에서, 제 1 전체 인간 중쇄는 단백질 A에 대한 그것의 친화성을 감소시키는 아미노산 변형을 내포하고, 제 2 전체 인간 중쇄는 단백질 A에 대한 그것의 친화성을 감소시키는 변형을 포함하지 않는다.

[0127] 한 측면으로, 제 1 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체의 제조 방법이 제공되는데, 이때 방법은 (a) 제 1 항원에 특이적인 제 1 인간 중쇄 가변(V_H) 도메인을 코드화하는 제 1 핵산 서열을 확인하고; (b) 제 2 항원에 특이적인 제 2 인간 중쇄 가변(V_H) 도메인을 코드화하는 제 2 핵산 서열을 확인하며; (c) (a)의 V_H 영역과 쌍을 이룰 때 제 1 항원에 특이적으로 결합하고, (b)의 V_H 영역과 쌍을 이룰 때 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 인간 경쇄 가변 (V_L) 영역을 코드화하는 제 3 핵산 서열을 제공하고; (d) 제 1, 제 2 및 제 3 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 배양하여 이중특이성 항체를 형성하기 위해 제 1 및 제 2 인간 V_H 영역 및 인간 V_L 영역의 발현을 허용하며; (e) 상기 이중특이성 항체를 회수하는 것을 포함한다. 다양한 측면으로, 제 1 및 제 2

항원은 서로 다르다. 다양한 측면으로 제 1 및 제 2 핵산 서열은 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 면역된 마우스로부터 분리되고, 이때 재배열된 면역글로불린 서열은 마우스의 생식선에 존재한다.

- [0128] 한 구체예에서, 인간 V_L 영역은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 유전자 절편 또는 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편을 포함하는 재배열된 인간 경쇄 서열로부터 유도된다. 특정 구체예에서, 재배열된 인간 경쇄 서열은 생식선 서열이다 (즉 V 유전자 절편 서열 내에서 체세포성 과돌연변이를 포함하지 않는다).
- [0129] 한 구체예에서, 제 3 핵산 서열은 마우스의 생식선에 있는 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 마우스로부터 분리된다. 한 구체예에서, 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 또는 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편을 포함한다. 특정 구체예에서, 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 유전자 절편이다. 한 구체예에서, 인간 면역글로불린 V_L 영역은 변형된 내인성 면역글로불린 경쇄 유전자좌로부터 발현된다.
- [0130] 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 항원은 한 분자 상에 존재한다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 항원은 상이한 분자 상에 존재한다. 다양한 구체예에서, 제 1 또는 제 2 핵산 서열은 코드화된 중쇄의 단백질 A에 대한 친화성을 감소시키는 변형을 포함한다.
- [0131] 한 구체예에서, 제 1 또는 제 2 핵산 서열은 V_{H1-2} , V_{H1-3} , V_{H1-8} , V_{H1-18} , V_{H1-24} , V_{H1-46} , V_{H1-58} , V_{H1-69} , V_{H2-5} , V_{H2-26} , V_{H2-70} , V_{H3-7} , V_{H3-9} , V_{H3-11} , V_{H3-13} , V_{H3-15} , V_{H3-20} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-33} , V_{H3-43} , V_{H3-48} , V_{H3-53} , V_{H3-64} , V_{H3-72} , V_{H3-73} , V_{H4-31} , V_{H4-34} , V_{H4-39} , V_{H4-59} , V_{H5-51} 및 V_{H6-1} 로부터 선택된 인간 중쇄 유전자 절편을 포함하는 재배열된 인간 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 중쇄 유전자 절편은 V_{H2-5} , V_{H3-23} 또는 V_{H3-30} 이다.
- [0132] 한 측면으로, 제 1 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체의 제조 방법이 제공되는데, 이때 방법은 (a) 제 1 항원에 특이적인 제 1 인간 중쇄 가변(V_H) 도메인을 코드화하는 제 1 핵산 서열을 확인하고; (b) 제 2 항원에 특이적인 제 2 인간 중쇄 가변(V_H) 도메인을 코드화하는 제 2 핵산 서열을 확인하며; (c) (a)의 V_H 영역과 쌍을 이룰 때 제 1 항원에 특이적으로 결합하고, (b)의 V_H 영역과 쌍을 이룰 때 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 또는 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편으로부터 유도된 인간 경쇄 가변 (V_L) 영역을 코드화하는 제 3 핵산 서열을 제공하고; (d) 제 1, 제 2 및 제 3 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 배양하여 이중특이성 항체를 형성하기 위해 제 1 및 제 2 인간 V_H 영역 및 인간 V_L 영역의 발현을 허용하며; (e) 상기 이중특이성 항체를 회수하는 것을 포함한다. 다양한 측면으로, 제 1 및 제 2 항원은 서로 다르다. 다양한 측면으로, 제 1 및 제 2 핵산 서열은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 또는 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편으로부터 유도된 재배열된 면역글로불린 서열로부터 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 면역된 마우스로부터 분리되고, 이때 재배열된 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 또는 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편은 마우스의 생식선에 존재한다.
- [0133] 한 구체예에서, 제 3 핵산 서열은 생식선 서열이다 (즉 V 유전자 절편 서열 내에 체세포성 과돌연변이를 포함하지 않는다). 한 구체예에서, 제 3 핵산 서열은 마우스의 생식선에 있는 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 또는 인간 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편으로부터 유도된 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 마우스로부터 분리된다. 특정 구체예에서, 제 3 핵산 서열은 상보성 결정 영역 (CDR) 및/또는 프레임워크 영역 (FWR)에 2 내지 5개의 체세포성 과돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 인간 면역글로불린 V_L 영역은 변형된 내인성 면역글로불린 경쇄 유전자좌로부터 발현된다.
- [0134] 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 항원은 한 분자 상에 존재한다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 항원은 상이한 분자 상에 존재한다. 한 구체예에서, 제 1 또는 제 2 핵산 서열은 단백질 A에 대한 코드화된 중쇄의 친화성을 감소시키는 변형을 포함한다.
- [0135] 한 구체예에서, 제 1 또는 제 2 핵산 서열은 V_{H1-2} , V_{H1-3} , V_{H1-8} , V_{H1-18} , V_{H1-24} , V_{H1-46} , V_{H1-58} , V_{H1-69} , V_{H2-5} , V_{H2-26} , V_{H2-70} , V_{H3-7} , V_{H3-9} , V_{H3-11} , V_{H3-13} , V_{H3-15} , V_{H3-20} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-33} , V_{H3-43} , V_{H3-48} , V_{H3-53} , V_{H3-64} , V_{H3-72} , V_{H3-73} , V_{H4-31} , V_{H4-34} , V_{H4-39} , V_{H4-59} , V_{H5-51} 및 V_{H6-1} 로부터 선택된

인간 중쇄 유전자 절편을 포함하는 재배열된 인간 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 중쇄 유전자 절편은 V_H2-5 , V_H3-23 또는 V_H3-30 이다.

- [0136] 한 측면으로, 이중특이성 항체의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 관심의 항원에 본원에 기술된 것과 같은 마우스를 노출시키고, 마우스가 관심의 항원에 대한 면역 반응을 일으키도록 허용하며, 관심의 항원의 제 1 에피토프에 결합하는 제 1 인간 중쇄 가변 영역을 확인하고, 관심의 항원의 제 2 에피토프에 결합하는 제 2 인간 중쇄 가변 영역을 확인하며, 관심의 항원의 제 1 에피토프에 결합하는 제 1 중쇄를 코드화하는 제 1 전체 인간 중쇄 유전자를 제조하고, 관심의 항원의 제 2 에피토프에 결합하는 제 2 중쇄를 코드화하는 제 2 전체 인간 중쇄 유전자를 제조하며, 이중특이성 항원-결합 단백질을 형성하기 위하여 인간 V_K1-39 또는 인간 V_K3-20 유전자 절편으로부터 유도된 단일한 전체 인간 경쇄를 발현하는 세포에서 제 1 중쇄 및 제 2 중쇄를 발현시키고, 이 중특이성 항원-결합 단백질을 분리하는 것을 포함한다.
- [0137] 한 구체예에서, 제 1 에피토프 및 제 2 에피토프는 동일하지 않다. 한 구체예에서, 제 1 중쇄 가변 영역의 제 1 에피토프에 대한 결합은 제 2 에피토프에 대한 제 2 중쇄 가변 영역의 결합을 차단하지 못한다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 중쇄는 제 1 및 제 2 에피토프에 동시에 결합할 수 있다.
- [0138] 한 구체예에서, 이중특이성 항체는 제 1 및 제 2 에피토프에 동시에 결합한다. 한 구체예에서, 이중특이성 항체는 제 1 및 제 2 에피토프에 독립적으로 결합한다.
- [0139] 한 구체예에서, 이중특이성 항체의 항원에 대한 결합 반응은 항원에 대한 제 1 중쇄 가변 영역의 결합 반응보다 약 2배 더 높다. 한 구체예에서, 항원에 대한 이중특이성 항체의 결합 반응은 항원에 대한 제 2 중쇄 가변 영역의 결합 반응보다 약 2배 더 높다. 한 구체예에서, 항원에 대한 이중특이성 항체의 결합 반응은 항원에 대한 제 1 중쇄 가변 영역 및/또는 제 2 중쇄 가변 영역의 결합 반응과 거의 동일하거나 거의 동등하다.
- [0140] 한 구체예에서, 항원은 가용성 항원, 세포 표면 항원 (예컨대 중양 항원) 및 세포 표면 수용체로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 세포 표면 수용체는 면역글로불린 수용체이다. 특정 구체예에서, 면역글로불린 수용체는 Fc 수용체이다.
- [0141] 한 구체예에서, 경쇄의 경쇄 가변 도메인은 2 내지 5개의 체세포성 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄 가변 도메인은 제 1 또는 제 2 중쇄 가변 도메인 중 어느 하나로 면역된 마우스의 B 세포에서 발현된 체세포적으로 돌연변이된 동족의 경쇄이다.
- [0142] 한 구체예에서, 제 1 전체 인간 중쇄는 단백질 A에 대한 그것의 친화성을 감소시키는 아미노산 변형을 내포하고, 제 2 전체 인간 중쇄는 단백질 A에 대한 그것의 친화성을 감소시키는 변형을 포함하지 않는다.
- [0143] 다양한 구체예에서, 이중특이성 항체의 제조 방법은 이중특이성 항체의 각각의 중쇄 가변 영역과 쌍을 이루는 공통 경쇄를 사용함으로써 증강된다. 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 공통 경쇄를 사용하는 것은 원래의 동족 경쇄를 사용하는 것과 비교하여 이중특이성이 결핍된 면역글로불린의 부적절한 종류의 수를 감소시킨다. 다양한 구체예에서, 이중특이성 항체의 중쇄 가변 영역은 공통 경쇄를 포함하는 단일특이성 항체로부터 확인된다. 다양한 구체예에서, 이중특이성 항체의 중쇄 가변 영역은 제한된 인간 경쇄 레퍼토리를 발현하기 위해 이전에 공학처리되었던 마우스 B 세포 내에서 생체 내에서 재배열된 인간 중쇄 가변 유전자 절편, 또는 인간 중쇄와 동족의 단일 인간 경쇄를 포함하고, 관심의 항원과의 노출에 대한 반응으로 하나 또는 두 개의 가능한 인간 경쇄 가변 영역 중 하나와 동족인 다수의 인간 중쇄 가변 영역을 함유하는 키메라 항체 레퍼토리를 생성하며, 이때 키메라 항체는 관심의 항원에 특이적이다.
- [0144] 다양한 측면으로, 이중특이성 항체의 제조 방법이 제공되는데, 이중특이성 항체는 1) 제 1 폴리펩티드 및 제 2 폴리펩티드, 및 2) 제 1 및 제 2 폴리펩티드의 각각의 결합 도메인을 포함하고, 이때 1) 제 1 및 제 2 폴리펩티드는 각각 제 1 및 제 2 폴리펩티드가 이량체를 형성하게 허용하는 다량체화 도메인 (예컨대 면역글로불린 Fc 도메인)을 포함하며, 다량체화 도메인은 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사이의 안정적인 상호작용을 촉진하고, 다량체화 도메인들 중 하나는 단백질 A에 대한 그것의 친화성을 감소시키는 아미노산 변형을 내포하고 다른 다량체화 도메인은 변형이 결핍되어 있으며, 2) 각각의 결합 도메인은 가변 중쇄 및 가변 경쇄를 포함하고, 제 1 폴리펩티드의 가변 경쇄 및 제 2 폴리펩티드의 가변 경쇄는 공통 아미노산 서열을 가지며, 그 공통 서열은 각각의 폴리펩티드의 원래의 경쇄에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 및 가장 바람직하게는 100%의 아미노산 서열 동일성을 가진다. 다양한 구체예에서, 가변 경쇄는 인간 V_K1-39 또는 인간 V_K3-20 유전자 절편으로부터 유도된다. 다양한 구체예에서, 가변 경쇄는 재배열된 인간 경쇄 서

열이다. 다양한 구체예에서, 가변 경쇄는 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 분리된다.

- [0145] 다양한 구체예에서, 방법은 (i) 제 1 폴리펩티드, 제 2 폴리펩티드 및 공통 경쇄를 코드화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 이때 핵산은 발현되고; (ii) 숙주 세포 배양물로부터 이중특이성 항체를 회수하는 단계를 포함하고; 한 구체예에서, 제 1 폴리펩티드를 코드화하는 핵산 또는 제 2 폴리펩티드를 코드화하는 핵산은 단백질 A에 대한 그것의 친화성을 감소시키는 아미노산 변형을 내포한다. 한 구체예에서, 제 1 폴리펩티드, 제 2 폴리펩티드 및 공통 경쇄를 코드화하는 핵산은 단일 벡터에 또는 별도의 벡터들에 존재한다. 한 구체예에서, 숙주 세포는 선행 문단에 따르는 이중특이성 항체를 제조하기 위해 사용된다.
- [0146] 한 측면으로, 이중특이성 항체의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 (a) 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 분리된 제 1 인간 중쇄 가변 영역을 코드화하는 제 1 핵산을 선택하고; (b) 본원에 기술된 것과 같거나 별도의 마우스로부터 분리된 제 2 인간 중쇄 가변 영역을 코드화하는 제 2 핵산을 선택하며; (c) 본원에 기술된 것과 같거나 별도의 마우스로부터 분리된 또는 본원에 기술된 것과 같은 재배열된 인간 경쇄 가변 영역으로부터 유도된 인간 경쇄 가변 영역을 코드화하는 제 2 핵산을 제공하고; (d) 숙주 세포 안에 제 1, 제 2 및 제 3 핵산을 도입하고 그 숙주 세포를 배양하여 제 1, 제 2 및 제 3 핵산의 발현이 일어나며; (e) 세포 배양물로부터 형성된 이중특이성 항체를 회수하는 것을 포함한다.
- [0147] 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 인간 중쇄 가변 영역은 체세포적으로 돌연변이된다. 특정 구체예에서, 제 1 및 제 2 인간 중쇄 가변 영역은 1-2, 1-3, 1-8, 1-18, 1-24, 1-46, 1-58, 1-69, 2-5, 2-26, 2-70, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-16, 3-20, 3-21, 3-23, 3-30, 3-33, 3-43, 3-48, 3-53, 3-64, 3-72, 3-73, 4-31, 4-34, 4-39, 4-59, 5-51 및 6-1 인간 V_H 유전자 절편으로부터 선택된 재배열된 인간 V_H 유전자 절편으로부터 독립적으로 유도된다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 인간 중쇄 가변 영역은 2-5, 3-30 및 3-23으로부터 선택된 재배열된 인간 V_H 유전자 절편으로부터 독립적으로 유도된다. 한 구체예에서, 제 1 인간 중쇄 가변 영역은 인간 V_H2-5 유전자 절편으로부터 유도되고 제 2 인간 중쇄 가변 영역은 인간 V_H3-30 유전자 절편으로부터 유도된다. 한 구체예에서, 제 1 인간 중쇄 가변 영역은 인간 V_H3-30 유전자 절편으로부터 유도되고 제 2 인간 중쇄 가변 영역은 인간 V_H3-23 유전자 절편으로부터 유도된다. 한 구체예에서, 제 1 인간 중쇄 가변 영역은 인간 V_H3-23 유전자 절편으로부터 유도되고 제 2 인간 중쇄 가변 영역은 인간 V_H3-30 유전자 절편으로부터 유도된다.
- [0148] 한 구체예에서, 제 1 또는 제 2 핵산은 단계 (c) 전에 변형되는데, 이때 제 1 또는 제 2 핵산은 단백질 A에 대한 친화성이 감소되도록 변형된다.
- [0149] 한 구체예에서, 제 2 핵산은 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 분리된다. 한 구체예에서, 제 3 핵산은 2 내지 5개의 체세포성 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 제 3 핵산은 인간 V_K1-39 유전자 절편으로부터 유도된 인간 경쇄 가변 영역을 코드화한다. 한 구체예에서, 제 3 핵산은 인간 V_K3-20 유전자 절편으로부터 유도된 인간 경쇄 가변 영역을 코드화한다.
- [0150] 한 구체예에서, 제 3 핵산은 재배열된 인간 경쇄 가변 영역으로부터 유도된다. 한 구체예에서, 재배열된 인간 경쇄 가변 영역은 인간 V_K1-39 유전자 절편 또는 인간 V_K3-20 유전자 절편으로부터 유도된 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 재배열된 인간 경쇄 가변 영역은 생식선 인단 V_K1-39 서열을 포함한다 (즉 V 유전자 절편 서열 내에 체세포성 과돌연변이를 포함하지 않는다). 한 구체예에서, 재배열된 인간 경쇄 가변 영역은 생식선 인간 V_K3-20 서열을 포함한다.
- [0151] 다양한 구체예에서, 그것의 생식선에서 재배열된 인간 경쇄 서열이 결핍되어 있는 변형 마우스로부터 유도된 가변 도메인을 포함하는 제 1 인간 중쇄를 통합하는 이중특이성 항체의 제조 방법이 제공되는데, 이때 제 1 인간 중쇄는 인간 V_K1-39 또는 인간 V_K3-20 유전자 절편으로부터 유도된 재배열된 인간 경쇄 가변 영역을 포함하는 동족 인간 경쇄와 쌍을 이룬다. 다양한 구체예에서, 제 1 인간 중쇄로부터의 상이한 특이성을 가지는 제 2 인간 중쇄는 본원에 기술된 것과 같은 면역된 마우스로부터 확인된다. 두 개의 중쇄 및 공통 경쇄를 코드화하는 핵산은 선행 단락에서 기술된 것과 같은 숙주 세포에 도입되어 세 개의 사슬이 전부 발현되며 이중특이성 항체가 세포 배양물로부터 회수된다.
- [0152] 한 구체예에서, 마우스는 제 1 인간 중쇄 가변 도메인을 생성하기 위해 사용된 동일한 항원으로 면역된다. 한 구체예에서, 마우스는 제 1 인간 중쇄 가변 도메인을 생성하기 위해 사용된 상이한 항원으로 면역된다.
- [0153] 한 측면으로, 이중특이성 항체를 코드화하는 핵산과 그 핵산을 포함하는 숙주 세포를 포함하여, 이중특이성 항

체를 제조하기 위해 단일 인간 경쇄와 쌍을 이룰 수 있는 인간 중쇄의 선택 방법이 제공된다.

- [0154] 한 측면으로, 단일특이성 항체와 같은 바람직하지 못한 생성물을 증가하여 세포 배양물에서 바람직한 이중특이성 항체의 양을 증가시키는 방법이 제공되는데, 이때 이중특이성 항체의 중쇄 중 하나는 단백질 A에 대한 친화성을 감소시키기 위해 변형된다.
- [0155] 한 측면으로, 분리된 숙주 세포가 제공되는데, 이때 숙주 세포는 (a) 마우스의 생식선에 있는 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 제 1 항원으로 면역된 마우스로부터 분리되는, 제 1 항원에 결합하는 제 1 인간 중쇄 가변 영역을 코드화하는 제 1 핵산 서열; (b) 마우스의 생식선에 있는 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 제 2 항원으로 면역된 마우스로부터 분리되는, 제 2 항원에 결합하는 제 2 인간 중쇄 가변 영역을 코드화하는 제 2 핵산 서열; (c) (a)의 중쇄 가변 영역과 쌍을 이룰 때 제 1 항원에 특이적으로 결합하고, (b)의 중쇄 가변 영역과 쌍을 이룰 때 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 인간 경쇄 가변 영역을 코드화하는 제 3 핵산 서열을 포함한다.
- [0156] 다양한 측면으로, 제 1 및 제 2 항원은 서로 상이하다. 다양한 측면으로, 제 1, 제 2 및 제 3 핵산 서열의 발현은 제 1 및 제 2 항원에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체의 형성을 유발한다.
- [0157] 한 구체예에서, 인간 V_L 영역은 인간 V_{k1-39} 유전자 절편 또는 인간 V_{k3-20} 유전자 절편을 포함하는 재배열된 인간 경쇄 서열로부터 유도된다. 특정 구체예에서, 재배열된 인간 경쇄 서열은 생식선 서열이다 (즉 가변 도메인 내에 체세포성 과돌연변이를 포함하지 않는다). 한 구체예에서, 제 3 핵산 서열은 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 마우스로부터 분리되고, 이때 재배열된 인간 경쇄 서열은 마우스의 생식선에 존재한다. 한 구체예에서, 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 인간 V_{k1-39} 유전자 절편 또는 인간 V_{k3-20} 유전자 절편을 포함한다. 특정 구체예에서, 인간 V_{k1-39} 유전자 절편 또는 인간 V_{k3-20} 유전자 절편은 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 프레임워크 영역 (FWR)에 적어도 하나의 체세포성 과돌연변이를 포함한다. 특정 구체예에서, 제 1, 제 2 및 제 3 핵산 서열은 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열로부터 인간 V_{k1-39} 또는 인간 V_{k3-20} 유전자 절편으로부터 유도된 인간 면역글로불린 V_L 영역을 발현하는 마우스로부터 분리되고, 이때 재배열된 면역글로불린 경쇄 서열은 마우스의 생식선에 존재한다.
- [0158] 다양한 구체예에서, 마우스는 면역글로불린 경쇄를 형성하기 위해 재배열할 수 있는 내인성 경쇄 가변 영역 유전자 절편을 함유하지 않는다.
- [0159] 한 구체예에서, 인간 면역글로불린 V_L 영역은 변형된 내인성 면역글로불린 경쇄 유전자좌로부터 발현된다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 항원은 한 분자 상에 존재한다. 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 항원은 상이한 분자 상에 존재한다. 한 구체예에서, 제 1 또는 제 2 핵산 서열은 단백질 A에 대한 코드화된 중쇄의 친화성을 감소시키는 변형을 포함한다.
- [0160] 한 구체예에서, 제 1 또는 제 2 핵산 서열은 V_{H1-2} , V_{H1-3} , V_{H1-8} , V_{H1-18} , V_{H1-24} , V_{H1-46} , V_{H1-58} , V_{H1-69} , V_{H2-5} , V_{H2-26} , V_{H2-70} , V_{H3-7} , V_{H3-9} , V_{H3-11} , V_{H3-13} , V_{H3-15} , V_{H3-20} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-33} , V_{H3-43} , V_{H3-48} , V_{H3-53} , V_{H3-64} , V_{H3-72} , V_{H3-73} , V_{H4-31} , V_{H4-34} , V_{H4-39} , V_{H4-59} , V_{H5-51} 및 V_{H6-1} 로부터 선택된 인간 중쇄 유전자 절편을 포함하는 재배열된 인간 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 중쇄 유전자 절편은 V_{H2-5} , V_{H3-23} 또는 V_{H3-30} 이다.
- [0161] 한 측면으로, 발명에 따라 만들어진 인간 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 이중특이성 항체가 제공된다. 다른 측면으로, 전체 인간 항체 또는 전체 인간 이중특이성 항체를 제조하기 위해 사용되는 본원에 기술된 것과 같은 마우스의 용도가 제공된다.
- [0162] 한 측면으로, 본원에 기술된 유전자 변형된 마우스, 배아 또는 세포는 내인성 조절 또는 제어 요소들, 예컨대 마우스 κ 인트론 인핸서, 마우스 κ 3' 인핸서 또는 인트론 인핸서 및 3' 인핸서 둘 다를 보유하는 κ 경쇄 유전자좌를 포함하고, 이때 조절 또는 제어 요소들은 κ 경쇄 유전자좌의 발현된 서열의 체세포성 돌연변이 및 친화성 성숙을 용이하게 한다.
- [0163] 한 측면으로, 하나 이하 또는 2개 이하의 재배열되거나 미재배열된 면역글로불린 경쇄 V 및 J 유전자 절편으로부터 유도된 면역글로불린 경쇄를 가지는 것을 특징으로 하는 B 세포 집단을 포함하는 마우스가 제공되며, 이때 마우스는 면역글로불린 경쇄 V 및 J 유전자 절편의 야생형 상보물을 포함하는 마우스와 거의 같은 $\kappa:\lambda$ 경쇄

비율을 나타낸다.

- [0164] 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄는 하나 이하 또는 2개 이하의 재배열되거나 미재배열된 면역글로불린 경쇄 V 및 J 유전자 절편으로부터 유도된다. 특정 구체예에서, 경쇄는 하나 이하의 재배열된 면역글로불린 경쇄 V 및 J 유전자 절편으로부터 유도된다. 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄는 2개의 미재배열 면역글로불린 V_L 유전자 절편 중 하나 및 1, 2, 3, 4 또는 5개의 면역글로불린 J_L 유전자 절편 중 하나로부터 생성된다. 한 구체예에서, 면역글로불린 경쇄는 2개의 미재배열 면역글로불린 V_L 유전자 절편 중 하나 및 하나의 면역글로불린 J_L 유전자 절편으로부터 생성된다.
- [0165] 한 측면으로, 하나 이하 또는 2개 이하의 인간 V_K/J_K 서열로부터 유도된 면역글로불린 경쇄를 발현하는 본원에 기술된 것과 같은 마우스가 제공되며, 이때 마우스는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 마우스 중쇄 가변 영역 유전자 절편이 하나 또는 그 이상의 인간 중쇄 가변 영역 유전자 절편으로 대체된 것을 포함하고, 마우스는 약 1 내지 약 20의, (a) λ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 $CD19^+$ B 세포의 (b) κ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 $CD19^+$ B 세포에 대한 비율을 나타낸다.
- [0166] 한 구체예에서, 마우스는 인간 V_K1-39J_K5 서열로부터 유도된 단일 κ 경쇄를 발현하고, λ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 $CD19^+$ B 세포의 κ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 $CD19^+$ B 세포에 대한 비율은 약 1 내지 약 20이며; 한 구체예에서, 그 비율은 약 1 내지 적어도 약 66이고; 특정 구체예에서, 그 비율은 약 1 내지 66이다.
- [0167] 한 구체예에서, 마우스는 인간 V_K3-20J_K1 서열로부터 유도된 단일 κ 경쇄를 발현하고, λ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 $CD19^+$ B 세포의 κ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 $CD19^+$ B 세포에 대한 비율은 약 1 내지 약 20이며; 한 구체예에서, 그 비율은 약 1 내지 적어도 약 21이다. 특정 구체예에서, 그 비율은 약 1 내지 20 또는 1 내지 21이다.
- [0168] 어떤 구체예에서, 본 발명은 2개 중 하나의 인간 V_K 유전자 절편의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 인간 J_K 유전자 절편으로의 재배열에 의해 이루어진 것과 동일한 서열을 가지는 면역글로불린 경쇄를 발현하는 마우스를 제공한다.
- [0169] 어떤 구체예에서, 2개 중 하나의 인간 V_K 유전자 절편의 1, 2, 3, 4 또는 5개의 인간 J_K 유전자 절편으로의 재배열로부터 생성된 면역글로불린 경쇄를 발현하는 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 모든 또는 실질적으로 모든 내인성 면역글로불린 V_H 유전자 절편이 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린 V_H , 하나 또는 그 이상의 D_H 및 하나 또는 그 이상의 J_H 유전자 절편으로 대체되어 있고, 마우스는 약 1 내지 약 15의 (a) λ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 골수의 B 세포의 (b) κ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 골수의 B 세포에 대한 비율을 나타낸다. 어떤 구체예에서, 재배열은 인간 V_K1-39 유전자 절편을 포함한다. 어떤 구체예에서, 재배열은 인간 V_K3-20 유전자 절편을 포함한다. 어떤 구체예에서, 내인성 면역글로불린 V_H 유전자 절편의 대체는 내인성 면역글로불린 V_H 유전자좌에서 일어난다. 어떤 구체예에서, 2개의 인간 V_K 유전자 절편은 내인성 면역글로불린 V_K 유전자좌에 있고, 어떤 구체예에서 2개의 인간 V_K 유전자 절편은 모든 또는 실질적으로 모든 마우스 면역글로불린 V_K 유전자 절편을 대체한다. 어떤 구체예에서, 2개의 인간 V_K 유전자 절편은 내인성 면역글로불린 V_K 유전자좌에 있고, 어떤 구체예에서, 2개의 인간 V_K 유전자 절편은 모든 또는 실질적으로 모든 V_K 및 J_K 유전자 절편을 대체한다. 다양한 구체예에서, 2개의 인간 V_K 유전자 절편은 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4, 5개)의 인간 J_K 유전자 절편에 작동가능하게 연결된다.
- [0170] 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 인간 V_K1-39 유전자 절편 또는 인간 V_K3-20 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_K 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 경쇄를 발현하고, κ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 골수의 미성숙 B 세포에 대한 λ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 골수의 미성숙 B 세포의 비율은 약 1 내지 약 13이다.
- [0171] 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 인간 V_K1-39 유전자 절편 또는 인간 V_K3-20 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_K 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 경쇄를 발현하고, κ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 골수의 미성숙 B 세포에 대한 λ 경쇄를 가지는 면역글로불린을 발현하는 골수의 성숙한 B 세포의 비율은 약 1 내지 약 7이다.

[0172]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 인간 V_κ1-39 유전자 절편 또는 인간 V_κ3-20 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_κ 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 경쇄를 발현하고, 예를 들어 약 2.5x10⁴, 3.0x10⁴, 3.5x10⁴, 4.0x10⁴, 4.5x10⁴, 5.0x10⁴, 5.5x10⁴, 6.0x10⁴, 6.5x10⁴, 7.0x10⁴, 7.5x10⁴, 8.0x10⁴, 8.5x10⁴, 9.0x10⁴, 9.5x10⁴, 1.0x10⁵ 또는 1.5x10⁵ 세포를 포함하여, 약 2.5x10⁴ 내지 약 1.5x10⁵ 세포의 범위 내에서 프로 B 세포 집단을 골수에 가지며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 2.88x10⁴ 세포의 프로 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 6.42x10⁴ 세포의 프로 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 9.16x10⁴ 세포의 프로 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.19x10⁵ 세포의 프로 B 세포 집단을 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 골수의 예시적인 프로 B 세포는 CD19, CD43, c-kit 및/또는 그것들의 조합의 발현 (예컨대 CD19⁺, CD43⁺, c-kit⁺)을 특징으로 한다.

[0173]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 인간 V_κ1-39 유전자 절편 또는 인간 V_κ3-20 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_κ 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 경쇄를 발현하고, 예를 들어 약 1.0x10⁶, 1.1x10⁶, 1.2x10⁶, 1.3x10⁶, 1.4x10⁶, 1.5x10⁶, 1.6x10⁶, 1.7x10⁶, 1.8x10⁶, 1.9x10⁶ 또는 2.0x10⁶ 세포를 포함하여, 약 1x10⁶ 내지 약 2x10⁶ 세포의 범위 내에서 프레 B 세포 집단을 골수에 가지며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.25x10⁶ 세포의 프레 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.46x10⁶ 세포의 프레 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.64x10⁶ 세포의 프레 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 2.30x10⁶ 세포의 프레 B 세포 집단을 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 골수의 예시적인 프레 B 세포는 CD19, CD43, c-kit 및/또는 그것들의 조합의 발현 (예컨대 CD19⁺, CD43⁻, c-kit⁻)을 특징으로 한다.

[0174]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 인간 V_κ1-39 유전자 절편 또는 인간 V_κ3-20 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_κ 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 경쇄를 발현하고, 예를 들어 약 5.0x10⁵, 5.1x10⁵, 5.2x10⁵, 5.3x10⁵, 5.4x10⁵, 5.5x10⁵, 5.6x10⁵, 5.7x10⁵, 5.8x10⁵, 5.9x10⁵, 6.0x10⁵, 6.1x10⁵, 6.2x10⁵, 6.3x10⁵, 6.4x10⁵, 6.5x10⁵, 6.6x10⁵, 6.7x10⁵, 6.8x10⁵, 6.9x10⁵ 또는 7.0x10⁵ 세포를 포함하여, 약 5x10⁵ 내지 약 7x10⁵ 세포의 범위 내에서 미성숙 B 세포 집단을 골수에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 5.33x10⁵ 세포의 미성숙 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 5.80x10⁵ 세포의 미성숙 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 5.92x10⁵ 세포의 미성숙 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 6.67x10⁵ 세포의 미성숙 B 세포 집단을 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 골수의 예시적인 미성숙 B 세포는 IgM, B220 및/또는 그것들의 조합의 발현 (예컨대 IgM⁺, B220^{int})을 특징으로 한다.

[0175]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 인간 V_κ1-39 유전자 절편 또는 인간 V_κ3-20 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_κ 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 경쇄를 발현하고, 예를 들어 약 3.0x10⁴, 3.5x10⁴, 4.0x10⁴, 4.5x10⁴, 5.0x10⁴, 5.5x10⁴, 6.0x10⁴, 6.5x10⁴, 7.0x10⁴, 7.5x10⁴, 8.0x10⁴, 8.5x10⁴, 9.0x10⁴, 9.5x10⁴, 1.0x10⁵ 또는 1.5x10⁵ 세포를 포함하여, 약 3x10⁴ 내지 약 1.5x10⁵ 세포의 범위 내에서 성숙한 B 세포 집단을 골수에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 3.11x10⁴ 세포의 성숙한 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.09x10⁵ 세포의 성숙한 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.16x10⁵ 세포의 성숙한 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.44x10⁵ 세포의 성숙한 B 세포 집단을 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 골수의 예시적인 성숙한 B 세포 집단은 IgM, B220 및/또는 그

것들의 조합의 발현 (예컨대 IgM^+ , $B220^{hi}$)을 특징으로 한다.

[0176]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 인간 $V_{\kappa}1-39$ 유전자 절편 또는 인간 $V_{\kappa}3-20$ 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_{κ} 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된 경쇄를 발현하고, 예를 들어 약 1.0×10^6 , 1.1×10^6 , 1.2×10^6 , 1.3×10^6 , 1.4×10^6 , 1.5×10^6 , 1.6×10^6 , 1.7×10^6 , 1.8×10^6 , 1.9×10^6 , 2.0×10^6 , 2.1×10^6 , 2.2×10^6 , 2.3×10^6 , 2.4×10^6 , 2.5×10^6 , 2.6×10^6 , 2.7×10^6 , 2.8×10^6 , 2.9×10^6 또는 2.0×10^6 세포를 포함하여, 약 1×10^6 내지 약 3×10^6 세포의 범위 내에서 총 B 세포 집단을 골수에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.59×10^6 세포의 총 B 세포를 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 1.75×10^6 세포의 총 B 세포를 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 2.13×10^6 세포의 총 B 세포를 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 골수에 약 2.55×10^6 세포의 총 B 세포를 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 골수의 예시적인 총 B 세포 집단은 $CD19^+$ 을 특징으로 한다.

[0177]

한 측면으로, 단일한 재배열 κ 경쇄를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 기능성 λ 경쇄 유전자좌를 포함하고, 마우스는 동일한 단일 재배열 κ 경쇄로부터 유도된 κ 경쇄를 발현하는 $Ig\kappa^+$ 세포를 포함하는 B 세포 집단을 발현한다. 한 구체예에서, 마우스에서 $Ig\kappa^+ Ig\lambda^+$ B 세포의 퍼센트는 야생형 마우스에서와 거의 동일하다. 특정 구체예에서, 마우스에서 $Ig\kappa^+ Ig\lambda^+$ B 세포의 퍼센트는 약 2 내지 약 6%이다. 특정 구체예에서, 단일한 재배열 κ 경쇄가 $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 서열로부터 유도된 마우스에서 $Ig\kappa^+ Ig\lambda^+$ B 세포의 퍼센트는 약 2 내지 약 3이고; 특정 구체예에서, 그 퍼센트는 약 2.6이다. 특정 구체예에서, 단일한 재배열 κ 경쇄가 $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 서열로부터 유도된 마우스에서 $Ig\kappa^+ Ig\lambda^+$ B 세포의 퍼센트는 약 4 내지 약 8이고; 특정 구체예에서, 그 퍼센트는 약 6이다.

[0178]

어떤 구체예에서, 재배열된 인간 면역글로불린 V_{κ}/J_{κ} 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 기능성 면역글로불린 경쇄 유전자좌를 포함하고, 마우스는 약 1 내지 약 8, 어떤 구체예에서는 약 1 내지 약 5의 $Ig\lambda^+$ B 세포의 $Ig\kappa^+$ B 세포에 대한 비율을 포함하는 비장 B 세포 집단을 포함한다. 어떤 구체예에서, 재배열된 인간 면역글로불린 V_{κ}/J_{κ} 서열은 2개의 인간 면역글로불린 V_{κ} 유전자 절편 중 하나와 1, 2, 3, 4 또는 5개의 인간 면역글로불린 J_{κ} 유전자 절편 중 하나의 재배열을 통해 생성된다. 어떤 구체예에서, 재배열된 인간 면역글로불린 V_{κ}/J_{κ} 서열은 인간 면역글로불린 $V_{\kappa}1-39$ 유전자 절편과 $J_{\kappa}1$, $J_{\kappa}2$, $J_{\kappa}3$, $J_{\kappa}4$, $J_{\kappa}5$ 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 면역글로불린 J_{κ} 유전자 절편의 재배열을 통해 생성된다. 어떤 구체예에서, 재배열된 인간 면역글로불린 V_{κ}/J_{κ} 서열은 인간 면역글로불린 $V_{\kappa}3-20$ 유전자 절편과 $J_{\kappa}1$, $J_{\kappa}2$, $J_{\kappa}3$, $J_{\kappa}4$, $J_{\kappa}5$ 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 면역글로불린 J_{κ} 유전자 절편의 재배열을 통해 생성된다.

[0179]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들어 약 2.0×10^6 , 2.5×10^6 , 3.0×10^6 , 3.5×10^6 , 4.0×10^6 , 4.5×10^6 , 5.0×10^6 , 5.5×10^6 , 6.0×10^6 , 6.5×10^6 또는 7.0×10^6 세포를 포함하여, 약 2×10^6 내지 약 7×10^6 세포의 범위 내에서 $CD19^+$ 비장 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 2.74×10^6 세포의 $CD19^+$ 비장 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 4.30×10^6 세포의 $CD19^+$ 비장 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 5.53×10^6 세포의 $CD19^+$ 비장 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 6.18×10^6 세포의 $CD19^+$ 비장 B 세포 집단을 포함한다.

