



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0055863
(43) 공개일자 2024년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0278 (2024.01)
C07K 16/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7012338(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년11월03일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2023-7002504
원출원일자(국제) 2017년11월03일
심사청구일자 2023년02월17일
(85) 번역문제출일자 2024년04월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/060006
(87) 국제공개번호 WO 2018/128691
국제공개일자 2018년07월12일
(30) 우선권주장
62/417,845 2016년11월04일 미국(US)
62/567,932 2017년10월04일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리
버 로드 777
(72) 발명자
귀 춘광
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로
드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
해리스 페이지스
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로
드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

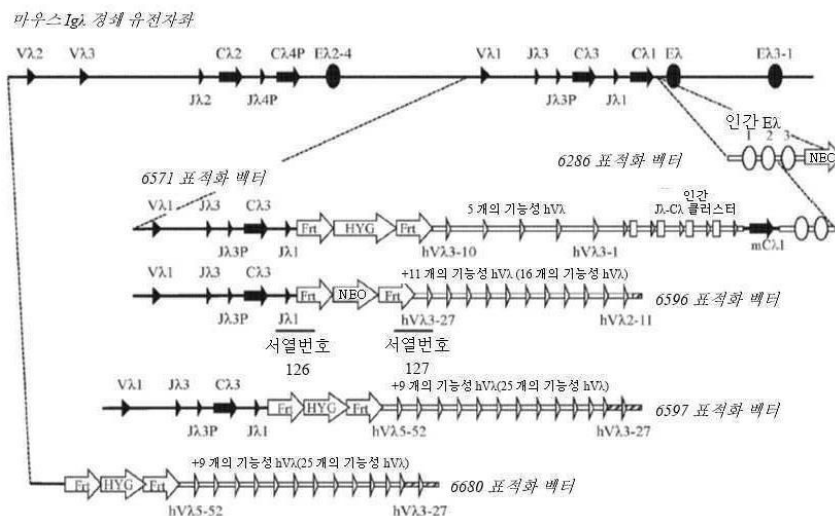
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 조작된 면역글로불린 램다 경쇄 유전자좌를 갖는 비인간 동물

(57) 요약

비인간 동물(및/또는 비인간 세포) 및 이를 만들고 사용하는 방법이 제공되며, 비인간 동물(및/또는 비인간 세포)은 인간 항체 암호화 서열(즉, 면역글로불린 유전자)을 포함하는 게놈을 갖는다. 본원에 기술된 비인간 동물은 인간 Igλ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 함유하는 항체를 발현한다. 특히, 본원에 제공된 비인간 동물은, 일부 구현예에서는, 비인간 동물의 내인성 Igλ 경쇄 유전자좌에 삽입된 인간 Igλ 경쇄 암호화 서열에 의해 암호화되는 인간 Igλ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 함유하는 항체의 발현을 특징으로 한다. 비인간 동물로부터 항체를 생산하는 방법이 또한 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
A01K 2207/15 (2013.01)
A01K 2217/05 (2013.01)
A01K 2217/072 (2013.01)
A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/01 (2013.01)
C07K 2317/14 (2013.01)

(72) 발명자

보로니나 베라

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

맥휘터 존

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

레벤코바 나타샤

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

맥도날드 린

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

투 낙신

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

머피 앤드류 제이.

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 설치류로서, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는:

- (a) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절,
 - (b) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및
 - (c) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하되,
- (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고,

상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: 하나 이상의 설치류 면역 글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$)를 더 포함하는, 설치류.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 설치류 $E\lambda$ 를 포함하는, 설치류.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 2개의 설치류 $E\lambda$ 는 마우스 $E\lambda$ 및 마우스 $E\lambda 3-1$ 인, 설치류.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 인간 $E\lambda$ 를 포함하는, 설치류.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류 계통은

- (i) 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결됨); 또는
- (ii) 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V_H , D_H 및 J_H 상기 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결됨), 및 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 C_K 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 추가로 포함하는, 설치류.

청구항 6

제5항에 있어서, 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절은 설치류 V_H , D_H 유전자 분절을 대체하는, 설치류.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 삽입은 인간 V_H , D_H , 및 J_H 유전자 분절, 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하는, 설치류.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서, 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절의 상기

삽입은 설치류 V_k 및 J_k 유전자 분절을 대체하는, 설치류.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 삽입은 인간 V_k 및 J_k 유전자 분절, 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하는, 설치류.

청구항 10

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역인, 설치류.

청구항 11

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류 C_k 영역은 내인성 설치류 C_k 영역인, 설치류.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내인성 면역글로불린 k 경쇄 유전자좌는 내인성 V_k 및 J_k 유전자 분절의 결실을 전체적으로 또는 부분적으로 포함하는, 설치류.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류 C_k 유전자 분절은 마우스 C_k 유전자 분절인, 설치류.

청구항 14

제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 k 경쇄 유전자좌는 인간 면역글로불린 k 경쇄 유전자좌의 전체 또는 일부의 근위 V_k 복제의 삽입을 포함하는, 설치류.

청구항 15

제5항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 설치류 Adam6 유전자가 결여되어 있는, 설치류.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 더 포함하는, 설치류.

청구항 17

제5항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류는 상기 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 대해 동형접합체인, 설치류.

청구항 18

제5항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류는 상기 내인성 면역글로불린 k 경쇄 유전자좌에 대해 동형접합체인, 설치류.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류는 상기 내인성 면역글로불린 k 경쇄 유전자좌에 대해 동형접합체인, 설치류.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류는 랫트 또는 마우스인, 설치류.

청구항 21

내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 단리된 설치류 세포로서, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는:

- (a) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절,
 - (b) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및
 - (c) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하되,
- (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고,

상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: 하나 이상의 설치류 면역 글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$)를 더 포함하는, 단리된 설치류 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 설치류 세포는 설치류 배아 줄기 세포인, 단리된 설치류 세포.

청구항 23

조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 설치류를 만드는 방법으로서, 상기 방법은

- (a) DNA 단편을 설치류 배아 줄기 세포에 도입하는 단계로서, 상기 DNA 단편은
 - (i) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절,
 - (ii) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및
 - (iii) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하되,
- (i) 내지 (iii)은 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되며,

상기 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$)를 더 포함하는 단계;

- (b) (a) 단계에서 생성된 설치류 배아 줄기 세포를 수득하는 단계; 및
- (c) (b) 단계의 상기 설치류 배아 줄기 세포를 사용해 설치류를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 설치류를 만드는 방법으로서(상기 조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절의 삽입을 포함하고, 상기 인간 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절은 설치류 또는 인간 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$)를 더 포함함), 상기 방법은

설치류의 상기 생식선 계놈이 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 이를 변형시켜(인간 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절은 설치류 또는 인간 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$)를 더 포함함) 상기 설치류를 만드는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절은 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및/또는 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$ 을 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절은 인간 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및/또는 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 상기 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절은 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3, J λ 6-C λ 6 및 상기 인간 J λ 유전자 분절을 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6은 인간 J λ 와 C λ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 상기 인간 J λ 유전자 분절은 인간 J λ 의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하는, 방법.

청구항 29

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류 C λ 유전자 분절은 마우스 C λ 유전자 분절인, 방법.

청구항 30

제23항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 인간 E λ 를 포함하는, 방법.

청구항 31

제23항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 설치류 E λ 를 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 2개의 설치류 E λ 는 마우스 E λ 및 마우스 E λ 3-1인, 방법.

청구항 33

설치류에서 항체를 생산하는 방법으로, 상기 방법은

(a) 설치류를 관심 항원으로 면역화하는 단계로서, 상기 설치류는 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계통을 가지고, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는

- (i) 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절,
- (ii) 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절, 및
- (iii) 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절을 포함하되,

(i) 및 (ii)는 (iii) 및 설치류 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고,

상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ)를 추가로 포함하는 단계;

(b) 상기 설치류가 상기 관심 항원에 대한 면역 반응을 생성하기에 충분한 조건 하에서 상기 설치류를 유지시키는 단계; 및

(c) 상기 관심 항원에 결합하는 항체를 상기 설치류, 또는 설치류 세포로부터 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제23항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 설치류는 랫트 또는 마우스인, 방법.

청구항 35

동형접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계통을 가진 설치류로서, 상기 동형접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는:

- (i) 인간 V λ 유전자 분절 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및 V λ 3-27 내지 V λ 3-1,

(ii) 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6,

(iii) 인간 J λ 유전자 분절 J λ 7, 및

(iv) 3개의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서를 포함하되,

(i) 내지 (iv)는 작동 가능하게 서로 연결되고, (i) 내지 (iii)은 설치류 C λ 유전자 분절의 상류에 있고, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 면역글로불린 E λ 2-4가 결여되어 있고,

상기 인간 V λ 유전자 분절 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및 V λ 3-27 내지 V λ 3-1은 상기 인간 V λ 유전자 분절들 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 상기 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6은 상기 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하며,

상기 인간 J λ 유전자 분절 J λ 7은 인간 J λ 7의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하는, 설치류.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 설치류는 랫트 또는 마우스인, 설치류.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2016년 11월 4일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/417,845호 및 2017년 10월 10일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/567,932호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배경 기술

[0003] 인간 항체는 가장 급속히 성장하는 부류의 치료법이다. 이들의 생산에 현재 사용되는 기술 중에서, 인간 항체를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 유전 물질로 조작된 유전자 이식 동물(예를 들어, 설치류)의 개발은 다양한 질환의 치료를 위한 인간 치료용 단클론 항체 분야에 혁신을 일으켰다. 숙주 유전자 이식 동물에서 인간 항체 레파토리를 극대화하는 인간 단클론 항체를 생성하기 위한 개선된 생체 내 시스템이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0004] 특정 양태에서, 인간에게 영향을 미치는 다양한 질환의 치료에 사용할 수 있는 새로운 항체 및 항체 기반 치료제를 동정하고 개발하기 위한 개선된 생체 내 시스템이 본원에 제공된다. 본원에 개시된 바와 같이, 특정 구현예에서 본원에 제공된 비인간 동물(예: 설치류)로서, 조작된 면역글로불린 유전자좌, 특히 조작된 면역글로불린(Ig) λ 경쇄 유전자좌를 갖는 비인간 동물 및/또는 인간 V λ 영역을 갖는 경쇄를 특징으로 하는 항체 레파토리를 달리 발현하거나, 생산하거나, 함유하는 비인간 동물은 가령 새로운 항체 기반 치료제를 식별하고 개발함에 있어서 인간 V λ 서열의 다양성을 활용하는 데 유용하다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 비인간 동물은 인간에게 투여하기 위한 항체 및/또는 항체 기반 치료제의 개발을 위한 개선된 생체 내 시스템을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 비인간 동물은 인간 V λ 영역 서열을 함유하는 기존의 생체 내 시스템으로부터 수득한 항체 및/또는 항체 기반 치료제와 비교해 개선된 성능을 특징으로 하는 인간 V λ 도메인을 함유하는 항체 및/또는 항체 기반 치료제의 개발을 위한 개선된 생체 내 시스템을 제공한다.

[0005] 특정 구현예에서, 조작된 면역글로불린 가변 및 불변 영역을 함유하고; 일부 구현예에서는 조작된 조절 영역(또는 서열)을 더 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 갖는 비인간 동물이 본원에 제공된다. 본원에 기술된 바와 같이, 특정 구현예에서, 제공된 비인간 동물은, 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 C λ 영역 유전자 및 설치류 C λ 영역 유전자가 존재하는 것을 특징으로 하는 조작된 Ig λ 경쇄 가변 영역을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 그들의 생식선 계통 내에 함유하는데, 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 분절들은 작동 가능하게 서로 연결되고 상기 설치류 C λ 영역 유전자에 작동 가능하게 연결된다.

[0006] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어

도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개 또는 적어도 25개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0007] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 5 내지 25개, 5 내지 24개, 5 내지 23개, 5 내지 22개, 5 내지 21개, 5 내지 20개, 5 내지 19개, 5 내지 18개, 5 내지 17개, 5 내지 16개, 5 내지 15개, 5 내지 14개, 5 내지 13개, 5 내지 12개, 5 내지 11개, 5 내지 10개, 5 내지 9개, 5 내지 8개, 5 내지 7개, 또는 5 내지 6개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 10 내지 70개, 10 내지 69개, 10 내지 68개, 10 내지 67개, 10 내지 66개, 10 내지 65개, 10 내지 64개, 10 내지 63개, 10 내지 62개, 10 내지 61개, 10 내지 60개, 10 내지 59개, 10 내지 58개, 10 내지 57개, 10 내지 56개, 10 내지 55개, 10 내지 54개, 10 내지 53개, 10 내지 52개, 10 내지 51개, 10 내지 50개, 10 내지 49개, 10 내지 48개, 10 내지 47개, 10 내지 46개, 10 내지 45개, 10 내지 44개, 10 내지 43개, 10 내지 42개, 10 내지 41개, 10 내지 40개, 10 내지 39개, 10 내지 38개, 10 내지 37개, 10 내지 36개, 10 내지 35개, 10 내지 34개, 10 내지 33개, 10 내지 32개, 10 내지 31개, 10 내지 30개, 10 내지 29개, 10 내지 28개, 10 내지 27개, 10 내지 26개, 10 내지 25개, 10 내지 24개, 10 내지 23개, 10 내지 22개, 10 내지 21개, 10 내지 20개, 10 내지 19개, 10 내지 18개, 10 내지 17개, 10 내지 16개, 10 내지 15개, 10 내지 14개, 10 내지 13개, 10 내지 12개, 또는 10 내지 11개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0008] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 6 내지 25개, 7 내지 25개, 8 내지 25개, 9 내지 25개, 10 내지 25개, 11 내지 25개, 12 내지 25개, 13 내지 25개, 14 내지 25개, 15 내지 25개, 16 내지 25개, 17 내지 25개, 18 내지 25개, 19 내지 25개, 20 내지 25, 21 내지 25개, 22 내지 25개, 23 내지 25개, 또는 24 내지 25개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 11 내지 70개, 12 내지 70개, 13 내지 70개, 14 내지 70개, 15 내지 70개, 16 내지 70개, 17 내지 70개, 18 내지 70개, 19 내지 70개, 20 내지 70개, 21 내지 70개, 22 내지 70개, 23 내지 70개, 24 내지 70개, 25 내지 70개, 26 내지 70개, 27 내지 70개, 28 내지 70개, 29 내지 70개, 30 내지 70개, 31 내지 70개, 32 내지 70개, 33 내지 70개, 34 내지 70개, 35 내지 70개, 36 내지 70개, 37 내지 70개, 38 내지 70개, 39 내지 70개, 40 내지 70개, 41 내지 70개, 42 내지 70개, 43 내지 70개, 44 내지 70개, 45 내지 70개, 46 내지 70개, 47 내지 70개, 48 내지 70개, 49 내지 70개, 50 내지 70개, 51 내지 70개, 52 내지 70개, 53 내지 70개, 54 내지 70개, 55 내지 70개, 56 내지 70개, 57 내지 70개, 58 내지 70개, 59 내지 70개, 60 내지 70개, 61 내지 70개, 62 내지 70개, 63 내지 70개, 64 내지 70개, 65 내지 70개, 66 내지 70개, 67 내지 70개, 68 내지 70개, 또는 69 내지 70개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 6 내지 24개, 7 내지 23개, 8 내지 22개, 9 내지 21개, 10 내지 20개, 11 내지 19개, 12 내지 18개, 13 내지 17개, 14 내지 16개, 또는 15 내지 16개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 11 내지 69개, 12 내지 68개, 13 내지 67개, 14 내지 66개, 15 내지 65개, 16 내지 64개, 17 내지 63개, 18 내지 62개, 19 내지 61개, 20 내지 60개, 21 내지 59개, 22 내지 58개, 23 내지 57개, 24 내지 56개, 25 내지 55개, 26 내지 54개, 27 내지 53개, 28 내지 52개, 29 내지 51개, 30 내지 50개, 31 내지 49개, 32 내지 48개, 33 내지 47개, 34 내지 46개, 35 내지 45개, 36 내지 44개, 37 내지 43개, 38 내지 42개, 또는 41 내지 42개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다.

[0010] 특정 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 5개, 16개, 또는 25개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 10개, 27개, 또는 40개의 인간 V λ 유전자 분절을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 구현예에서, 인간 V λ 유전자 분절은 상기 인간 V λ 유전자 분절이 인간 세포의 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 나타남에 따라 연속적인 인간 V λ 유전자 분절을 포함한다.

[0011] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 적어도 5개의 인간 J λ 유전자 분절(예: 5개의 인간 J λ 유전자 분절, 6개의 J λ 유전자 분절, 7개의 J λ 유전자 분절, 8개의 J λ 유전자 분절 등을 포함하되, 이들로 한정되지 않음)을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 적어도 4개의 인간 C λ 영역 유전자(예: 4개의 인간 C λ 영역 유전자, 5개의 C λ 영역 유전자, 6개의 C λ 영역 유전자, 7개의 C λ 영역 유전자, 8개의 C λ 영역 유전자 등을 포함하되, 이들로 한정되지 않음)을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 특정 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 내인성 Ig λ 경쇄 대립유전자에서 적어도 25개의 인간 V λ 유전자 분절, 적어도 5개의 인간 J λ 유전자 분절 및 적어도 4개의 인간 C λ 영역 유전자를 포함하는 Ig λ 경쇄

유전자좌를 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 내인성 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 단 하나의 꺾과(예: 마우스 또는 랫트) C λ 영역 유전자(예: 마우스 C λ 1 영역 유전자 또는 마우스 C λ 1 유전자 분절)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 Ig λ 경쇄 유전자좌는 3개의 서열 요소를 특징으로 하는 인간 E λ 영역(또는 서열)을 더 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 내인성 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 분절을 자연 배열 또는 생식선 배열로 함유한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 내인성 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 V λ , J λ 및 C λ 유전자 분절을 함유하되, 인간 세포 생식선 계능의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌에서 자연적으로 나타나지 않는 구성으로 함유한다.

[0013] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 비암호화 인간 면역글로불린 λ 경쇄 서열이 산재한 (또는 병치되거나 연관된) 복수의 인간 V λ , J λ 및 C λ 암호화 서열을 포함하는 내인성 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 DNA 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 비암호화 비인간(예: 꺾과) 면역글로불린 경쇄 λ 서열이 산재하는 복수의 인간 V λ , J λ 및 C λ 암호화 서열을 포함하는 내인성 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 DNA 서열을 함유한다.

[0014] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 상기 비인간 동물의 생식선 계능에서의 내인성 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌로부터 항체가 발현되는 것을 특징으로 하며, 항체는 인간 V λ 도메인 및 인간 또는 비인간 C λ 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은, 하나 이상의 조작된 기준 비인간 동물 또는 야생형 비인간 동물과 비교해(예를 들어, $\kappa:\lambda$ 의 비율이 95:5이지만, 이에 한정되지 않음) 조작된 면역글로불린 λ 경쇄 유래의 인간 V λ 영역의 사용이 증가한 것(예를 들어, $\kappa:\lambda$ 비율이 60:40)을 특징으로 한다.

[0015] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 계능을 가진 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직이 제공되는데, 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 분절은 비인간 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 비인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ)를 더 포함한다.

[0016] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계능을 갖는 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직이 제공되며, 상기 경쇄 유전자좌는: (a) 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절을 포함하되, (a)와 (b)는 (c) 및 비인간 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: 하나 이상의 비인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ)를 더 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 인간 E λ 를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 서열 요소가 존재하는 것을 특징으로 하는 하나의 인간 E λ 를 더 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 모듈 방식으로 작용하는(또는 기능하는) 3개의 서열 요소가 존재하는 것을 특징으로 하는 하나의 인간 E λ 를 더 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 비인간 E λ 를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 설치류 E λ 를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 마우스 E λ 를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 마우스 E λ 및 마우스 E λ 3-1을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 마우스 E λ 2-4를 함유하지 않는다 (또는 결여되어 있다). 일부 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 랫트 E λ 를 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 V λ 및 J λ 유전자 분절의 결실을 전체적으로 또는 부분적으로 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2 유전자 분절 및 V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1 유전자 분절의 결실을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4P-C λ 4P 유전자 분절 및 V λ 1-J λ 3-J λ 3P-C λ 3-J λ 1 유전자 분절의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 비인간 E λ 2-4의 결실을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 V λ 2, V λ 3, J λ 2, C λ 2, J λ 4P, C λ 4P, E λ 2-4, V λ 1, J λ 3, J λ 3P, C λ 3 및 J λ 1의 결실을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 존재하는 유일한 비인간 유전자 분절 또는 서열 요소로서 C λ 1, E λ 및 E λ 3-1을 포함한다.

- [0020] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 $V\lambda 4-69$ 내지 $V\lambda 3-1$, 적어도 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$, $J\lambda 6-C\lambda 6$, 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$ 및 설치류 $C\lambda 1$ 유전자 분절의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 3-1$, 적어도 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$, $J\lambda 6-C\lambda 6$, 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$ 및 설치류 $C\lambda 1$ 유전자 분절의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$, 적어도 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$, $J\lambda 6-C\lambda 6$, 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$ 및 설치류 $C\lambda 1$ 유전자 분절의 삽입을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 삽입은 인간 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$ 및 $J\lambda 6-C\lambda 6$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$ 의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0021] 일부 구현예에서, 비인간 $C\lambda$ 유전자 분절은 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절은 쥐과(예를 들어, 마우스 또는 랫트) $C\lambda$ 유전자 분절이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절은 랫트 $C\lambda$ 유전자 분절이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절은 마우스 $C\lambda$ 유전자 분절이거나 이를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절은 마우스 $C\lambda 1$ 유전자 분절이거나 이를 포함한다.
- [0022] 일부 구현예에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자(또는 유전자 분절)는 마우스 $C\lambda 1$, 마우스 $C\lambda 2$ 및 마우스 $C\lambda 3$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된 마우스 $C\lambda$ 유전자와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일하거나 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자는 마우스 $C\lambda 1$, 마우스 $C\lambda 2$ 및 마우스 $C\lambda 3$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된 마우스 $C\lambda$ 유전자와 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 마우스 $C\lambda 1$ 유전자는 서열번호 1이거나 이를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 마우스 $C\lambda 2$ 유전자는 서열번호 3이거나 이를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 마우스 $C\lambda 3$ 유전자는 서열번호 5이거나 이를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자는 마우스 $C\lambda 1$ 유전자와 동일한 서열을 포함한다.
- [0023] 일부 구현예에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자(또는 유전자 분절)는 마우스 $C\lambda 1$, 마우스 $C\lambda 2$ 및 마우스 $C\lambda 3$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된 마우스 $C\lambda$ 유전자와 50% 내지 100%, 55% 내지 100%, 60% 내지 100%, 65% 내지 100%, 70% 내지 100%, 75% 내지 100%, 80% 내지 100%, 85% 내지 100%, 90% 내지 100%, 95% 내지 100%, 또는 98% 내지 100% 동일한 서열을 포함한다.
- [0024] 일부 구현예에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자(또는 유전자 분절)는 마우스 $C\lambda 1$, 마우스 $C\lambda 2$ 및 마우스 $C\lambda 3$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된 마우스 $C\lambda$ 유전자와 50% 내지 98%, 50% 내지 95%, 50% 내지 90%, 50% 내지 85%, 50% 내지 80%, 50% 내지 75%, 50% 내지 70%, 50% 내지 65%, 50% 내지 60%, 또는 50% 내지 55% 동일한 서열을 포함한다.
- [0025] 일부 구현예에서, 마우스 $C\lambda$ 유전자(또는 유전자 분절)는 마우스 $C\lambda 1$, 마우스 $C\lambda 2$ 및 마우스 $C\lambda 3$ 으로 이루어진 군으로부터 선택된 마우스 $C\lambda$ 유전자와 55% 내지 98%, 60% 내지 95%, 65% 내지 90%, 70% 내지 85%, 또는 75% 내지 80% 동일한 서열을 포함한다.
- [0026] 일부 구현예에서, 랫트 $C\lambda$ 유전자(또는 유전자 분절)는 랫트 $C\lambda 1$, 랫트 $C\lambda 2$, 랫트 $C\lambda 3$, 및 랫트 $C\lambda 4$ 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 랫트 $C\lambda$ 유전자와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 동일하거나 100% 동일한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 랫트 $C\lambda$ 유전자는 랫트 $C\lambda 1$, 랫트 $C\lambda 2$, 랫트 $C\lambda 3$ 및 랫트 $C\lambda 4$ 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 랫트 $C\lambda$ 유전자와 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 랫트 $C\lambda 1$ 유전자는 서열번호 7이거나 이를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 랫트 $C\lambda 2$ 유전자는 서열번호 9이거나 이를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 랫트 $C\lambda 3$ 유전자는 서열번호 11이거나 이를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 랫트 $C\lambda 4$ 유전자는 서열번호 13이거나 이를 포함한다.
- [0027] 일부 구현예에서, 랫트 $C\lambda$ 유전자(또는 유전자 분절)는 랫트 $C\lambda 1$, 랫트 $C\lambda 2$, 랫트 $C\lambda 3$ 및 랫트 $C\lambda 4$ 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 랫트 $C\lambda$ 유전자와 50% 내지 100%, 55% 내지 100%, 60% 내지 100%, 65% 내지 100%, 70% 내지 100%, 75% 내지 100%, 80% 내지 100%, 85% 내지 100%, 90% 내지 100%, 95% 내지 100%, 또는

98% 내지 100% 동일한 서열을 포함한다.

- [0028] 일부 구현예에서, 랫트 C λ 유전자(또는 유전자 분절)는 랫트 C λ 1, 랫트 C λ 2, 랫트 C λ 3 및 랫트 C λ 4 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 랫트 C λ 유전자와 50% 내지 98%, 50% 내지 95%, 50% 내지 90%, 50% 내지 85%, 50% 내지 80%, 50% 내지 75%, 50% 내지 70%, 50% 내지 65%, 50% 내지 60%, 또는 50% 내지 55% 동일한 서열을 포함한다.
- [0029] 일부 구현예에서, 랫트 C λ 유전자(또는 유전자 분절)는 랫트 C λ 1, 랫트 C λ 2, 랫트 C λ 3 및 랫트 C λ 4 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 랫트 C λ 유전자와 55% 내지 98%, 60% 내지 95%, 65% 내지 90%, 70% 내지 85%, 또는 75% 내지 80% 동일한 서열을 포함한다.
- [0030] 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 일부 구현예에서, 상기 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 생식선 계통은 (i) 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌로(인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨); 또는 (ii) 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨), 및 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_K$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(인간 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절은 비인간 면역 글로불린 C $_K$ 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 더 포함한다.
- [0031] 일부 구현예에서, 삽입된 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절은 비인간 V $_H$, D $_H$ 유전자 분절을 대체한다. 특정 구현예에서, 삽입은 인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 분절 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 내인성 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 V $_H$ 3-74에서 V $_H$ 6-1까지의 인간 V $_H$ 유전자 분절, D $_H$ 1-1에서 D $_H$ 7-27까지의 인간 D $_H$ 유전자 분절, 및 인간 J $_H$ 유전자 분절 J $_H$ 1-J $_H$ 6의 삽입을 포함한다. 특정 구현예에서, 삽입은 인간 V $_H$ 3-74 내지 V $_H$ 6-1 사이에서 자연적으로 나타나는 (발생하는) 인간 비암호화 DNA, 인간 D $_H$ 1-1 내지 D $_H$ 7-27 사이에서 자연적으로 나타나는 (발생하는) 인간 비암호화 DNA, 및 J $_H$ 1-J $_H$ 6 사이에서 자연적으로 나타나는 (발생하는) 인간 비암호화 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 모든 기능성 인간 V $_H$ 유전자 분절, 모든 기능성 인간 D $_H$ 유전자 분절, 및 모든 기능성 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입을 포함한다.
- [0032] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 비인간 Adam6 유전자가 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 비인간 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열의 삽입을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열은 제1 및 제2 인간 V $_H$ 유전자 분절 사이에 삽입된다. 일부 구현예에서, 제1 인간 V $_H$ 유전자 분절은 인간 V $_H$ 1-2이고 제2 인간 V $_H$ 유전자 분절은 인간 V $_H$ 6-1이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열은 인간 V $_H$ 유전자 분절 및 인간 D $_H$ 유전자 분절 사이에 삽입된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열은 인간 Adam6 유사 유전자(pseudogene)의 자리에 삽입된다.
- [0033] 일부 구현예에서, 삽입된 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_K$ 유전자 분절은 비인간 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절을 대체한다. 일부 특정 구현예에서, 삽입은 인간 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 비인간 면역글로불린 C $_K$ 영역은 내인성 비인간 C $_K$ 영역이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌는 인간 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌의 근위 V $_K$ 중복의 전부 또는 일부의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌는 V $_K$ 2-40에서 V $_K$ 4-1까지의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 인간 J $_K$ 유전자 분절 J $_K$ 1-J $_K$ 5의 삽입을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 삽입은 인간 V $_K$ 2-40 내지 V $_K$ 4-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 J $_K$ 1-J $_K$ 5 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0034] 본원에 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 일부 구현예에서, 비인간 동물, 비인간 세포 또는

비인간 조직은 본원에 기술된 면역글로불린 중쇄 유전자좌(예: 본원에 기술된 바와 같은 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌)에 대해 이형접합체이거나 동형접합체이다.

- [0035] 본원에 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 일부 구현예에서, 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 본원에 기술된 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(예: 본원에 기술된 바와 같은 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌)에 대해 이형접합체이거나 동형접합체이다.
- [0036] 본원에 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 일부 구현예에서, 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 본원에 기술된 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌(예: 본원에 기술된 바와 같은 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌)에 대해 이형접합체이거나 동형접합체이다.
- [0037] 본원에 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 일부 구현예에서, 상기 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 생식선 계놈은 하나 이상의 비인간 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 추가로 포함하며, 동물은 상기 삽입에 대해 이형접합체이거나 동형접합체이다.
- [0038] 일부 구현예에서, 비인간 세포는 림프구이다. 일부 구현예에서, 비인간 세포는 B 세포, 수지상 세포, 대식 세포, 단핵구 및 T 세포로부터 선택된다.
- [0039] 일부 구현예에서, 비인간 세포는 비인간 배아 줄기(ES) 세포이다. 일부 구현예에서, 비인간 ES 세포는 설치류 ES 세포이다. 일부 특정 구현예에서, 설치류 ES 세포는 (예를 들어, 129 계통, C57BL 계통 또는 이의 혼합체 유래의) 마우스 ES 세포이다. 일부 특정 구현예에서, 설치류 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고, 129 계통 및 C57BL 계통의 혼합체이다. 일부 특정 구현예에서, 설치류 배아 줄기 세포는 마우스 배아 줄기 세포이고, 129 계통, C57BL 계통 및 BALB/c 계통의 혼합체이다.
- [0040] 일부 구현예에서, 비인간 동물을 만들기 위한, 본원에 기술된 비인간 ES 세포의 용도가 제공된다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 ES 세포는 마우스 ES 세포이며 본원에 기술된 바와 같은 조작된 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 마우스를 만드는 데 사용된다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 ES 세포는 랫트 ES 세포이며 본원에 기술된 바와 같은 조작된 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 랫트를 만드는 데 사용된다.
- [0041] 일부 구현예에서, 비인간 조직은 지방, 방광, 뇌, 유방, 골수, 안구, 심장, 장, 신장, 간, 폐, 림프절, 근육, 췌장, 혈장, 혈청, 피부, 비장, 위, 흉선, 고환, 난자, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0042] 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 단리된 비인간 세포 또는 조직으로부터 만들어지거나, 생성되거나, 생산되거나, 수득된 불멸화 세포가 제공된다.
- [0043] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 ES 세포로부터 만들어지거나, 생산되거나, 수득된 비인간 배아가 제공된다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 배아는 설치류 배아이고; 일부 구현예에서는, 마우스 배아이며; 일부 구현예에서는, 랫트 배아이다.
- [0044] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물, 단리된 비인간 세포 또는 조직, 불멸화 세포, 비인간 ES 세포, 또는 비인간 배아를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0045] 일부 구현예에서, 치료 또는 진단을 위한 약물(예: 항체 또는 이의 단편)의 제조 및/또는 개발에 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 키트가 제공된다.
- [0046] 일부 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태의 치료, 예방 또는 완화를 위한 약물(예: 항체 또는 이의 단편)의 제조 및/또는 개발에 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 키트가 제공된다.
- [0047] 일부 구현예에서, 조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 비인간 동물을 만드는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 비인간 배아 줄기 세포 내로 DNA 단편을 도입하는 단계; (b) (a) 단계에서 생성된 비인간 배아 줄기 세포를 수득하는 단계; 및 (c) (b) 단계의 비인간 배아 줄기 세포를 사용해 비인간 동물을 생성하는 단계를 포함하며, 상기 DNA 단편은 (i) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, (ii) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및 (iii) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하며, (i) 내지 (iii)은 비인간 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서($E\lambda$)를 추가로 포함한다.
- [0048] 일부 구현예에서, 조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 비인간 동물을 만드는 방법이 제공되는데(조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하고, 인간 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자

분절은 비인간 및/또는 인간 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되며, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 비인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ)를 추가로 포함함), 상기 방법은 비인간 동물의 생식선 계놈이 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 조작된 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 이를 변형시켜 상기 비인간 동물을 만드는 단계를 포함한다(인간 V λ 및 J λ 유전자 분절은 비인간 및/또는 인간 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ)를 추가로 포함함).

[0049] 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절은 V λ 4-69 내지 V λ 3-1, V λ 5-52 내지 V λ 3-1 또는 V λ 3-27 내지 V λ 3-1을 포함한다. 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절은 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및/또는 V λ 3-27 내지 V λ 3-1을 포함한다. 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 특정 구현예에서, 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절은 인간 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및/또는 V λ 3-27 내지 V λ 3-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다. 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절은 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3, J λ 6-C λ 6 및 인간 J λ 7 유전자 분절을 포함한다. 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 특정 구현예에서, 인간 J λ -C λ 유전자 분절 쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6은 인간 J λ 및 C λ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 인간 J λ 7 유전자 분절은 인간 J λ 7.의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0050] 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 특정 구현예에서, 인간 V λ 유전자 분절 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및 V λ 3-27 내지 V λ 3-1의 삽입은 인간 V λ 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6의 삽입은 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하며, 인간 J λ 7 유전자 분절의 삽입은 인간 J λ 7.의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0051] 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, 비인간 C λ 유전자 분절은 설치류 C λ 유전자 분절이고; 일부 특정 구현예에서는 마우스 C λ 1 유전자 분절이다.

[0052] 본원에 제공된 비인간 동물을 제조하는 방법의 일부 구현예에서, DNA 단편은 하나 이상의 선별 마커를 더 포함한다. 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, DNA 단편은 하나 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 더 포함한다. 본원에 제공된 비인간 동물을 제조하는 방법의 일부 특정 구현예에서, DNA 단편은 동일한 재조합 효소와 재조합되는 한 세트 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 더 포함한다. 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 특정 구현예에서, DNA 단편은 상이한 재조합 효소와 재조합되는 한 세트 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 더 포함한다.

[0053] 본원에 제공된 비인간 동물을 제조하는 방법의 일부 구현예에서, DNA 단편은 (i) 하나 이상의 인간 V μ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D μ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J μ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V μ , D μ 및 J μ 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨); 또는 (ii) 하나 이상의 인간 V μ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D μ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J μ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V μ , D μ 및 J μ 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨), 및 하나 이상의 인간 V κ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J κ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(인간 V κ 및 J κ 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 C κ 에 작동가능하게 연결됨)를 포함하는 생식선 계놈을 가진 비인간 배아 줄기 세포 내로 도입된다.

[0054] 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, DNA 단편은 (i) 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌; 또는 (ii) 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 야생형 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 비인간 배아 줄기 세포 내로 도입되며, 상기 방법은 상기 비인간 배아 줄기 세포로부터 만들어지거나, 생성되거나, 생산되거나, 수득된 마우스를 제2 마우스와 교배시키는 단계를 더 포함한다.

[0055] 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, 조작된 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하

도록 비인간 동물의 생식선 계놈을 변형시키는 단계는 비인간 배아 줄기 세포에서 수행되며, 상기 비인간 배아 줄기 세포의 생식선 계놈은 (i) 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨); 또는 (ii) 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨), 및 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 비인간 면역글로불린 C_K 영역에 작동가능하게 연결됨)를 추가로 포함한다.

[0056] 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 특정 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입은 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 하나 이상의 J_H 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다. 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 특정 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절의 삽입은 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0057] 본원에 제공된 비인간 동물을 만드는 방법의 일부 구현예에서, 조작된 면역 글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 비인간 동물의 생식선 계놈을 변형시키는 단계는 비인간 동물 배아 줄기 세포에서 수행되며, 상기 비인간 동물 배아 줄기 세포의 생식선 계놈은 (i) 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌; 또는 (ii) 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 야생형 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함하며, 상기 방법은 상기 비인간 배아 줄기 세포로부터 만들어지거나, 생성되거나, 생산되거나, 또는 수득된 마우스를 제2 마우스와 교배시키는 단계를 더 포함한다.

[0058] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 마우스는 야생형 IgH 및 Ig κ 유전자좌, 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 및 Ig κ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가지되, 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열, 또는 (Adam6 암호화 서열의 삽입이 있거나 없는) 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 유전자좌 및 동형접합성 또는 이형접합성 불활성화 Ig κ 유전자좌를 함유한다.

[0059] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 방법에 의해 만들어지거나, 생성되거나, 생산되거나, 수득되거나 수득될 수 있는 비인간 동물이 제공된다.

[0060] 일부 구현예에서, 비인간 동물에서 항체를 생산하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물을 관심 항원으로 면역화하는 단계, (b) 설치류가 관심 항원에 대한 면역 반응을 생성하는 데 충분한 조건 하에서 비인간 동물을 유지시키는 단계, 및 (c) 관심 항원에 결합하는 비인간 동물, 또는 비인간 세포로부터 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 램다 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0061] 일부 구현예에서, 비인간 동물에서 인간 램다 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산을 생산하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물을 면역화하는 단계, (b) 설치류가 관심 항원에 대한 면역 반응을 생성하는 데 충분한 조건 하에서 비인간 동물을 유지시키는 단계, 및 (c) 비인간 동물, 또는 비인간 세포로부터 인간 램다 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산을 회수하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 비인간 동물, 또는 비인간 세포로부터 인간 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 핵산을 회수하는 단계를 더 포함한다.

[0062] 비인간 동물에서 항체를 생산하는 방법의 일부 구현예에서, 비인간 세포는 B 세포이다. 비인간 동물에서 항체를 생산하는 방법의 일부 구현예에서, 비인간 세포는 하이브리도마(hybridoma)이다.

[0063] 비인간 동물에서 항체를 생산하는 방법의 일부 구현예에서, 설치류 또는 설치류 세포로부터 회수되고 관심 항원에 결합하는 항체는 인간 중쇄 가변 도메인 및 인간 램다 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0064] 비인간 동물에서 항체 또는 핵산을 생산하는 방법의 일부 구현예에서, 인간 중쇄 가변 도메인은 V_H3-74 , V_H3-73 ,

V_H3-72, V_H2-70, V_H1-69, V_H3-66, V_H3-64, V_H4-61, V_H4-59, V_H1-58, V_H3-53, V_H5-51, V_H3-49, V_H3-48, V_H1-46, V_H1-45, V_H3-43, V_H4-39, V_H4-34, V_H3-33, V_H4-31, V_H3-30, V_H4-28, V_H2-26, V_H1-24, V_H3-23, V_H3-21, V_H3-20, V_H1-18, V_H3-15, V_H3-13, V_H3-11, V_H3-9, V_H1-8, V_H3-7, V_H2-5, V_H7-4-1, V_H4-4, V_H1-3, V_H1-2 및 V_H6-1로 이루어진 군으로부터 선택된 재배열된 인간 V_H 유전자 분절을 포함한다.

[0065] 비인간 동물에서 항체 또는 핵산을 생산하는 방법의 일부 구현예에서, 인간 람다 경쇄 가변 도메인은 V_L4-69, V_L8-61, V_L4-60, V_L6-57, V_L10-54, V_L5-52, V_L1-51, V_L9-49, V_L1-47, V_L7-46, V_L5-45, V_L1-44, V_L7-43, V_L1-40, V_L5-39, V_L5-37, V_L1-36, V_L3-27, V_L3-25, V_L2-23, V_L3-22, V_L3-21, V_L3-19, V_L2-18, V_L3-16, V_L2-14, V_L3-12, V_L2-11, V_L3-10, V_L3-9, V_L2-8, V_L4-3 및 V_L3-1로 이루어진 군으로부터 선택된 재배열된 인간 V_L 유전자 분절을 포함한다.

[0066] 일부 구현예에서, 비인간 동물에서 항원 특이적 면역 반응을 유도하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물을 관심 항원으로 면역화하는 단계, (b) 설치류가 관심 항원에 대한 면역 반응을 생성하는 데 충분한 조건 하에서 비인간 동물을 유지시키는 단계를 포함한다.

[0067] 일부 구현예에서, 동형접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계통을 가진 비인간 동물이 제공되며, 상기 동형 접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 (i) 인간 V_L 유전자 분절 V_L4-69 내지 V_L3-1, V_L5-52 내지 V_L3-1, V_L3-27 내지 V_L3-1, 또는 V_L5-52 내지 V_L1-40, V_L3-27 내지 V_L3-1, (ii) 인간 J_L-C_L 유전자 분절쌍 J_L1-C_L1, J_L2-C_L2, J_L3-C_L3 및 J_L6-C_L6, (iii) 인간 J_L 유전자 분절 J_L7, 및 (iv) 3개의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(또는 3개의 서열 요소를 갖는 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서의 삽입을 포함하되; (i) 내지 (iv)는 작동 가능하게 서로 연결되고, 상기 삽입은 비인간 C_L 유전자 분절의 상류에 있으며, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 비인간 면역글로불린 E_L2-4가 결합되어 있다.

[0068] 일부 구현예에서, 동형접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계통을 가진 비인간 동물이 제공되며, 상기 동형접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: (i) 인간 V_L 유전자 분절 V_L5-52 내지 V_L1-40 및 V_L3-27 내지 V_L3-1, (ii) 인간 J_L-C_L 유전자 분절쌍 J_L1-C_L1, J_L2-C_L2, J_L3-C_L3 및 J_L6-C_L6, (iii) 인간 J_L 유전자 절편 J_L7, 및 (iv) 3개의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(또는 3개의 서열 요소를 갖는 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서)를 포함하되, (i) 내지 (iv)는 작동가능하게 서로 연결되고 (i) 내지 (iii)은 비인간 C_L 유전자 분절의 상류(또는 5')에 있고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 비인간 면역글로불린 E_L2-4가 결합되어 있고, 인간 V_L 유전자 분절 V_L5-52 내지 V_L1-40 및 V_L3-27 내지 V_L3-1은 인간 V_L 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 인간 J_L-C_L 유전자 분절쌍 J_L1-C_L1, J_L2-C_L2, J_L3-C_L3 및 J_L6-C_L6은 인간 J_L-C_L 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하며, 인간 J_L 유전자 분절 J_L7은 인간 J_L7의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0069] 제공된 비인간 동물의 일부 특정 구현예에서, 비인간 C_L 유전자(또는 유전자 분절)는 마우스 C_L1 유전자(또는 유전자 분절)이다. 제공된 비인간 동물의 일부 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 비인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서 E_L 및 E_L3-1을 추가로 포함한다. 제공된 비인간 동물의 일부 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 비인간 V_L2-V_L3-J_L2-C_L2-J_L4P-C_L4P 유전자 분절 및 V_L1-J_L3-J_L3P-C_L3-J_L1 유전자 분절의 결실을 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 치료 또는 진단을 위한 약물(예: 항체 또는 이의 단편)의 제조 및/또는 개발에 사용되도록 제공된다.

[0071] 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 질환, 장애 또는 병태의 치료, 예방 또는 완화를 위한 약제(medicament)의 제조에 사용되도록 제공한다.

[0072] 일부 구현예에서, 의료용으로 사용하기 위한 약물 또는 백신의 제조 및/또는 개발에 있어서 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직의 용도, 예컨대 약제로서의 용도가 제공된다.

[0073] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 단편의 제조 및/또는 개발에 있어서 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물 또는 세포의 용도가 제공된다.

[0074] 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 설치류, 설치류 세포 또는 설치류 조직이고; 일부 구현예에서는 마우스, 마우스 세포 또는 마우스 조직이며; 일부 구현예

에서는 랫트, 랫트 세포 또는 랫트 조직이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 마우스, 마우스 세포 또는 마우스 조직은 129 계통, BALB/c 계통, C57BL/6 계통, 혼합된 129Xc57BL/6 계통 또는 이들의 조합을 포함하는 유전적 배경을 포함한다.

[0075] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약(*about*)" 및 "대략(*approximately*)"은 동등하게 사용된다. 본 출원에서 사용된 임의의 수치는 약/대략의 유무와 상관없이, 당업자가 인식하는 임의의 정상적인 변동을 포함하는 것으로 간주된다.

도면의 간단한 설명

[0076] 다음의 도면들로 구성된 본원에 포함된 도면은 단지 예시를 위한 것이며 한정하기 위한 것이 아니다.

도 1은, 서로 작동 가능하게 연결되고 설치류 C λ 영역(또는 설치류 C λ 유전자)에 작동 가능하게 연결되는 복수의 인간 V λ , J λ 및 C λ 암호화 서열의 존재를 특징으로 하는 설치류에서 조작된 내인성 Ig λ 경쇄 유전자좌를 작제하기 위한 예시적인 전략에 대한 개략도를 도시하되, 축척에 비례하지는 않는다. 도시된 바와 같이, 5개의 분리된 표적화 벡터(6286, 6571, 6596, 6597 및 6680)가 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌 유래의 다양한 양의 유전 물질과 함께 도시되어 있으며, 이들은 내인성 설치류(예: 마우스) Ig λ 경쇄 유전자좌(상부에 도시됨) 내에 순차적으로 삽입된다. 제1 표적화 벡터(6286)를 설치류 C λ 1 영역의 하류에 삽입하고, 3개의 서열 요소를 특징으로 하는 모듈형 인간 Ig λ 인핸서(E λ) 영역(또는 서열)을 포함하도록 작제하였다. 제2 표적화 벡터(6571)를 설치류 C λ 1 영역의 상류에 삽입하고, 5개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절, 4개의 기능성 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 및 인간 J λ 7 유전자 분절(인간 J λ 1-C λ 1-J λ 2-C λ 2-J λ 3-C λ 3-J λ 4-C λ 4-J λ 5-C λ 5-J λ 6-C λ 6-J λ 7)을 함유하도록 조작하였다. 제3(6596) 및 제4(6597) 표적화 벡터는, 제1 표적화 벡터의 성공적인 표적화 이후에 내인성 마우스 Ig λ 경쇄 유전자좌의 총 인간 V λ 유전자 분절 함량에 순차적으로 추가되는 추가 세트의 추가적인 인간 V λ 유전자 분절(각각 11개 및 9개)을 포함하였다. 양 표적화 벡터는, 내인성 마우스 Ig λ 경쇄 유전자좌 내에 통합되었을 때 이전 표적화 벡터의 5' 말단과의 상동성 재조합을 용이하게 하기 위해 중첩 영역(줄무늬 사각형)을 3' 단부 상에 포함하였다. 대안적인 제5 표적화 벡터(6680)는, 본 대안적인 표적화 벡터가 설치류 V λ 2 유전자 분절의 서열 5'(또는 상류)과 동일한 서열을 갖는 5' 상동 아암을 포함한 것을 제외하고는 6597 표적화 벡터와 동일한 유전 물질을 갖는 것으로 나타나므로, 내인성 V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4P-C λ 4P-E λ 2-4-V λ 1-J λ 3-J λ 3P-C λ 3-J λ 1 유전자 분절이 표적화 벡터와 상동성 재조합될 때 이의 결실을 용이하게 한다. 달리 명시하지 않는 한, 폐쇄 심볼은 설치류 유전자 분절 및/또는 서열을 나타내는 반면, 개방 심볼은 인간 유전자 분절 및/또는 서열을 나타낸다. 선별 카세트(HYG: 유비퀴틴 프로모터에 의해 전사 조절되는 히그로마이신 내성 유전자 [HYG]^R); NEO: 유비퀴틴 프로모터에 의해 전사 조절되는 네오마이신 내성 유전자 [NEO]^R)의 측면에 위치하는 부위 특이적 재조합 인식 부위(예를 들어, λ oxP, Frt)도 도시되어 있다. 선별된 뉴클레오타이드 접합 위치는 각각의 접합부 아래에 선으로 표기되어 있고, 서열번호가 각각 표시되어 있다.

도 2는 실시예 1에서 기술된 표적화 벡터의 순차적 삽입 이후의 예시적인 설치류 Ig λ 경쇄 대립유전자의 개략도를 도시하되, 축척에 비례하지는 않는다. 6597 대립유전자: 25개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절, 4개의 기능성 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 및 설치류 C λ 영역(예: 마우스 C λ 1 영역)에 작동 가능하게 연결된 인간 J λ 7 유전자 분절을 함유하는 Ig λ 경쇄 대립유전자이며, Ig λ 경쇄 유전자좌는 내인성 V λ -J λ -C λ 유전자 분절, 3개의 (즉, E2.4, E 및 E3.1) 내인성 Ig λ 인핸서 영역(또는 서열), 및 3개의 서열 요소를 특징으로 하는 모듈형 인간 Ig λ 인핸서 영역(또는 서열)을 추가로 포함한다. 6680 대립유전자: 내인성 V λ J λ -C λ 유전자 분절 및 Ig λ 인핸서 E λ 2-4의 부위 특이적 결실 후의 Ig λ 경쇄 대립 유전자이며, Ig λ 경쇄 대립유전자는 25개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절, 4개의 기능적 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍, 및 설치류 C λ 영역(예: 마우스 C λ 1 영역)에 작동 가능하게 연결된 인간 J λ 7 유전자 분절을 함유하고, Ig λ 경쇄 유전자좌는 2개의 (즉, E 및 E3.1) 내인성 Ig λ 인핸서 영역(또는 서열) 및 모듈형 인간 Ig λ 인핸서 영역(또는 서열, 상기 참조)을 추가로 포함한다. 달리 명시하지 않는 한, 폐쇄 심볼은 설치류 유전자 분절 및/또는 서열을 나타내는 반면, 개방 심볼은 인간 유전자 분절 및/또는 서열을 나타낸다. 선별 카세트(HYG: 유비퀴틴에 의해 전사 조절되는 히그로마이신 내성 유전자 [HYG]^R)의 측면에 위치하는 부위 특이적 재조합 인식 부위(예: Frt)가 도시되어 있다. 점선은 2개의 도시된 Ig λ 대립유전자 사이에서 결실된 영역을 나타낸다. 선별된 뉴클레오타이드 접합 위치는 각각의 접합부 아래에 선으로 표기되어 있고, 서열번호가 각각 표시되어 있다.

도 3은, 서로 작동 가능하게 연결되고 설치류 C λ 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 V λ , J λ 및 C λ 암호화 서열이 존재하는 것을 특징으로 하는 설치류에서 조작된 내인성 Ig λ 경쇄 유전자좌의 작제를 위한 대안

적인 예시적 전략에 대한 개략도이며, 축척에 비례하지는 않는다. 도식된 바와 같이, 2개의 상이한 표적화 벡터가 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자와 유래의 다양한 양의 유전 물질과 함께 도식되어 있으며, 이들은 5개의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, 인간 $J\lambda$ - $C\lambda$ 클러스터, 및 마우스 $C\lambda 1$ 유전자를 함유하는 조작된 설치류(예: 마우스) $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(상단에 도식됨) 내로 동시에 삽입된다. 6596 표적화 벡터는, 네오마이신 선별 카세트(를 제거하고 5' 및 3' 단부에서 중첩 서열(줄무늬 사각형)을 통합하여 상응하는 인간 서열과의 재조합을 용이하게 하기 위한 상동성 영역을 제공하도록 변형된다. 제2 표적화 벡터는 변형된 6596 표적화 벡터(트리밍된 6596 표적화 벡터)와 서열 상동성을 공유하는 작제물(줄무늬 사각형)의 3' 단부 상에서 중첩 영역을 함유하도록 설계되며, 이는 트리밍된 6596 표적화 벡터의 5' 단부와 상동성 재조합을 용이하게 한다. 이들 2개의 표적화 벡터는, 제1 표적화 벡터의 성공적인 표적화 이후에 내인성 마우스 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 총 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 함량에 순차적으로 추가되는 추가 $V\lambda$ 유전자 분절의 추가 세트(각각 11개 및 9개)를 포함한다. 제2 표적화 벡터는 설치류 $V\lambda 2$ 유전자 분절의 서열 5'(또는 상류)와 동일한 서열을 갖는 5' 상동 아암을 포함하였으므로, 내인성 $V\lambda 2$ - $V\lambda 3$ - $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$ - $J\lambda 4P$ - $C\lambda 4P$ - $E\lambda 2$ -4- $V\lambda 1$ - $J\lambda 3$ - $J\lambda 3P$ - $C\lambda 3$ - $J\lambda 1$ 유전자 분절이 표적화 벡터와 상동성 재조합될 때 이의 결실을 용이하게 한다. 2개의 표적화 벡터는 가이드 RNA (GrNA)와 공동으로 전기천공되어 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌에서의 통합을 용이하게 하는데, 이들은 각각의 서열 위치 근처에 화살표로 표기되고 각각의 서열번호로 표시된다. 달리 명시하지 않는 한, 폐쇄 심볼은 설치류 유전자 분절 및/또는 서열을 나타내는 반면, 개방 심볼은 인간 유전자 분절 및/또는 서열을 나타낸다. 선별 카세트(HYG: 유비퀴틴 프로모터에 의해 전사 조절되는 히그로마이신 내성 유전자 [HYG]^R; NEO: 유비퀴틴 프로모터에 의해 전사 조절되는 네오마이신 내성 유전자 [NEO]^R)의 측면에 위치하는 부위 특이적 재조합 인식 부위 (예를 들어, *loxP*, *Frt*)도 도식되어 있다. 선별된 뉴클레오타이드 접합 위치는 각각의 접합부 아래에 선으로 표기되어 있고, 서열번호가 각각 표시되어 있다.

