



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2018년06월01일  
 (11) 등록번호 10-1862277  
 (24) 등록일자 2018년05월23일

- |  |   |
|--|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C07K 16/30 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)<br>C07K 14/705 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2012-7019435<br>(22) 출원일자(국제) 2010년12월17일<br>심사청구일자 2015년11월24일<br>(85) 번역문제출일자 2012년07월23일<br>(65) 공개번호 10-2012-0102138<br>(43) 공개일자 2012년09월17일<br>(86) 국제출원번호 PCT/US2010/060925<br>(87) 국제공개번호 WO 2011/084664<br>국제공개일자 2011년07월14일<br>(30) 우선권주장<br>61/288,562 2009년12월21일 미국(US)<br>(56) 선행기술조사문헌<br>KR1020060130604 A<br>US06676927 B1<br>W01995028959 A1*<br>US20080206867 A1<br>*는 심사관에 의하여 인용된 문헌 | (73) 특허권자<br>리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드<br>미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리<br>버 로드 777<br>(72) 발명자<br>맥도날드 린<br>미국 뉴욕 10605 화이트 플레인즈 게드니 웨이 16<br>투 나쎄<br>미국 뉴욕 10570 플라즌트빌 워싱턴 애비뉴 514<br>(뒷면에 계속)<br>(74) 대리인<br>특허법인와이에스장 |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 19 항

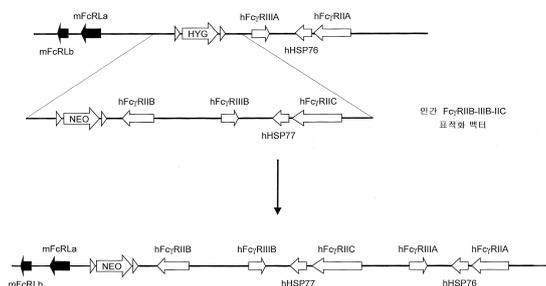
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **인간화된 FcγR 마우스**

(57) 요약

유전자 변형된 비-인간 동물 및 이들을 제조하고 사용하기 위한 방법 및 조성물이 제공되며, 상기 유전자 변형은 내인성 저 친화성 FcγR 유전자좌의 결실을 포함하고, 상기 마우스는 기능적 FcRγ-사슬을 발현할 수 있다. 내인성 FcγR 유전자좌로부터 저 친화성 인간 FcγR 유전자를 발현하는 마우스를 포함하는 유전자 변형된 마우스가 설명되며, 상기 마우스는 기능적 FcRγ-사슬을 포함한다. 숙주 면역 시스템의 부속 세포 상에서 최대 5개의 저 친화성 인간 FcγR 유전자를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 제공된다.

대표도



(72) 발명자

구러 카간

미국 뉴욕 10595 발할라 파멜라 레인 8

스티븐스 션

미국 캘리포니아 94158 샌프란시스코 베리 스트리트 #413 355

머피 앤드류 제이

미국 뉴욕 10520 크로톤 온 허드슨 뉴턴 코트 10

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

유전자 변형을 포함하는 마우스로서, 상기 유전자 변형은 인간 Fc $\gamma$ R1IA, Fc $\gamma$ R1IB, Fc $\gamma$ R1IC, Fc $\gamma$ R1IIIA 및 Fc $\gamma$ R1IIB 으로부터 선택된 적어도 2개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 암호화하는 인간 게놈 단편에 의한 Fc $\gamma$ R1IB, Fc $\gamma$ R1IV 및 Fc $\gamma$ R1III  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 마우스 유전자를 포함하는 내인성 마우스 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 게놈 단편의 치환을 포함하며, 상기 마우스는 기능적 FcR $\gamma$ -사슬을 포함하는 마우스.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서, 적어도 2개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자는 Fc $\gamma$ R1IA 및 Fc $\gamma$ R1IIIA인 것을 특징으로 하는 마우스.

**청구항 3**

제 2 항에 있어서, 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA가 마우스의 NK 세포 상에서 발현되는 것을 특징으로 하는 마우스.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서, 적어도 2개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자는 Fc $\gamma$ R1IB, Fc $\gamma$ R1IC, 및 Fc $\gamma$ R1IIB인 것을 특징으로 하는 마우스.

**청구항 5**

제 2 항에 있어서, Fc $\gamma$ R1IA 및 Fc $\gamma$ R1IIIA 유전자는 대립형질 변이체 또는 다형성을 포함하는 것을 특징으로 하는 마우스.

**청구항 6**

제 1 항에 있어서, 마우스는 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 대립형질 변이체를 포함하며, 상기 대립형질 변이체는 (a) Fc $\gamma$ R1IA 대립형질 변이체 131H, (b) Fc $\gamma$ R1IIIA 대립형질 변이체 158V, (c) Fc $\gamma$ R1IB 대립형질 변이체 232I, (d) 호중구 항원 2(NA2) 대립형질을 특징으로 하는 Fc $\gamma$ R1IIB 대립형질 변이체, 및 (e) 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 마우스.

**청구항 7**

유전자 변형된 마우스로서, 상기 유전자 변형은 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 유전자에 의한 Fc $\gamma$ R1IIB, Fc $\gamma$ R1III 및 Fc $\gamma$ R1IV  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 내인성 마우스 유전자의 치환을 포함하고, 상기 마우스는 내인성 마우스 FcR $\gamma$ -서브유닛과 관련된 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA 단백질을 발현하며, 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA 단백질이 마우스 NK 세포의 표면에서 발현되는 마우스.

**청구항 8**

제 7 항에 있어서, 마우스 NK 세포는 마우스의 혈액 안을 순환하는 NK 세포이고, 마우스 NK 세포의 표면에서 발현된 Fc $\gamma$ R1IIIA 단백질은 인간 Fc 또는 변형된 인간 Fc를 포함하는 면역부착소 또는 항체와 결합하며, 상기 면역부착소 또는 항체는 마우스 내의 표적 세포와 특이적으로 결합하고, 면역부착소 또는 항체와 NK 세포의 Fc $\gamma$ R1IIIA와의 결합은 표적 세포의 NK 세포 사멸을 매개하는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 마우스.

**청구항 9**

제 8 항에 있어서, 표적 세포는 인간 병원균으로 감염되고, 면역부착소 또는 항체는 인간 병원균의 에피토프와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 마우스.

**청구항 10**

제 8 항에 있어서, 표적 세포는 종양 세포이고, 면역부착소 또는 항체는 종양 세포의 에피토프와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 유전자 변형된 마우스.

**청구항 11**

(a) 유전자 변형된 마우스에, 마우스에서 NK 세포가 아닌 표적 세포와 특이적으로 결합하는, 인간 Fc를 포함하는 치료제를 투여하는 단계;

(b) 마우스 또는 마우스의 조직 샘플에서 NK-매개된 표적 세포 사멸의 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 치료제에 의해서 매개된 표적 세포 사멸의 양을 결정하여 치료제-의존성 세포 사멸을 측정하는 단계를 포함하며,

상기 유전자 변형은 마우스 Fc $\gamma$ RIIB의  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 유전자의 결실, 마우스 Fc $\gamma$ RIII의  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 유전자의 결실, 및 마우스 Fc $\gamma$ RIV의  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 유전자의 결실을 포함하고,

상기 마우스는 결실된 내인성 마우스  $\alpha$ -서브유닛 유전자좌에 인간 Fc $\gamma$ RIIIA의  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 유전자를 포함하며, 기능적 FcR $\gamma$ -사슬 서브유닛을 발현하는, 치료제-의존성 세포 사멸을 측정하는 방법.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서, 마우스는 결실된 내인성 마우스  $\alpha$ -서브유닛 유전자좌에 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -서브유닛, Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -서브유닛, Fc $\gamma$ RIIC  $\alpha$ -서브유닛, Fc $\gamma$ RIIIB  $\alpha$ -서브유닛, 및 이들의 조합으로부터 선택된 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -서브유닛을 암호화하는 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

제 11항에 있어서, 표적 세포는 인간 병원균이고, 치료제는 인간 병원균의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제 11 항에 있어서, 표적 세포는 인간 병원균에 의해 감염된 마우스 세포이고, 치료제는 인간 병원균의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제 11 항에 있어서, 표적 세포는 인간 병원균에 의해 감염된 인간 세포이고, 치료제는 인간 병원균의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제 11 항에 있어서, 표적 세포는 인간 종양 세포이고, 치료제는 인간 종양 세포의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제 11 항에 있어서, 조직 샘플은 혈액 샘플인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 11항에 있어서, 치료제는 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제 18 항에 있어서, 항체는 인간 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명의 분야는 내인성 뮤린 Fc $\gamma$ R 유전자를 결여한 유전자 변형된 비-인간 동물로서, 내인성 Fc $\gamma$ R 유전자의 인간 Fc $\gamma$ R 유전자로의 치환을 포함하는 유전자 변형된 동물을 포함하고, 적어도 2, 3, 4 또는 5개의 기능적 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현할 수 있는 마우스를 포함하고, 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하지 않는 면역세포를 포함하는 유전자 변형된 마우스를 포함한다.

**배경기술**

[0002] Fc 수용체(FcRs)는 포유류에서 면역 시스템의 다양한 기능을 수행하는 면역시스템의 세포 표면에서 발견되는 단백질이다. FcRs은 다양한 세포에 다양한 타입으로 존재하며, 다양한 면역 기능을 매개하는데, 예를 들어 감염된 세포나 침입하는 병원균에 부착된 항체와 결합하거나, 포식세포 또는 세포독성 세포를 자극해서 항체-매개 포식작용 또는 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)에 의해서 미생물이나 감염된 세포를 파괴하거나 한다.

[0003] ADCC는 면역 시스템의 이펙터 세포가 항체에 의해 결합된 표적 세포를 용해하는 과정이다. 이 과정은 외부 항원이나 세포에 대한 사전 노출에 좌우되며, 항체 반응을 유도한다. ADCC는 예를 들어 자연사멸(NK) 세포와 같은 이펙터 세포를 통해서 이펙터 세포의 표면에서 발현된 FcR과 그 자체가 외부 항원이나 세포와 결합된 항체의 Fc 부분의 결합에 의해서 매개될 수 있다. 면역반응에서 FcRs가 중추적인 역할을 하기 때문에 다수의 인간 FcRs을 공-발현하는 유용한 비-인간 동물이 필요하며, 이것은 다수의 인간 저 친화성 FcRs를 공-발현하는 비-인간 동물을 포함한다. 인간 질환 치료법, 특히 항-종양 치료법과 자가면역 질환의 치료를 위한 치료법의 연구와 해명, 및 제약 약물 개발, 특히 인간 항체 제약의 개발, 설계 및 시험에서 인간 FcR 기능 및 ADCC의 인간 과정에 관한 비-인간 동물 모델에 대한 필요성도 존재한다.

**발명의 내용**

[0004] 유전자 변형된 세포, 비-인간 배아, 비-인간 동물 및 이들을 제조하고 사용하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 다양한 양태에서, 비-인간 동물은 인간 Fc $\gamma$ R 수용체, 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 수용체의 결실, 및/또는 내인성 마우스 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌에서 내인성 Fc $\gamma$ R 수용체의 인간 Fc $\gamma$ R 수용체로의 치환을 포함한다.

[0005] 한 양태에서, 기능적 Fc $\gamma$ R-사슬을 포함하는 유전자 변형된 세포, 비-인간 배아, 및 비-인간 동물이 제공되며, 상기 세포, 배아, 및 동물은 저 친화성 내인성 비-인간 Fc $\gamma$ R 유전자 서열(예를 들어, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIV 및 Fc $\gamma$ RIII)의 하나 이상의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자 서열(예를 들어, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA, Fc $\gamma$ RIIIB, 및 이들의 조합으로부터 선택된)로의 치환을 포함하는 추가의 변형을 포함한다.

[0006] 한 구체예에서, 상기 세포, 비-인간 배아, 및 비-인간 동물은 뮤린이다. 한 구체예에서, 상기 기능적 Fc $\gamma$ -사슬은 마우스 Fc $\gamma$ -사슬이다. 한 구체예에서, 마우스 Fc $\gamma$ -사슬은 상기 마우스, 세포, 또는 배아에 내인성인 Fc $\gamma$ -사슬이다.

[0007] 한 구체예에서, 상기 세포, 배아, 및 동물은 마우스이고, 상기 마우스는 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 수용체의 기능적  $\alpha$ -사슬 및 기능적 내인성 마우스  $\gamma$ -사슬을 발현한다.

[0008] 한 양태에서, 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 상기 마우스는 Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬, Fc $\gamma$ RIV  $\alpha$ -사슬, Fc $\gamma$ RIII  $\alpha$ -사슬, 및 이들의 조합으로부터 선택된 내인성  $\alpha$ -사슬을 발현하지 않고, 상기 마우스는 기능적 내인성 마우스  $\gamma$ -사슬을 발현한다.

[0009] 특정 구체예에서, 상기 마우스는 기능적 Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬을 발현하지 않고, 기능적 Fc $\gamma$ RIV  $\alpha$ -사슬을 발현하지 않고, 기능적 Fc $\gamma$ RIII  $\alpha$ -사슬을 발현하지 않는다.

[0010] 한 구체예에서, 마우스 계통은 내인성 Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬의 결실, 내인성 Fc $\gamma$ RIV  $\alpha$ -사슬의 결실, 및 내인성 Fc $\gamma$ RIII  $\alpha$ -사슬의 결실을 포함한다.

[0011] 한 구체예에서, 마우스는 내인성 Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬의 결실, 내인성 Fc $\gamma$ RIV  $\alpha$ -사슬의 결실, 및 내인성 Fc $\gamma$ RIII  $\alpha$ -사슬의 결실을 포함하고, 동일한 항원과 관련하여 야생형 마우스의 능력과 비교해서 항원에 대한 면역 반응을 일으키는 감소된 능력을 더 포함한다. 한 구체예에서, 감소된 면역반응은 감소된 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)을 포함한다. 한 구체예에서, 감소된 면역반응은 세포 사멸 분석에서 항체-의존성 NK 세포 사멸을 달성하는 감소된 능력을 포함한다. 특정 구체예에서, ADCC 또는 항체-의존성 NK 세포 사멸의 감소는 적어도 50%, 한 구체예에서는 적어도 75%, 한 구체예에서는 적어도 90%이다.

- [0012] 한 구체예에서, 마우스는 내인성 Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬의 결실, 내인성 Fc $\gamma$ RIV  $\alpha$ -사슬의 결실, 및 내인성 FC7RIII  $\alpha$ -사슬의 결실을 포함하고, 야생형 마우스, 예를 들어 결실을 포함하지 않는 동일한 또는 유사한 계통의 마우스와 비교해서 항원에 의한 면역화시 증가된 체액성 항체 반응을 더 포함한다. 한 구체예에서, 증가된 체액성 항체 반응은 야생형 마우스에 비해서 2배이다. 한 구체예에서, 증가된 체액성 항체 반응은 야생형 마우스에 비해서 3배이다. 한 구체예에서, 증가된 체액성 항체 반응은 야생형 마우스에 비해서 5배이다. 한 구체예에서, 증가된 체액성 항체 반응은 야생형 마우스에 비해서 7배이다. 한 구체예에서, 증가된 체액성 항체 반응은 야생형 마우스에 비해서 10배이다. 특정 구체예에서, 체액성 항체 반응은 마우스로부터의 혈청 단백질 마이크로그램 당 항원(마우스가 면역화됨)과 특이적으로 결합하는 항체의 마이크로그램에 의해서 측정된다. 한 구체예에서, 증가된 체액성 항체 반응은 야생형 마우스가 내성을 나타내는 항원과 관련되거나, 또는 야생형 마우스에서 불량한 또는 최소한의 체액성 면역반응을 나타내는 항원과 관련된다. 특정 구체예에서, 항원은 마우스 항원이다. 특정 구체예에서, 항원은 마우스 단백질과 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 나타내는 인간 항원이다.
- [0013] 한 양태에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자로의 치환을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 상기 치환은 내인성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자 유전자좌에서 이루어진다. 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자는 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIV 및 Fc $\gamma$ RIII  $\alpha$ -사슬 유전자로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 상기 마우스는 내인성 Fc $\gamma$ -사슬을 발현하고, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자는 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬이다. 다른 특정 구체예에서, 유전자 변형된 마우스는 NK 세포에서 내인성 Fc $\gamma$ -사슬 및 기능적 인간 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬을 발현한다. 특정 구체예에서, NK 세포에서 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬의 기능성은 인간 항체-매개된 NK 사멸(예를 들어, 인간 항체에 의해 매개된 ADCC)에 의해 반영된다.
- [0014] 한 양태에서, 유전자 변형된 세포, 비-인간 배아, 또는 비-인간 동물이 제공되며, 상기 유전자 변형은 적어도 하나의 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자의 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자로의 치환을 포함하며, 상기 세포, 배아, 또는 동물은 기능적 Fc $\gamma$ 를 발현한다. 한 구체예에서, 기능적 Fc $\gamma$ -사슬은 내인성 Fc $\gamma$ -사슬이다. 한 구체예에서, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자는 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자, Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ RIIA 유전자는 다형성을 포함하며, 상기 다형성은 131His 저 반응자 다형성 및 131Arg 고 반응자 다형성으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, Fc $\gamma$ RIIA 다형성은 131His 저 반응자 다형성이다. 한 구체예에서, Fc $\gamma$ RIIA 유전자는 특정 대립형질 변이체이며, 상기 대립형질 변이체는 158Val 변이체 및 158Phe 변이체로부터 선택된다. 특정 구체예에서, Fc $\gamma$ RIIA 대립형질 변이체는 158Val 변이체이다.
- [0015] 한 구체예에서, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자는 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIB 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ RIIB 유전자는 아미노산 치환을 포함하며, 상기 치환은 232Ile 또는 232Thr 치환으로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, 아미노산 치환은 232Ile 치환이다. 특정 구체예에서, Fc $\gamma$ RIIB 유전자는 특정 대립형질 변이체이며, 상기 대립형질 변이체는 NA1 변이체 및 NA2 변이체로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, Fc $\gamma$ RIIB 대립형질 변이체는 NA2 변이체이다.
- [0016] 한 구체예에서, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자는 Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0017] 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ RIV  $\alpha$ -사슬 유전자 및 Fc $\gamma$ RIII  $\alpha$ -사슬 유전자가 적어도 하나의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자로 치환된다. 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ RIV  $\alpha$ -사슬 유전자 및 Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬 유전자가 적어도 하나의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자로 치환된다. 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬 유전자 및 Fc $\gamma$ RIII  $\alpha$ -사슬 유전자가 적어도 하나의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자로 치환된다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자는 Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, 적어도 하나의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자는 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자, Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, 적어도 하나의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자는 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자가 인간 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자 및 인간 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자로 치환된다. 다른 특정 구체예에서, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자는 변이체를 포함하며, 상기 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자는 131His 변이체를 포함하고, Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자는 158Val 변이체를 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자가 다음의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$

R α-사슬 유전자로 치환된다: FcγRIIB, FcγRIIC 및 FcγRIIIB. 다른 특정 구체예에서, 저 친화성 인간 FcγRIIIB α-사슬 유전자 및 FcγRIIIB α-사슬 유전자는 변이체를 포함하며, 상기 FcγRIIIB α-사슬 유전자는 232I1e 변이체를 포함하고, FcγRIIIB α-사슬 유전자는 NA2 변이체를 포함한다.