[0180]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들어 약 1.0×10^6 , 1.5×10^6 , 2.0×10^6 , 2.5×10^6 , 3.0×10^6 , 3.5×10^6 , 4.0×10^6 세포를 포함하여, 약 1×10^6 내지 약 4×10^6 세포의 범위 내에서 $CD19^+$, IgD^{hi} , IgM^{lo} 비장 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 1.30×10^6 의 $CD19^+$, IgD^{hi} , IgM^{lo} 비장 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 2.13×10^6 의 $CD19^+$, IgD^{hi} , IgM^{lo} 비장 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 3.15×10^6 의 $CD19^+$, IgD^{hi} , IgM^{lo} 비장 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체

예에서, 본 발명의 마우스는 약 3.93×10^6 의 $CD19^+$, IgD^{hi} , IgM^{lo} 비장 B 세포 집단을 포함한다.

[0181]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들어 약 9.0×10^5 , 9.25×10^5 , 9.5×10^5 , 9.75×10^5 , 1.0×10^6 , 1.25×10^6 , 1.50×10^6 , 1.75×10^6 , 2.0×10^6 세포를 포함하여, 약 9×10^5 내지 약 2×10^6 세포의 범위 내에서 $CD19^+$, IgD^{lo} , IgM^{hi} 비장 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 9.52×10^5 의 $CD19^+$, IgD^{lo} , IgM^{hi} 비장 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 1.23×10^6 의 $CD19^+$, IgD^{lo} , IgM^{hi} 비장 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 1.40×10^6 의 $CD19^+$, IgD^{lo} , IgM^{hi} 비장 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 1.42×10^6 의 $CD19^+$, IgD^{lo} , IgM^{hi} 비장 B 세포 집단을 포함한다.

[0182]

어떤 구체예에서, 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 그 마우스는 2개의 미재배열 인간 면역글로불린 V_{κ} 유전자 절편과 둘 또는 그 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 미재배열 인간 J_{κ} 유전자 절편을 포함하는 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함하고, 마우스는 면역글로불린 경쇄 V_{κ} 및 J_{κ} 유전자 절편의 야생형 상보물을 포함하는 마우스와 거의 동일한 이행(transitional) (예컨대 T1, T2 및 T3) B 세포 집단을 포함하는 말초 비장 B 세포 집단을 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 비장의 예시적인 이행 B 세포 집단 (예컨대 T1, T2 및 T3)은 IgM , $CD23$, $CD93$, $B220$ 및/또는 그것들의 조합의 발현을 특징으로 한다.

[0183]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들면 약 2.0×10^6 , 2.5×10^6 , 3.0×10^6 , 3.5×10^6 , 4.0×10^6 , 4.5×10^6 , 5.0×10^6 , 5.5×10^6 , 6.0×10^6 , 6.5×10^6 또는 7.0×10^6 세포를 포함하여 약 2×10^6 내지 약 7×10^6 세포의 범위 내에서 비장에 T1 B 세포 집단 ($CD93^+$, $B220^+$, IgM^{hi} , $CD23^-$)을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 2.16×10^6 세포의 T1 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 3.63×10^6 세포의 T1 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 3.91×10^6 세포의 T1 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 6.83×10^6 세포의 T1 B 세포 집단을 포함한다.

[0184]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들면 약 1.0×10^6 , 1.5×10^6 , 2.0×10^6 , 2.5×10^6 , 3.0×10^6 , 3.5×10^6 , 4.0×10^6 , 4.5×10^6 , 5.0×10^6 , 5.5×10^6 , 6.0×10^6 , 6.5×10^6 또는 7.0×10^6 세포를 포함하여, 약 1×10^6 내지 약 7×10^6 세포의 범위 내에서 T2 B 세포 집단 (예컨대 $CD93^+$, $B220^+$, IgM^{hi} , $CD23^+$)을 비장에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 1.30×10^6 세포의 T2 B 세포 집단을 비장에 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 2.46×10^6 세포의 T2 B 세포 집단을 비장에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 3.24×10^6 세포의 T2 B 세포 집단을 비장에 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 6.52×10^6 세포의 T2 B 세포 집단을 비장에 포함한다.

[0185]

어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들면 약 1.0×10^6 , 1.5×10^6 , 2.0×10^6 , 2.5×10^6 , 3.0×10^6 , 3.5×10^6 또는 4.0×10^6 세포를 포함하여, 약 1×10^6 내지 약 4×10^6 세포의 범위 내에서 T3 B 세포 집단 (예컨대 $CD93^+$, $B220^+$, IgM^{lo} , $CD23^+$)을 비장에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 1.08×10^6 세포의 T3 B 세포 집단을 비장에 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 1.35×10^6 세포의 T3 B 세포 집단을 비장에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 3.37×10^6 세포의 T3 B 세포 집단을 비장에 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 약 3.63×10^6 세포의 T3 B 세포 집단을 비장에 포함한다.

[0186]

어떤 구체예에서, 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 2개의 미재배열 인간 면역글로불린 V_{κ} 유전자 절편과 1, 2, 3, 4 또는 5개의 미재배열 인간 J_{κ} 유전자 절편을 포함하는 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함하고, 마우스는 면역글로불린 경쇄 V_{κ} 및 J_{κ} 유전자 절편의 야생형 상보물을 포함하는 마우스와 거의 동일한 변연부 (marginal zone) 및 변연부 전구 B 세포 집단을 포함하는 말초 비장 B 세포 집단을 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 비장의 예시적인 변연부 B 세포 집단은 IgM , $CD21/35$, $CD23$, $CD93$, $B220$ 및/또는 그것들의 조합의 발현을 특징으로 한다.

- [0187] 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들어 약 1.0×10^6 , 1.5×10^6 , 2.0×10^6 , 2.5×10^6 또는 3.0×10^6 세포를 포함하여, 약 1×10^6 내지 약 3×10^6 세포의 범위 내에서 변연부 B 세포 집단을 비장에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 1.47×10^6 세포의 변연부 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 1.49×10^6 세포의 변연부 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 2.26×10^6 세포의 변연부 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 2.33×10^6 세포의 변연부 B 세포 집단을 포함한다.
- [0188] 어떤 구체예에서, 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 2개의 미재배열 인간 면역글로불린 V_κ 유전자 절편과 1, 2, 3, 4 또는 5개의 미재배열 인간 J_κ 유전자 절편을 포함하는 면역글로불린 κ 경쇄 유전자 좌를 포함하고, 마우스는 면역글로불린 경쇄 V_κ 및 J_κ 유전자 절편의 야생형 상보물을 포함하는 마우스와 거의 동일한 낭포성 (예컨대 FO-I 및 FO-II) B 세포 집단(들)을 포함하는 말초 비장 B 세포 집단을 포함한다. 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형된 마우스의 비장의 예시적인 낭포성 B 세포 집단 (예컨대 FO-I 및 FO-II)은 IgM, IgD, CD21/35, CD93, B220 및/또는 그것들의 조합의 발현을 특징으로 한다.
- [0189] 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들어 약 3.0×10^6 , 3.5×10^6 , 4.0×10^6 , 4.5×10^6 , 5.0×10^6 , 5.5×10^6 , 6.0×10^6 , 6.5×10^6 , 7.0×10^6 , 7.5×10^6 , 8.0×10^6 , 8.5×10^6 , 9.0×10^6 , 9.5×10^6 , 1.0×10^7 또는 1.5×10^7 세포를 포함하여, 약 3×10^6 내지 약 1.5×10^7 세포의 범위 내에서 낭포성 유형 1 B 세포 집단 (예컨대 CD93⁻, B220⁺, CD21/35^{int}, IgM^{lo}, IgD^{hi})을 비장에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 3.57×10^6 세포의 낭포성 유형 1 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 6.31×10^6 세포의 낭포성 유형 1 B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 9.42×10^6 세포의 낭포성 유형 1 B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 1.14×10^7 세포의 낭포성 유형 1 B 세포 집단을 포함한다.
- [0190] 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 예를 들어 약 1.0×10^6 , 1.25×10^6 , 1.5×10^6 , 1.75×10^6 또는 2.0×10^6 세포를 포함하여, 약 1×10^6 내지 약 2×10^6 세포의 범위 내에서 낭포성 유형 2 B 세포 집단 (예컨대 CD93⁻, B220⁺, CD21/35^{int}, IgM^{int}, IgD^{hi})을 비장에 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 1.14×10^6 세포의 낭포성 유형 2B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 1.45×10^6 세포의 낭포성 유형 2B 세포 집단을 포함하며; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 1.80×10^6 세포의 낭포성 유형 2B 세포 집단을 포함하고; 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 비장에 약 2.06×10^6 세포의 낭포성 유형 2B 세포 집단을 포함한다.
- [0191] 한 측면으로, 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 이때 마우스는 인간 V_κ 및 J_κ 유전자 절편으로부터 유도된 단일한 재배열 κ 경쇄를 발현하고, 그 마우스는 단일한 재배열 κ 경쇄 서열로부터 유도된 단일한 κ 경쇄를 포함하는 B 세포 집단을 발현하며, 유전자 변형된 마우스는 체세포성 과돌연변이에 대해 내성이 되지 않았다. 한 구체예에서, 마우스의 B 세포 상에서 발현된 κ 경쇄의 적어도 90%는 적어도 1 내지 약 5개의 체세포성 과돌연변이를 나타낸다.
- [0192] 한 측면으로, 하나 이하 또는 2개 이하의 재배열된 κ 경쇄 서열로부터 유도된 단일한 κ 경쇄를 발현하도록 변형된 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 야생형 마우스에 의해 나타난 κ 경쇄 유용성보다 약 2배 이상, 적어도 약 3배 이상 또는 적어도 약 4배 이상 더 큰, 또는 κ 경쇄 유전자 절편의 야생형 레퍼토리를 포함하는 동일한 계통의 마우스에 의해 나타나는 κ 경쇄 유용성보다 더 큰 κ 경쇄 유용성을 나타낸다. 특정 구체예에서, 마우스는 하나 이하의 재배열된 κ 경쇄 서열로부터 단일한 κ 경쇄를 발현한다. 보다 구체적인 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 V_κ1-39J_κ5 및 V_κ3-20J_κ1 서열로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 V_κ1-39J_κ5 서열이다. 한 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 V_κ3-20J_κ1 서열이다.
- [0193] 한 측면으로, 하나 이하 또는 2개 이하의 재배열된 κ 경쇄 서열로부터 유도된 단일 κ 경쇄를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 완전한 또는 실질적으로 완전한 인간 κ 경쇄 유전자좌를 내포하는

마우스에 의해 나타난 동일한 κ 경쇄 유용성보다 약 100배 이상, 적어도 약 200배 이상, 적어도 약 300배 이상, 적어도 약 400배 이상, 적어도 약 500배 이상, 적어도 약 600배 이상, 적어도 약 700배 이상, 적어도 약 800배 이상, 적어도 약 900배 이상, 적어도 약 1000배 이상 더 큰 κ 경쇄 유용성을 나타낸다. 특정 구체예에서, 완전한 또는 실질적으로 완전한 인간 κ 경쇄 유전자좌를 내포하는 마우스는 기능성 미재배열 마우스 κ 경쇄 서열이 결핍되어 있다. 특정 구체예에서, 마우스는 하나 이하의 재배열된 κ 경쇄 서열로부터 단일 κ 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, 마우스는 재배열된 κ 경쇄 서열의 하나의 복사물을 포함한다 (예컨대 이형접합체). 한 구체예에서, 마우스는 재배열된 κ 경쇄 서열의 2개의 복사물을 포함한다 (예컨대 동형접합체). 보다 구체적인 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 및 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 서열로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 서열이다. 한 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 서열이다.

- [0194] 한 측면으로, 하나 이하 또는 2개 이하의 재배열된 경쇄 서열로부터 유도된 단일 경쇄를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 유전자 변형된 마우스의 경쇄는 완전한 또는 실질적으로 완전한 경쇄 유전자좌를 내포하는 마우스에 의해 나타난 동일한 재배열된 경쇄의 발현보다 적어도 10배 내지 약 1,000배, 100배 내지 약 1,000배, 200배 내지 약 1,000배, 300배 내지 약 1,000배, 400배 내지 약 1,000배, 500배 내지 약 1,000배, 600배 내지 약 1,000배, 700배 내지 약 1,000배, 800배 내지 약 1,000배 또는 900배 내지 약 1,000배 더 큰 발현 수준을 나타낸다. 한 구체예에서, 경쇄는 인간 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 인간 서열은 κ 서열이다. 한 구체예에서, 인간 서열은 λ 서열이다. 한 구체예에서, 경쇄는 전체 인간 경쇄이다.
- [0195] 한 구체예에서, 발현 수준은 전사된 경쇄 서열의 mRNA를 정량하고, 그것을 완전한 또는 실질적으로 완전한 경쇄 유전자좌를 내포하는 마우스의 전사된 경쇄 서열에 비교함으로써 특성화된다.
- [0196] 한 측면으로, 하나 이하 또는 2개 이하의 재배열된 κ 경쇄 서열로부터 유도된 단일 κ 경쇄를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공되는데, 이때 마우스는 항원으로 면역화될 때, 동일 항원으로 면역된 야생형 마우스에 비교될만한 혈청 역가를 나타낸다. 특정 구체예에서, 마우스는 하나 이하의 재배열된 κ 경쇄 서열로부터 단일 κ 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, 혈청 역가는 총 면역글로불린으로서 특성화된다. 특정 구체예에서, 혈청 역가는 IgM 특정 역가로서 특성화된다. 특정 구체예에서, 혈청 역가는 IgG 특정 역가로서 특성화된다. 보다 구체적인 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 및 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 서열로부터 선택된다. 한 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 서열이다. 한 구체예에서, 재배열된 κ 경쇄 서열은 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 서열이다.
- [0197] 한 측면으로, 항원-특이적 항체들의 집단을 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 이때 항원-특이적 항체들의 집단의 면역글로불린 경쇄는 모두 동일한 단일 인간 V_L 유전자 절편으로부터 유도된 인간 경쇄 가변 (V_L) 영역과 다수의 인간 V_H 유전자 절편 중 하나로부터 유도된 인간 중쇄 가변 (V_H) 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄를 포함한다.
- [0198] 다양한 구체예에서, 인간 V_H 유전자 절편은 V_{H1-2} , V_{H1-3} , V_{H1-8} , V_{H1-18} , V_{H1-24} , V_{H1-46} , V_{H1-58} , V_{H1-69} , V_{H2-5} , V_{H2-26} , V_{H2-70} , V_{H3-7} , V_{H3-9} , V_{H3-11} , V_{H3-13} , V_{H3-15} , V_{H3-20} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-33} , V_{H3-43} , V_{H3-48} , V_{H3-53} , V_{H3-64} , V_{H3-72} , V_{H3-73} , V_{H4-31} , V_{H4-34} , V_{H4-39} , V_{H4-59} , V_{H5-51} 및 V_{H6-1} 로부터 선택된다.
- [0199] 다양한 구체예에서, 동일한 단일 인간 V_L 유전자 절편은 인간 $V_{\kappa 1-39}$ 유전자 절편 및 $V_{\kappa 3-20}$ 유전자 절편으로부터 선택된다. 다양한 구체예에서, 모든 면역글로불린 경쇄는 J_{κ} 및 J_{λ} 유전자 절편으로부터 선택된 인간 경쇄 J (J_L) 유전자 절편을 포함한다. 특정 구체예에서, 인간 J_L 유전자 절편은 인간 $J_{\kappa 1}$ 및 $J_{\kappa 5}$ 유전자 절편으로부터 선택된다. 다양한 구체예에서, 마우스는 마우스 면역글로불린 V_L 유전자 절편으로부터 선택된 서열, 마우스 면역글로불린 J_L 유전자 절편 및 그것들의 조합이 결핍되어 있다. 다양한 구체예에서, 인간 V_L 영역은 인간, 마우스 또는 쥐 면역글로불린 경쇄 불변 (C_L) 영역에 작동가능하게 연결된다. 특정 구체예에서, 인간 V_L 영역은 마우스 C_{κ} 영역에 작동가능하게 연결된다. 특정 구체예에서, 인간 V_L 영역은 쥐 C_{κ} 영역에 작동가능하게 연결된다.
- [0200] 다양한 구체예에서, 인간 V_L 영역은 내인성 면역글로불린 경쇄 유전자좌로부터 발현된다. 다양한 구체예에서, 인간 V_H 영역은 인간, 마우스 또는 쥐 면역글로불린 중쇄 불변 (C_H) 영역에 작동가능하게 연결된다. 다양한 구체예에서, (C_H) 영역은 C_{H1} , 힌지, C_{H2} , C_{H3} , C_{H4} 및/또는 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 서열을 포함한다. 다양

한 구체예에서, 인간 V_H 영역은 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌로부터 발현된다.

- [0201] 한 측면으로, 단일 경쇄와 결합된 다수의 면역글로불린 중쇄를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공된다. 한 구체예에서, 중쇄는 인간 서열을 포함한다. 다양한 구체예에서, 인간 서열은 가변 서열, C_H1 , 힌지, C_H2 , C_H3 , C_H4 및/또는 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 단일 경쇄는 인간 서열을 포함한다. 다양한 구체예에서, 인간 서열은 가변 서열, 불변 서열 및 그것들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 마우스는 무능력한 내인성 면역글로불린 유전자좌를 포함하고 도입유전자 또는 염색체 외재성 에피솜으로부터 중쇄 및/또는 경쇄를 발현한다. 한 구체예에서, 마우스는 내인성 마우스 유전자좌에서 일부 또는 전부의 내인성 마우스 중쇄 유전자 절편 (즉 V , D , J) 및/또는 일부 또는 전부의 내인성 마우스 중쇄 불변 서열 (예컨대 C_H1 , 힌지, C_H2 , C_H3 또는 그것들의 조합), 및/또는 일부 또는 전부의 내인성 마우스 경쇄 서열 (예컨대 V , J , 불변 또는 그것들의 조합)이 하나 또는 그 이상의 인간 면역글로불린 서열로 대체된 것을 포함한다.
- [0202] 한 측면으로, 동일한 경쇄를 가지는 항체들을 제조하기에 적절한 마우스가 제공되고, 이때 모든 또는 실질적으로 모든 항체들은 동일한 경쇄로 발현되는 마우스에서 제조된다. 한 구체예에서, 경쇄는 내인성 경쇄 유전자좌로부터 발현된다.
- [0203] 한 측면으로, 인간 항체에 대한 경쇄를 제조하는 방법이 제공되는데, 그 방법은 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 얻는 것과, 그 경쇄 서열 및 중쇄 서열을 인간 항체를 제조하는 데 사용하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 인간 항체는 이중특이성 항체이다.
- [0204] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같이 공학처리된 경쇄와 관심의 항원을 결합시킬 수 있는 인간 중쇄 가변 도메인을 확인하는 방법이 제공되며, 이때 그 방법은 항원을 결합시킬 수 있는 제 1 항체로부터 유도된 중쇄 가변 도메인을 제공하고, 그 중쇄 가변 도메인을 생식선 경쇄 서열로 수복시켜 세포를 트랜스펙션시켜서 각각이 제 2 항체를 형성하도록 발현시키며, 제 2 항체를 항원에 노출시키고, 제 2 항체의 항원에 대한 결합을 측정하는 것을 포함한다.
- [0205] 한 구체예에서, 제 1 항체의 경쇄는 인간 V_{K1-39} 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 제 1 항체의 경쇄는 인간 V_{K3-20} 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 생식선 경쇄 서열은 인간 V_{K1-39} 또는 V_{K3-20} 서열을 포함한다. 다양한 구체예에서, 항원에 대한 제 2 항체의 결합은 제 1 항체의 항원에 대한 결합을 비교함으로써 측정된다.
- [0206] 본원에 기술된 구체예들 및 측면들은 어느 것이든지 문맥으로부터 다르게 표시되거나 드러나지 않는 한, 상호간에 함께 사용될 수 있다. 다른 구체예들은 설명을 확실하게 함으로서 해당 기술분야의 숙련자들에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0207] 도 1은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 절편을 인간 $V_{K1-39J_{K5}}$ 유전자 영역으로 대체하기 위한 표적화 전략을 도시한다.
- 도 2는 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 절편을 인간 $V_{K3-20J_{K1}}$ 유전자 영역으로 대체하기 위한 표적화 전략을 도시한다.
- 도 3은 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 절편을 인간 $V_{preB/J\lambda 5}$ 유전자 영역으로 대체하기 위한 표적화 전략을 도시한다.
- 도 4는 야생형 마우스 (WT), 공학적으로 도입된 인간 재배열 $V_{K1-39J_{K5}}$ 경쇄 영역에 대해 동형접합성인 마우스 ($V_{K1-39J_{K5}} H0$) 및 공학적으로 도입된 인간 재배열 $V_{K3-20J_{K1}}$ 경쇄 영역에 대해 동형접합성인 마우스 ($V_{K3-20J_{K1}} H0$)에 대한 말초혈로부터의 $CD19^+$ B 세포 (γ -축)의 퍼센트를 도시한다.
- 도 5a는 인간 V_K 및 J_K 유전자 절편 (H_K)으로 내인성 V_K 및 J_K 유전자 절편을 대체하기 위한 동형접합성 마우스, 야생형 마우스 (WT) 및 공학적으로 도입된 인간 재배열된 $V_{K1-39J_{K5}}$ 경쇄 영역에 대해 이형접합성인 마우스 ($V_{K1-39J_{K5}} HET$)에서, 공학적으로 도입된 인간 재배열된 $V_{K1-39J_{K5}}$ 경쇄 영역 ($V_{K1-39J_{K5}}$ 집합 프로브) 및 인간 V_{K1-39} 유전자 절편 (V_{K1-39} 프로브)의 접합에 특이한 프로브를 사용하는 정량 PCR 분석에서 V_{K1-39} -유도된 경쇄의 상대적인 mRNA 발현 (γ -축)을 도시한다. 신호는 마우스 C_K 의 발현에 대해 표준화된다. N.D.: 검출되지 않음.

도 5b는 인간 V_K 및 J_K 유전자 절편 (H_K)으로 내인성 V_K 및 J_K 유전자 절편을 대체하기 위한 동형접합성 마우스, 야생형 마우스 (WT) 및 공학적으로 도입된 인간 재배열된 V_K1-39J_K5 경쇄 영역에 대해 동형접합성인 마우스 (V_K1-39J_K5 HO)에서, 공학적으로 도입된 인간 재배열된 V_K1-39J_K5 경쇄 영역 (V_K1-39J_K5 접합 프로브) 및 인간 V_K1-39 유전자 절편 (V_K1-39 프로브)의 접합에 특이한 프로브를 사용하는 정량 PCR 분석에서 V_K1-39-유도된 경쇄의 상대적인 mRNA 발현 (y-축)을 도시한다. 신호는 마우스 C_K의 발현에 대해 표준화된다.

도 5c는 인간 V_K 및 J_K 유전자 절편 (H_K)으로 내인성 V_K 및 J_K 유전자 절편을 대체하기 위한 동형접합성 마우스, 야생형 마우스 (WT) 및 공학적으로 도입된 인간 재배열된 V_K3-20J_K1 경쇄 영역에 대해 이형접합성인 마우스 (HET) 및 동형접합성인 마우스 (HO)에서, 공학적으로 도입된 인간 재배열된 V_K3-20J_K1 경쇄 영역 (V_K3-20J_K1 접합 프로브) 및 인간 V_K3-20 유전자 절편 (V_K3-20 프로브)의 접합에 특이한 프로브를 사용하는 정량 PCR 분석에서 V_K3-20-유도된 경쇄의 상대적인 mRNA 발현 (y-축)을 도시한다. 신호는 마우스 C_K의 발현에 대해 표준화된다.

도 6a는 야생형 (WT; N=2) 및 β-갈락토시다제로 면역된, 공학적으로 도입된 인간 재배열된 V_K1-39J_K5 경쇄 영역에 대해 동형접합성인 마우스 (V_K1-39J_K5 HO; N=2)에서의 IgM (좌측) 및 IgG (우측) 역가를 도시한다.

도 6b는 야생형 (WT; N=5) 및 β-갈락토시다제로 면역된, 공학적으로 도입된 인간 재배열된 V_K3-20J_K1 경쇄 영역에 대해 동형접합성인 마우스 (V_K3-20J_K1 HO; N=5)에서의 총 면역글로불린 (IgM, IgG, IgA) 역가를 도시한다.

도 7a는 각각의 원래의 단일특이성 항체로부터의 중쇄 가변 영역으로부터 구성된 단일특이성 항체 (모-1 및 모-2) 및 이중특이성 항체 (이중특이성)의 개략도를 도시한다. 공통 경쇄 가변 영역 (진한 부분)은 이중 특이성 항체에서 표시된다.

도 7b는 관심의 항원에 대한 2개의 모(parent) 단일클론성 항체 (모-1 및 모-2)의 결합 특성뿐 아니라, 각각의 단일특이성 모 항체로부터의 중쇄 가변 영역을 공통 경쇄와 쌍을 이루으로써 구성된 이중특이성 항체의 결합 특성에 대한 개략도를 도시한다. 이중특이성 항체의 관심의 항원의 2개의 구별되는 에피토프에 별도로 (좌측 하부) 또는 동시에 (우측 하부) 결합하는 능력이 표시된다.

도 8은 BIACORE™ 장치 (RU)에서 포획된 단량체 항원 E 표면에 대한 300nM의 이중특이성 (진한 막대) 및 단일특이성 (줄무늬 및 회색 막대) 항체들의 결합의 막대 그래프를 도시한다. 단클론성 모-1 항체 (P1 Ab), 단클론성 모-2 (P2 Ab) 및 이중특이성 항체 (BsAb)가 표시된다.

도 9는 2개의 유전자 변형된 내인성 면역글로불린 경쇄 (예컨대 κ 경쇄) 유전자좌를 도시한다. 상부의 유전자좌 (DLC-5J)는 2개의 인간 V_K 유전자 절편과 5개의 인간 J_K 유전자 절편을 함유하는 공학처리된 인간 DNA 단편 (줄무늬)을 함유한다. 하부의 유전자좌 (DLC-1J)는 2개의 인간 V_K 유전자 절편과 하나의 인간 J_K 유전자 절편을 함유하는 공학처리된 인간 DNA 단편 (줄무늬)을 함유한다. 각 유전자좌는 내인성 경쇄 불변 영역 (예컨대 C_K)에 작동가능하게 연결된 인간 V_K 영역을 형성하기 위해 재배열할 수 있다. 면역글로불린 프로모터 (유전자좌 위의 화살표), 리더 엑손 (검은색 화살표), 2개의 인간 V_K 유전자 절편 (흰색 화살표)이 도시되는데, 이것들의 상류 (5')측에는 모두 Frt 재조합 부위를 함유하는 네오마이신 카세트가 있다. 각각의 인간 유전자 절편 (V_K 및 J_K)으로 공학처리된 재조합 신호 서열은 각 유전자 절편과 나란히 배치된 흰색 타원형으로 표시된다.

도 10a의 상부 패널은 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터의 B 및 T 세포 (각각 CD19⁺ 및 CD3⁺)에 대해 염색된 골수의 등고선 선도를 나타낸다. 하부 패널은 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터의 ckit⁺ and CD43⁺에 대해 염색되고 CD19⁺ 상에 모인 골수의 대표적인 등고선 선도를 도시한다. Pro 및 Pre B 세포는 하부패널의 등고선 선도 상에서 표시된다.

도 10b는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)의 대퇴골로부터 획득된 골수의 프로(Pro) (CD19⁺CD43⁺ckit⁺) 및 프렛(Pre)(CD19⁺CD43⁻ckit⁻)의 수를 도시한다.

도 11a는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터의 면역글로불린 M (IgM) 및 B220에 대해 염색된 싱글렛 상에 게이팅된 골수의 대표적인 등고선

선도를 도시한다. 미성숙, 성숙한 및 프로/프레 B 세포는 각각의 등고선 선도 상에 표시된다.

도 11b는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)의 대퇴골들로부터 분리된 골수의 B (CD19⁺), 미성숙 B (B220^{int}IgM⁺) 및 성숙한 B (B220^{hi}IgM⁺)세포의 총 수를 도시한다.

도 12a는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터의 면역글로불린 M (IgM) 및 B220에 대해 염색된 싱글렛 상에 게이팅된 골수의 대표적인 등고선 선도를 도시한다. 미성숙, 성숙한 및 프로/프레 B 세포는 각각의 등고선 선도 상에 표시된다.

도 12b는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)의 대퇴골들로부터 분리된 Ig 및 Ig 발현에 대해 염색된 미성숙한 (B220^{int}IgM⁺) 및 성숙한 (B220^{hi}IgM⁺) B 세포 상에 게이팅된 골수의 대표적인 등고선 선도를 도시한다.

도 13a의 상부 패널은 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터의 B 및 T 세포 (각각CD19⁺ 및 CD3⁺)에 대해 염색되고 싱글렛 상에 게이팅된 비장세포의 대표적인 등고선 선도를 도시한다. 하부 패널은 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터의 면역글로불린 D (IgD) 및 면역글로불린 M (IgM)에 대해 염색되고 CD19⁺ 상에 게이팅된 비장세포의 대표적인 등고선 선도를 도시한다. 성숙한 (WT에 대해 54, DLC-5J에 대해 56.9) 및 이행 (WT에 대해 23.6, DLC-5J에 EOG 25.6) B 세포를 각각의 등고선 선도에 대해 표시한다.

도 13b는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터 획득된 비장의 CD19⁺ B 세포, 이행 B (CD19⁺IgM^{hi}IgD^{lo}) 및 성숙한 B (CD19⁺IgM^{lo}IgD^{hi})세포의 총 수를 도시한다.

도 14a는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터의 CD19⁺ 상에 게이팅된 Igλ⁺ 및 Igκ⁺ 비장세포의 대표적인 등고선 선도를 도시한다.

도 14b는 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)로부터 획득된 비장의 B 세포 (CD19⁺), Igκ⁺ B (CD19⁺Igκ⁺) 및 Igλ⁺ B cells (CD19⁺Igλ⁺) 세포의 총 수를 도시한다.

도 15a는 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스에서 말초 B 세포 발달을 도시한다. 제 1 (가장 왼쪽) 등고선 선도는 미성숙 (39.6) 및 성숙한 (57.8) B 세포를 가리키는 CD19⁺ 상에 게이팅된 CD93⁺ 및 B220⁺ 비장세포를 도시한다. 제 2 (상부 중간) 등고선 선도는 T1 (33.7; IgD⁻IgM⁺CD21^{lo}CD23⁻), T2 (21.2; IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}CD23⁺) 및 T3 (29.1) B 세포 집단을 가리키는 미성숙 B 세포에서의 IgM⁺ 및 CD23⁺ 발현을 나타낸다. 제 3 (하부 중간) 등고선 선도는 변연부 B 세포를 발생시키는 작은 집단 (14.8) 및 낭포성 (FO) B 세포를 발생시키는 제 2 집단 (70.5)을 가리키는 성숙한 B 세포의 CD21⁺ (CD35⁺) 및 IgM⁺ 발현을 도시한다. 제 4 (상부 우측) 등고선 선도는 변연부 (90.5; MZ) 및 변연부 전구 (7.3; IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}CD23⁺) B 세포 집단을 가리키는 성숙한 B 세포에서의 B220⁺ 및 CD23⁺ 발현을 도시한다. 제 5 (하부 우측) 등고선 선도는 FO-I (79.0; IgD^{hi}IgM^{lo}CD21^{mid}CD23⁺) 및 FO-II (15.1; IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}CD23⁺) B 세포 집단을 가리키는 성숙한 B 세포에서의 IgD⁺ 및 IgM⁺ 발현을 도시한다.

도 15b는 야생형 마우스에서 말초 B 세포 발달을 도시한다. 제 1 (가장 왼쪽) 등고선 선도는 미성숙 (31.1) 및 성숙한 (64.4) B 세포를 가리키는 CD19⁺ 상에 게이팅된 CD93⁺ and B220⁺ 비장세포를 나타낸다. 제 2 (상부 중간) 등고선 선도는 T1 (28.5; IgD⁻IgM⁺CD21^{lo}CD23⁻), T2 (28.7; IgD^{hi}IgM^{hi}CD21^{mid}CD23⁺) 및 T3 (30.7) B 세포 집단을 가리키는 미성숙 B 세포에서의 IgM⁺ 및 CD23⁺ 발현을 보여준다. 제 3 (하부 중간) 등고선 선도는 변연부 B 세포를 발생시키는 작은 집단 (7.69) 및 낭포성 (FO) B 세포를 발생시키는 제 2 집단 (78.5)을 가리키는 성숙한 B

세포의 CD21⁺ (CD35⁺) 및 IgM⁺ 발현을 보여준다. 제 4 (상부 우측) 등고선 선도는 변연부 (79.9; MZ) 및 변연부 전구 (19.4; IgM^{hi} IgD^{hi} CD21^{hi} CD23⁺) B 세포 집단을 가리키는 성숙한 B 세포에서의 B220⁺ 및 CD23⁺ 발현을 보여준다. 제 5 (하부 우측) 등고선 선도는 FO-I (83.6; IgD^{hi} IgM^{lo} CD21^{mid} CD23⁺) 및 FO-II (13.1; IgD^{hi} IgM^{hi} CD21^{mid} CD23⁺) B 세포 집단을 가리키는 성숙한 B 세포에서의 IgD⁺ 및 IgM⁺ 발현을 보여준다. 각각의 게이트된 영역 내에서의 세포의 백분율이 표시된다.

도 16은 야생형 마우스 (WT) 및 2개의 인간 V_K 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)의 수득된 비장의 이행, 변연부 및 낭포성 B 세포 집단의 총 수를 도시한다.

도 17은 내인성 V_K 및 J_K 유전자 절편의 인간 V_K 및 J_K 유전자 절편으로의 대체에 대하여 동형접합성인 마우스 (H_K), 야생형 (WT), 2개의 인간 V_K 유전자 절편 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J) 및 2개의 인간 V_K 유전자 절편 및 하나의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-1J)에서, V_K3-20 또는 V_K1-39 유전자 절편에 특이적인 프로브를 사용하는 정량 PCR 분석에서 V_K3-20-유도된 및 V_K1-39-유도된 경쇄의 끝수 (y-축)에서의 상대적인 mRNA 발현을 도시한다. 신호는 마우스 C의 발현에 대해 표준화된다. ND: 검출되지 않음.

도 18은 내인성 V_K 및 J_K 유전자 절편의 인간 V_K 및 J_K 유전자 절편으로의 대체에 대하여 동형접합성인 마우스 (H_K), 야생형 (WT), 2개의 인간 V_K 유전자 절편 및 5개의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J) 및 2개의 인간 V_K 유전자 절편 및 하나의 인간 J_K 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-1J)에서, V_K3-20 또는 V_K1-39 유전자 절편에 특이적인 프로브를 사용하는 정량 PCR 분석에서 V_K3-20-유도된 및 V_K1-39-유도된 경쇄의 전체 비장 (y-축)에서의 상대적인 mRNA 발현을 도시한다. 신호는 마우스 C의 발현에 대해 표준화된다. ND: 검출되지 않음.

도 19는 재배열 전 (상부) 및 재배열 후 (하부)의 마우스의 면역글로불린 κ 경쇄 대립유전자의 V 및 J 유전자 절편의 재조합 및 경쇄 유전자좌의 구조에 대한 일반적인 예시를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0208] 본 발명은 기술된 특정 방법들 및 실험 조건들에 한정되지 않는데, 그런 방법들과 조건들이 달라질 수 있기 때문이다. 또한 본원에서 사용된 용어는 특정 구체예들만을 기술할 목적에 대한 것이고, 본 발명의 범주는 청구범위에 의해서 규정되기 때문에 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 인지되어야 한다.

[0209] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 용어 및 구절은 분명하게 반대로 표시되거나 그 용어 또는 구절이 사용되는 맥락으로부터 분명하게 드러나지 않는 한, 해당 기술분야에서 그 용어들과 구절들이 얻은 의미를 포함한다. 비록 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 어떠한 방법들과 물질들이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 특별한 방법들과 물질들이 이제 기술된다. 언급된 모든 공보들은 본원에 그것의 전체 내용이 참조로 포함된다.

[0210] 본원에 사용되는 것과 같이, 용어 "항체"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 상호-연결된 두 개의 중쇄 (H) 및 두 개의 경쇄 (L)를 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 (V_H) 영역과 중쇄 불변 영역 (C_H)을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 (V_L)과 경쇄 불변 영역 (C_L)을 포함한다. V_H와 V_L 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리고, 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 사이에 끼어 있는 추가변성 영역으로 추가로 나누어진다. 각각의 V_H와 V_L은 다음의 순서로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단 쪽으로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3로서 약칭되고; 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로서 약칭될 수 있다). 용어 "고친화성" 항체는 그것의 표적 에피토프에 대해 약 10⁻⁹M 이하 (예컨대 약 1 x 10⁻⁹M, 1 x 10⁻¹⁰M, 1 x 10⁻¹¹M 또는 약 1 x 10⁻¹²M)의 K_D를 가지는 항체를 말한다. 한 구체예에서, K_D는 표면 플라즈몬 공명, 예컨대 BIACORETM에 의해 측정되고; 다른 구체예에서 K_D는 ELISA에 의해 측정된다.

