



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0110577  
(43) 공개일자 2024년07월15일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A01K 67/0275 (2024.01) C07K 16/46 (2006.01)<br/>C12N 15/85 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A01K 67/0275 (2024.01)<br/>C07K 16/462 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7016792<br/>(22) 출원일자(국제) 2022년11월09일<br/>심사청구일자 없음<br/>(85) 번역문제출일자 2024년05월21일<br/>(86) 국제출원번호 PCT/US2022/079533<br/>(87) 국제공개번호 WO 2023/086815<br/>국제공개일자 2023년05월19일<br/>(30) 우선권주장<br/>63/263,855 2021년11월10일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>트리아니, 인코포레이티드<br/>미국, 텔라웨어 19801, 윌밍턴, 1209 오렌지 스트리트</p> <p>(72) 발명자<br/>버로우즈, 피터<br/>미국, 35222 알라바마, 버밍햄, 린우드 드라이브 4512<br/>필러, 베르너<br/>독일, 50931 쾰른, 우오엔삼스트라쎄 9<br/>와블, 마티아스<br/>미국, 94122 캘리포니아, 샌 프란시스코, 피프스 애비뉴 1515</p> <p>(74) 대리인<br/>황이남</p> |
|---|---|

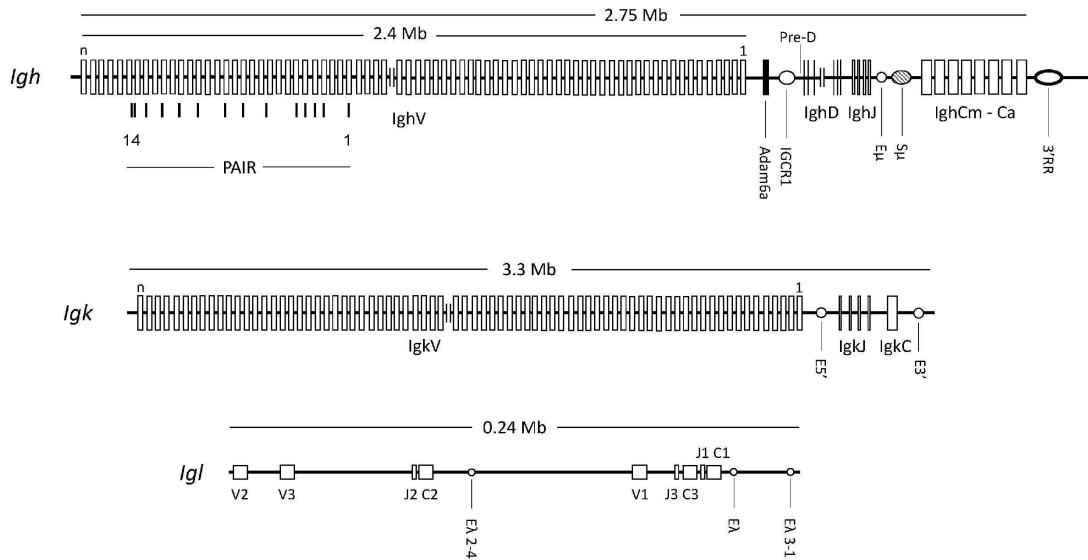
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 유전자이식 포유동물 및 이의 사용 방법

(57) 요약

치료용 고양이 항체를 개발하기 위해 고양이 가변 도메인을 가지는 면역글로불린을 발현하는 유전자이식 설치류를 포함하여, 고양이 가변 도메인을 가지는 면역글로불린을 발현하는 유전자이식 포유동물이 본원에 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 15/8509** (2013.01)

**C12N 5/163** (2013.01)

A01K 2217/072 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/01 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C12N 2015/8518 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

내인성 설치류 면역글로불린 가변 유전자 좌위가 결실되고, 고양이 면역글로불린 가변 유전자 암호화 서열과, 상기 내인성 설치류 면역글로불린 가변 유전자 좌위를 기반으로 한 비암호화 조절 서열을 포함하는 유전자좌로서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌로 치환된 게놈을 가지는 유전자이식 설치류로서, 상기 유전자이식 설치류의 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 기능성이고, 고양이 가변 도메인 및 설치류 불변 도메인을 포함하는 면역글로불린 사슬을 발현하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열을 포함하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이 카파  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열, 고양이 람다  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열 또는 이의 조합을 포함하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$ , 고양이 카파  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열, 고양이 람다  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열 또는 이의 조합을 포함하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류는 마우스인, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비암호화 조절 서열은 개별 V 유전자 분절에 선행하는 프로모터, 스플라이싱 부위, 그리고 V(D)J 재조합을 위한 재조합 신호 서열을 포함하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 ADAM6 유전자를 추가로 포함하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 Pax-5 활성화 유전자간 반복(PAIR) 요소를 추가로 포함하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 중쇄 유전자간 제어 영역 1로부터 유래하는 CTCF 결합 부위를 추가로 포함하는, 유전자이식 설치류.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 의한 유전자이식 설치류로부터 유래한 B 림프구 계통의 세포.

#### 청구항 11

제10항에 의한 B 림프구 계통의 세포로부터 유래한 하이브리도마 세포.

**청구항 12**

제10항에 의한 B 림프구 계통의 세포로부터 유래한 무한증식성 세포.

**청구항 13**

제10항에 의한 B 림프구 계통의 세포, 제11항에 의한 하이브리도마 또는 제12항에 의한 무한증식성 세포로부터 유래한 설치류 불변 도메인 및 고양이 가변 도메인을 포함하는 전체 면역글로불린 분자 또는 이의 일부.

**청구항 14**

제1항에 의한 유전자이식 설치류를 제조하기 위한 방법으로서, 이 방법은

- a) 설치류 세포 계능에, 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위의 상류 부위 특이적 재조합효소에 대한 표적 부위 적어도 1개와, 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위의 하류 부위 특이적 재조합효소에 대한 표적 부위 적어도 1개를 통합하는 단계로서, 상기 내인성 면역글로불린 가변 유전자좌는 (i)  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절, (ii)  $V_K$  및  $J_K$  유전자 분절, (iii)  $V_\lambda$  및  $J_\lambda$  유전자 분절; 또는 (iv)  $V_\lambda$  및  $J_\lambda$  유전자 분절과  $C_\lambda$  유전자를 포함하는 단계;
- b) 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절을 포함하는, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각은 고양이 면역글로불린 가변 영역 유전자 암호화 서열 및 설치류 비암호화 조절 서열을 포함하되, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위에는 부위 특이적 재조합효소에 대한 표적 부위들이 축적하고, 상기 표적 부위는 단계 a)에서 설치류 세포에 도입된 표적 부위와 재조합할 수 있는 것인 단계;
- c) 상기 세포에, 단계 b)의 벡터 및 상기 표적 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 도입하는 단계;
- d) 재조합 이벤트가 상기 세포의 계능과 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌 사이에서 발생하도록 허용하고, 그 결과 상기 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위의 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌로의 치환을 진행시키는 단계;
- e) 단계 d)에서 생성된, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 가변 유전자좌를 포함하는 세포를 선택하는 단계; 및
- f) 상기 세포를 이용하여, 상기 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 가변 유전자좌를 포함하는 유전자이식 설치류를 제조하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 세포는 설치류 배 줄기(ES) 세포인 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 세포는 마우스 배 줄기(ES) 세포인 방법.

**청구항 17**

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 도입 단계 이후 및 상기 제공 단계 이전에, 표적 부위 제1 세트를 인지하는 재조합효소를 도입함으로써 상기 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위를 결실시키는 단계로서, 상기 결실 단계는 서로 재조합할 수 없는 설치류 세포의 계능내에 적어도 2개의 표적 부위를 제자리에 남겨 두는 것인 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 18**

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열을 포함하는 방법.

**청구항 19**

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는  $\kappa$  또는  $\lambda$   $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함하는 방법.

**청구항 20**

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 내인성 숙주 기원의 재조합 부위 서열, 스플라이싱 부위 및 V 유전자 프로모터를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 21**

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 ADAM6 유전자를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 22**

제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 Pax-5 활성화 유전자간 반복 요소를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 23**

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 중쇄 유전자간 제어 영역 1로부터 유래한 CTCF 결합 부위를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 24**

치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 방법으로서, 본 방법은

(i) 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류의 항체 제조 세포로부터 클로닝된 고양이 가변 도메인을 가지는 항체를 발현시키는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 고양이 V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열 및 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열을 포함하는 것인 단계; 그리고

(ii) 고양이 가변 도메인을 가지는 항체를 단리하는 단계로서, 상기 항체는 치료 또는 진단의 용도로서 적합한 것인 단계

를 포함하는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 상기 항체는 상기 유전자이식 설치류의 B 세포로부터 클로닝된 방법.

**청구항 26**

제24항 또는 제25항에 의한 방법에 의해 제조된 치료용 또는 진단용 항체.

**청구항 27**

고양이 가변 도메인을 가지는 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 방법으로서, 본 방법은

(i) 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류의 항체 제조 세포에 의해 발현된 항체의 고양이 가변 도메인을 클로닝하는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 고양이

V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열 및 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열을 포함하는 것인 단계; 그리고

(ii) 상기 유전자이식 설치류에 의해 발현된 항체의 상기 고양이 가변 도메인을 포함하는 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 단계

를 포함하는 방법.

### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 고양이 가변 도메인은 상기 유전자이식 설치류로부터 유래한 B 세포에 의해 발현된 항체로부터 크로닝되는 방법.

### 청구항 29

제27항 또는 제28항에 의한 방법에 의해 제조된 치료용 또는 진단용 항체.

### 청구항 30

고양이 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체를 제조하는 방법으로서, 본 방법은

(i) 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자와 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류로부터 B 세포를 제공하는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열에 내포된 고양이 V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열을 포함하는 것인 단계;

(ii) 상기 B 세포를 무한증식시키는 단계; 그리고

(iii) 상기 무한증식 B 세포에 의해 발현되는 고양이 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이 항체를 암호화하는 유전자를 단리하는 단계.

를 포함하는 방법.

### 청구항 31

제30항에 있어서,

(iv) 상기 B 세포에 의해 발현된 상기 고양이 가변 도메인을 클로닝하는 단계; 그리고

(v) 상기 유전자이식 설치류의 B 세포로부터 클로닝된 상기 고양이 가변 도메인을 포함하는 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 32

고양이 가변 도메인을 포함하는 항체를 제조하는 방법으로서, 본 방법은 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류를 제공하는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열에 내포된 고양이 V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열을 포함하고, 이 유전자이식 설치류의 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이 가변 도메인을 포함하는 항체를 발현하는 것인 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 유전자이식 설치류에 의해 발현되는 고양이 가변 영역을 포함하는 항체, 또는 상기 항체

를 암호화하는 유전자를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 34**

제32항에 있어서,

- (i) 상기 표적 항원에 특이적인 항체를 발현하는 상기 유전자이식 설치류로부터 B 세포를 수득하는 단계;
- (ii) 상기 B 세포를 무한증식시키는 단계; 및
- (iii) 상기 무한증식 B 세포로부터 표적 항원에 특이적인 항체를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 상기 특정 항원에 특이적인 상기 B 세포로부터 고양이 가변 영역을 클로닝하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 B 세포로부터 클로닝된 상기 고양이 가변 영역을 사용하여 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 37**

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 의한 방법에 의해 제조된 치료용 또는 진단용 항체.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 면역글로불린 분자를 제조하는 방법, 예컨대 고양이 모노클로날 항체의 생성을 위해 항원 특이적 항체 분비 세포를 제조할 수 있는 유전자이식 포유동물을 제조하기 위한 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 이하 논의에서는 임의의 목적물 및 방법이 배경 및 소개 목적으로 기재된다. 본원에 포함된 어떠한 내용도 선행 기술을 '자인'하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 출원인은 적절한 경우 본원에 언급된 목적물과 방법이 관련 법령 조항에 따라 선행 기술을 구성하지 않는다는 점을 명백히 입증할 권리를 보유한다.

[0003] 항체는 (i) 다양한 분자 형태의 항원을 표적화할 수 있는 정교한 결합 특성을 나타내고, (ii) 치료된 인간과 동물에서 잘 관용되도록 만드는, 바람직한 약동학적 특성을 가지는 생리학적 분자이며, (iii) 자연적으로 감염원을 차단하는 강력한 면역학적 특성과 연관되어 있는 관계로, 중요한 생물학적 약제로서 급부상하고 있다. 더욱이 체내에 원래 존재하지 않던 사실상 모든 외래 물질에 대해 특이적 항체 반응을 용이하게 일으킬 수 있는 실험실 동물로부터 항체를 신속하게 분리하기 위한 것으로서 확립된 기술이 존재한다.

[0004] 항체는 그 자체로서 가장 기본적인 형태를 가질 때, 각각 동일한 경쇄(L)와 쌍을 형성하는 2개의 동일한 중쇄(H)를 포함한다. H 및 L 사슬 둘 다의 N-말단은 쌍을 형성한 H-L 사슬에 독특한 항원 결합 특이성을 함께 제공하는 가변 도메인(각각  $V_H$  및  $V_L$ )을 포함한다.

[0005] 항체  $V_H$  및  $V_L$  도메인을 암호화하는 엑손은 생식계열 DNA에는 존재하지 않는다. 그 대신, 각각의  $V_H$  엑손은 면역글로불린 H 사슬 유전자좌에 존재하는  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절로서, 무작위로 선택된 것들의 재조합에 의해 생성되고; 마찬가지로 개별  $V_L$  엑손은 경쇄 유전자좌에서 무작위로 선택된  $V_L$  및  $J_L$  유전자 분절의 염색체 재배열에 의해 생성된다.

[0006] 포유동물에서, 개놈은 통상적으로 H 사슬을 발현할 수 있는 2개의 대립유전자, 카파( $\kappa$ ) L 사슬을 발현할 수 있는 2개의 대립유전자, 그리고 람다( $\lambda$ ) L 사슬을 발현할 수 있는 2개의 대립유전자(각각의 대립유전자는 부모로부터 유래함)를 포함한다. 면역글로불린 H 사슬 유전자좌에는 다수의  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절이 존재할뿐 아니라

면역글로불린  $\kappa$  (IGK) 및 면역글로불린  $\lambda$  (IGL) L 사슬 유전자좌 둘 다에는 다수의  $V_L$  및  $J_L$  유전자 분절이 존재한다(Collins and Watson (2018) Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements, Receptor Editing and the Development of a Self-Tolerant Antibody Repertoire. Front. Immunol. 9:2249. (doi: 10.3389/fimmu.2018.02249)).

- [0007] 중쇄 유전자좌에는 상이한 항체 군(아이소타입)의 발현을 위한 엑손도 또한 존재한다. 예를 들어 고양이과 동물에서 암호화되는 아이소타입은 IgM, IgD, IgG1a, IgG2, IgE 및 IgA2이다.
- [0008] B 세포 발달 동안, 유전자 재배열은 H 사슬 가변 유전자 분절을 함유하는 2 개의 상동 염색체중 하나에서 먼저 발생한다. 전구 B 세포에 있어 생성된  $V_H$  엑손은 이후 IgM H 사슬( $\mu$ H 사슬) 발현을 위해 RNA 수준에서  $C_H$  엑손에 스플라이싱(splicing)된다. 전구 B 세포에 의해 합성된 대부분의  $\mu$ H 사슬은 소포체(ER)에 유지되고,  $\mu$ H 사슬의 부분적으로 언폴딩(unfolding)된  $C_H1$  도메인과 상주하는 ER 샤페론 BiP 사이의 비공유 상호작용으로 말미암아 결국에는 분해된다(Haas and Wabl, Nature, 306:387-9, 1983; Bole et al., J Cell Biol. 102:1558, 1986). 그러나  $\mu$ H 사슬의 작은 분획은 비가변적  $\lambda 5$  및 V 전구 B 단백질을 포함하는 대리 경쇄 복합체와 결합된다. 이러한 결합은 BiP를 치환하고,  $\mu$ H 사슬/ $\lambda 5$ /V 전구 B 복합체가 Ig  $\alpha/\beta$  신호전달 분자 이중이량체와 함께 전구 B 세포 수용체(전구BCR)로서 ER을 탈출하고, 분비 경로를 통해 원형질막으로 수송될 수 있도록 허용한다.
- [0009] 이어서,  $V_L$ - $J_L$  재배열은 기능성 L 사슬이 생성될 때까지 한 번에 1개의 L 사슬 대립유전자에서 일어나고, 그 후 L 사슬 폴리펩티드는 IgM H 사슬 동중이량체와 결합하고, 그 결과 미성숙 B 세포 표면에 발현되는 수용체로서, 완전히 기능성인 항원 특이적 B 세포 수용체(BCR)가 생성될 수 있게 된다.
- [0010] 미성숙 B 세포는 2차 림프 기관으로 이동하고, 여기에서 동족 항원에 반응하고 항체 분비 형질세포 및 기억 B 세포로 분화할 수 있는 성숙 B 세포로 분화한다. B 세포는 T 세포의 도움으로 아이소타입 스위칭을 진행하고, 그 결과 IgM으로부터 IgG, IgA 또는 IgE로의 항체 아이소타입 변경뿐 아니라  $V_H$  및  $V_L$  도메인의 아미노산 서열을 변경할 수 있는 체세포 과다돌연변이가 일어날 수 있다. 이러한 돌연변이는  $V_H$  및  $V_L$  엑손에 무작위로 도입되지만, 면역화 항원에 대한 친화성이 더 큰 B 세포는 더 많은 항원을 흡수하여 처리하고, 이를 T 여포 보조 세포에 제시할 수 있으므로, 면역화 항원에 대한 친화성이 더 작거나 아예 없는 B 세포에 비해 우선적으로 활성화된다. 결과적으로, 체세포 돌연변이는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3에 빈발하는데, 그 이유는 이것들이 항원과 상호작용하는  $V_H$  및  $V_L$  도메인의 영역이기 때문이다.
- [0011] 다양한 마우스 면역글로불린을 암호화하는 유전자가 광범위하게 특성규명되었다. 예를 들어, Blankenstein과 Krawinkel은 문헌(Eur. J. Immunol., 17:1351-1357(1987))에 마우스 가변 중쇄 영역을 기재하였다. 고양이 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 대한 정보는 적은 반면, 림프성 악성종양 및 바이러스에 대한 반응에 관한 연구에는 몇몇  $V_H$  도메인 서열이 포함되어 있다[예를 들어 Rout et al., Vet. Clin. Pat. 45:48 Suppl. 1 (2019) and Lu et al. Scientific Reports 7:12713 (2017)]. Lu의 다수는 또한 고양이 IgG1a, IgG2 및 IgA 서열을 특성규명하였다. 고양이 카파 및 람다 LC 유전자좌는 광범위하게 특성규명되었으며, IMGT(International ImMunoGeneTics) 정보 시스템에 완전하게 주석이 달려있다.
- [0012] 유전자이식 동물, 예컨대 가변적 면역글로불린 유전자좌를 가지는 마우스의 제조는 다양한 연구 및 개발 응용 분야, 예를 들어 약물 발견 및 다양한 생물학적 시스템에 대한 기초 연구에서 이러한 유전자이식 동물의 사용을 허용하였다. 예를 들어 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 유전자이식 마우스의 제조는 국제특허 출원 공개 공보 WO 90/10077 및 WO 90/04036에 기재되어 있다. WO 90/04036에는 인간 면역글로불린 "미니" 유전자좌가 통합된 유전자이식 마우스가 기재되어 있다. WO 90/10077에는 유전자이식 동물을 제조하는데 사용하기 위한 면역글로불린 우세 제어 영역 함유 벡터가 기재되어 있다.
- [0013] 약물 발견을 목적으로 하는 부분적 또는 전체 인간 항체를 생성하기 위해 마우스 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를, 예를 들어 인간 면역글로불린 서열로 변형시키기 위한 방법이 다수 개발되었다. 이러한 마우스의 예는, 예를 들어 미국 특허 제7,145,056호; 동 제7,064,244호; 동 제7,041,871호; 동 제6,673,986호; 동 제6,596,541호; 동 제6,570,061호; 동 제6,162,963호; 동 제6,130,364호; 동 제6,091,001호; 동 제6,023,010호; 동 제5,593,598호; 동 제5,877,397호; 동 제5,874,299호; 동 제5,814,318호; 동 제5,789,650호; 동 제5,661,016호; 동 제5,612,205; 및 동 제5,591,669호에 기재된 것들을 포함한다.

[0014] 약물로서 기능하는 항체의 사용은 인간 질환의 예방 또는 치료에만 국한되지 않는다. 고양이와 같은 가축은 인간의 질병과 유사한 질병, 예를 들어 암, 아토피성 피부염, 만성 통증 등을 앓는다. 신경 성장 인자를 표적으로 하는 모노클로날 항체(베딘베트맵(bedinvetmab))는 이미 고양이의 골관절염 치료를 위해 수의학분야에서 사용되고 있지만, 암이나 아토피성 피부염 치료용으로 승인된 것은 아직 없다. 그러나 임상적으로 사용되기 전에 마우스에서 만들어진 모노클로날 항체는 고양이화(felination)되어야 하는데, 즉 수용체 고양이의 불리한 면역 반응을 방지하기 위해 이 모노클로날 항체의 아미노산 서열은 마우스의 것으로부터 고양이의 것으로 변경되어야 했다.

**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

[0015] 이 '과제의 해결수단'은 이하 '발명을 실시하기 위한 구체적 설명'에 추가로 기재되는, 단순화된 형태의 개념에 대한 선택을 소개하기 위해 제공된다. 이 '과제의 해결수단'은 청구된 특허청구대상의 핵심적이거나 필수적인 특징을 확인하고자 하는 것은 아니며, 청구된 특허청구대상의 범위를 제한하는데 사용하고자 하는 의도도 없다. 청구된 특허청구대상의 기타 특징, 세부사항, 유용성 및 이점은 첨부 도면에 도시되어 있고, 첨부된 특허청구의 범위에 한정된 측면들을 포함하여 이하의 '발명을 실시하기 위한 구체적 설명'으로부터 명료해질 것이다.

[0016] 고양이 면역글로불린 가변 영역을 가지는 마우스 항체를 제조하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일 측면에서, 유전자이식 포유동물 또는 시험관내 세포 배양액에서 생성될 수 있는 항체로서, 고양이 가변 영역을 가지는 항체가 제공된다.

[0017] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 게놈을 가지는 것으로서, 고양이 아님 포유동물의 세포 또는 고양이가 아님 포유동물이 제공된다. 일 측면에서, 이중 유전자좌는 고양이 면역글로불린 가변 영역 유전자의 암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주의 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 기반으로 한 비암호화 서열이 포함된다. 일 측면에서, 고양이가 아님 포유동물 세포 또는 포유동물은 고양이 중쇄(H) 및 경쇄(L) 가변 영역과, 고양이가 아님 포유동물 숙주 세포 또는 포유동물에 내인성인 불변 영역을 포함하는 항체 또는 키메라 B 세포 수용체(BCR)를 발현할 수 있다. 일 측면에서, 유전자이식 포유동물 숙주 세포 또는 포유동물은 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위의 일부 또는 전부가 제거된 게놈을 가진다.

[0018] 고양이가 아님 포유동물 숙주에서 키메라 고양이 모노클로날 항체를 제조하기 위해, 숙주 게놈은 키메라 고양이 면역글로불린 H 또는 L 사슬을 발현하는 유전자좌를 적어도 1개 가져야 한다. 일 측면에서, 숙주 게놈은 각각 키메라 고양이 면역글로불린 H 및 L 사슬을 발현하는 1개의 중쇄 유전자좌 및 2개의 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0019] 몇몇 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_H$  암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주의 내인성  $V_H$  유전자 좌위에 존재하는 비암호화 서열을 포함한다. 몇몇 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_H$  암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주의 내인성  $V_H$  유전자 좌위에 존재하는 비암호화 조절 또는 스캐폴드(scaffold) 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절 암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주 세포 게놈의 내인성  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절에 존재하는 비암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절 암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주 세포 게놈의 내인성  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절에 존재하는 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함한다.