도 4는 실시예 3에 기술된 실험에 사용된 설치류의 야생형 대립유전자 및 예시적인 조작된 설치류 $Ig\lambda$ 경쇄 대립유전자의 개략도를 도식하며, 축척에 비례하지는 않는다. 야생형 대립유전자: 야생형 마우스 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(예: 미국 특허 제9,006,511호의 도 2를 또한 참조함); 6571 대립유전자: 5개의 기능성 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, 4개의 기능성 인간 $J\lambda$ - $C\lambda$ 유전자 분절쌍, 및 설치류 $C\lambda$ 영역(예: 마우스 $C\lambda 1$ 영역)에 작동 가능하게 연결된 인간 $J\lambda 7$ 유전자 분절을 포함하는 $Ig\lambda$ 경쇄 대립유전자로서, $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 내인성 $V\lambda$ - $J\lambda$ - $C\lambda$ 유전자 분절, 3개의 내인성 $Ig\lambda$ 인핸서 영역(또는 서열) 및 모돌형 인간 $Ig\lambda$ 인핸서 영역(또는 서열, 상기 참조)을 추가로 포함한다. 6597 대립유전자: 상기 참조; 6680 대립유전자: 상기 참조. 선별된 뉴클레오타이드 접합 위치는 각각의 접합부 아래에 선으로 표기되어 있고, 서열번호가 각각 표시되어 있다.

도 5a 및 5b는 CD19(y-축) 및 CD3(x-축)의 발현을 보여주는, 단일 세포로 게이팅한 비장세포를 나타내는 대표적인 등고선 플롯(A), 및 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로부터 수확된 비장당 절대 세포 수(B)를 도식한다.

도 6a 및 6b는 IgD(y-축) 및 IgM(x-축)의 발현을 보여주는, CD19⁺에 대해 게이팅한 비장세포 내 성숙세포 및 이행 B 세포를 나타내는 대표적인 등고선 플롯(A), 및 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로부터 수확된 비장당 절대 세포 수(B)를 도식한다. 특이적 B 세포 하위집단은 각각의 점 플롯 상에 표시되어 있다(예: 성숙, 이행).

도 7a 및 도 7b는 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형 접합성인 마우스(6680HO) 또는 야생형 한배 새끼(WT)로부터 수확하고, CD19⁺로 게이팅한 비장세포에서 마우스 $Ig\lambda$ (mIg λ , y-축), 마우스 $Ig\kappa$ (mIg κ , x-축) 또는 인간 $Ig\lambda$ (hIg λ , y-축)의 발현을 나타내는 대표적인 등고선 플롯을 도식한다.

도 8a 및 8b는 CD19(y-축) 및 CD3(x-축)의 발현을 보여주는, 단일 세포로 게이팅한 골수를 나타내는 대표적인 등고선 플롯(A), 및 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로부터 수확된 대퇴골당 절대 세포 수(B)를 도식한다.

도 9a 및 도 9b는 c-키트(y-축) 및 CD43(x-축)의 발현을 보여주는, CD19⁺IgM^{low}B220^{int}로 게이팅한 골수를 나타내는 대표적인 등고선 플롯(A), 및 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로부터 수확된 대퇴골당 절대 세포 수(B)를 도식한다. 특이적 B 세포 하위집단은 각각의 점 플롯 상에 표시되어 있다(예: pro-B, pre-B).

도 10a 및 도 10b는, IgM(y-축) 및 B220(x-축)의 발현을 보여주는, CD19⁺로 게이팅한 골수를 나타내는 대표적인 등고선 플롯(A), 및 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로

부터 수확된 대퇴골당 절대 세포 수(B)를 도시한다. 특이적 B 세포 하위집단은 각각의 점 플롯 상에 표시된다 (예: 미성숙, 성숙, B-이전 및 B-이후).

도 11a 및 도 11b는, 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로부터 마우스 Igλ(mIgλ, y-축), 마우스 Igκ(mIgκ, x-축) 또는 인간 Igλ(hIgλ, y-축)의 발현을 보여주는, (CD19⁺IgM⁺B220^{int}로 게이팅한) 미성숙 골수를 나타내는 대표적인 등고선 플롯을 도시한다.

도 12a 및 도 12b는, (CD19⁺IgM⁺B220⁺로 게이팅한) 성숙한 골수를 나타내고 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로부터 마우스 Igλ(mIgλ, y-축), 마우스 Igκ(mIgκ, x-축) 또는 인간 Igλ(hIgλ, y-축)의 발현을 보여주는 대표적인 등고선 플롯을 도시한다.

도 13은 본원에 기술된 조작된 마우스 계통으로부터 선택된 비장, 미성숙 골수(미성숙 BM) 및 성숙한 골수(성숙 BM)에서 Igκ 발현 B 세포(% κ C) 및 인간 Igλ 발현 B 세포(% humλC)의 대표적인 평균 백분율을 도시한다. 데이터는 평균 값으로 제시되어 있으며 표준 편차도 표시되어 있다. 6680HO/VI HO/Adam6 HO: 조작된 마우스 계통으로서, 25개의 기능성 인간 Vλ 유전자 분절, 4개의 기능성 인간 Jλ-Cλ 유전자 분절쌍, 및 설치류 Cλ 영역(예: 마우스 Cλ1 영역)에 작동 가능하게 연결된 인간 Jλ7 유전자 분절을 함유하도록 설계된 동형접합성의 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌, 및 동형접합성의 인간화 IgH 및 Igκ 유전자좌를 함유하되, Igλ 경쇄 유전자좌는 2개의 내인성 Igλ 인핸서 영역(또는 서열) 및 모듈형 인간 Igλ 인핸서 영역(또는 서열, 상기 참조)을 추가로 포함하고, 동형접합성 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열을 함유하였음 (예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호를 참조하되; 이들 전체는 참조로서 본원에 통합됨); 6889HO/VI HO/Adam6 HO: 조작된 마우스 계통으로서, 25개의 기능적 인간 Vλ 유전자 분절, 4개의 기능적 인간 Jλ-Cλ 유전자 분절쌍 및 설치류 Cλ 영역(예: 마우스 Cλ1 영역)에 작동 가능하게 연결된 인간 Jλ7 유전자 분절, 및 동형접합성의 인간화 IgH 및 Igκ 유전자좌를 함유하되, Igλ 경쇄 유전자좌는 2개의 내인성 Igλ 인핸서 영역(또는 서열) 및 모듈형 인간 Igλ 인핸서 영역 (또는 서열, 상기 참조)을 추가로 포함하고, 동형접합성 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열을 포함하였음(예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호를 참조하되; 이들 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 도시된 각각의 유전자형 코호트에 대한 마우스의 수는 그룹당 적어도 3마리 및 최대 8마리 동물을 포함하였다.

도 14a 및 도 14b는, 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 동형접합성인 조작된 마우스(6680HO) 및 야생형 한배 새끼(WT)로부터 단리된 혈청을 사용하는 비환원 조건 하의 SDS-PAGE의 대표적인 면역블롯(웨스턴 블롯)을 도시하는 것으로서, 마우스(B, 우측 이미지) 또는 인간(A, 좌측 이미지)λ 경쇄의 발현을 나타낸다 (각각의 샘플은 1.5ml 혈청의 부피로 레인 내에 로딩되었음). PHS: 0.25ml의 부피로 풀링된 인간 혈청(Labquip Ltd Cat#9101A). Kd에서의 분자량은 각 겔 이미지의 우측에 표시되어 있다.

도 15a는 6889HET 마우스 (n=5)로부터 수확한 비장세포로부터 단리한 RNA로부터 증폭시키고 인간 Cλ로 프라이밍한 서열에서 사용된 대표적인 Vλ(상단) 및 인간 Jλ(하단) 유전자 절편을 도시한다.

도 15b는 6889HET 마우스 (n=5)로부터 수확한 비장세포로부터 단리한 RNA로부터 증폭시키고 마우스 Cλ로 프라이밍한 서열에서 사용된 대표적인 인간 Vλ 유전자 분절을 도시한다.

도 15c는 6889HO/VI HO/Adam6 HO 마우스 (n=6)로부터 수확한 비장세포로부터 단리한 RNA로부터 증폭시키고 인간 Cλ로 프라이밍한 서열에서 사용된 대표적인 인간 Vλ(상단) 및 인간 Jλ(하단) 유전자 절편을 도시한다.

도 15d는 6889HO/VI HO/Adam6 HO 마우스 (n=6)로부터 수확한 비장세포로부터 단리한 RNA로부터 증폭시키고 마우스 Cλ로 프라이밍한 서열에서 사용된 대표적인 인간 Vλ 유전자 분절을 도시한다.

도 16a 및 도 16b는 6597(6597HET, n=6) 또는 6680(6680HET, n=6) 표적화 벡터의 삽입에 대해 이형접합성인 면역화된 마우스 및 면역화된 야생형 대조군(WT, n=6)으로부터 0일차 및 22일차에 수집한 혈청에서의 대표적인 총 IgG(A) 역가 및 항원 특이적 IgG(B) 역가를 도시한다.

도 17a~c는 6597 또는 6680 표적화 벡터의 삽입에 대해 이형접합성인 면역화된 마우스(6597HET, n=6 또는 6680HET, n=6) 및 면역화된 야생형 대조군(WT, n=6)으로부터 0일차 및 22일차에 수집한 혈청 내 항원 특이적 IgG에서의 대표적인 인간λ 경쇄 (hIgλ, 왼쪽), 마우스 λ 경쇄(mIgλ, 중간) 및 마우스 κ 경쇄(mIgκ, 오른쪽) 역가를 도시한다.

도 18a 및 도 18b는 CD19(y-축) 및 CD3(x-축)의 발현을 보여주는, 단일 세포로 게이팅한 비장세포를 나타내는

대표적인 등고선 플롯(좌측), 및 6889 표적화 백터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6889HO VI HO Adam6 HO) 및 기준 조작된 마우스(VI)로부터 수확한 비장당 절대 b 세포 수(우측)를 도시한다. 6889HO/VI HO/Adam6 HO: 상기 참조; VI: 동형접합성 인간화 IgH 및 Igκ 유전자좌를 함유하는 조작된 마우스 계통으로서, 동형접합성 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열을 포함하였음(예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제 8,697,940호를 참조하되; 이들 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 살아있는 단세포 비장세포는 생존성 염색(Thermo Fisher)에 의해 정의하였다.

도 19는 6889 표적화 백터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6889HO VI HO Adam6 HO) 및 기준 조작된 마우스(VI)로부터 수확하고, CD19⁺로 게이팅한 비장세포에서의 인간 Igλ(hIgλ, y-축) 및 마우스 Igκ(mIgκ, x-축) 발현을 나타내는 대표적인 등고선 플롯을 도시한다. 6889HO/VI HO/Adam6 HO: 상기 참조; VI: 상기 참조.

도 20은 6889 표적화 백터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6889HO VI HO Adam6 HO) 및 기준 조작된 마우스(VI)의 대퇴골에서 수확한 골수에서 유래하고, 단일 세포로 게이팅한 림프세포를 나타내는 대표적인 등고선 플롯으로, IgM(y-축) 및 B220(x-축)의 발현을 보여준다. 6889HO/VI HO/Adam6 HO: 상기 참조; VI: 상기 참조. 미성숙 및 성숙한 B 세포 하위집단은 각각의 등고선 플롯 상에 표시되어 있다.

도 21은 6889 표적화 백터의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(6889HO VI HO Adam6 HO) 및 기준 조작된 마우스(VI) 유래의 미성숙 골수(CD19⁺IgM⁺B220^{int}로 게이팅함, 왼쪽 컬럼) 및 성숙한 골수(CD19⁺IgM⁺B220⁺로 게이팅함, 우측 컬럼)를 나타내는 대표적인 등고선 플롯으로, 인간 Igλ(hIgλ, y-축) 및 마우스 Igκ(mIgκ, x-축)의 발현을 보여준다. 6889HO/VI HO/Adam6 HO: 상기 참조; VI: 상기 참조.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 서열 목록에서 선택된 서열의 간단한 설명

[0078] 마우스 Cλ1 DNA (서열번호 1):

[0079] GCCAGCCCAAGTCTTCGCCATCAGTCACCCCTGTTTCCACCTTCTCTGAAGAGCTCGAGACTAACAAGGCCACACTGGTGTGTACGATCACTGATTTCTACC
CAGGTGTGGTGACAGTGGACTGGAAGGTAGATGGTACCCCTGTCACTCAGGGTATGGAGACAACCCAGCCTTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACATGGCTA
GCAGCTACCTGACCTGACAGCAAGAGCATGGGAAAGGCATAGCAGTTACAGCTGCCAGGTCACATGAAGGTCACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTG
CTGACTGTTC

[0080] 마우스 Cλ1 아미노산 (서열번호 2):

[0081] GQPKSSPSVTLFPPSSEELTNKATLVCTITDFYPGVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSQVTHEGHTVEKSLSR
ADCS

[0082] 마우스 Cλ2 DNA (서열번호 3):

[0083] GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACTCTCACCGTGTTCACCTTCTCTGAGGAGCTCAAGGAAAACAAAGCCACACTGGTGTGTCTGATTTCCAACCTTTTCCC
CGAGTGGTGTGACAGTGGCTGGAAGGCAAATGGTACACCTATCACCCAGGGTGTGGACACTTCAAATCCCACCAAAGAGGGCAACAAGTTCATGGCCAGCA
GCTTCTACATTTGACATCGGACCAGTGGAGATCTCACAACAGTTTACCTGTCAAGTTACACATGAAGGGGACACTGTGGAGAAGAGTCTGTCTCTCGCAG
AATGTCTC

[0084] 마우스 Cλ2 아미노산 (서열번호 4):

[0085] GQPKSTPTLTVFPPSSEELKENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPIITQGVDTSNPTKEGNKFMASFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDTVEKSLSPA
ECL

[0086] 마우스 Cλ3 DNA (서열번호 5):

[0087] GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACTCACCATGTTTCCACCTTCCCTGAGGAGCTCCAGGAAAACAAAGCCACACTCGTGTGTCTGATTTCCAATTTTCCC
CAAGTGGTGTGACAGTGGCTGGAAGGCAAATGGTACACCTATCACCCAGGGTGTGGACACTTCAAATCCCACCAAAGAGGACAACAAGTACATGGCCAGCA
GCTTCTTACATTTGACATCGGACCAGTGGAGATCTCACAACAGTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGGACACTGTGGAGAAGAGTCTGTCTCTCGCAG
AATGTCTC

[0088] 마우스 Cλ3 아미노산 (서열번호 6):

[0089] GQPKSTPTLTMFPPSPEELQENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPIITQGVDTSNPTKEDNKYMSSFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDTVEKSLSPA

ECL

[0090] **랫트 Cλ1 DNA (서열번호 7):**

[0091] GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCACCTTCAACTGAGGAGCTCCAGGGAAACAAAGCCACACTGGTGTGTCTGATTTCTGATTCTTCTACC
CGAGTGATGTGGAAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTGCACCTATCTCCAGGGTGTGGAGACTGCAAATCCCACCAAACAGGGCAACAAATACATCGCCAGCA
GCTTCTTACGTTTGACAGCAGAACAGTGGAGATCTCGCAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGAACACTGTGGAGAAGAGTCTGTCTCCTGCAG
AATGTGTC

[0092] **랫트 Cλ1 아미노산 (서열번호 8):**

[0093] GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAWKANGAPI SQGVDTANPTKQGNKY IASSFLRLTAEQWRSRNSFTCQVTHEGNTVEKSLSPA
ECV

[0094] **랫트 Cλ2 DNA (서열번호 9):**

[0095] ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCCTGTTCACCTTCTCTGAAGAGCTCAAGACTGACAAGGCTACACTGGTGTGTATGGTGACAGATTTCTACC
CTGGTGTATGACAGTGGTCTGGAAGGCAGATGGTACCCCTATCACTCAGGGTGTGGAGACTACCCAGCCTTTCAAACAGAACAAACAGTACATGGCTACCA
GCTACCTGCTTTTGACAGCAAAAGCATGGGAGACTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCACTCACGAAGAGAACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTG
AGTGTTC

[0096] **랫트 Cλ2 아미노산 (서열번호 10):**

[0097] DQPKATPSVTLFPPSSEELKTDKATLVCMVTDYFPGVMTVWVKADGTPITQGVETTQPFKQNNKYMATSYLLL TAKAWETHSNYSCQVTHEENTVEKSLSRA
ECS

[0098] **랫트 Cλ3 DNA (서열번호 11):**

[0099] GTCAGCCCAAGTCCACTCCCACACTCACAGTATTTCCACCTTCAACTGAGGAGCTCCAGGGAAACAAAGCCACACTGGTGTGTCTGATTTCTGATTCTTCTACC
CGAGTGATGTGGAAGTGGCCTGGAAGGCAAATGGTGCACCTATCTCCAGGGTGTGGAGACTGCAAATCCCACCAAACAGGGCAACAAATACATCGCCAGCA
GCTTCTTACGTTTGACAGCAGAACAGTGGAGATCTCGCAACAGTTTTACCTGCCAAGTTACACATGAAGGGAACACTGTGGAAAAGAGTCTGTCTCCTGCAG
AGTGTGTC

[0100] **랫트 Cλ3 아미노산 (서열번호 12):**

[0101] GQPKSTPTLTVFPPSTEELQGNKATLVCLISDFYPSDVEVAWKANGAPI SQGVDTANPTKQGNKY IASSFLRLTAEQWRSRNSFTCQVTHEGNTVEKSLSPA
ECV

[0102] **랫트 Cλ4 DNA (서열번호 13):**

[0103] ACCAACCCAAGGCTACGCCCTCAGTCACCCCTGTTCACCTTCTCTGAAGAGCTCAAGACTGACAAGGCTACACTGGTGTGTATGGTGACAGATTTCTACC
CTGGTGTATGACAGTGGTCTGGAAGGCAGATGGTACCCCTATCACTCAGGGTGTGGAGACTACCCAGCCTTTCAAACAGAACAAACAGTACATGGCTACCA
GCTACCTGCTTTTGACAGCAAAAGCATGGGAGACTCATAGCAATTACAGCTGCCAGGTCACTCACGAAGAGAACACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCCGTGCTG
AGTGTTC

[0104] **랫트 Cλ4 아미노산 (서열번호 14):**

[0105] DQPKATPSVTLFPPSSEELKTDKATLVCMVTDYFPGVMTVWVKADGTPITQGVETTQPFKQNNKYMATSYLLL TAKAWETHSNYSCQVTHEENTVEKSLSRA
ECS

[0106] **정의**

[0107] 본 발명의 범주는 본원에 첨부된 청구범위에 의해 정의되고, 본원에 기술된 특정 구현예에 의해 한정되지 않으
며; 본 명세서를 읽는 당업자는 기술된 이러한 구현예와 동등할 수 있거나, 달리 청구범위의 범주에 속할 수 있
는 다양한 변형예를 알 수 있을 것이다.

[0108] 일반적으로, 본원에서 사용된 용어는 달리 명시되지 않는 한 당업계에서 이해되는 이들의 의미에 따른다. 특정
한 용어에 대한 명시적 정의가 아래에 제공되며; 본 명세서 전반에 걸친 특정의 이들 및 다른 용어의 의미는 문
맥을 통해서 당업자에게 명백해질 것이다. 다음 및 다른 용어에 대한 추가적인 정의는 본 명세서 전반에 걸쳐
제시된다. 본 명세서 내에 인용된 특허 및 비특허 문헌 참조, 또는 이의 관련 부분들은 그 전체가 참조로서 본
원에 통합된다.

- [0109] **투여(administration)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 조성물을 대상물 또는 시스템(예: 세포, 기관, 유기체, 또는 이의 관련 성분이나 성분의 집합)에 투여하는 것을 포함한다. 당업자는 투여 경로가, 예를 들어, 조성물이 투여되고 있는 대상물 또는 시스템, 조성물의 성질, 투여 목적 등에 따라 달라질 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 특정 구현예들에서, 동물 대상체(예를 들어, 사람 또는 설치류)에 대한 투여는 기관지(기관지 점적을 포함함), 협측, 장내, 진피간, 동맥내, 진피내, 위내, 골수내, 근육내, 비강내, 복강내, 척수장내, 정맥내, 뇌실내, 점막, 비강, 경구, 직장, 피하, 설하, 국소, 기관(기관내 점적을 포함함), 경피, 질 및/또는 유리체 투여일 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 간헐적 투약을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 적어도 선택된 기간 동안 연속 투약(예, 관류)을 포함할 수 있다.
- [0110] **완화(amelioration)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 상태의 예방, 약화 또는 일시적 완화, 또는 대상물의 상태의 개선을 포함한다. 완화는 질환, 장애 또는 병태의 완전한 회복 또는 완전한 예방을 포함하되 이를 필요로 하지는 않는다.
- [0111] **대략(approximately)**: 하나 이상의 관심 값에 대해 적용된 바와 같이, 명시된 기준 값과 유사한 값까지를 포함한다. 특정한 구현예에서, "대략" 또는 "약"이라는 용어는 다르게 진술되거나 문맥으로부터 명백하지 않는 한 진술된 참조 값의 양 방향(초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 이하 이내의 다양한 값을 지칭한다(이러한 수치가 가능한 값의 100%를 초과할 수 있는 경우는 제외).
- [0112] **생물학적 활성(biologically active)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 생물학적 시스템, 시험관 내 또는 생체 내(예: 유기체 내)에서 활성을 갖는 임의의 제제의 특성을 지칭한다. 예를 들어, 유기체 내에 존재할 때, 유기체 내에서 생물학적 효과를 갖는 제제는 생물학적으로 활성인 것으로 간주된다. 단백질 또는 폴리펩티드가 생물학적으로 활성인 특정한 구현예에서, 단백질 또는 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 공유하는 단백질 또는 폴리펩티드의 부분은 통상적으로 "생물학적 활성" 부위로서 지칭된다.
- [0113] **유사한(comparable)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 서로 동일하지 않을 수 있지만 이들 사이에서 비교가 가능할 만큼 충분히 유사하여 관찰된 차이점 또는 유사점을 기초로 합리적으로 결론을 내릴 수 있는 2종 이상의 제제, 개체, 상황, 조건의 집합 등을 지칭한다. 당업자는 임의의 주어진 상황에서 둘 이상의 이러한 제제, 개체, 상황, 조건의 집합 등이 유사한 것으로 간주되는 데에는 어떤 정도의 동일성이 요구되는지 문맥 내에서 이해할 것이다.
- [0114] **보존적(conservative)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 유사한 화학적 성질(예: 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 R기를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환을 포함하는, 보존적 아미노산 치환을 기술하는 경우를 지칭한다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 관심 단백질의 기능적 성질, 예를 들어, 리간드에 결합하는 수용체의 능력을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 유사한 화학적 성질을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산의 군의 예는 다음을 포함한다: 글리신(Gly, G), 알라닌(Ala, A), 발린(Val, V), 류신(Leu, L), 및 이소류신(Ile, I)과 같은 지방족 측쇄; 세린(Ser, S) 및 트레오닌(Thr, T)와 같은 지방족-하이드록실 측쇄; 아스파라긴(Asn, N) 및 글루타민(Gln, Q)와 같은 아미드 함유 측쇄; 페닐알라닌(Phe, F), 티로신(Tyr, Y), 및 트립토판(Trp, W)와 같은 방향족 측쇄; 라이신(Lys, K), 아르기닌(Arg, R), 및 히스티딘(His, H)와 같은 염기성 측쇄; 아스파르트산(Asp, D) 및 글루탐산(Glu, E)와 같은 산성 측쇄; 및 시스테인(Cys, C) 및 메티오닌(Met, M)과 같은 황 함유 측쇄. 보존적 아미노산 치환기는, 예를 들어, 발린/류신/이소류신(Val/Leu/Ile, V/L/I), 페닐알라닌/티로신(Phe/Tyr, F/Y), 라이신/아르기닌(Lys/Arg, K/R), 알라닌/발린(Ala/Val, A/V), 글루탐산/아스파르트산(Glu/Asp, E/D), 및 아스파라긴/글루타민(Asn/Gln, N/Q)을 포함한다. 일부 구현예에서, 보존적 아미노산 치환은, 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발에서 사용된 바와 같은 알라닌을 갖는 단백질 내 임의의 원래의 잔기의 치환일 수 있다. 일부 구현예에서, Gonnet, G.H. 외의 1992, Science 256:1443-1445에 개시된 PAM250 로그 우도 매트릭스(log-likelihood matrix)에서 양의 값을 갖는 보존적 치환이 이루어진다. 일부 구현예에서, 치환은 적당한 보존적 치환인데, 이러한 치환은 PAM250 로그 우도 매트릭스에서 음이 아닌 값을 가진다.
- [0115] **대조군(control)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 결과를 비교하기 위한 표준이 되는 "대조군"이라는 당업계에서 이해되는 의미를 지칭한다. 통상적으로, 대조군은 변수들에 대한 결론을 내리기 위해 변수들을 분리하여 실험의 완전성을 높이기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 대조군은 비교자를 제공하기 위해 시험 반응 또는 검정과 동시에 수행되는 반응 또는 검정이다. "대조군"에는 "대조군 동물(control animal)"도 포함된다. "대조군 동물"은 본원에 설명된 변형, 본원에 설명된 것과는 다른 변형을 가지거나 변형을 가지지 않을 수 있다(즉, 야생형 동물). 하나의 실험에서, "시험"(즉, 시험 중인 변수)이 적용된다. 제2 실험에서, "대조군" 시험 중인 변수가

적용되지 않는다. 일부 구현예에서, 대조군은 과거의 대조군(즉, 이전에 수행된 시험 또는 분석의 대조군, 또는 이전에 알려진 양 또는 결과)이다. 일부 구현예에서, 대조군은 인쇄되거나 달리 저장된 기록이거나 이를 포함한다. 대조군은 양성 대조군 또는 음성 대조군일 수 있다.

[0116] **유래하는(derived from):** 재배열되지 않은 가변 영역 및/또는 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절로부터 "유래하는" 재배열된 가변 영역 유전자 또는 가변 도메인과 관련하여 사용될 때, 본 용어는 재배열된 가변 영역 유전자 또는 가변 도메인의 서열을, 가변 도메인을 발현하는 재배열된 가변 영역 유전자를 형성하기 위해 재배열된 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절의 세트까지 다시 추적하는 능력을 지칭한다(경우에 따라, 스플라이스 차이 및 체세포 돌연변이를 해명함). 예를 들어, 재배열된 가변 영역 유전자가 체세포 돌연변이를 겪었더라도 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절로부터 유래한다는 사실에는 변화가 없다.

[0117] **파괴(disruption):** 본원에서 사용되는 바와 같이, DNA 분자(예를 들어, 유전자 또는 유전자좌와 같은 내인성 상동성 서열)와의 상동성 재조합 사건의 결과를 지칭한다. 일부 구현예에서, 파괴는 DNA 서열(들)의 삽입, 결실, 치환, 대체, 파오 돌연변이 또는 틀 이동 또는 이들의 임의의 조합을 달성하거나 나타낼 수 있다. 삽입은 내인성 서열(예: 이중 서열) 이외의 기원의 것일 수 있는 전체 유전자 또는 유전자 단편(예: 엑손)의 삽입을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물(예를 들어, 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드)의 발현 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 발현 및/또는 활성을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물(예: 암호화된 폴리펩티드)의 서열을 바꿀 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물(예를 들어, 암호화된 폴리펩티드)을 절단하거나 단편화할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 암호화된 유전자 산물을 확장할 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 손상은 융합 폴리펩티드의 조립을 달성할 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준에 영향을 미칠 수 있지만 활성에는 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 활성에는 영향을 미칠 수 있지만 수준에는 영향을 미치지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 활성에 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 파괴는 유전자 또는 유전자 산물의 수준 또는 활성 유의한 효과를 가지지 않을 수 있다.

[0118] **결정(determining), 측정(measuring), 확인(evaluating), 평가(assessing), 검정(assaying) 및 분석(analyzing):** 임의의 형태의 측정을 지칭하도록 상호 교환적으로 본원에서 사용되고, 요소의 존재 여부를 알아내는 것을 포함한다. 이들 용어는 정량적 및/또는 정성적 결정을 포함한다. 검정은 상대적이거나 절대적일 수 있다. "존재에 대한 검정(assaying for the presence of)"은 존재하는 어떤 것의 양을 결정하는 것 및/또는 존재 여부를 결정하는 것일 수 있다.

[0119] **내인성 유전자좌 또는 내인성 유전자:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에 기술된 손상, 결실, 대체, 변경, 또는 변형의 도입 전에 부모 유기체 또는 참조 유기체에서 발견된 유전자좌를 지칭한다. 일부 구현예에서, 내인성 유전자좌는 자연계에서 발견되는 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 내인성 유전자좌는 야생형 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 내인성 유전자좌는 조작된 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 기준 유기체는 야생형 유기체이다. 일부 구현예에서, 기준 유기체는 조작된 유기체이다. 일부 구현예에서, 기준 유기체는 (야생형이든 조작된 것이든) 실험실에서 교배된 유기체이다.

[0120] **내인성 프로모터(endogenous promoter):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 내인성 유전자와, 예를 들어 야생형 유기체 내에서 자연적으로 결합된 프로모터를 지칭한다.

[0121] **조작된(engineered):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 일반적으로 사람의 손으로 조작된 양태를 지칭한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 자연에서 그러한 순서로 서로 연결되지 않은 둘 이상의 서열이 조작된 폴리뉴클레오티드에서 서로 직접 연결되도록 사람의 손에 의해 조작될 때, 폴리뉴클레오티드는 "조작된" 것으로 간주될 수 있다. 일부 특정한 이런 구현예에서, 조작된 폴리뉴클레오티드는 자연에서 발견되는 조절 서열로서 제1 암호화 서열과 작동적으로 연관되고, 제2 암호화 서열과는 작동적으로 연관되지 않는 조절 서열을 포함할 수 있는데, 상기 조절 서열은 제2 암호화 서열과 작동적으로 연관되도록 사람의 손에 의해 연결된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 자연계에서 서로 연결되어 있지 않은 폴리펩티드 요소 또는 도메인을 각각 암호화하는 제1 및 제2 핵산 서열은 단일 조작된 폴리펩티드에서 서로 연결될 수 있다. 이에 비해, 일부 구현예에서, 세포 또는 유기체가 그의 유전 정보가 변경되도록 (예: 이전에 존재하지 않았던 새로운 유전 물질이 도입되거나, 이전에 존재하던 유전 물질이 변경되거나 제거되도록) 조작된 경우, 세포 또는 유기체는 "조작된" 것으로 간주될 수 있다. 통상적인 관행이면서 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 조작된 폴리뉴클레오티드 또는 세포의 자손

은 실제 조작이 이전 개체에 대해 수행되었더라도 일반적으로는 여전히 "조작된" 것으로서 지칭된다. 또한, 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 본원에서 기술된 바와 같은 "조작"이 달성될 수 있는 다양한 방법론이 이용 가능하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, "조작"은 분석이나 비교를 수행하거나, 달리 서열, 변경 등을 분석, 권고 및/또는 선택하도록 프로그램된 컴퓨터 시스템의 사용을 통해 (예를 들어, 핵산 서열, 폴리펩티드 서열, 세포, 조직 및/또는 유기체를) 선택하거나 설계하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, "조작"은 체외 화학 합성 방법론 및/또는, 예를 들어, (중합체 연쇄 반응 등을 통한) 핵산 증폭 혼성화, 돌연변이, 형질 변환, 형질 감염 등과 같은 재조합 핵산 기술 및/또는 다양한 통제된 교배 방법론 중 임의의 것을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, (예를 들어, 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양과 형질전환(예: 전기 천공, 리포펙션 등)을 위한) 확립된 이러한 다양한 기술은 당업계에 잘 알려져 있고, 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고/되거나 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참조 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, Sambrook 외의 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 및 *Principles of Gene Manipulation*: Old, R.W. 및 S.B. Primrose에 의해 편집된 *An Introduction to Genetic Manipulation*, 5th Ed., (편집자: Old, R.W. 및 S.B. Primrose) Blackwell Science, Inc., 1994를 참조한다.

[0122] **기능성(functional)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 특정 특성을 나타내고/내거나 (예를 들어, 코딩 서열의 일부를 형성하고/하거나) 활성을 나타내는 개체(예를 들어, 유전자 또는 유전자 분절)의 형태 또는 단편을 지칭한다. 예를 들어, 면역글로불린의 맥락에서, 가변 도메인은 기능성 코딩 서열을 형성하기 위해 조립되는 (또는 재조합되는) 고유 유전자 분절(즉, V, D 및/또는 J)에 의해 암호화된다. 게놈 내에 존재할 때, 변이가 발생하더라도 유전자 분절은 클러스터로 구성된다. A "기능성" 유전자 분절은, 상응하는 게놈 DNA가 단리되고 (즉, 클로닝되고) 서열에 의해 식별된, 발현된 서열(가변 도메인)로 표현된 유전자 분절이다. 일부 면역글로불린 유전자 분절 서열은 개방 해독 프레임에 함유하며, 발현된 레파토리로 표현되지 않더라도 기능성으로 간주되는 반면, 다른 면역글로불린 유전자 분절 서열은 정지 코돈 및/또는 절단 서열을 생성하는 돌연변이(예: 점 돌연변이, 삽입, 결실 등)를 함유하는데, 이는 후속하여 이러한 유전자 분절 서열이 비-돌연변이 서열(들)과 관련된 특성 및/또는 활성을 수행할 수 없게 한다. 이러한 서열은 발현된 서열에서 나타나지 않으므로, 유사유전자(pseudogenes)로서 분류된다.

[0123] **유전자(gene)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 산물(예: RNA 산물 및/또는 폴리펩티드 산물)을 코딩하는 염색체 내의 DNA 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 유전자는 암호화 서열(즉, 특정 생성물을 암호화하는 서열)을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자는 비암호화 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 유전자는 암호화(예: 엑손) 서열과 비암호화(인트론) 서열 모두를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자는 하나 이상의 조절 서열(예: 프로모터, 인핸서 등) 및/또는, 예를 들어, 유전자 발현의 하나 이상의 양태(예: 세포 유형 특이적 발현, 유도 발현 등)를 조절하거나 이에 영향을 줄 수 있는 인트론 서열을 포함할 수 있다. 명료성을 위해, 본 개시에 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자"는 일반적으로 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산의 일부를 지칭하며; 문맥으로부터 당업자에게 명백해지는 바와 같이, 조절 서열을 선택적으로 포함할 수 있음을 주목한다. 이러한 정의는 비단백질 코딩 발현 단위에 대한 용어 "유전자"의 적용을 배제하고자 하는 것이 아니며, 오히려, 대부분의 경우에, 본 문서에서 사용된 바와 같이 상기 용어가 폴리펩티드 코딩 핵산을 지칭한다는 것을 명확히 하고자 하는 것이다.

[0124] **이종(heterologous)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 상이한 공급원 유래의 제제 또는 개체를 지칭한다. 예를 들어, 특정 세포 또는 유기체 내에 존재하는 폴리펩티드, 유전자, 또는 유전자 산물을 참조하여 사용될 때, 상기 용어는 관련된 폴리펩티드, 유전자, 또는 유전자 산물이: 1) 사람의 손에 의해 조작되었고; 2) 사람의 손에 의해(예를 들어, 유전자 조작에 의해) 세포 또는 유기체(또는 이의 전구체)에 도입되었고/도입되었거나; 3) 관련 세포 또는 유기체(예를 들어, 관련 세포 유형 또는 유기체 유형) 내에 존재하거나 이에 의해 자연적으로 생산되지 않는다는 것을 명확하게 한다. "이종(heterologous)"은 특정 천연 세포나 유기체에 정상적으로 존재하지만, 예를 들어, 비자연적으로 결합된 요소 및, 일부 구현예에서는, 비내인성 조절 요소(예: 프로모터)의 조절 하에 돌연변이나 삽입에 의해 변경되거나 변형된 폴리펩티드, 유전자 또는 유전자 산물을 또한 포함한다.

[0125] **숙주 세포(host cell)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산 또는 단백질이 도입된 세포를 지칭한다. 본 개시를 읽는 당업자는 이러한 용어가 특정한 대상 세포를 언급하는 것 뿐 아니라 이러한 세포의 자손을 언급하기 위해 사용된다는 것을 이해할 것이다. 돌연변이 또는 환경적 영향에 의해 다음 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 부모세포와 사실 상 동일하지 않을 수 있지만, "숙주 세포"라는 용어의 범주 내에 여전히 포함된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포이거나 이를 포함한다. 일반적으로, 숙주 세포

는 해당 세포가 지정된 계(Kingdom of life)와 무관하게 이중 핵산 또는 단백질을 받고/받거나 생산하기에 적합한 임의의 세포이다. 예시적인 세포는 원핵세포 및 진핵세포(단세포 또는 다세포), 박테리아 세포(예: 대장균(*Escherichia coli*), 고초균 종(*Bacillus spp.*), 스트렙토미세스 종(*Streptomyces spp.*) 등의 균주), 마이코박테리아 세포, 진균 세포, 효모 세포(예: 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 피치아 메타놀리카(*Pichia methanolica*) 등), 식물 세포, 곤충 세포(예: SF-9, SF-21, 배콜로바이러스에 감염된 곤충 세포, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*) 등), 비인간 동물 세포, 인간 세포, 또는 세포 융합체, 예컨대 하이브리도마(hybridoma) 또는 퀼드로마(quadroma) 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 랫트, 또는 마우스 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 진핵세포이고, 다음의 세포로부터 선택된다: CHO(예를 들어, CHOK1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS(예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장(예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60(예를 들어, BHK21), Jurkat, Daudi, A431(상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127세포, SP2/0, NS-0, MMT 060562, Sertoli 세포, BRL 3A 세포, HT1080 세포, 골수종 세포, 종양 세포, 및 전술한 세포로부터 유래한 세포주. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포(예를 들어, PER.C6® 세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 단리된 세포이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 조직의 일부이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 유기체의 일부이다.

[0126] **동일성(identity):** 서열의 비교와 관련하여 본원에서 사용되는 바와 같이, 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 측정하는 데 사용될 수 있는 당업계에 알려진 다수의 상이한 알고리즘에 의해 결정되는 동일성을 지칭한다. 일부 구현예에서, 본원에 설명된 동일성은 10.0의 오픈 겟 패널티, 0.1의 연장갭 패널티를 채용한 ClustalW v.1.83 (slow) 정렬 및 Gonnet 유사성 매트릭스(MACVECTOR® 10.0.2, MacVECTOR Inc., 2008)를 사용하여 결정된다.

[0127] **시험관 내(in vitro):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 다세포 유기체 내에서가 아니라, 인공적인 환경, 예를 들어 시험관이나 반응 용기, 세포 배양기 등에서 발생하는 이벤트를 지칭한다.

[0128] **생체 내:** 본원에서 사용되는 바와 같이, 인간 및/또는 비인간 동물과 같은 다세포 유기체 내에서 발생하는 이벤트를 지칭한다. 세포 기반 시스템의 맥락에서, 상기 용어는 (예를 들어 시험관 내 시스템과 반대로) 활 세포 내에서 발생하는 이벤트를 지칭하도록 사용될 수 있다.

[0129] **단리된(isolated):** 본원에서 사용되는 바와 같이, (1) (자연계에서 및/또는 실험실 세팅에서의 여부를 불문하고) 초기에 생성될 때 연관되었던 성분의 적어도 일부로부터 분리되었고/되었거나, (2) 사람의 손에 의해 설계, 생산, 제작 및/또는 제조된 물질 및/또는 개체를 지칭한다. 단리된 물질 및/또는 개체는 초기에 연관되었던 다른 성분의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99%보다 더 많은 부분으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시예에서, 단리된 제제는 초기에 연관되었던 다른 성분의 10% 내지 100%, 15%~100%, 20%~100%, 25%~100%, 30%~100%, 35%~100%, 40%~100%, 45%~100%, 50%~100%, 55%~100%, 60%~100%, 65%~100%, 70%~100%, 75%~100%, 80%~100%, 85%~100%, 90%~100%, 95%~100%, 96%~100%, 97%~100%, 98%~100% 또는 99%~100%로부터 분리된다. 일부 실시예에서, 단리된 제제는 그들이 초기에 연관되었던 다른 성분의 10% 내지 100%, 10%~99%, 10%~98%, 10%~97%, 10%~96%, 10%~95%, 10%~90%, 10%~85%, 10%~80%, 10%~75%, 10%~70%, 10%~65%, 10%~60%, 10%~55%, 10%~50%, 10%~45%, 10%~40%, 10%~35%, 10%~30%, 10%~25%, 10%~20%, Ehsms 10%~15%로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 단리된 제제는 그들이 초기에 연관되었던 다른 성분의 11% 내지 99%, 12%~98%, 13%~97%, 14%~96%, 15%~95%, 20%~90%, 25%~85%, 30%~80%, 35%~75%, 40%~70%, 45%~65%, 50%~60%, 또는 55%~60%로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 단리된 제제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99%보다 더 많이 순수하다. 일부 구현예에서, 단리된 제제는 80%~99%, 85%~99%, 90%~99%, 95%~99%, 96%~99%, 97%~99%, 또는 98%~99% 순수이다. 일부 실시예에서, 단리된 제제는 80%~99%, 80%~98%, 80%~97%, 80%~96%, 80%~95%, 80%~90%, 또는 80%~85% 순수이다. 일부 실시예에서, 단리된 제제는 85%~98%, 90%~97%, 또는 95%~96% 순수이다. 일부 구현예에서, 실질적으로 다른 성분이 없는 경우에 물질은 "순수"하다. 일부 구현예에서, 당업자에게 이해되는 바와 같이, 물질은, 예를 들어, 하나 이상의 담체 또는 부형제(예를 들어, 완충액, 용매, 물 등)와 같은 어떤 다른 성분과 조합된 후에도 여전히 "단리"되거나 심지어 "순수"한 것으로 간주될 수 있는데; 이러한 구현예에서, 물질의 단리 또는 순도 백분율은 이러한 담체 또는 부형제를 포함하지 않고 계산된다. 하나의 예로서, 일부 구현예에서, 자연에서 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 생물학적 폴리머는: a) 파생의 기원 또는 공급원으로 인해 자연계에서의 원래의 상태에서

동반되는 일부 또는 전체 성분과 연관되어 있는 경우; b) 자연에서 이를 생산하는 종과 동일한 종의 다른 폴리펩티드 또는 핵산이 실질적으로 없는 경우; 또는 c) 자연에서 이를 생산하는 종의 것이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템의 성분에 의해 발현되거나 아니면 이와 연관되어 있는 경우에 "단리된" 것으로 간주된다. 따라서, 예를 들어, 일부 구현예에서, 화학적으로 합성되거나 자연계에서 폴리펩티드를 생산하는 세포 시스템과 상이한 세포 시스템에서 합성된 폴리펩티드는 "단리된" 폴리펩티드로 간주된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 하나 이상의 정제 기술을 거친 폴리펩티드는, a) 상기 폴리펩티드가 자연에서 연관되는 다른 성분; 및/또는 b) 상기 폴리펩티드가 초기에 생산될때 연관되었던 다른 성분으로부터 분리된 정도까지 "단리된" 폴리펩티드로 간주될 수 있다.

[0130] **유전자좌(locus 또는 loci)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자(또는 유의 서열), DNA 서열, 폴리펩티드 암호화 서열의 특정한 위치(들), 또는 유기체 게놈의 염색체 상에서의 위치를 지칭한다. 예를 들어, "면역글로불린 유전자좌(immunoglobulin locus)"는 면역글로불린 유전자 분절(예: V, D, J 또는 C), 면역글로불린 유전자 분절 DNA 서열, 면역글로불린 유전자 분절 암호화 서열의 특정한 위치, 또는 이러한 서열이 상주하는 곳으로 식별된 유기체 게놈의 염색체 상에서의 면역글로불린 유전자 분절의 위치를 지칭할 수 있다. "면역 글로불린 유전자좌"는 인핸서, 프로모터, 5' 및/또는 3' 조절 서열 또는 영역, 또는 이들의 조합을 포함하되 이들로 한정되지 않는 면역글로불린 유전자 분절의 조절 요소를 포함할 수 있다. "면역글로불린 유전자좌"는 야생형 유전자좌에서의 유전자 분절 사이에 정상적으로 상주하는 DNA를 포함할 수 있지만, DNA 자체는 면역글로불린 유전자 분절(예를 들어, V 유전자 분절의 군과 J 유전자 분절의 군 사이에 자연적으로 상주하는 면역글로불린 DNA 서열, J 유전자 분절의 군과 불변 영역 유전자 사이에 자연적으로 상주하는 면역글로불린 DNA 서열, 또는 불변 영역 유전자의 3'에 자연적으로 상주하는 면역글로불린 DNA 서열)이 결여되어 있다. 당업자는, 일부 구현예에서, 염색체가 수백 또는 수천 개의 유전자를 포함할 수 있고, 상이한 종 간에 비교했을 때 유사한 유전자좌가 물리적으로 동일 위치에 존재함을 입증할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 이러한 유전자좌는 공유 신터니(synteny)를 갖는 것으로 기술될 수 있다.

[0131] **비인간 동물(non-human animal)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 인간이 아닌 임의의 척추 동물 유기체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 원규류, 경골어, 연골 어류(예를 들어, 상어 또는 가오리), 양서류, 파충류, 포유동물, 및 새이다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 포유류이다. 일부 구현예에서, 비인간 포유류는 영장류, 염소, 양, 돼지, 개, 소, 또는 설치류이다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 랫트 또는 마우스와 같은 설치류이다.

[0132] **핵산(nucleic acid)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 사슬에 통합되거나 통합될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 인산디에스테르 결합을 통해 올리고뉴클레오타이드 사슬에 포함되거나 포함될 수 있는 화합물 및/또는 물질이다. 문맥으로부터 명백해지는 바와 같이, 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기(예를 들어, 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오시드)를 지칭하고; 일부 구현예에서, "핵산"은 개별적인 핵산 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 사슬을 지칭한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 RNA이거나 이를 포함하고; 일부 구현예에서, "핵산"은 DNA이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 자연적인 핵산 잔기이거나 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 핵산 유사체이거나 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 핵산 유사체는 인산디에스테르 골격을 활용하지 않는다는 점에서 "핵산"과 다르다. 예를 들어, 일부 구현예에서, "핵산"은 당염기에 알려져 있고 백본 내에 인산디에스테르 결합 대신 펩티드 결합을 갖는 하나 이상의 "펩티드 핵산"이거나, 이를 포함하거나 이로 구성된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, "핵산"은 인산디에스테르 결합보다는 하나 이상의 포스포로티오에이트 및/또는 5'-N-포스포라미디드 결합을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 자연적인 뉴클레오시드(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신, 및 데옥시시티딘)이거나, 이를 포함하거나, 이로 구성된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 뉴클레오시드 유사체(예를 들어, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-아이오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-테자아데노신, 7-테자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, 0(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화 염기, 삽입 염기, 및 이의 조합)이거나, 이를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 천연 핵산의 당과 비교해 하나 이상의 변형된 당(예를 들어, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-데옥시리보스, 아라비노스, 및 핵소스)을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 RNA 또는 폴리펩티드와 같은 기능성 유전자 산물을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 하나 이상의 엑손을 포함한다. 일부 구현예에서, "핵산"은 자연 공급원 유래의 하나 이상의

단리체, 상보성 템플릿에 기반한 중합화에 의한 효소적 합성(체내 또는 시험관내), 재조합 세포나 시스템에서의 재생산, 및 화학적 합성 중 하나 이상에 의해 제조된다. 일부 구현예에서, "핵산"은 적어도, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 또는 5000개 이상의 잔기 길이이지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, "핵산"은 단일 가닥이고; 일부 구현예에서, "핵산"은 이중 가닥이다. 일부 구현예에서, "핵산"은 폴리펩티드를 암호화하는 서열에 상보적이거나 폴리펩티드를 암호화하는 적어도 하나의 요소를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 가진다. 일부 구현예에서, "핵산"은 효소 활성을 가진다.

[0133] **작동 가능하게 연결된 (operatably linked):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 기술된 성분이 의도된 방식으로 기능하는 것을 허용하는 관계에 있는 병치(juxtaposition)를 지칭한다. 예를 들어, 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절이 항원 결합 단백질의 폴리펩티드 사슬로서 불변 영역 유전자와 함께 발현되는 재배열된 가변 영역 유전자를 형성하도록 재배열될 수 있는 경우, 재배열되지 않은 가변 영역 유전자 분절은 연속적인 불변 영역 유전자에 "작동 가능하게 연결"된다. 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 호환가능한 조건 하에 달성되도록 연결된다. "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자에 인접한 발현 조절 서열 및 관심 유전자(또는 관심 서열)를 조절하기 위해 일정한 거리에서 또는 인 트랜스(in trans)로 작용하는 발현 조절 서열을 포함한다. 용어 "발현 조절 서열"은 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는데, 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 이들이 연결되는 암호화 서열의 발현 및 가공에 영향을 미치기 위해 필요하다. "발현 조절 서열(expression control sequence)"은 다음을 포함한다: 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증진하는 서열; 폴리펩티드 안정성을 증진하는 서열(코작 공통 서열(Kozak consensus sequence)); 및 필요에 따라, 폴리펩티드 분비를 증진하는 서열. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 유기체에 따라 다르다. 예를 들어, 원핵생물에서, 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함하는 반면, 진핵생물에서, 통상적으로, 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. "조절 서열(control sequence)"이라는 용어는 발현 및 프로세싱을 위해 필수적으로 있어야 하는 성분을 포함하도록 의도되며, 있으면 유리한 추가적인 성분, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수도 있다.

[0134] **생리학적 조건(physiological conditions):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 세포나 유기체가 생존하고/하거나 재생산되는 조건을 참조하는 당업계에서 이해되는 의미를 지칭한다. 일부 구현예에서, 상기 용어는 유기체 또는 세포계에 대해 본질적으로 발생할 수 있는 외부 또는 내부 환경 조건을 포함한다. 일부 구현예에서, 생리학적 조건은 인간 또는 비-인간 동물의 체내에 존재하는 이러한 조건, 특히 수술 부위 지점 및/또는 내부에 존재하는 조건이다. 생리학적 조건은 일반적으로, 예를 들어, 20°C~40°C의 온도 범위, 1의 대기압, 6~8의 pH, 1~20 mM의 당농도, 대기 수준의 산소 농도, 및 지표 상에서 발생하는 중력을 포함한다. 일부 구현예에서, 실험실에서의 조건은 생리학적 조건으로 조작되고/되거나 유지된다. 일부 구현예에서, 생리학적 조건은 유기체 상에서 발생한다.

[0135] **폴리펩티드 (polypeptide):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산의 임의의 폴리머 사슬을 지칭한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 자연에서 발생하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 자연에서 발생하지 않는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 서로 별개로 자연에서 발생하는 부분(즉, 2종 이상의 상이한 유기체로부터, 예를 들어, 인간 및 비-인간 부위)을 함유하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 사람의 손의 작용을 통해 설계되고/되거나 생산된 조작된 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 자연에서 발생하지 않는 서열(예: 상기 폴리펩티드를 암호화하도록 사람의 손의 작용을 통해 설계되고/되거나 생산된다는 점에서 조작된 서열)에 의해 암호화된 아미노산 서열을 가진다.

[0136] **재조합 (recombinant):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 재조합 수단에 의해 설계, 조작, 제작, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드, 예컨대 숙주 세포로 형질 감염된 재조합 발현 벡터를 사용해 발현된 폴리펩티드, 재조합 조합 인간 폴리펩티드 라이브러리로부터 단리된 폴리펩티드(Hoogenboom H. R., 1997, TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H. 및 Highsmith W. E., 2002, Clin. Biochem. 35:425-45; Gavilondo J. V. 및 J. W. Larrick, 2002, BioTechniques 29:128-45; Hoogenboom H. 및 P. Chames, 2000, Immunol. Today 21:371-8), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자 이식된 동물(예: 마우스)로부터 단리된 항체(예: Taylor, L. D. 외, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-95; Kellermann, S-A. 및 L.L. Green, 2002, Curr. Opin. Biotechnol. 13:593-7; Little, M. 외, 2000, Immunol. Today 21:364-70; Osborn, M.J. 외, 2013, J. Immunol. 190:1481-90; Lee, E-C. 외, 2014, Nat. Biotech. 32(4):356-63; Macdonald, L.E. 외, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

111(14):5147-52; Murphy, A.J. 외, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-8 참조) 또는 선택된 서열을 서로 접합시키는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제작, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드를 지칭하도록 의도된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는 자연에서 발견된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는 인 실리코(*in silico*) 설계된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 이러한 선택된 서열 요소는, 예를 들어, 자연 또는 합성 공급원으로부터의 알려진 서열 요소의 돌연변이 유발(예를 들어, *생체 내* 또는 *시험관 내*)로부터 유래한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 관심 유기체원(예를 들어, 인간, 마우스 등)의 게놈에서 발견되는 서열로 이루어진다. 일부 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 (예를 들어, 비인간 동물 내에서, 예를 들어, 시험관 내 또는 생체 내) 돌연변이 유발로부터 유래한 아미노산 서열을 가지므로, 재조합 폴리펩티드의 아미노산 서열은 폴리펩티드 서열로부터 기원하고 이와 관련되지만 비인간 동물의 생체 내 게놈 내에서는 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0137] **기준(reference):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 제제, 동물, 코호트, 개체, 모집단, 샘플, 관심 서열 또는 관심 값이 비교되는 표준 제제 또는 대조 제제, 동물, 코호트, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값을 지칭한다. 일부 구현예에서, 기준 제제, 동물, 코호트(cohort), 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 제제, 동물, 코호트, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값의 시험 또는 결정과 실질적으로 동시에 시험 및/또는 결정된다. 일부 구현예에서, 기준 제제, 동물, 코호트, 개체, 집단, 샘플, 서열 또는 값은, 선택적으로 유형 매체로 구현된, 역사적 기준이다. 일부 구현예에서, 기준은 대조군을 지칭할 수 있다. "기준"은 "기준 동물"을 포함할 수도 있다. "기준 동물"은 본원에 설명된 변형, 본원에 설명된 것과는 다른 변형을 가지거나 변형을 가지지 않을 수 있다 (즉, 야생형 동물). 통상적으로, 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 기준 제제, 동물, 코호트, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심 제제, 동물(예: 포유류), 코호트, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값을 결정하거나 특성화하는 데 사용된 것에 필적할만한 조건 하에 결정되거나 특성화된다.