- [0018] 한 구체예에서, 유전자 변형은 마우스 및 인간 염색체 1의 신테닉 게놈 서열의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 유전자 변형은 내인성 저 친화성 마우스 FcγR 유전자를 포함하는 게놈 단편의 저 친화성 인간 FcγR 유전자를 포함하는 게놈 단편으로의 치환을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 염색체 1:172,889,983에서 염색체 1:172,989,911까지의 마우스 게놈이 인간 염색체 1:161,474,729에서 염색체 1:161,620,458까지 포함하는 인간 게놈 단편으로 치환된다.
- [0019] 한 양태에서, 유전자 변형된 세포, 비-인간 배아, 또는 비-인간 동물이 제공되며, 상기 유전자 변형은 하나 이상의 내인성 저 친화성 수용체 α-사슬 유전자의 녹아웃, 및 하나 이상의 인간 FcγR α-사슬 유전자를 포함하는 에피솜의 존재를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 세포, 배아, 또는 동물은 기능적 FcRγ-사슬을 발현한다. 특정 구체예에서, 상기 에피솜은 미니 염색체이다. 한 구체예에서, 기능적 FcRγ-사슬은 상기 세포, 배아, 또는 동물에 내인성이다.
- [0020] 한 양태에서, 저 친화성 마우스 FcγR α-사슬 유전자의 저 친화성 인간 FcγR α-사슬 유전자로의 치환을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 상기 마우스는 마우스 FcRγ-사슬 유전자를 포함하고, 기능적 인간 저 친화성 FcγR 수용체를 발현한다. 한 구체예에서, 기능적 저 친화성 FcγR 수용체는 저 친화성 FcγR 수용체가 인간에서 발현되는 세포 타입에서 발현된다. 특정 구체예에서, 기능적 인간 저 친화성 FcγR 수용체는 FcγRIIIA이고, 이 FcγRIIIA는 NK 세포에서 발현된다.
- [0021] 한 구체예에서, 마우스는 2개의 마우스 FcγR α-사슬 유전자의 결실을 포함한다. 다른 구체예에서, 마우스는 3개의 마우스 FcγR α-사슬 유전자의 결실을 포함한다.
- [0022] 한 구체예에서, 마우스는 3개 마우스 FcγR α-사슬 유전자의 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자로의 치환을 포함한다. 다른 구체예에서, 마우스는 2개 마우스 FcγR α-사슬 유전자의 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자로의 치환을 포함한다. 특정 구체예에서, 마우스는 3개 마우스 FcγR α-사슬 유전자의 적어도 2개의 인간 FcγR α-사슬 유전자로의 치환을 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 3개의 마우스 FcγR α-사슬 유전자가 3개의 인간 FcγR α-사슬 유전자로 치환된다. 다른 특정 구체예에서, 마우스는 2개 마우스 FcγR α-사슬 유전자의 적어도 2개의 인간 FcγR α-사슬 유전자로의 치환을 포함한다. 또 다른 특정 구체예에서, 2개의 마우스 FcγR α-사슬 유전자가 적어도 3개의 인간 FcγR α-사슬 유전자로 치환된다.
- [0023] 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 FcγR α-사슬 유전자는 FcγRIIB, FcγRIV, FcγRIII α-사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0024] 한 구체예에서, 저 친화성 인간 FcγR α-사슬 유전자는 FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB α-사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 저 친화성 인간 FcγR α-사슬 유전자는 FcγRIIA, FcγRIIIA α-사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 저 친화성 인간 FcγR α-사슬 유전자는 FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIB α-사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0025] 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 FcγRIV α-사슬 유전자 및 FcγRIII α-사슬 유전자가 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자로 치환된다. 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 FcγRIV α-사슬 유전자 및 FcγRIIB α-사슬 유전자가 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자로 치환된다. 한 구체예에서, 저 친화성 마우스 FcγRIIB α-사슬 유전자 및 FcγRIIIB α-사슬 유전자가 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자로 치환된다. 특정 구체예에서, 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자는 FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB α-사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자는 FcγRIIA, FcγRIIIA α-사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, 적어도 하나의 인간 FcγR α-사슬 유전자는 FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIB α-사슬 유전자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다른 특정 구체예에서, 마우스 α-사슬 유전자가 다음의 인간 FcγR α-사슬 유전자로 치환된다: FcγRIIA 및 FcγRIIIA. 또 다른 특정 구체예에서, 마우스 α-사슬 유전자가 다음의 인간 FcγR α-사슬 유전자로 치환된다: FcγRIIB, FcγRIIC 및 FcγRIIIB.
- [0026] 한 양태에서, 저 친화성 인간 FcγR α-사슬 및 마우스 FcRγ-사슬 서브유닛을 포함하는 유전자 변형된 마우스가 제공되며, 상기 마우스는 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵세포, 대식세포, 혈소판, 랑게르한스 세포, 수지상 세포, NK 세포, 비만세포, B 세포, T 세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된 세포에서 인간 FcγR α-사슬을 발

현한다. 한 구체예에서, 마우스는 호중구, 대식세포, 호산구, 혈소판, 수지상 세포, 랑게르한스 세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된 세포에서 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬을 발현한다. 한 구체예에서, 마우스는 발현된 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬을 통해서 개시되거나 매개되는 포식작용, ADCC 및 세포 활성화가 가능하다. 한 구체예에서, 마우스는 대식세포, NK 세포, 단핵세포, 비만세포, 호산구, 수지상 세포, 랑게르한스 세포, 적어도 하나의 T 세포 타입, 및 이들의 조합으로부터 선택된 세포에서 인간  $Fc\gamma RIIIA$   $\alpha$ -사슬을 발현한다. 한 구체예에서, 마우스는 NK 세포에서 발현된 인간  $Fc\gamma RIIIA$   $\alpha$ -사슬을 통해서 매개되는 ADCC가 가능하다. 특정 구체예에서, 마우스는 인간 Fc를 포함하는 항체에 반응하여 hFc $\gamma RIIIA$ -매개 ADCC를 나타낸다.

[0027] 한 구체예에서, 마우스는 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬과 인간  $Fc\gamma RIIIA$   $\alpha$ -사슬을 둘 다 발현한다. 한 구체예에서, 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬은 혈소판에서 발현되고, 인간  $Fc\gamma RIIIA$   $\alpha$ -사슬은 NK 세포에서 발현된다. 한 구체예에서, 마우스는 인간 Fc를 포함하는 항체에 의해 매개되는 ADCC가 가능하며, 상기 매개는 부속 세포의 표면에서 발현된 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬을 통해, 또는 인간  $Fc\gamma RIIIA$   $\alpha$ -사슬을 통해 이루어진다. 한 구체예에서, 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬은 혈소판에서 발현되지 않는다. 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬이 혈소판에서 발현되지 않는 특정 구체예에서, 마우스는 인간 게놈에서 인간  $Fc\gamma RIIA$   $\alpha$ -사슬에 작동 가능하게 연결된 인간 프로모터 서열을 결여하거나 실질적으로 결여한다.

[0028] 한 구체예에서, 마우스는 B 세포, 비만세포, 호염기구, 대식세포, 호산구, 호중구, 수지상 세포, 랑게르한스 세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된 세포에서 인간  $Fc\gamma RIIIB$   $\alpha$ -사슬을 발현한다. 특정 구체예에서, 마우스는 B 세포 및 비만세포에서 인간  $Fc\gamma RIIIB$   $\alpha$ -사슬을 발현한다. 다른 특정 구체예에서, 마우스는 발현된 인간  $Fc\gamma RIIIB$   $\alpha$ -사슬을 통해서 매개되는 면역 복합체의 엔도시토시스가 가능하다. 한 구체예에서, 마우스는 호중구, 대식세포, 호산구, 혈소판, 수지상 세포, 랑게르한스 세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된 세포에서 인간  $Fc\gamma RIIIC$   $\alpha$ -사슬을 발현한다. 특정 구체예에서, 마우스는 발현된 인간  $Fc\gamma RIIIC$   $\alpha$ -사슬을 통해서 개시되는 포식작용, ADCC 및 세포 활성화가 가능하다.

[0029] 한 구체예에서, 마우스는 호중구와 호산구에서 인간  $Fc\gamma RIIIB$   $\alpha$ -사슬을 발현한다. 특정 구체예에서, 마우스는 세포 활성화, 포식작용, ADCC 및 탈과립화가 가능하며, 상기 활성화, 포식작용, ADCC 및 탈과립화는 발현된 인간  $Fc\gamma RIIIB$   $\alpha$ -사슬을 통해 매개된다.

[0030] 내인성  $Fc\gamma RIIIB$ ,  $Fc\gamma RIV$  및  $Fc\gamma RIII$  유전자의 결실 및 인간  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\gamma RIIIB$ ,  $Fc\gamma RIIIC$ ,  $Fc\gamma RIIIA$  및  $Fc\gamma RIIIB$  유전자의 삽입을 포함하는 마우스가 제공되며, 상기 마우스는 기능적 마우스 Fc $\gamma$ -사슬 유전자를 포함한다.

[0031] 한 구체예에서, 마우스는 내인성  $Fc\gamma RIIIB$ ,  $Fc\gamma RIV$  및  $Fc\gamma RIII$  유전자에 의해 암호화된  $\alpha$ -사슬의 결실 및 인간  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\gamma RIIIB$ ,  $Fc\gamma RIIIC$ ,  $Fc\gamma RIIIA$ , 및  $Fc\gamma RIII$  B 유전자에 의해 암호화된  $\alpha$ -사슬의 삽입을 포함한다.

[0032] 한 구체예에서, 마우스 게놈 내의 무작위 위치에 인간  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\gamma RIIIB$ ,  $Fc\gamma RIIIC$ ,  $Fc\gamma RIIIA$ , 및  $Fc\gamma RIIIB$   $\alpha$ -사슬 유전자가 삽입된다.

[0033] 한 구체예에서, 내인성 마우스 저 친화성 FcR  $\alpha$ -사슬 유전자좌에 인간  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\gamma RIIIB$ ,  $Fc\gamma RIIIC$ ,  $Fc\gamma RIIIA$ , 및  $Fc\gamma RIIIB$   $\alpha$ -사슬 유전자가 삽입된다.

[0034] 한 구체예에서, 마우스는 NK 세포 및 대식세포에서 인간  $Fc\gamma RIIIA$ 를 발현한다. 특정 구체예에서, 마우스의 비장세포 샘플에서 모든 또는 실질적으로 모든 NK 세포는 인간  $Fc\gamma RIIIA$ 를 발현한다. 특정 구체예에서, 마우스의 비장세포 샘플에서 모든 또는 실질적으로 모든 대식세포는 인간  $Fc\gamma RIIIA$ 를 발현한다.

[0035] 한 구체예에서, 마우스는 호중구, 대식세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된 세포 타입에서 인간  $Fc\gamma RIIA$ , 인간  $Fc\gamma RIIIA$ , 및 이들의 조합으로부터 선택된 인간  $Fc\gamma R$ 을 발현한다. 특정 구체예에서, 마우스는 마우스의 비장세포 샘플의 모든 또는 실질적으로 모든 호중구 및 대식세포에서 인간  $Fc\gamma RIIA$  및 인간  $Fc\gamma RIIIA$ 를 발현한다.

[0036] 한 구체예에서, 마우스는 마우스의 B 세포-게이트형 비장세포 샘플로부터의 B 세포 및 B 세포의 호중구에서 인간  $Fc\gamma RIIIB$  및 인간  $Fc\gamma RIIIB$ 를 발현한다. 특정 구체예에서, 마우스는 마우스의 B 세포-게이트형 비장세포 샘플로부터의 모든 또는 실질적으로 모든 B 세포 및 호중구에서  $Fc\gamma RIIIB$  및  $Fc\gamma RIIIB$ 를 발현한다.

[0037] 한 구체예에서, 마우스는 인간화된 CD20 유전자를 더 포함한다. 한 구체예에서, Fc를 포함하는 항-CD20 결합 단백질로 치료 후에 인간화된 CD20 유전자를 더 포함하는 마우스는 B 세포의 결실(생체내)을 나타낸다. 한 구

체에에서, 상기 결실은 골수, 혈액, 림프절, 비장, 및 이들의 조합으로부터 선택된 구획에서 일어난다. 한 구체에에서, Fc는 인간 Fc이다. 한 구체에에서, Fc는 마우스 Fc이다. 한 구체에에서, 항-CD20 결합 단백질은 항-CD20 항체이다.

[0038] 한 양태에서, 본원에 설명된 유전자 변형을 포함하는 세포가 제공된다. 한 구체에에서, 세포는 배아줄기(ES) 세포, 다분화능 세포, 유도된 다분화능 세포, 및 전분화 세포로부터 선택된다. 한 구체에에서, 세포는 마우스 세포 및 래트 세포로부터 선택된다. 특정 구체에에서, 세포는 ES 세포이다. 더욱 특정한 구체에에서, 세포는 마우스 ES 세포이다.

[0039] 한 양태에서, 본원에 설명된 유전자 변형을 포함하는 비-인간 배아가 제공된다. 한 구체에에서, 비-인간 배아는 마우스 배아 및 래트 배아로부터 선택된다.

[0040] 한 양태에서, 치료제의 효능을 결정하는 방법이 제공된다. 한 구체에에서, 치료제는 인간 Fc를 포함하는 항체이다(예를 들어, 일-, 이-, 삼-, 다중-특이적 항체). 한 구체에에서, 치료제는 인간 항체이다. 한 구체에에서, 상기 효능은 치료제-매개된 세포 사멸(예를 들어, ADCC)의 효능이다. 특정 구체에에서, 인간 치료제는 인간 면역글로불린 중쇄의 Fc를 포함하는 융합 단백질이다. 한 구체에에서, 치료제가 본원에 설명된 마우스에 투여되고, 치료제-의존성 ADCC의 수준이 측정된다. 한 구체에에서, 마우스에 치료제를 투여한 다음, Fc $\gamma$ R-발현 세포 상에서 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R과 치료제의 결합을 검출함으로써 마우스를 사용하여 치료제의 ADCC 활성을 평가한다(예를 들어, 동물에서 채취한 샘플(예를 들어, 혈액)로부터 시험관내로). 특정 구체에에서, 마우스의 부속 세포들이 마우스로부터 분리되고, 치료제의 존재 및 부재하에 치료제-의존성 ADCC를 매개하는 능력에 대해 시험된다.

[0041] 한 양태에서, 저 친화성 Fc $\gamma$ R가 인간 질환 또는 장애와 관련되는지의 여부를 결정하는 방법이 제공되며, 이 방법은 본 발명에 따른 마우스에서 인간 질환 또는 장애와 관련된 특질을 결정하는 단계를 포함한다. 한 구체에에서, 상기 특질은 하나 이상의 저 친화성 Fc $\gamma$ R의 기능의 부재 또는 상실과 관련된 표현형이다. 특정 구체에에서, 질환 또는 장애는 자가면역 질환이나 장애이다. 특정 구체에에서, 자가면역 질환 또는 장애는 류마티스 관절염(RA), 전신 홍반성 루프스(SLE), 제1형 당뇨병, 길랑바레 증후군, 경화증, 다발성 경화증, 굽스페처 증후군, 베케너 육아종증 및 실험형 자가면역 뇌척수염(EAE)으로부터 선택된다. 특정 구체에에서, 마우스는 저 친화성 Fc $\gamma$ R에 다형성을 포함하고, 특질은 다형성을 지니지 않은 인간 집단의 대다수와 비교하여 ADCC를 매개하는 증진된 능력, 및 다형성을 지니지 않은 인간 집단의 대다수와 비교하여 ADCC를 매개하는 감소된 능력으로부터 선택된다.