[0020] 다른 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_L$  암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주의 내인성  $V_L$  유전자 좌위에 존재하는 비암호화 서열을 포함한다. 다른 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_L$  암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주의 내인성  $V_L$  유전자 좌위에 존재하는 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_L$  암호화 서열, 고양이  $J_L$  유전자 분절 암호화 서열과, 고양이가 아님 포유동물 숙주 세포 게놈의 내인성  $J_L$  유전자 분절에 존재하는 비암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_L$  암호화 서열, 고양이  $J_L$  유전자 분절 암호화 서열과, 고양이

이가 아닌 포유동물 숙주 세포 계놈의 내인성  $J_L$  유전자 분절에 존재하는 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함한다.

[0021] 일 측면에서, 고양이가 아닌 포유동물은 설치류, 예컨대 마우스 또는 래트이다.

[0022] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌를 포함하는, 고양이가 아닌 포유동물 세포를 제조하기 위한 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은 a) 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포의 계놈에 2개 이상의 재조합효소 표적화 부위를 도입하고, 내인성 면역글로불린  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 또는 내인성  $V_L$  및  $J_L$  유전자를 포함하는 계놈 영역의 하류 적어도 1개의 부위와 상류 적어도 1개의 부위를 통합하는 단계; 그리고 b) 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 또는 고양이  $V_L$  및  $J_L$  유전자 암호화 서열과, 고양이가 아닌 포유동물 숙주의 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위에 존재하는 비암호화 서열을 기반으로 한 비암호화 서열을 포함하는 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 유전자의 좌위를 재조합효소 매개 카세트 교환(RMCE)을 통해 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함한다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 방법은 2개의 이중 재조합효소 표적화 부위가 축적하는 숙주 동물 계놈의 내인성 면역글로불린 가변 영역을 결실시킨 후, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 유전자 좌위를 RMCE를 통해 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함한다.

[0024] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_H$  유전자 분절 암호화 서열, 고양이  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절 암호화 서열과, 고양이가 아닌 포유동물 숙주 계놈에 내인성인  $D_H$  유전자 분절 상류에 존재하는 서열을 기반으로 한 고양이  $D_H$  유전자 분절 상류의 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열(pre-D 서열, 도 1)을 포함한다. 일 측면에서, 상류 스캐폴드 서열은 음성 생식능과 관련된 비면역글로불린 유전자, 예컨대 Adam6a(도 1)를 함유한다[Nishimura et al. Developmental Biol. 233(1): 204-213 (2011)]. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는, 동일한 염색체상의 내인성 면역글로불린  $V_H$  유전자 좌위의 상류 및 내인성  $J_H$  유전자 좌위의 하류에 사전 도입된 재조합효소 표적화 부위가 사용되어 숙주 세포에 도입된다.

[0025] 일 측면에서, 스캐폴드 서열은 또다른 종으로부터 유래한 자연 발생 핵산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 스캐폴딩 서열은 또다른 종으로부터 유래하는 자연 발생 핵산 서열을 기반으로 디자인될 수 있는데, 예를 들어 스캐폴딩 서열은, 예를 들어 1회 이상의 핵산 치환, 삽입, 결실 또는 기타 변형에 의해 변형된 핵산 서열로서, 또다른 종으로부터 유래한 자연 발생 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 스캐폴딩 서열은 인공 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 스캐폴드 서열은 다른 서열, 예를 들어 다른 종으로부터 유래한 스캐폴드 서열과 아울러, 고양이 계놈의 면역글로불린 유전자좌에 존재하는 서열을 포함한다.

[0026] 또다른 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이 면역글로불린  $V_L$  유전자 분절 암호화 서열, 고양이  $J_L$  유전자 분절 암호화 서열과, 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포 계놈의 내인성 L 사슬 유전자좌에 존재하는 비암호화 서열을 기반으로 한 비암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 비암호화 서열은 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 동일한 염색체상 내인성  $J_L$  유전자 좌위 하류 및 내인성 면역글로불린  $V_L$  유전자 좌위의 상류에 사전 도입된 재조합효소 표적화 부위가 사용되어 숙주 세포 내로 도입된다.

[0027] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 단일 핵산으로서 합성되고, 단일 핵산 영역으로서 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포로 도입된다. 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 또한 2개 이상의 인접 분절에서 합성되어, 별도의 분절로서 포유동물 숙주 세포에 도입될 수 있다. 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 또한 재조합 방법이 사용되어 제조된 다음, 단리되어, 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포에 도입될 수 있다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자좌는 이하와 같이 컴퓨터시뮬레이션에 따라 생성될 수 있다: 마우스 중쇄 면역글로불린 유전자좌의 계놈 서열뿐만 아니라 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열도, 예를 들어 국립 생명공학 정보 센터 또는 국제 ImMunoGeneTics(IMG) 정보 시스템으로부터 취득된다. 마우스  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열은, 예를 들어 상업적으로 입수가 가능한 소프트웨어가 사용되어 컴퓨터시뮬레이션에 따라 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열로 치환된다. 유리하게는  $V_H$ ,  $D$  및  $J_H$  암호화 서열은 개재 마우스 비암호화 서열을 비변형상태로 유지하면서 치환될 수 있다. 유사하게, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자좌는 이하와 같이 컴퓨터시뮬레이션에

따라 생성될 수 있다: 마우스 경쇄 면역글로불린 유전자좌의 게놈 서열뿐 아니라 고양이  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열은, 예를 들어 국립 생명공학 센터(National Center for Biotechnology) 또는 국제 ImmunoGeneTics(IMG) 정보 시스템으로부터 취득된다. 마우스  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열은, 예를 들어 상업적으로 입수가능한 소프트웨어가 사용되어 컴퓨터시뮬레이션에 따라 고양이  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열로 치환된다. 또한  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열은 개체 마우스 비암호화 서열을 비변형상태로 유지하면서 치환될 수 있다. 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 DNA 서열을 컴퓨터시뮬레이션 서열을 기반으로 합성하기 위한 방법이 공지되어 있다.

[0028] 또다른 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌를 포함하는, 고양이가 아닌 포유동물의 세포를 제조하기 위한 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은 a) 서로 재조합할 수 없는 2개 이상의 서열 특이적 재조합 부위를 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포의 게놈에 도입하는 단계로서, 적어도 1개의 재조합 부위는 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위 상류에 도입되고, 적어도 1개의 재조합 부위는 동일한 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위의 하류에 도입되는 것인 단계; b) i) 고양이 면역글로불린 가변 영역 유전자 암호화 서열 및 ii) 숙주 세포 게놈의 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를 기반으로 한 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 가지는, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 벡터를 제공하는 단계로서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌에는 숙주 세포의 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위가 축적하는 2개의 동일한 서열 특이적 재조합 부위가 축적하는 것인 단계; c) 단계 b)의 벡터와 2개의 재조합효소 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 숙주 세포에 도입하는 단계; d) 세포의 게놈과 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌 사이에서 재조합 이벤트가 일어나도록 허용하여, 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위가 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위로 치환되도록 만드는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_H$  면역글로불린 유전자 분절 암호화 서열과, i) 고양이  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절 암호화 서열, ii) 고양이가 아닌 포유동물 숙주의 게놈에 내인적으로 존재하는 개별  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절에 축적하는 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열, 그리고 iii) 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포의 내인성 게놈을 기반으로 한 pre-D 서열을 포함한다. 일 측면에서, 재조합효소 표적화 부위는 내인성 면역글로불린  $V_H$  유전자 좌위의 상류 및 내인성  $J_H$  유전자 좌위의 하류에 도입된다.

[0029] 일 측면에서, 유전자이식 설치류에는 설치류 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위가 결실되고, 고양이 면역글로불린 가변 유전자 암호화 서열과, 설치류 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위를 기반으로 한 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함하는, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌로 치환된 게놈이 제공된다. 일 측면에서, 유전자이식 설치류의 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 이종 유전자좌는 기능성으로서, 고양이 가변 도메인 및 설치류 불변 도메인을 포함하는 면역글로불린 사슬을 발현한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌는 고양이 카파( $\kappa$ )  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌는 고양이 람다( $\lambda$ )  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 유전자이식 설치류로부터 유래하는 B 림프구 계통의 세포가 제공된다. 일 측면에서, B 림프구 계통의 세포로부터 취득된 설치류 불변 도메인 서열 및 고양이 가변 도메인 서열을 포함하는, 부분 또는 전체 면역글로불린 분자가 제공된다. 일 측면에서, B 림프구 계통의 세포로부터 유래하는 하이브리도마 세포가 제공된다. 일 측면에서, 하이브리도마 세포로부터 유래하는 설치류 불변 도메인 및 고양이 가변 도메인을 포함하는 부분 또는 전체 면역글로불린 분자가 제공된다. 일 측면에서, B 림프구 계통의 세포로부터 유래하는 무한증식성 세포가 제공된다. 일 측면에서, 무한증식성 세포로부터 유래하는 설치류 불변 도메인 및 고양이 가변 도메인을 포함하는 부분 또는 전체 면역글로불린 분자가 제공된다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌가 고양이  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함하는 유전자이식 설치류가 제공된다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌가 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열을 포함하는 유전자이식 설치류가 제공된다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌는 고양이 카파( $\kappa$ )  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이종 면역글로불린 유전자좌는 고양이 람다( $\lambda$ )  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 설치류는 마우스이다. 일 측면에서, 비암호화 조절 서열은 내인성 숙주의 하기 서열들, 즉 개별  $V$  유전자 분절에 선행하는 프로모터, 스플라이싱

부위, 그리고 V(D)J 재조합을 위한 재조합 신호 서열중 1개 이상을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 내인성 숙주의 이하 서열들, 즉 ADAM6 유전자, Pax-5 활성화 유전자간 반복(PAIR) 요소, 그리고 중쇄 유전자간 제어 영역 1(IGCR1)로부터 유래하는 CTCF 결합 부위중 1개 이상을 추가로 포함한다.

[0030] 일 측면에서, 고양이의 것이 아닌 세포는 포유동물 세포이다. 일 측면에서, 고양이가 아닌 포유동물의 세포는 포유동물 배 줄기(ES) 세포이다.

[0031] 일 측면에서, 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위가 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위로 치환된, 고양이가 아닌 포유동물의 세포가 선택되고 단리된다. 일 측면에서, 세포는 고양이가 아닌 포유동물의 ES 세포, 예를 들어 설치류 ES 세포이다. 일 측면에서, 적어도 1개의 단리된 세포로서, 고양이가 아닌 포유동물의 세포가 사용됨으로써, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를 발현하는, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물이 제조된다. 일 측면에서, 적어도 1개의 단리된 세포로서, 고양이가 아닌 포유동물의 ES 세포가 사용되어 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를 발현하는, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물이 제조된다.

[0032] 일 측면에서, 유전자이식 설치류를 제조하기 위한 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은 a) 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위의 상류에 있는 설치류 세포의 계놈에, 부위 특이적 재조합효소에 대한 표적 부위 적어도 1개와, 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위의 하류에 있는 부위 특이적 재조합효소에 대한 표적 부위 적어도 1개를 통합하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 내인성 면역글로불린 가변 유전자좌는  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절을 포함한다. 일 측면에서, 내인성 면역글로불린 가변 유전자좌는  $V_K$  및  $J_K$  유전자 분절을 포함한다. 일 측면에서, 내인성 면역글로불린 가변 유전자좌는  $V_\lambda$  및  $J_\lambda$  유전자 분절을 포함한다. 일 측면에서, 내인성 면역글로불린 가변 유전자좌는  $V_\lambda$ ,  $J_\lambda$  유전자 분절 및  $C_\lambda$  유전자를 포함한다. 일 측면에서, 본 방법은 b) 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 벡터를 제공하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 상기 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 키메라 고양이 면역글로불린 유전자 분절을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자 분절 각각은 고양이 면역글로불린 가변 유전자 암호화 서열 및 설치류 비암호화 조절 또는 스키펴드 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 유전자 좌위에는 부위 특이적 재조합효소에 대한 표적 부위가 측정한다. 일 측면에서, 표적 부위는 설치류 세포에 도입된 표적 부위와 재조합될 수 있다. 일 측면에서, 본 방법은 c) 표적 부위를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소 및 벡터를 설치류 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 본 방법은 d) 세포의 계놈과 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌 사이에서 재조합 이벤트가 발생하도록 허용하는 단계로서, 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위가 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌로 치환되는 것인 단계를 포함한다. 일 측면에서, 본 방법은 e) 단계 d)에서 제조된, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 유전자좌를 포함하는 세포를 선택한 다음, 이 세포를 사용하여 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 유전자좌를 포함하는 유전자이식 설치류를 제조하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 세포는 설치류 배 줄기(ES) 세포이다. 일 측면에서, 세포는 마우스 배 줄기(ES) 세포이다.

[0033] 일 측면에서, 본 방법은 단계 a) 이후 및 단계 b) 이전에, 표적 부위의 제1 세트를 인지하는 재조합효소를 도입함으로써 내인성 면역글로불린 가변 유전자 좌위를 결실시키는 단계로서, 이 결실 단계는 설치류 세포의 계놈에서 서로 재조합할 수 없는 표적 부위 세트 적어도 1개를 제자리에 유지시키는 것인 단계를 추가로 포함한다. 일 측면에서, 벡터는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 벡터는 고양이  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이 카파( $\kappa$ )  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 람다( $\lambda$ )  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 벡터는 이하의 것들, 즉 프로모터, 스플라이싱 부위 및 재조합 신호 서열중 1개 이상을 추가로 포함한다.

[0034] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를 포함하는, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물을 제조하기 위한 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은 a) 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자좌위에 측정하고, 서로 재조합할 수 없는 서열 특이적 재조합 부위 1개 이상을 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포의 계놈에 도입하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 본 방법은 b) i) 고양이 가변 영역 유전자 암호화 서열 및 ii) 내인성 숙주 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를 기반으로 한 비암호화 조절 또는 스키펴드 서열을 가지는 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 벡터를 제공하는

단계를 포함한다. 일 측면에서, 암호화 서열 및 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열에는 a)의 숙주 세포의 게놈에 도입된 것과 동일한 서열 특이적 재조합 부위가 축적한다. 일 측면에서, 본 방법은 c) 단계 b)의 벡터 및 재조합효소 부위 세트 1개를 인지할 수 있는 부위 특이적 재조합효소를 세포에 도입하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 본 방법은 d) a)의 세포의 게놈과 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위 사이에서 재조합 이벤트가 발생하도록 허용하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 내인성 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위는 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌로 치환된다. 일 측면에서, 본 방법은 e) 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 세포를 선택하는 단계; 및 f) 이 세포를 사용하여 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 유전자이식 포유동물을 제조하는 단계를 포함한다.

- [0035] 일 측면에서, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물은 설치류, 예컨대 마우스 또는 래트이다.
- [0036] 일 측면에서, 다양한 라이브러리 일원 적어도  $10^3$ 개를 포함하는 면역글로불린 라이브러리(레퍼토리(repertoire)라고도 지칭됨)가 제공된다.
- [0037] 일 측면에서, 본원에 기재된 항체로서, 부분적으로 고양이의 것인 항체를 포함하는 항체 레퍼토리가 제공된다. 일 측면에서, 레퍼토리는 각각이 동일한 표적 항원을 특이적으로 인지하는 다양한 항체를 포함한다. 이러한 레퍼토리는 동일한 항체 유형 또는 구조의 항체 라이브러리라 지칭될 수 있는데, 여기서 항체들은, 예를 들어 동일한 에피토프를 인지하는 부모 항체의 항체 변이체를 제조하기 위해 자체의 항원 결합 부위가 상이하다. 일 측면에서, 항체 라이브러리는 친화성 성숙되거나, 아니면 최적화된 항체 변이체를 포함한다. 일 측면에서, 항체 라이브러리는 표적 항원을 특이적으로 인지하되, 이러한 표적 항원의 상이한 에피토프는 인지하지 않는 항체를 포함한다.
- [0038] 일 측면에서, 항체 레퍼토리는 스크리닝되고, 개별 라이브러리 구성원은, 예를 들어 항체 생성물을 제조하기 위해 요망되는 구조적 특성 또는 기능적 특성에 따라 선택된다.
- [0039] 일 측면에서, 본원에 기재된 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 항체를 포함하는 항체 레퍼토리가 제공된다. 일 측면에서, 레퍼토리는 상이한 표적 항원을 인지하는 다양한 항체를 포함한다. 일 측면에서, 레퍼토리는 각각 다수의 에피토프를 포함할 수 있는 다수의 상이한 표적 항원을 가질 수 있는 다성분 항원, 예컨대 바이러스 또는 세균(이에 한정되는 것은 아님)으로 고양이가 아닌 포유동물을 면역화함으로써 수득된다.
- [0040] 일 측면에서, 레퍼토리는 "면역전 레퍼토리(pre-immune repertoire)"라고 지칭될 수도 있는 항체의 처녀(naive) 라이브러리이다. 일 측면에서, 면역전 레퍼토리는 최근 골수에서 빠져나온 것으로서, 성숙한 것이지만 항원을 경험하지 않은 B 세포에 의해 발현된다.
- [0041] 일 측면에서, 항체의 레퍼토리는 각각 상이한 항원 결합 부위에 의해 특성규명되는, 적어도 약  $10^3$ 개 항체, 예를 들어 적어도 약  $10^4$ 개, 약  $10^5$ 개, 약  $10^6$ 개 또는 약  $10^7$ 개의 항체를 포함하는 다양성에 의해 특성규명될 수 있다.
- [0042] 일 측면에서, 고양이 가변 영역 유전자 암호화 서열과, 숙주 게놈의 내인성 면역글로불린 유전자좌이되, 고양이의 것이 아닌 유전자좌를 기반으로 한 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 가지는, 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를 발현하는 세포로서, 고양이가 아닌 포유동물의 세포가 제공된다. 일 측면에서, 고양이가 아닌 포유동물의 세포는 고양이가 아닌 포유동물의 세포 또는 포유동물에 내인성인 각각의 불변 영역과 아울러, 전체가 고양이의 것인 H 또는 L 사슬 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체를 발현한다.
- [0043] 일 측면에서, 고양이 가변 영역 유전자 암호화 서열과, 숙주 게놈의 내인성 면역글로불린 유전자좌로서, 고양이의 것이 아닌 유전자좌를 기반으로 한 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 가지는, 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자 좌위를 발현하는 것으로서, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물이 제공된다. 일 측면에서, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물은 고양이가 아닌 포유동물의 세포 또는 포유동물에 내인성인 각각의 불변 영역과 아울러, 전체가 고양이의 것인 H 또는 L 사슬 가변 도메인을 포함하는 키메라 항체를 발현한다.
- [0044] 일 측면에서, 전체가 고양이의 것인 가변 서열을 가지는 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 항체를 발현할 수 있는, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물로부터 유래하는 B 세포가 제공된다. 일 측면에서, 무한증식성 B 세포는 특정 항원에 특이적인 모노클로날 항체의 공급원으로서 제공된다.
- [0045] 일 측면에서, 진단, 예방 및 치료적 용도를 위한 항체의 제조 또는 최적화하는데 사용하기 위해 B 세포로부터 클로닝된 고양이 면역글로불린 가변 영역 유전자 서열이 제공된다.

- [0046] 일 측면에서, 전체가 고양이인 것인 면역글로불린 가변 영역 서열을 가지는 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 모노클로날 항체를 제조할 수 있는, 고양이의 것이 아닌 하이브리도마 세포가 제공된다.
- [0047] 일 측면에서, 모노클로날 항체 제조 하이브리도마로부터 유래한 H 및 L 사슬 면역글로불린 가변 도메인을 암호화하는  $V_H$  및  $V_L$  엑손을 제거하고, 고양이 불변 영역을 포함하도록 이  $V_H$  및  $V_L$  엑손을 변형시켜, 고양이에게 주사되었을 때 면역원성을 보이지 않는, 전체가 고양이의 것인 항체를 제조하기 위한 방법이 제공된다.
- [0048] 일 측면에서, 치료 또는 진단의 용도인 고양이 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은
- [0049] (i) 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류의 항체 제조 세포로부터 클로닝된 고양이 가변 도메인을 가지는 항체를 발현시키는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 고양이 V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열 및 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열을 포함하는 것인 단계; 그리고
- [0050] (ii) 고양이 가변 도메인을 가지는 항체를 단리하는 단계로서, 이 항체는 치료 또는 진단의 용도로서 적합한 것인 단계
- [0051] 를 포함한다.
- [0052] 일 측면에서, 항체는 유전자이식 설치류의 B 세포로부터 클로닝된다. 일 측면에서, 설치류는 마우스이다. 일 측면에서, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 치료용 또는 진단용 항체가 제공된다.
- [0053] 일 측면에서, 고양이 가변 도메인을 가지는 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은
- [0054] (i) 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류의 항체 제조 세포에 의해 발현된 항체의 고양이 가변 도메인을 클로닝하는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 고양이 V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열 및 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열을 포함하는 것인 단계; 그리고
- [0055] (ii) 유전자이식 설치류에 의해 발현된 항체의 고양이 가변 도메인을 포함하는 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 단계
- [0056] 를 포함한다.
- [0057] 일 측면에서, 고양이 가변 도메인은 유전자이식 설치류의 B 세포에 의해 발현된 항체로부터 클로닝된다. 일 측면에서, 설치류는 마우스이다. 일 측면에서, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 치료용 또는 진단용 항체가 제공된다.
- [0058] 일 측면에서, 고양이 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체를 제조하기 위한 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은
- [0059] (i) 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류로부터 B 세포를 제공하는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열에 내포된 고양이 V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열을 포함하는 것인 단계;
- [0060] (ii) B 세포를 무한증식시키는 단계; 그리고

- [0061] (iii) 무한증식 B 세포에 의해 발현되는 고양이 가변 도메인을 포함하는 모노클로날 항체 또는 이 항체를 암호화하는 유전자를 단리하는 단계.
- [0062] 를 포함한다.
- [0063] 일 측면에서, 본 방법은 이하의 단계, 즉
- [0064] (iv) B 세포에 의해 발현된 고양이 가변 도메인을 클로닝하는 단계; 그리고
- [0065] (v) 유전자이식 설치류의 B 세포로부터 클로닝된 고양이 가변 도메인을 포함하는 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 단계
- [0066] 를 포함한다.
- [0067] 일 측면에서, 고양이 가변 도메인을 포함하는 항체를 제조하기 위한 방법이 제공된다. 일 측면에서, 본 방법은 자체의 게놈이, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역, 즉 결실된 후, 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 키메라  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  면역글로불린 가변 영역 유전자 분절 각각중 적어도 1개 및/또는 면역글로불린 경쇄 유전자좌에 키메라  $V_L$  및  $J_L$  가변 유전자 분절 각각중 적어도 1개를 포함하는 이중 면역글로불린 유전자좌 가변 영역으로 치환된, 내인성 설치류 면역글로불린 유전자좌 가변 영역을 포함하는, 유전자이식 설치류를 제공하는 단계로서, 각각의 키메라 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 가변 영역 비암호화 유전자 분절 서열에 내포된 고양이 V, D 또는 J 면역글로불린 가변 영역 암호화 서열을 포함하고, 이 유전자이식 설치류의 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이 가변 도메인을 포함하는 항체를 발현하는 것인 단계를 포함한다.
- [0068] 일 측면에서, 본 방법은 유전자이식 설치류에 의해 발현되는 고양이 가변 영역을 가지는 항체, 또는 이 항체를 암호화하는 유전자를 단리하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 본 방법은 (i) 표적 항원에 특이적인 항체를 발현하는 유전자이식 설치류로부터 B 세포를 수득하는 단계; (ii) B 세포를 무한증식시키는 단계; 및 (iii) 무한증식 B 세포로부터 표적 항원에 특이적인 항체를 단리하는 단계를 포함한다.
- [0069] 일 측면에서, 본 방법은 특정 항원에 특이적인 B 세포로부터 고양이 가변 영역을 클로닝하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 설치류는 마우스이다. 일 측면에서, 본 방법은 이 B 세포로부터 클로닝된 고양이 가변 영역이 사용되어 치료용 또는 진단용 항체를 제조하는 단계를 포함한다. 일 측면에서, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 치료용 또는 진단용 항체가 제공된다.
- [0070] 이러한 측면과 기타의 측면은 이하에 더욱 상세히 기재되어 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0071] 도 1은 12번 염색체의 텔로미어 말단에 위치한 마우스 Igh 유전자좌(상단)(V(IghV), D(IghD), J(IghJ) 및 C(IghC) 유전자 분절 포함), 6번 염색체에 위치한 Igk 유전자좌(중간)(V(IgkV), J(IgkJ) 및 C(IgkC) 유전자 분절 포함) 및 16번 염색체에 위치한 Igλ 유전자좌(하단)(IglV(V), IglJ(J) 및 IglC(C) 유전자 분절 포함)을 도시한다. 또한 Igh 유전자좌에는 1) VDJ 재배열에서 원위  $V_H$  유전자 분절의 이용을 보장하기 위해 Igh 루핑(looping)에 결정적 시스(cis) 조절 서열인 PAIR 요소, 2) Adam6a 음성 생식 가능 유전자, 3) Igh 유전자좌의 정돈된 계통 특이적 재배열을 조절하는 부위를 함유하는 유전자간 제어 영역 1(IGCR1), 4) 중쇄 인트론 인핸서인  $E_{\mu}$ , 5) 스위치 영역인  $S_{\mu}$ , 6) 아이소타입 스위칭(isotype switching)을 제어하는 시스 작용 요소인 3' 조절 영역(3'RR)이 보인다. 또한 Igk 유전자좌에는 5'(E5') 및 3'(E3') 인핸서가 보이고, Igλ 유전자좌에는 3개의 인핸서, 즉  $E_{\lambda 2-4}$ ,  $E_{\lambda}$  및  $E_{\lambda 3-1}$ 이 보인다.
- 도 2는 고양이가 아닌 포유동물의 숙주 세포의 게놈내 H 사슬 가변 영역 유전자 좌위의 상류 영역에 서열 특이적 재조합 부위 제1 세트를 도입하기 위한 전략으로서, 상동성 재조합에 의한 표적화 전략을 도시하는 개략도이다.
- 도 3은 상동성 표적화 벡터를 통해 고양이가 아닌 포유동물의 세포 게놈내 H 사슬 가변 영역 유전자 좌위의 하류 영역에 서열 특이적 재조합 부위 제2 세트를 도입하는 것을 도시하는 개략도이다. 본 도해는 또한 내인성 면역글로불린 H 사슬 가변 영역 유전자 좌위뿐 아니라, 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포의 게놈으로부터 유래한 선별 마커의 결실을 도시한다.
- 도 4는 내인성 면역글로불린 H 사슬 가변 영역 유전자좌가 결실되도록 사전 변형된, 고양이가 아닌 포유동물 숙

주의 세포 계놈에 부분적으로 고양이이것인 이중 면역글로불린 H 사슬 유전자좌를 도입하기 위한 RMCE 전략을 도시하는 개략도이다.