[0138] **대체(replacement):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 숙주 유전자좌에서 (예: 게놈에서) 발견된 "대체된" 핵산 서열(예: 유전자)이 해당 유전자좌로부터 제거되고, 상이한 "대체" 핵산이 그 자리에 위치하는 과정을 지칭한다. 일부 구현예에서, 대체된 핵산 서열 및 대체 핵산 서열은, 예를 들어 이들은 서로 상동성이거나/이거나 상응하는 요소(예를 들어, 단백질-코딩 요소, 조절 요소 등)를 함유한다는 점에서 서로 유사하다. 일부 구현예에서, 대체된 핵산 서열은 프로모터, 증강자, 접합 공여 부위, 접합 수용 부위, 인트론, 엑손, 미번역 영역(UTR) 중 하나 이상을 포함하고; 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 하나 이상의 코딩 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 대체된 핵산 서열의 상동체이거나 변이체(예: 돌연변이)이다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 대체된 서열의 오소로그(ortholog)이거나 상동체이다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 인간 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열이 인간 핵산 서열이거나 이를 포함하는 경우를 포함하여, 대체된 핵산 서열은 설치류 서열(예를 들어, 마우스 또는 랫트 서열)이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열이 인간 핵산 서열이거나 이를 포함하는 경우를 포함하여, 대체된 핵산 서열은 인간 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 대체 핵산 서열은 대체된 서열의 변이체 또는 돌연변이(즉, 대체된 서열과 비교하여 하나 이상의 서열 차이, 예컨대 치환을 함유하는 서열)이다. 이렇게 배치된 핵산 서열은 이렇게 배치된 서열을 획득하기 위해 사용된 핵산 서열원(source nucleic acid sequence)의 일부(예를 들어, 프로모터, 증강자, 5'- 또는 3'-미번역 영역 등)인 하나 이상의 조절 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다양한 구현예에서, 대체는 내인성 서열을 이중 서열과 치환시킴으로써 그렇게 삽입된 핵산 서열(이중 서열 포함)로부터 유전자 산물을 생성시키되 내인성 서열을 발현하지 않는 치환이며; 대체는 내인성 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드와 유사한 기능을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열로 내인성 게놈 서열을 치환하는 것이다(예를 들어, 내인성 게놈 서열은 비인간 가변 도메인 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하고, DNA 단편은 하나 이상의 인간 가변 도메인 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화함). 다양한 구현예에서, 내인성 비인간 면역글로불린 유전자 분절 또는 이의 단편은 인간 면역글로불린 유전자 분절 또는 이의 단편으로 대체된다.

[0139] **실질적으로(substantially):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 관심 특성 또는 성질의 전체 범위나 정도 또는 근사 전체 범위 또는 정도를 나타내는 정성적인 조건을 포함한다. 생물학 분야의 숙련자는 생물학적 및 화학적 현상이 완료되고/되거나 완료에 이르거나, 절대적인 결과를 달성하거나 피하는 경우는 거의 없다는 것을 이해할 것이다. 따라서, "실질적으로"라는 용어는 많은 생물학적 및 화학적 현상에 내재된 완전성의 잠재적인 결여를 포착하도록 본원에서 사용된다.

[0140] **실질적 상동(substantial homology):** 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열 간의 비교를 지칭한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 2개의 서열이 상응하는 위치에 상동성 잔기를 함유하는 경우, 이들은

"실질적 상동성"인 것으로 일반적으로 간주된다. 상동성 잔기는 동일한 잔기일 수 있다. 대안적으로, 상동성 잔기는 적절하게 유사한 구조적 및/또는 기능적 특성을 갖는 동일하지 않은 잔기일 수 있다. 예를 들어, 당업자에게 공지된 바와 같이, 특정 아미노산은 일반적으로 "소수성" 또는 "친수성" 아미노산으로서, 및/또는 "극성" 또는 "비극성" 측쇄를 갖는 것으로서 분류된다. 하나의 아미노산이 동일한 유형의 다른 것으로 치환되는 것은 흔히 "상동성" 치환으로 간주될 수 있다. 일반적인 아미노산 분류가 아래의 표에 요약되어 있다.

알라닌	Ala	A	비극성	중성	1.8
아르기닌	Arg	R	극성	양성	-4.5
아스파라긴	Asn	N	극성	중성	-3.5
아스파르트산	Asp	D	극성	음성	-3.5
시스테인	Cys	C	비극성	중성	2.5
글루탐산	Glu	E	극성	음성	-3.5
글루타민	Gln	Q	극성	중성	-3.5
글리신	Gly	G	비극성	중성	-0.4
히스티딘	His	H	극성	양성	-3.2
이소류신	Ile	I	비극성	중성	4.5
류신	Leu	L	비극성	중성	3.8
라이신	Lys	K	극성	양성	-3.9
메티오닌	Met	M	비극성	중성	1.9
페닐알라닌	Phe	F	비극성	중성	2.8
프롤린	Pro	P	비극성	중성	-1.6
세린	Ser	S	극성	중성	-0.8
트레오닌	Thr	T	극성	중성	-0.7
트립토판	Trp	W	비극성	중성	-0.9
티로신	Tyr	Y	극성	중성	-1.3
발린	Val	V	비극성	중성	4.2

[0141]

모호 아미노산	3자	1자
아스파라긴 또는 아스파르트산	Asx	B
글루타민 또는 글루탐산	Glx	Z
류신 또는 이소류신	Xle	J
불특정 또는 불명 아미노산	Xaa	X

[0142]

[0143]

당업계에서 잘 알려진 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은, 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 갭 BLAST 및 PSI-BLAST와 같이 상업적 컴퓨터 프로그램에서 사용할 수 있는 것들을 포함하여, 임의의 다양한 알고리즘을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 Altschul, S. F. 외, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul S.F. 외의 1996, Meth. Enzymol. 266:460-80; Altschul, S.F. 외의 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 및 Misener 외 (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132, Humana Press, 1998에 기술되어 있다. 상동성 서열을 확인하는 것 외에도, 전술된 프로그램은 일반적으로 상동성의 정도에 대한 지표를 제공한다. 일부 구현예에서, 2개의 서열의 상응하는 잔기의 적어도, 예를 들어, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상(이에 한정되지 않음)이 잔기의 관련 구간에 걸쳐 상동성인 경우 2개의 서열은 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17개 이상의 잔기이다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 완전한 서열을 따라 인접 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 전체 서열을 따라 불연속 잔기, 예를 들면, 폴리펩티드 또는 이의 부분의 접힌 형태에 의해 한데 모인 인접하지 않은 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 관련 구간은 적어도, 예를 들어, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 잔기이다.

[0144]

실질적 동일성(substantial identity): 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 서열 또는 핵산 서열 간의 비교를 지칭한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 2개의 서열이 상응하는 위치에 동일한 잔기를 함유하는 경우, 이들은 "실질적으로 동일한" 것으로 일반적으로 간주된다. 당업계에서 공지된 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 서열은, 뉴클레오티드 서열에 대한 BLASTN 및 아미노산 서열에 대한 BLASTP, 갭 BLAST 및 PSI-BLAST와 같이 상

업적 컴퓨터 프로그램에서 사용할 수 있는 것들을 포함하여, 임의의 다양한 알고리즘을 사용하여 비교될 수 있다. 예시적인 이러한 프로그램은 Altschul, S. F. 외, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul S.F. 외의 1996, Meth. Enzymol. 266:460-80; Altschul, S.F. 외의 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D. and B.F.F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 및 Misener 외 (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132, Humana Press, 1998에 기술되어 있다. 동일한 서열을 확인하는 것 외에도, 전송된 프로그램은 일반적으로 동일성의 정도에 대한 지표를 제공한다. 일부 구현예에서, 2개의 서열의 상응하는 잔기의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상이 잔기의 관련 구간에 걸쳐 동일한 경우 이들은 실질적으로 동일한 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 잔기의 관련 구간은 완전한 서열이다. 일부 구현예에서, 잔기의 관련 구간은 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 잔기이지만, 이에 한정되지 않는다.

[0145] **표적화 작제물(targeting construct)** 또는 표적화 벡터(**targeting vector**): 본원에서 사용되는 바와 같이, 표적 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 표적화 영역은, 표적 세포, 조직 또는 동물 내 서열과 동일하거나 실질적으로 동일하고 상동성 재조합을 통해 세포, 조직 또는 동물의 게놈 내 위치에 표적화 구조체의 통합을 제공하는 서열을 포함한다. 부위 특이적 재조합효소 인식 부위(예를 들어, *loxP* 또는 *Frt* 부위)를 이용하여 표적화하는 표적화 영역도 본원에 포함되어 기술된다. 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 표적화 작제물은 특정한 관심 핵산 서열 또는 유전자, 선별성 마커, 제어 및/또는 조절 서열, 및 이러한 서열을 포함하는 재조합을 돕거나 용이하게 하는 단백질의 외인성 첨가를 통해 매개되는 재조합을 가능하게 하는 다른 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 작제물은 관심 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 더 포함하되, 관심 유전자는 내인성 서열에 의해 암호화된 단백질과 유사한 기능을 갖는 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 이중 유전자이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 작제물은 관심 인간화 유전자를 전체적 또는 부분적으로 더 포함하되, 관심 인간화 유전자는 내인성 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드와 유사한 기능을 갖는 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화한다. 일부 구현예에서, 표적화 작제물(또는 표적화 벡터)은 사람의 손에 의해 조작되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 표적화 작제물(또는 표적화 벡터)은, 자연에서는 그러한 순서로 함께 연결되지 않지만 조작된 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 폴리뉴클레오티드에서는 서로 직접 연결되도록 사람의 손에 의해 조작되는 둘 이상의 서열을 함유하는 조작된 폴리뉴클레오티드 또는 재조합 폴리뉴클레오티드를 함유하도록 작제될 수 있다.

[0146] **이식유전자(transgene)** 또는 이식유전자 작제물(**transgene construct**): 본원에 사용된 바와 같이, 사람의 손에 의해, 예컨대 본원에 기술된 방법에 의해 세포 내로 도입된 핵산 서열(예를 들어, 관심 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화함)을 지칭한다. 또한, 이식유전자는 이식유전자가 도입되는 유전자이식 동물 또는 세포에 대해 부분적으로 또는 전체적으로 이중, 즉 외래일 수 있다. 이식유전자는 하나 이상의 전사 조절 서열 및 선택된 핵산 서열의 발현에 필요할 수 있는 임의의 다른 핵산, 예컨대 인트론이나 프로모터를 포함할 수 있다.

[0147] **유전자이식 동물(transgenic animal)**, 유전자이식 비인간 동물(**transgenic non-human animal**) 또는 Tg^+ : 본원에서는 상호 교환적으로 사용되며, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 이중 핵산 및/또는 유전자를 전체적으로 또는 부분적으로 함유하는 하나 이상의 비인간 동물 세포를 가진 임의의 비자연 발생적 비인간 동물을 지칭한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, **유전자 이식 동물** 또는 **"유전자이식 비인간 동물"**은 본원에 기술된 이식유전자 또는 이식유전자 작제물을 함유하는 동물 또는 비인간 동물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 이중 핵산 및/또는 유전자는 미세주입이나 재조합 바이러스 감염에 의한 것과 같은, 고의적인 유전자 조작에 의해 전구체 세포에 도입됨으로써 세포 내에 직접 및/또는 간접적으로 도입된다. 유전자 조작이라는 용어는 고전적인 교배 기술을 포함하지 않고, 오히려 재조합 DNA 분자(들)의 도입에 관한 것이다. 이러한 분자는 염색체 내에 통합되거나, 염색체 외에서 DNA를 복제할 수 있다. 용어 " Tg^+ "는 이중 핵산 및/또는 유전자에 대해 이형접합성 또는 동형접합성인 동물, 및/또는 이중 핵산 및/또는 유전자의 단일 또는 다중-사본을 갖는 동물을 포함한다.

[0148] **변이체(variant)**: 본원에서 사용되는 바와 같이, 기준 개체와 상당한 구조적 동일성을 나타내지만, 기준 개체와 비교하여, 하나 이상의 화학적 모이어티의 존재 또는 수준에서 기준 개체와 구조적으로 상이한 개체를 지칭한다. 많은 구현예에서, "**변이체**"는 또한 기준 개체와 기능적으로 상이하다. 일반적으로, 특정 개체가 기준 개체의 "**변이체**"로 간주되는 것이 적절한지는 기준 개체와의 구조적 동일성의 정도에 기초한다. 당업자가 이해

할 수 있는 바와 같이, 임의의 생물학적 또는 화학적 기준 개체는 특정 특징적인 구조적 요소를 가진다. 정의에 의하면, "변이체(*variant*)"는 하나 이상의 이러한 특징적인 구조적 요소를 공유하는 구분되는 화학적 개체이다. 2개만 예를 들자면, 폴리펩티드가 선형 또는 3차원 공간에서 서로에 대해 상대적으로 지정된 위치를 갖는 복수의 아미노산을 포함하고/하거나 특정 생물학적 기능에 기여하는 특징적인 서열 요소를 가질 수 있거나, 핵산이 선형 또는 3차원 공간에서 서로에 대해 상대적으로 지정된 위치를 갖는 복수의 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 특징적인 서열 요소를 가질 수 있다. 또 다른 예를 들자면, "변이체 폴리펩티드(*variant polypeptide*)"는 아미노산 서열에서의 하나 이상의 차이 및/또는 폴리펩티드 백본에 공유 결합된 화학적 모이어티(예: 탄수화물, 지질 등)에서의 하나 이상의 차이의 결과로서 기준 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 기준 폴리펩티드와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 99%의 전체 서열 동일성을 보인다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 기준 폴리펩티드와 적어도 하나의 특징적인 서열 요소를 공유하지 않는다. 일부 구현예에서, 기준 폴리펩티드는 하나 이상의 생물학적 활성을 가진다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 기준 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 공유한다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 기준 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, "변이체 폴리펩티드"는 기준 폴리펩티드와 비교하여 하나 이상의 생물학적 활성의 수준의 감소를 나타낸다. 많은 구현예에서, 관심있는 폴리펩티드는 관심있는 폴리펩티드가 특정한 위치에서의 소수의 서열 변경을 제외하고 모체의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 경우 모 폴리펩티드 또는 기준 폴리펩티드의 "변이체"인 것으로 간주된다. 통상적으로, 모체에 비해 변이체 내 잔기의 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 또는 2% 미만이 치환된다. 일부 구현예에서, "변이체"는 부모체와 비교해 가령 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 치환된 잔기(들)를 가지지만, 이에 한정되지 않는다. 흔히, "변이체"는 매우 적은 수(예를 들어, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만)의 치환된 기능적 잔기(즉, 특정 생물학적 활성에 참여하는 잔기)를 가진다. 또한, "변이체"는 일반적으로 부모체와 비교해 가령 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 첨가 또는 결실을 가지지만 이에 한정되지 않으며, 흔히는 첨가 또는 결실을 갖지 않는다. 또한, 임의의 첨가 또는 결실은, 통상적으로 약 25, 약 20, 약 19, 약 18, 약 17, 약 16, 약 15, 약 14, 약 13, 약 10, 약 9, 약 8, 약 7, 약 6개 미만, 일반적으로는 약 5, 약 4, 약 3, 또는 약 2개 미만의 잔기이다. 일부 구현예에서, 부모 폴리펩티드 또는 기준 폴리펩티드는 자연계에서 발견되는 것이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 특히 관심 폴리펩티드가 감염원 폴리펩티드인 경우, 특정 관심 폴리펩티드의 복수의 변이체는 자연에서 흔하게 발견될 수 있다.

[0149] **벡터 (vector)**: 본원에서 기술되는 바와 같이, 결합된 다른 핵산을 이송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, 벡터는, 진핵 세포 및/또는 원핵 세포와 같은 숙주 세포에서 벡터가 연결된 핵산의 염색체외 복제 및/또는 발현을 할 수 있다. 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있는 벡터를 본원에서 "발현 벡터"로 지칭한다.

[0150] **야생형**: 본원에서 사용되는 바와 같이, (돌연변이, 질환, 변경 등에 반하여) "정상" 상태로 또는 정상적인 맥락에서 자연계에서 발견되는 구조 및/또는 활성을 갖는 개체를 지칭한다. 당업자는 야생형 유전자 및 폴리펩티드가 흔히 다수의 상이한 형태(예: 대립유전자)로 존재한다는 것을 이해할 것이다.

[0151] 특정 구현예의 상세한 설명

[0152] 특정 양태에서, 무엇보다도 인간 가변 도메인 및, 일부 구현예에서는, 인간 불변 도메인을 암호화하는 이중 유전 물질을 갖는 조작된 비인간 동물이 본원에서 제공되는데, 상기 이중 유전 물질은 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 서열(유전자 분절), 및 인간 부분과 비인간 부분을 갖는 항체나 실질적으로 전체가 인간인 서열을 갖는 항체의 적절한 재배열 및 발현을 제공하는 다른 인간 서열을 포함한다. 다양한 구현예에서, 제공된 조작된 비인간 동물은, 인간 V λ 도메인 및 비인간 C λ 도메인을 갖는 경쇄를 함유한 항체가 비인간 동물의 항체 레퍼토리에서 발현되도록 하는 방식으로 삽입되는 이중 유전 물질을 함유한다. 또한, 제공된 조작된 비인간 동물은, 인간 V λ 도메인 및 인간 또는 비인간 C λ 도메인을 갖는 경쇄를 함유한 항체가 비인간 동물의 생식선 계통에 인간 및 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 발현되도록 하는 방식으로 삽입되는 이중 유전 물질을 함유한다.

[0153] 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 구현예는 치료 항체의 생산을 위해 인간 V λ 도메인을 함유하는 항체의 발현을 활용하는 개선된 생체 내 시스템을 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 구현예는, 일부 구현예에서는, 편향된 항체 반응(예를 들어, κ 또는 λ 경쇄의 압도적인 비율을 특징으로 하는 항체 반응)과 관련되어 있는 질환 표적에 대한 인간 항체 기반 치료제(예를 들어, 인간 단클론 항체, 다중 특이적 결합제, scFv, 융합 폴리펩티드 등)의 개발을 위해 이중

유전 물질을 함유하는 Ig λ 경쇄 유전자좌의 대안적인 조작된 형태를 제공하는 것으로 여겨진다. 따라서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 구현에는 부분적으로 왜곡된 항체 레퍼토리 및/또는 반응에 기인한 부족한 면역원성(예: 바이러스)과 관련된 표적에 대한 인간 항체의 개발에 특히 유용하다.

[0154] 특히 특정 양태에서, 본 개시는 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 함유하는 생식선 계통을 갖는 비인간 동물(예를 들어, 랫트 또는 마우스와 같은 설치류)을 생산하는 것을 기술하는데, 상기 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌는, 일부 구현예에서, 비인간 C λ 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 서열이 도입되어 인간 V λ 도메인 및 인간 또는 비인간 C λ 도메인을 포함하는 경쇄를 함유하는 항체가 발현되는 것을 특징으로 한다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 생산하면, 비인간 동물의 생식선 계통의 상기 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌로부터 인간 V λ 도메인 및 인간 또는 비인간 C λ 도메인을 포함하는 경쇄를 함유하는 항체가 발현된다. 제공된 비인간 동물의 생식선 계통은, 일부 구현예에서, (1) 인간화 IgH 및 Ig λ 유전자좌 또는 (2) 인간화 IgH 유전자좌 및 기능적으로 침묵화되었거나 달리 비기능성이 된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 추가로 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, 제공된 비인간 동물은 인간 V λ 도메인을 포함하는 Ig λ 경쇄를 함유하는 항체 레퍼토리를 발현한다.

[0155] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 단일 Ig λ 경쇄 유전자좌 내에 인간 및 비인간 Ig λ 경쇄 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 Ig λ 경쇄 유전자좌 내에 인간 Ig λ 경쇄 서열 및 쥐과 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트) Ig λ 경쇄 서열을 함유한다. 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 많은 구현예에서, 비인간 Ig λ 경쇄 서열은 쥐과 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트) 서열이거나 이를 포함한다.

[0156] 일부 구현예에서, Ig λ 경쇄 서열은 인간 및/또는 쥐과 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트) 기원의 것인 유전자간(intergenic) DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, Ig λ 경쇄 서열은 인간 또는 쥐과 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트) 기원의 것인 근원 서열에 기초하여 합성된 유전자간 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 유전자간 DNA는 유전자간 DNA가 그렇게 배치되거나, 삽입되거나, 위치되거나 조작되는 동일한 면역글로불린 유전자좌(예: Ig λ 경쇄 유전자좌 내의 Ig λ 유전자간 DNA)의 것이다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 비인간 기원의 Ig λ 경쇄 서열(들)(예: 마우스 또는 랫트 Ig λ 경쇄 서열)을 함유하는 유전자간 DNA를 함유하는 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 함유한다.

[0157] 다양한 구현예에서, 인간화 IgH 유전자좌는 비인간 IgH 불변 영역(예를 들어, IgM, IgG 등과 같은 하나 이상의 IgH 불변 영역 유전자를 포함하는 내인성 비인간 IgH 불변 영역)에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 V H , D H 및 J H 유전자 분절을 함유한다. 다양한 구현예에서, 인간화 Ig κ 경쇄 유전자좌는 비인간 Ig κ 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 V κ 및 J κ 유전자 분절을 함유한다. 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 본원에 제공된 도면(예를 들어, 도 1, 2, 3 및/또는 4 참조)에 예시된 면역 글로불린 유전자좌(또는 대립유전자)를 포함하는 생식선 계통을 가진다. 이러한 조작된 비인간 동물은 인간 항체 및 인간 항체 단편의 공급원, 및/또는 이러한 인간 항체 및 인간 항체 단편을 암호화하는 핵산을 제공하며, 인간 치료 항체의 생산을 위한 인간 V λ 서열을 활용하는 데 적합한 생체 내 시스템을 제공한다.

[0158] 본원에 기술된 바와 같이, 특정 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌에서의 비인간 면역글로불린 λ 경쇄 유전자 분절 대신에 복수의 인간 λ 경쇄 유전자 분절(예, V λ , J λ 및 C λ)을 함유하는 계통을 갖는 비인간 동물이 제공되며, 상기 비인간 동물은 인간 가변 영역 유전자 분절 사이에서 인간 비암호화 유전자간 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 비인간 동물은, 내인성 면역글로불린 중쇄 및 κ 경쇄 유전자좌에서의 비인간 중쇄(V H , D H 및 J H) 및 κ 경쇄(예: V κ 및 J κ) 가변 영역 유전자 분절을 대신해서 인간 중쇄(V H , D H 및 J H) 및 κ 경쇄(예: V κ 및 J κ) 가변 영역 유전자 분절을 각각 추가로 포함하는 계통을 갖는다. 많은 구현예에서, 인간 면역글로불린 유전자 분절(중쇄 및/또는 경쇄)은 상기 유전자 분절(즉, 인간 세포의 인간 면역글로불린 유전자좌에 자연적으로 나타나고 상기 유전자 분절과 연관된 비암호화 계통 DNA)과 자연적으로 연관되는 인간 유전자간 DNA(인간 비암호화 면역글로불린 유전자간 DNA)로 조작된다. 이러한 유전자간 DNA는, 예를 들어, 항체 가변 도메인의 맥락에서 인간 유전자 분절의 적절한 재조합 및 발현을 가능하게 하는 프로모터, 리더 서열 및 재조합 신호 서열을 포함한다. 당업자는 비인간 면역글로불린 유전자좌도 이러한 비암호화 유전자간 DNA를 함유함을 이해하며, 본 개시를 읽는 경우, 이러한 조작된 면역글로불린 유전자좌를 작제하여 비인간 동물에서의 항체의 맥락에서 인간 가변 도메인을 동일하게 발현시키는 데 다른 인간 또는 비인간 유전자간 DNA가 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 인간 가변 도메인을 함유하는 항체의 발현을 달성하기 위해, 이러한 유사한 조작된 면역글로불린 유전자좌는 원하는 인간 유전자 분절 또는 인간 유전자 분절의 조합의 인간 코딩 서열

(즉, 엑손)만을 함유할 필요가 있다.

[0159] 특정 구현예의 다양한 양태는 다음의 섹션에서 상세히 설명되며, 이들 각각은 본원에 기술된 임의의 양태 또는 구현예에 적용될 수 있다. 섹션의 사용은 한정하기 위한 것이 아니며, 달리 언급되지 않는 한 "또는(or)"은 "및/또는(and/or)"을 의미한다.

[0160] 비인간 동물에서의 항체 레파토리

[0161] 면역글로불린(항체라고도 함)은 외래 항원(예를 들어, 바이러스, 박테리아 등)을 중화하기 위해 숙주 면역 시스템의 B 세포에 의해 생산된 크고(~150 Kd), Y 자형인 당단백질이다. 각각의 면역글로불린(Ig)은 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄로 구성되며, 이들 각각은 2가지 구조적 성분인 가변 도메인과 불변 도메인을 가진다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 상이한 B 세포에 의해 생산된 항체에 있어서 상이하지만, 단일 B 세포 또는 B 세포 클론에 의해 생산된 모든 항체에 대해서는 동일하다. 각 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 항원 결합 영역(또는 항원 결합 부위)을 함께 포함한다. 면역글로불린은 이들이 함유하는 중쇄 불변 영역(또는 도메인)에 기초하여 아이소타입 또는 클래스로 지칭되는 상이한 종류로 존재할 수 있다. 중쇄 불변 도메인은 동일한 아이소타입의 모든 항체에 있어서 동일하지만, 상이한 아이소타입의 항체에 있어서는 상이하다. 아래 표는 마우스 및 남성(인간)에서의 9개의 항체 아이소타입을 요약한 것이다.

마우스	인간
IgM	IgM
IgD	IgD
IgG1	IgG1
IgG2a	IgG2
IgG2b	IgG3
IgG2c	IgG4
IgG3	IgE
IgE	IgA1
IgA	IgA2

[0162]

[0163] 추가 아이소타입은 다른 종에서 확인하였다. 아이소타입은 상이한 아이소타입간의 상이한 구조적 특성들로 인해 특화된 생물학적 특성을 항체에 부여하며, 동물 신체 내의 상이한 위치(세포, 조직 등)에서 발견된다. 초기에, B 세포는 동일한 항원 결합 영역을 갖는 IgM 및 IgD를 생산한다. 활성화되면, B 세포는 클래스 스위칭으로 지칭되는 프로세스에 의해 상이한 아이소타입으로 전환되는데, 이는 B 세포에 의해 생산된 항체의 불변 도메인의 변화를 수반하되 가변 도메인은 동일하게 유지되므로, 원 항체(B 세포)의 항원 특이성이 보존된다.

[0164] 2개의 별도 유전자좌(Ig κ 및 Ig λ)는 항체의 경쇄를 암호화하는 유전자 분절을 함유하고, 대립유전자형 및 아이소타입형 배제 모두를 나타낸다. λ^+ B 세포에 대한 κ^+ B 세포의 발현비(expression ratio)는 종들 사이에서 다양하다. 예를 들어, 인간은 약 60:40(κ : λ)의 비를 나타낸다. 마우스 및 랫트에서는 95:5(κ : λ)의 비가 관찰된다. 흥미롭게도, 고양이(5:95)에서 관찰된 κ : λ 비는 마우스 및 랫트의 비와 상반된다. 이러한 관찰된 비에 숨어 있는 가능한 이유를 밝히기 위해 여러 연구가 수행되었고, 유전자좌의 복잡성(즉, 유전자 분절 수, 특히 V 유전자 분절 수) 및 유전자 분절 재배열의 효율 둘 다가 근거로서 제시되었다. 인간 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 1,000kb에 걸쳐 연장되며, 3개의 클러스터로 구성된 약 70개의 V λ 유전자 분절(29 내지 33개는 기능성임) 및 7개의 J λ -C λ 유전자 분절쌍(4 내지 5개는 기능성임)을 함유한다(예를 들어, 미국 특허 제 9,006,511호의 도 1 참조). 발현된 항체 레파토리에서 관찰된 V λ 영역의 대부분은 가장 근위 클러스터(즉, 클러스터 A) 내에 함유된 유전자 분절에 의해 암호화된다. 마우스 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 유전자좌와 크게 상이하며, 계통에 따라서는 2개의 구별되는 유전자 클러스터로 구성된 몇 개의 V λ 및 J λ 유전자 분절만을 함유한다(예를 들어, 미국 특허 제 9,006,511호의 도 2 참조).

[0165] 다양한 인간 질환의 치료를 위한 치료 항체의 개발은 크게는 인간 면역글로불린 유전자에 상응하는 다양한 유전 물질을 그들의 게놈에 보유하는 조작된 비인간 동물 계통, 특히 조작된 설치류 계통의 생성에 중점을 두었다(예를 들어, Bruggemann, M. 외, 2015, Arch. Immunol. Ther. Exp. 63:101-8에서 검토됨). 이러한 유전자 이식 설치류 계통을 생성함에 있어서의 초기 노력들은, 불활성화된 내인성 면역글로불린 유전자좌를 갖지만 전적으로 인간이던 유전자 분절의 재조합 및 중쇄 및/또는 경쇄의 생산을 그 자체만으로도 지지할 수 있었던 인간 면역글로불린 유전자좌 부분들의 통합에 초점을 맞추었다(예를 들어, Bruggemann, M. 외의, 1989, Proc. Nat. Acad.

Sci. U.S.A. 86:67-09-13; Bruggemann, M. 외의, 1991, Eur. J. Immunol. 21:1323-6; Taylor, L.D. 외의, 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Davies, N.P. 외의, 1993, Biotechnol. 11:911-4; Green, L.L. 외의, 1994, Nat. Genet. 7:13-21; Lonberg, N. 외의, 1994, Nature 368:856-9; Taylor, L.D. 외의, 1994, Int. Immunol. 6:579-91; Wagner, S.D. 외의, 1994, Eur. J. Immunol. 24:2672-81; Fishwild, D.M. 외의, 1996, Nat. Biotechnol. 14:845-51; Wagner, S.D. 외의, 1996, Genomics 35:405-14; Mendez, M.J. 외의, 1997, Nat. Genet. 15:146-56; Green, L.L. 외의, 1998, J. Exp. Med. 188:483-95; Xian, J. 외의, 1998, Transgenics 2:333-43; Little, M. 외의, 2000, Immunol. Today 21:364-70; Kellermann, S.A. 및 L.L. Green, 2002, Cur. Opin. Biotechnol. 13:593-7을 참조한다). 특히, 일부 노력은 인간 Igλ 경쇄 서열의 통합을 포함하였다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2002/0088016 A1호, 제2003/0217373 A1호 및 제2011/0236378 A1호; 미국 특허 제 6,998,514호 및 제7,435,871호; Nicholson, I.C. 외의 1999, J. Immunol. 163:6898-906; Popov, A.V. 외의 1999, J. Exp. Med. 189(10):1611-19를 참조한다). 이러한 노력은 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 서열을 함유하는 효모 인공 염색체의 무작위 통합에 초점을 맞추므로써, 완전한 인간 λ 경쇄(즉, 인간 가변 및 인간 불변)를 발현하는 마우스 계통을 생성하였다. 더 최근의 노력에는 작제물을 사용하는 유사한 전략이 사용되었는데, 상기 작제물도 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 서열을 함유한다(Osborn, M.J. 외, 2013, J. Immunol. 190:1481-90; Lee, E-C. 외, 2014, Nat. Biotech. 32(4):356-63).

[0166] 또 다른 노력에는, 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절이 내인성 Ig 경쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결되도록 상기 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 내인성 설치류 경쇄 유전자좌(κ 및 λ) 내에 특이적으로 삽입하는 것이 포함되었다(예를 들어, 미국 특허 제9,006,511호, 제9,012,717호, 제9,029,628호, 제9,035,128호, 제9,066,502호, 제9,150,662호 및 제9,163,092호를 참조하며; 이들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 이러한 동물의 경우, 클러스터 A 및 B 유래의 모든 인간 Vλ 유전자 분절 및 하나 또는 4개의 인간 Jλ 유전자 분절을 내인성 Igκ 및 Igλ 경쇄 유전자좌 내에 삽입하였다. 결과적으로, 몇 가지 상이한 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절은 조작된 설치류 Ig 경쇄 유전자좌 모두에서 기능성 인간 Vλ 도메인을 형성하도록 적절하게 재배열되는 것으로 나타났는데, 상기 기능성 인간 Vλ 도메인은 설치류 항체 레파토리의 경쇄에서 Cκ 및 Cλ 영역 모두의 맥락에서 발현되었다(예를 들어, 미국 특허 제9,006,511호의 표 7 및 도 11 내지 도 13참조). 특히, 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절을 보유하는 조작된 Igκ 경쇄 유전자좌를 갖는 마우스는 비장 구획(splenic compartment)에서 약 1:1의 κ:λ 비를 나타냈다(예를 들어, 미국 특허 제9,006,511호의 표 4 참조). 실제로, 조작된 마우스 계통(즉, 조작된 Igκ 또는 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌) 모두는 설치류의 내인성 Ig 경쇄 유전자좌로부터 인간 Vλ 도메인이 발현될 수 있음을 입증하였는데, 이들은 경쇄 발현의 경우 대개는 큰 편향성을 보인다(상기 참조). 본 발명은, 특히 (인간 세포에서 나타나는) 인간 Igλ 경쇄 유전자좌와 일반적으로 연관된 복잡성과 강력한 품질이 결여된 Igλ 경쇄 유전자좌를 함유하는 비인간 동물(예: 마우스 및 랫트)과 비교했을 때, 다른 조작된 Ig 경쇄 유전자좌 구조들이 비인간 동물에서의 치료 표적에 대한 항체 레파토리에서 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절의 사용을 최대화하도록 생산될 수 있다는 인식에 기초한다. 이러한 대안적인 조작된 Ig 경쇄 유전자좌 구조는 이들의 설계로부터 나타나는 독특한 항체 레파토리에 대한 능력을 제공한다.

[0167] 본 개시는, 무엇보다도, 비인간 Igλ 경쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 유전자 분절을 포함하는 조작된 내인성 Igλ 경쇄 유전자좌를 함유하는 생식선 계통을 가진 비인간 동물의 성공적인 생산을 기술한다. 특히, 본 개시는 인간 가변 도메인 및 비인간 불변 도메인을 갖는 항체를 발현하는 조작된 비인간 동물의 성공적인 생산을 구체적으로 입증하며, 상기 항체는 인간 Vλ 도메인을 함유하는 경쇄를 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 경쇄의 발현은 상기 복수의 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 유전자 분절을 내인성 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자) 내에 삽입하는 것에 의해 달성된다. 또한, 본원에 기술된 바와 같이, 제공된 비인간 동물은, 일부 구현예에서는, 내인성 Vλ 도메인을 함유하는 경쇄의 발현이 (예를 들어, 유전자 결실에 의해) 불활성화 되도록 조작된다. 따라서, 본 발명은 적어도 일부 실시예에서, 대안적으로 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 함유하는 조작된 비인간 동물을 제공하여 인간 Vλ 도메인을 함유하는 항체 레파토리를 발현시킴으로써 인간 항체의 생산을 위한 개선된 생체 내 시스템의 개발을 포함한다.

[0168] DNA 삽입

[0169] 전형적으로, 인간 Igλ 경쇄 서열(예, Vλ, Jλ, Cλ 및 Igλ 인핸서) 또는 이의 부분(들)을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 분자는 숙주 세포에서 폴리뉴클레오타이드 분자를 복제하기 위해 벡터 내에, 바람직하게는 DNA 벡터 내에 삽입된다.

[0170] 인간 Igλ 경쇄 서열은 공지된 서열 또는 공급원(예: 라이브러리)으로부터 직접 클로닝되거나, GenBank 또는 다른 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스(예: IMGT)로부터 이용 가능한 공개된 서열에 기초하여 가상 환경에서

설계된 생식선 서열로부터 합성될 수 있다. 대안적으로, 박테리아 인공 염색체(BAC) 라이브러리가 관심 면역글로불린 DNA 서열(예를 들어, 인간 V λ 유전자 분절, 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍, 인간 E λ 영역 또는 서열, 및 이들의 조합)을 제공할 수 있다. BAC 라이브러리는 100~150 kb의 삽입체 크기를 포함할 수 있고, 300 kb 정도 크기의 삽입체를 보유할 수 있다(Shizuya, 외, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:8794-8797; Swiatek, 외, 1993, Genes and Development 7:2071-2084; Kim, 외, 1996, Genomics 34 213-218; 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 예를 들어, 164~196kb의 평균 삽입체 크기를 수용하는 인간 BAC 라이브러리가 기술되었다(Bacegawa, K. 외, 2001, Genome Res. 11(3):483-96; Osoegawa, K. 외, 1998, Genomics 52:1-8, Article No. GE985423). 인간 및 마우스 게놈 BAC 라이브러리가 작제되었으며, 상업적으로 이용 가능하다(예: ThermoFisher). 게놈 BAC 라이브러리는 면역글로불린 DNA 서열의 공급원으로서 뿐만 아니라 전사 조절 영역의 공급원으로서의 역할을 할 수도 있다.

[0171] 대안적으로, 면역글로불린 DNA 서열은 효모 인공 염색체(YAC)로부터 단리되고, 클로닝되고/되거나 전이될 수 있다. 예를 들어, 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 뉴클레오티드 서열이 결정되었다(예를 들어, Dunham, I. 외, 1999, Nature 402:489-95 참조). 또한, YAC는 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌 이식 유전자를 조립하기 위해 이전에 사용되었다(예를 들어, Popov, A.V. 외, 1996, Gene 177:195-201; Popov, A.V. 외, 1999, J. Exp. Med. 189(10):1611-19 참조). 전체 Ig λ 경쇄 유전자좌(인간 또는 설치류)를 클로닝하여 여러 YAC 내에 포함시킬 수 있다. 다수의 YAC가 사용되어 중첩된 상동성의 영역을 포함하는 경우, 이들은 효모 숙주 계통 내에서 재조합되어 전체 유전자좌 또는 유전자좌의 바람직한 부분들(예: 표적화 벡터로 표적화된 영역)을 나타내는 단일 작제물을 생산할 수 있다. 당 업계에 공지된 방법 및/또는 본원에 설명된 방법에 의해 구조체를 배아 줄기 세포 또는 배아에 도입하는 것을 돕기 위해, 레트로피팅(retrofitting)에 의해 포유류 선택 카세트로 YAC 아암을 추가로 변형시킬 수 있다.

[0172] 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 작제하는 데 사용하기 위한 인간 Ig λ 경쇄 유전자 분절의 DNA 및 아미노산 서열은 공개된 데이터베이스(예: GenBank, IMGT 등) 및/또는 공개된 항체 서열로부터 수득할 수 있다. 인간 Ig λ 경쇄 유전자 분절을 함유하는 DNA 삽입체는, 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열(또는 영역)을 포함한다. DNA 삽입체는, 일부 구현예에서, 하나 이상의 (예: 1, 2, 3개 등의) 서열 요소를 포함하는 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열(또는 영역)을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, DNA 삽입체는, 3개의 구별되는 서열 요소를 가지며 인간 E λ 로서 지칭되는 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열(또는 영역)을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 인간 E λ 는 모듈형이며 하나 이상의 서열 요소는 인핸서 서열(또는 영역)로서 함께 기능한다. 일부 특정 구현예에서, 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열을 함유하는 DNA 삽입체는 비인간 Ig λ 경쇄 서열(예: 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역 서열)에 작동 가능하게 연결된 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열을 함유하는 DNA 삽입체는, 비인간 Ig λ 경쇄 서열(예: 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역 서열)에 작동 가능하게 연결되고 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 및/또는 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결된 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열을 함유하는 DNA 삽입체는, 비인간 Ig λ 경쇄 서열(예: 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역 서열), 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결된 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 서열을 포함한다.

[0173] DNA 삽입체는 당업계에 공지된 방법을 사용해 제작될 수 있다. 예를 들어, DNA 삽입체는 더 큰 플라스미드의 일부로서 제작될 수 있다. 이러한 제작을 통해 당업계에 공지된 바와 같은 효율적인 방식으로 정확한 구조체의 클로닝 및 선택이 가능하다. 본원에 기술된 바와 같이 인간 Ig λ 경쇄 서열을 전체적으로 또는 부분적으로 함유하는 DNA 삽입체는, 원하는 비인간 동물 내로의 통합을 위해 잔여 플라스미드 서열로부터 이들이 쉽게 단리될 수 있도록 플라스미드 상의 편리한 제한 부위(restriction sites) 사이에 위치될 수 있다.

[0174] 플라스미드의 제작과 숙주 유기체의 형질전환에 사용된 다양한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 원핵 세포 및 진핵 세포 모두를 위한 다른 적절한 발현 시스템 및 일반적인 재조합 절차에 관해서는, Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Manipulation, 5th Ed., 편집자 Old, R.W. 및 S.B. Primrose, Blackwell Science, Inc., 1994 및 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2 판, 편집자 Sambrook, J. 외, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989를 참조한다.

[0175] **표적화 벡터**

[0176] 표적화 벡터는 DNA 삽입체를 게놈 표적 유전자좌 내로 도입하기 위해 사용될 수 있으며, 상기 DNA 삽입체 및 상

기 DNA 삽입체의 측면에 위치하는 상동 아암을 포함한다. 표적화 벡터는 선형 형태 또는 원형 형태일 수 있고, 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 표적화 벡터는 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)일 수 있다. 참조를 용이하게 하기 위해, 상동 아암은 본원에서 5' 및 3'(즉, 상류 및 하류) 상동 아암으로 지칭된다. 이 용어는 표적화 벡터 내에서 DNA 삽입체에 대한 상동 아암의 상대 위치에 관한 것이다. 5' 및 3' 상동 아암은 표적화된 유전자좌 내의 영역 또는 다른 표적화 벡터 내의 영역에 대응하며, 이는 본원에서 "5' 표적 서열" 및 "3' 표적 서열"로서 각각 지칭된다. 일부 구현예에서, 상동 아암은 5' 또는 3' 타겟 서열로서도 기능할 수 있다.

[0177] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 서로 재조합될 수 있는 2개, 3개 또는 그 이상의 표적화 벡터를 사용한다. 다양한 구현예에서, 표적화 벡터는 본원의 다른 곳에서 기술된 바와 같은 대형 표적화 벡터(LTVEC)이다. 이러한 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 표적화 벡터는 각각 5' 및 3' 상동 아암을 포함한다. 제1 표적화 벡터의 3' 상동 아암은 제2 표적화 벡터의 5' 상동 아암과 중첩하는 서열(즉, 중첩 서열)을 포함하는데, 이는 제1 및 제2 LTVEC들간의 상동성 재조합을 가능하게 한다.

[0178] 이중 표적화 방법의 경우, 제1 표적화 벡터의 5' 상동 아암 및 제2 표적화 벡터의 3' 상동 아암은 표적 게놈 유전자좌(표적 서열) 내의 상응하는 분절에 대해 상동성이며, 이는 상응하는 게놈 분절과 제1 및 제2 표적화 벡터의 상동성 재조합을 촉진하고 표적 게놈 유전자좌를 변형시킨다.

[0179] 삼중 표적화 방법의 경우, 제2 표적화 벡터의 3' 상동 아암은 제3 표적화 벡터의 5' 상동 아암과 중첩하는 서열(즉, 중첩 서열)을 포함하는데, 이는 제2 및 제3 LTVEC간의 상동성 재조합을 가능하게 한다. 제1 표적화 벡터의 5' 상동 아암 및 제3 표적화 벡터의 3' 상동 아암은 표적 게놈 유전자좌(즉, 표적 서열) 내의 상응하는 분절에 대해 상동성이며, 이는 상응하는 게놈 분절과 제1 및 제3 표적화 벡터의 상동성 재조합을 촉진하고 표적 게놈 유전자좌를 변형시킨다.

[0180] 상동 아암과 표적 서열 또는 2개의 상동 아암은 "상응"하거나, 2개의 영역이 서로에 대해 상동성 재조합 반응을 위한 기질로서 작용하기에 충분한 수준의 서열 동일성을 공유할 때 서로에 대해 "상응"한다. 용어 "상동성(homology)"은 상응하는 서열과 동일하거나 서열 동일성을 공유하는 DNA 서열을 포함한다. 주어진 표적 서열과 표적화 벡터 상에서 발견되는 상응하는 상동 아암간의 서열 동일성(즉, 중첩 서열) 또는 2개의 상동 아암간의 서열 동일성은 상동성 재조합이 발생할 수 있게 하는 임의의 정도의 서열 동일성일 수 있다. 하나의 예를 들자면, 표적화 벡터(또는 이의 단편)의 상동 아암과 또 다른 표적화 벡터의 표적 서열이나 표적 게놈 유전자좌(또는 이의 단편)의 표적 서열에 의해 공유되는 서열 동일성의 양은 서열이 상동성 재조합을 거치도록, 예를 들어, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0181] 또한, 상동 아암 및 상응하는 표적 서열 사이의 상응하는 상동성 영역은 표적 게놈 유전자좌에서 상동성 재조합을 촉진하기에 충분한 임의의 길이일 수 있다. 예를 들어, 주어진 상동 아암 및/또는 상응하는 표적 서열은, 상동 아암이 세포의 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열(들) 또는 또 다른 표적화 벡터 내의 상응하는 표적 서열(들)과 상동성 재조합을 거치기에 충분한 상동성을 갖도록, 예를 들어, 그 길이가 적어도 약 5~10kb, 5~15kb, 5~20kb, 5~25kb, 5~30kb, 5~35kb, 5~40kb, 5~45kb, 5~50kb, 5~55kb, 5~60kb, 5~65kb, 5~70kb, 5~75kb, 5~80kb, 5~85kb, 5~90kb, 5~95kb, 5~100kb, 100~200kb, 또는 200~300kb 이상(예컨대 본원의 임의의 다른 곳에 기술된 값)인 상응하는 상동성 영역을 포함할 수 있지만, 길이는 이들로 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 주어진 상동 아암 및/또는 상응하는 표적 서열은, 상동 아암이 세포의 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열(들) 또는 또 다른 표적화 벡터 내의 상응하는 표적 서열(들)과 상동성 재조합을 거치기에 충분한 상동성을 갖도록, 예를 들어, 그 길이가 적어도 약 10~100kb, 15~100kb, 20~100kb, 25~100kb, 30~100kb, 35~100kb, 40~100kb, 45~100kb, 50~100kb, 55~100kb, 60~100kb, 65~100kb, 70~100kb, 75~100kb, 80~100kb, 85~100kb, 90~100kb, 또는 95~100kb 이상(예컨대 본원의 임의의 다른 곳에 기술된 값)인 상응하는 상동성 영역을 포함하지만, 길이는 이들로 한정되지 않는다.

[0182] 제1 표적화 벡터의 3' 상동 아암과 제2 표적화 벡터의 5' 상동 아암의 중첩 서열 또는 제2 표적화 벡터의 3' 상동 아암과 제3 표적화 벡터의 5' 상동 아암의 중첩 서열은 상기 표적화 벡터들간의 상동성 재조합을 촉진하기에 충분한 임의의 길이일 수 있다. 예를 들어, 상동 아암의 주어진 중첩 서열은, 상동 아암이 또 다른 표적화 벡터 내의 상응하는 중첩 서열과 상동성 재조합을 거치기에 충분한 상동성을 갖도록, 예를 들어, 그 길이가 적어도 약 1~5kb, 5~10kb, 5~15kb, 5~20kb, 5~25kb, 5~30kb, 5~35kb, 5~40kb, 5~45kb, 5~50kb, 5~55kb, 5~60kb, 5~65kb, 5~70kb, 5~75kb, 5~80kb, 5~85kb, 5~90kb, 5~95kb, 5~100kb, 100~200kb, 또는 200~300kb 이상인 상응하는 중첩 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상동 아암의 주어진 중첩 서열은, 상동 아암이 또 다른 표

적화 벡터 내의 상응하는 중첩 서열과 상동성 재조합을 거치기에 충분한 상동성을 갖도록, 예를 들어, 그 길이가 적어도 약 1~100kb, 5~100kb, 10~100kb, 15~100kb, 20~100kb, 25~100kb, 30~100kb, 35~100kb, 40~100kb, 45~100kb, 50~100kb, 55~100kb, 60~100kb, 65~100kb, 70~100kb, 75~100kb, 80~100kb, 85~100kb, 90~100kb, 또는 95~100kb 이상인 상응하는 중첩 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 중첩 서열은 1 내지 5kb이다. 일부 구현예에서, 중첩 서열은 약 1kb 내지 약 70kb이다. 일부 구현예에서, 중첩 서열은 약 10kb 내지 약 70kb이다. 일부 구현예에서, 중첩 서열은 약 10kb 내지 약 50kb이다. 일부 구현예에서, 중첩 서열은 적어도 10kb이다. 일부 구현예에서, 중첩 서열은 적어도 20kb이다. 예를 들어, 중첩 서열은 약 1kb 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 15kb, 약 15kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 25kb, 약 25kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 35kb, 약 35kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 45kb, 약 45kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 70kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약 90kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 120kb, 약 120kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 220kb, 약 220kb 내지 약 240kb, 약 240kb 내지 약 260kb, 약 260kb 내지 약 280kb, 또는 약 280kb 내지 약 300kb일 수 있다. 하나의 예를 들자면, 중첩 서열은 약 20kb 내지 약 60kb일 수 있다. 대안적으로, 중첩 서열은 적어도 1kb, 적어도 5kb, 적어도 10kb, 적어도 15kb, 적어도 20kb, 적어도 25kb, 적어도 30kb, 적어도 35kb, 적어도 40kb, 적어도 45kb, 적어도 50kb, 적어도 60kb, 적어도 70kb, 적어도 80kb, 적어도 90kb, 적어도 100kb, 적어도 120kb, 적어도 140kb, 적어도 160kb, 적어도 180kb, 적어도 200kb, 적어도 220kb, 적어도 240kb, 적어도 260kb, 적어도 280kb, 또는 적어도 300kb일 수 있다.

[0183] 상동 아암은, 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 표적화된 유전자좌)에 대해 고유한 유전자좌에 상응할 수 있거나, 대안적으로, 예를 들어, DNA의 이식 유전자, 발현 카세트, 또는 이중 또는 외인성 영역을 포함하여 세포의 게놈 내에 통합된 DNA의 이중 또는 외인성 분절 영역에 상응할 수 있다. 대안적으로, 상동 아암은, 일부 구현예에서, 세포 내 표적화 벡터 상의 영역에 상응할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 벡터의 상동 아암은 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC), 인간 인공 염색체, 또는 적절한 숙주 세포에 함유된 임의의 다른 조작된 영역의 영역에 상응할 수 있다. 또한, 표적화 벡터의 상동 아암은 BAC 라이브러리, 코스미드 라이브러리, 또는 P1 파지 라이브러리의 영역에 상응하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일부 특정 구현예에서, 표적화 벡터의 상동 아암은 원핵세포, 효모, 조류(예: 닭), 비인간 포유류, 설치류, 인간, 랫트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 고양이, 개, 흰담비, 유인원(예: 마모셋 원숭이, 붉은털 원숭이), 가축 포유류, 축산 포유류, 또는 임의의 다른 관심 유기체에 대해 고유하거나, 이중이거나, 외인성인 유전자좌에 상응한다. 일부 구현예에서, 상동 아암은 종래 방법을 사용하여 표적화할 수 없거나, 뉴클레아제 제제(예: Cas 단백질)에 의해 유도된 Nick(nick) 또는 이중 가닥 절단이 없이는 부정확하게만 표적화할 수 있거나 유의하게 낮은 효율로만 표적화할 수 있는 세포의 유전자좌에 상응한다. 일부 구현예에서, 상동 아암은 합성 DNA로부터 유래된다.

[0184] 일부 구현예에서, 표적화 벡터(들)의 5' 또는 3' 상동 아암 중 하나는 표적화된 게놈 유전자좌에 상응하고, 5' 또는 3' 상동 아암 중 다른 하나는 또 다른 표적화 벡터 상의 영역에 상응한다.

[0185] 일부 구현예에서, 표적화 벡터(들)의 5' 및 3' 상동성 아암은 표적화된 게놈에 상응한다. 대안적으로, 상동 아암은 관련 게놈 유래일 수 있다. 예를 들어, 표적화된 게놈은 제1 계통의 마우스 게놈이고, 표적화 아암은 제2 계통의 마우스 게놈으로부터 유래하되, 제1 계통과 제2 계통은 상이하다. 특정 구현예에서, 상동 아암은 동일한 동물의 게놈으로부터 유래하거나 동일한 계통의 게놈으로부터 유래하며, 예를 들어 표적화된 게놈은 제1 계통의 마우스 게놈이고, 표적화 아암은 동일한 마우스 또는 동일한 계통으로부터의 마우스 게놈으로부터 유래한다.