[0042] 한 양태에서, 마우스에서 항-인간 FcR  $\alpha$ -사슬 항체를 제조하는 방법이 제공되며, 이 방법은 본 발명에 따른 마우스를 본원에 설명된 인간 FcR에 노출하는 단계를 포함한다. 한 구체에에서, 인간 FcR을 인식하는 항체가 마우스로부터 분리된다. 다른 구체에에서, 인간 FcR을 인식하는 항체의 가변 영역의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산 서열이 확인되고 클로닝된다.

[0043] 한 양태에서, 표적 분자의 포식작용을 위해 FcR-발현 세포에 분자를 표적화하는 항-인간 FcR 항체의 능력을 결정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 설명된 마우스를 항-인간 FcR 항체를 포함하는 체제에 노출시키는 단계, 및 표적 분자의 포식작용을 측정하는 단계를 포함한다.

[0044] 한 양태에서, 하나 이상의 Fc $\gamma$ R와 관련하여 야생형 마우스에서 불량한 면역성을 가진 항원에 대해 마우스에서 항체를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 마우스 저 친화성 FcR을 결여하지만 Fc $\gamma$ R $\gamma$ -사슬을 발현하는 본원에 설명된 마우스를 하나 이상의 Fc $\gamma$ R와 관련하여 야생형 마우스에서 불량한 면역성을 가진 항원에 노출시키는 단계, 및 불량한 항원성을 가진 항원을 인식하는 항체를 확인하는 단계를 포함한다. 한 구체에에서, 상기 방법은 마우스로부터 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 다른 구체에에서, 항체의 가변 영역의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산 서열이 확인되고 클로닝된다.

[0045] 한 양태에서, 인간 가변 영역을 포함하는 항체를 제조할 수 있는 마우스의 제조 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 설명된 제1의 마우스를 (a) 하나 이상의 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 세그먼트와 하나 이상의 인간 불변 영역 유전자; 또는 (b) 마우스 불변 영역 유전자에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 인간 면역글로불린 가변 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 제2의 마우스와 교배시키는 단계를 포함하고, 상기 인간 유전자 세그먼트는 마우스 가변 영역 유전자 세그먼트 유전자좌에서 가변 영역 유전자 세그먼트를 치환한다.

[0046] 한 구체에에서, 제2의 마우스는 (a) 하나 이상의 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트와 인간 경쇄 불변 유전자를 포함하는 트랜스젠, 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트와 하

나 이상의 인간 중쇄 불변 유전자를 포함하는 트랜스젠을 포함한다. 한 구체예에서, 하나 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 트랜스젠은 둘 이상의 중쇄 불변 유전자를 포함하며, 분류 전환이 가능하다. 특정 구체예에서, 상기 마우스는 불활화된 내인성 경쇄 유전자와 및/또는 불활화된 내인성 중쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 마우스는 내인성 경쇄 유전자좌의 결실 및/또는 내인성 중쇄 유전자좌의 결실을 포함한다.

- [0047] 한 구체예에서, 제2의 마우스는 (b) 인간 중쇄 및 인간 경쇄 가변 영역 유전자 세그먼트를 중쇄 및 경쇄 마우스 유전자좌에 각각 포함한다.
- [0048] 한 양태에서, 항-종양 항체를 선택하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 ADCC를 매개하는 항체의 능력을 결정하는 단계를 포함하고, ADCC를 매개하는 항체의 상기 능력은 본원에 설명된 마우스의 세포에 의해 매개되는 ADCC를 결정함으로써 시험되며, 상기 항체는 본원에 설명된 유전자 변형된 마우스의 세포를 이용하여 ADCC를 매개하는 경우 선택된다. 특정 구체예에서, 상기 항체와 유전자 변형된 마우스의 결합이 결정되고, 상기 항-종양 항체는 세포에서 인간 Fc $\gamma$ R과 결합하는 능력에 대해 선택된다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ R은 저 친화성 Fc $\gamma$ R이다.
- [0049] 한 구체예에서, 야생형 마우스의 세포를 통해서 ADCC를 매개하는 항-종양 항체의 능력과 비교해서 마우스의 세포를 통해서 ADCC를 매개하는 증진된 능력에 의해서 항-종양 항체가 확인된다. 특정 구체예에서, NK 세포를 통해서 ADCC를 매개하는 능력에 의해서 항-종양 항체가 확인된다. 특정 구체예에서, NK 세포는 인간 Fc $\gamma$ RIIIA를 발현한다.
- [0050] 한 구체예에서, 항-종양 제제를 선택하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 인간 Fc 또는 변형된 인간 Fc를 포함하는 제제를 제1의 비-인간 동물에 투여하는 단계; 상기 제제를 종양을 포함하는 제2의 비-인간 동물에 투여하는 단계; 및 제제의 투여 후에 인간 종양의 성장을 지연시키는 제1의 비-인간 동물 및 제2의 비-인간 동물의 능력을 결정하는 단계를 포함하고, 상기 제1의 비-인간 동물은 본 발명에 따라서 유전자 변형되며, 인간 종양을 포함하고, 상기 제제는 제1의 비-인간 동물에서는 인간 종양의 성장을 지연시키는 증진된 능력을 나타내고, 제2의 비-인간 동물에서는 그렇지 않을 경우 항-종양 제제로서 선택된다.
- [0051] 한 구체예에서, 제1의 비-인간 동물은 내인성 FcR  $\alpha$ -서브유닛의 결실을 포함하도록 변형되고, Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$ -서브유닛, Fc $\gamma$ RIIB  $\alpha$ -서브유닛, Fc $\gamma$ RIIC  $\alpha$ -서브유닛, Fc $\gamma$ RIIIA  $\alpha$ -서브유닛, Fc $\gamma$ RIIIB  $\alpha$ -서브유닛, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 인간 FcR  $\alpha$ -서브유닛을 포함하도록 변형된다. 한 구체예에서, 제2의 동물은 야생형 동물이다. 한 구체예에서, 제3의 비-인간 동물은 내인성 FcR $\gamma$ -사슬을 발현한다.
- [0052] 한 구체예에서, 제1의 비-인간 동물은 기능적 내인성 Fc $\gamma$ RI를 발현한다.
- [0053] 한 양태에서, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R를 결여하고, 기능적 FcR $\gamma$ -사슬을 발현하고, 인간 Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA, 및 Fc $\gamma$ RIIIB의  $\alpha$ -사슬을 암호화하는 유전자를 포함하는 마우스를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬을 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자좌에서 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬로 치환하는 단계를 포함한다.
- [0054] 한 구체예에서, 제1 단계는 내인성 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIV 및 Fc $\gamma$ RIII 유전자의  $\alpha$ -사슬을 결실시키고, 인간 Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIIA 유전자의  $\alpha$ -사슬을 삽입하는 것을 포함하고; 제2 단계는 제1 단계에서 얻어진 마우스 계통에 인간 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC 및 Fc $\gamma$ RIIIB 유전자의  $\alpha$ -사슬을 삽입하는 것을 포함하며, 상기 마우스는 기능적 마우스 FcR $\gamma$ -사슬 유전자를 포함한다. 특정 구체예에서, 제2 단계의 인간 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC 및 Fc $\gamma$ RIIIB 유전자의  $\alpha$ -사슬은 제1 단계의 인간 Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIIA의  $\alpha$ -사슬에 대해 5'에 삽입된다.
- [0055] 한 양태에서, 비-영장류에서 인간 치료제에 의한 세포 사멸을 결정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 세포, 비-인간 배아, 또는 비-인간 동물을 인간 Fc를 포함하는 인간 치료제에 노출시키는 단계, 및 상기 세포, 배아, 또는 동물의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R을 통해 세포 사멸을 매개하는 인간 치료제의 능력을 결정하는 단계를 포함하고, 상기 세포, 배아, 또는 동물은 기능적 FcR $\gamma$ -사슬을 포함하며, 하나 이상의 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자의 하나 이상의 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬로의 치환을 포함한다.
- [0056] 한 구체예에서, 비-영장류는 마우스이다. 특정 구체예에서, 내인성 마우스 FcR  $\alpha$ -사슬 유전자인 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIV 및 Fc $\gamma$ RIII가 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자인 Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIIA, 및 Fc $\gamma$ RIIIB로 치환된다.
- [0057] 한 구체예에서, 세포는 B 세포, 비만세포, 호염기구, 대식세포, 호산구, 호중구, 수지상 세포, 랑게르한스 세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 세포는 NK 세포이고, 인간 항체 또는 인간화된 항

체에 의한 NK 세포-매개된 ADCC가 결정된다. 특정 구체예에서, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R은 인간 Fc $\gamma$ R111A이다.

[0058] 한 양태에서, 치료제-의존성 혈전증을 결정하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 혈소판에서 인간 Fc $\gamma$ R111A를 발현하는 제1의 비-인간 동물을 치료제에 노출시키는 단계; 혈소판에서 인간 Fc $\gamma$ R111A를 발현하지 않는 제2의 비-인간 동물을 상기 치료제에 노출시키는 단계; 제1의 비-인간 동물 및 제2의 비-인간 동물에서 치료제-의존성 혈전증의 양을 측정하는 단계; 및 치료제-의존성 혈전증의 차이를 결정하는 단계를 포함한다.

[0059] 한 구체예에서, 비-인간 동물은 마우스 및 래트로부터 선택된다.

[0060] 한 구체예에서, 치료제-의존성 혈전증의 결정된 차이를 사용하여 인간에게 치료제를 투여하는 것과 관련된 위험을 확인한다. 한 구체예에서, 결정된 차이는 치료제를 필요로 하는 인간 환자에게 치료제를 투여하는 것에 있어서 변화를 가져온다.

**도면의 간단한 설명**

[0061] 도 1은 마우스에서 야생형 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 도해로서, 마우스 Fc $\gamma$ R111B, Fc $\gamma$ R111V 및 Fc $\gamma$ R111I 유전자 및 이들 유전자의 표적화된 고갈에 사용되는 마우스 Fc $\gamma$ R 표적화 벡터를 도시하며, 이것은 부위-특이적 재조합 부위가 측면 위치한 네오마이신 카세트를 포함한다.

도 2는 야생형 및 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자-결핍 마우스(mFc $\gamma$ R KO)에 대한 내인성 mFc $\gamma$ R111 및 mFc $\gamma$ R111I의 발현을 포함하는 B 세포(항-CD19), NK 세포(항-NKp46) 및 대식세포(항-F4/80)에 대한 게이트형 비장세포의 히스토그램을 도시한다.

도 3a-3d는 몇몇 림프구 구획에서, 즉 골수(도 3a), 혈액(도 3b), 림프절(도 3c) 및 비장(도 3d)에서 인간화된 CD20 마우스(hCD20) 및 Fc $\gamma$ R 녹아웃 마우스로 길러진 인간화된 CD20 마우스(hCD20/Fc $\gamma$ R KO)에서 마우스 Fc(Ab 168) 또는 인간 Fc(Ab 735)에 의한 인간 항-인간 CD20 항체를 지닌 B 세포의 생체내 고갈을 도시한다. 각 그래프에서 y-축은 게이트형 B 세포(B220+/IgM+ 또는 B220+/CD19+)의 퍼센트를 나타내고, x-축은 각 동물 그룹의 항체 용량을 나타내는데, 이는 10mg/kg 대조군 항체(C), 2mg/kg 인간 항-인간 CD20 항체(2 Ab) 및 0mg/kg 인간 항-인간 CD20 항체(10 Ab)이다.

도 4는 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 네오마이신-표적화된 결실 및 결실된 마우스 유전자좌에 2개의 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자(hFc $\gamma$ R111A 및 hFc $\gamma$ R111B)를 삽입하기 위한 두 번째 표적화 벡터의 도해이며, 이것은 부위-특이적 재조합 부위가 측면 위치한 히그로마이신 카세트를 포함한다. 혈소판에서 hFc $\gamma$ R111A의 발현을 위해 인간 Fc $\gamma$ R111A-IIA 표적화 벡터의 hFc $\gamma$ R111A 유전자에 작동 가능하게 연결된 연장된 프로모터 영역이 사용되고, 혈소판에서 hFc $\gamma$ R111A의 발현을 방지하기 위해서는 프로모터 영역이 생략되거나 실질적으로 생략된다.

도 5a는 야생형 및 인간 Fc $\gamma$ R111A-IIA 동형접합 마우스(인간 Fc $\gamma$ R111A/Fc $\gamma$ R111A HO)에 대한 인간 Fc $\gamma$ R111A의 발현을 포함하는 NK 세포(항-NKp46) 및 대식세포(항-F4/80)에 대한 게이트형 비장세포의 히스토그램을 도시한다.

도 5b는 야생형 및 인간 Fc $\gamma$ R111A-IIA 동형접합 마우스(인간 Fc $\gamma$ R111A/Fc $\gamma$ R111A HO)에 대한 인간 Fc $\gamma$ R111A의 발현을 포함하는 호중구(항-Ly6G) 및 대식세포(항-F4/80)에 대한 게이트형 비장세포의 히스토그램을 도시한다.

도 6은 2개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자(hFc $\gamma$ R111A 및 hFc $\gamma$ R111B)의 삽입을 포함하는 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 히그로마이신-표적화된 고갈 및 추가로 3개의 저 친화성 사람 Fc $\gamma$ R 유전자(hFc $\gamma$ R111B, hFc $\gamma$ R111C 및 hFc $\gamma$ R111D)를 삽입하기 위한 세 번째 표적화 벡터 및 부위 특이적 재조합 부위가 측면 위치한 네오마이신 카세트의 도해이다.

도 7은 야생형 및 인간 Fc $\gamma$ R111A-I11B-I11A-I11B-I11C 동형접합 마우스(인간 Fc $\gamma$ R111A/Fc $\gamma$ R111B/Fc $\gamma$ R111A/Fc $\gamma$ R111B/Fc $\gamma$ R111C HO)에 대한 인간 Fc $\gamma$ R111B 및 인간 Fc $\gamma$ R111B의 발현을 포함하는 B 세포(항-CD19) 및 호중구(항-Ly6G)에 대한 게이트형 비장세포의 히스토그램을 도시한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0062] 본 발명은 설명된 특정한 방법, 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 이러한 방법 및 조건은 다양할 수 있다. 본원에서 사용된 용어들은 단지 특정한 구체예들을 설명하기 위한 목적으로 사용되며, 본 발명을 제한하지 않으며, 본 발명의 범위는 청구항에 의해서만 제한된다.

[0063] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 당업자가

통상 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 설명된 것들과 동등하거나 유사한 어떤 방법 및 재료도 본 발명을 실시하거나 시험하는데 사용될 수 있으며, 특정한 방법 및 재료를 이제 설명한다. 본원에 언급된 모든 간행물은 그 전체가 참고자료로 본원에 포함된다.

[0064] 문구 "표적화 구성물"은 표적화 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 표적화 영역은 표적 세포, 조직 또는 동물의 서열에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하고, 상기 세포, 조직 또는 동물의 게놈 내의 위치에 표적화 구성물의 통합을 위해 제공된다. 특정 구체예에서, 표적화 구성물은 특정한 관심의 핵산 서열 또는 유전자, 선택성 마커, 대조군 및/또는 조절 서열, 및 다른 핵산 서열을 포함하는 재조합을 보조하거나 촉진하는 단백질의 외인성 첨가를 통해 매개되는 재조합을 허용하는 이러한 핵산 서열을 더 포함한다. 다른 특정 구체예에서, 표적화 구성물은 관심의 유전자를 더 포함하며, 관심의 유전자는 내인성 서열에 의해서 암호화된 단백질과 유사한 기능을 가진 단백질을 암호화하는 이중성 유전자이다.

[0065] 용어 "치환"은 달리 나타내지 않는다면, 게놈 내의 서열을 게놈 서열의 해당 유전자좌에서 이중성 서열(예를 들어, 마우스에서 인간 서열)로 치환할 수 있는 방식으로 DNA 서열이 세포의 게놈에 위치되는 것을 포함한다. 이렇게 위치된 DNA 서열은 이렇게 위치된 서열을 얻는데 사용된 공급원 DNA의 일부인 하나 이상의 조절 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 5'- 또는 3'-미번역 영역 등). 예를 들어, 다양한 구체예에서, 치환은 이렇게 위치된 DNA 서열(이중성 서열을 포함하는)로부터 유전자 산물이 생산되지만, 내인성 서열은 발현되지 않는 내인성 서열의 이중성 서열로의 치환이다. 상기 치환은 내인성 게놈 서열의 내인성 게놈 서열에 의해 암호화된 단백질과 유사한 기능을 가진 단백질을 암호화하는 DNA 서열로의 치환이다(예를 들어, 내인성 게놈 서열은 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 수용체를 암호화하고, DNA 단편은 하나 이상의 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 수용체, 예를 들어 인간 Fc $\gamma$ RIIC 및/또는 Fc $\gamma$ R1IIB를 암호화한다).

[0066] 용어 "Fc $\gamma$ R"은 Fc, 예를 들어 IgG 면역글로불린의 Fc 부분에 대한 수용체를 포함한다. The Fc $\gamma$ R 유전자는 세포의 표면에서 발현된  $\alpha$ -사슬을 포함하고, 리간드-결합 도메인으로 작용하며, FcR $\gamma$ -사슬의 호모다이머 또는 FcR $\gamma$ -사슬과  $\delta$ -사슬의 헤테로다이머와 회합한다. 몇몇 상이한 Fc $\gamma$ R 유전자가 있으며, 이들은 면역 복합체에서 IgG와의 우선적 결합에 따라서 저 친화성 및 고 친화성 타입으로 분류될 수 있다. 인간의 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자는 Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ R1IIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ R1IIIA 및 Fc $\gamma$ R1IIB를 포함하고, 이들 유전자의 대부분에 존재하는 자연 발생한 유전자 차이, 또는 다형성이 자가면역 질환을 가진 인간 피험자에서 설명되었다. 본 명세서를 읽는 당업자는 게놈에서 하나 이상의 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자(또는 전부)가 하나 이상의 이중성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자로 치환될 수 있음을 인정할 것이다(예를 들어, 대립형질 형태와 같은 변이체 또는 다형성, 다른 종으로부터의 유전자, 키메라 형태 등).