도 5는 마우스 계놈의 내인성 면역글로불린 κL 사슬 유전자좌에, 부분적으로 고양이이 것인 이중 면역글로불린 κL 사슬 가변 영역 유전자 좌위를 도입하는 것을 도시하는 개략도이다.

도 6은 마우스 계놈의 내인성 면역글로불린 λL 사슬 유전자좌에, 부분적으로 고양이이 것인 이중 면역글로불린 λL 사슬 가변 영역 유전자 좌위를 도입하는 것을 도시하는 개략도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0072] 정의

[0073] 본원에 사용된 용어는, 당업자들이 이해하는 평범하고 일반적인 의미를 가지도록 의도된다. 이하 정의들은 본 명세서를 읽는 이들이 본 발명을 이해하는데 도움을 주기 위한 것이지만, 구체적으로 명시되지 않는 한 이러한 용어들의 의미를 변경하거나 달리 제한하려는 의도는 아니다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같은 "유전자좌"라는 용어는, 각각 계놈에 내인적으로 존재하거나 계놈에 도입되는(또는 도입될 예정인) 염색체 분절 또는 핵산 서열을 지칭한다. 예를 들어 면역글로불린 유전자좌는 면역글로불린 H 또는 L 사슬 폴리펩티드의 발현을 지원하는 개재 비암호화 서열(즉 인트론, 인핸서 등)과, 유전자의 일부 또는 전부(즉, V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> 및 J<sub>H</sub> 유전자 분절 또는 V<sub>L</sub> 및 J<sub>L</sub> 유전자 분절뿐 아니라 불변 영역 유전자)를 포함한다. "유전자좌"라는 용어(예를 들어 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자좌)는 더 큰 유전자좌의 특정 부분(예를 들어 V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> 및 J<sub>H</sub> 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 H 사슬 유전자좌의 일부)을 지칭할 수 있다. 마찬가지로 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 좌위는 더 큰 유전자좌의 특정 부분(예를 들어 V<sub>L</sub> 및 J<sub>L</sub> 유전자 분절을 포함하는 면역글로불린 L 사슬 유전자좌의 일부)을 지칭할 수 있다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같은 "면역글로불린 가변 영역 유전자"란 용어는, 면역글로불린 중쇄 가변 영역의 V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> 또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절을 포함한 가변(V), 다양성(D), 연결(J) 유전자 분절, 또는 각각 면역글로불린 H 또는 L 사슬 가변 도메인의 일부를 암호화하는, 면역글로불린 경쇄 가변 영역내 V<sub>L</sub> 또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "면역글로불린 가변 영역 유전자좌"란 용어는, V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> 또는 J<sub>H</sub> 유전자 분절 또는 V<sub>L</sub> 또는 J<sub>L</sub> 유전자 분절 및 개재 비암호화 서열, 예컨대 비암호화 조절 또는 스키펴드 서열의 클러스터를 함유하는 핵산 가닥 또는 염색체 분절의 일부 또는 전부를 지칭한다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같은 "유전자 분절"이란 용어는, 면역글로불린 분자의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. 유전자 분절은 암호화 서열 및 비암호화 서열을 포함할 수 있다. 유전자 분절의 암호화 서열은 폴리펩티드, 예컨대 리더 펩티드 및 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 N-말단 부분으로 번역될 수 있는 핵산 서열이다. 유전자 분절의 비암호화 서열은 프로모터, 5' 비번역 서열, 리더 펩티드의 암호화 서열에 개재하는 인트론, 재조합 신호 서열(들)(RSS) 및 스플라이싱 부위를 포함할 수 있는, 암호화 서열에 축적하는 서열이다. 면역글로불린 중쇄(IGH) 유전자좌의 유전자 분절은 V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> 및 J<sub>H</sub> 유전자 분절(각각 IGHV, IGHD 및 IGHJ라고도 지칭됨)을 포함한다. 면역글로불린 κ 및 λ 경쇄 유전자좌의 경쇄 가변 영역 유전자 분절은 V<sub>L</sub> 및 J<sub>L</sub> 유전자 분절이라 지칭될 수 있다. κ 경쇄에서 V<sub>L</sub> 및 J<sub>L</sub> 유전자 분절은 V<sub>κ</sub> 및 J<sub>κ</sub> 유전자 분절 또는 IGKV 및 IGKJ라 지칭될 수 있다. 마찬가지로 λ 경쇄에서 V<sub>L</sub> 및 J<sub>L</sub> 유전자 분절은 V<sub>λ</sub> 및 J<sub>λ</sub> 유전자 분절 또는 IGLV 및 IGLJ라 지칭될 수 있다.

[0077] 중쇄 불변 영역은 C<sub>H</sub> 또는 IGHC라 지칭될 수 있다. IgM, IgD, IgG1a, IgG2, IgE 또는 IgA를 암호화하는 고양이의 C<sub>H</sub> 영역 엑손은 각각 C<sub>μ</sub>, C<sub>δ</sub>, C<sub>γ1a</sub>, C<sub>γ2</sub>, C<sub>ε</sub> 또는 C<sub>α</sub>로 지칭될 수 있다. 유사하게 면역글로불린 κ 또는 λ 불변 영역은 각각 C<sub>κ</sub> 또는 C<sub>λ</sub>뿐 아니라, IGKC 또는 IGLC로도 지칭될 수 있다.

[0078] 본원에 사용된 바와 같은 "부분적으로 고양이이 것인"이란 용어는, 고 핵산, 또는 이의 발현된 단백질 및 RNA 생성이 고양이 및 고양이가 아닌 포유동물 숙주 둘 다의 소정 유전자좌에서 발견되는 서열에 대응하는 서열을 포함하는 경우를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "부분적으로 고양이이 것인"이란 또한 면역글로불린 유전자좌가 고양이 및 고양이가 아닌 포유동물 둘 다로부터 유래한 핵산 서열을 포함하는 경우를 지칭한다. 일 측면

에서, "부분적으로 고양이의 것인"은 면역글로불린 유전자좌가, 예를 들어 설치류, 예를 들어 마우스로부터 유래한 핵산 서열을 포함하는 경우를 지칭한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 핵산은 고양이 면역글로불린 H 또는 L 사슬 가변 영역 유전자 분절의 암호화 서열과, 고양이가 아닌 포유동물의 내인성 면역글로불린 유전자좌의 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 기반으로 한 서열을 가진다.

[0079] 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포 계놈으로부터 유래한 내인성 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열과 관련하여 사용될 때 "~을 기반으로 한"이란 용어는, 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열이 포유동물 숙주 세포 계놈의 대응하는 내인성 유전자좌에 존재하는 경우를 지칭한다. 일 측면에서, "~을 기반으로 한"이란 용어는,

[0080] 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌에 존재하는 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열이 숙주 포유동물의 내인성 유전자좌의 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열과 비교적 높은 수준의 상동성을 공유함을 의미한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌의 비암호화 서열은 숙주 포유동물의 내인성 유전자좌에서 발견되는, 대응 비암호화 서열과 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100%의 상동성을 공유한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌의 비암호화 서열은 숙주 포유동물의 내인성 유전자좌에서 발견되는 대응 비암호화 서열과 동일하다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌의 비암호화 서열은 숙주 포유동물의 면역글로불린 유전자좌로부터 유지된다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌의 비암호화 서열은 숙주 포유동물의 내인성 유전자좌에 존재하는 대응 비암호화 서열과 동일하다. 일 측면에서, 고양이의 암호화 서열은 숙주 포유동물의 면역글로불린 유전자좌의 비조절 또는 스캐폴드 서열에 내포된다. 일 측면에서, 고양이가 아닌 숙주 동물은 래트 또는 마우스와 같은 설치류이다.

[0081] "키메라"란, 2개 이상의 동물 종으로부터 유래하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열, 또는 2개 이상의 동물 종으로부터 유래하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드, 예를 들어 항체를 지칭한다. "키메라" 면역글로불린 유전자좌란, 2개 이상의 동물 종으로부터 유래하는 핵산 서열을 포함하는 면역글로불린 유전자좌를 지칭한다. 일 측면에서, 키메라 면역글로불린 유전자좌는 고양이 핵산 서열 및 마우스 핵산 서열을 포함한다. 일 측면에서, 키메라 면역글로불린은 2개 이상의 동물 종로부터 유래하는 단백질 서열을 포함한다. 일 측면에서, 키메라 면역글로불린은 고양이 서열 및 마우스 서열을 포함한다. 일 측면에서, 키메라 면역글로불린은 고양이 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 포함한다. 일 측면에서, 키메라 면역글로불린 가변 영역 유전자좌는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열 또는 고양이  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열과, 고양이의 것이 아닌 비암호화 서열을 포함한다. 일 측면에서, 키메라 면역글로불린 가변 영역 유전자좌는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열 또는 고양이  $V_L$  및  $J_L$  암호화 서열 및 마우스 비암호화 서열을 포함한다.

[0082] 본원에 사용된 바와 같은 "측점(하는)"이란, 서열, 예를 들어 뉴클레오티드 서열이 참조 서열의 상류 또는 하류에 있는 경우를 지칭한다. 일 측면에서, 측점하는 서열은 참조 서열에 인접하여 있다. 일 측면에서, 한 쌍의 서열은 참조 서열에 측점하므로, 제1 서열은 참조 서열의 상류에 있고 제2 서열은 참조 서열의 하류에 있다.

[0083] "내인성"이란, 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 유기체 또는 세포 내에서 자연 발생하는 경우를 지칭한다.

[0084] "이종(의)"이란, 핵산 서열 또는 폴리펩티드가 유기체 또는 세포 내에서 자연 발생하지 않는 경우를 지칭한다.

[0085] "비암호화 조절 서열"이란, (i) V(D)J 재조합, (ii) 아이소타입 스위칭, (iii) V(D)J 재조합후 전장 면역글로불린 H 또는 L 사슬의 적절한 발현, 또는 (iv) 교번적 스플라이싱, 예를 들어 면역글로불린 H 사슬의 막결합형 및 분비형을 생성하기 위한 스플라이싱에 필수적인 것으로 공지된 서열을 지칭한다. "비암호화 조절 서열"은 이하의 서열들을 추가로 포함할 수 있다: CTCF 및 PAIR 서열과 같은 인핸서 및 유전자좌 제어 요소(Proudhon, et al., Adv. Immunol. 128:123-182 (2015)); 각각의 내인성 V 유전자 분절에 선행하는 프로모터; 스플라이싱 부위; 인트론; 또는 각각의 V, D 또는 J 유전자 분절에 측점하는 재조합 신호 서열. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌의 "비암호화 조절 서열"은 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포의 내인성 면역글로불린 유전자좌에서 발견되는 대응 비암호화 서열과 적어도 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 96%, 97%, 약 98%, 약 99% 및 약 100% 이하의 상동성을 공유한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌의 "비암호화 조절 서열"은 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포의 내인성 면역글로불린 유전자좌에서 발견되는 대응 비암호화 서열과 동일한 서열을 가진다.

[0086] "스캐폴드 서열"이란, 숙주 세포 계놈의 내인성 면역글로불린 유전자좌에 존재하는 유전자 분절에 개재하는 서열을 지칭한다. 임의의 측면에서, 스캐폴드 서열에는 기능성 비면역글로불린 유전자, 예를 들어 ADAM6A 또는

ADAM6B의 발현에 필수적인 서열이 사이사이 배치되어 있다. 일 측면에서, 스캐폴드 서열은 다른 종으로부터 유래하는 자연 발생 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 스캐폴딩 서열은 다른 종으로부터 유래하는 자연 발생 핵산 서열을 기반으로 한 이중일 수 있다. 일 측면에서, 스캐폴딩 서열은 인공 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 스캐폴드 서열은 다른 서열, 예를 들어 다른 종으로부터 유래하는 스캐폴드 서열과 아울러 고양이 게놈의 번역글로불린 유전자좌에 존재하는 서열을 포함한다. "비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열"이라는 어구는, 포괄적인 의미를 가지며, 번역글로불린 유전자좌의 비암호화 조절 서열 및 스캐폴드 서열 둘 다를 지칭할 수 있다.

[0087] “~와 특이적으로 결합하다”란, 항체 또는 번역글로불린이, 이 항체 또는 번역글로불린이 다른 항원과 결합할 때의 친화성보다 훨씬 더 큰 친화성으로 특정 항원의 에피토프 또는 항원 결정기와 결합하는 능력을 가지는 경우를 지칭한다.

[0088] "상동성 표적화 벡터"란 용어는, 상동성 재조합에 의해 포유동물 숙주 세포의 내인성 게놈을 변형시키는 데 사용되는 핵산 서열을 지칭한다. 상동성 표적화 벡터는, 예를 들어 고양이가 아닌 포유동물 숙주의 게놈에 존재하는 유전자좌로서, 변형될 유전자좌에 축적하는 대응 내인성 서열에 대해 상동성을 가지는 표적화 서열을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 상동성 표적화 벡터는 적어도 1개의 서열 특이적 재조합 부위를 포함한다. 일 측면에서, 상동성 표적화 벡터는 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함한다. 일 측면에서, 상동성 표적화 벡터는 1개 이상의 선택 마커 유전자를 포함한다. 일 측면에서, 상동성 표적화 벡터는 숙주 세포 게놈의 특정 영역에 서열 특이적 재조합 부위를 도입하는데 사용될 수 있다.

[0089] "부위 특이적 재조합" 또는 "서열 특이적 재조합"이란, 2개의 양립가능한 재조합 서열("서열 특이적 재조합 부위" 또는 "부위 특이적 재조합 서열"이라고도 지칭됨) 사이의 DNA 재배열 과정을 지칭한다. 부위 특이적 재조합은 이하 3개의 이벤트중 임의의 이벤트를 포함할 수 있다: a) 재조합 부위가 축적하는 사전 선택 핵산의 결실; b) 재조합 부위가 축적하는 사전 선택 핵산의 뉴클레오티드 서열의 역전, 그리고 c) 상이한 핵산 가닥에 위치하는 재조합 부위에 인접한 핵산 서열의 상호 교환. 핵산 분절의 이러한 상호 교환은 이중 핵산 서열을 숙주 세포의 게놈에 도입하기 위한 표적화 전략으로 이용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0090] "표적화 서열"이란 용어는, 변형될 번역글로불린 유전자좌 영역에 축적하거나 이에 인접한, 세포 게놈의 DNA 서열과 상동성인 서열을 지칭한다. 축적하는 서열 또는 인접 서열은 숙주 세포 게놈의 유전자좌 자체 내부에 있을 수 있거나, 암호화 서열의 상류 또는 하류에 있을 수 있다. 표적화 서열은 숙주 세포, 예를 들어 ES 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 재조합 DNA 벡터에 삽입되고, 이로써 벡터의 표적화 서열은 숙주 세포 게놈에 삽입될 서열, 예컨대 재조합 부위의 서열에 축적하게 된다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같은 "부위 특이적 표적화 벡터"란 용어는, 서열 특이적 재조합 부위를 암호화하는 핵산, 부분적으로 고양이의 것인 이중 유전자좌 및 임의로 선택가능한 마커 유전자를 포함하는 벡터를 지칭한다. 일 측면에서, "부위 특이적 표적화 벡터"는 재조합효소 매개 부위 특이적 재조합이 사용되어 숙주에서 내인성 번역글로불린 유전자좌를 변형하는데 사용된다. 표적화 벡터의 재조합 부위는 (예를 들어, 상동성 표적화 벡터를 통해) 변형될 번역글로불린 유전자좌에 인접해 있는 숙주 세포의 게놈 서열에 삽입된 또다른 대응 재조합 부위와의 부위 특이적 재조합에 적합하며, 부분적으로 고양이의 것인 이중 서열이 번역글로불린 유전자좌의 재조합 부위에 통합되면, 부분적으로 고양이의 것인 이중 영역에 의한 내인성 유전자좌의 치환이 달성된다.

[0092] "이식유전자"란 용어는, 본원에서 세포, 특히 포유동물 숙주 동물의 세포의 게놈에 인공적으로 삽입되었거나 삽입될 예정인 유전 물질을 설명하기 위해 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 "이식유전자"란, 부분적으로 고양이의 것인 핵산, 예를 들어 이중 발현 구조체 또는 표적화 벡터 형태인, 부분적으로 고양이의 것인 핵산을 지칭한다.

[0093] "유전자이식 동물"이란, 자체의 세포 일부에 염색체 외 요소로서 존재하거나 자체의 생식 계열 DNA(즉 자체의 세포 대부분 또는 전부의 게놈 서열)에 안정적으로 통합된 이중 핵산 서열을 가지는, 고양이가 아닌 동물, 일반적으로 포유동물을 지칭한다. 본 발명에 있어 부분적으로 고양이의 것인 핵산은, 예를 들어 당 분야에 널리 공지된 방법에 따라 숙주 동물의 배 또는 배 줄기 세포를 유전자 조작함으로써 이러한 유전자이식 동물의 생식 계열에 도입된다.

[0094] “벡터”는 자가 복제 여부에 관계없이 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는데 사용될 수 있는 플라스미드, 바이러스 및 임의의 DNA 또는 RNA 분자를 포함한다.

[0095] 발명의 상세한 설명

- [0096] 본원에 기재된 기술의 실시는, 달리 명시되지 않는 한, 유기 화학, 중합체 기술, 분자 생물학(재조합 기술 포함), 세포 생물학, 생화학 및 서열분석 기술에 대한 통상적인 기술 및 설명을 이용할 수 있으며, 이는 당 분야의 실무자 기술범위내에 있다. 이러한 종래 기술은, 중합체 어레이 합성, 폴리뉴클레오티드의 혼성화 및 결찰, 표지를 이용한 혼성화 검출을 포함한다. 적합한 기술의 구체적인 예시는 본원의 실시예들을 참조하여 수득될 수 있다. 그러나 기타 균등한 종래의 방법도 물론 사용될 수 있다. 이러한 종래의 기술 및 설명은 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대 문헌[Green, et al., Eds. (1999), Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV); Weiner, Gabriel, Stephens, Eds. (2007), Genetic Variation: A Laboratory Manual; Dieffenbach and Veksler, Eds. (2007), PCR Primer: A Laboratory Manual; Bowtell and Sambrook (2003), DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual; Mount (2004), Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis; Sambrook and Russell (2006), Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual; and Green and Sambrook (2012), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (all from Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th Ed.) W.H. Freeman, New York N.Y.; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London; Nelson and Cox (2021), Lehninger, Principles of Biochemistry 8e, W. H. Freeman Pub., New York, N.Y.; and Berg et al. (2019) Biochemistry, 93, Macmillan Pub., New York, N.Y.](상기 문헌들은 모두 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에서 살펴볼 수 있다.
- [0097] 본원과 이에 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같은 단수형을 나타내는 "한(a)", "하나의(an)" 및 "본(the)"는 문맥상 명백하게 달리 명시하지 않는 한 복수형을 포함한다는 점에 유의한다. 따라서, 예를 들어 "유전자좌"에 대한 언급대상은 1개 이상의 유전자좌를 지칭하고, "본 방법"에 대한 언급대상은 당업자에게 공지된 균등한 단계 및 방법 등에 대한 언급대상을 포함한다.
- [0098] 본원에 사용된 바와 같이, "또는"이란 용어는, 대안만을 지칭하도록 명시적으로 나타내지 않거나 대안이 상호 배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미할 수 있다. "~을 포함하는", "~을 포함한다" 및 "~에 포함된다"이라는 용어는 제한적인 것이 아니다.
- [0099] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는, 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 가진다. 본원에 언급된 모든 간행물은 현재 기재된 발명과 관련하여 사용될 수 있는 장치, 제형 및 방법론을 기술하고 개시할 목적으로 참고문헌으로서 포함된다.
- [0100] 어떤 값들의 범위가 제공되는 경우, 해당 범위의 상한과 하한 사이 각각의 중간 값과 해당 범위의 임의의 기타 진술된 값 또는 중간 값이 본 발명에 포함되는 것으로 이해된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 진술된 범위에서 구체적으로 제외된 임의의 한계에 따라 본 발명에 포함된다. 진술된 범위가 한계들중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 포함된 한계들중 하나 또는 둘 다를 제외하는 범위도 또한 본 발명에 포함된다.
- [0101] 이하 발명의 설명에서, 본 발명의 더욱 철저한 이해를 제공하기 위해 다양한 구체적 세부 사항이 제시된다. 그러나, 본 발명이 이러한 구체적 세부사항중 1개 이상이 없이도 실시될 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 경우, 본 발명이 모호해지는 것을 피하기 위해 당업자에게 널리 알려진 특징 및 절차는 설명되지 않았다.
- [0102] 체액성 면역계에서, 다양한 항체 레퍼토리는 V(D)J 재조합이라 칭하여지는 방법에 의해 IGH 및 IGL 사슬 유전자 좌위의 조합적 및 접합적 다양성에 의해 제조된다. 발달 중인 B 세포에서 제1 재조합 이벤트는 중쇄 유전자좌의 D 유전자 분절 1개와 J 유전자 분절 1개 사이에서 발생하며, 이 2개의 유전자 분절들 사이의 DNA는 결실된다. 이 D-J 재조합 이후에는 신생되는 DJ 복합체의 상류 영역으로부터 유래하는 1개의 V 유전자 분절의 접합이 진행되고, 그 결과 재배열된 VDJ 엑손이 생성된다. 신생된 VDJ 엑손의 재조합된 V 유전자 분절 및 D 유전자 분절 사이의 기타 모든 서열은 개별 B 세포의 게놈에서 결실된다. 이처럼 재배열된 엑손은 궁극적으로 B 세포 표면에서 H 사슬 폴리펩티드의 가변 영역으로서 발현되며, 이 H 사슬 폴리펩티드는 L 사슬 폴리펩티드와 결합하여 B 세포 수용체(BCR)를 형성한다. 마우스 및 고양이 Ig 유전자좌들은 그것들이 함유된 특징의 수와, V(D)J 재배열에 의해 그것들의 암호화 영역이 다양해지는 방식에 있어 매우 복잡하지만; 이러한 복잡성은 각각의 가변 영역 유전자 분절의 구조에 관한 기본적 세부사항으로 확장되지 않는다. V, D 및 J 유전자 분절은 그 조성과 조직이 균일하다. 예를 들어 V 유전자 분절은, 면역글로불린 유전자좌에서 본질적으로 불변하는 순차적 방식으로 배열되는 이하의 특징들을 가진다: 짧은 전사 프로모터 영역(길이 < 600 bp); 항체 사슬에 대한 신호 펩티드 대부분을 암호화하는 엑손; 인트론; 항체 사슬 신호 펩티드의 작은 부분과 항체 가변 도메인 대부분을 암호화하는 엑손; 그

리고 V(D)J 재배열에 필요한 3' 재조합 신호 서열. 마찬가지로 D 유전자 분절은 이하의 특징을 가진다: 5' 재조합 신호 서열, 암호화 영역 및 3' 재조합 신호 서열. J 유전자 분절은 이하의 특징을 가진다: 5' 재조합 신호 서열, 암호화 영역 및 3' 스플라이싱 공여 서열.