[0186] 표적화 벡터의 상동 아암은 상응하는 표적 서열과의 상동성 재조합 이벤트를 촉진하기에 충분한 임의의 길이일 수 있으며, 그 길이는, 예를 들어, 적어도 1~5kb, 5~10kb, 5~15kb, 5~20kb, 5~25kb, 5~30kb, 5~35kb, 5~40kb, 5~50kb, 5~55kb, 5~60kb, 5~65kb, 5~70kb, 5~75kb, 5~80kb, 5~85kb, 5~90kb, 5~95kb, 5~100kb, 100~200kb, 또는 200~300kb 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 벡터의 상동 아암은 상응하는 표적 서열과 상동성 재조합 이벤트를 촉진하기에 충분한 길이를 가지며, 그 길이는 적어도 1~100kb, 5~100kb, 10~100kb, 15~100kb, 20~100kb, 25~100kb, 30~100kb, 35~100kb, 40~100kb, 45~100kb, 50~100kb, 55~100kb, 60~100kb, 65~100kb, 70~100kb, 75~100kb, 80~100kb, 85~100kb, 90~100kb, 또는 95~100kb 이상이다. 본원에 기술된 바와 같이, 대형 표적화 벡터는 더 큰 길이의 표적화 아암을 사용할 수 있다.

[0187] 뉴클레아제 제제(예: CRISPR/Cas 시스템)는 표적 유전자좌(예: Igλ 경쇄 유전자좌)의 변형을 용이하게 하기 위해 표적화 벡터와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터와 표적 유전자좌간의 상동성 재조합을 촉진할 수 있다. 뉴클레아제 제제가 표적화 벡터와 조합하여 사용될 때, 뉴클레아제 절단 부위에서

닉 또는 이중 가닥 절단 시에 표적 서열과 상동 아암 간의 상동성 재조합 이벤트의 발생을 촉진하기 위해 표적화 벡터는 뉴클레아제 절단 부위에 충분히 근접하여 위치된 5' 및 3' 표적 서열에 상응하는 5' 및 3' 상동 아암을 포함할 수 있다. 용어 "뉴클레아제 절단 부위(*nuclease cleavage site*)"는 뉴클레아제 제제에 의해 닉 또는 이중 가닥 절단이 생성되는 DNA 서열(예: Cas9 절단 부위)을 포함한다. 뉴클레아제 절단 부위에서 닉 또는 이중 가닥 절단될 때 예컨대 거리에 의해 5' 및 3' 표적 서열과 상동 아암 간의 상동성 재조합 이벤트의 발생이 촉진되는 경우, 표적화 벡터의 5' 및 3' 상동 아암에 상응하는 표적화된 유전자와 내의 표적 서열은 뉴클레아제 절단 부위에 "충분한 근접하여 위치된다". 따라서, 특정 구현예에서, 표적화 벡터의 5' 및/또는 3' 상동 아암에 상응하는 표적 서열은 주어진 인식 부위의 1 뉴클레오타이드 내에 있거나 주어진 인식 부위의 적어도 10 뉴클레오타이드 내지 약 14kb 내에 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제 절단 부위는 표적 서열 중 적어도 하나 또는 둘 모두에 바로 인접한다.

[0188] 표적화 벡터의 상동 아암에 상응하는 표적 서열과 뉴클레아제 절단 부위의 공간적 관계는 달라질 수 있다. 예를 들어, 표적 서열은 뉴클레아제 절단 부위에 5'에 위치할 수 있거나, 표적 서열은 인식 부위에 대해 3'에 위치할 수 있거나, 표적 서열은 뉴클레아제 절단 부위의 측면에 위치할 수 있다.

[0189] 뉴클레아제와 표적화 벡터(예를 들어, 대형 표적화 벡터 포함)를 조합하여 사용하면 표적화 벡터를 단독으로 사용하는 것에 비해 표적화 효율을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 표적화 벡터가 뉴클레아제 제제와 함께 사용될 때, 표적화 벡터의 표적화 효율은 표적화 벡터를 단독으로 사용하는 것과 비교해 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 또는 이들 정수로부터 형성된 범위 이내, 예컨대 2~10배만큼 증가될 수 있다.

[0190] 일부 표적화 벡터는 "대형 표적화 벡터(*large targeting vector* 또는 LTVEC)"이며, 세포 내에서 상동성 재조합을 수행하기 위해 의도된 다른 접근법에 의해 전형적으로 사용되는 것들보다 더 큰 핵산 서열에 상응하고 그로부터 유래되는 상동성 아암을 포함하는 표적화 벡터를 포함한다. LTVEC은 예를 들어 그 길이가 적어도 10 kb일 수 있거나, 5' 상동 아암과 3' 상동 아암의 총 합은 예를 들어 적어도 10 kb일 수 있다. LTVEC은 세포에서 상동성 재조합을 수행하도록 의도된 다른 접근법에 의해 통상적으로 사용되는 것들보다 더 큰 DNA 삽입체를 포함하는 표적화 벡터를 또한 포함한다. 예를 들어, LTVEC은 크기 제한 때문에 전통적인 플라스미드 기반 표적화 벡터로 수용할 수 없는 큰 유전자좌의 변형을 가능하게 한다. 예를 들어, 표적화된 유전자좌는, 종래의 방법을 사용해 표적화할 수 없거나 뉴클레아제 제제(예: Cas 단백질)에 의해 유도되는 닉 또는 이중 가닥 절단이 없이는 부정확하게만 또는 유의하게 낮은 효율성으로만 표적화할 수 있는 세포의 유전자좌일 수 있다(즉, 5' 및 3' 상동 아암은 이 유전자좌에 상응할 수 있다).

[0191] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 3 방향 또는 4 방향 재조합 이벤트에서 서로 재조합되고 표적 게놈 유전자좌와 재조합될 수 있는 2개 또는 3개의 LTVEC을 사용한다. 이러한 방법은 단일 LTVEC을 사용하여 달성할 수 없는 대형 유전자좌의 변형을 가능하게 한다.

[0192] LTVEC의 예에는 박테리아 인공 염색체(BAC), 인간 인공 염색체, 또는 효모 인공 염색체(YAC)로부터 유래된 벡터가 포함한다. 예시적인 LTVEC 및 이를 제조하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호, 제6,596,541호 및 제7,105,348호; 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2002/036789호에 기재되어 있고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. LTVEC는 선형 형태 또는 원형 형태일 수 있다.

[0193] LTVEC는, 예를 들어, 약 20kb 내지 약 300kb, 약 20kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 75kb, 약 75kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 125kb, 내지 약 125kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 175kb, 약 175kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 225kb, 약 225kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 275kb, 또는 약 275kb 내지 약 300kb를 포함하는 임의의 길이일 수 있다. 대안적으로, LTVEC은 적어도 10kb, 적어도 15kb, 적어도 20kb, 적어도 30kb, 적어도 40kb, 적어도 50kb, 적어도 60kb, 적어도 70kb, 적어도 80kb, 적어도 90kb, 적어도 100kb, 적어도 150kb, 적어도 200kb, 적어도 250kb, 적어도 300kb, 적어도 350kb, 적어도 400kb, 적어도 450kb 또는 적어도 500kb 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, LTVEC의 크기가 너무 커서 웨스턴 블롯팅 및 긴 범위(예: 1kb 내지 5kb) PCR과 같은 종래의 검정에 의한 표적화 이벤트의 스크리닝이 불가능할 수 있다.

[0194] 일부 구현예에서, LTVEC는 약 5kb 이상 약 200kb 이하, 약 5kb 이상 약 10kb 이하, 약 10kb 이상 약 20kb 이하, 약 20kb 이상 약 30kb 이하, 약 30kb 이상 약 40kb 이하, 약 40kb 이상 약 50kb 이하, 약 60kb 이상 약 70kb 이하, 약 80kb 이상 약 90kb 이하, 약 90kb 이상 약 100kb 이하, 약 100kb 이상 약 110kb 이하, 약 120kb 이상 약 130kb 이하, 약 130kb 이상 약 140kb 이하, 약 140kb 이상 약 150kb 이하, 약 150kb 이상 약 160kb 이하, 약 160kb 이상 약 170kb 이하, 약 170kb 이상 약 180kb 이하, 약 180kb 이상 약 190kb 이하, 또는 약

190kb 이상 약 200kb 이하 범위의 DNA 삽입체를 포함한다. 일부 실시예에서, DNA 삽입체는 약 5kb 이상 약 10kb 이하, 약 10kb 이상 약 20kb 이하, 약 20kb 이상 약 40kb 이하, 약 40kb 이상 약 60kb 이하, 약 60kb 이상 약 80kb 이하, 약 80kb 이상 약 100kb 이하, 약 100kb 이상 약 150kb 이하, 약 150kb 이상 약 200kb 이하, 약 200kb 이상 약 250kb 이하, 약 250kb 이상 약 300kb 이하, 약 300kb 이상 약 350kb 이하, 또는 약 350kb 이상 약 400kb 이하의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, LTVEC는 약 400kb 이상 약 450kb 이하, 약 450kb 이상 약 500kb 이하, 약 500kb 이상 약 550kb 이하, 약 550kb 이상 약 600kb 이하, 약 600kb 이상 약 650kb 이하, 약 650kb 이상 약 700kb 이하, 약 700kb 이상 약 750kb 이하, 또는 약 750kb 이상 약 800kb 이하 범위의 DNA 삽입체를 포함한다.

[0195] 일부 구현예에서, LTVEC의 5' 상동 아암 및 3' 상동 아암의 총 합은 적어도 10kb이다. 일부 구현예에서, LTVEC(들)의 5' 상동 아암은 약 1kb 이상 약 100kb 이하의 범위이고/이거나, LTVEC(들)의 3' 상동 아암은 약 1kb 이상 약 100 kb 이하의 범위이다. 5' 및 3' 상동 아암의 총 합은, 예를 들어, 약 1kb 이상 약 5kb 이하, 약 5kb 이상 약 10kb 이하, 약 10kb 이상 약 20kb 이하, 약 20kb 이상 약 30kb 이하, 약 30kb 이상 약 40kb 이하, 약 40kb 이상 약 50kb 이하, 약 50kb 이상 약 60kb 이하, 약 60kb 이상 약 70kb 이하, 약 70kb 이상 약 80kb 이하, 약 80kb 이상 약 90kb 이하, 약 90kb 이상 약 100kb 이하, 약 100kb 이상 약 110kb 이하, 약 110kb 이상 약 120kb 이하, 약 120kb 이상 약 130kb 이하, 약 130kb 이상 약 140kb 이하, 약 140kb 이상 약 150kb 이하, 약 150kb 이상 약 160kb 이하, 약 160kb 이상 약 170kb 이하, 약 170kb 이상 약 180kb 이하, 약 180kb 이상 약 190kb 이하, 또는 약 190kb 이상 약 200kb 이하일 수 있다. 대안적으로, 각각의 상동 아암은, 일부 구현예에서, 적어도 5kb, 적어도 10kb, 적어도 15kb, 적어도 20kb, 적어도 30kb, 적어도 40kb, 적어도 50kb, 적어도 60kb, 적어도 70kb, 적어도 80kb, 적어도 90kb, 적어도 100kb, 적어도 110kb, 적어도 120kb, 적어도 130kb, 적어도 140kb, 적어도 150kb, 적어도 160kb, 적어도 170kb, 적어도 180kb, 적어도 190kb, 또는 적어도 200kb일 수 있다. 마찬가지로, 5' 및 3' 상동 아암의 총 합은, 일부 구현예에서, 적어도 5kb, 적어도 10kb, 적어도 15kb, 적어도 20kb, 적어도 30kb, 적어도 40kb, 적어도 50kb, 적어도 60kb, 적어도 70kb, 적어도 80kb, 적어도 90kb, 적어도 100kb, 적어도 110kb, 적어도 120kb, 적어도 130kb, 적어도 140kb, 적어도 150kb, 적어도 160kb, 적어도 170kb, 적어도 180kb, 적어도 190kb, 또는 적어도 200kb일 수 있다.

[0196] 일부 구현예에서, LTVEC 및 DNA 삽입물은 표적 유전자좌로부터 약 5kb 이상 약 10kb 이하, 약 10kb 이상 약 20kb 이하, 약 20kb 이상 약 40kb 이하, 약 40kb 이상 약 60kb 이하, 약 60kb 이상 약 80kb 이하, 약 80kb 이상 약 100kb 이하, 약 100kb 이상 약 150kb 이하, 약 150kb 이상 약 200kb 이하, 약 200kb 이상 약 300kb 이하, 약 300kb 이상 약 400kb 이하, 약 400kb 이상 약 500kb 이하, 약 500kb 이상 약 600kb 이하, 약 600kb 이상 약 700kb 이하, 약 700kb 이상 약 800kb 이하, 약 500kb 이상 약 1Mb 이하, 약 1Mb 이상 약 1.5Mb 이하, 약 1.5Mb 이상 약 2Mb 이하, 약 2Mb 이상 약 2.5Mb 이하, 또는 약 2.5Mb 이상 약 3Mb 이하의 내인성 서열의 결실을 허용하도록 설계된다. 대안적으로, 결실은 약 3Mb 이상 약 4Mb 이하, 약 4Mb 이상 약 5Mb 이하, 약 5Mb 이상 약 10Mb 이하, 약 10Mb 이상 약 20Mb 이하, 약 20Mb 이상 약 30Mb 이하, 약 30Mb 이상 약 40Mb 이하, 약 40Mb 이상 약 50Mb 이하, 약 50Mb 이상 약 60Mb 이하, 약 60Mb 이상 약 70Mb 이하, 약 70Mb 이상 약 80Mb 이하, 약 80Mb 이상 약 90Mb 이하, 또는 약 90Mb 이상 약 100Mb 이하일 수 있다. 대안적으로, 결실은 적어도 10kb, 적어도 20kb, 적어도 30kb, 적어도 40kb, 적어도 50kb, 적어도 60kb, 적어도 70kb, 적어도 80kb, 적어도 90kb, 적어도 100kb, 적어도 150kb, 적어도 200kb, 적어도 250kb, 적어도 300kb, 적어도 350kb, 적어도 400kb, 적어도 450kb, 또는 적어도 500kb 이상일 수 있다.

[0197] 일부 구현예에서, LTVEC 및 DNA 삽입물은 표적 유전자좌 내로 약 5kb 이상 약 10kb 이하, 약 10kb 이상 약 20kb 이하, 약 20kb 이상 약 40kb 이하, 약 40kb 이상 약 60kb 이하, 약 60kb 이상 약 80kb 이하, 약 80kb 이상 약 100kb 이하, 약 100kb 이상 약 150kb 이하, 약 150kb 이상 약 200kb 이하, 약 200kb 이상 약 250kb 이하, 약 250kb 이상 약 300kb 이하, 약 300kb 이상 약 350kb 이하, 또는 약 350kb 이상 약 400kb 이하의 외인성 핵산 서열의 삽입을 허용하도록 설계된다. 대안적으로 일부 구현예에서, 삽입은 약 400kb 이상 약 450kb 이하, 약 450kb 이상 약 500kb 이하, 약 500kb 이상 약 550kb 이하, 약 550kb 이상 약 600kb 이하, 약 600kb 이상 약 650kb 이하, 약 650kb 이상 약 700kb 이하, 약 700kb 이상 약 750kb 이하, 또는 약 750kb 이상 약 800kb 이하일 수 있다. 대안적으로 일부 실시예에서, 삽입은 적어도 10kb, 적어도 20kb, 적어도 30kb, 적어도 40kb, 적어도 50kb, 적어도 60kb, 적어도 70kb, 적어도 80kb, 적어도 90kb, 적어도 100kb, 적어도 150kb, 적어도 200kb, 적어도 250kb, 적어도 300kb, 적어도 350kb, 적어도 400kb, 적어도 450kb, 또는 적어도 500kb 이상일 수 있다.

[0198] 또 다른 경우에서, 변경, 결실, 표적화, 변형, 조작 등이 되는 내인성 유전자좌의 영역 및/또는 DNA 삽입체는 적어도 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 또는 900 뉴클레오타이드이거나 적어도 1kb, 2kb, 3kb, 4kb,

5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 10kb, 11kb, 12kb, 13kb, 14kb, 15kb, 16kb, 17kb, 18kb, 19kb, 또는 20kb 이상이다. 일부 구현예에서, 변경, 결실, 표적화, 변형, 조작 등이 되는 내인성 유전자좌의 영역 및/또는 DNA 삽입체는 수 뉴클레오타이드 내지 20kb, 200 뉴클레오타이드 내지 20kb, 300 뉴클레오타이드 내지 20kb, 400 뉴클레오타이드 내지 20kb, 500 뉴클레오타이드 내지 20kb, 600 뉴클레오타이드 내지 20kb, 700 뉴클레오타이드 내지 20kb, 800 뉴클레오타이드 내지 20kb, 900 뉴클레오타이드 내지 20kb, 1kb 내지 20kb, 2kb 내지 20kb, 3kb 내지 20kb, 4kb 내지 20kb, 5kb 내지 20kb, 6kb 내지 20kb, 7kb 내지 20kb, 8kb 내지 20kb, 9kb 내지 20kb, 10kb 내지 20kb, 11kb 내지 20kb, 12kb 내지 20kb, 13kb 내지 20kb, 14kb 내지 20kb, 15kb 내지 20kb, 16kb 내지 20kb, 17kb 내지 20kb, 18kb 내지 20kb, 또는 19kb 내지 20kb이다. 일부 구현예에서, 변경, 결실, 표적화, 변형, 조작 등이 되는 내인성 유전자좌의 영역 및/또는 DNA 삽입체는 100 뉴클레오타이드 내지 19kb, 100 뉴클레오타이드 내지 18kb, 100 뉴클레오타이드 내지 17kb, 100 뉴클레오타이드 내지 16kb, 100 뉴클레오타이드 내지 15kb, 100 뉴클레오타이드 내지 14kb, 100 뉴클레오타이드 내지 13kb, 100 뉴클레오타이드 내지 12kb, 100 뉴클레오타이드 내지 11kb, 100 뉴클레오타이드 내지 10kb, 100 뉴클레오타이드 내지 9kb, 100 뉴클레오타이드 내지 8kb, 100 뉴클레오타이드 내지 7kb, 100 뉴클레오타이드 내지 6kb, 100 뉴클레오타이드 내지 5kb, 100 뉴클레오타이드 내지 4kb, 100 뉴클레오타이드 내지 3kb, 100 뉴클레오타이드 내지 2kb, 100 뉴클레오타이드 내지 1kb, 100 뉴클레오타이드 내지 900 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 내지 800 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 내지 700 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 내지 600 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 내지 500 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 내지 400 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 내지 300 뉴클레오타이드, 또는 100 뉴클레오타이드 내지 200 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 변경, 결실, 표적화, 변형, 조작 등이 되는 내인성 유전자좌의 영역 및/또는 DNA 삽입체는 200 뉴클레오타이드 내지 19kb, 300 뉴클레오타이드 내지 18kb, 400 뉴클레오타이드 내지 17kb, 500 뉴클레오타이드 내지 16kb, 600 뉴클레오타이드 내지 15kb, 700 뉴클레오타이드 내지 14kb, 800 뉴클레오타이드 내지 13kb, 900 뉴클레오타이드 내지 12kb, 1kb 내지 11kb, 2kb 내지 10kb, 3kb 내지 9kb, 4kb 내지 8kb, 5kb 내지 7kb, 또는 5kb 내지 6kb이다.

[0199] 제공된 비인간 동물

[0200] 특정 양태에서, 인간 Igλ 경쇄 유전자좌의 적어도 일부에 상응하고 적어도 인간 Vλ 도메인(즉, 재배열된 인간 Vλ-Jλ 서열)을 암호화하는 유전 물질의 통합의 결과로 인간 Igλ 경쇄 서열을 전체적으로 또는 부분적으로 포함하는 경쇄를, 비인간 동물의 생식선 계통 내 상응하는 비인간 Igλ 경쇄 대신에 함유하는 항체를 발현하는 비인간 동물이 제공된다. 본원에 기술된 적절한 예는 설치류, 특히 랫트 또는 마우스를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0201] 인간 Igλ 경쇄 서열은, 일부 구현예에서, 인간 Igλ 경쇄 유전자좌 유래의 유전 물질을 포함하되, 인간 Igλ 경쇄 서열은 인간 Igλ 경쇄 유전자좌 유래의 유전 물질의 암호화된 부분을 포함하는 면역글로불린 경쇄를 암호화한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 인간 Igλ 경쇄 서열은 적어도 하나의 인간 Vλ 유전자 분절 및 적어도 하나의 인간 Jλ 유전자 분절, 및 인간 Vλ 도메인을 암호화하는 기능성 재배열된 인간 Vλ-Jλ 서열을 형성하기 위해 상기 적어도 하나의 인간 Jλ 유전자 분절과 상기 적어도 하나의 인간 Vλ 유전자 분절의 재배열을 촉진하는 데 필요한 하나 이상의 서열(예를 들어, 재조합 신호 서열(들))을 포함한다. 많은 구현예에서, 인간 Igλ 경쇄 서열은 복수의 인간 Vλ 유전자 분절 및 적어도 하나의 인간 Jλ 유전자 분절과 상기 인간 Vλ 유전자 분절의 재배열을 촉진하는 데 필요한 하나 이상의 서열을 포함한다. 많은 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 인간 Igλ 경쇄 서열은 인간 Igλ 경쇄 유전자좌의 (예를 들어, 박테리아 인공 염색체로부터 단리되고/되거나 클로닝된) 계통 서열이며 복수의 인간 Vλ 유전자 분절을 생식선 구성으로 함유한다. 일부 구현예에서, 인간 Igλ 경쇄 서열은 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 서열을 생식선 구성으로 포함한다(즉, 상기 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 서열이 인간 세포의 Igλ 경쇄 유전자좌에서 나타난다). 일부 구현예에서, 인간 Igλ 경쇄 서열은 도면에서 나타나는 인간 서열이거나 이를 포함한다(예를 들어, 도 1 내지 도 4 참조). 일부 구현예에서, 인간 Igλ 경쇄 서열은 Igλ 경쇄 폴리펩티드를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하며, 상기 Igλ 경쇄 폴리펩티드는 면역글로불린에서, 특히 인간 B 세포에 의해 발현되는 면역글로불린에서 나타난다. 상응하는 비인간 Igλ 서열(예: 내인성 설치류 Igλ 경쇄 유전자좌) 대신에 상기 인간 Igλ 경쇄 서열을 함유하는 비인간 동물, 비인간 배아, 및 세포를 만들기 위한 비인간 동물, 배아, 세포 및 표적화 작제물이 또한 제공된다.

[0202] 일부 구현예에서, 상응하는 비인간 Igλ 경쇄 서열 대신에 인간 Igλ 경쇄 서열이 비인간 동물의 생식선 계통 내에 삽입된다. 일부 구현예에서, 인간 Igλ 경쇄 서열은 비인간 Igλ 경쇄 서열(예: 비인간 Igλ 경쇄 불변 영역 서열)의 상류에 삽입된다. 일부 구현예에서, 인간 Igλ 경쇄 서열은 상기 인간 Igλ 경쇄 서열이 비인간 Igλ 경쇄 서열에 의해 병치(juxtaposed)되도록 하나 이상의 비인간 Igλ 경쇄 서열 중간에 삽입된다(예를 들어, 도 1, 2, 3 및/또는 4 참조).

- [0203] 일부 구현예에서, 비인간 Ig λ 경쇄 서열 중 하나 이상의 비인간 Ig λ 경쇄 서열(또는 이의 일부)은 결실되지 않는다. 일부 구현예에서, 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌 중 하나 이상의 비인간 Ig λ 경쇄 서열(예: V λ , J λ 및/또는 C λ)은 변경되거나, 변위되거나, 파괴되거나, 결실되거나, 무엇보다도, 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역 및 하나 이상의 인핸서 및/또는 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 조절 요소(들)에 작동 가능하게 연결되고 본원에 기술된 바와 같은 인간 Ig λ 경쇄 서열(예를 들어, 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절, 또는 이들의 조합을 포함하는 서열)과 대체된다. 일부 구현예에서, 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 전부 또는 실질적으로 전부는, 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역과 하나 이상의 비인간 Ig λ 경쇄 인핸서 및/또는 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 조절 요소(들)에 작동 가능하게 연결된(본원에 기술된 바와 같은) 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 서열과 대체된다. 일부 특정 구현예에서, 하나 이상의 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역 유전자는 본원에 기술된 바와 같은 인간 Ig λ 경쇄 서열을 포함하는 비인간 동물에서 결실되거나 대체되지 않는다. 하나의 비제한적인 예를 들자면, 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌 내에 삽입되는 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 삽입 사례에서, 상기 삽입은 삽입 지점(예: 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역 및/또는 비인간 Ig λ 경쇄 인핸서 영역 또는 서열) 근처에서 비인간 Ig λ 경쇄 서열의 완전성을 유지하는 방식으로 이루어진다. 따라서, 이러한 비인간 동물은 야생형 Ig λ 경쇄 불변 영역을 갖는다. 일부 구현예에서, 변경되거나, 변위되거나, 파괴되거나, 결실되거나, 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 서열과 대체되거나 이로 조작되는 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌는 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) Ig λ 경쇄 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 인간 Ig λ 경쇄 서열은 상기 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 2개의 카피 중 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 하나의 카피(대립유전자) 내에 삽입되어, 인간 Ig λ 경쇄 서열에 대해 이형접합성인 비인간 동물을 생성시킨다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 인간 Ig λ 경쇄 서열을 포함하는 Ig λ 경쇄 유전자좌에 대해 동형접합성인 비인간 동물이 제공된다.
- [0204] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌는, 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역과 하나 이상의 비인간 Ig λ 경쇄 인핸서 및/또는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 비인간 Ig λ 경쇄 유전자좌는, 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역, 하나 이상의 비인간 Ig λ 경쇄 인핸서 및/또는 조절 요소에 작동 가능하게 연결되고 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 및/또는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 분절을 포함한다.
- [0205] 일부 구현예에서, 비인간 동물은 (예를 들어, 무작위로 통합된 인간 Ig λ 경쇄 서열의 일부로서) 그의 게놈에 무작위로 통합되는, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 함유한다. 따라서, 이러한 비인간 동물은 복수의 V λ , J λ 및/또는 C λ 유전자 분절을 함유하는 인간 Ig λ 경쇄 이식 유전자를 갖는 것으로서 기술될 수 있으며, 상기 인간 V λ , J λ 및/또는 C λ 유전자 분절은 비인간 동물의 발현된 레퍼토리에서 항체의 Ig λ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 재배열하고 암호화할 수 있도록 구성된다. 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌 또는 이식 유전자는, 예를 들어, PCR, 웨스턴 블롯, 서던 블롯, 제한 단편 길이 다형성(RFLP), 또는 대립유전자의 획득 또는 상실 검정을 포함하는 다양한 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌에 대해 이형접합성이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌의 하나 이상의 카피를 함유한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 도면에 도시된 바와 같이 Ig λ 경쇄 유전자좌를 함유한다(예를 들어, 도 1, 2, 3 및/또는 4 참조).
- [0206] 일부 구현예에서, 비인간 Ig λ 경쇄 서열 대신에, 인간 V λ , J λ 및/또는 C λ 분절의 특이적 다형성 형태(예: 특이적 V 및/또는 J 대립유전자 또는 변이체)를 포함하는 인간 Ig λ 경쇄 암호화 서열을 포함하여 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 서열(예: 인간 V λ , J λ 및/또는 C λ 유전자 분절)을 포함하는 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 게놈을 가진 비인간 동물을 만들기 위한 조성물 및 방법이 제공되며, 상기 조성물 및 방법은, 인간 가변 도메인 및 인간 또는 비인간 불변 도메인을 함유하는 Ig λ 경쇄를 포함하며 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 V λ , J λ 및 C λ 분절을 함유하는 Ig λ 경쇄 유전자좌로부터 조립된 항체를 발현하는 비인간 동물을 만들기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 인핸서(들) 및/또는 내인성 조절 서열(들)의 제어 하에 이러한 항체(들)를 발현하는 비인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 이중 인핸서(들) 및/또는 이중 조절 서열(들)의 제어 하에 이러한 항체(들)를 발현하는 비인간 동물을 제조하기 위한 조성물 및 방법이 또한 제공된다.

- [0207] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법은, 항체가 발현되도록 비인간 Ig λ 경쇄 불변 영역(예: 쥐과 동물 C λ 영역)의 상류에서 인간 Ig λ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 단계를 포함하며, 상기 항체는, 적어도 인간 V λ 도메인을 함유하되 일부 구현예에서는 인간 V λ 및 C λ 도메인을 함유하고, B 세포 표면 및 비인간 동물의 혈청 내 모두에서 발현되는 경쇄의 존재를 특징으로 한다.
- [0208] 일부 구현예에서, 상기 방법은 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에 상응하는 유전 물질을 연속 삽입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에 상응하는 유전 물질은 합성 물질이거나 게놈 물질(예를 들어, 박테리아 인공 염색체로부터 클로닝된 것)일 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에 상응하는 유전 물질은, 상기 유전 물질이 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 나타나는 것과 상이한 배향으로 인간 V λ , J λ 및/또는 C λ 분절을 함유하고, 상기 유전 물질이 기능성 Ig λ 경쇄를 암호화하기 위해 상기 인간 V λ , J λ 및/또는 C λ 분절의 재배열을 지지하는 서열을 여전히 함유하도록 공개된 공급원 및/또는 박테리아 인공 염색체로부터 설계될 수 있다. 하나의 예를 들자면, 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에 상응하는 유전 물질은, 인간 세포의 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에서 나타나는 것과 상이한 순서 및/또는 배열로 인간 V λ , J λ 및/또는 C λ 분절을 함유하는 인간 Ig λ 경쇄 서열을 작제하기 위해 본원에 제공된 지침을 사용해 설계될 수 있다. 이러한 예에서, 인간 V λ , J λ 및/또는 C λ 분절의 함량은 인간 세포에서의 상응하는 분절과 동등하지만, 순서 및 배열은 상이할 것이다. 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 생성을 위한 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌를 작제할 때, 인간 분절이 정확히 재배열되어 기능성 Ig λ 경쇄를 형성할 수 있도록 필요 재조합 신호 서열이 구성될 수 있다.
- [0209] 적절한 재조합을 위해 필요한 인간 Ig λ 경쇄 분절 및 서열의 생식선 구성을 위한 지침은 Molecular Biology of B Cells, London: Elsevier Academic Press, 2004, Ed. Honjo, T., Alt, F.W., Neuberger, M. Chapters 4 (pp. 37-59) 및 5 (61-82)에서 찾아볼 수 있으며, 본 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0210] 일부 구현예에서, 연속 삽입은 단일 ES 세포 클론에서 이중 유전 물질 부분들의 다중 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 연속 삽입은 연속하는 ES 세포 클론에서 이중 유전 물질 부분들의 순차적 삽입을 포함한다.
- [0211] 일부 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역의 하류에 약 11,822bp의 DNA를 삽입하여 상기 DNA가 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역에 작동 가능하게 연결되도록 하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 영역(또는 서열)을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 방법은 3개의 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 영역(또는 서열)을 포함하는 약 11,822bp의 DNA를 삽입하는 것을 포함하되, 상기 3개의 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 영역(또는 서열)은 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역의 하류에 삽입된다.
- [0212] 일부 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역의 상류에 약 125,473bp의 DNA를 삽입하여 상기 DNA가 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역에 작동 가능하게 연결되도록 하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 인간 V λ 유전자 분절 V λ 3-10, V λ 3-9, V λ 2-8, V λ 4-3, V λ 3-1, 인간 J λ -C λ 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3, J λ 6-C λ 6 및 인간 J λ 유전자 분절 J λ 7을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 영역(또는 서열)을 포함하는 약 11,822bp의 DNA를 삽입하는 것을 포함하되, 상기 하나 이상의 인간 Ig λ 경쇄 인핸서 영역(또는 서열)은 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역의 하류에 삽입된다.
- [0213] 일부 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역의 상류에 약 171,458bp의 DNA를 삽입하여 상기 DNA가 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역에 작동 가능하게 연결되도록 하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 인간 V λ 유전자 분절 V λ 2-11, V λ 3-12, V λ 2-14, V λ 3-16, V λ 3-19, V λ 3-21, V λ 3-22, V λ 2-23, V λ 3-25 및 V λ 3-27을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역에 작동 가능하게 연결되는 인간 V λ 3-10 유전자 분절의 상류에 약 171,458bp의 DNA를 삽입하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 인간 V λ 유전자 분절 V λ 2-11, V λ 3-12, V λ 2-14, V λ 3-16, V λ 3-19, V λ 3-21, V λ 3-22, V λ 2-23, V λ 3-25 및 V λ 3-27을 포함한다.
- [0214] 일부 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역의 상류에 약 121,188bp의 DNA를 삽입하여 상기 DNA가 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역에 작동 가능하게 연결되도록 하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 인간 V λ 유전자 분절 V λ 3-27, V λ 1-36, V λ 5-37, V λ 5-39, V λ 1-40, V λ 7-43, V λ 1-44, V λ 5-45, V λ 7-46, V λ 1-47, V λ 9-49, V λ 1-51 및 V λ 5-52를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 방법은 쥐과(예: 마우스 또는 랫트) C λ 1 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 V λ 3-27 유전자 분절의 상류에 약 121,188bp의 DNA를 삽입하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 인간 V λ 유전자 분절 V λ 3-27, V λ 1-36, V λ 5-37, V λ 5-39, V

Λ1-40, VΛ7-43, VΛ1-44, VΛ5-45, VΛ7-46, VΛ1-47, VΛ9-49, VΛ1-51 및 VΛ5-52를 포함한다.

[0215] 일부 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) CΛ1 영역의 상류에 약 121,188bp의 DNA를 삽입하여 상기 DNA가 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) CΛ1 영역에 작동 가능하게 연결되도록 하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 인간 VΛ 유전자 분절 VΛ3-27, VΛ1-36, VΛ5-37, VΛ5-39, VΛ1-40, VΛ7-43, VΛ1-44, VΛ5-45, VΛ7-46, VΛ1-47, VΛ9-49, VΛ1-51 및 VΛ5-52를 포함하고, 상기 DNA는 마우스 VΛ2 유전자 분절의 5'인 서열을 포함하는 상동 아암을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) CΛ1 영역에 작동 가능하게 연결된 약 121,188bp의 DNA를 삽입하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 VΛ 유전자 분절 VΛ3-27, VΛ1-36, VΛ5-37, VΛ5-39, VΛ1-40, VΛ7-43, VΛ1-44, VΛ5-45, VΛ7-46, VΛ1-47, VΛ9-49, VΛ1-51 및 VΛ5-52를 포함하고, 상기 DNA는 마우스 IgΛ 게놈 서열(예: IgΛ 경쇄 유전자좌)이 상기 DNA 단편과 상동성 재조합될 때 이의 결실을 유도하기 위해 마우스 VΛ2 유전자 분절의 5'인 마우스 서열을 포함하는 상동 아암을 포함한다.

[0216] 추가 인간 VΛ, JΛ 및/또는 CΛ 유전자 분절의 삽입은 조작된 IgΛ 경쇄 유전자좌의 다양성을 더 보충하기 위해 본원에 기술된 방법을 사용해 달성될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 방법은 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) CΛ1 영역의 상류에 약 300kb의 DNA를 삽입하여 상기 DNA가 상기 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) CΛ1 영역에 작동 가능하게 연결되도록 하는 것을 포함하되, 상기 DNA는 인간 VΛ 유전자 분절 VΛ10-54, VΛ6-57, VΛ4-60, VΛ8-61 및 VΛ4-69를 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 DNA는 쥐과 동물(예: 마우스 또는 랫트) CΛ1 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 VΛ5-52 유전자 분절의 상류에 삽입되며, 상기 DNA는 인간 VΛ 유전자 분절 VΛ10-54, VΛ6-57, VΛ4-60, VΛ8-61 및 VΛ4-69를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 상기 DNA는 인간 VpreB 유전자를 포함한다. 전술한 추가 Λ 분절은 상업적으로 이용 가능한 BAC 클론으로부터 직접 클로닝될 수 있고, 본원 또는 당업계에 기술된 재조합 기술을 사용하여 보다 작은 DNA 단편에 배열될 수 있다. 대안적으로, 전술한 추가 인간 VΛ 유전자 분절은 전술한 바와 같이 DNA 단편으로 합성되어 조작된 IgΛ 경쇄 유전자좌에 추가될 수 있다. 마찬가지로, 추가 인간 JΛ 및/또는 CΛ 유전자 분절은 상업적으로 이용 가능한 BAC 클론으로부터 획득되거나 공개된 서열로부터 직접 합성될 수 있다. 또한, 내인성 IgΛ 경쇄 인핸서 영역(또는 서열)은 전술한 바와 같이 조작된 IgΛ 경쇄 유전자좌로부터 결실될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 조작된 IgΛ 경쇄 유전자좌를 보여주는 예시적인 도면은 도 1, 2, 3 및 4 중 어느 하나에 제시되어 있다.

[0217] 경우에 따라, IgΛ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 인간 IgΛ 경쇄 서열(즉, 인간 VΛ, JΛ 및/또는 CΛ 유전자 분절을 함유하는 서열)은 비인간 동물에서의 발현에 최적화된 코돈을 포함하도록 개별적으로 변형될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,670,356호 및 제5,874,304호 참조). 코돈 최적화된 서열은 합성 서열이고, 바람직하게는 코돈 최적화되지 않은 부모 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 동일한 폴리펩티드(또는 전장 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 활성을 갖는 전장 폴리펩티드의 생물학적으로 활성인 단편)를 암호화한다. 일부 구현예에서, 인간 IgΛ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 인간 IgΛ 경쇄 서열은 특정 세포 유형(예를 들어, 설치류 세포)에 대한 코돈 사용을 최적화하기 위해 변경된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비인간 동물(예를 들어, 설치류)의 게놈 내에 삽입될 각 뉴클레오타이드 서열의 코돈은 비인간 동물의 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 이러한 서열은 코돈 최적화 서열로서 기술될 수 있다.

[0218] 일부 구현예에서, 인간 IgΛ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 삽입에는 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물 생식선 게놈의 최소한의 변형이 사용되어 전체적으로 또는 부분적으로 인간 인 경쇄를 포함하는 항체를 발현시킨다. 녹아웃(knockouts)과 녹인(knock-ins)을 포함하여 조작된 비인간 동물을 생성하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc. (2000) 참조). 예를 들어, 유전자 이식 설치류를 생성하는 것은, 하나 이상의 내인성 설치류 유전자(또는 유전자 분절)의 유전자좌를 파괴하는 것 및 하나 이상의 이종 유전자(또는 유전자 분절 또는 뉴클레오타이드 서열)를 설치류 게놈 내에 도입하는 것, 일부 구현예에서, 내인성 설치류 유전자(또는 유전자 분절)와 동일한 위치에 도입하는 것을 선택적으로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 IgΛ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 설치류의 생식선 게놈에 무작위로 삽입된 IgΛ 경쇄 이식유전자 중 쥐과(예: 마우스 또는 랫트) IgΛ 경쇄 불변 영역 유전자의 상류에 도입된다. 일부 구현예에서, 인간 IgΛ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 설치류 생식선 게놈의 내인성 IgΛ 경쇄 유전자좌의 쥐과(예: 마우스 또는 랫트) IgΛ 경쇄 불변 영역 유전자의 상류에 도입되고; 일부 특정 구현예에서, 내인성 IgΛ 유전자좌는 설치류 CΛ1 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 IgΛ 유전자 분절(예: VΛ, JΛ 및/또는 CΛ)을 함유하도록 변경되거나, 변형되거나, 조작된다.

[0219] 예시적인 조작된 IgΛ 경쇄 유전자좌의 개략도(축척에 비례하지는 않음)는 도 1 내지 도 4에 제공되어 있다. 특

히, 도 1 및 도 3은 복수의 인간 $V\lambda$, $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 분절을 함유하는 뉴클레오타이드 서열의 삽입을 특징으로 하는 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 작제를 위한 예시적인 전략을 제시한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 인간 $E\lambda$ 서열 (또는 영역)을 함유하는 DNA 단편은 상동성 재조합을 통해 설치류 $C\lambda$ 영역의 하류에 삽입된다. 본 DNA 단편은 인간 $E\lambda$ 서열에 대해 3'에 위치되고 3개의 조작된 인간 $E\lambda$ 요소를 설치류 $C\lambda 1$ 영역의 하류(또는 3')에 함유하는 네오마이신 선택 카세트(예: *loxP* 재조합 인식 부위가 측면에 위치한 네오마이신 내성 유전자[NEO^R])를 함유한다. 또한, 도 1에는 인간 $V\lambda$ 분절의 제1 부분을 함유하는 DNA 단편이 도시되어 있으며, 인간 $J\lambda$ - $C\lambda$ 분절 쌍(예: 인간 $J\lambda 1$ - $C\lambda 1$, $J\lambda 2$ - $C\lambda 2$, $J\lambda 3$ - $C\lambda 3$, $J\lambda 6$ - $C\lambda 6$)과 인간 $J\lambda 7$ 분절의 세트는 상동성 재조합을 통해 설치류 $C\lambda 1$ 영역에 삽입되어 있다. 도시된 바와 같이, 히그로마이신 선택 카세트(예를 들어, *Frt* 재조합 인식 부위가 측면에 위치한 히그로마이신 내성 유전자 [HYG^R])는 표적화 벡터의 5' 말단 및 표적화 벡터에 함유된 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 서열의 상류에 위치한다. 히그로마이신 선택 카세트는 아래의 실시예 섹션에서 기술된 후속하는 표적화 벡터와의 상동성 재조합을 통해 제거된다. 그런 다음, 표적화 벡터는 설치류 배아 줄기(ES) 세포 내로 전기 천공되어 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계능을 가진 설치류를 생성한다. 양성 설치류 ES 세포 클론이 일단 확인되면, 다른 도시된 표적화 벡터가 연속적인 방식으로 전기 천공되고 각각의 단계에서 확인되어 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 작제를 완료한다(도 2 참조). 최종 표적화 벡터는 상동성 재조합을 통해 내인성 $Ig\lambda$ 경쇄 분절을 결실을 유도하여 2개의 잠재적인 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 대립유전자를 생성하는 상동 아암이 있거나(6680 표적화 벡터) 없는(6597 표적화 벡터) 상태로 설계될 수 있다(도 2). 또한, 임의의 잔여 선택 카세트는 재조합효소 매개 결실을 통해 원하는 대로 결실시킬 수 있다. 가이드 RNA(gRNA)를 사용해 추가 인간 $V\lambda$ 유전자 분절을 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌 내에 삽입하기 위한 대안적인 전략은 도 3에 제시되어 있다.

[0220] 일단 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 서열이 BAC 클론의 비인간 $Ig\lambda$ 경쇄 불변 영역의 상류에 삽입되면, $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌로의 통합을 위한 표적화 벡터가 생성된다. 표적화 벡터의 생성을 위해 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 서열로 표적화된 BAC 클론은 쥐과 동물(예를 들어, 마우스 또는 랫트) 기원의 5' 및/또는 3' 측면 계능 DNA를 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 표적화 벡터를 생성하기 위해 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 서열로 표적화된 BAC 클론은 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 서열과의 중첩 영역이 생성되도록 인간 기원의 5' 및/또는 3' 측면 계능 DNA를 함유할 수 있다. 이러한 방식으로, 다수의 조작된 BAC 클론의 연속적인 표적화가 가능하다(예를 들어, 도 1 참조). 최종 표적화 벡터는 비인간 세포(예를 들어, 설치류 배아 줄기 세포)의 계능 내 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌로 통합된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터는, 하나 이상의 IgH 불변 영역 유전자와 작동 가능하게 연결된 인간 V_H , D_H 및 J_H 계능 DNA(예를 들어, 복수의 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절을 함유함) 및/또는 IgK 불변 영역 유전자와 작동 가능하게 연결된 인간 V_K 및 J_K 계능 DNA(예를 들어, 복수의 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절을 함유함)를 추가로 함유하는 비인간 세포의 생식선 계능 내 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌로 통합된다(예를 들어, 미국 특허 제8,502,018호, 제8,642,835호, 제8,697,940호 및 제8,791,323호 참조하며, 이들 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0221] 표적화 벡터에 함유된 서열이 설치류 배아 줄기 세포의 계능에 삽입되어, 비인간 세포 또는 비인간 동물(예: 마우스)이 인간 $Ig\lambda$ 경쇄를 갖는 항체를 전체적으로 또는 부분적으로 발현하는 능력을 갖도록, 표적화 벡터가 전기 천공에 의해 설치류(예: 마우스) 배아 줄기 세포 내에 도입된다. 본원에 기술된 바와 같이, 유전자 이식 설치류는 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌가 설치류 계능의 생식선에서 생성된 곳(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 내인성 설치류 $C\lambda$ 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 서열을 함유하는 내인성 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌)에서 생성된다. 항체는 설치류 B 세포의 표면 및 상기 설치류의 혈청에서 발현되며, 상기 항체는 인간 $V\lambda$ 도메인을 갖는 경쇄, 일부 구현예에서는 인간 $V\lambda$ 및 $C\lambda$ 도메인을 갖는 경쇄를 특징으로 한다. 설치류 계능의 생식선 내의 내인성 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 표적화 벡터에 의해 표적화되지 않으며, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 바람직하게는 내인성 설치류 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌가 아닌 위치에서 삽입된다(예를 들어, 무작위로 삽입된 이식유전자).

[0222] 전술한 바와 같은 비인간 동물에서 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 생성하면, 인간 $V\lambda$ 도메인을 갖고, 일부 구현예에서는 인간 $V\lambda$ 및 $C\lambda$ 도메인을 갖는 그러한 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌로부터 발현된 $Ig\lambda$ 경쇄를 함유하는 항체를 생산하는 조작된 설치류 계통이 제공된다. IgH 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절을 포함하는 조작된 IgH 유전자좌의 존재를 이용하여, 인간 항체 기반 치료제의 개발을 위한 항체 및 항체 성분을 생산하는 조작된 설치류 계통이 생성된다. 따라서, 인간의 질환을 치료하기 위한 새로운 항체 기반 약물을 개발하기 위해 인간 $V\lambda$ 도메인을 활용하는 대안적인 생체 내 시스템을 제공하는 능력을 가진

하나의 조작된 설치류 계통이 실현된다.

- [0223] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 계놈은 미국 특허 제8,502,018호, 제8,642,835호, 제8,697,940호 및 제8,791,323호에 기술된 바와 같은 하나 이상의 인간 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 (예를 들어, 이중 교배 또는 다수 유전자 표적화 전략을 통해) 추가로 포함하며, 상기 문헌 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 대안적으로, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 조작하여 인간화 IgH 및/또는 Ig κ 유전자좌를 포함하는 배아 줄기 세포로 만들 수 있거나, 본원에 기술된 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 비인간 동물을 인간화 IgH 및/또는 Ig κ 유전자좌를 포함하는 또 다른 비인간 동물과 교배시킬 수 있다. 인간화 IgH 및/또는 Ig κ 유전자좌를 포함하는 다양한 이러한 동물, 예를 들어, VELOCIMMUNE® 계통(예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 제8,502,018호 및/또는 제8,642,835호 참조), XENOMOUSE™ 계통(예를 들어, Mendez, M.J. 외, 1997, Nat. Genetics 15(2):146-56 및 Jakobovits, A. 외, 1995, Ann. NY Acad. Sci. 764:525-35 참조) 등이 공지되어 있다. 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌의 동형접합성은 교배에 의해 후속하여 달성될 수 있다. 대안적으로, (전술한) 무작위로 삽입된 조작된 Ig λ 경쇄 이식유전자의 경우, 설치류 계통은 무엇보다도 이식유전자로부터 인간 V λ 도메인의 발현에 기초하여 선택될 수 있다.
- [0224] 대안적으로 및/또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물의 생식선 계놈은 결실되었거나, 불활성화되었거나, 기능적으로 침묵화되었거나 달리 비기능성인 내인성 Ig κ 경쇄 유전자좌를 추가로 포함한다. 유전자 또는 유전자좌를 결실시키거나 비기능성으로 만들기 위한 유전자 변형은 본원에 기술된 방법 및/또는 당업계에 공지된 방법들을 사용해 달성될 수 있다.
- [0225] 유전자이식 파운더 비인간 동물은, 그의 생식선 계놈에서 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌가 존재하는 것 및/또는 비인간 동물의 조직이나 세포에서 인간 Ig λ 경쇄 서열을 갖는 항체를 전체적으로 또는 부분적으로 발현하는 것에 기초하여 식별할 수 있다. 그런 다음, 유전자이식 파운더 비인간 동물은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 가진 추가 비인간 동물을 교배시킴으로써, 각각 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌의 하나 이상의 카피를 갖는 비인간 동물 코호트를 생성하는데 사용될 수 있다. 또한, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 가진 유전자이식 비인간 동물은 원하는대로 다른 이식유전자(예: 인간 면역글로불린 유전자)를 가진 유전자이식 비인간 동물과 추가로 교배시킬 수 있다.
- [0226] 일부 구현예에서, 유전자이식 비인간 동물은 이식유전자 또는 통합된 서열(들)의 발현을 조절, 지시, 유도 및/또는 특정 세포 유형화할 수 있는 선택 시스템을 함유하도록 생산될 수도 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 조건에 따라 발현되는 항체의 인간 Ig λ 경쇄를 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 서열을 포함하도록 조작될 수 있다(예를 들어, Rajewski, K. 외의 1996, J. Clin. Invest. 98(3):600-3). 예시적인 시스템은 박테리오파지 P1의 Cre/loxP 재조합 효소 시스템(예를 들어, Lakso, M. 외, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6232-6 참조) 및 사카로미세스 세레비시아(*S. cerevisiae*)의 FLT/Frt 재조합 효소 시스템(O'Gorman, S. 외, 1991, Science 251:1351-5)을 포함한다. 이러한 동물은 "이중(double)" 유전자이식 동물의 작제를 통해서, 예를 들어, 두 마리의 유전자 이식 동물, 즉 선택된 변형(예: 본원에 기술된바와 같은 내인성 Ig λ 경쇄 유전자좌)을 포함하는 이식유전자를 함유하는 한 마리와 재조합 효소(예: Cre 재조합 효소)를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 다른 한 마리의 교배에 의해 제공될 수 있다.
- [0227] 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 종종 비인간 동물의 의도된 용도에 따라 추가적인 인간 유전자, 인간화 유전자 또는 달리 조작된 유전자를 포함하도록 전술한 바와 같이 제작되거나, 당업계에 알려진 방법을 사용해 제작될 수 있다. 이러한 인간 유전자, 인간화 유전자 또는 달리 조작된 유전자의 유전 물질은, 원하는대로, 전술한 바와 같이 유전자 변형되었거나 변경된 세포(예: 배아 줄기 세포) 계놈의 추가적인 변경을 통해, 또는 유전자 변형되었거나 조작된 다른 계통을 사용해 당업계에 알려진 변식 기술을 통해 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 유전자이식 인간 IgH 및/또는 Ig κ 경쇄 유전자 또는 유전자 분절을 추가로 포함하도록 제작된다(예를 들어, Murphy, A.J. 외, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-5158; 미국 특허 제8,502,018호; 미국 특허 제8,642,835호; 미국 특허 제8,697,940호; 미국 특허 제8,791,323호; 및 미국 특허 출원 공개 제2013/0096287 A1호를 참조하며, 이들은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).
- [0228] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 표적화 벡터를 변형된 계통으로부터의 세포에 내에 도입하여 제작될 수 있다. 한 가지 예를 들자면, 상술한 바와 같은, 표적화 벡터가 벨로크이뮤(VELOCIMMUNE)® 마우스에 도입될 수 있다. VELOCIMMUNE® 마우스는 완전한 인간 가변 영역과 마우스

불변 영역을 갖는 항체를 발현한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 인간 면역 글로불린 유전자(가변 및/또는 불변 영역 유전자)를 추가로 포함하도록 제작된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자와 및 이중 종(예: 인간) 유래의 유전 물질을 포함하되, 상기 유전 물질은 하나 이상의 인간 중쇄 및/또는 Igκ 경쇄 가변 도메인을 전체적으로 또는 부분적으로 암호화한다.

[0229] 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 포함하는 비인간 동물은 (예를 들어, 이중 교배 또는 다수 표적화 전략을 통해) 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는데, 상기 하나 이상의 변형은 Murphy, A.J. 외, (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5153-8; Macdonald, L.E. 외의 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(14):5147-52; 미국 특허 번호 제8,502,018호, 제8,642,835호, 제8,697,940호 및 제8,791,323호에서 기술된 바와 같으며, 본 인용 문헌들은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 포함하는 설치류는 인간화 IgH 및/또는 Igκ 경쇄 가변 영역 유전자좌를 포함하는 설치류와 교배된다(예를 들어, 미국 특허 제8,502,018호, 제8,642,835호, 제8,697,940호 및/또는 제8,791,323호를 참조하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 포함하는 설치류는 인간화 IgH 가변 영역 유전자좌(예를 들어, 미국 특허 제8,502,018호, 제8,642,835호, 제8,697,940호 및/또는 제8,791,323호를 참조하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨) 및 불활성화된 내인성 Igκ 경쇄 유전자좌(미국 특허 제9,006,511호, 제9,012,717호, 제9,029,628호, 제9,035,128호, 제9,066,502호, 제9,150,662호 및 제9,163,092호를 참조하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨)를 포함하는 설치류와 교배된다.

[0230] 마우스에서 조작된 Igλ 경쇄 유전자의 작제를 기술하는 구현예(즉, 인간 Igλ 경쇄를 함유하는 항체가 전체적으로 또는 부분적으로 발현되도록 마우스 Cλ 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 유전자 분절이 존재하는 것을 특징으로 하는 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 갖는 마우스)가 본원에서 집중적으로 논의되고 있지만, 내인성 Igλ 경쇄 유전자좌를 포함하는 다른 비인간 동물도 제공된다. 이러한 비인간 동물은, 예를 들어, 포유류, 예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 돼지, 소(예를 들어, 젖소, 황소, 버팔로), 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은털 원숭이) 등을 포함하여, 본원에 개시된 바와 같은 항체를 발현하도록 유전자 변형될 수 있는 임의의 동물을 포함한다. 예를 들어, 적합하게 유전자 변형가능한 ES 세포를 쉽게 구할 수 없는 비인간 동물의 경우, 유전자 변형을 포함하여 비인간 동물을 제조하기 위한 다른 방법이 채용된다. 이러한 방법은, 예를 들어, 비ES 세포 계능(예를 들어, 섬유아세포 또는 유도 다능성 세포)을 변형하는 단계 및 적합한 세포, 예를 들어, 핵이 없는 난모세포에 유전자 변형된 계능을 전달하기 위해 체세포 핵 전달(SCNT)을 채용하는 단계, 및 변형된 세포(예를 들어, 변형된 난모세포)를 배아를 형성하기에 적합한 조건 하에 비-인간 동물에 잉태시키는 단계를 포함한다.