[0211] 구절 "이중특이성 항체"는 둘 또는 그 이상의 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 이중특이성 항체는 두 개의 상이한 단클론성 항체의 단편을 포함하고 (도 7a), 일반적으로 두 개의 상이한 단클론성

항체로부터 유도된 두 개의 동일하지 않은 중쇄를 포함하며, 이때 각각의 중쇄는 두 개의 상이한 분자 상에 있는 상이한 에피토프 (예컨대 두 개의 상이한 면역원 상의 상이한 에피토프들; 도 7b, 좌측 하부 참조) 또는 동일한 분자 상의 상이한 에피토프 (예컨대 동일한 면역원 상의 상이한 에피토프; 도 7b, 우측 하부 참조)에 특이적으로 결합한다. 만약 이중특이성 항체가 두 개의 상이한 에피토프들 (제 1 에피토프 및 제 2 에피토프)에 선택적으로 결합할 수 있다면, 제 1 에피토프에 대한 제 1 중쇄의 친화성은 일반적으로 제 2 에피토프에 대한 제 1 중쇄의 친화성보다 적어도 1 내지 2 또는 3 또는 4 또는 그 이상의 차수의 크기만큼 더 낮을 것이고, 그 역도 마찬가지일 것이다. 이중특이성 항체에 의해 특이적으로 결합된 에피토프들은 동일하거나 상이한 표적 상에 있을 수 있다 (예컨대 동일하거나 상이한 단백질 상에; 도 7b 참조). 예시적인 이중특이성 항체들로는 종양 항원에 특이적인 제 1 중쇄와 세포독성 마커, 예컨대 Fc 수용체 (예컨대 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, 등) 또는 T 세포 마커 (예컨대 CD3, CD28, 등)에 대해 특이적인 제 2 중쇄를 가지는 것들이 있다. 나아가, 제 2 중쇄 가변 영역은 상이한 바람직한 특이성을 가지는 중쇄 가변 영역으로 치환될 수 있다. 예를 들어 종양 항원에 대해 특이적인 제 1 중쇄와 독소에 대해 특이적인 제 2 중쇄를 가지는 이중특이성 항체는 종양 세포에 독소 (예컨대 사포린, 빈카 알칼로이드 등)를 전달하기 위해 쌍을 이룰 수 있다. 다른 예시적인 이중특이성 항체는 활성화 수용체 (예컨대 B 세포 수용체, Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA, Fc α RI, T 세포 수용체 등)에 대해 특이적인 제 1 중쇄와 억제성 수용체 (예컨대 Fc γ RIIB, CD5, CD22, CD72, CD300a, 등)에 대해 특이적인 제 2 중쇄를 가지는 것들을 포함한다. 그런 이중특이성 항체들은 세포 활성화와 관련된 치료적 상태 (예컨대 알레르기 및 천식)에 대해 구성될 수 있다. 이중특이성 항체들은 예를 들면 동일하거나 상이한 면역원의 상이한 에피토프들을 인지하는 중쇄를 조합함으로써 만들어질 수 있다 (도 7b). 예를 들어 동일하거나 상이한 면역원의 상이한 에피토프를 인지하는 중쇄 가변 서열들을 코드화하는 핵산 서열들은 동일하거나 상이한 중쇄 불변 영역들을 코드화하는 핵산 서열들에 융합될 수 있고, 그런 서열들은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중특이성 항체는 두 개의 중쇄를 가지고, 각각의 중쇄는 세 개의 중쇄 CDR과, 이어서 (N-말단 쪽에서 C-말단 쪽으로) C_{H1} 도메인, 힌지, C_{H2} 도메인 및 C_{H3} 도메인, 및 에피토프-결합 특이성을 부여하지는 않지만 각각의 중쇄와 결합할 수 있거나, 각각의 중쇄와 결합할 수 있고 중쇄 에피토프-결합 영역들에 의해 결합된 에피토프들의 하나 또는 그 이상에 결합할 수 있거나, 또는 각각의 중쇄와 결합할 수 있고 하나 또는 둘 다의 중쇄를 하나 또는 둘 다의 에피토프에 결합시킬 수 있는 면역글로불린 경쇄를 가진다.

[0212]

용어 "세포"는 재조합 핵산 서열을 발현하기에 적당한 모든 세포를 포함한다. 세포는 원핵생물 및 진핵생물의 것들 (단일-세포 또는 다중-세포), 박테리아 세포 (예컨대 대장균, 바실루스 종, 스트렙토마이세스 종 등의 균주), 마이코박테리아 세포, 진균류 세포, 효모 세포 (예컨대 *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, 등), 식물 세포, 곤충 세포 (예컨대 SF-9, SF-21, 배콜로바이러스-감염된 곤충 세포, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*) 등), 비-인간 동물 세포, 인간 세포 또는 예를 들면 하이브리도마 또는 과드로마와 같은 세포 융합물들을 포함한다. 어떤 구체예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 쥐 또는 마우스 세포이다. 어떤 구체예에서, 세포는 진핵생물의 세포이고 다음 세포들로부터 선택된다: CHO (예컨대 CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예컨대 COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장 (예컨대 HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, CoLo205, HB 8065, HL-60, (예컨대 BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르틀리 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포 및 상기 언급된 세포로부터 유도된 셀라인. 어떤 구체예에서, 세포는 하나 또는 그 이상의 바이러스 유전자, 예컨대 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포를 포함한다 (예컨대 PER.C6TM 세포).

[0213]

구절 "상보성 결정 영역" 또는 용어 "CDR"은 정상적으로 (즉 야생형 동물에서) 면역글로불린 분자 (예컨대 항체 또는 T 세포 수용체)의 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역에서 두 개의 프레임워크 영역들 사이에서 나타나는 유기체의 면역글로불린 유전자의 핵산 서열에 의해 코드화된 아미노산 서열을 포함한다. CDR은 예를 들면 생식선 서열 또는 재배열 또는 미재배열 서열, 및 예를 들면 미접촉(naive) 또는 성숙한 B 세포 또는 T 세포에 의해 코드화될 수 있다. CDR은 체세포적으로 돌연변이되거나 (예컨대 동물의 생식선에 코드화된 서열과 다름), 인간화되거나 및/또는 아미노산 치환, 첨가 또는 결실로 변형될 수 있다. 어떤 환경에서 (예컨대 CD3의 경우), CDR은 예컨대 스플라이싱 또는 서열들의 연결 (예컨대 중쇄 CDR3를 형성하기 위한 V-D-J 재조합)의 결과로서, 인접하지는 않지만 (예컨대 미재배열 핵산 서열에 있음) B 세포 핵산 서열에서는 인접한 둘 또는 그 이상의 서열 (예컨대 생식선 서열)에 의해 코드화될 수 있다.

[0214]

용어 "보존성"은 보존성 아미노산 치환을 설명하기 위해 사용될 때, 한 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예컨대 전하 또는 소수성)을 가지는 측쇄 R 기를 가지는 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것을 포함한다.

일반적으로 보존성 아미노산 치환은 단백질의 관심의 기능적 특성, 예를 들면 바람직한 친화성으로 표적 에피토프에 특이적으로 결합하는 가변 영역의 능력을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 특성을 가지는 측쇄들을 가지는 아미노산들의 그룹의 예를 들면 지방족 측쇄를 가지는 것들, 예컨대 글리신, 알라닌, 발린, 로이신 및 아이소로이신; 지방족-하이드록실 측쇄를 가지는 것들, 예컨대 세린 및 쓰레오닌; 아미드-함유 측쇄를 가지는 것들, 예컨대 아스파라긴 및 글루타민; 방향족 측쇄를 가지는 것들, 예컨대 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; 염기성 측쇄를 가지는 것들, 예컨대 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; 산성 측쇄를 가지는 것들, 예컨대 아스파르트산 및 글루탐산; 및 황-함유 측쇄를 가지는 것들, 예컨대 시스테인 및 메티오닌을 포함한다. 보존성 아미노산 치환 그룹은 예를 들면 발린/로이신/아이소로이신, 페닐알라닌/티로신, 라이신/아르기닌, 알라닌/발린, 글루타메이트/아스파테이트 및 아스파라긴/글루타민을 포함한다. 어떤 구체예에서, 보존성 아미노산 치환은 예를 들면 알라닌 주사(scanning) 돌연변이생성에서 사용된 것과 같이, 단백질의 어떠한 천연 잔기를 알라닌으로 치환하는 것일 수 있다. 어떤 구체예에서, 문헌에서 개시된 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 포지티브 값을 가지는 보존성 치환이 만들어진다 (Gonnet *et al.* (1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45, 본원에 참조로 포함됨). 어떤 구체예에서, 치환은 중간 보존성 치환이고, 그 치환은 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 네거티브가 아닌 값을 가진다.

- [0215] 어떤 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 잔기 위치들은 하나 또는 그 이상의 보존성 아미노산 치환만큼 다르다. 어떤 구체예에서, 면역글로불린 경쇄 또는 그것의 단편 (예컨대 B 세포로부터의 발현과 분비를 허용하는 단편)에서 잔기 위치들은 그것의 아미노산 서열이 본원에서 열거되는 경쇄와 동일하지 않지만, 하나 또는 그 이상의 보존성 아미노산 치환만큼 상이하다.
- [0216] 구절 "에피토프-결합 단백질"은 적어도 하나의 CDR을 가지며 선택적으로 에피토프를 인지할 수 있는, 예컨대 약 1 마이크로몰 이하의 K_D (예컨대 약 $1 \times 10^{-6} M$, $1 \times 10^{-7} M$, $1 \times 10^{-8} M$, $1 \times 10^{-9} M$, $1 \times 10^{-10} M$, $1 \times 10^{-11} M$ 또는 약 $1 \times 10^{-12} M$ 의 K_D)로 에피토프에 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 치료적 에피토프-결합 단백질 (예컨대 치료적 항체)은 자주 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D 를 필요로 한다.
- [0217] 구절 "기능적 단편"은 발현될 수 있고, 분비될 수 있으며, 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D 로 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 에피토프-결합 단백질의 단편을 포함한다. 특이적 인지는 적어도 마이크로몰 범위, 나노몰 범위 또는 피코몰 범위에 있는 K_D 를 가지는 것을 포함한다.
- [0218] 용어 "생식선"은 체세포적으로 돌연변이되지 않은 세포, 예컨대 체세포적으로 돌연변이되지 않은 B 세포 또는 프레-B 세포 또는 조혈 세포의 면역글로불린 핵산 서열에 대한 언급을 포함한다.
- [0219] 구절 "중쇄" 또는 "면역글로불린 중쇄"는 어떠한 유기체로부터의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 다르게 명시되지 않는 한, 3개의 중쇄 CDR과 4개의 FR 영역을 포함한다. 중쇄의 단편들은 CDR, CDR과 FR 및 그것들의 조합을 포함한다. 전형적인 중쇄는 가변 도메인 다음에 (N-말단에서 C-말단 쪽으로) C_{H1} 도메인, 힌지, C_{H2} 도메인 및 C_{H3} 도메인을 가진다. 중쇄의 기능적 단편은 에피토프를 특이적으로 인지할 수 있고 (예컨대 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D 로 에피토프를 인지함), 세포로부터 발현되고 분비될 수 있으며 적어도 하나의 CDR을 포함하는 단편을 포함한다.
- [0220] 용어 "동일성"은 서열과 관련하여 사용될 때 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는, 해당 기술분야에 알려져 있는 많은 상이한 알고리즘에 의해 측정되는 것과 같은 동일성을 포함한다. 본원에 기술된 어떤 구체예에서, 동일성은 10.0의 오픈 갭 페널티, 0.1의 연장된 갭 페널티를 사용하는 ClustalW v. 1.83 (slow) 배열을 사용하고, Gonnet 유사성 매트릭스 (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008)를 사용하여 측정된다. 서열들의 동일성과 관련하여 비교된 서열들의 길이는 특별한 서열에 좌우되겠지만, 경쇄 불변 도메인의 경우, 길이는 기본적인 경쇄 불변 도메인을 형성하기 위해 자체-결합할 수 있는, 예컨대 베타 가닥들을 포함하는 두 개의 베타 쉬트를 형성할 수 있고 인간 또는 마우스의 적어도 하나의 C_{H1} 도메인과 상호작용할 수 있는 경쇄 불변 도메인으로 접히기에 충분한 길이의 서열을 함유해야 한다. C_{H1} 도메인의 경우에, 서열의 길이는 베타 가닥들을 포함하는 두 개의 베타 쉬트를 형성할 수 있고 마우스 또는 인간의 적어도 하나의 경쇄 불변 도메인과 상호작용할 수 있는 C_{H1} 도메인으로 접히기에 충분한 길이의 서열을 함유해야 한다.
- [0221] 구절 "면역글로불린 분자"는 2개의 면역글로불린 중쇄와 2개의 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 중쇄는 동일하게

나 상이할 수 있고, 경쇄는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0222] 구절 "경쇄"는 어떠한 유기체로부터의 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하고, 다르게 명시되지 않는 한 인간 κ 및 λ 경쇄와 VpreB, 뿐만 아니라 대응 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 (V_L) 도메인은 다르게 명시되지 않는 한 전형적으로 3개의 경쇄 CDR 및 4개의 프레임워크 (FR) 영역을 포함한다. 일반적으로, 전-길이의 경쇄는 아미노 말단에서 카르복시 말단 쪽으로, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는 V_L 도메인과 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 경쇄는 예를 들면 그것들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 제 1 또는 제 2 에피토프 중 어느 하나에 선택적으로 결합하지 않는 것들을 포함한다. 경쇄는 또한 그것들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 또는 그 이상의 에피토프에 결합하고 인지하거나, 또는 결합 및 인지로 중쇄를 보조하는 것들을 포함한다. 공통 경쇄는 재배열된 인간 $V_{\kappa}1-39J_{\kappa}5$ 서열 또는 재배열된 인간 $V_{\kappa}3-20J_{\kappa}1$ 서열로부터 유도되는 것들이고, 체세포적으로 돌연변이된 (예컨대 친화성 성숙된) 버전을 포함한다.

[0223] 구절 "마이크로 몰 범위"는 1 내지 999 마이크로 몰을 의미하는 것으로 의도되고; 구절 "나노 몰 범위"는 1 내지 999 나노 몰을 의미하는 것으로 의도되며; 구절 "피코 몰 범위"는 1 내지 999 피코 몰을 의미하는 것으로 의도된다.

[0224] 구절 "체세포적으로 돌연변이된"은 동형 전환(class-switching)이 진행된 B 세포로부터의 핵산 서열에 대한 언급을 포함하고, 이때 동형 전환된 B 세포의 면역글로불린 가변 영역 (예컨대 중쇄 가변 도메인 또는 중쇄 CDR 또는 FR 서열을 포함함)의 핵산 서열은, 예를 들어 동형 전환이 일어나지 않은 B 세포와 동형 전환이 진행된 B 세포 사이의 CDR 또는 프레임워크 핵산 서열의 차이와 같이, 동형 전환되기 이전의 B 세포의 핵산 서열과 동일하지 않다. "체세포적으로 돌연변이된"은 친화성-성숙되지 않은 B 세포의 해당하는 면역글로불린 가변 영역 서열 (즉 생식선 세포의 게놈의 서열)에 동일하지 않은 친화성-성숙된 B 세포로부터의 핵산 서열에 대한 언급을 포함한다. 구절 "체세포적으로 돌연변이된"은 또한 관심의 에피토프에 B 세포가 노출된 후의 B 세포로부터의 면역글로불린 가변 영역 핵산 서열에 대한 언급을 포함하며, 이때 핵산 서열은 관심의 에피토프에 B 세포가 노출하기 전의 해당하는 핵산 서열과 상이하다. 구절 "체세포적으로 돌연변이된"은 면역원 도전에 대한 반응으로 동물, 예컨대 인간 면역글로불린 가변 영역 핵산 서열을 가지는 마우스에서 생성되고, 그런 동물에서 고유하게 작동하는 선택 과정으로부터 유발된 항체로부터의 서열을 말한다.

[0225] 핵산 서열과 관련하여 용어 "미재배열된"은 동물 세포의 생식선에 존재하는 핵산 서열을 포함한다.

[0226] 구절 "가변 도메인"은 다음의 아미노산 영역을 N-말단에서 C-말단으로의 순서로 포함하는 (다르게 표시되지 않는 한) 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 (바람직하게 변형된)의 아미노산 서열을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0227] **보편적 경쇄**

[0228] 유용한 다중특이성 에피토프-결합 단백질, 예컨대 이중특이성 항체를 만들기 위한 이전의 노력들은 자주 이중이량체 이중특이성 인간 면역글로불린의 쌍을 이루기에 적절한 포맷인, 타당하게 공학처리하거나, 또는 시행착오를 통해 공학처리하기 위한 서열의 시험관 내 선택 또는 조작이라는 공통 패러다임을 공유하는 다양한 문제점들에 의해 방해받았다. 불행하게도, 시험관 내 공학처리 접근법은 전부는 아니라도 대부분, 적어도 개별적인 분자들에 적절한 즉석에서의 고정(*ad hoc* fixes)을 대부분 제공한다. 다른 한편으로, 인간 치료제로 이어질 수 있는 적절한 쌍이루기(pairing)를 선택하기 위해 복잡한 유기체를 사용하는 생체 내 방법은 현실화되지 못하였다.

[0229] 마우스 게놈 안으로 무작위로 삽입된 인간 면역글로불린 유전자좌, 가변 및 불변 영역들을 함유하는 마우스는 해당 기술분야에 알려져 있다. 그런 마우스의 초기 계통들은 제한된 수의 인간 면역글로불린 유전자 절편을 함유하였다. 구체적으로, 인간 면역글로불린 경쇄 유전자 절편을 함유하는 소수의 계통은 하나, 3개 또는 4개의 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편과 5개의 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편을 함유하였다 (Taylor *et al.* 1992, Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295; Fishwild *et al.* 1996, Nature Biotechnology 14:845-851; Lonberg *et al.* 1994, Nature 368:856-859; Green *et al.* 1994, Nature Genetics 7:13-21; Green and Jakobovits 1998, J. Exp. Med. 188(3):483-495; Green 1999, J. Immunol. Methods 231:11-23). 마우스 게놈 안으로 무작위로 삽입된 전체 인간 이식유전자의 일부로서 단지 소수의 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편을 함유하고 있는 이들 마우스는 면역적으로 손상된 B 세포 수, 손상된 B 세포 발달 및 다른 면역 결함을 보였다. 인간 면역글로불린 V_L 유전자의 발현은, B 세포 상에서의 인간 C_{κ} 의 표면 발현에 의해 검출되는 바, 야생형에 비

교하여 내인성 경쇄보다 낮았다. 놀랍게도, 본 발명은 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌에서 하나 또는 2개의 인간 면역글로불린 V_{κ} 유전자 절편을 함유하도록 공학처리될 때 B 세포 수 및 발달이 거의 야생형인 마우스를 제공한다 (예컨대 실시예 2 및 14, 표 3, 25 및 26, 도 4, 10a 내지 18). 나아가 어떤 구체예에서, 항원에 대한 반응으로 인간 V_H 및 V_L 도메인을 함유하는 여러 개의 고-친화성 역 키메릭 항체들을 생성할 수 있는 마우스가 본 발명에 의해 제공되며, 이때 각각의 V_L 도메인은 2개의 가능한 인간 V_L 유전자 절편 중 하나와 5개의 가능한 인간 J_L 유전자 절편 중 하나를 함유한다 (예컨대 실시예 5 내지 10, 12 및 14). 그래서 인간 면역글로불린 경쇄 미니유전자좌 (즉 제한된 수의 인간 면역글로불린 유전자 절편)를 사용하여 공학처리된 마우스의 예비 계통들과는 대조적으로, 현재 제한된 수의 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편 (하나 또는 2개), 및 어떤 구체예에서는 2개 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편을 함유하는 제공된 공학처리된 마우스가 놀랍게도 정상적인 B 세포 수, 정상적인 면역글로불린 경쇄 발현 및 정상적인 B 세포 발달을 나타낸다. 나아가, 그렇게 제공된 마우스는 또한 제한된 면역글로불린 경쇄 레퍼토피의 결과로서 다중 항원들에 대한 왕성한 면역 반응을 발생시키는 능력이 감소되거나 손상되지 않는 것으로 나타난다. 따라서, 2개 이하의 미재배열 인간 면역글로불린 V_L 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 면역글로불린 J_L 유전자 절편 - 또는 2개 이하의 재배열된 인간 $V_L J_L$ 절편-을 포함하고, 야생형 B 세포 집단 수 및 야생형 B 세포 발달을 나타내는 인간화된 V_L 유전자좌를 포함하는 마우스가 제공된다.

[0230] 일반적으로, 천연 마우스 서열은 자주 인간 치료 서열에 대한 좋은 공급원이 아니다. 적어도 그런 이유로 인해, 공통 인간 경쇄와 쌍을 이루는 마우스 중쇄 면역글로불린 가변 영역들을 생성하는 것은 실제 활용성이 제한된다. 마우스 중쇄 가변 서열을 인간화하는 한편 공통 인간 경쇄와 결합하는 능력을 유지하는 한편으로 에피토프 특이성과 친화성을 보유하기를 기대하면서 시행착오 과정에서 더 많은 시험관 내 공학처리 노력이 쏟아져서, 결과는 불확실하였다. 그런 과정 끝에, 최종 생성물이 일부의 특이성과 친화성을 유지할 수 있었고, 공통 경쇄와 결합할 수 있었지만, 궁극적으로 인간에서의 면역원성은 뚜렷한 위험을 유지하는 것으로 보인다.

[0231] 그러므로, 인간 치료제를 만들기 위한 적당한 마우스는 내인성 마우스 중쇄 가변 영역 유전자 절편 대신 인간 중쇄 가변 영역 유전자 절편의 적당히 큰 레퍼토리를 포함할 것이다. 인간 중쇄 가변 영역 유전자 절편은 재배열될 수 있어야 하고 내인성 마우스 중쇄 불변 도메인과 재조합되어 가역적인 키메릭 중쇄 (즉 인간 가변 도메인과 마우스 불변 영역을 포함하는 중쇄)를 형성할 수 있어야 한다. 중쇄는 동형 전환 및 체세포성 과돌연변이를 할 수 있어서 적당히 큰 중쇄 가변 도메인의 레퍼토리가 인간 경쇄 가변 영역의 제한된 레퍼토리와 결합할 수 있는 것을 선택하기 위해 마우스에 활용할 수 있어야 한다.

[0232] 다수의 중쇄에 대한 공통 경쇄를 선택하는 마우스는 실제로 활용될 수 있다. 다양한 구체예에서, 공통 경쇄만을 발현할 수 있는 마우스에서 발현하는 항체는 동일하거나 실질적으로 동일한 경쇄와 결합 및 발현할 수 있는 중쇄를 가질 것이다. 이것은 특히 이중특이성 항체를 만드는데 유용하다. 예를 들어 그런 마우스는 제 1 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 B 세포를 생성하기 위해 제 1 면역원으로 면역될 수 있다. 마우스 (또는 유전적으로 동일한 마우스)는 제 2 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 B 세포를 생성하기 위해 제 2 면역원으로 면역될 수 있다. 가변 중쇄 영역들은 B 세포로부터 클론될 수 있고 동일한 중쇄 불변영역 및 동일한 경쇄 영역 (예컨대 공통 경쇄)로 세포에서 발현되어 이중특이성 항체를 만들 수 있고, 이때 이중특이성 항체의 가변 중쇄 성분은 가변 경쇄 (또는 공통 경쇄) 성분과 결합하고 발현하기 위해 마우스에 의해 선택될 수 있다.

[0233] 발명자들은 그것의 가변 영역이 생식선 서열과 다른, 예컨대 친화성 성숙된 또는 체세포적으로 돌연변이된 가변 영역을 가지는 중쇄를 포함하여, 꽤 다양한 중쇄 패밀리와 적절하게 쌍을 이루는 면역글로불린 경쇄를 생성하기 위한 마우스를 공학적으로 제조하였다. 다양한 구체예에서, 마우스는 체세포성 돌연변이를 포함하는 인간 중쇄 가변 도메인과 인간 경쇄 가변 도메인이 쌍을 이루도록 고안됨으로써, 인간 치료제로서의 사용에 적절한 고친화성 결합 단백질로의 여정을 가능하게 한다.

[0234] 유전자 공학제조된 마우스는 유기체 내에서 길고 복잡한 항체 선택의 과정을 통해, 인간 중쇄 가변 도메인의 다양한 수집을 제한된 수의 인간 경쇄 옵션과 쌍을 이루는 데 있어 생물학적으로 적절한 선택을 하게 한다. 이것을 이루기 위하여, 마우스는 광범위한 인간 중쇄 가변 도메인 옵션과 함께 제한된 수의 인간 경쇄 가변 도메인 옵션을 제공하도록 공학적으로 처리된다. 면역원으로 도전될 때, 마우스는 그것의 레퍼토리의 수 또는 레퍼토리의 경쇄 옵션에 의해 크게 또는 단독으로 제한된, 면역원에 대한 항체를 발달시키기 위한 해결의 수를 그것의

레퍼토리에서 최대화한다. 다양한 구체예에서, 이것은, 그럼에도 불구하고 마우스가 특히 체세포적으로 돌연변이된 인간 중쇄 가변 도메인을 포함하여 인간 중쇄 가변 도메인의 상대적으로 큰 다양성과 부합하게 될 경쇄 가변 도메인의 적절하고 부합하는 체세포성 돌연변이를 이루는 것을 허용한다.

- [0235] 경쇄 옵션의 제한된 레퍼토리를 이루기 위하여, 마우스는 천연 마우스 경쇄 가변 도메인을 만들거나 재배열하는 능력을 비기능적으로 또는 실질적으로 비기능적으로 만들도록 공학적으로 처리된다. 이것은 예컨대 마우스의 경쇄 가변 영역 유전자 절편을 결실시킴으로써 이루어질 수 있다. 그런 다음 내인성 마우스 유전자좌가 내인성 마우스 경쇄 불변 도메인에 작동가능하게 연결된 선택된 적절한 외인성 인간 경쇄 가변 영역 유전자 절편에 의해, 외인성 인간 가변 영역 유전자 절편이 내인성 마우스 경쇄 불변 영역 유전자와 조합하여 재배열된 역 키메라 경쇄 유전자 (인간 가변, 마우스 불변)를 형성하도록 변형될 수 있다. 다양한 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 체세포적으로 돌연변이될 수 있다. 다양한 구체예에서, 경쇄 가변 영역의 체세포성 돌연변이를 획득하는 능력을 최대화하기 위하여, 적절한 인핸서(들)이 마우스에 보유된다. 예를 들어 인간 κ 경쇄 유전자 절편으로 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자 절편을 대체하기 위해 마우스 κ 경쇄 유전자를 변형시키는 데 있어서, 마우스 κ 인트론 인핸서 및 마우스 κ 3' 인핸서가 기능적으로 유지되거나 파괴되지 않는다.
- [0236] 다양한 역 키메라 (인간 가변, 마우스 불변) 중쇄와 결합된 제한된 레퍼토리의 역 키메라 (인간 가변, 마우스 불변) 경쇄를 발현하는 유전자 공학처리된 마우스가 제공된다. 다양한 구체예에서, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자 절편이 결실되고 내인성 마우스 C_{κ} 유전자에 작동가능하게 연결되어 있는 단일 (또는 2개의) 재배열된 인간 경쇄 영역으로 대체된다. 재배열된 인간 경쇄 영역의 체세포성 과돌연변이를 최대화하기 위한 구체예에서, 마우스 κ 인트론 인핸서와 마우스 κ 3' 인핸서가 유지된다. 다양한 구체예에서, 마우스는 또한 비기능적인 λ 경쇄 유전자좌, 또는 그것의 결실 또는 유전자좌가 λ 경쇄를 만들 수 없게 만드는 결실을 포함한다.
- [0237] 다양한 구체예에서, 내인성 마우스 경쇄 V_L 및 J_L 유전자 절편이 없고 재배열된 인간 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역 유전자좌를 포함하고, 한 구체예에서 마우스 불변 영역에 작동가능하게 연결된 재배열된 인간 V_L/J_L 서열을 포함하는 유전자 공학처리된 마우스가 제공되는데, 이때 유전자좌는 체세포성 과돌연변이를 진행할 수 있고, 유전자좌는 마우스 불변 영역에 연결된 인간 V_L/J_L 서열을 포함하는 경쇄를 발현한다. 그래서 다양한 구체예에서, 유전자좌는 마우스 κ 3' 인핸서를 포함하고, 그것은 체세포성 과돌연변이의 정상적이거나 야생형 수준과 상관된다.
- [0238] 하나 또는 2개의 경쇄가 예컨대 하나 내지 5개의 체세포성 돌연변이를 포함하는 인간 경쇄 가변 영역을 포함하는 구체예를 포함하여, 다양한 구체예에서 관심의 항원으로 면역될 때 유전자 공학처리된 마우스는 발현 및 기능하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 다양한 재배열을 나타내는 B 세포를 생성하고, 이때 하나 또는 2개의 경쇄가 재배열된다. 다양한 구체예에서, 그렇게 발현된 인간 경쇄는 마우스에서 발현된 어떠한 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역과 결합 및 발현될 수 있다.
- [0239] 본원에 기술된 제한된 면역글로불린 경쇄 레퍼토리 (예컨대 단일 인간 V_L 유전자 절편 또는 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편 및, 하나의 인간 J_L 유전자 절편 또는 임의로 둘 이상의 인간 J_L 유전자 절편) 를 포함하는 유전자 공학처리된 마우스 외에, 또한 단일 인간 V_H 유전자 절편 또는 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편을 포함하는 다른 유전자 변형 비-인간 동물이 본원에 제공된다. 어떤 구체예에서, 그런 비-인간 동물은 재배열된 인간 V_L/J_L 서열로 구성된 단일한 재배열된 인간 V_L 영역을 포함한다. 어떤 구체예에서, 그런 비-인간 동물은 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편 및 둘 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5개)의 인간 J_L 유전자 절편을 포함한다. 다양한 구체예에서, 인간 유전자 절편들은 비-인간 경쇄 불변 영역, 예컨대 마우스, 쥐 경쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된다.
- [0240] 그런 비-인간 동물은 마우스, 쥐, 토끼, 돼지, 소 (예컨대 젖소, 황소, 버팔로), 양, 사슴, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비, 영장류 (예컨대 마모셋, 게잡이 원숭이)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 적절한 유전자 변형가능한 ES 세포를 쉽게 입수할 수 없는 경우의 비-인간 동물에 대해서는, 본원에 기술된 것과 같은 유전자 변형을 포함하는 비-인간 동물을 제조하기 위하여 다른 방법들이 사용된다. 그런 방법으로는 예컨대, 비-ES 세포 계능 (예컨대 섬유아세포 또는 유도된 다능 세포)의 변형방법 및 변형된 계능을 적당한 세포, 예컨대 난모세포에 전달하기 위해 핵 전달을 사용하는 방법, 및 변형된 세포 (예컨대 변형된 난모세포)를 비-인간 동물에게 배아를 형성하기에 적당한 조건하에서 임신시키는 방법을 포함한다.
- [0241] 어떤 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 포유류이다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 작은 포

유류, 예컨대 디포도이테아(Dipodoidea) 또는 무로이테아(Muroidea) 상과의 작은 포유류이다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 설치류이다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 설치류는 마우스, 쥐 및 햄스터로부터 선택된다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 설치류는 무로이테아 상과로부터 선택된다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 동물은 칼로미스시dae(Calomyscidae) (예컨대 마우스-유사 햄스터), 크리세티dae(Cricetidae) (예컨대 햄스터, 신세계 쥐 및 마우스, 들쥐), 무리dae(Muridae) (참 마우스 및 참쥐, 게르빌루스 쥐, 아프리카가시쥐, 크레스티드 쥐), 네소미이다에(Nesomyidae) (산악 쥐, 바위 쥐, 위드-테일드 쥐, 말레이시아 쥐 및 마우스), 플라타칸소미이다에(Platacanthomyidae) (예컨대 가시겨울잠쥐) 및 스파라시dae(Spalacidae) (예컨대 두더지, 대나무 쥐 및 조코라스(zokoras))로부터 선택되는 과로부터 유래된다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 설치류는 참 마우스 또는 쥐 (무리dae과), 게르빌루스쥐, 아프리카가시쥐 및 크레스티드 쥐로부터 선택된다. 어떤 특정 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 마우스는 무리dae과의 구성원으로부터 유래된다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 설치류이다. 어떤 특정 구체예에서, 본 발명의 설치류는 마우스 및 쥐로부터 선택된다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 마우스이다.

[0242] 어떤 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr 및 C57BL/01a로부터 선택된 C57BL 계통의 마우스인 설치류이다. 어떤 특정 구체예에서, 본 발명의 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (예컨대 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 계통으로 이루어진 군으로부터 선택된 129 계통이다 (예컨대 Festing et al., 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach et al., 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032 참조). 어떤 특정 구체예에서, 본 발명의 유전자 변형된 마우스는 상기 언급된 129 계통과 상기 언급된 C57BL/6 계통의 혼합이다. 어떤 특정 구체예에서, 본 발명의 마우스는 상기 언급된 129 계통들의 혼합이거나 상기 언급된 BL/6 계통들의 혼합이다. 어떤 특정 구체예에서, 본원에 기술된 것과 같은 혼합의 129 계통은 129S6 (129/SvEvTac) 계통이다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 BALB 계통, 예컨대 BALB/c 계통이다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 마우스는 BALB 계통과 다른 상기 언급된 계통의 혼합이다.

[0243] 어떤 구체예에서, 본 발명의 비-인간 동물은 쥐이다. 어떤 특정 구체예에서, 본 발명의 쥐는 위스타 쥐, LEA 계통, 스프라그 도울리 계통, 피셔 계통, F344, F6 및 다크 아구티(Dark Agouti)로부터 선택된다. 어떤 특정 구체예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 쥐 계통은 위스타, LEA, 스프라그 도울리, 피셔, F34, F6 및 다크 아구티로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 계통의 혼합이다.

[0244] **하나 이상의 에피토프에 결합하는 에피토프-결합 단백질**

[0245] 본원에서 기술되는 조성물 및 방법은 고친화성으로 하나 이상의 에피토프에 결합하는 결합 단백질, 예컨대 이중 특이성 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 발명의 장점들은 그것의 각각이 단일 경쇄와 결합할, 적절하게 높은 결합력의 (예컨대 친화성 성숙된) 중쇄 면역글로불린 사슬을 선택하는 능력을 포함한다.

[0246] 재조합 세포 배양물로부터 이중특이성 항체 단편을 제조하기 위한 여러 기법들이 보고되어 있다. 그러나, 이중 특이성 결합 단백질의 합성 및 발현은 부분적으로 2개의 상이한 중쇄와 결합 및 발현할 수 있는 적절한 경쇄를 확인하는 것과 관련된 문제로 인해, 그리고 부분적으로 분리 문제로 인해 문제의 소지가 많다. 다양한 구체예에서, 본원에 기술된 조성물 및 방법은 성분들의 용해도/상호작용을 증가시킴으로써 전통적인 면역글로불린 구조를 유지하기 위해 특수한 변형(들)을 필요로 하지 않는 전 길이 이중특이성 항체의 장점을 제공한다 (도 7a). 다양한 구체예에서, 그런 변형(들)은 번거롭고 이중특이성 항체 기술의 개발 및 인간 질병을 치료하기 위한 그것들의 잠재적인 사용에서 장애물로서 작용하는 것으로 증명되었다. 그로써, 다양한 구체예에서, 다중 특이성이라는 부가된 특성을 가지는 천연 면역글로불린 구조 (즉 전 길이)를 제공하는 것을 통해서, 전 길이 이중특이성 항체는 이전의 이중특이성 단편에 결핍되었던 중요한 이펙터 기능을 유지하고, 나아가 더 긴 반감기라는 중요한 약물동역학적 변수를 증명하는 치료제를 제공한다.

[0247] 본원에 기술된 방법들 및 조성물들은 유전자 변형된 마우스가, 그렇지 않은 경우 천연 과정을 통해, 체세포적으로 돌연변이된 (예컨대 친화성 성숙된) 중쇄를 포함하여, 하나 이상의 중쇄와 결합 및 발현될 수 있는 적절한 경쇄를 선택하는 것을 허용한다. 본원에 기술된 것과 같이 역 키메라 중쇄 (즉 인간 가변 및 마우스 불변)를 가지는 친화성 성숙된 항체를 발현하는 변형된 마우스의 적절한 B 세포로부터의 인간 V_L 및 V_H 서열은 적절한 인간 불변 영역 유전자 서열 (예컨대 인간 IgG1)을 포함한 발현 벡터에서 한 프레임으로(in frame) 확인 및 클론될 수 있다. 그런 2개의 구성물이 제조될 수 있는데, 각각의 구성물은 상이한 에피토프에 결합하는 인간 중쇄 가변 도메인을 코드화한다. 인간 V_L들 (예컨대 V_k1-39J_k5 또는 V_k3-20J_k1) 중 하나는, 서열이 체세포적으로 돌연

변이되어 있는 생식선 서열 또는 B 세포에서, 적절한 인간 불변 영역 유전자 (예컨대 인간 κ 불변 유전자)에 한 프레임으로 융합될 수 있다. 이들 3개의 전체 인간 중쇄 및 경쇄 구성물들은 적절한 세포에서 발현을 위해 대체될 수 있다. 세포는 2가지 주요 종류, 즉 동일한 경쇄를 가지는 동종이량체 중쇄 및 동일한 경쇄를 가지는 이종이량체 중쇄를 발현할 것이다. 이들 주요 종류의 손쉬운 분리를 허용하기 위하여, 중쇄들 중 하나는 단백질 A-결합 결정기를 생략하도록 변형되고, 그 결과 이종이량체 결합 단백질로부터 동종이량체 결합 단백질의 부분 친화성(differential affinity)을 초래한다. 이 문제를 해결하는 조성물 및 방법들은 2010년 6월 25일에 출원되고 US 2010/0331527A1으로서 공개된 "천연 면역글로불린 방식을 가지는 쉽게 분리된 이중특이성 항체"라는 제목의 USSN 12/832,838에서 기술된다 (본원에 참조로 포함됨).

[0248] 한 측면으로, 본원에 기술된 것과 같은 에피토프-결합 단백질이 제공되는데, 이때 인간 V_L 및 V_H 서열들은 관심의 에피토프를 포함하는 항원으로 면역된, 본원에 기술된 마우스로부터 유도된다.

[0249] 한 구체예에서, 제 1 및 제 2 폴리펩티드를 포함하고, 제 1 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 쪽으로 제 1 에피토프에 선택적으로 결합하는 제 1 에피토프-결합 영역과, 이어서 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 IgG의 제 1 C_H3 영역을 포함하는 불변 영역을 포함하고; 제 2 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단 쪽으로 제 2 에피토프에 선택적으로 결합하는 제 2 에피토프-결합 영역과, 이어서 IgG1, IgG2, IgG4 및 그것들의 조합으로부터 선택된 인간 IgG의 제 2 C_H3 영역을 포함하는 불변 영역을 포함하는 에피토프-결합 단백질이 제공되며, 이때 제 2 C_H3 영역은 제 2 C_H3 의 단백질 A에의 결합을 감소시키거나 제거하는 변형을 포함한다.

[0250] 한 구체예에서, 제 2 C_H3 영역은 H95R 변형 (IMGT 엑손 넘버링에 의한 것임; EU 넘버링에 의하면 H435R)을 포함한다. 다른 구체예에서, 제 2 C_H3 영역은 추가로 Y96F 변형 (IMGT; EU에 의하면 Y436F)을 포함한다.

[0251] 한 구체예에서, 제 2 C_H3 영역은 변형된 인간 IgG1으로부터 유래되고, 추가로 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형을 포함한다.

[0252] 한 구체예에서, 제 2 C_H3 영역은 변형된 인간 IgG2로부터 유래되고, 추가로 N44S, K52N 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형을 포함한다.

[0253] 한 구체예에서, 제 2 C_H3 영역은 변형된 인간 IgG4로부터 유래되고, 추가로 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)로 이루어진 군으로부터 선택된 변형을 포함한다.