[0067] 문구 "대립형질 변이체"는 동일한 유전자의 일련의 상이한 형태를 생성하는 유전자의 정상 서열의 변형을 포함한다. 상이한 형태는 유전자로부터의 단백질 서열에서 최대 예를 들어 20개 아미노산의 차이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 대립형질은 같은 물리적 유전자 유전자좌에 있는 다른 형태의 DNA 서열로서 이해될 수 있으며, 이것은 동일한 유전자의 다른 대립형질에서는 생길 수 없거나 다른 대립형질에서는 그 정도가 상이한 특정 질환 또는 상태에 대한 감수성과 같은 상이한 특질(예를 들어, 유전가능한 표현형적 특성들)을 가져올 수도 있고, 그렇지 않을 수도 있다.

[0068] "부속 세포"는 면역반응의 이펙터 기능에 연루된 면역세포를 포함한다. 전형적인 면역세포는 림프양 또는 골수양 기원의 세포들, 예를 들어 림프구, 자연살해(NK) 세포, 단핵세포, 대식세포, 호중구, 호산구, 호염기구, 혈소판, 랑게르한스 세포, 수지상 세포, 비만세포 등을 포함한다. 부속 세포는 이들의 표면에서 발현된 수용체, 예를 들어 FcRs를 통해 면역 시스템의 특정 기능을 수행한다. 특정 구체예에서, 부속 세포는 세포 표면에서 발현된 FcR, 예를 들어 저 친화성 Fc $\gamma$ R을 통해서 매개된 ADCC를 촉발할 수 있다. 예를 들어, FcRs를 발현하는 대식세포는 포식작용 및 항체-코팅된 박테리아의 파괴에 연루된다. 또한, 부속 세포는 다른 면역 과정을 매개하는 체제를 방출할 수도 있다. 예를 들어, 비만세포는 FcRs에 결합된 항체에 의해 활성화되어 감염 부위에서 과립, 예를 들어 염증성 분자(예를 들어, 사이토카인)를 방출할 수 있다. 다양한 다른 구체예에서, 부속 세포 상에서 FcRs의 발현은 다른 요인들(예를 들어, 사이토카인)에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, Fc $\gamma$ RI 및 Fc $\gamma$ R1IIB 발현은 인터페론  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )에 의한 자극에 의해 유도될 수 있다.

[0069] 마우스 및 인간 FcRs

[0070] 면역글로불린(FcRs)의 Fc(즉, 불변) 영역에 대한 수용체는 면역반응의 조절에서 중요한 역할을 한다. FcRs은 숙주의 면역 시스템의 부속 세포들에 존재하여 항체에 의해 결합된 외부 항원을 효과적으로 배치한다. 또한, FcRs는 면역 시스템의 부속 세포들의 활성화 반응과 억제성 반응의 균형을 이루는데 중요한 역할을 한다. FcRs

는 대식세포에 의한 포식작용, 비만세포의 탈과립화, 항체-항원 복합체의 흡수 및 면역반응의 조절은 물론 다른 면역 시스템 과정들에 연루된다.

[0071] 마우스 및 인간에서, 분리된 FcRs는 발현된 항체 레퍼토리에 존재하는 면역글로불린 이소타입들에 각각 특이적인 상이한 부속 세포들의 표면에서 차등 발현된다. 예를 들어, 면역글로불린 G(IgG) 항체는 IgG 수용체(Fc $\gamma$ Rs)를 통해서 이펙터 기능을 매개한다. Fc $\gamma$ Rs는 고 친화성 활성화 Fc $\gamma$ RI(CD64), 저 친화성 억제성 Fc $\gamma$ RII(CD32) 및 저 친화성 활성화 Fc $\gamma$ RIII(CD16)의 세 그룹으로 분류되었다. 마우스와 인간 둘 다 각 그룹이 존재하지만, 이들이 존재하는 면역세포의 동형 및 서브타입의 수는 상이하다. 예를 들어, Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIIB는 인간의 부속 세포들에서 발현되지만, 마우스에는 부재한다고 보고되었다. 또한, 각 Fc $\gamma$ R에 대한 상이한 IgG 이소타입(예를 들어, IgG1)의 항체는 마우스와 인간에서 상이하다.

[0072] Fc $\gamma$ Rs를 통한 세포 신호화의 활성화 또는 억제 및 Fc $\gamma$ Rs와 결합하는 항체와 관련된 이펙터 기능은 Fc $\gamma$ Rs의 세포내 도메인, 또는 공-수용체들의 서브유닛의 특정 서열 모티프에 의해서 매개된다고 생각된다. 활성화 수용체는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유하는 공통된  $\gamma$ -사슬(Fc $\gamma$ -사슬)과 가장 일반적으로 관련된다. ITAMs은 FcR과 결합하는 항체에 반응하여 인산화되는 티로신 잔기를 포함하는 약 9-12개 아미노산의 특정 서열을 함유한다. 인산화는 신호 변환 연속단계를 유도한다. FcR $\gamma$ -사슬(FcR $\gamma$ -사슬 KO)을 암호화하는 유전자를 결여한 마우스가 보고되었다(예를 들어, Takai et al.(1994) FcR $\gamma$  Chain Depletion Results in Pleiotrophic Effector Cell Defects, Cell 76:519-529; van Vugt et al.(1996) FcR $\gamma$ -Chain Is Essential for Both Surface Expression and Function of human Fc $\gamma$ RI(CD64) In Vivo, Blood 87(9):3593-3599; 및 Park et al.(1998) Resistance of Fc Receptor-deficient Mice to Fatal Glomerulonephritis, J. Clin. Invest. 102(6):1229-1238 참조). 보고에 따르면 FcR $\gamma$ -사슬은 FcRs의 적절한 표면 발현 및 기능(예를 들어, 신호 변환, 포식작용 등)에 필수적이라고 하며, FcR $\gamma$ -사슬 KO 마우스는 일부 보고에 따르면 Fc $\gamma$ RI를 결여한다. 그러나, 다른 보고서에서는 FcR $\gamma$ -사슬 KO 마우스가 실제로 특정 부속 세포의 표면에서 Fc $\gamma$ RI를 발현한다는 것을 밝혔으며, 보고에 따르면 발현된 Fc $\gamma$ RI는 발현된 Fc $\gamma$ R-사슬의 부재하에 마우스에서 IgG와 결합한다는 점에서 기능적으로 보인다고 한다(Barnes et al.(2002) Fc $\gamma$ RI-Deficient Mice Show Multiple Alterations to Inflammatory and Immune Responses, Immunity 16:379-389).

[0073] 반대로, Fc $\gamma$ RIIB는 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기반 억제성 모티프(ITIM)를 함유하는 억제성 수용체이다. ITAMs과 마찬가지로 ITIMs은 인산화될 수 있는 티로신 잔기를 포함하는 서열 모티프이다. 그러나, ITIM의 인산화 후의 하류 사건들은 면역세포기능의 활성화가 아니라 억제를 유도한다. 보고에 따르면 Fc $\gamma$ RIIB가 결핍된 마우스는 야생형 마우스와 비교해서 증가된 항체 반응을 나타낸다고 하는데(Takai et al.(1996) Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc $\gamma$ RII-deficient mice, Nature 379:346-349), 이 관찰은 B 세포 항체 반응의 하향조절인자로서 Fc $\gamma$ RIIB의 역할을 뒷받침한다.

[0074] 인간에서 Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC, Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIIB는 고전적인 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자로 생각되며, 동일한 염색체 상에 함께 위치된다(Su et al.(2002) Genomic organization of classical human low-affinity Fc $\gamma$  receptor genes, Genes and Immunity 3(Supple 1 ):S51-S56). 이들 유전자는 분리된 표현형과 관련된 몇몇 다형성을 나타내는데, 예를 들어 리간드 결합의 변경 및 수용체의 기능 등이다. 일부 다형성은 자가면역 질환, 예를 들어 전신 홍반성 루프스(SLE), 류마티스 관절염(RA), 및 다발성 경화증(MS)과 관련된다. 상이한 인간Fc $\gamma$ Rs(hFc $\gamma$ Rs)에 대한 트랜스제닉 마우스가 질환 모델로서 개발되어 사용되었는데, 고 친화성 항체를 생성하거나, 특정한 세포 반응을 도출하는 능력에 대해 치료 항체를 시험하거나, 비정상적 면역반응을 완화하는 화합물을 스크리닝하거나 한다(예를 들어, Heijnen et al.(1996) A human Fc $\gamma$ RI/CD64 Transgenic Model for In Vivo Analysis of(Bispecific) Antibody Therapeutics, J. Hematother. 4:351-356; Heijnen and van de Winkel(1996) Antigen Targeting to Myeloid-specific human Fc $\gamma$ RI/CD64 Triggers Enhanced Antibody Responses in Transgenic, J. Clin. Invest. 97(2):331-338; US Pat Nos. 6,111,166, 6,676,927, 7,351,875, 7,402,728 및 7,416,726 참조).

[0075] 항체와 면역 시스템의 부속 세포 간에 다리를 제공하는데 있어서 FcRs의 중요한 역할에도 불구하고 현재로서 저 친화성 hFc $\gamma$ Rs가 모두 발현되는 모델 시스템은 존재하지 않는 실정이다. 다양한 구체예에서, 내인성 마우스 Fc $\gamma$ Rs를 결여하는 마우스를 포함하는 모든 저 친화성 hFc $\gamma$ Rs가 공-발현되는 마우스를 사용하여 ADCC-매개된 효과를 포함하는 인간 항체 치료제의 효과를 정확하게 반영할 수 있다. 이러한 마우스는 특히 인간 항체 치료제를 시험하는 것과 관련하여 인간에서의 면역학적 과정의 더 정확한 평가를 달성할 수 있는 동물 모델을 제공함으로써 RA, 제1형 당뇨병, SLE 및 자가면역성과 같은 인간 질환의 치료를 위한 치료제 항체의 조작, 분석 및 평가에서 살아 있는 도구로서 사용된다. 또한, 마우스는 저 친화성 수용체를 지닌 세포의 소중한 공급원이며,

이러한 세포를 시험관내 분석에 사용하여 저 친화성 수용체와 결합하는 치료제의 치료제-의존성 세포 사멸을 평가하고, 이로써 유용한 인간 치료제를 확인할 수 있다.

[0076] 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자 결핍 마우스

[0077] 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자는 발현하지 않고, 내인성 마우스 FcR $\gamma$ -사슬을 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공된다. 다양한 구체예에서, FcR $\gamma$ -사슬은 상기 마우스에서 야생형 마우스와 동일한 또는 실질적으로 동일한 수준으로 분포되어(즉, 세포 타입들에) 발현된다. 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자는 면역세포의 표면에서 발현될 수 있거나, 또는 동물의 말초부에서 가용성 방식으로 발현될 수 있다. 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하지 않는 비-인간 동물을 제조하기 위한 유전자 변형은 예시로서 마우스를 사용하여 편리하게 설명된다. 본 발명에 따른 유전자 변형된 마우스는 다양한 방식으로 제조될 수 있으며, 이들 중 특정한 구체예들이 본원에서 논의된다.

[0078] 내인성 유전자좌에서 Fc $\gamma$ R 유전자 배치를 도시하는 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자 유전자좌의 도해(축척 없음)가 도 1(상부)에 제공된다. 예시된 대로, 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIV 및 Fc $\gamma$ RIII 은 한 염색체 상에 서로 근접해서 함께 존재한다. 이들 유전자는 각각 항체 분자의 Fc 부분과의 결합을 담당하는  $\alpha$ -사슬 또는 리간드 결합 도메인을 포함한다.

[0079] 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자의  $\alpha$ -사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 결여한 유전자 변형된 마우스가 본 분야에 알려진 어떤 방법에 의해서 제조될 수 있다. 예를 들어, 선택성 마커 유전자를 가진 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자를 결실한 표적화 벡터가 제조될 수 있다. 도 1은 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자좌의 상류 서열을 함유하는 5' 상동성 암, 이어서 약물 선택 카세트(예를 들어, loxP 서열이 측면 위치한 네오마이신 내성 유전자), 및 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자좌의 하류 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 가진 표적화 구성물에 의해서 표적화된 마우스 게놈(하부)을 예시한다. 상기 유전자좌에서 상동성 재조합 시에 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자좌가 약물 선택 카세트로 치환된다(도 1의 하부). 이로써 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자 유전자좌가 결실되고, 그 결과 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자를 발현하지 않는 세포 또는 비-인간 동물이 얻어진다. 약물 선택 카세트는 선택적으로 이어서 재조합효소를 첨가함으로써 제거될 수 있다(예를 들어, Cre 처리에 의해).

[0080] 다양한 구체예에서, 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자 또는 유전자들을 비기능성으로 만들기 위해 마우스를 유전자 변형하는 것은 면역반응에 결함을 나타내는 마우스를 만들며, 이로써 정상 및 장애가 있는 면역기능, IgG-매개된 과정 및 자가면역 질환에서 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자의 개별적 역할은 물론 협동을 평가하는데 유용한 마우스가 얻어진다. 다양한 구체예에서, 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자를 변형하고 FcR $\gamma$ -사슬은 변형하지 않음으로써 표면 발현 및 기능을 위해 FcR $\gamma$ -사슬을 필요로 하는 다른 내인성 FcR 유전자(예를 들어, 고 친화성 Fc $\gamma$ RI)의 잠재적 감소를 피할 수 있으며, 이로써  $\gamma$ -사슬 의존성 과정을 통해 매개되는 다양한 다른 면역학적 기능 및 과정들이 유지된다.

[0081] 일부 보고서에 따르면, FcR $\gamma$ -사슬 결핍 마우스는 Fc $\gamma$ RI II 및 Fc $\gamma$ RI의 표면 발현을 결여한다. 그러나, Fc $\gamma$ RI는 보고에 따르면 FcR $\gamma$ -사슬 결핍 마우스에서 세포 표면에서 검출되었으며, 적어도 부분적으로 기능적이라고 보고되었다. 반대로, 본 발명에 따른 마우스는 미변형 내인성 FcR $\gamma$ -사슬을 함유하는데, 이것은 FcR $\gamma$ -사슬을 필요로 하는 다른 FcR 유전자의 세포 기능과 천연 세포 표면 발현 패턴을 보존한다.

[0082] 다양한 구체예에서, 본 발명의 마우스는 이들이 지닌 유전자 변형이 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자에는 전체적으로 의존하지 않는 다른 면역학적 기능들에 필요한 다른 유전자를 유지한다는 점에서 다른 Fc $\gamma$ R 유전자-결핍 마우스를 능가하는 이점을 나타낸다. 예를 들어, 기능적 FcR $\gamma$ -사슬의 경우, 다른  $\gamma$ -사슬 의존성 단백질(예를 들어, Fc $\gamma$ RI)은 FcR $\gamma$ -사슬과 회합하여 면역반응의 이펙터 세포 기능에 참여할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 다양한 유전자 변형된 마우스에서, 이러한 기능(기능적 FcR $\gamma$ -사슬의 존재로 인한)을 유지하면서 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자를 결실시키는 것(하나 이상의  $\alpha$ -서브유닛)은 자가면역에서 FcRs의 역할의 더 정확한 해명을 가능하게 한다고 생각된다.

[0083] 저 친화성 Fc $\gamma$ R 인간화된 마우스

[0084] 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하는 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공된다. 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자는 동물의 면역 시스템의 부속 세포의 표면에서, 또는 동물의 말초부에서 가용성 방식으로 발현될 수 있다.

[0085] 다양한 구체예에서, 유전자 변형은 하나 이상의 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자의 기능적  $\alpha$ -사슬의 결실을 포함하고, 일부 구체예에서 추가의 변형은 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 5개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -

서브유닛 유전자로의 치환을 포함하며, 상기 비-인간 동물은 기능적 마우스 Fc $\gamma$ R  $\gamma$ -사슬 유전자를 발현한다. 비-인간 동물, 비-인간 배아, 및 세포를 제조하기 위한 유전자 변형된 비-인간 배아, 세포, 및 표적화 구성물이 또한 제공된다.

[0086] 특이적 다형성 형태 또는 대립형질 변이체(예를 들어, 단일 아미노산 차이)를 포함해서 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하는 마우스를 제조하는 조성물 및 방법이 제공되며, 이것은 인간 프로모터 및 인간 조절성 서열로부터의 이러한 유전자를 발현하는 마우스를 제조하는 조성물 및 방법을 포함한다. 상기 방법은 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자를 선택적으로 비기능성으로 만드는 단계(예를 들어, 그것의  $\alpha$ -사슬의 결실에 의해), 및 상기 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자 유전자좌에서 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의  $\alpha$ -사슬을 사용해서 마우스에서 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -서브유닛 유전자를 발현하는 단계를 포함한다. 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자의 결실은 하나 이상의  $\alpha$ -사슬 유전자의 결실에 의해서 이루어지며, Fc $\gamma$ R-사슬 유전자는 결실되지 않는다. 이 접근법은 기능적 내인성 Fc $\gamma$ R-사슬을 유지하면서 하나 이상의 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자를 비기능성으로 만든다.