[0231] 비인간 동물의 생식선 계능(예: 돼지, 젖소, 설치류, 닭 등의 계능)을 변형하는 방법은, 예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전자 활성화인자 유사 작동자 뉴클레아제(TALEN), 또는 Cas 단백질(CRISPR/Cas 시스템)을 사용해 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 계능을 변형시키는 것을 포함한다. 비인간 동물의 생식선 계능을 변형시키는 방법에 대한 지침은, 예를 들어, 미국 특허 출원 제14/747,461호(2015년 6월 23일 출원), 제14/948,221호(2015년 11월 20일 출원) 및 제14/974,623호(2015년 12월 18일 출원)에서 찾을 수 있으며, 3개의 출원 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0232] 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은, 예를 들어, 뛰는 쥐상과(Dipodoidea 또는 Muroidea) 아목의 작은 포유동물이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전적으로 개질된 동물은 설치류이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 설치류는 마우스, 랫트 및 햄스터로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 설치류는 쥐상과 아목으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전적으로 변형된 동물은 칼로미스쿠스과(Calomyscidae)(예를 들어, 마우스 유사 햄스터), 비단털쥐과(Cricetidae)(예: 햄스터, 미국 랫트 및 마우스, 들쥐), 쥐과(Muridae)(진짜 마우스 및 랫트, 사막쥐, 가시쥐, 갈기쥐), 네소미스과(Nesomyidae)(클라이밍 마우스, 락 마우스(rock mice), 흰꼬리 랫트, 말라가시 랫트 및 마우스), 가시겨울잠쥐과(Platacanthomyidae)(예: 가시겨울잠쥐), 및 소경쥐과(Spalacidae)(예: 두더쥐, 대나무쥐, 및 동북)로부터 선택된 과(family)로부터 유래한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 유전자 변형된 설치류는 진짜 마우스 또는 랫트(쥐상과), 사막쥐(gerbil), 가시쥐(spiny mouse), 갈기쥐(crested rat)로부터 선택된다. 일부 특정 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 유전자 변형된 마우스는 쥐상과의 구성원으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물은 설치류이다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된

바와 같은 설치류는 마우스와 랫드로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물은 마우스이다.

[0233] 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물은 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 및 C57BL/01a로부터 선택된 C57BL 계통의 마우스인 설치류이다. 일부 특정 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1(예를 들어, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6(129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 계통으로 이루어지는 군으로부터 선택된 129 계통이다(예: Festing 외, 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach, W. 외, 2000, Biotechniques 29(5):1024-1028, 1030, 1032 참조). 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 변형된 마우스는 전술한 129 계통 및 전술한 C57BL/6 계통의 혼합체이다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 마우스는 전술한 129 계통의 혼합체, 또는 전술한 BL/6 계통의 혼합체이다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 129 계통의 혼합체는 129S6(129/SvEvTac) 계통이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 마우스는 BALB 계통, 예를 들어 BALB/c 계통이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 마우스는 BALB 계통 및 전술한 다른 계통의 혼합체이다.

[0234] 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 바와 같은 비인간 동물은 랫트이다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 랫트는 위스타 랫트(Wistar rat), LEA 계통, 스프래그 다울리(Sprague Dawley) 계통, 피셔(Fischer) 계통, F344, F6, 및 다크 아구티(Dark Agouti)로부터 선택된다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 설명된 바와 같은 랫트 계통은 위스타, LEA, 스프래그 다울리, 피셔, F344, F6, 및 야크 아구티로 이루어지는 군으로부터 선택된 2가지 이상 계통의 혼합체이다.

[0235] 랫트 다능성 및/또는 재생성 세포는, 예를 들어, ACI 랫트 계통, 검은 아구티(Dark Agouti, DA) 랫트 계통, 위스타 랫트 계통, LEA 랫트 계통, 스프래그 다울리(SD) 랫트 계통, 또는 피셔 F344나 피셔 F6과 같은 피셔 랫트 계통을 포함하는 임의의 랫트 계통으로부터 유래될 수 있다. 랫트 다능성 및/또는 재생성 세포는 위에 인용된 하나 이상의 계통의 혼합체로부터 유래된 계통으로부터 획득될 수도 있다. 예를 들어, 랫트 다능성 및/또는 재생성 세포는 DA 계통 또는 ACI 계통으로부터 유래될 수 있다. ACI 랫트 계통은 흰 배와 다리 및 RT1av1 일배체형을 가진 검은 아구티를 가지는 것을 특징으로 한다. 이러한 계통은 Harlan Laboratories를 포함하는 다양한 공급원으로부터 이용이 가능하다. ACI 랫트 유래의 랫트 ES 세포주의 예는 ACI.G1 랫트 ES 세포이다. 검은 아구티(DA) 랫트 계통은 아구티 코트(coat) 및 RT1av1 일배체형을 가지는 것을 특징으로 한다. 이러한 랫트는 Charles River 및 Harlan Laboratories를 포함하는 다양한 공급원으로부터 이용이 가능하다. DA 랫트 유래의 랫트 ES 세포주의 실시예는 DA.2B 랫트 ES 세포주 및 DA.2C 랫트 ES 세포주이다. 일부 구현예에서, 랫트 다능성(pluripotent) 세포 및/또는 재생성(totipotent) 세포는 근친교배된 랫트 계통 유래이다(예를 들어, 2014년 8월 21에 공개된 미국 특허 출원 공개 제2014-0235933 A1호를 참조하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨).

[0236] 특정 예시적인 실시예 - 조작된 IgH 유전자좌

[0237] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함하며, 생식선 구성으로 배열되고 비인간 IgH 불변 영역, 인헨서 및 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절이 존재하는 것을 특징으로 하는 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 비인간 IgH 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절을 포함한다.

[0238] 일부 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 이상(예: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52개 등)의 인간 V $_H$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연계에서 나타나는 인간 IgH 유전자좌의 인간 V $_H$ 3-74 이상 인간 V $_H$ 6-1 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 V $_H$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 V $_H$ 유전자 분절 V $_H$ 3-74, V $_H$ 3-73, V $_H$ 3-72, V $_H$ 2-70, V $_H$ 1-69, V $_H$ 3-66, V $_H$ 3-64, V $_H$ 4-61, V $_H$ 4-59, V $_H$ 1-58, V $_H$ 3-53, V $_H$ 5-51, V $_H$ 3-49, V $_H$ 3-48, V $_H$ 1-46, V $_H$ 1-45, V $_H$ 3-43, V $_H$ 4-39, V $_H$ 4-34, V $_H$ 3-33, V $_H$ 4-31, V $_H$ 3-30, V $_H$ 4-28, V $_H$ 2-26, V $_H$ 1-24, V $_H$ 3-23, V $_H$ 3-21, V $_H$ 3-20,

V_H1-18, V_H3-15, V_H3-13, V_H3-11, V_H3-9, V_H1-8, V_H3-7, V_H2-5, V_H7-4-1, V_H4-4, V_H1-3, V_H1-2 및 V_H6-1을 포함한다.

[0239] 일부 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 5, 10, 15, 20, 25개 이상(예를 들어, 26, 27개 등)의 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 IgH 유전자좌의 인간 D_H1-1 이상 인간 D_H7-27 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 D_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 D_H 유전자 분절 D_H1-1, D_H2-2, D_H3-3, D_H4-4, D_H5-5, D_H6-6, D_H1-7, D_H2-8, D_H3-9, D_H3-10, D_H5-12, D_H6-13, D_H2-15, D_H3-16, D_H4-17, D_H6-19, D_H1-20, D_H2-21, D_H3-22, D_H6-25, D_H1-26 및 D_H7-27을 포함한다.

[0240] 일부 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개 이상의 기능성 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 IgH 유전자좌의 인간 J_H1 이상 인간 J_H6 이하의 유전자 분절에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 J_H 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 J_H 유전자 분절 J_H1, J_H2, J_H3, J_H4, J_H5 및 J_H6을 포함한다.

[0241] 일부 구현예에서, 비인간 IgH 불변 영역은, 예를 들어 면역글로불린 M (IgM), 면역글로불린 D (IgD), 면역글로불린 G (IgG), 면역글로불린 E (IgE) 및 면역글로불린 A (IgA)와 같은 하나 이상의 비인간 IgH 불변 영역 유전자를 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 비인간 IgH 불변 영역은 설치류 IgM, 설치류 IgD, 설치류 IgG3, 설치류 IgG1, 설치류 IgG2b, 설치류 IgG2a, 설치류 IgE 및 설치류 IgA 불변 영역 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_H, D_H 및 J_H 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 IgH 인핸서(즉, 인핸서 서열 또는 인핸서 영역)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_H, D_H 및 J_H 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 IgH 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 V_H, D_H 및 J_H 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 IgH 인핸서(또는 인핸서 서열) 및 하나 이상의 비인간 IgH 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된다.

[0242] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 IgH 유전자좌는 내인성 Adam6 유전자를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 IgH 유전자좌는 동일한 종의 야생형 비인간 동물의 생식선 계놈에서 발견된 것과 동일한 생식선 계놈 위치에 내인성 Adam6 유전자(또는 Adam6 암호화 서열)를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 IgH 유전자좌는 인간 Adam6 유사유전자를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 IgH 유전자좌는 하나 이상의 비인간(예를 들어, 설치류) Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열의 삽입을 포함한다. 상기 삽입은 본원에 기술된 바와 같은 조작된 면역글로불린 중쇄 유전자좌의 외부(V_H 유전자 분절의 5' 최 상류)에 있거나, 조작된 IgH 유전자좌 내에 있거나, 비인간 동물(예: 무작위로 도입된 비인간 Adam6 암호화 서열), 세포 또는 조직의 생식선 계놈 내의 다른 곳에 있을 수 있다.

[0243] 본원에 기술된 바와 같은 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비인간 V_H 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 검출 가능하게 발현하지 않는다. 본원에 기술된 바와 같은 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비인간 V_H 영역(예: V_H, D_H 및/또는 J_H)을 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 함유하지 않거나, 결여되어 있거나, 이의 결실을 함유한다. 본원에 기술된 바와 같은 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 내인성 비인간 V_H, D_H 및 J_H 유전자 분절의 전체적 또는 부분적 결실을 포함하는 생식선 계놈을 갖는다. 다양한 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 번식 능력이 있다.

[0244] 이러한 조작된 IgH 유전자좌(또는 대립유전자)를 보유하는 표적화 벡터, 비인간 세포 및 동물의 생성을 위한 지침은, 예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호에서 발견할 수 있으며, 문헌 전체는 참조로서 본원에 통합된다. 당업자는 비인간(예: 포유동물) 계놈의 이러한 유전자 조작 및/또는 조작을 달성하거나, 비인간 동물의 생식선 계놈 내로의 도입을 위해 이러한 서열을 달리 제작하거나, 제공하거나, 제조하기 위한, 당업계에

공지된 다양한 기술을 알고 있다.

[0245] **특정 예시적인 구현예 - 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌**

[0246] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 포함하며, 생식선 구성으로 배열되고 비인간 $Ig\kappa$ 경쇄 불변 영역, $Ig\kappa$ 인헨서 및 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절이 존재하는 것을 특징으로 하는 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 하나 이상의 인간 $V\kappa$ 유전자 분절 및 비인간 $Ig\kappa$ 불변 영역($C\kappa$)에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 인간 $J\kappa$ 유전자 분절을 포함한다.

[0247] 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌의 원위 가변 클러스터(또는 원위 아암 또는 원위 복제)에서 나타나는 적어도 인간 $V\kappa$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌의 근위 가변 클러스터(또는 근위 아암 또는 근위 복제)에서 나타나는 적어도 인간 $V\kappa$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌의 원위 및 근위 가변 클러스터에서 나타나는 적어도 인간 $V\kappa$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌의 인간 $V\kappa$ 2-40(또는 $V\kappa$ 3D-7) 이상 인간 $V\kappa$ 4-1 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 $V\kappa$ 유전자 분절을 포함한다.

[0248] 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 5, 10, 15, 20, 25, 30, 또는 35개 이상(예를 들어, 36, 37, 38, 39, 40개 등)의 인간 $V\kappa$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 인간 $V\kappa$ 유전자 분절 $V\kappa$ 3D-7, $V\kappa$ 1D-8, $V\kappa$ 1D-43, $V\kappa$ 3D-11, $V\kappa$ 1D-12, $V\kappa$ 1D-13, $V\kappa$ 3D-15, $V\kappa$ 1D-16, $V\kappa$ 1D-17, $V\kappa$ 3D-20, $V\kappa$ 6D-21, $V\kappa$ 2D-26, $V\kappa$ 2D-28, $V\kappa$ 2D-29, $V\kappa$ 2D-30, $V\kappa$ 1D-33, $V\kappa$ 1D-39, $V\kappa$ 2D-40, $V\kappa$ 2-40, $V\kappa$ 1-39, $V\kappa$ 1-33, $V\kappa$ 2-30, $V\kappa$ 2-28, $V\kappa$ 1-27, $V\kappa$ 2-24, $V\kappa$ 6-21, $V\kappa$ 3-20, $V\kappa$ 1-17, $V\kappa$ 1-16, $V\kappa$ 3-15, $V\kappa$ 1-12, $V\kappa$ 3-11, $V\kappa$ 1-9, $V\kappa$ 1-8, $V\kappa$ 1-6, $V\kappa$ 1-5, $V\kappa$ 5-2 및 $V\kappa$ 4-1을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 $V\kappa$ 유전자 분절 $V\kappa$ 3D-7, $V\kappa$ 1D-8, $V\kappa$ 1D-43, $V\kappa$ 3D-11, $V\kappa$ 1D-12, $V\kappa$ 1D-13, $V\kappa$ 3D-15, $V\kappa$ 1D-16, $V\kappa$ 1D-17, $V\kappa$ 3D-20, $V\kappa$ 6D-21, $V\kappa$ 2D-26, $V\kappa$ 2D-28, $V\kappa$ 2D-29, $V\kappa$ 2D-30, $V\kappa$ 1D-33, $V\kappa$ 1D-39 및 $V\kappa$ 2D-40을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 $V\kappa$ 유전자 분절 $V\kappa$ 2-40, $V\kappa$ 1-39, $V\kappa$ 1-33, $V\kappa$ 2-30, $V\kappa$ 2-28, $V\kappa$ 1-27, $V\kappa$ 2-24, $V\kappa$ 6-21, $V\kappa$ 3-20, $V\kappa$ 1-17, $V\kappa$ 1-16, $V\kappa$ 3-15, $V\kappa$ 1-12, $V\kappa$ 3-11, $V\kappa$ 1-9, $V\kappa$ 1-8, $V\kappa$ 1-6, $V\kappa$ 1-5, $V\kappa$ 5-2 및 $V\kappa$ 4-1을 포함한다.

[0249] 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 1, 2, 3, 4, 또는 5개 이상의 기능성 인간 $J\kappa$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌의 인간 $J\kappa$ 1 이상 인간 $J\kappa$ 5 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 $J\kappa$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 $J\kappa$ 유전자 분절 $J\kappa$ 1, $J\kappa$ 2, $J\kappa$ 3, $J\kappa$ 4 및 $J\kappa$ 5를 포함한다.

[0250] 일부 구현예에서, 상기 인간 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 $Ig\kappa$ 경쇄 인헨서(즉, 인헨서 서열 또는 인헨서 영역)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 $Ig\kappa$ 경쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 $V\kappa$ 및 $J\kappa$ 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 $Ig\kappa$ 경쇄 인헨서(또는 인헨서 서열 또는 인헨서 영역) 및 하나 이상의 비인간 $Ig\kappa$ 경쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된다.

[0251] 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 $C\kappa$ 영역은, 예를 들어, 마우스 $C\kappa$ 영역이나 랫트 $C\kappa$ 영역과 같은 설치류 $C\kappa$ 영역을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 $C\kappa$ 영역은 129 계통, BALB/c 계통, C57BL/6 계통, 혼합된 129xC57BL/6 계통 또는 이들의 조합을 포함하는 유전적 배경 유래의 마우스 $C\kappa$ 영역이거나 이를 포함한다.

[0252] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은 본원에 기술된 바와 같은 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 포함하고, 불활성화된 $Ig\kappa$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)를 추가로 포함한다.

[0253] 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비인간 $V\kappa$ 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 검출 가능하게 발현하지 않는다. 다양한 구현예에

서, 본원에 기술된 바와 같은 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 항체 분자에서 내인성 비인간 V_k 영역을 전체적으로 또는 부분적으로 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 함유하지 않거나, 결여되어 있거나, 이의 결실을 함유한다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 제공된 비인간 동물, 비인간 세포 또는 비인간 조직은 내인성 비인간 V_k 및 J_k 유전자 분절의 전체적 또는 부분적 결실을 포함하는 생식선 계통을 갖는다.

[0254] 이러한 조작된 Ig_k 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)를 보유하는 표적화 벡터, 비인간 세포 및 동물의 생성을 위한 지침은, 예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호에서 발견할 수 있으며, 문헌 전체는 참조로서 본원에 통합된다. 당업자는 비인간(예: 포유동물) 계통의 이러한 유전자 조작 및/또는 조작을 달성하거나, 비인간 동물의 생식선 계통 내로의 도입을 위해 이러한 서열을 달리 제작하거나, 제공하거나, 제조하기 위한, 당업계에 공지된 다양한 기술을 알고 있다.

[0255] **특정 예시적인 구현예 - 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌**

[0256] 일부 구현예에서, 제공된 비인간 동물은, 생식선 구성으로 배열되고 비인간 $C\lambda$ 유전자 분절(또는 $C\lambda$ 영역 유전자)의 상류에 삽입되고, 이에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 $V\lambda$, $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 유전자 분절이 존재하는 것을 특징으로 하는 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 인헨서 영역(또는 인헨서 서열)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 및 비인간 $Ig\lambda$ 경쇄 불변 ($C\lambda$) 영역에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 적어도 클러스터 A에서 나타나는; 일부 구현예에서는 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 클러스터 A 및 클러스터 B에서 나타나는; 일부 특정 구현예에서는, 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 클러스터 A, 클러스터 B 및 클러스터 C에서 나타나는 인간 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함한다.

[0257] 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30개 이상(예를 들어, 31, 32, 33, 34, 35개 등)의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 인간 $V\lambda$ 4-69 이상 인간 $V\lambda$ 3-1 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 인간 $V\lambda$ 5-52 이상 인간 $V\lambda$ 3-1 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 인간 $V\lambda$ 3-27 이상 인간 $V\lambda$ 3-1 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 $V\lambda$ 4-69, $V\lambda$ 8-61, $V\lambda$ 4-60, $V\lambda$ 6-57, $V\lambda$ 10-54, $V\lambda$ 5-52, $V\lambda$ 1-51, $V\lambda$ 9-49, $V\lambda$ 1-47, $V\lambda$ 7-46, $V\lambda$ 5-45, $V\lambda$ 1-44, $V\lambda$ 7-43, $V\lambda$ 1-40, $V\lambda$ 5-39, $V\lambda$ 5-37, $V\lambda$ 1-36, $V\lambda$ 3-27, $V\lambda$ 3-25, $V\lambda$ 2-23, $V\lambda$ 3-22, $V\lambda$ 3-21, $V\lambda$ 3-19, $V\lambda$ 2-18, $V\lambda$ 3-16, $V\lambda$ 2-14, $V\lambda$ 3-12, $V\lambda$ 2-11, $V\lambda$ 3-10, $V\lambda$ 3-9, $V\lambda$ 2-8, $V\lambda$ 4-3 및 $V\lambda$ 3-1을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 $V\lambda$ 5-52 내지 $V\lambda$ 1-40 및 $V\lambda$ 3-27 내지 $V\lambda$ 3-1의 적어도 기능성 인간 $V\lambda$ 유전자 분절을 포함한다.

[0258] 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 이상의 기능성 인간 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 인간 $J\lambda$ 1 이상 인간 $J\lambda$ 7 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 $J\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda$ 1, $J\lambda$ 2, $J\lambda$ 3, $J\lambda$ 6 및 $J\lambda$ 7을 포함한다.

[0259] 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개 이상의 기능성 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 자연에서 나타나는 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌의 인간 $C\lambda$ 1 이상 인간 $C\lambda$ 7 이하의 유전자 분절 사이에서 발견되는 모든 또는 실질적으로 모든 기능성 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 인간 $C\lambda$ 유전자 분절 $C\lambda$ 1, $C\lambda$ 2, $C\lambda$ 3 및 $C\lambda$ 6를 포함한다.

[0260] 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 야생형 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에서 나타나는 것과 동일한 비인간 $Ig\lambda$ 경쇄 인헨서 영역(또는 인헨서 서열)을 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 적어도 하나의 비인간 $Ig\lambda$ 경쇄 인헨서 영역(또는 인

헨서 서열)이 전체적으로 또는 부분적으로 결여되어 있다(예: Igλ 인헨서 2-4 또는 Eλ2-4).

- [0261] 일부 구현예에서, 상기 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 Igλ 경쇄 인헨서(즉, 인헨서 서열 또는 인헨서 영역) 및 하나 이상의 인간 Igλ 경쇄 인헨서(즉, 인헨서 서열 또는 인헨서 영역)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 Igλ 경쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절은 하나 이상의 비인간 Igλ 경쇄 인헨서(또는 인헨서 서열 또는 인헨서 영역), 하나 이상의 인간 Igλ 경쇄 인헨서(즉, 인헨서 서열 또는 인헨서 영역) 및 하나 이상의 비인간 Igλ 경쇄 조절 영역(또는 조절 서열)에 작동 가능하게 연결된다.
- [0262] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 인간 VpreB 유전자(또는 인간 VpreB 유전자 암호화 서열)를 함유하지 않는다.
- [0263] 일부 구현예에서, 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은, 예를 들어, 마우스 Cλ 영역이나 랫트 Cλ 영역과 같은 설치류 Cλ 영역을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은 129 계통, BALB/c 계통, C57BL/6 계통, 혼합된 129xC57BL/6 계통 또는 이들의 조합을 포함하는 유전적 배경 유래의 마우스 Cλ 영역이거나 이를 포함한다.
- [0264] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은 서열번호 1(마우스 Cλ1), 서열번호 3(마우스 Cλ2) 또는 서열번호 5(마우스 Cλ3)와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은 서열번호 1(마우스 Cλ1), 서열번호3(마우스 Cλ2) 또는 서열번호5(마우스 Cλ3)와 동일하거나 실질적으로 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은 마우스 Cλ1 영역의 서열이거나 이를 포함한다.
- [0265] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에 위치한 서열에 의해 암호화된 비인간 Cλ 영역은 서열번호 2(마우스 Cλ1), 서열번호 4(마우스 Cλ2) 또는 서열번호 6(마우스 Cλ3)과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에 위치한 서열에 의해 암호화된 비인간 Cλ 영역은 서열번호 2(마우스 Cλ1), 서열번호 4(마우스 Cλ2) 또는 서열번호 6(마우스 Cλ3)과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에 위치한 서열에 의해 암호화된 비인간 Cλ 영역은 마우스 Cλ1 영역 폴리펩티드이거나 이를 포함한다.
- [0266] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은 서열번호 7(랫트 Cλ1), 서열번호 9(랫트 Cλ2), 서열번호 11(랫트 Cλ3) 또는 서열번호 13(랫트 Cλ4)과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은 서열번호 7(랫트 Cλ1), 서열번호 9(랫트 Cλ2), 서열번호 11(랫트 Cλ3) 또는 서열번호 13(랫트 Cλ4)과 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)의 비인간 Cλ 영역은 랫트 Cλ1 영역의 서열이거나 이를 포함한다.
- [0267] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에 위치한 서열에 의해 암호화된 비인간 Cλ 영역은 서열번호 8(랫트 Cλ1), 서열번호 10(랫트 Cλ2), 서열번호 12(랫트 Cλ3) 또는 서열번호 14(랫트 Cλ4)와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에 위치한 서열에 의해 암호화된 비인간 Cλ 영역은 서열번호 8(랫트 Cλ1), 서열번호 10(랫트 Cλ2), 서열번호 12(랫트 Cλ3) 또는 서열번호 14(랫트 Cλ4)와 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에 위치한 서열에 의해 암호화된 비인간 Cλ 영역은 랫트 Cλ1 영역 폴리펩티드이거나 이를 포함한다.

- [0268] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 내인성 유전자좌에서의 비인간 Igλ 경쇄 서열 내에 또는 그 자리에 인간 Igλ 경쇄 서열(게놈 서열 또는 합성 서열)에 상응하는 인간 유전 물질을 삽입함으로써 발생한 하나 이상의 고유한 뉴클레오티드 서열 접합부(또는 고유한 서열 접합부의 조합)가 존재하는 것을 특징으로 한다. 예시적인 뉴클레오티드 서열 접합부는 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128 및 서열번호 129에 제시된다.
- [0269] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124, 서열번호 125, 서열번호 126, 서열번호 127, 서열번호 128 및 서열번호 129 중 하나 이상을 포함한다.
- [0270] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122 및 서열번호 123을 포함한다.
- [0271] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 서열번호 117, 서열번호 118, 서열번호 119, 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122 및 서열번호 123을 포함한다.
- [0272] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 128 및 서열번호 129를 포함한다.
- [0273] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 126 및 서열번호 127을 포함한다.
- [0274] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)는 서열번호 120, 서열번호 121, 서열번호 122, 서열번호 123, 서열번호 124 및 서열번호 125를 포함한다.
- [0275] 인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 유전자 분절에 대한 지침은, 예를 들어, Lefranc, M.P., 2000, Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes, Current Protocols in Immunology, No. Supplement, 40:A.1p.1-A.1p.37.에서 찾을 수 있다. 무엇보다도, 본 개시는 Igλ 경쇄 유전자좌(또는 대립유전자)에 인간 Vλ 및 Jλ 유전자 분절이 존재하는 것이, 이러한 조작된 Igλ 경쇄 대립유전자를 포함하지 않는 비인간 동물의 발현된 항체 레퍼토리에서의 경쇄의 다양성과 비교해서, 제공된 비인간 동물의 경쇄 레퍼토리의 다양성을 증가시킨다는 것을 입증한다.
- [0276] **방법**
- [0277] 특정 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 인간 항체 및/또는 인간 항체를 암호화하는 핵산 서열을 만드는 데 사용될 수 있으며, 상기 인간 항체는 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물 세포의 유전 물질에 의해 암호화된 핵산 서열로부터 유래된 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은, 비인간 동물이 관심 항원에 대한 면역 반응을 나타내는 데 충분한 시간 및 조건 하에서 상기 관심 항원으로 면역화된다. 항체는 그렇게 면역화된 비인간 동물(또는 하나 이상의 세포, 예컨대 하나 이상의 B 세포)로부터 단리되고, 예를 들어 친화성, 특이성, 에피토프 맵핑, 리간드 수용체 상호 작용을 차단하는 능력, 억제 수용체 활성화 등을 측정하는 다양한 검정을 사용해 특성화된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 비인간 동물에 의해 생산된 항체는 비인간 동물로부터 단리된 하나 이상의 인간 가변 영역 뉴클레오티드 서열로부터 유래되는 하나 이상의 인간 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항약물 항체(예, 항이디오타형(anti-idiotypic) 항체)는 본원에 기술된 비인간 동물에서 증가시킬 수 있다.
- [0278] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 비인간 동물은 다양한 검정에 유용한 인간 항체를 생산하기 위한 개선된 생체 내 시스템 및 생물학적 물질(예: 세포)의 공급원을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 관심 폴리펩티드(예를 들어, 막관통 또는 분비 폴리펩티드)를 표적화하고/하거나 상기 관심 폴리펩티드와 연관된 하나 이상의 활성을 약독화하고/하거나 다른 결합 파트너(예: 리간드 또는 수용체 폴리펩티드)와 상기 관심 상기 폴리펩티드의 상호 작용을 약독화하는 치료제를 개발하는 데 사용된다. 예를 들어, 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 하나 이상의 수용체 폴리펩티드를 표적화하고, 수용체 폴리펩티드 활성을 약독화하고/하거나 다른 결합 파트너와 수용체 폴리펩티드의 상호작용을 약독화하는 치료제를 개발하는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 하나 이상의 관심 폴리펩티드에 결합하는 후보 치료제(예: 항체, siRNA 등)를 동정하고, 스크리닝하고/하거나 개발하는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 하나 이상의 관심 폴리펩티드의 활성을 차단하거나 하나 이

상의 관심 수용체 폴리펩티드의 활동을 차단하는 후보 치료제(예: 항체, siRNA 등)를 스크리닝하고 개발하는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 하나 이상의 관심 폴리펩티드의 길항제 및/또는 작용제의 결합 프로파일을 알아내는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 하나 이상의 관심 폴리펩티드에 결합하는 하나 이상의 후보 치료제 항체의 에피토프 또는 에피토프들을 알아내는 데 사용된다.

[0279] 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 하나 이상의 항체 후보의 약동학적 프로파일을 알아내는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 비인간 동물 및 하나 이상의 대조군 또는 기준 비인간 동물은 하나 이상의 인간 항체 후보의 다양한 용량(예: 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/mg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 또는 50 mg/kg 이상)에 각각 노출된다. 후보 치료용 항체는 비경구 및 비경구가 아닌 투여 경로를 포함하여 임의의 원하는 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 비경구 경로는, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 내문내, 근육내, 피하, 복강내, 척수내, 척추강내, 뇌실질내, 두개내, 흉막내 주입 경로 또는 다른 주입 경로를 포함한다. 비경구가 아닌 경로는, 예를 들어, 경구, 비강, 경피, 폐, 직장, 볼, 질내, 안내를 포함한다. 투여는 또한 연속적 주입, 국소 투여, 이식물(겔, 막 등)으로부터의 서방출, 및/또는 정맥내 주입일 수 있다. 혈액은 다양한 시점(예를 들어, 0시간, 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 또는 최대 30일 이상)에서 비-인간 동물(인간화 및 대조군)로부터 분리된다. 총 IgG, 항치료 항체 반응, 응집 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 검정이 본원에 설명된 비인간 동물로부터 수득한 샘플을 사용하여 투여된 후보 치료용 항체의 약동학적 프로파일을 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0280] 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 관심 폴리펩티드의 활성을 차단하거나 약독화하는 치료적 효과 및 세포 변화로 인한 유전자 발현의 효과를 측정하거나, 수용체 폴리펩티드의 맥락에서, 비인간 동물의 세포 표면 상에서 수용체 폴리펩티드의 밀도를 측정하는 데 사용된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물 또는 이로부터 분리된 세포를 관심 폴리펩티드에 결합하는 후보 치료제에 노출시키고, 후속 기간이 지난 후, 상기 관심 폴리펩티드와 연관되는 특이적 세포 과정에 대한 효과, 예를 들어, 리간드 수용체 상호 작용 또는 신호 전달에 대해 분석한다.

[0281] 특정 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물이 인간 항체 가변 도메인을 발현하므로, 세포, 세포주, 및 세포 배양물이 생성되어 결합 및 기능 검정에 사용하기 위한 인간 항체 가변 도메인의 공급원으로서의 역할을 하며, 특히 길항제 또는 작용제가 관심 인간 항체에 대해 특이적이거나 리간드 수용체 상호작용(결합)에서 기능하는 에피토프에 대해 특이적인 경우, 예를 들어, 길항제 또는 작용제의 결합 또는 기능에 대한 검정에 사용하기 위한 인간 항체 가변 도메인의 공급원으로서의 역할을 한다. 다양한 구현예에서, 후보 치료 항체 또는 siRNA에 결합된 에피토프는 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물로부터 분리된 세포를 사용해 알아낼 수 있다.

[0282] 제공된 비인간 동물 유래의 세포는 필요에 따라 분리되어 사용될 수 있거나, 많은 세대 동안 배양물 내에 유지될 수 있다. 다양한 구현예에서, 제공된 비인간 동물 유래의 세포는 (예를 들어, 바이러스의 사용을 통해) 불멸화되고, 배양물 내에서 (예를 들어, 계대 배양물 내에서) 무기한으로 유지된다.

[0283] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 관심 폴리펩티드에 결합하는 인간 항체 가변 도메인의 변이체(예: 인간 VL 도메인 변이체)의 생성을 위한 생체 내 시스템을 제공한다. 이러한 변이체는 원하는 기능성, 특이성, 관심 폴리펩티드의 둘 이상의 변이체에 의해 공유되는 공통 에피토프에 대한 낮은 교차 반응성을 갖는 인간 항체 가변 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 바람직한 또는 개선된 기능성에 대해 스크리닝되는 일련의 변이체 가변 도메인을 함유하는 인간 항체 가변 도메인의 패널을 생성하는 데 사용된다.

[0284] 특정 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 인간 항체 가변 영역 라이브러리(예: 인간 VL 도메인 라이브러리)를 생성하기 위한 생체 내 시스템을 제공한다. 이러한 라이브러리는, 원하는 작동자 기능에 기초하여 상이한 Fc 영역 상에 이식될 수 있고, 당업계에 알려진 기술(예: 부위 특이적 돌연변이 유발, 오류 유발 PCR 등)을 사용해 가변 영역 서열의 진화성 성숙을 위한 공급원으로서 사용될 수 있고/있거나 예를 들어 키메라 항원 수용체(scFv와 같은 항체 성분을 사용해 조작된 분자), 다중 특이적 결합 제제(예: 이중 특이적 결합 제제) 및 융합 단백질(예: 단일 도메인 항체, scFv 등)과 같은 항체 기반 치료 분자의 생성을 위한 항체 성분의 공급원으로서 사용될 수 있는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 서열의 공급원을 제공한다.

[0285] 일부 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 약물 또는 백신의 분석 및 시험을 위한 생체 내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 후보 약물 또는 백신이 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 비인간 동물에

전달된 다음, 약물 또는 백신에 대한 면역 반응, 약물 또는 백신의 안전성 프로파일, 또는 질환 또는 병태에 대한 효과 및/또는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상 중 하나 이상을 알아내기 위해 비인간 동물에 대한 모니터링이 이어질 수 있다. 안전성 프로파일을 알아내기 위해 사용되는 예시적인 방법은 약물 또는 백신의 독성, 최적 투여 농도, 항체 (즉, 항약물) 반응, 효능, 및 가능한 위험 인자의 측정을 포함한다. 이러한 약물 또는 백신은 이러한 비인간 동물에서 개선되고/되거나 개발될 수 있다.

[0286] 백신 효능은 여러 가지 방식으로 결정될 수 있다. 간단히 말하면, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물에게 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 백신을 투여한 다음, 백신을 접종하거나, 기 감염된 비인간 동물에게 백신을 투여한다. 백신에 대한 비인간 동물(들)의 반응은, 비인간 동물(들) (또는 그로부터 분리된 세포)을 모니터링 하고/하거나 백신의 효능을 알아내기 위한 하나 이상의 검정을 수행함으로써 측정할 수 있다. 그리고 나서 백신에 대한 비인간 동물(들)의 반응은 당 기술분야에 공지된 및/또는 본원에 설명된 하나 이상의 방법을 사용하여 대조군 동물과 비교된다.

[0287] 백신 효능은 바이러스 중화 분석에 의해 추가로 알아낼 수 있다. 간단히 말하면, 본원에 설명된 비인간 동물을 면역화하고, 면역화 이후의 다양한 일차에 혈청을 채집한다. 혈청의 순차 희석액을 바이러스와 함께 사전 배양 하는데, 그 동안 바이러스에 특이적인 혈청 내의 항체가 그것에 결합하게 된다. 그리고 나서, 바이러스/혈청 혼합물을 허용 세포에 가하여 플라크 분석 또는 미세중화 분석에 의해 감염성을 측정한다. 혈청 내의 항체가 바이러스를 중화시킨다면, 대조군에 비해 플라크가 적거나 상대적으로 루시퍼라제 단위가 적다.

[0288] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물이 인간 항체 가변 도메인을 생산하므로, 진단 응용분야 (예를 들어, 면역학, 혈청학, 미생물학, 세포 병리학 등)에 사용하기 위한 인간 항체 생산용 생체 내 시스템을 제공하게 된다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은, 예를 들어, 병리학적 변화를 나타내는 특정 세포 표면 마커의 발현과 같은 세포 변화의 식별을 위한 관련 항원성 부위에 결합하는 인간 항체 가변 도메인을 생산하는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 다양한 화학 엔티티(예를 들어, 방사성 추적자)에 접합될 수 있고, 원하는 대로 다양한 생체 내 및/또는 시험관 내 분석에 사용될 수 있다.

[0289] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물은 종양학 및/또는 감염성 질환에 사용하기 위한 인간 항체의 개발과 선별을 위한 개선된 생체 내 시스템을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물 또는 대조군 비인간 동물(예를 들어, 본원에 설명된 것과 다른 유전자 변형을 갖거나 유전자 변형이 없는 것, 즉, 야생형)에 종양(또는 종양 세포)을 이식하거나 바이러스(예: 인플루엔자, HIV, HCV, HPV 등)로 감염시킬 수 있다. 이식 또는 감염 후에, 비인간 동물에게 후보 치료제를 투여할 수 있다. 후보 치료제를 투여하기 전에, 종양이나 바이러스가 비동물 내의 하나 이상의 위치에서 발병하도록 충분한 시간을 줄 수 있다. 대안적으로 및/또는 추가적으로, 치료제로서 개발될 수 있는 잠재적 인간 항체를 특성화하고 선별하기 위해 이러한 비인간 동물에서 면역 반응을 모니터링할 수 있다.

[0290] **키트**

[0291] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 적어도 하나의 비인간 동물, 비인간 세포, DNA 단편, 표적화 벡터, 또는 이들의 임의의 조합으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 팩 또는 키트를 추가로 제공한다. 키트는 임의의 적용 가능한 방법(예: 연구 방법)에서 사용될 수 있다. 이러한 용기(들)에는 의약품 또는 생물학적 제제의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 양식으로 된 공지가 선택적으로 부착될 수 있으며, 공지에는 (a) 인간 투여용으로 제조, 사용 및 판매하는 것에 대한 기관의 승인 사항, (b) 사용 지침, 및/또는 (c) 둘 이상의 엔티티 간의 물질 및/또는 생물학적 산물(예: 본원에 기술된 바와 같은 비인간 동물 또는 비인간 세포)의 이전을 규율하는 계약이 반영된다.

[0292] 특정 구현예의 다른 특징은 예시적인 구현예들에 대한 다음의 설명 과정에서 명백해질 것이나, 이들 구현예는 예시를 위한 것이며 이를 제한하도록 의도되지 않는다.

[0293] **추가적 예시적 구현예들**

[0294] 예시적인 구현예 1에서, (a) 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절을 포함하는 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 설치류가 본원에 제공되며, (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ)를 포함한다.

[0295] 예시적인 구현예 2에서, 구현예 1의 설치류가 본원에 제공되며, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의

설치류 E λ 를 포함한다.

- [0296] 예시적인 구현예 3에서, 구현예 2의 설치류가 본원에 제공되며, 2개의 설치류 E λ 는 마우스 E λ 및 마우스 E λ 3-1이다.
- [0297] 예시적인 구현예 4에서, 구현예 1 내지 3 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 인간 E λ 를 포함한다.
- [0298] 예시적인 구현예 5에서, 구현예 1 내지 4 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 여기서 생식선 계통은 (i) 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 추가로 포함하거나(인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨); (ii) 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨), 및 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_K$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(인간 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 C $_K$ 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 추가로 포함한다.
- [0299] 예시적인 구현예 6에서, 구현예 5의 설치류가 본원에 제공되며, 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입은 설치류 V $_H$, D $_H$ 유전자 분절을 대체한다.
- [0300] 예시적인 구현예 7에서, 구현예 6의 설치류가 본원에 제공되며, 삽입은 인간 V $_H$, D $_H$, 및 J $_H$ 유전자 분절 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0301] 예시적인 구현예 8에서, 구현예 5 또는 6의 설치류가 본원에 제공되며, 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_K$ 유전자 분절의 삽입은 설치류 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절을 대체한다.
- [0302] 예시적인 구현예 9에서, 구현예 8의 설치류가 본원에 제공되며, 삽입은 인간 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절, 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0303] 예시적인 구현예 10에서, 구현예 5 내지 8 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다.
- [0304] 예시적인 구현예 11에서, 구현예 5 내지 10 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 설치류 C $_K$ 영역은 내인성 설치류 C $_K$ 영역이다.
- [0305] 예시적인 구현예 12에서, 구현예 1 내지 9 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 내인성 면역글로불린은 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 V λ 및 J λ 유전자 분절의 결실을 전체적으로 또는 부분적으로 포함한다.
- [0306] 예시적인 구현예 13에서, 구현예 12의 설치류가 본원에 제공되며, 내인성 면역글로불린은 λ 경쇄 유전자좌는 V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2 유전자 분절 및 V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1 유전자 분절의 결실을 포함한다.
- [0307] 예시적인 구현예 14에서, 구현예 12의 설치류가 본원에 제공되며, 내인성 면역글로불린은 λ 경쇄 유전자좌는 V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4P-C λ 4P 유전자 분절 및 V λ 1-J λ 3-J λ 3P-C λ 3-J λ 1 유전자 분절의 결실을 포함한다.
- [0308] 예시적인 구현예 15에서, 구현예 1 내지 14 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 설치류 C λ 유전자 분절은 마우스 C λ 1 유전자 분절이다.
- [0309] 예시적인 구현예 16에서, 구현예 1 내지 13 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 설치류 E λ 2-4의 결실을 포함한다.
- [0310] 예시적인 구현예 17에서, 구현예 1 내지 16 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 설치류는 내인성 면역글로불린 λ 경쇄를 검출 가능하게 발현하지 않는다.
- [0311] 예시적인 구현예 18에서, 구현예 5 내지 17 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 인간 V $_H$ 유전자 분절 V $_H$ 3-74 내지 V $_H$ 6-1, 인간 D $_H$ 유전자 분절 D $_H$ 1-1 내지 D $_H$ 7-27, 및 인간 J $_H$ 유전자 분절 J $_H$ 1-J $_H$ 6의 삽입을 포함한다.

- [0312] 예시적인 구현예 19에서, 구현예 18의 설치류가 본원에 제공되며, 삽입은 인간 V_{H3-74} 내지 V_{H6-1} 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 D_{H1-1} 내지 D_{H7-27} 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 $J_{H1-J_{H6}}$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0313] 예시적인 구현예 20에서, 구현예 5 내지 19 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌는 인간 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌의 근위 V_{κ} 복제의 전체적 또는 부분적 삽입을 포함한다.
- [0314] 예시적인 구현예 21에서, 구현예 20의 설치류가 본원에 제공되며, 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌는 인간 V_{κ} 유전자 분절 $V_{\kappa 2-40}$ 내지 $V_{\kappa 4-1}$ 및 인간 J_{κ} 유전자 분절 $J_{\kappa 1-J_{\kappa 5}}$ 의 삽입을 포함한다.
- [0315] 예시적인 구현예 22에서, 구현예 21의 설치류가 본원에 제공되며, 삽입은 인간 $V_{\kappa 2-40}$ 내지 $V_{\kappa 4-1}$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 $J_{\kappa 1-J_{\kappa 5}}$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA의 삽입을 포함한다.
- [0316] 예시적인 구현예 23에서, 구현예 1 내지 22 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 V_{λ} 유전자 분절 $V_{\lambda 5-52}$ 내지 $V_{\lambda 1-40}$ 및 $V_{\lambda 3-27}$ 내지 $V_{\lambda 3-1}$, 적어도 인간 $J_{\lambda}-C_{\lambda}$ 유전자 분절쌍 $J_{\lambda 1-C_{\lambda 1}}$, $J_{\lambda 2-C_{\lambda 2}}$, $J_{\lambda 3-C_{\lambda 3}}$, $J_{\lambda 6-C_{\lambda 6}}$, 인간 J_{λ} 유전자 분절 $J_{\lambda 7}$ 및 설치류 $C_{\lambda 1}$ 유전자 분절의 삽입을 포함한다.
- [0317] 예시적인 구현예 24에서, 구현예 23의 설치류가 본원에 제공되며, 삽입은 인간 $V_{\lambda 5-52}$ 내지 $V_{\lambda 1-40}$ 및 $V_{\lambda 3-27}$ 내지 $V_{\lambda 3-1}$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 $J_{\lambda}-C_{\lambda}$ 유전자 분절쌍 $J_{\lambda 1-C_{\lambda 1}}$, $J_{\lambda 2-C_{\lambda 2}}$, $J_{\lambda 3-C_{\lambda 3}}$ 및 $J_{\lambda 6-C_{\lambda 6}}$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 J_{λ} 유전자 분절 $J_{\lambda 7}$ 의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0318] 예시적인 구현예 25에서, 구현예 5 내지 24 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 설치류 Adam6 유전자가 결여되어 있다.
- [0319] 예시적인 구현예 26에서, 구현예 5 내지 25 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 추가로 포함한다.
- [0320] 예시적인 구현예 27에서, 구현예 26의 설치류가 본원에 제공되며, 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 제1 및 제2 인간 V_H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0321] 예시적인 구현예 28에서, 구현예 26의 설치류가 본원에 제공되며, 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 Adam6 슈도유전자의 대신에 삽입된다.
- [0322] 예시적인 구현예 29에서, 구현예 27의 설치류가 본원에 제공되며, 제1 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_{H1-2} 이고 제2 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_{H6-1} 이다.
- [0323] 예시적인 구현예 30에서, 구현예 26의 설치류가 본원에 제공되며, 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 V_H 유전자 분절 및 인간 D_H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0324] 예시적인 구현예 31에서, 구현예 5 내지 30 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 상기 설치류는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 대해 이형접합성이거나 동형접합성이다.
- [0325] 예시적인 구현예 32에서, 구현예 5 내지 31 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 상기 설치류는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌에 대해 이형접합성이거나 동형접합성이다.
- [0326] 예시적인 구현예 33에서, 구현예 1 내지 32 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 상기 설치류는 내인성 면역글로불린에 λ 경쇄 유전자좌에 대해 이형접합성이거나 동형접합성이다.
- [0327] 예시적인 구현예 34에서, 구현예 1 내지 33 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 상기 설치류는 랫트이거나 마우스이다.
- [0328] 예시적인 구현예 35에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계능을 가진 단리된 설치류 세포가 본원에 제공되며, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: (a) 하나 이상의 인간 V_{λ} 유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간 J_{λ} 유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간 C_{λ} 유전자 분절을 포함하되, (i) (a)와

(b)는 (c) 및 설치류 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되며, (ii) 내인성 번역 글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ) 및 하나 이상의 인간 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ)를 추가로 포함한다.

[0329] 예시적인 구현예 36에서, 구현예 35의 설치류 세포로부터 만들어진 불멸화 세포가 본원에 제공된다.

[0330] 예시적인 구현예 37에서, 구현예 35의 단리된 설치류 세포가 본원에 제공되며, 상기 설치류 세포는 설치류 배아 줄기 세포이다.

[0331] 예시적인 구현예 38에서, 구현예 35의 설치류 배아 줄기 세포로부터 생성된 설치류 배아가 본원에 제공된다.

[0332] 예시적인 실시예 39에서, 조작된 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계능을 가진 설치류를 만드는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 (a) DNA 단편을 설치류 배아 줄기 세포 내로 도입하는 단계로서, 상기 DNA 단편은 (i) 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, (ii) 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절, 및 (iii) 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, (i) 내지 (iii)은 설치류 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 상기 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 인간 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ)를 포함하는 단계; (b) (a) 단계에서 생성된 설치류 배아 줄기 세포를 수득하는 단계; 및 (c) (b) 단계의 설치류 배아 줄기 세포를 사용해 설치류를 생성하는 단계를 포함한다.

[0333] 예시적인 구현예 40에서, 구현예 39의 방법이 본원에 제공되며, 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 인간 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ)를 추가로 포함한다.

[0334] 예시적인 구현예 41에서, 조작된 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계능을 가진 설치류를 만드는 방법이 본원에 제공되는데, 상기 조작된 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절의 삽입을 포함하고, 상기 인간 V λ 및 J λ 유전자 분절은 설치류 또는 인간 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 상기 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ) 및 하나 이상의 인간 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ)를 추가로 포함하며, 상기 방법은 설치류의 생식선 계능이 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 조작된 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 상기 설치류의 생식선 계능을 변형시켜 상기 설치류를 만드는 단계를 포함하되, 상기 인간 V λ 및 J λ 유전자 분절은 설치류 또는 인간 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되며, 상기 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ), 및 하나 이상의 인간 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서(E λ)를 추가로 포함한다.

[0335] 예시적인 구현예 42에서, 실시예 39 또는 41의 방법이 본원에 제공되는데, 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절은 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및/또는 V λ 3-27 내지 V λ 3-1을 포함한다.

[0336] 예시적인 구현예 43에서, 구현예 42의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절은 인간 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및/또는 V λ 3-27 내지 V λ 3-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0337] 예시적인 구현예 44에서, 구현예 39 내지 43 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절은 인간 J λ -C λ 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3, J λ 6-C λ 6 및 인간 J λ 7 유전자 분절을 포함한다.

[0338] 예시적인 구현예 45에서, 구현예 44의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6은 인간 J λ 및 C λ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 인간 J λ 7 유전자 분절은 인간 J λ 7.의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0339] 예시적인 구현예 46에서, 구현예 39 내지 45 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 C λ 유전자 분절은 마우스 C λ 1 유전자 분절이다.

[0340] 예시적인 구현예 47에서, 구현예 39 내지 46 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 인간 E λ 를 포함한다.

[0341] 예시적인 구현예 48에서, 구현예 39 내지 46 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 설치류 E λ 를 포함한다.

- [0342] 예시적인 구현예 49에서, 구현예 48의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 2개의 설치류 E λ 는 마우스 E λ 및 마우스 E λ 3-1이다.
- [0343] 예시적인 구현예 50에서, 구현예 38 및 42 내지 49 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 DNA 단편은 하나 이상의 선택 마커를 추가로 포함한다.
- [0344] 예시적인 구현예 51에서, 구현예 39 및 42 내지 50 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 DNA 단편은 하나 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 추가로 포함한다.
- [0345] 예시적인 구현예 52에서, 구현예 39 및 42 내지 51 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 (a)의 DNA 단편은 설치류 배아 줄기 세포 내로 도입되고, 상기 설치류 배아 줄기 세포의 생식선 계통은 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 (인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 포함하거나, 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 (인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨), 및 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_K$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌 (인간 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 C $_K$ 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 포함한다.
- [0346] 예시적인 구현예 53에서, 구현예 39 및 42 내지 51 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 (a)의 DNA 단편은 설치류 배아 줄기 세포 내로 도입되고, 상기 설치류 배아 줄기 세포의 생식선 계통은 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하거나, 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 야생형 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함하며, 상기 방법은 상기 비인간 배아 줄기 세포로부터 생산된 마우스를 제2 마우스와 교배시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0347] 예시적인 구현예 54에서, 구현예 47 내지 49 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류의 생식선 계통이 조작된 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 설치류의 생식선 계통을 변형시키는 단계는 설치류 배아 줄기 세포에서 수행되며, 상기 설치류 배아 줄기 세포의 생식선 계통은, 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 추가로 포함하거나; 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V $_H$, D $_H$ 및 J $_H$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨) 및 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_K$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(인간 V $_K$ 및 J $_K$ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 C $_K$ 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 추가로 포함한다.
- [0348] 예시적인 구현예 55에서, 구현예 52 또는 54의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D $_H$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_H$ 유전자 분절의 삽입은 하나 이상의 인간 V $_H$ 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 하나 이상의 D $_H$ 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA 및 하나 이상의 J $_H$ 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0349] 예시적인 구현예 56에서, 구현예 52 또는 54의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J $_K$ 유전자 분절의 삽입은 하나 이상의 인간 V $_K$ 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA 및 하나 이상의 J $_K$ 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0350] 예시적인 구현예 57에서, 구현예 41 내지 49 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 비인간 동물의 생식선 계통이 조작된 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 비인간 동물의 생식선 계통을 변형시키는 단계는 비인간 동물 배아 줄기 세포에서 수행되며, 상기 비인간 동물 배아 줄기 세포의 생식선 계통은, 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하거나 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 야생형 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함하며; 상기 방법은 상기 비인간 동물 배아 줄기 세포로부터 생산된 마우스

스를 제2 마우스와 교배시키는 단계를 추가로 포함한다.