[0254] 하나 이상의 에피토프에 결합하는 에피토프-결합 단백질을 제조하기 위한 한 가지 방법은 관심의 제 1 에피토프를 포함하는 항원으로 본 발명에 따라 제 1 마우스를 면역시키는 것인데, 이때 마우스는 경쇄를 재배열하고 형성할 수 있는 내인성 마우스 V_L 을 함유하지 않은 내인성 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자좌를 포함하고, 내인성 마우스 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자좌에는 마우스 내인성 경쇄 불변 영역 유전자에 작동가능하게 연결된 단일한 재배열된 인간 V_L 영역이 있으며, 재배열된 인간 V_L 영역은 인간 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 및 인간 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 로부터 선택되고, 내인성 마우스 V_H 유전자 절편은 전체적으로 또는 부분적으로 인간 V_H 유전자 절편으로 대체되어 있어서, 마우스에 의해 만들어진 면역글로불린 중쇄가 단독으로 또는 실질적으로 인간 가변 도메인과 마우스 불변 도메인을 포함하는 중쇄가 된다. 면역될 때, 그런 마우스는 2개의 인간 경쇄 가변 도메인들 중 하나 (예컨대 인간 $V_{\kappa 1-39J_{\kappa 5}}$ 또는 인간 $V_{\kappa 3-20J_{\kappa 1}}$ 중 하나)만을 포함하는 역 키메라 항체를 만들 것이다. 일단 B 세포가 관심의 에피토프에 결합하는 V_H 를 코드화하는 것이 확인되면, V_H (및 임의로 V_L)의 뉴클레오티드 서열은 (예컨대 PCR에 의해) 회수될 수 있고 적절한 인간 면역글로불린 불변 도메인과 한 프레임으로 발현 구성물 안으로 클론될 수 있다. 이 과정은 제 2 에피토프에 결합하는 제 2 V_H 도메인을 확인하기 위해 반복될 수 있고, 제 2 V_H 유전자 서열은 회수되어 제 2의 적절한 면역글로불린 불변 도메인과 한 프레임으로 발현 벡터 안으로 클론될 수 있다. 제 1 및 제 2 면역글로불린 불변 도메인은 동일하거나 상이한 아이소타입일 수 있고, 면역글로불린 불변 도메인 중 하나 (다른 하나는 아님)는 본원에 또는 US 2010/0331527A1에 기술된 것과 같이 변형될 수 있고, 에피토프-결합 단백질은 적절한 세포에서 발현될 수 있으며, 예컨대 US 2010/0331527A1에서 기술된 것과 같이, 동종이량체 에피토프-결합 단백질에 비교하여 단백질 A에 대한 부분 친화성을 토대로 분리된다.

[0255] 한 구체예에서, 이중특이성 에피토프-결합 단백질의 제조 방법이 제공되는데, 그 방법은 제 1 친화성-성숙된 (예컨대 하나 또는 그 이상의 체세포성 과돌연변이를 포함하는) 인간 V_H 뉴클레오티드 서열 (V_{H1})을 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 확인하는 단계, 제 2 친화성-성숙된 (예컨대 하나 또는 그 이상의 체세포성 과돌연변이를 포함하는) 인간 V_H 뉴클레오티드 서열 (V_{H2})을 본원에 기술된 것과 같은 마우스로부터 확인하는 단계, 중쇄 1 (HC1)을 형성하기 위하여 US 2010/0331527A1에 기술된 것과 같이 V_{H1} 을 단백질 A-결정기 변형이 결핍되어 있는 인간 중쇄와 한 프레임으로 클로닝하는 단계, 중쇄 2 (HC2)를 형성하기 위하여 US 2010/0331527A1에 기술된 것과 같이 V_{H2} 를 단백질 A-결정기 변형이 결핍되어 있는 인간 중쇄와 한 프레임으로 클로닝하는 단계, HC1을 포함하는 발현 벡터와 HC2를 포함하는 동일하거나 상이한 발현 벡터를 세포 안에 도입하는 단계, 이때 세포는 또한 인간 경쇄 불변 도메인에 융합된 인간 V_{K1-39} /인간 J_{K5} 또는 인간 V_{K3-20} /인간 J_{K1} 을 포함하는 인간 면역글로불린 경쇄를 발현하는 단계, 세포가 V_{H1} 에 의해 코드화된 V_H 도메인 및 V_{H2} 에 의해 코드화된 V_H 도메인을 포함하는 이중특이성 에피토프-결합 단백질을 발현하도록 허용하는 단계 및 단일특이성 동중이량체 에피토프-결합 단백질과 비교하여 단백질 A에 결합하는 능력의 차이를 토대로 이중특이성 에피토프-결합 단백질을 분리하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, HC1은 IgG1이고, HC2는 변형 H95R (IMGT; EU에 의하면 H435R)을 포함하며 추가로 변형 Y96F (IMGT; EU에 의하면 Y436F)를 포함하는 IgG1이다. 한 구체예에서, V_H 도메인은 V_{H1} 에 의해 코드화되고, V_H 도메인은 V_{H2} 에 의해 코드화되며, 또는 두 가지 모두 체세포적으로 돌연변이된다.

[0256] **공통 인간 V_L 을 사용하여 발현하는 인간 V_H 유전자**

[0257] 4개의 상이한 항원에 대해 발생된 친화성-성숙된 항체들로부터의 다양한 인간 가변 영역들은 그것들의 동족 경쇄, 또는 인간 V_{K1-39}/J_{K5} , 인간 V_{K3-20}/J_{K1} 또는 인간 $V_{preB}/J_{\lambda 5}$ 로부터 선택된 적어도 하나의 인간 경쇄 중 어느 하나로 발현되었다 (실시예 1 참조). 각각의 항원에 대한 항체에 대해, 상이한 유전자 패밀리로 부터 체세포적으로 돌연변이된 고친화성 중쇄들은 재배열된 인간 생식선 V_{K1-39}/J_{K5} 및 V_{K3-20}/J_{K1} 영역과 성공적으로 쌍을 이루었고, 중쇄 및 경쇄를 발현하는 세포로부터 분리되었다. V_{K1-39}/J_{K5} 및 V_{K3-20}/J_{K1} 에 대해, 다음의 인간 V_H 유전자 패밀리로 부터 유도된 V_H 도메인들이 우선적으로 발현되었다: 1-2, 1-8, 1-24, 2-5, 3-7, 3-9, 3-11, 3-13, 3-15, 3-20, 3-23, 3-30, 3-33, 3-48, 4-31, 4-39, 4-59, 5-51 및 6-1. 그로써 V_{K1-39}/J_{K5} 및 V_{K3-20}/J_{K1} 중 하나 또는 둘 다로부터의 인간 V_L 도메인의 제한된 레퍼토리를 발현하도록 공학적으로 처리된 마우스는 마우스 V_H 유전자 절편을 인간 V_H 유전자 절편으로 대체하도록 변형된 체세포적으로 돌연변이된 인간 V_H 도메인을 생성할 것이다.

[0258] 단일한 재배열 경쇄 (예컨대 V_{K1-39}/J 또는 V_{K3-20}/J)와 결합된 역 키메릭 (인간 가변, 마우스 불변) 면역글로불린 중쇄를 발현하도록 유전자 공학처리된 마우스는, 관심의 항원으로 면역될 때, 다양한 인간 V_H 재배열체를 포함하는 B 세포들을 생성하였고 항원의 리간드에 대한 결합을 차단하는 능력과 항원의 변이체에 결합하는 능력에 관하여 다양한 특성을 가지는 다양한 고친화성 항원-특이적 항체들을 발현하였다 (실시예 5 내지 10 참조).

[0259] 그로써, 본원에 기술된 마우스 및 방법들은 체세포적으로 돌연변이된 인간 중쇄 가변 도메인을 포함하여, 다양한 재배열체로부터 유발되고, 광범위한 친화성 (약 나노 몰 이하의 K_D 를 나타내는 것을 포함함), 광범위한 특이성 (동일한 항원의 상이한 에피토프들에 대한 결합을 포함함)을 나타내며, 동일한 또는 실질적으로 동일한 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역과 결합하여 그것들을 발현하는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 도메인들을 제조하고 선택하는 데 유용하다.

[0260] **공통 경쇄를 가지는 전체 인간 이중특이성 항체**

[0261] 다양한 구현예들의 제 1 단계로서, 각각 인간 중쇄 가변 도메인들 (및 이중특이성 항체를 형성하는 임의의 추가의 핵산 서열)을 코드화하는 제 1 및 제 2 핵산 서열은 예를 들어 상이한 친화성 등을 가지는 상이한 에피토프들에 결합할 수 있는 바람직한 특성을 가지는 모 (parent) 단클론성 항체들로부터 선택된다 (도 7a 및 7b). 정상적으로, 인간 중쇄 가변 도메인을 코드화하는 핵산 서열은 본원에 기술된 것과 같이, 인간 투여에 적당할 인간 중쇄 불변 영역과의 융합을 허용하기 위해 면역된 마우스로부터 분리된다. 서열(들)에 대한 추가의 변형은 추가의 기능성을 이중특이성 항체에 첨가하는 돌연변이를 도입함으로써 이루어질 수 있고, 그것은 예를 들어 혈청 반감기를 증가시키는 것 (예컨대 U.S. 7,217,797 참조) 및/또는 항체-의존성 세포-중재된 세포독성을 증가시키는 것 (예컨대 U.S. 6,737,056 참조)을 포함한다. 돌연변이를 항체들의 불변 영역에 도입시키는 것은 해당 기

술분야에 공지되어 있다. 추가로, 이중특이성 항체의 부분은 세포 배양 중에 재조합적으로 만들어지고 분자의 다른 부분(들)은 상기 언급된 기법들에 의해 만들어질 수 있다.

[0262]

항체를 제조하기 위한 여러 기법들이 기술되었다. 예를 들어 다양한 구체예에서, 키메릭 항체들은 본원에 기술된 것과 같이 마우스에서 제조된다. 항체들은 직접 면역된 마우스의 B 세포로부터 분리되거나 (예컨대 U.S. 2007/0280945A1 참조) 및/또는 면역된 마우스의 B 세포는 하이브리도마를 만들기 위해 사용될 수 있다 ((Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495-497). 본원에 기술된 것과 같이 마우스로부터의 항체 (인간 중쇄 및/또는 경쇄)를 코드화하는 DNA는 종래 기법들을 사용하여 쉽게 분리되고 서열화된다. 본원에 기술된 것과 같이 마우스로부터 유도된 하이브리도마 및/또는 B 세포는 그런 DNA의 바람직한 공급원으로서 작용한다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터 안에 위치한 다음, 그렇지 않은 경우 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 숙주 세포 안에 트랜스펙션되어 재조합 숙주 세포에서 단클론성 항체의 합성이 얻어진다. DNA는 또한 예를 들면 쥐 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환함으로써 변형될 수 있다.

[0263]

다양한 구체예에서, 바람직한 특이성/친화성을 가지는 제 1 및 제 2 인간 중쇄 가변 도메인들을 코드화하는 제 1 및 제 2 핵산 서열, 및 인간 경쇄 도메인을 코드화하는 제 3 핵산 서열 (본원에 기술된 것과 같은 생식선 재배열 서열 또는 마우스로부터 분리된 경쇄 서열)의 DNA의 분리 및 선택에 이어서, 분자들을 코드화하는 3가지 핵산 서열들이 발현되어 해당 기술분야에서 광범위하게 활용될 수 있는 재조합 기법들을 사용하여 이중특이성 항체가 형성된다. 보통, 선택된 발현 시스템은 포유류 세포 발현 벡터와 숙주를 포함하고 그로써 이중특이성 항체가 적절하게 글리코실화될 것이다 (예컨대 글리코실화되는 항체 도메인들을 포함하는 이중특이성 항체의 경우). 그러나, 분자들은 또한 원핵생물 발현 시스템에서도 생성될 수 있다. 정상적으로, 숙주 세포는 제 1 인간 중쇄 가변 도메인, 제 2 인간 중쇄 가변 도메인 둘 다와 단일 벡터 또는 독립적인 벡터 상의 인간 경쇄 도메인을 코드화하는 DNA로 형질전환될 것이다. 그러나, 제 1 인간 중쇄 가변 도메인, 제 2 인간 중쇄 가변 도메인 및 인간 경쇄 도메인 (이중특이성 항체 성분들)을 독립적인 발현 시스템에서 발현시키고 시험관 내에서 그 발현된 폴리펩티드들을 결합시키는 것이 가능하다. 다양한 구체예에서, 인간 경쇄 도메인은 생식선 서열을 포함한다. 다양한 구체예에서, 인간 경쇄 도메인은 경쇄 도메인의 경쇄 가변 서열을 포함하는 하나 이하, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하 또는 5개 이하의 체세포성 과돌연변이를 포함한다.

[0264]

다양한 구체예에서, 2개의 중쇄 및 단일한 인간 경쇄를 코드화하는 핵산(들)(예컨대 cDNA 또는 게놈 DNA)은 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 및/또는 발현을 위해 복제가능한 벡터 안에 삽입된다. 많은 벡터가 활용가능하고, 일반적으로 그것들에 한정되는 것은 아니지만 다음 중 하나 또는 그 이상을 포함한다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 또는 그 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열. 각각의 성분은 개별적으로 또는 숙주 세포 선택 또는 실험적으로 결정된 다른 기준을 토대로 선택될 수 있다. 각 성분의 여러 예시는 해당 기술분야에 공지되어 있다.

[0265]

발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 숙주 유기체에 의해 인지되고 이중특이성 항체의 각각의 또는 모든 성분을 코드화하는 핵산 서열들에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적 숙주 세포들에 의해 인지되는 대다수의 프로모터가 잘 알려져 있다. 이들 프로모터는 제한 효소 소화에 의해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 그 분리된 프로모터 서열을 벡터 안에 삽입함으로써 이중특이성 항체-코드화 DNA에 작동가능하게 연결된다.

[0266]

진핵생물 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세포 유기체로부터의 핵화된 세포)에서 사용된 발현 벡터들은 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화를 위해 필요한 서열들을 함유할 수 있다. 그런 서열들은 흔히 진핵생물의 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 단부, 및 때로는 3' 미번역 영역으로부터 활용가능하다. 이들 영역은 이중특이성 항체 성분들을 코드화하는 mRNA의 미번역 부분의 폴리아데닐화된 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 절편들을 함유한다. 다양한 구체예들에 적당한 발현 벡터로는 이중특이성 항체를 코드화하는 DNA의 포유류 세포에서의 일과성(transient) 발현을 제공하는 것들을 포함한다. 일반적으로, 일과성 발현은 숙주 세포에서 효과적으로 복제할 수 있음으로써 숙주 세포가 발현 벡터의 많은 복사물을 축적하고, 계속해서 그 발현 벡터에 의해 코드화된 바람직한 폴리펩티드가 고수준으로 합성되도록 하는 발현 벡터의 사용을 포함한다. 적당한 발현 벡터와 숙주 세포를 포함하는 일과성 발현 시스템은 클론된 DNA에 의해 코드화된 폴리펩티드들의 편리한 포지티브 확인뿐 아니라, 제 1 또는 제 2 인간 중쇄 가변 도메인의 동종이량체를 가지는 모 항체들에 비하여 바람직한 결합 특이성/친화성 또는 바람직한 겔 이동 특성을 가지는 이중특이성 항체들의 신속한 스크리닝을 허용한다.

[0267]

다양한 구체예에서, 일단 이중특이성 항체의 성분들을 코드화하는 DNA가 상기에서 기술된 것과 같이 바람직한

백터(들)로 조립된 후에는 백터들은 발현 및 회수를 위해 적당한 숙주 세포 안으로 도입된다. 숙주 세포를 트랜스펙션시키는 것은 선택된 숙주 세포에 적절한 것으로 해당 기술분야에 알려져 있는 표준 기법들 (예컨대 일렉트로포레이션, 핵 마이크로주입, 곤충 세포 또는 다가 양이온, 예컨대 폴리브렌, 폴리오르니틴과의 박테리아 원형질 융합 등)을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0268]

다양한 구체에에서, 성분들을 함유한 발현 백터에 가장 잘 맞고 이중특이성 항체 중들의 가장 효과적이고 선호되는 생성을 허용하는 숙주 세포가 선택된다. 발현에 대해 예시적인 숙주 세포는 원핵생물과 진핵생물의 것들 (단일-세포 또는 다중-세포), 박테리아 세포 (예컨대 대장균, 바실루스 종, 스트렙토마이세스 종 등의 균주들), 미코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포 (예컨대 *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* 등), 식물 세포, 곤충 세포 (예컨대 SF-9, SF-21, 배칼로바이러스-감염된 곤충 세포, *Trichoplusia ni* 등), 비-인간 동물 세포, 인간 세포 또는 예를 들면 하이브리도마 또는 파드로마와 같은 세포 융합물을 포함한다. 다양한 구체에에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 쥐 또는 마우스 세포이다. 다양한 구체에에서, 세포는 다음 세포들로부터 선택된다: CHO (예컨대 CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예컨대 COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장 (예컨대 HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (예컨대 BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, 세르틀리 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포 및 상기 언급된 세포로부터 유도된 셀라인. 다양한 구체에에서, 세포는 하나 또는 그 이상의 바이러스 유전자, 예컨대 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포를 포함한다 (예컨대 PER.C6TM 세포).

[0269]

이중특이성 항체를 생성하기 위해 사용된 포유류 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 활용가능한 배지, 예컨대 Ham F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) 및 둘베코 변형 이글스 배지 ((DMEM), Sigma)가 숙주 세포의 배양에 적당하다. 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자들 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액 (예컨대 HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생물질 (예컨대 GENTAMYCINTM), 미량 원소 (보통 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코오스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 어떠한 다른 보충물들이 또한 해당 기술분야의 숙련자들에게 알려진 대로 적절한 농도에서 포함될 수 있다. 다양한 구체에에서, 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현에 대해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것들이고, 해당 기술분야에 숙련된 사람들에게 명백해질 것이다.

[0270]

이중특이성 항체는 다양한 구체에에서 분비된 폴리펩티드로서 배양 배지로부터 회수되지만, 또한 분비 신호 없이 직접 생성될 때 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수도 있다. 만약 이중특이성 항체가 막-결합된 상태라면, 그것은 적당한 계면활성제 용액 (예컨대 트리톤-X 100)을 사용하여 막으로부터 방출될 수 있다. 바람직하게, 본원에 기술된 이중특이성 항체들은 제 1 면역글로불린 C_H3 도메인 및 제 2 면역글로불린 C_H3 도메인의 사용을 포함하고, 여기서 제 1 및 제 2 면역글로불린 C_H3 도메인은 상호간에 적어도 하나의 아미노산만큼 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 없는 이중특이성 항체에 비교하여 단백질 A에 대한 이중특이성 항체의 결합을 감소시킨다 (U.S. 2010/0331527A1; 본원에 참조로 포함됨). 한 구체에에서, 제 1 면역글로불린 C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하고 제 2 면역글로불린 C_H3 도메인은 H95R 변형 (IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의하면 H435R)과 같은 단백질 A 결합을 감소시키거나 없애는 돌연변이를 함유한다. 제 2 C_H3는 추가로 Y96F 변형 (IMGT; EU에 의하면 Y436F)을 포함할 수 있다. 제 2 C_H3 내에서 발견될 수 있는 추가의 변형은 다음을 포함한다: IgG1 항체의 경우 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 항체의 경우 N44S, K52N 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I); IgG4 항체의 경우 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I). 상기 기술된 이중특이성 항체 포맷에 대한 변이는 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0271]

이중특이성 항체의 이중 성질 (즉 한 폴리펩티드의 상이한 에피토프에 특이적이거나 하나 이상의 표적 폴리펩티드에 특이적인 항원-결합 도메인을 함유할 수 있다, 도 7b 참조; 또한 예컨대 Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244 참조) 때문에, 항체들은 치료적 용도에 유용한 많은 장점을 부여한다. 예를 들어 이중특이성 항체들은 전용 세포독성 (예컨대 종양 세포를 사멸하기 위한)을 위해 백신 보조제로서, 응혈에 혈전용해제를 전달하기 위해, 표적 부위 (예컨대 종양)에서 효소 활성화된 선구약물을 전환시키기 위해, 감염성 질병을 치료하기 위해, 세포 표면 수용체에 면역 복합체를 표적화하기 위해

여 또는 중앙 세포에 면역독소를 전달하기 위하여 사용될 수 있다.

[0272] 본원에 기술된 이중특이성 항체들은 또한 치료적 및 비-치료적 및/또는 진단용 분석 방법, 예컨대 효소 면역분석, 2-부위 면역분석, 다양한 질병 (예컨대 암)의 시험관 내 또는 생체 내 면역진단, 경합성 결합 분석, 직간접 샌드위치 분석 및 면역침전 분석에서 사용될 수 있다. 이중특이성 항체들에 대한 다른 용도들도 해당 기술분야의 숙련자들에게 명백해질 것이다.

[0273] 다음의 실시예들은 해당 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람들에게 발명의 조성물의 제조 방법 및 사용 방법을 설명하기 위해 제공되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것들의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 사용된 숫자들 (예컨대 양, 온도 등)과 관련하여 정확성을 보장하기 위해 많은 노력이 기울여졌지만, 일부 실험적인 오차와 편차들은 해명되어야 한다. 다르게 표시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도로 표시되고, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

[0274] **실시예**

[0275] 다음의 실시예들은 해당 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람들에게 발명의 조성물의 제조 방법 및 사용 방법을 설명하기 위해 제공되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것들의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 사용된 숫자들 (예컨대 양, 온도 등)과 관련하여 정확성을 보장하기 위해 많은 노력이 기울여졌지만, 일부 실험적인 오차와 편차들은 해명되어야 한다. 다르게 표시되지 않는 한, 온도는 섭씨 온도로 표시되고, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이며, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이다.

[0276] **실시예 1. 선택된 인간 V_L 영역과 결합하는 인간 V_H 영역의 확인**

[0277] 단일한 재배열된 인간 생식선 경쇄가 항원 특이적 인간 항체들로부터의 인간 중쇄와 공동-발현될 수 있는지를 측정하기 위해 시험관 내 발현 시스템을 구성하였다.

[0278] 유전자 변형된 마우스에서 인간 항체들을 생성하기 위한 방법들은 알려져 있다 (예컨대 US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE® 참조). VELOCIMMUNE® 기술은 내인성 마우스 불변 영역 유전자좌에 작동가능하게 연결된 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 계놈을 가지는 유전자 변형된 마우스를 제조함으로써, 그 마우스가 항원성 자극에 대한 반응으로 인간 가변 영역과 마우스 불변 영역을 포함하는 항체를 생성하게 하는 것을 포함한다. VELOCIMMUNE® 마우스로부터 생성된 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들을 코드화하는 DNA는 전체적으로 인간이다. 처음에, 인간 가변 영역과 마우스 불변 영역을 가지는 고친화성 키메릭 항체를 분리한다. 아래에서 기술하게 되는 것과 같이, 항체들을 특성확인하고 친화성, 선택성, 에피토프 등을 포함하여 바람직한 특성에 대해 선택한다. 마우스 불변 영역들을 비-IgM 아이소타입을 함유하는 전체 인간 항체, 예를 들면 야생형 또는 변형된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 생성하기 위해 바람직한 인간 불변 영역으로 대체한다. 선택된 불변 영역은 특정 용도에 따라 선택될 수 있는 한편, 고친화성 항원-결합 및 표적 특이성 특성들은 가변 영역에 남아 있다.

[0279] VELOCIMMUNE® 마우스를 혈관형성을 촉진하는 성장 인자 (항원 C)로 면역시켰고, 항원-특이적 인간 항체를 분리한 후 해당 기술분야에 인지된 표준 기법들을 사용하여 V 유전자 유용성에 대해 서열화하였다. 선택한 항체를 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역 위에 클론하였고, 다음 3개의 인간 경쇄 중 하나와 쌍을 이루기 위해 69개의 중쇄를 선택하였다: (1) 인간 κ 불변 영역에 연결된 동족의 κ 경쇄, (2) 인간 κ 불변 영역에 연결된 재배열된 인간 생식선 V_κ1-39J_κ5 또는 (3) 인간 κ 불변 영역에 연결된 재배열된 인간 생식선 V_κ3-20J_κ1. 각각의 중쇄 및 경쇄 쌍을 CHO-K1 세포에서 표준 기법들을 사용하여 공동-트랜스펙션시켰다. 상층액 중의 항체의 존재를 ELISA 분석에서 항-인간 IgG에 의해 검출하였다. 항체 역가 (ng/ml)를 각 중쇄/경쇄 쌍에 대해 측정하였고, 상이한 재배열된 생식선 경쇄와의 역가를 모 항체 분자 (즉 동족 경쇄와 쌍을 이룬 중쇄)로 얻어진 역가와 비교하였으며, 천연 역가의 퍼센트를 계산하였다 (표 1). V_H: 중쇄 가변 유전자. ND: 현재의 실험 조건하에서 발현이 검출되지 않음.

표 1

[0280]

V _H	항체 역가 (ng/mL)			천연 역가의 퍼센트	
	동족 LC	V _κ 1-39J _κ 5	V _κ 3-20J _κ 1	V _κ 1-39J _κ 5	V _κ 3-20J _κ 1
3-15	63	23	11	36.2	17.5
1-2	103	53	ND	51.1	-
3-23	83	60	23	72.0	27.5
3-33	15	77	ND	499.4	-

4-31	22	69	17	309.4	76.7
3-7	53	35	28	65.2	53.1
-	22	32	19	148.8	89.3
1-24	3	13	ND	455.2	-
3-33	1	47	ND	5266.7	-
3-33	58	37	ND	63.1	-
-	110	67	18	60.6	16.5
3-23	127	123	21	96.5	16.3
3-33	28	16	2	57.7	7.1
3-23	32	50	38	157.1	119.4
-	18	45	18	254.3	101.7
3-9	1	30	23	2508.3	1900.0
3-11	12	26	6	225.9	48.3
1-8	16	ND	13	-	81.8
3-33	54	81	10	150.7	19.1
-	34	9	ND	25.9	-
3-20	7	14	54	203.0	809.0
3-33	19	38	ND	200.5	-
3-11	48	ND	203	-	423.6
-	11	23	8	212.7	74.5
3-33	168	138	182	82.0	108.2
3-20	117	67	100	57.5	86.1
3-23	86	61	132	70.7	154.1
3-33	20	12	33	60.9	165.3
4-31	69	92	52	133.8	75.0
3-23	87	78	62	89.5	71.2
1-2	31	82	51	263.0	164.6
3-23	53	93	151	175.4	285.4
-	11	8	17	75.7	151.4
3-33	114	36	27	31.6	23.4
3-15	73	39	44	53.7	59.6
3-33	1	34	16	5600.0	2683.3
3-9	58	112	57	192.9	97.6
3-33	67	20	105	30.1	157.0
3-33	34	21	24	62.7	70.4
3-20	10	49	91	478.4	888.2
3-33	66	32	25	48.6	38.2
3-23	17	59	56	342.7	329.8
-	58	108	19	184.4	32.9
-	68	54	20	79.4	29.9
3-33	42	35	32	83.3	75.4
-	29	19	13	67.1	43.9
3-9	24	34	29	137.3	118.4
3-30/33	17	33	7	195.2	43.1
3-7	25	70	74	284.6	301.6
3-33	87	127	ND	145.1	-
6-1	28	56	ND	201.8	-
3-33	56	39	20	69.9	36.1
3-33	10	53	1	520.6	6.9
3-33	20	67	10	337.2	52.3
3-33	11	36	18	316.8	158.4
3-23	12	42	32	356.8	272.9
3-33	66	95	15	143.6	22.5
3-15	55	68	ND	123.1	-
-	32	68	3	210.9	10.6
1-8	28	48	ND	170.9	-
3-33	124	192	21	154.3	17.0
3-33	0	113	ND	56550.0	-

3-33	10	157	1	1505.8	12.5
3-33	6	86	15	1385.5	243.5
3-23	70	115	22	163.5	31.0
3-7	71	117	21	164.6	29.6
3-33	82	100	47	122.7	57.1
3-7	124	161	41	130.0	33.5

[0281]

유사한 실험으로, VELOCIMMUNE® 마우스를 여러 상이한 항원으로 면역시켰고, 항원 특이적 인간 항체의 선택된 중쇄를 상이한 재배열된 인간 생식선 경쇄와 쌍을 이루는 그것의 능력에 대해 시험하였다 (상기에서 기술된 것과 같음). 이 실험에서 사용한 항원들은 콜레스테롤 항상성에 포함된 효소 (항원 A), 글루코오스 항상성을 조절하는 데 포함된 혈청 호르몬 (항원 B), 혈관형성을 촉진하는 성장 인자 (항원 C) 및 세포-표면 수용체 (항원 D)를 포함하였다. 항원 특이적 항체들을 각 면역화 그룹의 마우스들로부터 분리하였고, 중쇄 및 경쇄 가변 영역들을 클론하고 서열화하였다. 중쇄 및 경쇄의 서열로부터 V 유전자 유용성을 측정하였고, 선택한 중쇄를 그것의 동족 경쇄 또는 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 영역 중 어느 하나와 쌍을 이루었다. 각각의 중쇄/경쇄 쌍을 CHO-K1 세포에서 공동-트랜스펙션시켰고, 상층액 중의 항체의 존재를 ELISA 분석에서 항-인간 IgG에 의해 검출하였다. 항체 역가 (µg/ml)를 각 중쇄/경쇄 쌍에 대해 측정하였고, 상이한 재배열된 생식선 경쇄와의 역가를 모 항체 분자 (즉 동족 경쇄와 쌍을 이룬 중쇄)로 얻어진 역가와 비교하였으며, 천연 역가의 퍼센트를 계산하였다 (표 2). V_H: 중쇄 가변 유전자. V_K: K 경쇄 가변 유전자. ND: 현재의 실험 조건하에서 발현이 검출되지 않음.

표 2

[0282]

항원	항체	V _H	V _K	역가 (µg/ml)			천연 역가 퍼센트
				V _H 단독	V _H + V _K	V _H + V _K 1-39J _K 5	
A	320	1-18	2-30	0.3	3.1	2.0	66
	321	2-5	2-28	0.4	0.4	1.9	448
	334	2-5	2-28	0.4	2.7	2.0	73
	313	3-13	3-15	0.5	0.7	4.5	670
	316	3-23	4-1	0.3	0.2	4.1	2174
	315	3-30	4-1	0.3	0.2	3.2	1327
	318	4-59	1-17	0.3	4.6	4.0	86
	B	257	3-13	1-5	0.4	3.1	3.2
283		3-13	1-5	0.4	5.4	3.7	69
637		3-13	1-5	0.4	4.3	3.0	70
638		3-13	1-5	0.4	4.1	3.3	82
624		3-23	1-17	0.3	5.0	3.9	79
284		3-30	1-17	0.3	4.6	3.4	75
653		3-33	1-17	0.3	4.3	0.3	7
268		4-34	1-27	0.3	5.5	3.8	69
633	4-34	1-27	0.6	6.9	3.0	44	
C	730	3-7	1-5	0.3	1.1	2.8	249
	728	3-7	1-5	0.3	2.0	3.2	157
	691	3-9	3-20	0.3	2.8	3.1	109
	749	3-33	3-15	0.3	3.8	2.3	62
	750	3-33	1-16	0.3	3.0	2.8	92
	724	3-33	1-17	0.3	2.3	3.4	151
	706	3-33	1-16	0.3	3.6	3.0	84
	744	1-18	1-12	0.4	5.1	3.0	59
	696	3-11	1-16	0.4	3.0	2.9	97
	685	3-13	3-20	0.3	0.5	3.4	734
	732	3-15	1-17	0.3	4.5	3.2	72
	694	3-15	1-5	0.4	5.2	2.9	55
	743	3-23	1-12	0.3	3.2	0.3	10
	742	3-23	2-28	0.4	4.2	3.1	74
693	3-23	1-12	0.5	4.2	4.0	94	
D	136	3-23	2-28	0.4	5.0	2.7	55

155	3-30	1-16	0.4	1.0	2.2	221
163	3-30	1-16	0.3	0.6	3.0	506
171	3-30	1-16	0.3	1.0	2.8	295
145	3-43	1-5	0.4	4.4	2.9	65
49	3-48	3-11	0.3	1.7	2.6	155
51	3-48	1-39	0.1	1.9	0.1	4
159	3-7	6-21	0.4	3.9	3.6	92
169	3-7	6-21	0.3	1.3	3.1	235
134	3-9	1-5	0.4	5.0	2.9	58
141	4-31	1-33	2.4	4.2	2.6	63
142	4-31	1-33	0.4	4.2	2.8	67

[0283] 이들 실험으로부터 얻어진 결과들은 체세포적으로 돌연변이되고, 상이한 유전자 패밀리로부터 유래된 고친화성 중쇄들이 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1 영역과 쌍을 이룰 수 있으며 정상 항체 분자로서 세포로부터 분비될 수 있다는 것을 증명한다. 표 1에서 알 수 있는 것과 같이, 항체 역가는 모 항체의 동족 경쇄와 비교하여 재배열된 인간 V_K1-39J_K5 경쇄와 쌍을 이루었을 때 약 61% (69개 중 42개) 증가하였고, 재배열된 인간 V_K3-20J_K1 경쇄와 쌍을 이루었을 때 약 29% (69개 중 20개) 증가하였다. 중쇄의 약 20% (69개 중 14개)에 대해서, 재배열된 인간 생식선 경쇄는 둘 다 모 항체의 동족 경쇄에 비교하여 발현의 증가를 나타냈다. 표 2에서 알 수 있는 것과 같이, 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 영역은 모 항체에 대한 동족 경쇄에 비교하여 항원들의 광범위한 상이한 부류에 특이적인 여러 중쇄의 발현에서 증가를 나타냈다. 항체 역가는 모 항체의 동족 경쇄에 비교하여 중쇄의 약 35% (15/43)에 대해 2배 이상 증가하였다. 2개의 중쇄 (315 및 316)에 대해, 증가는 모 항체에 비교하여 10배보다 컸다. 모 항체의 동족 경쇄에 비교하여 발현의 증가를 나타낸 모든 중쇄 내에서, 패밀리 3 (V_H3) 중쇄는 다른 중쇄 가변 영역 유전자 패밀리에 비교하여 증폭하여 나타난다. 이것은 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1 경쇄와 쌍을 이루는 인간 V_H3 중쇄의 유리한 관계를 증명한다.

[0284] **실시예 2. 재배열된 인간 생식선 경쇄 유전자좌의 생성**

[0285] 마우스 계놈 박테리아 인공 염색체 (BAC) 클론 320g12 및 254m04 (Invitrogen)를 변형시키기 위하여 다양한 재배열된 인간 생식선 경쇄 표적화 벡터를 VELOCIGENE® 기술을 사용하여 제조하였다 (예컨대 미국 특허 제 6,586,251호 및 Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659 참조). 이들 2개의 BAC 클론을 사용하여 계놈 구성물을 단일 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역을 함유하도록 공학처리하였고, 그것을 내인성 κ 가변이 결실되도록 사전에 변형시켜 놓은 내인성 κ 경쇄 유전자좌 안에 삽입하고 유전자 절편들을 결합시켰다.

[0286] **재배열된 인간 생식선 경쇄 표적화 벡터의 구성**

[0287] 3개의 상이한 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역을 해당 기술분야에 인지되어 있는 표준 분자생물학 기법들을 사용하여 만들었다. 이들 2개의 영역을 구성하기 위해 사용된 인간 가변 유전자 절편은 재배열된 인간 V_K1-39J_K5, 재배열된 인간 V_K3-20J_K1 및 재배열된 인간 VpreBJλ5 서열을 포함하였다.

[0288] 마우스 V_K3-7 유전자의 엑손 1 (리더 펩티드를 코드화함) 및 인트론 1을 함유하는 DNA 절편을 데노보(de novo) DNA 합성 (Integrated DNA Technologies)에 의해 만들었다. 5' 미변역 영역의 일부부터 자연적으로 발생하는 BspI 제한 효소 부위까지를 포함하였다. 인간 V_K1-39 및 V_K3-20 유전자들의 엑손들을 인간 계놈 BAC 라이브러리로부터 PCR 증폭시켰다. 전방 프라이머는 마우스 V_K3-7 유전자의 인트론 1의 스플라이스 수용체 부위를 함유하는 5' 연장부를 가지고 있다. 인간 V_K1-39 서열의 PCR에 사용한 역 프라이머는 인간 J_K5를 코드화하는 연장을 포함하고 있는 한편, 인간 V_K3-20 서열의 PCR에 사용한 역 프라이머는 인간 J_K1을 코드화하는 연장을 포함하였다. 인간 VpreBJλ5 서열을 데노보 DNA 합성 (Integrated DNA Technologies)에 의하여 만들었다. 스플라이스 공여 부위를 포함하는 인간 J_K-C_K 인트론의 일부를 플라스미드 pBS-296-HA18-PISceI로부터 PCR 증폭시켰다. 전방 PCR 프라이머는 인간 J_K5, J_K1 또는 Jλ5 서열 중 어느 하나의 일부를 코드화하는 연장부를 포함하였다. 역 프라이머는 인트론에 이미 공학적으로 도입되어 있는 PI-SceI 부위를 포함하였다.

[0289] 마우스 V_K3-7 엑손 1/인트론 1, 인간 가변 경쇄 엑손 및 인간 J_K-C_K 인트론 단편들을 중첩 연장 PCR에 의해 함께 결합시키고, BspI 및 PI-SceI으로 소화시킨 후, 인간 V_K3-15 가변 유전자 절편으로부터의 프로모터를 함유하고 있는 플라스미드 pBS-296-HA18-PISceI 안에 결합시켰다. 플라스미드 pBS-296-HA18-PISceI 내에 있는 록

시드(loxed) 하이그로마이신 카세트를 양옆에 NotI 및 AscI 부위가 있는 FRTed 하이그로마이신 카세트로 대체하였다. 이 플라스미드의 NotI/PI-SceI 단편을 마우스 J_K-C_K 인트론, 마우스 C_K 엑손 및 마우스 κ 유전자좌 하류의 약 75kb의 게놈 서열을 함유하고, 마우스 ES 세포에서 상동성 재조합에 대한 3' 상동성 아암을 제공하는 변형된 마우스 BAC 254m04 안에 결찰시켰다. 그런 다음 이 BAC의 NotI/AscI 단편을 마우스 ES 세포에서의 상동성 재조합을 위해 FRTed 네오마이신 카세트 및 내인성 κ 유전자좌 상류의 약 23kb의 게놈 서열을 함유하고 있는 변형된 마우스 BAC 302g12에 결찰시켰다.