- [0103] 일 측면에서, 포유동물 숙주 게놈의 면역글로불린 유전자좌에 존재하는 고양이 가변 영역 암호화 서열 및 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열, 예를 들어 숙주 포유동물이 마우스일 때 마우스 게놈 비암호화 서열을 포함하는 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 핵산 서열을 포함하는, 고양이가 아닌 포유동물의 세포가 제공된다.
- [0104] 고양이가 게놈  $V_H$  영역은 대략 24개의  $V_H$  유전자 분절 및 5개의  $J_H$  유전자 분절을 포함한다.  $D_H$  유전자 분절의 수는 아직 정확하게 규정되지 않았지만, 모든 유전자 분절은 아비시니안 고양이 품종의 고양이 염색체 B3에 대해 맵핑(mapping)한다. 카파( $\kappa$ ) 암호화 영역은 약 200 kb에 걸쳐 존재하는 고양이 염색체 A3에 대해 맵핑하며, 약 12개의 기능성  $V_\kappa$  유전자, 5개의  $J_\kappa$  유전자 및 1개의  $C_\kappa$  유전자를 포함한다. 람다( $\lambda$ ) 암호화 영역은 약 1000 kb에 걸쳐 존재하는 고양이 염색체 D3에 대해 맵핑하며, 약 32개의 기능성  $V_\lambda$  유전자, 10개의 기능성  $J_\lambda$  유전자 및 12개의  $C_\lambda$  유전자를 포함하되, 그중 단 5개만이 기능을 가진다. 고양이가 IGL 유전자좌에는 분명히 기능이 아닌  $V_\lambda$  유전자 분절이 높은 빈도(약 62/94)로 함유되어 있다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 H 및  $\kappa$  및  $\lambda$ L 사슬 유전자좌에서, 모든  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  분절과 모든  $V_L$  및  $J_L$  분절에는, 마우스 RSS가 축적하며, B 세포 발달 동안의 재배열과, 유전자이식 마우스의 부분적으로 고양이의 것인 항체 레퍼토리에 대한 기여가 촉진된다.
- [0105] 인간 및 마우스와 마찬가지로 고양이도 2개의 유형의 Ig 경쇄( $\kappa$  및  $\lambda$ )를 발현한다. 그러나  $\kappa$  대  $\lambda$  비율은 이들 동물마다 유의미하게 상이하다. 마우스에 있어 혈청 항체중 경쇄 약 96%가  $\kappa$  유형인 반면, 인간에 있어  $\kappa$  유형은 전체 Ig L 사슬 모집단의 66%에 불과하다. 대조적으로, 고양이의 L 사슬 레퍼토리에  $\lambda$ 가 지배적으로 존재한다(95%).
- [0106] *Igh*, *Ig $\kappa$*  또는 *Ig $\lambda$*  유전자좌에 통합된, 부분적으로 고양이의 것인 핵산 서열은 유전자이식 동물이, 고양이가  $\kappa$  또는  $\lambda$  가변 영역과 쌍을 형성하는 고양이 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 제조하는 것을 허용한다. 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 가변 영역 유전자좌는 숙주에서의 효율적인 항체 제조 및 항원 인지를 촉진하는데 도움이 되는 숙주 게놈(예컨대 설치류 게놈)의 개재 서열 내부에 조절 서열 및 기타 요소를 보유한다.
- [0107] 일 측면에서, 면역글로불린  $V_H$ ,  $V_\lambda$  또는  $V_\kappa$  유전자좌로부터 유래하는 고양이 암호화 서열 및 고양이의 것이 아닌 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함하여, 합성 또는 재조합에 의해 제조된 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌가 제공된다.
- [0108] 일 측면에서, 합성 H 사슬 DNA 분절은 이하 요소들중 1개 이상을 함유한다: 음성 생식능에 필요한 ADAM6 유전자, *Igh* 유전자좌 수축에 관여하는 Pax-5 활성화 유전자간 반복(PAIR) 요소, 정상적 VDJ 재배열 조절에 관여하는 것으로서, 중쇄 유전자간 제어 영역 1로부터 유래하는 CTCF 결합 부위[(Proudhon, et al., *Adv. Immunol.*, 128:123-182 (2015))] 또는 이들의 조합. 마우스 *Igh* 유전자좌의 이러한 내인성 비암호화 조절 및 스캐폴드 서열의 위치는 도 1에 도시되었는데, 이 도 1에는 좌측에서 우측으로 이하의 것들이 도시되어 있다: 약 100개의 기능성 중쇄 가변 영역 유전자 분절; PAIR, 즉 VDJ 재조합을 위한 *Igh* 유전자좌 수축에 관여하는 Pax-5 활성화 유전자간 반복부; Adam6a, 즉 음성 생식능에 필요한 메탈로펩티다아제 도메인 6A 유전자 및 디스인테그린; pre-D 영역, 즉 가장 원위의  $D_H$  유전자 분절의 상류 21609 bp 단편, *Ighd-5*;  $V_H$  유전자 분절 선호도를 조절하는 CTCF 분리인자 부위를 함유하는 유전자간 제어 영역 1(IGCR1);  $D_H$ , 즉 다양성 유전자 분절(마우스 계통에 따라 10개 ~ 15개); 4개의 접합  $J_H$  유전자 분절;  $E_\mu$ , 즉 VDJ 재조합에 관여하는 인트론 인핸서;  $S_\mu$ , 즉 아이소타입 스위칭을 위한  $\mu$  스위치 영역; 8개의 중쇄 불변 영역 유전자:  $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_\gamma 3$ ,  $C_\gamma 1$ ,  $C_\gamma 2b$ ,  $C_2\gamma a/c$ ,  $C_\epsilon$  및  $C_\alpha$ ; 아이소타입 스위칭과 체세포 과다돌연변이를 제어하는 3' 조절 영역(3'RR). 도 1은 문헌(Proudhon, et al., *Adv. Immunol.*, 128:123-182 (2015))에서 발췌한 그림을 수정한 것이다.
- [0109] 일 측면에서, 포유동물 숙주 세포에 통합될 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 공지된 고양이  $V_H$  유전자 분절 전부 또는 상당 수를 포함한다. 그러나 몇몇 경우에 있어 이러한  $V_H$  유전자 분절의 하위세트를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 일 측면에서, 고양이가  $V_H$  암호화 서열 심지어 1개일지라도 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌에 포함될 수 있다.

- [0110] 일 측면에서, 고양이가 아닌 포유동물 또는 이의 것이 아닌 포유동물 세포는 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 암호화 서열을 포함하는, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌를 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 고양이가 아닌 포유동물 숙주의 내인성  $Igh$  유전자좌를 기반으로 한 비암호화 조절 및 스캐폴드 서열, 예를 들어 pre-D 서열을 포함한다. 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌는 완전히 재조합된 V(D)J 엑손을 포함한다.
- [0111] 일 측면에서, 고양이가 아닌 유전자이식 포유동물은, 설치류의 개재(비암호화 조절 또는 스캐폴드) 서열을 기반으로 한 개재 서열, 예컨대 pre-D 영역과 고양이  $V_H$ ,  $D_H$ ,  $J_H$  유전자를 포함하는 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 설치류, 예를 들어 마우스이다. 일 측면에서, 유전자이식 설치류는 고양이  $V_k$  또는  $V_\lambda$  암호화 서열, 고양이  $J_k$  또는  $J_\lambda$  암호화 서열 각각과, 개재 서열, 예를 들어 설치류  $IgI$  유전자좌에 존재하는 비암호화 조절 또는 스캐폴드 서열을 포함하는, 부분적으로 고양이의 것인 IGL 유전자좌를 추가로 포함한다.
- [0112] 일 측면에서, 마우스 계놈의 전체 내인성  $V_H$  면역글로불린 유전자좌는 결실되고, 마우스 계놈 J558  $V_H$  유전자좌의 비암호화 서열 및 기능성 고양이  $V_H$  유전자 분절 24개로 치환된다. 일 측면에서, 이중 면역글로불린 유전자좌는 고양이  $D_H$  및 5개의  $J_H$  유전자 분절을 포함한다. 일 측면에서, 이중 면역글로불린 유전자좌는 마우스 pre-D 영역을 포함한다. 일 측면에서, 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  암호화 서열은 설치류 비암호화 서열에 내포되어 있다.
- [0113] 일 측면에서, 상동성 재조합과 부위 특이적 재조합의 조합은 유전자이식 세포 및 동물을 제조하는데 사용된다. 일 측면에서, 상동성 표적화 벡터는 내인성 면역글로불린 유전자좌의 원하는 위치에 있는 포유동물 숙주 세포 계놈에 서열 특이적 재조합 부위를 도입하는데 사용된다. 일 측면에서, 서열 특이적 재조합 부위는 상동성 재조합에 의해 포유동물 숙주 세포의 계놈에 삽입되고, 포유동물 숙주 세포내 기타 임의의 유전자의 발현 또는 암호화 서열에 영향을 미치지 않는다. 일 측면에서, 전사되고 번역되어 항체를 생성할 면역글로불린 유전자의 능력은 재조합 부위와, 선택적으로는 선택 마커 유전자와 같은 임의의 추가 서열이 삽입된 후에도 유지된다. 그러나 몇몇 경우에 있어, 기타 이중 서열이 면역글로불린 유전자좌 서열에 삽입될 수 있으며, 이로부터 생성된 항체 분자의 아미노산 서열은 삽입에 의해 변경되되, 이 항체는 원하는 목적에 충분한 기능을 유지한다. 일 측면에서, 1개 이상의 다형성이 불변 영역 엑손의 내인성 유전자좌에 도입되고, 이로써 알로타입 마커가 제공되어 상이한 Ig 대립유전자가 구별될 수 있게 된다.
- [0114] 일 측면에서, 상동성 표적화 벡터는 내인성 면역글로불린 유전자좌 내부의 서열을 치환할 뿐 아니라, 서열 특이적 재조합 부위 및 1개 이상의 선택 마커 유전자를 숙주 세포 계놈에 삽입하는데 사용된다. 당업자는 본원에 사용된 바와 같은 선택 마커 유전자가 상동성 재조합을 겪지 않은 세포 또는 표적화 벡터의 무작위 통합을 보유하는 세포를 동정하고 제거하는데 이용될 수 있음을 이해한다.
- [0115] 상동성 재조합을 위한 방법은 공지되어 있으며, 각각이 그 전체로서 참고문헌으로 인용된 미국 특허 제 6,689,610호; 동 제6,204,061호; 동 제5,631,153호; 동 제5,627,059호; 동 제5,487,992호; 및 동 제5,464,764호에 기재된 것들을 포함한다.
- [0116] 부위/서열 특이적 재조합
- [0117] 부위/서열 특이적 재조합은, 재조합효소에 의한 인지에 필요한 짧고 특이적인 DNA 서열이 재조합이 일어나는 유일한 부위라는 점에서, 상동성 재조합과 상이하다. 특정 DNA 가닥 또는 염색체에 있는 이들 부위의 방향에 따라, 이들 특이적 서열을 인지하는 특화된 재조합효소는 i) DNA 절제 또는 ii) DNA 역전 또는 회전을 촉매화할 수 있다. 부위 특이적 재조합은 또한 만일 이러한 부위가 동일한 염색체에 존재하지 않으면 2개의 DNA 가닥 사이에서 발생할 수 있다. 각각 재조합효소와 이의 동족 인지 부위를 포함하는 다수의 박테리오파아지 및 효모 유래 부위 특이적 재조합 시스템, 예컨대 박테리오파아지 P1 Cre/lox 시스템, 효모 FLP-FRT 시스템, 그리고 부위 특이적 재조합효소의 티로신 과 Dre 시스템을 포함하되 이에 한정되지 않는 시스템은 진핵생물 세포에서 작동하는 것으로 보였다. 이러한 시스템과 방법은, 예를 들어 각각이 참고문헌으로서 본원에 포함된 미국특허 제 7,422,889호; 동 제7,112,715호; 동 제6,956,146호; 동 제6,774,279호; 동 제5,677,177호; 동 제5,885,836호; 동 제5,654,182호; 및 동 제4,959,317호에 기재되어 있다.
- [0118] 부위 특이적 재조합효소의 기타 티로신 과 시스템, 예컨대 박테리오파아지 람다 인테그라아제, HK2022 인테그라아제, 그리고 재조합효소의 세린 과에 속하는 시스템, 예컨대 박테리오파아지 phiC31 및 R4Tp901 인테그라아제

를 포함하되 이에 한정되는 것은 아닌 시스템이 사용될 수 있다.

- [0119] 부위 특이적 재조합은 2개의 상이한 DNA 가닥 사이에서 일어날 수 있기 때문에, 부위 특이적 재조합은 재조합효소 매개 카세트 교환(RMCE)이라고 칭하여지는 과정에 의해 이중 면역글로불린 유전자좌를 숙주 세포 게놈에 도입하는데 사용될 수 있다. RMCE 과정은 재조합효소 단백질에 대한 야생형 및 돌연변이 서열 특이적 재조합 부위를 사용하여 이용될 수 있다. 예를 들어 표적화될 염색체상 유전자좌의 한쪽 말단에는 야생형 LoxP 부위가 축적할 수 있고, 또 다른쪽 말단에는 돌연변이 LoxP 부위가 축적할 수 있다. 마찬가지로 벡터는, 한쪽 말단에는 야생형 LoxP 부위가 축적하고, 또 다른쪽 말단에는 돌연변이 LoxP 부위가 축적하는 숙주 세포 게놈에 삽입될 이중 서열을 포함할 수 있다. 벡터가 Cre 재조합효소의 존재하에 숙주 세포를 형질감염시킬 때, Cre 재조합효소는 동일한 DNA 가닥에 대한 절제 반응을 촉매화하기보다는 내인성 DNA 가닥과 벡터의 DNA 사이의 RMCE를 촉매할 것인데, 그 이유는 각각의 DNA 가닥상 야생형 LoxP 부위 및 돌연변이 LoxP 부위는 서로 재조합에 대해 양립불가능하다. 그러므로 DNA 가닥 1개상 LoxP 부위는 또 다른 DNA 가닥상 LoxP 부위와만 재조합할 것이고; 마찬가지로 DNA 가닥 1개상 돌연변이 LoxP 부위는 또 다른 DNA 가닥상 돌연변이 LoxP 부위와만 재조합할 것이다.
- [0120] 일 측면에서, RMCE용 재조합효소와 동일한 재조합효소에 의해 인지되는 서열 특이적 재조합 부위의 변이체가 사용된다. 이러한 서열 특이적 재조합 부위 변이체의 예로서는, 역전된 반복부의 조합을 함유하는 것 또는 돌연변이 스페이스 서열과 재조합 부위를 포함하는 것을 포함한다. 예를 들어, 안정적인 Cre-loxP 통합 재조합을 조작하는데 변형 재조합효소 부위 군 2개가 사용될 수 있다. 둘 다는 8 bp 스페이스 영역 또는 13 bp 역 반복부 내부에서 Cre 인지 서열의 서열 돌연변이를 이용한다. 스페이스 돌연변이체, 예컨대 lox511[Hoess, et al., *Nucleic Acids Res*, 14:2287-2300 (1986)], lox5171 및 lox2272[Lee and Saito, *Gene*, 216:55-65 (1998)], m2, m3, m7 및 m11[Langer, et al., *Nucleic Acids Res*, 30:3067-3077 (2002)]은 스스로 용이하게 재조합하지만, 야생형 부위와의 재조합 비율은 현저하게 감소하였다. 이러한 돌연변이체 군은 비상호작용 Cre-Lox 재조합 부위 및 비상호작용 FLP 재조합 부위가 사용되는, RMCE에 의한 DNA 삽입에 이용되었다[Baer and Bode, *Curr Opin Biotechnol*, 12:473-480 (2001); Albert et al., *Plant J*, 7:649-659 (1995); Seibler and Bode, *Biochemistry*, 36:1740-1747 (1997); Schlake 및 Bode, *Biochemistry*, 33:12746-12751 (1994)].
- [0121] 역전된 반복부 돌연변이체는 변이체 재조합효소 부위의 또 다른 군이다. 예를 들어 LoxP 부위는 좌측 역전 반복부(LE 돌연변이체) 또는 우측 역전 반복부(RE 돌연변이)에 변경된 염기를 함유할 수 있다. LE 돌연변이체 lox71은 야생형 서열에서 TACCG로 변경된, 좌측 역전 반복부의 5' 말단상 5 bp를 차지한다[Araki, et al, *Nucleic Acids Res*, 25:868-872 (1997)]. 마찬가지로 RE 돌연변이체 lox66은 CGGTA로 변경된, 3'에 가장 가까운 5개의 염기를 가진다. 역전 반복부 돌연변이체는 "공여체" RE 돌연변이체가 재조합되는 "표적" 염색체 loxP 부위로 지정된 LE 돌연변이체와 함께 염색체 DNA에 플라스미드 삽입물을 통합하는데 사용된다. 재조합 후 loxP 부위는 삽입된 분절에 축적하여 시스(cis) 방식으로 위치하게 된다. 재조합 메커니즘은, 재조합 후 1개의 loxP 부위가 이중 돌연변이체(LE 및 RE 역전 반복부 돌연변이 둘 다를 함유함)이고, 또 다른 하나는 야생형인 경우이다[Lee and Sadowski, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 80: 1-42(2005); Lee and Sadowski, *J Mol Biol*, 326:397-412 (2003)]. 이중 돌연변이체는 Cre 재조합효소에 의해 인지되지 않고, 삽입된 분절이 절제되지 않는다는 점에서 야생형 부위와 충분히 상이하다.
- [0122] 일 측면에서, 서열 특이적 재조합 부위는 항체 발현에 사용되는 암호화 서열 또는 조절 서열의 파괴를 피하기 위해 암호화 또는 조절 서열보다는 인트론에 도입된다.
- [0123] 서열 특이적 재조합 부위의 도입은 종래의 상동성 재조합 기술에 의해 달성될 수 있다. 이러한 기술은 참고문헌, 예를 들어 문헌[Green and Sambrook (2012) (*Molecular cloning: a laboratory manual 4th ed.* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press) and Nagy, A. (2003). (*Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, 3rd ed. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press))]에 기재되어 있다.
- [0124] 게놈으로의 특이적 재조합은 당업계에 공지된 바와 같은 양성 또는 음성 선택을 위해 디자인된 벡터가 사용되어 촉진될 수 있다. 치환 반응을 거친 세포의 동정을 용이하게 하기 위해, 적당한 유전자 마커 시스템이 사용될 수 있으며, 세포는, 예를 들어 선택 조직 배양 배지가 사용되어 선택될 수 있다. 일 측면에서, 이중 서열의 2개의 말단 지점에 있거나 이에 인접해 있는 핵산 서열, 예를 들어 마커 시스템 또는 유전자는 이중 핵산을 함유하는 세포의 선택 후 제거될 수 있다.
- [0125] 일 측면에서, 내인성 면역글로불린 유전자좌가 결실된 세포는 마커 유전자를 사용하는 것에 대해 양성 선택될 수 있는데, 이 마커 유전자는 선택적으로 재조합 이벤트 이후 또는 그 결과로서 세포로부터 제거될 수 있다. 사

용될 수 있는 양성 선택 시스템은, 재조합 이벤트를 통해 합쳐지는 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(HPRT)와 같은 마커 유전자의 비기능성 부분 2개를 사용하는 것을 기반으로 한다. 일 측면에서, 비기능성 부분 2개는 내인성 면역글로불린 유전자좌가 이중 면역글로불린 유전자좌로 성공적으로 치환됨에 따라 기능적으로 결합된다. 일 측면에서, 기능적으로 재구성된 마커 유전자의 양쪽중 어느 한쪽에는 (치환 반응에 사용된 서열 특이적 재조합 부위와는 상이한) 추가의 서열 특이적 재조합 부위가 축적하는 관계로, 마커 유전자는 적당한 부위 특이적 재조합효소가 사용되어 게놈으로부터 절제될 수 있다. 또 다른 측면에서, 세포는 독소 또는 약물에 노출되는 것에 대해 음으로 선택된다. 예를 들어 표적화 구조체가 상동성 재조합에 의해 통합되지 않되, 게놈에 무작위로 통합되는 세포는, 만일 HSV-TK 유전자가 상동성 영역 외부에 위치하면 단순 포진 바이러스-티미딘 키나아제(HSV-TK)의 발현을 유지할 것이다. 이러한 세포는 간시클로버와 같은 뉴클레오시드 유사체를 사용하는 것에 대해 선택될 수 있다.

[0126] 일 측면에서, 재조합효소는 정제된 단백질로 제공된다. 일 측면에서, 재조합효소는 숙주 세포를 일시적으로 형질감염시키거나 숙주 세포 게놈에 안정하게 통합된 벡터 구조물로부터 발현된 단백질로서 제공된다. 대안적으로, 이중 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 유전자이식 동물은 재조합효소를 발현하는 동물과 교배될 수 있다.

[0127] 일 측면에서, 2개 이상의 서열 특이적 재조합 부위 세트는 조작된 게놈에 포함되고, RMCE의 라운드 다수 회가 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 가변 영역 유전자좌를 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포 게놈에 삽입하기 위해 이용될 수 있다.

[0128] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 CRISPR 기술이 사용되어 도입된다. 예를 들어 CRISPR/Cas9 게놈 편집 시스템은 표적화된 재조합을 위해 사용될 수 있다[He, et al., Nuc. Acids Res., 44:e85, (2016)].