- [0351] 예시적인 구현예 58에서, 구현예 53 또는 57의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 제2 마우스는 야생형 IgH 및 Ig κ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 갖는다.
- [0352] 예시적인 구현예 59에서, 구현예 53 또는 57의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 제2 마우스는 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 및 Ig κ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 갖고, 상기 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열을 함유한다.
- [0353] 예시적인 구현예 60에서, 구현예 53 또는 57의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 제2 마우스는 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 유전자좌 및 동형접합성 및 이형접합성 불활성화 Ig κ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 갖는다.
- [0354] 예시적인 구현예 61에서, 설치류에서 항체를 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 (1) 관심 항원으로 설치류를 면역화하는 단계로서, 상기 설치류는 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가지고, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 (a) 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간 J λ 유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간 C λ 유전자 분절을 포함하되, (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E λ) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인핸서(E)를 포함하는 단계; (2) 설치류가 관심 항원에 대한 면역 반응을 생성하기에 충분한 조건 하에서 설치류를 유지시키는 단계; 및 (3) 관심 항원에 결합하는 설치류 또는 설치류 세포로부터 항체를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0355] 예시적인 구현예 62에서, 구현예 61의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류는 생식선 계놈을 가지고, 상기 생식선 계놈은: 하나 이상의 인간 V H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J H 유전자 분절(인간 V H , D H 및 J H 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 추가로 포함하거나; 하나 이상의 인간 V H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J H 유전자 분절(인간 V H , D H 및 J H 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌, 및 하나 이상의 인간 V κ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J κ 유전자 분절(인간 V κ 및 J κ 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 C κ 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 추가로 포함한다.
- [0356] 예시적인 구현예 63에서, 구현예 61 또는 62의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류 세포는 B 세포이다.
- [0357] 예시적인 구현예 64에서, 구현예 61 또는 62의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류 세포는 하이브리도마(hybridoma)이다.
- [0358] 예시적인 구현예 65에서, 구현예 61 내지 64 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 V λ 유전자 분절 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및 V λ 3-27 내지 V λ 3-1, 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3, J λ 6-C λ 6 및 인간 J λ 유전자 분절 J λ 7을 포함한다.
- [0359] 예시적인 구현예 66에서, 구현예 65의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 삽입은 인간 V λ V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및 V λ 3-27 내지 V λ 3-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 J λ 유전자 분절 J λ 7.의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0360] 예시적인 구현예 67에서, 구현예 61 내지 66 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류 C λ 유전자 분절은 마우스 C λ 1 유전자 분절이다.
- [0361] 예시적인 구현예 68에서, 구현예 62 내지 67 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 인간 V H 유전자 분절 V H 3-74 내지 V H 6-1, 인간 D H 유전자 분절 D H 1-1 내지 D H 7-27 및 인간 J H 유전자 분절 J H 1-J H 6의 삽입을 포함하고, 상기 인간 V H , D H 및 J H 유전자 분절은 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결된다.
- [0362] 예시적인 구현예 69에서, 구현예 68의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 삽입은 인간 V H 3-74 내지 V H 6-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 D H 1-1 내지 D H 7-27 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화

화 DNA, 및 인간 J_H1-J_H6 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

- [0363] 예시적인 구현예 70에서, 구현예 68의 방법이 본원에서 제공되며, 여기서 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절을 대체한다.
- [0364] 예시적인 구현예 71에서, 구현예 62 내지 70 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌는 인간 V_K 유전자 분절 V_{K2-40} 내지 V_{K4-1} 및 인간 J_K 유전자 분절 $J_{K1-J_{K5}}$ 의 삽입을 포함하고, 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 내인성 설치류 면역글로불린 C_K 영역에 작동 가능하게 연결된다.
- [0365] 예시적인 구현예 72에서, 구현예 71의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 삽입은 인간 V_{K2-40} 내지 V_{K4-1} 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 $J_{K1-J_{K5}}$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0366] 예시적인 구현예 73에서, 구현예 71의 방법이 본원에서 제공되며, 여기서 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 V_K 및 J_K 유전자 분절을 대체한다.
- [0367] 예시적인 구현예 74에서, 구현예 61 내지 73 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류의 생식선 계통은 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 추가로 포함한다.
- [0368] 예시적인 구현예 75에서, 구현예 62 내지 74 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 설치류 Adam6 유전자가 결여되어 있다.
- [0369] 예시적인 구현예 76에서, 구현예 75의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 추가로 포함한다.
- [0370] 예시적인 구현예 77에서, 구현예 76의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 제1 및 제2 인간 V_H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0371] 예시적인 구현예 78에서, 구현예 77의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 제1 및 제2 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_{H1-2} 이고 제2 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_{H6-1} 이다.
- [0372] 예시적인 구현예 79에서, 구현예 76의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 Adam6 슈도유전자 자리에 삽입된다.
- [0373] 예시적인 구현예 80에서, 구현예 76의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 V_H 유전자 분절 및 인간 D_H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0374] 예시적인 구현예 81에서, 구현예 61 내지 80 중 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류 또는 설치류 세포로부터 회수되고 관심 항원에 결합하는 항체는 인간 중쇄 가변 도메인 및 인간 램다 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0375] 예시적인 구현예 82에서, 구현예 81의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 인간 중쇄 가변 도메인은 V_{H3-74} , V_{H3-73} , V_{H3-72} , V_{H2-70} , V_{H1-69} , V_{H3-66} , V_{H3-64} , V_{H4-61} , V_{H4-59} , V_{H1-58} , V_{H3-53} , V_{H5-51} , V_{H3-49} , V_{H3-48} , V_{H1-46} , V_{H1-45} , V_{H3-43} , V_{H4-39} , V_{H4-34} , V_{H3-33} , V_{H4-31} , V_{H3-30} , V_{H4-28} , V_{H2-26} , V_{H1-24} , V_{H3-23} , V_{H3-21} , V_{H3-20} , V_{H1-18} , V_{H3-15} , V_{H3-13} , V_{H3-11} , V_{H3-9} , V_{H1-8} , V_{H3-7} , V_{H2-5} , V_{H7-4-1} , V_{H4-4} , V_{H1-3} , V_{H1-2} 및 V_{H6-1} 로 이루어진 군으로부터 선택된 재배열된 인간 V_H 유전자 분절을 포함한다.
- [0376] 예시적인 구현예 83에서, 구현예 81 또는 82의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 인간 감다 경쇄 가변 도메인은 $V_{\lambda 4-69}$, $V_{\lambda 8-61}$, $V_{\lambda 4-60}$, $V_{\lambda 6-57}$, $V_{\lambda 10-54}$, $V_{\lambda 5-52}$, $V_{\lambda 1-51}$, $V_{\lambda 9-49}$, $V_{\lambda 1-47}$, $V_{\lambda 7-46}$, $V_{\lambda 5-45}$, $V_{\lambda 1-44}$, $V_{\lambda 7-43}$, $V_{\lambda 1-40}$, $V_{\lambda 5-39}$, $V_{\lambda 5-37}$, $V_{\lambda 1-36}$, $V_{\lambda 3-27}$, $V_{\lambda 3-25}$, $V_{\lambda 2-23}$, $V_{\lambda 3-22}$, $V_{\lambda 3-21}$, $V_{\lambda 3-19}$, $V_{\lambda 2-18}$, $V_{\lambda 3-16}$, $V_{\lambda 2-14}$, $V_{\lambda 3-12}$, $V_{\lambda 2-11}$, $V_{\lambda 3-10}$, $V_{\lambda 3-9}$, $V_{\lambda 2-8}$, $V_{\lambda 4-3}$ 및 $V_{\lambda 3-1}$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 재배열된 인간 V_{λ} 유전자 분절을 포함한다.
- [0377] 예시적인 구현예 84에서, 구현예 39 내지 83 중 어느 하나의 방법이 본원에 제공되며, 여기서 설치류는 마우스 또는 랫트이다.

- [0378] 예시적인 구현예 85에서, 동형접합성 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 설치류가 본원에 제공되며, 상기 동형접합성 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: (i) 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$, (ii) 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$ 및 $J\lambda 6-C\lambda 6$, (iii) 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$, 및 (iv) 3개의 인간 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서를 포함하되, (i) 내지 (iv)는 서로 작동 가능하게 연결되고, (i) 내지 (iii)은 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절의 상류에 있으며, 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 번역글로불린 $E\lambda 2-4$ 가 결여되어 있고, 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$ 은 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$ 및 $J\lambda 6-C\lambda 6$ 은 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하여, 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$ 은 인간 $J\lambda 7$ 의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0379] 예시적인 구현예 86에서, 구현예 85의 설치류가 본원에 제공되며, 여기서 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절은 마우스 $C\lambda 1$ 유전자 분절이다.
- [0380] 예시적인 구현예 87에서, 구현예 85 또는 86의 설치류가 본원에 제공되며, 여기서 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서 $E\lambda$ 및 $E\lambda 3-1$ 을 추가로 포함한다.
- [0381] 예시적인 구현예 88에서, 구현예 85 내지 87 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 여기서 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 $V\lambda 2-V\lambda 3-J\lambda 2-C\lambda 2-J\lambda 4P-C\lambda 4P$ 유전자 분절 및 $V\lambda 1-J\lambda 3-J\lambda 3P-C\lambda 3-J\lambda 1$ 유전자 분절의 결실을 포함한다.
- [0382] 예시적인 구현예 89에서, 구현예 85 내지 88 중 어느 하나의 설치류가 본원에 제공되며, 여기서 설치류는 랫트 또는 마우스이다.
- [0383] 일부 구현예에서, 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 설치류가 본원에 제공되며, 상기 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 (a) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하되, (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 번역글로불린을 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$), 및 하나 이상의 인간 번역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함한다.
- [0384] 일부 구현예에서, 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 설치류 $E\lambda$ 을 포함한다.
- [0385] 일부 구현예에서, 2개의 설치류 $E\lambda$ 는 마우스 $E\lambda$ 및 마우스 $E\lambda 3-1$ 이다.
- [0386] 일부 구현예에서, 내인성 번역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 인간 $E\lambda$ 를 포함한다.
- [0387] 일부 구현예에서, 생식선 계놈은 (i) 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 번역글로불린 중쇄 유전자좌를 추가로 포함하거나(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 번역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨); (ii) 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 번역글로불린 중쇄 유전자좌(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 번역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨) 및 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절의 삽입을 포함하는 내인성 번역글로불린 κ 경쇄 유전자좌(인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 번역글로불린 C_K 영역에 작동 가능하게 연결됨)를 추가로 포함한다.
- [0388] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입은 설치류 V_H , D_H 유전자 분절을 대체한다.
- [0389] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 V_H , D_H , 및 J_H 유전자 분절, 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0390] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절은 설치류 V_K 및 J_K 유전자 분절을 대체한다.
- [0391] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절, 및 이들의 조합 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

- [0392] 일부 구현예에서, 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역은 내인성 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역이다.
- [0393] 일부 구현예에서, 설치류 C κ 영역은 내인성 설치류 C κ 영역이다.
- [0394] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 V λ 및 J λ 유전자 분절의 전체적 또는 부분적 결실을 포함한다.
- [0395] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2 유전자 분절 및 V λ 1-J λ 3-C λ 3-J λ 1 유전자 분절의 결실을 포함한다.
- [0396] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 V λ 2-V λ 3-J λ 2-C λ 2-J λ 4P-C λ 4P 유전자 분절 및 V λ 1-J λ 3-J λ 3P-C λ 3-J λ 1 유전자 분절의 결실을 포함한다.
- [0397] 일부 구현예에서, 설치류 C λ 유전자 분절은 마우스 C λ 1 유전자 분절이다.
- [0398] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 설치류 E λ 2-4의 결실을 포함한다.
- [0399] 일부 구현예에서, 설치류는 내인성 면역글로불린을 λ 경쇄를 검출 가능하게 발현하지 않는다.
- [0400] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 인간 V H 유전자 분절 V H 3-74 내지 V H 6-1, 인간 D H 유전자 분절 D H 1-1 내지 D H 7-27, 및 인간 J H 유전자 분절 J H 1-J H 6의 삽입을 포함한다.
- [0401] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 V H 3-74 내지 V H 6-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 D H 1-1 내지 D H 7-27 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 J H 1-J H 6 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0402] 일부 구현예에서, 면역글로불린은 κ 경쇄 유전자좌는 인간 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌의 근위 V κ 복제의 전체적 또는 부분적 삽입을 포함한다.
- [0403] 일부 구현예에서, 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌는 인간 V κ 유전자 분절 V κ 2-40 내지 V κ 4-1 및 인간 J κ 유전자 분절 J κ 1-J κ 5의 삽입을 포함한다.
- [0404] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 V κ 2-40 내지 V κ 4-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 J κ 1-J κ 5 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0405] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 V λ 유전자 분절 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및 V λ 3-27 내지 V λ 3-1, 적어도 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3, J λ 6-C λ 6, 인간 J λ 유전자 분절 J λ 7 및 설치류 C λ 1 유전자 분절의 삽입을 포함한다.
- [0406] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 V λ 5-52 내지 V λ 1-40 및 V λ 3-27 내지 V λ 3-1 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 J λ -C λ 유전자 분절쌍 J λ 1-C λ 1, J λ 2-C λ 2, J λ 3-C λ 3 및 J λ 6-C λ 6 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 J λ 유전자 분절 J λ 7의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0407] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 설치류 Adam6 유전자가 결여되어 있다.
- [0408] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 추가로 포함한다.
- [0409] 일부 구현예에서, 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 제1 및 제2 인간 V H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0410] 일부 구현예에서, 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 Adam6 슈도유전자의 자리에 삽입된다.
- [0411] 일부 구현예에서, 제1 인간 V H 유전자 분절은 인간 V H 1-2이고, 제2 인간 V H 유전자 분절은 인간 V H 6-1이다.
- [0412] 일부 구현예에서, 하나 이상의 뉴클레오티드 서열은 인간 V H 유전자 분절 및 인간 D H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0413] 일부 구현예에서, 설치류는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌에 대해 이형접합성 또는 동형접합성이다.
- [0414] 일부 구현예에서, 설치류는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌에 대해 이형접합성 또는 동형접합성이다.

- [0415] 일부 구현예에서, 설치류는 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌에 대해 이형접합성 또는 동형접합성이다.
- [0416] 일부 구현예에서, 설치류는 랫트 또는 마우스이다.
- [0417] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 단리된 설치류 세포가 본원에 제공되며, 상기 내인성 면역글로불린 램다 경쇄 유전자좌는: (a) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하되, (i) (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되며, (ii) 내인성 면역 글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함한다.
- [0418] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 설치류 세포로 만들어진 불멸화 세포가 본원에 제공한다.
- [0419] 일부 구현예에서, 설치류 세포는 설치류 배아 줄기 세포이다.
- [0420] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 설치류 배아 줄기 세포로부터 생성된 설치류 배아가 제공된다.
- [0421] 일부 구현예에서, 조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 설치류를 제조하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은, (a) DNA 단편을 설치류 배아 줄기 세포 내로 도입하는 단계로서, 상기 DNA 단편은 (i) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, (ii) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및 (iii) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하되, (i) 내지 (iii)은 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되며, 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함하는 단계; (b) (a) 단계에서 생성된 설치류 배아 줄기 세포를 수득하는 단계; 및 (c) (b) 단계의 설치류 배아 줄기 세포를 사용해 설치류를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0422] 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 서열은 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함한다.
- [0423] 일부 구현예에서, 조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 갖는 설치류를 만드는 방법이 본원에 제공되며, 상기 조작된 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절의 삽입을 포함하고(인간 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절은 설치류 또는 인간 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결됨), 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역 글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함하고, 상기 방법은 설치류의 생식선 계놈이, 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절의 삽입을 포함하는(인간 $V\lambda$ 및 $J\lambda$ 유전자 분절은 설치류 또는 인간 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결됨) 조작된 면역 글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 상기 설치류의 생식선 계놈을 변형시켜 상기 설치류를 만드는 단계를 포함하며, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 면역 글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$), 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함한다.
- [0424] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절은 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및/또는 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$ 을 포함한다.
- [0425] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절은 인간 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및/또는 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$ 사이에 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0426] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절은 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$, $J\lambda 6-C\lambda 6$ 및 인간 $J\lambda 7$ 유전자 분절을 포함한다.
- [0427] 일부 구현예에서, 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$ 및 $J\lambda 6-C\lambda 6$ 은 인간 $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 인간 $J\lambda 7$ 유전자 분절은 인간 $J\lambda 7$ 의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0428] 일부 구현예에서, 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절은 마우스 $C\lambda 1$ 유전자 분절이다.
- [0429] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 3개의 인간 $E\lambda$ 를 포함한다.
- [0430] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 2개의 설치류 $E\lambda$ 를 포함한다.
- [0431] 일부 구현예에서, 2개의 설치류 $E\lambda$ 는 마우스 $E\lambda$ 및 마우스 $E\lambda 3-1$ 이다.

- [0432] 일부 구현예에서, DNA 단편은 하나 이상의 선택 마커를 추가로 포함한다.
- [0433] 일부 구현예에서, DNA 단편은 하나 이상의 부위 특이적 재조합 부위를 포함한다.
- [0434] 일부 구현예에서, (a)의 DNA 단편은 설치류 배아 줄기 세포 내로 도입되며, 상기 설치류 배아 줄기 세포는 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하거나; 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절(인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 면역 글로불린 C_K 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함한다.
- [0435] 일부 구현예에서, (a)의 DNA 단편은 설치류 배아 줄기 세포 내로 도입되며, 설치류 배아 줄기 세포의 생식선 계놈은 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하거나; 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 야생형 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함하며, 상기 방법은 상기 비인간 배아 줄기 세포로부터 생산된 마우스를 제2 마우스와 교배시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0436] 일부 구현예에서, 설치류의 생식선 계놈을 변형시켜 상기 생식선 계놈이 조작된 면역 글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 하는 단계는 설치류 배아 줄기 세포에서 수행되며, 설치류 배아 줄기 세포의 생식선 계놈은 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 추가로 포함하거나; 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절(인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 면역 글로불린 C_K 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 추가로 포함한다.
- [0437] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절의 삽입은 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0438] 일부 구현예에서, 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절의 삽입은 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0439] 일부 구현예에서, 비인간 동물의 생식선 계놈을 변형시켜 상기 생식선 계놈이 조작된 면역 글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하도록 하는 단계는 비인간 동물 배아 줄기 세포에서 수행되며, 비인간 동물 배아 줄기 세포의 생식선 계놈은 하나 이상의 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 포함하거나; 야생형 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 야생형 내인성 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 포함할 수 있으며, 상기 방법은 상기 비인간 동물 배아 줄기 세포로부터 생산된 마우스를 제2 마우스와 교배시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0440] 일부 구현예에서, 제2 마우스는 야생형 IgH 및 Ig κ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 갖는다.
- [0441] 일부 구현예에서, 제2 마우스는 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 및 Ig κ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 갖고, 상기 이형접합성 또는 동형접합성 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열을 함유한다.
- [0442] 일부 구현예에서, 제2 마우스는 동형접합성 또는 이형접합성 인간화 IgH 유전자좌 및 동형접합성 또는 이형접합성 불활성화된 Ig κ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 갖는다.
- [0443] 일부 구현예에서, 설치류에서 항체를 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 (1) 설치류를 관심 항원의

로 면역화하는 단계로서, 상기 설치류는 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가지며, 상기 내인성 면역글로불린 램다 경쇄 유전자좌는 (a) 하나 이상의 인간 $V\lambda$ 유전자 분절, (b) 하나 이상의 인간 $J\lambda$ 유전자 분절, 및 (c) 하나 이상의 인간 $C\lambda$ 유전자 분절을 포함하되, (a)와 (b)는 (c) 및 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되고, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌: 하나 이상의 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$) 및 하나 이상의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함하는 단계; (2) 설치류가 관심 항원에 대한 면역 반응을 생성하는 데 충분한 조건 하에서 설치류를 유지시키는 단계; 및 (3) 관심 항원에 결합하는 설치류, 또는 설치류 세포로부터 항체를 회수하는 단계를 포함한다.

[0444] 일부 구현예에서, 설치류는 생식선 계놈을 가지며, 상기 생식선 계놈은: 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌를 추가로 포함하거나; 하나 이상의 인간 V_H 유전자 분절, 하나 이상의 인간 D_H 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 분절(인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자좌, 및 하나 이상의 인간 V_K 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 J_K 유전자 분절(인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 면역 글로불린 C_K 영역에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 면역 글로불린 κ 경쇄 유전자좌를 추가로 포함한다.

[0445] 일 구현예에서, 설치류 세포는 B 세포이다.

[0446] 일부 구현예에서, 설치류 세포는 하이브리도마(hybridoma)이다.

[0447] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 인간 $V\lambda$ 유전자 분절 $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$, 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$, $J\lambda 6-C\lambda 6$ 및 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$ 의 삽입을 포함한다.

[0448] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 $V\lambda$ $V\lambda 5-52$ 내지 $V\lambda 1-40$ 및 $V\lambda 3-27$ 내지 $V\lambda 3-1$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 $J\lambda-C\lambda$ 유전자 분절쌍 $J\lambda 1-C\lambda 1$, $J\lambda 2-C\lambda 2$, $J\lambda 3-C\lambda 3$ 및 $J\lambda 6-C\lambda 6$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 $J\lambda$ 유전자 분절 $J\lambda 7$ 의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0449] 일부 구현예에서, 설치류 $C\lambda$ 유전자 분절은 마우스 $C\lambda 1$ 유전자 분절이다.

[0450] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 인간 V_H 유전자 분절 $V_H 3-74$ 내지 $V_H 6-1$, 인간 D_H 유전자 분절 $D_H 1-1$ 내지 $D_H 7-27$ 및 인간 J_H 유전자 분절 $J_H 1-J_H 6$ 의 삽입을 포함하되, 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 내인성 설치류 면역 글로불린 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결된다.

[0451] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 $V_H 3-74$ 내지 $V_H 6-1$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 인간 $D_H 1-1$ 내지 $D_H 7-27$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 $J_H 1-J_H 6$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0452] 일부 구현예에서, 인간 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절은 설치류 V_H , D_H 및 J_H 유전자 분절을 대체한다.

[0453] 일부 구현예에서, 면역글로불린 κ 경쇄 유전자좌는 인간 V_K 유전자 분절 $V_K 2-40$ 내지 $V_K 4-1$ 및 인간 J_K 유전자 분절 $J_K 1-J_K 5$ 의 삽입을 포함하되, 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 내인성 설치류 면역 글로불린 C_K 영역에 작동 가능하게 연결된다.

[0454] 일부 구현예에서, 삽입은 인간 $V_K 2-40$ 내지 $V_K 4-1$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA, 및 인간 $J_K 1-J_K 5$ 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.

[0455] 일부 구현예에서, 인간 V_K 및 J_K 유전자 분절은 설치류 V_K 및 J_K 유전자 분절을 대체한다.

[0456] 일부 구현예에서, 설치류의 생식선 계놈은 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열의 삽입을 추가로 포함한다.

[0457] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 내인성 설치류 Adam6 유전자가 결여되어 있다.

[0458] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상

의 뉴클레오타이드 서열의 삽입을 추가로 포함한다.

- [0459] 일부 구현예에서, 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열은 제1 및 제2 인간 V_H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0460] 일부 구현예에서, 제1 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_H1-2 이고, 제2 인간 V_H 유전자 분절은 인간 V_H6-1 이다.
- [0461] 일부 구현예에서, 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열은 인간 Adam6 슈도유전자의 자리에 삽입된다.
- [0462] 일부 구현예에서, 하나 이상의 설치류 Adam6 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열은 인간 V_H 유전자 분절 및 인간 D_H 유전자 분절 사이에 삽입된다.
- [0463] 일부 구현예에서, 관심 항원에 결합하는 설치류, 또는 설치류 세포로부터 회수된 항체는 인간 중쇄 가변 도메인 및 인간 램다 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0464] 일부 구현예에서, 인간 중쇄 가변 도메인은 V_H3-74 , V_H3-73 , V_H3-72 , V_H2-70 , V_H1-69 , V_H3-66 , V_H3-64 , V_H4-61 , V_H4-59 , V_H1-58 , V_H3-53 , V_H5-51 , V_H3-49 , V_H3-48 , V_H1-46 , V_H1-45 , V_H3-43 , V_H4-39 , V_H4-34 , V_H3-33 , V_H4-31 , V_H3-30 , V_H4-28 , V_H2-26 , V_H1-24 , V_H3-23 , V_H3-21 , V_H3-20 , V_H1-18 , V_H3-15 , V_H3-13 , V_H3-11 , V_H3-9 , V_H1-8 , V_H3-7 , V_H2-5 , V_H7-4-1 , V_H4-4 , V_H1-3 , V_H1-2 및 V_H6-1 로 이루어진 군으로부터 선택된 재배열된 인간 V_H 유전자 분절을 포함한다.
- [0465] 일부 구현예에서, 인간 램다 경쇄 가변 도메인은 $V_{\lambda}4-69$, $V_{\lambda}8-61$, $V_{\lambda}4-60$, $V_{\lambda}6-57$, $V_{\lambda}10-54$, $V_{\lambda}5-52$, $V_{\lambda}1-51$, $V_{\lambda}9-49$, $V_{\lambda}1-47$, $V_{\lambda}7-46$, $V_{\lambda}5-45$, $V_{\lambda}1-44$, $V_{\lambda}7-43$, $V_{\lambda}1-40$, $V_{\lambda}5-39$, $V_{\lambda}5-37$, $V_{\lambda}1-36$, $V_{\lambda}3-27$, $V_{\lambda}3-25$, $V_{\lambda}2-23$, $V_{\lambda}3-22$, $V_{\lambda}3-21$, $V_{\lambda}3-19$, $V_{\lambda}2-18$, $V_{\lambda}3-16$, $V_{\lambda}2-14$, $V_{\lambda}3-12$, $V_{\lambda}2-11$, $V_{\lambda}3-10$, $V_{\lambda}3-9$, $V_{\lambda}2-8$, $V_{\lambda}4-3$ 및 $V_{\lambda}3-1$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 재배열된 인간 V_{λ} 유전자 분절을 포함한다.
- [0466] 일 구현예에서, 설치류는 마우스 또는 랫트이다.
- [0467] 일부 구현예에서, 동형접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계통을 가진 설치류가 본원에 제공되며, 상기 동형접합성 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는: (i) 인간 V_{λ} 유전자 분절 $V_{\lambda}5-52$ 내지 $V_{\lambda}1-40$ 및 $V_{\lambda}3-27$ 내지 $V_{\lambda}3-1$, (ii) 인간 $J_{\lambda}-C_{\lambda}$ 유전자 분절쌍 $J_{\lambda}1-C_{\lambda}1$, $J_{\lambda}2-C_{\lambda}2$, $J_{\lambda}3-C_{\lambda}3$ 및 $J_{\lambda}6-C_{\lambda}6$, (iii) 인간 J_{λ} 유전자 분절 $J_{\lambda}7$, 및 (iv) 3개의 인간 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서를 포함하되, (i) 내지 (iv)는 서로 작동 가능하게 연결되고, (i) 내지 (iii)은 설치류 C_{λ} 유전자 분절의 상류에 있으며, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 면역글로불린 $E_{\lambda}2-4$ 가 결여되어 있고, 인간 V_{λ} 유전자 분절 $V_{\lambda}5-52$ 내지 $V_{\lambda}1-40$ 및 $V_{\lambda}3-27$ 내지 $V_{\lambda}3-1$ 은 인간 V_{λ} 유전자 분절 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하고, 인간 $J_{\lambda}-C_{\lambda}$ 유전자 분절쌍 $J_{\lambda}1-C_{\lambda}1$, $J_{\lambda}2-C_{\lambda}2$, $J_{\lambda}3-C_{\lambda}3$ 및 $J_{\lambda}6-C_{\lambda}6$ 은 인간 $J_{\lambda}-C_{\lambda}$ 유전자 분절쌍 사이에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함하여, 인간 J_{λ} 유전자 분절 $J_{\lambda}7$ 은 인간 $J_{\lambda}7$ 의 상류(또는 5')에서 자연적으로 나타나는 인간 비암호화 DNA를 포함한다.
- [0468] 일부 구현예에서, 설치류 C_{λ} 유전자 분절은 마우스 $C_{\lambda}1$ 유전자 분절이다.
- [0469] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 면역글로불린 λ 경쇄 인헨서 E_{λ} 및 $E_{\lambda}3-1$ 을 추가로 포함한다.
- [0470] 일부 구현예에서, 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 $V_{\lambda}2-V_{\lambda}3-J_{\lambda}2-C_{\lambda}2-J_{\lambda}4P-C_{\lambda}4P$ 유전자 분절 및 $V_{\lambda}1-J_{\lambda}3-J_{\lambda}3P-C_{\lambda}3-J_{\lambda}1$ 유전자 분절의 결실을 포함한다.
- [0471] 일 구현예에서, 설치류는 랫트 또는 마우스이다.
- [0472] **실시예**
- [0473] 다음의 실시예는 당업자에게 본원에 기술된 방법 및 조성물을 어떻게 만들고 사용하는 지를 설명하기 위해 제공되며, 본 개시의 발명자가 그의 발명으로 간주하는 것의 범주를 한정하도록 의도되지 않는다. 다르게 명시되지 않는 한, 온도는 섭씨로 표시되고, 압력은 대기압이거나 대기압에 가깝다.
- [0474] **실시예 1. 설치류 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자의 조작을 위한 표적화 벡터의 제작**

- [0475] 본 실시예는 설치류(예: 마우스)와 같은 비인간 동물의 게놈 내에 삽입하기 위한 표적화 벡터를 제작하는 예시적인 방법을 기술한다. 본 실시예에 기술된 방법은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계능을 가진 비인간 동물의 생산을 입증한다. 본 실시예는, 비인간 동물이 비인간 동물의 생식선 계능의 상기 내인성 Ig λ 유래의 인간 가변 도메인 및 비인간 또는 (일부 구현예에서는) 인간 불변 도메인을 갖는 Ig λ 경쇄를 포함하는 항체를 발현하고/하거나 생산하도록, 비인간 동물에서 내인성 Ig λ 경쇄 유전자좌를 조작하기 위한 일련의 표적화 벡터를 제작하는 것을 보여준다. 아래에 기술된 바와 같이, 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌(인간 V λ J λ , C λ 및 Ig λ 인핸서 서열)에 상응하는 다양한 양의 유전 물질을 함유하는 일련의 표적화 벡터를 내인성 설치류 Ig λ 경쇄 유전자좌 내로 삽입한다. 특히, 상기 유전 물질은 인간 V λ , J λ 및 C λ 유전자 분절이 상기 설치류 C λ 유전자 분절에 작동 가능하게 연결되도록 설치류 C λ 유전자(또는 유전자 분절)의 상류에 삽입된다. 본 실시예에 기술된 방법은 내인성 설치류 Ig λ 유전자 분절(또는 서열)의 보유 및/또는 결실을 가능하게 한다. 조작된 내인성 Ig λ 경쇄 유전자좌를 제작하기 위한 일련의 표적화 벡터의 예시적인 개략도는 도 1 내지 4에 제시되어 있다.
- [0476] VELOCIGENE®의 기술(예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호 및 Valenzuela 등, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-9를 참조하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨) 및 당업계에 공지된 분자 생물학 기술을 사용해, 설치류 Ig λ 경쇄 유전자좌 내에 삽입하기 위한, 다양한 양의 인간 V λ , J λ , C λ 및 Ig λ 인핸서 서열(또는 영역)을 함유하는 일련의 표적화 벡터를 생성하였다. 본 실시예에 기술된 방법은 임의의 인간 V λ , J λ , C λ 및 Ig λ 인핸서 서열, 또는 서열(또는 서열 단편)의 조합을 활용하는 데 원하는대로 사용될 수 있다. 표 1은 도 1에 도시된 각 표적화 벡터에 대한 간단한 설명을 제시한다.
- [0477] 간략하게, 인간 박테리아 인공 염색체(BAC) 클론 CTD-2502m16 유래의 약 12kb(11,822bp)의 인간 Ig λ 게놈 서열을 마우스 BAC 클론 RP23-60e14에 연결하였다. 인간 Ig λ 게놈 서열과의 연결에 앞서, 2번의 연속 박테리아 상동성 재조합(BHR) 단계에 의해, 본 마우스 BAC 클론을 조작하여 BAC 클론을 약 90kb 만큼 줄이고, 마우스 C λ 1 유전자의 하류에 있는 고유한 AsiSI 및 PI-SceI 제한 효소 인식 부위에 삽입하여 원래의 클로람페니콜 내성(CM^R) 유전자를 스펙티노마이신 내성(Spec^R) 유전자 및 고유한 I-CeuI 제한 부위로 대체하였다. 인간 BAC 클론 CTD-2502m16 또한 2번의 연속 BHR 단계에 의해 변형하여, 네오마이신 선택 카세트와 고유한 PI-SceI 제한 부위를 이용하여 약 53 kb의 인간 서열을 3' 말단으로부터 트리밍하고, 히그로마이신 카세트 및 고유한 AsiSI 제한 부위로 CM^R 유전자 및 약 101,5kb의 인간 서열을 5' 말단으로부터 트리밍하여, AsiSI 부위 및 네오마이신 선택 카세트를 모듈형 인간 인핸서 영역의 약 2885bp 상류 및 약 1418bp 하류에 각각 배치하였다(예를 들어, Asenbauer, H. and H.G. Klobeck, 1996, Eur. J. Immunol. 26(1):142-50을 참조하며, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 인간 Ig λ 게놈 서열은 인간 Ig λ 인핸서(E λ) 영역(또는 서열)에 상응하는 약 7.5kb를 함유하였는데, 이는 모듈형이며 3개의 서열 요소(도 1; Asenbauer, H. 및 H.G. Klobeck, 1996, Eur. J. Immunol. 26(1):142-50), 및 각각 2,9kb 및 1,4kb의 5' 및 3' 측면 서열뿐만 아니라 네오마이신 선택 카세트(유비퀴틴 프로모터에 의해 전사 조절되고 loxP 부위가 측면에 위치하는 네오마이신 내성 유전자[NEO^R])를 함유한다. 변형된 인간 및 마우스 BAC 클론을 AsiSI 및 PI-SceI 부위와 함께 분해하여 함께 연결하였다. 조작된 마우스 BAC 클론에 대한 연결 후, 생성된 표적화 벡터는 5' 상동 아암으로서 약 39,166bp의 마우스 서열을 함유하였고, 마우스 Ig λ 유전자 분절 V λ 1, J λ 3, J λ 3P, C λ 3, J λ 1, 및 C λ 1을 포함하였다(6286 표적화 벡터, 도 1). 3' 상동 아암(약 30,395bp)은 마우스 Ig λ 인핸서(mE λ)를 포함하였다. 간략화를 위해, 도 1에서의 6286 표적화 벡터의 도식에서, 마우스 상동 아암은 도시되지 않는다. 이러한 표적화 벡터와의 상동성 재조합으로 마우스 서열의 결실 없이 3개의 인간 Ig λ 인핸서 서열뿐만 아니라 5' 및 3' 측면 서열도 삽입하였다. Cre 재조합효소의 일시적인 발현에 의해 ES 세포에서 네오마이신 선택 카세트의 재조합효소 매개 결실을 달성하였다(예를 들어, Lakso, M. 외, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6; Orban, P.C. 외, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:6861-5; Gu, H. 외, 1993, Cell 73(6):1155-64; Araki, K. 외, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:160-4; Dymecki, S.M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93(12):6191-6을 참조하며; 이들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다).
- [0478] 5개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절 및 약 125,473bp에 걸쳐있는 실질적으로 모든 인간 J λ -C λ 클러스터(즉 인간 J λ 1-C λ 1-J λ 2-C λ 2-J λ 3-C λ 3-J λ 4-C λ 4-J λ 5-C λ 5-J λ 6-C λ 6-hJ λ 7)의 균을 포함하도록, 인간 BAC 클론 CTD-2079i4로부터 수득한 제2 작제물(6571 표적화 벡터)을 조작하였다. 표적화 벡터를 제작하기 위해, 먼저 BHR에 의해 인간 BAC 클론 CTD-2079i4에서의 인간 C λ 7 유전자를 마우스 C λ 1 유전자 및 약 1588bp의 측면 서열로 대체하였고, 이를 마우스 BAC 클론 RP23-60e14를 템플릿으로서 사용하여 PCR 증폭하였다. 그런 다음, 마우스 및

인간 BAC 클론 모두에 BHR에 의해 별도로 도입된 고유한 I-CeuI 및 PI-SceI 제한 효소 인식 부위를 사용해, 마우스 BAC 클론 RP23-60e14 서열에서의 마우스 Cλ1 유전자의 서열 5'에 상응하는 약 37,161bp의 마우스 서열을 함유하는 5' 상동 아암을 합성 마우스 Cλ1 유전자를 함유하는 변형된 인간 BAC 클론 CTD-2079i4에 연결하였다. 이 5' 상동 아암은 마우스 Vλ1, Jλ3, Jλ3P, Cλ3, 및 Jλ1 유전자 분절을 함유하였다(도 1). 3' 상동 아암은 6286 표적화 벡터 유래의 2개의 인간 Eλ에 상응하는 약 9,189bp의 인간 서열을 함유하였다(도 1).

[0479] 추가 11개의 기능성 인간 Vλ 유전자 분절을 함유하도록 제3 작제물(6596 표적화 벡터)를 조작하였다. 본 표적화 벡터는 BAC 클론 RP11-761L13 유래의 약 171,458bp의 인간 서열을 함유하였다. 설계에 의해, 3개의 인간 Vλ 유전자 분절들을 포함시켜 6571 표적화 벡터와 (약 33,469bp의) 3' 중첩 상동성을 제공하였다. 전술한 바와 같이, BHR에 의해 마우스 및 인간 BAC 클론에 별도로 도입된 고유 I-CeuI 및 AscI 제한 효소 인식 부위를 사용해, 약 37,161bp의 마우스 서열을 함유하는 5' 상동 아암을 인간 Vλ 유전자 분절을 함유하는 DNA 단편의 5' 말단에 연결하였다.

[0480] 추가 9개의 기능성 인간 Vλ 유전자 분절을 함유하도록 제4 작제물(6597 표적화 벡터)을 조작하였다. 본 표적화 벡터는 2개의 BAC 클론인 RP11-22L18 및 RP11-761L13 유래의 약 121,188bp의 인간 서열을 함유하였다. 전술한 바와 같이, 본 인간 서열의 3' 말단은 추가적인 인간 Vλ 유전자 분절을 함유하였는데, 이는 6596 표적화 벡터와의 3' 중첩 상동성을 제공하였다(약 27,468bp). 6571 및 6596 표적화 벡터에 대해 전술한 바와 같이, BHR에 의해 마우스 및 인간 BAC 클론에 별도로 도입된 고유 I-CeuI 및 AscI 제한 효소 인식 부위를 사용해, BAC 클론 RP23-60e14 유래의 마우스 서열을 함유하는 약 37,161bp의 5' 상동 아암을 인간 서열의 5' 말단에 연결하였다.

[0481] 유사한 방식으로, 마우스 Igλ 경쇄 유전자가 상동성 재조합을 통해 결실될 수 있도록 5' 상동 아암이 변경된 것을 제외하고는 6597 표적화 벡터와 동일하게 추가 9개의 기능성 인간 Vλ 유전자 분절을 포함하도록 제5 작제물(6680 표적화 벡터)을 조작하였다. 본 5' 상동 아암은 마우스 BAC 클론 RP23-15m16 유래의 약 22,298bp를 함유하였고, BHR에 의해 마우스 및 인간 BAC 클론 모두에 별도로 도입된 고유 I-CeuI 및 AscI 제한 효소 인식 부위를 사용해 이를 인간 서열의 5' 말단(~121,188bp 단편, 전술한 바와 같음)에 연결하였다. 본 5' 상동 아암은 마우스 Vλ2 유전자 분절의 마우스 서열 5'을 함유하는데, 이는 상동성 재조합 시, 마우스 Igλ 경쇄 유전자좌를 효과적으로 결실시킨다. 본 표적화 벡터는 6597 표적화 벡터와 동일한 3' 중첩 상동성을 함유하였다(전술함). 도 2는 6597 또는 6680 표적화 벡터의 삽입에 의해 생성되는 상이한 대립유전자를 도시한다.

[0482] 유사한 방식으로, CRISPR/Cas9 시스템을 사용해 가이드 RNA(gRNA)의 도움을 받아 2개의 상이한 표적화 벡터를 ES 세포 내로 전기 천공하여 추가 조작된 마우스 계통을 생성하였다(도 3). 이에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제9,228,208호(2016년 1월 5일 등록) 및 미국 특허 출원 U.S. 2015-0159174 A1 (2014년 10월 15일 출원), U.S. 2015-0376650 A1 (2015년 6월 5일 출원), U.S. 2015-0376628 A1 (2015년 6월 23일 출원), U.S. 2016-0060657 A1 (2015년 10월 30일 출원), U.S. 2016-0145646 A1 (2015년 11월 20일 출원), 및 U.S. 2016-0177339 A1 (2015년 12월 18일 출원)을 참조하고; 이들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. ES 세포는 6571 표적화 벡터 작제물의 삽입에 대해 게놈 이형접합성을 가졌다.

[0483] 간략하게, 도 3에 도시된 바와 같이, 6571 표적화 벡터에서 3개의 인간 Vλ 유전자 분절에 상응하는 중첩 서열을 함유하는 약 33kb 3' 상동 아암, 11개의 추가 인간 Vλ 유전자 분절을 포함하는 약 111kb 서열, 및 단일 인간 Vλ 유전자 분절을 함유하고 제2 표적화 벡터와의 중첩 영역으로서 기능하는 약 27kb 서열을 함유하도록, 트리밍된 6596 표적화 벡터(즉, 전술한 바와 같은 5' 상동 아암 및 카세트가 없음)를 설계하였다. 제2 표적화 벡터(6680 표적화 벡터)는 동일하게 표적화 벡터의 3' 말단 상에 위치한 약 27kb 중첩 영역 서열, 추가 9개의 인간 Vλ 유전자 분절을 포함하는 약 94kb 서열, 네오마이신 선택 카세트(예: Frt 재조합 인식 부위가 측면에 위치한 유비퀴틴 프로모터에 의해 전사가 조절되는 네오마이신 내성 유전자[NEO^R]) 및 약 22kb 5' 마우스 λ 상동 아암을 포함한다. 이들 2개의 표적화 벡터의 전기 천공에 사용된 ES 세포는 6571 표적화 벡터의 삽입에 대해 게놈 이형접합성을 가졌다(도 3). 뉴클레오티드 서열 CGACCTGATG CAGCTCTCGG (서열번호 130)에서 6571 표적화 벡터 유래의 히그로마이신 내성 유전자를 표적화하는 가이드 RNA 및 마우스 Vμ2 유전자 분절의 상류에 있는 영역(즉, 마이너스 가닥 상의 마우스 Vλ2 유전자 분절의 3'; gRNA1: GTACATCTTG TCTCAACGT, 서열번호 139, 마우스 Vλ2의 상류에 있는 약 1000bp; gRNA2: GTCCATAATT AATGTAGTTA C, 서열번호 140, 마우스 Vλ2의 상류에 있는 약 380bp)을 표적화하고 이들 서열에서 이중 가닥 절단을 촉진하는 2개의 gRNA와 함께 전술한 2개의 표적화 벡터로 이들 ES 세포를 공동으로 전기 천공하였다. 2개의 공동 전기 천공된 표적화 벡터를 상동성 재조합에 의해 히그로마이신 서열에서 ES 세포의 게놈 내로 삽입하여, 히그로마이신 선택 카세트를 함유하고 둘러싸는 영역을 치환하였다. 생성된 ES 세포는, 인간 Jλ-Cλ 클러스터에 작동가능하게 연결된 25개의 기능성 인간 Vλ 유

전자 분절 및 마우스 C λ 1 유전자에 작동 가능하게 연결된 인간 J λ 7 유전자 분절을 포함하는 인간 면역글로불린 가변 영역이 포함된 조작된 내인성 Ig λ 유전자좌를 함유하였다(도 3).

[0484] 전술한 표적화 벡터를 마우스 배아 줄기(ES) 세포 내로 도입하여 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 생성하였다. 다음 표적화 벡터의 삽입 전에 각각의 표적화 벡터를 ES 세포의 게놈 내로 삽입한 후 양성 ES 세포 클론을 확인하였다(하기 참조). 일부 예에서, 표현형 분석을 위해 중간 계통을 생성하였다.

표 1

【표 1】 표적화 벡터의 요약

이름	대략적인 hIg λ 서열	설명
6286	11,822bp	마우스 Ig λ 유전자좌 내에 인간 E λ 삽입함
6571	125,473bp	5 개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절 및 인간 J λ -C λ 유전자 클러스터의 일부를 삽입함
6596	171,458bp	추가로 11 개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절 삽입함
6597	121,188bp	추가로 9 개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절 삽입함
6680	121,188bp	추가로 9 개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절을 삽입하고 마우스 Ig λ 유전자 분절을 결실함
6889	121,188bp	추가로 9 개의 기능성 인간 V λ 유전자 분절을 삽입하고, 2 개의 표적화 벡터 및 가이드 RNA 의 동시 삽입을 통해 마우스 Ig λ 유전자 분절을 결실함

[0485]

[0486] 전술한 표적화 벡터의 삽입 후 선택된 접합점 양단의 뉴클레오타이드 서열을 시퀀싱에 의해 확인하였다. 도 1 내지 도 4에 표시된 선택된 접합점들이 아래에 제공된다.

서열번호 117	CCCTATTCAGTCTGAGTTCTGGAAGCTCTGCTATTTCCATGATCGTTTCA CTGACCCCTGTTGATCTTACCGGTACCGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCC TA
서열번호 118	TTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCGCGCC GATGTACATCAGTTCAGTCTGGAAGGTGGAACAGCTCCAGGTGAAGG CAGG
서열번호 119	CTCTACGGGTGATGTTTCTAAGGTGACAGGAGTCAGTGAGGGCTTC TCAAGCTTTATCTATGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAAATGAAATGGCA CTCGAGCCCTGCTGGTGCCCTTCTGTTGTATCCACGCTTCAGTAGATT GATGA
서열번호 120	GAGTTTTTCCCTTTCTCTGTCTGTGCAAGGCTAAGGTCTAAGCCTGTCT GGTCACACTAGGTAAAGAATTTCTTTCTTCTCTAGATGCTTTGTCTCA TTTC
서열번호 121	TATGTCACTGGAATTTAGAGTAGTGTGTGGAATGTCTTGGCAACCTGG ACACGCGTCTGGCACCCAGTGAGAAAGTGGCCCTGAGGGAGAGGCTCA TAG
서열번호 122	AGCAGCCGACATTTAGCAAAGAGGATTGGAATAAGAACCCCTTAAA ATACAGTTAAACACAGAGGAGGAGCAAAACCGGTATAACTTCGTATAA TGT
서열번호 123	ATGCTATACGAAGTTATGTGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCATCTA TGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAAATGAAATGGTCTCATTCCTTCCCTG TCTCAAGGCATAATGGTTCAATATGCACCTGTA
서열번호 124	TTCTCTCCAAGACTTGAGGTGCTTTTTGTTGTATACTTTCCCTTTCTG TATTCTGCTTCATACCTATACTGGTACCGAAGTTCCTATTCCGAAGTT CCTA
서열번호 125	TTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCGCGCC TGCCATTTTCACTACCTCTTTCTCCGACCCGACATAGATAAGCTTTGGA TTGGATTCACTGAGCAAGAATTCACAAACACAATGGACTTATC
서열번호 126	TTCTCTCCAAGACTTGAGGTGCTTTTTGTTGTATACTTTCCCTTTCTG TATTCTGCTTCATACCTATACTGGTACCGAAGTTCCTATTCCGAAGTT CCTA
서열번호 127	TTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCGCGCCC CCCTGCTGGTGCCCTTTTGTGTATCCACGCTTCAGTAGATTGATGA TGC
서열번호 128	TTCTCTCCAAGACTTGAGGTGCTTTTTGTTGTATACTTTCCCTTTCTG TATTCTGCTTCATACCTATACTGGTACCGAAGTTCCTATTCCGAAGTT CCTA
서열번호 129	TTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTCCTAGGGTTTCACCGGTGGCGCGCC GATGTACATCAGTTCAGTCTGGAAGGTGGAACAGCTCCAGGTGAAGG CAGG

[0487]

[0488]

조작된 유전자좌, 특히, 조작된 면역 글로불린 유전자좌를 제작함에 있어서, 발명자들은 일부 인간 V λ 유전자 분절은 특정 일배체형으로부터 누락될 수 있으며, 따라서, 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에 걸쳐 있는 선택된 BAC 클론에 나타나지 않음을 인식하였다. 하나의 예를 들자면, 한 보고서는 보다 최근에 발견된 대립유전자가 이전에 보고된 대립유전자들과 비교해 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 클러스터 B에서 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절의 삽입/결실을 함유한다는 증거를 제공하였다(예: 인간 V λ 1-50, V λ 5-48, V λ 5-45 및 V λ 5-39; Moraes, J.C. 및 G.A. Passos, 2003, Immunogenetics 55(1):10-5 참조). 따라서, 발명자들은 표적화 벡터 설계 및 제작에 사용된 특정 BAC 클론에서 누락된 인간 V λ 유전자 분절을 포함시키는 전략을 설계하였다.

[0489]

간략하게, 인간 BAC 클론을 말단 시퀀싱에 의해 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌에 맵핑한다. 특히, GRCh37/hg19 Assembly (UCSC Genome Browser, Human Feb. 2009)를 사용하며, 인간 BAC 클론 RP11-346I4, CTD-2523F21 및 CTD-2523E22가 인간 V λ 7-46 내지 V λ 1-36을 포함하는 인간 Ig λ 경쇄 유전자좌의 클러스터 B의 영역에 걸치는 것이 식별된다. 예를 들어, 하나 이상의 누락된 인간 V λ 유전자 분절(예, V λ 5-39, V λ 5-37 및/또는 V λ 1-36)은 삽입하고자 하는 하나 이상의 인간 V λ 유전자 분절을 함유하는 것으로 식별된 이들 BAC 클론들 중 임의의 하나를 사용하여 전술한 표적화 벡터(6680 또는 6889)에 삽입될 수 있다. 예를 들어, BAC 클론 CTD-

2523F21는 3'을 재조합 효소 인식 부위가 측면에 위치한(예를 들어, *lox2372*) 선택 카세트(예: 유비퀴틴 프로모터에 의해 전사가 조절되는 히그로마이신 내성 유전자 [HYG^R])로 대체하고, 중첩 서열을 갖는 ~27kb의 3' 상동 아암을 6597 표적화 벡터와 대체함으로써 변형된다(상기 참조). 인간 BAC 클론의 5' 말단은 6680 또는 6889 표적화 벡터와 중첩 서열을 갖는 5' 상동 아암으로서 작용하여, 선택 카세트와 함께 상동성 재조합 및 임의의 누락된 인간 $V\lambda$ 유전자 분절의 삽입을 용이하게 한다. 선택저진 마지막 단계인 재조합 효소(예: Cre)의 일시적인 발현이 선택 카세트를 제거에 사용될 수 있다.

[0490] **실시예 2. 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 갖는 설치류의 생성**

[0491] 본 실시예는 내인성 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 비인간 동물(예를 들어, 설치류)의 생산을 보여주며, 상기 내인성 Ig 램다 경쇄 유전자좌는 복수의 인간 $V\lambda$, $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 서열(인간 $V\lambda$, $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 서열은 설치류 $C\lambda$ 유전자(또는 유전자 분절)에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하고, 상기 내인성 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 인간 $Ig\lambda$ 인헨서($E\lambda$)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 내인성 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 내인성 $Ig\lambda$ 경쇄 인헨서 영역(또는 서열)의 결실을 포함한다. 이러한 비인간 동물은, 일부 구현예에서, 완전한 인간인 $Ig\lambda$ 경쇄(즉, 인간 가변 및 불변 도메인)를 발현하는 것을 특징으로 한다.

[0492] 실시예 1에 기술된 표적화 벡터의 표적화된 삽입을 중합효소 연쇄 반응에 의해 확인하였다. 이어서, 중합효소 연쇄 반응에 의해 확인된 표적화된 BAC DNA를 전기천공을 통해 F1 하이브리드 (129S6SvEvTac/C57BL6NTac) 마우스 배아 줄기 (ES) 세포 내로 도입한 후 선택 배지에서 배양하였다. 일부 구현예에서, 일련의 표적화 벡터의 전기 천공에 사용된 ES 세포는 야생형 IgH 및 $Ig\kappa$ 유전자좌, 동형접합성 인간화 IgH 및 $Ig\kappa$ 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가질 수 있으며, 상기 동형접합성 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열을 함유하거나(예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호 참조; 전체는 참조로서 본원에 통합됨), 동형접합성 인간화 IgH 유전자좌(예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호 참조, *상기와 같음*) 및 동형접합성 불활성화된 $Ig\kappa$ 유전자좌를 함유하였다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 ES 세포가 마우스(하기 참조)를 생성하는데 사용된 후, 생성된 본원에 기술된 바와 같은 조작된 인간 $Ig\lambda$ 유전자좌를 포함하는 생성된 마우스는 인간화 IgH 및 $Ig\kappa$ 유전자좌를 포함하는 마우스와 교배에 사용되며, 상기 인간화 IgH 유전자좌는 삽입된 설치류 Adam6 암호화 서열을 함유하거나(예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호 참조, *상기와 같음*), 인간화 IgH 유전자좌(예를 들어, 미국 특허 제8,642,835호 및 제8,697,940호 참조, *상기와 같음*) 및 불활성화된 $Ig\kappa$ 유전자좌를 함유한다. 전기 천공 후 10일차에 약물 내성 콜로니를 뽑아서 TAQMAN™에 의해 스크리닝하고 전술한 바와 같이 정확한 표적화를 위한 핵형분석을 하였다(Valenzuela 외, *상기와 같음*; Friendewey, D. 외, 2010, Methods Enzymol. 476:295-307). 표 2는 양성 ES 세포 클론 스크리닝을 위해 사용된 예시적인 프라이머/프로브 세트(F: 정방향 프라이머; R: 역방향 프라이머; P: 프로브)를 제시한다.

[0493] VELOCIMOUSE® 방법 (DeChiara, T.M. 외, 2010, Methods Enzymol. 476:285-294; DeChiara, T.M., 2009, Methods Mol. Biol. 530:311-324; Poueymirou 외, 2007, Nat. Biotechnol. 25:91-99)을 사용하였으며, 여기서, 표적화된 ES 세포를 미압축된 8-세포 단계의 Swiss Webster 배아 내로 주입하여 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 대립유전자에 대해 이형접합체인 건강하고 완전한 ES 세포 유래 F0 세대 마우스를 생산하였다. F0 세대 이형접합체 마우스를 C57B16/NTac 마우스와 교배시켜 F1 이형접합체를 생성하고, 이를 상호교잡시켜 표현형 분석을 위한 F2 세대 동물을 생산하였다.