[0290] **재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 표적화 벡터 (도 1)**

[0291] 표적화 벡터 안으로의 클로닝을 위해 공학처리된 경쇄 삽입물의 5' 및 3' 단부에 제한 효소 부위를 다음과 같이 도입하였다: 5' 단부에 AscI 부위 및 3' 단부에 PI-SceI 부위. 5' AscI 부위 및 3' PI-SceI 부위 내에서 표적화 벡터는 5'에서 3' 방향으로, 마우스 BAC 클론 302g12로부터 얻은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 대해 5'쪽 서열을 함유하는 5' 상동성 아암, FRTed 네오마이신 내성 유전자, 인간 V_K3-15 프로모터를 포함하는 게놈 서열, 마우스 V_K3-7 가변 유전자 절편의 리더 서열, 마우스 V_K3-7 가변 유전자 절편의 인트론 서열, 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 영역의 오픈 리딩 프레임, 인간 J_K-C_K 인트론의 일부를 함유하는 게놈 서열 및 마우스 BAC 클론 254m04로부터 얻어진 내인성 마우스 J_K5 유전자 절편의 3' 서열을 함유하는 3' 상동성 아암을 포함하였다 (도 1, 중간). 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌의 상류 및 가장 3'쪽의 J_K 유전자 절편의 하류에 있는 유전자 및/또는 서열 (예컨대 내인성 3' 인헨서)은 표적화 구성물에 의해 변형되지 않았다 (도 1 참조). 공학처리된 인간 V_K1-39J_K5 유전자좌의 서열은 SEQ ID NO:1에 표시된다.

[0292] 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 영역의 BAC DNA 안으로의 표적화된 삽입을 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의하여 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역 내에 있는 서열들에 위치한 프라이머들을 사용하여 확인하였다. 간단히 설명하면, 마우스 V_K3-7 리더 서열에 대해 3'쪽의 인트론 서열을 프라이머 ULC-m1F (AGGTGAGGGT ACAGATAAGT GTTATGAG; SEQ ID NO:2) 및 ULC-m1R (TGACAAATGC CCTAATTATA GTGATCA; SEQ ID NO:3)을 사용하여 확인하였다. 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 영역의 오픈 리딩 프레임을 프라이머 1633-h2F (GGGCAAGTCA GAGCATTAGC A; SEQ ID NO:4) 및 1633-h2R (TGCAAAGTGG ATGCAGCATA G; SEQ ID NO:5)을 사용하여 확인하였다. 네오마이신 카세트를 프라이머 neoF (ggtggagagg ctattcggc; SEQ ID NO:6) 및 neoR (gaacacggcg gcatcag; SEQ ID NO:7)을 사용하여 확인하였다. 그런 다음 표적화된 BAC DNA를 사용하여 마우스 ES 세포를 생성된 변형 ES 세포에 대해 일렉트로포레이션하여 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 영역을 발현하는 키메라 마우스를 제조하였다.

[0293] 포지티브 ES 세포 클론을 내인성 유전자좌 안에 삽입된 공학처리된 V_K1-39J_K5 경쇄 영역에 특이적인 프로브를 사용하여 Taqman™ 스크리닝과 염색체분석(karyotyping)에 의해 확인하였다. 간단하게 설명하면, 프로브 neoP (TGGGCACAAC AGACAATCGG CTG; SEQ ID NO:8)는 네오마이신 마커 유전자 내에서 결합하고, 프로브 ULC-m1P (CCATTATGAT GCTCCATGCC TCTCTGTTC; SEQ ID NO:9)는 마우스 V_K3-7 리더 서열에 대해 3'쪽의 인트론 서열 내에서 결합하며 프로브 1633h2P (ATCAGCAGAA ACCAGGGAAA GCCCCT; SEQ ID NO:10)는 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 오픈 리딩 프레임 내에서 결합한다. 그런 다음 포지티브 ES 세포 클론을 사용하여 암컷 마우스에 이식하여 생식선 V_K1-39J_K5 경쇄 영역을 발현하는 한배 새끼를 생성하였다.

[0294] 다르게는, 재배열된 인간 생식선 V_K1-39J_K5 경쇄 영역을 내포하는 ES 세포를 표적화 구성물에 의해 도입된 FRTed 네오마이신 카세트를 제거하기 위해 FLP를 발현하는 구성물로 트랜스펙션시켰다. 임의로, 네오마이신 카세트는 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스에 사육함으로써 제거한다 (예컨대 US 6,774,279 참조). 임의로, 네오마이신 카세트는 마우스에 보유된다.

[0295] **재배열된 인간 생식선 V_K3-20J_K1 표적화 벡터 (도 2)**

[0296] 유사한 방식으로, 재배열된 인간 생식선 V_K3-20J_K1 영역을 발현하는 공학처리된 경쇄 유전자좌를, 5'에서 3' 방향으로, 마우스 BAC 클론 302g12로부터 얻은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 대해 5'쪽 서열을 함유하는 5' 상동성 아암, FRTed 네오마이신 내성 유전자, 인간 V_K3-15 프로모터를 포함하는 게놈 서열, 마우스 V_K3-7 가변 유전자 절편의 리더 서열, 마우스 V_K3-7 가변 유전자 절편의 인트론 서열, 재배열된 인간 생식선 V_K3-20J_K1 영역의 오픈 리딩 프레임, 인간 J_K-C_K 인트론의 일부를 함유하는 게놈 서열 및 마우스 BAC 클론 254m04로부터 얻어진 내인성 마우스 J_K5 유전자 절편의 3' 서열을 함유하는 3' 상동성 아암을 포함하는 표적화 구성물을 사용하여 만들었다 (도 2, 중간). 공학처리된 인간 V_K3-20J_K1 유전자좌의 서열은 SEQ ID NO:11에 표시된다.

[0297] 재배열된 인간 생식선 V_K3-20J_K1 영역의 BAC DNA 안으로의 표적화된 삽입을 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의하여

여 재배열된 인간 생식선 Vκ3-20Jκ1 경쇄 영역 내에 있는 서열들에 위치한 프라이머들을 사용하여 확인하였다. 간단히 설명하면, 마우스 Vκ3-7 리더 서열에 대해 3'쪽의 인트론 서열을 프라이머 ULC-m1F (SEQ ID NO:2) 및 ULC-m1R (SEQ ID NO:3)을 사용하여 확인하였다. 재배열된 인간 생식선 Vκ3-20Jκ1 영역의 오픈 리딩 프레임에 프라이머 1635-h2F (TCCAGGCACC CTGTCTTTG; SEQ ID NO: 12) 및 1635-h2R (AAGTAGCTGC TGCTAACACT CTGACT; SEQ ID NO: 13)을 사용하여 확인하였다. 네오마이신 카세트를 프라이머 neoF (SEQ ID NO:6) 및 neoR (SEQ ID NO:7)을 사용하여 확인하였다. 그런 다음 표적화된 BAC DNA를 사용하여 마우스 ES 세포를 생성된 변형 ES 세포에 대해 일렉트로포레이션하여 재배열된 인간 생식선 Vκ3-20Jκ1 경쇄를 발현하는 키메라 마우스를 제조하였다.

[0298] 포지티브 ES 세포 클론을 내인성 κ 경쇄 유전자좌 안에 삽입된 공학처리된 Vκ3-20Jκ1 경쇄 영역에 특이적인 프로브를 사용하여 Taqman™ 스크리닝과 염색체분석(karyotyping)에 의해 확인하였다. 간단하게 설명하면, 프로브 neoP (SEQ ID NO:8)는 네오마이신 마커 유전자 내에서 결합하고, 프로브 ULC-m1P (SEQ ID NO:9)는 마우스 Vκ3-7 리더 서열 내에서 결합하며 프로브 1635h2P (AAAGAGCCAC CCTCTCCTGC AGGG; SEQ ID NO: 14)는 인간 생식선 Vκ3-20Jκ1 오픈 리딩 프레임 내에서 결합한다. 그런 다음 포지티브 ES 세포 클론을 사용하여 암컷 마우스에 이식하였다. 한배 새끼들은 생식선 Vκ3-20Jκ1 경쇄 영역을 발현하였다.

[0299] 다르게는, 재배열된 인간 생식선 Vκ3-20Jκ1 경쇄 영역을 내포하는 ES 세포를 표적화 구성물에 의해 도입된 FRTed 네오마이신 카세트를 제거하기 위해 FLP를 발현하는 구성물로 트랜스펙션시켰다. 임의로, 네오마이신 카세트는 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스에 사육함으로써 제거한다 (예컨대 US 6,774,279 참조). 임의로, 네오마이신 카세트는 마우스에 보유된다.

[0300] **재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 표적화 벡터 (도 3)**

[0301] 유사한 방식으로, 재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 영역을 발현하는 공학처리된 경쇄 유전자좌를, 5'에서 3' 방향으로, 마우스 BAC 클론 302g12로부터 얻은 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 대해 5'쪽 서열을 함유하는 5' 상동성 아암, FRTed 네오마이신 내성 유전자, 인간 Vκ3-15 프로모터를 포함하는 게놈 서열, 마우스 Vκ3-7 가변 유전자 절편의 리더 서열, 마우스 Vκ3-7 가변 유전자 절편의 인트론 서열, 재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 영역의 오픈 리딩 프레임, 인간 Jκ-Cκ 인트론의 일부를 함유하는 게놈 서열 및 마우스 BAC 클론 254m04로부터 얻어진 내인성 마우스 Jκ5 유전자 절편의 3' 서열을 함유하는 3' 상동성 아암을 포함하는 표적화 구성물을 사용하여 만들었다 (도 3, 중간). 공학처리된 인간 VpreBJλ5 유전자좌의 서열은 SEQ ID NO:15에 표시된다.

[0302] 재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 영역의 BAC DNA 안으로의 표적화된 삽입을 증합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의하여 재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 경쇄 영역 내에 있는 서열들에 위치한 프라이머들을 사용하여 확인하였다. 간단히 설명하면, 마우스 Vκ3-7 리더 서열에 대해 3'쪽의 인트론 서열을 프라이머 ULC-m1F (SEQ ID NO:2) 및 ULC-m1R (SEQ ID NO:3)을 사용하여 확인하였다. 재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 영역의 오픈 리딩 프레임을 프라이머 1616-h1F (TGTCTCGGC CCTTGA; SEQ ID NO:16) 및 1616-h1R (CCGATGTCAT GGTCGTCTCT; SEQ ID NO:17)을 사용하여 확인하였다. 네오마이신 카세트를 프라이머 neoF (SEQ ID NO:6) 및 neoR (SEQ ID NO:7)을 사용하여 확인하였다. 그런 다음 표적화된 BAC DNA를 사용하여 마우스 ES 세포를 생성된 변형 ES 세포에 대해 일렉트로포레이션하여 재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 경쇄를 발현하는 키메라 마우스를 제조하였다.

[0303] 포지티브 ES 세포 클론을 내인성 κ 경쇄 유전자좌 안에 삽입된 공학처리된 VpreBJλ5 경쇄 영역에 특이적인 프로브를 사용하여 Taqman™ 스크리닝과 염색체분석(karyotyping)에 의해 확인하였다. 간단하게 설명하면, 프로브 neoP (SEQ ID NO:8)는 네오마이신 마커 유전자 내에서 결합하고, 프로브 ULC-m1P (SEQ ID NO:9)는 마우스 Vκ3-7 리더 서열 내에서 결합하며 프로브 1616h1P (ACAATCCGCC TCACCTGCAC CCT; SEQ ID NO:18)는 인간 생식선 VpreBJλ5 오픈 리딩 프레임 내에서 결합한다. 그런 다음 포지티브 ES 세포 클론을 사용하여 암컷 마우스에 이식하여 생식선 경쇄 영역을 발현하는 한배 새끼들을 생성하였다.

[0304] 다르게는, 재배열된 인간 생식선 VpreBJλ5 경쇄 영역을 내포하는 ES 세포를 표적화 구성물에 의해 도입된 FRTed 네오마이신 카세트를 제거하기 위해 FLP를 발현하는 구성물로 트랜스펙션시켰다. 임의로, 네오마이신 카세트는 FLP 재조합효소를 발현하는 마우스에 사육함으로써 제거한다 (예컨대 US 6,774,279 참조). 임의로, 네오마이신 카세트는 마우스에 보유된다.

[0305] **실시에 3. 단일한 재배열 인간 경쇄를 발현하는 마우스들의 제조**

[0306] 상기에서 기술된 표적화된 ES 세포를 공여 ES 세포로서 사용하여 VELOCIMOUSE® 방법에 의해 8-세포 단계 마우

스 배아 안에 도입하였다 (예컨대 미국 특허 제 7,294,754호 및 Poueymirou *et al.* (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99 참조). 독립적으로 공학처리된 인간 생식선 Vκ1-39Jκ5 경쇄 영역, Vκ3-20Jκ1 경쇄 영역 또는 VpreBJλ5 경쇄 영역을 내포하는 VELOCIMOUSE®을 독특한 재배열 인간 생식선 경쇄 영역의 존재를 검출하는 대립유전자 분석 (Valenzuela *et al.*, 상기 동일)의 변형을 사용하여 유전형 분석에 의해 확인하였다.

[0307] 새끼들의 유전형을 분석하고, 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역의 발현을 특성화하기 위해 독특한 재배열 인간 생식선 경쇄 영역에 대해 이형접합성이거나 동형접합성인 새끼를 선택한다.

[0308] **유동 세포분석.** 공통 경쇄 마우스의 정상적인 항체 레퍼토리에서 재배열된 인간 경쇄 영역의 발현을 면역글로블린의 분석과 공통 경쇄 마우스의 비장세포 및 말초혈에서의 발현에 의해 확인하였다. 야생형 (n=5), Vκ1-39Jκ5 공통 경쇄 이형접합체 (n=3), Vκ1-39Jκ5 공통 경쇄 동형접합체 (n=3), Vκ3-20Jκ1 공통 경쇄 이형접합체 (n=2) 및 Vκ3-20Jκ1 공통 경쇄 동형접합체 (n=2)의 수득한 비장 및 말초혈로부터의 세포 현탁액을 표준 방법을 사용하여 만들고 형광 표지된 항체 (BD Pharmigen)를 사용하여 CD19⁺, Ig⁺ 및 Ig⁺로 염색하였다.

[0309] 간단히 설명하면, 1x10⁶ 세포를 항-마우스 CD16/CD32 (클론 2.4G2, BD Pharmigen)와 함께 얼음 상에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 다음의 항체 카테일로 30분 동안 얼음 위에서 표지화하였다: APC 포함된 항-마우스 CD19 (클론 1D3, BD Pharmigen), PerCP-Cy5.5 포함된 항-마우스 CD3 (클론 17A2, BioLegend), FITC 포함된 항-마우스 Ig (클론 187.1, BD Pharmigen), PE 포함된 항-마우스 Ig (클론 RML-42, BioLegend). 염색 후에, 세포를 세척하고 2% 포름알데히드에 고정시켰다. 데이터 획득은 LSRII 유동 세포분석기 상에서 수행하였고, FlowJo로 분석하였다. 게이팅: 총 B 세포 (CD19⁺CD3⁻), Igκ⁺ B 세포 (Igκ⁺Igλ⁻CD19⁺CD3⁻), Igλ⁺ B cells (Igκ⁻Igλ⁺CD19⁺CD3⁻). 혈액과 비장세포 샘플로부터 모은 데이터는 유사한 결과를 증명하였다. 표 3은 Igλ⁺, Igκ⁺ 또는 Igλ⁺Igκ⁺인 각 그룹으로부터의 대표적인 한 마우스의 말초혈로부터의 포지티브 CD19⁺B 세포 퍼센트를 나타낸다. 야생형 (WT) 및 Vκ1-39Jκ5 또는 Vκ3-20Jκ1 공통 경쇄 중 어느 하나에 대해 동형접합성인 마우스로부터의 말초혈의 CD19⁺B 세포 퍼센트를 도 4에 나타낸다.

표 3

[0310]

마우스	CD19 ⁺ B 세포		
	Igλ ⁺	Igκ ⁺	Igλ ⁺ Igκ ⁺
야생형	4.8	93	0.53
Vκ1-39Jκ5	1.4	93	2.6
Vκ3-20Jκ1	4.2	88	6

[0311] **공통 경쇄 발현.** 각각의 공통 경쇄 (Vκ1-39Jκ5 및 Vκ3-20Jκ1)의 발현을 정량 PCR 분석 (예컨대 TAQMAN™)을 사용하여 이형접합성 및 동형접합성 마우스에서 분석하였다.

[0312] 간단히 설명하면, CD19⁺B 세포를 야생형, 마우스 중쇄 및 κ 경쇄 가변 영역 유전자좌가 해당하는 인간 중쇄 및 κ 경쇄 가변 영역 유전자좌(Hκ)로 대체된 것에 대해 동형접합성인 마우스, 뿐만 아니라 각각의 재배열된 인간 경쇄 영역 (Vκ1-39Jκ5 또는 Vκ3-20Jκ1)에 대해 동형접합성이고 이형접합성인 마우스들의 비장으로부터, 마우스 CD19 마이크로비즈 (Miltenyi Biotec)를 사용하여 제조자의 명세를 따라 정제하였다. 총 RNA를 RNeasy Mini 키트 (Qiagen)를 사용하여 제조자의 명세를 따라 CD19⁺B 세포로부터 정제하였고, 게놈 RNA를 RNase-유리 DNase 온-칼럼 처리(Qiagen)를 사용하여 제거하였다. 200ng의 mRNA를 First Stand cDNA 합성 키트 (Invitrogen)를 사용하여 cDNA 안에 역전사시키고, 그 결과의 cDNA를 Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하여 증폭시켰다. 모든 반응을 ABI 7900 서열 검출 시스템 (Applied Biosystems)을 사용하여 (1) 2개의 공통 경쇄에 대한 Vκ-Jκ 접합, (2) Vκ 유전자 단독 (즉 Vκ1-39 및 Vκ3-20) 및 (3) 마우스 Cκ 영역에 걸쳐 있는 프라이머 및 Taqman MGB 프로브들을 사용하여 수행하였다. 표 4는 이 분석에 사용한 프라이머 및 프로브들의 서열을 나타낸다. 상대적인 발현을 마우스 Cκ 영역의 발현에 대해 표준화하였다. 그 결과를 도 5a, 5b 및 5c에 도시한다.

표 4

영역	프라이머/프로브 설명 (5'-3')	SEQ ID NO:
V _κ 1-39J _κ 5 접합	(센스) AGCAGTCTGC AACCTGAAGA TTT	19
	(안티-센스) GTTAAATCTC CAGTCGTGTC CCTT	20
	(프로브) CCTCCGATCA CCTTC	21
V _κ 1-39	(센스) AAACCAGGGA AAGCCCCTAA	22
	(안티-센스) ATGGGACCCC ACTTTGCA	23
	(프로브) CTCCTGATCT ATGCTGCAT	24
V _κ 3-20 J _κ 1 접합	(센스) CAGCAGACTG GAGCCTGAAG A	25
	(안티-센스) TGATTTCAC CTGGTCCCT T	26
	(프로브) TAGCTCACCT TGGACGTT	27
V _κ 3-20	(센스) CTCCTCATCT ATGGTGCATC CA	28
	(안티-센스) GACCCACTGC CACTGAACCT	29
	(프로브) CCACTGGCAT CCC	30
마우스 C _κ	(센스) TGAGCAGCAC CCTCACGTT	31
	(안티-센스) GTGGCCTCAC AGGTATAGCT GTT	32
	(프로브) ACCAAGGACG AGTATGAA	33

[0313]

[0314] **항원 특이적 공통 경쇄 항체.** 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌에 V_κ1-39J_κ5 또는 V_κ3-20J_κ1 공통 경쇄 중 어느 하나를 내포하는 공통 경쇄 마우스를 β -갈락토시다제로 면역시키고 항체 역가를 측정하였다.

[0315]

간단히 설명하면, β -갈락토시다제 (Sigma)를 타이터맥스(titermax) 보조제 (Sigma)에 제조자의 지시대로 유화시켰다. 야생형 (n=7), V_κ1-39J_κ5 공통 경쇄 동형접합체 (n=2) 및 V_κ3-20J_κ1 공통 경쇄 동형접합체 (n=5)를 100 μ g의 β -갈락토시다제/타이터맥스로 피하 주사함으로써 면역시켰다. 마우스들을 3주 간격으로 2회 50 μ g의 β -갈락토시다제/타이터맥스로 피하 주사함으로써 부스팅하였다. 두 번째 부스팅 후에 혈액을 마취된 마우스로부터 안와 출혈을 사용하여 제조자의 지시대로 혈청 분리 튜브 (BD Biosciences)에 수집하였다. 항- β -갈락토시다제 IgM 또는 IgG 항체를 측정하기 위하여, ELISA 플레이트 (Nunc)를 1 μ g/mL의 β -갈락토시다제로 밤새 4°C에서 코팅하였다. 과잉 항원을 세척으로 제거한 후에 1% BSA가 첨가된 PBS로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 혈청의 연속적인 희석액을 플레이트에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 인큐베이션한 후에 세척하였다. 그런 다음 플레이트를 HRP 포함된 항-IgM (Southern Biotech) 또는 항-IgG (Southern Biotech)와 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 한 번 더 세척한 후 TMB 기질 (BD Biosciences)과 함께 전개시켰다. 1N 황산을 사용하여 반응을 중지시키고 OD₄₅₀을 Victor X5 플레이트 판독기 (Perkin Elmer)를 사용하여 판독하였다. 데이터를 GraphPad Prism으로 분석하고, 신호를 바탕보다 2배인 혈청의 희석액으로서 계산하였다. 그 결과를 도 6a 및 6b에 도시한다.

[0316]

이 실시예에서 알 수 있는 것과 같이, V_κ1-39J_κ5 및 V_κ3-20J_κ1 공통 경쇄 마우스의 비장 및 말초 구획 두 곳에서의 κ/λ B 세포의 비율은 둘 다 거의 야생형 패턴을 증명하였다 (표 3 및 도 4). 그러나 VpreBJ λ 5 공통 경쇄 마우스는 더 적은 수의 말초 B 세포, 약 1 내지 2%가 공학처리된 인간 경쇄 영역을 발현하는 것을 증명하였다 (데이터는 제시하지 않음). 내인성 κ 경쇄 유전자좌로부터의 V_κ1-39J_κ5 및 V_κ3-20J_κ1 재배열 인간 경쇄 영역의 발현 수준은 마우스 V_κ 및 J_κ 유전자 절편의 인간 V_κ 및 J_κ 유전자 절편으로의 완전한 대체를 함유하고 있는 내인성 κ 경쇄 유전자좌에 비교하여 상승되었다 (도 5a, 5b 및 5c). VpreBJ λ 5 재배열된 인간 경쇄 영역의 발현 수준은 이형접합성 및 동형접합성 마우스 둘 다에서 내인성 κ 경쇄 유전자좌로부터 유사한 고 발현을 증명하였다 (데이터는 제시하지 않음). 이것은 마우스 λ , κ 또는 두 가지의 내인성 경쇄 유전자좌와의 직접 경합으로, 단일 재배열된 인간 V_L/J_L 서열이 내인성 κ 경쇄 유전자좌로부터 야생형 수준보다 더 좋은 발현 수준을 낳을 수 있고, 비장세포 및 혈액 B 세포 빈도를 정상으로 발생시킬 수 있음을 증명한다. 나아가, 인간 V_κ1-39J_κ5 또는 인간 V_κ3-20J_κ1 서열 중 어느 하나를 가지는 공학처리된 κ 경쇄 유전자좌의 존재는 마우스에 의해 잘 보존되었고, 면역 반응의 체액 성분의 경쇄 레퍼토리의 실질적인 부분을 나타냄으로써 야생형 방식으로 기능하는 것으로 나타난다 (도 6a 및 6b).

[0317]

실시예 4. 단일 재배열된 인간 생식선 경쇄를 발현하는 마우스의 사육(breeding)

[0318]

이 실시예는 다수의 유전자 변형된 면역글로불린 유전자좌를 은닉하고 있는 다중 유전자 변형된 마우스 계통을

제조하기 위해 본원에서 기술된 공통 경쇄 마우스 중 어느 것에 대해 사육될 수 있는 여러 다른 유전자 변형된 마우스 계통을 설명한다.

[0319] **내인성 Igλ 녹아웃 (KO).** 공학처리된 경쇄 유전자좌의 유용성을 최적화하기 위하여 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역들 중 하나를 내포하고 있는 마우스를 내인성 λ 경쇄 유전자좌가 결실되어 있는 다른 마우스에 교배한다. 이 방식으로, 얻어진 자손은 그것들의 경쇄만으로서, 실시예 2에서 기술된 것과 같은 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역을 발현할 것이다. 사육은 해당 기술분야에 인지되어 있는 표준 기법들에 의해 수행되고, 다르게는, 상업적 사육기 (예컨대 The Jackson Laboratory)에 의해 수행된다. 공학처리된 경쇄 유전자좌와 내인성 λ 경쇄 유전자좌의 결실을 내포하고 있는 마우스 계통들을 독특한 경쇄 영역의 존재 및 내인성 마우스 λ 경쇄의 부재에 대해 스크리닝한다.

[0320] **인간화된 내인성 중쇄 유전자좌.** 공학처리된 인간 생식선 경쇄 유전자좌를 내포하고 있는 마우스들을, 인간 중쇄 가변 유전자 유전자좌로 내인성 마우스 중쇄 가변 유전자 유전자좌가 대체되어 있는 마우스들과 교배시킨다 (US 6,596,541 참조; VELOCIMMUNE® 마우스, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). VELOCIMMUNE® 마우스는 내인성 마우스 불변 영역 유전자좌에 작동가능하게 연결된 인간 중쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 포함하고, 그로써 마우스는 항원 자극에 대한 반응으로 인간 중쇄 가변 영역과 마우스 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체를 생성한다. 항체의 중쇄의 가변 영역들을 코드화하는 DNA를 분리하고 인간 중쇄 불변 영역들을 코드화하는 DNA에 작동가능하게 연결시킨다. 그런 다음 DNA를 항체의 전체 인간 중쇄를 발현할 수 있는 세포에서 발현시킨다.

[0321] 내인성 κ 경쇄 유전자좌에서 내인성 마우스 V_H 유전자좌가 인간 V_H 유전자좌 및 단일 재배열 인간 생식선 V_L 영역으로 대체되어 있는 마우스들을 얻는다. 단일 인간 경쇄 (인간 V_L 및 마우스 C_L)로 체세포적으로 돌연변이된 중쇄를 함유하는 역 키메라 항체 (인간 V_H 및 마우스 C_H)를 관심의 항원으로 면역시킬 때 얻는다. 그 항체를 발현하는 B 세포의 V_H 및 V_L 뉴클레오티드 서열을 확인하고 V_H 및 V_L 뉴클레오티드 서열을 인간 적당한 발현 시스템에서 C_H 및 C_L 뉴클레오티드 서열에 융합시킴으로써 전체 인간 항체를 만들었다.

[0322] **실시예 5. 인간 중쇄 및 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역을 발현하는 마우스로부터 항체의 생성**

[0323] 다른 내인성 Ig 유전자좌의 변형 및 결실을 함유하는 다양한 바람직한 계통에 대해 공학처리된 인간 경쇄 영역을 함유하는 마우스들을 사육한 후에 (실시예 4에서 기술한 바와 같음), 선택한 마우스들을 관심의 항원으로 면역시켰다.

[0324] 일반적으로 단일 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역들 중 하나를 함유하고 있는 VELOCIMMUNE® 마우스를 항원으로 도전시키고, 림프구 (예컨대 B-세포)를 동물의 혈청으로부터 회수한다. 림프구를 골수종 셀라인과 융합시켜서 불멸의 하이브리도마 셀라인을 제조하고, 그 하이브리도마 셀라인을 스크리닝하고 선택하여 면역화에 사용한 항원에 특이적인, 인간 중쇄 가변 및 재배열된 인간 생식선 경쇄를 함유하는 항체를 생성하는 하이브리도마 셀라인을 확인한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들을 코드화하는 DNA를 분리하고, 중쇄 및 경쇄의 바람직한 아이소타입 불변 영역에 연결시킨다. 내인성 유전자좌에 존재하는 내인성 마우스 서열과 어떠한 추가의 cis-작용 요소들의 존재로 인해, 각 항체의 단일 경쇄는 체세포적으로 돌연변이될 수 있다. 이것은 추가의 다양성을 단일 경쇄 및 다양한 중쇄 서열들을 포함하는 항원-특이적 레퍼토리에 부가한다. 그 결과의 클론된 항체 서열들을 계속해서 세포, 예컨대 CHO 세포에서 발현시킨다. 다르게는, 항원-특이적 키메라 항체 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 코드화하는 DNA를 직접 항원-특이적 림프구로부터 확인한다.

[0325] 처음에, 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 가지는 고친화성 키메라 항체들을 분리한다. 상기에서 기술한 것과 같이, 항체들을 특성확인하고 친화성, 선택성, 에피토프 등을 포함하는 바람직한 특성에 대해 선택한다. 마우스 불변 영역을 바람직한 인간 불변 영역으로 대체하여 체세포적으로 돌연변이된 인간 중쇄 및 발명의 재배열된 인간 생식선 경쇄 영역으로부터 유도된 단일 경쇄를 함유하는 전체 인간 항체를 제조한다. 적당한 인간 불변 영역은 예를 들면 야생형 또는 변형된 IgG1 또는 IgG4를 포함한다.

[0326] 내인성 마우스 중쇄 유전자좌가 인간 V_H, D_H 및 J_H 유전자 절편으로 대체되어 있고, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌가 공학처리된 생식선 V_κ1-39J_κ5 인간 경쇄 영역 또는 공학처리된 생식선 V_κ3-20J_κ1 인간 경쇄 영역 (상기에서 기술됨) 중 어느 하나로 대체되어 있는 VELOCIMMUNE® 마우스들의 별도 집단을 인간 세포-표면 수용체 단백질 (항원 E)로 면역시켰다. 항원 E를 직접 마우스의 뒷발 발바닥에 매 3,4일 간격으로 6회 연속적인 주사로 투여한다. 2 내지 3μg의 항원 E를 10μg의 CpG 올리고뉴클레오티드 (Cat # tlr1-modn - ODN1826 올리고뉴클레오티드; InVivogen, San Diego, CA) 및 25μg의 Adju-Phos (알루미늄 포스페이트 겔 보조제, Cat # H-71639-

250; Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark)와 주사 전에 혼합한다. 총 6회의 주사를 최종 항원 리콜 전에 제공하고, 최종 항원 리콜 후 3 내지 5일 후에 회생시킨다. 4번째 및 6번째 주사 후 출혈을 수집하고 항체 면역 반응을 표준 항원-특이적 면역분석에 의해 모니터링한다.

[0327] 바람직한 면역 반응이 이루어졌을 때, 비장세포를 수득하고 마우스 골수종 세포와 융합시켜서 그것의 생존력을 보존시키고, 하이브리도마 셀라인을 형성한다. 하이브리도마 셀라인을 스크리닝하고 선택하여 항원 E-특이적 공통 경쇄 항체를 생성하는 셀라인을 확인한다. 이 기법을 사용하여 여러 개의 항-항원 E-특이적 공통 경쇄 항체 (즉 인간 중쇄 가변 도메인, 동일한 인간 경쇄 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 가지는 항체)를 얻는다.

[0328] 다르게는, 항-항원 E 공통 경쇄 항체를 U.S. 2007/0280945A1 (전체 내용이 본원에 참조로 구체적으로 포함된다)에서 기술된 것과 같이, 골수종 세포에 대한 융합 없이 직접 항원-포지티브 B 세포로부터 분리한다. 이 방법을 사용하여, 여러 개의 전체 인간 항-항원 E 공통 경쇄 항체 (즉 인간 중쇄 가변 도메인, 공학처리된 인간 V_K1-39J_K5 경쇄 또는 공학처리된 인간 V_K3-20J_K1 경쇄 영역 중 어느 하나 및 인간 불변 도메인을 가지는 항체)를 얻었다.

[0329] 이 실시예의 방법에 따라 제조된 예시적인 항-항원 E 공통 경쇄 항체들의 생물학적 특성들을 아래의 단원들에서 상세하게 기술한다.

[0330] **실시예 6. 항원-특이적 공통 경쇄 항체에서 중쇄 유전자 절편 유용성**

[0331] 생성된 인간 항-항원 E 공통 경쇄 항체의 구조를 분석하기 위하여, 중쇄 항체 가변 영역들을 코드화하는 핵산들을 클론하고 서열화하였다. 항체의 핵산 서열 및 예측된 아미노산 서열로부터, 공학처리된 인간 V_K1-39J_K5 경쇄 또는 공학처리된 인간 V_K3-20J_K1 경쇄 영역 중 어느 하나를 함유하는 면역된 VELOCIMMUNE® 마우스로부터 얻어진 선택된 공통 경쇄 항체들의 중쇄 가변 영역 (HCVR)에 대해 유전자 유용성을 확인하였다. 그 결과를 표 5 및 6에 나타내는데, 그 결과들은 인간 V_K1-39- 또는 인간 V_K3-20-유도된 경쇄만으로부터 경쇄를 발현하는 어느 한 마우스를 사용할 때, 발명에 따르는 마우스가 다양한 인간 중쇄 유전자 절편들로부터 다양한 재배열로 인해 항원-특이적 공통 경쇄 항체를 생성하는 것을 증명한다. 2, 3, 4 및 5개의 패밀리인 인간 V_H 유전자 절편을 다양한 인간 D_H 절편 및 인간 J_H 절편으로 재배열하여 항원-특이적 항체들을 제조하였다.

표 5

[0332]

V _K 1-39J _K 5 공통 경쇄 항체들							
항체	HCVR			항체	HCVR		
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H
2952	2-5	6-6	1	6030	3-30	6-6	5
5978	2-5	6-6	1	6032	3-30	6-6	5
5981	2-5	3-22	1	2985	3-30	6-13	4
6027	3-13	6-6	5	2997	3-30	6-13	4
3022	3-23	3-10	4	3011	3-30	6-13	4
3028	3-23	3-3	4	3047	3-30	6-13	4
5999	3-23	6-6	4	5982	3-30	6-13	4
6009	3-23	2-8	4	6002	3-30	6-13	4
6011	3-23	7-27	4	6003	3-30	6-13	4
5980	3-30	1-1	4	6012	3-30	6-13	4
3014	3-30	1-7	4	6013	3-30	6-13	4
3015	3-30	1-7	4	6014	3-30	6-13	4
3023	3-30	1-7	4	6015	3-30	6-13	4
3024	3-30	1-7	4	6016	3-30	6-13	4
3032	3-30	1-7	4	6017	3-30	6-13	4
6024	3-30	1-7	4	6020	3-30	6-13	4
6025	3-30	1-7	4	6034	3-30	6-13	4
6031	3-30	1-7	4	2948	3-30	7-27	4
6007	3-30	3-3	4	2987	3-30	7-27	4
2982	3-30	3-22	5	2996	3-30	7-27	4
6001	3-30	3-22	5	3005	3-30	7-27	4
6005	3-30	3-22	5	3012	3-30	7-27	4
6035	3-30	5-5	2	3020	3-30	7-27	4

3013	3-30	5-12	4	3021	3-30	7-27	4
3042	3-30	5-12	4	3025	3-30	7-27	4
2955	3-30	6-6	1	3030	3-30	7-27	4
3043	3-30	6-6	3	3036	3-30	7-27	4
3018	3-30	6-6	4	5997	3-30	7-27	4
2949	3-30	6-6	5	6033	3-30	7-27	4
2950	3-30	6-6	5	3004	3-30	7-27	5
2954	3-30	6-6	5	6028	3-30	7-27	6
2978	3-30	6-6	5	3010	4-59	3-16	3
3016	3-30	6-6	5	3019	4-59	3-16	3
3017	3-30	6-6	5	6018	4-59	3-16	3
3033	3-30	6-6	5	6026	4-59	3-16	3
3041	3-30	6-6	5	6029	4-59	3-16	3
5979	3-30	6-6	5	6036	4-59	3-16	3
5998	3-30	6-6	5	6037	4-59	3-16	3
6004	3-30	6-6	5	2964	4-59	3-22	3
6010	3-30	6-6	5	3027	4-59	3-16	4
6019	3-30	6-6	5	3046	5-51	5-5	3
6021	3-30	6-6	5	6000	1-69	6-13	4
6022	3-30	6-6	5	6006	1-69	6-6	5
6023	3-30	6-6	5	6008	1-69	6-13	4

표 6

[0333]

V κ 3-20J κ 1 공통 경쇄 항체들								
항체	HCVR			항체	HCVR			
	V _H	D _H	J _H		V _H	D _H	J _H	
5989	3-30	3-3	3	5992	4-39	1-26	3	
5994	3-33	1-7	4	2975	5-51	6-13	5	
5985	3-33	2-15	4	2972	5-51	3-16	6	
5987	3-33	2-15	4	5986	5-51	3-16	6	
5995	3-33	2-15	4	5993	5-51	3-16	6	
2968	4-39	1-26	3	5996	5-51	3-16	6	
5988	4-39	1-26	3	5984	3-53	1-1	4	
5990	4-39	1-26	3					

[0334]

실시예 7

[0335]

LUMINEX™ 분석에 의한 항원-특이적 공통 경쇄 항체의 차단 능력의 측정

[0336]

항원 E에 대해 발생된 98개의 인간 공통 경쇄 항체를 비드-기초 분석에서 항원 E에 대한 항원 E의 천연 리간드 (리간드 Y)의 결합을 차단하는 능력에 대해 시험하였다.

[0337]

항원 E의 세포외재성 도메인 (ECD)을 2개의 myc 에피토프 태그 및 6X 히스티딘 태그 (항원 E-mmH)에 포함시키고 MES 완충액 중의 20µg/mL의 농도에서 카르복실화된 마이크로스피어에 아민-결합시켰다. 그 혼합물을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 이어서 1M 트리스 pH 8.0으로 비드를 탈활성화시킨 후, 0.05% (v/v) Tween-20이 첨가된 PBS로 세척하였다. 그런 다음 비드를 2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)를 함유하는 PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)로 차단하였다. 96-웰 필터 플레이트에서 항원 E-특이적 공통 경쇄 항체를 함유하는 상층액을 완충액으로 1:15로 희석하였다. 항체 상층액에 대한 것과 동일한 배지 성분들을 사용하여 mock 상층액을 함유하는 네거티브 대조표준을 제조하였다. 항원 E-표지된 비드를 그 상층액에 첨가하고 밤새 4 °C에서 인큐베이션하였다. 비오틴화된-리간드 Y 단백질을 0.06nM의 최종 농도로 첨가하고 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 항원 E-myc-myc-6His 표지된 비드에 결합된 비오틴화된-리간드 Y의 검출을 스트렙트아 비딘에 포함된 R-피코에리트린 (Moss Inc, Pasadena, MD)을 사용하여 측정하고, 이어서 LUMINEX™ 유동 세포분석법-기초 분석기에서 측정하였다. 리간드 Y가 없는 샘플의 바탕 평균 형광 세기 (MFI)를 모든 샘플로부터 제하

였다. 퍼센트 차단율, 각 샘플의 바탕값을 뺀 MFI를 조정된 네거티브 대조표준 값으로 나눈 후 곱하기 100을 한 다음 그 결과의 값을 100으로부터 뺀으로써 계산하였다.