[0129] 유전자이식 동물의 제조

[0130] 일 측면에서 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 유전자이식 동물, 예를 들어 설치류, 예를 들어 마우스를 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0131] 일 측면에서, 유전자이식 동물의 B 세포가 세포당 1개를 초과하는 기능성  $V_H$  도메인을 발현할 수 있도록, 유전자 이식 동물의 게놈이 변형되는데, 즉 세포는 그 개시내용이 본원에 참고문헌으로 포함된 WO 2017/035252(2016년 8월 24일에 출원, 발명의 명칭 'Enhanced Production of Immunoglobulins')에 기재된 바와 같은 이중특이적 항체를 제조한다.

[0132] 일 측면에서, 유전자이식 동물의 게놈은, 이 유전자이식 동물의 B 세포가 중쇄는 포함하지만 경쇄는 포함하지 않는 항체를 발현할 수 있도록, 즉 세포가 중쇄만의 항체를 제조하도록 변형된다.

[0133] 일 측면에서, 숙주 세포는 배 줄기(ES) 세포인데, 이는 이후 유전자이식 포유동물을 제조하는데 사용될 수 있다. 일 측면에서, 본 방법은 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 배 줄기 세포를 단리한 후, 이 ES 세포를 사용하여 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 유전자이식 동물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0134] 실시예

[0135] 이하의 실시예들은 당업자에게 본 발명을 어떻게 제조 및 사용하는지에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제시되며, 이것들은 발명가가 자신의 발명으로 간주하는 범위를 제한하려는 의도는 없으며, 또한 이하의 실험이, 수행된 실험 전체 또는 유일한 실험임을 나타내거나 암시하려는 의도도 없다. 당업자는 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형 또는 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서 실시예들은 제한적인 것이 아니라 예시적인 것으로 간주되어야 한다.

[0136] 사용된 용어 및 숫자(예컨대 벡터, 양, 온도 등)에 대한 정확성을 보장하기 위한 노력이 이루어졌지만, 몇몇 실험상 오류 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 단위이고, 압력은 대기압 또는 대기압에 가까운 압력이다.

[0137] 실시예들은 RMCE를 통한 합성 DNA의 재조합 및 도입 부위에 축적하는 3' 벡터 및 5' 벡터 둘 다에 의한 표적화를 기재한다. 발명의 설명을 읽으면, 5' 벡터 표적화가 먼저 일어나고 3' 벡터 표적화가 후속될 수 있거나, 3' 벡터 표적화가 먼저 일어나고 5' 벡터 표적화가 후속될 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 몇몇 상황에

서 이중 탐지 메커니즘을 통해 타겟팅이 동시에 수행될 수 있다. 5' 벡터 또는 3' 벡터가 적절하게 통합된 세포를 선택하기 위해 각각의 실시예에서 몇 가지 상이한 전략이 사용되지만, 이러한 전략은 사소한 수정을 통해 Igh, Igk 또는 Igl 유전자좌 표적화에 대해 상호 교환 가능하다는 것도 또한 명료할 것이다.

[0138] 실시예 1: 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 가변 영역 유전자좌의 고양이가 아닌 포유동물 숙주 세포 계놈의 면역글로불린 H 사슬 가변 영역 유전자 좌위에서의 도입

[0139] 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌의 비포유동물 ES 세포의 계놈 유전자좌에서의 도입을 설명하는 예시적인 방법이 도 2 ~ 도 4에 도시되어 있다. 도 2는 내인성  $V_H$  유전자 분절의 상류(5')에 부위 특이적 재조합 서열을 도입하기 위한 방법을 도시한다. 2개의 상이한 재조합효소 인지 부위(예컨대 F1p 및 Cre에 대한 FRT(207) 및 loxP(205) 각각)와, 각각의 야생형 대응물/부위(즉 야생형 FRT(207)와 야생형 loxP(205))와 재조합하는 능력이 결여된 2개의 상이한 돌연변이체 부위(예컨대 변형된 돌연변이체 FRT(209) 및 돌연변이체 loxP(211))가 축적하는 퓨로마이신 포스포트랜스퍼라아제-티미딘 키나아제 융합 단백질(Puro-TK)(203)을 포함하는 5' 상동성 표적화 벡터(201)가 제공된다. 표적화 벡터는 세포의 음성 선택에 사용하기 위한 디프테리아 독소 수용체(DTR) cDNA(217)를 포함한다. 표적화 벡터는 또한, 선택적으로 녹색 형광 단백질(GFP)과 같은 시각적 마커를 포함한다(보이지 않음). 영역들(213 및 215)은, 고양이의 것이 아닌 내인성  $V_H$  유전자 분절을 포함하는 계놈 영역의 5'에 있는, 고양이의 것이 아닌 내인성 유전자좌내 인접 영역(229)의 5' 및 3' 부분과 각각 상동성이다. 상동성 표적화 벡터(201)는 내인성  $V_H$  유전자 분절(219), pre-D 영역(221),  $D_H$  유전자 분절(223),  $J_H$  유전자 분절(225) 및 면역글로불린 불변 유전자 영역 유전자(227)를 포함하는 면역글로불린 유전자좌(231)를 가지는 ES 세포로 도입된다(202). 상동성 표적화 벡터(201)로부터 유래하는 DTR cDNA 및 부위 특이적 재조합 서열은 내인성 마우스  $V_H$  유전자 좌위의 5' 부위에서 고양이의 것이 아닌 계놈으로 통합되어(204), 233에 예시된 계놈 구조를 형성한다.

[0140] 마우스 배 줄기(ES) 세포(C57B1/6NTac 마우스로부터 유래)는 공지된 방법에 따라 5' 벡터(201)가 이용되어 전기천공법으로 형질감염된다. 전기천공법 이전에 벡터 DNA는 원핵생물의 플라스미드 서열이나 이와 결합된 폴리링커만 절단하는 희귀 절단 제한효소로 선형화된다. 형질감염된 세포는 도말되고, 약 24시간 이후에는 자체의 DNA에 5' 벡터가 통합된 세포가 선택되는 상황에 놓인다. 자체의 계놈에 5' 벡터(201)가 통합되지 않은 ES 세포는, 배양 배지에 퓨로마이신을 포함시켜 선택(사멸)될 수 있으며; 자체의 계놈에 5' 벡터(201)가 안정적으로 통합되고, Puro-TK 유전자를 구성적으로 발현하는 ES 세포만이 퓨로마이신에 내성을 보인다.

[0141] 약물 내성 ES 세포의 콜로니는 약 1 주일 이후에 육안으로 볼 수 있게 된 후 자체의 평판에서 물리적으로 추출된다. 이렇게 선별된 콜로니는 해체(disaggregating)되고, 마이크로웰 평판에 다시 도말되며, 수 일 동안 배양된다. 그 다음, 세포 클론 각각은 분할되는데, 일부 세포는 아카이브(archive)로서 동결되고, 나머지는 분석 목적의 DNA 단리에 사용된다. 5' 벡터 도입을 위한 1차 스크리닝 방법은 서던 블롯팅(Southern blotting)에 의해 수행될 수 있거나, 서던 블롯팅과 같은 2차 스크리닝 방법을 통한 확인이 동반되는 PCR에 의해 수행될 수 있다.

[0142] ES 세포 클론으로부터 유래하는 DNA는 널리 수행되는 유전자 표적화 검정 디자인이 사용되는 PCR에 의해 스크리닝된다. 이 검정을 위해 PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머 서열들중 하나는 5' 벡터(201)와 계놈 DNA 사이에 공유되는 동일성 영역 외부를 맵핑하는 반면, 또 다른 것은 5' 벡터 내부(예컨대 Puro-TK 유전자)(203)를 맵핑한다. 표준 디자인에 따르면, 이러한 검정은 5' 표적화 벡터와 내인성 마우스 Igh 유전자좌 사이의 상동성 재조합을 진행하는 ES 세포 클론에만 존재하게 될 DNA를 검출한다.

[0143] 서던 블롯 검정은 프로브들과 절단물들의 조합이, 클론내 표적화된 유전자좌의 구조가 상동성 재조합에 의해 적당히 변형된 것으로 동정되는 것이 허용되도록 선택된 다수의 제한효소로 절단된 계놈 DNA 및 3개의 프로브가 사용되는 절차로서, 널리 사용되는 절차에 따라 수행된다. 프로브들중 하나는 5' 표적화 벡터와 계놈 DNA 사이에 공유되는 동일성 영역의 5'쪽에 축적하는 DNA 서열에 대해 맵핑하고; 제2 프로브는 동일성 영역 외부이되 3'쪽에 있는 부분을 맵핑하며; 제3 프로브는 벡터내 계놈 동일성을 보이는 두 팔(arm) 사이의 신규 DNA 내부(예컨대 Puro-TK 유전자)(203)를 맵핑한다. 서던 블롯팅은 외부 프로브들중 하나와 Puro-TK 프로브에 의해 검출된 바와 같이, 변형된 서열, 즉 Igh 유전자좌의 일부인 5' 표적화 벡터와의 상동성 재조합에 의해 변형된 서열에 대응하는 DNA의 예상 제한효소 생성 단편의 존재를 동정한다. 외부 프로브는 상동 염색체상 면역글로불린 Igh 유전자좌의 비돌연변이 복사체로부터 유래한 야생형 단편뿐 아니라, 돌연변이 단편도 검출한다.

[0144] ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은, 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하기 위해 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이러한 이상이 발생한 클

론은 추가 사용에서 제외된다. 서던 블롯팅 데이터를 기반으로 한 예상 게놈 구조는 가지되, 핵형 분석을 기반으로 하였을 때 검출 가능 염색체 이상은 가지지 않는 ES 세포 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0145] 도 3에 도시된 바와 같이, 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(HPRT) 결핍 ES 세포에서 양성 선택을 위해 사용될 수 있는 선택적 HPRT 유전자(335); 네오마이신 내성 유전자(337); Flp 및 Cre에 대한 재조합효소 인지 부위 FRT(307) 및 loxP(305) 각각을 포함하는, 3' 상동성 표적화 벡터(301)가 제공된다. 영역들(329 및 339)은 내인성  $J_H$  유전자 분절(325)의 하류 및 불변 영역 유전자(327)의 상류에 있는 내인성 마우스 유전자좌내 인접 영역(341)의 5' 부분 및 3' 부분에 각각 상동성이다. 상동성 표적화 벡터는, 내인성  $V_H$  유전자 분절(319), pre-D 영역(321),  $D_H$  유전자 분절(323),  $J_H$  유전자 분절(325) 및 불변 영역 유전자(327)를 포함하는 변형 마우스 면역글로불린 유전자좌(331)에 도입된다. 상동성 표적화 벡터의 부위 특이적 재조합 서열들(307, 305), HPRT 유전자(335) 및 네오마이신 내성 유전자(337)는 내인성 마우스 불변 영역 유전자(327)의 상류 마우스 게놈에 통합되고, 그 결과 333에 도시된 게놈 구조가 형성된다.

[0146] 3' 벡터(301)로 변형된 허용 가능 클론은, 선택을 위해 퓨로마이신 대신 네오마이신 또는 HPRT 선택이 사용된다.는 점을 제외하고는, 5' 벡터(201)가 사용된 절차 및 검정과 디자인이 본질적으로 동일한 절차 및 스크리닝 검정이 사용되어 동정된다. PCR 검정, 프로브 및 절단물도 또한 3' 벡터에 의해 변형된 게놈 영역과 부합하도록 맞춤제작된다. ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이러한 이상이 발생한 클론은 추가 사용에서 제외된다.

[0147] 3' 벡터 및 5' 벡터 둘 다에 의해 돌연변이된 ES 세포의 클론, 즉 조작된 돌연변이 둘 다를 운반하는 이중 표적화 세포는 벡터 표적화 및 분석 이후에 단리된다. 클론은 상동 염색체와 달리, 동일한 염색체에서 유전자 표적화를 거쳐야 한다(즉 표적화 벡터에 의해 진행된 조작 돌연변이는 별도의 상동성 DNA 가닥상에서 트랜스(trans)방식으로 발생하기 보다는 오히려 동일한 DNA 가닥상에서 시스방식으로 발생해야 한다). 시스 배열로 발생한 클론은, 게놈 동일성을 보이는 자체의 팔들 사이 2개의 유전자 표적화 벡터(303 및 337)에 존재하는 신규 DNA에 혼성화되는 프로브가 사용되어, 중기 확산의 형광 현장 혼성화와 같은 분석 방법에 의해 트랜스 배열로 발생한 클론과 구별된다. 2가지 유형의 클론은 또한 이 클론을, 만일 표적화 벡터가 시스방식으로 통합되었으면, Cre 재조합효소를 발현하되, HPRT(335) 및 네오마이신 내성(337) 유전자를 결실시킨 벡터로 형질감염시킨 후, 각각의 클론으로부터 유래한 몇몇 세포가 G418/네오마이신에 대한 내성에 대해 테스트되는 "형제자매 선택(sibling selection)" 스크리닝 방법을 통해 클론의 약물 내성 표현형을 분석함으로써 서로 구별될 수 있다. 결과로서 생성된 시스 유래 클론 대다수는 약물에 대한 내성을 보유해야 하는 트랜스 유래 클론과는 대조적으로, G418/네오마이신에도 또한 감수성이다. 중쇄 유전자좌에 조작된 돌연변이가 시스 배열로 발생한 세포의 이중 표적화 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0148] 일단 2개의 재조합 부위가 포유동물 숙주 세포 게놈에 통합되면, 내인성 면역글로불린 유전자좌는 이후 게놈에 통합된 서열 특이적 재조합 부위에 대응하는, 재조합효소 중 하나, 예를 들어 Flp 또는 Cre를 도입함으로써 재조합이 진행된다. Flp 또는 Cre가 존재할 때(306), DTR 유전자(317), 내인성 Igh 가변 영역 유전자 좌위들(319, 323, 325), pre-D 영역(321) 및 HPRT(335)를 포함하는 야생형 loxP 부위 또는 야생형 FRT 부위와, 네오마이신 내성(337) 유전자 사이의 모든 개재 서열이 결실되고, 그 결과 339에 도시된 게놈 구조가 형성된다. 본 절차는 자체의 동족체가 아닌 동일 염색체에서 발생한(즉 트랜스방식이 아닌 시스방식) 2차 표적화에 의존한다. 만일 의도된 바대로 표적화가 시스방식으로 발생하면, 세포는 배지에 도입된 디프테리아 독소에 의한 음성 선택에 감수성이 아닌데, 그 이유는 디프테리아 독소에 대한 감수성을 유발하는 DTR 유전자(317)가 숙주 세포 게놈에 부재(결실)할 것이기 때문이다. 마찬가지로, 1차 또는 2차 표적화 벡터(들)의 무작위 통합을 포함하는 ES 세포는 결실되지 않은 DTR 유전자의 존재로 인해 디프테리아 독소에 대해 감수성이 되었다.

[0149] 자체의 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 상동성 복사체 2개중 하나에 서열 결실을 운반하는 ES 세포 클론은 Cre 재조합효소 발현 벡터와, 마우스 비암호화 서열에 내포된 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절 암호화 서열을 함유하는, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하는 벡터로 재형질감염된다. 도 4는 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 내인성  $V_H$  및  $J_H$  유전자 좌위 사이 개재 서열을 포함하여, 중쇄 가변 영역 도메인을 암호화하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 일부가 결실된, 마우스 게놈으로의 도입을 도시하고 있다. 고양이가 아닌 숙주의 게놈에 삽입될, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 부위 특이적 표적화 벡터(441)는 RMCE에 의해 숙주 세포(439)의 변형된 게놈에 도입된다

(402). 부분적으로 고양이의 것인  $V_H$  유전자 좌위(419), 마우스 pre-D 영역(421), 부분적으로 고양이의 것인  $D_H$  유전자 좌위(423), 부분적으로 고양이의 것인  $J_H$  유전자 좌위(425)뿐 아니라, 측접하는 돌연변이 FRT(409), 돌연변이 LoxP(lox5171; 411), 야생형 FRT(407) 및 야생형 LoxP(405) 부위를 포함하는 부위 특이적 표적화 벡터(441)가 RMCE에 의해 숙주 세포에 도입된다(402). 특히 부분적으로 고양이의 것인  $V_H$  유전자 좌위(419)는 고양이의 것이 아닌 내인성 게놈에 존재하는 개재 서열 및 3' RSS 및 기능성 고양이  $V_H$  유전자 분절 암호화 서열 24 개를 포함하며; pre-D 영역(421)은 고양이의 것이 아닌 내인성 게놈의 상류에 존재하는 서열로서, 고양이의 것이 아닌 21.6 kb 서열을 포함하고;  $D_H$  영역(423)은 고양이의 것이 아닌 RSS가 측접하고, 고양이의 것이 아닌 내인성  $D_H$  영역에 존재하는 개재 서열에 내포된 고양이  $D_H$  유전자 분절의 코돈을 포함하며;  $J_H$  유전자 좌위(425)는 고양이의 것이 아닌 5' RSS를 가지고 고양이의 것이 아닌 내인성 게놈에 존재하는 개재 서열에 내포된 고양이  $J_H$  유전자 분절 5개의 코돈을 포함한다. 일 측면에서, 숙주 세포 게놈의 Igh 유전자좌는 도 3과 관련하여 기술된 바와 같이 개재 서열을 포함하는 모든 내인성  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절을 결실시키도록 변형된다. 이 변형의 결과로서, 고양이의 것이 아닌 내인성 Igh 유전자좌(439)는 Puro-TK 융합 유전자(403)와 함께 유지되고, 여기에는 돌연변이 FRT 부위(409)와 돌연변이 LoxP 부위(lox5171; 411) 상류뿐 아니라 야생형 FRT(407) 및 야생형 LoxP(405) 하류가 측접한다. 적당한 재조합효소가 도입될 때(404), 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 유전자좌는 lox5171(411)과 야생형 loxP(405) 부위 사이 내인성 마우스 불변 영역 유전자(427)의 상류 게놈으로 통합되어, 443에 도시된 DNA 영역을 형성한다.

[0150] RMCE 및 부분적으로 고양이의 것인 Igh 유전자좌의 통합이 진행되지 않은 ES 세포는 Puro-TK 융합 유전자(403)를 보유하고, 조직 배양 배지에 간시클로버를 포함시킴으로써 제거된다.

[0151] 현재 주석이 달린 기능성 고양이  $V_H$ ,  $D_H$  및  $J_H$  유전자 분절의 서열은 서열번호 1 ~ 13에 보인다. 고양이 IGH 유전자좌에는 주석이 전체적으로 달려 있지는 않기 때문에, 본원에 기술된 동물, 세포 및 방법에 사용될 수 있는 추가 유전자 분절이 존재한다.

[0152] 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 영역의 통합은 서던 블롯팅에 의해, 또는 서던 블롯팅과 같은 2차 스크리닝 방법에 의한 확인이 동반되는 PCR에 의해 검출될 수 있다. 스크리닝 방법은 삽입된  $V_H$ ,  $D_H$  또는  $J_H$  유전자 좌위뿐만 아니라 개재 서열의 존재를 검출하도록 디자인된다. ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이러한 이상이 발생한 클론은 추가 사용에서 제외된다.

[0153] 마우스 중쇄 유전자좌에 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 중쇄 가변 영역(443)을 운반하는 ES 세포 클론은 표준 절차에 따라 DBA/2 계통으로부터 유래한 마우스 배반포에 미세주사되고, 그 결과 ES 세포 유래 키메라 마우스가 제조된다. 마우스 털에 대한 ES 세포 유래 기여도 수준이 가장 높은 수컷 키메라 마우스가 암컷 마우스와의 교배를 위해 선택된다. 이들 교배로부터 태어난 자손은 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 존재에 대해 분석된다. 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 운반하는 마우스는 마우스 콜로니를 확립하는데 사용된다.

[0154] 실시예 2: 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌의 마우스 게놈의 면역글로불린 카파 사슬 유전자 좌위에의 도입

[0155] 마우스 Igk 유전자좌의 일부를 부분적으로 고양이의 것인 Igk 유전자좌로 치환하는 방법이 도 5에 도시되어 있다. 이 방법은 마우스 게놈에 제1 부위 특이적 재조합효소 인지 서열을 도입하는 단계를 포함하는데, 이 단계를 통해 이 제1 부위 특이적 재조합효소 인지 서열은 마우스 게놈의 내인성  $V_K$ (515) 및  $J_K$ (519) 영역 유전자 분절 클러스터의 5' 또는 3'에 도입될 수 있으며, 이어서 제2 부위 특이적 재조합효소 인지 서열이 마우스 게놈에 도입되고, 이 단계를 통해 제1 서열 특이적 재조합 부위와 아울러 불변 영역 유전자 상류  $V_K$  및  $J_K$  유전자 분절 클러스터를 포함하는 전체 유전자좌(521)가 측접하게 된다. 측접하게 된 영역은 결실되고, 유관 부위 특이적 재조합효소가 사용되어 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자좌로 치환된다.

[0156]  $V_K$ (515) 및  $J_K$ (519) 유전자 분절중 어느 한 쪽에 부위 특이적 재조합 서열을 도입하기 위해 사용된 표적화 벡터는 또한 재조합효소에 의해 여전히 효율적으로 인지되되 비변형 부위들과 재조합하지는 않는, 추가 변형 부위 특이적 재조합 서열을 포함한다. 이 부위는,  $V_K$  및  $J_K$  유전자 분절 클러스터의 결실후 이중 면역글로불린 경쇄

가변 영역 유전자좌가 변형된  $V_k$  유전자좌에 RMCE를 통해 삽입되는 2차 부위 특이적 재조합 이벤트에 사용될 수 있도록 표적화 벡터에 위치하게 된다. 이 실시예에서, 이중 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자좌는 고양이  $V_k$  및  $J_k$  유전자 분절 및 마우스  $Igk$  가변 영역 비암호화 서열을 포함하는 합성 핵산이다.

[0157] 앞서 개략적으로 제시된 방법을 수행하기 위해 2개의 유전자 표적화 벡터가 구성된다. 벡터(503)들중 하나는 가장 원위의  $V_k$  유전자 분절(515) 상류 유전자좌의 5' 말단으로부터 취하여진 마우스 게놈 DNA(525 및 541)를 포함한다. 또 다른 벡터(505)는  $J_k$  유전자 분절(519)의 하류(3') 및 불변 영역 유전자(521)의 상류 내부로부터 취하여진 마우스 게놈 DNA(543 및 549)를 포함한다.

[0158] 5' 벡터(503)의 핵심적인 특징은 이하와 같다: 폴리오마 바이러스 유래 돌연변이 전사 인핸서(423) 2개에 결합된 변형 단순 포진 바이러스 I형 티미딘 키나아제 유전자 프로모터의 전사 제어하에 있는, 디프테리아 독소 A 서브유닛(DTA)을 암호화하는 유전자; 카파 사슬 유전자좌에서 가장 원위에 있는 가변 영역 유전자의 상류를 맵핑하는 6 Kb의 마우스 게놈 DNA(525); Flp 재조합효소에 대한 FRT 인지 서열(527); 마우스 Polr2a 유전자 프로모터를 함유하는 게놈 DNA 조각(529); 번역 개시 서열(535, "Kozak" 공통 서열에 내포된 메티오닌 코돈); Cre 재조합효소에 대한 돌연변이 loxP 인지 서열(lox5171)(531); 전사 종결/폴리아데닐화 서열(533); Cre 재조합효소에 대한 loxP 인지 서열(537); 마우스 포스포글리세레이트 키나아제 1 유전자로부터 유래한 프로모터의 전사 제어 하에 있는, 절단된 형태의 티미딘 키나아제에 융합된 퓨로마이신에 대한 내성을 부여하는 단백질이 포함된 융합 단백질을 암호화하는 유전자(pu-TK)(539); 벡터의 5' 말단에서 6 Kb 서열에 가까운 부분을 맵핑하고, 상대적 원산 방향으로 배열된, 2.5 Kb의 마우스 게놈 DNA(541).