[0087] 내인성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 치환 접근방식은, 다양한 구체예에서 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬의 게놈 서열이 단일 단편에서 치환되고, 따라서 필요한 조절성 서열을 포함함으로써 정상 기능성을 보유하게 되기 때문에 동물에서 천연 Fc $\gamma$ R-매개된 신호 변환을 비교적 최소화한 파괴한다. 따라서, 이러한 구체예에서, Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 변형은 기능적 Fc $\gamma$ R-사슬 분자에 의존적인 다른 내인성 FcR에는 영향을 미치지 않는다. 또한, 다양한 구체예에서, 이 변형은 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 및 내인성 Fc $\gamma$ R-사슬을 포함하는 기능적 수용체 복합체의 조립에는 영향을 미치지 않는데, 이것은 세포 표면에서 일부 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬의 적절한 발현 및 활성화된 수용체로부터 생긴 하류 신호화에 필요하다고 생각된다. Fc $\gamma$ R-사슬은 결실되지 않기 때문에, 다양한 구체예에서 내인성 Fc $\gamma$ R-사슬 유전자의 인간 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -사슬 유전자로의 치환을 함유하는 동물은 IgG 면역글로불린의 Fc 부분과 부속 세포의 표면에 존재하는 인간 Fc $\gamma$ R-사슬의 결합을 통해서 항체로부터 정상 이펙터 기능을 처리할 수 있다.

[0088] 고갈된 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자의 도해(축적 없음)가 도 4(상부)에 제공된다. 예시된 대로, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자 Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIIA가 인간 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIIA 유전자를 함유하는 게놈 단편을 가진 표적화 구성물(인간 Fc $\gamma$ RIIIA-IIA 표적화 벡터)에 의해 고갈된 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자에 삽입된다. 이들 유전자는 각각 항체 분자의 Fc 부분과의 결합을 담당하는 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의  $\alpha$ -사슬 또는 리간드-결합 도메인을 포함한다.

[0089] 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌에서 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하는 유전자 변형된 마우스는 본 분야에 알려진 어떤 방법에 의해서 제조될 수 있다. 예를 들어, 선택성 마커 유전자를 가진 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자(예를 들어, Fc $\gamma$ RIIA 및 Fc $\gamma$ RIIIA)를 도입하는 표적화 벡터가 제조될 수 있다. 도 4는 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 결실을 포함하는 마우스 게놈을 예시한다(상부). 예시된 대로, 표적화 구성물은 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 상류 서열을 함유하는 5' 상동성 암, 이어서 약물 선택 카세트(예를 들어, 양쪽에 loxP 서열이 측면 위치한 히그로마이신 내성 유전자), 인간 Fc $\gamma$ RIIA 유전자, 인간 HSP76 유전자 및 인간 Fc $\gamma$ RIIIA 유전자를 함유하는 게놈 단편, 및 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 하류 서열을 함유하는 3' 상동성 암을 함유한다. 결실된 유전자좌에서 상동성 재조합 시에 약물 선택 카세트가 표적화 벡터에 함유된 서열로 치환된다(도 4의 하부). 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자 유전자좌는 이로써 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자로 치환되며, 그 결과 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하는 세포 또는 동물이 얻어진다. 약물 선택 카세트는 선택적으로 이어서 재조합효소를 첨가함으로써 제거될 수 있다(예를 들어, Cre 처리에 의해).

[0090] 혈소판에서 hFc $\gamma$ RIIA의 발현을 위한 표적화 구성물인 인간 hFc $\gamma$ RIIA-IIA 표적화 벡터는, 예를 들어 인간 게놈에서 hFc $\gamma$ RIIA 유전자에 작동 가능하게 연결된 인간 프로모터 영역의 전부 또는 실질적으로 전부를 포함하는 연결된 서열을 포함한다. 혈소판에서 hFc $\gamma$ RIIA의 발현을 방지하기 위한 표적화 구성물은 인간의 hFc $\gamma$ RIIA 유전자에 작동 가능하게 연결된 인간 프로모터 영역의 전부 또는 실질적으로 전부를 결여한다.

[0091] 키메라 유전자좌에 대한 추가 변형(도 4의 하부)이 2개의 인간 Fc $\gamma$ R 유전자로의 치환에 대해 설명된 것과 유사한 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자 유전자좌를 2개의 인간 Fc $\gamma$ R 유전자로 치환하는 변형은 또한 다른 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의 통합을 위한 시작점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 2개의 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자로 치환된 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 도해(축적 없음)가 도 6에 제공된다(상부). 예시된 대로, 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC 및 Fc $\gamma$ RIIIB가 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC 및 Fc $\gamma$ RIIIB 유전자를 함유하는 게놈 단편을 가진 다른 표적화 구성물(인간 Fc $\gamma$ RIIB-IIIB-IIC 표적화 벡터)에 의해 변형된 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자 유전자좌에 삽입된다. 이들 유전

자는 각각 항체 분자의 Fc 부분과의 결합을 담당하는 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의  $\alpha$ -사슬 또는 리간드 결합 도메인을 포함한다.

[0092] 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌에서 5개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하는 유전자 변형된 마우스가 본 분야에 알려진 어떤 방법에 의해서 제조될 수 있다. 예를 들어, 선택성 마커 유전자를 가진 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자(예를 들어, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC 및 Fc $\gamma$ R11B)를 도입한 표적화 벡터가 제조될 수 있다. 도 6은 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 2개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자로의 치환을 포함하는 마우스 게놈을 예시한다(상부). 예시된 대로, 표적화 구성물은 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 상류 서열을 함유하는 5' 상동성 압, 이어서 약물 선택 카세트(예를 들어, 양쪽에 loxP 서열이 측면 위치한 네오마이신 내성 유전자), 인간 Fc $\gamma$ RIIB 유전자, 인간 Fc $\gamma$ R11B, 인간 HSP77 유전자, 인간 Fc $\gamma$ RIIC 유전자를 함유하는 게놈 단편, 이어서 내인성 유전자좌에 존재하는 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R11A 유전자의 상류 서열을 함유하는 3' 상동성 압을 함유한다. 변형된 유전자좌에서의 상동성 재조합 시에 인간 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ R11B 및 Fc $\gamma$ RIIC 유전자가 표적화 벡터(도 6의 하부)에 함유된 서열에 의해 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자 유전자좌에 이미 존재하는 인간 Fc $\gamma$ R11A 및 Fc $\gamma$ R11A 유전자에 5' 삽입된다. 변형된 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자 유전자좌는 따라서 추가의 3개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 통합하도록 더 변형되고, 그 결과 5개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하는 세포 또는 동물이 얻어진다. 약물 선택 카세트는 선택적으로 이어서 재조합효소를 첨가함으로써 제거될 수 있다(예를 들어, Cre 처리에 의해). 도 6(하부)은 결과의 유전자좌의 구조가 5개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하며, 이들은 동물의 면역 시스템의 부속 세포의 표면에서 검출될 수 있고, 적절하다면 독립적으로 내인성 FcR $\gamma$ -사슬과 회합할 수 있음을 도시한다.

[0093] Fc $\gamma$ R 결핍 마우스 및 Fc $\gamma$ R 인간화된 마우스의 실험 모델

[0094] 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하지 않는 유전자 변형된 비-인간 동물은, 예를 들어 면역반응에서 각각의 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자의 다양한 기능을 설명하고, 세포-매개된 면역(예를 들어, ADCC)을 통한 인간 치료제 항체의 효능을 측정하고, 면역 질환 또는 장애에서 Fc $\gamma$ R의 역할을 결정하고, 면역 질환 또는 장애의 모델로서 사용하고, 하나 이상의 Fc $\gamma$ R 단백질에 대해 항체를 생성하고, 그리고 교배 상대로서 사용하여 다른 유전자 변형된 관심의 마우스를 생성하는데 유용하다.

[0095] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 마우스를 사용하여, 이러한 마우스에 야생형 마우스에서 Fc $\gamma$ R-의존성 세포독성 효과를 촉발한다고 알려진 제제를 투여함으로써 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자를 발현하지 않는 마우스에서 상실된 세포독성 효과를 결정할 수 있다(야생형 마우스와 비교해서). 한 구체예에서, 본 발명의 마우스에 종양 세포가 이식되고, 계속해서 시간 경과 후, 종양 세포의 표면에서 발현된 항원에 특이적인 항체가 주사된다. 항체의 이소타입은 주사 전에 알고 있으며, 동물은 야생형 동물에서 관찰된 ADCC와의 비교에 의해서 Fc $\gamma$ R-의존성 ADCC의 손상에 대해 분석된다.

[0096] 다른 양태에서, 내인성 저 친화성 수용체가 결핍된 마우스가 다른 면역 결핍 마우스와 조합되어(예를 들어, 교배에 의해) 자가면역 질환의 생체내 모델을 개발할 수 있었다. 예를 들어, 중증 복합 면역결핍증(SCID) 마우스가 면역 시스템 연구를 위한 모델 유기체로서 본 분야에서 통상 사용된다. SCID 마우스는 T 또는 B 림프구를 만드는 능력이 손상되거나, 또는 보체 시스템의 일부 성분을 활성화하고, 감염에 효과적으로 대항할 수 없고, 종양을 거부할 수 없으며, 이식물을 거부할 수 없다. 본 발명의 저 친화성 Fc $\gamma$ R  $\alpha$ -서브유닛 유전자-결핍 마우스를 SCID 마우스와 교배하여 항체 치료제(예를 들어, 항-종양 항체)의 투여에 반응하여 숙주 동물에서 세포 고갈을 확인할 수 있으며, 이것은 생체내에서 종양 세포 고갈에서 ADCC 및 보체-의존성 세포독성(CDC)의 역할을 결정할 것이다.

[0097] 다른 양태에서, 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자로의 치환을 포함하는 유전자 변형된 비-인간 동물이 제공된다. 이러한 동물은 완전한 인간 항체 및 hFc $\gamma$ R-매개된 ADCC의 약동학을 연구하는데 유용하다. 또한, 인간 Fc $\gamma$ R 유전자는 질환(예를 들어, SLE, RA, 베케너육아종증, 길랑바레 증후군 및 다발성 경화증)과 관련된 다형성이나 대립형질 변이체를 나타낸다고 알려져 있다. 따라서, 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자의 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의 특정 대립형질 또는 다형성 형태로의 치환을 포함하는 유전자 변형된 비-인간 동물을 사용하여 동물에서 인간 자가면역 질환, 및 다형성과 관련된 특질을 연구할 수 있다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의 대립형질 형태는 인간 IgG의 증진된 효능과 관련된다.

[0098] 다른 특정 구체예에서, 인간 항체 치료제의 효능에 대한 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 다형성의 효과가 결정된다. 특정 구체예에서, 항-종양 항체가 인간 Fc $\gamma$ R의 제1 다형성을 포함하는 제1의 인간화된 마우스에 투여되고, 또한 인간 Fc $\gamma$ R의 제2의 다형성을 포함하는 제2의 인간화된 마우스에도 투여되며, 상기 제1 및 제2의 마우스는 각각

인간 종양 세포를 포함하고, 상기 항-종양 항체의 항-종양 활성이 제1 및 제2의 마우스에서 평가된다. 특정 구체예에서, 치료 선택사항은 제1 및 제2 마우스에서의 항-종양 항체의 효능 평가에 기초하여, 제1 또는 제2 다형성을 가지며, 인간 종양 세포에 상응하는 종양을 가진 인간을 치료하는 것과 관련하여 의사에 의해서 선택된다.

[0099] 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의 적합한 다형성은 본 분야에 알려진 것들을 모두 포함한다. 인간 Fc $\gamma$ R1IA 유전자의 경우, 다형성은 예를 들어 IgG에 반응하여 증식하는 T 세포의 능력에 의해 보고된 고 반응자 및 저 반응자 표현형을 포함한다. 고 반응자 다형성은 위치 131에 아르기닌 잔기(131Arg)를 특징으로 하고, 저 반응자는 위치 131에 히스티딘 잔기(131His)를 특징으로 한다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ R1IA 서열은 131His 다형성을 포함한다. 인간 Fc $\gamma$ R1IA  $\alpha$ -사슬의 대표적인 단백질 서열이 SEQ ID NO:32에 도시된다.

[0100] 인간 Fc $\gamma$ R1IB 유전자의 단일-뉴클레오티드 치환은 리간드 결합 도메인( $\alpha$ -사슬)에 미스-센스 치환을 가져오며, 잠정적으로는 세포 표면에서 Fc $\gamma$ R1IB의  $\alpha$ -사슬과 결합하는 IgG의 Fc 부분의 결합 능력에 영향을 미친다. 예를 들어, 마우스에서 Fc $\gamma$ R1IB 유전자의 막 통과 도메인 내의 위치 232에서 이소류신의 트레오닌 잔기로의 치환(11e232Thr)은 수용체의 신호화 능력을 손상시킨다고 밝혀졌다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ R1IB 유전자는 이소류신 변이체(232I1e)를 포함한다. 인간 Fc $\gamma$ R1IB  $\alpha$ -사슬의 대표적인 단백질 서열이 SEQ ID NO:33에 도시된다.

[0101] 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA 유전자의 대립형질 변이체는 SLE 및 RA에 대한 감수성에 관련된다는 것이 제안되었다. 이 대립형질 변이체는 위치 158(Val158Phe)에서 발린의 페닐알라닌 치환을 포함한다. 발린 대립형질 변이체(158Val)는 페닐알라닌 대립형질 변이체(158Phe)보다 IgG1 및 IgG3에 대해 높은 친화성을 갖는 것을 특징으로 한다. 158Phe 대립형질 변이체는 면역 복합체의 감소된 청소를 유도하는 것이 제안되었다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA 유전자는 158Val 대립형질 변이체를 포함한다. 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA  $\alpha$ -사슬의 대표적인 단백질 서열이 SEQ ID NO:35에 도시된다.

[0102] 인간 Fc $\gamma$ R1IIB 유전자의 대립형질 변이체는 호중구 항원 1(NA1) 및 호중구 항원 2(NA2) 대립형질을 포함한다. 이들 대립형질 변이체는 수혈 반응, 동종면역성 중성구감소증, SLE 및 베케너육아종증에 관련된다는 것이 제안되었다. NA2 대립형질 변이체는 포식작용을 매개하는 감소된 능력을 특징으로 한다. 특정 구체예에서, 인간 Fc $\gamma$ R1IIB 유전자는 NA2 대립형질 변이체를 포함한다. 인간 Fc $\gamma$ R1IIB  $\alpha$ -사슬의 대표적인 단백질 서열이 SEQ ID NO:36에 도시된다.

[0103] 한 양태에서, 유전자 변형된 비-인간 동물은 치료제 항체의 Fc 부분에 의해 촉발되는 Fc $\gamma$ R-매개된 기능을 최적화하는데 유용하다. 항체의 Fc 부분은 본 분야에 알려진 어떤 방법에 의해서 변형될 수 있다. 예를 들어, Fc 부분 내의(예를 들어, CH2 및 CH3 도메인) 아미노산 잔기들을 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA에 대한 결합 친화성이 선택적으로 증진되도록 변형될 수 있다. 따라서, 결과의 항체는 Fc $\gamma$ R1IIIA-의존성 ADCC를 가져야 한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 인간 Fc $\gamma$ R1IIIA를 발현하는 동물을 사용하여, 동물에 변형된 인간 항체를 투여하고, Fc $\gamma$ R1IIIA-발현 세포와 결합한 항체를 검출하고(예를 들어, 시험관내로), 관찰된 ADCC 활성을 야생형 동물에서 결정된 것으로부터 관찰된 ADCC 활성과 비교함으로써, 변형된 인간 항체의 증진된 ADCC 능력을 평가한다.

[0104] 실시예

[0105] 실시예 1: 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자 결핍 마우스의 생성

[0106] 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 결실을 도입하기 위한 표적화 구성물(하기 설명된)을 구성했다(도 1).

[0107] VELOCIGENE® 기술(예를 들어, US Pat. No. 6,586,251 및 Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659 참조)을 사용하여 박테리아 인공 염색체(BAC) RP23-395f6(Invitrogen)를 변형시켜서 표적화 구성물을 제조했다. RP23-395f6 BAC DNA는 Fc $\gamma$ Rs 각각의  $\alpha$ -사슬을 포함하는 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R1IB, Fc $\gamma$ R1IV 및 Fc $\gamma$ R1III 유전자가 결실되도록 변형되었다.

[0108] 간단히 말해서, 프라이머 mFcR 5-up-1(5'-ACCAGGATAT GACCTGTAGA G; SEQ ID NO:1) 및 mFcR 3-up-1a(GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A; SEQ ID NO:2), 그리고 mFcR 5-DN(ATGCGAGCTC ATGCATCTATG TCGGGTGC GG AGAAAGAGGT AATGCATTCT TGCCCAATAC TTAC; SEQ ID NO:3) 및 mFcR 3-DN(ACTCATGGAG CCTCAACAGG A; SEQ ID NO:4)를 각각 사용해서 상류 및 하류 상동성 암을 제조했다. 이들 상동성 암을 사용해서 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R1IB, Fc $\gamma$ R1IV 및 Fc $\gamma$ R1III 유전자의  $\alpha$ -사슬이 결실된 카세트를 제조했다. 표적화 구성물은 내인성 유전자좌와 관련하여 5' 및 3' 영역에 상동성인 서열을 포함하는 상동성 암을 포함하는 lox형 네오마이신 내성 유전자를 포함했다. 내인성 Fc $\gamma$ R1IB

유전자의 상류와 내인성 Fc $\gamma$ RIII 유전자의 하류에 있는 유전자 및/또는 서열(도 1 참조)은 표적화 구성물에 의해서 변형되지 않았다.