[0338] 유사한 실험에서, 항원 E에 대해 발생된 동일한 98개의 인간 공통 경쇄 항체들을, 리간드 Y-표지된 비드에 대한 항원 E의 결합을 차단하는 그것들의 능력에 대해 시험하였다.

[0339] 간단히 설명하면, 리간드 Y를 MES 완충액으로 희석된 20µg/mL의 농도에서 카르복실화된 마이크로스피어에 아민-결합시켰다. 그 혼합물을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 이어서 1M 트리스 pH 8.0으로 비드를 탈활성화 시킨 후, 0.05% (v/v) Tween-20이 첨가된 PBS로 세척하였다. 그런 다음 비드를 2% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)를 함유하는 PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)로 차단하였다. 96-웰 필터 플레이트에서 항원 E-특이적 공통 경쇄 항체를 함유하는 상층액을 완충액으로 1:15로 희석하였다. 항체 상층액에 대한 것과 동일한 배지 성분들을 사용하여 mock 상층액을 함유하는 네거티브 대조표준을 제조하였다. 비오틴화된-항원 E-mmH를 0.42nM의 최종 농도로 첨가하고 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 리간드 Y-표지된 비드를 항체/항원 E 혼합물에 첨가하고 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 리간드 Y-표지된 비드에 결합된 비오틴화된-항원 E-mmH의 검출을 스트렙타아비딘에 포함된 R-피코에리트린 (Moss Inc, Pasadena, MD)을 사용하여 측정하고, 이어서 LUMINEX™ 유동 세포분석법-기초 분석기에서 측정하였다. 항원 E가 없는 샘플의 바탕 평균 형광 세기 (MFI)를 모든 샘플로부터 제하였다. 퍼센트 차단율, 각 샘플의 바탕값을 뺀 MFI를 조정된 네거티브 대조표준 값으로 나눈 후 곱하기 100을 한 다음 그 결과의 값을 100으로부터 뺀으로써 계산하였다.

[0340] 아래의 표 7과 8은 두 개의 LUMINEX™ 분석으로 시험된 98개의 모든 항-항원 E 공통 경쇄 항체들에 대한 퍼센트 차단율 나타낸다. ND: 현재의 실험 조건하에서 측정되지 않음.

표 7

[0341]

VK1-39JK5 공통 경쇄 항체들		
항체	항원 E-표지된 비드의 % 차단	용액에서 항원 E의 % 차단
2948	81.1	47.8
2948G	38.6	ND
2949	97.6	78.8
2949G	97.1	73.7
2950	96.2	81.9
2950G	89.8	31.4
2952	96.1	74.3
2952G	93.5	39.9
2954	93.7	70.1
2954G	91.7	30.1
2955	75.8	30.0
2955G	71.8	ND
2964	92.1	31.4
2964G	94.6	43.0
2978	98.0	95.1
2978G	13.9	94.1
2982	92.8	78.5
2982G	41.9	52.4
2985	39.5	31.2
2985G	2.0	5.0
2987	81.7	67.8
2987G	26.6	29.3
2996	87.3	55.3
2996G	95.9	38.4
2997	93.4	70.6
2997G	9.7	7.5
3004	79.0	48.4
3004G	60.3	40.7
3005	97.4	93.5
3005G	77.5	75.6
3010	98.0	82.6

3010G	97.9	81.0
3011	87.4	42.8
3011G	83.5	41.7
3012	91.0	60.8
3012G	52.4	16.8
3013	80.3	65.8
3013G	17.5	15.4
3014	63.4	20.7
3014G	74.4	28.5
3015	89.1	55.7
3015G	58.8	17.3
3016	97.1	81.6
3016G	93.1	66.4
3017	94.8	70.2
3017G	87.9	40.8
3018	85.4	54.0
3018G	26.1	12.7
3019	99.3	92.4
3019G	99.3	88.1
3020	96.7	90.3
3020G	85.2	41.5
3021	74.5	26.1
3021G	81.1	27.4
3022	65.2	17.6
3022G	67.2	9.1
3023	71.4	28.5
3023G	73.8	29.7
3024	73.9	32.6
3024G	89.0	10.0
3025	70.7	15.6
3025G	76.7	24.3
3027	96.2	61.6
3027G	98.6	75.3
3028	92.4	29.0
3028G	87.3	28.8
3030	6.0	10.6
3030G	41.3	14.2
3032	76.5	31.4
3032G	17.7	11.0
3033	98.2	86.1
3033G	93.6	64.0
3036	74.7	32.7
3036G	90.1	51.2
3041	95.3	75.9
3041G	92.4	51.6
3042	88.1	73.3
3042G	60.9	25.2
3043	90.8	65.8
3043G	92.8	60.3

표 8

[0342]

V κ 3-20J κ 1 공통 경쇄 항체들		
항체	항원 E-표지된 비드의 % 차단	용액에서 항원 E의 % 차단
2968	97.1	73.3
2968G	67.1	14.6
2969	51.7	20.3

2969G	37.2	16.5
2970	92.2	34.2
2970G	92.7	27.2
2971	23.4	11.6
2971G	18.8	18.9
2972	67.1	38.8
2972G	64.5	39.2
2973	77.7	27.0
2973G	51.1	20.7
2974	57.8	12.4
2974G	69.9	17.6
2975	49.4	18.2
2975G	32.0	19.5
2976	1.0	1.0
2976G	50.4	20.4

[0343] 상기에서 기술된 첫 번째 LUMINEX™ 실험에서, V_K1-39J_K5 공학처리된 경쇄를 함유하는 80개의 공통 경쇄 항체들을 항원 E-표지된 비드에 대한 리간드 Y 결합을 차단하는 능력에 대해 시험하였다. 이들 80개의 공통 경쇄 항체 중에서 68개는 >50% 차단을 보인 반면, 12개는 <50% 차단을 나타냈다 (6개는 25 내지 50%의 차단, 6개는 <25%의 차단을 보임). V_K3-20J_K1 공학처리된 경쇄를 함유하는 18개의 공통 경쇄 항체들에 대해, 12개는 항원 E-표지된 비드에 대한 리간드 Y의 결합에 대해 >50% 차단을 보인 반면, 6개는 <50% 차단을 나타냈다 (3개는 25 내지 50%의 차단, 3개는 <25%의 차단을 보임).

[0344] 상기에서 기술된 두 번째 LUMINEX™ 실험에서, V_K3-20J_K1 공학처리된 경쇄를 함유하는 80개의 공통 경쇄 항체들을 항원 E-표지된 비드에 대한 리간드 Y 결합을 차단하는 능력에 대해 시험하였다. 이들 80개의 공통 경쇄 항체 중에서 36개는 >50% 차단을 보인 반면, 44개는 <50% 차단을 나타냈다 (27개는 25 내지 50%의 차단, 17개는 <25%의 차단을 보임). V_K3-20J_K1 공학처리된 경쇄를 함유하는 18개의 공통 경쇄 항체들에 대해, 1개가 항원 E-표지된 비드에 대한 리간드 Y의 결합에 대해 >50% 차단을 보인 반면, 17개가 <50% 차단을 나타냈다 (5개는 25 내지 50%의 차단, 12개는 <25%의 차단을 보임).

[0345] 표 7 및 8의 데이터는 표 5 및 6에서 기술된 재배열이 다양한 정도의 효능으로 리간드 Y의 그것의 동족 수용체 항원 E에 대한 결합을 차단하는 항-항원 E-특이적 공통 경쇄 항체들을 생성하였음을 나타내고, 그것은 항원 E에 관하여 중첩하는 에피토프 특이성과 중첩하지 않는 에피토프 특이성을 가지는 항체들을 포함하는, 표 5 및 6의 항-항원 E 공통 경쇄 항체들과 일치한다.

[0346] **실시예 8. ELISA에 의한 항원-특이적 공통 경쇄 항체들의 차단 능력의 측정**

[0347] 항원 E에 대해 발생한 인간 공통 경쇄 항체들을, ELISA 분석으로, 리간드 Y-코팅된 표면에 항원 E가 결합하는 것을 차단하는 능력에 대해 시험하였다.

[0348] 리간드 Y를 96-웰 플레이트 상에 PBS로 희석된 2µg/mL의 농도에서 코팅하고, 밤새 인큐베이션한 후에 0.05% Tween-20이 첨가된 PBS로 4회 세척하였다. 그런 다음 플레이트를 0.5% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)를 함유하는 PBS (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 별도의 플레이트에서, 항-항원 E 공통 경쇄 항체들을 함유하는 상층액을 완충액으로 1:10으로 희석하였다. 항체들의 동일한 성분을 가지는 mock 상층액을 네거티브 대조표준으로서 사용하였다. 항원 E-mmH (상기에서 기술됨)를 0.150nM의 최종 농도로 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 항체/항원 E-mmH 혼합물을 리간드 Y를 함유하고 있는 플레이트에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 리간드 Y에 결합된 항원 E-mmH의 검출을 항-펜타-His 항체 (Qiagen, Valencia, CA)에 포함된 서양고추냉이 과산화효소 (HRP)로 측정하고, 황산에 의해 증화된 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질 (BD Biosciences, San Jose, CA)을 사용하여 표준 열량측정 반응에 의해 전개시켰다. 흡광도를 OD450에서 0.1초 동안 판독하였다. 항원 E가 없는 샘플의 바탕 흡광도를 모든 샘플로부터 제하였다. 퍼센트 차단을, 각 샘플의 바탕값을 뺀 MFI를 조정된 네거티브 대조 값으로 나눈 후, 곱하기 100을 한 다음 그 결과의 값을 100으로부터 뺀으로써 계산하였다.

[0349] 표 9 및 10은 ELISA 분석으로 시험된 98개의 모든 항-항원 E 공통 경쇄 항체들에 대한 퍼센트 차단을 보여준다. ND: 현재의 실험 조건하에서 측정되지 않음.

표 9

[0350]

Vκ1-39Jκ5 공통 경쇄 항체들			
항체	용액 중의 항원 E의 %차단	항체	용액 중의 항원 E의 %차단
2948	21.8	3015	23.7
2948G	22.9	3015G	10.2
2949	79.5	3016	78.1
2949G	71.5	3016G	37.4
2950	80.4	3017	61.6
2950G	30.9	3017G	25.2
2952	66.9	3018	40.6
2952G	47.3	3018G	14.5
2954	55.9	3019	94.6
2954G	44.7	3019G	92.3
2955	12.1	3020	80.8
2955G	25.6	3020G	ND
2964	34.8	3021	7.6
2964G	47.7	3021G	20.7
2978	90.0	3022	2.4
2978G	90.2	3022G	15.0
2982	59.0	3023	9.1
2982G	20.4	3023G	19.2
2985	10.5	3024	7.5
2985G	ND	3024G	15.2
2987	31.4	3025	ND
2987G	ND	3025G	13.9
2996	29.3	3027	61.4
2996G	ND	3027G	82.7
2997	48.7	3028	40.3
2997G	ND	3028G	12.3
3004	16.7	3030	ND
3004G	3.5	3030G	9.5
3005	87.2	3032	ND
3005G	54.3	3032G	13.1
3010	74.5	3033	77.1
3010G	84.6	3033G	32.9
3011	19.4	3036	17.6
3011G	ND	3036G	24.6
3012	45.0	3041	59.3
3012G	12.6	3041G	30.7
3013	39.0	3042	39.9
3013G	9.6	3042G	16.1
3014	5.2	3043	57.4
3014G	17.1	3043G	46.1

표 10

[0351]

Vκ3-20Jκ1 공통 경쇄 항체들			
항체	용액 중의 항원 E의 %차단	항체	용액 중의 항원 E의 %차단
2968	68.9	2972G	35.7
2968G	15.2	2973	20.7
2969	10.1	2973G	23.1
2969G	23.6	2974	ND
2970	34.3	2974G	22.0
2970G	41.3	2975	8.7
2971	6.3	2975G	19.2
2971G	27.1	2976	4.6

2972	9.6	2976G	26.7
------	-----	-------	------

[0352]

이 실시예에서 기술된 것과 같이, 리간드 Y-코팅된 표면에 대한 항원 E의 결합을 차단하는 능력에 대해 시험한 Vκ1-39Jκ5 공학처리된 경쇄를 함유하는 80개의 공통 경쇄 항체들 중에서, 22개는 >50% 차단을 보인 반면, 58개는 <50% 차단을 나타냈다 (20개는 25 내지 50%의 차단, 38개는 <25%의 차단을 보임). Vκ3-20Jκ1 공학처리된 경쇄를 함유하는 18개의 공통 경쇄 항체들에 대해, 1개가 리간드 Y-코팅된 표면에 대한 항원 E의 결합에 대해 >50% 차단을 보인 반면, 17개는 <50% 차단을 나타냈다 (5개는 25 내지 50%의 차단, 12개는 <25%의 차단을 보임).

[0353]

이들 결과는 또한 항원 E에 관련하여 중첩 및 비-중첩 에피토프 특이성을 가지는 항체들을 포함하는 항원 E-특이적 공통 경쇄 항체 풀과 일치한다.

[0354]

실시예 9. 항원-특이적 공통 경쇄 항체들에 대한 BIACORE™ 친화성 측정

[0355]

선택된 항체 상층액에 대한 평형 해리 상수 (K_D)를 SPR(표면 플라즈몬 공명)에 의해 BIACORE™ T100 기기 (GE Healthcare)를 사용하여 측정하였다. 모든 데이터를 작동 및 샘플 완충액으로서 HBS-EP (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.3mM EDTA, 0.05% 계면활성제 P20, pH 7.4)를 25°C에서 사용하여 얻었다. 항체를 고밀도 항-인간 Fc로 사전에 유도한 CM5 센서 칩 표면에 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 포획하였다. 포획 단계 중에 상층액을 항-인간 Fc 표면을 가로질러 3µL/분의 유속으로 총 3분 동안 주입하였다. 포획 단계에 이어서 작동 완충액이나 분석물을 100nM의 농도로 2분 동안 35µL/분의 유속으로 주입하였다. 포획된 항체로부터의 항원의 해리를 6분 동안 모니터링하였다. 포획된 항체를 10mM의 글리신, pH 1.5의 간단한 주입에 의해 제거하였다. 모든 센서그램은 분석물 센서그램으로부터 완충액 주입으로부터의 센서그램을 빼고, 그로써 포획 표면으로부터 항체의 해리에 의해 유발된 인공물을 제거함으로써 이중으로 참조되었다. 각 항체에 대한 결합 데이터는 BIAcore T100 평가 소프트웨어 v2.1을 사용하는 질량 수송과의 1:1 결합 모델에 적합하였다. 그 결과를 표 11 및 12에 나타낸다.

표 11

[0356]

Vκ1-39Jκ5 공통 경쇄 항체들					
항체	100 nM 항원 E		항체	100 nM 항원 E	
	K_D (nM)	$T_{1/2}$ (분)		K_D (nM)	$T_{1/2}$ (분)
2948	8.83	28	3015	29.1	11
2948G	95.0	1	3015G	65.9	0
2949	3.57	18	3016	4.99	17
2949G	6.37	9	3016G	18.9	4
2950	4.91	17	3017	9.83	8
2950G	13.6	5	3017G	55.4	2
2952	6.25	7	3018	11.3	36
2952G	7.16	4	3018G	32.5	3
2954	2.37	24	3019	1.54	59
2954G	5.30	9	3019G	2.29	42
2955	14.4	6	3020	5.41	39
2955G	12.0	4	3020G	41.9	6
2964	14.8	6	3021	50.1	6
2964G	13.0	9	3021G	26.8	4
2978	1.91	49	3022	25.7	17
2978G	1.80	58	3022G	20.8	12
2982	6.41	19	3023	263	9
2982G	16.3	9	3023G	103	5
2985	64.4	9	3024	58.8	7
2985G	2.44	8	3024G	7.09	10
2987	21.0	11	3025	35.2	6
2987G	37.6	4	3025G	42.5	8
2996	10.8	9	3027	7.15	6
2996G	24.0	2	3027G	4.24	18
2997	7.75	19	3028	6.89	37

2997G	151	1	3028G	7.23	22
3004	46.5	14	3030	46.2	7
3004G	1.93	91	3030G	128	3
3005	2.35	108	3032	53.2	9
3005G	6.96	27	3032G	13.0	1
3010	4.13	26	3033	4.61	17
3010G	2.10	49	3033G	12.0	5
3011	59.1	5	3036	284	12
3011G	41.7	5	3036G	18.2	10
3012	9.71	20	3041	6.90	12
3012G	89.9	2	3041G	22.9	2
3013	20.2	20	3042	9.46	34
3013G	13.2	4	3042G	85.5	3
3014	213	4	3043	9.26	29
3014G	36.8	3	3043G	13.1	22

표 12

[0357]

V κ 3-20J κ 1 공통 경쇄 항체들					
항체	100 nM 항원 E		항체	100 nM 항원 E	
	K _D (nM)	T _{1/2} (분)		K _D (nM)	T _{1/2} (분)
2968	5.50	8	2973	5.35	39
2968G	305	0	2973G	11.0	44
2969	34.9	2	2974	256	0
2969G	181	1	2974G	138	0
2970G	12.3	3	2975	38.0	2
2971G	32.8	22	2975G	134	1
2972	6.02	13	2976	6.73	10
2972G	74.6	26	2976G	656	8

[0358]

표 5 및 6에 나타난 재배열을 포함하는 공통 경쇄 항체들의 결합 친화성은 달랐고, 거의 모두 나노 몰 범위로 K_D를 나타냈다. 친화성 데이터는 고친화성이고, 클론적으로 선택되었으며, 체세포적으로 돌연변이된, 표 5 및 6에서 기술된 재배열된 가변 도메인들의 조합적 결합으로부터 유발된 공통 경쇄 항체들과 일치한다. 이전에 나타난 데이터들과 함께 취합하면, 표 5 및 6에 기술된 공통 경쇄 항체들은 항원 E의 하나 또는 그 이상의 에피토프에 대한 특이성을 나타내는 다양한 고친화성 항체들의 집단을 포함한다.

[0359]

실시에 10. LUMINEX™ 분석에 의한 항원-특이적 공통 경쇄 항체들의 결합 특이성의 측정

[0360]

선택한 항-항원 E 공통 경쇄 항체들을 게잡이 원숭이 오솔로그 (ortholog)(Mf 항원 E)를 포함하여, 항원 E의 ECD 및 항원 E ECD 변이체들에 결합하는 능력에 대해 시험하였고, 그것들은 아미노산 잔기의 대략 10%로 인간 단백질과 다르다; ECD의 C-말단부로부터 적어도 10 아미노산이 결핍된 항원 E의 결실 돌연변이 (항원 E-DCT); 및 리간드 Y와의 상호작용이 예상된 위치에서 알려진 치환을 함유하는 두 개의 돌연변이 (항원 E-A1a1 및 항원 E-A1a2). 항원 E 단백질들은 CHO 세포에서 생성되었고, 각각은 myc-myc-His C-말단 태그를 함유하였다.

[0361]

결합 연구를 위해서, 1mL의 배양 배지로부터 항원 E ECD 단백질 또는 변이체 단백질 (상기에서 기술됨)을, 항-myc 단클론성 항체 (Mab 9E10, 하이브리도마 셀라인 CRL-1729™; ATCC, Manassas, VA)로 공유적으로 코팅된 1 x 10⁶의 마이크로스피어 (LUMINEX™) 비드와 함께 2시간 동안 실온에서 인큐베이션함으로써 포획하였다. 그런 다음 비드를 사용 전에 PBS로 세척하였다. 항-항원 E 공통 경쇄 항체를 함유하는 상층액을 완충액으로 1:4로 희석하고 96-웰 필터 플레이트에 첨가하였다. 항체가 없는 mock 상층액을 네거티브 대조표준으로서 사용하였다. 그런 다음 포획된 항원 E 단백질을 함유하는 비드를 항체 샘플에 첨가하고 (웰당 3000 비드) 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 다음날, 샘플 비드를 세척하고, 결합된 공통 경쇄 항체를 R-피코에리트린-포획된 항-인간 IgG 항체로 검출하였다. 비드 (대략 100개의 비드를 각각의 항원 E 단백질에 결합하는 각 항체 샘플에 대해 계수함)의 형광 세기를 LUMINEX™ 유동 세포분석법-기초 분석기를 사용하여 측정하였고, 비드/항체 상호작용당 적어도 100개의

계수된 비드에 대한 평균 형광 세기 (MFI)를 기록하였다. 그 결과를 표 13 및 14에 나타낸다.

표 13

항체	V κ1-39J κ5 공통 경쇄 항체들				
	평균 형광 세기 (MFI)				
	항원 E-ECD	항원 E-△CT	항원 E-A1a1	항원 E-A1a2	Mf 항원 E
2948	1503	2746	4953	3579	1648
2948G	537	662	2581	2150	863
2949	3706	4345	8169	5678	5142
2949G	3403	3318	7918	5826	5514
2950	3296	4292	7756	5171	4749
2950G	2521	2408	7532	5079	3455
2952	3384	1619	1269	168	911
2952G	3358	1001	108	55	244
2954	2808	3815	7114	5039	3396
2954G	2643	2711	7620	5406	3499
2955	1310	2472	4738	3765	1637
2955G	1324	1802	4910	3755	1623
2964	5108	1125	4185	346	44
2964G	4999	729	4646	534	91
2978	6986	2800	14542	10674	8049
2978G	5464	3295	11652	8026	6452
2982	4955	2388	13200	9490	6772
2982G	3222	2013	8672	6509	4949
2985	1358	832	4986	3892	1669
2985G	43	43	128	244	116
2987	3117	1674	7646	5944	2546
2987G	3068	1537	9202	6004	4744
2996	4666	1917	12875	9046	6459
2996G	2752	1736	8742	6150	4873
2997	5164	2159	12167	8361	5922
2997G	658	356	3392	2325	1020
3004	2794	1397	8542	6268	3083
3004G	2753	1508	8267	5808	4345
3005	5683	2221	12900	9864	5868
3005G	4344	2732	10669	7125	5880
3010	4829	1617	2642	3887	44
3010G	3685	1097	2540	3022	51
3011	2859	2015	7855	5513	3863
3011G	2005	1072	6194	4041	3181
3012	3233	2221	8543	5637	3307
3012G	968	378	3115	2261	1198
3013	2343	1791	6715	4810	2528
3013G	327	144	1333	1225	370
3014	1225	1089	5436	3621	1718
3014G	1585	851	5178	3705	2411
3015	3202	2068	8262	5554	3796
3015G	1243	531	4246	2643	1611
3016	4220	2543	8920	5999	5666
3016G	2519	1277	6344	4288	4091
3017	3545	2553	8700	5547	5098
3017G	1972	1081	5763	3825	3038
3018	2339	1971	6140	4515	2293
3018G	254	118	978	1020	345
3019	5235	1882	7108	4249	54
3019G	4090	1270	4769	3474	214
3020	3883	3107	8591	6602	4420
3020G	2165	1209	6489	4295	2912

[0362]

3021	1961	1472	6872	4641	2742
3021G	2091	1005	6430	3988	2935
3022	2418	793	7523	2679	36
3022G	2189	831	6182	3051	132
3023	1692	1411	5788	3898	2054
3023G	1770	825	5702	3677	2648
3024	1819	1467	6179	4557	2450
3024G	100	87	268	433	131
3025	1853	1233	6413	4337	2581
3025G	1782	791	5773	3871	2717
3027	4131	1018	582	2510	22
3027G	3492	814	1933	2596	42
3028	4361	2545	9884	5639	975
3028G	2835	1398	7124	3885	597
3030	463	277	1266	1130	391
3030G	943	302	3420	2570	1186
3032	2083	1496	6594	4402	2405
3032G	295	106	814	902	292
3033	4409	2774	8971	6331	5825
3033G	2499	1234	6745	4174	4210
3036	1755	1362	6137	4041	1987
3036G	2313	1073	6387	4243	3173
3041	3674	2655	8629	5837	4082
3041G	2519	1265	6468	4274	3320
3042	2653	2137	7277	5124	3325
3042G	1117	463	4205	2762	1519
3043	3036	2128	7607	5532	3366
3043G	2293	1319	6573	4403	3228

표 14

[0363]

항체	V _K 3-20J _K 1 공통 경쇄 항체들				
	평균 형광 세기 (MFI)				
	항원 E-ECD	항원 E-△CT	항원 E-Ala1	항원 E-Ala2	Mf 항원 E
2968	6559	3454	14662	3388	29
2968G	2149	375	9109	129	22
2969	2014	1857	7509	5671	3021
2969G	1347	610	6133	4942	2513
2970	5518	1324	14214	607	32
2970G	4683	599	12321	506	31
2971	501	490	2506	2017	754
2971G	578	265	2457	2062	724
2972	2164	2158	8408	6409	3166
2972G	1730	992	6364	4602	2146
2973	3527	1148	3967	44	84
2973G	1294	276	1603	28	44
2974	1766	722	8821	241	19
2974G	2036	228	8172	135	26
2975	1990	1476	8669	6134	2468
2975G	890	315	4194	3987	1376
2976	147	140	996	1079	181
2976G	1365	460	6024	3929	1625

[0364]

항-항원 E 공통 경쇄 항체 상층액은 항원 E-ECD에 결합된 비드에 대해 매우 특이적인 결합을 나타냈다. 이들 비드에 대하여, 네거티브 대조표준 mock 상층액은 항원 E-ECD 비드 샘플과 조합될 때 무시할만한 신호 (<10 MFI)를 초래한 반면, 항-항원 E 공통 경쇄 항체를 함유한 상층액은 강력한 결합 신호를 나타냈다 (98개의 항체 상층

액에 대해 2627의 평균 MFI; 98개 항체 샘플 중 91개에 대해 MFI>500).

[0365] 선택된 항-항원 E 공통 경쇄 항체의 항원 E의 ECD 상의 상이한 에피토프들을 확인하는 능력에 대한 척도로서, 변이체에 대한 항체들의 상대적인 결합을 측정하였다. 4개의 모든 항원 E 변이체를 천연 항원 E-ECD 결합 연구에 대해 상기에서 기술한 것과 같이 항-myc LUMINEX™ 비드에 포획하고, 상대적인 결합 비율 (MFI_{변이체}/MFI_{항원 E-ECD})을 측정하였다. 표 12 및 13에 나타낸 98개의 시험된 공통 경쇄 항체 상층액에 대해 평균 비율 (MFI_{변이체}/MFI_{항원 E-ECD})은 각 변이체에 대해 달랐고, 그것은 아마도 비드 상의 단백질들의 상이한 포획량을 반영하는 것 같다 (항원 E-DCT, 항원 E-A1a1, 항원 E-A1a2 및 *Mf* 항원 E에 대해 각각 0.61, 2.9, 2.0 및 1.0의 평균 비율). 각 단백질 변이체에 대해, 98개의 시험된 공통 경쇄 항체의 하위세트에 대한 결합은 크게 감소된 결합을 나타냈고, 그것은 주어진 변이체를 특성화하는 돌연변이에 대한 민감성을 가리킨다. 예를 들어 공통 경쇄 항체 샘플 중 19개가 <8%의 MFI_{변이체}/MFI_{항원 E-ECD}로 *Mf* 항원 E에 결합하였다. 이 그룹의 많은 것들이 높거나 적당히 높은 친화성 항체를 포함하기 때문에 (5개의 K_D는 <5nM, 15개의 K_D는 <50nM), 이 그룹에 대한 더 낮은 신호는 더 낮은 친화성으로부터라기보다는 천연 항원 E-ECD와 주어진 변이체 사이의 서열 (에피토프) 차이에 대한 민감성으로부터 유발되는 것 같다.

[0366] 이들 데이터는 표 5 및 6에 기술된 공통 경쇄 항체들이 항원 E 상의 하나 이상의 에피토프를 특이적으로 인지하는 항원-E-특이적 공통 경쇄 항체들의 다양한 그룹을 나타내는 것을 수립한다.

[0367] **실시예 11. 공통 경쇄 항체에서의 경쇄 서플링**

[0368] 선택한 항원-특이적 공통 경쇄 항체들의 중쇄를, 생식선 V_K1-39J_K5 또는 생식선 V_K3-20J_K1 공학처리된 경쇄 (실시예 1에서 설명된 것과 같음) 중 어느 하나와 중쇄가 쌍을 이룬 후에 항원 E에 결합하는 것에 대해 시험하였다.

[0369] 간단하게 설명하면, 항원 E-특이적 공통 경쇄 항체 (V_K1-39J_K5 및 V_K3-20J_K1)의 247 중쇄를 생식선 V_K1-39 또는 생식선 V_K3-20 공학처리된 경쇄 중 어느 하나로 트랜스펙션시키고, LUMINEX™ 분석에 의하여 항원 E에 대한 결합에 대해 재스크리닝하였다 (실시예 7 및 실시예 10에서 기술된 것과 같음). 항원 E에 대한 결합을 BIACORE™에 의해 확인하였다 (실시예 9에서 기술된 것과 같음). 그 결과를 표 15에 나타낸다.

[0370] 이 실시예에서 나타나는 것과 같이, 항원 E에 대해 특이적인 28개의 공통 경쇄 항체들은 경쇄의 생식선 형태와 쌍을 이룰 때, 항원 E에 결합할 수 있었다.

표 15

원래의 경쇄	수복된 경쇄	시험된 갯수	확인된 결합체의 수
1-39	1-39	198	23
3-20	3-20	49	5

[0372] **실시예 12. 공통 경쇄 항체에서 중쇄 유전자 유용성 및 체세포성 과돌연변이 빈도**

[0373] VELCOIMMUNE® 마우스 (예컨대 US 6,596,541 및 US 7,105,348)에서 발생한 항체들의 중쇄 및 경쇄 서열들 (>6000)을 공학처리된 경쇄 마우스 (상기에서 기술됨)를 사용하는 다중-항원 면역화 계획에 의해 얻어진 공통 경쇄 항체들의 중쇄 및 경쇄 서열 (>600)로 편집하여 항체 사슬의 중쇄 유전자 유용성 및 체세포성 과돌연변이 빈도와 비교하였다.

[0374] **중쇄 유전자 유용성.** 인간 세포-표면 수용체 (항원 E), 2개의 인간 세포-표면 당단백질의 이중이량체 (항원 F), 인간 사이토킨 수용체 (항원 G) 및 인간 중양 분화 항원 (항원 H)으로 면역된, 내인성 마우스 중쇄 유전자좌가 인간 V_H, D_H 및 J_H 유전자 절편으로 대체되었고 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자좌가 공학처리된 생식선 V_K1-39J_K5 인간 경쇄 영역 또는 공학처리된 생식선 V_K3-20J_K1 인간 경쇄 영역 중 어느 하나로 대체되어 있는 (실시예 2에서 기술됨) VELCOIMMUNE® 마우스로부터 얻어진 중쇄 및 경쇄 서열들을 중쇄 및 경쇄 유전자 유용성에 대해 분석하였고, V_H 및 J_H 유전자 절편을 기록하였다. 그 결과를 표 16 내지 18에 나타낸다. 표 16 내지 18의 백분율은 반올림값을 나타내고 어떤 경우에는 함께 부가될 때 100%와 같지 않을 수 있다.

[0375] 표 16은 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의 항체 (VI), 동족 V_K1-39 경쇄를 가지는 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의

항체 (VI-V_K1-39), V_K1-39 공학처리된 경쇄 마우스로부터의 항체 (V_K1-39), 동족 V_K3-20 경쇄를 가지는 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의 항체 (VI-V_K3-20) 및 V_K3-20 공학처리된 경쇄 마우스로부터의 항체 (V_K3-20)에 대한 퍼센트 중쇄 패밀리 유용성을 나타낸다. 표 17은 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의 항체 (VI), 동족 V_K1-39 경쇄를 가지는 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의 항체 (VI-V_K1-39), V_K1-39 공학처리된 경쇄 마우스로부터의 항체 (V_K1-39), 동족 V_K3-20 경쇄를 가지는 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의 항체 (VI-V_K3-20) 및 V_K3-20 공학처리된 경쇄 마우스로부터의 항체 (V_K3-20)에 대한 퍼센트 V_H 및 J_H 유전자 유용성을 나타낸다. 표 18은 각각의 면역화 그룹 (항원 E, F, G 및 H)으로부터의 V_K1-39 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K1-39 마우스)로부터의 항체에 대한 퍼센트 V_H 유전자 유용성 및 선택된 면역화 그룹 (항원 E 및 G)으로부터의 V_K3-20 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K3-20 마우스)로부터의 항체에 대한 퍼센트 V_H 유전자 유용성을 나타낸다.

[0376]

이 실시예에서 알 수 있는 것과 같이, V_K1-39J_K5-공학처리된 경쇄 마우스에서 시험된 항원들에 대한 중쇄 유전자 유용성은 V_H 패밀리 III 하위그룹 (V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-20, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-33 및 V_H3-48)이 우세한 것을 특징으로 하였다. 다른 V_H 패밀리 하위그룹의 주지할만한 유용성은 V_H1-18, V_H1-69, V_H2-5, V_H4-59 및 V_H6-1의 유용성을 특징으로 하였다. V_K3-20J_K1 공학처리된 경쇄 마우스에서 시험된 항원들에 대해서, 중쇄 유전자 유용성은 V_H 패밀리 III, V_H 패밀리 IV 및 V_H 패밀리 V 하위그룹 (V_H3-11, V_H3-30, V_H3-33, V_H4-39, V_H4-59 및 V_H5-51)의 우세한 것이 특징이었다. 다른 V_H 패밀리 하위그룹의 주지할만한 유용성은 V_H1-18, V_H1-69, V_H2-70 및 V_H6-1의 유용성을 특징으로 하였다.

[0377]

체세포성 과돌연변이 빈도. VELCOIMMUNE® 마우스 및 공학처리된 경쇄 마우스들 (상기 기술됨)에서 생성된 항체들로부터의 중쇄 및 경쇄들을 각각의 중쇄 및/또는 경쇄에 대해 증명된 중쇄 및 경쇄 유전자 유용성에 따라 생식선 서열에 대해 일렬배열하였다. 각 서열의 중쇄 및 경쇄 둘 다에 대하여 각 프레임워크 영역 (FW) 및 상보성 결정 영역 (CDR)에 대한 아미노산 변화를 계산하였다. 그 결과를 표 19 내지 22에 나타낸다. 표 21 내지 24의 백분율은 반올림값을 나타내며, 어떤 경우에는 함께 부가될 때 100%가 아닐 수 있다.

[0378]

표 19는 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의 항체들의 중쇄, V_K1-39 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K1-39 마우스)로부터의 항체들의 중쇄 및 V_K3-20 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K3-20 마우스)로부터의 항체들의 중쇄의 각각의 FW 및 CDR 영역에서 관찰된 아미노산 (AA) 변화의 수를 나타낸다. 표 20은 VELCOIMMUNE® 마우스로부터의 항체들의 경쇄, V_K1-39 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K1-39 마우스)로부터의 항체들의 경쇄 및 V_K3-20 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K3-20 마우스)로부터의 항체들의 경쇄의 각각의 FW 및 CDR 영역에서 관찰된 아미노산 (AA) 변화의 수를 나타낸다. 표 21은 선택된 면역화 그룹 (항원 E, F 및 H)에 대해 V_K1-39 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K1-39 마우스)로부터의 항체들의 중쇄의 각각의 FW 및 CDR 영역에서 관찰된 아미노산 (AA) 변화의 수를 나타낸다. 표 22는 선택된 면역화 그룹 (항원 E 및 G)에 대해 V_K3-20 공학처리된 경쇄 마우스 (V_K3-20 마우스)로부터의 항체들의 중쇄의 각각의 FW 및 CDR 영역에서 관찰된 아미노산 (AA) 변화의 수를 나타낸다.