[0159] 3' 벡터(505)의 핵심적인 특징은 이하와 같다:  $J_k$ (519)와  $C_k$ (521) 유전자 좌위 사이 인트론 내부를 맵핑하는 6 Kb의 마우스 게놈 DNA(543); 마우스 Polr2a 유전자 프로모터의 전사 제어하에 있는 인간 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(HPRT)를 암호화하는 유전자(545); 마우스 포스포글리세레이트 키나아제 1 유전자 프로모터의 제어하에 있는 네오마이신 내성 유전자(547); Cre 재조합효소에 대한 loxP 인지 서열(537); 벡터의 5' 말단에 포함된 6 Kb DNA 단편의 게놈 바로 하류를 맵핑하되, 2개의 단편이 마우스 게놈에서와 동일한 상대적 방향으로 배향된, 3.6 Kb의 마우스 게놈 DNA(549); 폴리오마 바이러스의 돌연변이 전사 인핸서 2개에 결합된 변형 단순 포진 바이러스 I형 티미딘 키나아제 유전자 프로모터의 전사 제어하에 있는, 디프테리아 독소 A 서브유닛(DTA)을 암호화하는 유전자(523).

[0160] C57B1/6NTac 마우스로부터 유래된 마우스 배 줄기(ES) 세포는 공지된 절차에 따라 3' 벡터(505)가 사용되는 전기천공법으로 형질감염되었다. 전기천공법 이전에 벡터 DNA는 원핵생물의 플라스미드 서열이나 이와 결합된 폴리링커만 절단하는 희귀 절단 제한효소로 선형화된다. 형질감염된 세포는 도말되고, 약 24시간후 네오마이신 유사 약물 G418이 사용되면서 3' 벡터가 자체의 DNA에 통합된 세포에 대한 양성 선택하에 놓인다. 또한 벡터가 자체의 DNA에 통합되었지만 이 통합이 상동성 재조합에 의한 것은 아닌 세포에 대한 음성 선택도 일어난다. 비상동성 재조합은 DTA 유전자를 유지시켜, 유전자가 발현될 때 세포를 사멸시킬 것인 반면, DTA 유전자는 마우스  $Igk$  유전자좌와 벡터 상동성 영역 외부에 있는 관계로 상동성 재조합에 의해 결실된다. 약물 내성 ES 세포의 콜로니는 약 1주일후에 육안으로 확인될 수 있게 될 때 자체의 평판으로부터 물리적으로 추출된다. 이렇게 선별된 콜로니는 해체되고, 마이크로웰 평판에 다시 도말되며, 수 일 동안 배양된다. 이후, 세포 클론 각각은 분할되는데, 세포 일부는 아카이브로서 동결되고, 나머지는 분석의 목적으로 DNA 단리에 사용된다.

[0161] ES 세포 클론의 DNA는 유전자 표적화 검정이 적용되는 PCR에 의해 스크리닝된다. 이 검정을 위해, PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열들중 하나는 3' 벡터(505)와 게놈 DNA(501) 사이에 공유된 동일성 영역 외부를 맵핑하는 반면, 또 다른 하나는 벡터내 게놈 동일성을 보이는 2개의 팔 사이 신규 DNA, 예컨대 HPRT(545) 또는 네오마이신 내성(547) 유전자 내부를 맵핑한다. 이러한 검정은 3' 벡터(505)와 내인성 마우스  $Igk$  유전자좌 사이의 상동성 재조합을 겪은, 형질감염 세포로부터 유래된 ES 세포의 클론에만 존재하는 DNA 조각을 검출한다. 증식에 대해 PCR 양성 클론이 선택되고, 이후에는 서던 블롯팅 검정이 사용되어 추가 분석이 수행된다.

[0162] 서던 블롯팅 검정은 공지된 절차에 따라 수행되는데, 이 검정에는 3개의 프로브와 선택된 다수의 제한효소로 절단된 게놈 DNA가 포함되므로, 프로브와 절단물의 조합은 클론내 표적화된 유전자좌의 구조와 그것이 상동성 재조합에 의해 적절하게 변형되었는지 여부에 대한 결론이 도출되도록 허용한다. 프로브들중 하나는 3' 카파 표적화 벡터(505)와 게놈 DNA 사이에 공유되는 동일성 영역의 5'쪽에 축적하는 DNA 서열에 대해 맵핑하고; 제2 프로브도 또한 동일성 영역 외부이되, 3'쪽을 맵핑하며; 제3 프로브는 벡터내 게놈 동일성을 보이는 두 팔 사이 신규 DNA, 예를 들어 HPRT(545) 또는 네오마이신 내성(547) 유전자 내부를 맵핑한다. 서던 블롯팅은 외부 프로브

들중 하나와 네오마이신 내성 또는 HPRT 유전자 프로브에 의해 검출되는 바와 같이, 올바르게 돌연변이된 (correctly mutated) DNA, 즉 카파 유전자좌의 3' 카파 표적화 벡터(505) 일부와의 상동성 재조합에 의해 올바르게 돌연변이된 DNA에 대응하는 DNA의 예상 제한효소 생성 단편의 존재를 동정한다. 외부 프로브는 돌연변이 단편을 검출할 뿐 아니라, 상동성 염색체상 면역글로불린 카파 유전자좌의 비돌연변이 복사체로부터 유래한 야생형 단편도 검출한다.

[0163] ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하기 위해 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이러한 이상이 발생한 클론은 추가 사용에서 제외된다. 서던 블롯팅 데이터를 기반으로 하였을 때 올바른 예상 게놈 구조를 가지는 것으로 판단되는, 핵형이 정상인 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0164] 그 다음, 허용 가능한 클론은, G418/네오마이신 선택 대신 푸로마이신 선택이 사용되는 점을 제외하고는, 3' 벡터(505)에 대해 사용된 방법 및 스크리닝 검정과 디자인이 본질적으로 동일한 방법 및 스크리닝 검정이 사용되어 5' 벡터(503)로 변형되고, 프로토콜은 5' 벡터(503)에 의해 변형된 게놈 영역과 부합하도록 맞춤제작된다. 5' 벡터(503) 형질감염 실험의 목표는, 3' 벡터(505)와 5' 벡터(503) 둘 다에 의해 예상되는 방식으로 돌연변이된 ES 세포의 클론, 즉 조작 돌연변이가 둘 다를 운반하는 이중 표적화 세포를 단리하는 것이다. 이들 클론에서 Cre 재조합효소는 2개의 벡터에 의해 카파 유전자좌에 도입된 loxP 부위들 사이에서 재조합(502)이 일어나도록 유도하여, 507에 보인 게놈 DNA 구성체를 형성한다.

[0165] 또한, 클론은 상동 염색체와는 반대로 동일한 염색체에서 유전자 표적화를 거쳐야 하는데; 즉 표적화 벡터에 의해 진행된 조작 돌연변이는 별도의 상동 DNA 가닥에서 진행되는 트랜스방식이 아닌, 동일한 DNA 가닥에서 진행되는 시스방식이어야 한다. 시스 배열로 발생한 클론은, 게놈 동일성을 보이는 자체의 팔 사이 2개의 유전자 표적화 벡터(503 및 505)에 존재하는 신규 DNA에 혼성화되는 프로브가 사용되는 방법으로서, 중기 확산의 현장 형광 혼성화와 같은 분석 방법에 의해 트랜스 배열로 발생한 클론과 구별된다. 2가지 유형의 클론은, 만일 표적화 벡터가 시스방식으로 통합되었다면 pu-Tk(539), HPRT(545) 및 네오마이신 내성(547) 유전자를 결실시키는, Cre 재조합효소 발현 벡터로 형질감염시키고, 5' 벡터(503)에 의해 도입된 티미딘 키나아제 유전자에 대한 간시클로버 선택을 통해 살아남은 콜로니의 수를 비교함으로써, 그리고 살아남은 클론의 약물 내성 표현형을 '형제자매 선택' 스크리닝 방법, 즉 클론으로부터 유래한 몇몇 세포가 푸로마이신 또는 G418/네오마이신에 대한 내성에 대해 테스트되는 스크리닝 방법에 의해 분석함으로써 서로 구별될 수 있다. 돌연변이가 시스 배열로 발생한 세포는 트랜스 배열로 발생한 세포보다 약  $10^3$ 개 더 많은 간시클로버 내성 클론을 생성할 것으로 예상된다. 결과로 생성된 시스 유래 간시클로버 내성 클론의 대부분은 푸로마이신과 G418/네오마이신 둘 다에도 감수성이어야 하는 반면에, 트랜스 유래 간시클로버 내성 클론은 두 약물에 대해 내성을 유보하여야 한다. 카파 사슬 유전자좌에 조작된 돌연변이가 시스 배열로 발생한 세포 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0166] 세포의 이중 표적화된 클론은 Cre 재조합효소를 발현하는 벡터로 일시형질감염되고(502), 형질감염된 세포는 이후 상기 요약된 분석 실험에서와 같이 간시클로버 선택하에 놓이게 된다. 간시클로버 내성 세포 클론은 단리된 후, 5' 벡터(503)와 3' 벡터(505)에 의해 진행된 2개의 조작 돌연변이 사이 예상 결실의 존재(507)에 대해 PCR 및 서던 블롯팅으로 분석된다. 이들 클론에서 Cre 재조합효소는 2개의 벡터에 의해 카파 사슬 유전자좌에 도입된 loxP 부위(537)들 사이에서 재조합 발생을 유도한다. loxP 부위는 2개의 벡터에서 동일한 상대적 방향으로 배열되기 때문에, 재조합은 2개의 loxP 부위 사이 전체 게놈 간격을 포함하는 DNA 원(DNA circle)의 절제가 이루어진다. 원은 복제 기원을 포함하지 않으므로, 유사분열동안 복제되지 않고, 이에 따라 클론 증식이 진행됨에 따라 세포 클론들중에서 소실된다. 생성된 클론은 원래 2개의 loxP 부위 사이에 있던 DNA의 결실을 운반한다. ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이러한 이상이 발생한 클론은 추가 사용에서 제외된다. 서던 블롯팅 데이터를 기반으로 하였을 때 정확한 예상 게놈 구조를 가지는 것으로 판단되는, 핵형이 정상인 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

[0167] 자체의 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌의 상동성 복사체 2개중 하나에 서열의 결실을 운반하는 ES 세포 클론은 Cre 재조합효소 발현 벡터와,  $V_{\kappa}$ (551) 및  $J_{\kappa}$ (555) 유전자 분절을 함유하는 것으로서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 카파 사슬을 포함하는 벡터(509)로 재형질감염된다(504). 벡터의 핵심적 특징은 이하와 같다: lox5171 부위(531); 개시인자 메티오닌 코돈이 결여되어 있지만 메티오닌 개시 코돈(535) 하류 lox5171 부위(531)에 중단없는 개방 해독 틀과 인접하며 프레임내에 있는 네오마이신 내성 유전자 개방 해독 틀(547); FRT 부위(527); 12개의 고양이  $V_{\kappa}$  유전자 분절의 어레이(551)(각각은 3' 쪽에 마우스 RSS가 측접하고 마우스

비암호화 서열에 내포된 고양이 암호화 서열을 포함함); 선택적으로 마우스 카파 사슬 유전자좌의 J 카파 영역 유전자 분절 클러스터의 바로 상류 13.5 Kb 계놈 DNA 조각(표시되지 않음); 5'쪽에 마우스 RSS가 측접하고, 마우스 비암호화 DNA에 내포된 고양이 J<sub>κ</sub> 영역 유전자 분절 5개를 함유하는 DNA(555); 1ox5171 부위(531)와 상대적 방향이 반대인 1oxP 부위(537).

- [0168] 가능성 고양이 V<sub>κ</sub> 및 J<sub>κ</sub> 유전자 암호화 영역의 서열은 서열 번호 14 ~ 30에 보인다.
- [0169] 형질감염된 ES 클론은 G418 선택하에 놓이게 되는데, 이로써 RMCE가 진행된 세포의 클론은 증량되고, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌를 포함하는 공여 DNA(509)는, 각각 5'(503) 및 3'(505) 벡터에 의해 현 위치에 배치된 1ox5171(531) 및 1oxP(537) 부위 사이 결실된 내인성 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌에 전체로서 통합된다. RMCE가 적절하게 진행된 세포만이 네오마이신 내성 유전자(547)를 발현할 수 있는 역량을 가지는데, 그 이유는 자체의 발현에 필요한 프로모터(529)와 개시인자 메티오닌 코돈(535)이 벡터(509)에 존재하지 않고, 변형된 숙주 세포 Ig<sub>κ</sub> 유전자좌(507)에 이미 사전에 존재하고 있기 때문이다. 서열(509)이 사용되어 생성된 DNA 영역은 511에 도시되어 있다. FRT 부위(527)들 사이에 위치한 5' 벡터(503)의 나머지 요소는 이하 기술된 바와 같이 시험관내 또는 생체내 Flp 매개 재조합(506)을 통해 제거되고, 그 결과 513에 보이는 바와 같은 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 경쇄 유전자좌가 생성된다.
- [0170] G418 내성 ES 세포 클론은 PCR 및 서던 블롯팅에 의해 분석되고, 그 결과 클론이 원치 않는 재배열 또는 결실이 일어나지 않고 예상 RMCE 과정이 진행되었는지 여부가 확정된다. ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은, 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이러한 이상이 발생한 클론은 추가 사용에서 제외된다. 서던 블롯팅 데이터를 기반으로 하였을 때 정확한 예상 계놈 구조를 가지는 것으로 판단되는, 핵형이 정상인 클론은 추가 사용을 위해 선택된다.
- [0171] 내인성 마우스 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌(513)에 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌를 운반하는 ES 세포 클론은 DBA/2 계통으로부터 유래한 마우스 배반포에 미세주사되고, 그 결과 표준 절차에 따라 부분적으로 ES 세포로부터 유래한 키메라 마우스가 제조된다. 마우스 털에 대한 ES 세포 유래 기여도 수준이 가장 높은 수컷 키메라 마우스가 암컷 마우스와의 교배를 위해 선택된다. 교배에 사용하기 위해 선택된 암컷 마우스는 C57Bl/6NTac 계통에 속하며, 자체의 생식계열에서 발현되고, Flp 재조합효소를 암호화하는 이식 유전자를 운반할뿐 아니라 FRT 측접 네오마이신 내성 유전자(520) 및 기타 요소를 5' 벡터로부터 결실시킬 것이다. 이러한 교배로부터 얻어진 자손은 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌의 존재 및 네오마이신 내성 유전자의 손실에 대해 분석된다. 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌를 운반하는 마우스가 마우스의 콜로니 확립을 위해 사용된다.
- [0172] 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 운반하는 마우스는 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 카파 사슬 유전자좌를 운반하는 마우스와 교배될 수 있다. 그들의 자손은 결국 부분적으로 고양이의 것인 Igh와, 부분적으로 고양이의 것인 Ig<sub>κ</sub> 둘 다에 대해 동형접합성인 마우스를 제조하는 계획에서 함께 육종된다. 이러한 마우스는 고양이 가변 도메인과 마우스 불변 도메인을 포함하는, 부분적으로 고양이의 것인 중쇄를 제조한다. 그들은 또한 고양이 카파 가변 도메인과 마우스 카파 불변 도메인을 포함하는, 부분적으로 고양이의 것인 카파 단백질을 제조한다. 이들 마우스로부터 회수된 모노클로날 항체는 고양이 카파 가변 도메인과 쌍을 형성하는 고양이 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0173] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 Igh 및 부분적으로 고양이의 것인 Ig<sub>κ</sub> 둘 다에 대해 동형접합성인 마우스는 실시예 3에서 제조된, 부분적으로 고양이의 것인 람다 유전자좌에 대해 동형접합성인 마우스와 교배되고, 그 결과 3개의 유전자좌 모두에 대해 동형접합성인 마우스가 제조된다.
- [0174] 당업자는, Ig<sub>κ</sub> 유전자좌를 표적화하기 위해 본원에 사용된 5' 벡터(503) 및 후속 전략이, Igh 유전자좌를 표적화하는 대안 전략으로서 도 2에서 5' 벡터(201) 대신 사용될 수도 있음을 인지할 것이다. 이 경우, 5' 벡터(503)는 Ig<sub>κ</sub> 유전자좌에 상동성인 계놈 DNA 영역(525 및 541)이, Igh 유전자좌에 상동성인 계놈 DNA 영역(도 2의 213 및 215)으로 치환되도록 변형된다.
- [0175] 실시예 3: 부분적으로 고양이의 것인 이중 면역글로불린 유전자좌의 마우스 계놈의 면역글로불린 람다 사슬 유전자 좌위로의 도입
- [0176] 마우스 Ig<sub>λ</sub> 유전자좌의 일부를, 부분적으로 고양이의 것인 Ig<sub>λ</sub> 유전자좌로 치환하기 위한 방법이 도 6에 도시되

어 있다. 이 방법은, V $\lambda$ 2/V $\lambda$ 3 유전자 분절(613)의 상류 및 C $\lambda$ 1 유전자 분절(617의 가장 오른쪽 박스)의 하류 둘 다와, E $\lambda$  인헨서의 상류 또는 하류(623) 내인성 마우스 면역글로불린 램다 유전자좌와 동일성을 공유하는 표적화 벡터(603)가 연루되는 상동성 재조합 방법에 의해, V $\lambda$ 2/V $\lambda$ 3 유전자 분절(613), J $\lambda$ 2/C $\lambda$ 2 유전자 클러스터(615) 및 V $\lambda$ 1-J $\lambda$ 3/C $\lambda$ 3-J $\lambda$ 1/C $\lambda$ 1 유전자 클러스터(617)를 포함하는 야생형 마우스 면역글로불린 램다 유전자좌(601 및 도 1 하단)로부터 약 200 Kb의 DNA를 결실시키는 단계를 포함한다. 벡터는 약 200 Kb의 내인성 마우스 게놈 DNA를, 이중 면역글로불린 램다 유전자좌가 변형된 V $\lambda$  유전자좌를 RMCE를 통해 치환시키는 후속 부위 특이적 재조합이 허용되도록 디자인된 요소로 치환한다(604). 이 실시예에서, 이중 면역글로불린 램다 유전자좌는 고양이 Ig $\lambda$  암호화 서열 및 마우스 Ig $\lambda$  비암호화 서열을 포함하는 합성 핵산이다.

[0177] 약 200 Kb만큼의 결실을 달성하고, 부위 특이적 재조합 부위를 삽입하기 위한 유전자 표적화 벡터(603)의 핵심적 특징은 이하와 같다: 디프테리아 독소의 A 서브유닛을 암호화하는 유전자(DTA, 659) 또는 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제 유전자(표시되지 않음)와 같은 음성 선택 유전자; 면역글로불린 램다 유전자좌에 있는 마우스 V $\lambda$ 2/V $\lambda$ 3 가변 영역 유전자 분절의 5'로부터 4 Kb만큼 떨어져 있는 게놈 DNA(625); FRT 부위(627); 마우스 Polr2a 유전자 프로모터를 함유하는 게놈 DNA(629); 번역 개시 서열("Kozak" 공통 서열에 내포된 메티오닌 코돈)(635); Cre 재조합효소에 대한 돌연변이 loxP 인지 서열(lox5171)(631); 전사 종결/폴리아데닐화 서열(633); 퓨로마이신(637)에 대한 내성을 부여하는 단백질을 암호화하는 반면에, Polr2a 프로모터 및 그 옆의 번역 개시 서열을 기준으로 안티센스 가닥에 존재하며, 자체의 전사 종결/폴리아데닐화 서열이 뒤따르는 개방 해독틀(633); Cre 재조합효소에 대한 loxP 인지 서열(639); 퓨로마이신 내성 유전자 개방 해독 틀이 존재하는 가닥과 동일한 안티센스 가닥의 번역 개시 서열("Kozak" 공통 서열에 내포된 메티오닌 코돈)(635); 퓨로마이신 내성 개방 해독틀의 전사가 지휘될과 아울러 loxP 부위 하류의 개시 코돈(635)에서 번역이 개시되고, 이후 계속해서 loxP 부위를 통해 Polr2a 프로모터와 그 옆의 번역 개시 서열을 기준으로 모두 안티센스 가닥에 있는 퓨로마이신 개방 해독틀로 복귀하도록 배향된, 담 베타 액틴 프로모터 및 거대세포바이러스 초기 인헨서 요소(641); Flp 재조합효소에 대한 돌연변이 인지 부위(643); E $\lambda$  인헨서 요소(623)를 함유하는 게놈 DNA(645).

[0178] C57B1/6NTac 마우스로부터 유래된 마우스 배 줄기(ES) 세포는 공지된 절차에 따라 표적화 벡터(603)를 이용한 전기천공법에 의해 형질감염된다(602). 상동성 재조합은 내인성 마우스 면역글로불린 램다 유전자좌를 약 200 Kb 영역의 표적화 벡터(603)로부터 유래한 부위 특이적 재조합 부위로 치환하고, 605에 도시된 게놈 DNA 구성체를 형성한다.

[0179] 전기천공법 이전 벡터 DNA는 원핵 플라스미드 서열 또는 이와 결합된 폴리링커만 절단하는 회귀 절단 제한효소로 선형화된다. 형질감염된 세포는 도말되고, 약 24시간 이후에는 퓨로마이신이 사용되는 양성 약물 선택하에 놓인다. 또한 벡터가 자체의 DNA에 통합되되, 상동성 재조합에 의하여 통합된 것이 아닌 세포에 대한 음성 선택도 일어난다. 비상동성 재조합은 유전자가 발현될 때 세포를 사멸시키는, DTA 유전자(659)의 유지를 초래할 것인 반면, DTA 유전자는 마우스 Ig $\lambda$  유전자좌와 함께 벡터 상동성 영역 외부에 있는 관계로 상동성 재조합에 의해 결실된다. 약물 내성 ES 세포의 콜로니는 일주일 후 육안으로 볼 수 있게 된 다음에 자체의 평판으로부터 물리적으로 추출된다. 이렇게 선별된 콜로니는 해체되어, 마이크로웰 평판에 한계 희석으로 다시 도말되고, 수 일 동안 배양된다. 이후 세포 클론 각각은 분할되는데, 몇몇 세포는 아카이브로서 동결되고, 나머지는 분석 목적으로 DNA 단리에 사용된다.

[0180] ES 세포 클론 유래 DNA는 공지된 유전자 표적화 검정이 사용되는 PCR에 의해 스크리닝된다. 이러한 검정을 위해, PCR 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열들중 하나는 표적화 벡터와 게놈 DNA 사이에 공유된 동일성 영역 외부를 맵핑하는 반면, 다른 하나는 벡터내 게놈 동일성 팔 2개 사이의 신규 DNA 내부, 예컨대 퓨로 유전자(637)를 맵핑한다. 이러한 검정은 표적화 벡터(603)와 내인성 DNA(601) 사이에서 상동 재조합이 진행된 형질감염 세포로부터 유래된 세포의 클론에만 존재하게 될 DNA 조각을 검출한다.

[0181] 형질감염으로부터 얻어진 PCR 양성 클론은 증식을 위해 선택되고, 이어서 서던 블롯팅 검정이 사용되어 추가 분석이 이루어진다. 서던 블롯팅에서는 3개의 프로브와 선택된 다수의 제한효소로 분해된 클론 유래 게놈 DNA가 관여하므로, 프로브와 절단물의 조합은 ES 세포 DNA가 상동성 재조합에 의해 적절하게 변형되었는지 여부에 대한 동정을 허용한다.

[0182] ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이상의 증거를 보여주는 클론은 추가 사용에서 제외된다. 서던 블롯팅 데이터를 기반으로 하였을 때 정확한 예상 게놈 구조를 가지는 것으로 판단되는, 핵형이 정상인 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.