[0109] 결실된 영역 바깥쪽과 표적화 구성물 내부의 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해서 표적화된 결실을 확인했다. 결실된 유전자좌의 상류 영역은 프라이머 mFcR-up-detect(ATCCTGAGTA TACTATGACA AGA; SEQ ID NO:5) 및 PGK-up-detect(ACTAGTGAGA CGTGCTACTT C; SEQ ID NO:6)를 사용하여 PCR로 확인되었고, 결실된 유전자좌의 하류 영역은 프라이머 pA-DN-detect(CTCCCACTCA TGATCTATAG A; SEQ ID NO:7) 및 mFcR-DN-detect(TGGAGCCTCA ACAGGACTCC A; SEQ ID NO:8)를 사용하여 확인되었다. 상류 결실 지점을 가로지른 뉴클레오티드 서열은 다음 서열을 포함했는데, 이것은 결실 지점에 존재하는 카세트 서열에 연속하여 연결된 Fc $\gamma$ RIIB 유전자(하기 괄호의)의 하류에 있는 내인성 마우스 서열을 나타낸다: (GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A)TTCGCTACC TTAGGACCGT TA(SEQ ID NO:9). 하류 결실 지점을 가로지른 뉴클레오티드 서열은 다음 서열을 포함했는데, 이것은 Fc $\gamma$ RIII 유전자(하기 괄호의)의 상류에서 내인성 마우스 서열에 이어진 카세트 서열을 나타낸다: CGGGTGGGA GAAAGAGGTA AT(GCATTCTT GCCAATACT TA)(SEQ ID NO:10).

[0110] 표적화된 BAC DNA(상기 설명된)를 마우스 ES 세포에 전기천공하여 Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIII 및 Fc $\gamma$ RIV가 결핍된 마우스를 생성했다. 양성 ES 세포 클론을 Taqman™ 스크리닝 및 염색체 분석에 의해서 확인한다. 다음에, 양성 ES 세포 클론을 사용하여 암컷 마우스에 이식해서 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자가 결핍된 새끼를 몇 마리 만들었다.

[0111] 실시예 2: 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자 결핍 마우스의 특성화

[0112] Fc $\gamma$ R 결핍된 마우스와 야생형 마우스로부터 비장을 수거하고, 멸균 일회용 백 안에 넣어 10mL 콜라게나제-D를 관류시켰다. 다음에, 1개씩의 비장을 함유하는 각 백을 Stomacher®(Seward)에 넣고, 30초간 중간 설정에서 균질화했다. 균질화된 비장을 10cm 페트리디쉬로 옮겨서 37°C에서 25분간 인큐베이션했다. 0.5M EDTA 1:50 희석액을 사용해서 피펫으로 세포를 분리한 다음, 37°C에서 5분 더 인큐베이션했다. 다음에, 원심분리(10분간 1000rpm)해서 세포를 펠릿화하고, 적혈구 세포를 3분간 4mL ACK 버퍼(Invitrogen)에서 용해했다. 비장세포를 RPMI-1640(Sigma)로 희석하고 다시 원심분리했다. 펠릿화된 세포를 10mL RPMI-1640에 다시 현탁해서 0.2 $\mu$ m 세포 여과기로 여과했다.

[0113] 유세포분석: 항-CD19(B 세포), 항-CD3(T 세포), 항-NKp46(NK 세포) 및 항-F4/80(대식세포)의 형광발색단 콘주게이트된 세포 표면 마크를 사용하여 BD LSR II 시스템(BD Bioscience)에서 FAC에 의해서 림프구 세포 집단을 확인했다. 림프구는 특정 세포 계통에 대해 게이트형이었으며, 래트 항-마우스 Fc $\gamma$ RIII/II 항체(클론 2.4G2, BD Biosciences)를 가진 내인성 Fc $\gamma$ RIII 및 Fc $\gamma$ RIIB의 발현에 대해 분석했다. 클론 2.4G2는 무린 Fc $\gamma$ RIII 및 Fc $\gamma$ RII의 세포외 도메인 상의 공통 다형성 에피토프를 인식한다. 이 결과는 mFc $\gamma$ R KO 마우스에서는 B 세포, NK 세포 및 대식세포 상에 검출가능한 무린 저 친화성 Fc $\gamma$ RIII 또는 Fc $\gamma$ RII가 존재하지 않았음을 나타낸다(도 2).

[0114] ADCC 분석: Fc $\gamma$ R 유전자 결핍 마우스와 야생형 마우스로부터 분리된 비장세포를 세포-사멸 분석에서 ADCC를 수행하는 능력에 대해서 분석했다. 세포 집단을 MACS® 기술(Miltenyi Biotec)을 사용해서 분리하고 구분했다. 간단히 말해서, 자기 표지된 항-마우스 CD3 비드를 사용하여 비장세포로부터 T 세포를 고갈시켰다. 다음에, T 세포 고갈된 비장세포를 자기 표지된 항-마우스 CD49B 비드를 사용하여 NK 세포로 부화시켰다. 별도로, Raji 세포(인간 CD20을 발현하는)를 4°C에서 30분간 다양한 농도의 마우스 항-인간 CD20 항체(클론 B1: Beckman Coulter)로 코팅했다. 항체 코팅된 Raji 세포를 37°C에서 4시간 100:1 및 50:1의 비율(NK:Raji)로 부화된 NK 세포와 함께 인큐베이션했다. CytoTox-Glo™ 세포독성 분석(Promega)을 사용해서 세포 사멸을 측정했다. 용해된 세포로부터 발광 신호가 유도되며, 이것은 죽은 세포의 수에 비례한다. 각 비율에서 바탕값 죽은 세포수에 대해 대조군(항-CD20 항체가 없는)으로부터의 발광이 결정되었으며, 이것은 야생형 및 KO 마우스에 대한 측정값에서 차감된다. 평균 세포 사멸이 계산되었고, 세포 사멸의 감소 퍼센트(ADCC %)가 야생형과의 비교에 의해 결정되었다. 결과를 표 1에 나타낸다.

표 1

	mFcγR KO	% ADCC		
		10 μg/mL B1 항체	1 μg/mL B1 항체	0.1 μg/mL B1 항체
NK 세포:Raji 세포	100:1	42	53	35
	50:1	15	0	0

[0115]

[0116]

실시예 3: 저 친화성 FcγR 유전자 결핍 마우스에서 B 세포의 생체내 고갈

[0117]

ADCC 경로를 통한 B 세포 고갈에 대한 인간 또는 뮤린 FC 이소타입의 효과가 인간 항-인간 CD20 항체를 사용하여 인간 CD20을 발현하도록 조작된 저 친화성 FcγR 유전자 결핍 마우스에서 다양한 B 세포 구획에 대해 결정되었다. 별도로, 인간 CD20을 발현하는 마우스를 본 분야에 알려진 기술을 사용하여 조작했다. B 세포 상에서 인간 CD20을 발현하는 마우스와 저 친화성 FcγR 유전자가 결핍된 마우스(실시예 1에 설명된)를 두 조작된 계통으로부터 표준 조작 기술에 의해서 만들었다.

[0118]

인간 CD20을 발현했고, 내인성 저 친화성 FcγR 유전자의 완전 보체를 가졌던 마우스의 별도의 그룹들에 다음 중 하나를 각각 투여했다: (1) 10mg/kg 대조군 항체(N=4; 마우스 IgG2a를 가진 인간 CD20에 대해 특이적이 아닌 인간 항체); (2) 2mg/kg Ab 168(N=3; 마우스 IgG2a를 가진 인간 항-hCD20 항체; US 특허 공개 No. 2009/0035322의 SEQ ID NOs: 339 및 347에서 각각 발견된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열); (3) 10mg/kg Ab 168; (4) 2mg/kg Ab 735(N=3; 인간 IgG1을 가진 Ab 168); (5) 10mg/kg Ab 735. 유사한 실험 세트에서, 인간 CD20을 발현했고, 내인성 저 친화성 FcγR 유전자가 고갈됐던 마우스의 그룹들에 대조군 및 인간 항 hCD20 항체(상기 설명된)를 투여했다.

[0119]

각 그룹의 마우스에 복강내 주사에 의해 항체를 투여했다. 주사 후 7일 뒤에 동물을 마취하고, LSR-II 유세포 계수기에서 수행된 다중-컬러 FACS에 의해서 골수(B220+/IgM+), 말초혈(B220+/CD19+), 림프절(B220+/CD19+) 및 비장(B220+/CD19+)의 나머지 B 세포 함유량을 확인하고, FlowJo 소프트웨어를 사용해서 분석했다(상기 설명된 대로). B 세포 고갈 실험의 결과가 도 3a-3d에 도시된다.

[0120]

도 3a-3d에 도시된 대로, Ab 735는 저 친화성 FcγR 유전자의 완전한 보체를 함유하는 마우스에서 Ab 168보다 낮은 효능으로 B 세포를 고갈시켰다. 또한, 두 항체(마우스 및 인간 Fc) 모두, 저 친화성 FcγR 유전자의 완전 보체를 결여한 마우스에서는 B 세포 고갈이 상당히 감소되었다. 이 실시예는 ADCC 경로를 통해 B 세포를 고갈시키는 능력이 저 친화성 FcγRs를 필요로 한다는 것을 나타내며, 마우스에서 인간 불변 영역을 함유하는 항체에 대한 ADCC 효능의 측정에는 인간 저 친화성 FcγR 유전자의 완전 보체를 함유하는 유전자 조작된 마우스를 사용하는 것이 더 적합하다는 것을 증명한다.

[0121]

실시예 4: FcγRIIIA/FcγRIIA 인간화된 마우스의 생성

[0122]

결실된 내인성 저 친화성 마우스 FcγR 유전자좌에 2개의 저 친화성 인간 FcγR 유전자를 도입하기 위한 표적화 구성물(하기 설명된)을 구성했다(도 4).

[0123]

BAC RP23-395f6 및 CTD-2514j12(Invitrogen)의 변형을 통해서 유사한 방법(실시예 1 참조)을 사용하여 인간 FcγRIIA 및 FcγRIIIA 유전자를 포함하는 표적화 구성물을 제조했다. 두 BAC 모두의 BAC DNA는 결실된 내인성 저 친화성 FcγR 유전자좌에 저 친화성 인간 FcγRIIA 및 FcγRIIIA 유전자의 α-사슬의 결실을 도입하도록 변형되었다.

[0124]

유사한 방식으로, 프라이머 h14(GCCAGCCACA AAGGAGATAA TC; SEQ ID NO:11)와 h15(GCAACATTTA GGACAACCTG GG; SEQ ID NO:12), 및 h4(GATTTCCTAA CCACCTACCC C; SEQ ID NO:13)와 h5(TCTTTTCCAA TGGCAGTTG; SEQ ID NO:14)를 각각 사용하여 상류 및 하류 상동성 암을 제조했다. 이들 상동성 암을 사용해서 내인성 마우스 저 친화성 FcγR 유전자좌에 저 친화성 인간 FcγRIIA 및 FcγRIIIA 유전자의 α-사슬을 도입한 카세트를 제조했다. 표적화 구성물은 결실된 내인성 저 친화성 FcγR 유전자좌에 5' 서열을 포함하는 5' 상동성 암, FRT'ed 히그로마이신 내성 유전자, 이어서 저 친화성 인간 FcγRIIA 및 FcγRIIIA α-사슬 유전자를 포함하는 BAC CTD-2514j12로부터의 인간 게놈 단편, 및 결실된 내인성 저 친화성 FcγR 유전자좌에 마우스 3' 서열을 포함하는 3' 상동성 암을 포함했다(도 4의 중간). 마우스 혈소판에서 FcγRIIA를 발현하는 마우스의 경우, 표적화 구성물이 유사한 방식

으로 제조되었는데(동일한 BACs를 사용하여), 단 이 구성물은 양쪽에 lox2372 부위가 측면 위치한 히그로마이신 카세트를 사용하여, 예를 들어 최대 약 18kb 이상까지 인간 게놈의 인간 Fc $\gamma$ R1IA 유전자에 작동 가능하게 연결된 연장된 프로모터 서열을 포함하며, 프로모터 영역과 제1 lox2372 부위의 접합부는 ATCGGGGATA GAGATGTTG(CC)GCGATCGC GGTACCGGC(SEQ ID NO:37 괄호가 인간/lox2372 접합부)이고, 제2 lox2372 부위와 마우스 서열의 접합부는 TTATACGAAG TTATACCGG(T G)CATTCTGC CCAATACTTA(SEQ ID NO:38 괄호가 lox2372/마우스 접합부)이다. 적합한 프라이머를 사용하여 프로모터 영역을 포함하는 인간화의 유전자형을 분석했다.

[0125] 인간 Fc $\gamma$ R1IA 및 Fc $\gamma$ R1IIIA  $\alpha$ -사슬 유전자의 표적화된 삽입을 PCR에 의해서 확인했다(상기 설명된 대로). 부분적으로 인간화된 유전자좌의 상류 영역은 프라이머 h16(CCCAGGTAAG TCGTGATGAA ACAG; SEQ ID NO:15) 및 pA-DN-detect(CTCCCACTCA TGATCTATAG A; SEQ ID NO:16)를 사용하여 PCR로 확인했고, 부분적으로 인간화된 유전자좌의 하류 영역은 프라이머 mFcR DN-detect-9(TGGAGCCTCA ACAGGACTCC A; SEQ ID NO:17) 및 h6(CACACATCTC CTGGTGACTT G; SEQ ID NO:18)를 사용하여 확인했다. 하류 접합부를 가로지른 뉴클레오티드 서열은 다음 서열을 포함했으며, 이것은 검출된 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 3' 내인성 마우스 서열에 이어진 hFc $\gamma$ R1IA 유전자(아래 괄호 안의) 상류에 있는 내인성 인간 서열의 새로운 삽입 지점을 나타낸다: (CAACTGCCAT TGGAAAAGA)CTCGAGTGCCA TTTCATTACC TC(SEQ ID NO:19). 상류 접합부는 2개의 새로운 서열을 포함한다. 상류 접합부의 한 지점은 다음 서열을 포함하며, 이것은 삽입된 hFc $\gamma$ R1IIIA 유전자의 상류 영역을 포함하는 인간 게놈 서열(아래 괄호 안의)에 이어진 히그로마이신 카세트의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다: TAAACCCGCG GTGGAGCTC(GCCAGCCACAA AGGAGATAAT CA)(SEQ ID NO:20). 상류 접합부의 두 번째 지점은 다음 서열을 포함하며, 이것은 히그로마이신 카세트 내의 뉴클레오티드 서열과 이어진 검출된 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 상류 영역으로부터 내인성 마우스 서열(아래 괄호 안의)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다: (CCATGGGTAA GTAGAAAC)TC TAGACCCCGGCTCGATAA CT(SEQ ID NO:21).

[0126] 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌를 대신해서 2개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자(hFc $\gamma$ R1IA, 연장된 프로모터 영역을 결합, 및 hFc $\gamma$ R1IIIA)를 함유하는 마우스를, 마우스 ES 세포에 표적화된 BAC DNA(상기 설명된)를 전기천공하여 생성했다. 양성 ES 세포 클론을 Taqman™ 기술 및 염색체 분석에 의해 확인했다. 다음에, 양성 ES 세포 클론을 VELOCIMOUSE® 방법(아래 설명된)을 사용해서 암컷 마우스에 이식하여 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자가 2개의 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자로 치환된 새끼들을 몇 마리 만들었다.

[0127] 상기 설명된 표적화된 ES 세포를 도너 ES 세포로 사용하여 VELOCIMOUSE® 방법에 의해서 8-세포기 마우스 배아에 도입했다(예를 들어, US Pat. No. 7,294,754 및 Poueymirou et al.(2007) FO generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99 참조). hFc $\gamma$ R 유전자의 존재를 검출했던 대립형질 분석(Valenzuela et al., supra)의 변형을 사용하여 유전자형 분석을 통해서 hFc $\gamma$ R1IA 및 hFc $\gamma$ R1IIIA를 지닌 VELOCIMICE®(도너 ES 세포로부터 완전히 유도된 FO 마우스)를 확인했다.

[0128] hFc $\gamma$ R 유전자를 지닌 마우스는 Cre 결실자 마우스 계통과 교배될 수 있으며(예를 들어, 국제특허출원 공개 WO 2009/114400 참조), 이로써 예를 들어 ES 세포기나 배아에서 제거되지 않은 표적화 구성물에 의해 도입된 lox형 neo 카세트를 제거할 수 있다. 선택적으로, 네오마이신 카세트는 마우스에 보유된다.

[0129] 새끼들을 유전자형 분석하고, hFc $\gamma$ R 유전자에 이형접합된 새끼를 선택해서 Fc $\gamma$ R1IA 및 Fc $\gamma$ R1IIIA 인간화를 특성화한다.

[0130] 실시예 5: Fc $\gamma$ R1IIIA/Fc $\gamma$ R1IA 인간화된 마우스의 특성화

[0131] 인간화된 Fc $\gamma$ R1IIIA Fc $\gamma$ R1IA 마우스(이형접합체, 연장된 Fc $\gamma$ R1IA 프로모터 영역을 결합) 및 야생형 마우스로부터 비장을 수거하고, FAC를 위해 준비했다(상기 설명된 대로).

[0132] 유세포분석: 림프구는 특정 세포 계통에 대해 게이트형이었으며, 마우스 항-인간 Fc $\gamma$ R1I 항체(클론 FL18.26; BD Biosciences) 및 마우스 항-인간 Fc $\gamma$ R1II 항체(클론 3G8; BD Biosciences)를 각각 사용하여 hFc $\gamma$ R1I 및 hFc $\gamma$ R1II의 발현에 대해 분석했다. 각 림프구 하위집단에서 관찰된 상대적 발현(++,+ ) 또는 무발현(-)을 표 2에 나타낸다.