표 16

[0379]

V _H 패밀리	VI	VI - V _K 1-39	V _K 1-39	VI - V _K 3-20	V _K 3-20
1	9.0	14.8	3.3	7.1	4.9
2	2.2	1.8	4.6	0	1.6
3	77.8	69.8	77.3	61.4	29.5
4	8.4	8.3	11.2	27.1	39.3
5	0.9	0	0.7	4.3	23.0
6	1.7	5.3	3.0	0	1.6

표 17

[0380]

V _H 유전자	VI	VI - V _K 1-39	V _K 1-39	VI - V _K 3-20	V _K 3-20
1-2	3.9	8.3	0	2.9	0
1-3	0	0	0	0	0
1-8	1.3	0.6	0	1.4	0
1-18	3.0	0.6	1.3	2.1	1.6
1-24	0.4	3.6	0	0.7	0

1-46	0.1	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0
1-69	0.3	1.8	2.0	0	3.3
2-5	1.9	0	4.6	0	0
2-26	0.2	1.8	0.0	0	0
2-70	0.1	0	0	0	1.6
3-7	3.0	14.8	0	1.4	0
3-9	8.5	3.6	29.6	16.4	0
3-11	5.4	10.7	0	7.1	1.6
3-13	3.2	1.8	0.7	2.1	0
3-15	4.0	4.7	0.3	0.7	0
3-20	1.0	0.6	0.3	5.0	0
3-21	0.8	0.6	0	2.1	0
3-23	20.4	8.9	3.3	8.6	0
3-30	17.6	4.1	35.2	12.9	1.6
3-33	12.6	14.8	0	5.0	26.2
3-43	0.2	0.6	0	0	0
3-48	0.8	1.2	7.2	0	0
3-53	0.3	3.6	0.3	0	0
3-64	0	0	0.3	0	0
3-72	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0
4-31	2.7	0	0.7	8.6	0
4-34	1.8	0.6	0.3	14.3	0
4-39	1.6	0.6	3.0	2.1	14.8
4-59	2.3	7.1	7.2	2.1	24.6
5-51	0.9	0	0.7	4.3	23.0
6-1	1.7	5.3	3.0	0	1.6
J _H 유전자	VI	VI - V _K 1-39	V _K 1-39	VI - V _K 3-20	V _K 3-20
1	1.5	1.2	7.1	0	0
2	4.5	2.4	0.7	5.0	26.9
3	10.5	16.6	13.1	13.6	26.9
4	44.0	34.3	32.3	50.7	9.6
5	9.6	10.1	16.8	7.9	1.9
6	29.7	35.5	30.0	22.9	34.6

표 18

[0381]

V _H 유전자	V _K 1-39 마우스				V _K 3-20 마우스	
	항원 E	항원 F	항원 G	항원 H	항원 E	항원 G
1-2	0	0	0	0	0	0
1-3	0	0	0	0	0	0
1-8	0	0	0	0	0	0
1-18	0	0	0	8.3	0	3.1
1-24	0	0	0	0	0	0
1-46	0	0	0	0	0	0
1-58	0	0	0	0	0	0
1-69	2.9	0	25.0	0	0	6.3
2-5	8.2	0	0	0	0	0
2-26	0	0	0	0	0	0
2-70	0	0	0	0	0	3.1
3-7	0	0	0	0	0	0
3-9	1.2	98.8	0	14.6	0	0
3-11	0	0	0	0	0	3.1
3-13	0.6	0	25.0	0	0	0
3-15	0	1.2	0	0	0	0

3-20	0	0	25.0	0	0	0
3-21	0	0	0	0	0	0
3-23	4.1	0	25.0	4.2	0	0
3-30	62.9	0	0	0	3.4	0
3-33	0	0	0	0	13.8	37.5
3-43	0	0	0	0	0	0
3-48	0.6	0	0	43.8	0	0
3-53	1.6	0	0	0	0	0
3-64	1.6	0	0	0	0	0
3-72	0	0	0	0	0	0
3-73	0	0	0	0	0	0
4-31	0	0	0	4.2	0	0
4-34	0	0	0	2.1	0	0
4-39	5.3	0	0	0	31.0	0
4-59	11.8	0	0	4.2	3.4	43.8
5-51	1.2	0	0	0	48.3	0
6-1	0	0	0	18.8	0	3.1

표 19

[0382]

# AA 변화	VELCOIMMUNE® 마우스들로부터의 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	63	32	36	26	12	82
1	23	32	41	31	22	17
2	9	25	17	23	27	1
3	4	10	5	16	13	0
4	0	1	1	3	12	0
>5	1	0	0	1	14	0

# AA 변화	Vκ1-39 마우스들로부터의 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	8	34	30	9	37
1	25	26	35	34	19	54
2	9	44	23	20	33	9
3	1	19	8	12	22	0
4	0	3	0	5	11	0
>5	1	0	0	0	7	0

# AA 변화	Vκ3-20 마우스들로부터의 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	57	8	54	16	8	93
1	41	43	34	39	21	7
2	2	25	10	18	20	0
3	0	15	2	21	13	0
4	0	10	0	3	20	0
>5	0	0	0	2	18	0

표 20

[0383]

# AA 변화	VELCOIMMUNE® 마우스들로부터의 항체들의 경쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	65	24	49	60	33	23
1	24	20	34	31	27	38
2	9	27	16	9	18	28
3	1	20	1	0	14	7
4	0	7	0	0	4	3
>5	1	1	0	0	3	0

# AA 변화	V _K 1-39 마우스들로부터의 항체들의 경쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	91	75	80	90	71	63
1	9	19	17	10	21	27
2	0	5	1	1	5	8
3	0	0	1	0	2	1
4	0	0	0	0	2	1
>5	0	0	0	0	0	0

# AA 변화	V _K 3-20 마우스들로부터의 항체들의 경쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	90	47	93	97	63	57
1	10	27	3	3	20	43
2	0	27	3	0	17	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
>5	0	0	0	0	0	0

표 21

[0384]

# AA 변화	V _K 1-39 마우스들로부터의 항-항원 E 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	75	8	49	41	14	36
1	21	25	33	35	25	52
2	4	43	14	18	28	12
3	0	20	4	5	16	0
4	0	5	0	1	12	0
>5	1	0	0	0	5	0

# AA 변화	V _K 1-39 마우스들로부터의 항-항원 E 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	52	0	6	6	2	15
1	35	24	32	35	15	78
2	11	59	46	22	49	7
3	0	17	16	24	29	0
4	0	0	0	12	4	0
>5	1	0	0	0	1	0

# AA 변화	V _K 1-39 마우스들로부터의 항-항원 H 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	54	21	29	33	4	77
1	17	35	50	27	6	23
2	23	21	15	21	25	0
3	6	21	4	15	27	0
4	0	2	2	2	15	0
>5	0	0	0	2	23	0

표 22

[0385]

# AA 변화	V _K 3-20 마우스들로부터의 항-항원 E 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	79	17	62	24	17	90
1	21	28	34	55	31	10
2	0	28	3	21	24	0
3	0	14	0	0	10	0
4	0	14	0	0	3	0

>5	0	0	0	0	14	0
# AA 변화	V _K 3-20 마우스들로부터의 항-항원 G 항체들의 중쇄					
	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3	CDR3
0	38	0	47	9	0	97
1	59	56	34	25	13	3
2	3	22	16	16	16	0
3	0	16	3	41	16	0
4	0	6	0	6	34	0
>5	0	0	0	3	22	0

실시에 13. 보편적 경쇄를 가지는 이중특이성 항체의 결합 친화성

전체 인간 이중특이성 항체를, 선택된 단일특이성 항-항원 E 공통 경쇄 항체 (실시에 5에서 기술됨)의 클론된 인간 중쇄 가변 영역으로부터 해당 기술분야에 공지되어 있는 표준 재조합 DNA 기법들을 사용하여 구성하였다. 표 23은 선택된 모(parental) 단일특이성 항체로부터 인간 중쇄 (HC-1 및 HC-2)의 쌍 이루기를 나타내며, 각각의 쌍은 각각의 이중특이성 항체의 구성을 위해 생식선 재배열된 인간 V_K1-39/J_K1 경쇄와 함께 사용한다.

이중특이성 또는 모 단일특이성 항-항원 E 항체의 항원 E의 세포외재성 도메인 (ECD)에 대한 결합을 BIACORE™ 2000 기기 (GE Healthcare) 상에서의 실시간 표면 플라즈몬 공명 바이오센서 분석을 사용하여 측정하였다. EDC-NHS 화학을 사용하여 항-c-myc-특이적 단클론성 항체 (클론# 9E10)로 유도체화된 CM5 BIACORE™ 센서 표면을 사용하여 항원 E (항원E-mmh)의 C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그된 ECD를 포획하였다. 항원E-mmh의 190 RU 주변을 BIACORE™ 센서 표면상에 포획하고, 이어서 300nM 및 500nM 농도의 상이한 이중특이성 또는 모 단일특이성 항-항원 E 항체를 50µl/분의 유속으로 주입하였다. 실험을 25℃에서 HBST 작동 완충액 (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20)중에서 수행하였다. 300nM 농도에서 항원E-mmh 표면에 결합하는 항체의 양을 항체 주입이 끝나기 3초 전에 기록하고, 도표화하였다.

표 24 및 도 8은 이중특이성 항체 (BsAb) 및 단일특이성 모 항체 (PAb-1, PAb-2) 각각에 대해 관찰된 결합 반응 (BIACORE™ 장치; RU)을 나타낸다. 각각의 항체를 동일한 항원E-mmh 표면 위의 포화 조건하에서 주입하였기 때문에, 결합반응은 항원 포획 표면에 대한 각각의 항체 결합에 대한 결합 화학양론을 반영한다.

이 실시예에서 알 수 있는 것과 같이, 각각의 이중특이성 항체에 대해 관찰된 결합 반응은 각각의 단일특이성 항체에 대한 결합 반응보다 대략 2배 더 컸고(표 24 및 도 8), 그것은 항원-특이적 단클론성 항체의 중쇄들 및 공통 경쇄를 사용하는 이중특이성 항체들의 기능적 구성을 증명하며, 이때 이중특이성 단클론성 항체 분자의 각각의 Fab 아암은 세포 표면 수용체 (항원 E; 도 7b, 좌측 하부 참조)의 세포외재성 도메인상의 구별되는 에피토프들에 동시에 결합한다.

표 23

이중특이성 항체	모 HC-1	모 HC-2
3108	2952	2978
3109	2978	3022
3111	2952	3005
3112	3022	3005

표 24

이중특이성 항체	결합 반응 (RU)		
	PAb-1	PAb-2	BsAb
3108	236	229	485
3109	236	197	408
3111	202	229	435
3112	202	197	345

- [0393] **실시예 14. 2개의 인간 경쇄를 발현하는 마우스의 제조 및 분석**
- [0394] 상기 실시예 2에서 기술한 방법들을 사용하여, 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편 (예컨대 인간 $V_{\kappa}1-39$ 및 인간 $V_{\kappa}3-20$ 유전자 절편)을 함유하는 2개의 추가의 공학처리된 경쇄 유전자좌를 제조하였다 (도 9). 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편과 5개의 인간 J_{κ} 유전자 절편을 미재배열 형태로 함유하는 경쇄 유전자좌를 공학적으로 제조하였다 (DLC-J5). 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편과 하나의 인간 J_{κ} 유전자 절편을 미재배열 형태로 함유하는 경쇄 유전자좌를 또한 공학적으로 제조하였다 (DLC-J1). 2개의 추가 공학처리된 경쇄 유전자좌의 각각에 대해, 재조합 신호 서열을 인간 유전자 절편의 3' 쪽에 연결시켜서 인간 유전자 절편의 B 세포에서의 생체 내 재배열을 허용하였다.
- [0395] 마우스 서열에 작동가능하게 연결된 공학처리된 경쇄 유전자좌의 각각 (즉 내인성 번역글로불린 κ 경쇄 유전자좌의 상류 및 하류 서열)을 별도로 함유하는 변형된 BAD DNA 클론을 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편을 함유하는 각각의 공학처리된 경쇄 유전자좌 내의 서열에 위치한 프라이머들을 사용한 PCR에 의해 확인하고, 이어서 ES 세포 안으로 일렉트로포레이션하여 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편 중 어느 하나를 발현하는 마우스를 제조하였다 (상기에서 기술됨). 상기에서 기술한 공학처리된 경쇄 유전자좌 중 어느 하나를 함유하는 포지티브 ES 세포 클론을 Taqman™ 스크리닝 및 공학처리된 경쇄 유전자좌에 특이적인 프로브를 사용하는 염색체분석에 의해 확인하였다 (상기에서 기술됨). 그런 다음 확인한 ES 세포 클론을 사용하여 마우스 C_{κ} 도메인과 융합된 인간 경쇄 가변 도메인을 발현하는 한배 새끼들을 얻기 위해 암컷 마우스에 이식하였고, 그 마우스를 본원에서 이중 경쇄 (DLC) 마우스로 언급하였다.
- [0396] 다르게는, 공학처리된 경쇄 유전자좌를 내포하는 ES 세포를 표적화 구성물에 의해 도입된 ERTed 네오마이신 카세트 제거하기 위하여 FLP를 발현하는 구성물로 트랜스팩션시킬 수 있다. 임의로, 네오마이신 카세트는 FLP 제조효소를 발현하는 마우스를 사육함으로써 제거된다 (예컨대 US 6,774,279). 임의로, 네오마이신 카세트는 마우스에서 보유된다.
- [0397] **유동 세포분석.** DLC 마우스에서의 B 세포 집단과 B 세포 발달을 비장세포 및 골수 제제의 유동 세포분석에 의해 확인하였다. 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편과 5개의 인간 J_{κ} 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 ($n=4$), 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편과 하나의 인간 J_{κ} 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 ($n=4$) 및 야생형 마우스 ($n=4$)로부터의 세포 현탁액을 표준 방법 (상기 기술됨)을 사용하여 제조하고, 형광 표지된 항체들로 염색하였다 (실시예 3에서 기술함).
- [0398] 간단히 설명하면, 1×10^6 세포를 항-마우스 CD16/CD32 (클론 2.4G2, BD Pharmigen)와 함께 얼음 상에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 다음의 항체 칩케일로 30분 동안 얼음 위에서 표지화하였다: APC-H7 포함된 항-마우스 CD19 (클론 1D3, BD Pharmigen), 퍼시픽 블루 포함된 항-마우스 CD3 (클론 17A2, BioLegend), FITC 포함된 항-마우스 $Ig\kappa$ (클론 187.1, BD Pharmigen) 또는 항-마우스 CD43 (클론 1B11, BioLegend), PE 포함된 항-마우스 $Ig\lambda$ (클론 RML-42, BioLegend) 또는 항-마우스 c-kit (클론 2B8, BioLegend), PerCP-Cy5.5 포함된 항-마우스 IgD (BioLegend), PE-Cy7 (클론 II/41, eBioscience), APC 포함된 항-마우스 B220 (클론 RA3-6B2, eBioscience). 염색 후에, 세포를 세척하고 2% 포름알데히드에 고정시켰다. 데이터 획득은 LSRII 유동 세포분석기 상에서 수행하였고, FlowJo로 분석하였다. 게이팅: 총 B 세포 ($CD19^+CD3^-$), $Ig\kappa^+$ B 세포 ($Ig\kappa^+Ig\lambda^-CD19^+CD3^-$), $Ig\lambda^+$ B cells ($Ig\kappa^-Ig\lambda^+CD19^+CD3^-$). 골수 구획에 대한 결과를 도 10a 내지 도 12b에 나타낸다. 비장 구획에 대한 결과를 도 13a 내지 도 16에 나타낸다.
- [0399] 이 실시예에서 알 수 있는 것과 같이, DLC-5J 마우스는 비장 및 골수 구획 내에서 정상적인 B 세포 집단을 입증한다 (도 10a 내지 16). DLC-5J 마우스는 골수 구획 내에서 실질적으로 야생형 한배 새끼들에서 관찰된 것과 동일한 미성숙, 성숙한 및 프레/프로 B 세포 집단을 보였다. 실제로, DLC-5J 유전자좌는 실질적으로 야생형 마우스에서 관찰된 것과 동일한 $\kappa:\lambda$ 비율을 유발하기 위해 내인성 λ 유전자좌와 결합할 수 있었다 (도 14b). 또한 DLC-5J 마우스는 비장 구획에서 다양한 단계 (예컨대 미성숙, 성숙한, T1, T2, T3, 변연부 전구, 변연부, 낭포성-I, 낭포성-II 등)를 통해 B 세포가 진행됨에 따라 정상적인 말초 B 세포 발달이 실질적으로 야생형 마우스에서 관찰된 것과 동일한 방식으로 일어나는 것을 보인다 (도 15a 내지 16). 대조적으로, DLC-1J 마우스는 공학처리된 경쇄에 비교하여 더 낮은 B 세포의 전체 수와 증가된 κ 경쇄 유용성을 보였다 (데이터는 제시하지 않음).
- [0400] **이중 경쇄 발현.** 2개의 인간 V_{κ} 유전자 절편의 발현을 실시예 3에 따라 정량 PCR 분석을 사용하여 동형접합성

마우스에서 분석하였다. 간단하게 설명하면, CD19⁺ B 세포를 야생형 마우스, 마우스 중쇄 및 κ 경쇄 가변 유전자좌의 해당하는 인간 중쇄 및 κ 경쇄 가변 영역 유전자좌로의 대체에 대하여 동형접합성인 마우스 (Hκ), 뿐만 아니라 2개의 인간 Vκ 유전자 절편 및 5개의 인간 Jκ 유전자 절편 (DLC-5J) 또는 하나의 인간 Jκ 유전자 절편 (DLC-1J)을 함유하는 공학처리된 κ 경쇄 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스의 골수 및 전체 비장으로 부터 정제하였다. 상대적인 발현을 마우스 Cκ 영역의 발현에 대해 표준화하였다 (그룹당 n=3 내지 5마리). 그 결과를 도 17 및 도 18에 나타낸다.

[0401] 재배열된 인간 Vκ3-20 또는 인간 Vκ1-39 유전자 절편을 함유하는 경쇄의 발현을 DLC-5J 및 DLC-1J 마우스의 골수 및 비장 두 곳에서 검출하였다 (도 17 및 도 18). 골수 구획에서, 두 계통의 DLC 마우스에서 인간 Vκ3-20-유도된 및 인간 Vκ1-39-유도된 경쇄의 발현은 둘 다 마우스 Vκ 및 Jκ 유전자 절편이 해당하는 인간 Vκ 및 Jκ 유전자 절편으로 대체되어 있는 마우스에 비교하여 상당히 더 높았다 (Hκ; 도 17). 인간 Vκ3-20-유도된 경쇄 발현은 Hκ 마우스에서보다 약 6배 (DLC-5J) 내지 15배 (DLC-1J) 더 높게 관찰되었다. DLC-1J 마우스는 골수 구획에서 DLC-5J 마우스를 능가하는, 인간 Vκ3-20-유도된 경쇄의 약 2배 더 높은 발현을 보였다. 인간 Vκ1-39-유도된 경쇄 발현은 Hκ 마우스에서보다 약 6배 (DLC-5J) 내지 13배 (DLC-1J) 더 높게 관찰되었다. DLC-1J 마우스는 골수 구획에서 DLC-5J 마우스를 능가하는, 인간 Vκ1-39-유도된 경쇄의 약 2배 더 높은 발현을 보였다.

[0402] 비장 구획에서, 두 계통의 DLC 마우스에서 인간 Vκ3-20-유도된 및 인간 Vκ1-39-유도된 경쇄의 발현은 둘 다 Hκ 마우스에 비교하여 상당히 더 높았다 (도 18). 인간 Vκ3-20-유도된 경쇄 발현은 Hκ 마우스에서보다 약 4배 (DLC-5J) 내지 8배 (DLC-1J) 더 높게 관찰되었다. DLC-1J 마우스는 비장 구획에서 DLC-5J 마우스를 능가하는, 인간 Vκ3-20-유도된 경쇄의 약 2배 더 높은 발현을 보였다. 인간 Vκ1-39-유도된 경쇄 발현은 Hκ 마우스에서보다 약 4배 (DLC-5J) 내지 5배 (DLC-1J) 더 높게 관찰되었다. DLC-1J 마우스는 비장 구획에서 DLC-5J 마우스에 비교하여 인간 Vκ1-39-유도된 경쇄의 유사한 발현을 보였다.

[0403] **DLC-5J 마우스에서 인간 Vκ/Jκ 유용성.** 2개의 미재배열 인간 Vκ 유전자 절편 및 5개의 미재배열 인간 Jκ 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)를 비장 B 세포에서 역-전사효소 증합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)에 의하여 인간 Vκ/Jκ 유전자 절편 유용성에 대해 분석하였다.

[0404] 간단히 설명하면, 동형접합성 DLC-5J (n=3) 및 야생형 (n=2) 마우스로부터 비장을 수득하여 10% 열-비활성화된 우태아 혈청이 함유된 10mL의 RPMI 1640 (Sigma)에서 같은 유리 슬라이드를 사용하여 체질(meshing)하여 단일 세포 현탁액을 만들었다. 비장 세포를 원심분리 (1200rpm, 5분)를 사용하여 펠릿화하고, 적혈구를 5mL의 ACK 용해 완충액 (GIBCO)으로 3분 동안 용해시켰다. 비장세포를 PBS (Irvine Scientific)로 희석하고, 0.7µm의 세포 여과기를 사용하여 여과한 후 다시 원심분리하여 세포를 펠릿화하고, 그것을 1mL의 PBS에 재현탁하였다.

[0405] 펠릿화된 비장세포로부터 AllPrep DNA/RNA 미니 키트 (Qiagen)를 사용하여 제조자의 지시를 따라 분리하였다. 비장세포 RNA에 대해 마우스 Cκ에 특이적인 프라이머들을 포함한 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) 시스템을 사용하여 제조자의 지시 (Invitrogen)를 따라 RT-PCR을 수행하였다. 마우스 Cκ에 특이적인 프라이머들은 3' mIgC RACE1 (AAGAAGCACA CGACTGAGGC AC; SEQ ID NO:34) 및 mIgC3'-1 (CTCACTGGAT GGTGGGAAGATGGA; SEQ ID NO:35)이었다. PCR 생성물은 겔-정화하고, pCR®2.1-TOPO® vector (TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen)에 클론한 후 벡터 내에서 클로닝 부위 양 측면에 위치한 M13 전방 (GTA AACGAC GGCCAG; SEQ ID NO: 36) 및 M13 역 (CAGGAAACAG CTATGAC; SEQ ID NO: 37) 프라이머들을 사용하여 서열화하였다. 각 비장 샘플로부터 10개의 클론들을 서열화하였다. 서열을 Vκ/Jκ 유용성을 측정하기 위해 IMGT/V-QUEST 참조 디렉토리 세트로부터의 마우스 및 인간 면역글로불린 세트에 비교하였다. 표 25는 각 비장세포 샘플로부터 RT-PCR 클론에서 관찰된 선택된 클론에 대한 Vκ/Jκ 조합을 나타낸다. 표 26은 DLC-5J 동형접합성 마우스로부터 선택된 RT-PCR 클론들의 인간 Vκ/인간 Jκ 및 인간 Jκ/마우스 Cκ 접합부의 아미노산 서열을 나타낸다. 소문자들은 가변 영역 또는 재조합 중에 N 및/또는 P 첨가로부터 유발된 비-주형 첨가의 아미노산 서열의 돌연변이를 나타낸다.

[0406] 이 실시예에서 알 수 있는 것과 같이, 마우스 Cκ 유전자에 작동가능하게 연결된 2개의 미재배열 인간 Vκ 유전자 절편 및 5개의 미재배열 인간 Jκ 유전자 절편에 대해 동형접합성인 마우스 (DLC-5J)는 제한된 면역글로불린 경쇄 레퍼토리를 생성하기 위해 다수의 인간 Jκ 유전자 절편에 인간 Vκ 유전자 절편을 생상적으로 재조합할 수 있다. 표 25에 나타낸 DLC-5J 동형접합성 마우스에서의 재배열체 중에서, Vκ1-39/J2 (1), Vκ1-39/J3 (1), Vκ3-20/J1 (7), Vκ3-20/J2 (4) 및 Vκ3-20/J3 (1)에 대한 독특한 인간 Vκ/Jκ 재배열체가 관찰되었다. 나아가, 그런 독특한 재배열체는 발달 중에 돌연변이 및/또는 인간 Vκ 및 Jκ 유전자 절편들의 재조합으로부터 유발되는 경쇄의 CDR3 영역 (표 26) 내에 있는 독특한 아미노산의 존재를 통한 접합 다양성을 보였다. 모든 재배

열체는 마우스 C_κ 안으로의 기능성 관독을 나타냈다 (표 26).

[0407]

이런 결과들을 함께 고려하면, 선택된 2개 이하의 인간 V_L 유전자 절편을 제공하도록 공학처리된 마우스는 둘 다 재배열할 수 있고 (예컨대 하나 또는 그 이상의, 어떤 구체에에서는 최대 5개의 인간 J_L 유전자 절편과), 모든 측면에서 거의 야생형과 같은 B 세포 수 및 발달을 가지는 면역글로불린 경쇄의 인간 V_L 도메인을 코드화할 수 있음이 입증된다. 그런 마우스는 집단에 존재하는 2개의 가능한 인간 V_L 유전자 절편 중 하나를 가지는 면역글로불린 경쇄를 가지는 항체 집단을 생성한다. 이런 항체 집단은 항원 도전에 대한 반응으로 마우스에 의해 생성되고 다양한 역 키메라 (인간 가변/마우스 불변) 중쇄와 결합된다.

표 25

[0408]

마우스 ID 번호	유전형	클론	V _L /J _L 조합
1089451	DLC-5J	1-2	1-39/3
		1-4	3-20/2
		1-7	3-20/1
		1-8	3-20/2
1089452	DLC-5J	2-2	3-20/1
		2-3	3-20/1
		2-6	3-20/2
		2-8	3-20/2
		2-9	3-20/1
1092594	DLC-5J	3-1	3-20/1
		3-2	3-20/1
		3-4	3-20/1
		3-6	3-20/3
		3-9	3-20/2
1092587	WT	1-1	19-93/1
		1-2	6-25/1
		1-3	4-91/5
		1-5	3-10/4
		1-6	4-86/4
		1-8	19-93/1
		1-10	19-93/2
1092591	WT	2-1	19-93/1
		2-3	6-20/5
		2-4	6-25/5
		2-5	1-117/1
		2-6	8-30/1
		2-7	8-19/2
		2-8	8-30/1
		2-10	1-117/1

표 26

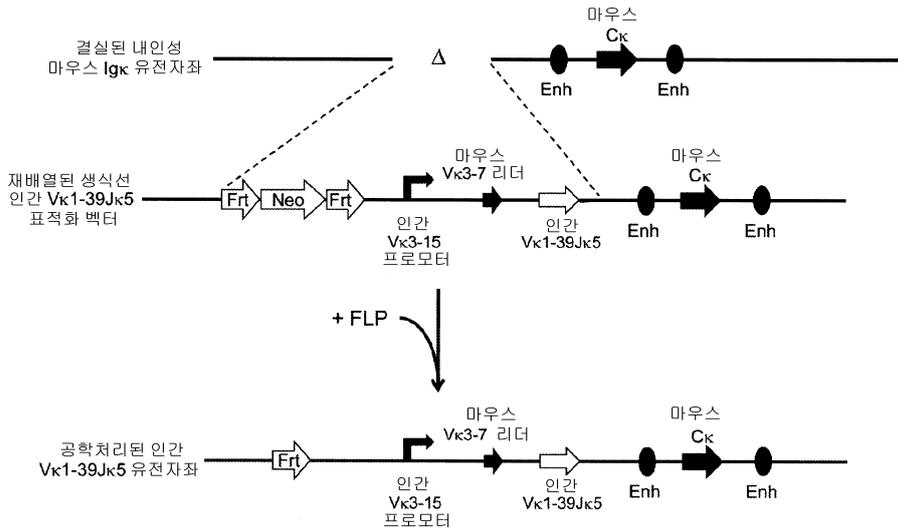
[0409]

클론	V _L /J _L	hV _L /hJ _L /mC _L 접합부 서열 (CDR3 밑줄, mIg _L C 이탤릭체)	SEQ ID NO:
2-10	1-39/2	QPEDFATYYCQQSYSTPYTFGGQGTKLEIKRADAAPT <i>VS</i> I	38
1-2	1-39/3	QPEDFATYYCQQSYSTPF <i>TF</i> GGPGTKVDIKRADAAPT <i>VS</i> I	39
1-7	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPr <i>TF</i> GGQTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> I	40
2-2	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSS <i>r</i> TFGGQTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> I	41
2-3	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPW <i>TF</i> GGQTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> I	42
2-9	3-20/1	dPEDFAVYYCQQYGSSPr <i>TF</i> GGQTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> I	44
3-1	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPr <i>TF</i> GGQTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> I	45
3-2	3-20/1	EPEDFAVYYCQQYGSSPW <i>TF</i> GGQTKVEIKRADAAPT <i>VS</i> I	46

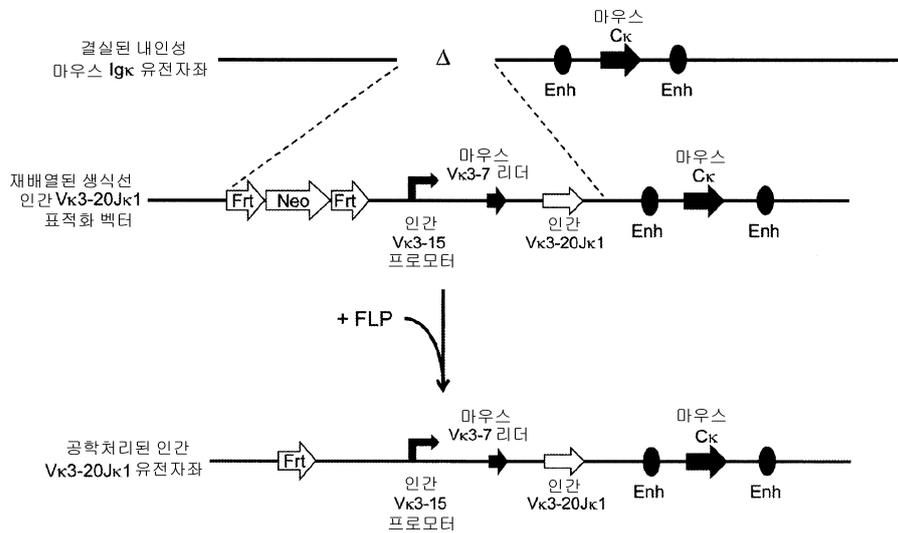
3-4	3-20/1	EPEDFAVYYCQYQSSPPTFGQGTKVEIKRADAAPT VS I	47
3-9	3-20/2	EPEDFAVYYCQYQSSPYTFGQGTKLEIKRADAAPT VS I	48
3-6	3-20/3	EPEDFAVYYCQYQSSiFTFGPGTKVDIKRADAAPT VS I	49