- [0183] 자체의 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌의 상동성 복사체 2개중 하나에 결실을 운반하는 ES 세포 클론은 고양이  $V_{\lambda}$  및  $J_{\lambda}$  영역 유전자 분절 암호화 서열을 을 함유하는, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌를 포함하는 벡터(607)와 함께 Cre 재조합효소 발현 벡터로 재형질감염된다(604). 이 벡터(607)의 핵심적인 특징은 이하와 같다: lox5171 부위(631); 개시인자 메티오닌 코돈(647)은 결여되어 있지만, 프레임 내에 있으면서 lox5171 부위(다이어그램 605의 631)에서 중단된 부분이 없는 개방 해독 틀과 인접한 네오마이신 내성 유전자 개방 해독틀); FRT 부위(627); 각각의 유전자 분절 3'쪽에 마우스 RSS가 축적하고, 마우스 램다 비암호화 서열에 내포된 고양이 램다 암호화 서열을 포함하는, 32개의 기능성 고양이 램다 가변 영역 유전자 분절의 어레이(651); 각각의 단위가  $E_{\lambda}2-4$  인핸서 요소를 포함하는 마우스 램다 유전자좌(655)의 비암호화 서열 내부에 내포된 마우스 램다 불변 도메인 유전자 분절 및 고양이  $J_{\lambda}$  유전자 분절을 포함하는, J-C 단위의 어레이(도 1). 고양이의  $J_{\lambda}$  유전자 분절은  $J_{\lambda 1}$ ,  $J_{\lambda 2}$  및  $J_{\lambda 4-11}$ 을 암호화하는 분절이다. 또 다른  $J_{\lambda}$  유전자 분절인  $J_{\lambda 3}$  및  $J_{\lambda 12}$ 는 비기능성 ORF(개방 해독틀)인 반면, 마우스 램다 불변 도메인 유전자 분절은  $C_{\lambda 1}$ ,  $C_{\lambda 2}$  또는  $C_{\lambda 3}$  또는 이들의 조합이고; Flp 재조합효소에 대한 돌연변이 인지 부위(643); 구조체내 면역글로불린 유전자 분절 암호화 정보를 기준으로 안티센스 가닥에 위치하는 것으로서, 하이그로마이신 내성을 부여하는 개방 해독틀(657); lox5171 부위에 대한 상대적 방향이 반대인 loxP 부위(639).
- [0184] RCME는, RCME 벡터(607)로부터 유래한, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌를 변형된 내인성 마우스 Ig $\lambda$  유전자좌에 삽입하여, 609에 도시된 게놈 DNA 구성체를 형성한다.
- [0185] 기능성 고양이  $V_{\lambda}$  및  $J_{\lambda}$  유전자 암호화 영역의 서열은 서열 번호 31 ~ 73에 제시되어 있다.
- [0186] 형질감염된 클론은 G418 또는 하이그로마이신 선택하에 놓였는데, 이 선택은RMCE 과정이 진행된 세포의 클론을 증량하였고, 이때 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 사슬 가변부는 유전자 표적화 벡터에 의해 해당 부분에 존재하게 된 loxP 부위 및 lox5171 부위 사이 결실된 내인성 마우스 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌에 통합된다. 표적화 벡터(603)로부터 유래한 나머지 요소는 시험관내 또는 생체내(이하 참조)에서 FLP 매개 재조합(606)을 통해 제거되며, 그 결과 611에 보인 바와 같이 부분적으로 고양이의 것인 최종 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌가 생성된다.
- [0187] 611의 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌의 일 구성체에 대한 도면으로서, 더욱 상세히 도시한 도면이 613에 보이지만, 이는 단지 예로서 제공된다. 고양이  $V_{\lambda}$  및  $J_{\lambda}$  유전자 분절과 마우스  $C_{\lambda}$  유전자 분절의 기타 배열 및 개수뿐 아니라, 인핸서 요소의 위치 및 개수도 또한 구현가능하다.
- [0188] G418/하이그로마이신 내성 ES 세포 클론은 PCR 및 서던 블롯팅으로 분석되고, 그 결과 이 클론에서 일치않는 재 배열 또는 결실이 일어나지 않고 예상 재조합효소 매개 카세트 교환 과정이 진행되었는지 여부가 확인된다. ES 세포의 PCR 및 서던 블롯팅 양성 클론의 핵형은 마우스 ES 세포에서 일어나는, 가장 일반적으로 발생하는 염색체 이상을 구별하도록 디자인된 현장 형광 혼성화 방법이 사용되어 분석된다. 이상의 증거를 보여주는 클론은 추가 사용에서 제외된다. 서던 블롯팅 데이터를 기반으로 하였을 때 정확한 예상 게놈 구조를 가지는 것으로 판단되는, 핵형이 정상인 클론이 추가 사용을 위해 선택된다.
- [0189] 마우스 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌에 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌(611)를 운반하는 ES 세포 클론은, DBA/2 계통으로부터 유래한 마우스 배반포에 미세주사되었으며, 그 결과 공지된 절차에 따라 부분적으로 ES 세포로부터 유래한 키메라 마우스가 제조된다. 마우스 털에 대한 ES 세포 유래 기여도 수준이 가장 높은 수컷 키메라 마우스가 암컷 마우스와의 교배를 위해 선택된다. 여기에서 선택된 암컷 마우스는 자체의 생식계열에서 발현된 Flp 재조합효소를 암호화하는 이식유전자를 운반하는 C57B1/6NTac 계통의 것으로서, FRT 축적 선택 마커가 결실될 것이다. 이러한 교배에서 나온 자손은 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌의 존재와, RMCE 단계에서 생성된 FRT 축적 네오마이신 내성 유전자 및 mFRT 축적 하이그로마이신 내성 유전자의 손실에 대해 분석된다. 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 사슬 유전자좌를 운반하는 마우스는 마우스 콜로니를 확립하기 위해 사용된다.
- [0190] 일 측면에서, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 카파 경쇄 유전자좌(실시예 1 및 2에 기술됨)에 대해 동형접합성인 마우스는, 부분적으로 고양이의 것인 면역글로불린 램다 경쇄 유전자좌를 운반하는 마우스와 교배된다. 이러한 유형의 육종 계획으로 제조된 마우스는 부분적으로 고양이의 것인 Igh 유전자좌에 대해 동형접합성이고, 부분적으로 고양이의 것인 Ig $\kappa$  및 Ig $\lambda$  유전자좌에 대해 동형접합성이다. 이들 마우스로부터 회수된 모노클로날 항체는 몇몇 경우에는 고양이 카파 가변 도

메인과, 다른 경우에는 고양이 램다 가변 도메인과 쌍을 형성하는 고양이 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0191]

서열 정보

**IGHV**

**서열 번호 1** > LOC101082137

Atggagtttgctgtgggctgggtttctcctggttgctcttttaaaagggtgccagtgatga  
cgtgcagctgggtggagctctgggggagacctgggtgaagcctgggggtccctgagactca  
cctgtgtgacctctggattcaccttcagtagttccagcatgaactgggtccgccaggct  
ccagggaaagggctgcagtggttcgcatatattatgatgatggaagtagcacatacta  
cgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacacgctgt  
atctgcagatgaacaacctgaagaccgaggacacggccacataattactgtgcaagagac  
acggtgaggggacctcactgggagcccagacacaaaacctccctgcaggaggggatcagc  
accaccagggggcgcaactatgcacaactctggtttgtgttcccaggagcaggtgcag  
atggaggttacaggcaggttccctgtcagggtctggggcttccctccacacagcagtt  
tccccaggagcctctctggacacaggattctgtactttctgttcttctcctgactta

**서열 번호 2** > LOC101093781

Atggagtttgctgtgggctgggtttctcctggttgctcttttaaaagggtgccagtgatga  
cgtgcagctgggtggagctctgggggagacctgggtgaagcctgggggtccctgagactca  
cctgtgtgacctctggattcaccttcagtagctatggaatgagctgggtccgccaggct  
ccagggaaagggctgcagtggttcgcatatattagatatgatggaagtagcacatacta  
cgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacacgctgt  
atctgcagatgaacagcctgaagaccgaggacacggccacataattactgtgcaagagac  
acgctgaggggacctcactgggagcccacacacaaaacctccctgcaggaggggatcagc  
accaccagggggcgcaactatgcacaattctggtttgtgttcccaggagcaggtgcag  
atggaggttacaggcaggttccctgtcagggtctggggcttccctccacacagcagtt  
tctccaggagcctctctggtcacaggattctgtgtttatctattaactctctgaatta  
g

**서열 번호 3** > LOC111559009

atggagtttgctgtgggctgggtttctcctggttgctcttttaaaagggtgccagtgatga  
cgtgcagctgggtggagctctgggggagacctgggtgaagcctgggggtccctgagactca  
cctgtgtgacctctggattcaccttcagtagctactacatgaactgggtccgccaggct  
ccagggaaagggctgcagtggttcgcatatattagatatgatggaagtagcacagccta  
cgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacgccaagaacacgctgt  
atctgcagatgaacagcctcaagaccgaggacacggccacataattactgtgcaagagac  
acagtgaggggacctcactgggagcccagacacaaaacctccctgcaggaggggatcagc  
accaccagggggcgcaactatgcacaattctcctttgtgttcccaggcagcaggtgcag  
atggaggttacaggcaggttccctgtcagggtctggggcttccctccacacagcagtt  
tccccaggagcctccctggttatatgattctgtgtttactattaactctctgaatta  
g

**서열 번호 4** > LOC111560938

atgcagatgctgtggtccctcctctgctgctggtgagctccctgggtgctcctatctca  
acttacacttgggagctccggccaggactgggtgaagccttcacaatcctctctctca  
cctgctgtgtctccggaggtctgttacaccagcagttactactggaactggatccgccag

[0192]



cggttcagcggcagtggtctgggacagatttcaccctcaccatcagcagcctggagcct  
gaagacgctgccacttactactgtcagcagcataacagcggcatc

**서열 번호 15** >IMGT000050 | IGKV1-17\*01

atgaaggcccccgctcagctcctgggctcctgctgctctggctcccaggagccagctgt  
gaaatccagatgaccagctctccatcctcgtctgtcgcctccaggagacagagtcacc  
atcacctgccgggagtcagaatgttaacacgtggttagcctggatcagcagaaaccg  
gggaaagtccaaagcttctgatctatcgtgcatccacggttgaaactggggctccctcg  
cggttcagcggcagtggtctgggacagatttcaccctcaccatcagcagcctggagcct  
gaagacgctgccacttactactgccagcaaatagcaatctccctcc

**서열 번호 16** >IMGT000050 | IGKV2-4\*01

atgagggtccctgctcagctgctgggctgctgatgctctggatcccaggatccagtggt  
gatgtcgtgatgacgcagaccctctgtccctgcccgtaacccctggagagccggcctca  
atctcctgcaggccagtcagagcctcctgcacagtaatggaaatacttactgaattgg  
tacctgcagaagccaggccagctctccacggcgactgatctataaggtttccaaccgggac  
tctggggtcccagacaggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcaccctgagaatc  
agcagggtggaggctgacgacgtcggagtttattactgccagcaaggtacacatgctcct  
cg

**서열 번호 17** >IMGT000050 | IGKV2-5\*01

atgagggtccctgctcagctgctgggctgctgatgctctggatcccaggatccagtggt  
gatgtcgtgatgacgcagaccctctgtccctgcccgtaacccctggagagccggcctca  
atctcctgcaggccagtcagagcctcctgcacagtaatggaaatacttactgaattgg  
tacctgcagaagccaggccagctctccacggcgactgatctataaggtttccaaccgggac  
tctggggtcccagacaggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcaccctgagaatc  
agcagggtggaggctgacgacgtcggagtttattactgccagcaaggtacacatgctcct  
cg

**서열 번호 18** >IMGT000050 | IGKV2-9\*01

atgagggtccctgctcagctgctgggctgctgatgctctggatcccaggatccagtggt  
gatgtcgtgatgacgcagaccctctgtccctgcccgtaacccctggagagccggcctca  
atctcctgcaggccagtcagagcctcctgcacagtaatggaaacacctatttacattgg  
tacctgcagaagccaggccagctctccacggcgactgatctataaggtttccaaccgggac  
tctggggtcccagacaggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcaccctgagaatc  
agcagggtggaggctgacgacgtcggagtttattactgcctgcaaggtacacacagacc  
cc

**서열 번호 19** >IMGT000050 | IGKV2-12\*01

atgagggtccctgctcagctcctgggactcatcatgctctggatcccaggatccagtggt  
gatattgtgatgacgcagaccctctgtccctgctcctgtaacccctggagagccagcctca  
atctcctgcaggccagtcagagcctcctgcacagtgatggaaatacttactgaattgg  
tacctgcagaagccaggccagctctccacggcgcttgatctatctgtttccaaccgggac  
tctggggtcccagacaggttcagtggcagcgggtcagggacagatttcaccctgagaatc  
agcagggtggaggctgacgacgtcggagtttattactgcctgcaaggtacacacagacc  
cc

**서열 번호 20** >IMGT000050 | IGKV2-13\*01

atgagggtccctgctcagctcctgggctgctagtgtctgggtccctggatccgggtgctg  
gatgtcgtgatgacgcagaccctctgtccctgctcctgtaacccctggagagccggcctca  
atctcctgcaggccagtcagagcctcctgcacagtgatggaaatacttactgaattgg

[0194]

tacctgcagaagccaggccagctctccacggcgactgatctataaggtttccaaaccgggac  
tctggggtccacagacaggttcagtgccagcgggtcaggggacagatttcaccctgagaatc  
agcagggttagaggctgacgacgctcggagtttattactgctgcaaggtacaagtatcct  
ac

**서열 번호 21** >IMG000050 | IGKV2-14\*01

atgaggttccctgctcagctcctgggctgctagtgctttgggtccctggatccagtggg  
gatgcatgatgaccagaccctctgtcctgcccgtcggccctggacagccgggtca  
atctcctgcaggccagtcagagcctcctgcccagcaatggatactcctatttaagtgg  
tacctgcagaagacagccagctctccacagcggccgatctatcaggtttccaaaccgggac  
tctggggtccacagacaggttcagtgccagcgggtcaggggacagatttcacactcaaaatc  
aacagagtggaggctgaggatgtgggagtttattgctgctgcaagatacaacttctc  
ct

**서열 번호 22** >IMG000050 | IGKV4-1\*01

atggtagccagagggcaggtcctcctatccttgggtgctggtgggtctcagggtcctgtggg  
gogatacagatgacgcagctccaggtccctggctgggtctccaggtcagcaggtcaac  
atgaactgcaggccagtcagagtgtagcagctacttagcctgggtaccagcagaaacca  
gggcagcactcctaagctgctcactcactcagcttccacccgggcatctggagtccccgac  
cgattcagtgggcagtggtccgggacggatttcacccctaccatcagcaacctccaggtc  
gaagacgtggcagttactactgtcagcagatttacagctctcctcc

**서열 번호 23** >IMG000050 | IGKV6-6\*01

atgggtctccatcaacagcttctgggcttctgctcctctgggtccagcctccagtggt  
gaggttctgtgaccagctcctcagccttctgctcaggactctaaaagaaaaagccacc  
atcacctgcccagcccaatcaggggcatcagcaccatcttgcaactgggtatcagcagaaacca  
aatcaggctccgaagctccttgaagtagcttccagctcgtctcggggcggcctg  
cggttcagcggcagtggtctgggacagatttcacccctaccatcagcagccggagcct  
gaagacgtgcccacttactactgcccagcaaaagtaacaatctcctcgg

**서열 번호 24** >IMG000050 | IGKV8-3\*01

atgggggtcctgaccagctcctctgcttctgctggcctgcctcccagctgccggcggg  
accactgagttgaccagctctcccaccatctctctgtgtccctgacagacagcgtgtcc  
gtcatctgcaggccagtgagagcattagtgatcaactaagctgggtatcagcagaaacca  
ggccagcctcccaagcttatcatctatgatgcccagataacctagagttctggcgtctcagac  
cgcttctctgggattcagctctggcacagaattcactcctcaaaatcagcagctcgaggct  
gatgacgcggcggcttattactgcccagcagggttatggcgttctctcc

**서열 번호 25** >IMG000050 | IGKV8-16\*01

atgggggtcctgaccagctcctctgcttctgctggcctgcctcccagctgccagcggg  
accgctgagttgaccagctctcccaccatctctctgtgtccctgacagacagcgtgtcc  
ctcatctgcaggcccaatgagagcgttagtgattacttaagctgggtatcagcagaaacca  
ggccagcctcccaagcttatcatctatgatgcccagataacctagagttctggcgtctcagac  
cgcttctctgggattcagctctgacacagaattcactcctcaaaatcagcagctcgaggct  
gatgacgcggcggcttattactgcccagcagggttatggcgttctctcc

**IGKJ**

**서열 번호 26** >IMG000050 | IGKJ1\*01

gtggacgtttggccaaggaaccaagctggaagtcaaac

[0195]



ccaggaaatgggccccaaaaccgtcatctattggaataacagcaaacocctgggggtccca  
gatagattctccggctcaaatgtctggcagttcaggcaccctgaccatcactgggctgcag  
gtgaggacgaggtgattattactgtctcagcgtgggatgatagttctcagtgctca

**서열 번호 36** >IMGT000038 | IGLV1-42\*01

atggcctgggtctcctttcctctcactctcctcgtcactgcacagggctcctgggcccag  
tctgtgctgactcagccgcctcagtgctcggggctcctgggcccagagggtcaccatctcc  
tgcaactggaagcagctccaacatcgggggtggtaattatgtgagctggtaaccaacaagtcc  
caggaaacggccccagggctcctgatttatgagaataacaaacgaccctccgggggtcccc  
gatcgattctcctggctccaagtctggcagctcaggctcctgaccatcactgggctgcag  
gctgagcagaggtgattattattgtgcatcatggacaatagtctcagtgctca

**서열 번호 37** >IMGT000038 | IGLV1-51\*01

atggcctgggtcctctctcctgaccctctcactcactgcacagggctcctgggcccag  
tctgtgctgactcagccgcctcagtgctcggggcctggggcagagggtcaccatctcc  
tgccctggaagtaggagcaacatcgggtatgtcgggtgaaactggtaaccaacagctcca  
ggaaagggccccaaactcctctctatgctaatagacagaaacacccctcatgggtcctct  
gaaacgaatccgcgaatctcctggctccaagtctggcaacacagggctcctgaccatcact  
gggctccaggctgaggacgaggtgattattactgctcagcatgggatgctattctgaaa  
gctca

**서열 번호 38** >IMGT000038 | IGLV1-56\*01

atggcctgggtcctttctcctcctcaccctcctcgtcactgcacagggctcctgggctcag  
tctgtgctgactcagccgcctcagtgctcggggcctggggcagagggtcaccatctcc  
tgcaactggaagcagctccaacatcggggctggtaattatgtgagctggtaaccaacaactc  
tcaggaaacagctccaacacccctcctctctatggtaatagcaatcgaccctcgggggtcccc  
gatcgattttctggctccaagtctggcagcagggctcctgaccatcactgggctgcag  
gctgaggacgaggtgattattactgtcagcgtgggacagcagctcctcaatgctca

**서열 번호 39** >IMGT000038 | IGLV1-61\*01

atgtcctgggtcctctgtccttctcgcctcttctcactcactgcacagggctcctgggcccag  
tctgtactgactcagccaccctcgggtgctcagggctcctggggcagagggtcaccatctcc  
tgcaactggaagcagctccaacatcagtaacaattttgtgaaactggtaaccaacaactccca  
ggcacaacccccaaaaccataatcctttgggatgatagcagaccctcgggggtcctgaa  
cgattctctggctccaagtctggcagcagggcaccctgaccatcactgggctccaggct  
gaggacgaggtgattattactgctcagcgtgggatgatagttctgagagctca

**서열 번호 40** >IMGT000038 | IGLV1-63\*01

atggcctgggtcctctctcctcaccctcctcactcactgcacagggctcctgggcccag  
tctgagctgactcagccgcctcagtgctcggggcctggggcagagggtcaccatctcc  
tgccctggaagtaggagcaacatgggtatgtcgggtgaaactggtaaccaacagcatcca  
ggaaaagggccccaaaactcctcactatggtagtagcaatcgaccctcaggggtcctgac  
agattttctggctccaagtctggcaacacagggctcctgaccatcactgggctccaggcc  
gaggacgaggtgattattattgctctgtgttgacgttacggaggtgctga

**서열 번호 41** >IMGT000038 | IGLV1-70\*01

atggcctgggtcctctctcctcaccctcctcactcactgcacagggctcctgggcccag  
tctgagctgactcaaccgcctcagtgctcggggcctggggcagagggtcaccatctcc  
tgccctggaagtgcaacaacatcggtagaattgggtgaaactggtaaccaacagtttcca  
ggaaaagggccccaaaactcctcactcctccttatagcaatcaaccctcaggggttctgggt  
cgattttctggctccaagtctggcaacacagggctcctgaccatcactgggctccaggcc  
gaggacgaggtgattattactgcacgtctgctgaccctattcaaatgctca

[0197]

**서열 번호 42** >IMGT000038 | IGLV2-24\*01

atggcctgggctctggctcctcctcagtcctcactcaggacacagggtcctgggcccag  
tctgccctgaatcagcctcctcactgtcoggggatctgggacgcacagtcaccatctcc  
tgtgtggcagcagcaatgacatgggagatagtgacgtcctcctggtaaccaacagctc  
gaaggcacatccccaaactcctgatccataatgtaattcccggcctcagggtaccct  
gatcgctctctggctccaagctcggcaacacggcctccttgaccatctctgggctccag  
ctgaagatgaggctgatttactgttctcatatgctagtagtaataactctc

**서열 번호 43** >IMGT000038 | IGLV3-2\*01

atggcctggaccctctctcctcagtcctcctggctcactgcaacagggtccatggcctcc  
taagtgtgaccacgccccctgggtgtcagtgaaacctgggacagacagccagaatcacc  
tgtgggggaaacaacattggaagtaaacatgcttactggtaccagcagaagccaggccag  
gccccatgctggtcatcttactatagcagcaaccggcctcagggtaccctgaccgattc  
ctggcaccactcggggaacacggccaccctgaccatcaggcgggcccaggctgaggac  
gaggctgactattactgtcaggtgtgggataacagtggttaagtct

**서열 번호 44** >IMGT000038 | IGLV3-5\*01

atggcctggaccctctcctcctcagtcctcctggcactactacacagggtccgtgacctca  
aacagggtgactcagccccctccatttcagtgccctgggagagatggcaaggatcacc  
tgtgagggaaacaacatcggaaatacatagtttcctggtaccagcagaagccgaaccag  
gtgccctgatgattattatcaggtatagcaaccggcctcagggtaccctgaccgattc  
ctggcctcctcctggggaacacggccaccctgactgtcaggcgggcccaggctgaggat  
gaggctgactattactgtctgtctcctcagcagtagtaacgtt

**서열 번호 45** >IMGT000038 | IGLV3-6\*01

atggcctggaccctctcctcctcagtcctcctggcactactacacagggtccgtgacctca  
tatgagctgactcagccccctcagtgctcagtgaaacctgggacagacggccaggatcaca  
tgtgagggaaacaacatcggaaataaagatgcttactggtaccagcagaagtcaggccag  
gccccatgctgattatctatgaggacagcaaacggcctcagggtaccctgaccgattc  
ctggcaccactcagggaacatggccacctgaccatcaggcgggcccgggcccgaagat  
gaggctgactattactgcccagggtgtgggacagcagtagtgatgct

**서열 번호 46** >IMGT000038 | IGLV3-7\*01

atggcctggaccctctcctcctcagtcctcctcactcactgcaacagggtccatagcctcc  
tatgtgctgactcagccccctcagtgctcgggtgagcctgggacagacggccaggaccacc  
tgtgagggaaacaacatcggaaagcaaaagtgttactggtaccagcagaagtcaggccaa  
accctgtgctgattatctatagtgatagcaaccggcctcaggatccccgaccgattc  
tcaggcaccactcggggaacacggccaccctgaccatcaggcgggcccgggcccaggac  
gaggctgactattactgtcaggtgtgggacagtagtagtgatgct