표 2

림프구 계통	hFcγRIII	hFcγRII
B 세포	-	-
NK 세포	++	-
대식세포	+	+
호중구	-	+

[0133]

[0134]

유사한 실험에서, 인간화된 FcγRIIIA/FcγRIIA 마우스(동형접합체, 연장된 FcγRIIA 프로모터 영역을 결여함) 및 야생형 마우스로부터 비장을 수거하고, FAC에 대해 준비했다(상기 설명된 대로). 결과를 도 5a 및 5b에 도시한다. FcγRI IIA/FcγRIIA 동종접합 마우스에서 인간 FcγRIIIA, FcγRIIA, 또는 둘 다를 발현하는 분리된 림프구 세포 집단의 퍼센트를 표 3에 나타낸다.

표 3

림프구 계통	hFcγRIII	hFcγRII	hFcγRII/hFcγRIII
NK 세포	97	-	-
대식세포	26	14	39
호중구	-	94	-

[0135]

[0136]

이 실시예에 나타난 대로, 실시예 3에 따라서 생성된 유전자 변형된 마우스(이형접합체 및 동종접합체 유전자형 모두)는 NK 세포와 대식세포 상에서 인간 FcγRIIIA를 발현했고, 호중구와 대식세포 상에서 인간 FcγRIIA를 발현했으며, 혈소판에서는 발현하지 않았다. 인간 FcγRIIIA는 NK 세포에서 많이 발현되었다. 이 실시예에서 나타난 인간 FcγR 유전자의 발현 패턴은 인간 부속 세포에서 이들 유전자의 발현 패턴과 일치한다.

[0137]

실시예 6: 저 친화성 FcγR 인간화된 마우스의 생성

[0138]

부분적으로 인간화된 내인성 저 친화성 FcγR 유전자좌에 3개의 추가의 저 친화성 인간 FcγR 유전자를 도입하기 위한 표적화 구성물(하기 설명된)을 구성했다(도 6).

[0139]

인간 FcγRIIB, FcγRI IIB 및 FcγRIIC 유전자를 포함하는 표적화 구성물을 BAC RP-23 395f6 및 RP-11 697e5(Invitrogen)의 변형을 통해서 유사한 방법(실시예 1 참조)을 사용하여 제조했다.

[0140]

두 BACs 모두의 BAC DNA가 2개 인간 저 친화성 FcγR 유전자를 함유하는 부분적으로 인간화된 내인성 저 친화성 FcγR 유전자좌에 저 친화성 인간 FcγRIIB, FcγRII IB 및 FcγRIIC 유전자의 α-사슬을 도입하도록 변형되었다.

[0141]

유사한 방식에서, 프라이머 mFcR up-1(ACCAGGATAT GACCTGTAGA G; SEQ ID NO:22) 및 mFcR2b NheI-2(GTTTCTACTT ACCCATGGAC; SEQ ID NO:23), 및 h10(AAATACACAC TGCCACAGAC AG; SEQ ID NO:24) 및 h11(CCTCTTTTGT GAGTTTCCTG TG; SEQ ID NO:25)을 각각 사용하여 상류 및 하류 상동성 암을 제조했다. 이들 상동성 암을 사용해서 저 친화성 인간 FcγRIIB, FcγRIIIB 및 FcγRIIC의 α-사슬을 암호화하는 DNA 서열을 도입한 카세트를 제조했다. 표적화 구성물은 결실된 내인성 저 친화성 FcγR 유전자좌에 5' 마우스 서열을 포함하는 5' 상동성 암, lox형 네오마이신 내성 유전자, 이어서 저 친화성 인간 FcγRIIB, FcγRIIIB 및 FcγRIIC α-사슬 유전자로부터의 인간 계놈 단편, 및 저 친화성 인간 FcγRIIIA α-사슬 유전자에 5' 인간 서열을 포함하는 3' 상동성 암을 포함했다(도 6의 중간).

[0142]

3개의 추가의 저 친화성 인간 FcγR 유전자의 표적화된 삽입을 PCR에 의해서 확인했다(상기 설명된 대로). 완전히 인간화된 유전자좌의 상류 영역은 프라이머 mFcR up-detect-3(GAGTATACTA TGACAAGAGC ATC; SEQ ID NO:26) 및 PGK up-detect(ACTAGTGAGA CGTGCTACTT C; SEQ ID NO:27)를 사용하여 PCR로 확인되었고, 완전히 인간화된 유

전자좌의 하류 영역은 프라이머 neo detect(CTCCCACTCA TGATCTATAG A; SEQ ID NO:28) 및 h12(CTTTTATGG TCCACAATC AG; SEQ ID NO:29)를 사용하여 확인되었다. 하류 접합부를 가로지른 뉴클레오티드 서열은 hFc $\gamma$  RIIA  $\alpha$ -사슬 유전자의 상류에 동일한 인간 게놈 서열을 포함했다(실시예 3 참조; SEQ ID NO:19). 상류 접합부를 가로지른 뉴클레오티드 서열은 다음의 서열을 포함했으며, 이것은 삽입 지점에서 마우스와 카세트 서열 그리고 카세트와 인간 게놈 서열의 2개의 새로운 접합부를 나타낸다. 게놈 마우스 서열의 접합부(아래 괄호 안의)와 neo 카세트 서열의 상류 영역은 다음과 같다: (GTCCATGGGT AAGTAGAAAC A)TTCGCTACC TTAGGACCGT TA(SEQ ID NO:30). 두 번째 새로운 접합부는 neo 카세트의 3' 단부와 hFc $\gamma$ R IIB  $\alpha$ -사슬 유전자 하류의 인간 게놈 서열의 연결을 포함한다: (GCTTATCGAT ACCGTGAC)A AATACACACT GCCACAGACA GG; SEQ ID NO:31). 이들 접합부는 도 6 (중간)에서 표적화 구성물 안에 도시된다. 완전히 인간화된 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자좌의 결과의 변형된 게놈을 도 6에 도시한다(하부).

[0143] 내인성 저 친화성 마우스 Fc $\gamma$ R 유전자좌를 대신해서 5개의 저 친화성 인간 Fc $\gamma$ R 유전자를 함유하는 마우스를, 마우스 ES 세포에 표적화된 BAC DNA(상기 설명된)를 전기천공하여 생성했다. 양성 ES 세포 클론을 Taqman™ 스크리닝 및 염색체 분석에 의해서 확인했다. 다음에, 양성 ES 세포 클론을 암컷 마우스에 이식하여(상기 설명된 대로), 내인성 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자를 5개의 인간 저 친화성 Fc $\gamma$ R 유전자로 치환한 새끼들을 몇 마리 만들었다.

[0144] 실시예 7: 저 친화성 Fc $\gamma$ R 인간화된 마우스의 특성화

[0145] 인간화된 Fc $\gamma$ R(이형접합체) 및 야생형 마우스로부터 비장을 수거하고, FAC를 위해 준비했다(상기 설명된 대로).

[0146] 유세포분석: 림프구는 특정 세포 계통에 대해 게이트형이었으며, 마우스 항-인간 Fc $\gamma$ R II 항체(클론 FL18.26; BD Biosciences) 및 마우스 항-인간 Fc $\gamma$ R III 항체(클론 3G8; BD Biosciences)를 각각 사용하여 인간 hFc $\gamma$  RIIA 및 hFc $\gamma$  RIIIA의 발현에 대해 분석했다. 각 림프구 하위집단에서 관찰된 상대적 발현(++,+ 또는 무발현(-))을 표 4에 나타낸다.

표 4

림프구 계통	hFc $\gamma$ R III	hFc $\gamma$ R II
<b>B</b> 세포	-	+
<b>NK</b> 세포	+	+
대식세포	+	+
호중구	+	+

[0147]

[0148] 유사한 실험에서, 완전히 인간화된 Fc $\gamma$ R 마우스(동형접합체) 및 야생형 마우스로부터 비장을 수거하고, FAC에 대해 준비했다(상기 설명된 대로). 결과를 도 7에 도시한다. 완전히 인간화된 Fc $\gamma$ R 동종접합 마우스에서 인간 Fc $\gamma$  RIIIA, 인간 Fc $\gamma$  RIIIB, 인간 Fc $\gamma$  RIIA, 인간 Fc $\gamma$  RIIB, 인간 Fc $\gamma$  RIIC 또는 이들의 조합을 발현하는 분리된 림프구 세포 집단의 퍼센트를 표 5에 나타낸다.

표 5

림프구 계통	hFc $\gamma$ R III	hFc $\gamma$ R II	hFc $\gamma$ R II/hFc $\gamma$ R III
<b>B</b> 세포		100	
<b>NK</b> 세포	30	-	-
대식세포	<1	55	26
호중구	-		100

[0149]

[0150] 이 실시예에 나타난 대로, 실시예 5에 따라서 생성된 유전자 변형된 마우스(이형접합체 및 동종접합체 유전자형 모두)는 NK 세포와 대식세포 상에서 인간 Fc $\gamma$ R111A를 발현했고, 호중구 상에서 인간 Fc $\gamma$ R111B, 호중구와 대식세포 상에서 인간 Fc $\gamma$ R111A, B 세포 상에서 인간 Fc $\gamma$ R111B, 그리고 NK 세포 상에서 인간 Fc $\gamma$ R111C를 발현했다. 이 실시예에서 나타난 인간 Fc $\gamma$ R 유전자의 발현 패턴은 인간 부속 세포에서 이들 유전자의 발현 패턴과 일치한다.

[0151] 실시예 8: 인간화된 Fc $\gamma$ R 마우스에서 ADCC

[0152] Fc $\gamma$ R 유전자 결핍(즉, 녹아웃) 마우스 Fc $\gamma$ R111A/Fc $\gamma$ R111A(동종접합체), Fc $\gamma$ R111A/Fc $\gamma$ R111B/Fc $\gamma$ R111A/Fc $\gamma$ R111B/Fc $\gamma$ R111C(동종접합체)와 야생형 마우스로부터 분리된 비장세포를 세포 사멸 분석에서 ADCC를 수행하는 능력에 대해 분석했다(상기 실시예 2에서 설명된 대로).

[0153] 간단히 말해서, MACS $\text{\textcircled{R}}$  기술(Miltenyi Biotec)을 사용하여 세포 집단을 분리하고 구분했다. 간단히 말해서, T 및 B 세포 고갈된 비장세포를 마우스 IL-2(500 U/mL)의 존재하에 2주간 배양했다. 결과의 확장된 NK 세포를 50:1(NK:Raji)의 비율에서 ADCC 분석에서 이펙터 세포로 사용했다. Raji 세포를 Ab 168 또는 Ab 735 10 $\mu$ g/mL로 코팅했다(상기 실시예 3에 설명된 대로). 결과를 표 6에 나타낸다.

표 6

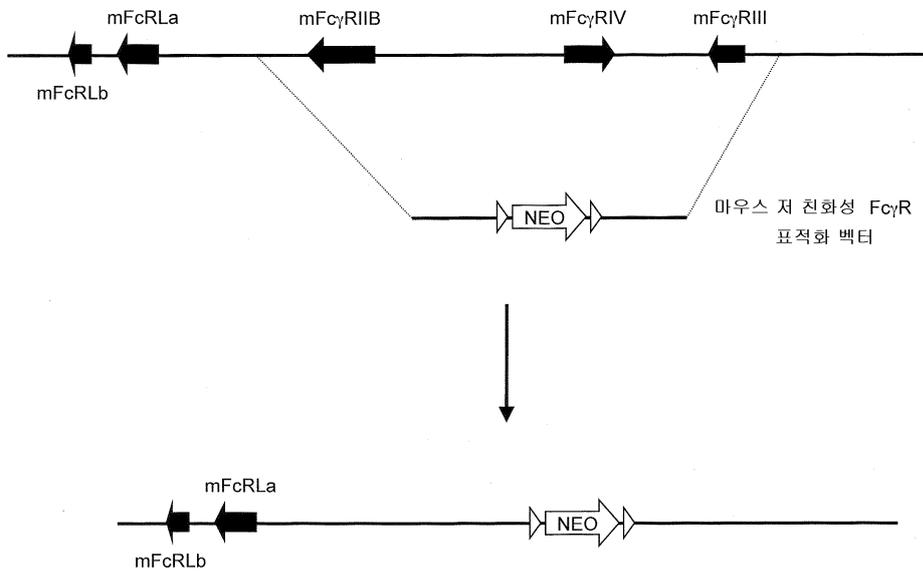
NK 세포 유전자형	% ADCC	
	10 $\mu$ g/mL Ab 168	10 $\mu$ g/mL Ab 735
야생형	89	72
마우스 Fc $\gamma$ R KO	13	14
인간 Fc $\gamma$ R111A-111A HO	78	85
인간 Fc $\gamma$ R111A-111B-111A-111B-111C HO	81	59

[0154]

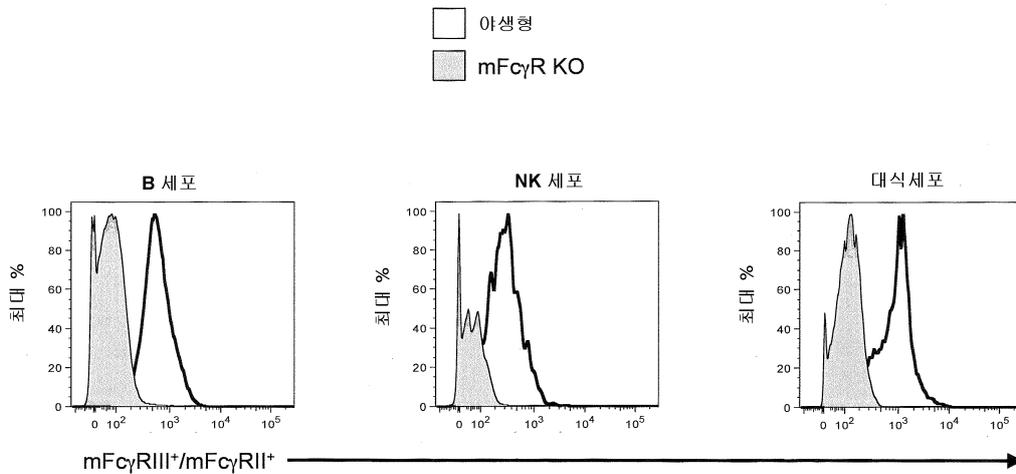
[0155] 본 발명은 여기 설명된 특정 구체예에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로 여기 설명된 것들에 더하여 본 발명의 다양한 변형들이 전술한 설명 및 첨부한 도면으로부터 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 들어간다.

도면

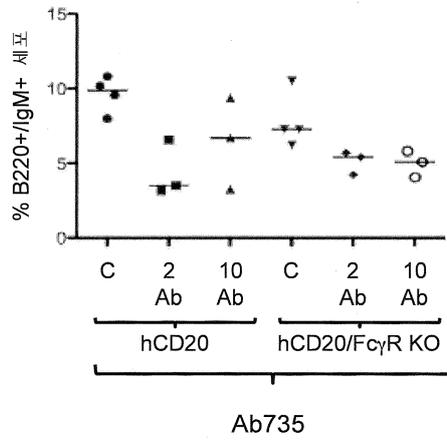
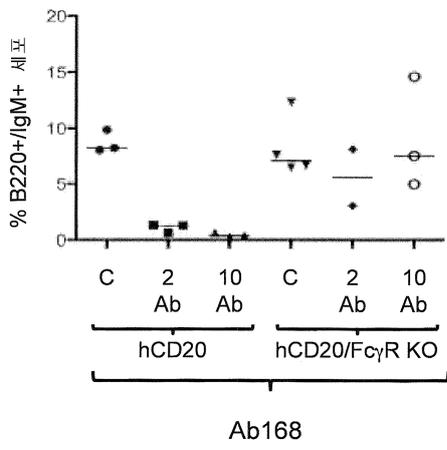
도면1



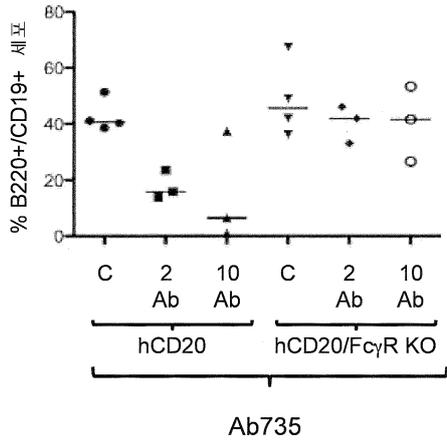
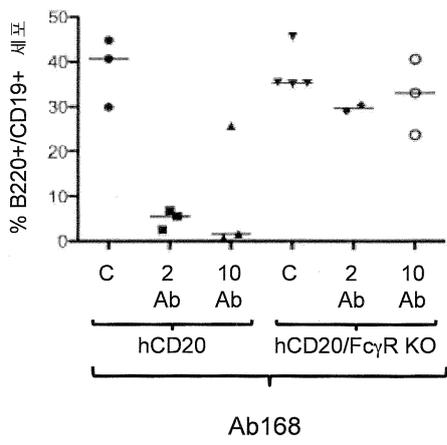
도면2