도면

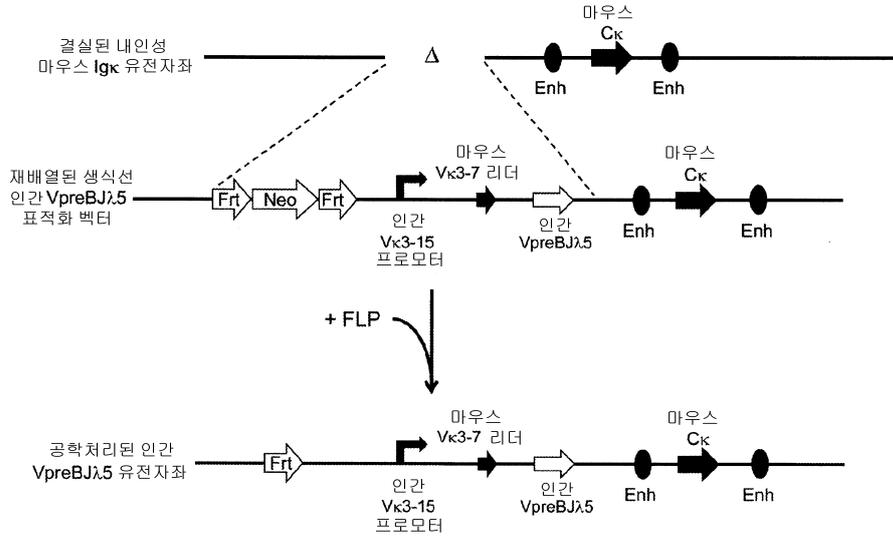
도면1



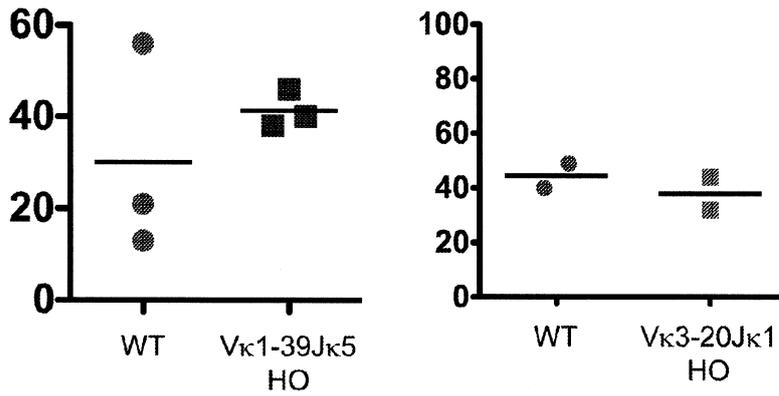
도면2



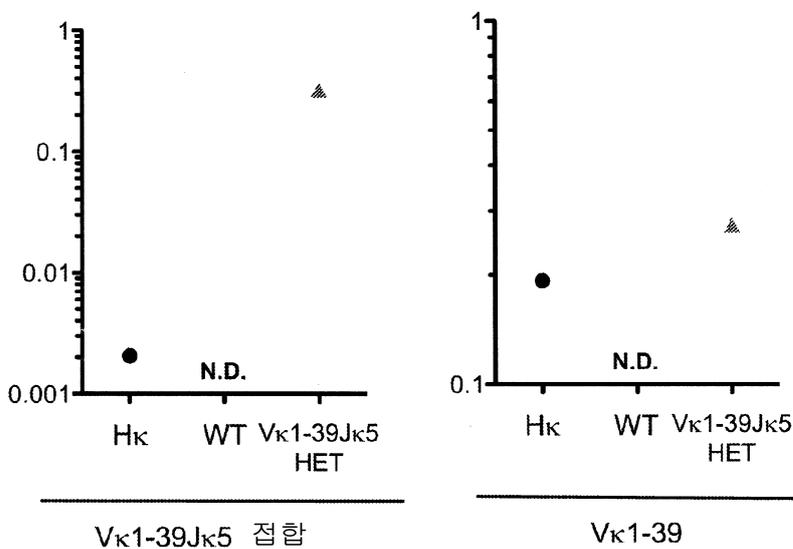
도면3



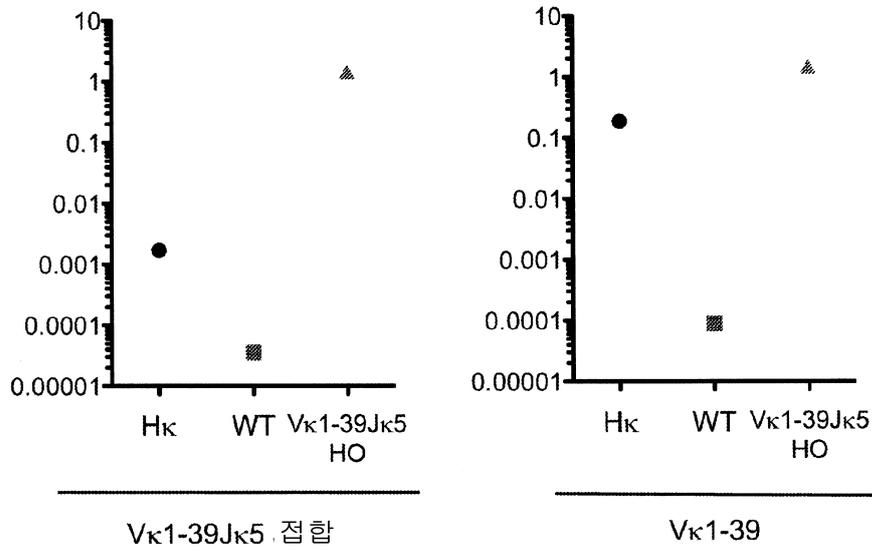
도면4



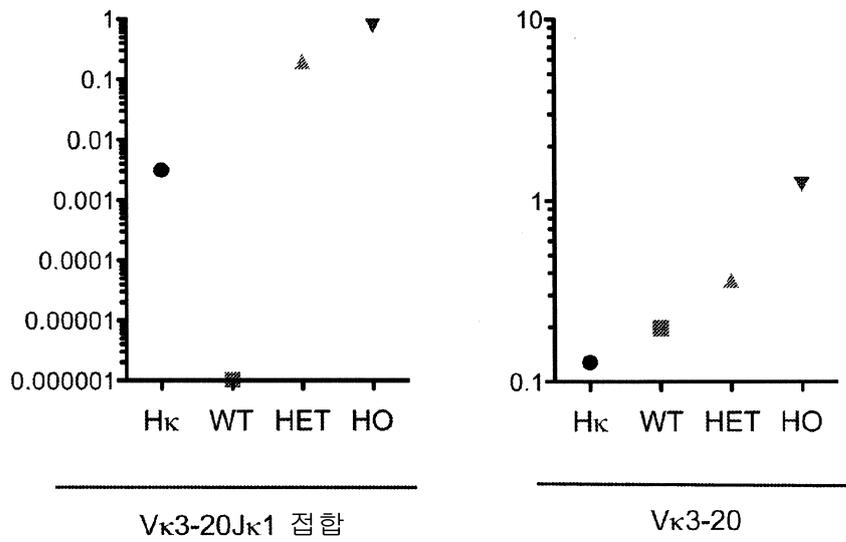
도면5a



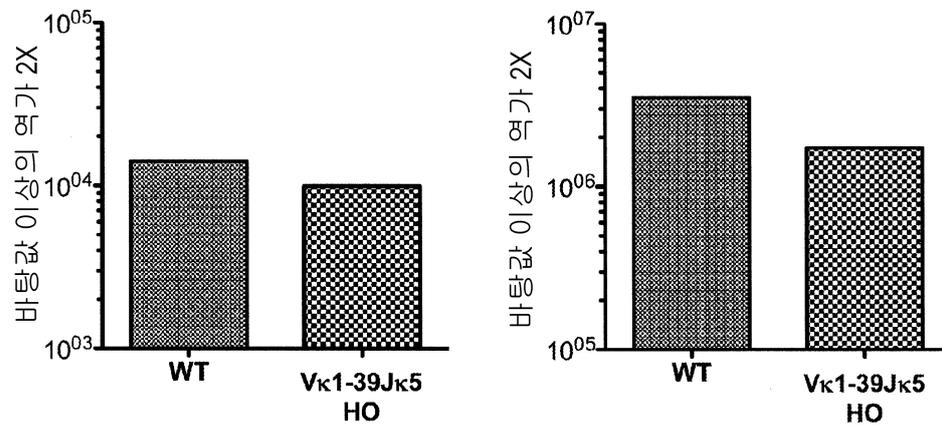
도면5b



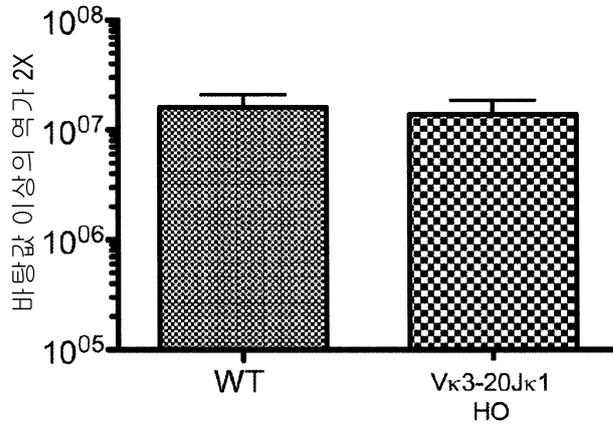
도면5c



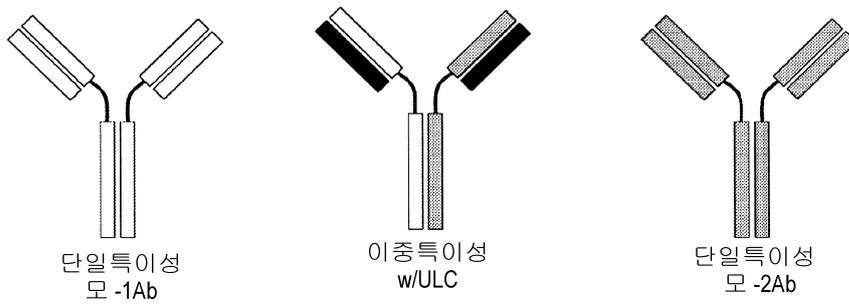
도면6a



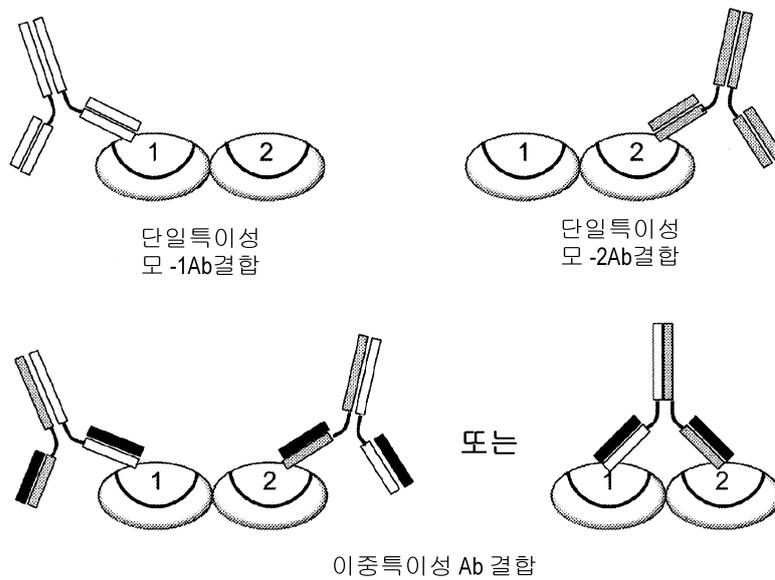
도면6b



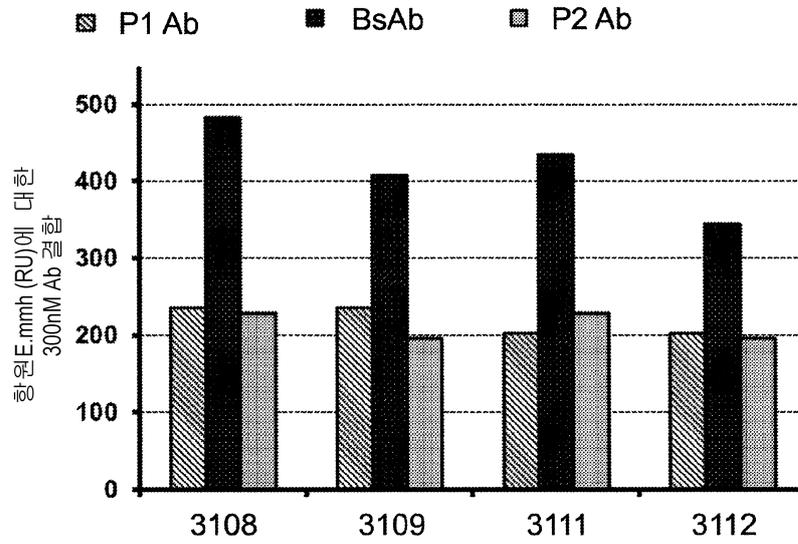
도면7a



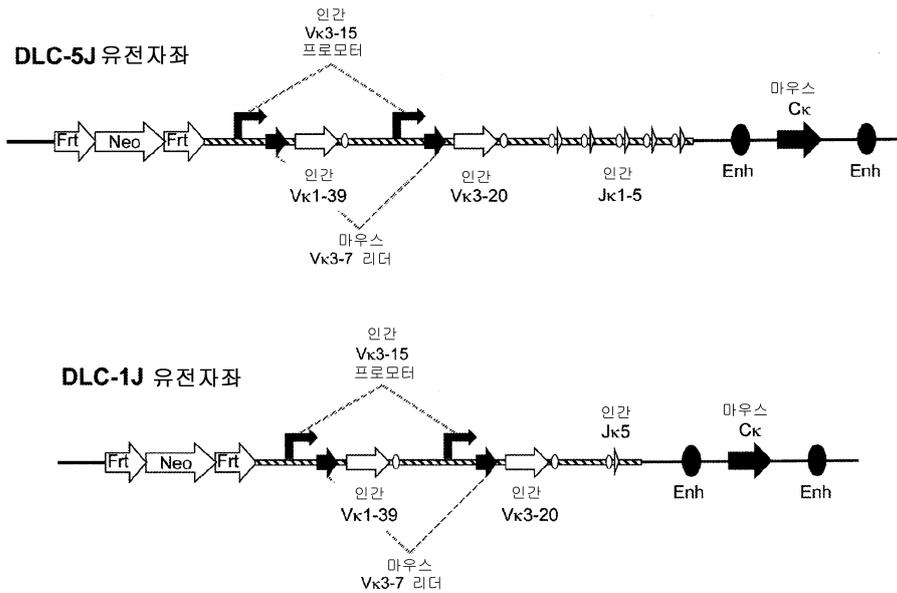
도면7b



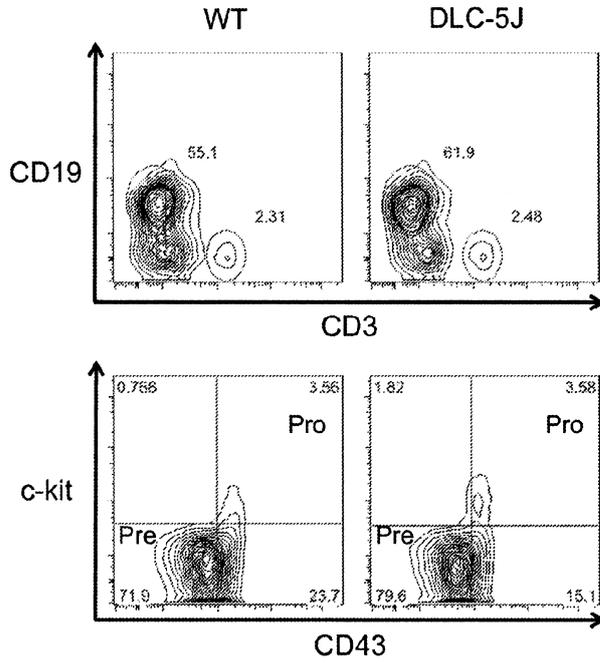
도면8



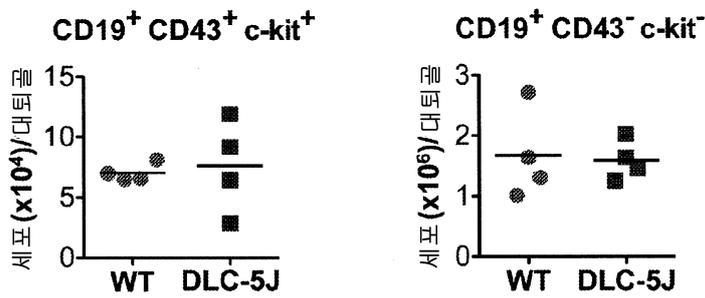
도면9



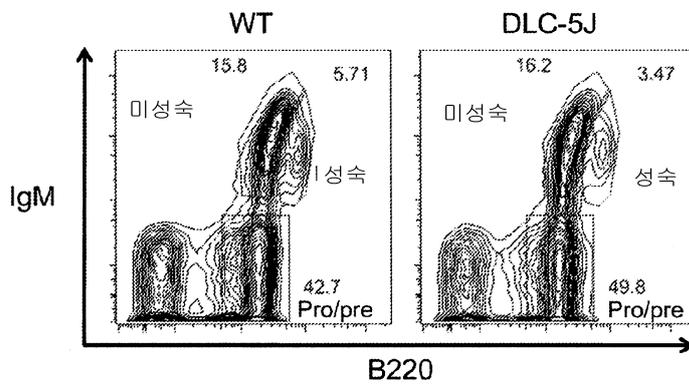
도면10a



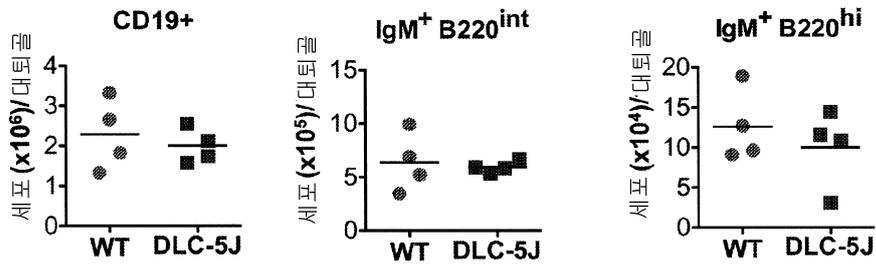
도면10b



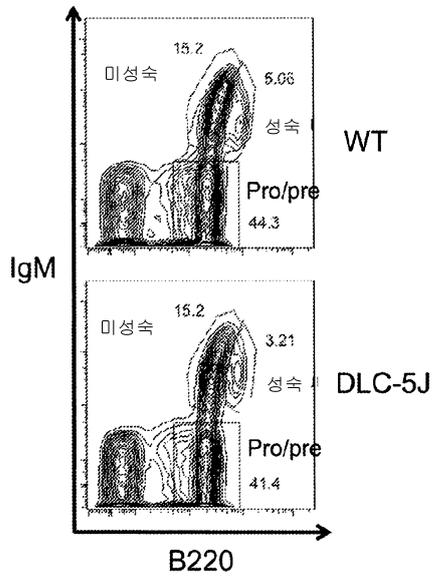
도면11a



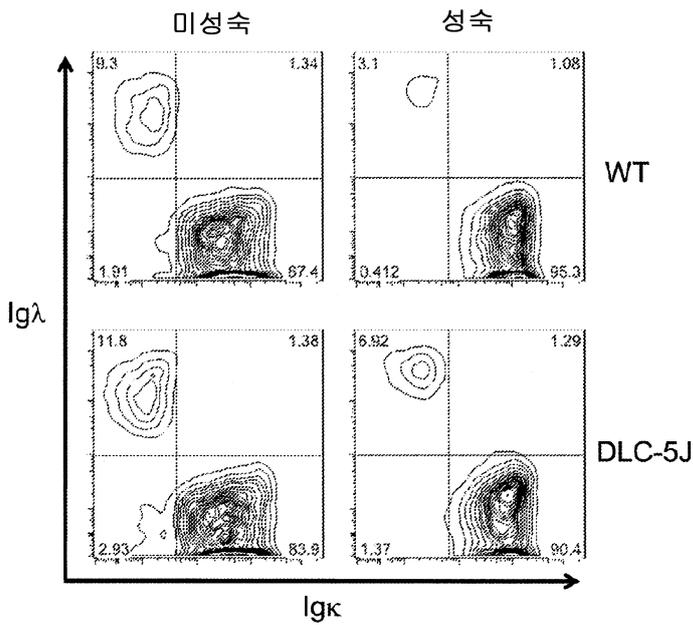
도면11b



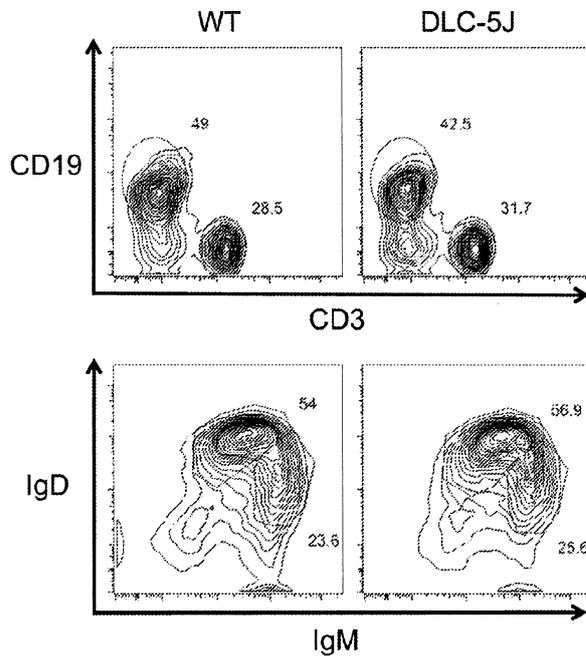
도면12a



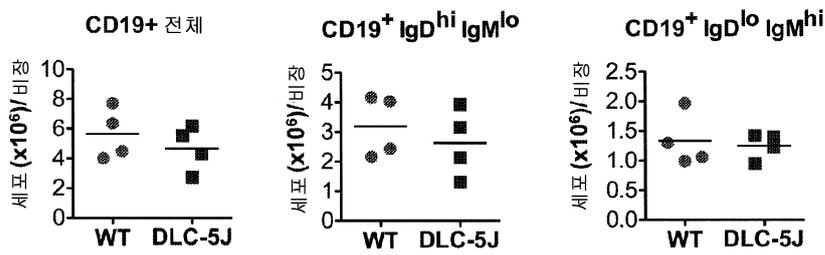
도면12b



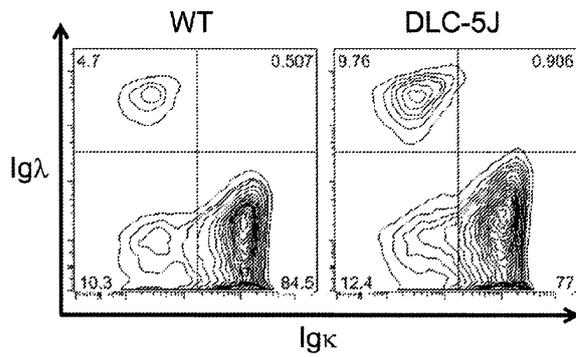
도면13a



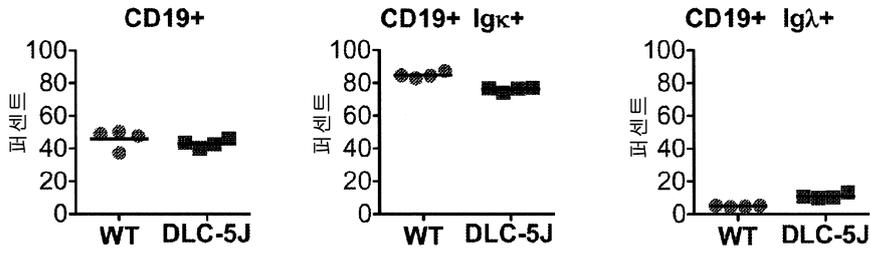
도면13b



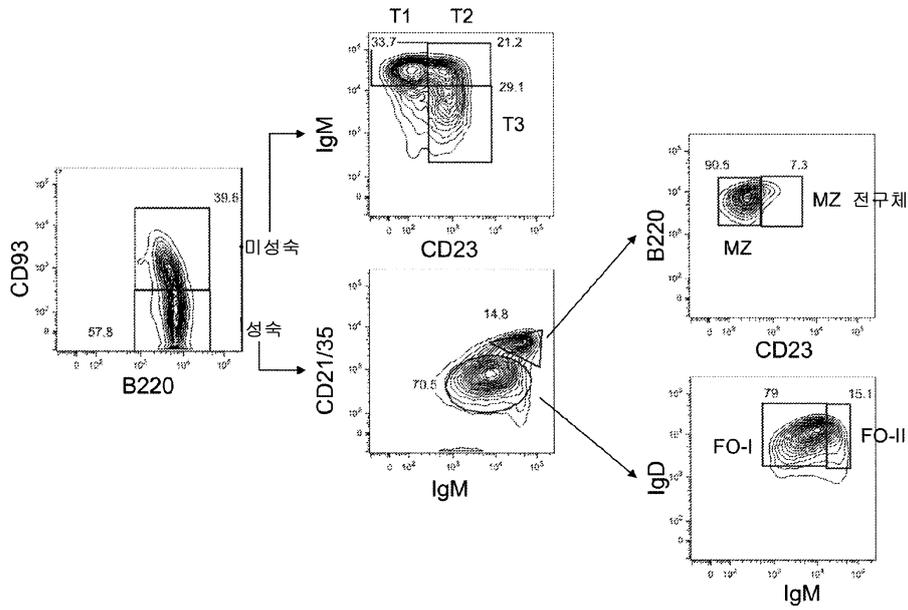
도면14a



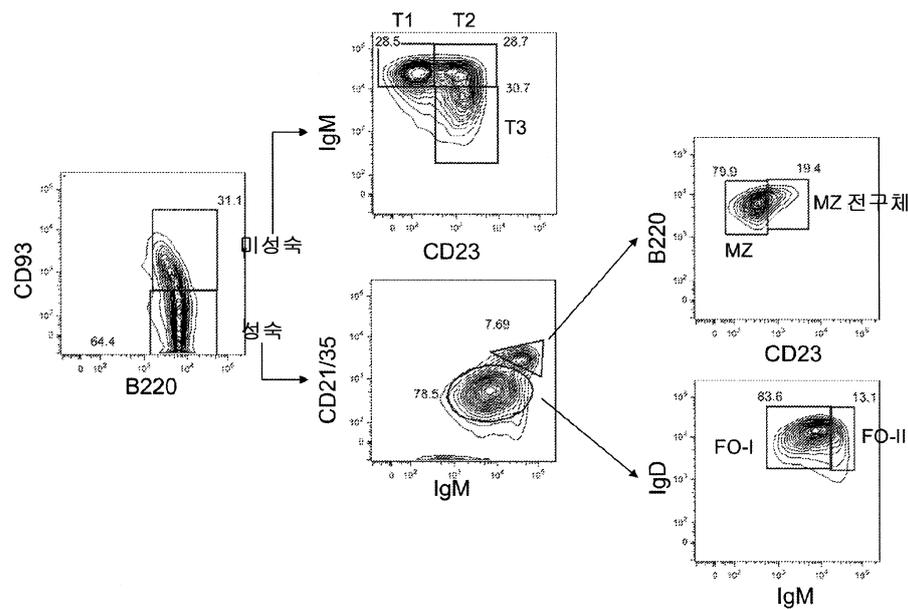
도면14b



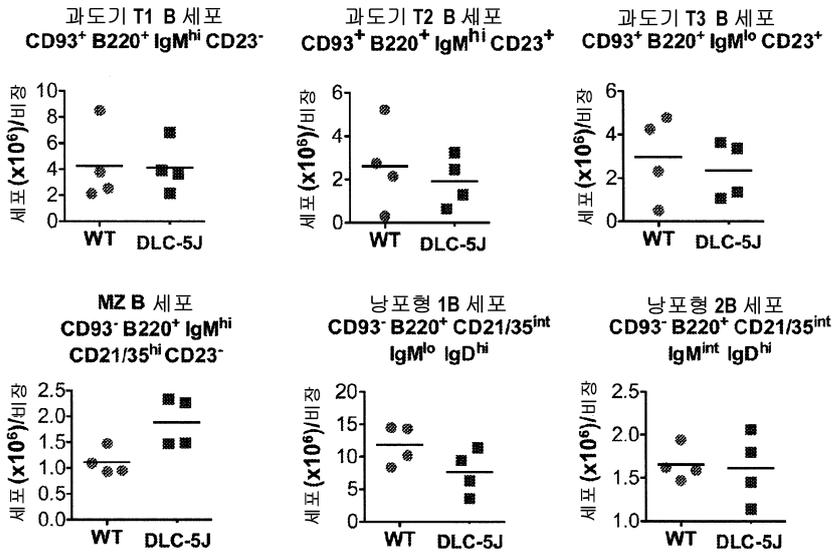
도면15a



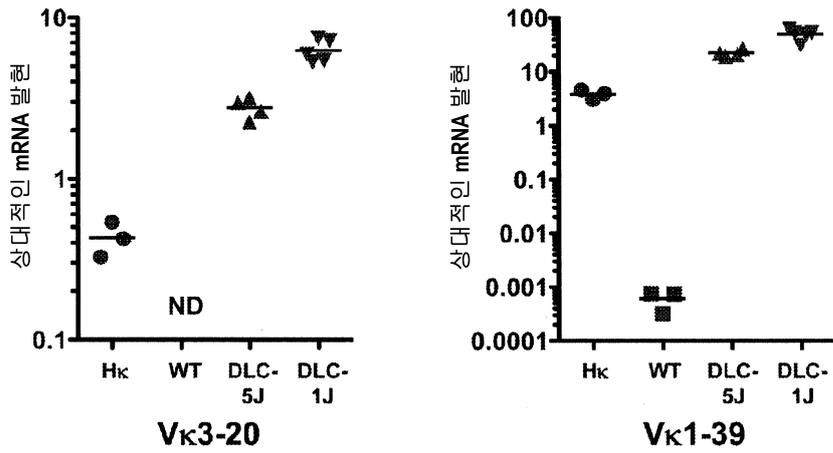
도면15b



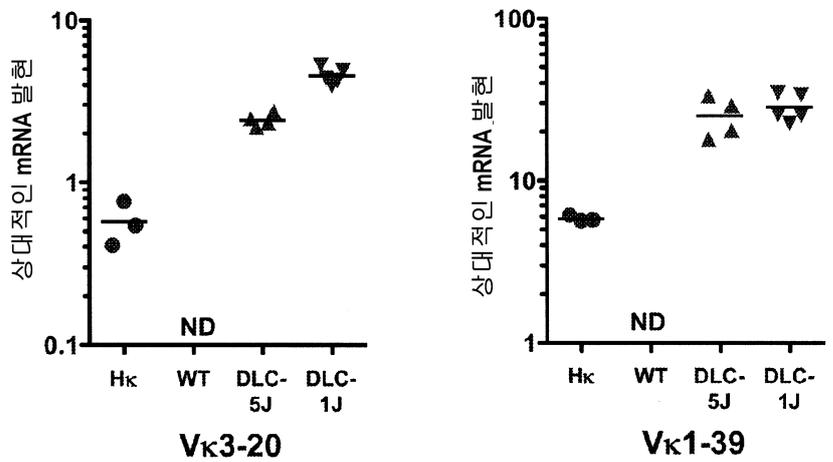
도면16



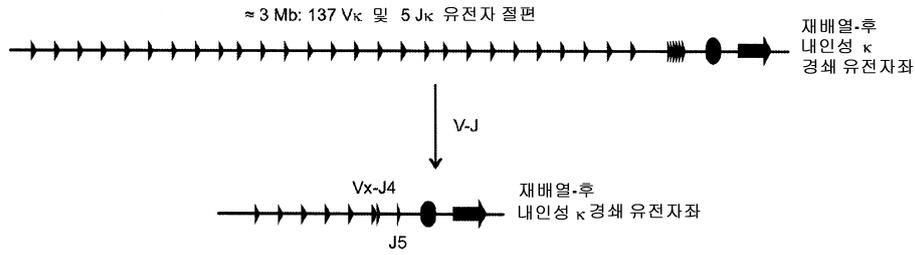
도면17



도면18



도면19



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> BABB, Robert
 MCWHIRTER, John
 MACDONALD, Lynn
 STEVENS, Sean
 DAVIS, Samuel
 BUCKLER, David R.
 HOSIAWA, Karolina A.
 MURPHY, Andrew J.

 - <120> Mice Expressing A Limited Immunoglobulin Light Chain Repertoire
 - <130> 2010794-0550
 - <150> 13/798,455
 - <151> 2013-03-13
 - <160> 49
 - <170> PatentIn version 3.5
 - <210> 1
 - <211> 3155
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Synthetic

 - <400> 1
- ```

ggcgcgccgt agctttgaat tttaaacatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60
tttaaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac 120
atgatagaag tgtagcataa atctatgaaa aattccatct ccctgtgect acaacaacta 180
cctgggattg aaaacttctt cccttgcctt agtcctttct tctacaccta cttccacatc 240

```

atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatcccgg aaagagcaaa aaagacttcc 300  
 ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360  
 gaggaagagc agagcttgta aatctttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420  
  
 acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt 480  
 tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540  
 aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600  
 gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tatacccagc 660  
 atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720  
 attgtattgt attttctct tatatcatct tcttcttctg tcattaaaaa aaaaccgttc 780  
 aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atatcttatt tcataacaca 840  
  
 ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtctc attccaagg taacaagcct 900  
 gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggt agcttttctt tattgtcctg 960  
 gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020  
 gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacatttga taatggatga tgagaattaa 1080  
 tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtactttagc acagattaag 1140  
 accaatcat taggatttaa agagtttgtg agagttagtg aaggaaaagc cttagaatta 1200  
 aatttggctg cggataaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260  
  
 agtatatta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata ttaataaat aaaacaaaa 1320  
 ttaattgccg catacataat gtcctgaata ctattgtaa tgtttatct tatttcttt 1380  
 aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440  
 accgagacac agggaagtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500  
 catctatgtc agggctgcca ggacatgta ctgtaaacag aagttttca ctttttaact 1560  
 caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620  
 caagcaaatg aaaggtgtat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680  
  
 tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaaa 1740  
 acacagcttt ttatattgtt cttaacaggc ttgtgcaaaa catcttctgg gtggatttag 1800  
 gtgatgagg agaagaaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctca 1860  
 caticagact gageccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920  
 gtgcagagag gaagaagcag gtggtctttg cagctgaaag ctcagctgat ttgcatatgg 1980  
 agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040

ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100

gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160

ccatgcctct ctgttcttga tcactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtttcc 2220

ccagtcacct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280

aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340

atcattccag gtgccagatg tgacatccag atgaccagc ctccatcctc cctgtctgca 2400

tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cgggcaagtc agagcattag cagctattta 2460

aattggatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc tgatctatgc tgcacccagt 2520

ttgcaaagt gggtcccatc aaggttcagt ggcatggat ctgggacaga tttcactctc 2580

accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt gcaacttact actgtcaaca gagttacagt 2640

accctccga tcaccttcgg ccaagggaca cgactggaga ttaaacgtaa gtaatttttc 2700

actattgtct tctgaaattt gggtctgatg gccagtattg acttttagag gcttaaatag 2760

gagtttgta aagattgta aatgagggca ttttaagattt gccatgggtt gcaaaagtta 2820

aactcagctt caaaaatgga tttggagaaa aaaagattaa attgctctaa actgaatgac 2880

acaaagtaaa aaaaaaagt gtaactaaaa aggaaccctt gtatttctaa ggagcaaaag 2940

taaatttatt tttgttact cttgccaat attgtattgg ttgttgctga ttatgcatga 3000

tacagaaaag tggaaaaata cattttttag tctttctccc tttgtttga taaattattt 3060

tgtcagacaa caataaaaat caatagcacg ccctaagatc tagatgcatg ctcgagtgcc 3120

atttcattac ctctttctcc gcacccgaca tagat 3155

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

aggtgagggt acagataagt gttatgag 28

<210> 3

<211> 27

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3  
 tgacaaatgc cctaattata gtgatca 27  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 4  
 gggcaagtca gagcattagc a 21  
 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 5  
 tgcaaactgg atgcagcata g 21  
 <210> 6  
  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 6  
 ggtggagagg ctattcggc 19  
 <210> 7  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 7  
 gaacacggcg gcatcag 17  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic  
 <400> 8  
 tgggcacaac agacaatcgg ctg 23

<210> 9  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 9  
 ccattatgat gctccatgcc tctctgttc 29

<210> 10  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 10  
 atcagcagaa accagggaaa gccctt 26

<210> 11  
 <211> 3166  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 11  
 ggcgcccggt agctttgaat tttaaacatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc 60

tttaaaataa tgtaatgttt cttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctcccaac 120  
 atgatagaag tntagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgect acaacaacta 180  
 cctgggattg aaaacttctt cccttgcctt agtcctttct tctacaccta ctccacatc 240  
 atctgtgact caaacaata cttgtcagga aagatcccgg aaagagcaaa aaagacttcc 300  
 ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat 360  
 gaggaagagc agagcttcta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca 420  
 acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggett 480

tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca 540

aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag 600  
 gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tataaccagc 660  
 atatgtctaa tatatatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct 720  
 attgtattgt attttctct tataatcatct tcttcttctg tcattaaaa aaaaccgttc 780  
 aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca 840  
 ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtcttc attccaagg taacaagcct 900  
  
 gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggt agcttttctt tattgtcctg 960  
 gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca 1020  
 gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa 1080  
 tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtactttagc acagattaag 1140  
 accaatcat taggatttaa agagtttgtt agagtttagt aaggaaaagc cttagaatta 1200  
 aatttggctg cggataaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta 1260  
 agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata ttaataaat aaaaacaaaa 1320  
  
 ttaattgccg catacataat gtctgaata ctattgtaa tgtttatct tatttctttt 1380  
 aaactgtcta cagcactata aggtaggtag cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440  
 accgagacac agggaagtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500  
 catctatgtc agggctgccca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560  
 caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620  
 caagcaaatg aaagggtgat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680  
 tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaaa 1740  
  
 acacagcttt ttatatgtt cttaacaggc ttgtgccaaa catcttctgg gtggatttag 1800  
 gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagttcta 1860  
 cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920  
 gtgcagagag gaagaagcag gtggtccttg cagctgaaag ctgagctgat ttgcatatgg 1980  
 agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040  
 ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100  
 gggttccagg tgaggggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160  
  
 ccatgccctc ctgttcttga tcactataat tagggcattt gtcactgggt ttaagtttcc 2220  
 ccagtccct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280  
 aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340  
 atcattccag gtgccagatg tataaccacc gagaaattgt gttgacgcag tctccaggca 2400

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ccctgtcttt gtctccagg gaaagagcca ccctctctg cagggccagt cagagtgtta   | 2460 |
| gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct  | 2520 |
| atggtgcatc cagcagggcc actggcatcc cagacagtt cagtggcagt gggctctggga | 2580 |
|                                                                   |      |
| cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttcagtg tattactgtc  | 2640 |
| agcagtatgg tagctcacct tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaacgta | 2700 |
| agtaattttt cactattgtc ttctgaaatt tgggtctgat ggccagtatt gacttttaga | 2760 |
| ggcttaaata ggagtttgg aaagattggt aatgagggc atttaagatt tgccatgggt   | 2820 |
| tgcaaaagt aaactcagct tcaaaaatgg atttgagaa aaaaagatta aattgctcta   | 2880 |
| aactgaatga cacaaagtaa aaaaaaaaa tgtaactaaa aaggaacct tgtatttcta   | 2940 |
| aggagcaaaa gtaaatat tttgttcac tcttgccaaa tattgtattg gttgttctg     | 3000 |
|                                                                   |      |
| attatgcatg atacagaaaa gtggaaaaat acatTTTTTA gtctttctcc cttttgttg  | 3060 |
| ataaattatt ttgtcagaca acaataaaaa tcaatagcac gccctaagat ctatgcat   | 3120 |
| gctcagtgct catttcatta cctctttctc cgcacccgac atagat                | 3166 |
| <210> 12                                                          |      |
| <211> 19                                                          |      |
| <212> DNA                                                         |      |
| <213> Artificial Sequence                                         |      |
| <220><223> Synthetic                                              |      |
| <400> 12                                                          |      |
| tccaggcacc ctgtctttg                                              | 19   |
| <210> 13                                                          |      |
| <211> 26                                                          |      |
| <212> DNA                                                         |      |
| <213> Artificial Sequence                                         |      |
| <220><223> Synthetic                                              |      |
| <400> 13                                                          |      |
| aagtagctgc tgctaacct ctgact                                       | 26   |
|                                                                   |      |
| <210> 14                                                          |      |
| <211> 24                                                          |      |
| <212> DNA                                                         |      |
| <213> Artificial Sequence                                         |      |
| <220><223> Synthetic                                              |      |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| <400> 14                                                           |      |
| aaagagccac cctctcctgc aggg                                         | 24   |
| <210> 15                                                           |      |
| <211> 3187                                                         |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> Artificial Sequence                                          |      |
| <220><223> Synthetic                                               |      |
| <400> 15                                                           |      |
| ggcgcgccgt agctttgaat tttaaacatc tatttgacaa gaaatgcata gttccttctc  | 60   |
| tttaaataa tgtaatgttt ctttcaagaa taagcttggg ttgatgcctc tctccccaac   | 120  |
| atgatagaag tgtagcataa atctatgaaa aattccattt ccctgtgcct acaacaacta  | 180  |
| <br>                                                               |      |
| cctgggattg aaaacttctt cccttgctct agtcctttct tctacaccta cttccacatc  | 240  |
| atctgtgact caaaacaata cttgtcagga aagatcccgg aaagagcaaa aaagacttcc  | 300  |
| ttagagggtg cagagattcc tatgccacta tctgtcatct ctagaagggg ttgtgagtat  | 360  |
| gaggaagagc agagcttcta aattttctac ttgctttgac ttccactgta tttcctaaca  | 420  |
| acaacaacca cagcaacacc cataacatca caggacaaac ttctagtact tccaaggctt  | 480  |
| tagtctcagt aaatcttctc tacctccatc acagcagcta gaaggtttga tactcataca  | 540  |
| aatagtactg tagctttctg ttcataattg gaaaaataga caagacccaa tgtaatacag  | 600  |
| <br>                                                               |      |
| gctttccttc agccagttag cgttcagttt ttggatcacc attgcacaca tatacccagc  | 660  |
| atatgtctaa tataatgta gaaatccgtg aagcaagagt tataatagct tgtgttttct   | 720  |
| attgtattgt attttctct tataatcatc tcttcttctg tcattaaaa aaaaccgttc    | 780  |
| aagtaggtct aaattaatta ttggatcata agtagataaa atattttatt tcataacaca  | 840  |
| ttgacccgat gaatatgttt ctttgccaga catagtctc atttccaagg taacaagcct   | 900  |
| gaaaaaatta tactggagca agtcaacagg taatgatggg agcttttctt tattgtcctg  | 960  |
| gggcaagaat aagacaaaag ataacagggt agaataaaga ttgtgtaaga aagaaggaca  | 1020 |
| <br>                                                               |      |
| gcaacaggac atgggaacct tttatagagt aacattttga taatggatga tgagaattaa  | 1080 |
| tgagttagac agggatgggt gggaatgatt gaagggtgta gtactttagc acagattaag  | 1140 |
| accaaactcat taggatttaa agagtttgtg agagtttagt aaggaaaagc cttagaatta | 1200 |
| aatttggctg cggataaac attcttggat tagactgaag actcttttct gtgctaagta   | 1260 |
| agtatattta tgataatgat gatgactgta gtgctgaata tttataaat aaaaacaaaa   | 1320 |
| ttaattgccg catacataat gtctgaata ctattgtaa tgttttatct tatttccttt    | 1380 |

aaactgtcta cagcactata aggtaggtac cagtattgtc acagttacac agatatggaa 1440  
  
 accgagacac agggaagtta agttacttga tcaatttcaa gcaatcggca agccatggag 1500  
 catctatgtc agggctgcca ggacatgtga ctgtaaacag aagtttttca ctttttaact 1560  
 caaagagggt atgtggctgg gttaatggaa agcttcagga ccctcagaaa acattactaa 1620  
 caagcaaatg aaaggtgtat ctggaagatt aagttttaac agactcttca tttccatcga 1680  
 tccaataatg cacttaggga gatgactggg catattgagg ataggaagag agaagtgaaa 1740  
 acacagcttt ttatattgtt cttaacaggc ttgtgcaaaa catcttctgg gtggatttag 1800  
 gtgattgagg agaagaaaga cacaggagcg aaattctctg agcacaaggg aggagtctca 1860  
  
 cactcagact gagccaacag acttttctgg cctgacaacc agggcggcgc aggatgctca 1920  
 gtgcagagag gaagaagcag gtggtctttg cagctgaaag ctcagctgat ttgcatatgg 1980  
 agtcattata caacatccca gaattcttta agggcagctg ccaggaagct aagaagcatc 2040  
 ctctcttcta gctctcagag atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct 2100  
 gggttccagg tgagggtaca gataagtgtt atgagcaacc tctgtggcca ttatgatgct 2160  
 ccatgctct ctgttcttga tcaactataat tagggcattt gtcactggtt ttaagtttcc 2220  
 ccagtccct gaattttcca ttttctcaga gtgatgtcca aaattattct taaaaattta 2280  
  
 aatgaaaagg tcctctgctg tgaaggcttt taaagatata taaaaataat ctttgtgttt 2340  
 atcattccag gtgccagatg tgttgtggtc ctcagccggt gctgcatcag ccgccggcca 2400  
 tgtctcggc ccttggaaacc acaatccgcc tcactgcac cctgaggaac gaccatgaca 2460  
 tcggtgtgta cagcgtctac tggtagcagc agaggccggg ccacccctcc aggttctctg 2520  
 tgagatattt ctcacaatca gacaagagcc agggccccca ggtccccct cgttctctg 2580  
 gatccaaaga tgtggccagg aacaggggggt atttgagcat ctctgagctg cagcctgagg 2640  
 acgaggctat gtattactgt gctatgcata actcagtgac gcatgtgttt ggcagcggga 2700  
  
 cccagctcac cgttttaagt aagtaatttt tcaactattgt cttctgaaat ttgggtctga 2760  
 tggccagtat tgacttttag aggcctaaat aggagttagg taaagattgg taaatgaggg 2820  
 catttaagat ttgccatggg ttgcaaaagt taaactcagc ttcaaaaatg gatttggaga 2880  
 aaaaaagatt aaattgctct aaactgaatg acacaaagta aaaaaaaaa gtgtaactaa 2940  
 aaaggaacce ttgtatttct aaggagcaaa agtaaattta tttttgttca ctcttgccaa 3000  
 atattgtatt ggttgttct gattatgcat gatacagaaa agtggaaaaa tacatttttt 3060  
 agtctttctc ccttttgttt gataaattat tttgtcagac aacaataaaa atcaatagca 3120

cgccctaaga tctagatgca tgctcgagtg ccatttcatt acctctttct cgcacccga 3180  
 catagat 3187  
 <210> 16  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 16  
 tgtcctcggc ccttgga 17  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 17  
 ccgatgtcat ggtcgttct 20  
 <  
 210> 18  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 18  
 acaatcggcc tcacctgcac cct 23  
 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 19  
 agcagtctgc aacctgaaga ttt 23  
 <210> 20  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic  
 <400> 20  
 gtttaatctc cagtcgtgtc cctt 24

<210> 21  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 21  
 cctccgatca ccttc 15

<210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 22  
 aaaccaggga aagcccctaa 20

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 23  
 atgggacccc actttgca 18

<210> 24  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 24  
 ctctgatct atgctgcat 19

<210> 25  
 <211> 21

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 25  
 cagcagactg gagcctgaag a 21  
 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 26  
 tgatttcac cttggtcct t 21  
  
 <210> 27  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 27  
 tagctcacct tggacgtt 18  
 <210> 28  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 28  
 ctctcatct atggtgcatc ca 22  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 29  
 gaccactgc cactgaacct 20

<210> 30  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 30  
 ccactggcat ccc 13  
 <210> 31  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 31  
 tgagcagcac cctcacgtt 19  
 <210> 32  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 32  
 gtgcctcac aggtatagct gtt 23  
  
 <210> 33  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 33  
 accaaggacg agtatgaa 18  
 <210> 34  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> synthetic  
 <400> 34

aagaagcaca cgactgaggc ac 22

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 35

ctcactggat ggtgggaaga tgga 24

<210> 36

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 36

gtaaacgac ggccag 16

<210> 37

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 37

caggaacag ctatgac 17

<210> 38

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile



115 120

<210> 40

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala  
 100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120

<210> 41

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 41

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120

<210> 42

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45  
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala

100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120

<210> 43

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 43

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Phe Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala

100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120

<210> 44

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 44

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

                  20                    25                    30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg His Leu

                  35                    40                    45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

                  50                    55                    60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Asp

65                    70                    75                    80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

                  85                    90                    95  
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala

                  100                    105                    110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

                  115                    120

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 45

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                   20                    25                    30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

                  35                    40                    45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

                  50                    55                    60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu



<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 47

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20                    25                    30

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35                    40                    45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50                    55                    60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65                    70                    75                    80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85                    90                    95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala

100                    105                    110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115                    120

<210> 48

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20                    25                    30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35                    40                    45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