**서열 번호 47** >IMGT000038 | IGLV3-11\*01

atggcctggaccctctcctgctccccctccttactctttgcaacaggattcgtggcctcc  
agtgagggtgactcagccgccccctcagtgctcagtgccctgggacagacggctagaatcacc  
tgctctggagatagtgaggaaaaataccaattggccaccagcagaagccagggtcaa  
gccccatacagatcatttataaggatagtgagcggcctcagggtaccctgaccgattc  
ctagctccagtccagggaaacagtcaccctgaccatcaggcgggcccgggcccgaagac  
gaggctgactactactgtcagtccttatgacatcagtagtaagtct

**서열 번호 48** >IMGT000038 | IGLV3-13\*01

atggcctggaccctctcctcctcagtcctcctcctcactgcaacagggtccgtggcctcc  
tatgtgctgactcagccccctcagtgccagtgaaacctgggacagacggccaggatcaca

[0198]



ccagggagccctccccggtatctcctgtactactactcagattcaataagcaccagggc  
cccggggtcccagccgcttctcgggtccaaagatgcctcggccaatgcagggtctctg  
ctcatctctgggctgcagcctgaggaagaggtgactattactgtgcaacttggcacagt  
agtgtgtgt

**서열 번호 55** >IMGT000038 | IGLV5-46\*01

atggcctggaccatgctctcctcgtgctctctgtgcaactgcacaggttccctgtcccag  
cctgtcgtgactcagccaccctcctcctctgcatctctgggagcaacagccagactcacc  
tgaccctcagcagggaagtgcggttggtagttaaagcatatactggtaccaacagaag  
ccagggagccctcctcgggtatctcctgtactactactcagactccagcaatgcagctggga  
cccggggtcccagtcgagtgctgtgggtccaaagatgcctcggccaatgcagggtctctg  
ctcatctctgggctgcagcctgaggaagaggtgactattactgtgctatagcaatggc  
agtggaaagcagcttgggttact

**서열 번호 56** >IMGT000038 | IGLV5-48\*01

atggcctggactctctagtctcctcagctgtgtgtcaatggacaggttccctgtcccag  
cctgtgctgaccagccgctcctcctcgtctgcatctcctggaaacaacagccagactcacc  
tgaccctcagcagcgggttcagtggtggaggctactacataaattggttccagcagaag  
ccagggagccctccccggtatctcctgtactactactcagattcaataagcaccagggc  
cctggggtcccagccgcttctcgggtccaaagatgcctcggccaatgcagggtctctg  
ctcatctctgggctgcagcctgaggaagaggtgactattactgtgctatagcaatggc  
agtggaaagcagctaccgttact

**서열 번호 57** >IMGT000038 | IGLV5-49\*01

atggcctggatccccgctcctcctcgtgctcctcctgtcactgcccaggttccctgtcccag  
cctgtcgtgactcagccaccctcctcctcctgcatctctgggagcaacagccagactcacc  
tgaccctcagcagggaagtgcggttggtagttaaagcatatactggtaccaacagaag  
ccagggagccctcctcgggtatctcctgtactactactcagactccagcaatgcagctggga  
cccggggtcccagtcgagtgctgtgggtccaaagatgcctcggccaatgcagggtctctg  
ctcatctctgggctgcagcctgaggaagaggtgactattactgtgctatagcaatggc  
agtggaaagcagctaccgttact

**서열 번호 58** >IMGT000038 | IGLV5-55\*01

atggcctggactcctgtcctcctcctcagctcctcctccatgtgaggttccctgtcccag  
cctgtgctgaccagccgctcctcctcctgctgcatctcgggaaacaacagccagactcacc  
tgaccctcagcagcggcttcaatgttggaggctactacataaattggttccagcagaag  
ccagggagccctccccggtatctcctgtactactactcagactcagataagcaccagggc  
cccggggtcccagccgcttctcgggtccaaagatgcctcggccaatgcagggtctctg  
ctcatctctgggctgcagcctgaggaagaggtgactattactgtgctacagatcagtc  
agtgtgttact

**서열 번호 59** >IMGT000038 | IGLV5-66\*01

atggcctggcctctctcgtcctcactactcctgtctcactgcacaggttccctgtcccag  
cctgtgctgaccagccgctcctcctcctgctgcatctcgggaaacaacagccagactcacc  
tgaccctcagcagcggcttcaatgttggaggctactacataaattggttccagcagaag  
ccagggagccctccccggtatctcctgtactactactcagactcagataagcaccagggc  
cccggggtcccagccgcttctcgggtccaaagatgcctcggccaatgcagggtctctg  
ctcatctctgggctgcagcctgaggaagaggtgactattactgtgctacagatcagtc  
agtgggagcagctaccgttact

**서열 번호 60** >IMGT000038 | IGLV5-68\*01

atggcctggatctcctcctcctcgtgctcctcctgtcactgcccaggttccctgtctcag

[0200]

cctgtgctgactcagccagcctccctctctgcatctctgggagcaacagccagactcacc  
tgcacgctgagcagggacatcaatgttggaggctactacatatactggtagcaacagaat  
ccagggagcctcccgggtatctcctgtaactactcagactccagtaacagttggga  
cctggggtccccagccgcttctccggatccaaagatgctcggccaatgcaagggtctctg  
ctcatctctgggctgagcctgaggacgaggctgactattactgtgcaatcgggacagt  
agtgtggt

**서열 번호 61** >IMGT000038 | IGLV5-71\*01

atggcctggatccccatcctcctcgtgctcctctgtcactgcacaggtccctgtcccag  
cctgtctgactcagccagcctccctctctgcatctctgggagcaacagccagactcacc  
tgcacctgagcagggacatcaacgttggaggctataacatatactggtagcaacagaag  
ccagggagcctcccgggtatctcctgtaactactcagactcagataagcaccagggc  
cctggctcccagccgcttctcctgggtccaaagatgctcggccaatgcaagggtctctg  
ctcatctctgggctgagcctgaggacgaggctgactattactgtgcaatcgggacagt  
agtgtggt

**서열 번호 62** >IMGT000038 | IGLV5-79\*01

atggcctggaccctttttcctctgtgttcctggctcactgcacaggtccctgtctcag  
ccggtgctgaccaccagccaccctcctctctgcatctctgggaaactctgtgagactaac  
tgtaccctgagcagtggtctcagagttggtgatttctggataaaactggtaccagcagaat  
ccagggaaacctcccgggtatctcctgtaactaccactcagactcagataaacaccagggc  
tccggggtcccagccgcttctcctggatccagtgatgctcggccaatgcaagggtctctg  
ctcatctctgggctgagcctgaggatgaggctgactattactgtgtagcaatggcctggc  
aactctaagcttta

**서열 번호 63** >IMGT000038 | IGLV12-26\*01

atggcctggctctctcctcctggttcacactctgtctcactgcacaggggccaactcccag  
gaagtgtgactcaggaacttcaactctcaacaactcctggaggaaactcaccatcacc  
tgtggtccagctactggggtgtcaccaccagtaattatgcccagctgggtccaacagaag  
ccctaccagagattccagggctctgataggtgggaccagctaccggaaccaggggtccct  
gcccgatctctggctccctgggtggacagaagccgctcctcaccatcaccggggcgag  
tcagaggatgaagctgagtattactgtgttctgtggttcagcaaccattac

**IGLJ**

**서열 번호 64** >IMGT000038 | IGLJ1\*01

ttgggtgttcggcggaggtaccatctgagcgtcctag

**서열 번호 65** >IMGT000038 | IGLJ2\*01

tcatatcttcgggtggaggaccatctgactgtcctcg

**서열 번호 66** >IMGT000038 | IGLJ4\*01

ttatgttttcggcggaggaccaagtgaccgtcctcg

**서열 번호 67** >IMGT000038 | IGLJ5\*01

tcctatcttcggcggaggaccgtctgaccgtcctcg

**서열 번호 68** >IMGT000038 | IGLJ6\*01

ttttgtttttggcagaggaccctggctgacggctcctag

**서열 번호 69** >IMGT000038 | IGLJ7\*01

tgctttgttcggcggaggaccatctgaccgtcctcg

**서열 번호 70** >IMGT000038 | IGLJ8\*01

ttgggtgtttggcgatggaaccagctgactgtattag

**서열 번호 71** >IMGT000038 | IGLJ9\*01

tattgtgttcggcggaggaccatctgaccgtcctcg

**서열 번호 72** >IMGT000038 | IGLJ10\*01

ttgggtgtttggcgatggaaccagctgactgtattag

**서열 번호 73** >IMGT000038 | IGLJ11\*01

tattgtgttcggcggaggaccatctgaccgtcctcg

[0201]

[0202]

[0203]

[0204]

[0205]

**pre-D**

이는 Ighd-5 D<sub>H</sub> 유전자 상류 21609bp 단편이다. pre-D 서열은 무스 무스쿨러스(*Mus musculus*) C57BL/6J 계통 12 번 염색체, 어셈블리: GRCm38.p4, 주석 릴리스 106, 서열 번호 NC\_000078.6에서 찾을 수 있다.

전체 서열은 이하 보인 2개의 100 bp 서열 사이에 존재한다:

NC\_000078.6 내 113526905- 113527004 번 위치에 대응하는,  
Ighd-5 DH 유전자 분절의 상류

**서열 번호 74**

ATTTCGTACCTGATCTATGTCAATATCTGTACCATGGCTCTAGCAGAGATGAAATATGAGACAG  
TCTGATGTCATGTGGCCATGCCTGGTCCAGACTTG

NC\_000078.6 내 113548415 - 113548514 번 위치에 대응하는,

Adam6a 유전자의 2kb 상류

**서열 번호 75**

GTCAATCAGCAGAAATCCATFCATACATGAGACAAAGTTATAATCAAGAAATGTTGCCATAGGAA  
ACAGAGGATATCTCTAGCACTCAGAGACTGAGCAC

[0206]

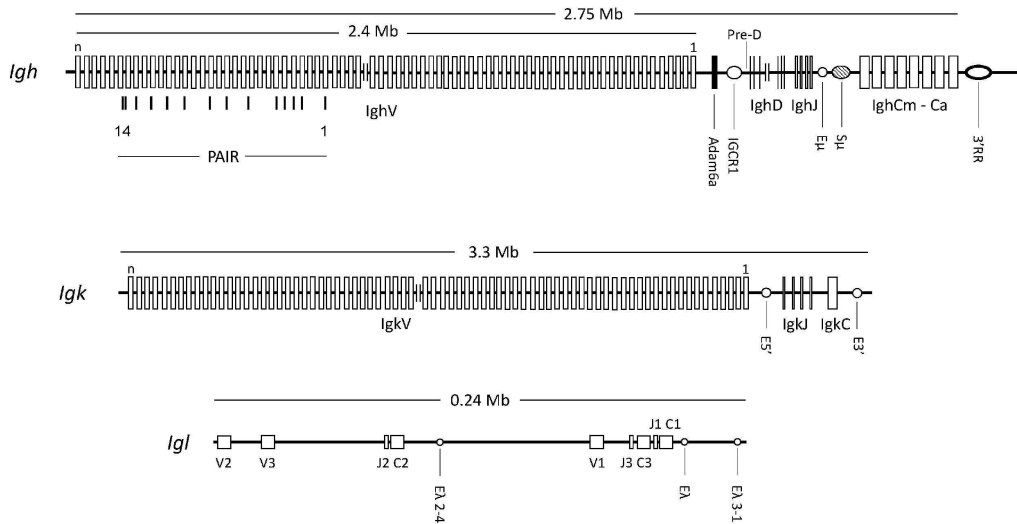
[0207] **Adam6a**

[0208] Adam6a(디스인테그린 및 메탈로캡티다아제 도메인 6A)는 음성 생식능에 관여하는 유전자이다. Adam6a 서열은 무스 무스쿨러스 C57BL/6J 계통 12번 염색체, 어셈블리: GRCh38.p4, 주석 릴리스 106, 서열 번호 NC\_000078.6의 113543908 ~ 113546414번 위치에서 찾을 수 있다.

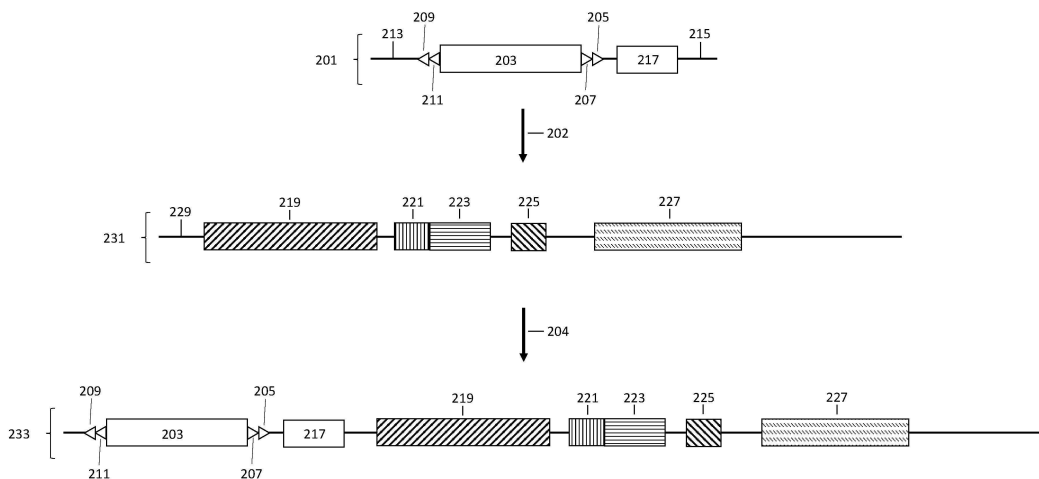
[0209] Adam6a 서열 번호 OTTMUSG00000051592(VEGA)

도면

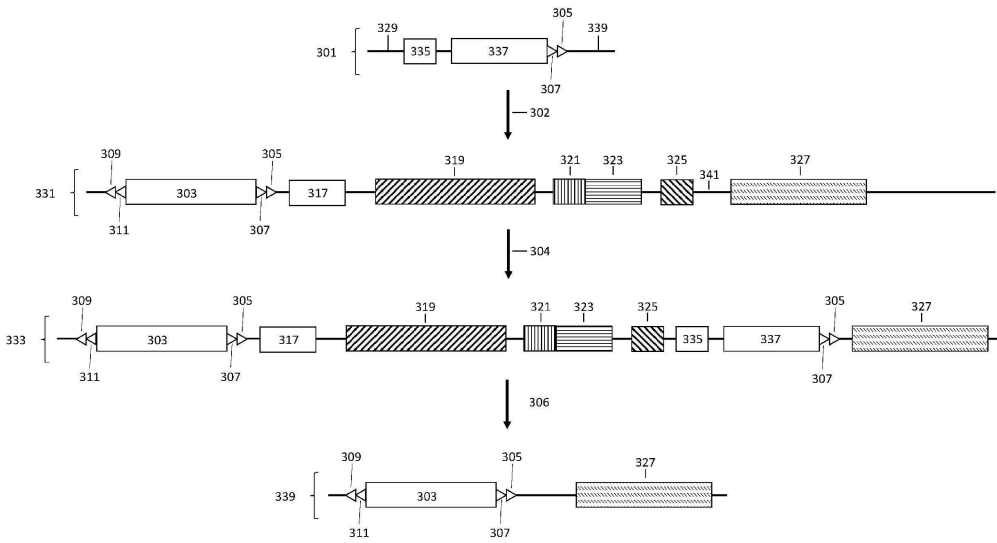
도면1



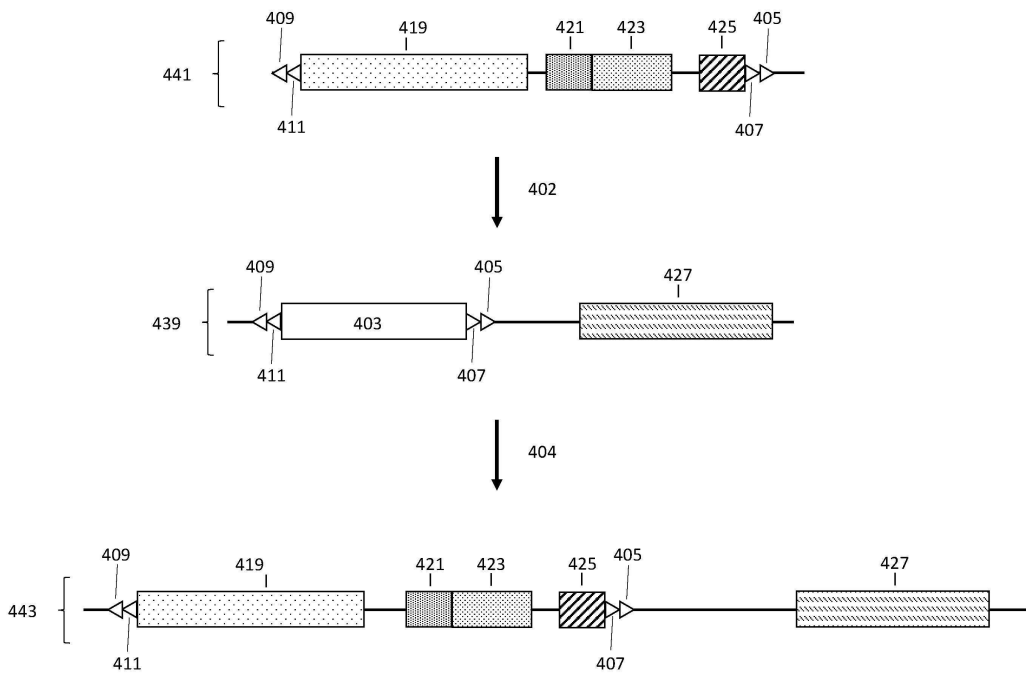
도면2



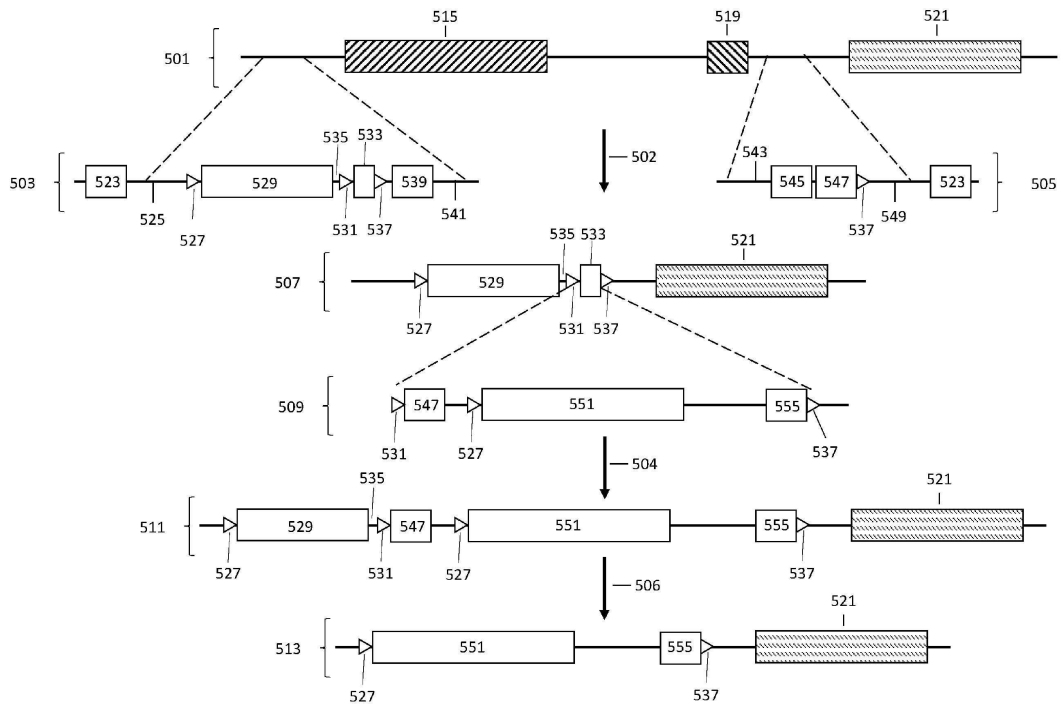
도면3



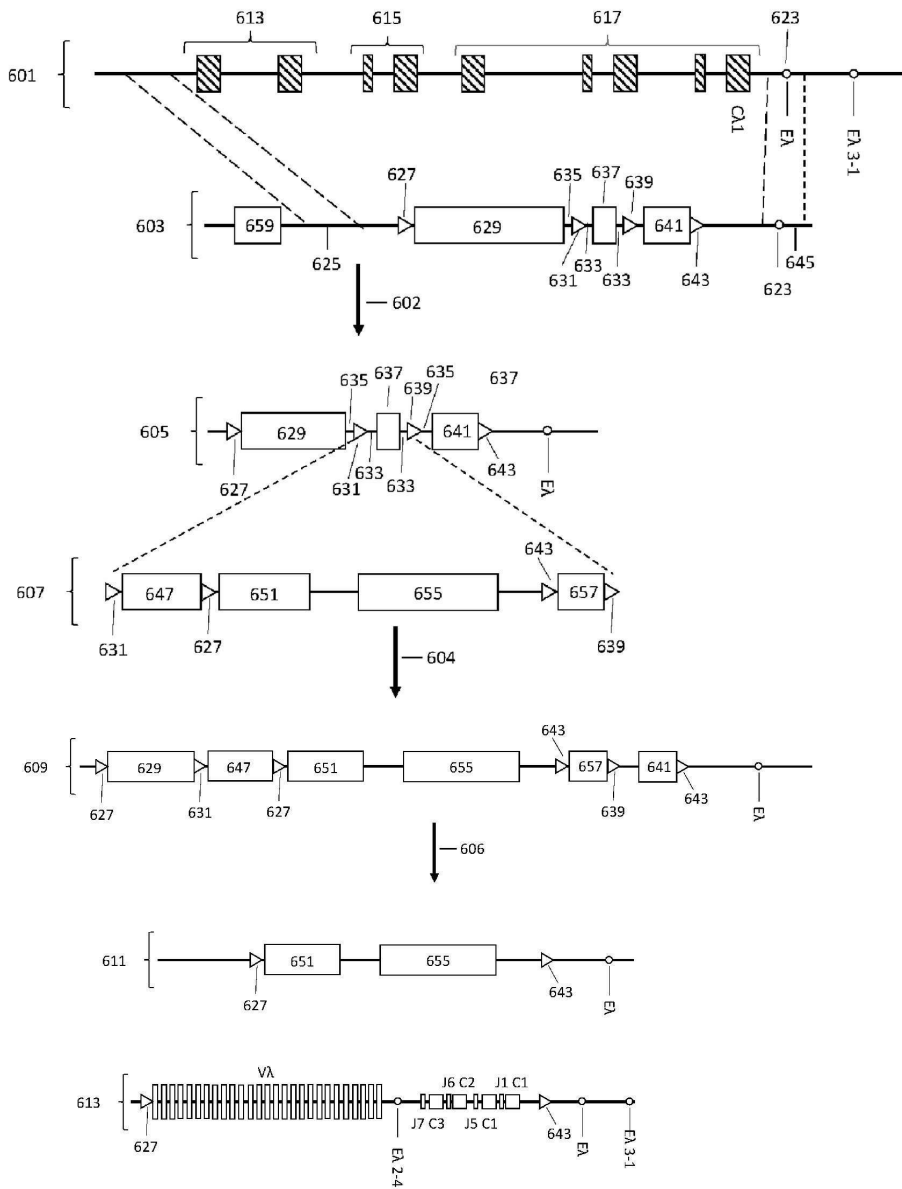
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.