[0494] 종합하면, 본 실시예는 설치류 $C\lambda$ 유전자에 작동 가능하게 연결된 복수의 인간 $V\lambda$, $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 서열이 존재하는 것을 특징으로 하는 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌를 포함하는 생식선 계놈을 가진 설치류(예를 들어, 마우스)의 생성을 예시하고 있으며, 상기 설치류의 조작된 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌는 내인성 설치류 및 인간 $Ig\lambda$ 경쇄 인헨서 서열(또는 영역)을 포함한다. 인간 $V\lambda$, $J\lambda$ 및 $C\lambda$ 서열을 내인성 설치류 $Ig\lambda$ 경쇄 유전자좌 내에 삽입하기 위한, 본원에 기술된 전략은 인간 또는 설치류 $C\lambda$ 도메인에 융합된 인간 $V\lambda$ 도메인을 함유하는 항체를 발현하는 설치류의 제작을 가능하게 한다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 인간 $V\lambda$ 도메인은 내인성 $Ig\lambda$ 생식선 설치류 계놈에서의 경쇄 유전자좌에서 발현된다.

표 2

[0495]

양성 ES 세포 클론의 스크리닝을 위한 대표적인 프라이머/프로브 세트		
이름		서열 (5'-3')
mIgLC1p3	F	GCATGGCCTAGAGATAACAAGAC (서열번호 15)
	R	GGCCTTGGATAACCTCAGGATAC (서열번호 16)
	P	TCCATCCCAATAGATCTCATTCCTTCCC (서열번호 17)
HSS1-1	F	CCCTGTCAAGTCTCCAAGGTTG (서열번호 18)
	R	CACTGTGGCCCAAGGATCAC (서열번호 19)
	P	CACTCTGCCCAGGGAGTGTCTGG (서열번호 20)
LoLjxn1	F	GCATGGCCTAGAGATAACAAGACTG (서열번호 21)
	R	GTGCTCTTCCCTTGGGAGA (서열번호 22)
	P	TCCATCCCAATAGAGCGATCGCA (서열번호 23)
Neo	F	GGTGGAGAGGCTATTCGGC (서열번호 24)
	R	GAACACGGCGGCATCAG (서열번호 25)
	P	TGGGCACAACAGACAATCGGCTG (서열번호 26)
hIgI2	F	AGCTGAATGGAAACAAGGCAA (서열번호 27)
	R	GGAGACAATGCCCCAGTGA (서열번호 28)
	P	TGACATGAACCATCTGTTTCTCTCTCGACAA (서열번호 29)
hIgI4	F	CCACCGCCAAGTTGACCTC (서열번호 30)
	R	TGAAGGACTAAGGCCAGGATAG (서열번호 31)
	P	AGTACAGCAAGGGCCAGCCT (서열번호 32)
hIgI5	F	TGGCTCAGTGACAAGAGTC (서열번호 33)
	R	CCAGGGACACAGCCTTTGC (서열번호 34)
	P	TGCATTGCAGAGACCAGGGACC (서열번호 35)
Hyg	F	TGCGGCCGATCTTAGCC (서열번호 36)
	R	ACGAGCGGGTTTCGGCCATTG (서열번호 37)
	P	TTGACCGATTCTCTGCGG (서열번호 38)
Hyg D	F	TGTCGGGCGTACACAAATCG (서열번호 39)
	R	GGGCGTCGGTTTCCACTATC (서열번호 40)
	P	CCGTCTGGACCGATGGCTGTGT (서열번호 41)
Hyg U	F	CGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTG (서열번호 42)
	R	CACGCCCTCCTACATCGAA (서열번호 43)
	P	AGTTCGACAGCGTGTCCGACCTGA (서열번호 44)
mIgI1	F	AACAACCGAGCTCCAGGTGT (서열번호 45)
	R	AGGGCAGCCTTGCTCTCAA (서열번호 46)
	P	CCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTG (서열번호 47)
mIgI6	F	GGAGGTCAGGAATGAGGGAC (서열번호 48)
	R	CACTTGCTCACTGCAAAAGCA (서열번호 49)
	P	TGTGGGATTTTGAATTCTATCTCACTGATAGGAAAG (서열번호 50)
mIgI10	F	GCAGAGAGGATTCAAGAGCTGG (서열번호 51)
	R	TTTTTGCAATGCTTCACCTGA (서열번호 52)
	P	CAGGTGTCTGTATTGGAGGTCAATGGCA (서열번호 53)
mIgI11	F	GATTGCTGAGGGCAGGGT (서열번호 54)
	R	CCCCAAGTCTGATCCTTCCTT (서열번호 55)
	P	CCTTCATACTCTTGATCCTCCCTTCTCCA (서열번호 56)
mIgI12	F	GCTGACCAACGATCGCCTAA (서열번호 57)
	R	TAAGCGCCACACTGCACCT (서열번호 58)
	P	TTCCTTCTCTTCTGTGACTCAATTATTTGTGGACA (서열번호 59)
mIgI13	F	AACTGCTGATGCACTGGGC (서열번호 60)
	R	TGAATGCATGGAGTTGGCC (서열번호 61)
	P	TCTCCTTTGCAGTGGCTTAATTAGCTGAGTCA (서열번호 62)
1467hTI1	F	CCCTGGTGAAGCATGTTTGC (서열번호 63)
	R	TGTGGCCTGTCTGCCTTACG (서열번호 64)
	P	CCAAGCAGGAGGTGCTCAGTTCCCA (서열번호 65)

1467hTI2	F	GGGACAGGTGAAGGGCCTATC (서열번호 66)
	R	TGGTCCACAGGATGCAGTTG (서열번호 67)
	P	CGCACCTGTATCTAACCAGTCCCAGCATC (서열번호 68)
1467hTI3	F	CACACCTAGACCCCGAAGTC (서열번호 69)
	R	TCGCTTTGCCAGTTGATTCTC (서열번호 70)
	P	TCCACACTGTCGGCTGGGAGCTCA (서열번호 71)
1468h1	F	CGCTTCAATGACCCAACCA (서열번호 72)
	R	TGTTGAAACGTAATCCCCAATG (서열번호 73)
	P	CTCCCACCAGGTGCCACATGCA (서열번호 74)
1468h2	F	GGGCTACTTGAGGACCTTGCT (서열번호 75)
	R	GACAGCCCTTACAGAGTTTGAA (서열번호 76)
	P	CAGGGCCTCCATCCCAGGCA (서열번호 77)
1468h3	F	AGTGCAACAGCAAGATGAGATCT (서열번호 78)
	R	GGCGCTGAGCAGAAAACAA (서열번호 79)
	P	AGACCACCAAGAAGGCCAGAGTGACC (서열번호 80)
1468h5	F	AAGACCAGGAGCTCTGCCTAAGT (서열번호 81)
	R	CCCATCACGAACTGAAGTTGAG (서열번호 82)
	P	CCCCAGTGTGTGAATCACTCTACCTCC (서열번호 83)
1468h6	F	CCCTTCATGATGCTTTGTCATC (서열번호 84)
	R	GTAGTGGCAAAGGCAGATTCCCT (서열번호 85)
	P	CCTTCACTCCCCGAATGCCCTCC (서열번호 86)
6596V3-25-1	F	GCCCTGCTCCAGTCTTATTC (서열번호 87)
	R	CTGCGTCTGGGCTTTGCT (서열번호 88)
	P	CCACAGATCCCAAGTTGAGCCTGC (서열번호 89)
6596V3-22-1	F	GTGAGCGGTACCCCTGGAATC (서열번호 90)
	R	AGCCTCGTCTTCGGTCAGGAC (서열번호 91)
	P	TGAACGATTCTCTGGGTCCACC (서열번호 92)
6596V3-21-1	F	CCTGAGCCAGGATGGAATGAAG (서열번호 93)
	R	GGCCGTGATTTAAGAGGTGTTAG (서열번호 94)
	P	ACTGTGGACCCCAGATAATTCCTTG (서열번호 95)
6596VLdetect-1	F	GAGTGCAGTGGCAGAATCTTG (서열번호 96)
	R	GGCAGGGAGCATTGGTAGA (서열번호 97)
	P	TACTGAAATCTCAGCCTCCCAGGC (서열번호 98)
6596V3-19-1	F	TGGCTCCAGCTCAGGAAV (서열번호 99)
	R	CCCGGGAGTTACAGTAATAGTCA (서열번호 100)
	P	CACAGCTTCCTTGACCATCACTGGG (서열번호 101)
6597_h3'arm1	F	CCAGCCCACCAATTATGCTA (서열번호 102)
	R	GCGTTTAGGGCCAGGTACAAAT (서열번호 103)
	P	TGGATCTGTCAAACACTTTCAGAGCA (서열번호 104)
6597_h3'arm2	F	GAGGCTGCAGGGATGTAAC (서열번호 105)
	R	CCCATTCCAGGTCCAATTCTCA (서열번호 106)
	P	TTTGTAAGTGCATAACACAGACCCTGA (서열번호 107)
66805'Arm1	F	GGGTACAATGAGACAAGAATCAGA (서열번호 108)
	R	GAAAGGCAAAACACAAGTCACAGATG (서열번호 109)
	P	TCAGCCCTCTGGAATGTAAGGATCA (서열번호 110)
66805'Arm2	F	GCTGCATCTTCTCAAGTCTTAAAGT (서열번호 111)
	R	GGGAACCAGTCAGGAATCATAAC (서열번호 112)
	P	TAAGCAGACCTATGCATCGCTCA (서열번호 113)
hIgLVpre2-8	F	GTGCTCCTTGTTCCCTTCACAG (서열번호 114)
	R	CTGAAGCATCTGCACCATCAAATC (서열번호 115)
	P	CCACCCACATGTGCCCGTGTG (서열번호 116)

[0496] 실시예 3. 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 갖는 설치류의 표현형 평가

[0497] 본 실시예는 상기 기술된 바와 같이 내인성 Igλ 경쇄 유전자좌를 함유하도록 조작된 설치류(예: 마우스)에서 다양한 면역 세포 모집단의 특성을 입증한다. 특히, 본 실시예는 본원에 기술된 바와 같이 조작된 내인성 Igλ 경쇄 유전자좌를 갖는 설치류가 야생형 한배 새끼와 비교해 유사한 B 세포 발생을 나타낸다는 것을 구체적으로

입증한다. 특히, 인간 Igλ 경쇄 유전자좌에 상응하는 상이한 양의 유전 물질을 보유한 몇몇 조작된 설치류는 인간 가변 도메인 및 인간 또는 설치류 불변 도메인을 갖는 Igλ 경쇄를 설치류 B 세포의 표면 상에서 검출될 수 있도록 발현한다.

[0498]

요컨대, 도 4에 도시된 Igλ 경쇄 대립유전자에 대해 동형접합성이거나 이형접합성인 선택된 조작된 마우스 계통 및 야생형 한배 새끼로부터 비장과 대퇴골을 채취하였다. 2.0% 소태아혈청(FBS)이 함유된 1x 인산 완충 식염수(PBS, Gibco)로 세척하여 대퇴골로부터 골수를 채취하였다. 비장 및 골수 제조로부터의 적혈구 세포를 ACK 용해 완충액(Gibco)으로 용해시킨 다음 2.0% FBS가 함유된 1xPBS로 세척하였다. 단리된 세포 (1×10^6)를 선택된 항체 카테일과 함께 +4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다(표 3 참조).

【표 3】 유동 세포 계측에 의해 분석된 세포 염색용 항체

항체	표지	공급자	클론
골수			
항마우스 CD43	FITC	BioLegend	1B11
항마우스 c-키트	PE	BioLegend	2B8
항마우스 IgM	PeCy7	eBiosciences	II/41
항마우스 IgD	PerCP-Cy5.5	BioLegend	11-26c.2a
항마우스 CD3	PB	BioLegend	17-A2
항마우스/항인간 B220	APC	eBiosciences	RA3-6B2
항마우스 CD19	APC-H7	BD	1D3
골수			
항마우스 Igκ	FITC	BD	187.1
항마우스 Igλ	PE	BioLegend	RML-42
항마우스 IgM	PeCy7	eBiosciences	II/41
항마우스/항인간 B220	PerCP-Cy5.5	BD	RA3-6B2
항마우스 CD3	PB	BioLegend	17-A2
항인간 Igλ	APC	Biolegend	MHL-38
항마우스 CD19	APC-H7	BD	1D3
비장			
항마우스 Igκ	FITC	BD	187.1
항마우스 Igλ	PE	BioLegend	RML-42
항마우스 IgM	PeCy7	eBiosciences	II/41
항마우스 IgD	PerCP-Cy5.5	BioLegend	11-26c.2a
항마우스 CD3	PB	BioLegend	17-A2
항인간 Igλ	APC	Biolegend	MHL-38
항마우스 CD19	APC-H7	BD	1D3

[0499]

염색한 후에, 세포를 세척하고 2% 포르말데히드로 고정시켰다. BD FORTESSA™ 유동 세포 계측기 상에서 데이터를 수집하고 FLOWJO™ 소프트웨어로 분석하였다. 대표적인 결과는 도 5 내지 13 및 18 내지 21에 제시되어 있다. 도 4에 도시된 다른 계통에 대해 유사한 데이터를 얻었지만, 선택된 계통만이 도시되어 있다.

[0500]

[0501]

결과는 인간 Igλ 경쇄 유전자좌에 상응하는 유전 물질의 상이한 양을 보유하는 각각의 계통이 비장 및 골수 구획에서 유사한 면역 세포 집단 프로파일을 보였음을 입증했다. 특히, 도 5 내지 도 7에 도시된 데이터로부터 입증되는 바와 같이, 조작된 마우스는 유사한 수의 CD19⁺ 비장 B 세포, 비장 내 유사한 성숙 및 이행 B 세포의 집단, 비장 내 유사한 카파 사출, 및 그들의 야생형 한배 새끼 대조군과 유사한 변연부(marginal zone) 및 여포 성 B 세포의 집단을 보여주었다. 또한, 추가 인간화 IgH 및 인간화 Igκ 유전자좌가 존재하는 가운데 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 함유하는 마우스는 인간화 IgH 및 인간화 Igκ 유전자좌만을 함유하는 마우스와 비교해 B 세포 발생에서는 큰 차이를 나타내지 않았다(예를 들어, 도 18a 및 18b 참조). 또한, 도 8 내지 도 12에서 제시된 마우스에서 보이는 바와 같이, 조작된 마우스는 골수에서 이들의 야생형 한배 새끼 대조군과 유사한 CD19⁺, 이후, 이전, 미성숙 및 성숙 B 세포 수, 및 유사한 카파 사출을 나타냈다. 그들의 야생형 리터메이트 대조군과 비교하여 선택된 조작된 계통 (동형접합체 - HO; 이형접합성 - HET)에서의 경쇄 발현의 요약이 도 13에 제공된다. 본원에 기술된 바와 같은 조작된 인간화 Igλ 유전자좌에 대해 동형접합체이고, 또한 인간화 IgH 및 Igκ 유전자좌에 대해 동형접합체이며 설치류 Adam6 암호화 서열에 대해 동형접합체인 마우스는

야생형 마우스에 대해 알려진 람다의 통상적인 주변 이용률(예를 들어, 비장에서 5%)에 비해 람다 유전자좌(약 40%)의 증가된 활용도를 입증하였다(참조: 6680HO/VI HO/Adam6 HO 및 6689HO/VI HO/Adam6 HO 마우스, 도 13). 또한, 작은 비율의 마우스 Igλ-양성 B 세포가 이들 마우스에서 검출되었는데(~3 내지 5%), 이는 조작된 λ 경쇄 유전자좌 내의 마우스 Cλ 유전자도 이들 마우스에서의 기능성 λ 경쇄의 맥락에서 발현된다는 것을 확인해 준다.

[0502] **실시예 4. 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 갖는 설치류에서의 항체 발현**

[0503] 본 실시예는 비인간 동물로부터의 항체의 발현을 입증하며, 상기 항체는 인간 Vλ 영역 및 인간 또는 설치류 Cλ 영역의 존재를 특징으로 하는경쇄를 함유하며, 경쇄는 조작된 내인성 설치류 Igλ 경쇄 유전자좌에서 발현된다. 특히, 본 실시예는 비인간 동물(예: 설치류)의 혈청에서 항체의 발현을 구체적으로 입증하며, 상기 비인간 동물의 생식선 계통은, 하나 이상의 인간 Vλ 유전자 분절, 하나 이상의 인간 Jλ 유전자 분절 및 하나 이상의 인간 Cλ 유전자 분절(인간 Vλ, Jλ 및 Cλ 유전자 분절은 설치류 Cλ 유전자에 작동 가능하게 연결됨)의 삽입을 포함하는 내인성 Igλ 경쇄 유전자좌를 포함하며, 상기 내인성 면역글로불린 λ 경쇄 유전자좌는 하나 이상의 설치류 Igλ 경쇄 인핸서(Eλ) 및 하나 이상의 인간 Igλ 경쇄 인핸서(Eλ)를 추가로 포함한다.

[0504] 간단히 말하면, 선별된 조작된 마우스 계통 및 야생형 한배 동종으로부터 혈액을 채취하였다(실시예 3 참조). Eppendorf 튜브를 사용하여 4℃에서 5분 동안 9000 rcf로 원심분리하여 혈액으로부터 혈청을 분리하였다. 수집된 혈청을 면역블로팅에 사용해 항체의 Ig 경쇄 발현을 확인하였다. 마우스 혈청을 PBS(Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 없음) 중에서 1.5:10으로 희석하고, 환원 및 비환원 조건 하에 4-20% Novex Tris-Glycine 겔 상에서 작동 시켰다. 제조사의 사양에 따라 겔을 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막으로 옮겼다. 0.05% Tween-20 (TBST, Sigma)이 함유된 트리스 완충 식염수 중 5% 무지방 우유로 밤새 블롯을 블로킹하였다. PVDF 막을, TBST 중의 0.1% 무지방 우유에서 1:1,000으로 희석된 상이한 1차 항체(HRP(Southern Biotech)에 접합된 마우스 항hIgλ; HRP(Southern Biotech)에 접합된 염소 항mIgλ)에 실온에서 1시간 동안 노출시켰다. 블롯을 4회 세척하고(각 10분씩), 제조사의 사양에 따라 Amersham ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시약(GE Healthcare Life Sciences)으로 1분 동안 전개시켰다. 그런 다음, GE Healthcare ImageQuant LAS-4000 Cooled CCD Camera Gel Documentation System을 사용하여 블롯을 촬영하였다. 20개의 이미지가 캡처되거나 이미지들이 완전히 노출되는 것 중 어느 하나가 될 때까지 15초 간격으로 이미지를 캡처하였다. 대표적인 결과는 도 14a 및 14b에 제시되어 있다. 결과는 모든 조작된 계통이 그들의 혈청 내에 항체를 함유하는 인간 Igλ 경쇄를 검출 가능한 레벨로 발현하였음을 입증하였다(도 14; 데이터 미도시).

[0505] **실시예 5. 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 갖는 설치류에서의 인간 유전자 분절의 용도**

[0506] 본 실시예는, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Igλ 경쇄 유전자좌를 함유하도록 조작된 설치류(예: 마우스)에서 발현된 항체의 경쇄에서 인간 유전자의 용도를 보여준다. 전술한 선택된 조작된 설치류 계통에서 인간 Igλ 유전자 분절의 용도를 차세대 시퀀싱 항체 레퍼토리 분석에 의해 결정하였다.

[0507] 간략하게, 25개의 기능성 인간 Vλ 유전자 분절, 4개의 기능성 인간 Jλ-Cλ 클러스터, 및 마우스 Cλ1 유전자의 상류에 있는 인간 Jλ7 유전자 절편, 및 마우스 Cλ1 유전자 및 내인성 마우스 Igλ 인핸서 3.1 사이에 삽입된 인간 Igλ 인핸서의 삽입을 위해 마우스 이형접합체(도 4에서와 같은 6889 이형접합체 마우스)로부터 비장세포를 수확하였다. B 세포는 항마우스 CD19 자성 비드 및 MACS 컬럼(Miltenyi Biotech)에 의해 총 비장세포로부터 적극적으로 농축하였다. RNeasy Plus 키트(Qiagen)를 사용하여 비장의 B 세포로부터 총 RNA를 분리하였다.

[0508] 올리고-dT 프라이머를 사용한 역전사에 이어서 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)를 사용하여 유전자 특이적 PCR을 수행하여 인간 Igλ 불변 영역 서열(Cλ1, Cλ2, Cλ3 및 Cλ6), 및 마우스 Cλ1 서열을 함유하는 를 함유하는 cDNA를 생성하였다. 역전사하는 동안, 특이적 DNA 서열 (PIIA: 5'-CCCATGTACT CTGCGTGTGAT ACCACTGCTT-3', 서열번호 133)을 새롭게 합성된 cDNA의 3' 말단에 부착하였다. NucleoSpin Gel 및 PCR Clean-Up Kit (Clontech)로 cDNA를 정제한 다음, 인간 Cλ 특이적 프라이머(5'-CACYAGTGTG GCCTTGTGG CTTG-3', 서열번호 131) 및 마우스 Cλ1 특이적 프라이머(5'-CACCAGTGTG GCCTTGTAG TCTC-3', 서열번호 132)와 쌍을 이룬 PIIA(5' - AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTACAT - 3')에 대한 역상보성 프라이머를 사용해 추가로 증폭하였다.

[0509] 이어서, 정제된 앰플리콘을 PIIA 특이적 프라이머 (5'-GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGCTCTCCG ATCTAAGCAG TGGTATCAAC GCAGAGT-3', 서열번호 134) 및 내포된 인간 Cλ 특이적 프라이머 (5'-ACACTCTTTC CCTACACGAC GCTCTCCGA TCTCAGAGGA GGGCGGAAC AGAGTG-3', 서열번호 135) 또는 내포된 마우스 Cλ1 특이적 프라이머 (5'-

ACACTCTTTC CCTACACGAC GCTCTTCCGA TCTAAGGTGG AACAGGGTG ACTGATG-3', 서열 번호 136)를 사용하여 PCR로 의해 증폭하였다. 450 내지 690bp의 PCR 산물을 분리하고 Pippin Prep (SAGE Science)에 의해 수집하였다. 이들 단편들은 다음의 프라이머를 사용하여 PCR로 추가 증폭하였다: 5'-AATGATACGG CGACCACCGA GATCTACACX XXXXACACT CTTCCCTAC ACGACGCTCT TCCGATC-3', 서열번호 137, 및 5'-CAAGCAGAAG ACGGCATACG AGATXXXXX TGACTGGAGT TCAGACGTGT GCTCTTCCGA TCT-3', 서열번호 138 ("XXXXXX"는 시퀀싱을 위한 다중화 샘플을 가능하게 하는 6bp 색 인서열 서열임). Pippin Prep에 의해 490bp 내지 710bp의 PCR 산물을 분리하고 수집한 뒤, 시퀀싱을 위해 MiSeq 서열분석기(Illumina) 상에 로딩하기 전에 KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems)를 사용해 qPCR로 정량화하였다(v3, 600 사이클).

[0510] 생물정보학적 분석을 위해, 생성된 Illumina 서열을 디멀티플렉싱하고 품질 확인을 위해 트리밍하였다. 이어서, 중첩된 쌍-말단 판독값을 조합하고, igblast(NCBI, v2.2.25+)를 국소 설치하여 주석을 달았다. 판독값을 인간 및 마우스 생식선 V λ 및 J λ 분절 데이터베이스에 대해 정렬하고 가장 좋은 결과별로 분류하였다. 동일한 점수의 다수의 최고 결과가 검출된 경우, 서열이 모호한 것으로 표시하고 분석에서 제거하였다. 결과를 분석하고 mysql 데이터베이스에 저장하기 위해 한 세트의 perl 스크립트를 개발하였다. 대표적인 결과가 도 15a(인간 C λ -프라이밍됨) 및 15b(마우스 C λ -프라이밍됨)에 제시되어 있다.

[0511] 또 다른 실험에서, (전술한) 차세대 시퀀싱 항체 레파토리 분석에 의해 6889 표적화 벡터(6889H0/VI H0/Adam6 H0, 위 참조)의 삽입에 대해 동형접합성인 마우스(n=3)로부터 수확한 비장 B 세포를 인간 Ig λ 유전자 분절 용도에 대해 분석하였다. 비장 B 세포로부터 분리된 mRNA를 마우스 mC λ (n=3) 및 인간 hC λ (n=3)에 대한 프라이머를 사용해 5'RACE로 증폭하고 MiSeq를 사용해 시퀀싱하였다. 대표적인 결과는 도 15c(인간 C λ -프라이밍됨) 및 15d(마우스 C λ -프라이밍됨)에 제시되어 있다.

[0512] 6889 표적화 벡터(즉, 2개의 표적화 벡터 및 gRNA의 공동 전기천공)를 사용하여 생성된 마우스는 모든 25개의 기능tjd 인간 V λ 유전자 분절의 발현을 입증하였다. 또한, 이들 마우스의 B 세포 유래의 인간 V λ 유전자 분절의 발현은 인간 제대혈에서 관찰된인간 V λ 유전자 분절과 비교했을 때 분리된 B 세포에서 그 빈도가 유사함을 입증하였다. 종합하자면, 본 실시예는 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 그들의 생식선 계통에 함유하는 설치류가 인간 Ig λ 서열을 함유하는 Ig λ 경쇄를 B 세포에 발현함을 입증한다. 또한, 이러한 인간 Ig λ 서열은 마우스 또는 인간 C λ 도메인을 함유하는 경쇄에서 쉽게 구별될 수 있다.

[0513] **실시예 6. 조작된 설치류에서 항체의 생산**

[0514] 본 실시예는 전술한 바와 같은 조작된 내인성 Ig λ 경쇄 유전자좌를 포함하는 설치류에서 관심 항원(예: 단일 통과 또는 다중 통과 막 단백질 등)을 사용하여 항체를 생산하는 것을 보여준다 본 실시예에 기술된 방법 또는 당업계에 잘 알려진 면역화 방법은, 원하는대로, 폴리펩티드 또는 이의 단편(예컨대, 원하는 에피토프로부터 유도된 펩티드), 또는 폴리펩티드 또는 이의 단편의 조합을 사용하여 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌를 함유하는 설치류를 면역화하는 데 사용될 수 있다.

[0515] 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌 및 (전술한) 인간화 IgH 유전자좌, 또는 본원에 기술된 바와 같은 조작된 Ig λ 경쇄 유전자좌 및 (전술한) 인간화 IgH 및 Ig κ 경쇄 유전자좌를 갖는 마우스 코호트에 당업계에 알려진 면역화 방법을 사용해 관심 항원을 접종한다. 항체 면역 반응을 ELISA 면역분석법(즉, 혈청 역가)으로 모니터링하였다. 원하는 면역 반응이 달성되면, 비장세포(및/또는 림프 조직)를 채취하고, 마우스 골수종 세포와 융합시켜 생존력을 보존하고 불멸 하이브리도마 세포주를 형성한다. 상기 하이브리도마 세포주를 스크리닝(예컨대, ELISA 분석으로) 및 선택하여 항원-특이적 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 확인하였다. 하이브리도마를 원하는 상대적인 결합 친화도 및 이소형에 대해 추가로 특성분석할 수 있다. 이러한 기술 및 전술한 면역원을 사용하여, 여러 개의 항원 특이적 키메라 항체(즉, 인간 가변 도메인 및 설치류 불변 도메인을 갖는 항체)를 수득한다.

[0516] 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 DNA를 분리하여 완전한 인간 항체의 제조를 위해 중쇄 및 경쇄의 원하는 아이소타입(불변 도메인)에 연결할 수 있다. 이러한 항체 단백질은 세포, 예컨대 CHO 세포에서 생산될 수 있다. 완전한 인간 항체는 이어서 관심 항원의 상대적인 결합 친화도 및/또는 중화 활성에 대해 특성분석된다.

[0517] 항원-특이적 키메라 항체 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인을 암호화하는 DNA가 항원-특이적 림프구로부터 직접 분리될 수 있다. 초기에, 인간 가변 도메인 및 설치류 불변 도메인을 갖는 고친화성 키메라 항체를 분리하고 특성을 분석하여 친화성, 선택도, 에피토프 등을 포함하는 원하는 특성별로 선택한다. 설치류 불변 도메인을 원하는 인간 불변 도메인으로 대체하여 완전한 인간 항체가 생성한다. 선택된 불변 영역은 특이적 용도에 따라 매우

다양할 수 있지만, 고친화성 항원 결합성 및 표적 특이성 특성은 가변 도메인에 존재한다. 예컨대, 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 제7,582,298호에 기술된 바와 같이, 항원 특이적 항체도 (면역화된 마우스 유래의) 항원 양성 B 세포로부터 골수종 세포의 융합 없이 직접 단리된다. 이러한 방법을 사용하여, 몇몇 완전한 인간 항원-특이적 항체 (즉, 인간 가변 도메인 및 인간 불변 도메인)가 제조된다.

[0518] 하나의 실험에서, 6597het(n=6) 및 6680het(n=6) 마우스를 발판 투여를 통해 수용체 폴리펩티드의 세포외 도메인(ECD)으로 면역화하여, 조작된 마우스에서의 면역 반응을 결정하였다.

[0519] 간략하게, 10mg의 CpG 애주번트(Invivogen ODN1826)가 추가된 2.35mg의 항원(수용체 폴리펩티드 ECD)으로 마우스를 프라이밍하였다. 2.35mg의 항원(수용체 폴리펩티드 ECD), 10mg의 CpG 애주번트 및 25mg의 Adju-Phos (Brenntag)로 마우스를 7회 추가 접종하였다. 최종 주입 2일 후에, 선택된 조작된 마우스 계통 및 대조군으로부터 혈액을 채취하였다. 혈청으로부터 Mictrotainer 모세관 혈액 수집기 튜브(BD cat#365967)를 사용하여 4 °C에서 5분 동안 9000 rfc로 원심분리하여 혈청으로부터 혈청을 분리하였다. 혈청 ELISA 검정을 수행하여 총 IgG(도 16a), 항원 특이적 IgG(도 16b), mIgκ(도 17c), mIgλ(도 17b) 및 hIgλ(도 17a) 역가를 결정하였다.

[0520] 총 Igg ELISA 검정을 위해, Maxisorp 플레이트(Nunc)를 웰당 DPBS(Ca 및 Mg 포함) 중에 1μg/mL의 염소 항마우스 IgG+IgM+IgA H&L(Abcam)로 코팅하고, 4 °C에서 밤새 인큐베이팅하였다. 다음 날, 플레이트를 PBS-T(Ca 또는 Mg이 없고 0.1% Tween-20이 있는 PBS)에서 4회 세척하고, PBS-T 중에서 1% BSA로 1시간 동안 실온에서 블로킹하였다. PBS-T 중에서 0.1% BSA로 혈청을 10배 희석하고(1:100에서 시작해 1:10⁹에서 마침), PBS-T 중에서 0.1% BSA로 마우스 표준 IgG(Sigma)를 3배 희석하였다(1μg/mL에서 시작해 0.05ng/mL에서 마침). 100 μl의 각 표준 및 샘플 희석물을 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅한 다음, PBS-T 중에서 4회 세척하였다. 1:2500으로 희석한 100 μl의 염소 항마우스 Igg 인간 ads-HRP(Southern Biotech)를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 한 시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBS-T 중에서 4회 세척하고, 100 μl의 TMB 기질 시약(BD Biosciences)을 각 웰에 10분 동안 첨가하였다. 웰당 100 μl의 1N 황산으로 반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. GraphPad Prism에서 데이터를 분석하였고, 데이터는 4-파라미터 곡선과 일치하였다.

[0521] 항원특이적 ELISA를 위해, Maxisorp 플레이트(Nunc)를 웰당 DPBS(Ca 및 Mg 함유) 중 1μg/mL의 항원으로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이팅하였다. 다음 날, 플레이트를 PBS-T 중에서 4회 세척하고, PBS-T 중에서 1:2로 희석된 Sea Block(ThermoFisher)에서 1시간 동안 실온에서 블로킹하였다. PBS-T 중에서 1:5로 희석된 Sea Block에서 혈청을 희석하였다(상기와 같음). 각 샘플 희석물을 각 플레이트에 첨가하여 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS-T 중에서 4회 세척하였다. 1:2500으로 희석된 염소 항마우스 IgG 인간 ads-HRP (Southern Biotech), 1:4000으로 희석된 염소 항-mIgκ-HRP (Southern Biotech), 1:4000으로 희석된 염소 항mIgλ-HRP (Southern Biotech), 또는 1:4000으로 희석된 염소 항-hIgλ 마우스 ads-HRP (Southern Biotech) 중 어느 하나의 100 μl을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBS-T 중에서 4회 세척하고, 전술한 바와 같이 전개하였다. 대표적인 결과는 도 16 및 17에 제시되어 있다.

[0522] 종합하면, 본 실시예는 본원에 기술된 바와 같은 Igλ 경쇄 유전자좌를 함유하도록 조작된 설치류가 관심 항원을 사용한 면역화에 대해 강력한 항체 반응을 생성함을 구체적으로 입증한다. 또한, 이러한 조작된 설치류가 야생형 대조군과 유사한 총 IgG 레벨 및 항원 특이적 IgG 레벨을 보여주는데, 이는 이들 조작된 동물이 강력한 면역 반응을 생성할 수 있음을 확인해 주는 것이다. 실제로, 면역화 시의 hIgλ 역가는 mIgλ 역가보다 더 강력했다(도 17a 및 17b). 따라서, 본원에 기술된 바와 같은 조작된 설치류는 인간 항체 기반 치료제, 특히 인간 Igλ 경쇄 서열을 사용하는 인간 항체 기반 치료제의 개발을 위해 항체를 생성할 수 있는 개선된 생체 내 시스템을 제공한다.

[0523] **균등물**

[0524] 당업자는 본 발명의 다양한 변경, 변형 및 개선이 당업자에게 쉽게 일어날 것임을 이해할 것이다. 이러한 변경, 변형 및 개선은 본 개시의 일부가 되도록 의도되고, 본 발명의 사상 및 범주 내에 있도록 의도된다. 따라서, 전술된 설명 및 도면은 단지 예시이며, 본 개시에 기술된 임의의 발명은 이어지는 청구범위에 의해 더 상세히 기술된다.

[0525] 청구범위 요소를 변형하기 위한 청구범위 내 "제1", "제2", "제3" 등과 같은 서수 용어의 사용은 그 자체가 하나의 청구범위 요소가 다른 것을 앞서는 어떠한 우선순위, 선행, 또는 순서 또는 방법의 작용이 수행되는 일시적인 순서를 나타내지 않으며, 단지 청구범위 요소들을 구분하기 위해 일정한 이름을 갖는 하나의 청구범위 요

소를 (서수 용어의 사용이 없었다면) 동일한 이름을 가진 다른 요소로부터 구분하기 위한 표지로서 사용된다.

[0526]

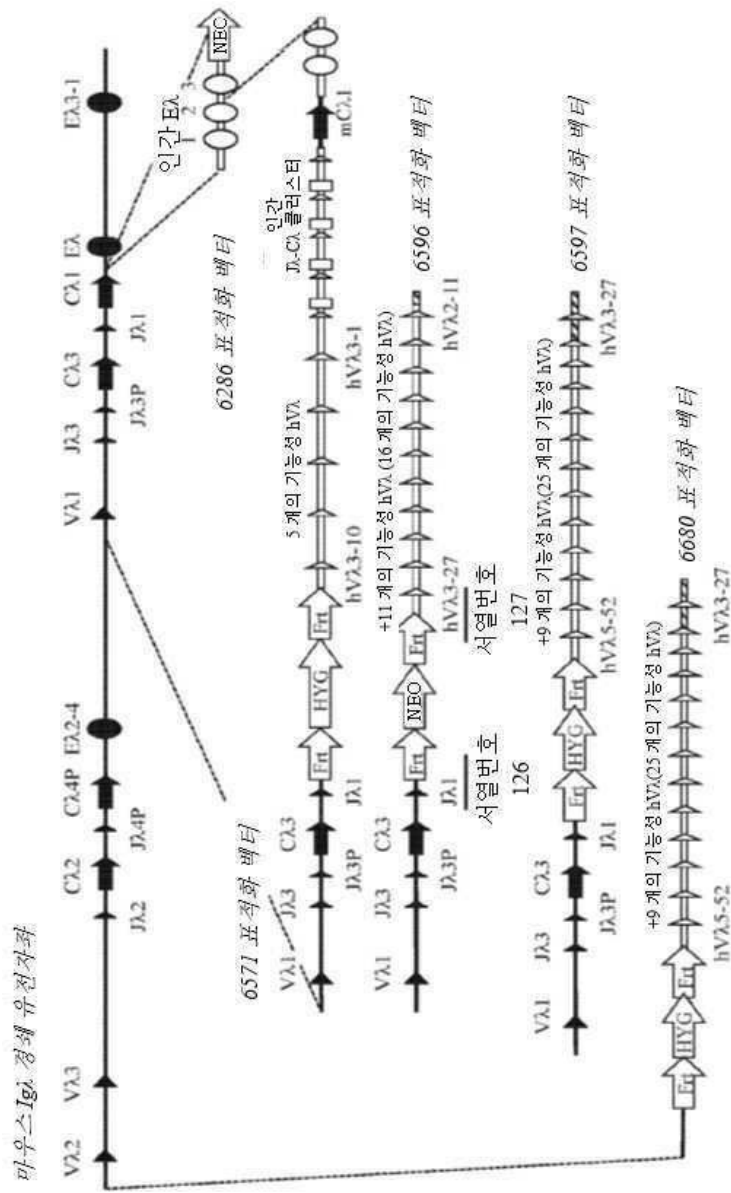
본 명세서 및 청구범위 내에서 관사 "a" 및 "an"은 명확하게 달리 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 하나의 군의 하나 이상의 구성원 사이에서 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 상세한 설명은 반대로 지시되거나 그렇지 않으면 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나, 하나 초과 또는 전체의 군 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련되는 것을 만족하는 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련된 구현예를 포함한다. 본 발명은 또한 하나 초과, 또는 전체 군의 구성원이 주어진 산물 또는 과정에 존재하거나 채용되거나 그렇지 않으면 관련된 구현예를 포함한다. 나아가, 본 발명은 그렇지 않은 것으로 지시되거나 반대 또는 불일치가 일어날 수 있다는 것이 당업자에게 명백하지 않는 한 하나 이상의 열거된 청구범위로부터 하나 이상의 제한, 요소, 항목, 서술 용어 등이 동일한 기반의 청구범위에 의존하는 다른 청구범위에 도입된 모든 변형, 조합, 치환을 포함하는 것으로 이해된다. 요소가 (예를 들어, 마커시 군 또는 유사한 형식 내) 목록으로서 제시된 경우, 이러한 요소의 각각의 하위군도 또한 개시되고, 임의의 요소(들)가 이러한 군으로부터 제거될 수 있는 것으로 이해된다. 일반적으로, 본 발명, 또는 본 발명의 측면이 특정 요소, 특징 등을 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 본 발명의 특정 구현예 또는 본 발명의 측면은 이러한 요소, 특징으로 이루어지거나 필수적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 간결성을 위해, 이러한 구현예들은 본원에서 글자 그대로 모든 경우에서 구체적으로 기재되지 않는다. 또한 본 발명의 임의의 구현예 또는 측면은 특정한 배제가 본 명세서 내에 언급되었는지에 관계없이 청구범위로부터 명백하게 제외될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0527]

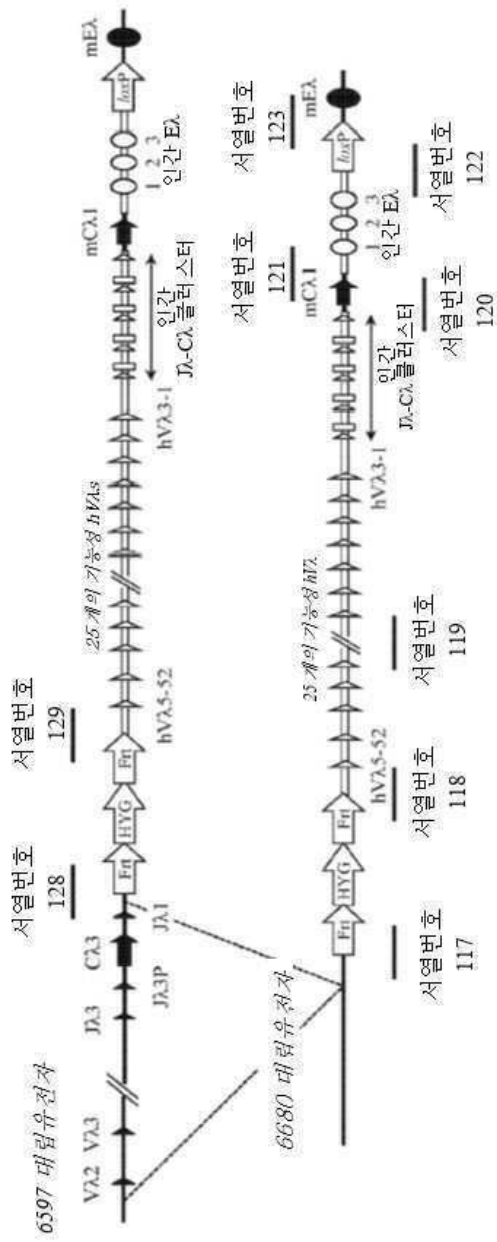
당업자는 본원에 기술된 검정 또는 다른 과정들에서 얻어진 값에서 기인할 수 있는 통상적인 오차 또는 표준 편차를 이해할 것이다. 본 발명의 배경기술을 설명하고, 본 발명의 실시와 관련된 추가 상세한 설명을 제공하기 위해 본원에서 참조된 간행물, 웹사이트 및 다른 참조 자료는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