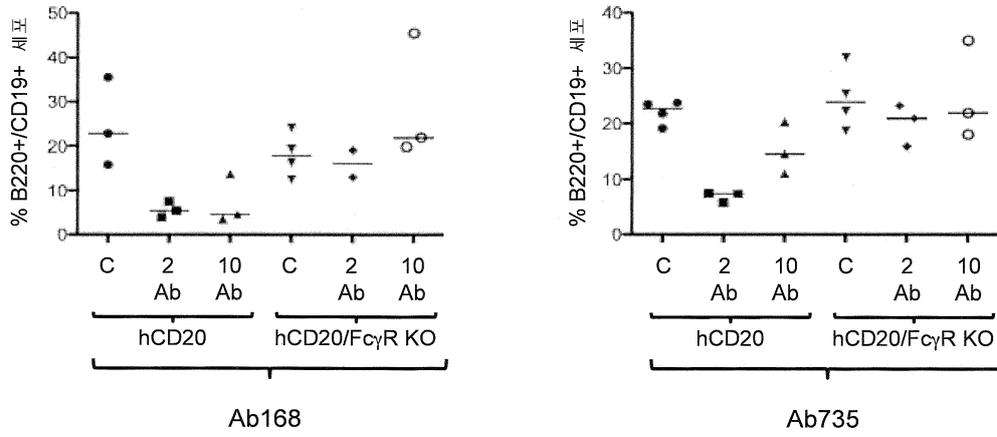
도면3a



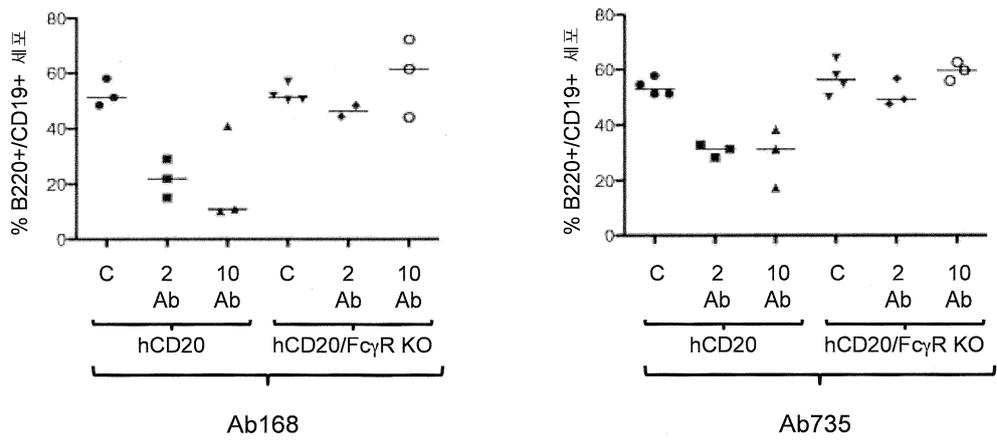
도면3b



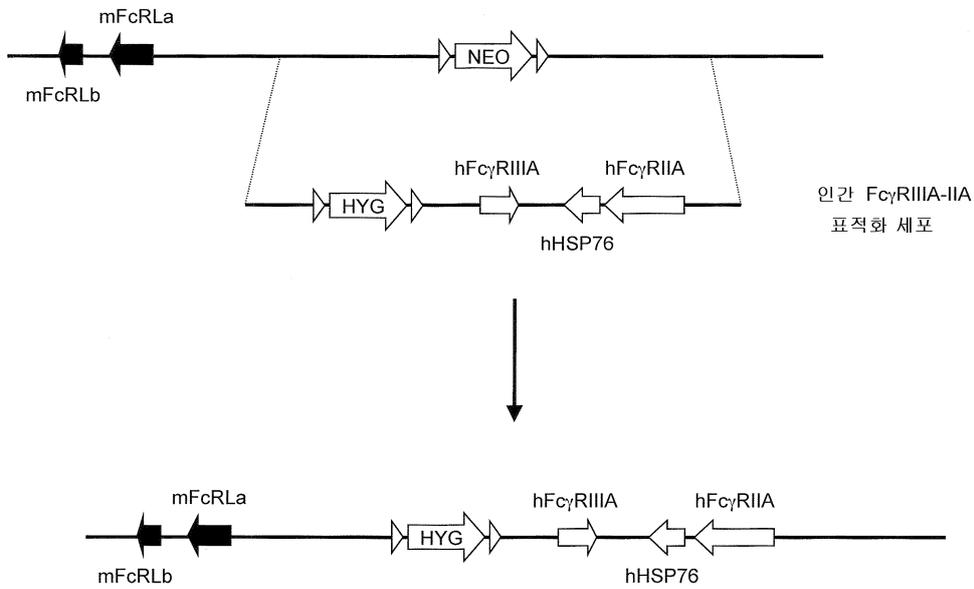
도면3c



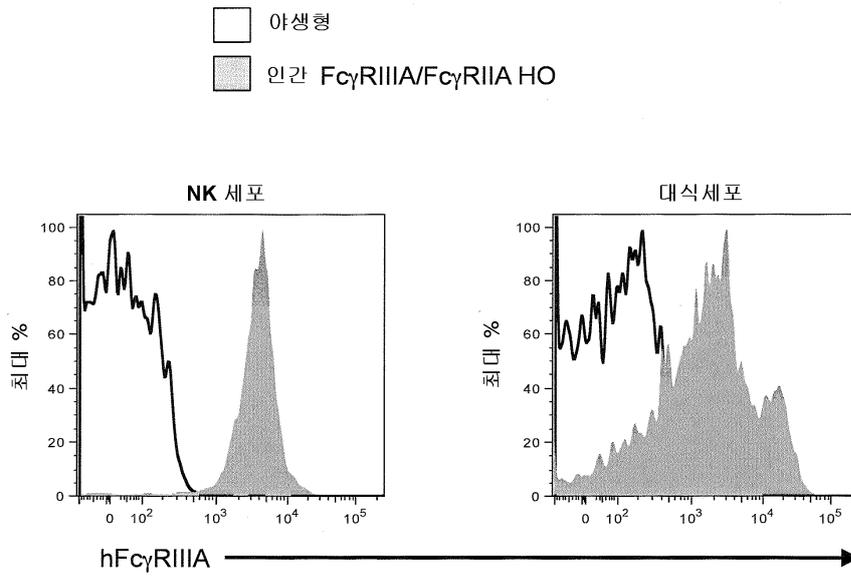
도면3d



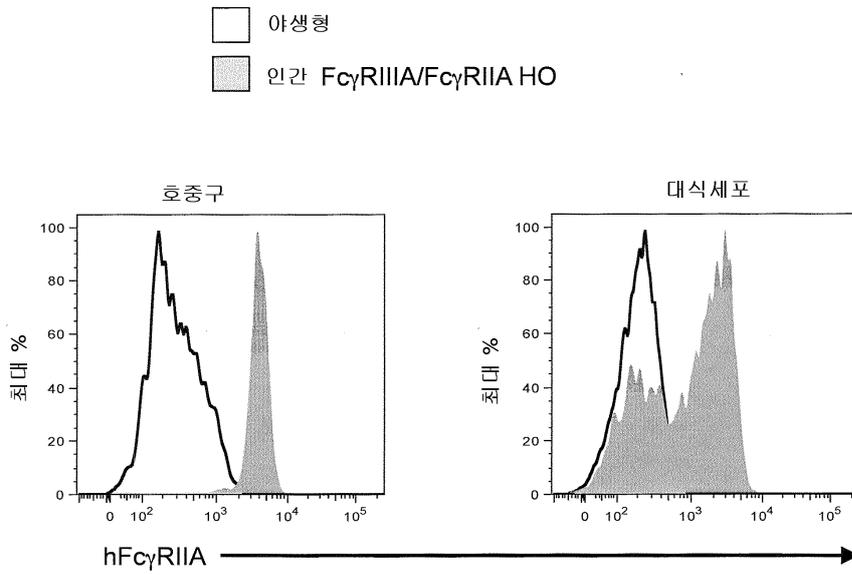
도면4



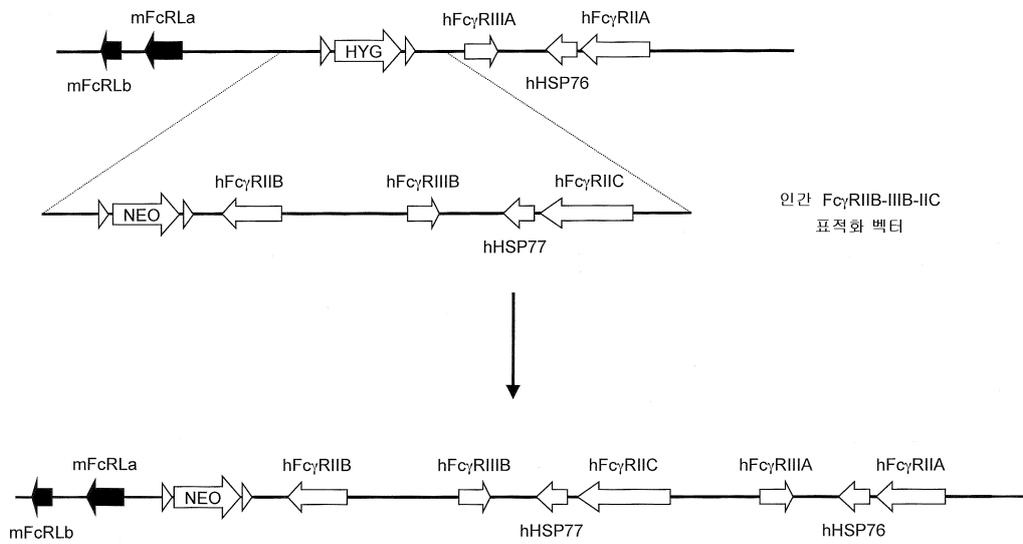
도면5a



도면5b

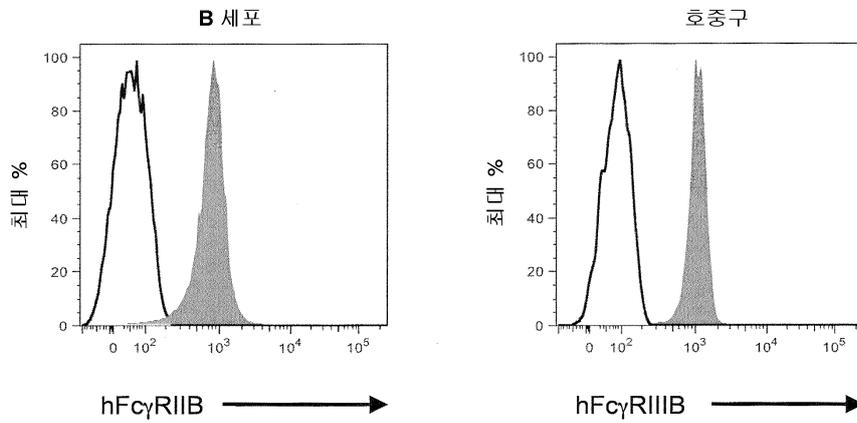


도면6



도면7

- 야생형
- 인간 FcγRIIIA/FcγRIIIB/FcγRIIA/FcγRIIB/FcγRIIC HO



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MACDONALD, Lynn  
TU, Naxin  
GURER, Cagan  
STEVENS, Sean  
MURPHY, Andrew J.
- <120> HUMANIZED FCγR MICE
- <130> 3070A-WO
- <140> To be assigned
- <141>
- <150> 61/288,562
- <151> 2009-12-21
- <160> 38
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>

<223> synthetic  
 <400> 1  
 accaggatat gacctgtaga g 21

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic  
 <400> 2  
 gtccatgggt aagtagaac a 21

<210> 3  
 <211> 65  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic  
 <400> 3  
 atgcgagctc atgcatctat gtcgggtgcg gagaaagagg taatgcattc ttgcccaata 60  
 cttac 65

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic  
 <400> 4  
 actcatggag cctcaacagg a 21

<210> 5  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic  
 <400> 5  
 atcctgagta tactatgaca aga 23  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 6  
 actagtgaga cgtgctactt c 21  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 7  
 ctcccactca tgatctatag a 21  
 <210> 8  
  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 8  
 tggagcctca acaggactcc a 21  
 <210> 9  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 9

gtccatgggt aagtagaac attcgctacc ttaggaccgt ta 42  
 <210> 10  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 10  
 cgggtgcgga gaaagagta atgcattctt gcccaatact ta 42  
 <210> 11  
 <211>  
 > 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 11  
 gccagccaca aaggagataa tc 22  
 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 12  
 gcaacattta ggacaactcg gg 22  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 13  
 gatttcctaa ccacctacc c 21  
 <210> 14

<211  
 > 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 14  
 tcttttcaa tggcagttg 19  
 <210> 15  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 15  
 cccaggtaa tcgtgatgaa acag 24  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 16  
 ctcccactca tgatctatag a 21  
 <210> 17  
 <211  
 > 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 17  
 tggagcctca acaggactcc a 21  
 <210> 18  
 <211> 21

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 18  
 cacacatctc ctggtgactt g 21  
 <210> 19  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 19  
 caactgccat tggaaaagac tcgagtgccca tttcattacc tc 42  
 <210> 20  
 <211>  
 > 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 20  
 taaaccgcg gtggagctcg ccagccacaa aggagataat ca 42  
 <210> 21  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 21  
 ccatgggtaa gtagaaactc tagacccccg ggctcgataa ct 42  
 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> synthetic  
 <400> 22  
 accaggatat gacctgtaga g 21  
 <210> 23  
 <211>  
 > 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 23  
 gtttctactt acccatggac 20  
 <210> 24  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 24  
 aaatacacac tgccacagac ag 22  
 <210> 25  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 25  
 cctcttttgt gaggttcctg tg 22  
 <210> 26  
 <211>  
 > 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> synthetic  
 <400> 26  
 gagtatacta tgacaagagc atc 23  
 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 27  
 actagtgaga cgtgctactt c 21  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 28  
 ctcccactca tgatctatag a 21  
 <210> 29  
 <211>  
 > 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 29  
 ctttttatgg tcccacaatc ag 22  
 <210> 30  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> synthetic  
 <400> 30

gtccatgggt aagtagaaac attcgctacc ttaggaccgt ta 42

<210> 31

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 31

gcttatcgat accgtcgaca aatacacact gccacagaca gg 42

<210> 32

<211>

> 317

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 32

Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu

1 5 10 15

Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp

20 25 30

Ser Gln Ala Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro

35 40 45

Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly

50 55 60

Ala Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn

65 70 75 80

Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn

85 90 95

Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser

100 105 110

Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr

115 120 125

Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His  
 130 135 140

Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly  
 145 150 155 160

Lys Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln  
 165 170 175

Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly  
 180 185 190

Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro  
 195 200 205

Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile Val Ala Val Val Ile  
 210 215 220

Ala Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr  
 225 230 235 240

Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala  
 245 250 255

Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg  
 260 265 270

Gln Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr  
 275 280 285

Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr  
 290 295 300

Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn

305

310

315

<210> 33

<211> 303

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 33

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp

1                    5                    10                    15  
 Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr  
                           20                    25                    30  
 Ala Val Leu Phe Leu Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu  
                           35                    40                    45  
  
 Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys  
                           50                    55                    60  
 Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn  
 65                    70                    75                    80  
 Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala  
                           85                    90                    95  
 Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser  
                           100                    105                    110  
  
 Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu  
                           115                    120                    125  
 Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg  
                           130                    135                    140  
 Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln  
 145                    150                    155                    160  
 Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile  
                           165                    170                    175  
  
 Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn  
                           180                    185                    190  
 Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln  
                           195                    200                    205  
 Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile Val Ala Val Val Thr Gly  
                           210                    215                    220  
 Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys  
 225                    230                    235                    240  
  
 Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Pro Glu Cys Arg Glu  
                           245                    250                    255

Met Gly Glu Thr Leu Pro Glu Lys Pro Ala Asn Pro Thr Asn Pro Asp  
 260 265 270  
 Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Leu Leu  
 275 280 285  
 Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln Asn Arg Ile  
 290 295 300

<210> 34

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 34

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp  
 1 5 10 15  
 Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr  
 20 25 30  
 Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu  
 50 55 60  
 Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Ile Pro Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln  
 85 90 95  
 Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr  
 100 105 110  
 Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val  
 115 120 125  
 Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu  
 130 135 140  
 Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu

145                    150                    155                    160  
 Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg  
                          165                    170                    175  
 Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly  
                          180                    185                    190  
 Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys  
                          195                    200                    205  
 Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile  
                          210                    215                    220  
 Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala  
 225                    230                    235                    240  
 Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser

                         245                    250                    255  
 Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met  
                          260                    265                    270  
 Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln Pro Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu  
                          275                    280                    285  
 Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp  
                          290                    295                    300  
 Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn

305                    310                    315                    320  
 Ser Asn Asn

<210> 35

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 35

Met Gly Gly Gly Ala Gly Glu Arg Leu Phe Thr Ser Ser Cys Leu Val  
 1                    5                    10                    15

Gly Leu Val Pro Leu Gly Leu Arg Ile Ser Leu Val Thr Cys Pro Leu  
 20 25 30  
 Gln Cys Gly Ile Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu  
 35 40 45  
 Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val  
 50 55 60  
 Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp  
 85 90 95  
 Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile  
 100 105 110  
 Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn  
 115 120 125  
 Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp  
 130 135 140  
 Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile  
 145 150 155 160  
 His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr  
 165 170 175  
 Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp  
 180 185 190  
 Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys  
 195 200 205  
 Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile  
 210 215 220  
 Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala  
 245 250 255  
 Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser



Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val

165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln

180 185 190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln

195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile

225 230

<210> 37

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 37

atcggggata gagatgtttg ccgcatcgc ggtaccgggc 40

<210> 38

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic

<400> 38

ttatacgaag ttataccggt gcattcttgc ccaatactta 40