도면

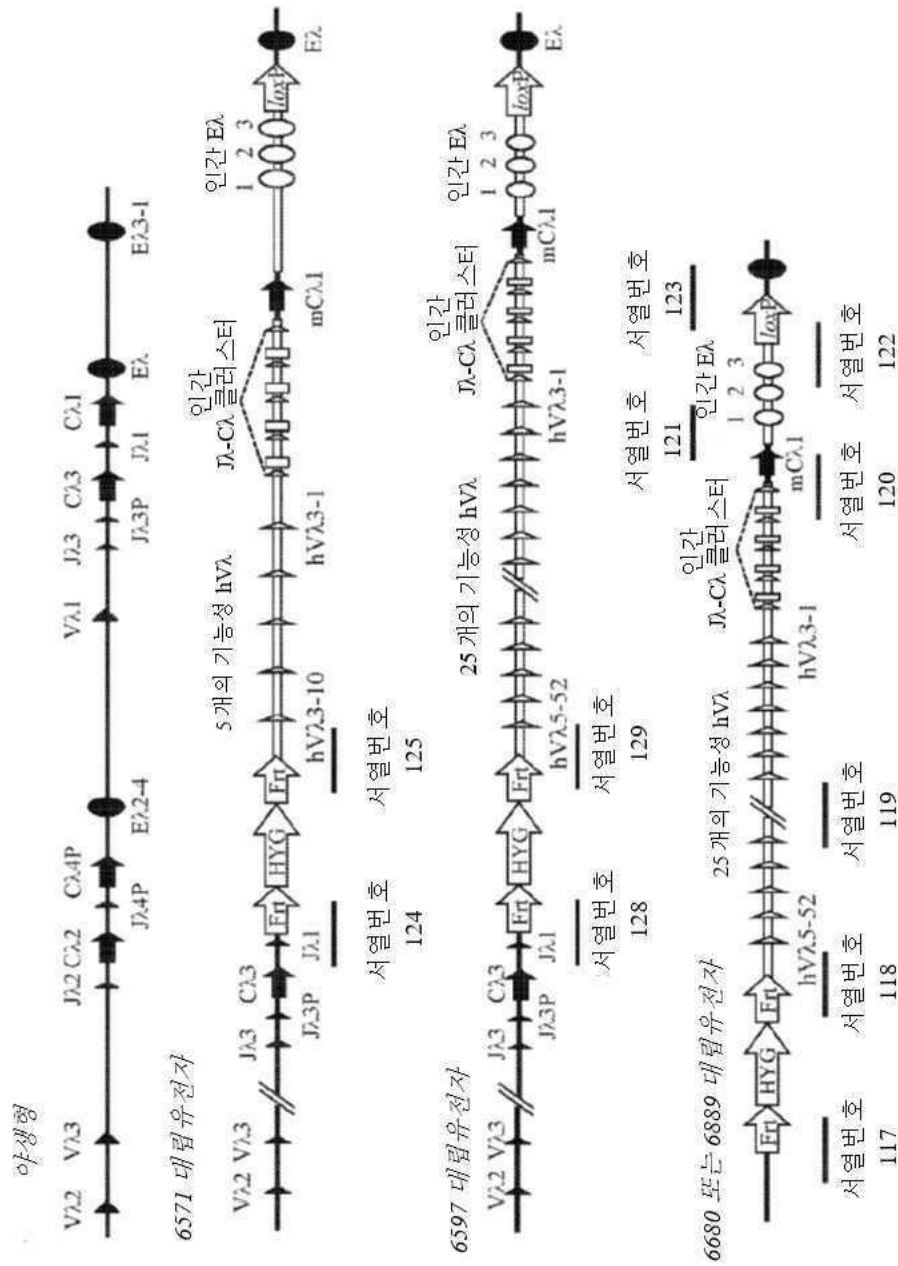
도면1



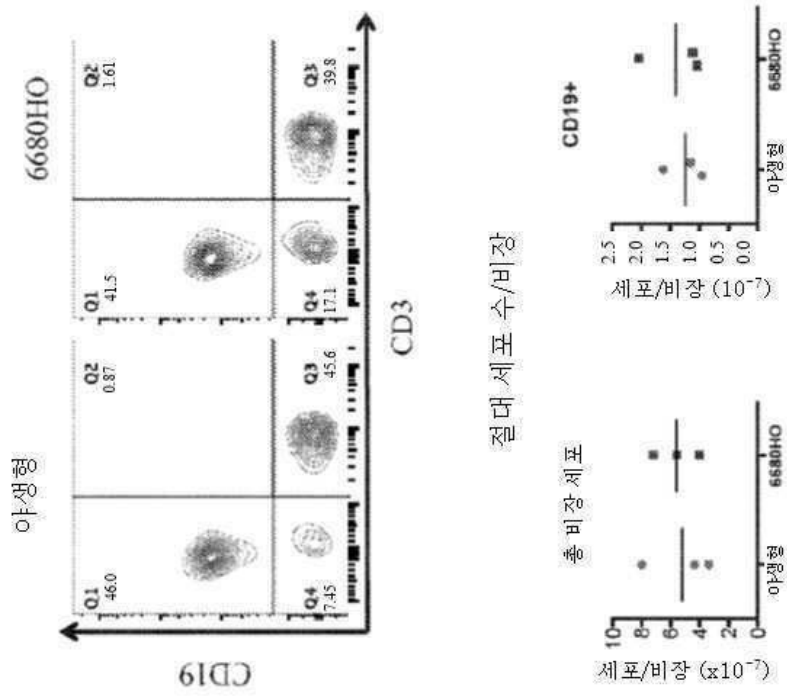
도면2



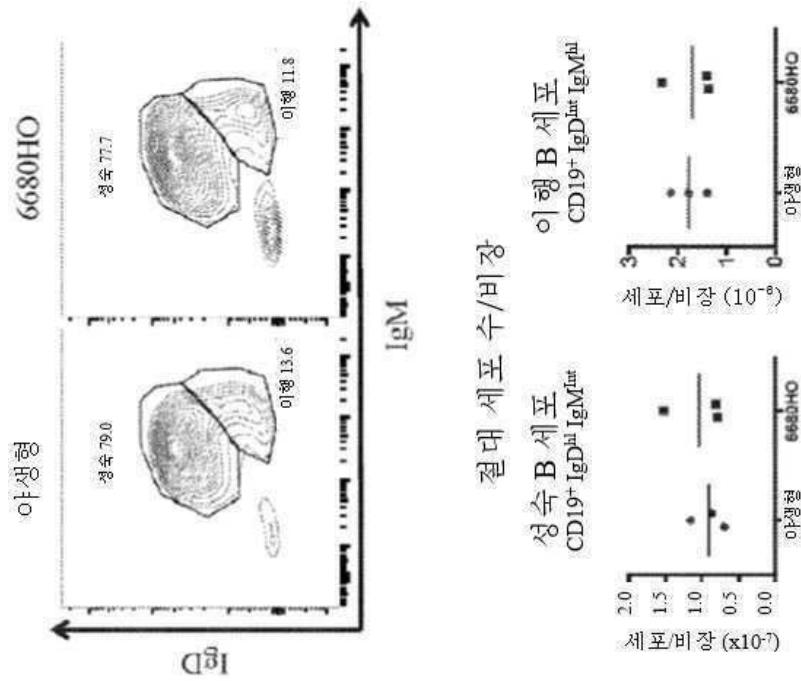
도면4



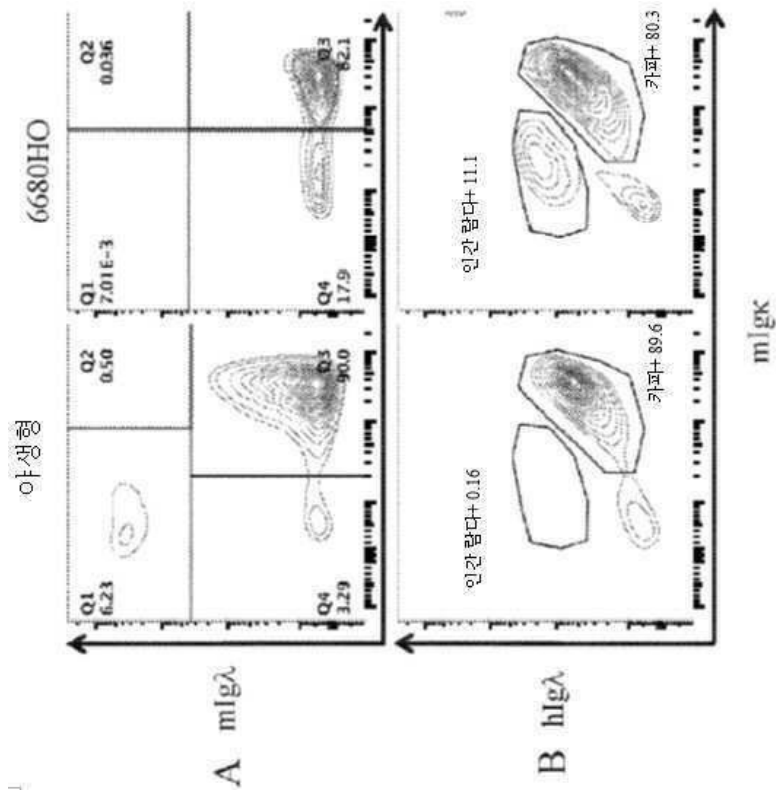
도면5



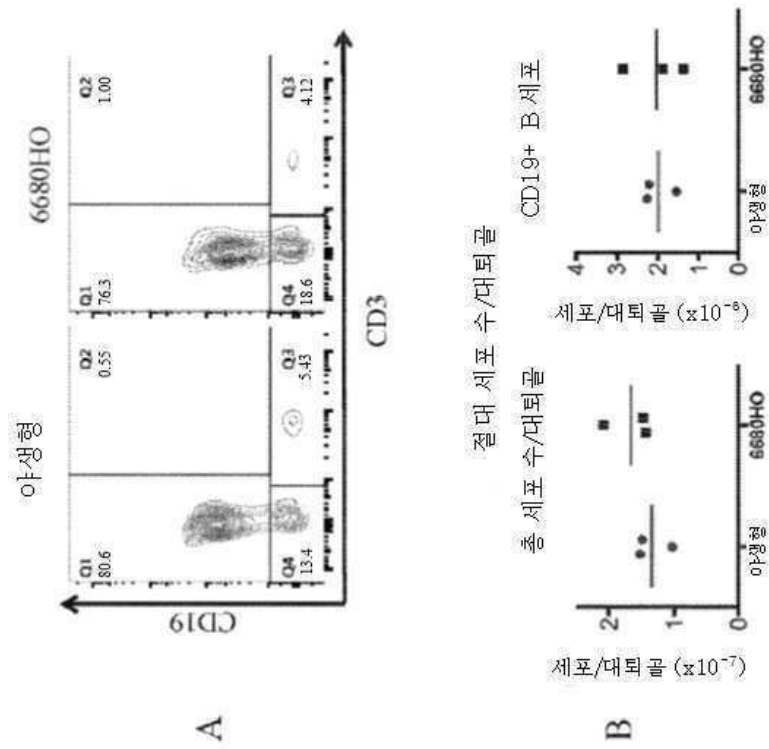
도면6



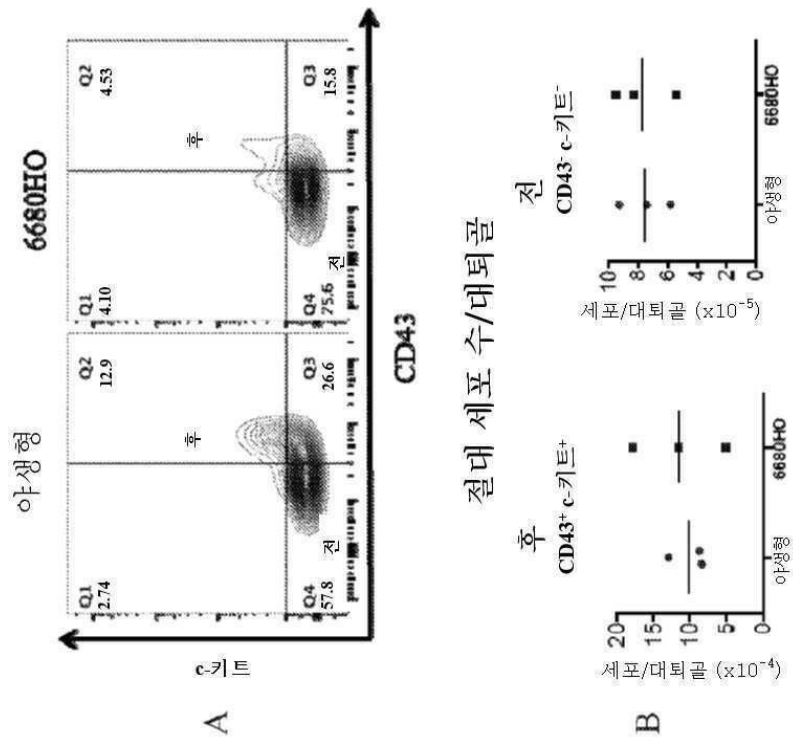
도면7



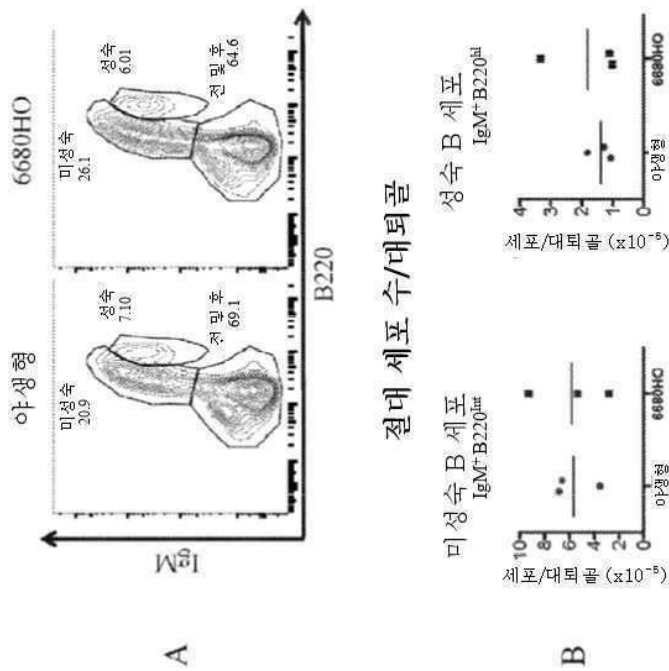
도면8



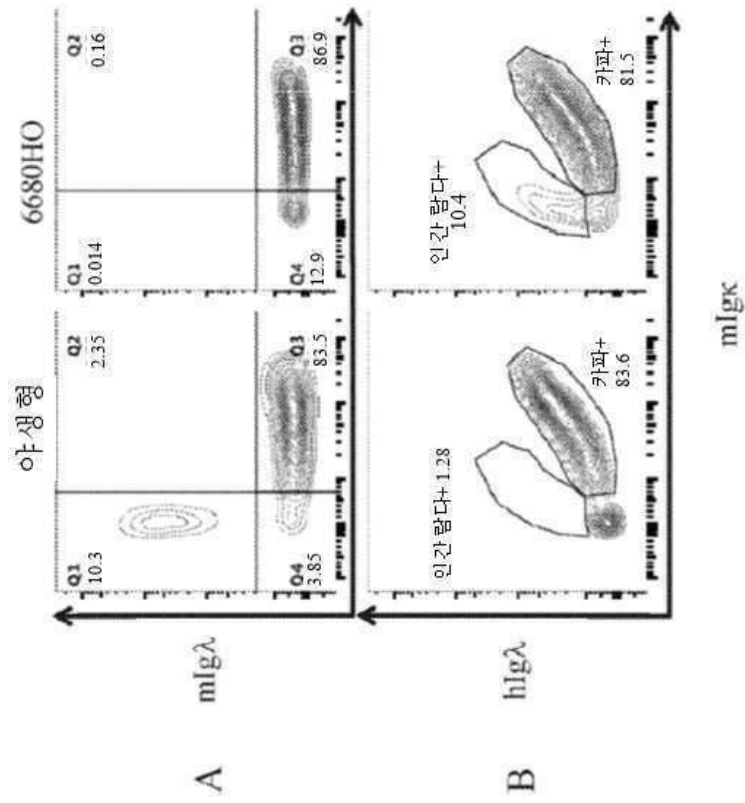
도면9



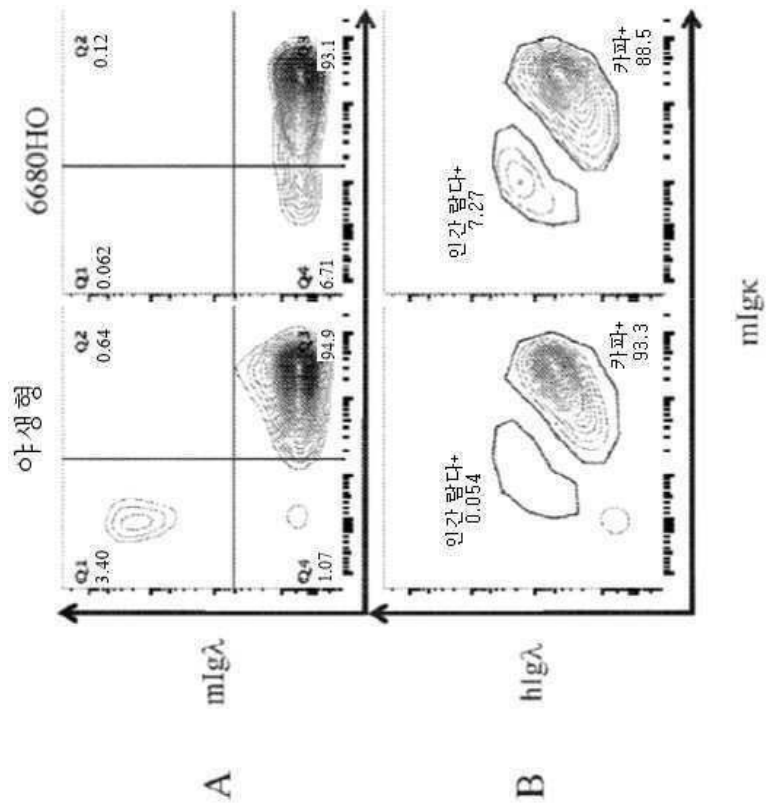
도면10



도면11



도면12



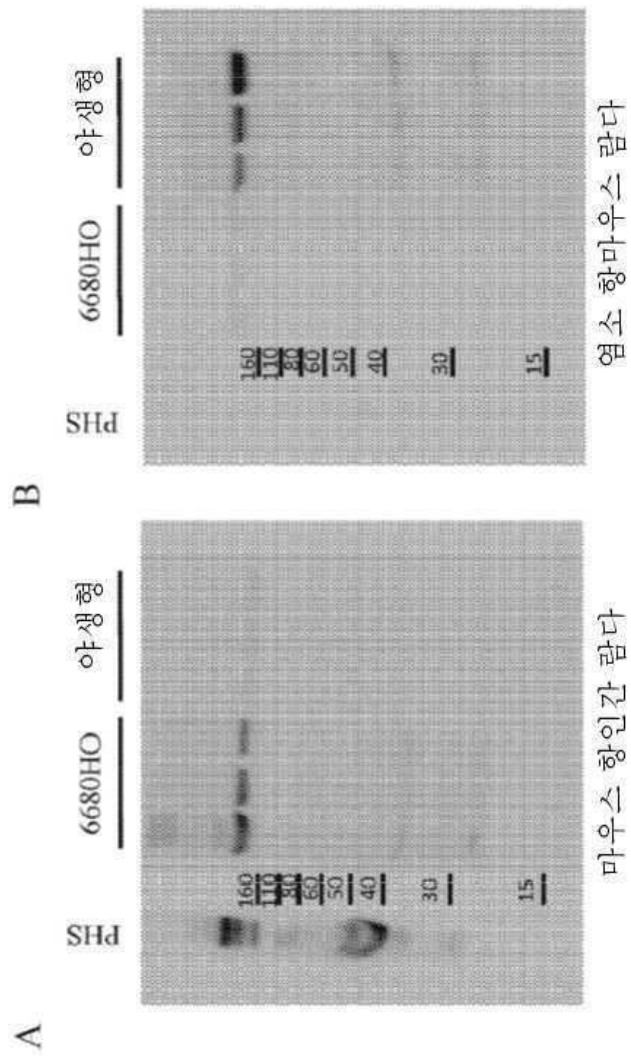
도면13

비장	6571HET	6571HO	6597HET	6680HET	6680HO	6680HO VI HO Adam6	6889HET	6889HO VI HO Adam6
% K C	92 ± 0.4	81 ± 1.1	84 ± 0.4	87 ± 0.5	82 ± 2.2	67 ± 7.6	87 ± 0.7	59 ± 2.1
% 인간 λ C	2.2 ± 0	7.1 ± 0.1	12.4 ± 0.5	9.9 ± 0.5	10 ± 1.1	28 ± 8.2	6.6 ± 0.3	37 ± 2.2

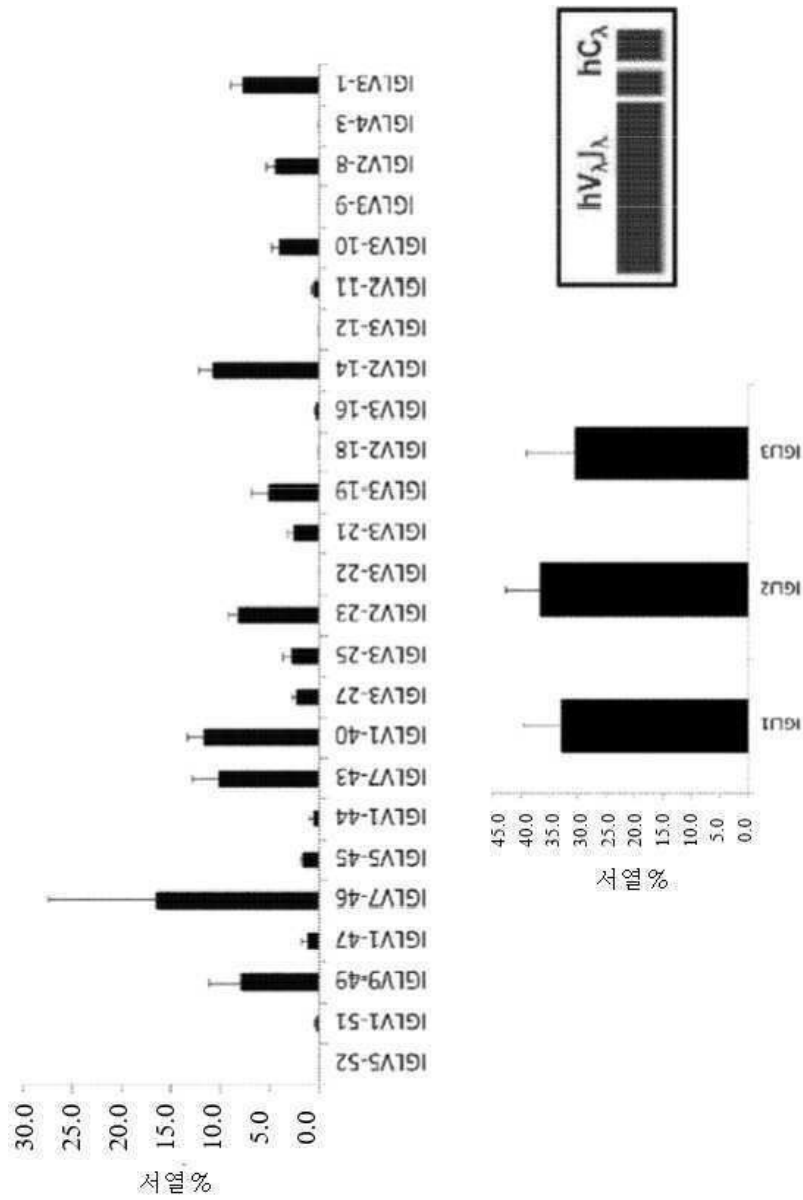
미정숙 BM	6571HET	6571HO	6597HET	6680HET	6680HO	6680HO VI HO Adam6 HO	6889HET	6889HO VI HO Adam6 HO
% K C	88 ± 0.2	84 ± 1.6	86 ± 0.4	83 ± 1.3	77 ± 2.4	54 ± 13	80 ± 0.7	52 ± 3.2
% 인간 λ C	3.3 ± 0.0	3.2 ± 0.3	7.2 ± 0.3	9.7 ± 1.2	12 ± 1.0	33 ± 8.6	7.3 ± 0.6	43 ± 2.8

정숙 BM	6571HET	6571HO	6597HET	6680HET	6680HO	6680HO VI HO Adam6 HO	6889HET	6889HO VI HO Adam6 HO
% K C	90 ± 0.8	92 ± 0.7	89 ± 0.5	92 ± 1.3	88 ± 1.2	76 ± 6.3	89 ± 0.5	66 ± 1.7
% 인간 λ C	2.7 ± 0.0	5.6 ± 0.7	8.9 ± 0.5	7.6 ± 0.9	6.8 ± 0.8	16 ± 5.4	5.2 ± 0.4	31 ± 1.6

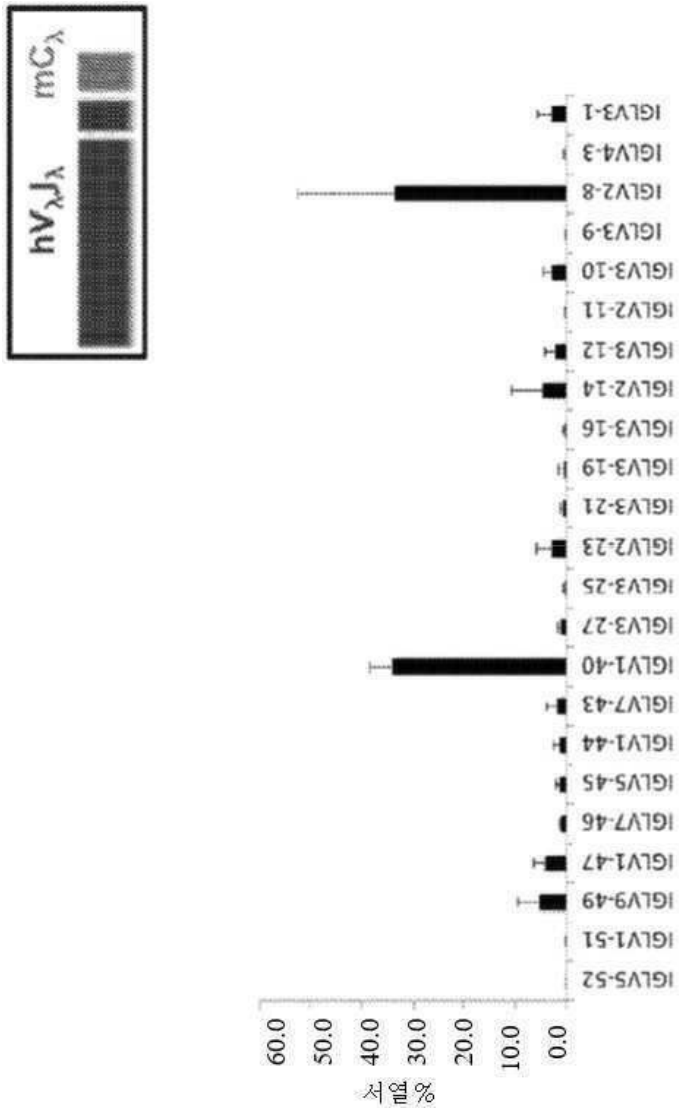
도면14



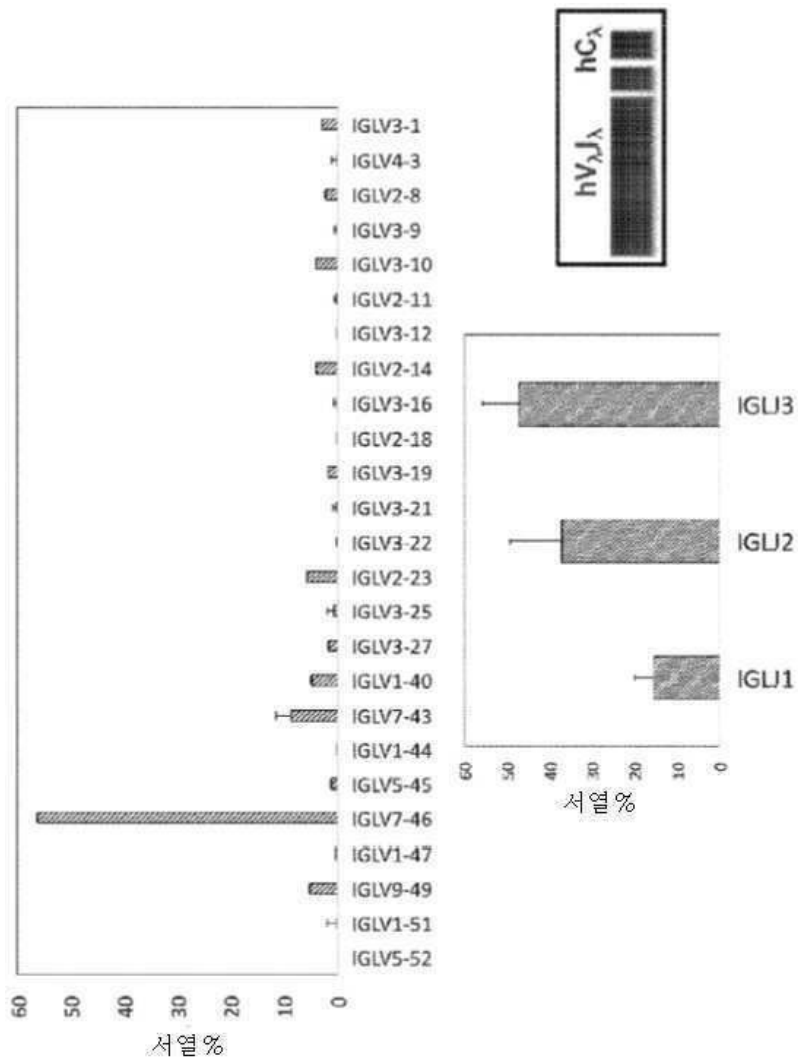
도면15a



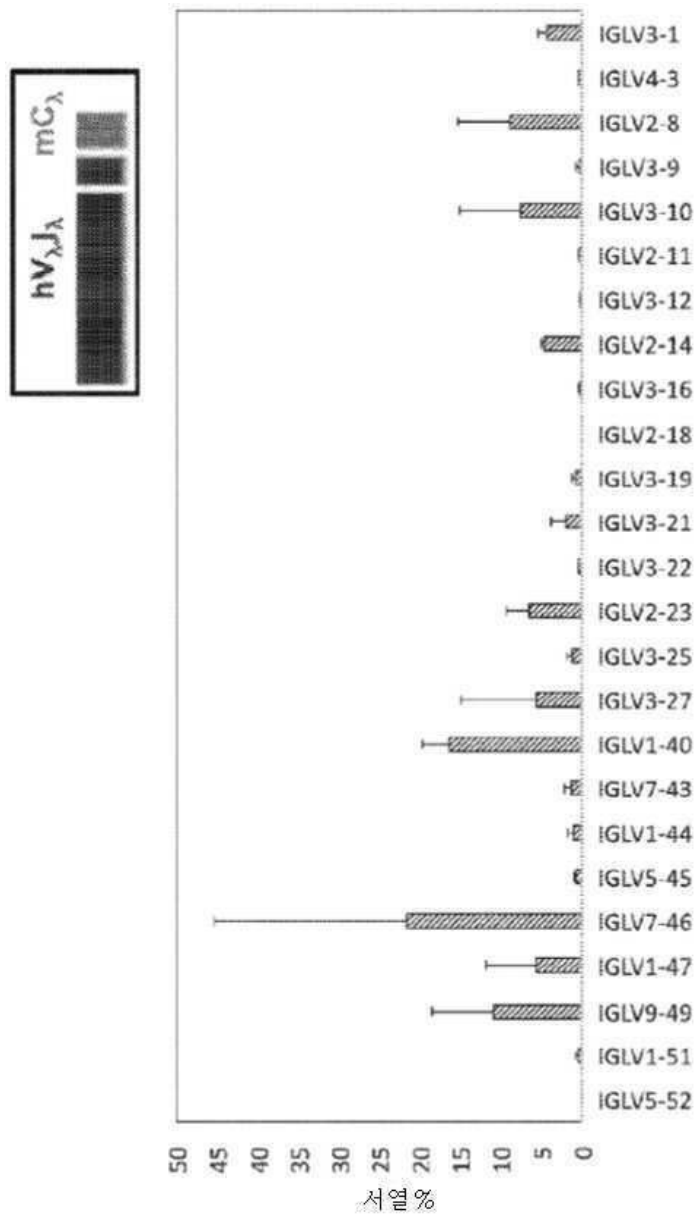
도면15b



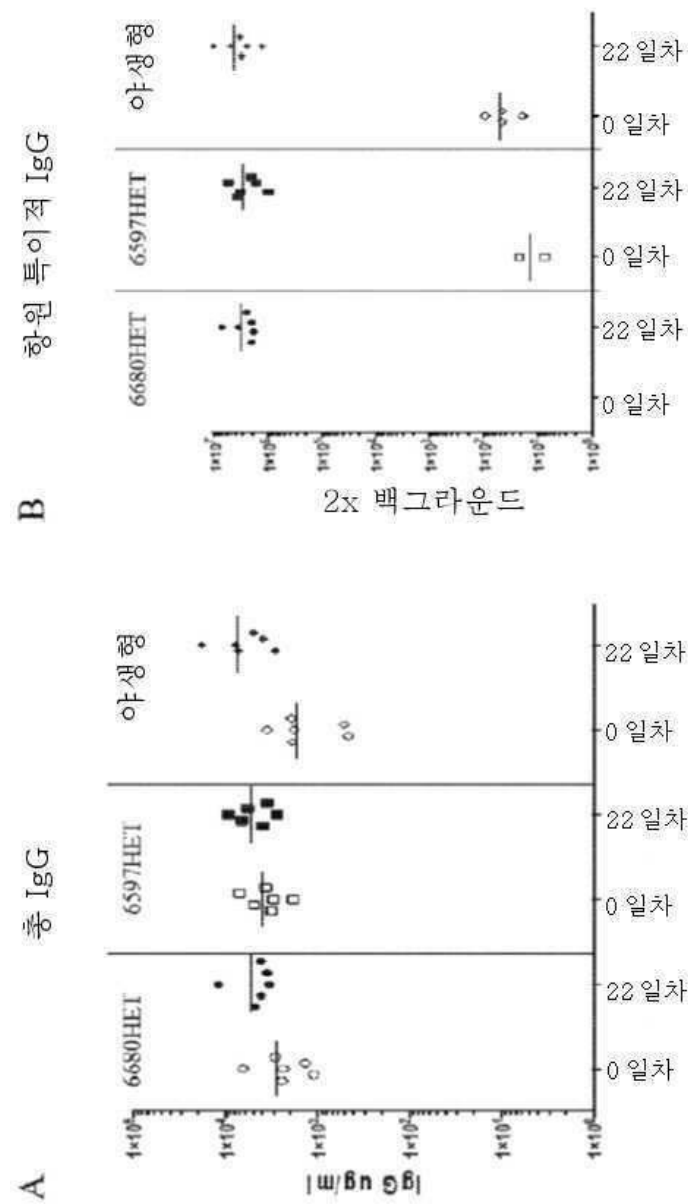
도면15c



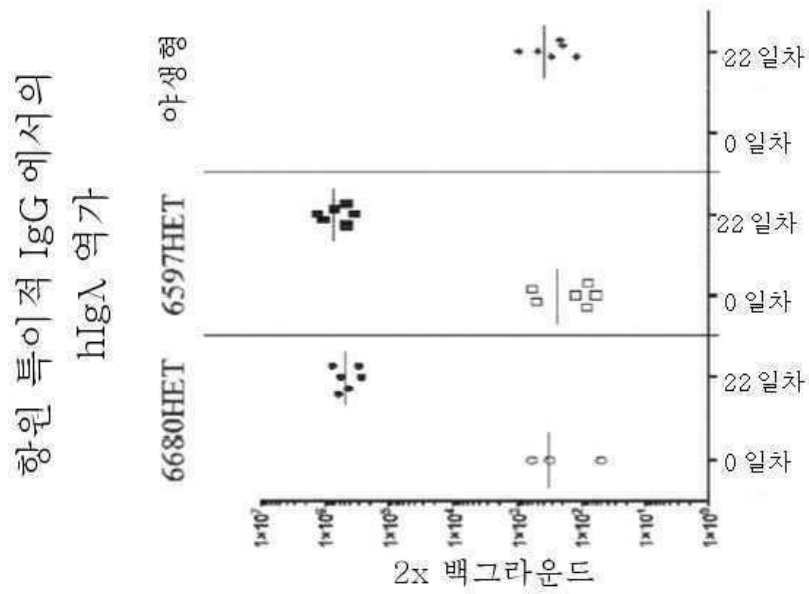
도면15d



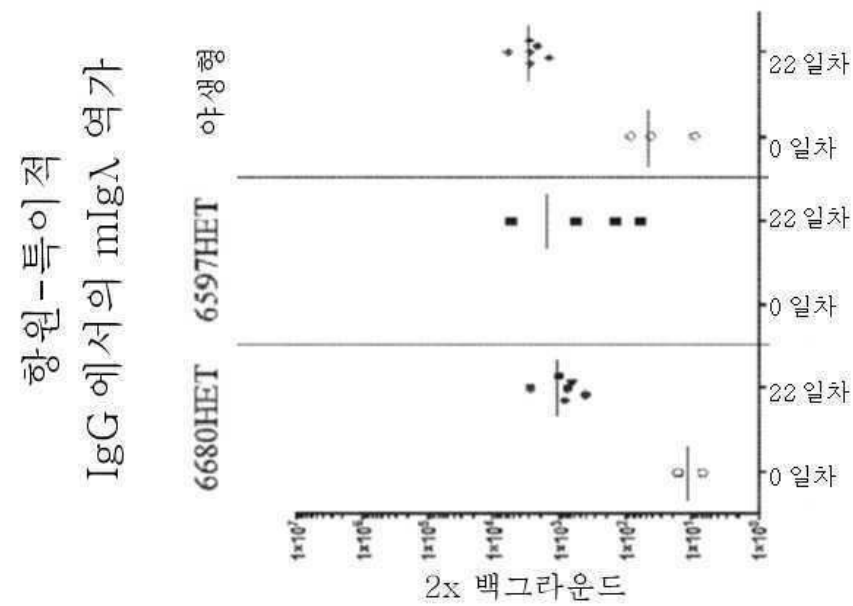
도면16



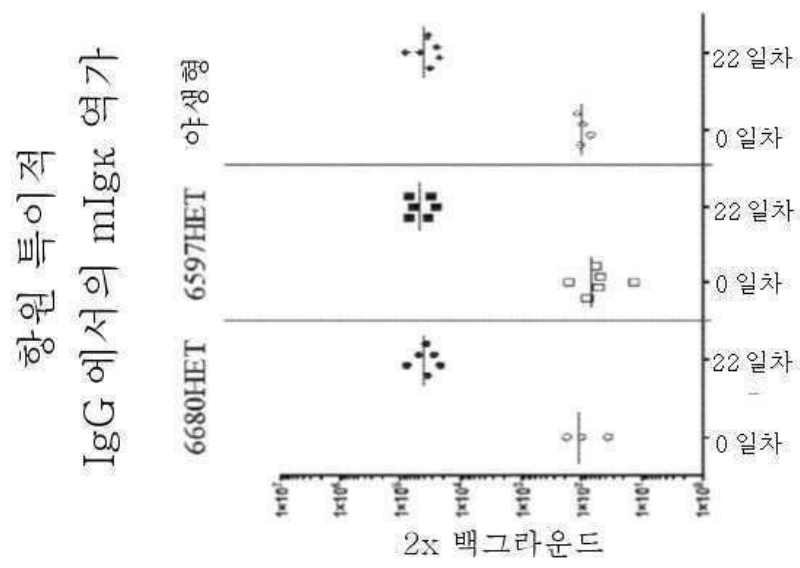
도면17a



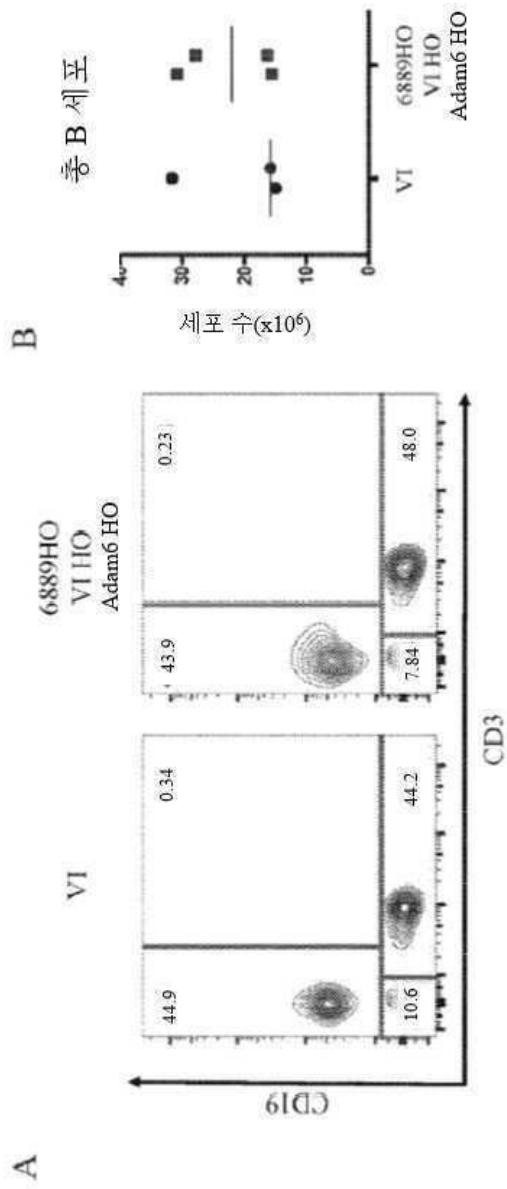
도면17b



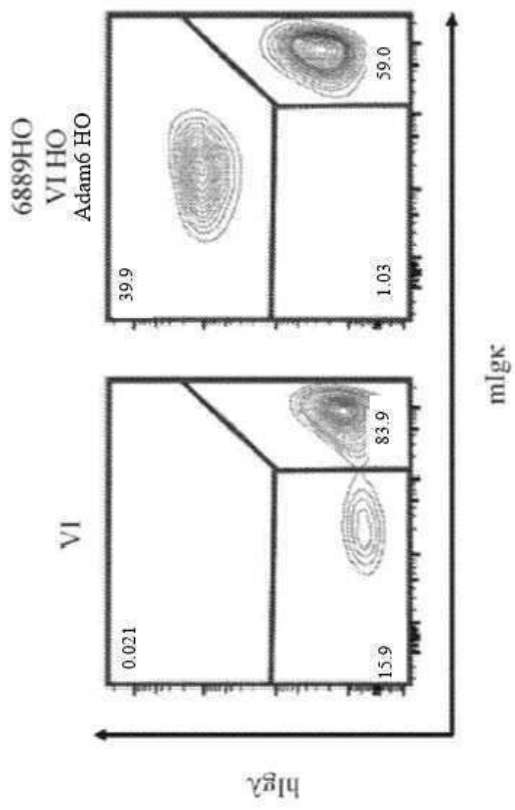
도면17c



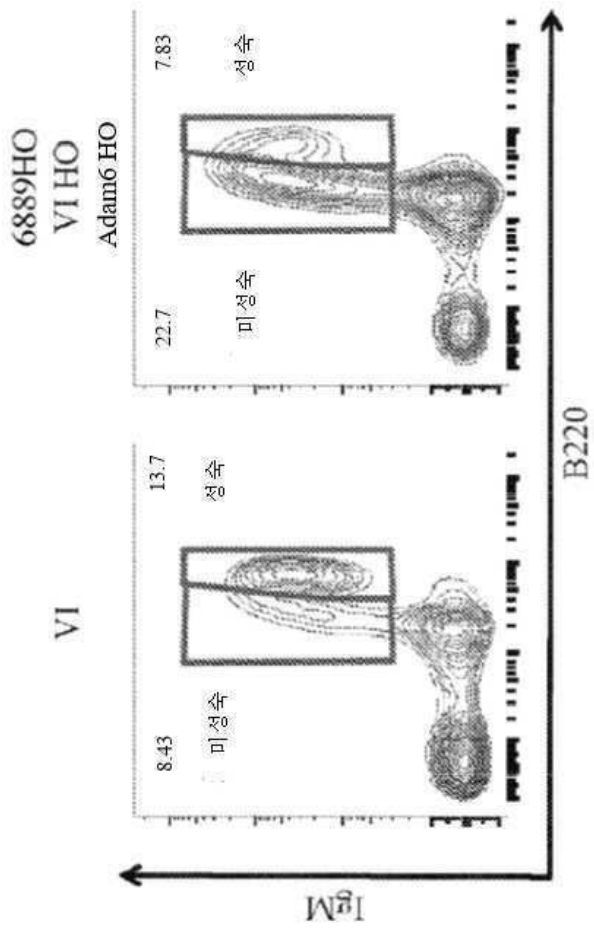
도면18



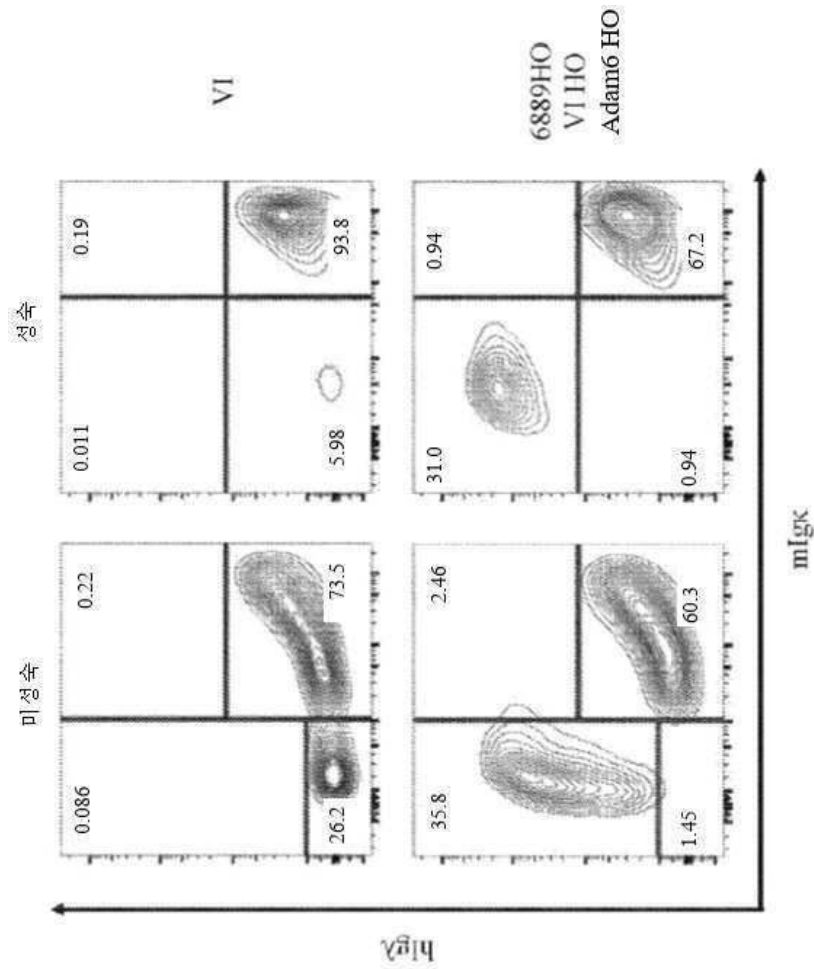
도면19



도면20



도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> NON-HUMAN ANIMALS HAVING AN ENGINEERED IMMUNOGLOBULIN LAMBDA
LIGHT CHAIN LOCUS

<130> RPB-01825

<140> PCT/US2017/060006

<141> 2017-11-03

<150> 62/567,932

<151> 2017-10-04

<150> 62/417,845

<151> 2016-11-04

<160> 141

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 317

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

gccagcccaa gtcttcgcca tcagtcaccc tgtttccacc ttctctgaa gagctcgaga 60
ctaacaaggc cacactgggtg tgtacgatca ctgatttcta cccaggtgtg gtgacagtgg 120

actggaaggt agatggtacc cctgtcactc agggatatgga gacaaccag ccttccaaac 180
agagcaacaa caagtacatg gctagcagct acctgaccct gacagcaaga gcatgggaaa 240
ggcatagcag ttacagctgc caggtcactc atgaaggtca cactgtggag aagagtttgt 300
cccgtgctga ctgttcc 317

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp

20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro
35 40 45
Val Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu
65 70 75 80
Arg His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val

85 90 95
Glu Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
100 105

<210> 3

<211> 314

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

gtcagcccaa gtccactccc actctcaccg tgtttccacc ttctctgag gagtcaagg	60
aaaacaaagc cacactgggtg tgtctgattt ccaacttttc cccgagtggg gtgacagtgg	120
cctggaaggc aaatggtaca cctatcacc aggggtgtgga cacttcaaata cccaccaaag	180
agggaacaaa gticattggcc agcagcttcc tacatttgac atcggaccag tggagatctc	240
acaacagttt tacctgtcaa gttacacatg aaggggacac tgtggagaag agtctgtctc	300
ctgcagaatg tctc	314

<210> 4

<211> 105

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

<210> 5

<211> 314

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

gtcagcccaa gtccactccc acactcacca tgtttccacc ttcccctgag gagctccagg	60
aaaacaaagc cacactcgtg tgtctgattt ccaatttttc cccaagtggg gtgacagtgg	120
cctggaaggc aaatggtaca cctatcaccc aggggtgtgga cacttcaaat cccaccaaag	180
aggacaacaa gtacatggcc agcagcttct tacatttgac atcggaccag tggagatctc	240
acaacagttt tacctgccaa gttacacatg aaggggacac tgtggagaag agtctgtctc	300
ctgcagaatg tctc	314

<210> 6

<211> 105

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

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

<210> 7

<211> 314

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

gtcagcccaa gtccactccc acactcacag tattttccacc ttcaactgag gagctccagg	60
--	----

gaaacaaagc cacactgggtg tgtctgattt ctgatttcta cccgagtgat gtggaagtgg 120
cctggaaggc aaatggtgca cctatctccc aggggtgtgga cactgcaaat cccaccaaac 180
agggaacaa ataatcgcc agcagcttct tacgtttgac agcagaacag tggagatctc 240
gcaacagttt tacctgcca gttacacatg aagggaacac tgtggagaag agtctgtctc 300
ctgcagaatg tgc 314

<210> 8

<211> 105

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Gly Gln Pro Lys Ser Thr Pro Thr Leu Thr Val Phe Pro Pro Ser Thr

1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Gly Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Ser Asp Val Glu Val Ala Trp Lys Ala Asn Gly Ala Pro
35 40 45
Ile Ser Gln Gly Val Asp Thr Ala Asn Pro Thr Lys Gln Gly Asn Lys
50 55 60
Tyr Ile Ala Ser Ser Phe Leu Arg Leu Thr Ala Glu Gln Trp Arg Ser

65 70 75 80
Arg Asn Ser Phe Thr Cys Gln Val Thr His Glu Gly Asn Thr Val Glu
85 90 95
Lys Ser Leu Ser Pro Ala Glu Cys Val
100 105

<210> 9

<211> 314

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

accaacccaa ggctacgccc tcagtcaccc tgttcccacc ttctctgaa gagtcaaga 60
ctgacaaggc tacactgggtg tgtatgggtga cagatttcta ccctgggtgtt atgacagtgg 120
tctggaaggc agatgggtacc cctatcactc aggggtgtgga gactaccag cctttcaaac 180

agaacaacaa gtacatggct accagctacc tgcttttgac agcaaaagca tgggagactc 240
atagcaatta cagctgccag gtcactcacg aagagaacac tgtggagaag agtttgtccc 300
gtgctgagtg ttcc 314

<210> 10

<211> 105

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 10

Asp Gln Pro Lys Ala Thr Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

1 5 10 15

Glu Glu Leu Lys Thr Asp Lys Ala Thr Leu Val Cys Met Val Thr Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Val Met Thr Val Val Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro

35 40 45

Ile Thr Gln Gly Val Glu Thr Thr Gln Pro Phe Lys Gln Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Met Ala Thr Ser Tyr Leu Leu Leu Thr Ala Lys Ala Trp Glu Thr

65 70 75 80

His Ser Asn Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Glu Asn Thr Val Glu

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Glu Cys Ser

100 105

<210> 11

<211> 314

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 11

gtcagcccaa gtccactccc acactcacag tatttccacc ttcaactgag gagctccagg 60

gaaacaaagc cacactgggtg tgtctgattt ctgatttcta cccgagtgat gtggaagtgg 120

cctggaaggc aaatggtgca cctatctccc aggggtgtgga cactgcaaatt cccaccaaac 180

agggaacaa atacatcgcc agcagcttct tacgtttgac agcagaacag tggagatctc 240

gcaacagttt tacctgccaa gttacacatg aagggaacac tgtggaaaag agtctgtctc 300

ctgcagagtg tgtc 314

<210> 12

<211> 105

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 12

Gly Gln Pro Lys Ser Thr Pro Thr Leu Thr Val Phe Pro Pro Ser Thr

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Gly Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Ser Asp Val Glu Val Ala Trp Lys Ala Asn Gly Ala Pro

35 40 45

Ile Ser Gln Gly Val Asp Thr Ala Asn Pro Thr Lys Gln Gly Asn Lys

50 55 60

Tyr Ile Ala Ser Ser Phe Leu Arg Leu Thr Ala Glu Gln Trp Arg Ser

65 70 75 80

Arg Asn Ser Phe Thr Cys Gln Val Thr His Glu Gly Asn Thr Val Glu

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Pro Ala Glu Cys Val

100 105

<210> 13

<211> 314

<212> DNA

<213>

> Rattus norvegicus

<400> 13

accaacccaa ggctacgccc tcagtcaccc tgttcccacc ttctcttgaa gagtcaaga 60

ctgacaaggc tacactgggtg tgtatgggtga cagatttcta ccctgggtgtt atgacagtgg 120

tctggaaggc agatgggtacc cctatcactc aggggtgtgga gactaccag cctttcaaac 180

agaacaacaa gtacatggct accagctacc tgcttttgac agcaaaagca tgggagactc 240

atagcaatta cagctgccag gtcactcacg aagagaacac tgtggagaag agtttgtccc 300

gtgctgagtg ttcc 314

<210> 14

<211> 105

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 14

Asp Gln Pro Lys Ala Thr Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

1 5 10 15

Glu Glu Leu Lys Thr Asp Lys Ala Thr Leu Val Cys Met Val Thr Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Val Met Thr Val Val Trp Lys Ala Asp Gly Thr Pro

35 40 45

Ile Thr Gln Gly Val Glu Thr Thr Gln Pro Phe Lys Gln Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Met Ala Thr Ser Tyr Leu Leu Leu Thr Ala Lys Ala Trp Glu Thr

65 70 75 80

His Ser Asn Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Glu Asn Thr Val Glu

85 90 95

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Glu Cys Ser

100 105

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 15

gcatggccta gagataacaa gac

23

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 16
ggccttggat aacctcagga tac 23
<210> 17
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"
<400>
> 17
tccatcccaa tagatctcat tccttccc 28
<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 18
ccctgtcaag tctccaaggt tg 22
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 19
cactgtggcc caaggatcac 20

<210> 20
<211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"
 <400> 20
 cactctgccc agggagtgtc tgg 23
 <210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 21
 gcatggccta gagataaca gactg 25
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 22
 gtgctcttcc cttgggaga 19
 <210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"
 <400> 23
 tccatcccaa tagagcgatc gca 23

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 24

ggtggagagg ctattcggc

19

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 25

gaacacggcg gcatcag

17

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 26

tgggcacaac agacaatcgg ctg

23

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"
 <400> 27
 agctgaatgg aaacaaggca a 21
 <210> 28
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"
 <400> 28
 ggagacaatg cccagtga 19
 <210> 29
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

probe"
 <400> 29
 tgacatgaac catctgtttc tctctcgaca a 31
 <210> 30
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"
 <400>
 > 30
 ccaccgccaa gttgacctc 19
 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 31

tgaaggacta aggcccagga tag 23

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 32

agtacagcaa gggcccagcc t 21

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 33

tggctcagtg acaagagtc 19

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 34

ccagggacac agcctttgc 19

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 35

tgcattgcag agaccagga cc

22

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 36

tgcgccgat cttagcc

17

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 37

acgagcgggt tcggccatt c

21

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 38
 ttgaccgatt ccttgagg 18
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 39
 tgtcgggagt acacaaatcg 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 40
 gggcgtcggg ttccactatc 20
 <210> 41
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"
 <400> 41
 ccgtctggac cgatggctgt gt 22
 <210> 42
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 42

cgacgtctgt cgagaagttt ctg 23

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400>

> 43

cagccctcc tacatcgaa 19

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 44

agttcgacag cgtgtccgac ctga 24

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 45

aacaaccgag ctccaggtgt 20

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 46

agggcagcct tgtctcaa 19

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 47

cctgccagat tctcaggctc cctg 24

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 48

ggaggtcagg aatgaggac 20

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 49

cacttgctca ctgcaaaagc a 21

<210> 50

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 50

tgtgggattt tggaattcta tctcactgat aggaaag 37

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 51

gcagagagga ttcaagagct gg 22

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 52

tttttgcaat gcttcacctg a 21

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"
<400> 53
caggtgtctg tattggaggt caatggca 28
<210> 54
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 54
gatttgctga gggcagggt 19
<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 55
ccccaagtct gatccttcct t 21
<210> 56
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"
<400>
> 56
ccttcatact cttgcatcct cccttctcca 30
<210> 57
<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 57

gctgaccaac gatgcctaa 20

<210> 58

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 58

taagcgccac actgcacct 19

<210> 59

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 59

ttccttctct tctgtgactc aattatttgt ggaca 35

<210> 60

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 60

aactgctgat gcactgggc 19

<210> 61

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 61

tgaatgcatg gaggtagcc

19

<210> 62

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 62

tctcctttgc agtggcctaa ttagctgagt ca

32

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 63

ccctgggtgaa gcatgtttgc

20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 64

tgtggcctgt ctgccttag 20

<210> 65

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 65

ccaagcagga ggtgctcagt tcccaa 26

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 66

gggacaggtg aaggcctat c 21

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 67

tggccacag gatgcagttg 20

<210> 68

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 68

cgcacctgta tctaaccagt cccagcatc 29

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400>

> 69

cacacctaga ccccggaagt c 21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 70

tcgctttgcc agttgattct c 21

<210> 71

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 71

tccacactgt cggctgggag ctca 24

<210> 72
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 72
 cgcttcaatg acccaacca 19
 <210> 73
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 73
 tggtgaaacg taatcccaa tg 22
 <210> 74
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"
 <400> 74
 ctcccaccag gtgccacatg ca 22
 <210> 75
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 75
 gggctacttg aggaccttgc t 21
 <210> 76
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 76
 gacagccctt acagagtttg gaa 23
 <210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"
 <400> 77
 cagggcctcc atcccaggca 20
 <210> 78
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 78
 agtgcaaaca gcaagatgag atct 24
 <210> 79
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 79

ggcgcgtgagc agaaaacaa 19

<210> 80

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 80

agaccaccaa gaaggcccag agtgacc 27

<210> 81

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 81

aagaccagga gctctgccta agt 23

<210> 82

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400>

> 82

cccatcacga actgaagttg ag 22

<210> 83

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 83

ccccagtgtg tgaatcactc taccctcc 28

<210> 84

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 84

cccttcatga tgctttgtca tc 22

<210> 85

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 85

gtagtggcaa aggcagattc ct 22

<210> 86

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 86

ccttcactcc ccgaatgccc tcc 23

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 87

gccctgctcc agtcttattc c 21

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 88

ctgcgtctgg gctttgct 18

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 89

ccacagatcc caagttgagc ctgc 24

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 90
gtgagcggta ccctggaatc 20
<210> 91
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 91
agcctcgtct tcggtcagga c 21
<210> 92
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"
<400> 92
tgaacgattc tctgggtcca cc 22
<210> 93
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 93
cctgagccag gatggaatga ag 22
<210> 94
<211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 94
 ggccgtgatt taagaggttg ttag 24
 <210> 95
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"
 <400>
 > 95
 actgtggacc ccagataatt cccctg 26
 <210> 96
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 96
 gaggcagtg gcagaatctt g 21
 <210> 97
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 97

ggcagggagc attggtaga

19

<210> 98

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 98

tactgaaatc tcagcctccc aggc

24

<210> 99

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 99

tggctccagc tcaggaaav

19

<210> 100

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 100

cccgggagtt acagtaatag tca

23

<210> 101

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"
<400> 101
cacagcttcc ttgaccatca ctggg 25
<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 102
ccagcccacc caattatgct a 21
<210> 103
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 103
gcgttttaggg ccaggtacaa at 22
<210> 104
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"
<400> 104
tggatctgtc aaacactttc agagca 26
<210> 105
<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 105

gaggctgcag ggatgtaac 19

<210> 106

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 106

cccattccag gtccaattct ca 22

<210> 107

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 107

tttgtaaagt gcataacaca gaccctga 28

<210> 108

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 108

gggtacaatg agacaagaat caga 24

<210> 109

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 109

gaaaggcaaa cacaagtcac agatg 25

<210> 110

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 110

tcagccctct ggaatgtaag gatca 25

<210> 111

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 111

gctgcatctt ctcaagtctt taagt 25

<210> 112

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 112

gggaaccagt caggaactca tac 23

<210> 113

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"

<400> 113

taagcagacc tatgcatcgc tca 23

<210> 114

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 114

gtgctccttg ttcccttcac ag 22

<210> 115

<211>

> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 115

ctgaagcatc tgcacatca aatc 24

<210> 116

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 probe"
 <400> 116
 ccaccacat gtgccgtgt g 21
 <210> 117
 <211> 100
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <400> 117
 ccctattcac tgagttctgg aagctctgct atttccatga tcgttcacac tgaccctgt 60
 tgatcttacc ggtaccgaag ttctattcc gaagttccta 100
 <210> 118
 <211> 100
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <400> 118
 ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt ggcgcgccga tgtacatcag 60

ttcagttctgg aaaggtggaa cagctccagg tgaaggcagg 100
 <210> 119
 <211> 150
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 119

ctctacgggt gatgttcac taaggtgaca ggagtcagtg agggcttctc aagctttatc	60
tatgtcgggt gcggagaaag aggtaatgaa atggcactcg agccctgctg gtgccttctg	120
ttgtatccac gccttcagta gatttgatga	150

<210> 120

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 120

gagtttttcc ctttctgtc tgcgaaggc taaggtctaa gcctgtctgg tcacactagg	60
taaagaattt ctttcttctc tagatgcttt gtctcatttc	100

<210> 121

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 121

tatgtcactg gaatttagag tagtgtgtgg aatgtcttgg caacctggac acgcgtcctg	60
---	----

gcacccagtg agaaagtggc cctgaggagg aggctcatag	100
---	-----

<210> 122

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 122

agcagccgac atttagcaaa gaggattgga aaatgaaccc ccccttaaaa tacagttaaa	60
---	----

cacagaggag ggagcaaacc ggtataactt cgtataatgt 100

<210> 123

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 123

atgctatacg aagttatgtc gacctcgagg gggggcccg taccatctat gtcgggtgcg 60

gagaaaggag taatgaaatg gtctcattcc ttccctgtct caaggcataa tggttcaata 120

tgcacctgta 130

<210> 124

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 124

ttctctccaa gacttgaggt gctttttgtt gtatactttc cttttctgta ttctgcttca 60

tacctatact ggtaccgaag ttctatttcc gaagttccta 100

<210> 125

<211> 140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 125

ttctctagaa agtataggaa cttctaggg ttccaccggt ggcgcgcctg ccatttcatt 60

acctctttct ccgcaccga catagataag ctttgattg gattcagtga gcaagaattc 120

acaaacacaa tggacttatac 140

<210> 126

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 126

ttctctccaa gacttgaggt gctttttggt gtatactttc cttttctgta ttctgcttca 60

tacctatact ggtaccgaag ttcctattcc gaagttccta 100

<210> 127

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 127

ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg ttccaccggt ggcgcgcccc cctgctggtg 60

ccctttgttg tatccacgcc ttcagtagat ttgatgatgc 100

<210> 128

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 128

ttctctccaa gacttgaggt gctttttggt gtatactttc cttttctgta ttctgcttca 60

tacctatact ggtaccgaag ttcctattcc gaagttccta 100

<210> 129

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 129

ttctctagaa agtataggaa ctctctaggg ttccaccggt ggcgcgccga tgtacatcag 60

ttcagtcctgg aaaggtggaa cagctccagg tgaaggcagg 100

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 130

cgacctgatg cagctctcgg 20

<210> 131

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 131

cacyagtgtg gccttggttg cttg 24

<210> 132

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 132

caccagtgtg gccttgtag tctc 24

<210> 133

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 133

cccatgtact ctgcgttgat accactgctt 30

<210> 134

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 134

gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctaagcag tggtatcaac gcagagt 57

<210> 135

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 135

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcagagga gggcggaac agagtg 56

<210> 136

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 136

acactctttc cctacacgac gctcttccga tctaagggtg aaacagggtg actgatg 57

<210> 137

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> modified_base

<222> (30)..(35)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 137

aatgatacgg cgaccaccga gatctacacn mnnnnacact ctttcctac acgacgtct 60

tccgatc 67

<210> 138

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> modified_base

<222> (25)..(29)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 138

caagcagaag acggcatacg agatnnnnng tgactggagt tcagacgtgt gctcttccga 60

tct 63

<210> 139

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 139

gtacatcttg tcttcaacgt 20

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 140

gtccataatt aatgtagtta c 21

<210> 141

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 141

aagcagtggg atcaacgcag agtacat 27